

Effekte von Lipiden
und lipophilen Antioxidantien:
In-vivo und *in-vitro* Untersuchungen

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Silke Gisela De Spirt

aus Würselen

März 2008

Aus dem Institut für Biochemie und Molekularbiologie I
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Gedruckt mit der Genehmigung der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referent: Prof. Dr. Wilhelm Stahl

Koreferent: Prof. Dr. Claudia Staudt

Tag der mündlichen Prüfung: 06.05.2008

meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Nahrungsergänzungsmittel und Functional Foods	1
1.2	Die Haut	3
1.2.1	Anatomie der menschlichen Haut	3
1.2.2	Funktion der Haut	4
1.2.3	Hautalterung	5
1.3	Mehrfach ungesättigte Fettsäuren; ω -6 und ω -3 Fettsäuren	7
1.3.1	Definitionen, Vorkommen, Stoffwechsel der Fettsäuren	7
1.3.2	Funktionen von PUFAs	12
1.3.2.1	Eicosanoide	12
1.3.2.2	Eicosanoide der Haut	13
1.3.2.3	Weitere Funktionen der PUFAs	14
1.4	Hautschädigung durch UV-Licht - Prävention	15
1.4.1	Hautschädigung durch UV-Licht	15
1.4.2	Sonnenschutz	19
1.4.3	Carotinoide: Struktur und Vorkommen	20
1.4.4	Eigenschaften von Carotinoiden	22
1.4.5	Die zelluläre Kommunikation über Gap Junctions	25
1.4.5.1	Struktur und Funktionen von Gap Junctions und Adhäsionsproteinen	25
1.4.5.2	Gap Junctions und Carotinoide	28
2	Ziel der Arbeit	30

3	Material und Methoden	31
3.1	Chemikalien	31
3.1.1	Verwendete Carotinoide	33
3.2	Geräte	34
3.3	Analytik Fettsäuren	39
3.3.1	Fettextraktion aus biologischem Material: Plasma, Erythrozyten und Cerumen	39
3.3.2	Transmethylierung der Fettsäuren	39
3.3.3	Gaschromatographie- Flammenionisationdetektion	40
3.3.4	Gaschromatographie- Massenspektrometrie (GC-MS)	41
3.3.5	Probennahme Blut und Cerumen	41
3.4	Interventionstudien	42
3.4.1	Bestimmung des Fettsäuremusters in Plasma, Erythrozyten und Cerumen nach Supplementierung mit Fischölkapseln	42
3.4.2	Interventionsstudie I: Effekte der oralen Applikation von Leinsamenöl und Borretschöl auf die Haut Interventionsstudie II: Effekte der oralen Applikation von Leinsamenöl und Distelöl auf die Haut	44
3.4.3	Blutuntersuchungen Interventionsstudien	46
3.4.3.1	Bestimmung der Fettsäuremuster in Plasma und Erythrozyten	46
3.4.3.2	Bestimmung der Triglyceride	46
3.4.3.3	HPLC-Analytik der Carotinoide	47
3.4.4	Untersuchung der Oberflächenstruktur, der Hydratation, des transepidermalen Wasserverlustes und der Sensitivität der Haut	48
3.4.4.1	Bestimmung der Oberflächenstruktur der Haut mittels SELS- Verfahren	48
3.4.4.2	Messung der Hauthydratation und des transepidermalen Wasserverlustes	48
3.4.4.3	Nicotinat-Test	49

Inhaltsverzeichnis

3.5	Methoden Zellkultur	50
3.5.1	Allgemeine Zellkultur	50
3.5.1.1	Zelltyp	50
3.5.1.2	Stammhaltung und Anzucht der Zellen	50
3.5.1.3	Einfrieren und Auftauen der Zellen	50
3.5.1.4	Inkubationsbedingungen und Bestrahlung der Zellen	51
3.5.2	Proteinbestimmung	51
3.5.3	Bestimmung der Zellviabilität SRB-Assay	52
3.5.4	Messung von DCF als Marker für die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies	53
3.5.5	Bestimmung der Lipidperoxidation: Malondialdehyd (MDA)-Analytik	54
3.5.5.1	Probenvorbereitung	54
3.5.5.2	Probenaufarbeitung	54
3.5.5.3	HPLC-Bedingungen	55
3.5.6	Bestimmung der Zell- Zell- Kommunikation über Gap Junctions	55
3.5.7	Denaturierende Polyacrylamid- Gelelektrophorese (SDS-PAGE) und immunologischer Nachweis von Proteinen (Western Blot)	58
3.5.7.1	Probenvorbereitung	58
3.5.7.2	SDS-Polyacrylamid- Gelelektrophorese	59
3.5.7.3	Western Blot (Semi-Dry-Blot)	59
3.5.7.4	Immunologischer Nachweis der Proteine	60
3.5.8	Immunozytochemischer Nachweis von Cx43, N-Cadherin und Nrf2	61
3.5.8.1	Probenvorbereitung Cx43 und N-Cadherin	61
3.5.8.2	Probenvorbereitung Nrf2	62
3.5.8.3	Zellkernfärbung, Fixierung und Auswertung der Proben	62
3.6	Statistik	63

4	Ergebnisse Interventionsstudien	64
4.1	Analyse von mehrfach ungesättigten Fettsäuren (PUFAs) in Humanproben	64
4.1.1	Fettsäuremuster in Plasma, Erythrozyten und Cerumen nach Supplementierung mit Fischölkapseln	65
4.2	Interventionsstudie I: Effekte von Leinsamen- und Borretschöl auf Struktur und Funktion der Haut nach oraler Applikation	71
4.2.1	Blutuntersuchungen	74
4.2.1.1	Fettsäuremuster im Plasma nach Gabe von Leinsamen- und Borretschöl	74
4.2.1.2	Fettsäuremuster in Erythrozyten nach Gabe von Leinsamen- und Borretschöl	80
4.2.1.3	Bestimmung der Triglyceridkonzentration im Plasma	85
4.2.2	Effekte der Supplementierung mit Leinsamen- und Borretschöl auf Struktur und Funktion der Haut	87
4.2.2.1	Analyse der Oberflächenstruktur der Haut mit dem SELS- Verfahren (Surface evaluation of living skin)	87
4.2.2.2	Messung der Hauthydration	88
4.2.2.3	Messung der Hautsensitivität	88
4.2.3	Zusammenfassung der Ergebnisse der Interventionsstudie I	91
4.3	Interventionsstudie II: Effekte von Leinsamen- und Distelöl auf Struktur und Funktion der Haut nach oraler Applikation	92
4.3.1	Blutuntersuchungen	94
4.3.1.1	Fettsäuremuster in Plasma und Erythrozyten nach Gabe von Leinsamen- und Distelöl	94
4.3.1.2	Tocopherol-, Carotinoid- und Retinolkonzentrationen im Plasma	95
4.3.2	Effekte der Supplementierung mit Leinsamen- und Distelöl auf Struktur und Funktion der Haut	97
4.3.2.1	Analyse der Oberflächenstruktur der Haut mit dem SELS-Verfahren	97
4.3.2.2	Messung der Hauthydration	97

4.3.2.3	Messung der Sensitivität	98
4.3.3	Interventionsstudie II: Zusammenfassung der Ergebnisse	98
5	Diskussion Interventionsstudien	100
5.1	Bestimmung der Bioverfügbarkeit langkettiger ungesättigter Fettsäuren	100
5.1.1	Fettsäuremuster in Plasma, Erythrozyten und Cerumen nach Supplementierung mit Fischölkapseln	100
5.1.2	Fettsäuremuster in Plasma und Erythrozyten nach Gabe von PUFA-reichen Pflanzenölen	103
5.1.2.1	Interventionsstudie I: Fettsäuremuster in Plasma und Erythrozyten nach Gabe von Leinsamen- oder Borretschöl	103
5.1.2.2	Interventionsstudie II: Fettsäuremuster in Plasma und Erythrozyten nach Gabe von Leinsamen- oder Distelöl	106
5.1.2.3	Schlussfolgerung	107
5.1.3	Bestimmung der Tocopherol-, Carotinoid- und Retinolkonzentrationen im Plasma	107
5.2	Effekte der Supplementierung mit Leinsamen- Borretsch- oder Distelöl auf Struktur und Funktion der Haut	108
5.2.1	Einfluss der Supplementierung mit Leinsamenöl, Borretschöl oder Distelöl auf die Hydratation (Barrierefunktion) und Oberflächenstruktur des Stratum Corneums	109
5.2.2	Einfluss der Supplementierung mit Leinsamenöl, Borretschöl oder Distelöl auf die Sensitivität der Haut	111
6	Wirkungen von UV-A Bestrahlung auf humane dermale Hautfibroblasten	116
6.1	Carotinoide und UV-A Strahlung: Untersuchungen an humanen Hautfibroblasten	116
6.1.1	Zellviabilität: SRB Assay	116
6.1.1.1	Bestrahlung von humanen Hautfibroblasten	117

6.1.1.2	Inkubation von HdF mit Carotinoiden	118
6.1.1.3	Viabilität und Morphologie von HdF nach Präinkubation mit Carotinoiden und UV-A Bestrahlung	118
6.1.2	Messung von DCF als Marker für die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies in HdF unter UV-A- Bestrahlung	122
6.1.2.1	Bildung von DCF in HdF nach UV-A Bestrahlung	123
6.1.2.2	Einfluss von Carotinoiden auf die Bildung von ROS in HdF nach UV-A Bestrahlung	123
6.1.3	Messung der Expression von Hämoxxygenase-1 (HO-1) und subzelluläre Lokalisation von Nrf2	125
6.1.3.1	Bestimmung der Expression von HO-1	127
6.1.3.2	Subzelluläre Lokalisation von Nrf2	
6.1.4	Bestimmung von Malondialdehyd (MDA) als Marker der Lipidperoxidation	131
6.1.5	Zell- Zell- Kommunikation über Gap Junctions (GJC) nach UV-A Bestrahlung	132
6.1.5.1	Farbstoff- Transfer- Assay	132
6.1.5.2	Expression und Phosphorylierungsmuster von Connexin43	133
6.1.5.3	Subzelluläre Lokalisation von Connexin43	137
6.1.6	Einfluss von UV-A Bestrahlung auf Zell- Zell- Ädhäsionsmoleküle	139
6.1.6.1	Expression von N-Cadherin und β -Catenin	139
6.1.6.2	Einfluss der UV-A Strahlung auf die subzelluläre Lokalisation von N-Cadherin	141
6.1.7	Einfluss der Carotinoide Astaxanthin und Canthaxanthin auf die GJC, sowie N-Cadherin und β -Catenin Expression nach UV-A Bestrahlung	143
7	Diskussion Wirkungen von UV-A Strahlen auf humane dermale Fibroblasten	146
7.1	Wirkungen von UV-A Bestrahlung auf humanen dermalen Hautfibroblasten	147

7.2	Carotinoide und UV-A Strahlung: Untersuchungen an humanen Hautfibroblasten	148
7.3	Zell- Zell- Kommunikation über Gap Junctions (GJC) nach UV-A Bestrahlung	149
	Zusammenfassung	155
	Summary	157
	Literatur	159
	Danksagung	176
	Anhang	178

Tabellen

Tabelle 1.1	Nomenklatur und Charakteristik der für den Menschen bedeutsamen Fettsäuren
Tabelle 1.2	Wichtige Eicosanoide und ihre Wirkungen beim Menschen.
Tabelle 3.1	Extinktionskoeffizienten der Carotinoide
Tabelle 3.2	GC-Bedingungen: Fischölstudie
Tabelle 3.3	Zusammensetzung der in den Interventionsstudien verwendeten Öle
Tabelle 3.4	Probanden in Interventionsstudie I; unterteilt in verschiedene Altersgruppen
Tabelle 3.5	Probanden der Interventionsstudie II; unterteilt in verschiedene Altersgruppen
Tabelle 3.6	GC-Bedingungen Interventionsstudien
Tabelle 3.7	HPLC-Bedingungen Carotinoidanalytik
Tabelle 3.8	Verdünnung der Probenlysate zur Proteinbestimmung nach Bradford
Tabelle 3.9	HPLC-Bedingungen MDA-Bestimmung
Tabelle 3.10	Zusammensetzung Puffer zur Probenaufarbeitung für die SDS-Gelelektrophorese
Tabelle 3.11	Zusammensetzung von Trenngel und Sammelgel
Tabelle 3.12	Puffer für den Western Blot
Tabelle 3.13	Verdünnung der verwendeten Antikörper
Tabelle 3.14	Konzentrationen der Antikörper für den immunozytochemischen Nachweis
Tabelle 3.15	Optimale Absorptions-/Emissionswellenlängen von DAPI und Alexa Fluor 546 bzw. 488
Tabelle 4.1	Fischölstudie: Fettsäuremuster im Plasma während 12 wöchiger Supplementierung mit Fischölkapseln
Tabelle 4.2	Fischölstudie: Fettsäuremuster der Erythrozyten während 12 wöchiger Supplementierung mit Fischölkapseln
Tabelle 4.3	Fettsäuren in Cerumen: identifiziert durch massenspektrometrische Untersuchung
Tabelle 4.4	Interventionsstudie I: Fettsäuremuster der verwendeten Supplemente
Tabelle 4.5	Interventionsstudie I: Fettsäuremusters im Plasma (Auswertung 1; Zusammenfassung)
Tabelle 4.6	Interventionsstudie I: Fettsäuremusters im Plasma (Auswertung 1)
Tabelle 4.7	Interventionsstudie I: Fettsäuremusters im Plasma (Auswertung 2)

Tabelle 4.8	Interventionsstudie I: Fettsäuremusters der Erythrozyten (Auswertung 1; Zusammenfassung)
Tabelle 4.9	Interventionsstudie I: Fettsäuremusters der Erythrozyten (Auswertung 1)
Tabelle 4.10	Interventionsstudie I: Fettsäuremusters der Erythrozyten (Auswertung 2)
Tabelle 4.11	Interventionsstudie I: Konzentration der Triglyceride [mg/dl] in der ALA-, GLA- und Placebogruppe
Tabelle 4.12	Interventionsstudie I: Tocopherol-, Carotinoid- und Retinolkonzentrationen im Plasma [nmol/ml]
Tabelle 4.13	Interventionsstudie I: Änderung der Oberflächenstruktur, Hydratation und Sensitivität der Haut in der ALA-Gruppe (Leinsamenöl)
Tabelle 4.14	Interventionsstudie I: Änderung der Oberflächenstruktur, Hydratation und Sensitivität der Haut in der GLA-Gruppe (Borretschöl)
Tabelle 4.15	Interventionsstudie I: Änderung der Oberflächenstruktur, Hydratation und Sensitivität der Haut in der Placebo-Gruppe
Tabelle 4.16	Interventionsstudie II: Fettsäuremuster der verwendeten Supplemente
Tabelle 4.17	Interventionsstudie II: Fettsäuremuster im Plasma
Tabelle 4.18	Interventionsstudie II: Carotinoid-, Tocopherol- und Retinolkonzentrationen im Plasma
Tabelle 4.19	Interventionsstudie II: Änderung der Oberflächenstruktur, Hydratation und Sensitivität der Haut
Tabelle 5.1	Gegenüberstellung der Ergebnisse der Hautanalyse aus der Interventionsstudie I und II
Tabelle 6.1	Viabilität der HdF nach Inkubation mit Carotinoiden für 24h (10 µmol/L)
Tabelle 6.2	Viabilität von HdF nach UV-A Bestrahlung und Präinkubation mit Carotinoide (Postinkubation 24)
Tabelle 6.3	Viabilität von HdF nach UV-A Bestrahlung und Präinkubation mit Carotinoiden, Postinkubation 3h und 6h
Tabelle 6.4	Effekt von UV-A Bestrahlung (10 J/cm ²) auf die GJC in HdF
Tabelle 6.5	Phosphorylierungsmuster von Cx43 nach UV-A Bestrahlung zu unterschiedlichen Postinkubationszeiten
Tabelle 6.6	Effekt von UV-A Bestrahlung auf GJC in HdF nach Präinkubation mit Astaxanthin und Canthaxanthin

- Tabelle A.1** Verhältnis der Intensitäten der Phosphorylierungsbanden von Connexin43 im Western Blot nach UV-A Bestrahlung und Präinkubation mit Astaxanthin und Canthaxanthin 3h nach der Bestrahlung (10 J/cm²)
- Tabelle A.2** Verhältnis der Intensitäten der Phosphorylierungsbanden von Connexin43 im Western Blot nach UV-A Bestrahlung und Präinkubation mit Astaxanthin und Canthaxanthin 6h nach der Bestrahlung (10 J/cm²)
- Tabelle A.3** Verhältnis der Intensitäten der Phosphorylierungsbanden von Connexin43 im Western Blot nach UV-A Bestrahlung und Präinkubation mit Astaxanthin und Canthaxanthin 24h nach der Bestrahlung (10 J/cm²)

Abbildungen

- Abb. 1-1** Schematische Darstellung der Haut
- Abb. 1-2** Beispiel für eine ω -6 Fettsäure (Linolsäure) und eine ω -3 Fettsäure (α -Linolensäure)
- Abb. 1-3** Synthese der ω -6 Fettsäuren im menschlichen Körper
- Abb. 1-4** Synthese der ω -3 Fettsäuren im menschlichen Körper
- Abb. 1-5** Metabolismus essentieller Fettsäuren zu Leukotrienen und Prostaglandinen
- Abb. 1-6** Modell für die transkriptionelle Aktivierung des HO-1 Genes
- Abb. 1-7** Strukturen von in der Nahrung und im Plasma der Menschen vorkommenden Carotinoiden
- Abb. 1-8** Reaktionen von Carotinoiden
- Abb. 1-9** Schematische Darstellung der transmembranen Struktur von Connexinen
- Abb. 1-10** Der Cadherin- Catenin- Komplex
- Abb. 3-1** Strukturformeln der verwendeten Carotinoide
- Abb. 3-2** GC-Chromatogramm des Fettsäuremethylester (FAME) Standards
- Abb. 3-3** Messung der Oberflächenstruktur mit dem SELS-Verfahren
- Abb. 3-4** Nicotinattest
- Abb. 3-5** Spektren der Bestrahlungssapparatur Biosun
- Abb. 3-6** Struktur von Sulforhodamin B
- Abb. 3-7** Reaktion von Malondialdehyd mit Thiobarbitursäure
- Abb. 3-8** Struktur des Fluoreszenzfarbstoffes Lucifer Yellow
- Abb. 3-9** Fluoreszenz-Farbstoff-Assay
- Abb. 4-1** Fischölstudie: Veränderung des Anteils von EPA und DHA bezogen auf die Gesamtfettsäure
- Abb. 4-2** GC-Chromatogramme der Fettsäuremethylester einer Cerumenprobe
- Abb. 4-3** GC-Chromatogramme der Fettsäuremethylester des Leinsamen- (A), Borretschöl (B) und Placebo (C)
- Abb. 4-4** Typisches GC-Chromatogramm der Fettsäuremethylester zur Bestimmung des Fettsäuremusters einer Plasmprobe
- Abb. 4-5** Interventionsstudie I: Änderung des prozentuale Anteiles an α -Linolensäure (A) und γ -Linolensäure (B) im Plasma
- Abb. 4-6** Typisches GC-Chromatogramm der Fettsäuremethylester zur Bestimmung des Fettsäuremusters einer Erythrozytenprobe

- Abb. 4-7** Beispiel der Veränderung des Hautoberflächenprofils analysiert mit dem SELS-Verfahren
- Abb. 6-1** Viabilität von HdF nach Bestrahlung mit UV-A unterschiedlicher Dosis
- Abb. 6-2** Morphologische Veränderung in HdF nach UV-A Bestrahlung und Präinkubation mit Carotinoiden
- Abb. 6-3** Fluoreszenz von DCF in HdF nach der Bestrahlung mit UV-A
- Abb. 6-4** Bildung von DCF in HdF nach UV-A Bestrahlung und Präinkubation mit Carotinoiden
- Abb. 6-5** HO-1 nach UV-A Bestrahlung und Präinkubation mit Astaxanthin und Canthaxanthin (Western Blot)
- Abb. 6-6** Expression von HO-1 nach UV-A Bestrahlung (10 J/cm²) und Präinkubation mit Carotinoiden
- Abb. 6-7** Lokalisation von Nrf2 nach UV-A Bestrahlung und Präinkubation mit Carotinoiden (3h Postinkubationszeit)
- Abb. 6-8** Lokalisation von Nrf2 nach UV-A Bestrahlung und Präinkubation mit Carotinoiden (6h Postinkubationszeit)
- Abb. 6-9** Lokalisation von Nrf2 nach UV-A Bestrahlung und Präinkubation mit Carotinoiden (24h Postinkubationszeit)
- Abb. 6-10** MDA nach UV-A Bestrahlung und Präinkubation mit Carotinoiden
- Abb. 6-11** Effekt von UV-A Bestrahlung auf GJC in HdF
- Abb. 6-12** Beispiel: typisches Phosphorylierungsmuster von Cx43 in HdF (Western Blot)
- Abb. 6-13** Effekt von UV-A Bestrahlung (10 J/cm²) auf Expression und Phosphorylierungsmuster von Cx43 in HdF
- Abb. 6-14** Expression von Connexin 43 in HdF nach UV-A Bestrahlung
- Abb. 6-15** Phosphorylierungsmuster von Connexin 43
- Abb. 6-16** Subzelluläre Verteilung von Cx43 in unbestrahlte und bestrahlte Zellen (UV-A) zu verschiedenen Postinkubationszeiten
- Abb. 6-17** Subzelluläre Verteilung von Cx43 in unbestrahlte und bestrahlte Zellen (UV-A) 24h nach der Bestrahlung
- Abb. 6-18** N-Cadherin nach UV-A Bestrahlung (Western Blot)
- Abb. 6-19** β -Catenin nach UV-A Bestrahlung (Western Blot)
- Abb. 6-20** Expression von N-Cadherin in HdF nach UV-A Bestrahlung
- Abb. 6-21** Expression von β -Catenin in HdF nach UV-A Bestrahlung

- Abb. 6-22** Subzelluläre Verteilung von N-Cadherin in unbestrahlten und bestrahlten Zellen (UV-A) zu verschiedenen Postinkubationszeiten
- Abb. 6-23** Subzelluläre Verteilung von N-Cadherin in unbestrahlten und bestrahlten Zellen (UV-A) (24h Postinkubation)
- Abb. A-1** Effekt von UV-A Bestrahlung (10 J/cm²) und Präinkubation mit Astaxanthin und Canthaxanthin auf die Expression und das Phosphorylierungsmuster von Cx43 in HdF
- Abb. A-2** Expression von Connexin 43 in HdF nach Präinkubation mit Astaxanthin und Canthaxanthin und UV-A Bestrahlung (10 J/cm²)
- Abb. A-3** Subzellulären Verteilung von Cx43; unbestrahlte und bestrahlte mit Astaxanthin präinkubierte Zellen (UV-A 10 J/cm²) zu verschiedenen Postinkubationszeiten
- Abb. A-4** Subzellulären Verteilung von Cx43; unbestrahlte und bestrahlte mit Canthaxanthin präinkubierte Zellen (UV-A 10 J/cm²) zu verschiedenen Postinkubationszeiten
- Abb. A-5** Effekt von UV-A Bestrahlung (10 J/cm²) und Präinkubation mit Astaxanthin und Canthaxanthin auf die Expression von N-Cadherin in HdF
- Abb. A-6** Expression von N-Cadherin in HdF nach Präinkubation mit Astaxanthin und Canthaxanthin und UV-A Bestrahlung (10 J/cm²)
- Abb. A-7** Effekt von UV-A Bestrahlung (10 J/cm²) und Präinkubation mit Astaxanthin und Canthaxanthin auf die Expression von β -Catenin in HdF
- Abb. A-8** Expression von β -Catenin in HdF nach Präinkubation mit Astaxanthin und Canthaxanthin und UV-A Bestrahlung (10 J/cm²)
- Abb. A-9** Subzellulären Verteilung von N-Cadherin, nach Inkubation mit den Carotinoiden Astaxanthin und Canthaxanthin im Vergleich zur Kontrolle
- Abb. A-10** Subzellulären Verteilung von N-Cadherin; unbestrahlte und bestrahlte mit Astaxanthin präinkubierte Zellen (UV-A) zu verschiedenen Postinkubationszeiten
- Abb. A-11** Verteilung von N-Cadherin; unbestrahlte und bestrahlte mit Canthaxanthin präinkubierte Zellen (UV-A) zu verschiedenen Postinkubationszeiten

Abkürzungsverzeichnis

15-OH DGLA	15- Hydroxydihomo- γ -linolensäure
AA	Arachidonsäure
ALA-Gruppe	α -Linolensäure- Gruppe (Probanden supplementiert mit Leinsamenöl)
AMG	Arzneimittelgesetz
AP	aktivierendes Protein
APS	Ammoniumpersulfat
ARE	antioxidant response element
AU	<i>arbitrary units</i> ; relative Masseinheit
BHT	Butylhydroxytoluol
COX	Cyclooxygenase
Cx	Connexin
DAPI	4',6'-Diamidino-2-Phenylindolhydrochlorid
DCF	Dichlorofluorescein
DCF-DA	Dichlorofluorescein-diacetat
DGE	Deutsche Gesellschaft der Ernährung
DHA	Docosahexaensäure
DHGLA	Dihomo- γ -linolensäure
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DPA	Docosapentaensäure
DTT	1,4-Dithiothreitol
EPA	Eicosapentaensäure
FAME	<i>Fatty Acid Methyl ester</i> (Fettsäuremethylester)
FBS	<i>Foetale bovine serum</i> (fötales Rinderserum)
FFAP	Free Fatty Acid Phase
FID	Flammenionisationsdetektor
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GC	Gaschromatographie
GJ	Gap Junction
GJC	Gap Junctional Communication (Zell- Zell- Kommunikation)
GLA-Gruppe	γ -Linolensäure- Gruppe (Probanden supplementiert mit Borretschöl)
HBSS	Hank's buffered saline

Abkürzungsverzeichnis

HdF	Humane dermale Fibroblasten
HO	Hämoxygenase
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
HRP	Horseradish- Peroxidase (Meerrettich-Peroxidase)
IL	Interleukin
KEAP	Kelch-like ECH associated protein
LA-Gruppe	Linolsäure- Gruppe, Probanden supplementiert mit Distelöl
LFGB	Lebensmittel- und Futtermittelgesetzbuch
LPS	Lipopolysaccharid
LT	Leukotrien
Maf	small musculoaponeurotic fibrosarcoma
MAPK	mitogen-activated protein kinase (mitogenaktivierte Proteinkinase)
MARE	Maf recognition element
MDA	Malondialdehyd
MeOH	Methanol
MMP	Matrix- Metalloproteinase
MS	Massenspektrometrie
MUFA	<i>monounsaturated fatty acids</i> (einfach ungesättigte Fettsäuren)
NfκB	nuclear factor κB
NO	Stickstoffmonoxid
Nrf2	NF-E2-related factor
PBS	Phosphat buffered saline (Phosphatpuffer)
PG	Prostaglandin
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
PUFA	<i>Polyunsaturated fatty acid</i> (mehrfach ungesättigte Fettsäuren)
RFU	<i>relative fluorescence units</i>
ROS	<i>reactive oxygen species</i> (reaktive Sauerstoff-Spezies)
SFA	<i>saturated fatty acid</i> (gesättigte Fettsäuren)
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SELS	Surface Evaluation of Living Skin
SRB	Sulforhodamine B
TBA	Thiobarbitursäure
TBS	TRIS buffered saline (Tris-gepufferte isotonische Salzlösung)

Abkürzungsverzeichnis

TBS-T	TRIS buffered saline + Tween (Tris-gepufferte isotonische Salzlösung mit 0,1% (v/v) TritonX 100)
TEMED	N, N, N-Tetramethylethylendiamin
TEWL	transepidermal water loss (transepidermaler Wasserverlust)
THF	Tetrahydrofuran
TNF- α	tumor necrosis factor alpha
TPA	12-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetat
TRIS	Trihydroxymethylammoniummethan
TX	Thromboxan
UV	Ultraviolett

1 Einleitung

1.1 Nahrungsergänzungsmittel und funktionelle Lebensmittel

Zahlreiche epidemiologische Studien haben gezeigt, dass eine erhöhte Zufuhr ausgewählter Mikro- und Makronährstoffe mit einem verminderten Risiko für bestimmte Krankheiten korreliert. Beispiele sind ω -3 Fettsäuren, die in Verbindung mit Prävention von koronaren Herzerkrankungen gebracht werden (siehe Abschnitt 1.3.2) oder Carotinoide, bei denen gemäß Studien, eine Korrelation zu einem verminderten Risiko an bestimmten Krebserkrankungen besteht (Abschnitt 1.4.1).

Diese Nährstoffe werden häufig als Nahrungsergänzungsmittel oder als Bestandteile in funktionellen Lebensmitteln (*Functional Foods*) in den Verkehr gebracht. *Functional Foods* sind Produkte, bei denen meist konventionelle Lebensmittel mit bestimmten Nährstoffen angereichert werden. Nährstoffe mit physiologischen Wirkungen werden auch *Nutraceutical* (Kurzform für nutritional pharmaceutical) genannt. Definiert ist dieser Begriff als eine Substanz oder eine Kombination von Substanzen, die aus Nahrungsmitteln stammen und deren Verzehr gesundheitliche Vorteile bringt [Colquhoun 2001]. In Anlehnung an diesem Begriff werden manche Nährstoffe auch als *Nutricosmetics* bezeichnet. Dies sind Nährstoffe, die wie Kosmetika das äußere Erscheinungsbild der Haut verändern sollen. Eine offizielle Definition für diesen Begriff gibt es bislang nicht. Produkte, die *Nutricosmetics* enthalten, versprechen bei regelmäßigem Konsum ein „besseres“ und „jüngeres“ Aussehen.

Die rechtliche Einordnung von Produkten, die *Nutraceuticals* oder *Nutricosmetics* enthalten, ist oft schwierig, da der Übergang zwischen Lebensmittel und Arzneimittel oft fließend ist. Nahrungsergänzungsmittel oder *Functional Foods* unterliegen dem deutschen Lebensmittel- und Futtermittelgesetzbuch (LFGB) und seinen Verordnungen. Der Schutz des Verbrauchers vor einer möglichen Irreführung ist hier ein wichtiger Aspekt. Dieser wird in §11 Abs. 1 LFGB geregelt. Demnach ist es verboten, Lebensmittel unter irreführender Bezeichnung, Angabe oder Aufmachung gewerbsmäßig in den Verkehr zu bringen oder für Lebensmittel allgemein oder im Einzelfall mit irreführenden Darstellungen oder sonstigen Aussagen zu werben. Eine Irreführung liegt insbesondere dann vor, wenn einem Lebensmittel Wirkungen beigelegt werden, die ihm nach den Erkenntnissen der Wissenschaft nicht zukommen oder die wissenschaftlich nicht hinreichend gesichert sind [LFGB in der aktuellen Fassung]. Die Notwendigkeit für unabhängig wissenschaftliche Studien mit objektiven Methoden wird hier deutlich. Neben der Vermeidung einer möglichen Irreführung gemäß §11 Abs.1 LFGB darf

weiterhin gemäß Abs. 4 nicht der Anschein eines Arzneimittels gegeben sein. Ein Nährstoff ist auf jeden Fall dann kein Lebensmittel gemäß §2(2) LFGB, wenn es der Definition des §2 des Arzneimittelgesetzes (AMG) unterliegt. In diesem Falle ist der Begriff Nahrungsergänzungsmittel nicht mehr zulässig.

Nährstoffe, die zumeist in isolierter Form, als Arzneimittel in den Verkehr gebracht werden unterliegen dem deutschen Arzneimittelgesetz und bedürfen gesonderter Zulassungsverfahren. Für diese sind pharmakologische Wirkungsnachweise ebenfalls von Bedeutung. Die Prophylaxe oder Behandlung von pathologischen Zuständen stehen bei Arzneimittel im Vordergrund.

1.2 Die Haut

Bestimmte Nährstoffe wirken auf Bereiche der Haut, entsprechenden Zellen und Stoffwechselwege. In den nachfolgenden Abschnitten werden der Aufbau der Haut und die wichtigsten Funktionen beschrieben. Viele Produkte, die diese Nährstoffe enthalten, werden mit *anti-ageing*-Wirkungen beworben. Abschnitt 1.3.1 beschreibt die intrinsische Hautalterung. Auf die extrinsische Hautalterung wird in Abschnitt 1.4.1 eingegangen.

1.2.1 Anatomie der menschlichen Haut

Die Haut ist das größte Organ des Menschen mit einer durchschnittlichen Oberfläche von 1,8 m² und einem Gewicht von 8-12% des Körpergewichtes. Sie besteht aus 3 Hauptschichten, der Epidermis, dem Corium oder auch Dermis und dem subkutanen Fettgewebe (Subkutis). Ihr Aufbau ist in Abbildung 1-1 dargestellt.

Die Epidermis oder auch Oberhaut ist aus einem mehrschichtigen Plattenepithel aufgebaut. Dominierende Zellen sind die Keratinozyten (ca. 90%). Diese werden in der untersten Plattenepithelschicht gebildet. Von innen nach außen durchlaufen die Keratinozyten einen Reifungsprozess (Keratinisierungsprozess, Verhornung). Während dieses Prozesses werden die Keratinozyten flacher, der Wassergehalt nimmt ab und es kommt zu einem Verlust des Zellkernes und der Zellorganellen. In der obersten Schicht der Epidermis, dem Stratum corneum (Hornschicht), sind die Zellen verhornt und teilweise abgestorben. Diese Zellen werden als Korneozyten bezeichnet.

Weitere wichtige Zelltypen der Epidermis sind die Melanozyten (Pigmentzellen), die Langerhanszellen (dendritische Zellen zur Immunabwehr) und die Merkelzellen (Sinneszellen). Die Epidermis enthält keine Blutgefäße, so dass die Versorgung dieser Zellen nur durch Diffusion aus darunter liegenden Schichten erfolgen kann.

Die zweite Hauptschicht der Haut ist die Dermis oder auch Lederhaut bzw. Corium. Diese besteht hauptsächlich aus Bindegewebe, durchzogen von Lymphbahnen und Nervenzellen. Es dominieren hier Fibroblasten, welche Tropokollagene synthetisieren. Aus ihnen bilden sich die Kollagen-, Elastin- und Retikulinfasern. Diese Fasern sind in einer extrazellulären Matrix, bestehend aus einem Proteoglycan- Hyaluronat- Komplex, eingebettet. In der Dermis eingebettet sind auch die Follikel (Haarbalg), Talg-, Schweiß- und Duftdrüsen.

Unterhalb der Dermis befindet sich die Subkutis. Es handelt sich hierbei um ein lockeres, stark dehnbares Gewebe. Es besteht hauptsächlich aus Fettzellen, die je nach

Ernährungszustand unterschiedlich groß sind [Möller et al. 1995; Bucher, Wartenberg 1989; Kindl et al. 1998].

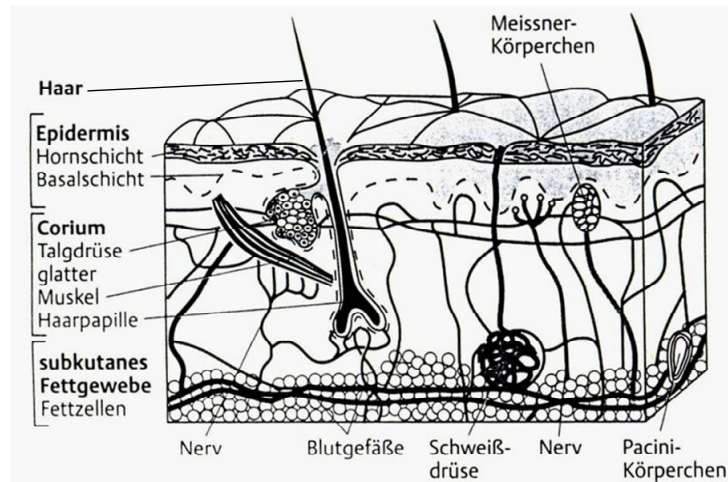


Abb. 1-1 Schematische Darstellung der Haut [Möller et al. 1995]

1.2.2 Funktion der Haut

Eine wichtige Aufgabe der Haut ist die Aufrechterhaltung der Barrierefunktion, die der Regulation des Wasserhaushaltes wie auch dem Schutz vor exogenen Noxen und pathogenen Keimen dient.

Zum Aufrechterhalten der Barrierefunktion sind die proteinreichen Korneozyten des Stratum corneums in eine lipidreiche interzelluläre Matrix eingebettet. Lipide der interzellulären Matrix sind vor allem Ceramide, freie Fettsäuren und Cholesterol [Proksch et al. 2006]. Gebildet werden Vorstufen dieser Lipide in Form von Lamellarkörpern in den Keratinozyten in tieferen Schichten der Epidermis. Es handelt sich hierbei um Phospholipide, Glucosylceramide, Sphingomyeline und Cholesterol. Beim Übergang der Zellen in das Stratum corneum werden die Lipide in den interzellulären Raum entleert [Möller et al. 1995]. Dieser Vorgang wird Desquamierung genannt. Die extrazellulären Lipide fungieren als Permeabilitäts-, antioxidative und antimikrobielle Barriere, die Korneozyten als UV- und mechanische Barriere. Die einzelnen Korneozyten sind durch Desmosome (Adhäsionsproteine) miteinander verbunden [Schürer 2002, Wertz 2000, Lee et al. 2006].

Ceramide sind die wichtigsten Lipide des Stratum corneums. Dies sind Sphingolipide, in denen Sphingosin amidartig mit einer Fettsäure verknüpft ist. Für die Lipidmatrix ist insbesondere das Ceramid 1 von Bedeutung, welches entscheidend zur Stabilität und Barrierefunktion des Stratum corneums beiträgt. Beim Ceramid 1 ist das Ceramidgerüst über die ω -Hydroxygruppe mit Linolsäure verestert, beim ernährungsbedingten Mangel an Linolsäure kann es zur Veresterung mit Ölsäure kommen. Folgen sind ein erhöhter

transepidermaler Wasserverlust und Verhornungsstörungen, da diese Ceramide weniger stabilisierend wirken. Topische Applikationen von Linolsäure oder γ -Linolensäure können den Mangel reduzieren [Feingold 2007; Hellmer Habilitationsschrift 2001].

Weitere charakteristische Lipide des Stratum corneums sind die freien Fettsäuren. Es handelt sich insbesondere um langkettige gesättigte Fettsäuren, deren wichtige Funktion die Aufrechterhaltung des pH-Wertes der Hautoberfläche ist. Optimal liegt dieser zwischen 5-5,5. Bei der Bildung der Lipidmatrix sind sie vermutlich mitverantwortlich für den korrekten Zusammenbau der Komponenten [Wertz 2000; Feingold 2007; Rawlings 2003].

Die Haut erfüllt auch Schutzfunktionen im Sinne der Immunabwehr. Eindringende exogene Noxen oder Erreger werden durch Immunzellen erkannt und bekämpft. Bis etwa 10% der Zellen können dem Immunsystem entstammen und als unspezifisch (Makrophagen) oder spezifisch agierende Zellen (verschiedene T- Lymphozyten) Fremdstoffe oder Keime absorbieren, transportieren oder eliminieren [Möller et al.1995]. Daran beteiligt sind auch Eicosanoide, die hormonähnlich den Stoffwechsel beeinflussen. Deren Vorstufen sind langkettige ungesättigte Fettsäuren (siehe Abschnitt 1.3.2.1).

Weitere Aufgaben der Haut sind, die Wahrnehmungsfunktionen durch Sinnesrezeptoren, die Wärmeregulierung durch Schweißdrüsen und periphere Ventilsysteme.

1.2.3 Hautalterung

Die menschliche Haut unterliegt wie alle anderen Organe einem Alterungsprozess. Dabei unterscheidet man zwischen der chronologischen oder auch intrinsischen endogenen Alterung, die hauptsächlich genetisch und rassespezifisch ist, und der von äußeren Faktoren verursachten vorzeitigen exogenen Hautalterung [Krämer et al. 2006]. Äußere Faktoren sind z.B. die Belastung durch Ultraviolette (UV)-Strahlung, aber auch Infrarotstrahlung, Ozon, Tabakrauch und Umwelttoxine spielen eine Rolle (siehe Kapitel 1.4.1) [Schroeder et al. 2006].

Der vollständige Mechanismus der Hautalterung ist nicht bekannt, einzelne Schritte konnte man jedoch schon aufschlüsseln. Bei der Regulation der intrinsischen Hautalterung geht man von einer hormonellen Steuerung aus [Makrantonaki Dissertation 2006].

Gealterte Haut zeichnet sich vor allem durch ein trockenes, fettarmes Erscheinungsbild aus. Sie ist stumpf, schlecht durchblutet, blass, schlaff, schuppig und dünn. Zusätzlich sind Anhangsgebilde zu erkennen. Die Haut ist mit mehr Falten durchzogen, ebenso treten kleine Angiome auf [Kindl et al. 1998]. Diese Veränderungen sind das Ergebnis einer reduzierten Stoffwechselaktivität der gealterten Haut. Morphologisch sind vor allem die Epidermis und

die Dermis betroffen. Insbesondere die trockene und rauhe Haut lassen sich auf Defizite im Stratum corneum der Epidermis zurückführen, die Abnahme der Ceramide ist charakteristisch [Tagami 2007]. Natürliche Feuchthaltefaktoren wie Glycerin und Hyaluronsäure nehmen ab, dadurch vermindert sich das Wasserbindevermögen, der Feuchtigkeitsverlust innerhalb der Epidermis erhöht sich. Weiteres Kennzeichen der Hautalterung ist die dünner werdende Epidermis, dies erfolgt insbesondere durch Atrophie der Stachelzellschicht, einer tiefer liegenden Schicht der Epidermis. Hauptaufgabe dieser Schicht ist die Versorgung der oberen Epidermiszellen mit Wasser, Sauerstoff und Nährstoffen. Diese Versorgung ist durch die Atrophie nicht mehr gewährleistet. Durch die Verringerung der Basalzellschicht, der untersten Schicht der Epidermis, geht der Zusammenhalt zur Dermis verloren. Diese Vorgänge bewirken die oben genannten charakteristischen Erscheinungsformen der gealterten Haut. Falten entstehen zusätzlich durch Veränderungen in der Dermis. Das Bindegewebe wird dabei durch verschiedene biochemische Vorgänge verstärkt abgebaut, zusätzlich nimmt die Anzahl der Fibroblasten ab, so dass wenig neues Bindegewebe gebildet wird.

1.3 Mehrfach ungesättigte Fettsäuren; ω -6 und ω -3 Fettsäuren

Mehrfach ungesättigte Fettsäuren (PUFAs) sind Nahrungsmittel, deren ausgewogene Zufuhr u.a. das Risiko für koronare Herzerkrankungen moduliert. Sie beeinflussen den Eicosanoidstoffwechsel und die Eigenschaften von Membranen. Öle, die mehrfach ungesättigte Fettsäuren enthalten, werden häufig als Nahrungsergänzungsmittel angeboten. Lipide sind am Aufbau des Stratum corneums beteiligt. Linolsäure, eine essentielle Fettsäure, ist hierbei von entscheidender Bedeutung (Abschnitt 1.2.2). Oftmals werden Lipide als ergänzende Therapie von entzündlichen Erkrankungen der Haut, wie Psoriasis oder Ekzemen (Abschnitt 1.3.2.2) eingesetzt.

1.3.1 Definitionen, Vorkommen, Stoffwechsel der Fettsäuren

Fettsäuren sind gesättigte oder ungesättigte Carbonsäuren unterschiedlicher Kettenlänge. Im menschlichen Körper liegen sie frei oder verestert vor. Als Ester sind sie zumeist mit Glycerol, Sphingosin oder Cholesterol gebunden.

Im Organismus haben Fettsäuren folgende Aufgaben:

- sie dienen der Energiegewinnung, Speicherung als Triacylglyceride
- sie sind Bausteine von Phospho- und Glycolipiden und somit Bestandteile von biologischen Membranen
- Fettsäuren und ihre Derivate sind an der hormonellen Steuerung und an intrazellulären Signalwegen beteiligt.

In der Nomenklatur der Fettsäuren werden zwei unterschiedliche Bezeichnungen benutzt. Bei der Bezeichnung mit „ Δ “ wird die Position bestimmter Kohlenstoffe vom Carboxylende aus bestimmt. Bei der Bezeichnung mit „ ω “ wird die Position der Kohlenstoffe vom Methylende bestimmt.

Den Fettsäurebedarf des Organismus wird mit der Nahrung abgedeckt. Nahrungslipide sind zumeist Triglyceride. Der größte Teil wird zur Energiegewinnung genutzt bzw. bei einem Nahrungsüberangebot zur Speicherung in Fettzellen. Bei der Energiegewinnung werden die Fettsäuren durch Lipasen vom Glycerin des Triacylglycerids gespalten und frei oder an Albumin gebunden zum Zielorgan transportiert. Alle Gewebe, bis auf das Gehirn und Erythrozyten, können Fettsäuren zur Energiesynthese nutzen. In der Mitochondrienmembran werden in einem vierstufigen Prozess, der β -Oxidation, vom Carboxylende her jeweils 2 C-Atome als Acetyl-CoA abgespalten. Dieses wird dann zur ATP-Synthese genutzt.

Bei einem Überangebot an Acetyl- CoA synthetisiert der Körper Fettsäuren. Dafür wird im Zytosol mit einem multifunktionalen Enzymkomplex unter NADPH- Verbrauch Acetyl- CoA zu Palmitat verlängert. Weitere Verlängerungen und der Einbau von Doppelbindungen finden am endoplasmatischen Reticulum statt. Für diesen Prozess sind spezielle Elongasen zur Kettenverlängerung und Desaturasen (mikrosomale Monooxygenasen) zum Einbau der Doppelbindungen notwendig [Stryer et al 2002].

Beim Menschen fehlen Enzyme zum Einbau von Doppelbindungen ab der Δ -9 Position der Fettsäuren. Da der Körper einen Bedarf an Fettsäuren mit Doppelbindungen ab der Δ -9 Position hat, gehören diese Verbindungen zu den essentiellen Fettsäuren. Gemäß der unterschiedlichen Nomenklatur werden diese Fettsäuren auch ω -6 oder ω -3 Fettsäuren genannt. Der kurzkettigste Vertreter der ω -3 Fettsäuren ist die α -Linolensäure, der der ω -6 Fettsäuren die Linolsäure (Abbildung 1-2).

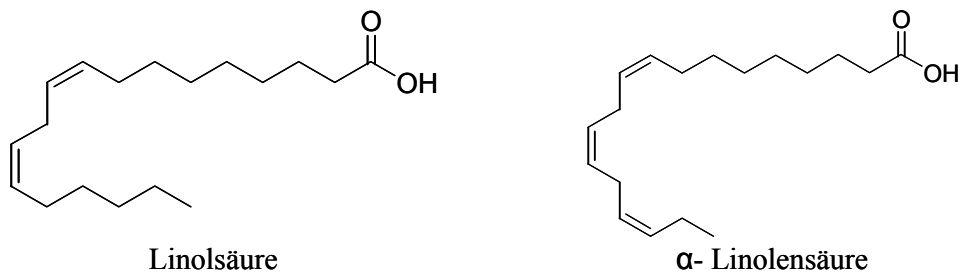


Abb. 1-2 Beispiel für eine ω -6 Fettsäure (Linolsäure) und eine ω -3 Fettsäure (α -Linolensäure)

Die körpereigenen Desaturasen und Elongasen katalysieren die Synthese längerer homologer Verbindungen aus der Linolsäure bzw. α -Linolensäure. Dieser Prozess läuft vorwiegend in den Leberzellen ab. Der Einbau einer Doppelbindung an der Δ -6 Position der Fettsäuren ist der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Reaktionsfolge. Katalysiert wird diese Reaktion durch die Δ -6 Desaturase. Bei allen Reaktionsschritten konkurrieren ω -6 und ω -3 Fettsäuren um die gleichen Enzyme. Die Affinität der Enzyme zu den ω -3 Fettsäuren ist jedoch größer. α -Linolensäure hemmt z.B. die Δ -6 Desaturase für die Linolsäure [Stryer et al. 2002; Koolmann et al. 2002]. Die Reaktionsfolgen sind schematisch in Abbildungen 1-3 und 1-4 dargestellt.

Die Umsatzrate der Enzyme wurde in zahlreichen Studien untersucht. Dabei zeigte sich, dass die Aktivität der Δ -6 Desaturase mit zunehmenden Lebensalter des Menschen abnimmt und sich zunehmend auf die Leber beschränkt [Burdge et al. 2005, 2006; Simopoulos 2002a]. Bei Frauen ist die Aktivität höher als bei Männern. So konnte insbesondere bei schwangeren und

stillenden Frauen eine Zunahme der Docosahexaensäure (DHA) beobachtet werden. DHA ist in der frühkindlichen Entwicklung zur Ausbildung der Gehirn- und Sehkraft essentiell [Connor 2000].

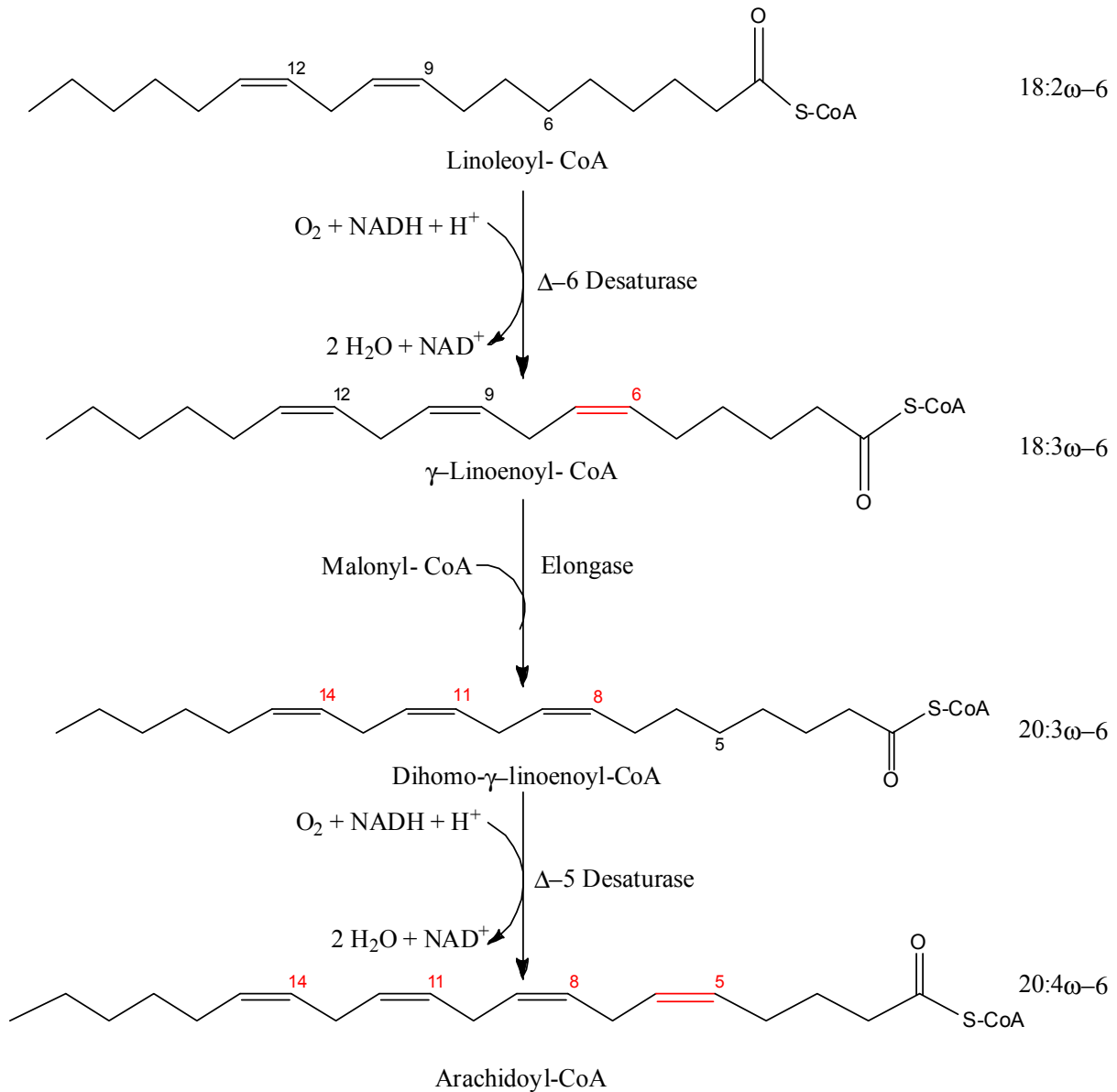


Abb. 1-3 *Synthese der ω -6 Fettsäuren im menschlichen Körper*

Einleitung

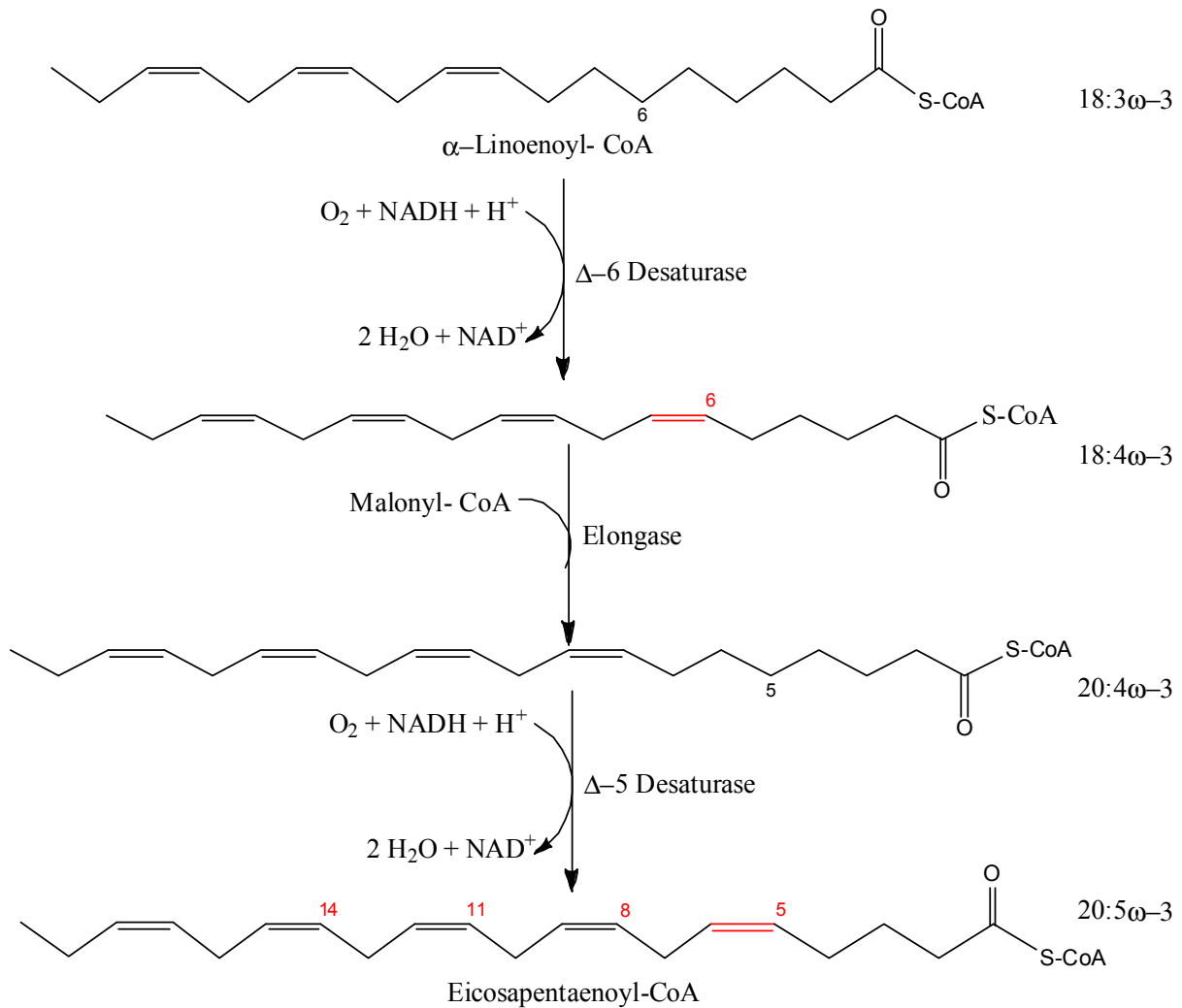


Abb. 1-4 Synthese der ω -3 Fettsäuren im menschlichen Körper

Natürliche Quellen für Linolsäure sind Pflanzenöle wie Sonnenblumen-, Distel- und Sojakeimöl. α -linolensäurereiche Öle sind z.B. Leinsamen-, Raps- und Walnussöl. In den meisten Pflanzenölen, mit Ausnahme von Leinsamen-, Sonnenblumen- und Rapsöl ist das Verhältnis Linolsäure zu α -Linolensäure etwa 10:1, in Leinsamenöl liegt es ungefähr bei 1:3,5, in Sojakeimöl bei 8:1. In den USA sind ca. 89% der konsumierten PUFAs Linolsäure und nur 9% α -Linolensäure [McLean et al. 2005].

Weitere Quellen für PUFAs sind z.B. Borretschöl oder Nachtkerzenöl, diese sind reich an γ -Linolensäure. Fleisch der Säugetiere ist reich an Arachidonsäure (AA) und Fischprodukte enthalten hohe Anteile an Eicosapentaensäure (EPA) und Docosahexaensäure (DHA).

Die IUPAC- Nomenklatur, Trivialnamen, Abkürzungen und Vorkommen der wichtigsten PUFAs sind in Tabelle 1.1 zusammengefasst.

Da PUFAs essentiell für den menschlichen Organismus sind, empfiehlt die Deutsche Gesellschaft der Ernährung (DGE) für Erwachsene und Kinder ab 4 Jahren eine tägliche

Zufuhr an ω -6 Fettsäuren von 2,5% und für ω -3 Fettsäuren von 0,5% bezogen auf den Gesamtenergiebedarf. Für Kleinkinder liegt der Anteil der ω -6 Fettsäuren höher [DGE 2000]. Aufgrund vieler Studien mit PUFAs wird in der Ernährung ein Verhältnis von ω -6 zu ω -3 von mindestens 5:1 empfohlen. Das tatsächliche Verhältnis in der westlichen Ernährung kann bis zu 20:1 betragen, durchschnittlich liegt es meist zwischen 8:1–10:1 [Linseisen et al. 2003; Simopoulos 2002a].

Tabelle 1.1 Nomenklatur und Charakteristik der für den Menschen bedeutsamen Fettsäuren [Gaßmann 2006]

Systematischer Name	Trivialname	Abkürzung	Vorkommen
ω-6-Reihe			
Octadeca-9(Z),12(Z)diensäure (LA)	Linolsäure	C18:2 ω -6	Sonnenblumen-, Soja-, Baumwollsaatöl
Octadeca-6(Z),9(Z),12(Z)triensäure (GLA)	γ -Linolensäure	C18:3 ω -6	Borretschöl, Nachtkerzenöl
Eicosa-5(Z),8(Z),11(Z),15(Z)tetraensäure	Arachidonsäure	C20:4 ω -6	Tierfette
ω-3-Reihe			
Octadeca-9(Z),12(Z),15(Z)triensäure (ALA)	α -Linolensäure	C18:3 ω -3	Leinsamen-, Walnuss-, Rapsöl
Octadeca-6(Z),9(Z),12(Z),15(Z)tetraensäure	Stearidonsäure	C18:4 ω -3	Erdnuss-, Fischöl
Eicosa-5(Z),8(Z),11(Z),14(Z),17(Z)pentaensäure (EPA)	Timnodonsäure	C20:5 ω -3	Fischöl
Docosa-4(Z),7(Z),10(Z),13(Z),16(Z),19(Z)hexaensäure (DHA)	Clupanodonsäure	C22:6 ω -3	Fischöl

1.3.2 Funktionen von PUFAs

1.3.2.1 Eicosanoide

Eicosanoide sind Oxidationsprodukte der PUFAs, mit einer Kettenlänge von 20 C-Atomen (z.B. AA, EPA). Sie regulieren zahlreiche Gewebehormone, sind aber auch an der Muskelkontraktion, Differenzierung und Wachstum von Zellen und am Stoffaustausch beteiligt. Zu den Eicosanoiden zählen Prostaglandine, Thromboxane und Leukotriene. Die zur Synthese notwendigen Fettsäuren werden aus den Zellmembranen durch Phospholipase A₂ freigesetzt und stehen dann als Substrate für Cyclooxygenasen (COX) (Prostaglandinsynthese) und Lipoxygenasen (Leukotriensynthese) zur Verfügung. Thromboxane (TX) werden aus Prostaglandinen (PG) mit Hilfe von Thromboxan-Synthasen synthetisiert. Je nach Edukt entstehen verschiedene Serien an Prostaglandinen und Leukotrienen (LT). So entstehen z.B. aus der Arachidonsäure die Prostaglandine der Serie 2 und die Leukotriene der Serie 4. Hier wird vorherrschend das TXA₂ und LTB₄ gebildet, in der Immunabwehr spielt auch das PGE₂ in Kombination mit dem TXA₂ eine entscheidende Rolle. Aus der Eicosapentaensäure werden die Prostaglandine der Serie 3 und Leukotriene der Serie 5 gebildet, überwiegend das PGI₃ und LTB₅. Die einzelnen Synthesewege der Eicosanoide sind in Abbildung 1-5 zusammengefasst, die Wirkungen wichtiger Eicosanoide in Tabelle 1.2.

Tabelle 1.2 Wichtige Eicosanoide und ihre Wirkungen beim Menschen [Singer et al. 2000]

Edukt	Eicosanoid	Wirkung
ω-6 Arachidonsäure	Prostaglandin E ₂	gefäßerweiternd
	Thromboxan A ₂	gefäßverengend, gerinnungsfördernd
	Leukotrien B ₄	stark entzündungsfördernd
ω-3 Eicosapentaensäure	Prostaglandin I ₃	gefäßerweiternd, gerinnungshemmend
	Prostaglandin E ₃	gefäßerweiternd, gerinnungshemmend
	Leukotrien B ₅	schwach entzündungsfördernd

ω-6 und ω-3 Fettsäuren konkurrieren bei den einzelnen Synthesereaktionen um die gleichen Enzymsysteme. Die Affinität der Enzyme zu den ω-3 Fettsäuren ist höher. Da PGI₃ im Gegensatz zu PGI₂ gefäßerweiternd und gerinnungshemmend wirkt, kann eine erhöhte Zufuhr von EPA bestimmte Krankheiten, wie z.B. der Entstehung von koronaren Herzerkrankungen, vorbeugen. Aus dieser Fettsäure synthetisiert der Organismus auch das nur schwach entzündungsfördernde LTB₅. Die Bildung des stark entzündungsfördernde LTB₄ wird

gehemmt. Deswegen wird eine erhöhte Zufuhr bei entzündlichen Darmerkrankungen wie Morbus Crohn und Colitis ulcerosa empfohlen [Belch et al. 2000 Singer et al. 2000].

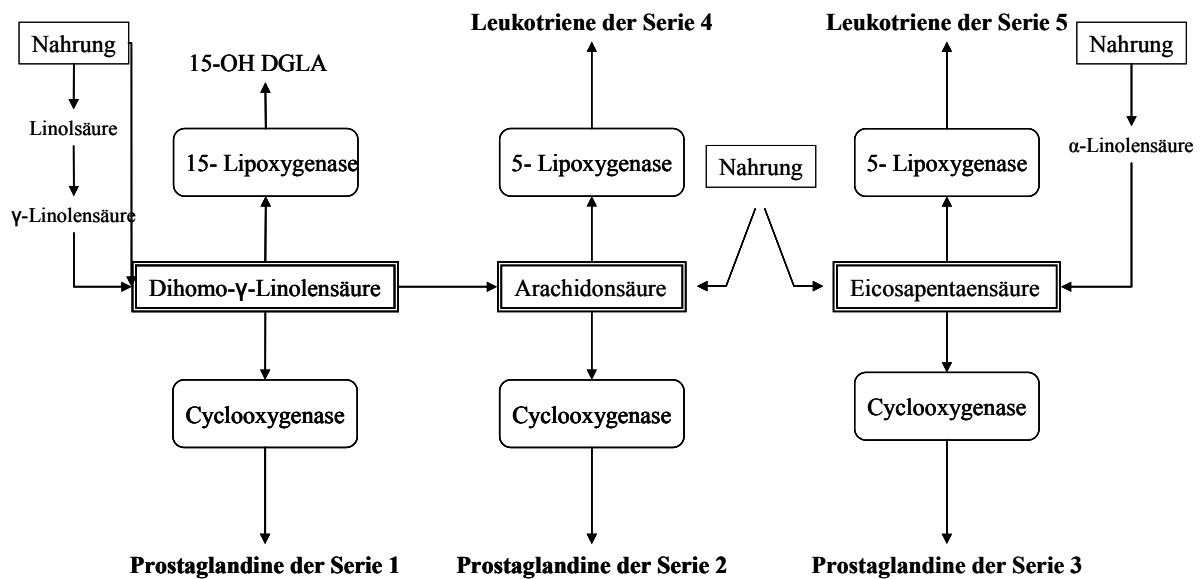


Abb. 1-5 *Metabolismus essentieller Fettsäuren zu Leukotrienen und Prostaglandinen*
 [Belch et al. 2000 modif.]; 15-OH DGLA=15-Hydroxydihomo- γ -linolensäure.

Weiterhin haben Studien gezeigt, dass aus der EPA über den Cyclooxygenase und Lipoxygenasestoffwechselweg Resolvine der E-Serie gebildet werden, die neben den bekannten Eicosanoiden ebenfalls antiinflammatorisch wirken [Calder 2006 a und b; Simopoulos 2002 b].

1.3.2.2 Eicosanoide der Haut

Eine wichtige Aufgabe der Eicosanoide in der Haut ist die Regulierung der Wundheilung und Immunabwehr. Dabei sind vor allem die Stoffwechselprodukte der Arachidonsäure von Bedeutung.

Aufgrund der antiinflammatorischen Wirkung ω -3 Fettsäuren wird eine erhöhte Zufuhr dieser Fettsäuren als ergänzenden Therapie von entzündlichen Erkrankungen wie Schuppenflechte (Psoriasis) oder Ekzemen eingesetzt [Belch et al. 2000; Connor 2000; Horrobin 2000].

Doch nicht nur ω -3 Fettsäuren, sondern auch die γ -Linolensäure und Dihomo- γ -Linolensäure (DHGLA) zeigen positive Effekte bei der Therapie von entzündlichen Hauterkrankungen. Mögliche Ursache ist, dass Δ -6 und Δ -5 Desaturasen in der Haut nicht sehr aktiv sind. Durch die geringe Aktivität der Δ -5 Desaturase findet keine Verlängerung der γ -Linolensäure bzw. DHGLA zur Arachidonsäure statt. Zusätzlich hemmen sowohl die γ -Linolensäure als auch die

DHGLA die 5-Lipoxygenase, so dass die Bildung der Leukotriene der Serie 4 nur noch vermindert stattfindet. Ebenfalls in der Haut vermehrt aktiv ist die 15-Lipoxygenase. Die durch dieses Enzym gebildeten Verbindungen hemmen vermutlich ebenfalls die 5-Lipoxygenase [Ziboh et al. 2000, Chapkin et al. 1987; Mayser et al. 2002]. Viele Untersuchungen beziehen sich auf topische Applikationen der Fettsäuren, nur wenige Studien beschäftigen sich mit den endogenen Wirkungen.

1.3.2.3 Weitere Funktionen der PUFAs

Langkettige ungesättigte Fettsäuren übernehmen wichtige Funktionen in biologischen Membranen und in der Lipidmatrix des Stratum Corneums. So erhöht sich die Fluidität der biologischen Membranen durch den Einbau der PUFAs. Auch in der Barrierefunktion der Haut spielen sie eine wichtige Rolle. So konnte im Tierversuch gezeigt werden, dass eine Ernährung frei an essentiellen Fettsäuren zu einer Zunahme des transepidermalen Wasserverlustes führte. Der transepidermale Wasserverlust [TEWL = transepidermal water loss] wird als Marker für die Barrierefunktion der Haut eingesetzt [Singer 2000; Proksch et al. 2006].

Neben der Eicosanoidsynthese sind PUFAs an zahlreichen weiteren Signalwegen beteiligt. So inhibieren z. B. ω -3 Fettsäuren die Synthese der Entzündungszytokine TNF α (tumor necrosis factor alpha) und IL-1 β (Interleukin) und können damit zusätzlich Entzündungsreaktionen entgegen wirken [Caughey et al. 1996].

1.4 Hautschädigung durch UV-Licht- Prävention

Unsere Haut ist als äußeres Organ stetig UV-Licht ausgesetzt. Dies wird im Allgemeinen als angenehm empfunden, so steigert sich an Sonnentagen das generelle Wohlbefinden, Vitamin D wird produziert, Stoffwechselwege werden angeregt und die Haut bräunt sich. Bei der Bräunung handelt sich um einen körpereigenen Prozess, bei dem UV-Strahlen die Melaninsynthese anregen. Melanin ist ein körpereigener UV-Schutz.

Neben den positiven Eigenschaften der UV-Strahlen, kann eine übermäßige Exposition zu akuten und chronischen Schäden führen.

Zu den akuten Schäden zählt u. a. der Sonnenbrand. Chronische Schäden entstehen hauptsächlich durch wiederholte Einwirkung hoher Dosen und spiegeln sich in vorzeitiger Hautalterung oder in der Entstehung von Hautkarzinomen wider.

1.4.1 Hautschädigung durch UV-Licht

Von der Gesamtenergie der Sonne erreichen Strahlen der Wellenlänge 100 nm – 1000 µm die Erdoberfläche. Schädigungen der Haut werden vor allem durch UV-B (250 – 315 nm) und UV-A Licht (315 – 400 nm) hervorgerufen. Neuere Studien zeigen, dass auch durch Infrarot-Strahlung (0,78 – 1000 µm) Hautschäden induziert werden [Schroeder et al. 2007]. Die Intensität der Bestrahlung schwankt je nach Region und Höhenlage, so ist z.B. das Verhältnis der UV-A zur UV-B-Strahlung abhängig von der Position auf der Erdoberfläche. Je nach Zeit berechnen sich unterschiedliche UV-Dosen zur Angabe möglicher UV-Expositionen. Eine amerikanische Studie zeigt, dass die US-Bevölkerung durchschnittlich einer Dosis von 25000 J/m² pro Jahr ausgesetzt ist. Zugrunde gelegt wurden diesen Berechnungen die durchschnittlichen Sonnenstunden und die Zeit, in denen sich die Probanden außerhalb ihrer Wohnung befanden. 1/3 der Gesamtmenge wurde allein in 3 wöchigen Urlauben erreicht [Godar et al. 2001]. Am 35. nördlichen Breitengrad wurde an einem wolkenlosen Sommertag zur Mittagszeit innerhalb von 70 Minuten eine UV-A Dosis von 25 J/cm² ermittelt [Frederick et al. 1988; Trekli et al. 2003].

UV-Strahlen dringen unterschiedlich tief in die Haut ein, kurzwelliges UV-B Licht wird von der Haut absorbiert und reflektiert und dringt daher nur in die obere Epidermis ein, UV-A Licht dringt bis zur Dermis. UV-A Strahlen und UV-B Strahlen lösen unterschiedliche Schäden in der Haut aus, von denen einige im Folgenden beschrieben werden.

Der Sonnenbrand (Erythema solare) wird durch UV-B Strahlen ausgelöst. Es handelt sich um eine Entzündungsreaktion der Haut, deren Einsetzen und Stärke vom jeweiligen individuellen

Hauttyp und der Eigenschutzzeit der Haut abhängt. 10 – 100 mJ/cm² UV-B Strahlen reichen schon aus um bei den meisten Menschen einen Sonnenbrand auszulösen, dieser zeigt sich in der Regel 4-6 h nach der Bestrahlung [Kindl et al. 1998]. Wie die meisten Entzündungen äußert sich der Sonnenbrand durch Rötung, Schwellung, Schmerz und Überwärmung. Entzündungsmediatoren werden dabei freigesetzt, diese bewirken eine Dilatation der Blutkapillaren, Makrophagen und Lymphozyten gelangen zum Entzündungsherd. Dies geht meist einher mit dem Auftreten so genannter „sun burn cells“, veränderter Keratinozyten mit aktiviertem Zelltodprogramm (Apoptose). Geschädigte Zellen werden durch Apoptose aus dem Gewebe entfernt, ohne dass weitere Schädigungen des umliegenden Gewebes auftreten [Godar 1999, Kulms et al., 1999].

Entzündungsmediatoren sind Zytokine, wie TNF- α , IL-1 β und IL-6, NO und Prostaglandine (Abschnitt 1.3.2). Die Biosynthese dieser Faktoren wird u.a. durch den Transkriptionsfaktor Nf κ B (nuclear factor κ B) gesteuert [Lee et al. 2003]. Die verstärkte Aktivität von Nf κ B nach UV-Belastung der Haut, wurde in zahlreichen Studien untersucht und belegt [Tanaka et al. 2005, Larsson et al. 2006, Vile et al. 1995]. Weiterhin wirkt Nf κ B regulatorisch auf die Expression von Matrix-Metalloproteinasen (MMP) (zu MMP siehe Abschnitt 1.4.1) und Wachstumsfaktoren der Keratinozyten und Melanozyten [Tanaka et al. 2005].

Hautschäden verursacht durch UV-A Strahlen ist auf eine vermehrte Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) zurückzuführen [Sies 1991]. Dies sind u. a. Singulett-Sauerstoff (¹O₂), Superoxidanionen (O₂⁻), Wasserstoffperoxide (H₂O₂), Hydroxylradikale (HO[•]) und Stickstoffmonoxide. In jeder Zelle werden diese als normale Stoffwechselprodukte gebildet [Halliwell et al. 1989]. Eine übermäßige Produktion führt aufgrund der hohen Reaktivität dieser Verbindungen zu zahlreichen zellulären Schäden. Antioxidantien wie Glutathion oder Carotinoide können diesen Schäden entgegenwirken. Als oxidativen Stress bezeichnet eine Störung des Gleichgewichtes von Antioxidantien und Oxidantien [Sies 1991].

Molekulare Schäden in der Haut infolge einer erhöhten UV-Exposition sind z.B. gekennzeichnet durch die Entstehung von Thymindimeren und einer vermehrten Lipidperoxidation.

Bei den Thymindimeren handelt es sich um Cyclobutan-Pyrimidindimere oder um Cyclobutan Pyrimidin(6-4)-Pyrimidondimere der DNA Basen Thymin oder Cytosin. Folgen dieser Dimerbildung sind Mutationen. Die Bildung erfolgt hauptsächlich durch die Wechselwirkung mit UV-B Strahlen. Phosphorylasen und das Tumor- Supressor- Gen p53 sind an der Reparatur der Dimeren beteiligt. Ein weiterer DNA-Schaden infolge von UV-A

Strahlen ist die Bildung von 8-Oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosin [Mouret et al. 2006; Decraene et al.2001].

Auch die Lipide der Hautzellen können geschädigt werden. Durch UV-Exposition werden die in den Membranen enthaltenen ungesättigten Fettsäuren oxidiert, es entstehen Peroxylradikale, die ihrerseits mit intakten Fettsäuren reagieren und somit weitere Peroxylradikale entstehen lassen. Dadurch verändern sich die Eigenschaften der Zellmembranen, die Membranintegrität geht verloren. In mehreren Studien konnte gezeigt werden, dass der Gehalt an Malondialdehyd oder 4-Hydroxynonenal, als Biomarker der Lipidperoxidation, durch UV-Bestrahlung ansteigen [Eichler et al. 2002; Morlière et al. 1991, Yang et al. 2003; Moysan et al. 1993].

Ein weiterer sensibler Marker der UV-A Exposition ist die Expression der Hämoxigenase (HO). HO ist ein mikrosomales Enzym, von dem bisher 3 Isoformen HO-1, HO-2 und HO-3 nachgewiesen wurden, welche die Häm- Gruppe abbaut. Die Häm-Gruppe ist als prosthetische Gruppe im Blutfarbstoff Hämoglobin, in Cytochromen, Peroxidasen und Katalasen vorhanden [Tyrell 2004; Ryter et al. 1999]. Untersuchungen an Fibroblasten zeigten, dass insbesondere HO-1, ein 32 kDa großes Protein, durch UV-A und in Anwesenheit von Wasserstoffperoxid hochreguliert wird [Keyse et al. 1987].

Beim Hämabbau wird freies Häm zu Biliverdin IX α oxidiert. In diesem Prozess wird H₂O, CO und Fe II freigesetzt. Daran beteiligt sind außerdem als Energielieferant NADPH und Cytochrom p-450 Reduktase [Ryter et al. 1999]. Der zügige Abbau von Häm ist wichtig, da es in freier Form toxisch wirkt und ihm prooxidative und proinflammatorische Eigenschaften zugesprochen werden [Balla et al. 2003, Wagener et al. 2003; Ryter et al. 1999]. Bilirubin, eines der Abbauprodukte von Häm, zeigt *in-vitro* antioxidative Eigenschaften [Stocker et al. 1987].

Die Regulation der Transkription des Enzyms wird von zwei wesentlichen Faktoren beeinflusst. Häm reagiert als ein starkes Chromophor sensibel auf UV-A Licht. Es wird nach elektronischer Anregung aus den Proteinen freigesetzt und aktiviert die Transkription von HO-1 (Abbildung 1-6). Repressor der Transkription ist ein heterodimeres Protein Bach1, welches an Maf (*small musculoaponeurotic fibrosarcoma*) gebunden ist. Die bindende Region auf der DNA- Sequenz wird MARE (*Maf recognition element*) genannt. Zusätzlich ist für die Transkription von HO-1 noch ein Aktivator Nrf2 (*NF-E2 related factor*) nötig. Dieser ist im Zytosol an Keap-1 (*Kelch-like ECH associated protein-1*) gebunden. Nach UV-A Exposition oder elektrophilem Stress löst sich diese Bindung, Nrf2 wird durch Häm stabilisiert und

wandert in den Kern, wo es mit Maf ein Heterodimer bildet und die Transkription aktiviert [Tyrell 2004].

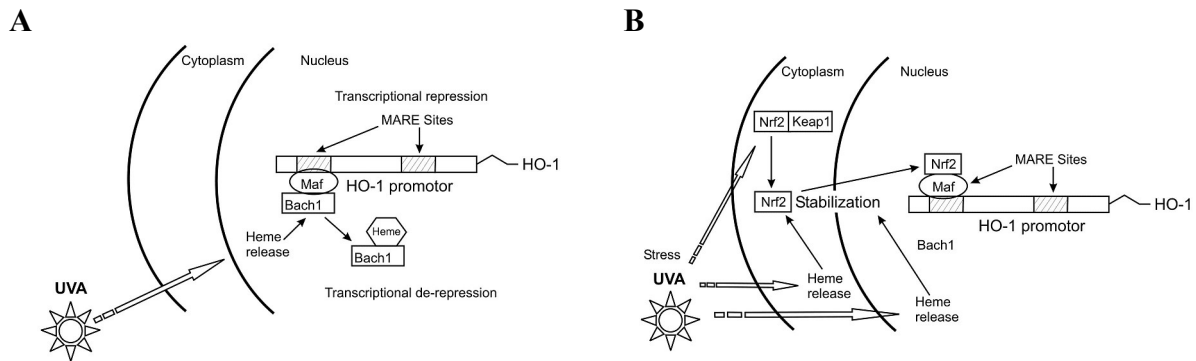


Abb. 1-6 Modell für die transkriptionelle Aktivierung des HO-1 Gens [Tyrell 2004, modif].

A: Aktivierung der Transkription von Hämoxigenase durch Häm

B: Funktion von Nrf2 in der Transkription

Vorzeitige Hautalterung ist ein häufiger Schaden infolge übermäßiger UV-Exposition. Gekennzeichnet ist diese durch diffus gelbliche Färbung, tiefe Falten, Schlaffheit und ledriges Erscheinungsbild der Haut mit erhöhter Verletzbarkeit, Blasenentwicklung und gestörter Wundheilung. Aber auch die aktinische Elastose ist charakteristisch. Insgesamt wirkt die Haut häufig atroph [Grether-Beck et al. 2005, Leitlinien der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft 2005]. Morphologisch ist die Anzahl der Fibroblasten erhöht, was zu einer Gewebeergrößerung führt. Zusätzlich sind die Anzahl von Mastzellen, Histiozyten und mononukleären Zellen erhöht. Diese sind am Entzündungsgeschehen beteiligt, infolgedessen kommt es zu einer chronischen Entzündung der Haut.

Molekularbiologisch/ biochemisch werden verschiedene Ursachen für die vorzeitige Hautalterung diskutiert. So beobachtet man in der photogelalterten Haut eine vermehrte Degeneration des Bindegewebes. Die Zunahme von MMPs (insbesondere MMP-1) durch UV-Licht ist ursächlich. MMPs sind zinkabhängige Endopeptidasen mit proteolytischer Aktivität, die in der extrazellulären Matrix der Dermis Makromoleküle wie verschiedene Kollagentypen, Proteoglykane und Glycoproteine abbauen [Krutmann 2006, Brenneisen et al. 2002].

In der photogelalterten Haut kommt es zu einer frühzeitigen Verkürzung von Telomeren durch UV-Licht. Diese sind an der als Bestandteile der DNA an der Replikation dieser beteiligt. Die Zellteilung wird dadurch vorzeitig eingestellt [Krutmann et al 2006].

Weiterhin wird die Rolle der mitochondrialen Alterung diskutiert. So wird durch UV-Licht die Mutationsrate der mitochondrialen DNA erhöht, die ATP-Synthese-Rate wird vermindert und reaktive Sauerstoffmetabolite werden angehäuft [Grether- Beck 2005].

Auch die Bildung von oxidierten und damit funktionsunfähigen Proteinen trägt maßgeblich zur Alterung bei. Das degradierte, oxidierte und in seiner Funktion eingeschränkte Protein wird hauptsächlich durch das proteasomale System der Zelle abgebaut [Grune 2000]. Zahlreiche Studien haben gezeigt, dass in epidermalen Zellen im Alterungsprozess und nach UV-Belastung die Proteasomaktivität abnimmt [Bulteau 2007]. Durch den verminderten Abbau der oxidierten Proteine akkumulieren diese, ein typisches Merkmal gealterter Zellen.

Eine weitere Folge von chronischen Veränderungen infolge übermäßiger UV-Exposition, ist das erhöhte Risiko an Hautkrebs zu erkranken. Beim Hautkrebs kann man generell 2 Typen unterscheiden. Zum einen der „Nicht-Melanom-Hautkrebs“, dessen Ursprung im Hautepithel liegt und der Hautkrebs der Pigmentzellen (malignes Melanom) [Kindl et al. 1998]. Der „Nicht-Melanom-Hautkrebs“ leitet sich von den Keratinozyten der Epidermis ab, das maligne Melanom von den pigmentbildenden Zellen der Epidermis, den Melanozyten oder Nävuszellen (Leberfleck) [www.hautkrebs.de; DDG 2005].

1.4.2 Sonnenschutz

Aus den in Kapitel 1.4.1 genannten Gründen muss die Haut vor einer übermäßigen UV-Exposition geschützt werden. Unsere Haut besitzt dafür ein eigenes Verteidigungssystem: die Melaninproduktion und eine verstärkte Verhornung der Haut. Topisch aufgetragene Sonnenschutzmittel, die hauptsächlich Zimtsäurederivate, Bornanderivate oder Titandioxid enthalten, schützen unsere Haut ebenfalls. Neben Melanin, das UV-Licht absorbiert und reflektiert, besitzt unsere Haut auch ein enzymatisches Verteidigungssystem, dazu gehören Katalasen und Superoxiddismutasen.

Aber auch die endogene, systemische Photoprotektion durch Nährstoffe ist möglich. Zur Erhöhung der UV-Barriere der Haut sollten die Substanzen UV-Licht über ein breites Spektrum absorbieren. Manche dieser Verbindungen wirken auch als Antioxidantien, andere dagegen beeinflussen zelluläre Signalwege, Reparaturmechanismen und Entzündungsreaktionen.

Bekanntes Beispiel sind Carotinoide (Abschnitt 1.4.3), aber auch Flavonoide, Vitamin E und C sind Mikronährstoffe die zur Photoprotektion beitragen. α -Tocopherol (Vitamin E) kann z.B. die Lipidperoxidation inhibieren. Es agiert dabei als klassisches Antioxidans, in dem es durch UV induzierte Lipidperoxidradikale abfängt. Vitamin C liegt in hohen Konzentrationen

in vielen Geweben vor und wird durch ROS zu Dehydroascorbat oxidiert, welches dann enzymatisch durch die Dehydroascorbatreduktase wieder zur Ascorbinsäure oxidiert wird [Sies et al. 1995, Stahl et al. 2007]. ROS werden dabei deaktiviert.

Eine Studie mit flavanolreichem Kakao zeigte, dass nach einem Konsum von 12 Wochen die Erythembildung signifikant sank. Auch hier wurden in Anlehnung an *in-vitro* Untersuchungen antioxidative Eigenschaften diskutiert [Heinrich et al. 2006; Neukam Dissertation 2006].

PUFAs sind ebenfalls Nährstoffe die zum endogenen Sonnenschutz beitragen. UV-Bestrahlung erhöht die COX-2 Aktivität, daraus resultieren chronische Entzündungen, vorzeitige Hautalterung und ein erhöhtes Risiko an „Nicht-Melanom-Hautkrebs“ zu erkranken [Rundhaug et al. 2007]. Im Tierversuch konnte gezeigt werden, dass durch die Supplementierung mit ω -3 Fettsäuren das Krebsrisiko sinkt; eine ω -6 reiche Diät erhöht das Risiko [Black et al. 2006].

Weiterhin wurde in *in-vitro* Untersuchungen an Hautfibroblasten gezeigt, dass die durch UV-Licht induzierte Bildung von MMPs durch die Inkubation mit Eicosapentaensäure sinkt [Kim et al. 2006].

1.4.3 Carotinoide: Struktur und Vorkommen

Nährstoffe mit photoprotektiver antioxidativer Wirkung sind z.B. verschiedene Carotinoide, wie β - Carotin oder Lycopin.

Carotinoide sind eine weit verbreitete Klasse von isoprenoiden Naturstoffen, die durch ihre zumeist rote und gelbe Farbe hervorstechen und als Pigmente (Farbstoffe) in vielen Lebensmitteln eingesetzt werden (z.B. Gelbfärbung von Margarine oder Käse). Bis heute sind mehr als 600 Verbindungen bekannt. Natürlich kommen sie als sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe in z.B. Paprika, Tomaten, Möhren, Zitrusfrüchten vor. Tierische Quellen sind Lachsfleisch und Krustentiere, bedingt durch die carotinoidhaltige Nahrung der Tiere [Baltes 1995, Franzke 1990].

Bei den natürlich vorkommenden Carotinoiden handelt es sich um Isoprenoide bestehend aus einem C-40 Kohlenstoffgerüst. Charakteristisch ist ihr System aus konjugierten Doppelbindungen. Die Carotinoide werden in 2 Hauptklassen unterteilt, Carotine und Xanthophylle. Carotine sind reine Kohlenwasserstoffverbindungen, wohingegen die Xanthophylle sauerstoffhaltige funktionelle Gruppen (Hydroxyl-, Carbonyl-, Epoxygruppen) enthalten. Zusätzlich gliedert man die Carotinoide in acyclische, mono- oder bicyclischen Carotinoide. Für cyclische Carotinoide ist häufig eine β -Iononstruktur charakteristisch [Belitz 1992, Franzke 1990, Britton et al. 1995a].

Die wichtigsten in der Nahrung vorkommenden Carotinoide sind die Carotine α -Carotin, β -Carotin, Lycopin und die Xanthophylle β -Cryptoxanthin, Zeaxanthin und Lutein (siehe Abbildung 1-7) [Mayne 2003]. Diese lassen sich auch im menschlichen Plasma nachweisen [Stahl et al. 1993].

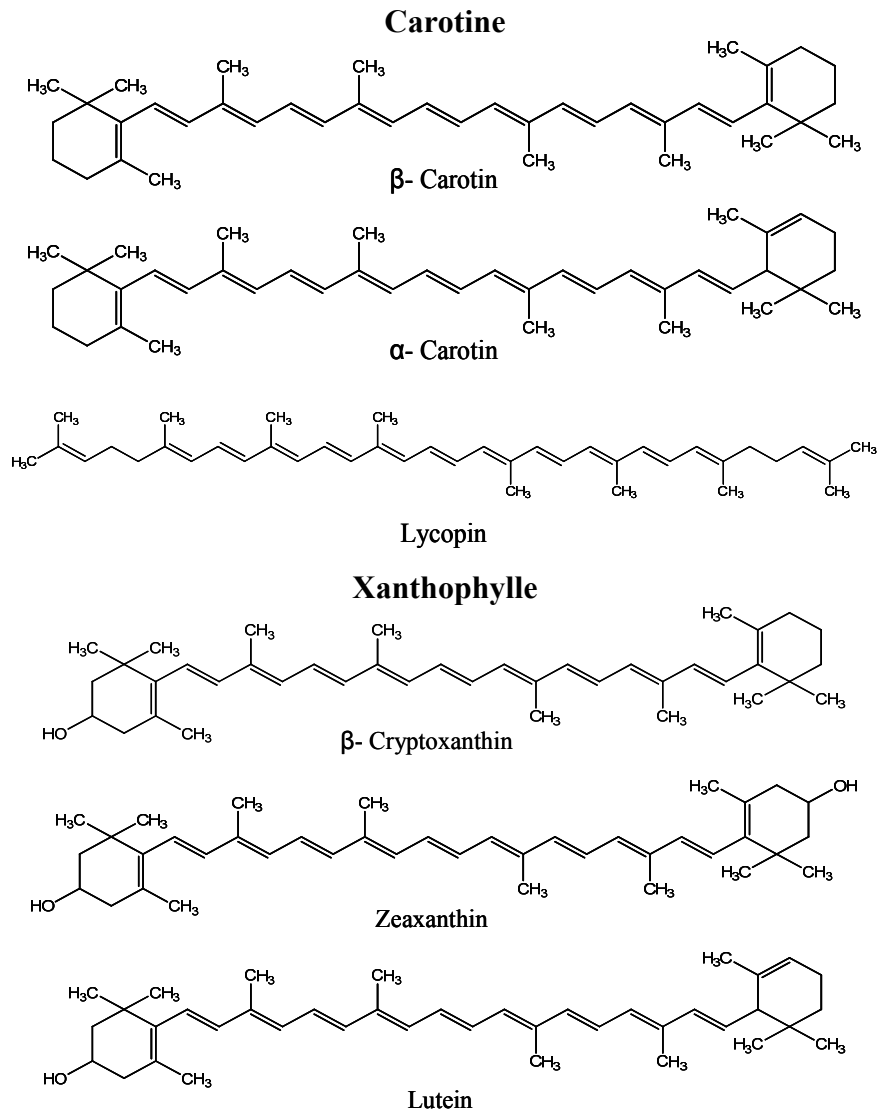


Abb. 1-7 *Strukturen von in der Nahrung und im Plasma des Menschen vorkommenden Carotinoiden*

1.4.4 Eigenschaften von Carotinoiden

Charakteristisch für Carotinoide ist ihre antioxidativen Eigenschaft. Weiterhin beeinflussen sie auch zahlreiche zelluläre Signalwege.

Das konjugierte Doppelbindungssystem der Carotinoide bildet ein Chromophor. Dadurch sind sie in der Lage Licht im sichtbaren Bereich und im Falle von Phytoen und Phytofluen auch im UV-Bereich zu absorbieren [Britton 1995 a; b]. Ihre photoprotektiven Eigenschaften beruhen insbesondere auf der Fähigkeit Singulett-Sauerstoff zu deaktivieren („quenchen“). Dabei handelt es sich um einen physikalischen Prozess, bei dem die Energie des Singulett-Sauerstoffes auf das Carotinoid übertragen wird. Das angeregte Carotinoid geht anschließend unter Wärmeabgabe in den Grundzustand über. Die Möglichkeit einer chemischen Reaktion zwischen Singulett-Sauerstoffes und dem Carotinoid ist mit 0,05% der gesamten Quenchrates klein [Britton 1995a; Stahl 2003]. Das acyclische Lycopin ist einer der besten bis jetzt bekannten natürlich vorkommenden Singulett-Sauerstoff-Quencher [di Mascio 1989].

Carotinoide können aber auch als klassische Antioxidantien bei der Lipidperoxidation eingreifen (zur Lipidperoxidation siehe Abschnitt 1.4.1), es kommt zum Kettenabbruch der Reaktion [El-Agamey et al. 2004, Young et al. 2004]. Der Ablauf der Mögliche Reaktionen von Carotinoiden sind in Abbildung 1-8 dargestellt.

1) Quenchen					
$^1\text{O}_2^*$	+	CAR	\longrightarrow	$^3\text{O}_2 + ^3\text{CAR}^*$	Energietransfer
2) Kettenabbruchreaktion					
CAR	+	ROO \cdot	\longrightarrow	CAR \cdot^+ + ROO $^-$	Elektronentransfer
CAR	+	ROO \cdot	\longrightarrow	CAR \cdot + ROOH	Wasserstoffabstraktion
CAR	+	ROO \cdot	\longrightarrow	(ROO-CAR) \cdot	Addition

Abb. 1-8 Reaktionen von Carotinoiden [El-Agamey 2004, Young et al. 2004]

Aufgrund der antioxidativen und photoprotektiven Eigenschaften werden Carotinoide auch als endogene Photoprotektoren eingesetzt. Carotinoidkonzentrationen in der Haut liegen zwischen 0,2-0,6 nmol/g feuchte Haut, wobei der Anteil je nach Einzelcarotinoid und Hautgebiet variieren kann [Peng et al. 1993; Stahl et al. 1998].

Schon 1972 wurden photoprotektive Wirkung von β - Carotin nachgewiesen [Mathews-Roth et al. 1972]. Zahlreiche weitere Studien untermauern dieses Ergebnis [Heinrich et al. 2003b;

Stahl et al. 2003]. Es zeigte sich jedoch, dass eine Supplementierung über 10 Wochen notwendig ist um einen Schutzeffekt zu erzielen. Eine Supplementierung von 3-4 Wochen reichen nicht aus [Stahl et al. 2002].

Auch für Lycopin konnten photoprotektive Wirkungen festgestellt werden. Dabei zeigt sich, dass auch Lebensmittel mit hohem Lycopingehalt (z.B. Tomatenpaste) wirkungsvoll sind. Die Bioverfügbarkeit des Lycopins ist hier besonders hoch [Gärtner et al. 1997]. Nach einer 10 wöchigen Gabe von 16 mg Lycopin/Tag wurde eine verringerte Erythembildung festgestellt [Stahl et al. 2001].

Neben den protektiven Wirkungen in der Haut zeigen mehrere Studien außerdem, dass Lutein und Zeaxanthin, die Hauptpigmente der Macula lutea, der menschlichen Retina, das Auge vor Lichtschäden schützen. Je höher der Gehalt an Lutein/Zeaxanthin in der Macula, desto geringer ist das Risiko an einer altersbedingten Makuladegeneration zu erkranken [Landrum et al. 2004].

Epidemiologische Studien haben weiterhin gezeigt, dass ein erhöhter Konsum an carotinoidreichen Obst und Gemüse mit einem verminderten Risiko an Krebs zu erkranken korreliert. Dies gilt insbesondere für neoplastische Erkrankungen der Lunge, Brust und Prostata [Sharoni et al. 2004]. In zwei Interventionsstudien zur chemopräventiven Wirkung von Carotinoiden (CARET (β -Carotene and Retinol Efficacy Trial; ATBC: Alpha-Tocopherol Beta-Carotene Trial) wurde jedoch beobachtet, dass die Supplementierung mit β -Carotin und Vitamin A bei Rauchern und Asbest exponierten Personen zu einem erhöhten Risiko an Lungenkrebs zu erkranken führt [Sharoni et al. 2004]. Die zugrunde liegenden Mechanismen sind nicht vollständig verstanden.

Besonders wichtig ist β -Carotin zudem für den menschlichen Organismus, da es von den Carotinoiden die höchste Pro-Vitamin A Aktivität besitzt. Vitamin A (Retinol) ist am Sehvorgang, der Embryogenese und an der Proliferation und Differenzierung vieler Zellen beteiligt [Biesalski et al. 1995].

Carotinoide und ihre Derivate modulieren die Transkription. Insbesondere redoxsensitive Transkriptionssysteme, wie AP-1, NF- κ B oder ARE (antioxidant response element) sind betroffen [Sharoni et al. 2004]. Weiterhin beeinflussen sie auch die zelluläre Kommunikation über Gap Junctions, die im Abschnitt 1.4.5 näher beschrieben wird.

Zwei bis her wenig untersuchte Carotinoide sind Astaxanthin und Canthaxanthin.

Astaxanthin ist ein Carotinoid mit hohem antioxidativen Potential. Im Modellsystem wurde gezeigt, dass es zweimal effizienter als Canthaxanthin, fünfmal effizienter als β -Carotin und zehnmal stärker als α -Tocopherol ist. Auch als Singulett-sauerstoff-Quencher ist Astaxanthin

effektiver als Canthaxanthin [Miki 1991]. Natürliche Quellen von Astaxanthin sind im Wasser lebende Tiere wie Lachs, Forelle, Brasse, Hummer und Shrimps [Guerin et al. 2003], aber auch Mikroorganismen wie z.B. *Haematococcus pluvialis* [Boussiba et al. 1991].

Canthaxanthin gehört ebenfalls zu den Xanthophyllen und kommt natürlicherweise in Fischen, Krustentieren, Pfifferlingen und Algen vor [<http://www.zusatzstoffe-online.de>]

1.4.5 Die zelluläre Kommunikation über Gap Junctions

1.4.5.1 Struktur und Funktionen von Gap Junctions und Adhäsionsproteinen

Der Stoffaustausch zwischen Zellen erfolgt über verschiedene Mechanismen. Eine Möglichkeit ist der Austausch über Gap Junctions (GJ). GJ sind Zellkanäle, die das Zytoplasma benachbarter Zellen miteinander verbinden und den Austausch niedermolekularer Substanzen (<1kDa), wie Zucker, Aminosäuren und verschiedenen Signalmolekülen ermöglichen. Der Austausch wird Zell- Zell- Kommunikation bzw. Gap Junctional Communication (GJC) genannt. Zum Aufbau eines funktionsfähigen Kanals steuert jede der beiden benachbarten Zellen einen Halbkanal (Connexon) bei, der aus 6 Protein-Untereinheiten (Connexin) zusammengesetzt ist (Abbildung 1-9) [Lodish et al. 2002].

Es gibt eine Reihe verschiedener Connexine die man anhand ihres Molekulargewichtes unterscheidet. Connexin43 (Cx43, Molekularmasse 43 kDa) ist das am häufigsten vorkommende Connexin. Auch in der menschlichen Haut ist es vorrangig vertreten, daneben findet man aber auch noch Cx30, 31, 26, 45 und 57. In der Epidermis bilden Keratinozyten Gruppen von 25-50 Zellen die über GJ miteinander kommunizieren, Fibroblasten bilden Verbände von bis zu 100 kommunizierenden Zellen. Eine Verbindung zwischen den epidermalen und dermalen Bereichen wird jedoch nicht aufgebaut [Salomon et al. 1988]. Es besteht ein direkter Zusammenhang zwischen Hautfunktionsstörungen und eingeschränkter GJC [Meşe et al. 2007]

Topologisch unterscheiden sich die verschiedenen Connexine kaum. Sie weisen 4 hydrophobe Transmembranbereiche (M1-M4), zwei extrazelluläre Schleifen, eine zytoplasmatische Schleife und je einen zytoplasmatischen N- und C- Terminus auf [Lodish et al. 2002].

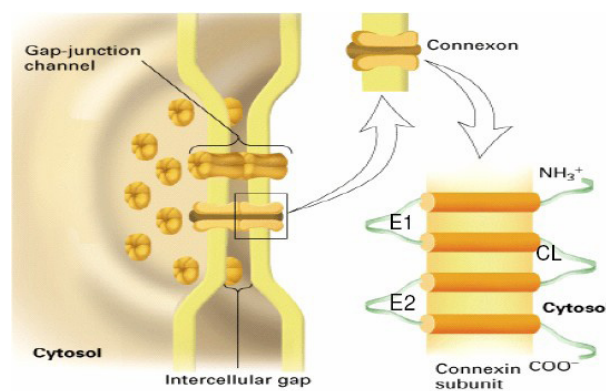


Abb. 1-9 Schematische Darstellung der transmembranen Struktur von Connexinen
E1, E2 extrazelluläre Schleife 1 bzw 2, CL zytoplasmatische Schleife [Lodish et al. 2002]

GJ Proteine werden am endoplasmatischen Reticulum aufgebaut, dann mit Vesikeln zum Golgi-Apparat transportiert, an der die Oligomerisierung zum Connexon erfolgt. Dieses wird dann zur Membran transportiert. Abgebaut werden Connexone zum einen über den ubiquitinabhängigen Proteasomabbau zum anderen über lysosomale Proteolyse. Die Halbwertszeit beträgt 1,5–5h [Goodenough et al. 1996, Richard 2000].

Bei der Regulation von Expression, Einbau und Kanalöffnung ist die Phosphorylierung von Connexinen von entscheidender Bedeutung. Eine wichtige Rolle bei der Phosphorylierung spielen die Protein-Kinasen A und C (PKA und PKC) und die mitogen-aktivierten Protein Kinasen (MAPK) [Lampe et al. 2004, Moreno et al. 2005, Abdelmohsen et al. 2005].

Neben dem Einbau der Connexone in die Membran ist auch ihr Öffnungsgrad, der durch pH, Ca^{2+} , Glucosespiegel, Membranpotential und über die Phosphorylierung geregelt ist, von entscheidender Bedeutung [Cascio 2005].

Zahlreiche Stimuli modulieren die GJC. Darunter fallen Onkogene, Tumorpromotoren und Wachstumsfaktoren [Lampe et al. 2004]. Z.B. führt die Behandlung von Rattenleberepithelzellen mit dem Tumorpromotor TPA, der vornehmlich die Protein-Kinase C stimuliert, zur vollständigen Inhibierung der GJC [Ale Agha 2002 Dissertation].

Auch geht man davon aus, dass die Zusammensetzung der Zellmembran nahe den Zellkanälen einen Einfluss auf die Kanaldurchlässigkeit hat. Die Zusammensetzung der Lipiddoppelschicht und die darin verankerten Proteine beeinflussen sich gegenseitig in Struktur und Funktion [Cascio 2005].

Die GJC kann sich unter pathophysiologischen Bedingungen verändern. Bei der Tumorentstehung wurde beobachtet, dass die GJC vermindert bzw. inhibiert ist [Bertram 2004, Trosko et al. 2001]. Es wird vermutet, dass es für die Tumorzelle wichtig ist, sich von den Signalen (z.B. Wachstumskontrollsignalen) der sie umgebenden Zellen zu isolieren und sich so der Wachstumskontrolle zu entziehen [Vine et al. 2002].

Bei der Entstehung des Melanoms spielt die GJC eine besondere Rolle. Melanozyten kommunizieren mit Keratinozyten über Gap Junctions, während Melanomazellen diesen Kommunikationsweg nicht ausbilden. Dafür kommunizieren Melanomazellen untereinander oder mit Fibroblasten der Dermis. Grund dafür ist vermutlich der im Melanomabildungsprozess beobachtete Wechsel der Adhäsionsproteine von E-Cadherin zu N-Cadherin [Hsu et al. 2000]. Der Aufbau der GJ scheint mit diesen Zelladhäsionssystemen gekoppelt zu sein. In mehreren Zellsystemen wurde gezeigt, dass die Adhäsion über Cadherine Voraussetzung für die Ausbildung von GJs ist [Ko et al. 2000]. Umgekehrt führt

eine Blockade der GJC dazu, dass adhärenzte Zellverbindungen entweder nicht gebildet werden oder instabil sind [Goodenough et al 1996; Richard 2000].

Cadherine sind Kalziumionen abhängige transmembrane Glycoproteine aus der Gruppe der Adhäsionsproteine. Sie spielen eine Rolle bei der Stabilisierung von Zell- Zellkontakten, der embryonalen Morphogenese, der Erhaltung der Zellpolarität und der Signaltransduktion. Beim Menschen sind ca. 80 verschiedene Cadherine identifiziert, wichtige Vertreter sind E-Cadherin, N-Cadherin, P-Cadherin und VE-Cadherin. E-Cadherin ist zumeist in Epithelzellen, N-Cadherin in Endothel-, Neuronal- oder Muskelzellen und P-Cadherin in embryonalen Geweben und in der Plazenta vorhanden, man findet sie aber auch in vielen andere Gewebetypen. VE-Cadherine findet man ebenfalls in Endothelzellen, wo sie Aufgaben bei der Angiogenese und vaskulären Permeabilität erfüllen [Li et al. 2000].

Cadherine sind homophil, d.h. sie bauen nur eine Bindung zwischen Zellen aus, die das gleiche Cadherin exprimieren. Sie bilden in der Zelle parallele Dimere aus, die mit einem identischen Cadherin- Dimer in der Nachbarzelle interagieren und überbrücken so den extrazellulären Raum. Die zytoplasmatische Seite der Cadherine interagiert mit Cateninen; dieser Komplex ist mit dem Aktinzytoskelett verknüpft. Dadurch wird die Zell- Zell-Adhäsion ermöglicht. Die Cateninfamilie hat 3 Mitglieder, α , β und γ -Catenin. α -Catenin spielt eine entscheidende Rolle bei der Adhäsion, β -Catenin ist vermutlich ein Bindeglied zwischen Cadherin und α -Catenin [Abbildung 1-10].

Auch in Hautzellen findet man Cadherine. E-Cadherin wird in den Keratinozyten und Langerhanschen Zellen exprimiert, P-Cadherin in den Keratinozyten der Basalschicht, N-Cadherin in den Fibroblasten und vaskulären Endothelzellen [Haass et al. 2004].

Der Zusammenhang zwischen Adhäsionsproteinen und Connexinen ist noch nicht vollständig geklärt. Man kann aber davon ausgehen, dass ein stabiler Kontakt zwischen zwei Zellen notwendig ist, um GJ aufzubauen [Jongen et al, 1991]. Die Inhibierung von E-Cadherin mit spezifischen Antikörpern in Teratocarcinomazellen führt zu einer Blockierung der GJC [Kanno et al. 1984, Jongen et al. 1991]. In Mausepithelzellen wurde nachgewiesen, dass die Abhängigkeit der GJ von Kalziumionen direkt mit der kalziumabhängigen Regulierung von E-Cadherin zusammenhängt [Jongen et al. 1991]. Anhand von immunozytochemischer Untersuchungen an NIH3T3- Zellen wird belegt, dass eine Kollokalisierung von Cx43 und N-Cadherin bzw. Proteinen die mit N-Cadherin assoziiert sind vorliegt. Weiterhin wurde in der Arbeit gezeigt, dass N-Cadherin und ihre assoziierten Proteine mit Cx43 koimmunopräzipitiert werden können, und dass der siRNA induzierte „*knockdown*“ von N-Cadherin auch zu einem Verlust von Cx43 führt [Wei et al. 2005].

Auch wenn die Interaktionen von Cadherinen und GJC bei der Entstehung von Hautkrebs Gegenstand vieler Untersuchungen ist, ist wenig bekannt über Veränderungen der GJC und Cadherinen nach UV-A Exposition.

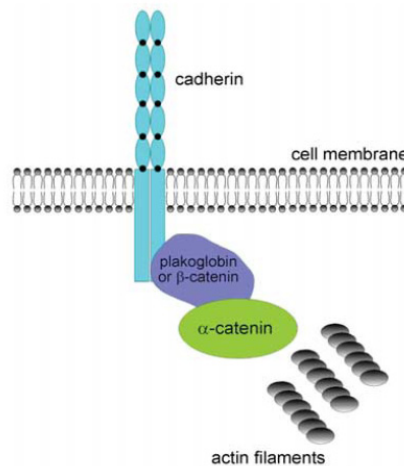


Abb. 1-10 Der Cadherin-Catenin- Komplex.

Das extrazelluläre Segment besteht aus 5 Cadherindomänen. Ca^{2+} -Ionen verbinden diese Domänen [Haass et al. 2004].

1.4.5.2 Gap Junctions und Carotinoide

Carotinoide beeinflussen die GJC. Eine Verbindung zwischen den antioxidativen Eigenschaften der Carotinoide und ihrer Wirkung auf die GJC konnte bisher nicht gezeigt werden [Zhang et al. 1992, Stahl et al. 1997]. Beispiele sind β -Carotin, α -Carotin, Lutein, Canthaxanthin und β -Cryptoxanthin, diese stimulierten die GJC im Zellkultorexperiment [Stahl et al. 1997, Bertram et al. 1990, Daubrawa et al. 2005]. Die Stimulierung geht in der Regel mit einer erhöhten Expression der Connexin Proteine einher. Ebenfalls korreliert die erhöhte Expression des Connexins nach Carotinoidbehandlung mit einer Wachstumskontrolle transformierter Zellen [Hossain 1993, Bertram 1995, Livny 2002]. Retinsäure stimuliert ebenfalls die GJC, die Stimulierung der GJC durch Carotinoide ist jedoch unabhängig von der Provitamin A Aktivität [Stahl et al. 2005].

Die Wirkungsweise der Carotinoide auf die Mechanismen der GJC ist noch nicht vollständig aufgeklärt.

In Mausfibroblasten (C3H/10T1/2) konnte folgende Reihenfolge für die stimulatorischen Effekte von Carotinoiden aufgestellt werden: β -Carotin > Canthaxanthin > Lutein > Lycopin > α -Carotin [Zhang et al. 1991].

Teilweise lässt sich der Wirkungsmechanismus der Carotinoide und die Struktur der Verbindungen korrelieren. Carotinoide mit einem C-6 Ring stimulieren die Kommunikation stärker als Carotinoide mit einem C-5 Ring, wobei die Position von Sauerstoff im Ringssystem kaum einen Einfluss hat [Stahl et al 1997].

Teilweise sind auch die Abbau- oder Oxidationsprodukte für die Wirkung auf die GJC verantwortlich. So konnte für Canthaxanthin gezeigt werden, dass zentrale Spaltprodukte wie all-trans- und 13-cis-4-oxo- Retinsäure die GJC stimulieren. Produkte der exzentrischen Spaltung von Canthaxanthin, sog. Apo-Carotinoide, zeigten keine stimulatorische Aktivität auf die GJC [Hanusch 1995, Teicher 1999].

Lycopin als acyclisches Carotinoid stimulierte die GJC. Methylbixin, ebenso ein acyclisches Carotinoid, dagegen nicht [Stahl 2005]. Im Falle von Lycopin sind vermutlich Lycopinderivate für die Stimulierung verantwortlich. Eine *in-vitro* Studie zeigte, dass das Oxidationsprodukt des Lycopins 2,7,11-Trimethyltetradecaheptaen-1,14-dial die GJC stimuliert [Aust et al. 2003]; ob diese Verbindung *in-vivo* entsteht ist ungewiss [Stahl 2005]. Im Blut konnte als Oxidationsprodukt von Lycopin das Epimer 2,6-cyclolycopene-1,5-diol nachgewiesen werden, welches vermutlich aus dem in Tomaten natürlich vorkommenden Lycopin-5,6-epoxid stammt. Dieser Metabolit stimuliert die GJC [Khachik et al. 2002, Stahl et al. 2005].

Während die genannten Carotinoide eine Stimulierung der GJC bewirken, inhibiert Astaxanthin die GJC konzentrations- und zeitabhängig in humanen Hautfibroblasten und Rattenleberepithelzellen. Dieser Effekt ist erstaunlich, da das strukturell verwandte Canthaxanthin die GJC stimuliert [Daubrawa et al 2005, Daubrawa 2006 Dissertation].

2 Ziel der Arbeit

Im ersten Teil der Arbeit sollten am Menschen die Effekte geringer Dosen von Ölen, die reich an langkettigen ungesättigten Fettsäuren sind, auf das Fettsäuremuster des Blutes, Oberflächenstruktur, Barrierefunktion (Hydratation) und Sensitivität der Haut untersucht werden. Dazu sollten folgende 12-Wochen Interventionsstudien durchgeführt bzw. verglichen werden:

- Gabe von Fischöl (reich an Eicosapentaensäure und Docosahexaensäure): Einfluss auf das Fettsäuremuster in Plasma und Erythrozyten der Probanden. Zusätzlich sollte das Verteilungsmuster der Fettsäuren im Cerumen der Probanden untersucht werden
- Applikation von Leinsamenöl (reich an α -Linolensäure) und Borretschöl (reich an γ -Linolensäure): Einfluss auf das Fettsäuremuster in Plasma und Erythrozyten, Effekte auf die Oberflächenstruktur, Barrierefunktion und Sensitivität der Haut
- Applikation von Leinsamenöl (reich an α -Linolensäure) und Distelöl (reich an Linolsäure): Einfluss auf das Fettsäuremuster in Plasma und Erythrozyten, Effekte auf Oberflächenstruktur, Barrierefunktion und Sensitivität der Haut

Im zweiten Teil der Arbeit sollte an Hautfibroblasten geprüft werden, welchen Einfluss UV-A Strahlen auf zelluläre Signalwege hat und inwieweit die Carotinoide β -Carotin, Lycopin, Astaxanthin und Canthaxanthin regulierend wirken. Untersucht werden sollten dazu *in-vitro* Zellviabilität, zelluläre Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies, Hämoxygenaseexpression und Lipidperoxidation. Zudem sollte der Einfluss von UV-Strahlen auf die zelluläre Kommunikation über Gap Junctions und die Expression von Adhäsionsproteinen untersucht werden.

3 Material und Methoden

3.1 Chemikalien

In der vorliegenden Arbeit wurden folgend aufgeführten Chemikalien, Geräte und Materialien verwendet. Die Herstellung sämtlicher wässriger Lösungen erfolgte mit membranfiltriertem Wasser, zu dessen Gewinnung eine Milli-Q® académic Reinstwasseranlage (Millipore GmbH, Eschborn) Anlage diente.

Antikörper:

anti- Cx43 (monoklonal, Kaninchen)	Sigma	Deisenhofen
anti- HO-1 (monoklonal, Maus)	Biomol	Hamburg
anti- N- Cadherin (monoklonal, Maus)	BD Bioscience	Heidelberg
anti- β - Catenin (polyklonal, Kaninchen)	BD Bioscience	Heidelberg
anti- GAPDH (polyklonal, Maus)	Chemikon	Eschborn
anti- Nrf2 (monoklonal, Kaninchen)	Abcam	Cambridge; UK
ImmunoPure® Peroxidase gekoppelter anti-Maus IgG (H+L) (Ziege)	Pierce Biotechnolgy INC	Bonn
Immuno Pure® Peroxidase gekoppelter anti- Kaninchen IgG (H+L) (Ziege)	Pierce Biotechnolgy INC	Bonn
Alexa 546 anti- Kaninchen IgG (Ziege)	Invitrogen GmbH	Karlsruhe
Alexa 488 anti- Maus IgG (Ziege)	Invitrogen GmbH	Karlsruhe

Sonstige Chemikalien:

Verwendete Lösemittel und Säuren stammten, soweit nicht anders angegeben, von der Firma Merck (Darmstadt), Zellkulturlösungen von PAA Laboratories (Pasching, A) oder Sigma (Deisenhofen).

Ammoniumpersulfat (APS),p.a	Serva	Heidelberg
β - Apo-8'-Carotinol	Fluka	Deisenhofen
BHT	Merck	Darmstadt
Bortrifluorid- Reagenz	Supelco	Deisenhofen
Bradford- Reagenz	Sigma	Deisenhofen
Bromphenolblau	Fluka	Seelze

Material und Methoden

Chemilumineszenz-Kit SuperSignal West	Pierce Biotechnology INC	Bonn
Complete Proteaseinhibitor	Roche	Mannheim
Dichlorofluoresceindiacetat	Sigma	Deisenhofen
Di-Natriumhydrogenphosphat	Merck	Darmstadt
DMSO	Fluka	Seelze
Docosapentaensäuremethylester	Sigma	Deisenhofen
Docosatetraensäuremethylester	Sigma	Deisenhofen
DTT	Sigma	Deisenhofen
EDTA	Merck	Darmstadt
EGTA	Sigma	Deisenhofen
Entwickler- und Fixiererkonzentrat	Adefo-Chemie GmbH	Dietzenbach
Fettsäuremethylester- Mischung	Supelco	Deisenhofen
Formaldehyd (methanolfrei 16%)	Polyscience	Eppelheim
Glycin	Roth	Karlsruhe
Kaliumchlorid	Merck	Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck	Darmstadt
Lithiumchlorid	Merck	Darmstadt
Lucifer Yellow CH, Dilithiumsalsz	Sigma	Deisenhofen
Methanolische Bortrifluorid- Lösung	CSChromatographie - Service	München
Milchpulver fettfrei, blotting grade	Roth	Karlsruhe
Natrium- Glycerolphosphat	Fluka	Seelze
Natriumchlorid	Merck	Darmstadt
Natriumdihydrogenphosphat- Monohydrat	Merck	Darmstadt
Natrium-Dodecylsulfat ultra pure, für die Elektrophorese	Roth	Karlsruhe
Natriumfluorid	Fluka	Seelze
Natriummethylat	Fluka	Seelze
Natriumvanadat	Fluka	Seelze
Ponceau S- Lösung	Sigma	Deisenhofen
Presicion Plus Standard Protein Marker	Biorad	München
ProLong® gold antifade Reagenz	Invitrogen	Karlsruhe
Rinder- Serum- Albumin	Biorad	München

Rotiphorese®Gel 40 (37,5:1)	Roth	Karlsruhe
Saccharose	Merck	Darmstadt
Sulforhodamine B	Sigma	Deisenhofen
TEMED (N,N,N-Tetramethylethylendiamin)	Serva	Heidelberg
Tetramethoxypropan	Fluka	Seelze
THF für Lumineszenz	Fluka	Seelze
Thiobarbitursäure	Fluka	Seelze
TRIS Pufferan®	Roth	Karlsruhe
TritonX 100	Sigma	Deisenhofen
Tween20	Sigma	Deisenhofen
Ziegen- Normalserum	Dianova	Hamburg

Gase

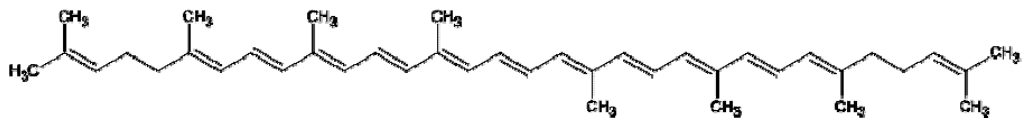
Alle verwendeten Gase (Stickstoff, Wasserstoff, synthetische Luft) stammten von der Firma Linde (Höllriegelskreuth) und hatten höchste Reinheit (5.0).

Verwendete Carotinoide

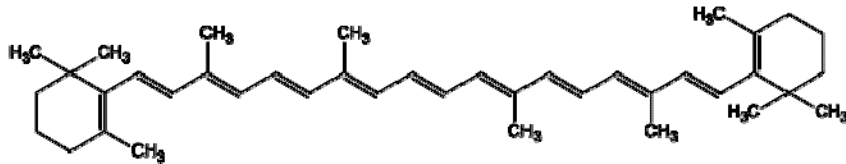
Zellkulturexperimente wurden mit Astaxanthin, Canthaxanthin, β -Carotin und Lycopin durchgeführt. Diese Verbindungen wurden freundlicherweise von Herrn Dr. Ernst (BASF - Ludwigshafen) zur Verfügung gestellt. Die Reinheit wurde mittels HPLC überprüft. Von jedem Carotinoid wurde eine Stammlösung (10 mmol/l) in THF hergestellt. Die Konzentration wurde nach Verdünnung 1:10000 am Photometer eingestellt. Dabei wurden die in Tabelle 3.1 aufgeführten Wellenlängen und Extinktionskoeffizienten verwendet. Die Stammlösungen wurden in Aliquots bei -80°C gelagert.

Tabelle 3.1 Extinktionskoeffizienten der Carotinoide

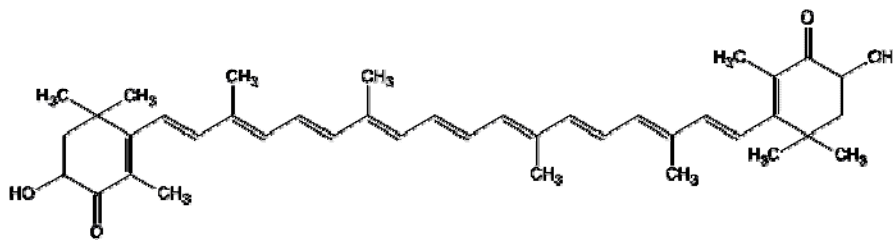
Carotinoid	Extinktionskoeffizient ϵ	Wellenlänge [nm]
	$\left(\frac{l}{\text{mol} \times \text{cm}} \right)$	
Astaxanthin	125100	470
Canthaxanthin	130000	470
β - Carotin	139000	451
Lycopin	184000	470



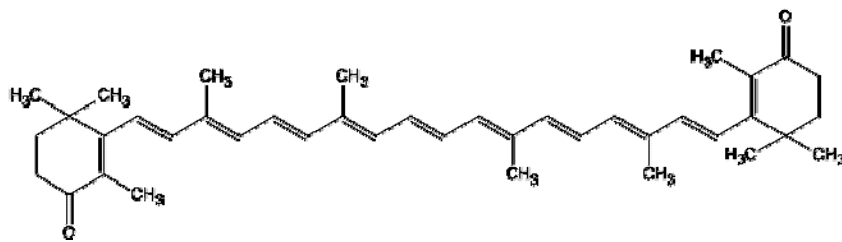
Lycopin



β-Carotin



Astaxanthin



Canthaxanthin

Abb. 3-1 *Strukturformeln der verwendeten Carotinoide*

3.2 Geräte

3.2.1 Gaschromatographie (GC) und Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)

HPLC:

Autosampler L-2200	Merck Hitachi	Darmstadt
Pumpe L-7100		
UV/VIS- Detektor L-7420		
Fluoreszenzdetektor L- 7480		
Interface L 7100		
Säulenofen 655A-52		

Gaschromatographie:

Clarus 500 mit integriertem Autosampler und Flammenionisationsdetektor (FID)	Perkin Elmer LAS GmbH	Rodgau- Jügesheim
Gaschromatograph gekoppelt mit Massenspektrometer (MS) (Automass 60) (Quadrupol- Technik)	Delsi- Nermag	Frankreich

Chromatographiesäulen:

50 %-Cyanopropylmethyl-50 % phenylmethylpolysiloxan (30 m; 320 µm)	Perkin Elmer LAS GmbH	Rodgau- Jügesheim
FFAP (Crossbond Carbowax PEG für freie Fettsäuren, 30m; 250µm)	Perkin Elmer LAS GmbH	Rodgau- Jügesheim
Suplex pKb-100	Merck Hitachi	Darmstadt
LiChrospher-100 RP-18 endcapped	Merck Hitachi	Darmstadt

Geräte zur Messung von Hautparametern

Corneometer CM 825 [®]	Courage & Khazaka electronics	Köln
Tewameter TM 300 [®]	Courage & Khazaka electronics	Köln
Visio Scan [®]	Courage & Khazaka electronics	Köln
Chromameter CR 300 [®]	Minolta	Ahrensburg
O2C- System	Lea Instruments	Giessen

Weitere Geräte

Mikroinjektionsanlage:

Mikromanipulator FemtoJet Typ S170	Eppendorf	Hamburg
Mikoinjektor InjectMan Typ 5242	Eppendorf	Hamburg
Fluoreszenzmikroskop Axiovert 100 TV	Zeiss	Jena
Digital Camera C4742	Hamamtsu	Herrsching a.Ammersee
Camera Controller C4742	Hamamtsu	Herrsching a.Ammersee
Begasungsbrutschrank	Binder GmbH	Tuttlingen
Elektrophoresekammer	Invitrogen	Karlsruhe
X Cell Sure Lock [™]		
Elisa Plate Reader; PowerWaveX	BioTek Instruments	Vermont USA
Fluoreszenz-Platten-Leser FluoStar Optima	BMG LabTec	Offenburg
HP Scanjet 2400	Hewlett Packard	Böblingen
Magnet Rührer IkamagRCT	IKA Labortechnik	Staufen i.Br
pH Meter 526	WTW	Weilheim
Pipetten	Eppendorf AG	Hamburg
Power Supply Consort E835	Merck Hitachi	Darmstadt
Schüttler Rotamax 120	Heidolph Instruments	Kelheim
Semi Dry Blotter	Roth	Karlsruhe
Sepateck Biofuge A	Heraus Instruments	Düsseldorf
Trockenschrank UT	Heraeus Instruments	Düsseldorf

Material und Methoden

Ultraschallbad Sonorex Super Digital	Bandelin electronics	Berlin
Universal30RF- Zentrifuge	Hettich AG	Mühlheim a.d.Ruhr
UV-Bestrahlungsapparatur Biosun®	Vilbert Lourmat	Marnè-la- Vallée, F
UV-VIS Spektrophotometer DU® 530	Beckmann Inc	Fullerton USA
Vortexer Relax 2000	Heidolph Instruments	Kelheim
Waagen: 1603MP und 2442	Sartorius AG	Göttingen
Wasserbad Typ 1083	GFLGmbH	Burgwedel

Materialien

Küvetten: No 67.742, 1dm, Plastik	Sarstedt AG & Co	Nümbrecht, D
Probengefäße GC:		
1,5ml Rollrand, Glas mit Bördelkappe, Septum	CsChromatographie Service	München
100µl Mikroeinsätze	Perkin Elmer LAS GmbH	Rodgau- Jüdesheim
Probengefäße HPLC:		
2,0ml Glasgewindeflaschen mit Septen (G8Sil/gS)	CSChromatographie Service	München
200µl Mikroeinsätzen (G30)		
Chemiluminescence BioMax Light Film	Sigma	Deisenhofen
Zellkulturmaterialien	Greiner	Frickenhausen
Objektträger	Greiner	Frickenhausen
Glasplättchen (Ø 25 mm)	Greiner	Frickenhausen
Gel- Blotting Papiere (580 x 580 mm)	Roth	Karlsruhe
Nitrocellulose Membran Hybond™-C Extra	Amersham Biosciences	Freiburg
Femtotips®	Eppendorf	Hamburg
Microloader	Eppendorf	Hamburg
Gelkassetten (10 x 10 cm, Dicke 1,5 mm)	Invitrogen	Karlsruhe
Zentrifugengläser	Welabo	Düsseldorf

Vacutainer®-System S-Monovetten	Becton Dickinson Sarstedt	Plymouth UK Nümbrecht
------------------------------------	------------------------------	--------------------------

Software

Total Chrom®	Perkin Elmer LAS GmbH	Rodgau- Jüdesheim
Aqua Cosmos Version 1.2®	Hamamatsu	Herrsching a. Ammersee
HPLC System Manager, D-7000 Multi HSM	Merck Hitachi	Darmstadt
Delsi-Nermag Lucy Version 3.22	Delsi- Nermag	Frankreich

Diese Arbeit wurde soweit nicht anders erwähnt mit dem Microsoft-Office Packet 2003 (Word, Excel, Power Point) erstellt.

Moleküle wurden mit dem Freeware- Programm ACD/Chem Sketch 8.00 (www.acdlabs.com) oder ChemDraw Version 11.0 Cambridge Soft erstellt.

Die Auswertung der Western Blots erfolgte mit dem Freeware Programm ImageJ 1.36b Wayne Rasband, National Institute of health (<http://rsb.info.nih.gov/ij>).

3.3 Analytik Fettsäuren

3.3.1 Fettextraktion aus biologischem Material: Plasma, Erythrozyten und Cerumen

Die Extraktion von Rohfett aus biologischem Material wurde in Anlehnung an Folch et al. [Folch et al. 1951, Ferraz et al. 2004, Oette et al. 1968] durchgeführt. Plasmaproben wurden in ein Zentrifugenglas mit Schraubverschluss und Teflondichtung überführt und mit der 10 fachen Menge einer Chloroform/Methanolmischung 2:1 (0,02% BHT als Antioxidant) überschichtet. Eingesetzt wurde 0,5 ml der Probe. Die Mischung wurde 45 Minuten bei 37°C im Wasserbad durchmischt. Nach Zugabe von 0,9% NaCl- Lösung (w/v) (20% der eingesetzten Extraktionsmenge) wurde 10 Minuten bei 2000 U/min (4°C) zur Phasentrennung zentrifugiert. Die untere lipophile Phase wurde entnommen, der Rückstand zweifach mit ca. 0,5 ml einer Mischung aus MeOH/ NaCl 0,9%/ CHCl₃ 49:48:3 v/v/v- Mischung gewaschen und die lipophilen Phasen vereint.

Zur Zerstörung der Erythrozyten wurde die Probe mit der fünffachen Menge Methanol versetzt und ca. 1 Minute bei Raumtemperatur auf dem Vortexer konstant vermischt, anschließend wurde die gleiche Menge an Chloroform (0,04% BHT) zugesetzt. Die Probenmenge war 0,5-1 ml. Zur Extraktion des Rohfettes wurde die Mischung 45 Minuten bei Raumtemperatur gemischt und danach bei 2000 U/min (4°C) zentrifugiert. Die untere lipophile Phase wurde entnommen und die Extraktion mit dem Rückstand wiederholt. Zu den vereinigten Extrakten wurde 0,9% NaCl- Lösung (w/v) (20% der eingesetzten Probenmenge) gegeben. Nach Phasentrennung wurde die wässrige Phase mit einer Glaspipette entfernt und die organische Phase weiter aufgearbeitet.

Zur Extraktion der Fette aus den Cerumenproben wurden 5 ml der Chloroform/Methanolmischung 2:1 (0,02% BHT) auf die Probe gegeben. Die Aufarbeitung erfolgte analog den Plasmaproben, die Extraktion wurde zweimal wiederholt.

3.3.2 Transmethylierung der Fettsäuren

Die Fettextrakte nach 3.3.1 wurden unter einem Stickstoffstrom unter leichter Erwärmung (37°C) zur Trockene eingedampft. Die alkalische Transmethylierung der gebundenen Fette in Plasma- und Erythrozytenproben erfolgte in Anlehnung an Oette et al. [Oette et al. 1968]. Dazu wurde das trockene Rohfett mit Transmethylierungsreagenz (3% Natriummethylatlösung in Methanol¹) unter Wasserausschluss in einem

¹ Methanol vor dem Lösen des Natriummethylates über Na₂SO₄ trocknen, die Lösung muss jeden Tag frisch angesetzt werden

Zentrifugenschraubglasgefäß mit Teflondichtung 60 Minuten bei 60°C unter regelmäßigem Schütteln inkubiert. Für Plasmaproben wurden 3 ml bei den Erythrozytenproben 2 ml Transmethylierungsreagenz zugesetzt.

Nach Abkühlen der Mischung wurde eine äquimolare Menge an Salzsäure zur Neutralisation und Inaktivierung der Reaktion zur Probe gegeben. Die entstanden Fettsäuremethylester (FAME) wurden zweifach mit 3 ml Hexan extrahiert und die vereinigten Extrakte auf 350 µl eingengt. Das Konzentrat wurde in GC-Probengefäße überführt und konnte nach Versiegelung mit einer Metallkappe mit Teflondichtung bei -80°C bis zur Analyse gelagert werden.

Das Rohfett der Cerumenproben wurde mit 2 ml einer methanolischen Bortrifluorid- Lösung (10% w/w) versetzt und 1h bei 80°C erhitzt. Der Extrakt wurde anschließend mit 1 ml Wasser versetzt, die FAMES zweifach mit 2ml Hexan extrahiert, auf 100 µl eingengt, in GC-Probengefäße, die mit Glasinserts versehen wurden, überführt und ebenfalls versiegelt. Da die Inserts bei -80°C zerspringen, wurden die Proben bei -20°C bis zur Analyse gelagert.

Das Öl der Supplemente wurde mit methanolischer Natriummethylatlösung transmethyliert.

3.3.3 Gaschromatographie- Flammenionisationdetektion

Die Analyse der FAMES erfolgte gaschromatographisch in Kombination mit einem Flammenionisationsdetektor (FID). Die Identifizierung der einzelnen Fettsäuren erfolgte mit einer FAME-Standardmischung (Supelco) (Abbildung 3-2), Docosatetraensäure und Docosapentaensäure mit Einzelstandards. War eine Identifizierung mit den externen Standards nicht möglich, wurden die Proben zusätzlich mit jeweiligen Fettsäuremethylester-Einzelstandards dotiert.

Die Auswertung erfolgte entsprechend der gängigen Praxis über die 100%- Methode, in der die Flächen aller Signale summiert und die relative Menge der einzelnen identifizierten Signale berechnet wurde. Da es sich um eine relative Methode handelte, konnte auf die Korrektur mit einem externen oder internen Standard verzichtet werden.

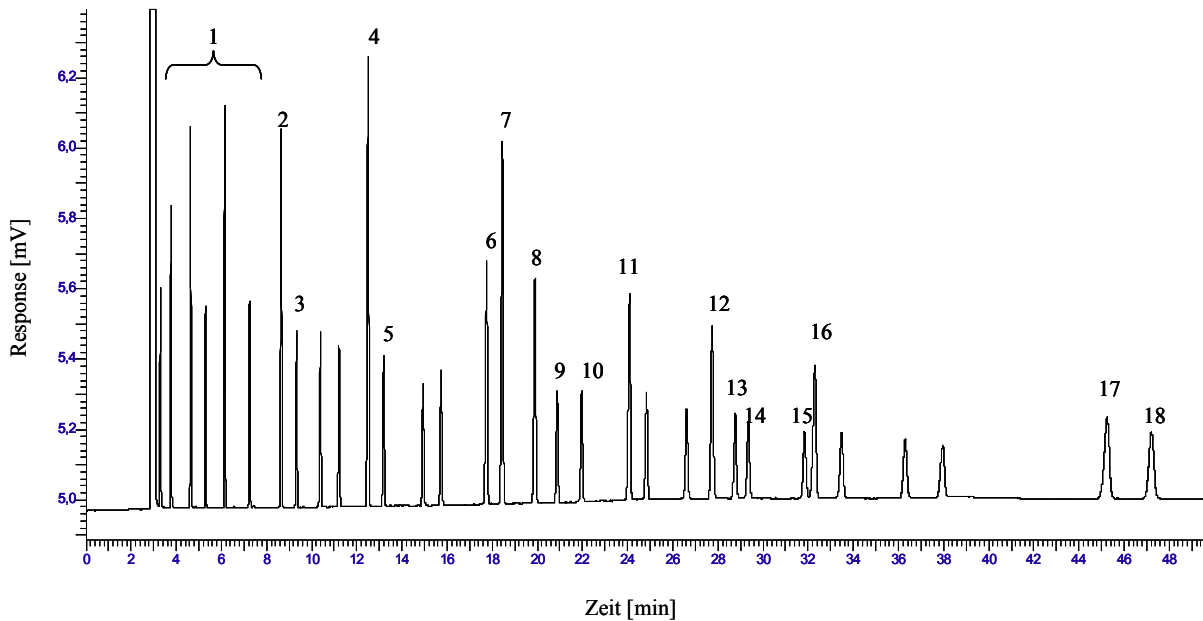


Abb. 3-2 GC-Chromatogramm des Fettsäuremethylester (FAME)-Standards (Säule FFAP; GC-Bedingungen gemäß Interventionstudie I)

Bezeichnet sind nur die für die nachfolgenden Analysen relevanten Fettsäuren
1: kurzkettige Fettsäuren; **2:** Myristinsäure; **3:** Myristoleinsäure;
4: Palmitinsäure; **5:** Palmitoleinsäure; **6:** Stearinsäure; **7:** Ölsäure; **8:**
 Linolsäure; **9:** γ -Linolensäure; **10:** α -Linolensäure; **11:** Arachinsäure; **12:** ω -
 6 Eicosatriensäure (Di-homo- γ -Linolensäure); **13:** Arachidonsäure, **14:** ω -3
 Eicosatriensäure; **15:** ω -3 Eicosapentaensäure; **16:** Behensäure; **17:**
 Lignocerinsäure; **18:** Docosahexaensäure

3.3.4 Gaschromatographie- Massenspektroskopie (GC-MS)

Die aufgearbeiteten und methylierten Cerumenproben wurden zusätzlich mit Hilfe der GC-MS vermessen. Die Messung erfolgte in Kooperation mit PD Dr. Friedhelm Marx und Heinz Fabricius (Institut für Lebensmittelwissenschaften der Universität Bonn).

3.3.5 Probennahme Blut und Cerumen

Zur Blutentnahme wurde das Vacutainer®-System (Becton Dickinson) in Kombination mit 10 ml ETDA-beschichteten Plastikröhrchen (S-Monovetten) verwendet. Die Blutproben wurden unmittelbar nach der Entnahme bei 5000 U/min (4°C) zentrifugiert und der Plasmaüberstand in ein PP- Röhrchen überführt. Nach zweimaligem Waschen mit 0,9% NaCl (w/v) und erneutem Zentrifugieren, wurden die Erythrozyten ebenfalls in ein PP- Röhrchen überführt. Die Proben wurden bis zur Analyse bei -80°C eingefroren.

Cerumen wurde mit Hilfe handelsüblicher Wattestäbchen (Bel Nature Hartmann), welche mit fettfreiem Vlies (Vliwasoft Lohmann Rauscher) umwickelt waren, von den Probanden selbst entnommen. Das Vlies wurde direkt, ohne Wattestäbchen, in ein Glaszentrifugenschraubgefäß überführt und bei -20°C bis zur Analyse gelagert.

Da eine Trennung des Cerumens vom Vlies vor der Fettextraktion nicht möglich war, wurde im Vorfeld sichergestellt, dass das Vlies keinen störenden Einfluss auf die Analytik hatte.

3.4 Interventionstudien

3.4.1 Bestimmung des Fettsäuremusters in Plasma, Erythrozyten und Cerumen nach Supplementierung mit Fischölkapseln

In dieser Studie wurden 3 Probandinnen handelsübliche Fischölkapseln (Ameu Omega Pharma GmbH, gemäß Herstellerangaben: 70 mg EPA, 50 mg DHA/Kapsel) verabreicht.

Studiendauer war 12 Wochen, dabei wurden von den Probanden 2 Kapseln am Tag vor einer beliebigen Mahlzeit eingenommen, dies entsprach 1 g Fischöl pro Tag, Probennahme erfolgte zu den Zeitpunkten 0, 2, 4, 6, 10 und 12 Wochen. Untersucht wurde die Fettsäurezusammensetzung in Plasma, Erythrozyten und Cerumen.

Die Probanden waren Freiwillige des Institutes für Biochemie und Molekularbiologie I der Universität Düsseldorf, alle weiblich (27-29 Jahre). Nach Möglichkeit sollten möglichst wenige Fischmahlzeiten während der Studie verzehrt werden. Am Tag vor der Blutentnahme sollte auf Alkohol und fettreiche Mahlzeiten verzichtet werden. Die Blutentnahme erfolgte nüchtern.

Von einem Probanden waren keine Blutproben zu den Zeitpunkten 2 und 6 Wochen zu entnehmen. Von einem anderen Probanden ließen sich die Erythrozyten zum Zeitpunkt 10 Wochen nicht analysieren.

Die Analyse der Blut- und Cerumenproben erfolgte gemäß Abschnitt 3.3. Folgende gaschromatographischen Bedingungen wurden angewendet:

Tabelle 3.2 GC- Bedingungen: Fischölstudie

	Blut	Cerumen
Säule	FFAP (Crossbond Carbowax PEG für freie Fettsäuren, 30m 250µm)	
Trägergas	Stickstoff, Druckkontrolliert: 70 kPa	
Injektionsvolumen	Plasma: 2 µl	Erythrozyten: 3 µl
Split	1:10	
Injektortemperatur	240°C	
Ofenprogramm	150°C → 190°C (20°C/min) → 235°C (1°C/min) (35 Minuten)	190°C → 230°C (1°C/min) (30 Minuten)
Detektor	260°C	240°C
Make-Up-Gas	Synthetische Luft	
FID-Gas	Wasserstoff	
Auswertesoftware	Total Chrom von PE	

Cerumenproben wurden zusätzlich mittels GC-MS vermessen. Dafür wurden folgende Bedingungen gewählt:

GC	Delsi DI der Fa. Delsi- Nermag (Frankreich)
Säule	BPX5, Länge 25m, 0,22 mm i.D., 0,25µm Filmdicke
Trägergas	Helium druckkontrolliert 0,5bar
Injektionsvolumen	1 µl
Split	1:20
Injektortemperatur	310°C
Ofenprogramm	130°C → 310°C (5°C/min)
Detektortemperatur	260°C
Temperatur der Transferleitung zur MS:	240°C
Massenspektrometer	Automass 60 (Quadrupol- Technik)
Ionenquelle	200°C; EI-Modus, 70eV
Multiplifier-Spannung	800V
Massenbereich	41-500 m/z
Auswertesoftware	Delsi-Nermag Lucy Version 3.22
Spektrenbibliothek:	NIST Gaithersbury USA

3.4.2 Interventionsstudie I: Effekte der oralen Applikation von Leinsamenöl und Borretschöl auf die Haut

Interventionsstudie II: Effekte der oralen Applikation von Leinsamenöl und Distelöl auf die Haut

In der ersten Studie wurde der Einfluss von Leinsamenöl (*Linum usitatissimum*; α -linolensäurereich) und Borretschöl (*Borago officinalis*; γ -linolensäurereich) auf das Fettsäuremuster im Blut und auf Eigenschaften der Haut überprüft.

Dafür wurden je 15 weiblichen Probanden über einen Zeitraum von 12 Wochen entsprechende Nahrungssupplemente in Form von 4 Weichgelatinekapseln (2 Kapseln morgens, 2 abends) gegeben. Die Zusammensetzung der Kapseln ist in Tabelle 3.3 wiedergegeben. Die Placebogruppe (ebenfalls 15 Probanden) erhielt Kapseln mit kurzkettigen triglyceridisch gebundenen Fettsäuren. Diese Studie wurde monozentrisch, randomisiert und doppelblind durchgeführt.

Folgende Bedingungen wurden an die Probandinnen gestellt:

Alle Studienteilnehmerinnen waren zwischen 20-65 Jahre alt und hatten einen BMI von 18-25kg/m². Über die Altersverteilung in den verschiedenen Gruppen gibt Tabelle 3.4 Auskunft. Der Gesundheitszustand war allgemein gut, alle Probandinnen waren Nichtraucher, weder schwanger noch in der Stillphase. Bekannte Malabsorptionskrankheiten, Lebererkrankungen und Erkrankungen des Lipidstoffwechsels wurden ebenfalls ausgeschlossen. Die Einnahme von für die Studie relevanten Medikamenten und von Vitaminsupplementen wurde ebenfalls ausgeschlossen. Die Ernährungsgewohnheiten sollten normal sein. Die Haut der Studienteilnehmerinnen sollte sensitiv und trocken sein. Sie sollten keine photosensitiven Erkrankungen aufweisen, intensives Sonnenbaden in den Monaten vor und während der Studie war untersagt. Die Probanden der Studie wurden vom Dermatologischen Institut in Witten- Herdecke rekrutiert, sie erhielten alle detaillierte Informationen über den Ablauf der Studie und gaben ihr schriftliches Einverständnis.

Abweichend zu dieser Studie wurde in der Interventionsstudie II jeweils 13 Probandinnen 4 Kapseln (2 morgens, 2 abends) ebenfalls Leinsamenöl, 13 Probandinnen jedoch Distelöl (*Carthamus tinctorius*, linolsäurereich) gegeben. Diese Studie wurde doppelblind durchgeführt. Weitere Bedingungen entsprechen der Interventionsstudie I. Angaben über die Altersverteilung ist nur für das gesamte Probenkollektiv möglich und in Tabelle 3.5 aufgeführt. Die Interventionsstudie II wurde in Zusammenarbeit mit Dr. Karin Neukam durchgeführt und ist ebenfalls in ihrer Dissertation aufgeführt [Neukam Dissertation 2006].

Tabelle 3.3 Zusammensetzung der in den Interventionsstudien verwendeten Öle

	Leinsamenöl	Borretschöl	Distelöl	Placebo
Ölmenge pro Kapsel (Hauptbestandteil)	555mg (α -Linolensäure: 227mg)	555 mg (γ -Linolensäure: i.e. 125 mg)	559mg	565 mg (hauptsächlich Capryl- und Caprinsäure)
α - Tocopherolgehalt pro Kapsel	2,5mg	2,5mg	---	---
Rosmarinextrakt Gehalt pro Kapsel	0,83 mg	---	0,83 mg	---

Tabelle 3.4 Probanden in Interventionsstudie I; unterteilt in verschiedene Altersgruppen

	Anzahl der Probanden in jeder Altersgruppe (n)		
	Leinsamenöl- Gruppe	Borretschöl- Gruppe	Placebo- Gruppe
20-30 Jahre	2	7	3
31- 40 Jahre	1	4	4
41- 50 Jahre	7	3	4
51-60 Jahre	4	1	3
61- 65 Jahre	1	---	1

Tabelle 3.5 Probanden der Interventionsstudie II; unterteilt in verschiedene Altersgruppen

	Anzahl der Probanden in jeder Altersgruppe (n)
20-30 Jahre	4
31- 40 Jahre	6
41- 50 Jahre	12
51-60 Jahre	3
61- 65 Jahre	1

3.4.3 Blutuntersuchungen Interventionsstudien

3.4.3.1 Bestimmung der Fettsäuremuster in Plasma und Erythrozyten

Die Bestimmung des Fettsäuremusters erfolgte gemäß Abschnitt 3.3; Gaschromatographische Bedingungen siehe Tabelle 3.6:

Tabelle 3.6 GC- Bedingungen Interventionsstudien

	Interventionsstudie I	Interventionsstudie II
Säule	FFAP (Crossbond Carbowax PEG für freie Fettsäuren, 30m 250µm)	50 %-Cyanopropylmethyl-50 %-phenylmethylpolysiloxan, 320 µm / 30 m
Trägergas	Stickstoff, druckkontrolliert: 70 kPa	Stickstoff, druckkontrolliert: 50 kPa
Injektionsvolumen	Plasma, Nahrungssupplemente 2 µl; Erythrozytenproben 3 µl	
Split	1:10	
Injektortemperatur	240°C	230°C
Ofenprogramm	150°C→190°C (20°C/min) → 235°C (2°C/min) (35 Minuten)	120°C→160°C (20°C/min) →220°C (1°C/min) (30 Minuten)
Detektor	260°C	
Make-Up- Gas	Synthetische Luft	
FID- Gas	Wasserstoff	
Auswertesoftware	Total Chrom	

3.4.3.2 Triglyceride

Die Triglyceridkonzentration wurde zu den Zeitpunkten 0, 6 und 12 Wochen nur in den Plasmaproben der Interventionsstudie I untersucht. Die Bestimmung erfolgte durch die Medizinischen Laboratorien Düsseldorf.

3.4.3.3 HPLC- Analytik der Carotinoide

Die Konzentrationsbestimmung der Carotinoide und Tocopherole im Plasma wurde analog in beiden Studien gleich durchgeführt. Dafür wurden in einem PP-Reaktionsgefäß 150µl Blutplasma mit 1 ml Kaliumphosphatpuffer² gemischt. Zur Proteinfällung wurde 1 ml Ethanol, als interner Standard β-apo-8'-carotenol zugefügt. Nach Zufügen von 6 ml Extraktionsmittel (Hexan/Dichlormethan 5:1 + 0,01% BHT) wurden die Proben 1 Minute geschüttelt und 5 Minuten im Ultraschallbad behandelt, wiederum geschüttelt und zur Phasentrennung bei 5000 U/min 10 Minuten zentrifugiert. 5 ml der organischen Phase wurde in ein neues PP-Reaktionsgefäß überführt und unter Stickstoffstrom zur Trockene eingedampft. Mit Diethylether wurde die Wand der Röhren gespült und erneut getrocknet. Der Rückstand wurde in 20 µl Dichlormethan und 200 µl Fließmittel (Mobile Phase) aufgenommen, in HPLC-Mikroinserts überführt und mit Hilfe der HPLC vermessen. Die HPLC- Bedingungen sind in Tabelle 3.7 aufgeführt.

Tabelle 3.7 HPLC- Bedingungen: Carotinoidanalytik

Säule:	pKb-100, 25 cm x 4,6 mm, 5 µm
Mobile Phase	Methanol:ACN:Propanol (54:44:2)
Gradient	Isokratisch
Fluss:	1 ml/min
Temperatur:	20°C
UV-VIS Detektion	450 nm
Injektionsvolumen:	50 µl

² KH₂PO₄ 2 mM, K₂HPO₄ 2 mM, EDTA 0,3 mM; pH 7,2

3.4.4 Untersuchung der Oberflächenstruktur, der Hydration, des transepidermalen Wasserverlustes und der Sensitivität der Haut

Folgende Untersuchungen wurden in Kooperation in dem Institut für Dermatologie der Universität Witten Herdecke durchgeführt; analog in beiden Interventionsstudien:

3.4.4.1 Bestimmung der Oberflächenstruktur der Haut mittels SELS-Verfahren (SELS= Surface Evaluation of Living Skin) [Tronnier et al. 1999]

Bei dem SELS-Verfahren handelt es sich um eine Messung der Oberflächenstruktur der Haut. Dabei wird unter Speziallicht die Oberfläche photographisch mit einer CCD Kamera dargestellt. Das aufgenommene Bild wird anschließend mittels *Skinviviometer*-Software elektronisch verarbeitet und analysiert. Die Software wertet dabei 4 verschiedene Hautparameter aus: Schuppigkeit, Rauhigkeit, Glätte und Faltigkeit. Die Ergebnisse werden in relativen Einheiten [A.U.] angegeben.

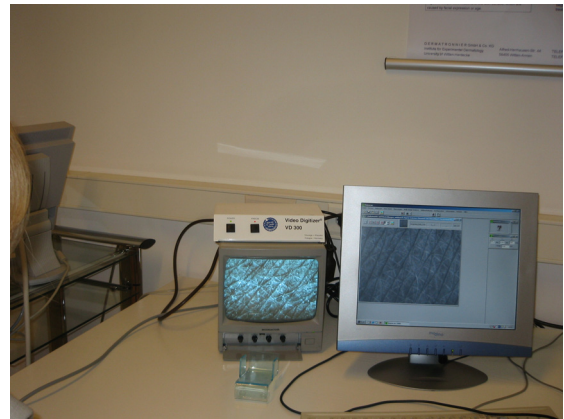


Abb. 3-3 Messung der Oberflächenstruktur der Haut mit dem SELS-Verfahren

3.4.4.2 Messung der Hauthydration und des transepidermalen Wasserverlustes (TEWL) [Heinrich et al. 2003a; Rodrigues et al. 2004]

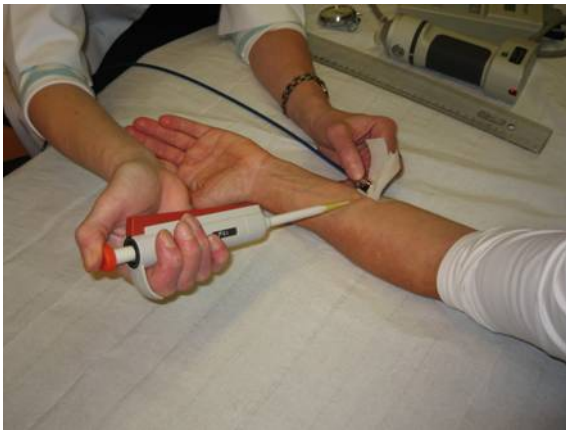
Die Hauthydration wurde mit Hilfe des Corneometers CM 825® bestimmt. Es handelt sich hierbei um eine kapazitative Messmethode, die ausnutzt, dass sich je nach Wassergehalt im Stratum corneum die dielektrischen Eigenschaften ändern.

Der TEWL wurde mit dem Tewameter TM 300® bestimmt. Bestimmt wird der kontinuierliche Wasserverlust über die Haut an die Umgebung, nicht der Verlust durch aktives Schwitzen. Der TEWL kann als Maß für die Barrierefunktion der Haut angesehen werden.

3.4.4.3 Nicotinat- Test [Primavera et al. 2005]

Beim Nicotinatstest wird durch topische Applikation von 0,25% Nicotinatlösung ($5\mu\text{l}/\text{cm}^2$) eine Entzündung hervorgerufen. Nach einem festgelegten Zeitraum wird die Rötung mit Hilfe eines Chromameters vermessen (siehe Abbildung 3-4). Die Hautfarbe vor und nach der Entzündung wird in Relation gesetzt und als Δa Einheiten angegeben. Zusätzlich wurde der kapillare Blutfluss mit Hilfe des O2C® Systems (oxygen to see) bestimmt. Das Messprinzip beruht auf dem Laser-Doppler-Effekt. Neben der Rötung ist ein gesteigerter Blutfluss ein Charakteristikum einer Entzündung. Der Messwert wurde in relativen Einheiten [A.U.] angegeben.

A



B



Abb. 3-4 Nicotinatstest

A: Applikation der Nicotinatlösung

B: Bestimmung des Δa -Wertes mit dem Chromameter CR 300

3.5 Methoden Zellkultur

3.5.1 Allgemeine Zellkultur

3.5.1.1 Zelltyp

Die hier vorliegende Arbeit wurde mit gesunden humanen Hautfibroblasten (HdF) von Praeputien eines männlichen Spenders durchgeführt. Die Zellen wurden freundlicherweise von Prof. Dr. Peter Brenneisen und Dr. Dominik Stuhlmann (Institut für Biochemie und Molekularbiologie I, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf) zur Verfügung gestellt. Zellen wurden bis Passage 20 kultiviert und genutzt.

3.5.1.2 Stammhaltung und Anzucht der Zellen

Zellen wurden in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) in einer wasserdampfgesättigten, 37°C warmen Atmosphäre mit 5% Kohlendioxid kultiviert. Das Medium wurde mit 10% hitzeinaktiviertem fötalen Rinderserum (FBS), 2mM Glutamax und Penicillin/Streptomycin (20mg/ml) (Komplettmedium) supplementiert. Nach Erreichen einer 80-90% igen Konfluenz wurden die Zellen mit Phosphat-Puffer (phosphat buffered saline – PBS³) gewaschen und anschließend mit Trypsin-EDTA (50% in PBS) abgelöst. Nach 2-3 Minuten wurde die Reaktion mit Anzuchtmedium gestoppt und die resuspendierten Zellen in entsprechende Kulturschalen bzw. Kulturflaschen überführt. Das Teilungsverhältnis für Kulturflaschen betrug 1:5, für Kulturschalen wurden die Zellen zusätzlich 1:5 bis 1:10 verdünnt. Bis zum Erreichen der gewünschten Zelldichte wurde das Kulturmedium alle 3-4 Tage gewechselt.

3.5.1.3 Einfrieren und Auftauen der Zellen

Zellen wurden in möglichst frühen Passagen kryokonserviert. Dafür wurde nach dem Ablösen der Zelle mit Trypsin/EDTA die entstandene Zellsuspension zentrifugiert (ca. 2000 U/min, 5 Minuten). Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet im Einfriermedium (DMEM, 20% FBS und 10% DMSO; Konzentration 10⁶ Zellen/ml) aufgenommen. Die Zellsuspension wurde in spezielle Kryoröhrchen überführt und bei -80°C eingefroren.

Zum Auftauen der Zellen wurden diese bei Raumtemperatur zügig angetaut und in 75cm³ Kulturflaschen überführt. Zur Vermeidung von Membranschäden durch das enthaltene DMSO, wurde das Medium spätestens nach 24h gewechselt.

³ Selbst hergestellt: NaCl 140mmol/l, KCl 2,68mol/l, Na₂HPO₄·H₂O, KH₂PO₄ 1,47mmol/l; pH 7,2-7,4

3.5.1.4 Inkubationsbedingungen und Bestrahlung der Zellen

Die Zellen wurden, soweit nicht anders beschrieben, in Kulturschalen bis zur 90% igen Konfluenz kultiviert. Vor der Inkubation wurden die Zellen 24h in einem Medium, welches 3% FBS enthielt, kultiviert.

Aus den Carotinoidstammlösungen (siehe Abschnitt 3.1.1) wurden durch Verdünnen in 3% FBS- haltigen Kulturmedium Carotinoidlösungen der Konzentration 10 $\mu\text{mol/l}$ hergestellt. Die THF- Endkonzentration betrug dabei 0,1%. Ein Medium für die Kontrollzellen nur mit Lösemittel wurde ebenfalls hergestellt. Die Carotinoidlösungen wurden für jede Versuchsreihe frisch angesetzt. Die Inkubationzeit mit den Substanzen betrug 24h.

Nach der Inkubation wurden die Zellen zweifach mit PBS und einmal mit Hank's Buffered Saline (HBSS) gewaschen. Anschließend wurden die Kulturschalen mit HBSS überschichtet und die geöffneten Kulturschalen mit UV-A (Biosun) bestrahlt. Die Intensität der Bestrahlung wird während der Bestrahlung regelmäßig und automatisch bestimmt, sie betrug durchschnittlich 4,8 mW/cm^2 . Daraus berechnete sich je nach gewünschter Bestrahlungsdosis die Bestrahlungszeit. Sie betrug z.B. für eine Dosis von 10 J/cm^2 UV-A zwischen 32 und 40 Minuten.

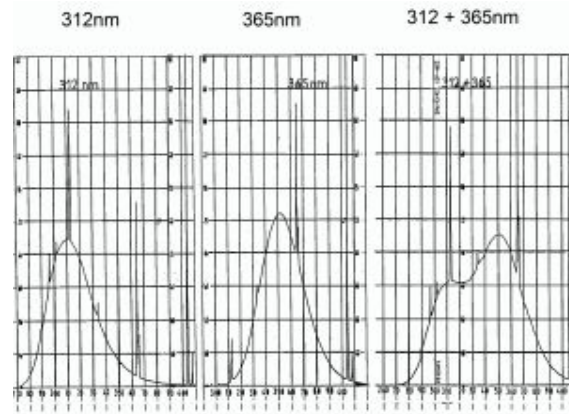


Abb. 3-5 Spektren der Bestrahlungssapparatur Biosun (Fa. Vilbert Lourmat)

3.5.2 Proteinbestimmung

Die Proteinbestimmung der Zellproben erfolgte nach Bradford [Bradford 1976] mit einer handelsüblichen Fertiglösung der Firma Sigma. Die Reaktion basiert auf einer Komplexbildung von Brilliant Blau G mit den Proteinen. Die Menge des gebildeten Komplexes ist direkt proportional zur Proteinkonzentration. Die Fertiglösung ist geeignet für Proteinlösungen mit einer Konzentration zwischen 0,1–1,4 mg/ml . Die Probenlysate aus den einzelnen Versuchen wurden entsprechend verdünnt (Tabelle 3.8).

Nach Zusammenfügen des Zelllysates und der Bradfordlösung in einer Kunststoffküvette wurden die Proben nach mindestens 5 Minuten Reaktionszeit im Photometer bei 590 nm vermessen. Zur Konzentrationsberechnung wurde jeweils eine Regressionsgerade mit Rinderserumalbumin erstellt.

Die hier verwendeten HdF- Zellen hatten eine durchschnittliche Proteinmenge von 2,6 ng/Zelle. Die Zellzahl wurde mit der Neubauer Zählkammer bestimmt.

Tabelle 3.8 Verdünnung der Probenlysate zur Proteinbestimmung nach Bradford (Zelllysate:Bradford:H₂O)

Versuch	Menge Zelllysate [μ l]	Bradford [μ l]	H ₂ O [μ l]
Western Blot (Abschnitt 3.5.8)	6	500	500
MDA (Abschnitt 3.5.6)	5	85	20

3.5.3 Bestimmung der Zellviabilität SRB-Assay [Skehan et al. 1990]

Bei dem SRB-Assay handelt es sich um einen *in-vitro* Toxizitätstest bei dem die negativ geladenen Sulfoniumgruppen von Sulforhodamin B mit den positiven Gegenionen der Aminosäuren von zellulären Proteinen elektrostatisch gebunden werden. Die Proteinmenge korreliert mit der Zellzahl. Sulforhodamin B lässt sich photometrisch vermessen.

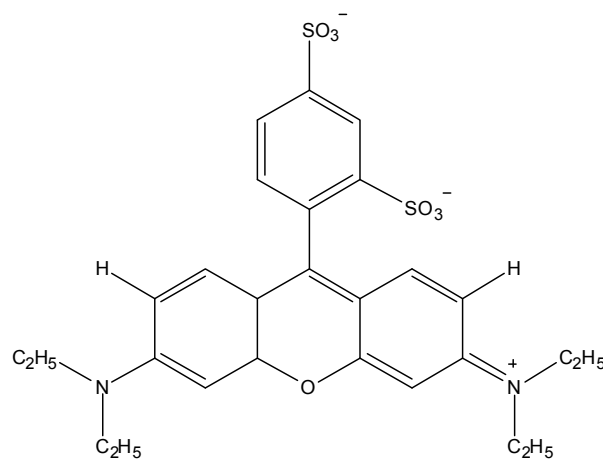


Abb. 3-6 Struktur von Sulforhodamin B

Die Zellen wurden für den Test gemäß Abschnitt 3.5.1.4 in „24-Well-Platten“ kultiviert. Nach Absaugen des Kulturmediums wurde 4°C kalte Trichloressigsäure (10% w/v) zur Fixierung auf die Zellen gegeben. Nach einer einstündigen Inkubationszeit bei 4°C wurden die Platten mehrfach mit bidestilliertem Wasser gewaschen. Nach Trocknung der Zellen bei Raumtemperatur wurden, zur Bildung des Sulforhodamin-Protein-Komplexes, die fixierten Zellen in 400 µl SRB-Lösung (0,4% w/v) 10 Minuten inkubiert. Überschüssiger Farbstoff wurde anschließend mit 1% iger Essigsäure (v/v) entfernt.

Nach erneuter Trocknung wurde der Farbstoff mit 130 µL TRIS-Lösung (10 mmol/l) resuspendiert. Die photometrische Messung erfolgte nach Überführung der TRIS-SRB-Lösung auf eine „96-Well“ Platte bei 492 nm in einem Elisa Plate- Reader. Die Absorption von Schwebeteilchen wurde bei 620 nm gemessen und vom ursprünglichen Messwert abgezogen.

Zusätzlich wurde die Morphologie der Zellen mit Hilfe einer Digitalkamera (C4742) dokumentiert.

3.5.4 Messung von DCF als Marker für die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies

ROS- Spiegel in der Zelle lassen sich mit DCF-DA (Dichlorofluorescein-diacetat) untersuchen. Der Farbstoff ist zellmembranpermeabel und wird nach Spaltung der Estergruppen durch zelleigene Esterasen impermeabel. Durch reaktive Sauerstoffspezies wird der Farbstoff zu DCF (Dichlorofluorescein) oxidiert. Diese Verbindung lässt sich bei einer Anregungswellenlänge von 485 nm und einer Emissionswellenlänge von 520 nm nachweisen. Für die Messung wurden die Zellen in einer „24-Well-Platte“ bis zur Konfluenz kultiviert. Abweichend vom allgemeinen Inkubationsprotokoll (Abschnitt 3.7.1.4) wurden die Zellen jedoch in FBS-freiem Medium 24h konditioniert. Unmittelbar nach der Bestrahlung gemäß Protokoll wurde das HBSS-Medium entfernt und mit 0,5 ml einer DCF-DA-Lösung (100 µM in HBSS⁴) überschichtet. Anschließend wurde die Fluoreszenz 85 Minuten im 5 Minuten Intervall gemessen. Dabei wurde jede Probe 30 mal vermessen und über alle gemessenen Werte gemittelt.

⁴ hergestellt aus einer 100 mM DCF-DA-Lösung in DMSO durch eine 1:1000 Verdünnung in HBSS, Stammlösungen wurden wöchentlich (Lagerung bei -20°C), Arbeitslösungen täglich hergestellt

3.5.5 Bestimmung der Lipidperoxidation: Malondialdehyd (MDA)-Analytik

MDA ist ein Marker der Lipidperoxidation. Die Methode wurde in Anlehnung an publizierte Methoden entwickelt [Eichler et al. 2002; Morlière et al. 1990]

MDA reagiert mit Thiobarbitursäure (TBA) zu einem Thiobarbitursäure- Dialdehydkomplex (Abbildung 3-7), der mittels HPLC analysiert wird.

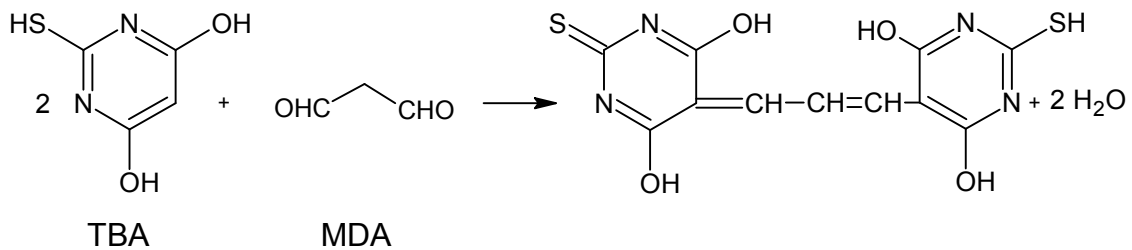


Abb. 3-7 *Reaktion von Malondialdehyd mit Thiobarbitursäure*

3.5.5.1 Probenvorbereitung

Zur Bestimmung wurden mit konfluenten Zellen Inkubationsschalen (d=9 cm) 24h mit FBS freiem Medium inkubiert und anschließend nach Protokoll behandelt (abweichend wurden die Carotinoide in FBS-freiem Medium gelöst). Nach Bestrahlen wurden die Zellen 1,5h auf HBSS-Puffer inkubiert (Inkubator, 37°C). MDA geht dabei in den Puffer über. Anschließend wurden die Zellen mit einem Zellschaber gelöst und eine homogene Mischung von Zellen und Medium in ein Reaktionsgefäß überführt. Die Proben wurden bis zur Aufarbeitung bei -80°C gelagert.

3.5.5.2 Probenaufarbeitung

Zu 150 µL Zelllysate wurden 200 µL 0,4% (w/v) TBA Lösung und 50 µL 0,05% (w/v) BHT-Lösung gegeben. Zur Bildung des Komplexes wurde die Mischung 30 Minuten auf 95°C erhitzt und anschließend direkt auf Eis gekühlt. Störende Zellbestandteile wurden durch 10minütiges zentrifugieren bei 20000 U/min (4°C) beseitigt. Eine Regressionsgerade wurde mit Tetramethoxypropan erstellt.

3.5.5.3 HPLC-Bedingungen

Die Auftrennung erfolgte mittels HPLC, die Identifizierung und die Quantifizierung mit Hilfe eines Fluoreszenzdetektors. Folgende HPLC-Bedingungen wurden angewendet:

Tabelle 3.9 HPLC- Bedingungen: MDA-Bestimmung

Säule:	LiChrospher-100 RP-18 endcapped
Mobile Phase	50mM Natriumphosphatpuffer (pH 5,5; eingestellt mit Na ₂ HPO ₄)/Methanol (6:4) pH 6,5
Gradient	Isokratisch
Fluss:	1 ml/min
Temperatur:	20°C
Fluoreszenz-Detektion	Anregungswellenlänge: 513 nm, Emissionswellenlänge: 553 nm
Injektionsvolumen:	50 µl

Das Ergebnis wird auf die Proteinkonzentration normiert und als nmol MDA/mg Protein angegeben.

3.5.6 Bestimmung der Zell- Zell- Kommunikation über Gap Junctions (GJC)

Zur Bestimmung der GJC wird der Farbstoff- Transfer- Assay angewendet. Das Prinzip des Kommunikationsassay beruht auf der Diffusionsfähigkeit des Farbstoffes Lucifer Yellow CH durch die Gap Junctions (Zellkanäle) der Zellmembranen. Unspezifische Diffusion durch intakte Zellmembranen kann dabei ausgeschlossen werden, da die Sulfonatgruppen dieses Farbstoffes bei physiologischem pH- Wert (7,4) aufgrund des niedrigen pKa- Wertes, als Anion vorliegen. Intakte Membranen sind für diesen wasserlöslichen Farbstoff impermeabel.

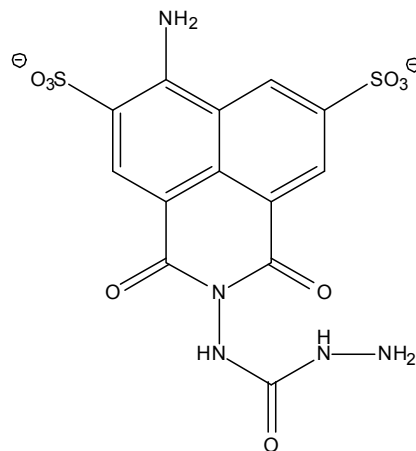


Abb. 3-8 Struktur des Fluoreszenzfarbstoffes Lucifer Yellow

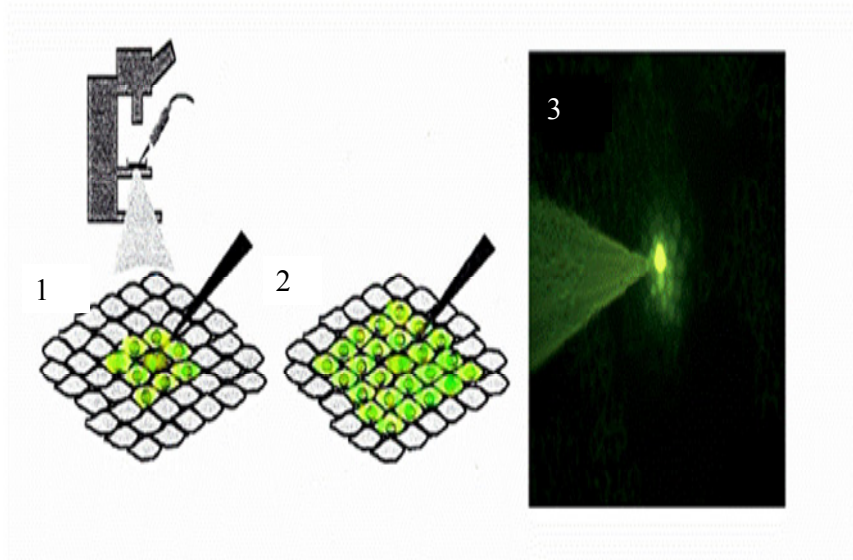
Verwendet wurde für diesen Assay eine für Zellen nicht toxische Konzentration von 10% (w/v) Lucifer Yellow CH in 0,33M LiCl₃-Lösung. Zur Messung wurde eine Gerätekombination aus einem inversem Fluoreszenzmikroskop (Axiovert 100), einem Mikromanipulator (FemtoJet) und einem semiautomatischen Mikroinjektor (Injekt Man) verwendet. 50- 200 Femtoliter der Lucifer Yellow Lösung wurden dabei mittels Femtotip bei einem Injektionsdruck von 150 hPa, einem Kompensationsdruck von 50 hPa und einer Injektionsdauer von 0,5 sec in das Zytoplasma einer Zielzelle injiziert. Nach einer Minute wurden die durch Diffusion abgefärbten benachbarten Zielzellen ausgezählt (Abbildung 3-9). Die Anzahl der benachbarten, fluoreszierenden Zellen stellt ein direktes Maß für die interzelluläre Kommunikation dar [Bertram et al. 1994]

Die Anregungswellenlänge betrug 428 nm, die Emissionswellenlänge 536 nm.

Die Zellen wurden für den Assay in Kulturschalen (d=35mm) kultiviert und nach allgemeinem Versuchsprotokoll inkubiert und bestrahlt. Inkubiert wurden die Zellen mit Astaxanthin und Canthaxanthin, bestrahlt wurde mit 10 J/cm² UV-A Messungen wurden 3,6 und 24h nach der Bestrahlung durchgeführt.

Für die Messung der ZZK wurden bei jeder Testreihe pro Kulturschale jeweils in 10 zufällig ausgewählte Zellen der Farbstoff Lucifer Yellow injiziert. Die Ergebnisse der 10 Einzelmessungen wurden gemittelt.

A



B

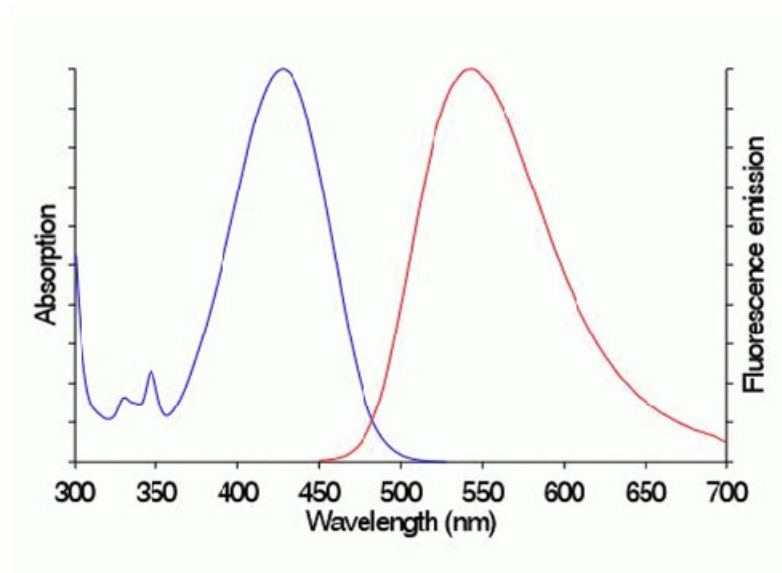


Abb. 3-9 Fluoreszenz-Farbstoff-Assay

A: Schematische Darstellung [Ale Agha 2003 Dissertation]

(1: Kontrolle, 2: erhöhte GJC nach Stimulation der ZZK, 3: Injektionsnadel und fluoreszierende Zellen im Mikroskop)

B: Absorptions- und Emissionsspektrum des Fluoreszenzfarbstoffs Lucifer Yellow CH.

3.5.7 Denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) und immunologischer Nachweis von Proteinen (Western Blot)

3.5.7.1 Probenvorbereitung

Die Expression folgender Proteine wurden mit diesem Assay nachgewiesen: Connexin 43 (Cx43), N-Cadherin, β -Catenin, Hämoxygenase-1 (HO-1).

Dafür wurden Zellen gemäß Protokoll (Abschnitt 3.7.1.4) in kultiviert, inkubiert und bestrahlt. Inkubiert wurde mit Astaxanthin und Canthaxanthin. Anschließend wurde das Gesamtprotein extrahiert. Dafür wurden die Zellen zweimal mit kalten PBS gewaschen und mit Lysispuffer (Tabelle 3.10) lysiert. Die Menge des Gesamtproteins betrug ungefähr 1 mg/ml Lysispuffer. Die Proben wurden bis zur Bestimmung bei -80°C in Eppendorf Probengefäßen gelagert. Unmittelbar vor der Elektrophorese wurden die Proben mit Ultraschall behandelt und die Proteinmenge mittels Bradford (Abschnitt 3.5.2) bestimmt. Zum Zelllysat wurde Dithiothreitol- Blaupuffer (Tabelle 3.10) hinzugefügt. Anschließend wurden die Proben 5 Minuten bei 95°C erhitzt und direkt auf Eis gegeben.

Tabelle 3.10 Zusammensetzung Puffer zur Probenaufarbeitung für die SDS Gelelektrophorese

Blaupuffer (5x, pH 6,8)		Lysispuffer RL+ (pH 7,4)	
SDS	10%	TRIS	20 mM
TRIS	0,25 M	NaCl	139 mM
Saccharose	30%	NaF	10 mM
Bromphenolblau	0,1% (w/v)	Na-Pyrophosphat·10 H ₂ O	9,9 mM
DTT	eine Spatelspitze frisch zugesetzt	TritonX-100	1%
		EDTA pH8	4 mM
		EGTA pH8	4 mM
		Na-Vanadat	1,6 mM
		β -Glycerolphosphat	
		Zusätzlich wurde eine Tablette Complete Proteaseinhibitor je 50ml Puffer hinzugefügt	

3.5.7.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Bei der SDS-Page (SDS: Sodiumdodecylsulfat) werden Proteine in einem SDS-haltigen Polyacrylamidgel aufgetrennt. Die Wandergeschwindigkeit der Proteine im elektrischen Feld ist abhängig von ihrem Molekulargewicht und der Porengröße des Gels. Um eine optimale Trennung der gewünschten Moleküle zu erhalten, sollte die Porengröße des Geles auf die Molekülgröße abgestimmt sein. Für die hier untersuchten Proteine eigneten sich Gele mit einer 10% Acrylamid- Bisacrylamidkonzentration.

Gele wurden in Plastikgellkassetten (Invitrogen; 10x10 cm) gegossen und feucht verpackt bei 4°C gelagert (Zusammensetzung siehe Tabelle 3.11)

Nach der Aufarbeitung der Proben gemäß Abschnitt 3.5.7.1 wurden für Cx43 25 µg und für die restlichen Proteine 50 µg Gesamtprotein aufgetragen. Die Trennung erfolgte in einem SDS- Laufpuffer (50 mmol/l TRIS, 384 mmol/l Glycin, 3,47 mmol/l SDS) bei 25 mA/Gel im Sammelgel und bei 40 mA/Gel im Trenngel. Als Protein Marker wurden 8 µl „Prestained Protein Marker“ (19-119 kDa) verwendet.

Tabelle 3.11 Zusammensetzung von Trenngel und Sammelgel

	Trenngel pH= 8,8 10% Polyacrylamidgel	Sammelgel pH 6,8 5% Polyacrylamidgel
Bidestilliertes Wasser	48%	70,6%
TRIS	25% (1,5 mol/l, pH 8,8)	13% (1 mol/l, pH 6,8)
SDS	1%	1%
Acrylamid-Biacrylamid- Lösung 40%	25%	14,8%
TEMED	0,1%	0,1%
APS 10% in H ₂ O (v/v)	1%	1%

3.5.7.3 Western Blot (Semi-Dry-Blot)

Beim Semi- Dry- Blot werden die Proteine im elektrischen Feld vom SDS- Gel auf eine Nitrocellulose- Membran übertragen und anschließend mit spezifischen Antikörpern nachgewiesen. Der Proteintransfer erfolgte in einem diskontinuierlichen Puffersystem bestehend aus 2 verschiedenen Anodenpuffern und einem Kathodenpuffer (Tabelle 3.12).

Je Puffer und Membran wurden 2 „Blottingpapiere“ in Gelgröße in verschiedene Puffer getränkt. Die Nitrocellulosemembran wurde durch bidestilliertes Wasser aktiviert und ebenfalls kurz im Anoden 2- Puffer getränkt. Das Gel der Elektrophorese wurde kurz mit

Kathodenpuffer befeuchtet. Anschließend wurden die „Blottingpapiere“, die Membran und das Gel im Blotter luftblasenfrei zusammengesetzt (2 Blottingpapiere Anode 1, 2 Blottingpapiere Anode 2, Membran, Gel, 2 Blottingpapiere Kathode 1)

Die Übertragung der Proteine erfolgte bei 60 mA/Gel, je nach Proteingröße zwischen 60 und 80 Minuten. Anschließend wurde eine Transferkontrolle mit Ponceaus S-Lösung (0,1% (w/v) in 5% Essigsäure) durchgeführt. Anschließend wurde die Membran mit TBS-T entfärbt und unspezifische Bindungsstellen mit 5% (w/v) fettfreien Milchpulver in TBS-T bei 4°C über Nacht blockiert.

Table 3.12 Puffer für den Western Blot, pH-Werte wurden mit HCl bzw. NaOH eingestellt

	Anode 1	Anode 2	Kathode	TBS-T
TRIS	300 mmol/l	25 mmol/l	25 mmol/l	50 mmol/l
Methanol (p.a.)	10%	10%	10%	---
Glycin	---	---	40 mmol/l	---
NaCl	---	---	---	150 mmol/l
Tween	---	---	---	0,1%
pH	10,4	10,4	9,4	7,5

3.5.7.4 Immunologischer Nachweis der Proteine

Nach dem Entfernen des Milchpulvers wurden die Membranen 1h mit spezifischen Antikörpern inkubiert. Verwendet wurden Maus oder Kaninchen Antikörper. Alle Antikörper wurden in 1% Milchpulverlösung (w/v TBS-T) gelöst. Nach 3-4 maligen Waschen mit TBS-T, erfolgte die Inkubation mit den sekundären, Meerrettichperoxidase (HRP)- gekoppelten anti- Kaninchen bzw. anti- Maus Antikörper. Detektiert wurden die sekundären Antikörper und somit die Proteine mit Hilfe eines Chemilumineszenz- Kits. Dafür wurden die Luminol- und die Verstärker- Lösung 1:1 vermischt und je 1 ml auf die Membran gegeben. Nach 5 Minuten Reaktionszeit und Entfernen der überschüssigen Lösung wurde je nach Signalstärke 0,5 – 15 Minuten in einer lichtundurchlässigen Kassette das Signal auf einem BioMax Röntgenfilm exponiert. Anschließend wurde der Film in einer Entwickler- und Fixiererlösung entwickelt. Das Prinzip dieser HRP-Antikörper beruht darauf, dass die Meerrettich-Peroxidase das Luminol umsetzt und die dadurch entstehende Chemilumineszenz abgebildet werden kann.

Die Signalstärke wurde semiquantitativ durch einscannen der Blots (hp scanjet 2400) und Auswertung mit der Freewaresoftware ImageJ ausgewertet.

Tabelle 3.13 Verdünnung der verwendeten Antikörper

(Antikörper : 1% Milchpulverlösung in TBS-T)

Protein	Molekulargewicht [kDa]	Verdünnung	
		primärer Antikörper	sekundärer Antikörper
Cx-43	43	1:1000	1:10000
N- Cadherin	130	1:1000	1:5000
β- Catenin	92	1:750	1:5000
HO-1	32	1:750	1:5000
GAPDH	36	1:1000	1:10000

3.5.8 Immunozytochemischer Nachweis von Cx43, N-Cadherin und Nrf2

Bei dem immunozytochemischen Nachweis von Proteinen lassen sich mit Hilfe von fluoreszierenden Farbstoffen die Lokalisation und die Menge bestimmter Proteine visualisieren. Hierbei werden fixierte Zellen mit spezifischen Antikörpern inkubiert und anschließend mit Fluoreszenzfarbstoff gekoppelten Sekundäantikörpern behandelt.

3.5.8.1 Probenvorbereitung Cx43 und N-Cadherin

Die Zellen wurden auf Glasplättchen (d=25mm) kultiviert und gemäß allgemeinem Protokoll behandelt. Das Medium wurde nach der Behandlung entfernt, die Zellen zweimal mit kaltem PBS gewaschen und 10 Minuten mit -20°C kaltem Methanol bei -20°C fixiert.

Anschließend wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und mit 1 ml Blockierlösung (3% Ziegennormalserum (ZNS), 0,3% Triton X-100, PBS) 1h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Entfernen der Blockierlösung wurden die Zellen mit Primäantikörper (Tabelle 3.14) über Nacht bei 4°C inkubiert.

Nach dreimaligem Waschen mit PBS wurden die Zellen 45 Minuten bei 37°C mit dem Sekundäantikörper inkubiert.

3.5.8.2 Probenvorbereitung Nrf2

Zellen werden nur bis zur 60% igen Zelldichte herangezogen und ohne 24h Behandlung mit 3% FBS- haltigen Medium direkt mit den Testsubstanzen in 3% FBS-haltigen Medium inkubiert. Die weitere Behandlung erfolgte gemäß allgemeiner Versuchsvorschrift.

Nach Behandlung wurden die Zellen mit 4% Formaldehydlösung fixiert. Dazu wurde Formaldehyd- Fertiglösung (16%) 1:4 mit PBS verdünnt und 500 µL 10-15 Minuten auf die mit PBS gewaschenen Zellen gegeben. Anschließend wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen, wobei im letzten Waschschrift eine 10 mM Glycinlösung in PBS verwendet wurde. Anschließend wurden die Zellen 10 Minuten mit einer 0,1% TritonX-100 Lösung in PBS behandelt und erneut dreifach mit PBS gewaschen. Dann wurde 1h mit einer 3% ZNS- Lösung in PBS blockiert. Die Behandlung mit den Antikörpern entspricht Abschnitt 3.7.8.1.

Tabelle 3.14 Konzentrationen der Antikörper für den immunozytochemischen Nachweis, jeweils in PBS mit 1% ZNS (Primärantikörper) bzw. PBS (Sekundärantikörper)

Protein	Konzentration: Primärantikörper		Konzentration: Sekundärantikörper	
Cx43	Cx43	1:1500	Alexa 546 (anti-Kaninchen)	1:1500
N- Cadherin	N-Cadherin	1:100	Alexa 488(anti- Maus)	1:500
Nrf2	Nrf2	1:200	Alexa 546 (anti-Kaninchen)	1:300

3.5.8.3 Zellkernfärbung, Fixierung und Auswertung der Proben

Zur Zellkernfärbung eignet sich 4',6'-Diamidino-2-phenylindolhydrochlorid (DAPI), welches an die DNA bindet. Dieses ist im ProLong ® Gold antifade Reagenz (Invitrogen) enthalten. Dieses Reagenz fixiert die Zellprobe auf Objektträger, färbt die Zellkerne und verhindert ein Ausbleichen des Farbstoffes unter dem Fluoreszenzlicht.

Dazu wurden die Zellen nach Behandlung mit den sekundären Antikörpern dreimal mit PBS gewaschen. Auf ein Objektträger ein Tropfen der Lösung gegeben, vorsichtig verteilt und das Deckgläschen darauf fixiert. Nach Trocknung über Nacht konnten die Proben am Fluoreszenzmikroskop ausgewertet werden. Dafür wurden die in Tabelle 3.15 verwendeten Absorptions- und Emissionswellenlängen verwendet.

Tabelle 3.1 Optimale Absorptions-/Emissionswellenlängen von DAPI und Alexa Fluor 546 bzw. 488

Sekundärer Antikörper bzw. DAPI	$\lambda_{\text{Absorption}} \text{nm}$	$\lambda_{\text{Emmission}} \text{nm}$
DAPI	358	461
Alexa Fluor®546	556	573
Alexa Fluor®488	495	519

3.6 Statistik

Zur statistischen Auswertung erfolgte die Berechnung der Mittelwerte, der relativen Standardabweichungen und der Signifikanzniveaus. Die Standardabweichungen werden entsprechend der Kennzeichnung mit \pm SD (*standard deviation*; Standardabweichung) angegeben. Die statistische Bewertung der Interventionsstudien I und II erfolgte mittels Vorzeichenrangtests nach Wilcoxon, die Berechnungen der Triglyceridbestimmungen der Interventionstudie I, die Carotinoidanalytik und der *in-vitro* Studien erfolgte durch Bestimmung der Signifikanzniveaus p mit Hilfe des Student's t-Test (Excel). Signifikanzniveaus $p < 0,05$ wurden als signifikant angesehen.

4 Ergebnisse Interventionsstudien

4.1 Analyse von mehrfach ungesättigten Fettsäuren (PUFAs) in Humanproben

Die Bioverfügbarkeit einzelner Fettsäuren lässt sich durch Analyse von Veränderungen im Fettsäuremusters mit der Gaschromatographie in Plasma und Erythrozyten untersuchen. Erst durch die Bestimmung der Bioverfügbarkeit bestimmter Nahrungsmittelinhaltstoffen kann man einen Zusammenhang zwischen Exposition und physiologischen Effekten herstellen. Ziel der nachfolgenden Studie war es, die gaschromatographische Bestimmung von Fettsäuremustern in Humanproben zu etablieren und Veränderungen im Fettsäuremuster nach oraler Applikation von Fischölkapseln zu bestimmen.

Zur Probenvorbereitung wurden Plasma und Erythrozyten gemäß Abschnitt 3.3.1 extrahiert und mit methanolischer Natriummethylatlösung gemäß Abschnitt 3.3.2 transmethyliert. Die entstandenen Fettsäuremethylester (FAME) wurden anschließend mittels Gaschromatographie getrennt und mit einem Flammenionisationsdetektor detektiert. Identifiziert wurden die einzelnen FAMES anhand von Standardverbindungen. Die Auswertung erfolgte über die 100%- Methode, d.h. die Summe der Flächen aller identifizierten Fettsäuren wurden 100% gesetzt und der prozentuale Anteil der einzelnen Fettsäuren berechnet. Vorteil dieser Methode ist es, dass nur die Relation der Fettsäuren zueinander berechnet wird, wodurch eine Kalibrierung und die Verwendung von internen Standards entfallen. Auch individuelle Schwankungen in der Gesamtfettmenge bei einzelnen Probanden spielen keine Rolle. Es gilt jedoch zu beachten, dass die Flächenprozentage nicht identisch mit den absoluten Stoffprozentagen sind. Änderungen in den Flächenprozentagen, sind jedoch auf Änderungen des Fettsäuremusters in der untersuchten Matrix zurückzuführen [Kolb 2003]. Im Rahmen der Studie sollte ebenfalls das Fettsäuremuster von Cerumen (Ohrwachs) bestimmt werden.

4.1.1 Fettsäuremuster in Plasma, Erythrozyten und Cerumen nach Supplementierung mit Fischölkapseln

In der vorliegenden Studie wurde an drei Probanden untersucht, ob sich nach Gabe eines handelsüblichen Fischölpräparats (in Weichgelatine kapseln) das Fettsäuremuster in Plasma, Erythrozyten und Cerumen verändert.

Die Einnahme betrug 1g Fischöl täglich (2 Kapseln). Jede Kapsel enthielt 70 mg Eicosapentaensäure (EPA) und 50 mg Docosahexaensäure (DHA). Die Applikationsdauer betrug 12 Wochen. Zu den Zeitpunkten 0, 2, 4, 6, 10 und 12 Wochen wurden Blut- und Cerumenproben entnommen. Das Fettsäuremuster in Plasma und Erythrozyten wurde für jede Probe doppelt analysiert und der Mittelwert berechnet. Cerumenproben konnten aufgrund der geringen Probenmenge nur einfach vermessen werden.

In Tabelle 4.1 und Tabelle 4.2 sind die Ergebnisse der PUFAs der Fettsäureanalysen in Plasma und Erythrozyten dargestellt. Abbildung 4-1 stellt die prozentualen Veränderungen der EPA und der DHA bezogen auf die Gesamtfettsäuren graphisch dar.

Zu Beginn der Studie (Woche 0) betrug der Anteil von EPA im Plasma an den Gesamtfettsäuren 0,73%. Unter Supplementierung mit Fischölkapseln nahm der Anteil in der Woche 2 auf 1,01% zu. Dieser Wert veränderte sich im weiteren Verlauf der Studie nur noch geringfügig.

Der Anteil der DHA betrug zu Beginn der Studie 1,37% (Woche 0) und stieg in Woche 2 auf 1,48%. DHA nahm weiter kontinuierlich im Verlauf der Studie zu. In Woche 10 betrug der Wert 1,64% und fiel wieder leicht in Woche 12 auf 1,60%. Auch der Anteil von Docosapentaensäure (DPA) an den Gesamtfettsäuren stieg von Woche 0 (0,32%) nach Woche 2 (0,44%), veränderte sich dann nur noch geringfügig. Der Anteil der Linolsäure nahm um 2,89% von Woche 0 zu Woche 12 ab. Entsprechend nahm der Gesamtanteil an ω -3 Fettsäuren zu, der an ω -6 Fettsäuren ab. Das Verhältnis ω -6/ ω -3 verringerte sich von 15,6 (Woche 0) auf 12,1 (Woche 12).

Das Fettsäuremuster der Erythrozyten veränderte sich im Verlauf der Studie kaum. Nur der Anteil der DPA an den Gesamtfettsäuren nahm von 2,27% in Woche 0 auf 2,68% in Woche 12 zu. Der Anstieg des Linolsäureanteils in Woche 2 im Vergleich zur Woche 0 (Woche 0: 14,62%; Woche 2: 22,40%) ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass nur 2 von 3 Proben auswertbar waren. Die Ergebnisse der Woche 2 bleiben bei der Interpretation unberücksichtigt.

Die Summe der Anteile der EPA und DHA in den Erythrozyten beschreiben den *Omega-3-Index* [Cao et al. 2006]. Der Index veränderte sich im Verlauf der Studie nur geringfügig. Eine Zunahme war nicht zu verzeichnen.

Eine statistische Analyse wurde aufgrund der kleinen Probandenzahl nicht durchgeführt.

Tabelle 4.1 *Fischölstudie: Fettsäuremuster im Plasma während 12 wöchiger Supplementierung mit Fischölkapseln*

	Woche					
	0	2*	4	6*	10	12
ω-6- FS						
18:2ω-6	38,95±1,71	38,00±1,26	36,73±3,17	39,31±1,01	35,90±3,61	36,16±2,69
18:3ω-6	0,36±0,07	0,36±0,06	0,49±0,28	0,44±0,05	0,33±0,02	0,37±0,05
20:3ω-6	1,52±0,29	1,55±0,01	1,60±0,16	1,70±0,22	1,40±0,52	1,59±0,32
20:4ω-6	6,22±1,02	6,90±0,62	5,67±1,12	6,55±0,29	5,84±0,37	6,02±0,94
22:4ω-6	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
ω-3- FS						
18:3ω-3	0,59±0,09	0,69±0,09	0,62±0,12	0,50±0,06	0,63±0,03	0,58±0,12
20:5ω-3 (EPA)	0,73±0,41	1,01±0,44	1,09±0,19	1,18±0,12	0,95±0,13	1,06±0,38
22:5ω-3 (DPA)	0,32±0,05	0,44±0,10	0,42±0,14	0,49±0,08	0,45±0,14	0,41±0,15
22:6ω-3 (DHA)	1,37±0,09	1,48±0,00	1,56±0,51	1,52±0,08	1,64±0,11	1,60±0,30
Σ ω-6	47,0	46,8	44,5	48,0	43,5	44,1
Σ ω-3	3,0	3,6	3,7	3,7	3,7	3,7
ω-6/ω-3	15,6	12,9	12,0	13,0	11,9	12,1

Mittelwert ± SD (n=3); n.n.: nicht nachweisbar; (Angabe der Fettsäuren in % bezogen auf Gesamtfettsäuren)

* nur 2 von 3 Proben auswertbar

Tabelle 4.2 Fischölstudie: Fettsäuremuster der Erythrozyten während 12 wöchiger Supplementierung mit Fischölkapseln

	Woche					
	0	2*	4	6*	10*	12
ω-6- FS						
18:2ω-6	14,62±1,36	22,40±8,73	16,88±2,30	16,23±0,65	15,84±0,78	14,88±0,95
18:3ω-6	0,21±0,24	0,16±0,17	0,20±0,13	0,17±0,16	0,09±0,07	0,24±0,32
20:3ω-6	3,22±2,25	1,91±0,47	2,08±0,62	2,05±0,22	1,78±0,63	1,78±0,90
20:4ω-6	17,28±2,48	15,45±7,11	15,47±0,35	17,35±2,14	18,16±0,62	16,87±1,18
22:4ω-6	3,22±1,09	2,47±1,49	2,79±0,16	3,21±0,32	2,85±0,53	2,93±0,45
ω-3- FS						
18:3ω-3	0,91±1,29	0,33±0,22	0,46±0,61	0,21±0,03	0,55±0,66	0,16±0,07
20:5ω-3 (EPA)	1,25±0,82	0,97±0,33	1,20±0,45	1,07±0,02	1,17±0,17	1,15±0,17
22:5ω-3 (DPA)	2,27±0,54	1,91±0,66	2,31±0,40	2,41±0,02	2,71±0,16	2,68±0,25
22:6ω-3 (DHA)	5,02±0,27	3,06±2,82	4,06±1,30	4,84±0,65	5,72±0,34	4,83±1,21
Σ EPA+DHA	6,3	4,0	5,3	5,9	6,9	6,0
Σ ω-6	38,6	42,4	37,4	39,0	38,7	36,7
Σ ω-3	9,5	6,3	8,0	8,5	10,1	8,8
ω-6/ω-3	4,1	6,7	4,7	4,6	3,8	4,2

Mittelwert ± SD (n=3); (Angabe der Fettsäuren in % bezogen auf Gesamtfettsäuren)

* nur 2 von 3 Proben auswertbar

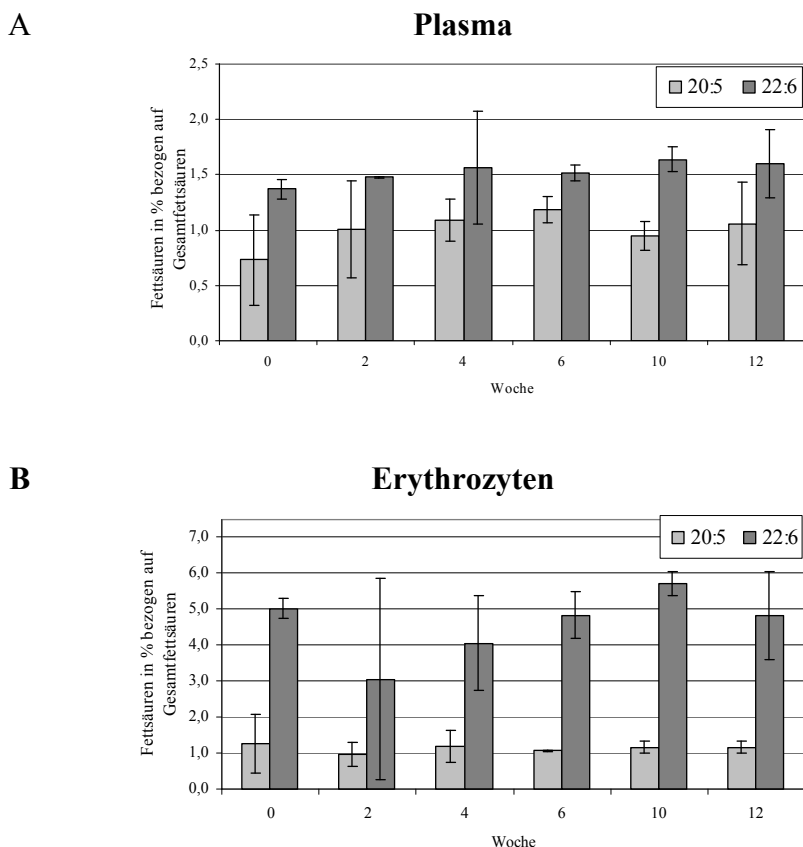


Abb. 4-1 *Fischölstudie: Veränderung des Anteils von EPA und DHA bezogen auf die Gesamtfettsäure in Plasma (A) und Erythrozyten (B) während 12 wöchiger Supplementierung mit Fischölkapseln*
Mittelwert \pm SD

Als möglicher biologischer Marker für die Zufuhr bestimmter Fettsäuren mit der Nahrung wurde das Fettsäuremuster von Cerumen gaschromatographisch untersucht. Bei der Derivatisierung der Fettsäureester mit methanolischer Natriummethylatlösung werden freie Fettsäuren nicht in Methylester überführt. Cerumen enthält einen hohen Anteil an freien Fettsäuren [Bortz et al. 1990]. Daher wurde für diese Proben zur Derivatisierung die Hydrolyse und Veresterung mit methanolischer Bortrifluoridlösung gewählt, unter der sowohl freie als auch veresterte Fettsäuren in Methylester überführt werden.

Ein typisches GC-Chromatogramm von Cerumen detektiert mit einem FID ist in Abbildung 4-2 A dargestellt. Viele der Signale ließen sich mit den verfügbaren Standards eindeutig zuordnen. Eindeutig identifiziert wurden Myristinsäure, Palmitinsäure, Stearinsäure und Ölsäure. Wie aus der Abbildung 4-2 A ersichtlich, wurde die Ölsäure (Signal 4) von mindestens einem weiteren Signal überlagert. Zur weiteren Zuordnung wurde an ausgewählten Proben eine GC-Analyse gekoppelt mit einem MS Detektor durchgeführt. Ein

Beispiel ist in der Abbildung 4-2 B und in Tabelle 4.3 aufgeführt. Die Auswertung der GC-Massenspektren erfolgte durch Vergleich mit der Datenbank des National Institute of Standards and Technologie (Gaithersbury).

Die massenspektrometrische Analyse zeigte, dass das gewonnene Cerumen aus einem komplexen Gemisch verschiedener Fettsäuren besteht. In Tabelle 4.3 ist exemplarisch das Analyseergebnis für eine Probe aufgeführt (Probennahme nach 12 Wochen). Den größten Anteil an Fettsäuren im Cerumen hatte die Palmitinsäure mit 61%, gefolgt von Stearinsäure mit 12%. Auch die Ölsäure wurde in der Probe identifiziert (Signal 7). In der GC-Analyse mit FID-Detektor war das Signal der Ölsäure durch ein unbekanntes Signal überlagert. Die GC-MS-Analyse erbrachte eine höhere Spezifität das Signal konnte aber keiner in der Datenbank vorhandener Verbindung zugeordnet werden (Signal 6). Langkettige ungesättigte Fettsäuren wie z.B. EPA oder DPA waren in der Cerumenprobe nicht nachweisbar, dagegen konnten gesättigte langkettige Fettsäuren mit 24 und mehr Kohlenstoffatomen identifiziert werden. Auffällig waren auch die Anteile an verzweigten Fettsäuren. Neben den genannten Fettsäuren wurden noch verschiedene Phthalate (nicht in der Tabelle dargestellt) identifiziert.

Die Analyseergebnisse ließen den Schluss zu, dass das Fettsäuremuster in Cerumen nicht zur Bestimmung von Fettsäureveränderungen nach Nahrungsaufnahme geeignet ist, mehrfach ungesättigte Fettsäuren sind nicht vorhanden.

Tabelle 4.3 Fettsäuren in Cerumen: identifiziert durch massenspektrometrische Untersuchung (Beispiel einer Probe)

Fettsäure	%	Fettsäure	%	Fettsäure	%
14:0	5,6	17:0	1,4	24:0 verzweigt	0,4
15:0 verzweigt	0,3	18:2	1,4	24:0	4,5
15:0 verzweigt	0,6	18:1	1,6	C25 verzweigt	0,4
16:1	1,7	18:0	12,1	C25 verzweigt	0,7
16:1	1,5	20:0	0,6	25:0	0,8
16:0	61,4	22:0 verzweigt	0,3	26:0	2,0
17:0 verzweigt	0,7	22:0	0,4	27:0	0,3
17:0 verzweigt	0,3	23:0	0,5	28:0	0,4

Angaben in % bezogen auf die Gesamtfettsäuren

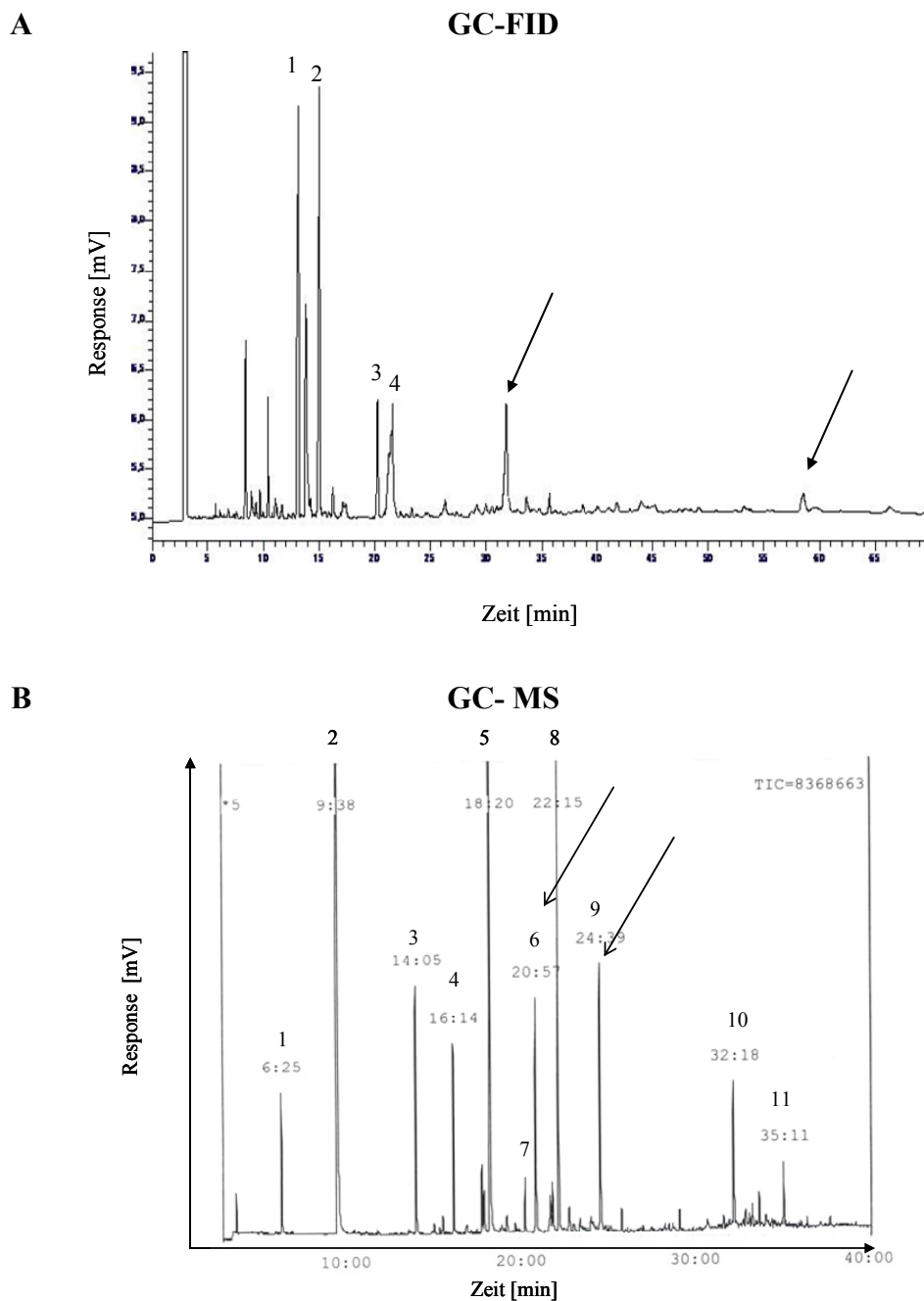


Abb. 4-2 GC- Chromatogramme der Fettsäuremethylester einer Cerumenprobe
 schwarze Pfeile: nicht identifizierte Fettsäuren
A: GC- FID Chromatogramm: 1: Myristinsäure; 2: Palmitinsäure; 3: Stearinsäure,; 4: Ölsäure)
B: GC- MS Chromatogramm: 1: BHT; 2: Phthalat; 3: Myristinsäure; 4: Pentadecansäure; 5: Palmitinsäure; 6: nicht identifiziert; 7: Ölsäure 8: Stearinsäure; 9: nicht identifiziert; 10: Tetracosansäure; 11: Hexacosansäure

4.2 Interventionsstudie I: Effekte von Leinsamen- und Borretschöl auf Struktur und Funktion der Haut nach oraler Applikation

In dieser Interventionsstudie wurde untersucht, ob die Applikation eines α -linolensäurereichen Öls (Leinsamenöl) bzw. eines γ -linolensäurereichen Öls (Borretschöl) das Fettsäuremuster im Blut moduliert und ob unter Supplementierung Funktion und Struktur der Haut beeinflusst wird. Die Studie wurde an insgesamt 45 Probanden durchgeführt. 15 Probanden erhielten über einen Zeitraum von 12 Wochen 2220 mg Leinsamenöl pro Tag (ALA-Gruppe), 15 Probanden erhielten die gleiche Menge an Borretschöl (GLA-Gruppe), jeweils in Weichgelatine kapseln (2x2 Kapseln). Die Kontrollgruppe (15 Probanden) erhielt ein Placebo, 2260 mg kurzkettige Fettsäuren in 4 Weichgelatine kapseln.

Das Fettsäuremuster in den Präparaten wurde mittels GC-FID gemäß Abschnitt 3.3 analysiert. In Abbildung 4-3 sind GC-Chromatogramme des verwendeten Leinsamen-, Borretschöls und des Placebos abgebildet. Die Ergebnisse sind in Tabelle 4.4 zusammengefasst.

Die dominierende Fettsäure im Leinsamenöl war α -Linolensäure mit 52,8%, gefolgt von Ölsäure (19,6%) und Linolsäure (16,0%). Der Anteil an γ -Linolensäure betrug 0,04%. Hauptbestandteile des Borretschöls waren Linolsäure (38,7%) und γ -Linolensäure (21,6%), gefolgt von Ölsäure mit 15,0%. Der Anteil der α -Linolensäure betrug 0,38%. Das Placebo enthielt vornehmlich Caprylsäure (36,9%) und Caprinsäure (21,8%), wobei einige unbekannte Signale hinzukamen. Alle Angaben wurden auf die Gesamtfettsäuren bezogen. Sonstige Bestandteile des Leinsamenöls waren α -Tocopherol (2,5mg/Kapsel) und Rosmarinextrakt (0,83mg/ Kapsel). Die Borretschölkapseln enthielten α -Tocopherol (2,5mg/Kapsel). Die Placebokapseln enthielten keine weiteren Zusätze.

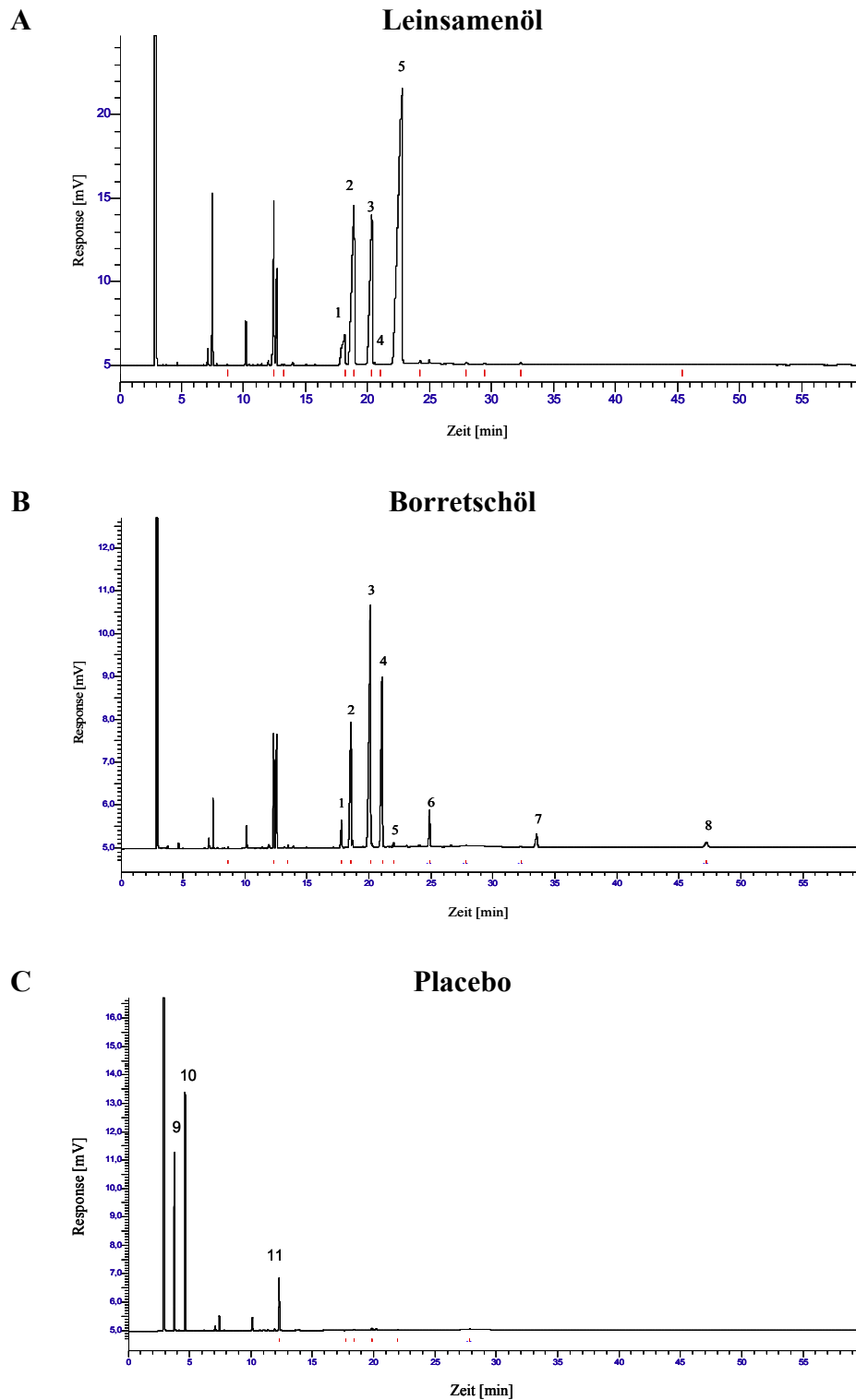


Abb. 4-3 GC-Chromatogramme der Fettsäuremethylester des Leinsamen- (A), Borretschöls (B) und Placebo (C)

1: Stearinsäure; 2: Ölsäure; 3: Linolsäure; 4: γ -Linolensäure; 5: α -Linolensäure; 6: Eicosensäure; 7: Erucasäure; 8: Lignocerinsäure; 9: Caprylsäure; 10: Caprinsäure; 11: unbekanntes Signal

Tabelle 4.4 *Interventionsstudie I: Fettsäuremuster der verwendeten Supplemente*

Fettsäure		Leinsamenöl	Borretschöl	Placebo
8:0	Caprylsäure	n.n	n.n	36,91
10:0	Caprinsäure	n.n	n.n	21,75
12:0	Laurinsäure	n.n	n.n	n.n
13:0	Tridecansäure	n.n	n.n	0,48
14:0	Myristinsäure	n.n	0,06	n.n
15:0	Pentadecansäure	n.n	n.n	1,21
16:0	Palmitinsäure	4,73	1,87	0,24
16:1	Palmitoleinsäure	0,04	0,05	n.n
17:0	Heptadecansäure	0,06	0,06	n.n
17:1	Heptadecensäure	0,04	0,03	n.n
18:0	Stearinsäure	4,12	2,82	0,09
18:1 ω -9	Ölsäure	19,58	15,02	0,60
18:2 ω -6	Linolsäure	15,99	38,67	n.n
18:3 ω -6	γ -Linolensäure	0,04	21,59	0,18
18:3 ω -3	α -Linolensäure	52,79	0,38	n.n
20:0	Arachinsäure	0,16	0,21	n.n
20:1	Eicosensäure	0,20	3,95	n.n
20:2	Eicosadiensäure	0,05	0,23	n.n
20:3 ω -6	Eicosatriensäure	0,10	n.n	0,29
22:1	Erucasäure	n.n	2,23	n.n
24:0	Lignocerinsäure	0,05	n.n	n.n
24:1	Nervonsäure	n.n	1,30	n.n
unidentifiziert		2,05	11,53	38,26

(Angabe der FS in % bezogen auf Gesamtfettsäuren) n.n. = nicht nachweisbar

4.2.1 Blutuntersuchungen

4.2.1.1 Fettsäuremuster im Plasma nach Gabe von Leinsamen- und Borretschöl

Die Fettsäuremuster im Plasma wurden zu den Zeitpunkten 0, 6 und 12 Wochen mittels GC untersucht (Abschnitt 3.3). Abbildung 4-4 zeigt ein typisches GC- Chromatogramm der Fettsäuremethylester einer Plasmaprobe. Die Daten wurden auf zwei Arten ausgewertet. In die erste Auswertung wurden die Flächen aller identifizierten Fettsäuren im Chromatogramm des Plasmas einbezogen (Tabelle 4.5 und Tabelle 4.6). und auf 100% gesetzt. Im zweiten Auswertungsmodus wurden ausschließlich die Flächen der PUFAs berücksichtigt und die gesamten PUFAs auf 100% gesetzt.

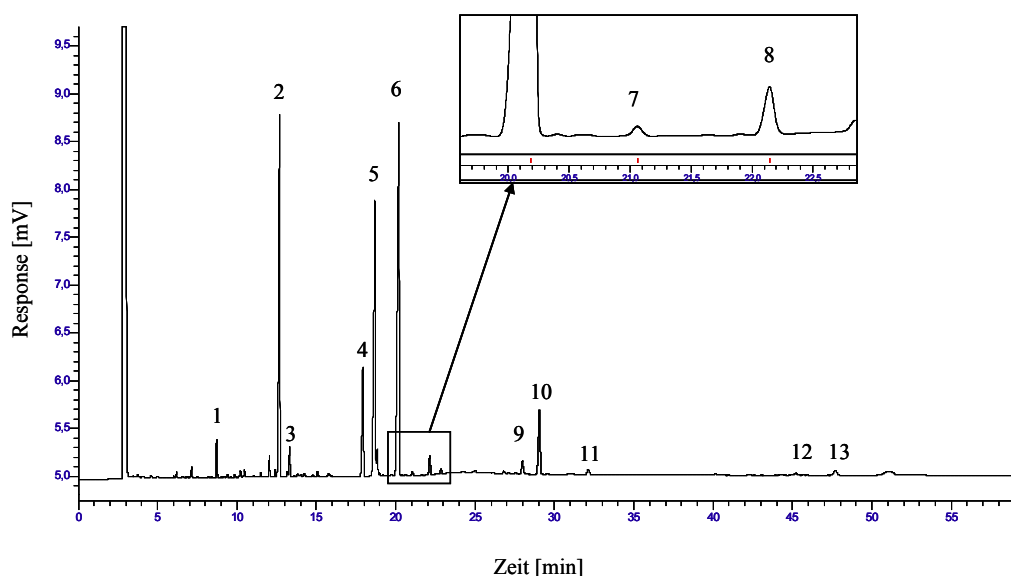


Abb. 4-4 *Typisches GC-Chromatogramm der Fettsäuremethylester zur Bestimmung des Fettsäuremusters einer Plasmaprobe (Chromatogramm eines Probanden der ALA-Gruppe in Woche 6)*

1: Myristinsäure; 2: Palmitinsäure; 3: Palmitoleinsäure; 4: Stearinsäure; 5: Ölsäure; 6: Linolsäure; 7: γ -Linolensäure; 8: α -Linolensäure; 9: Di-homo- γ -Linolensäure; 10: Arachidonsäure; 11: Eicosasapentaensäure; 12: Docosapentaensäure; 13: Docosanhexaensäure

Auswertung 1:

Zu Beginn der Studie (Woche 0) betrug der Anteil der α -Linolensäure in der ALA-Gruppe 0,58% und nahm nach Supplementierung mit Leinsamenöl zu Woche 6 statistisch signifikant zu (0,83%) (Abbildung 4-5 A, Tabelle 4.5 und Tabelle 4.6). Der Anteil war auch nach 12

wöchiger Supplementierung noch statistisch signifikant im Vergleich zu Woche 0 erhöht (0,84%); γ -Linolensäure und Linolsäure veränderten sich nicht signifikant. Das Verhältnis der ω -6 Fettsäuren zu den ω -3 Fettsäuren nahm entsprechend der Veränderungen der α -Linolensäure von 13,1 in Woche 0 auf 12,0 in Woche 12 ab.

In der GLA-Gruppe betrug der Anteil der γ -Linolensäure zu Beginn der Studie 0,47% und nahm nach Supplementierung mit Borretschöl zu Woche 6 statistisch signifikant zu (0,70%) (Abbildung 4-5 B, Tabelle 4.5 und Tabelle 4.6). Der Anteil war nach 12 Wochen mit 0,64%, wieder leicht erniedrigt aber immer noch statistisch signifikant unterschiedlich zu Woche 0. α -Linolensäure nahm ebenfalls von Woche 0 nach Woche 6 statistisch signifikant zu (0,50% auf 0,58%), fiel dann wieder auf 0,52% in Woche 12 (statistisch nicht signifikant unterschiedlich zur Woche 0). Der prozentuale Anteil an Linolsäure veränderte sich statistisch nicht signifikant. Dagegen nahm der Anteil der Dihomo- γ -linolensäure (DHGLA) von Woche 0 (2,1%) auf Woche 6 (2,4%) statistisch signifikant zu, fiel dann wieder in Woche 12 auf 2,3%. Ferner nahm der Anteil der Docosatetraensäure von Woche 0 (0,2%) auf Woche 12 (0,1%) statistisch signifikant ab. In der GLA-Gruppe erhöhte sich das Verhältnis der ω -6 Fettsäuren zu den ω -3- Fettsäuren nur gering, von 14,3 in Woche 0 auf 14,7 in Woche 12.

In der Placebo- Gruppe veränderte sich nach Gabe des Placebos nur der Anteil der DHGLA von Woche 0 (2,0%) auf Woche 12 (1,8%) statistisch signifikant. Weiter waren keine Veränderungen der Fettsäureanteile zu beobachten. Das Verhältnis von ω -6 zu ω -3 nahm von 14,5 in Woche 0 auf 13,8 in Woche 12 ab.

Auswertung 2:

Die Auswertung der Ergebnisse nur über die Flächen der PUFAs ergab entsprechend prozentual höhere Anteile der einzelnen Fettsäure. In der statistischen Analyse ergaben sich bis auf wenige Ausnahmen die gleichen Signifikanzen. In der ALA-Gruppe nahm abweichend zur 1. Auswertung der Anteil der Arachidonsäure von Woche 0 (16,0%) auf Woche 6 (15,3%) statistisch signifikant ab. In der GLA-Gruppe war der Abfall der Linolsäure von Woche 0 auf Woche 6 signifikant.

In diesem Auswertemodus wurde zusätzlich ein Intergruppenvergleich durchgeführt. Dabei ergaben sich folgende statistisch signifikante Unterschiede: In der ALA-Gruppe war der prozentuale Anstieg der α -Linolensäureanteils von Woche 0 nach Woche 6 unterschiedlich zur Placebogruppe. Von Woche 0 nach Woche 12 war dieser Anstieg unterschiedlich zu den Veränderungen der Placebo- und GLA-Gruppe. Die Veränderung des Anteils an Arachidonsäure von Woche 0 auf Woche 6 war unterschiedlich zur GLA-Gruppe.

In der GLA-Gruppe war der prozentuale Anstieg der γ -Linolensäure von Woche 0 auf Woche 6 und 12 unterschiedlich zur ALA-Gruppe, nicht jedoch zur Placebogruppe. Die Veränderung des Anteils der DHGLA von Woche 0 auf Woche 6 war unterschiedlich zu den Veränderungen der DHGLA der ALA-Gruppe.

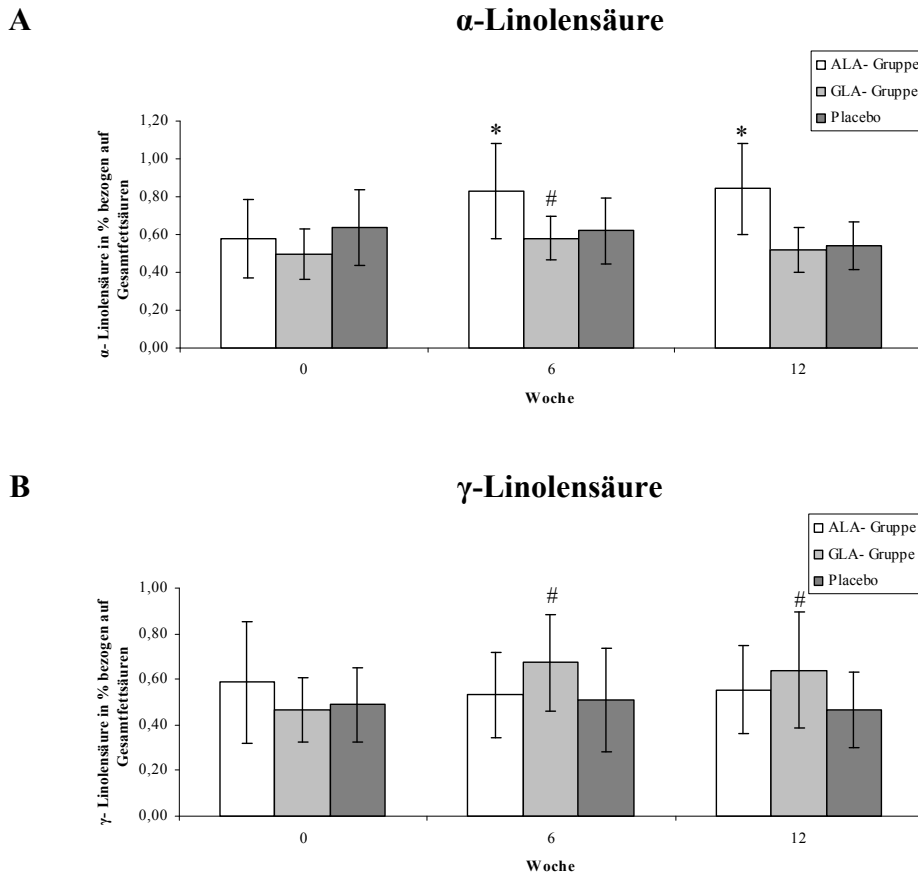


Abb. 4-5 *Interventionsstudie I: Änderung des prozentuale Anteiles an α -Linolensäure (A) und γ -Linolensäure (B) im Plasma nach 0, 6, 12 Wochen Supplementierung mit Leinsamenöl (ALA-Gruppe), Borretschöl (GLA-Gruppe) und Placebo (Placebo-Gruppe); Mittelwerte \pm SD (n=15)*

*statistisch signifikant unterschiedlich zu Woche 0 der ALA-Gruppe ($p < 0,05$)

#statistisch signifikant unterschiedlich zu Woche 0 der GLA-Gruppe ($p < 0,05$)

Tabelle 4.5 *Interventionsstudie I: Fettsäuremuster im Plasma (Auswertung I; Zusammenfassung)*

FS	ALA-Gruppe			GLA-Gruppe			Placebo-Gruppe		
	Woche			Woche			Woche		
	0	6	12	0	6	12	0	6	12
SFA	31,25±1,83	31,25±2,62	31,30±2,80	31,64±2,14	32,57±4,60	31,82±2,65	31,54±2,42	32,08±3,24	32,02±3,04
MUFA	23,33±2,40	23,31±3,20	23,54±4,15	23,75±3,58	24,51±4,01	23,28±3,14	23,08±3,40	23,53±3,44	23,52±3,12
PUFA	45,42±3,54	45,45±5,27	45,17±6,51	44,62±4,56	42,92±7,92	44,90±5,08	45,38±4,52	44,39±3,95	44,47±5,6
davon									
18:2ω-6	32,40±3,35	32,76±4,88	32,31±5,97	31,33±4,68	28,59±9,06	31,13±5,56	32,34±4,35	31,59±5,32	31,38±4,67
18:3ω-6	0,59±0,27	0,53±0,19	0,55±0,19	0,47±0,14	0,70±0,21*	0,64±0,25*	0,49±0,16	0,51±0,23	0,47±0,16
18:3ω-3	0,58±0,21	0,83±0,25*	0,84±0,24*	0,50±0,13	0,58±0,11*	0,52±0,12	0,64±0,2	0,62±0,17	0,54±0,12
Σω-6	42,19±3,17	42,13±4,98	41,69±6,35	41,69±4,54	39,98±8,17	42,03±5,14	42,44±4,5	41,29±6,04	41,46±5,32
Σω-3	3,23±1,00	3,32±0,56	3,48±0,75	2,93±1,18	2,94±0,93	2,87±1,55	2,93±0,57	3,10±0,71	3,00±1,14
Σω-6/Σω-3	13,08	12,69	11,99	14,25	13,59	14,66	14,46	13,32	13,83

Mittelwerte in % bezogen auf Gesamtfettsäuren± SD (n=15); *statistisch signifikanter Unterschied zur Woche 0 (p<0,05)

SFA: Gesättigte Fettsäuren; MUFA: Einfach ungesättigte Fettsäuren; PUFA: Mehrfach ungesättigte Fettsäuren; FS Fettsäure

Tabelle 4.6 *Interventionsstudie I: Fettsäuremuster im Plasma (Auswertung 1)*

FS	ALA-Gruppe			GLA-Gruppe			Placebo-Gruppe		
	Woche			Woche			Woche		
	0	6	12	0	6	12	0	6	12
14:0	0,83±0,27	0,90±0,38	0,95±0,39	0,94±0,28	0,88±0,40	0,88±0,41	0,94±0,29	1,08±0,58	0,92±0,42
14:1	0,08±0,08	0,10±0,07	0,12±0,13	0,07±0,04	0,06±0,05	0,07±0,06	0,06±0,04	0,10±0,07	0,07±0,05
16:0	22,98±2,00	22,75±2,71	23,12±2,71	23,45±2,00	24,23±4,06	23,71±2,32	23,08±2,40	23,28±2,83	23,72±2,47
16:1	2,47±0,80	2,44±0,95	2,73±1,32	2,63±0,68	2,78±1,17	2,61±0,96	2,25±0,85	2,43±0,98	2,32±0,82
18:0	7,44±0,82	7,60±0,93	7,23±0,74	7,26±0,81	7,47±1,14	7,23±0,84	7,53±1,20	7,72±1,02	7,38±1,20
18:1	20,78±2,01	20,77±2,65	20,69±3,16	21,05±3,18	21,67±3,62	20,60±2,56	20,77±2,61	21,0±2,87	21,13±2,49
18:2ω-6	32,40±3,35	32,76±4,88	32,31±5,97	31,33±4,68	28,59±9,06	31,13±5,56	32,34±4,35	31,59±5,32	31,38±4,67
18:3ω-6	0,59±0,27	0,53±0,19	0,55±0,19	0,47±0,14	0,70±0,21*	0,64±0,25*	0,49±0,16	0,51±0,23	0,47±0,16
18:3ω-3	0,58±0,21	0,83±0,25*	0,84±0,24*	0,50±0,13	0,58±0,11*	0,52±0,12	0,64±0,2	0,62±0,17	0,54±0,12
20:3ω-6	1,88±0,41	1,82±0,43	1,83±0,36	2,09±0,4	2,44±0,57*	2,33±0,59	2,03±0,3	1,92±0,32	1,81±0,37*
20:4ω-6	7,23±1,15	6,90±1,13	6,91±1,06	7,62±1,42	8,11±1,78	7,82±1,36	7,49±1,65	7,16±1,59	7,71±2,01
20:5ω-3	0,85±0,38	0,88±0,31	0,97±0,37	0,73±0,7	0,70±0,46	0,72±0,85	0,68±0,29	0,79±0,32	0,69±0,47
22:4ω-6	0,10±0,07	0,12±0,08	0,08±0,08	0,17±0,08	0,14±0,1	0,12±0,1*	0,09±0,09	0,11±0,07	0,10±0,08
22:5ω-3	0,44±0,12	0,42±0,08	0,42±0,16	0,37±0,12	0,35±0,19	0,35±0,13	0,38±0,11	0,39±0,1	0,36±0,12
22:6ω-3	1,36±0,6	1,20±0,31	1,24±0,4	1,33±0,65	1,31±0,50	1,29±0,62	1,23±0,41	1,30±0,48	1,40±0,65

Mittelwerte in % bezogen auf Gesamtfettsäuren ± SD (n=15); *statistisch signifikanter Unterschied zu Woche 0 (p<0,05); FS: Fettsäure

Tabelle 4.7 Interventionsstudie I: Fettsäuremusters im Plasma (Auswertung 2)

FS	ALA-Gruppe			GLA-Gruppe			Placebo-Gruppe		
	Woche			Woche			Woche		
	0	6	12	0	6	12	0	6	12
18:2 ω -6	71,3 \pm 4,07	71,86 \pm 3,84 [#]	71,16 \pm 3,99	70,03 \pm 5,11	64,49 \pm 14,21*	68,93 \pm 6,26	71,13 \pm 4,39	70,92 \pm 4,51	70,54 \pm 5,18
18:3 ω -6	1,31 \pm 0,65	1,18 \pm 0,47 [#]	1,27 \pm 0,55 [#]	1,08 \pm 0,38	1,76 \pm 0,87*	1,47 \pm 0,68*	1,09 \pm 0,37	1,17 \pm 0,57	1,07 \pm 0,39
18:3 ω -3	1,28 \pm 0,47	1,83 \pm 0,59* ⁺	1,95 \pm 0,82* ^{#+}	1,12 \pm 0,3	1,42 \pm 0,54	1,17 \pm 0,32	1,42 \pm 0,45	1,42 \pm 0,39	1,25 \pm 0,4
20:3 ω -6	4,18 \pm 1,02	4,12 \pm 1,41 [#]	4,16 \pm 1,14	4,69 \pm 0,81	6,03 \pm 2,81* [°]	5,25 \pm 1,50 [°]	4,55 \pm 1,07	4,43 \pm 1,08	4,15 \pm 1,10
20:4 ω -6	15,95 \pm 2,63	15,25 \pm 2,39* [#]	15,39 \pm 1,99	17,24 \pm 3,58	20,11 \pm 8,89	17,65 \pm 3,72	16,50 \pm 3,05	16,12 \pm 2,65	17,26 \pm 3,64
20:5 ω -3	1,87 \pm 0,82	1,92 \pm 0,68	2,16 \pm 0,79	1,63 \pm 1,47	1,76 \pm 1,27	1,59 \pm 1,73	1,52 \pm 0,62	1,87 \pm 0,93	1,53 \pm 0,91
22:4 ω -6	0,22 \pm 0,17	0,27 \pm 0,18	0,21 \pm 0,21	0,38 \pm 0,19	0,37 \pm 0,33	0,27 \pm 0,25	0,22 \pm 0,22	0,25 \pm 0,18	0,23 \pm 0,17
22:5 ω -3	0,95 \pm 0,23	0,92 \pm 0,15	0,95 \pm 0,34	0,84 \pm 0,29	0,83 \pm 0,51	0,78 \pm 0,32	0,86 \pm 0,26	0,89 \pm 0,23	0,82 \pm 0,28
22:6 ω -3	2,97 \pm 1,20	2,64 \pm 0,62	2,75 \pm 0,79	2,99 \pm 1,51	3,23 \pm 1,6	2,88 \pm 1,29	2,73 \pm 0,91	2,94 \pm 1,08	3,16 \pm 1,29
$\Sigma\omega$ -6	92,94 \pm 1,96	92,68 \pm 1,07	92,19 \pm 1,78	93,42 \pm 2,59	92,77 \pm 3,04	93,57 \pm 3,19	93,48 \pm 1,32	92,88 \pm 1,89	93,24 \pm 2,25
$\Sigma\omega$ -3	7,06 \pm 1,96	7,32 \pm 1,06	7,81 \pm 1,78	6,58 \pm 2,59	7,23 \pm 3,04	6,43 \pm 3,19	6,52 \pm 1,32	7,12 \pm 1,89	6,78 \pm 2,25

Mittelwerte in % bezogen auf alle PUFAs \pm SD (n=15); FS: Fettsäure

*statistisch signifikanter Unterschied zur Woche 0 (p<0,05)

[#]statistisch signifikanter Unterschied zwischen ALA-Gruppe und GLA-Gruppe (p<0,05)

⁺statistisch signifikanter Unterschied zwischen ALA-Gruppe und Placebo-Gruppe (p<0,05)

[°]statistisch signifikanter Unterschied zwischen GLA-Gruppe und Placebo-Gruppe (p<0,05)

4.2.1.2 Fettsäuremuster in Erythrozyten nach Gabe von Leinsamen- und Borretschöl

Die Fettsäuremuster in den Erythrozyten wurden zu den Zeitpunkten 0, 6 und 12 Wochen mittels der GC untersucht (Abschnitt 3.3). Die Ergebnisse wurden, wie bereits für Plasma beschrieben, auf zwei Arten ausgewertet (Tabelle 4.8, 4.9 und Tabelle 4.10). Abbildung 4-6 zeigt ein typisches GC- Chromatogramm der Fettsäuremethylester einer Erythrozytenprobe.

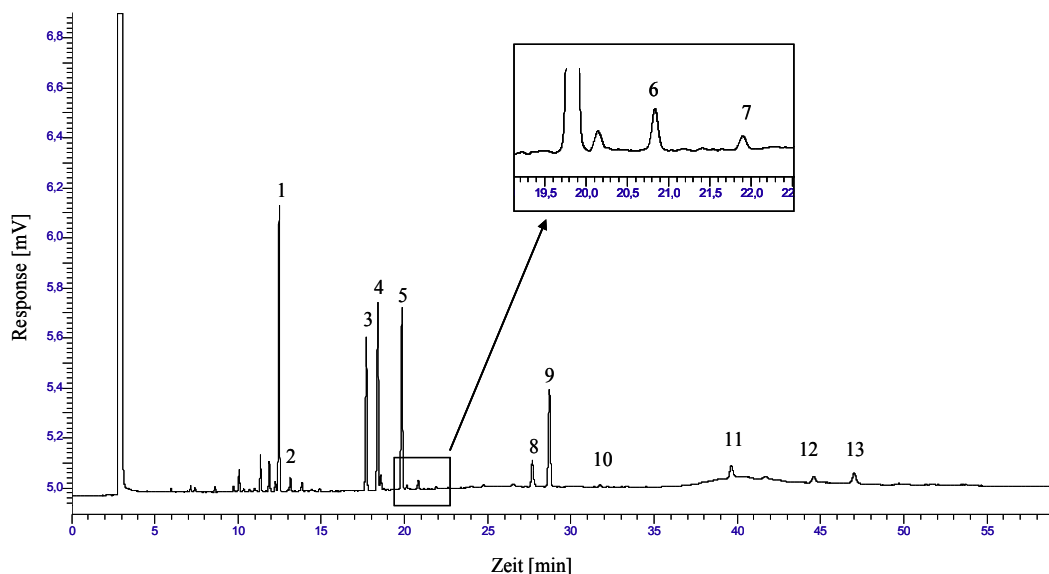


Abb. 4-1 *Typisches GC-Chromatogramm der Fettsäuremethylester zur Bestimmung des Fettsäuremusters einer Erythrozytenprobe (Chromatogramm eines Probanden der GLA-Gruppe in Woche 6)*

1: Palmitinsäure; 2: Palmitoleinsäure; 3: Stearinsäure; 4: Ölsäure; 5: Linolsäure; 6: γ -Linolensäure; 7: α -Linolensäure; 8: Dihomo- γ -Linolensäure; 9: Arachidonsäure; 10: Eicosapentaensäure; 11: Docosatetraensäure; 12: Docosapentaensäure; 13: Docosahexaensäure

1. Auswertung:

In der ALA-Gruppe betrug der Anteil an α -Linolensäure zu Beginn der Studie 0,17%, nach Supplementierung mit Leinsamenöl stieg der Anteil bis zur Woche 6 bzw. Woche 12 (0,24% bzw. 0,29%) (Tabelle 4.8 und Tabelle 4.9). Der Anstieg war von Woche 0 nach Woche 12 statistisch signifikant. Daneben konnte auch eine statistisch signifikante Zunahme des Anteiles der γ -Linolensäure von Woche 0 zu Woche 6 und Woche 12 beobachtet werden (0,88%; 1,4%; 1,7%). Der Anteil der Palmitinsäure nahm von 22,5% in Woche 0 auf 21,5% in Woche 6, sowie auf 21,4% in Woche 12 statistisch signifikant ab.

Unter Einnahme von Borretschöl (GLA-Gruppe) über einen Zeitraum von 12 Wochen veränderte sich der Anteil an γ -Linolensäure statistisch nicht signifikant. Er betrug zu Beginn der Studie (Woche 0) 1,4%, in Woche 6 0,95% und in Woche 12 1,6%. Der Anteil an DHGLA stieg von Woche 0 (2,1%) auf Woche 6 (2,2%) statistisch signifikant an und lag in Woche 12 bei 2,3%. Der Arachidonsäureanteil stieg von Woche 0 auf Woche 12 von 15,8% auf 16,1% statistisch signifikant an, der Anteil der Eicosapentaensäure fiel von Woche 0 auf Woche 12 von 0,73% auf 0,41% signifikant ab.

In der Placebogruppe fiel der Anteil der Ölsäure von 16,5% in Woche 0 auf 15,0% in Woche 12 statistisch signifikant ab. Ansonsten waren in der Placebogruppe keine Veränderungen bezüglich des Fettsäuremusters zu beobachten.

Auswertung 2:

Die statistische Auswertung nur über die PUFAs ergab einen entsprechend höheren Anteil für die einzelnen Fettsäuren (Tabelle 4.10). Bis auf wenige Ausnahmen wurden die gleichen Signifikanzen wie im Auswertemodus 1 berechnet. In der GLA-Gruppe, war die prozentuale Zunahme der Arachidonsäure in Woche 12 im Vergleich zur Woche 0 statistisch nicht mehr signifikant. Der Anteil an Docosapentaensäure von Woche 0 auf Woche 12 nahm statistisch signifikant ab (4,21% bzw. 3,54%). Entsprechend nahm auch der Gesamtanteil der ω -3 Fettsäure von 12,9% auf 11,9% statistisch signifikant ab.

Wie für die Plasmawerte wurde auch hier ein Intergruppenvergleich durchgeführt. Für die ALA-Gruppe ergab sich, dass die Zunahme von α -Linolensäure von Woche 0 auf Woche 6 statistisch signifikant im Vergleich zur Placebo-Gruppe nicht jedoch zur GLA-Gruppe war. Die Zunahme auf Woche 12 war statistisch signifikant unterschiedlich zu beiden Gruppen.

Für die GLA-Gruppe zeigte sich, dass die prozentuale Zunahme der DHGLA und die Abnahme der Docosapentaensäure von Woche 0 auf Woche 12 statistisch signifikant unterschiedlich zur ALA-Gruppe waren. Vergleicht man die GLA- Gruppe mit der Placebo-Gruppe, so war die Zunahme der DHGLA in der GLA-Gruppe, sowohl auf Woche 6, wie auch auf Woche 12 statistisch signifikant unterschiedlich zur Placebo-Gruppe.

Die Ergebnisse der Fettsäureanalyse des Plasmas zeigte, dass durch Supplementierung des α -linolensäurereichen Leinsamenöls der Anteil der α -Linolensäure im Blut ansteigt und durch die Supplementierung des γ -linolensäurereichen Borretschöls der Anteil der γ -Linolensäure, die Analyse der Erythrozyten bestätigen dieses Ergebnis nur teilweise.

Tabelle 4.1 Interventionsstudie I: Fettsäuremuster der Erythrozyten (Auswertung I; Zusammenfassung)

FS	ALA-Gruppe			GLA-Gruppe			Placebo-Gruppe		
	Woche			Woche			Woche		
	0	6	12	0	6	12	0	6	12
SFA	37,94±3,17	37,88±1,91	37,85±2,50	37,83±3,33	37,76±3,08	38,05±2,56	38,29±3,03	38,19±2,41	38,68±3,58
MUFA	18,04±1,42	17,87±1,23	17,64±1,42	17,47±2,34	17,58±2,01	17,33±2,21	17,18±1,46	16,24±3,99	15,62±3,85
PUFA	44,01±2,66	44,22±2,43	44,51±3,05	44,69±4,33	44,30±3,99	44,62±4,00	44,52±3,40	45,06±3,77	45,71±4,57
davon									
18:2ω-6	19,14±5,45	17,31±2,62	18,28±4,08	16,89±2,98	16,86±3,96	16,82±3,36	17,18±2,48	17,25±2,31	17,51±2,98
18:3ω-6	0,88±0,87	1,39±1,44*	1,72±1,62*	1,43±2,41	0,95±0,78	1,62±2,65	1,17±1,24	2,39±3,75	2,55±5,67
18:3ω-3	0,17±0,17	0,24±0,18	0,29±0,13*	0,14±0,11	0,21±0,20	0,17±0,10	0,22±0,19	0,15±0,13	0,19±0,12
Σω -6	38,84±2,68	38,90±1,99	39,17±3,22	39,14±4,74	39,06±4,16	39,95±4,26	39,06±2,89	39,71±4,00	40,50±5,36
Σω -3	5,18±1,26	5,32±1,00	5,35±1,43	5,55±1,58	5,24±1,65	4,67±1,26*	5,45±1,51	5,35±1,35	5,21±1,54
Σω -6/Σω -3	7,50	7,30	7,32	7,03	7,45	8,55	7,12	7,42	7,77

Mittelwerte in % bezogen auf Gesamtfettsäuren± SD (n=15); *statistisch signifikanter Unterschied zu Woche 0 (p<0,05)

SFA: Gesättigte Fettsäuren; MUFA: Einfach ungesättigte Fettsäuren; PUFA: Mehrfach ungesättigte Fettsäuren; FS: Fettsäure

Tabelle 4.9 Interventionsstudie I: Fettsäuremusters der Erythrozyten (Auswertung 1)

FS	ALA-Gruppe			GLA-Gruppe			Placebo-Gruppe		
	Woche			Woche			Woche		
	0	6	12	0	6	12	0	6	12
16:0	22,53±1,86	21,45±1,08*	21,38±1,38*	22,12±1,92	22,46±1,59	22,13±1,54	21,38±1,16	22,02±2,17	21,62±2,99
16:1	0,92±0,46	0,74±0,31	0,79±0,42	0,85±0,4	0,92±0,51	0,81±0,49	0,64±0,31	0,71±0,42	0,59±0,44
18:0	15,41±3,14	16,50±2,24	16,46±2,16	15,71±3,09	15,50±3,09	15,92±2,36	16,91±2,98	16,56±1,85	17,05±2,06
18:1	17,12±1,21	17,08±1,15	16,85±1,04	16,62±2,11	16,82±1,77	16,52±1,92	16,54±1,33	15,65±1,85	15,03±3,84*
18:2ω-6	19,14±5,45	17,31±2,62	18,28±4,08	16,89±2,98	16,86±3,96	16,82±3,36	17,18±2,48	17,25±2,31	17,51±2,98
18:3ω-6	0,88±0,87	1,39±1,44*	1,72±1,62*	1,43±2,41	0,95±0,78	1,62±2,65	1,17±1,24	2,39±3,75	2,55±5,67
18:3ω-3	0,17±0,17	0,24±0,18	0,29±0,13*	0,14±0,11	0,21±0,20	0,17±0,10	0,22±0,19	0,15±0,13	0,19±0,12
20:3ω-6	1,82±0,31	2,50±2,56	1,81±0,31	2,06±0,41	2,23±0,49*	2,26±0,62	2,10±0,65	1,81±0,62	1,86±0,45
20:4ω-6	14,58±2,33	15,25±1,32	14,9±1,31	15,79±2,31	16,05±1,86	16,09±2,24*	15,92±3,07	15,71±2,21	15,94±2,46
20:5ω-3	0,69±0,23	0,72±0,20	0,75±0,29	0,73±0,67	0,57±0,45	0,41±0,23	0,68±0,40	0,65±0,27	0,70±0,40
22:4ω-6	2,41±0,82	2,46±0,48	2,45±0,48	2,97±0,52	2,98±0,74	3,15±0,62	2,68±0,63	2,56±0,58	2,64±0,50
22:5ω-3	1,94±0,48	1,91±0,33	2,00±0,43	1,85±0,54	1,65±0,48	1,58±0,33	1,90±0,50	1,93±0,43	1,90±0,49
22:6ω-3	2,37±0,93	2,45±0,82	2,30±0,96	2,82±1,16	2,81±1,13	2,52±1,01	2,66±0,83	2,61±0,99	2,41±1,00

Mittelwerte in % bezogen auf Gesamtfettsäuren± SD (n=15);*statistisch signifikanter Unterschied zu Woche 0 (p<0,05); FS: Fettsäure

Tabelle 4.10 Interventionsstudie I: Fettsäuremusters der Erythrozyten (Auswertung 2)

FS	ALA-Gruppe			GLA-Gruppe			Placebo-Gruppe		
	Woche			Woche			Woche		
	0	6	12	0	6	12	0	6	12
18:2 ω -6	43,19 \pm 11,02	39,03 \pm 4,86	40,67 \pm 6,79	37,51 \pm 3,8	37,61 \pm 6,45	37,04 \pm 5,78	38,61 \pm 4,97	38,41 \pm 4,93	38,21 \pm 5,83
18:3 ω -6	2,06 \pm 2,14	3,22 \pm 3,44*	3,89 \pm 3,79* ⁺	2,99 \pm 4,77	2,14 \pm 1,74	3,35 \pm 5,07	2,65 \pm 2,93	5,01 \pm 7,45	4,85 \pm 9,42
18:3 ω -3	0,37 \pm 0,38	0,53 \pm 0,41 ⁺	0,66 \pm 0,31* ^{#+}	0,32 \pm 0,24	0,45 \pm 0,42	0,38 \pm 0,24	0,49 \pm 0,41	0,35 \pm 0,31	0,42 \pm 0,28
20:3 ω -6	4,15 \pm 0,74	5,56 \pm 5,30	4,07 \pm 0,75	4,63 \pm 1,07	5,05 \pm 1,19* [°]	5,06 \pm 1,57 ^{#°}	4,76 \pm 1,51	4,07 \pm 1,46	4,13 \pm 1,17
20:4 ω -6	33,23 \pm 5,74	34,58 \pm 3,70	33,49 \pm 3,45	35,31 \pm 4,46	36,18 \pm 3,77	35,70 \pm 4,74	35,65 \pm 5,49	34,99 \pm 4,55	35,00 \pm 5,81
20:5 ω -3	1,58 \pm 0,55	1,63 \pm 0,45	1,70 \pm 0,65	1,69 \pm 1,60	1,32 \pm 1,12	0,92 \pm 0,53 [#]	1,51 \pm 0,88	1,49 \pm 0,68	1,57 \pm 0,89
22:4 ω -6	5,49 \pm 1,87	5,55 \pm 1,02	5,50 \pm 1,12	6,67 \pm 1,20	6,73 \pm 1,71	7,01 \pm 1,47	6,03 \pm 1,42	4,32 \pm 1,12	4,20 \pm 1,20
22:5 ω -3	4,43 \pm 1,15	4,32 \pm 0,75	4,52 \pm 1,04	4,21 \pm 1,50	3,79 \pm 1,34	3,54 \pm 0,99*	4,27 \pm 1,14	4,32 \pm 1,12	4,20 \pm 1,20
22:6 ω -3	5,49 \pm 1,87	5,55 \pm 1,02	5,50 \pm 1,12	6,67 \pm 1,26	6,73 \pm 1,71	7,01 \pm 1,47	6,03 \pm 1,42	5,68 \pm 1,09	5,81 \pm 1,21
$\Sigma\omega$ -6	88,12 \pm 2,64	87,95 \pm 1,06	87,62 \pm 2,09	87,11 \pm 2,47	87,71 \pm 2,53	88,15 \pm 2,12	87,70 \pm 1,83	88,17 \pm 2,04	88,00 \pm 2,23
$\Sigma\omega$ -3	11,88 \pm 2,64	12,04 \pm 1,06	12,38 \pm 2,09	12,89 \pm 2,47	12,29 \pm 2,53	11,85 \pm 2,12*	12,30 \pm 1,83	11,84 \pm 2,04	12,00 \pm 2,23

(Mittelwerte in % bezogen auf alle PUFAs \pm SD) (n=15); FS: Fettsäure

*statistisch signifikanter Unterschied zur Woche 0 (p<0,05)

[#]statistisch signifikanter Unterschied zwischen der ALA-Gruppe und der GLA-Gruppe (p<0,05)

⁺statistisch signifikanter Unterschied zwischen ALA-Gruppe und Placebo-Gruppe (p<0,05)

[°]statistisch signifikanter Unterschied zwischen GLA-Gruppe und Placebo-Gruppe (p<0,05)

4.2.1.3 Bestimmung der Triglyceridkonzentration im Plasma

In den Plasmaproben wurden die Konzentration an Triglyceriden zu den Zeitpunkten 0, 6 und 12 Wochen bestimmt. Das Ergebnis ist in Tabelle 4.11 wiedergegeben.

Die Konzentration der Triglyceride war zu keinem Zeitpunkt und in keiner Gruppe im Vergleich zum Ausgangswert statistisch signifikant verändert.

Tabelle 4.11 *Interventionsstudie I: Konzentration der Triglyceride [mg/dl] in der ALA-, GLA- und Placebo-Gruppe*

	Woche		
	0	6	12
ALA-Gruppe	94±40	92±41	108±91
GLA-Gruppe	101±34	117±50	116±67
Placebo-Gruppe	102±37	104±52	99±43

Mittelwerte ± SD (n=15)

4.2.1.4 Tocopherol-, Carotinoid- und Retinolkonzentrationen im Plasma

In den Plasmaproben wurden des Weiteren die Carotinoid- und Tocopherolkonzentrationen bestimmt. Die Werte sind angegeben in nmol/ml Plasma und in Tabelle 4.12 zusammengefasst. Bis auf einen statistisch signifikanten Abfall der Lycopinkonzentration in der Placebogruppe in Woche 12 im Vergleich zur Woche 0 (von 0,49±0,24 nmol/ml auf 0,44±0,34 nmol/ml) konnten keine Veränderungen in der Carotinoid- oder Tocopherolkonzentrationen festgestellt werden.

Tabelle 4.12 Interventionsstudie I: Tocopherol-, Carotinoid- und Retinolkonzentrationen im Plasma [nmol/ml]

	Woche	Lutein	Zeaxanthin	Cryptoxanthin	Lycopin	α -Carotin	β -Carotin	α -Tocopherol	γ -Tocopherol	Retinol
ALA-Gruppe	0	0,34±0,13	0,07±0,03	0,36±0,28	0,56±0,20	0,19±0,19	0,82±0,55	27,11±4,2	0,82±0,35	1,18±0,28
	6	0,32±0,13	0,09±0,05	0,35±0,29	0,56±0,21	0,24±0,28	0,98±0,73	26,25±3,9	0,84±0,43	1,20±0,37
	12	0,33±0,11	0,09±0,07	0,27±0,18	0,58±0,16	0,23±0,24	0,99±0,94	27,72±5,1	0,85±0,46	1,20±0,34
GLA-Gruppe	0	0,26±0,13	0,06±0,03	0,29±0,28	0,49±0,26	0,12±0,10	0,54±0,43	22,94±6,6	0,78±0,50	1,26±0,21
	6	0,27±0,13	0,07±0,04	0,31±0,33	0,48±0,25	0,12±0,08	0,53±0,44	24,55±5,5	0,65±0,31	1,34±0,35
	12	0,28±0,10	0,07±0,03	0,25±0,20	0,59±0,31	0,18±0,21	0,70±0,47	24,43±7,7	0,66±0,37	1,30±0,23
Placebo-Gruppe	0	0,30±0,14	0,07±0,03	0,43±0,22	0,49±0,24	0,15±0,10	0,56±0,26	24,33±4,5	0,98±0,65	1,28±0,23
	6	0,29±0,11	0,08±0,04	0,30±0,19	0,44±0,36	0,13±0,09	0,50±0,26	25,91±4,8	0,80±0,38	1,32±0,25
	12	0,27±0,11	0,07±0,06	0,21±0,11	0,44±0,34*	0,16±0,11	0,49±0,23	23,22±5,9	0,70±0,36	1,19±0,32

Mittelwerte \pm SD (n=15)

*statistisch signifikanter Unterschied zur Woche 0 (p<0,05)

4.2.2 Effekte der Supplementierung mit Leinsamen- und Borretschöl auf Struktur und Funktion der Haut

Im Folgenden werden Effekte auf die Haut nach Supplementierung mit Leinsamen-, Borretschöl bzw. einem Placebo über einen Zeitraum von 12 Wochen dargestellt. Untersucht wurden Oberflächenstruktur, Hydratation und Sensitivität der Haut. Die Parameter wurden in Kooperation mit dem Institut für Dermatologie der Universität Witten Herdecke untersucht.

4.2.2.1 Analyse der Oberflächenstruktur der Haut mit dem SELS-Verfahren (Surface Evaluation of Living Skin)

Bei der Analyse der Oberflächenstruktur der Haut mit dem SELS-Verfahren wird aus einem Foto ein Hautprofil erstellt (Beispiel Abbildung 4-7). Die Aufnahmen wurden unter standardisierten Bedingungen erstellt. Mit dem Verfahren lassen sich Aussagen zur Rauigkeit, Schuppigkeit, Faltigkeit und Glätte der Haut machen. Die Ergebnisse der Untersuchungen sind in den Tabellen 4.13 bis 4.15 dargestellt.

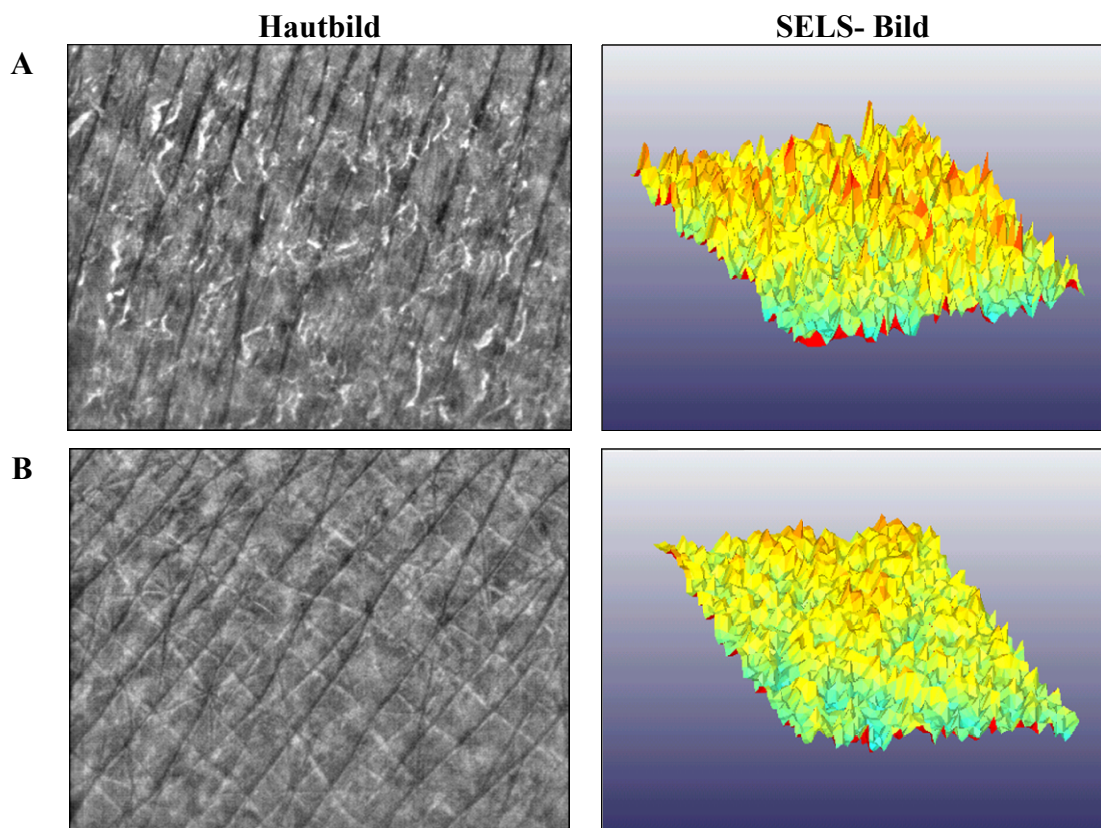


Abb. 4-7 Beispiel der Veränderung des Hautoberflächenprofils analysiert mit dem SELS-Verfahren

A: Hautprofil eines Probanden zu Beginn der Studie

B: Hautprofil nach 12 Wochen Supplementierung mit Leinsamenöl

In der ALA-Gruppe ließen sich folgende statistisch signifikanten Unterschiede feststellen: Der Parameter Rauhigkeit fiel um 15% in Woche 6 und um 34% in Woche 12 im Vergleich zu Woche 0. Die Schuppigkeit nahm um 29% in Woche 6 und um 35% in Woche 12 ab. Beim Parameter Glätte ließ sich eine Zunahme um 4% von Woche 12 im Vergleich zur Woche 0. Die Faltigkeit der Haut veränderte sich nicht.

In der GLA- Gruppe war die Rauhigkeit der Haut in Woche 12 um 15% verringert verglichen mit Woche 0. Auch die Schuppigkeit verringerte sich um 27% in Woche 12 verglichen mit Woche 0. Die Parameter Faltigkeit und Glätte veränderten sich nicht.

In der Placebogruppe wurde durch die Supplementierung keiner der genannten Parameter moduliert.

So lässt sich festhalten, dass durch die Supplementierung mit Leinsamenöl Rauhigkeit, Schuppigkeit und Glätte der Haut sich verbessern. Unter Supplementierung mit Borretschöl verbessert sich die Rauhigkeit und Schuppigkeit, wobei die Effekte in der GLA- Gruppe geringer ausgeprägt sind als in der ALA- Gruppe.

4.2.2.2 Messung der Hauthydration

Zur Messung der Hauthydration wurden Hautfeuchtigkeit und der transepidermale Wasserverlust (TEWL) gemessen (Abschnitt 3.4.4). Die Ergebnisse sind in den Tabellen 4.13 bis 4.15 dargestellt.

In der ALA- Gruppe nahm die Feuchtigkeit der Haut von der Woche 0 nach Woche 6 und Woche 12 zu (Woche 6: +12%, Woche 12 +19%). Der TEWL nahm zu Woche 6 um 8% und zu Woche 12 um 26% ab.

In der GLA- Gruppe nahm die Feuchtigkeit der Haut von Woche 0 auf Woche 12 um 17% zu, der TEWL nahm von Woche 0 zu Woche 6 um 9% und zu Woche 12 um 11% ab. Alle Veränderungen waren statistisch signifikant.

In der Placebo- Gruppe ließ sich keine statistisch signifikante Veränderung feststellen.

Folglich verbesserte sich durch die Supplementierung mit Leinsamen- und Borretschöl die Hauthydration. Der Effekt war bei Supplementierung mit Leinsamenöl stärker ausgeprägt.

4.2.2.3 Messung der Hautsensitivität

Um Veränderungen in der Hautsensitivität nach Applikation von Leinsamenöl bzw. Borretschöl zu untersuchen wurde der Nicotinattest gemäß Abschnitt 3.4.4.3 durchgeführt. Messparameter waren die Differenz der Hautrötung vor und nach topischer Anwendung einer Nicotinatlösung, ausgedrückt durch den Δa - Wert und der kapillare Blutfluss. Die Ergebnisse sind in den Tabellen 4.13 bis 4.15 dargestellt.

In der ALA- Gruppe fiel der Δa - Wert um 32% in Woche 6 und um 45 % in Woche 12 im Vergleich zur Woche 0. Der Blutfluss verringerte sich in der Gruppe um 34% in Woche 6 und um 81% in Woche 12. Alle Veränderungen waren statistisch signifikant verglichen mit Woche 0. In der GLA- Gruppe war der Δa - Wert in Woche 6 statistisch signifikant geringer als in Woche 0 (-29%), in der Woche 12 betrug die Abnahme 35%. Der Blutfluss verminderte sich statistisch signifikant um 28% in der Woche 6 und um 34% in der Woche 12.

In der Placebogruppe war im Verlauf der Studie keiner der Parameter statistisch signifikant verändert.

Durch die Supplementierung mit Leinsamenöl verringerte sich die Sensitivität der Haut. Ebenfalls konnte durch die Supplementierung mit Borretschöl eine Verbesserung erreicht werden.

Tabelle 4.13 Interventionsstudie I: Änderung der Oberflächenstruktur, Hydratation und Sensitivität der Haut in der ALA-Gruppe (Leinsamenöl)

	Woche		
	0	6	12
Oberflächenstruktur			
Rauhigkeit (AU)	1,27±0,40	1,07±0,43* (-15%)	0,84±0,40* (-34%)
Schuppigkeit (AU)	0,69±0,33	0,49±0,28* (-29%)	0,45±0,29* (-35%)
Faltigkeit (AU)	34,95±2,07	34,59±2,25 (-1%)	34,95±2,19 (+0%)
Glätte (AU)	37,23±6,11	39,08±5,54 (+5%)	38,87±5,73* (+4%)
Hydratation			
Feuchtigkeit (AU)	32±8	35±10* (+12%)	38±7* (+19%)
TEWL (g/h*m ²)	9,70±1,06	8,95±1,09* (-8%)	7,15±1,80* (-26%)
Sensitivität			
Δa - Wert (AU)	4,32±1,25	2,93±0,94* (-32%)	2,38±1,03* (-45%)
Blutfluss (AU)	75,0±22,2	49,5±23,4* (-34%)	14,4±12,2* (-81%)

Mittelwerte aller Probanden ± SD (n=15)

* statistisch signifikant unterschiedlich zur Woche 0 (p<0,05)

Tabelle 4.14 *Interventionsstudie I: Änderung der Oberflächenstruktur, Hydratation und Sensitivität der Haut in der GLA-Gruppe (Borretschöl)*

	Woche			
	0	6		12
Oberflächenstruktur				
Rauhigkeit (AU)	1,43±0,61	1,32±0,56	(-7,6%)	1,22±0,42* (-15%)
Schuppigkeit (AU)	0,59±0,33	0,44±0,11	(-25%)	0,43±0,11* (-27%)
Faltigkeit (AU)	35,23±2,90	35,52±2,67	(+0,8%)	35,61±2,81 (+1,1%)
Glätte (AU)	38,15±7,68	38,09±6,38	(-0,2%)	39,14±6,74 (+2,6%)
Hydratation				
Feuchtigkeit (AU)	30±7	32±6	(+8%)	35±7* (+17%)
TEWL (g/h*m ²)	9,89±0,80	9,00±1,11*	(-9%)	8,78±1,15* (-11%)
Sensitivität				
Δ-a- Wert (AU)	4,20±1,50	2,99±1,64*	(-29%)	2,73±1,24* (-35%)
Blutfluss (AU)	70,9±20,3	51,1±30,1*	(-28%)	46,9±20,3* (-34%)

Mittelwerte aller Probanden ± SD (n=15)

* statistisch signifikant unterschiedlich zur Woche 0 (p<0,05)

Tabelle 4.15 *Interventionsstudie I: Änderung der Oberflächenstruktur, Hydratation und Sensitivität der Haut in der Placebo-Gruppe*

	Woche			
	0	6		12
Oberflächenstruktur				
Rauhigkeit (AU)	1,19±0,25	1,20±0,21	(+0,61%)	1,20±0,35 (+1%)
Schuppigkeit (AU)	0,59±0,37	0,57±0,33	(-4,3%)	0,52±0,24 (-12,6%)
Faltigkeit (AU)	35,22±3,57	35,76±2,57	(+1,5%)	35,83±2,68 (+1,7%)
Glätte (AU)	35,81±6,43	34,25±6,17	(-4,3%)	34,97±5,84 (-2,3%)
Hydratation				
Feuchtigkeit (AU)	29±5	30±5	(+3%)	32±5 (+9%)
TEWL (g/h*m ²)	9,73±1,19	9,67±1,51	(-0,6%)	9,61±1,63 (-1,2%)
Sensitivität				
Δ-a- Wert (AU)	3,40±1,00	3,40±1,33	(+0%)	3,33±1,17 (-2%)
Blutfluss (AU)	70,1±22,0	62,6±26,0	(-10%)	64,1±28,7 (-8,5%)

Mittelwerte aller Probanden ± SD (n=15)

* statistisch signifikant unterschiedlich zur Woche 0 (p<0,05)

4.2.3 Zusammenfassung der Ergebnisse der Interventionsstudie I

Durch die tägliche Zufuhr kleiner Dosen an Leinsamenöl bzw. Borretschöl (ca. 2,2g) veränderte sich das Fettsäuremuster des Plasmas in den jeweiligen Gruppen. Von Woche 0 nach Woche 6 nahm in der ALA-Gruppe hauptsächlich der Anteil der α -Linolensäure im Gesamtfettsäuremuster zu, in der GLA-Gruppe nahm der Anteil der γ -Linolensäure zu. Eine weitere Zunahme der beiden Fettsäuren von Woche 6 nach Woche 12 konnte nicht festgestellt werden.

Der Anteil der α -Linolensäure im Gesamtfettsäuremuster der Erythrozyten in der ALA-Gruppe erhöhte sich in der Woche 12 im Vergleich zur Woche 0 statistisch signifikant. In der GLA-Gruppe konnten keine wesentlichen Veränderungen festgestellt werden.

Rauhigkeit und Schuppigkeit als Parameter der Hautoberflächenstruktur, nahmen in der ALA- und GLA-Gruppe ab. In der ALA-Gruppe verbesserte sich die Glätte geringfügig.

Die Hauthydratation verbesserte sich sowohl in der ALA- als auch in der GLA-Gruppe nach Supplementierung (Zunahme der Feuchtigkeit und Abnahme des transepidermalen Wasserverlustes). Die Verbesserungen waren ausgeprägter in der ALA-Gruppe.

Die Entzündungsreaktion, infolge topischer Applikation einer Nicotinatlösung, verringerte sich in der ALA- und GLA-Gruppe. In der ALA-Gruppe war die Verringerung der Entzündungsreaktion ausgeprägter als in der GLA-Gruppe.

In der Kontrollgruppe veränderte sich das Fettsäuremuster in Plasma und Erythrozyten nicht. Veränderungen in der Hautoberflächenstruktur, Hauthydratation und Hautsensitivität wurden nicht festgestellt.

4.3 Interventionsstudie II: Effekte von Leinsamen- und Distelöl auf Struktur und Funktion der Haut nach oraler Applikation

Interventionsstudie II ist in Zusammenarbeit mit Frau Dr. Karin Neukam im Rahmen ihrer Dissertation entstanden und ebenfalls dort aufgeführt. Weitere Details sind aus ihrer Arbeit zu entnehmen [Neukam Dissertation 2006].

In dieser Studie wurde untersucht, ob die orale Applikation eines α -linolensäurereichen Öls (Leinsamenöl) und eines linolsäurereichen Öls (Distelöl) Einfluss auf Funktion und Struktur der Haut haben. Die Studie wurde an 26 Probanden durchgeführt. 13 Probanden erhielten über einen Zeitraum von 12 Wochen 2220 mg Leinsamenöl pro Tag (ALA-Gruppe), weitere 13 Probanden erhielten 2236 mg Distelöl pro Tag (LA-Gruppe), jeweils in Weichgelatine kapseln (2x2 Kapseln).

Das Fettsäuremuster der beiden Öle wurde mit der GC gemäß Abschnitt 3.3 analysiert. Die Ergebnisse dieser Analyse sind in Tabelle 4.16 zusammengefasst. Die dominierende Fettsäure im Leinsamenöl war die α -Linolensäure mit ca. 49% Anteil. Daneben fanden sich noch größere Mengen an Ölsäure (21%) und Linolsäure (16%). Hauptbestandteil des Distelöls war die Linolsäure (72%) gefolgt von Ölsäure (13%) und der Palmitinsäure (7%). Weitere Bestandteile des Leinsamenöls waren α -Tocopherol (3,85 mg/Kapsel) und 0,83mg Rosmarinextrakt je Kapsel. Die Distelölkapsel enthielt zusätzlich 0,83 mg Rosmarinextrakt je Kapsel.

Table 4.16 *Interventionsstudie II: Fettsäuremuster der verwendeten Supplemente*

FS		Leinsamenöl	Distelöl
8:0	Caprylsäure	n.n	n.n
10:0	Caprinsäure	n.n	n.n
12:0	Laurinsäure	n.n	n.n
13:0	Tridecansäure	n.n	n.n
14:0	Myristinsäure	n.n.	0,21
15:0	Pentadecansäure	n.n.	n.n
16:0	Palmitinsäure	4,98	7,39
16:1	Palmitoleinsäure	0,08	0,10
17:0	Heptadecansäure	0,13	n.n.
18:0	Stearinsäure	3,70	2,63
18:1 ω-9	Ölsäure	21,24	12,68
18:2 ω-6	Linolsäure	15,61	71,98
18:3 ω-6	γ-Linolensäure	0,14	0,08
18:3 ω-3	α-Linolensäure	48,76	0,64
20:0	Arachinsäure	0,16	0,46
20:1	Eicosensäure	0,49	0,21
20:2	Eicosadiensäure	0,18	0,16
20:3 ω-6	Eicosatriensäure	n.n.	n.n.
22:0	Behensäure	0,20	0,29
22:1	Erucasäure	n.n.	0,56
24:0	Lignocerinsäure	0,36	0,19
24:1	Nervensäure	n.n.	0,20
unidentifiziert		4,22	1,51

Angabe der FS in % bezogen auf Gesamtfettsäuren

n.n.: nicht nachweisbar

4.3.1 Blutuntersuchungen

4.3.1.1 Fettsäuremuster in Plasma und Erythrozyten nach Gabe von Leinsamen- und Distelöl

Die Fettsäuremuster im Plasma und Erythrozyten wurde zu den Zeitpunkten 0, 6 und 12 Wochen mit Hilfe der GC und FID untersucht. In die Auswertung einbezogen wurden hier ausschließlich die PUFAs. Die Summe der Flächen der Signale aller PUFAs im Chromatogramm wurde auf 100% gesetzt. Die Ergebnisse der Plasmaanalyse sind in Tabelle 4.17 dargestellt.

Nach Supplementierung mit Leinsamenöl nahm in der ALA-Gruppe der Anteil der α -Linolensäure von Woche 0 nach Woche 6 statistisch signifikant zu. Der Anteil war auch noch nach 12 wöchiger Supplementierung statistisch signifikant erhöht (Woche 0 1,31%; Woche 6 2,19%; Woche 12: 1,93%). Der Anstieg schlug sich im Anteil der Gesamt ω -3 Fettsäuren nieder, der ebenfalls in Woche 6 und Woche 12 im Vergleich zur Woche 0 erhöht war. Entsprechend fand sich eine Verringerung in der Summe der ω -6 Fettsäuren und im Verhältnis ω -6 zu ω -3. Der Anteil der α -Linolensäure in der ALA-Gruppe war in Woche 6 und Woche 12 statistisch signifikant unterschiedlich zu Woche 0. Entsprechend war auch der Anteil der ω -3 Fettsäuren in Woche 6 und 12 statistisch signifikant unterschiedlich zwischen den Wochen.

Nach Supplementierung mit Distelöl nahm in der LA-Gruppe der Anteil der Linolsäure von Woche 0 nach Woche 6 statistisch signifikant zu. Auch hier blieb zu Woche 12 der Anteil statistisch signifikant erhöht (Woche 0: 68,9%; Woche 6: 72,6%; Woche 12 71,3%).

In den Erythrozyten (Daten nicht dargestellt) nahm in der ALA-Gruppe der Anteil der α -Linolensäure von Woche 0 nach Woche 6 und 12 zu (Woche 0: 0,9%; Woche 6 1,0%; Woche 12 1,2%). Diese Veränderung war jedoch nicht signifikant. In der LA-Gruppe nahm die Linolsäure, ebenfalls statistisch nicht signifikant zu (Woche 0: 42,1%; Woche 6: 46,4%; Woche 12 44,4%).

Die Daten zeigen, wie in der Interventionsstudie I, dass unter Supplementierung einer geringen Dosis an Leinsamenöl der Anteil der α -Linolensäure am Fettsäuremuster im Blut zunimmt. Durch die Supplementierung mit Distelöl nimmt der Anteil an Linolsäure zu.

Tabelle 4.17 Interventionsstudie II: Fettsäuremusters im Plasma

FS	ALA-Gruppe			LA-Gruppe		
	Woche			Woche		
	0	6	12	0	6	12
18:2 ω -6	67,7 \pm 4,10	67,3 \pm 3,95	68,8 \pm 5,89	68,9 \pm 4,16	72,6 \pm 4,13*	71,3 \pm 4,18
18:3 ω -6	3,97 \pm 9,38	1,51 \pm 0,87	1,90 \pm 1,87	1,37 \pm 0,64	1,15 \pm 0,86	1,16 \pm 0,65
18:3 ω -3	1,31 \pm 0,76	2,19 \pm 0,70*	1,93 \pm 1,03*	1,36 \pm 0,95	1,58 \pm 0,96*	1,53 \pm 0,53
20:3 ω -6	4,97 \pm 1,93	4,80 \pm 0,94	5,11 \pm 1,01	4,94 \pm 1,11	4,91 \pm 1,08	5,08 \pm 1,08
20:4 ω -6	15,7 \pm 5,02	16,8 \pm 2,44	15,8 \pm 4,86	16,1 \pm 2,92	14,1 \pm 4,96	15,1 \pm 4,74
20:5 ω -3	1,61 \pm 1,08	2,17 \pm 0,95	1,86 \pm 1,15	2,14 \pm 1,06	1,43 \pm 0,72*	1,53 \pm 0,84
22:5 ω -3	1,25 \pm 0,78	1,70 \pm 0,54	1,26 \pm 0,90	1,87 \pm 0,60	1,68 \pm 1,13	1,61 \pm 0,87
22:6 ω -3	3,48 \pm 1,76	3,56 \pm 1,93	3,40 \pm 1,74	3,27 \pm 0,97	2,48 \pm 1,32	2,72 \pm 1,13
$\Sigma\omega$ -6	92,3 \pm 4,0	90,4 \pm 2,6*	91,5 \pm 4,1	91,4 \pm 2,9	92,8 \pm 2,8*	92,6 \pm 2,5
$\Sigma\omega$ -3	7,7 \pm 4,0	9,6 \pm 2,60*	8,5 \pm 4,10*	8,6 \pm 2,9	7,2 \pm 2,8	7,4 \pm 2,5
ω -6/ ω -3	12,0	9,4	10,7	10,6	13,0	12,5

Mittelwerte \pm SD (n=13); FS = Fettsäure

* statistisch signifikant unterschiedlich zu Woche 0 (p<0,05)

4.3.1.2 Tocopherol-, Carotinoid- und Retinolkonzentrationen im Plasma

Im Plasma der Probanden wurden zu den Zeitpunkten 0, 6 und 12 Wochen die Tocopherol-, die Carotinoid- und die Retinolkonzentration untersucht. Die Ergebnisse sind in Tabelle 4.18 dargestellt.

Keine der untersuchten Carotinoid- oder Retinolkonzentrationen der Woche 6 oder 12 veränderten sich statistisch signifikant im Vergleich zu Woche 0.

Ergebnisse Interventionsstudien

Tabelle 4.18 *Interventionsstudie II: Carotinoid-, Tocopherol- und Retinolkonzentrationen im Plasma [nmol/ml]*

	Woche	Lutein	Zeaxanthin	Cryptoxanthin	Lycopin	α -Carotin	β -Carotin	α -Tocopherol	γ -Tocopherol	Retinol
ALA-Gruppe	0	0,29±0,10	0,08±0,05	0,26±0,14	0,50±0,25	0,14±0,10	0,60±0,61	28,09±4,84	1,38±0,91	1,31±0,32
	6	0,29±0,10	0,08±0,05	0,24±0,20	0,56±0,25	0,14±0,11	0,67±0,59	31,61±7,08	0,95±0,56	1,27±0,27
	12	0,29±0,09	0,07±0,03	0,19±0,17	0,50±0,16	0,15±0,10	0,56±0,46	32,42±6,27	1,02±0,61	1,37±0,25
LA-Gruppe	0	0,27±0,10	0,07±0,03	0,33±0,22	0,59±0,25	0,12±0,06	0,45±0,16	24,48±7,88	0,76±0,48	1,15±0,26
	6	0,29±0,11	0,06±0,03	0,25±0,13	0,53±0,15	0,15±0,10	0,56±0,32	26,17±12,53	1,16±1,05	1,16±0,21
	12	0,29±0,13	0,06±0,02	0,21±0,09	0,59±0,13	0,14±0,07	0,52±0,18	23,89±5,13	0,91±0,62	1,15±0,26

Mittelwerte ± SD (n=13)

4.3.2 Effekte der Supplementierung mit Leinsamen- und Distelöl auf Struktur und Funktion der Haut

Im Folgenden werden einer Supplementierung mit Leinsamen- bzw. Distelöl auf die Haut über einen Zeitraum von 12 Wochen dargestellt. Untersucht wurden Oberflächenstruktur, Hydratation und Sensitivität der Haut (Tabelle 4.19)

4.3.2.1 Analyse der Oberflächenstruktur der Haut mit dem SELS- Verfahren

Untersuchungsparameter der Oberflächenstruktur der Haut waren Rauigkeit, Schuppigkeit, Faltigkeit und Glätte der Haut (SELS-Methode).

In der ALA-Gruppe nahm die Rauigkeit von Woche 0 nach Woche 6 statistisch signifikant um 22% ab, nach Woche 12 um 30%. Die Schuppigkeit nahm von Woche 0 auf Woche 12 um 31% statistisch signifikant ab. Die Glätte nahm von Woche 0 auf Woche 12 um 7% statistisch signifikant zu. Der Hautparameter Faltigkeit veränderte sich nicht.

In der LA-Gruppe verringerte sich die Rauigkeit statistisch signifikant zu Woche 6 um 10% und blieb dann konstant bis Woche 12. Die Schuppigkeit verringerte sich zu Woche 6 um 6% und Woche 12 um 14%; dieser Rückgang war jedoch statistisch nicht signifikant. Auch bei den Parametern Glätte und Faltigkeit konnten keine statistisch signifikanten Veränderungen festgestellt werden.

Die Rauigkeit und Schuppigkeit der Haut verbesserten sich folglich in beiden Gruppen nach Gabe der Öle, die Effekte waren ausgeprägter unter Supplementierung mit Leinsamenöl.

4.3.2.2 Messung der Hauthydratation

Nach Supplementierung mit Leinsamenöl war in der Hautfeuchtigkeit eine Zunahme zu beobachten, die in Woche 12 statistisch signifikant höher war als in der Woche 0 (+39%). Der TEWL nahm von Woche 0 auf Woche 6 um 21% und auf Woche 12 um 31% statistisch signifikant ab.

In der LA-Gruppe stieg die Feuchtigkeit nach 12 Wochen Intervention um 13% statistisch signifikant an, der TEWL fiel um 12% (statistisch nicht signifikant).

Folglich verbesserte sich in beiden Gruppen die Hauthydratation, die Wirkung des Leinsamenöls war stärker als die des Distelöls.

4.3.2.3 Messung der Sensitivität

In dieser Studie wurde, wie in der Interventionsstudie I, durch topische Applikation einer Nicotinatlösung ein Erythem induziert. Untersuchungsparameter waren ebenfalls der Δa -Wert und der kapillare Blutfluss.

In der ALA-Gruppe nahm der Δa - Wert von Woche 0 auf Woche 12 um 48% statistisch signifikant ab. Der Parameter Blutfluss nahm von Woche 0 zu Woche 6 um 34% und zu Woche 12 um 66% statistisch signifikant ab.

Nach Supplementierung mit Distelöl war keine Veränderung in den Parametern Δa - Wert und Blutfluss zu beobachten.

4.3.3 Interventionsstudie II: Zusammenfassung der Ergebnisse

In der Interventionsstudie II wurde nach Supplementierung mit Leinsamenöl bzw. Distelöl über einen Zeitraum von 12 Wochen folgende Veränderungen beobachtet:

In der ALA-Gruppe nahm im Plasma der Anteil der α - Linolensäure in der Woche 6 zur Woche 12 zu, in der LA-Gruppe die Linolsäure. Folglich veränderten die beiden Öle das Fettsäuremuster im Plasma.

In der ALA-Gruppe verringerte sich in Woche 6 und 12 die Rauigkeit und die Schuppigkeit der Haut, die Glätte nahm leicht zu; in der LA-Gruppe reduzierte sich nur die Rauigkeit statistisch signifikant. Beide Öle verbesserten demzufolge die Oberflächenstruktur der Haut, Leinsamenöl bewirkte stärkere Effekte.

In der ALA-Gruppe erhöhte sich im Verlauf der Studie die Feuchtigkeit und verringerte sich der TEWL der Haut; in der LA-Gruppe erhöhte sich nur die Feuchtigkeit statistisch signifikant. Beide Öle bewirkten eine Verbesserung in der Hydratation, die Supplementierung mit Leinsamenöl zeigte einen mehr ausgeprägten Effekt.

Die Sensitivität der Haut veränderte sich nur in der ALA-Gruppe, so nahm der Δa -Wert und der Blutfluss statistisch signifikant ab. Nur mit Leinsamenöl konnte eine Verbesserung der Sensitivität erzielt werden.

Table 4.19 *Interventionsstudie II: Änderung der Oberflächenstruktur, Hydratation und Sensitivität der Haut*

Parameter	Wochen	ALA-Gruppe	LA-Gruppe
Oberflächenstruktur			
Rauhigkeit (AU)	0	1,87±1,01	1,56±0,67
	6	1,45±0,61* (-22 %)	1,4±0,61* (-10 %)
	12	1,31±0,59* (-30 %)	1,41±0,66* (-10 %)
Schuppigkeit (AU)	0	0,97±0,68	0,95±0,56
	6	0,83±0,52 (-15 %)	0,89±0,49 (-6 %)
	12	0,66±0,50* (-31%)	0,82±0,31 (-14 %)
Faltigkeit (AU)	0	21,5±3,4	22,3±4,5
	6	21,4±3,1 (-0,4 %)	22,9±3,6 (+2 %)
	12	22,0±3,2 (+2%)	23,1±5,7 (+4 %)
Glätte (AU)	0	25,3±5,9	26,9±5,7
	6	26,0±6,7 (+3 %)	22,6±5,6 (-1 %)
	12	27,2±7,1* (+7%)	27,4±5,7 (+2 %)
Sensitivität			
Δa Wert (AU)	0	4,12±2,35	4,03±1,51
	6	3,23±2,12 (-22 %)	4,02±1,52 (-0,2 %)
	12	2,13±1,50* (-48 %)	3,76±1,77 (-7 %)
Blutfluss (AU)	0	86,2±48,3	79,8±37,3
	6	57,9±51,2* (-34 %)	89,4±48,7 (+11 %)
	12	29±20,9* (-66 %)	84,9±47,9 (+7 %)
Hydratation			
Feuchtigkeit (AU)	0	30±7	36±4
	6	32±6 (+7 %)	36±5 (-2 %)
	12	41±8* (+39 %)	41±4* (+13 %)
TEWL (g/hm ²)	0	8,82±4	6,95±2
	6	6,95±3* (-21 %)	6,54±2 (-6 %)
	12	6,05±2* (-31 %)	6,13±2 (-12 %)

Mittelwerte ± SD (n=13)

* statistisch signifikant unterschiedlich zur Woche 0 (p<0,05)

5 Diskussion Interventionsstudien

5.1 Bestimmung der Bioverfügbarkeit langkettiger ungesättigter Fettsäuren

Im vorherigen Abschnitt wurden die Ergebnisse aus drei Studien vorgestellt. Wesentlicher Bestandteil der Studien war die Bestimmung der Bioverfügbarkeit langkettiger ungesättigter Fettsäuren (PUFAs) aus verschiedenen Ölen. Die Anteile der für die Öle charakteristischen PUFAs erhöhten sich schon nach kurzer Intervention im Plasma der Probanden. Die Studiendauer betrug in allen drei Studien 12 Wochen. Die tägliche Dosis der verwendeten Fette war im Verhältnis zur täglich mit der Ernährung aufgenommen Fettmenge relativ gering.

Die Einzelergebnisse zur Bioverfügbarkeit von langkettigen ungesättigten Fettsäuren werden im Folgenden diskutiert.

5.1.1 Fettsäuremuster in Plasma, Erythrozyten und Cerumen nach Supplementierung mit Fischölkapseln

In der ersten Studie wurden 3 Probandinnen mit täglich 1g Fischöl supplementiert; 1g Fett entspricht 1,6% der durchschnittlich täglich empfohlenen Fettzufuhr für einen weiblichen Erwachsenen [Wirths 2000]. Untersucht wurden die Fettsäuremuster in Plasma, Erythrozyten und Cerumen.

Die Studie hatte folgende Zielsetzungen:

1. Die gewählte Analysenmethode mitsamt der Extraktion von Fettsäuren mit einer Mischung aus Chloroform und Methanol, anschließender Derivatisierung zu den Methylester und Bestimmung mittels GC-FID zu etablieren (Abschnitt 3.3).
2. Veränderungen im Fettsäuremuster nach oraler Applikation in verschiedenen biologischen Materialien zu bestimmen.

Lipide bzw. Fettsäuren sind wesentliche Bestandteile des Blutes. In der vorgestellten Studie wurde gezeigt, dass durch die Supplementierung mit Fischöl sich die Fettsäurezusammensetzung im Blut verändert.

Eine Veränderung des Fettsäuremusters nach Zufuhr bestimmter Fettsäuren ist in der Literatur in zahlreichen Interventionsstudien beschrieben [Brosche et al. 2000, Mantzoris et al. 1994, Cao et al. 2006].

Die wichtigsten Lipide im Blut sind Triglyceride, Cholesterin und Phospholipide. Der Transport im Blut erfolgt in den von Lipoproteinen. Zusätzlich können kurzkettige Fettsäuren frei im Blut vorliegen, langkettige Fettsäuren sind an Albumin gebunden. Untersuchungen haben gezeigt, dass sich das Fettsäuremuster des Gesamtplasmas nach Aufnahme von Fettsäuren schon innerhalb weniger Stunden verändert. Das Muster gilt als sensitiver Indikator für Veränderungen im Plasmagehalt langkettigen Fettsäuren nach einer PUFA-reichen Diät [Arab 2003].

Unmittelbar nach Fettzufuhr verändert sich das Fettsäuremuster der Lipide in den Chylomikronen. Dadurch wird auch das Fettsäuremuster im Gesamtplasma maßgeblich beeinflusst. Chylomikronen sind Lipoproteinkomplexe, welche die mit der Nahrung aufgenommenen Fette vom Darm zu Zielorganen, wie z.B. Leber, transportieren. Nüchternblut enthält keine Chylomikronen Um in dieser und in den nachfolgenden Studien Veränderungen im Fettsäuremuster auf längerfristige Effekte zurückzuführen, wurde auf Nüchternblutabnahmen geachtet.

Charakteristische Fettsäuren in den verwendeten Fischölsupplementen waren die Eicosapentaensäure (EPA) und die Docosahexaensäure (DHA). Zu Studienbeginn betragen die Anteile dieser Fettsäuren im Plasma der Probanden 0,73% (EPA) und 1,37% (DHA). Im Verhältnis zu Fettsäuren wie der Linolsäure (39%) sind diese Fettsäuren Minorbestandteile des Fettsäuremusters. Nach Supplementierung wurde ein Anstieg dieser Minorfettsäuren beobachtet. Während der Anstieg des Anteil der EPA von Woche 0 auf Woche 2 am größten ist und sich anschließend nur noch gering verändert, stieg der Anteil der DHA- Gehaltes im Verlaufe der gesamten Supplementierung kontinuierlich an.

Entsprechend den Veränderungen des EPA und DHA-Gehaltes stieg der Anteil der gesamten ω -3 Fettsäuren, das Verhältnis des Gehaltes von ω -6 zu ω -3 Fettsäuren sank.

Auch der Anteil der Docosapentaensäure (DPA) in der Fettsäureverteilung nahm zu. Diese entsteht durch Elongation aus der EPA, abhängig von der Enzymaktivität der Elongase [Burdge et al. 2005]. So ist der Anstieg während der DPA eine Folge der Supplementierung mit Fischöl.

Auch wenn sich durch die geringe Anzahl der Probanden sich das Ergebnis statistisch nicht validieren ließ, so zeigen die Daten, dass auch die Gabe geringer Dosen eines Fischölsupplementes Veränderungen im Fettsäuremuster des Plasmas bewirken. Infolgedessen zeigte sich, dass die gewählte Analysenmethode geeignet ist auch Veränderungen der Minorfettsäuren im Plasma zu erfassen.

Neben dem Fettsäuremuster des Plasmas wurde auch das Fettsäuremuster der Erythrozyten bestimmt. Erythrozyten haben eine durchschnittliche Lebensdauer von 12 Wochen. Daher werden Veränderungen im Fettsäuremuster nur durch längerfristigen Konsum bestimmter Fettsäuren bewirkt [Arab 2003]. Dies wird bei der Bestimmung des *Omega-3 Index* ausgenutzt, dieser Index berechnet sich aus der Summe des Gehaltes an EPA und DHA in den Erythrozyten. Da ein Zusammenhang zwischen dem regelmäßigen Verzehr dieser Fettsäuren und einem verminderten Risiko für koronare Herzerkrankungen besteht (siehe Abschnitt 1.3.2), lässt sich der *Omega-3-Index* als klinischer Marker zur Risikoeinschätzung nutzen [Cao et al. 2006; Harris et al. 2004]. 1 g Fischöl täglich, wie sie in der hier dargestellten Studie supplementiert wurde, reichen nicht aus um die Anteil der EPA und DHA zu erhöhen, so dass sich der *Omega-3-Indexes* nicht verändert. Weitere Studien zeigen ebenfalls, dass höhere Supplementierungen erforderlich sind um Veränderungen der Erythrozyten zu bewirken. In einer von Cao et al. durchgeführten Studie veränderte sich die Fettsäurezusammensetzung in den Erythrozyten nach einer täglichen Gabe von 3510 mg EPA und 900 mg DHA über einen Zeitraum von 8 Wochen [Cao et al. 2006]. Das Fettsäuremuster der Erythrozyten in der hier durchgeführten Studie veränderte sich von Woche 0 zur Woche 12 nur geringfügig. Im Vergleich zur Studie von Cao et al. wurden in dieser Studie nur 140 mg EPA und 100 mg DHA supplementiert.

Zusätzlich wurde in der Studie geprüft, ob sich das Fettsäuremuster im Cerumen verändert und sich dieses Fettsäuremuster als Marker für die Bioverfügbarkeit von PUFAs eignet. In der Literatur wird als „Langzeitmarker“ der Fettzufuhr der Fettsäuregehalt von subkutanem Fettgewebe beschrieben. Der Gehalt der PUFAs im Fettgewebe korreliert gut mit der täglichen Aufnahme dieser Fettsäuren [Baylin et al. 2002; Arab et al. 2002]. Die Gewinnung von Fettgewebe ist aufwendig und nur durch invasive Biopsien möglich. Die Gewinnung des Cerumens ist weitgehend einfach. Die Trockenmasse des Cerumens besteht aus 6,4% Squalen, 9,6% Cholesterolester, 9,3% Wachsester, 3% Triacylglycerol, 22,7% Fettsäuren, 20,9% Cholesterol, 18,6% Ceramiden, 2,0% Cholesterolsulfat und 7,5% nicht identifizierten polaren Komponenten [Bortz et al. 1990]. Folglich enthält Cerumen analysierbare Fettsäuren. Diese wurden zuerst mit der GC-FID untersucht. Dabei ließen sich jedoch nicht alle Signale in den Chromatogrammen zuordnen. PUFAs, wie z.B. EPA oder DHA konnten nicht identifiziert werden. Eine GC-MS Analyse ausgewählter Proben zeigte, dass die Lipide des Cerumens hauptsächlich gesättigte Fettsäuren enthalten mit hohen Anteilen an Palmitin- und Stearinsäure. Langkettige ungesättigte Fettsäuren ließen sich nicht nachweisen. Auch in der

GC-MS Analyse konnten nicht alle Signale zugeordnet werden. Das Fettsäuremuster im Cerumen ist folglich ein ungeeigneter Marker für die Bioverfügbarkeit von langkettigen ungesättigten Fettsäuren.

5.1.2 Fettsäuremuster in Plasma und Erythrozyten nach Gabe von PUFA-reichen Pflanzenölen

In Kapitel 5.1.1 wurde gezeigt, dass geringe orale Dosen an Fischöl ausreichen, um das Fettsäuremuster im Plasma zu verändern. In der folgenden Interventionsstudie I, mit größeren Probandenkollektiven, wurden die Veränderungen des Fettsäuremusters in Plasma und Erythrozyten nach Supplementierung mit Leinsamenöl, und Borretschöl untersucht. Die Ergebnisse werden mit der Interventionsstudie II verglichen, in der die Veränderungen des Fettsäuremusters im Plasma und Erythrozyten nach Supplementierung mit Leinsamenöl und Distelöl untersucht wurde [Neukam 2006, Dissertation].

Die Probanden der Studien waren ausschließlich Frauen mit trockener sensibler Haut. Die Dauer beider Studien war 12 Wochen, die tägliche Dosis der jeweiligen Öle war 2,2 g. Dies entspricht ca. 3,5% der tägliche empfohlenen Fettzufuhr für erwachsene Frauen [Wirths 2000], die supplementierte Dosis dementsprechend gering. Blutproben wurden zu Beginn der Studie, nach 6 und 12 Wochen entnommen. Zu den gleichen Zeitpunkten wurden Hautparameter zur Analyse der Funktion und Struktur gemessen.

5.1.2.1 Interventionsstudie I: Fettsäuremuster in Plasma und Erythrozyten nach Gabe von Leinsamen- oder Borretschöl

Leinsamenöl (oder auch Flachsöl) gehört zu den ω -3 reichen Ölen und wird aus den Samen des Flachses gewonnen. Charakteristisch für Leinsamenöl ist der hohe Anteil an α -Linolensäure. Borretschöl, gewonnen aus den Samen der Borretschpflanze, gehört zu den ω -6 reichen Ölen. Im Gegensatz zu anderen ω -6 reichen Pflanzenölen, wie z.B. Sonnenblumen- oder Distelöl, enthält es einen hohen Anteil an γ -Linolensäure. Die Fettsäurezusammensetzung der in der durchgeführten Studie verwendeten Öle war typisch für Leinsamen- bzw. Borretschöl und stimmt mit Angaben der Literatur überein [Brosche et al. 2000; Fokkema et al. 2000 Sanders et al 1981]. Das in der Studie verwendete Placebo enthielt ein synthetisches Öl, welches hauptsächlich aus Capryl- und Caprinsäureestern bestand.

Die Probanden wurden in drei Gruppen von jeweils 15 Personen eingeteilt. Die erste Gruppe (ALA-Gruppe) erhielt Leinsamenöl, die zweite Gruppe (GLA-Gruppe) Borretschöl und die dritte Gruppe ein Placebo (Placebo-Gruppe).

Das Fettsäureverhältnis im Plasma zu Beginn der Studie entsprach in allen drei Gruppen den in der Literatur angegebenen Verhältnissen für gesunde Erwachsene. Dominante Fettsäuren waren die Palmitinsäure ($22,8\% \pm 2,7\%$ bis $24,2\% \pm 4,1\%$), Ölsäure ($20,6\% \pm 2,6\%$ bis $21,1\% \pm 2,5\%$) und Linolsäure ($28,5\% \pm 9,1\%$ bis $32,8\% \pm 4,9\%$). Sun et al. geben in ihren Studien mit 306 Frauen für Palmitinsäure einen Wert von $19,7\% \pm 2,4\%$, für Ölsäure einen Wert von $18,6\% \pm 2,4\%$ und für Linolsäure einen Wert von $30,6\% \pm 4,3\%$ an [Sun et al. 2007]. Risé et al. haben folgende Werte ermittelt: Palmitinsäure: $22,7\% \pm 1,7\%$, Ölsäure: $19,4\% \pm 2,6\%$, Linolsäure: $29,0\% \pm 2,7\%$ [Risé et al. 2007].

In der ALA-Gruppe nahm nach Supplementierung der Anteil der α -Linolensäure, in der GLA-Gruppe der Anteil der γ -Linolensäure schon nach 6 Wochen statistisch signifikant zu. Eine weitere Anreicherung im Plasma konnte in den darauf folgenden 6 Wochen nicht beobachtet werden. In der Placebogruppe war keine Veränderung des Fettsäuremusters im Hinblick der untersuchten Fettsäuren feststellbar. In den beiden Verum-Gruppen reichten die Dosis der Supplemente aus, um eine Erhöhung der charakteristischen Fettsäuren im Plasma zu bewirken.

Körpereigene Desaturasen und Elongasen katalysieren Kettenverlängerungen der essentiellen C-18 Fettsäuren zu längeren homologen Verbindungen (siehe Abschnitt 1.3.1). Die Reaktion findet vornehmlich in der Leber statt. Die Aktivität der Desaturase ist limitiert. Unterschiede sind alters- und geschlechtsabhängig. Mit zunehmendem Alter nimmt die Aktivität des Enzyms ab, Frauen haben eine höhere Aktivität als Männer. Ebenfalls sind höhere Aktivitäten während der Schwangerschaft und Stillphase feststellbar [Burdge et al. 2005; 2006; Simopoulos 2002a]. Die vorliegende Studie wurde nur mit erwachsenen Frauen durchgeführt, Schwangerschaft und Stillen waren Ausschlusskriterien. Es ist folglich davon auszugehen, dass die Probanden aktive Desaturasen haben, von erhöhten Aktivitäten wie sie in der Schwangerschaft- und Laktationsphase anzufinden sind, kann abgesehen werden.

Aus α -Linolensäure wird die für den Körper wichtige EPA gebildet, abhängig von der Aktivität der Δ -6 Desaturase (Abschnitt 1.3.1). In der hier dargestellten Studie konnte in der ALA-Gruppe eine Zunahme der EPA beobachtet werden, diese war statistisch nicht signifikant. Eine Studie von Mantzioris et al. (15 männliche Probanden) zeigt, dass bei einer Aufnahme von durchschnittlich 9,2 g α -Linolensäure am Tag, der Anteil der α -Linolensäure an den Gesamtfettsäuren um das 3-4 fache und der Anteil der EPA um das ca. 2,5 fache zunimmt. Gemessen wurde das Fettsäuremuster der Plasmaphospholipide, Cholesterinester und Triglyceriden [Mantzioris et al. 1994]. Die Menge der zugeführten α -Linolensäure ist hier deutlich höher als in der vorliegenden Interventionsstudie (908 mg täglich, siehe Tabelle 3.3).

Der Anteil der α -Linolensäure nahm um das 1,4 fache zu. Folglich war nur eine geringe Zunahme des Anteils der EPA zu erwarten, diese nahm um das 1,1 fache von Woche 0 zu Woche 12 zu.

Erheblich sensitiver als die gaschromatographische Analyse des Fettsäuremusters im Gesamtplasma, ist die Messung mit Isotopen- Tracer Techniken. In einer Studie von Pawlosky et al. wurde mit Hilfe dieser Technik gezeigt, dass von 1 g deuterierter α -Linolensäure nur durchschnittlich 0,2% zur EPA umgewandelt wurde (supplementiert wurde eine Einzeldosis von 1 g der deuterierten α -Linolensäure). Interventionsstudien über längere Zeiträume gehen von einer Umsatzrate von ca. 8% aus (gemessen mit ^{13}C - Tracer-Isotopentechnik) [Pawlosky et al. 2001; Burdge et al. 2005]. Diese Daten zeigen, dass nur eine geringe Menge der α -Linolensäure in EPA umgewandelt wird und dass bei einer Supplementierung von 2,2 g Leinsamenöl die Umsetzung nur mit sensitiveren Methoden als der GC- Analyse gekoppelt mit einem FID nachweisbar ist.

Im Gegensatz zur Umwandlung von α -Linolensäure in EPA ist die Umwandlung von γ -Linolensäure in Dihomo- γ -Linolensäure (DHGLA) unabhängig von der Δ -6 Desaturaseaktivität. In der vorliegenden Studie konnte eine Zunahme an DHGLA beobachtet werden (statistisch signifikant unterschiedlich von Woche 0 zu Woche 6, in Woche 12 nahm der Anteil wieder leicht ab). Eine Zunahme des Arachidonsäuregehaltes ließ sich nicht feststellen. Die Umwandlung der DHGLA in Arachidonsäure ist abhängig von der Aktivität der Δ -5 Desaturase (Abschnitt 1.3.1). Die verabreichte Dosis an γ -Linolensäure (Borretschöl) reicht demnach aus, um signifikante Mengen an DHGLA im Körper zu bilden.

Ebenfalls enthalten im Borretschöl ist ein hoher Anteil an Linolsäure. Diese kommt im Blut in größeren Mengen vor (durchschnittliche 32% bezogen auf die Gesamtfettsäuren). Eine signifikante Zunahme der Linolsäure war nicht zu beobachten. Linolsäure ist im Gegensatz zur γ -Linolensäure in vielen Lebensmitteln enthalten und Hauptbestandteil der täglichen Ernährung. Folglich reicht die geringe zusätzliche Zufuhr an Linolsäure nicht aus, um messbare Unterschiede im Fettsäuremuster zu erzielen.

Die Analyse der Erythrozyten zeigte, dass zu allen drei Zeitpunkten in allen drei Gruppen neben den gesättigten Fettsäuren Palmitin- und Stearinsäure ($21,4\% \pm 1,2\%$ bis $22,5\% \pm 1,9\%$ bzw. $15,4\% \pm 3,1\%$ bis $17,1\% \pm 2,1\%$), Ölsäure ($15,0\% \pm 3,8\%$ bis $17,1\% \pm 1,2\%$), Linolsäure ($16,8\% \pm 3,4\%$ bis $19,1\% \pm 5,5\%$) und Arachidonsäure ($14,6\% \pm 2,3\%$ bis $16,1\%$ bis $2,2\%$) dominieren. Die Anteile dieser Fettsäuren entsprechen den in der Literatur angegebenen Werten [Ris  et al. 2007: Palmitinsäure: $24,2\% \pm 3,1\%$; Stearinsäure: $20,6\% \pm 2,1\%$; Ölsäure: $15,6\% \pm 1,9\%$; Linolsäure: $9,8\% \pm 1,4\%$; Arachidonsäure: $12,9\% \pm 2,1\%$; Sun et al. 2007:

Palmitinsäure: $18,7 \pm 1,9$; Stearinsäure: $13,1 \pm 1,0\%$; Ölsäure: $13,3 \pm 1,2\%$; Linolsäure: $14,6 \pm 1,8\%$; Arachidonsäure: $14,6 \pm 1,3\%$]. In der hier vorliegenden Studie I konnte in der ALA-Gruppe eine Zunahme der α -Linolensäure beobachtet werden. Gleichzeitig nahm aber auch der Anteil der γ -Linolensäure zu. Bei der Auswertung der γ -Linolensäurewerte sind folgende Punkte aufgefallen:

Der prozentuale Anteil der γ -Linolensäure in dieser Studie liegt zwischen $0,95\% \pm 0,78$ bis $2,39\% \pm 3,75\%$ im Vergleich mit Literaturdaten verhältnismäßig hoch [Brosche et al. 2000: $0,04 \pm 0,01\%$ bis $0,07\% \pm 0,02\%$]. Ebenfalls sind die Standardabweichungen der γ -Linolensäurewerte sind im Vergleich zu den anderen ermittelten Fettsäuren in den Erythrozyten relativ hoch. Zur Absicherung wurde in der Analyse das GC- Signal der γ -Linolensäure sowohl durch externe, wie auch durch Dotierung mit internen Standards (nicht dargestellt) identifiziert. Daher sind vermutlich große interindividuelle Unterschiede Ursache für die Streuung; wodurch eine Interpretation schwierig wird.

In der GLA-Gruppe nahm der Anteil an DHGLA zu und der Anteil an DPA ab. Die γ -Linolensäure nahm von Woche 0 zu Woche 12 zu, auch wenn diese Zunahme aufgrund der hohen Streuung statistisch nicht signifikant war. Brosche et al. verzeichneten ebenfalls eine Zunahme an γ -Linolensäure und der DHGLA nach Supplementierung mit Borretschöl. Die supplementierten Ölmengen lagen zwischen 1,5 und 3 g und entsprachen folglich denen in dieser Studie [Brosche et al. 2000].

Die Analysenergebnisse der Analyse des Fettsäuremusters in Erythrozyten lassen den Schluss zu, dass im gewählten Dosisbereich nur geringfügige Verschiebungen in der Fettsäurezusammensetzung erzielt werden. Die Supplementierung in der Studie war demnach zu gering um Veränderungen im Fettsäuremuster zu bewirken.

5.1.2.2 Interventionsstudie II: Fettsäuremuster in Plasma und Erythrozyten nach Gabe von Leinsamen- oder Distelöl

Interventionsstudie II wurde mit 26 Probandinnen durchgeführt. Eine Gruppe (ALA- Gruppe) erhielt wie in Studie I 2,2 g Leinsamenöl. Die Fettsäurezusammensetzung des Öls unterschied sich kaum von der in der ersten Interventionsstudie. Die zweite Gruppe erhielt 2,2 g Distelöl (LA-Gruppe). Distelöl wird aus den Samen der Saflorpflanze gewonnen. Hier war die dominierende Fettsäure die Linolsäure. Im Unterschied zur ersten Interventionsstudie wurden in dieser Studie nur die langkettigen ungesättigten Fettsäuren zur Auswertung herangezogen [Neukam 2006]. Dieser Auswertungsmodus wurde ebenfalls für die erste Studie durchgeführt, um die beiden Studien besser vergleichen zu können.

Im Plasma der ALA-Gruppe nahm nach Supplementierung der Anteil der α -Linolensäure im Vergleich zu den Gesamtfettsäuren statistisch signifikant zu. Die Zunahme entsprach den Ergebnissen aus der Interventionsstudie I, wenngleich der Anteil der α -Linolensäure bezogen auf die Gesamtfettsäuren insgesamt höher war als in Studie I. Auch eine Zunahme der EPA ließ sich beobachten, die ebenfalls wie in der Studie I statistisch nicht signifikant war. Das Ergebnis zur Supplementierung mit Leinsamenöl aus Interventionsstudie I wurde somit bestätigt. In der LA- Gruppe konnte eine Zunahme der Linolsäure beobachtet werden. Im Gegensatz zur Borretschöl enthielt das Distelöl größere Mengen der Linolsäure bezogen auf die Gesamtfettsäuren. Hier war die supplementierte Menge demnach ausreichend da sich das Fettsäuremuster im Gesamtplasma signifikant verändert.

5.1.2.3 Schlussfolgerung

Aus den vorgestellten Daten lässt sich schließen, dass eine moderate Zufuhr von Leinsamen-, Borretsch- oder Distelöl ausreicht, um das Fettsäuremuster im Gesamtplasma zu modulieren. In Übereinstimmung mit der Literatur reichen die zugeführten Mengen jedoch nicht aus, um eine deutliche Zunahme homolog längerer Verbindungen aus der endogenen Biosynthese zu beobachten. Nur geringfügige Veränderungen, hauptsächlich Verbindungen die durch Elongasen synthetisiert werden, sind feststellbar. Die Kenntnis des Fettsäuremusters des Blutes ist für die Interpretation der Effekte der Supplementierung mit Leinsamen- Borretsch- und Distelöl auf Struktur und Funktion der Haut wichtig.

5.1.3 Bestimmung der Tocopherol-, Carotinoid- und Retinolkonzentrationen im Plasma

Carotinoide und Tocopherole sind endogene Antioxidantien und zeigen photoprotektive Wirkungen in der Haut [Stahl et al. 2000]. In einer Studie von Heinrich et al. wurde gezeigt, dass eine 12 wöchige Supplementierung mit einer Mischung aus α - Tocopherol, Carotinoiden und Selen Hautdicke und Oberflächenstruktur der Haut verbessert. Die verwendeten Kapseln enthielten 10 mg α - Tocopherol [Heinrich et al. 2006b]. Die in dieser Arbeit beschriebenen Supplemente enthielten, bis auf das Placebo der Studie I und die Distelölkapseln der Studie II 2,5 mg α -Tocopherol als Antioxidans. Um einen Einfluss des α -Tocopherols auf die Oberflächenstruktur der Haut interpretieren zu können, wurde die Konzentration nach Supplementierung im Plasma bestimmt. Es wurde keine statistisch signifikanten Veränderungen der Tocopherolkonzentration im Plasma festgestellt. Zusätzlich wurden Carotinoid- und Retinolkonzentration bestimmt, da ein verändertes Ernährungsverhalten der Probanden im Verlauf der Studie zu Konzentrationsveränderungen im Plasma führen kann.

Aber auch hier war keine Veränderung feststellbar, so dass in den hier vorgestellten Interventionsstudien, weder das supplementierte α - Tocopherol, noch Carotinoide Einfluss auf die Ergebnisse haben.

5.2 Effekte der Supplementierung mit Leinsamen- Borretsch- oder Distelöl auf Struktur und Funktion der Haut

In den hier beschriebenen Interventionsstudien konnte nach Supplementierung mit Leinsamenöl oder Borretschöl eine Verbesserung der Hautfunktion und -struktur beobachtet werden. Die Effekte betrafen Hydratation, Oberflächenstruktur und Sensitivität. Von den untersuchten Ölen hatte Distelöl die geringste Wirkung. Die prozentualen Veränderungen der untersuchten Parameter aus beiden Studien sind hier nochmals tabellarisch gegenüber gestellt (Tabelle 5.1). Da sich in der Placebo- Gruppe der Interventionsstudie I die Parameter nicht veränderten, wird auf die Darstellung dieser Ergebnisse verzichtet.

Tabelle 5.1 Gegenüberstellung der Ergebnisse der Hautanalyse aus der Interventionsstudie I und II

	Interventionsstudie I				Interventionsstudie II			
	ALA- Gruppe Leinsamenöl Woche		GLA- Gruppe Borretschöl Woche		ALA- Gruppe Leinsamenöl Woche		LA- Gruppe Distelöl Woche	
	6	12	6	12	6	12	6	12
Hydratation								
Feuchtigkeit (AU)	+12%*	+19%*	+8%	+17%*	+7%	+39%*	-2%	+13%*
TEWL (g/hm ²)	-8%*	-26%*	-9%*	-11%*	-21%*	-31%*	-6%	-12%
Oberflächenstruktur								
Rauhigkeit	-15%*	-34%*	-7,6%	-15%*	-22%*	-30%*	-10%*	-10%*
Schuppigkeit	-29%*	-35%*	-25%	-27%*	-15%	-31%*	-6%	-14%
Faltigkeit	-1%	+0%	+0,8%	+1,1%	-0,4%	+2%	+2%	+4%
Glätte	+5%	+4%*	-0,2%	+2,6%	+3%	+7%*	-1%	+2%
Sensitivität								
Δ a Wert (AU)	-32%*	-45%*	-29%*	-35%*	-22%	-48%*	-0,2%	-7%
Blutfluss (AU)	-34%*	-81%*	-28%*	-34%*	-34%*	-66%*	+11%	+7%

* statistisch signifikant unterschiedlich zur Woche 0 (p<0,05)

Aus der Übersicht wird deutlich, dass in den ALA-Gruppen beider Studien tendenziell gleiche Ergebnisse erzielt werden. Unterschiede ergeben sich aufgrund individueller Schwankungen. Die Ergebnisse beider ALA-Gruppen lassen sich demnach gemeinsam diskutieren. Entsprechend der Daten der Tabelle 5.1 lässt sich schlussfolgern, dass folgende Rangfolge in der Wirksamkeit der Öle besteht: Leinsamenöl>Borretschöl>Distelöl. Es wurde in allen Gruppen die gleiche Menge an Öl supplementiert. Da die Öle sich in der Fettsäurezusammensetzung unterscheiden und nach Supplementierung die jeweils charakteristischen Fettsäuren der Öle im Blut anstiegen, kann ein Zusammenhang zwischen den veränderten Fettsäuremustern und den Haupteffekten postuliert werden. Die möglichen Ursachen einer solchen Struktur- Wirkungsbeziehung werden im Folgenden diskutiert.

5.2.1 Einfluss der Supplementierung mit Leinsamenöl, Borretschöl oder Distelöl auf die Hydration (Barrierefunktion) und Oberflächenstruktur des Stratum corneums

Messungen der Feuchtigkeit der Haut und des TEWL geben Auskünfte über die natürliche Barrierefunktion des Organs. Ist diese Barrierefunktion gestört, sinkt in der Regel die Hydration und der TEWL steigt. Um die Haut vor übermäßigem Wasserverlust zu schützen, sind die Korneozyten des Stratum corneums in einer Lipidmatrix eingebettet (Abschnitt 1.2.2). Nur bei einem hohen Wassergehalt behält die Haut ihre Flexibilität, wodurch eine optimale Funktion gewährleistet ist [Rawling 2003].

Die dargestellten Studien zeigen, dass die Supplementierung mit Leinsamenöl die Barrierefunktion der Haut erhöht. Geringer waren die Effekte nach Supplementierung mit Borretschöl in der GLA-Gruppe. Die Gabe von Distelöl (LA-Gruppe) erhöhte die Barrierefunktion der Haut, im Vergleich zu den beiden anderen Ölen nur geringfügig. Bei der LA-Gruppe fiel auf, dass die Ausgangswerte der Feuchtigkeitsmessung (Woche 0) mit 36 ± 4 AU im Verhältnis zu den anderen Gruppen höher waren, obwohl immer noch trocken ist (Interventionsstudie I: ALA-Gruppe: 32 ± 8 AU; GLA-Gruppe: 30 ± 7 AU; Placebo-Gruppe: 29 ± 5 AU; Interventionsstudie II: ALA-Gruppe: 30 ± 7 AU). Heinrich et al. definieren die Haut bei Messwerten <30 AU als sehr trocken, zwischen $30-40$ AU als trocken und bei Messwerten >40 AU als normal [Heinrich et al. 2003a]. Somit lagen die Ausgangsmesswerte der Verum-Gruppen im Bereich der trockenen Haut, der Hydrationszustand in der LA- Gruppe war am besten.

Für gesunde normale Haut liegt der TEWL zwischen $1-5$ g/m²/h [Piche et al. 2002]. In beiden Studien lagen alle Messwerte etwas über dem optimalen Bereich, verringerten sich jedoch

nach Supplementierung. Zu Beginn der Studien lagen die Werte, mit Ausnahme der LA-Gruppe, zwischen 8,8 und 9,7 g/m²/h. Die LA-Gruppe hatte einen Ausgangswert von 7,0 g/m²/h und damit den geringsten TEWL.

Somit kann nicht abschließend geklärt werden, ob die geringere Verbesserung der Hauthydratation der LA-Gruppe im Vergleich zur ALA- bzw. GLA-Gruppe auf die unterschiedliche Fettsäurezusammensetzung der Öle zurückzuführen ist oder nur eine Folge des besseren Ausgangszustandes ist.

Die Werte zeigten, dass alle Probanden zu Beginn der Studie eine trockene Haut hatten. Objektiv ist das Aussehen der trockenen Haut geprägt durch Rauigkeit, Schuppigkeit, Glanzlosigkeit und/oder mangelnde Elastizität. Subjektiv können Spannungsgefühle und Juckreiz bei der trockenen Haut auftreten. Im Allgemeinen ist trockene Haut gekennzeichnet durch eine veränderte Lipidzusammensetzung der Lipidmatrix des Stratum corneums [Abschnitt 1.2.2], aber auch verringerte Talgdrüsenaktivität und ein vermindertes Wasserbindungsvermögen können eine Rolle spielen [Leitlinien der Fachgruppe Dermokosmetik 2000]. Insbesondere die Veränderung der Lipidmatrix führt zu einem Anstieg des TEWL und einer verringerten Hydratation. Studien haben gezeigt, dass mit zunehmendem Lebensalter sich zumeist der TEWL erhöht. Aber auch bei Erkrankungen, wie der atopischen Dermatitis, ist der erhöhte TEWL charakteristisch. Hier kommt es zusätzlich zu einer Hyperkeratose. In beiden Fällen nimmt insbesondere der Anteil der Ceramide in der Lipidmatrix ab [Proksch et al. 2006; Rawling 2003]. Ceramide sind zu einem hohen Anteil mit Linolsäure verestert, welche als essentielle Fettsäure mit der Nahrung zugeführt werden muss. Ein Linolsäuredefizit hat in Experimenten mit Ratten und Mäusen zum erhöhten TEWL und zu Verhornungsstörungen geführt [Horrobin 2000]. Ebenso hat man bei Menschen beobachtet, dass im Winter die Linolsäure in Ceramiden teilweise durch Ölsäure ersetzt ist. Insbesondere bei älteren Menschen ist dies zu beobachten [Rogers et al. 1996, Zellmer 2001]. Diese Veränderung im Zusammenhang mit einem verminderten Gesamtanteil der Ceramide wird als Ursache für die trockene Haut im Winter und im Alter angenommen. Die Ursachen für den verminderten Ceramid und Linolsäureanteil im Winter sind nicht bekannt, Ein möglicher Zusammenhang mit der verminderten Vitamin D Konzentrationen in der Haut im Winter wird diskutiert [Rawlings et al. 2003].

Chung et al. zeigten bei Meerschweinchen dass durch die Supplementierung mit Borretschöl Linolsäure in den Ceramiden teilweise durch die DHGLA ersetzt wird. Gleichzeitig zeigte sich eine höhere Ceramidsynthese als nach Supplementierung mit Distelöl [Chung et al. 2002]. Ebenfalls an Meerschweinchen wurde gezeigt, dass unter α -linolensäurereicher Diät

die Fettsäure vermehrt in Haut und Fell der Tiere eingebaut wird, der TEWL sich dabei aber nicht verringert [Sinclair et al. 2002].

Brosche et al. untersuchten den Einfluss von Borretschöl auf den transepidermalen Wasserverlust älterer Menschen. Die Abnahme des TEWL in dieser Studie entsprach den in der Interventionsstudie I festgestellten Werten. Die Autoren schließen in der Diskussion einen Einbau der γ -Linolensäure in die Lipidmatrix aus. Sie postulieren einen Einfluss von Borretschöl auf Regelmechanismen der Hautbarriere. [Brosche et al. 2000]. Als Zielstrukturen nennen sie Schlüsselenzyme der Cholesterin-, Fettsäure- und Ceramid-synthese, mögliche Einflüsse auf extrazelluläres Calcium und Kalium, sowie auf den Zytokin- oder Eicosanoidstoffwechsel (Abschnitt 6.2.1.2).

Die in der Literatur beschriebenen Studien zeigen die Bedeutung der Linolsäure als essentielle Fettsäure für die Barrierefunktion der Haut ist. Zurzeit sind keine humanen Interventionsstudien bekannt, die Aufschluss darüber geben, inwieweit ein Linolsäuremangel in der Haut durch endogene Gabe von α -Linolensäure oder γ -Linolensäure kompensiert werden kann. Mit den in dieser Arbeit durchgeführten Studien konnte jedoch deutlich die positive Wirkung von α - und γ -linolensäurehaltigen Ölen nachgewiesen werden.

Eng verknüpft mit dem Hydrationszustand der Haut sind die mit der SELS-Methode ermittelten Daten zur Hautstruktur. Mit dieser objektiven Methode konnte erstmals im direkten Vergleich gezeigt werden, dass sich sowohl nach Supplementierung mit Leinsamenöl als auch nach Supplementierung mit Borretschöl die Rauigkeit und Schuppigkeit der Haut verringert. Eine erhöhte Rauigkeit und Schuppigkeit ist charakteristisch für trockene Haut. Analog den Ergebnissen der Hautfeuchtigkeit und des TEWL konnte durch die Supplementierung mit Leinsamenöl ein größerer Effekt erzielt werden. Die Supplementierung mit Distelöl bewirkte nur eine statistisch signifikante Verringerung des Parameters Rauigkeit.

Falten entstehen hauptsächlich durch biochemische Veränderungen der Kollagenmatrix in der Dermis (Abschnitt 1.2.3). Mit keinem der untersuchten Pflanzenöle konnte die Faltenbildung bzw. -rückbildung beeinflusst werden.

5.2.2 Einfluss der Supplementierung mit Leinsamenöl, Borretschöl oder Distelöl auf die Sensitivität der Haut

Die Haut reagiert besonders sensibel auf äußere Faktoren [Primavera et al. 2005]. Veränderungen der Sensitivität der Haut nach Supplementierung mit den Ölen wurden mit dem Nicotinattest bestimmt. Nicotinat löst einen inflammatorischen Reiz aus, wobei

Entzündungsmediatoren freigesetzt werden, was zur Dilation der Kapillaren und infolge zu einem erhöhten Blutfluss führt. Typische Entzündungsmediatoren sind Zytokine wie TNF- α , IL-1, IL-6 und IL-8, Eicosanoide (hauptsächlich der Arachidonsäure), NO oder MMPs [Calder 2006]. Makrophagen, Lymphozyten sowie lösliche Wirkstoffe gelangen ebenfalls zum Entzündungsherd. Die Entzündung macht sich auf der Haut durch eine deutliche Rötung bemerkbar, bestimmbar durch den Δa -Wert. Dieser Wert beschreibt die Differenz der Hautrötung vor und nach Applikation der Nicotinatlösung. Die Veränderungen des kapillaren Blutflusses wurde mit Hilfe des O2C- Systems gemessen (Abschnitt 3.4.4.3) [Primavera et al. 2005].

Der Δa -Wert verringerte sich in den ALA-Gruppen beider Studien nach der Supplementierung mit Leinsamenöl. Entsprechend wurde ein verringerter Blutfluss festgestellt. In der GLA-Gruppe verringerten sich diese beiden Parameter ebenfalls. Im Vergleich zur ALA-Gruppe waren die Effekte jedoch geringer. Keine statistisch signifikanten Veränderungen ließen sich in der LA-Gruppe der aufgeführten Interventionsstudie II beobachten.

Trockene Haut, wie sie im vorherigen Abschnitt beschrieben wurde, kann auch zu einer Erhöhung der Sensitivität beitragen [Primavera et al. 2005]. Eine verbesserte Barrierefunktion des Stratum corneums, schützt die Haut vor entzündungsauslösenden Noxen, wie Nicotinat. In den ALA-Gruppen beider Studien und der GLA-Gruppe der ersten Studie sind deutliche Verringerungen des Δa -Wertes und des Blutflusses auf die Noxe zu beobachten. Neben dem Einfluss der Barrierefunktion können deswegen noch weitere Faktoren eine Rolle an der verminderten Hautreaktion spielen

Fettsäuren haben Einfluss auf Entzündungsmediatoren. Im Falle der Eicosanoide, sind sie deren Vorstufen. Die Bildung von Eicosanoiden ist gekoppelt an die Anwesenheit von C-20 PUFAs. Die in diesen Studien verwendeten Öle enthalten große Anteile mehrfach ungesättigter C-18 Fettsäuren aus denen die entsprechenden C-20 Verbindungen (z.B. EPA, DHGLA, Arachidonsäure) gebildet werden können. Die Eicosanoide der Arachidonsäure bilden das an der Dilation beteiligte Prostaglandin E₂ und das an der Konstriktion der Gefäße beteiligte TXA₂, so dass die Arachidonsäure eine entscheidende Rolle am Entzündungsgeschehen hat. Die Umwandlung der Arachidonsäure in die Eicosanoide wird durch Cyclooxygenasen katalysiert. Leukotriene der Arachidonsäure (wie LTB₄), deren Bildung durch Lipoxygenasen katalysiert werden, erhöhen die vaskuläre Permeabilität, verstärken die Bildung von ROS und der Entzündungszytokine TNF- α , IL-1 und IL-6 [Calder 2006] (siehe Abschnitt 1.3.2.1).

In Abschnitt 6.1.2 ist jedoch gezeigt, dass eine Zunahme von C-20 Fettsäuren infolge der moderaten Supplementierung mit den entsprechenden Ölen, im Blut nur bedingt feststellbar war. Desaturation und Elongation findet vor allem in der Leber statt, aber auch Hautzellen exprimieren diese Enzyme. Die Aktivität der Desaturasen in der Haut ist geringer als in der Leber; altersbedingt nehmen Enzymaktivitäten ab [Ziboh et al. 2000; Brosche et al. 2000]. Die in den Zellmembranen der Haut enthaltenen PUFAs stammen zumeist aus der Nahrung oder sind in der Leber. Die im Leinsamenöl enthaltene α -Linolensäure ist Vorstufe der EPA. Leukotriene die aus der EPA gebildet werden sind nur schwach entzündungsfördernd. Gleichzeitig hemmt die EPA die Cyclooxygenase für die Arachidonsäure, so dass entsprechende Prostaglandine nicht mehr gebildet werden. Nach Supplementierung mit Leinsamenöl nahm der Anteil der EPA im Blut der ALA-Gruppe nur geringfügig zu (Abschnitt 6.1.2). Entsprechend veränderte sich das Verhältnis der EPA zur Arachidonsäure in den Phospholipiddoppelschichten der Haut vermutlich nur geringfügig.

In einer Studie von Schubert et al. wurden 15 Probanden über 14 Tage mit einer Mischung aus 240 mg α -Linolensäure, 120 mg EPA, 49 mg Stearinsäure und 73 mg γ -Linolensäure supplementiert. Das Fettsäuremuster des Plasmas veränderte sich nach Supplementierung entsprechend. Entsprechende Zellen in den Blutproben wurden *ex-vivo* mit Lipopolysacchariden (LPS) stimuliert. Hierbei handelt es sich um ein etabliertes Modellsystem für Entzündungsreaktionen. Die LPS- Stimulierung des Gesamtblutes *ex vivo* führte zu einer Abnahme von PGE₂ und einer Zunahme von PGE₁. LTB₄ wurde nicht beeinflusst. Aufgrund der Mischung der ω -3 Fettsäure und γ -Linolensäure ist keine Aussage über die Wirkung von α -Linolensäure möglich. Die Studie zeigt aber, dass schon kleine Veränderungen im Fettsäuremuster des Blutes ausreichen um Veränderungen der Prostaglandinspiegel zu bewirken [Schubert et al. 2007]. Demzufolge ist nicht auszuschließen, dass durch die Zunahme der α -Linolensäure nach Supplementation und der sich ergebenden geringen Zunahme der EPA ausreicht, um die Konzentration an PGE₂ zu senken. Dies führt dann zu einer verringerten Vasodilation.

Von EPA und DHA ist weiterhin bekannt, dass sie auf Genebene Einfluss auf die Regulationen des Entzündungsgeschehens haben. Insbesondere die Expression von TNF- α und Interleukinen werden inhibiert [Calder 2006 a und b; Simopoulos 2002b; James et al. 2000]. Die Bildung der Zytokine ist eng verknüpft mit der Bildung der Prostaglandine. Ähnliche Effekte sind in *in-vitro* Studien für die α -Linolensäure beschrieben. Diese hemmt, wie ihre langkettigen homologen Verbindungen, die Aktivitäten von Nf κ B und der MAPK in

RAW 264.7 Makrophagen, dadurch kommt es zur verminderten Expression von iNOS (katalysiert die NO- Entstehung), COX-2 und TNF- α [Ren et al. 2007].

Frühere Studien haben gezeigt, dass durch eine vierwöchige Supplementierung mit Leinsamenöl die Bildung von TNF α und IL-1 β nach LPS-Stimulierung um 30% herabgesetzt wird [Caughey et al. 1996]. Die α -Linolensäuredosis lag hier bei 13,7 g/Tag über einen Zeitraum von 4 Wochen. Studien mit adipösen bzw. leicht übergewichtigen Studienteilnehmern ergaben keine Veränderungen der Entzündungsmediatoren nach Leinsamenölsupplementierung Die Menge wurde für diese Studie individuell für jeden Probanden berechnet und betrug 5% der täglichen aufgenommenen Gesamtenergie (dies entspricht ca. 3 g Öl). In einer Studie von Wallace et al. wurden 9 g Öl über einen Zeitraum von 12 Wochen supplementiert, diese Menge reichte nicht aus um Veränderungen der Zytokine nach LPS Behandlung festzustellen [Nelson et al. 2007; Wallace et al. 2002]. In der oben aufgeführten Studie von Schubert et al. wurden ebenfalls kaum Veränderungen von TNF- α , IL-8 und IL-10 beobachtet [Schubert et al. 2007].

Aus dem Vergleich mit den Literaturdaten lässt sich schlussfolgern, dass die verringerte Dilation der Gefäße nach Stimulierung mit Nicotinat in der ALA-Gruppe auf die erhöhte Barrierefunktion der Haut und vermutlich auf eine veränderte Prostaglandinsynthese zurückzuführen ist, weniger auf eine direkte Beeinflussung der Zytokine.

Auch in der GLA-Gruppe war eine verringerte Dilation der Gefäße feststellbar. Die antiinflammatorische Wirkung sowohl nach topischer wie auch endogener Applikation von Borretschöl bzw. Nachtkerzenöl (ebenfalls ein Öl reich an γ -Linolensäure) ist bekannt. Insbesondere bei atopischer Dermatitis reichen schon 2-6 g Nachtkerzenöl aus um eine Besserung der Erkrankung zu bewirken [Horrobin 2000]. Die enthaltene γ -Linolensäure wird mittels Elongation zügig in die DHGLA umgewandelt (siehe Abschnitt 6.1.2). Dies kann in der Leber erfolgen, aber auch in der Haut, da die Elongasenreaktion im Gegensatz zur Desaturasenreaktion im Körper nicht vermindert ist. DHGLA ist direkt am Eicosanoidstoffwechsel beteiligt und bildet Prostaglandine der Serie 1 und antiinflammatorische Leukotriene (15-Hydroxyeicosatriensäure). Erstere inhibieren u. a. Phospholipasen, so dass weniger Arachidonsäure aus der Zellmembran freigesetzt wird. Die Bildung ließ sich beim Menschen sowohl nach endogener wie auch topischer Applikation von Borretsch- bzw. Nachtkerzenöl nachweisen [Ziboh et al. 2000; Horrobin 2000]. Gleichzeitig wirkt es antagonistisch zu Arachidonsäure auf die Cyclooxygenase, so dass das auf die Vasodilation wirkende Prostaglandin E₂ vermindert gebildet wird. γ -Linolensäure kann somit Einfluss auf die Prostaglandinsynthese unabhängig von der Aktivität der Desaturasen nehmen.

Dieser Mechanismus ist vermutlich für die verminderte Entzündungsreaktion in der GLA-Gruppe von Bedeutung. Aber auch hier muss die verbesserte Barrierefunktion der Haut nach Supplementierung berücksichtigt werden.

In-vitro Studien zeigen, dass durch γ -Linolensäure und DHGLA die Expression zahlreicher Zytokine beeinflusst wird [Dooper et al. 2003]. Thies et al. konnten in einer Humanstudie zeigen, dass 700 mg γ -Linolensäure nicht ausreichten, um die Bildung von Zytokinen (hier IL-2 und Interferon- γ) zu stimulieren [Thies et al. 2001], so dass auch in der GLA-Gruppe die supplementierter Menge an γ -Linolensäure vermutlich nicht ausreichte, um die Zytokinproduktion zu beeinflussen

Die Supplementierung mit dem linolsäurereichen Distelöl bewirkte keine Veränderung der Sensitivität der Haut.

Die durchgeführte Studie I zeigt, dass moderate Mengen an Leinsamenöl oder Borretschöl ausreichen, um die Barrierefunktion, sowie die Sensitivität der Haut zu verbessern. Erstmals wurde dieser Vergleich mit objektiven Methoden in einer placebokontrollierten Studie gezeigt. Die Wirkung vom Leinsamenöl kann durch die angeführte Studie II bestätigt werden. Damit ist ein Wirkungsnachweis der Öle gegeben. Dieser Aspekt kann zur Beurteilung und Einsatz der Öle als Nahrungsergänzungsmittel oder als Bestandteil in Functional Foods herangezogen werden.

6 Wirkung von UV-A Bestrahlung auf humane dermale Hautfibroblasten

6.1 Carotinoide und UV-A Strahlung: Untersuchungen an humanen Hautfibroblasten

Zu der Gruppe der Lipide zählen neben den Fettsäuren auch die Carotinoide, von denen ebenfalls aus Humanstudien bekannt ist, dass sie Hautstruktur und Funktion beeinflussen [Heinrich et al. 2006b]. Die photoprotektiven Eigenschaften des wohl bekanntesten Carotinoids, β - Carotin, sind in mehreren Studien untersucht [Stahl et al. 2002]. Nur wenig bekannt ist zu den photoprotektiven Effekten anderer Carotinoide wie Astaxanthin, Canthaxanthin oder Lycopin. Im folgenden Abschnitt sind in- vitro Untersuchungen an humanen dermalen Fibroblasten (HdF) zur Interaktion von Carotinoiden mit UV-A Licht beschrieben.

In photochemischen Reaktionen werden unter UV-Bestrahlung biologisch wichtige Moleküle zerstört oder verändert. Des Weiteren bilden sich in Anwesenheit von Photosensibilisatoren reaktive Sauerstoffverbindungen, die Makromoleküle wie DNA, Lipide und Proteine oxidieren. Der Funktionsverlust der zellulären Strukturen führt zu Zellschäden und im Extremefall zum Zelltod. Auch zelluläre Signalwege, die Wachstum und Differenzierung kontrollieren werden beeinflusst. Photoprotektive Substanzen und/oder Antioxidantien, zu denen auch die Carotinoide gehören, wirken diesen Effekten entgegen.

In den nachfolgenden Studien wurden folgende Parameter untersucht: Zellviabilität, Expression der Hämoxigenase-1 (HO-1), Lokalisation des Transkriptionsfaktors Nrf2, Bildung von MDA, Zell- Zell- Kommunikation über Gap Junctions, Expression und Lokalisation von N- Cadherin, Expression von β - Catenin.

6.1.1 Zellviabilität: SRB Assay

Mit Hilfe des SRB- Assays wird die Zellviabilität gemessen. Zellviabilität hängt direkt mit der Zelltoxizität zusammen. Dabei kann mit diesem Assay nicht zwischen Nekrose und Apoptose unterschieden werden. Der Assay beruht auf der Bindung von Sulforhodamine B (SRB) an die Proteine lebender Zellen. Die Menge des gebundenen SRB lässt sich bei 492 nm im Photometer messen. Die Extinktionswerte korrelieren direkt mit der Zellviabilität.

6.1.1.1 Bestrahlung von humanen Hautfibroblasten

Zu Beginn der Untersuchung wurde die Wirkung von UV-A Bestrahlung auf HdF in verschiedenen Dosen untersucht. Dazu wurden die Zellen abweichend vom allgemeinen Protokoll im Abschnitt 3.5.1.4 nicht mit Carotinoiden behandelt. Die Ergebnisse des SRB-Assays sind in Abbildung 6-1 dargestellt. Jeder Wert ist über 8 Proben einer Versuchsreihe gemittelt. Die Auswertung der Messdaten erfolgte gepaart, d.h. die Viabilität der unbestrahlten Zellen wurden in jeder Versuchsreihe 100% gesetzt (Kontrolle) und die prozentualen Abweichungen der Einzelproben berechnet. Diese Auswertung ist sinnvoll, da es bei diesem Assay keine Möglichkeit zur Normierung gibt und Versuchsbedingungen nur innerhalb einer Versuchsreihe konstant gehalten werden können. Jede Versuchsreihe wurde 3 mal in verschiedenen Zellpassagen durchgeführt und über diese 3 Werte der Mittelwert mit Standardabweichung gebildet.

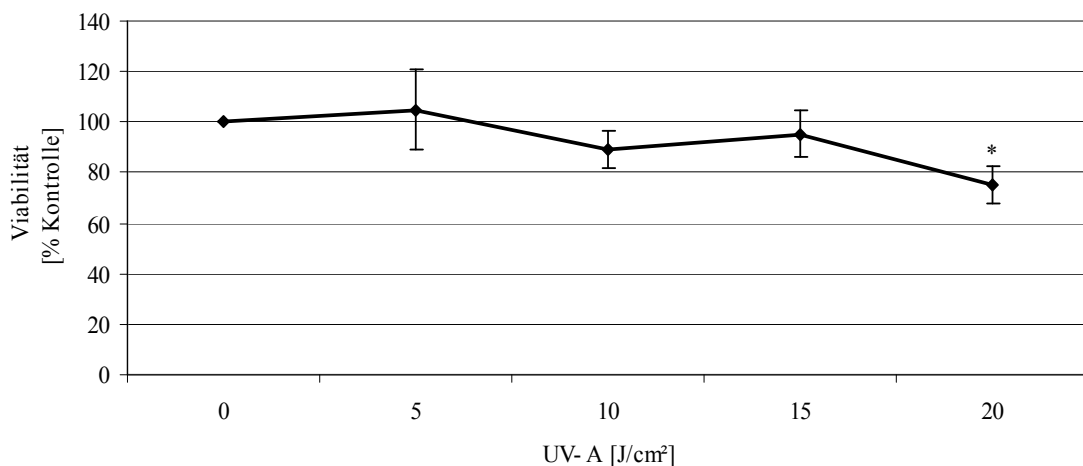


Abb. 6-1 Viabilität von HdF nach Bestrahlung mit UV-A unterschiedlicher Dosis (24h Postinkubation)

Mittelwert \pm SD; angegeben in Prozent der unbestrahlten HdF (n=3)

*statistisch signifikant unterschiedlich zu den unbestrahlten HdF ($p < 0,05$)

Wie aus der Abbildung ersichtlich, veränderte sich die Zellviabilität bis zu einer UV-A- Dosis von 15 J/cm² nicht. Erst bei 20 J/cm² konnte eine statistisch signifikante Abnahme der Zellviabilität von 25% beobachtet werden.

6.1.1.2 Inkubation von HdF mit Carotinoiden

In diesem Versuch wurde die Zellviabilität der HdF 24h nach Inkubation mit den Carotinoiden Astaxanthin, Canthaxanthin, β -Carotin und Lycopin (ohne Bestrahlung) untersucht. Die eingesetzte Carotinoidkonzentration im Inkubationsmedium betrug 10 $\mu\text{mol/L}$, die Endlösemittelkonzentration (THF) war 0,1%. Für die Kontrollproben wurde das Medium nur mit THF versetzt. Die Viabilität ist in % der Kontrolle in Tabelle 6.1 dargestellt, die Auswertung erfolgte ebenfalls gepaart (Abschnitt 6.1.1.1).

Es zeigte sich, dass weder Astaxanthin oder Canthaxanthin bei einer 24 stündigen Inkubationszeit die Viabilität der HdF statistisch signifikant beeinflussen. Bei Inkubation mit β - Carotin nahm die Viabilität um 13% statistisch signifikant ab. β - Carotin war somit in einer Konzentration von 10 $\mu\text{mol/L}$ zytotoxisch im verwendeten Zellsystem. Auch Lycopin war leicht toxisch.

Tabelle 6.1 Viabilität der HdF nach Inkubation mit Carotinoiden für 24h (10 $\mu\text{mol/L}$)
Mittelwerte \pm SD; angegeben in Prozent der Kontrolle (n=3)

Substanz	Viabilität [% Kontrolle]
Kontrolle	100,0
Astaxanthin	100,0 \pm 5,9
Canthaxanthin	103,1 \pm 5,8
β - Carotin	87,1 \pm 5,9*
Lycopin	93,6 \pm 3,1*

*statistisch signifikant unterschiedlich zur Kontrolle (p<0,05)

6.1.1.3 Viabilität und Morphologie von HdF nach Präinkubation mit Carotinoiden und UV-A Bestrahlung

In diesem Versuch wurden die Viabilität und die Morphologie der HdF nach 24h Präinkubation mit verschiedenen Carotinoiden, Bestrahlung mit UV-A verschiedener Dosis und Postinkubation bis 24h im carotinoidfreien Medium untersucht. Die Behandlung der Zellen erfolgte gemäß Abschnitt 3.5.1.4. Veränderungen in der Zellmorphologie sind in Abbildung 6-2 dargestellt, die Extinktionswerte des SRB- Assays, jeweils bezogen auf die unbestrahlte Kontrolle (100%), in Tabelle 6.2.

Viabilität

In den Kontrollzellen nahm die Viabilität mit zunehmender Bestrahlungsdosis ab (24h Postinkubation; Tabelle 6.2). Für Zellen, die mit Astaxanthin präinkubiert wurden, war die Viabilität bei keiner Bestrahlungsdosis statistisch signifikant unterschiedlich zur unbestrahlten Kontrolle.

In den mit Canthaxanthin inkubierten Zellen nahm die Viabilität bei Bestrahlung mit 10 J/cm² und 20 J/cm² statistisch signifikant im Vergleich zur unbestrahlten Kontrolle ab (10 J/cm²: 89%±1,5%; 20 J/cm²: 80,4%±5,0%). Die Abnahme ist ebenfalls statistisch signifikant unterschiedlich zu den unbestrahlten mit Canthaxanthin inkubierten Zellen.

Mit β - Carotin inkubierte Zellen hatten schon ohne Bestrahlung eine statistisch signifikante erniedrigte Viabilität (53,7%±3,2%). Dies bestätigte das Ergebnis aus Abschnitt 6.1.2.1, wonach β - Carotin zytotoxisch auf HdF wirkt. Die Viabilität nahm nach Bestrahlung wieder leicht zu (10 J/cm²: 62,7%±4,2%, 20 J/cm²: 60,0%±2,4%), die Zunahme war nach der Bestrahlung mit 10 J/cm² statistisch signifikant im Vergleich zu den unbestrahlten mit β -Carotin behandelten Zellen.

Die mit Lycopin präinkubierten HdF zeigten schon nach Bestrahlung mit 10 J/cm² eine im Vergleich zur unbestrahlten Kontrolle verringerte Viabilität (79,1%±16,6%), bei 20 J/cm² betrug diese 59,5%±5,0%. Die Abnahme bei 20 J/cm² war statistisch signifikant, im Vergleich zur unbestrahlten Kontrolle und den unbestrahlten mit Lycopin behandelten Zellen.

Von den getesteten Carotinoiden wirkte Astaxanthin der durch UV-A Bestrahlung induzierten verringerten Viabilität entgegen, Canthaxanthin zeigte geringere Effekte. β -Carotin senkte die Viabilität schon ohne Bestrahlung. Lycopin verstärkte die durch UV-A induzierte Verringerung der Zellviabilität.

Zusätzlich wurde für die mit Astaxanthin und Canthaxanthin inkubierten Zellen (24h) die Viabilität 3h und 6h nach Bestrahlung bestimmt. Es zeigten sich keine statistisch signifikanten Unterschiede zur jeweiligen unbestrahlten Kontrolle (Tabelle 6.3)

Tabelle 6.2 Viabilität von HdF nach UV-A Bestrahlung und Präinkubation mit Carotinoide (Postinkubation 24)

Mittelwerte \pm SD; angegeben in Prozent der Kontrolle (n=3-6)

Substanz	Viabilität (% Kontrolle)		
	0 J/cm ²	10 J/cm ²	20 J/cm ²
Kontrolle	100	94,8 \pm 10,2	84,0 \pm 7,7*
Astaxanthin	104,3 \pm 7,5	94,9 \pm 15,4	88,6 \pm 7,5
Canthaxanthin	104,0 \pm 9,1	89,0 \pm 1,5*	80,4 \pm 5,0* [#]
β - Carotin	53,7 \pm 3,2*	62,7 \pm 4,2* [#]	60,0 \pm 2,4*
Lycopin	100,1 \pm 17,0	79,1 \pm 16,6	59,5 \pm 5,0* [#]

*statistisch signifikant unterschiedlich zur unbestrahlten Kontrolle (p<0,05)

[#]statistisch signifikant unterschiedlich zu den unbestrahlten mit gleichen Carotinoid inkubierten Zellen

Tabelle 6.3 Viabilität von HdF nach UV-A Bestrahlung und Präinkubation mit Carotinoiden (Postinkubation 3h und 6h)

Mittelwerte \pm SD; angegeben in Prozent der Kontrolle (n=3)

	Substanz	Viabilität (% Kontrolle)	
		0J/cm ²	10J/cm ²
3h	Kontrolle	100	91,2 \pm 6,2
	Astaxanthin	98,6 \pm 6,6	100,1 \pm 3,7
	Canthaxanthin	104,6 \pm 7,4	96,8 \pm 2,5
6h	Kontrolle	100	97,3 \pm 11,5
	Astaxanthin	107,9 \pm 9,1	106,4 \pm 15,0
	Canthaxanthin	111,7 \pm 13,8	105,1 \pm 14,6

Zellmorphologie

Die Ergebnisse der Zellmorphologieuntersuchungen konnten die Resultate der Zellviabilitätsuntersuchungen bestätigen (Abbildung 6-2).

Bei den unbestrahlten Zellen waren zwischen Kontrolle und den mit Astaxanthin, Canthaxanthin und Lycopin behandelten Zellen keine Unterschiede in der Morphologie zu erkennen. Die Zellen waren konfluent, besondere Auffälligkeiten waren nicht zu erkennen. Sie waren parallel angeordnet, wie es für humane dermale Fibroblasten in Kultur üblich. Bei den mit β -Carotin behandelten Zellen war (wie aus den vorherigen Versuchen zu erwarten war) die Zellzahl deutlich gegenüber der Kontrolle erniedrigt. Die Strukturen der Einzelzellen waren unauffällig. Zellfragmente (helle Stellen im Bild, zusätzlich gekennzeichnet durch rote Pfeile) waren nur wenige zu erkennen.

Nach Bestrahlung mit 10 J/cm^2 UV-A waren zwischen der unbestrahlten und der bestrahlten Kontrolle keine Unterschiede zu erkennen. Auch die mit Astaxanthin bzw. Canthaxanthin inkubierten Zellen zeigten die für HdF typische Struktur. Die Zellzahl in den mit β -Carotin inkubierten und bestrahlten Zellen, war im Vergleich zu den mit β -Carotin inkubierten unbestrahlten Zellen nicht verändert. Die Zellstruktur war jedoch verändert. Deutlich zeigte sich dies in einer Streckung der Einzelzellen und der Ausbildung von „faserartigen“ Strukturen (schwarze Pfeile). Die Anzahl der Zellfragmente war deutlich erhöht im Vergleich zur unbestrahlten Kontrolle. Bei den mit Lycopin vorbehandelten Zellen war die Zellzahl im Vergleich zur Kontrolle und zur unbestrahlten Lycopinprobe erniedrigt.

Nach Bestrahlung mit 20 J/cm^2 UV-A waren in der Kontrolle, sowie in den mit Astaxanthin und mit Canthaxanthin präinkubierten Proben deutlich weniger Zellen als im unbestrahlten Vergleichsansatz zu erkennen. Der Effekt war am stärksten ausgeprägt in der bestrahlten Kontrolle, gefolgt von den mit Canthaxanthin präinkubierten Zellen. Geringer war er in den mit Astaxanthin präinkubierten Zellen. In den mit β -Carotin und Lycopin behandelten Kulturen war die Zellzahl deutlich erniedrigt. Die Zellen waren ungewöhnlich deformiert, die Anzahl der Fragmente deutlich erhöht.

Zusammenfassend kann vermerkt werden: Die Beobachtungen zur Zellmorphologie konnten die Veränderungen aus den Zellviabilitätsuntersuchungen bestätigen. Die Zellzahl nahm mit zunehmender Bestrahlungsdosis ab und Astaxanthin wirkte diesem Effekt entgegen. Zusätzlich zeigte sich, dass die mit β -Carotin und Lycopin vorbehandelten Zellen nach Bestrahlung deutlich geschädigt sind.

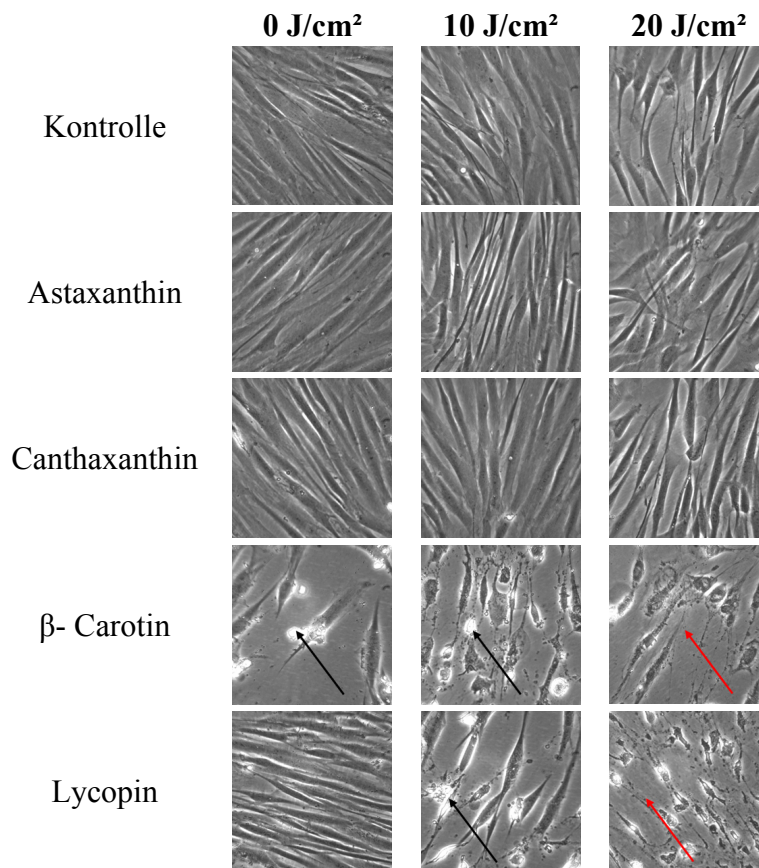


Abb. 6-2 *Morphologische Veränderung in HdF nach UV-A Bestrahlung und Präinkubation mit Carotinoiden*
Rote Pfeile: Zellfragmente; Schwarze Pfeile: „faserartige“ Strukturen

6.1.2 Messung von DCF als Marker für die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies in HdF unter UV-A- Bestrahlung

Unter Bestrahlung mit UV-A werden vermehrt reaktive Sauerstoffspezies (ROS) in den Zellen gebildet (siehe Abschnitt 1.4.1). Dichlorodihydrofluorescein (H₂DCF) ist eine Substanz, die durch die entstehenden ROS zum Fluorochrom Dichlorofluorescein (DCF) oxidiert wird. Die Fluoreszenz (Anregungswellenlänge 485 nm, Emissionswellenlänge 520 nm) korreliert direkt mit der Menge an gebildeten ROS. Da H₂DCF photoinstabil ist, konnten die Zellen erst nach der Bestrahlung mit dem Farbstoff inkubiert werden [Keller et al. 2004]. Folglich lassen sich nur relativ stabile ROS wie z.B. Peroxide erfassen.

Die Behandlung der Zellen und die Messung der Fluoreszenz erfolgte, soweit nicht anders beschrieben, gemäß Abschnitt 3.5.1.4. Von den Messwerten der Proben wurden ermittelte Messwerte von Zellen ohne H₂DCF und von H₂DCF-DA ohne Zellen abgezogen.

6.1.2.1 Bildung von DCF in HdF nach UV-A Bestrahlung

Abweichend vom allgemeinen Protokoll wurde zur Etablierung des Systems in vorangehenden Untersuchungen jeweils 12 Zellproben in einer Versuchsserie bestrahlt und mit unbestrahlten Zellen verglichen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 6.3 dargestellt.

Die Reaktionskinetik zeigte eine Annäherung an einen Maximalwert, der umso größer war, je größer die Bestrahlung. Entsprechend waren mehr reaktive Sauerstoffspezies/Peroxide in der Zelle entstanden. Der lineare Bereich lag zwischen der 25. und 40. Minute. Weiterhin wurde deutlich, dass es ca. 10-15 Minuten dauert, bis der Farbstoff in die Zellen gelangt (Schnittpunkt der Kurven mit der x-Achse).

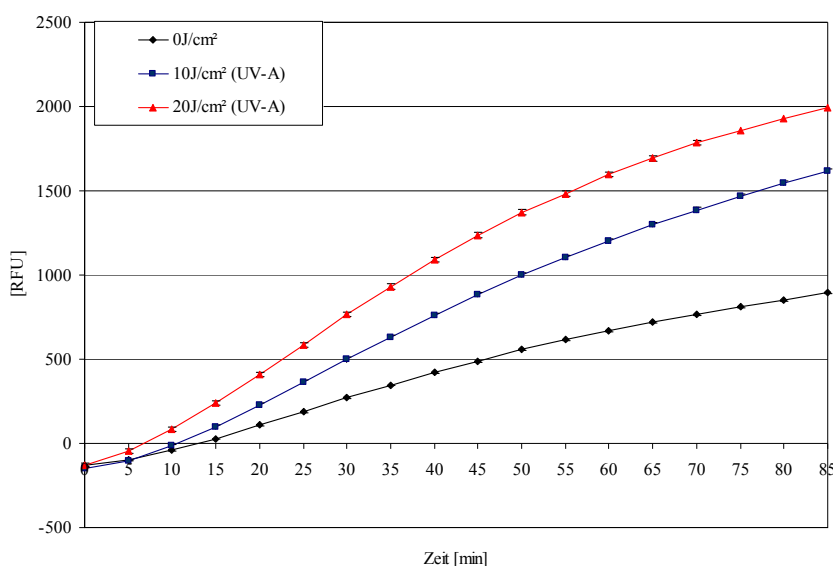


Abb. 6-3 Fluoreszenz von DCF in HdF nach der Bestrahlung mit UV-A
Fluoreszenz angegeben in relative Fluoreszenz- Einheiten [RFU] (Mittelwert \pm SD)

6.1.2.2 Einfluss von Carotinoiden auf die Bildung von ROS in HdF nach UV-A Bestrahlung

Konfluente HdF wurden mit Carotinoiden nach Protokoll inkubiert und bestrahlt. Die Fluoreszenz- Messung erfolgte gemäß Abschnitt 6.1.3.1. In jeder Versuchsreihe wurde jede Substanz vierfach vermessen und die Werte gemittelt. Wie schon in Abschnitt 6.1.1.1 erfolgte

auch hier die Auswertung gepaart. Jede Versuchsreihe wurde 3 mal wiederholt und ein Mittelwert \pm SD gebildet (Abbildung 6-4). Für die Auswertungen wurden die Messwerte zwischen der 25. Minute und 40. Minute der Messung in jeder Versuchsreihe summiert.

Nach Bestrahlung der Zellen nahm in der Kontrolle die Fluoreszenz bei 10 J/cm² um das 2 fache, nach 20 J/cm² um das 3 fache zu. Die Messung der mit Astaxanthin und Canthaxanthin präinkubierten Zellen zeigte unter Bestrahlung einen ähnlichen Verlauf.

In den mit β -Carotin inkubierten Zellen war der Anstieg der Fluoreszenz nach der Bestrahlung mit 10 J/cm² größer als in den Kontrollzellen (4 fache der unbestrahlten mit β -Carotin inkubierten Zellen), ein weiterer Anstieg bei 20 J/cm² war nicht zu beobachten. Auffällig war, dass in den mit Lycopin präinkubierten Zellen die Werte auf das 7 fache bei 10 J/cm² und auf das 6 fache bei 20 J/cm² im Vergleich zu den unbestrahlten Lycopin inkubierten Zellen anstiegen. Die Daten zeigen, dass Astaxanthin, Canthaxanthin und β -Carotin unter den Versuchsbedingungen kaum Einfluss auf die Bildung von ROS nach einer Bestrahlung hatten. Lycopin verstärkt die Bildung von ROS.

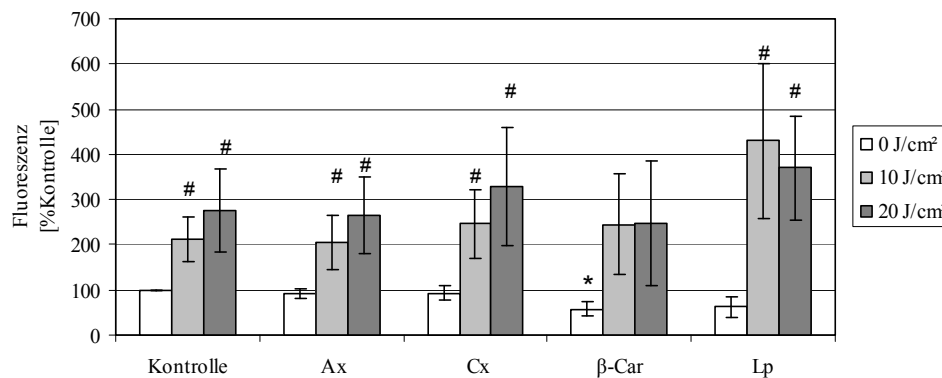


Abb. 6-4 *Bildung von DCF in HdF nach UV-A Bestrahlung und Präinkubation mit Carotinoiden*

Mittelwert \pm SD; angegeben in Prozent der unbestrahlten Kontrolle; (n=3);

Ax=Astaxanthin, Cx=Canthaxanthin, β -Car = β -Carotin, Lyc=Lycopin

**statistisch signifikant zur unbestrahlten Kontrolle*

#statistisch signifikant zu den unbestrahlten mit gleichen Carotinoid inkubierten Zellen

Aufgrund der Ergebnisse aus Viabilitäts- und ROS- Messungen wurden Astaxanthin und Canthaxanthin für die weiteren Untersuchungen ausgewählt. Als Standarddosis für die UV-A Bestrahlungen wurde 10 J/cm² festgelegt.

6.1.3 Messung der Expression von Hämoxigenase-1 (HO-1) und subzelluläre Lokalisation von Nrf2

Ein geeigneter Marker für die ROS- Bildung in der Zelle ist die ROS abhängige Induktion der Expression von HO-1 [Tyrell 2004]. Bei der Regulation der Expression dieses Proteins spielt der Transkriptionsfaktor Nrf2 eine wichtige Rolle. Unter verstärkter Expression von HO-1 wird meist auch eine erhöhte Translokation von Nrf2 vom Zytosol in den Zellkern beobachtet [Tyrell 2004].

Die Expression von HO-1 wurde mit Hilfe einer Western Blottechnik untersucht (Abschnitt 3.5.7), Nrf2 wurde immunozytochemisch mit spezifischen Antikörpern nachgewiesen (Abschnitt 3.5.8).

6.1.3.1 Bestimmung der Expression von HO-1

Inkubiert und bestrahlt wurden die Zellen gemäß Protokoll (Abschnitt 3.5.1.4), Probenlysate wurden 3, 6 und 24h nach der Bestrahlung gewonnen. Die Blots wurden für die Zeitpunkte 6h und 24h dreimal wiederholt, der 3h- Wert zweimal. Ladungskontrolle war GAPDH.

In Abbildung 6-5 ist je ein Blot exemplarisch dargestellt. Quantifiziert wurde über eine densitometrische Auswertung mit Hilfe der Auswertesoftware ImageJ die Werte wurden auf die unbestrahlte Kontrolle bezogen, normiert wurden die Einzelwerte auf die Signalstärke der GAPDH- Ladekontrolle. Es zeigte sich, dass in der unbestrahlten Kontrolle Hämoxigenase zumeist nur ein schwaches Signal lieferte. Daher wurde die densitometrische Auswertung nur von den Blots der bestrahlten Zellen durchgeführt; die bestrahlte Kontrolle wurde 100% gesetzt (Abbildung 6-6). Die Auswertung erfolgte wie schon in den vorherigen Versuchen gepaart.

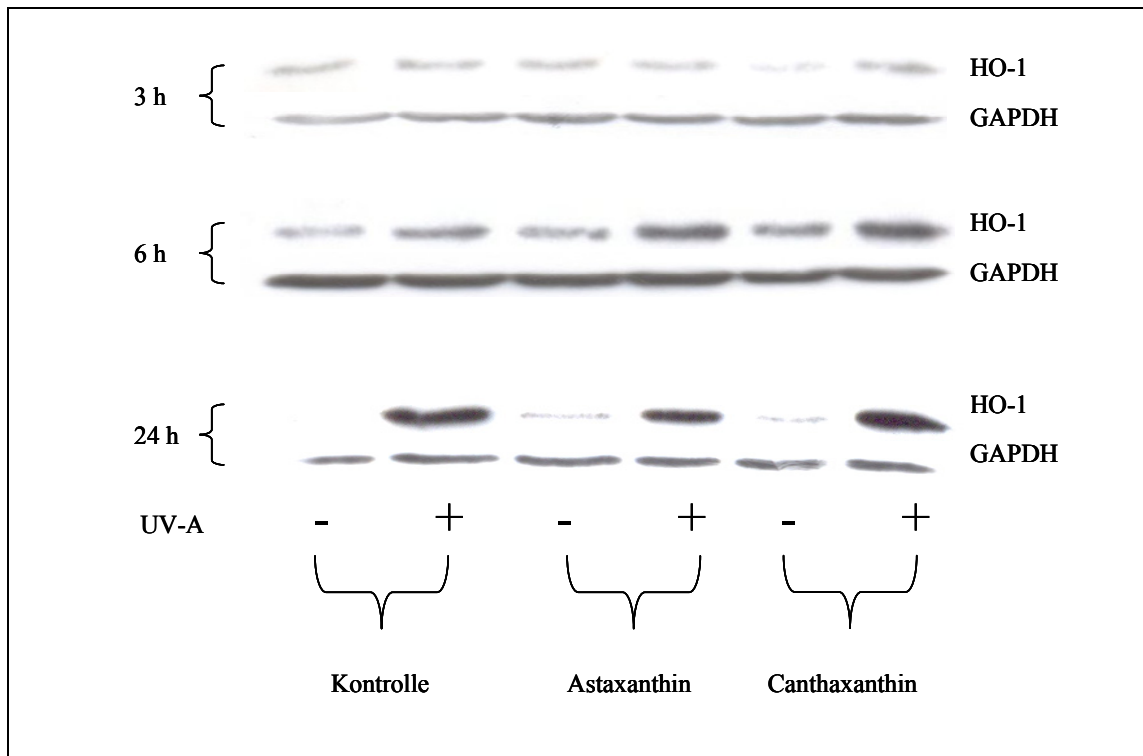


Abb. 6-5 *HO-1 nach UV-A Bestrahlung und Präinkubation mit Astaxanthin und Canthaxanthin (Western Blot)*

3h nach der Bestrahlung waren keine Unterschiede in der Expression von HO-1 zwischen den unbestrahlten und bestrahlten Zellen zu erkennen. 6h und 24h nach der Bestrahlung nahm die Expression im Vergleich zu den unbestrahlten Zellen zu. Durch die Präinkubation mit Carotinoiden ergab sich auch in den unbestrahlten Zellen eine höhere Expression des Proteins. In den bestrahlten mit Astaxanthin inkubierten Zellen war die Expression von HO-1 mit 65% gegenüber der bestrahlten Kontrolle (100%) erniedrigt. Unter Inkubation mit Canthaxanthin waren keine Unterschiede zu erkennen. Die Western Blots zeigen, dass durch die Bestrahlung mit 10 J/cm² UV-A die HO-1- Expression in den HdF ansteigt. Astaxanthin konnte diesem Effekt geringfügig entgegenwirken, Canthaxanthin war nicht wirksam.

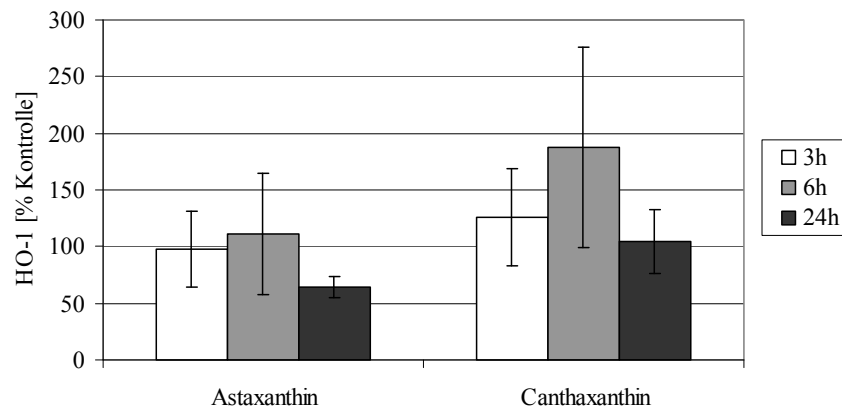


Abb. 6-6 Expression von HO-1 nach UV-A Bestrahlung (10 J/cm^2) und Präinkubation mit Carotinoiden
Mittelwerte \pm SD, ($n=2$ bei den 3h- Werten; $n=3$ bei den anderen Zeitpunkten; angegeben in Prozent der bestrahlten Kontrolle (100%). Werte wurden auf GAPDH normiert

6.1.3.2 Subzelluläre Lokalisation von Nrf2

Nrf2 ist ein Transkriptionsfaktor, der die Expression von HO-1 reguliert. Nrf2 ist im Zytosol an Keap1 gebunden. Unter Einwirkung exogener Stressfaktoren, wie UV-A Bestrahlung, löst sich dieser Komplex, Nrf2 wandert in den Zellkern und initiiert die Expression von u. a. HO-1 (siehe auch Abschnitt 1.4.1).

Die Aufarbeitung und Bestrahlung der Zellen erfolgte dabei gemäß Protokoll. Postinkubationszeiten waren 3h, 6h und 24h. Exemplarische Bilder sind in Abbildung 6-7 bis Abbildung 6-9 dargestellt. Der Versuch wurde zweimal durchgeführt.

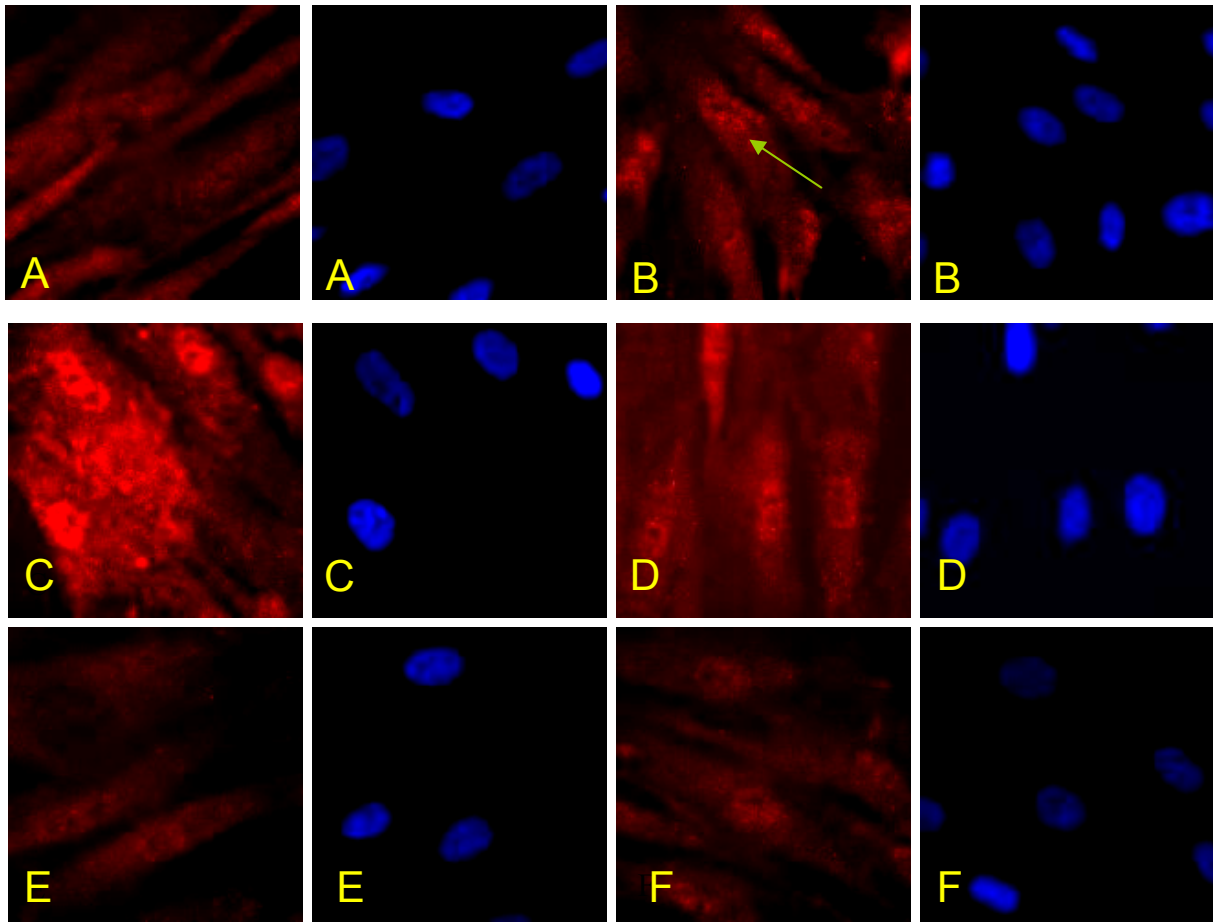


Abb. 6-7 Lokalisation von Nrf2 nach UV-A Bestrahlung und Präinkubation mit Carotinoiden (3h Postinkubationszeit)

Rot Protein: Grüner Pfeil Nrf2 im Zellkern

Blau DAPI-DNA-Färbung

A: Kontrolle 0 J/cm²; B: Kontrolle 10 J/cm²; C: Astaxanthin 0 J/cm²; D: Astaxanthin 10 J/cm²; E: Canthaxanthin 0 J/cm²; F: Canthaxanthin 10 J/cm²

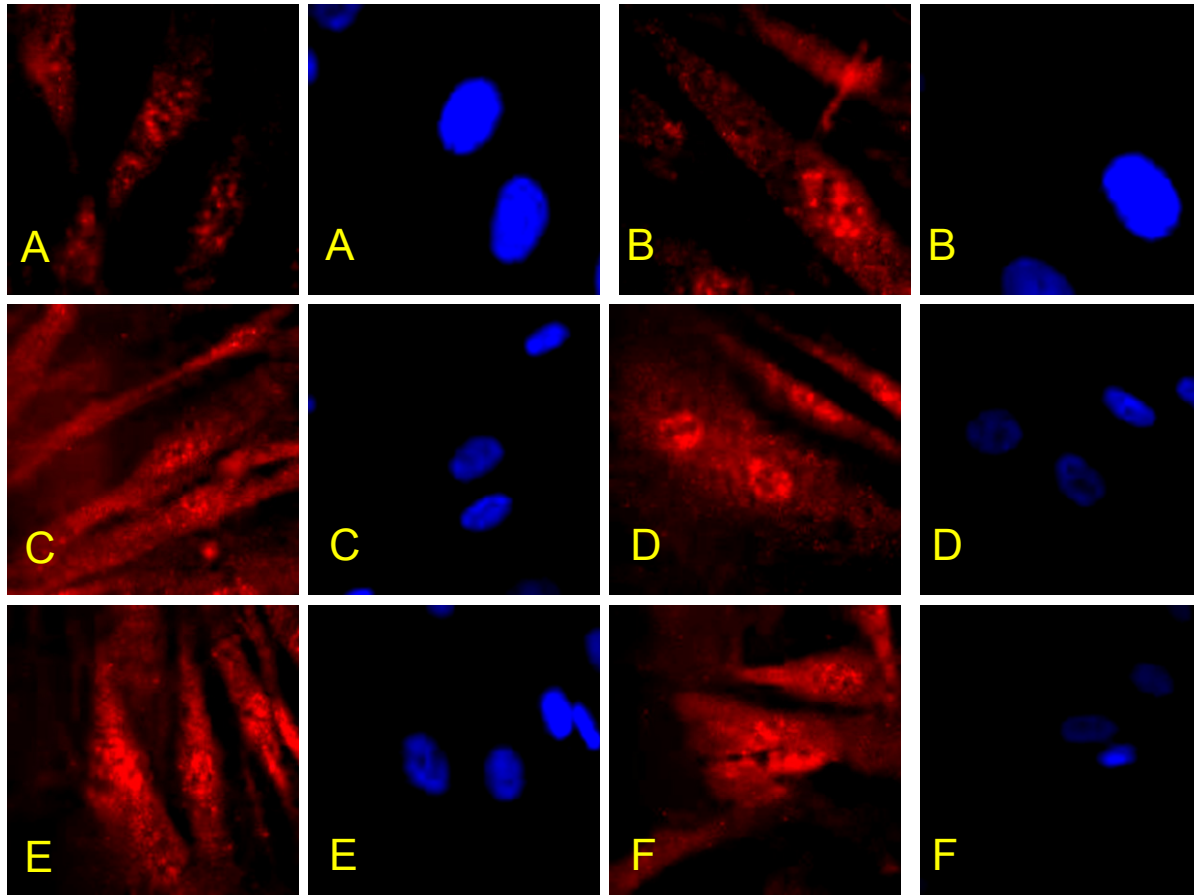


Abb. 6-8 Lokalisation von Nrf2 nach UV-A Bestrahlung und Präinkubation mit Carotinoiden (6h Postinkubationszeit)

Rot Protein: Grüner Pfeil Nrf2 im Zellkern

Blau DAPI-DNA-Färbung

A: Kontrolle 0 J/cm²; B: Kontrolle 10 J/cm²; C: Astaxanthin 0 J/cm²; D:

Astaxanthin 10 J/cm²; E: Canthaxanthin 0 J/cm²; F: Canthaxanthin 10 J/cm²

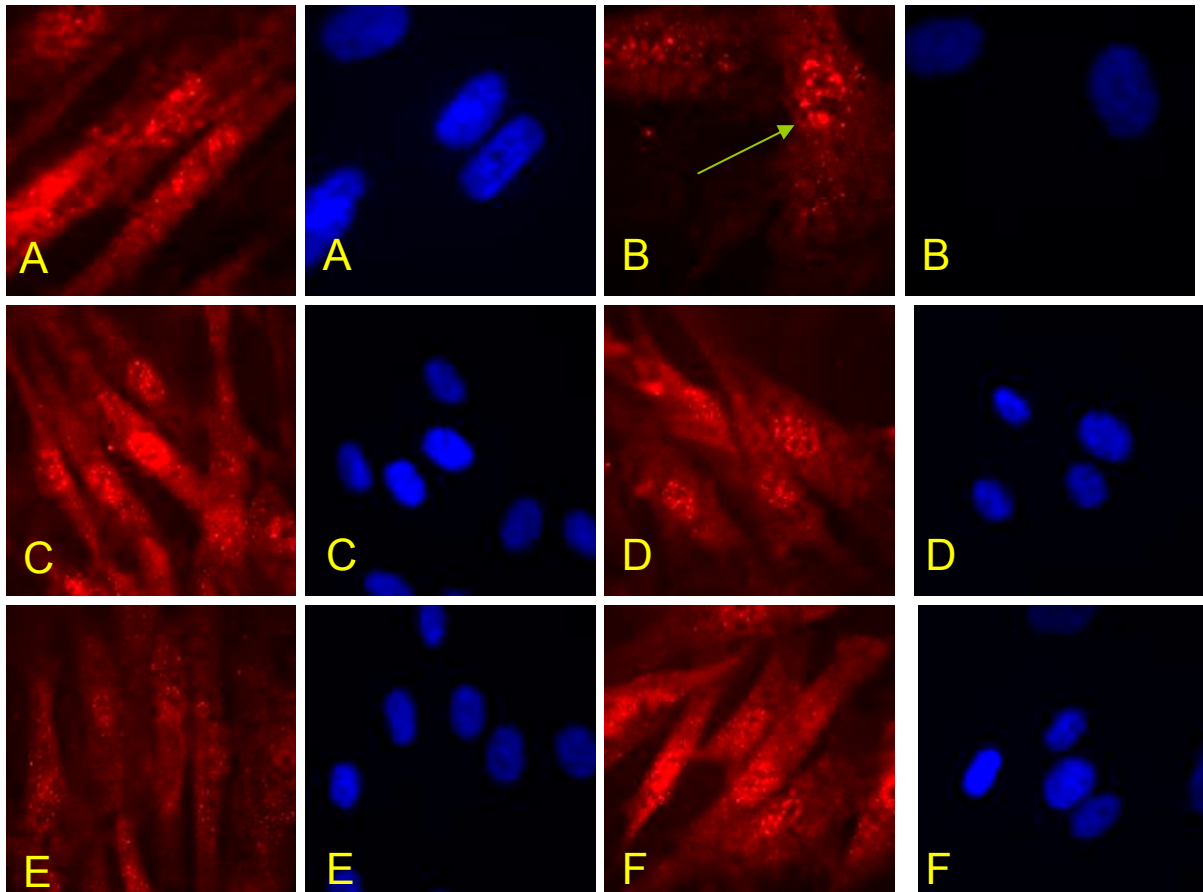


Abb. 6-9 Lokalisation von Nrf2 nach UV-A Bestrahlung und Präinkubation mit Carotinoiden (24h Postinkubationszeit)
Rot Protein: Grüner Pfeil Nrf2 im Zellkern
Blau DAPI- DNA-Färbung
A: Kontrolle 0 J/cm²; B: Kontrolle 10 J/cm²; C: Astaxanthin 0 J/cm²; D: Astaxanthin 10 J/cm²; E: Canthaxanthin 0 J/cm²; F: Canthaxanthin 10 J/cm²

Nach UV-A Bestrahlung konnte zu allen Zeitpunkten eine zunehmende Translokation des Transkriptionsfaktors in den Kern beobachtet werden. Ob Nrf2 auch verstärkt exprimiert wird, ließ sich nicht feststellen. Die Beobachtung war in beiden Versuchsreihen gleich. Bei den mit den Carotinoiden Astaxanthin und Canthaxanthin inkubierten Zellen ergab sich kein eindeutiges Ergebnis. Insbesondere bei den mit Astaxanthin inkubierten Zellen störten unspezifische Anfärbungen der Antikörper (siehe 3h 0 J/cm²). In einigen Zellen war aber auch in den mit Carotinoiden inkubierten Zellen der Transkriptionsfaktor verstärkt im Kern lokalisiert. Ob die verwendeten Carotinoide die durch UV-A Bestrahlung induzierte Translokation von Nrf2 in den Kern vermindert oder verstärkt, konnte nicht abschließend geklärt werden.

6.1.4 Bestimmung von Malondialdehyd (MDA) als Marker der Lipidperoxidation

Die Bestimmung der UV- induzierten Lipidperoxidation ist ein oft verwendeter Parameter zur Messung des Einflusses von UV-A Bestrahlung in Zellsystemen. Ein Marker für die Lipidperoxidation ist die Menge an entstehendem Malondialdehyd.

Zellen wurden dafür gemäß Protokoll behandelt und bestrahlt (Abschnitt.3.5.1). Inkubiert wurde mit Astaxanthin und Canthaxanthin. Die MDA-Menge in jedem Zelllysate wurde auf die Proteinmenge normiert. Für jeden Messwert wurde eine Doppelbestimmung durchgeführt. Die Versuchsreihe wurde 3 mal wiederholt und der Mittelwert \pm SD gebildet. Die Ergebnisse sind in Abbildung 6-10 dargestellt.

Die MDA-Konzentration nahm nach UV-A Bestrahlung um das 5,4fache (Absolutwert: 0,65 nmol/mg Protein) zu. In den unbestrahlten mit Astaxanthin und Canthaxanthin inkubierten Zellen ergab eine Erhöhung der MDA-Menge im Vergleich zur unbestrahlten Kontrolle. Die Erhöhungen waren jedoch statistisch nicht signifikant. Nach der Bestrahlung nahm in den mit Astaxanthin präinkubierten Zellen die MDA-Menge um das 11 fache, in Canthaxanthin exponierten Zellen nahm MDA um das 7,3 fache im Vergleich zur unbestrahlten Kontrolle zu. Eine Verringerung der MDA-Bildung nach Bestrahlung durch Carotinoiden ließ sich nicht feststellen. Astaxanthin wirkte prooxidativ.

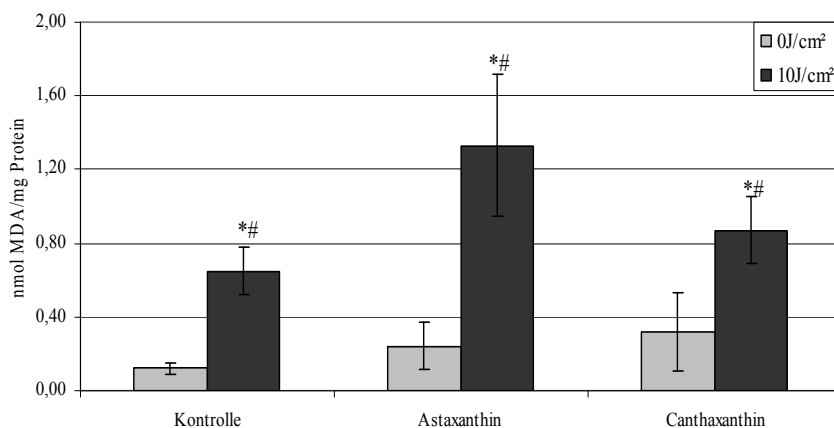


Abb. 6-10 MDA nach UV-A Bestrahlung und Präinkubation mit Carotinoiden
Mittelwert \pm SD (n=3) [nmol/mg Protein]

*statistisch signifikant unterschiedlich zur unbestrahlten Kontrolle ($p < 0,05$)

#statistisch signifikant unterschiedlich zu den unbestrahlten, mit Carotinoiden inkubierten Zellen ($p < 0,05$)

6.1.5 Zell- Zell- Kommunikation über Gap Junctions (GJC) nach UV-A Bestrahlung

Über den Einfluss von UV-A Strahlen auf die GJC ist bisher wenig bekannt. Die GJC ist an Signalwegen beteiligt, die im direkten Zusammenhang mit der zellulären Reaktion auf UV-A Strahlen stehen (z.B. Apoptose) [Wei et al. 2005]. Im nächsten Abschnitt wird die Modulation der GJC in HdF nach UV-A Exposition gezeigt. Untersucht wurde die GJC mit Hilfe des Farbstoff- Transfer- Assays, Expression bzw. Phosphorylierung des Cx43- Proteins anhand der Western Blot- Technik und immunocytochemischer Untersuchungen zur Lokalisation des Proteins.

6.1.5.1 Farbstoff- Transfer Assay

Die Zellen wurden gemäß Abschnitt 3.5.1 behandelt und die GJC gemäß Abschnitt 3.5.6 bestimmt. In jeder Versuchsreihe wurde die Zell- Zell- Kommunikation ausgehend von zehn zufällig ausgewählten Zellen bestimmt und die erhaltenen Werte gemittelt. Jede Versuchsreihe wurde sechsmal durchgeführt und der Mittelwert \pm SD gebildet. Die Ergebnisse sind in Abb. 6-11 und Tabelle 6.4 dargestellt. Die Werte sind in Prozent angegeben bezogen auf die unbestrahlten Zellen zu jedem Zeitpunkt (100%). In Tabelle 6.4 sind zusätzlich die Absolutwerte angegeben.

Tabelle 6.4 Effekt von UV-A Bestrahlung (10 J/cm^2) auf die GJC in HdF

Mittelwerte \pm SD ($n=6$) angegeben in Prozent bezogen auf die GJC der unbestrahlten Zellen zu jedem Zeitpunkt (100%). Zusätzlich sind die Absolutwerte (AW) angegeben.

	GJC					
	Postinkubationzeitpunkt					
	3h		6h		24h	
	%	AW	%	AW	%	AW
0 J/cm²	100 \pm 31,1	9,4 \pm 2,9	100 \pm 9,9	9,9 \pm 1,0	100 \pm 10,4	8,9 \pm 0,9
10 J/cm²	82,0 \pm 38,4	7,7 \pm 3,6	87,5 \pm 7,6*	8,7 \pm 0,7	59,1 \pm 4,9*	5,2 \pm 0,4

*statistisch signifikant unterschiedlich zu der GJC der unbestrahlten Zellen ($p<0,05$)

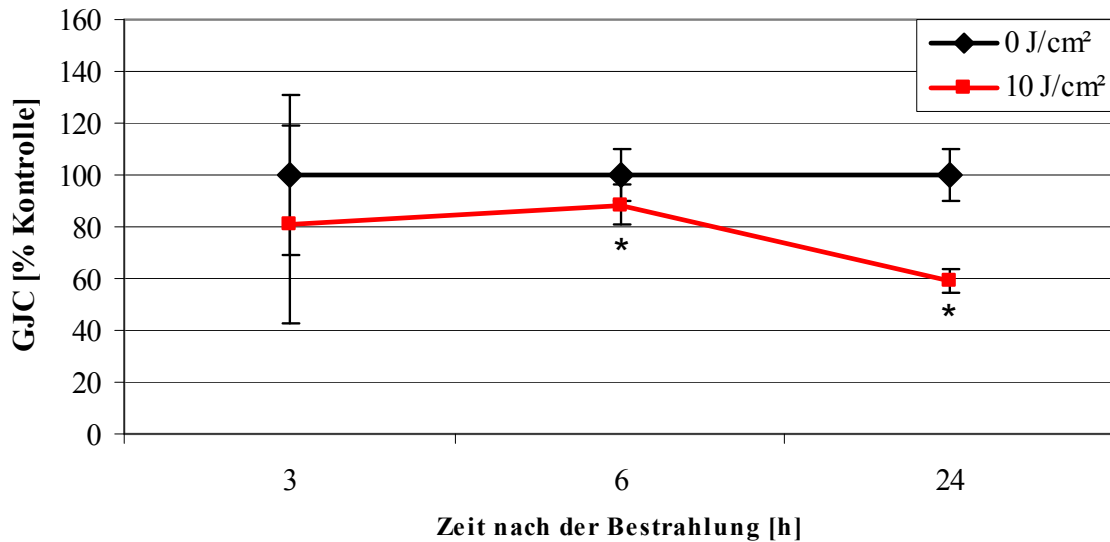


Abb. 6-11 *Effekt von UV-A Bestrahlung auf GJC in HdF (graphische Darstellung)*
 Mittelwert \pm SD ($n=6$;) angegeben in Prozent bezogen auf die GJC der unbestrahlten Zellen (100%)
 *statistisch signifikant unterschiedlich zu der GJC der unbestrahlten Zellen ($p < 0,05$)

Wie aus den Absolutdaten der Tabelle 6.4 ersichtlich, veränderte sich die GJC in den unbestrahlten Zellen zu den verschiedenen Zeitpunkten nicht. Die GJC der bestrahlten Zellen war zu allen Zeitpunkten geringer als die der unbestrahlten Zellen (statistisch signifikant 6h und 24h nach der Bestrahlung). 24h nach der Bestrahlung war die Differenz der GJC zwischen den unbestrahlten und bestrahlten Zellen mit 41% am größten.

6.1.5.2 Expression und Phosphorylierungsmuster von Connexin 43

Um den Einfluss der UV-A Strahlen auf die Expression und die Phosphorylierung des Proteins Cx43 zu untersuchen, wurde eine Western Blot- Analyse gemäß Abschnitt 3.5.7 durchgeführt. Im Western Blot zeigt Cx43 mehrere Banden, die unterschiedlichen Phosphorylierungsgraden des Proteins entsprechen. Ein typisches Phosphorylierungsmuster von Cx43 im Western Blot zeigt 3 Banden (P0, P1 und P2) (Abbildung 6-12).

Die Behandlung der Zellen erfolgte gemäß Kapitel 3.5.1.4. Probenlysate wurden 3h, 6h und 24h nach Bestrahlung gewonnen. Zur besseren Übersicht sind in Abbildung 6-13 nur Ausschnitte exemplarischer Blots dargestellt. Die vollständige Blots sind im Anhang aufgeführt. Jeder Blot wurde mindestens dreimal mit vergleichbaren Ergebnissen durchgeführt. Zelllysate zu unterschiedlichen Postinkubationszeiten wurden auf

unterschiedliche Gele aufgetragen. Ein direkter Vergleich der Expressionen zu unterschiedlichen Zeitpunkten war daher nicht möglich. Es konnte nur die Expressionen des Proteins der unbestrahlten Zellen mit denen der bestrahlten Zellen innerhalb eines Zeitpunktes verglichen werden.

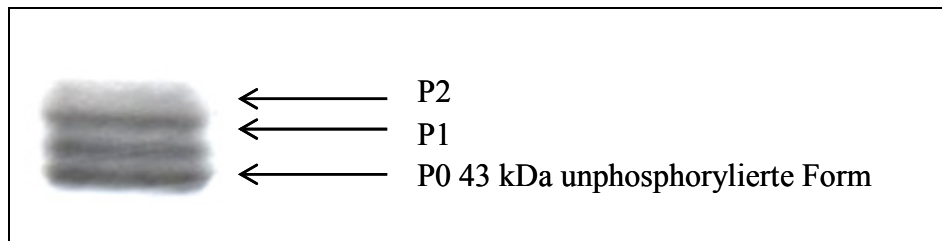


Abb. 6-12 Beispiel: typisches Phosphorylierungsmuster von Cx43 in HdF (Western Blot)

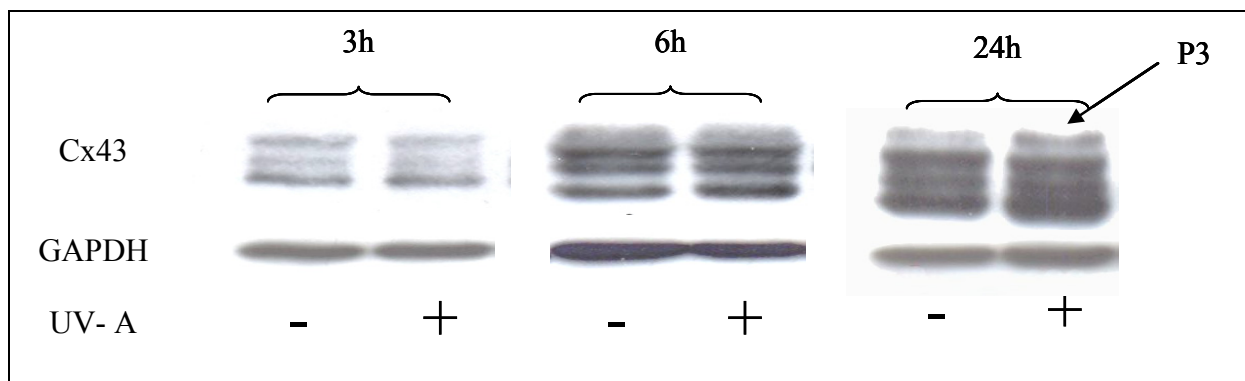


Abb. 6-13 Effekt von UV-A Bestrahlung (10 J/cm^2) auf Expression und Phosphorylierungsmuster von Cx43 (Western Blot)

Schwarzer Pfeil: zusätzliche Phosphorylierungsbande (P3)

Zur semiquantitativen Bestimmung der Gesamtexpression des Proteins wurden jeweils drei Blots ausgewertet, zur Auswertung des Phosphorylierungsmusters drei (6h- Werte) bis vier (3h und 24h Werte).

In Abbildung 6-14 ist die Gesamtconnexinmenge der bestrahlten Zellen bezogen auf die Connexinmenge der unbestrahlten Zellen zu jedem Zeitpunkt dargestellt. Die Gesamtconnexinmenge wurde auf die Ladekontrolle GAPDH normiert.

Zwischen den unbestrahlten Zellen und den bestrahlten Zellen war zu keinem Postinkubationszeitpunkt ein Unterschied in der Gesamtexpression des Proteins feststellbar.

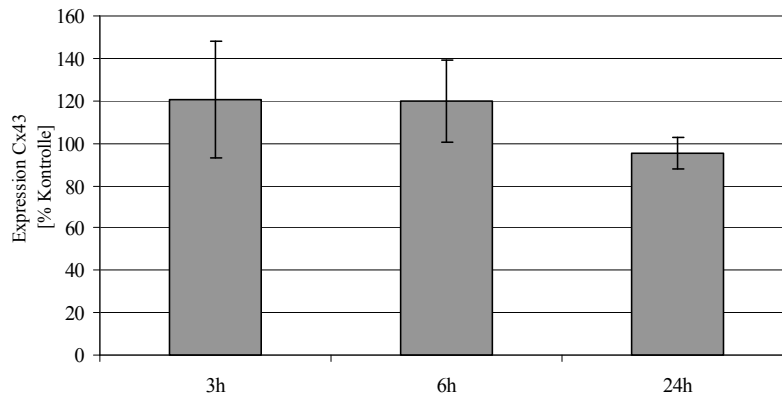


Abb. 6-14 *Expression von Connexin 43 in HdF nach UV-A Bestrahlung*
Gesamtexpression von Cx43 bestrahlter HdF im Verhältnis zur Cx43
Expression der unbestrahlten HdF (100%) zu verschiedener
Postinkubationszeiten; Mittelwert \pm SD (n=3)

In Abbildung 6-15 und Tabelle 6.5 sind die Intensitäten der Phosphorylierungsbanden aufgeführt, normiert auf die P0 Bande. Ein typisches Phosphorylierungsmuster von Cx43 ist gekennzeichnet durch gleichmäßige Intensitätsverteilung dreier Banden. (Abbildung 6-12).

UV-A Bestrahlung beeinflusste das Phosphorylierungsmuster von Cx43 im Western Blot. Neben den drei charakteristischen Banden trat eine vierte Bande (P3) auf. Das Auftreten dieser Bande in den unbestrahlten Zellen war nicht immer auszuschließen, der Effekt war jedoch geringer als in den bestrahlten Zellen. Erst bei einem Verhältnis der P3 Bande zur P0 Bande von größer 0,2 wurde das Vorhandensein dieser Bande als nachweisbar angesehen. So konnte gering die Bande in zwei Western Blots der bestrahlten Zellen 3h nach der Bestrahlung und in allen Blots der bestrahlten Zellen 24h nach der Bestrahlung detektiert werden.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass abweichend von der typischen Verteilung der drei Phosphorylierungsbanden im Western Blot von Cx43 nach UV-A Bestrahlung, teilweise eine weitere Bande detektierbar war. Besonders ausgeprägt war dieser Effekt 24h nach der Bestrahlung.

Tabelle 6.5 Phosphorylierungsmuster von Cx43 nach UV-A Bestrahlung zu unterschiedlichen Postinkubationszeiten

Werte bezogen auf die P0 Bande; Mittelwert \pm SD (n=3-4)

	Phosphorylierungsmuster					
	Postinkubationszeitpunkt					
	3h		6h		24h	
	0 J/cm ²	10 J/cm ²	0 J/cm ²	10 J/cm ²	0 J/cm ²	10 J/cm ²
P3	n.n.	0,3 \pm 0,4	n.n.	n.n.	n.n.	0,5 \pm 0,2
P2	1,5 \pm 1,0	1,0 \pm 0,6	1,8 \pm 0,9	1,3 \pm 0,5	1,3 \pm 0,5	0,7 \pm 0,1
P1	0,8 \pm 0,3	0,8 \pm 0,3	0,9 \pm 0,2	0,8 \pm 0,1	0,8 \pm 0,1	0,6 \pm 0,1
P0	1	1	1	1	1	1

n.n. = nicht nachweisbar (P3 \leq 0,2)

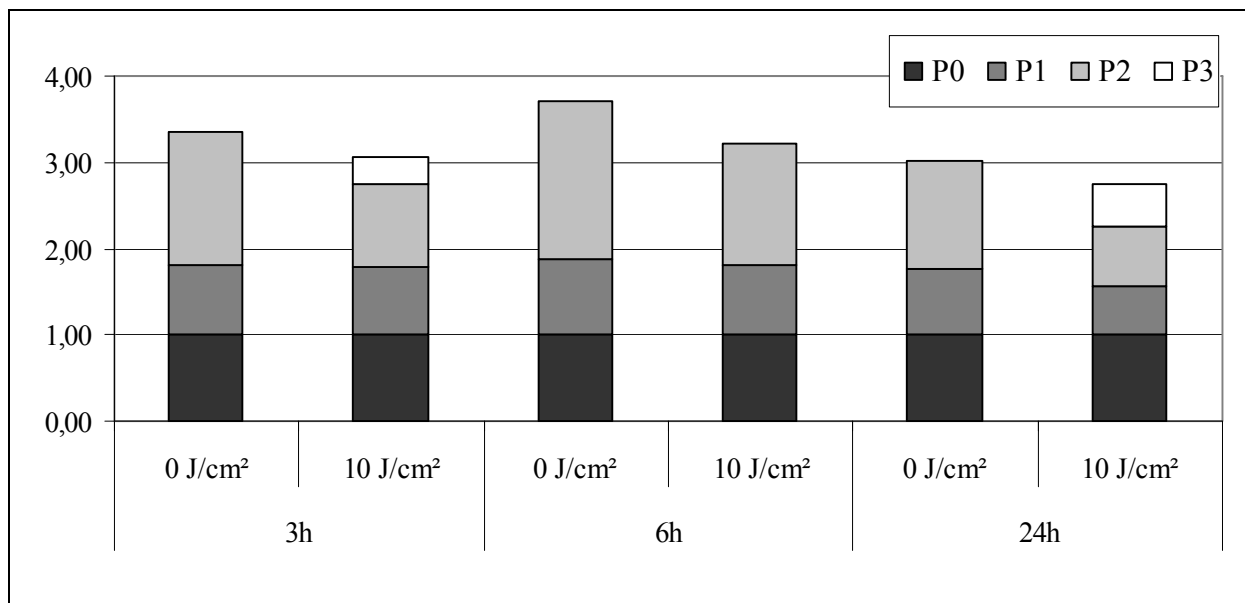


Abb. 6-15 Phosphorylierungsmuster von Connexin 43 (graphische Darstellung)

Veränderungen der Intensitäten der einzelnen Phosphorylierungsbanden zu den verschiedenen Postinkubationszeiten, jeweils bezogen die unphosphorylierte P0 Bande; angegeben Mittelwert (n=3-4)

6.1.5.3 Subzelluläre Lokalisation von Connexin43

Mit Hilfe der Immunofluoreszenzfärbung lässt sich die Lokalisation des Kanalproteins Cx43 untersuchen. Musil et al. (1993) postulierten, dass veränderte Phosphorylierungen von Cx43 eine Delokalisierung des Proteins von der Zellmembran ins Zytoplasma und dadurch eine Abnahme der GJC bewirken [Musil et al. 1993]. Der Western Blot von Cx43 zeigte, dass UV-A Bestrahlung zur Veränderungen der Phosphorylierung des Proteins führt. Ob dies Einfluss auf Lokalisation des Proteins hat, sollte im Folgenden untersucht werden. Die Behandlung der HdF erfolgte gemäß Abschnitt 3.5.1.4, die Immunofluoreszenzfärbung gemäß Abschnitt 3.5.8. Zur besseren Darstellung wurde eine Falschfarbendarstellung gewählt, in der Cx43 grün, die Zellkerne rot dargestellt sind. Jede Versuchsreihe wurde mindestens 3 mal durchgeführt.

In Abbildung 6-16 sind die Ergebnisse unbestrahlter und bestrahlter HdF zu verschiedenen Postinkubationszeiten exemplarisch dargestellt. In den unbestrahlten Zellen waren zu keinem Postinkubationszeitpunkt besondere Auffälligkeiten zu erkennen. Das Protein war überwiegend in der Membran lokalisiert (gelbe Pfeile).

3h nach der Bestrahlung war in den bestrahlten Zellen Cx43 teilweise delokalisiert (blaue Pfeile), d.h. Cx43 war vorhanden, es befand sich jedoch nicht mehr in der Zellmembran. 6h nach der Bestrahlung war kein Unterschied zwischen den unbestrahlten und den bestrahlten Zellen zu erkennen. Das Protein war überwiegend in der Membran lokalisiert. 24h nach der Bestrahlung war das Cx43 Protein der bestrahlten HdF in mehreren Zellen nicht mehr in der Membran lokalisiert. Diese Delokalisation war deutlicher ausgeprägt als bei den bestrahlten Zellen 3h nach der Bestrahlung. Aber auch hier war das immunozytochemische Bild nicht homogen, d.h. nicht in allen HdF war diese Delokalisation von Cx43 zu beobachten. Daher wurden für den 24h Postinkubationszeitpunkt in einer Doppelbestimmung die Zellen auch mit 20 J/cm² UV-A bestrahlt. Das Ergebnis ist in Abbildung 6-17 dargestellt. Die Aufnahmen zeigten bei 0 J/cm² das typische Bild der immunozytochemischen Färbung von Cx43. Das Cx43- Protein ist in den meisten Zellen in der Zellmembran lokalisiert. Bei 20 J/cm² war eine eindeutige Delokalisation des Proteins feststellbar. Auffällig war bei dieser hohen Bestrahlungsdosis, dass größere Connexinmengen am Zellkern lokalisiert waren. Hierbei galt jedoch zu beachten, dass bei dieser Dosis die Zellen aufgrund apoptotischer oder nekrotischer Vorgänge nicht mehr konfluent waren und Gap Junctions zwischen 2 Zellen nicht mehr an jeder Stelle ausgebildet werden konnten.

Aus den immunozytochemischen Untersuchungen lässt sich schlussfolgern, dass 3h und 24h nach der Bestrahlung Cx43 sowohl im Zytoplasma wie auch in der Membran detektierbar ist. Dies

korreliert mit den Beobachtungen im Western Blot, bei denen ebenfalls 3h und 24h nach der Bestrahlung die P3 Bande auftrat. Vermutlich führt die Hyperphosphorylierung des Proteins zu einer Delokalisation aus der Zellmembran.

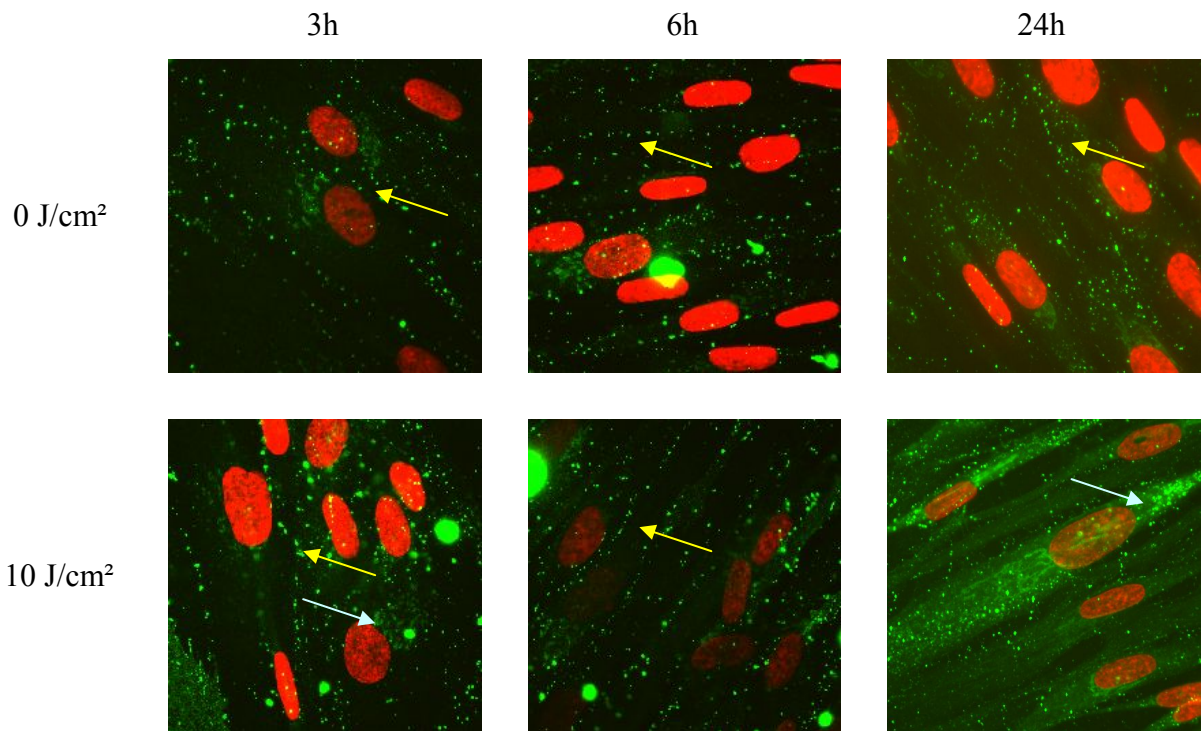


Abb. 6-16 Subzelluläre Verteilung von Cx43 in unbestrahlte und bestrahlte Zellen (UV-A) zu verschiedenen Postinkubationszeiten
 Gelber Pfeil: Cx43 in der Zellmembran
 Blauer Pfeil: Cx43 delokalisiert, bzw. am Kern lokalisiert

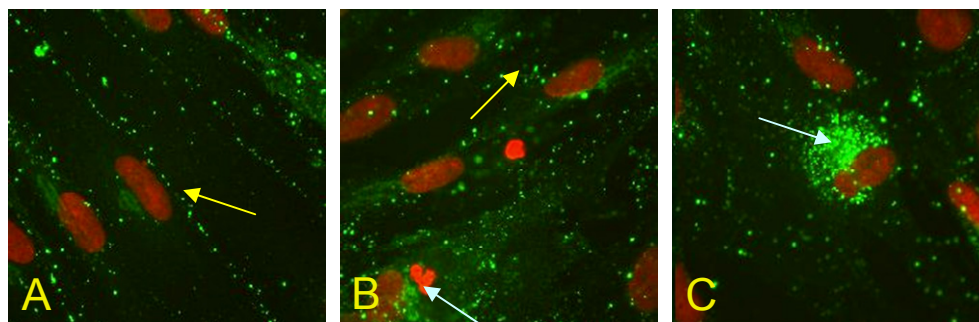


Abb. 6-17 Subzelluläre Verteilung von Cx43 in unbestrahlte und bestrahlte Zellen (UV-A) 24h nach der Bestrahlung
 A) 0 J/cm²; B) 10 J/cm² UV-A; C) 20 J/cm²
 Gelber Pfeil: Cx43 in der Zellmembran
 Blauer Pfeil: Cx43 delokalisiert, bzw. am Kern lokalisiert

6.1.6 Einfluss von UV-A Bestrahlung auf Zell- Zell- Ädhäsionsmoleküle

Die Zusammenlagerung der Connexine in der Zellmembran ist an die Funktionen von Zelladhäsionsmolekülen wie Cadherine und Catenine gekoppelt (Abschnitt 1.4.5).

Im nächsten Versuchsschritt wurde die Expression von N-Cadherin mit der Western Blot Technik und die Lokalisation des Proteins immunozytochemisch untersucht. Zusätzlich wurden Western Blots zur Bestimmung der Expression von β -Catenin durchgeführt.

6.1.6.1 Expression von N-Cadherin und β -Catenin

Um den Einfluss von UV-A Bestrahlung auf die Expression von N-Cadherin und β -Catenin in HdF zu untersuchen, wurde ein Western Blot gemäß Abschnitt 3.5.7 durchgeführt. Zuvor wurden die Zellen gemäß Abschnitt 3.5.1.4 behandelt. Probenlysate wurden 3h, 6h und 24h nach der Bestrahlung gewonnen. Für beide Proteine wurden die Western Blots dreimal wiederholt. Zur besseren Darstellung sind in Abbildung 6-18 (N-Cadherin) und Abbildung 6-19 (β -Catenin) Ausschnitte exemplarischer Blots dargestellt. Der vollständige Blot ist im Anhang aufgeführt.

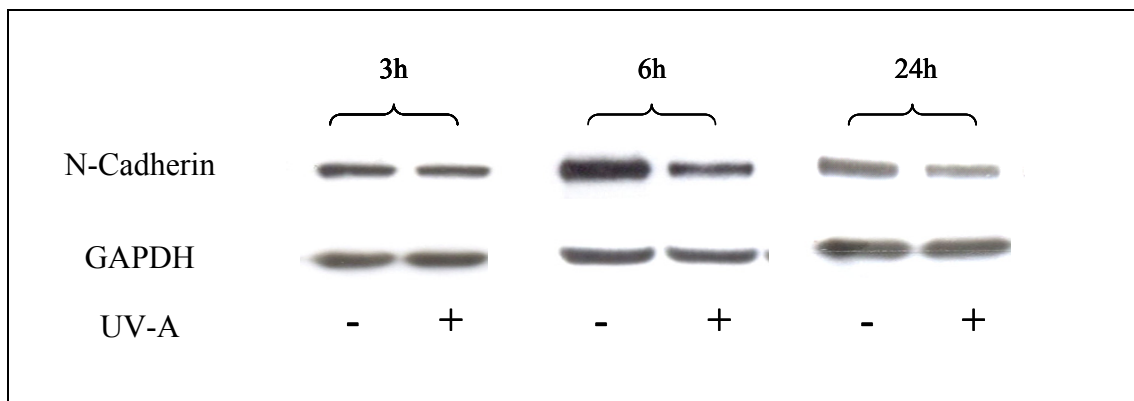


Abb. 6-18 N-Cadherin nach UV-A Bestrahlung (Western Blot)

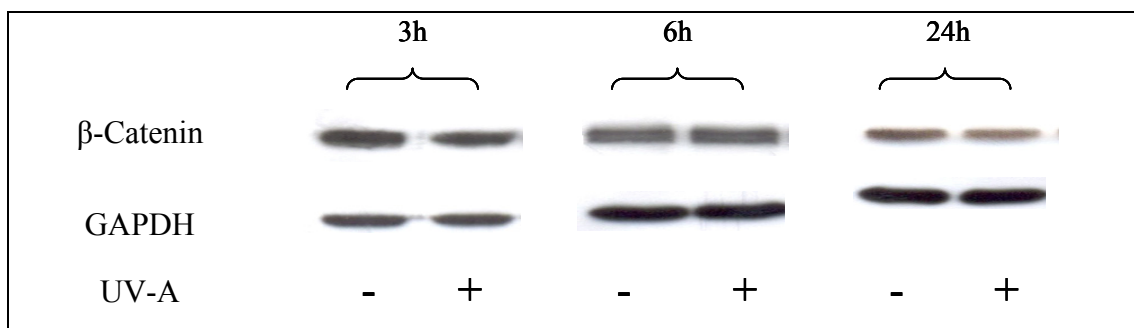


Abb. 6-19 β -Catenin nach UV-A Bestrahlung (Western Blot)

Zur semiquantitativen Bestimmung der Gesamtexpression der Proteine wurden jeweils drei Blots ausgewertet. In Abbildung 6-20 und Abbildung 6-21 sind die Expressionen der Proteine der bestrahlten Zellen bezogen auf die Expressionen der Proteine in den unbestrahlten Zellen zu jeder Postinkubationszeit dargestellt. Die Proteinmengen wurden jeweils auf die Ladekontrolle GAPDH normiert. Auch hier war, wie bei den Western Blots zu Cx43, ein Vergleich der Proteinexpressionen zwischen den verschiedenen Zeitpunkten nicht möglich, da die Zelllysate auf unterschiedliche Gele aufgetragen wurden.

Die Expression von N-Cadherin (Abbildung 6-20) in HdF war nach der Bestrahlung zu allen drei Postinkubationszeiten im Vergleich zu den unbestrahlten Zellen erniedrigt. Zum Postinkubationszeitpunkt 6h war der Effekt am stärksten ausgeprägt ($37\% \pm 17\%$).

Die β -Catenin- Expression nach der Bestrahlung (Abbildung 6-21) war im Vergleich zu den unbestrahlten Zellen nur leicht erniedrigt. Am stärksten war der Effekt zum Postinkubationszeitpunkt 3h ($75\% \pm 23\%$).

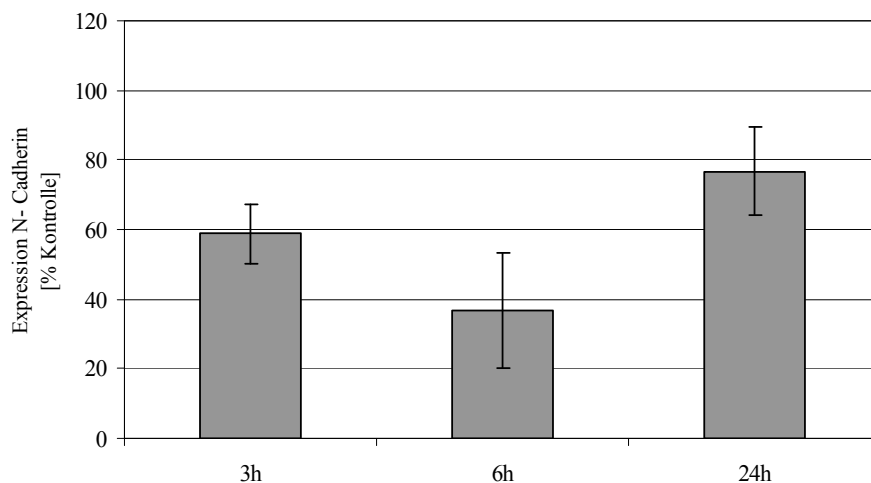


Abb. 6-20 *Expression von N-Cadherin in HdF nach UV-A Bestrahlung*
Gesamtexpression von N-Cadherin in bestrahlten HdF im Verhältnis zur N-Cadherin Expression der unbestrahlten HdF (100%) zu verschiedenen Postinkubationszeiten; Mittelwert \pm SD (n=3)

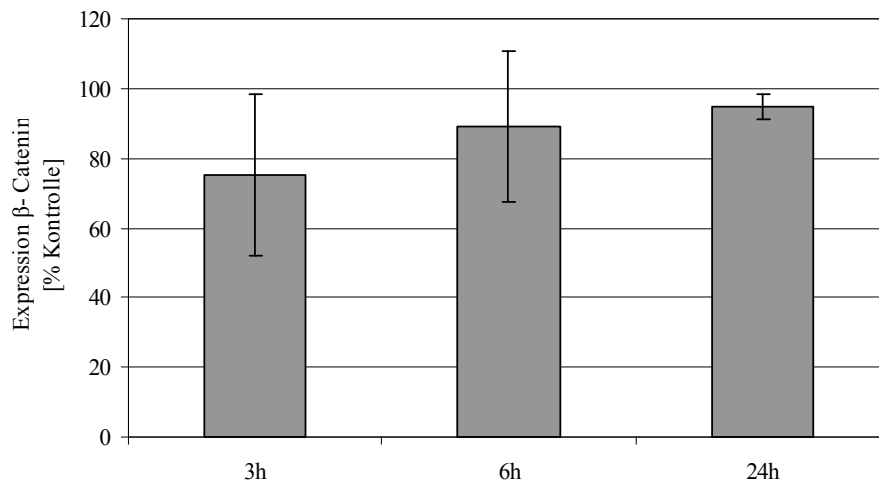


Abb. 6-21 Expression von β -Catenin in HdF nach UV-A Bestrahlung
Gesamtexpression von β -Catenin in bestrahlten HdF im Verhältnis zur β -Catenin Expression der unbestrahlten HdF (100%) zu verschiedenen Postinkubationszeiten; Mittelwert \pm SD (n=3)

6.1.6.2 Einfluss der UV-A Strahlung auf die subzelluläre Lokalisation von N-Cadherin

Im Western Blot zeigte sich, dass die Gesamtexpression von N-Cadherin nach einer Bestrahlung von 10 J/cm² in HdF abnahm. Diese Abnahme sollte sich folglich auch in immunozytochemischen Experimenten wieder finden. Exemplarische Aufnahmen sind in Abbildung 6-22 dargestellt. Jede Versuchsreihe wurde mindestens 2–3mal durchgeführt. Zu allen drei Zeitpunkten konnte in den unbestrahlten Zellen N- Cadherin in der Zellmembran bestimmt werden, deutlich ausgeprägt zum Zeitpunkt 24h.

3h nach der Bestrahlung waren zwischen den unbestrahlten und den bestrahlten Zellen keine Unterschiede in der Lokalisation des Proteins zu erkennen, 6h nach der Bestrahlung konnte in den bestrahlten Zellen kaum N- Cadherin an der Membran detektiert werden. 24h nach der Bestrahlung war der Anteil von N- Cadherin an der Zellmembran im Vergleich zu den unbestrahlten Zellen erniedrigt. Das Ergebnis des Western Blots wurde für den 6h und 24h Wert bestätigt.

Zur genaueren Untersuchung der Lokalisation von N-Cadherin, wurden die Zellen mit UV-A Dosen bis 20 J/cm² bestrahlt und die Lokalisation bei einer Postinkubationszeit von 24h bestimmt. (Abbildung 6-23). Dieser Versuch wurde in einer Doppelbestimmung durchgeführt. Bei 0 J/cm² war N-Cadherin an der Zellmembran der HdF erkennbar, bei 10 J/cm² war die Expression vermindert. Bei 20 J/cm² war kein N-Cadherin- Protein mehr in der Membran detektierbar.

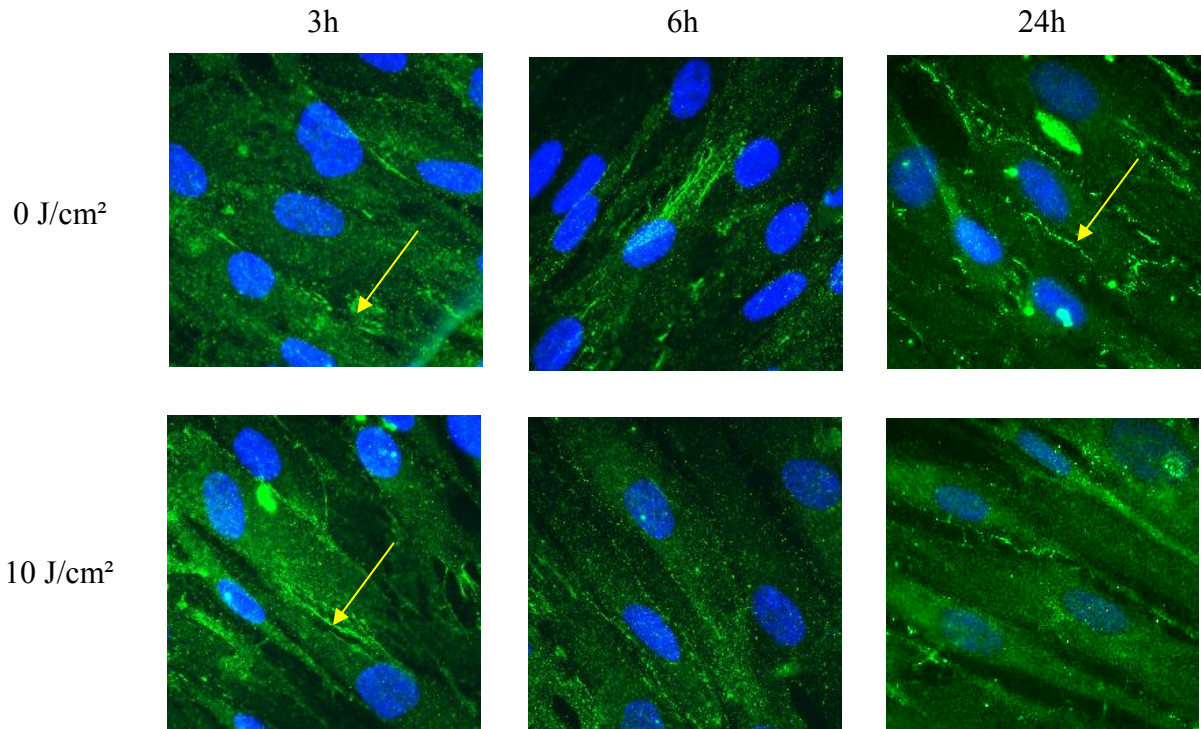


Abb. 6-22 Subzelluläre Verteilung von N-Cadherin in unbestrahlten und bestrahlten Zellen (UV-A) zu verschiedenen Postinkubationszeiten
Gelber Pfeil: N-Cadherin in der Zellmembran

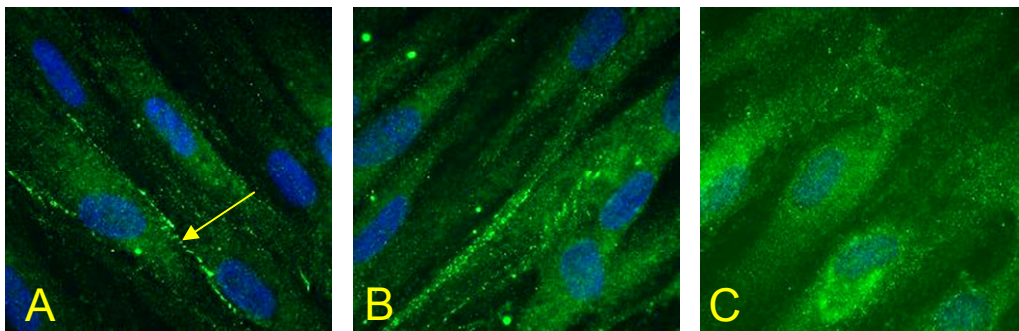


Abb. 6-23 Subzelluläre Verteilung von N-Cadherin in unbestrahlten und bestrahlten Zellen (UV-A) (24h Postinkubation)
A 0 J/cm²; B 10 J/cm² UV-A; C 20J/cm²
Gelber Pfeil: N-Cadherin in der Zellmembran

6.1.7 Einfluss der Carotinoide Astaxanthin und Canthaxanthin auf die GJC, sowie N-Cadherin und β -Catenin Expression nach UV-A Bestrahlung

Sowohl Astaxanthin als auch Canthaxanthin sind Carotinoide mit antioxidativen Potential [Miki et al. 1991, Beutner et al 2000, Palozza et al. 1992]. Beide Carotinoide haben auch Einfluss auf die GJC. Astaxanthin inhibiert die GJC in HdF, Canthaxanthin hingegen stimuliert die GJC. Beide Effekte sind nach dem Entfernen der Carotinoide wieder reversibel [Daubrawa et al. 2006].

Bisher ist nichts bekannt über den Einfluss von Carotinoiden auf die Expression von N-Cadherin in HdF.

Im Folgenden wurde untersucht, inwieweit die Carotinoide Astaxanthin und Canthaxanthin die durch UV-A induzierte Erniedrigung der GJC und N-Cadherin bzw. β -Catenin Expression in HdF beeinflussen.

In Tabelle 6.6 ist die GJC in HdF nach Präinkubation mit den Carotinoiden und UV-A Bestrahlung zu den verschiedenen Postinkubationszeiten aufgeführt. Die Daten der Kontrollzellen sind aus Abschnitt 6.4.6.1 übernommen.

Astaxanthin präinkubierte Zellen zeigen zu allen Postinkubationszeitpunkten eine im Vergleich zu den Kontrollzellen erniedrigte GJC. 24h nach Bestrahlung war der Unterschied zu den Ergebnissen der Kontrollzellen am geringsten. Zu den Postinkubationszeitpunkten 3h und 24h war die GJC der bestrahlten Astaxanthin behandelten Zellen größer als die der unbestrahlten Zellen, der Unterschied war jedoch gering.

Durch die Präinkubation mit Canthaxanthin ist die GJC zu den Postinkubationszeitpunkten 3h und 6h erhöht. Durch Bestrahlung ist die GJC gegenüber den unbestrahlten inkubierten Zellen erniedrigt. Zum Postinkubationszeitpunkt 24h war kein Unterschied der GJC zwischen inkubierten unbestrahlten und den Kontrollzellen feststellbar. Zu diesem Zeitpunkt war die GJC der bestrahlten Canthaxanthin inkubierten Zellen gegenüber den unbestrahlten erniedrigt. Die Differenz betrug 13%. Diese war folglich geringer als die Differenz zwischen der unbestrahlten und bestrahlten Kontrolle, hier betrug die Differenz 41%.

Die Daten spiegeln die bekannten Effekte der Carotinoide wider, Modulationen durch UV-A Bestrahlung waren teilweise zu beobachten.

Tabelle 6.6 Effekt von UV-A Bestrahlung auf GJC in HdF nach Präinkubation mit Astaxanthin und Canthaxanthin
Mittelwerte \pm SD (n=6) angegeben in Prozent bezogen auf die GJC der unbestrahlten Kontrolle (100%)

	UV-A Dosis	GJC (% unbestrahlte Kontrolle)		
		Postinkubation		
		3h	6h	24h
Kontrolle¹	0 J/cm ²	100 \pm 31,1	100 \pm 9,9	100 \pm 10,4
	10 J/cm ²	82,0 \pm 38,4	87,5 \pm 7,6*	59,1 \pm 4,9*
Astaxanthin	0 J/cm ²	13,5 \pm 8,3*	8,4 \pm 8,0*	46,5 \pm 13,2*
	10 J/cm ²	21,2 \pm 15,0* [#]	8,4 \pm 9,4*	57,3 \pm 6,7* [#]
Canthaxanthin	0 J/cm ²	140,6 \pm 28,1*	128,1 \pm 4,8*	102,8 \pm 19,9*
	10 J/cm ²	117,7 \pm 31,0 [#]	112,1 \pm 20,3 [#]	89,5 \pm 17,6

¹ GJC in der unbestrahlten Kontrolle 0J/cm² 3h: 9 \pm 3; 6h: 10 \pm 1; 24h: 9 \pm 1

*statistisch signifikant unterschiedlich zur unbestrahlten Kontrolle (p<0,05)

[#]statistisch signifikant unterschiedlich zu den jeweiligen unbestrahlten inkubierten HdF, (p<0,05)

Da UV-A Bestrahlung der HdF zu einer Veränderung des Phosphorylierungsmusters von Cx43 im Western Blot (Abschnitt 6.1.5.2) und zu einer Delokalisation des Proteins (Abschnitt 6.1.5.3) führte, wurden diese Untersuchungen auch nach Präinkubation mit den Carotinoiden durchgeführt. Die Ergebnisse sind im Anhang aufgeführt.

24h nach der Bestrahlung konnte in den mit Canthaxanthin präinkubierten und bestrahlten Zellen, eine zusätzliche Phosphorylierungsbande (P3) im Western Blot zu Cx43 detektiert werden. In den unbestrahlten mit Canthaxanthin präinkubierten Zellen war diese Bande nicht zu beobachten. In den mit Astaxanthin präinkubierten Zellen, konnte weder in den unbestrahlten noch in den bestrahlten Zellen die P3 Bande detektiert werden. Diese Daten entsprechen den Ergebnissen des Farbstoff- Transfer- Assays. Die immunozytochemischen Untersuchungen zur Cx43- Lokalisation lieferten kein eindeutiges Ergebnis. Über die Expressionen der Proteine Cx43, N-Cadherin und β -Catenin in HdF nach Präinkubation mit den Carotinoiden Astaxanthin und Canthaxanthin und anschließender UV-A Bestrahlung war

ebenfalls keine Aussage möglich. Wie aus den Abbildungen im Anhang ersichtlich, variierten die densitometrisch ermittelten Werte der Western Blots stark.

Es konnte nicht abschließend geklärt werden, ob die Carotinoide Astaxanthin und Canthaxanthin die durch UV-A induzierte Verringerung der GJC in HdF und N-Cadherin bzw. β -Catenin Expression entgegenwirken können.

7 Diskussion: Wirkungen von UV-A Strahlen auf humane dermale Fibroblasten

Im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit wurden biochemische Veränderungen in Hautzellen nach UV-A Bestrahlung mit Hilfe verschiedener Assays untersucht. Dafür eignen sich Zellkulturmodelle mit humanen dermalen Hautfibroblasten (HdF), als der Hauptzelltyp in der Dermis der Haut. UV-A Strahlen dringen (im Gegensatz zu den UV-B Strahlen) bis in diese Hautschicht ein. In den Untersuchungen wurde mit physiologischen UV-A Dosen von maximal 20 J/cm² bestrahlt. Diese Dosen reichten aus um in allen Assays Veränderungen in den Zellen zu bewirken. Angaben über physiologische UV-A Dosen auf der Erdoberfläche sind unterschiedlich und abhängig von vielen Faktoren (Abschnitt 1.4.1). 25 J/cm² entsprechen einer UV-A Menge nach einer 70 minütigen Bestrahlung am 35. nördlichen Breitengrad zur Mittagszeit an einem wolkenlosen Sommertag [Trekli et al. 2002; Frederick et al. 1988]. In einer weiteren Versuchsserie wurde geprüft, inwieweit sich die Effekte während der Bestrahlung durch verschiedene Carotinoide beeinflussen lassen. Die Wirkung der Carotinoide und UV-A Bestrahlung auf HdF war in den verschiedenen Assays unterschiedlich. Es konnten sowohl anti- als auch prooxidative Effekte festgestellt werden. Die Einzelergebnisse werden in den folgenden Abschnitten diskutiert.

7.1 Wirkungen von UV-A Bestrahlung auf humanen dermalen Hautfibroblasten

Nach UV-A Bestrahlung werden vermehrt reaktive Sauerstoffspezies (ROS) gebildet. Dies führt zu Modifikationen oder Zerstörung biologisch wichtiger Makromoleküle. Bei ausgeprägtem Schaden führt dies in der Regel zum Zelltod. Das Verhalten der HdF unter UV-A Bestrahlung wurde in folgenden Assays untersucht: Zellviabilität/-toxizität (SRB-Assay), Bildung von ROS in der lebenden Zelle (Dichlorodihydrofluorescein- Assay), Expression von HO-1, sowie Lokalisation/ Translokation von Nrf2 und die Bildung von Malondialdehyd (MDA). Weiterhin wurden Änderungen der zellulären Kommunikation über Gap Junctions untersucht, auf die gesondert in Abschnitt 7.3 eingegangen wird.

Der SRB-Assay eignet sich, um die Lebensfähigkeit (Viabilität) der Zellen zu untersuchen. Zelltod setzt je nach Zelllinie bei unterschiedlichen UV-A Dosen ein, in den hier verwendeten HdF reichte eine Dosis von 10 J/cm² nicht aus, um eine statistisch signifikante Abnahme der Viabilität zu erreichen. Bei einer Dosis von 20 J/cm² betrug die Abnahme der Zellviabilität 15-

25% (statistisch signifikant unterschiedlich zu den unbestrahlten Zellen). Folglich betrug die zytotoxische UV-A Dosis für die verwendeten Zellen 20 J/cm^2 .

Obwohl bei 10 J/cm^2 noch keine zytotoxischen Effekte messbar waren, konnte ein Anstieg der ROS bei dieser Bestrahlungsdosis in der lebenden Zelle gemessen werden. Die ROS- Bildung nahm bei 20 J/cm^2 weiter zu. Die Messung der ROS erfolgte mit H_2DCF , einer Substanz die durch ROS zum Fluorochrom DCF oxidiert. Dieser Assay ist ein in der Literatur häufig beschriebenes System zur Messung von oxidativem Stress in der lebenden Zelle. Zumeist wird er angewendet bei der Messung von chemisch induziertem oxidativen Stress. Nachteilig in dem hier verwendeten Modellsystem ist, dass der Farbstoff photoinstabil ist [Keller et al. 2004], die direkte Erfassung von ROS während der Bestrahlung ist daher nicht möglich. Der Farbstoff konnte erst nach Bestrahlung auf die Zellen gegeben werden, nur noch stabile ROS wie z.B. Peroxide wurden erfasst. Die Daten zeigen, dass schon physiologische UV-A Dosen ausreichen um analytisch erfassbare Zunahmen an ROS- Gehalten zu erzielen.

Um die Wirkung der kurzlebigen ROS besser zu erfassen, wurde die Menge an exprimierter HO-1 mit Hilfe von Western Blots bestimmt. Die Messung einer erhöhten HO-1 Expression nach UV-A Bestrahlung ist ein allgemein akzeptierter Marker des oxidativen Stresses. Singulett-Sauerstoff induziert den in Abschnitt 1.4.1 beschriebenen Stoffwechselweg, der eine erhöhte Expression des Proteins zur Folge hat [Trekli et al. 2002]. Die Expression von HO-1 kann über längere Zeiträume in der Zelle verfolgt werden. Eine Bestrahlung mit 10 J/cm^2 reichte aus, um eine erhöhte HO-1 Expression in den Zellen zu induzieren. 24h nach der Bestrahlung war die höchste Proteinmenge feststellbar. Dies zeigt, dass die Expression des Proteins zeitversetzt zur eigentlichen Bestrahlung eintritt. Trekli et al. erhielten ähnliche Ergebnisse, hier wurde eine entsprechende Erhöhung der HO-1 mRNA-Expression in Hautfibroblasten gezeigt [Trekli et al. 2002]. In einer weiteren Untersuchung zu Nrf2, Transkriptionsfaktor von HO-1, zeigte sich, dass dieser nach Bestrahlung vermehrt im Kern lokalisiert war. Die Translokation von Nrf2 in den Zellkern gehört zu den initialen Schritten des HO-1 Signalweges. Die Translokation erfolgt vermutlich schon während oder unmittelbar nach der Bestrahlung. Aber auch zu den Messzeitpunkten 3h, 6h und 24h konnte noch Nrf2 in den bestrahlten Zellen am Kern detektiert werden.

Unter ROS Einwirkung beobachtet man die Lipidperoxidation der in den Zellmembranen lokalisierten ungesättigten Fettsäuren. Bei dieser Reaktion entsteht u.a. MDA, welcher als Marker für diesen Prozess dient. Die Konzentration an MDA in den verwendeten Zellen betrug nach der Bestrahlung durchschnittlich $0,65 \text{ nmol/mg Protein}$. Dieser Wert entspricht den in der Literatur angegebenen Werten. So untersuchte Moliere et al. verschiedene

Fibroblastenzelllinien nach einer Bestrahlung von 18 J/cm² UV-A, die Werte schwankten zwischen 0,4 – 1,15 nmol/mg Protein [Moliere et al. 1991].

Die Untersuchungen zeigen, dass physiologische UV-A Dosen von 10-20 J/cm² bei den gewählten HdF in der Zellkultur ausreichen um apoptotische oder nekrotische Prozesse auszulösen. 10 J/cm² verursachen primäre Zellschäden. Zusätzlich zeigte der Vergleich mit den Literaturdaten, dass die gewählten Zellen nicht ungewöhnlich auf die UV-A Exposition reagierten.

7.2 Carotinoide und UV-A Strahlung: Untersuchungen an humanen Hautfibroblasten

Die photoprotektiven Eigenschaften des acyclischen Lycopin, β -Carotin und den Xanthophylle Canthaxanthin und Astaxanthin wurden in dieser Arbeit untersucht. Carotinoide sind als Antioxidantien, welche in der Lage sind ROS zu deaktivieren, die durch Bestrahlung vermehrt in der Zelle gebildet werden. Die Mechanismen sind in Abschnitt 1.4.4 dargestellt. β -Carotin war in der gewählten Konzentration zytotoxisch. Lycopin wirkte toxisch in Kombination mit UV-A Bestrahlung von 10 J/cm². Die ROS Messung zeigte, dass im Gegensatz zu den Kontrollzellen auch vermehrt Peroxide gebildet wurden. Man kann davon ausgehen, dass Lycopin in einer Konzentration von 10 μ mol/l prooxidativ wirkt. In einem Fibroblasten Zellkultursystem wurde gezeigt, dass bei einer Lycopinkonzentration von 0,15 nmol/mg Protein nach UV-B Bestrahlung prooxidative Effekte bezüglich MDA Entstehung feststellbar waren [Eichler et al. 2002].

Astaxanthin zeigte gute antioxidative Eigenschaften in im Zellviabilitätsassay. Die Viabilität war auch nach 20 J/cm² statistisch nicht signifikant erniedrigt im Vergleich zu den unbestrahlten Kontrollzellen. Ebenfalls konnten antioxidative Effekte in der Expression von HO-1 festgestellt werden, denn die HO-1 Expression war um 35% erniedrigt gegenüber den bestrahlten Kontrollzellen (10 J/cm²). Konträr zu diesen Ergebnissen war Astaxanthin im Lipidperoxidationsassay prooxidativ.

Die Daten zeigen, dass in dem gewählten Zellkulturmodell die Carotinoide β -Carotin, Lycopin, Astaxanthin und Canthaxanthin kaum protektive Wirkungen ausüben. Dies steht im Gegensatz zu zahlreichen Interventionsstudien. So konnten die photoprotektiven Wirkungen von β -Carotin und Lycopin in zahlreichen Humanstudien belegt werden [Heinrich et al. 2003b, Stahl et al. 2000, Mathew-Roth et al. 1972]. Schwerpunkt der Studien war die Auswirkung der Supplementierung mit Carotinoiden auf die Erythembildung nach UV-Exposition. Diese verminderten sich durch die Supplementierung. Stoffwechselwege, wie sie

in dieser Zellkulturstudie untersucht wurden, konnten nicht betrachtet werden. Im Hinblick auf die protektiven Wirkungen von Carotinoide können Zellkulturstudien zwar Hinweise liefern, Humanstudien sind jedoch unumgänglich, um die Wirkungen richtig einschätzen zu können.

In den durchgeführten Zellkulturstudien konnten teilweise prooxidative Effekte der Carotinoide festgestellt werden. So induzierte Lycopin schon bei einer Bestrahlung von 10 J/cm² UV-A Vorgänge, die zum Zelltod führten. Prooxidative Eigenschaften von Carotinoiden sind bekannt. Das konjugierte Doppelbindungssystem, welches mitverantwortlich für die antioxidativen Eigenschaften der Carotinoide ist, ist sensitiv für chemische Modifikationen. Die durch Oxidation entstehenden Produkte können z.B. zur vermehrten Lipidperoxidation führen [Wang 2004]. Anti- oder prooxidative Wirkungen sind abhängig von Konzentration, chemischer Struktur der Carotinoide, sowie der Lokalisation in der Zellmembran, äußeren Faktoren wie Sauerstoffpartialdruck, dem Redoxstatus der Zelle und möglichen Interaktionen mit anderen redoxaktiven Verbindungen [Palozza et al. 2004]. In den durchgeführten Zellkulturstudien wurden hohe Konzentrationen der Carotinoide eingesetzt (10 µmol/l). Im Vergleich zu dem in der Haut natürlich vorkommenden Carotinoidgehalt (0,1-0,2 pmol/mg feuchte Haut) [Sies et al. 2004]. Die hohe Konzentration kann Ursache für die prooxidativen Effekte sein.

7.3 Zell- Zell- Kommunikation über Gap Junctions (GJC) nach UV-A Bestrahlung

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass UV-A Strahlen (Dosis 10 J/cm²) die GJC in humanen dermalen Fibroblasten verringert. Zytotoxische Effekte waren nicht ursächlich für die Hemmung, da die verwendete Dosis, wie im SRB-Assay gezeigt, nicht toxisch auf die Zellen wirkte (Abschnitt 6.1.1.1). Im vorherigen Abschnitt konnte aber auch gezeigt werden, dass eine geringe wenn auch nicht toxische Dosis ausreicht, um im gewählten Zellmodell Veränderungen der Signalwege zu bewirken. Eine verringerte GJC war in den Zellen zu allen drei gewählten Zeitpunkten feststellbar, statistisch signifikant nach 6h und 24h. 24h nach der Bestrahlung war der Unterschied zwischen unbestrahlten und bestrahlten Zellen am größten und betrug 49%. Nur wenige Studien haben sich bisher mit dem Zusammenhang zwischen UV-A Bestrahlung und der GJC beschäftigt. Nicht im HdF- System wurde dieser Effekt in der Arbeit von Banrud et al. gezeigt. Sie bestrahlten V79 Hamsterfibroblasten mit 33,5 J/cm² UV-A und stellten eine Verringerung der GJC fest. In diesem Modellsystem war der Effekt 4h nach der Bestrahlung am größten. Unmittelbar nach der Bestrahlung war jedoch eine

verstärkte GJC im Vergleich zu den unbestrahlten Zellen festzustellen [Banrud et al. 1994]. Provost et al. zeigten in humanen Keratinozyten bei einer Bestrahlungsdosis von 10 J/cm² UV-A einen Rückgang der GJC. Hier war 30 Minuten nach der Bestrahlung die Differenz zwischen den unbestrahlten und bestrahlten Zellen am größten. 8h nach der Bestrahlung war kein Unterschied zwischen den unbestrahlten und bestrahlten Zellen feststellbar. Interessanterweise zeigte diese Arbeit wieder eine verringerte GJC 24h nach der Bestrahlung. Der Effekt wurde in der Veröffentlichung jedoch nicht weiter untersucht bzw. diskutiert, da in diesem Modellsystem auch die unbestrahlten Zellen eine verminderte Zell-Zell-Kommunikation zu diesem Zeitpunkt aufwiesen [Provost et al. 2002].

Übereinstimmend mit den Literaturdaten lässt sich schlussfolgern, dass die GJC nach UV-A Bestrahlung vermindert ist. Dieser Effekt setzt zeitversetzt ein. Provost et al. beschreiben zusätzlich, dass der Effekt im Keratinozytenmodell reversibel ist. Dies war im Fibroblastenmodellsystem innerhalb von 24h nach Bestrahlung nicht festzustellen. Zum Zeitpunkt 24h war die Differenz der GJC zwischen unbestrahlten und bestrahlten Zellen am größten. Da die Hemmung der GJC nicht unmittelbar nach Bestrahlung einsetzt, kann man vermuten, dass nicht das Protein Cx43 selbst degradiert, sondern Regelmechanismen des Kanalschlusses, des Ein- und Abbaus der Connexone oder die Expression von Cx43 betroffen sind.

Western Blots zeigten, dass die Gesamtexpression des Proteins Cx43 durch UV-A Strahlen nicht betroffen war, eine Genaktivierung entsprechend ausgeschlossen werden kann. Auch in der Arbeit von Provost et al. zeigte sich in den Western Blots keine veränderte Expression des Proteins [Provost et al. 2002]. Die Verringerung der GJC korrelierte mit einer Veränderung im Phosphorylierungsmusters der Cx43 Proteine. Unbehandelt ergibt sich für Cx43 ein typisches Phosphorylierungsmuster, das aus 3 gleichmäßig verteilten Banden (P0, P1, P2). Nach UV-A Bestrahlung tritt teilweise eine P3 Bande auf (höherer Phosphorylierungsgrad). Untersuchungen zur Lokalisation von Cx43 zeigten, dass 3h und insbesondere 24h nach Bestrahlung das Protein auch im Zytoplasma lokalisiert ist. Zu den gleichen Zeitpunkten konnte in den Western Blots der bestrahlten Zellen die P3 Bande detektiert werden, ebenfalls mit ausgeprägten Effekt 24h nach der Bestrahlung. Es besteht vermutlich ein Zusammenhang zwischen der Hyperphosphorylierung und der Delokalisation von der Membran ins Zytoplasma. Dies wiederum führt zur verminderten funktionierenden GJC. Immunocytochemische Untersuchungen in der Arbeit von Provost et al. zeigten ebenfalls eine Delokalisation des Proteins, insbesondere 2h nach Bestrahlung. Eine Hyperphosphorylierung von Cx43 wurde nicht festgestellt [Provost et al. 2002].

Phosphorylierungen des Kanalproteins Cx43 sind von entscheidender Bedeutung für deren Ein- und Abbau aus der Membran und spielen eine Rolle beim Öffnungs- und Schließmechanismus eingebauter Proteine [Lampe 2004]. Tumorpromotoren wie z.B. TPA hemmen die GJC durch Phosphorylierung, was zur Ausbildung der höher phosphorylierten P3 Bande führt. Unter Einfluss von TPA nimmt die Menge an unphosphorylierten Cx43 (P0 Bande) ab [Matesic 1994]. Verursacht wird diese Hyperphosphorylierung durch eine verstärkte Protein- Kinase C (PKC) Aktivität und vermutlich auch durch eine verstärkte MAPK-Aktivität. Immunozytochemische Untersuchungen an TPA behandelten Rattenleberepithelzellen zeigen eine Delokalisation des Proteins aus der Zellmembran [Ale-Agha 2003, Dissertation]. Die Aktivität der PKC wird durch UV-A Strahlen induziert. Matsui et al. vermuten jedoch, dass der Aktivierung der PKC durch UV-A ein anderer Mechanismus zugrunde liegt, als durch die Behandlung mit TPA [Matsui et al. 1990]. Von der PKC ist bekannt, dass sie Cx43 an Serinresten phosphoryliert, bekannt ist die Phosphorylierung an S368 und S372, aber auch die Phosphorylierung an anderen Serinen des Cx43 sind nicht auszuschließen [Lampe et al. 2000, Lampe et al. 2004, Saez 1997]. In verschiedenen Fibroblastenzelltypen konnte die Hemmung der GJC mit der Aktivität von drei Isoformen der PKC in Verbindung gebracht werden, PKC α , β und γ [Cruciani et al. 2001]. Lin et al. untersuchten den Einfluss von H₂O₂ auf die PKC und Cx43 in Kaninchenlinsenzellen und Neuronenzellen. In der Arbeit konnte auch eine Aktivierung der PKC γ und infolge eine Phosphorylierung der Serinreste von Cx43 festgestellt werden, was zu einer Inhibierung der GJC führt. Eine Veränderung der Gesamtexpression des Proteins konnte die Arbeitsgruppe ebenfalls nicht feststellen [Lin et al. 2004].

Somit ist zu vermuten, dass in dem gewählten Modellsystem, durch UV-A Bestrahlung Protein- Kinasen abhängige Signalwege angeregt werden was zu einer Phosphorylierung von Cx43 an Serinresten führt. Dies wiederum inhibiert die GJC. Durch die moderate Bestrahlung mit nur 10 J/cm² ist der Effekt nicht so deutlich ausgeprägt, so dass das Vorhandensein der unphosphorylierten Isoform neben der hyperphosphorylierten Form erklärbar ist. In den Versuchen von Provost konnte in den Keratinozyten eine verstärkte Aktivität von PKC im Zytosol der Zellen gemessen werden [Provost et al 2002].

Aber auch eine verstärkte MAPK-Aktivität (mitogen activated protein kinase) nach UV-A Bestrahlung ist zu berücksichtigen. Zahlreiche Stimuli können MAPK-abhängige Signalwege aktivieren, die wiederum zu einer Cx43 Phosphorylierung führen [Lampe 2004]. Auch hier wirkt z.B. TPA durch Aktivierung der ERK1/2 (extrazellulär regulierte Kinase 1 und 2) vermittelten Phosphorylierung von Cx43. ERK 1/2 gehören zur Klasse der MAPK [Ruch et

al. 2001]. In mit EGF (epidermal growth factor) behandelten Zellen wird Cx43 durch eine EGF- Rezeptor vermittelte Aktivierung des MAPK- Signalweges phosphoryliert und infolge die GJC inhibiert. Die EGF- Wirkung ist jedoch zelltypabhängig [Kanemitsu 1993; Houssain 2000]. Menadion hemmt die GJC in Rattenleberepithelzellen, indem es die EGF- Rezeptor vermittelte MAPK- Aktivität erhöht was zur Phosphorylierung von Cx43 führt [Klotz et al. 2002]. In einer Arbeit von Bellei et al. wird ebenfalls am Keratinozytenzellmodell beschrieben, dass nach UV-A Bestrahlung (10 J/cm²) die p38 MAPK aktiviert wurde, was ebenfalls zur Verringerung der GJC führt [Bellei et al. 2007]. Die Arbeiten geben Hinweise, dass unter UV-A Bestrahlung auch eine durch MAPK katalysierte Phosphorylierung von Cx43 zur Verminderung der GJC führen kann. Endgültig konnte bisher nicht geklärt werden, welche Kinasen für die Hyperphosphorylierung des Cx43 Proteins in Fibroblasten nach UV-A Bestrahlung verantwortlich sind.

Die vorgestellten Daten zeigen, dass Regelmechanismen, wie die Expression und Funktion des Cx43- Proteins von UV-A Strahlen beeinflusst werden, auch wenn die gewählte Dosis moderat und im physiologischen Bereich ist. Hautzellen sind direkt der Sonnenbestrahlung ausgesetzt. Zwischen der Entstehung von verschiedenen Hauttumoren und UV-Belastung besteht eine Korrelation. Ebenso zeigen Studien, dass bei der Tumorentstehung die GJC reduziert oder inhibiert ist [Bertram 2004, Trosko 2001]. Es wird vermutet, dass es für die Tumorzelle bedeutsam ist, sich von Signalen (z.B. Wachstumskontrollsignalen) der sie umgebenden Zellen zu isolieren und sich damit der Wachstumskontrolle zu entziehen [Vine 2002]. Der Mechanismus der procarcinogenen Wirkung der UV-A Strahlen ist noch nicht vollständig aufgeklärt, eine verringerte GJC nach UV-A Bestrahlung, wie sie in dieser Arbeit festgestellt wurde, kann in einem ursächlichen Zusammenhang stehen.

In der vorliegenden Arbeit konnte erstmalig gezeigt werden, dass sich nach UV-A Bestrahlung die Expression des Adhäsionsproteins N-Cadherin verringert. N-Cadherine sind für den Einbau und die Regulation der Connexinfunktion in den Zellmembranen der Fibroblasten wichtig (Abschnitt 1.4.5). Western Blots und immunozytochemische Untersuchungen zur Expression und Lokalisation des Proteins wurden durchgeführt. Die Untersuchungen zeigten, dass nach UV-A Bestrahlung die Expression des Proteins abnahm. Die immunozytochemischen Untersuchungen zeigen ebenfalls eine Abnahme der Gesamtexpression, teilweise auch eine verstärkte Lokalisation des Proteins am Kern. Nach Bestrahlung mit 20 J/cm² ist eine vollständige Delokalisation des Proteins aus der Membran und eine verstärkte Lokalisation am Zellkern zu beobachten. Cadherine sind Transmembranproteine, deren extrazelluläre Regionen Zellen miteinander verbinden (siehe

Abschnitt 1.4.5). Intrazellulär sind Cadherine mit β - oder γ -Cateninen assoziiert, welche unter Beteiligung von α -Catenin mit dem Actinzytoskelett verbunden sind. Western Blots zu β -Catenin weisen darauf hin, dass sich die Expression des Proteins nach UV-A Bestrahlung in den Fibroblasten nur geringfügig verringert. Cadherine und Catenine sind nicht nur Strukturproteine, sie sind auch an Zellsignalwegen beteiligt. Eine Studie von Soler et al. hat gezeigt, dass β -Catenin im direkten Zusammenhang mit der Wachstumsrate der Fibroblasten steht [Soler et al. 1998]. Von den möglichen Cadherin/ Catenin Komplexen sind die E-Cadherin Verbindungen am besten untersucht. Es konnte nachgewiesen werden, dass chemisch induzierter oxidativer Stress (durch Diamid und tert-Buthylhydroperoxid) zu einem Abbau des E-Cadherin/ β -Catenin Komplex in Mäuseleberzellen führt [Parrish et al. 1999]. Diese Zellen exprimieren neben E-Cadherin auch N-Cadherin, jedoch nur der E-Cadherin/ β -Catenin- Komplex reagiert sensibel auf oxidativen Stress, unterschiedliche Stabilitäten der verschiedenen Komplexe wurden angenommen [Schmelz et al. 2001]. Eine Reduktion der Gesamtexpression von E-Cadherin oder β -Catenin konnte in beiden Arbeiten nicht festgestellt werden. Der durch die UV-A Bestrahlung induzierte oxidative Stress kann in den untersuchten Fibroblasten einen ähnlichen Effekt auslösen, wodurch es zu der beobachteten Delokalisation kommt.

Eine Abnahme der GJC im Zusammenhang mit dem Abbau von Cadherin/ Catenin-Komplexen ist ebenfalls beschrieben. So hat TPA ebenfalls Einfluss auf den E- Cadherin/ β -Catenin- Komplex. In Mausepidermiszellen und primären Keratinozyten konnte *in-vitro* nach TPA Behandlung nachgewiesen werden, dass sich der Anteil von E-Cadherin in der Zellmembran verringert und der Anteil am Zellkern zunimmt. Unter Behandlung mit Benzoylperoxid nahm der Gesamtanteil von E-Cadherin ebenfalls ab, gleichzeitig wurde bei beiden Behandlungen eine verminderte GJC in den Zellen festgestellt. Phosphorylierungen von β -Catenin, katalysiert durch Kinasen, führen hier vermutlich zum Abbau des Komplexes [Jansen et al. 1996]. Die Delokalisation von N-Cadherin kann somit zusätzlich zur Verminderung der GJC in den Fibroblasten nach UV-A Bestrahlung beitragen.

Eine Abnahme der Gesamtexpression von Cadherinen aufgrund von äußeren Faktoren ist nur in wenigen Studien beschrieben. So vermindert Epigallocatechin-3-gallat die Expression von N-Cadherin in Blasenkarzinomzellen. In diesem Fall ein positiver Effekt, da N-Cadherin in diesen Zellen erst die Invasion und Migration der Krebszellen ermöglicht [Rieger- Christ et al. 2007]. Auch in Melanomzellen wird verstärkt N-Cadherin exprimiert, während gesunde Melanozyten E-Cadherin exprimieren. Der Wechsel bewirkt vermutlich, dass der Kontakt zu den E- Cadherin exprimierenden Keratinozyten verloren geht, und es zur Migration und

Invasion der Karzinomzellen kommt. Zellkontakte zu Fibroblasten und vaskulären Endothelzellen werden ausgebildet. Gleichzeitig werden Gap Junctions zwischen den Melanomzellen und den Fibroblasten aufgebaut [Haass et al. 2003; Jamahl et al. 2002]. Dieser Vorgang begünstigt die Tumorbildung. Welche Rolle die durch UV-A induzierte Verringerung von N-Cadherin in Fibroblasten bei diesem Prozess hat, kann nicht abschließend geklärt werden. Denkbar ist jedoch, dass ein direkter Zusammenhang zwischen verminderter GJC und verringerter N-Cadherin Expression besteht.

Weiterhin wurde untersucht, ob die Carotinoide Astaxanthin und Canthaxanthin als Antioxidantien der Verringerung der GJC und Abnahme der N-Cadherin Expression entgegenwirken. Die Ergebnisse des Farbstofftransfer- Assays zeigten, dass die Inkubation mit den Carotinoiden nur geringen Einfluss auf die Kommunikation nach der Bestrahlung hatte. Nur bei den Astaxanthin inkubierten Zellen, zeigte sich 24h nach der Bestrahlung keine weitere Inhibierung aufgrund der Bestrahlung. Störend wirken direkte Effekte der Carotinoide auf die GJC. So ist von Astaxanthin bekannt, dass diese Substanz die GJC reversibel hemmt, Canthaxanthin dagegen stimuliert die GJC [Daubrawa et al. 2005]. Auch die Messungen zur Expression von N-Cadherin lieferten kein eindeutiges Ergebnis zur möglichen protektiven Wirkung der beiden Carotinoide in diesem System.

Zusammenfassung

Die Haut ist die äußere Barriere des Organismus und wie jedes andere Organ auf eine ausgewogene Versorgung mit Makro- und Mikronährstoffen angewiesen. Mit zunehmendem Alter ändern sich ihre Struktur und Funktionsfähigkeit. Mittels optimierter Zufuhr ausgewählter Nahrungskomponenten wird angestrebt strukturelle Parameter zu verbessern und dermale Funktionen zu erhalten oder wiederherzustellen. Dazu werden zahlreiche Nahrungsergänzungsmittel und funktionelle Lebensmittel angeboten, deren Prüfung auf Wirksamkeit unabdingbar ist. Im ersten Teil der Arbeit wurden *in-vivo* die Effekte von Pflanzenölen, reich an langkettigen ungesättigten Fettsäuren, untersucht. In einer placebokontrollierten Interventionsstudie über 12 Wochen wurden die Wirkungen von Leinsamenöl (reich an α -Linolensäure) und Borretschöl (reich an γ -Linolensäure) verglichen. Untersuchungsparameter waren Oberflächenstruktur, Barrierefunktion (Hydratation, transepidermaler Wasserverlust) und Sensitivität der Haut. Zum Nachweis der Exposition wurde das Fettsäuremuster des Blutes analysiert. Im Plasma war eine Zunahme der für die Öle charakteristischen Fettsäuren nachweisbar. Verbesserungen der Hautqualität konnten nach Supplementierung festgestellt werden. Unter Gabe von Leinsamenöl besserten sich Rauigkeit, Schuppigkeit (Parameter der Oberflächenstruktur), Hydratation, Barrierefunktion und Sensitivität. Mit der Supplementierung von Borretschöl veränderten sich die gleichen Parameter, die Effekte waren aber geringer. Die Ergebnisse wurden mit einer Interventionsstudie verglichen, in der Leinsamenöl und Distelöl (reich an Linolsäure) appliziert wurde. Leinsamenöl zeigte die gleichen Effekte, während Distelölsupplementierung nur geringe Verbesserungen in Rauigkeit und Feuchtigkeit bewirkte. Zusammenfassend lässt sich folgende Rangfolge in der Wirksamkeit der Öle aufstellen: Leinsamenöl > Borretschöl > Distelöl.

Photooxidative Schädigungen in Dermis und Epidermis korrelieren mit der Entstehung von Hauterkrankungen und vorzeitiger Hautalterung. Biochemische Veränderungen in humanen dermalen Fibroblasten (HdF), Hauptzellen der Dermis, waren Gegenstand des zweiten Teils der Arbeit. Diese Studien wurden *in-vitro* durchgeführt. Schwerpunkt waren Untersuchungen zum Einfluss von UV-A Licht auf die zelluläre Kommunikation über Gap Junctions (GJC). Gap Junctions ermöglichen den interzellulären Austausch von niedermolekularen Verbindungen zur Signaltransduktion und Nährstoffversorgung. Es besteht ein direkter Zusammenhang zwischen Hautfunktionen und GJC. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass nach Bestrahlung mit 10 J/cm² die GJC in Fibroblasten reduziert war. Der

Effekt korrelierte mit einer Änderung im Phosphorylierungsmuster des Kanalproteins, dem Connexin 43 und nachfolgender Delokalisation des Proteins aus der Membran. Vermindert war auch die Expression des Adhäsionsproteins N-Cadherin. Adhäsionsproteine spielen eine Rolle bei der Ausbildung von Zellkomponenten, so dass vermutlich ein Zusammenhang zwischen der Abnahme der GJC und der verminderten Expression von N-Cadherin besteht.

Weiterhin wurden in diesem Zusammenhang protektive Effekte von Carotinoiden untersucht. Von den untersuchten Carotinoiden (Astaxanthin, Canthaxanthin, β -Carotin und Lycopin) schützte Astaxanthin vor der UV-A Bestrahlung induzierten Zelltoxizität, Canthaxanthin war weniger wirksam. Im DCF Assay (antioxidative Wirkung) waren Astaxanthin, Canthaxanthin und β -Carotin wenig aktiv, Lycopin zeigte prooxidative Wirkungen. UV-A Bestrahlung induzierte die Expressionen von Hämoxxygenase-1 (HO-1) in HdF. Mit Astaxanthin präinkubierte Zellen exprimierten weniger HO-1, die Substanz wirkte protektiv. Keine Effekte wurden mit Canthaxanthin erzielt.

Eine Verringerung der MDA-Bildung nach Bestrahlung durch die Präinkubation mit Carotinoiden ließ sich nicht feststellen. Astaxanthin wirkte in diesem Modellsystem prooxidativ.

Es konnte nicht abschließend geklärt werden, ob die Carotinoide Astaxanthin und Canthaxanthin UV-A induzierten Veränderungen der GJC sowie der N-Cadherin Expression in HdF entgegenwirken können.

Summary

The skin is the outer barrier of the organism and requires a balanced supply with micro- and macronutrients for optimal function. With increasing age, structure and function of the skin is changing. An optimized intake of selected nutrients may improve structural parameters maintain or restore dermal functions. Numerous food supplements and functional foods are on the market; however, proof of function is often lacking. In the first part of this work the effect of plant oils, rich in polyunsaturated fatty acids, were determined *in-vivo* over a period of 12 weeks. The effects of linseed oil (rich in α -linolenic acid) and borage oil (rich in γ -linolenic acid) were compared in a placebo controlled intervention study. Surface structure, barrier function (hydration, transepidermal water loss) and skin sensitivity were analyzed. Fatty acid pattern of the blood was analyzed to prove the absorption of the fatty acids. Increases of the characteristic fatty acids were detected. Supplementation with fatty acids was associated with an improved skin quality. During administering with linseed oil, skin roughness, scaling (parameters of skin surface structure), hydration, barrier function and sensitivity were enhanced. Under supplementation with borage oil the same parameters improved, but effects were less pronounced. These results were compared with an intervention study, in which linseed oil and safflower oil (rich in linoleic acid) were applied. Linseed oil showed the same effects, whereas the supplementation of safflower oil caused in only minor improvements in roughness and hydration. Thus, the sequence of efficacy was: Linseed oil >borage oil>safflower oil.

Photooxidative damage of the dermis and epidermis is correlated with skin diseases and premature skin ageing. Biochemical changes in human dermal fibroblasts (HdF), which are the main cell type of the dermis, were investigated in the second part of the work. The studies were performed *in-vitro*. Focus was on the influence of UV-A light on cellular communication via gap junctions (GJC). GJC allows intercellular exchange of low molecular compounds relevant for signal transduction and nutrition. There is a direct correlation between skin function GJC. The present work has shown that after irradiation with 10 J/cm², GJC of the fibroblasts is reduced. The effect was correlated with a change in the phosphorylation pattern of the major channel protein connexin 43 followed by delocalisation of the protein of the membrane. Expression of the adhesions protein N-cadherin was also diminished. Adhesions proteins play a role in the development of cell contact, thus there may be a relationship between GJC and expression of N-cadherin.

In this context also protective effects of carotenoids were determined. Of the tested carotenoids (astaxanthin, canthaxanthin, β -carotin and lycopin) astaxanthin was protective against UV-A induced cell- toxicity, canthaxanthin was less effective. In the DCF-assay, which proves antioxidant activity, astaxanthin, canthaxanthin and β -carotin were less active, lycopin showed prooxidative effects. UV-A irradiation induced the expression of hemeoxygenase-1 (HO-1). Astaxanthin incubated cells expressed less HO-1, pointing to antioxidative effects. No effects were achieved with canthaxanthin.

MDA-production wasn't diminished after irradiation in the presence of carotenoids. Astaxanthin was prooxidative in this system.

It couldn't be clarified finally, if the carotenoids astaxanthin or canthaxanthin are able to modulate UV-A effects on GJC or N-Cadherin expression in HdF.

Literatur

- ABDELMOHSEN K, Stuhlmann D, Daubrawa F, Klotz L-O (2005): Dicumarol is a potent reversible inhibitor of gap junctional intercellular communication. *Arch Biochem Biophys* 434, 241-247
- ALE- AGHA (2003): Untersuchungen zum Einfluss von Retinoiden, Flavonoiden und Menadion auf die interzelluläre Kommunikation über Gap Junctions. Dissertation Universität Düsseldorf
- ALE-AGHA N, Stahl W, Sies H (2002): (-)-Epicatechin effects in rat liver epithelial cells: Stimulation of gap junctional communication and counteraction of its loss due to the tumor promoter 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate. *Biochem Pharmacol* 63, 2145-2149
- ARAB L (2003): Biomarkers of fat and fatty acid intake. *J. Nutr.* 133, 925-932
- ARAB L, Akbar J. (2002): Biomarkers and the measurement of fatty acids. *Public Health Nutr.* 2002 5(6A), 865-871
- AUST O, Ale- Agha N, Zhang L, Wollersen H, Sies H, Stahl W (2003): Lycopene oxidation product enhances gap junctional communication. *Food Chem Toxicol* 41, 1399-1407.
- BALLA J, Vercellotti GM, Nath K, Yachie A, Nagy E, Eaton JW, Balla G. (2003) Haem, haem oxygenase and ferritin in vascular endothelial cell injury. *Nephrol Dial Transplant.* 18 Suppl 5, 8-12
- BALTES W (1995): *Lebensmittelchemie*. Vierte Auflage Springer- Verlag Berlin, Heidelberg, New York S.50ff
- BANRUD H, Mikalsen SO, Berg K, Moan J (1994): Effects of ultraviolet radiation on intercellular communication in V79 Chinese hamster fibroblasts. *Carcinogenesis* 15, 233-239
- BAYLIN A, Kabagambe EK, Siles X, Campos H (2002): Adipose tissue biomarkers of fatty acid intake. *Am J Clin Nutr* 76, 750-757
- BELCH JJF, Hill A (2000): Evening primrose oil and borage oil in rheumatologic conditions. *Am J Clin Nutr* 71 suppl, 352-356
- BELITZ H-D (Hrsg), Grosch W, Schieberle P (2001): *Lehrbuch der Lebensmittelchemie*. 5. Auflage Springer Verlag Berlin Heidelberg New York, S.151ff

- BELLEI B, Mastrofrancesco A, Briganti S, Aspate N, Ale- Agha N, Sies H, Picardo M (2007): Ultraviolet A induced modulation of gap junctional intercellular communication by p38 MAPK activation in human keratinocytes. *Exp. Dermatol* 17 (2), 115-124
- BERTRAM JS (2004): Induction of connexin 43 by carotenoids: functional consequences. *Arch Biochem Biophys* 430, 120-126
- BERTRAM JS, Bortkiewicz H (1995): Dietary carotenoids inhibit neoplastic transformation and modulate gene expression in mouse and human cells. *Am J Clin Nutr* 62 (6 Suppl), 1327-1336
- BERTRAM JS, Zhang LX (1994): Assays for regulation of gap junctional communication and connexin expression by carotenoids. *Methods Enzymol* 234, 235-244.
- BEUTNER S, Bloedorn B, Hoffmann T, Martin HD (2000): Synthetic singlet oxygen quenchers. *Methods Enzymol* 3, 226-241
- BIESALSKI HK, Fürst P, Kluthe HKR, Pöler W, Puchstein C, Stähelin HB (1995): *Ernährungsmedizin*. Biesalski HK (Hrsg) Georg Thieme Verlag Stuttgart
- BLACK HS, Rhodes LE (2006): The potential of omega-3 fatty acid in the prevention of non-melanoma skin cancer. *Cancer Detection and Prevention* 30, 224-232
- BORTZ JT, Wertz PW, Downing DT J (1990): Composition of cerumen lipids. *Am Acad Dermatol* 23(5 Pt 1), 845-849
- BOUSSIBA S, Vonshak A (1991): Astaxanthin accumulation in the green alga *Haematococcus pluvialis*. *Plant & Cell Physiol* 32, 1077-1082
- BRADFORD MM (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding *Anal. Biochem.*, 72, 248 -254
- BRENNEISEN P, Sies H. und Scharffetter- Kochanek K (2002): Ultraviolet-B irradiation and matrix metalloproteinase: from induction via signalling to initial events. *Annals of the New York Academy of Sciences* 973, 31-43
- Britton G (1995a) Structure and properties of carotenoids in relation to function. *FASEB J* 9, 1551-1558
- BRITTON G (1995b) UV/visible spectroscopy, in: *Carotenoids*, volume 1B: spectroscopy, Britton, G, Liaaen-Jensen, Pfander, H (Hrsg.), Birkhäuser, Basel, Boston, Berlin, S. 13-62

- BROSCHÉ T, Platt D (2000): Effect of borage oil consumption on fatty acid metabolism, transepidermal water loss and skin parameters in elderly people. *Arch Gerontol Geriatr.* 30(2), 139-150
- BUCHER O, Wartenberg H (1989): *Cytologie, Histologie und mikroskopische Anatomie des Menschen*, Bucher, O, Wartenberg, H (Hrsg.), 11. Aufl., Huber, Bern, Stuttgart, Toronto, S. 557-573
- BULTEAU AL, Moreau M, Nizard C, Friguet B (2007): Proteasome and photoaging: the effects of UV irradiation. *Ann N Y Acad Sci* 1100, 280-290.
- BURDGE GC (2006): Metabolism of alpha-linolenic acid in humans. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acid* 75(3), 161-168
- BURDGE GC, Calder PC (2005): Conversion of α -linolenic acid to longer-chain polyunsaturated fatty acids in human adults. *Reprod Nutr Dev* 45, 581-597
- CALDER PC (2006a): Polyunsaturated fatty acids and inflammation. *Prostaglandins Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 75, 197-202.
- CALDER PC (2006b): N-3 Polyunsaturated fatty acids, inflammation and inflammatory diseases. *Am J Clin Nutr* 83(suppl), 1505-1519
- CAO J, Schwichtenberg KA, Hanson NQ, Tsai MY (2006): Incorporation and clearance of omega-3 fatty acids in erythrocyte membranes and plasma phospholipids. *Clin Chem.* 52(12), 2265-2272
- CASCIO M (2005): Connexins and their environment: effects of lipids composition on ion channels. *Biochim Biophys Acta* 1711, 142-153
- CAUGHEY GE, Mantzioris E, Gibson RA, Cleland LG, James MJ (1996): The effect on human tumor necrosis factor alpha and interleukin 1 beta production of diets enriched in n-3 fatty acids from vegetable oil or fish oil. *Am J Clin Nutr.* 63, 116-122
- CHAPKIN RS, Ziboh VA, McCullough JL (1987): Dietary influences of evening primrose and fish oil on the skin of essential fatty acid-deficient guinea pigs. *J Nutr.* 117(8), 1360-1370.
- CHUNG S, Kong S, Seong K, Cho Y (2002): γ - linolenic acid in borage oil reverses epidermal hyperproliferation in guinea pigs. *J Nutr.* 132, 3090-3097

- COLQUHOUN DM (2001): Nutraceuticals: vitamins and other nutrients in coronary heart disease. *Curr Opin Lipidol* 12, 639-646.
- CONNOR WE (2000): Importance of n-3 fatty acids in health and disease. *Am J Clin Nutr* 71 (suppl), 171-175
- CRUCIANI V, Husøy T, Mikalsen SO (2001): Pharmacological evidence for system-dependent involvement of protein kinase C isoenzymes in phorbol ester-suppressed gap junctional communication. *Exp Cell Res.* 268(2), 150-161.
- DAUBRAWA F (2006): Effekte von Astaxanthin und Canthaxanthin auf die Zell-Zell-Kommunikation über Gap Junctions. Dissertation Universität Düsseldorf
- DAUBRAWA F, Sies H, Stahl W (2005): Astaxanthin diminishes gap junctional intercellular communication in primary human fibroblasts. *J Nutr* 135, 2507-2511.
- DECRAENE D, Agostimis P, Pupe A, de Haes P, Garmyn M, Giacomoni PU (Hrsg) (2001): p53 protein and the response of human skin to UV; in Sun protection in man, Paolo U. Giacomoni (Hrsg) Elsevier- Verlag Amsterdam, London, S.407
- DEUTSCHE GESELLSCHAFT FÜR ERNÄHRUNG (DGE), Österreichische Gesellschaft für Ernährung (ÖGE), Schweizerische Gesellschaft für Ernährung (SGE), Schweizerische Vereinigung für Ernährung (SVE), eds. (2000): Referenzwerte für die Nährstoffzufuhr, Umschau- Verlag Frankfurt/Main
- DI MASCIO P, Raiser S, SIES H (1989): Lycopene as the most efficient biological carotenoid singlet oxygen quencher. *Archives of biochemistry and biophysics*, 274, 532-538
- DOOPER MM, van Riel B, Graus YM, M'Rabet L (2003): Dihomo-gamma-linolenic acid inhibits tumour necrosis factor-alpha production by human leucocytes independently of cyclooxygenase activity. *Immunology* 110(3), 348-57.
- EICHLER O, Sies H; Stahl W (2002): Divergent optimum levels of lycopene, β - carotene and lutein protections against UVB irradiation in human fibroblasts. *Photochem Photobiol* 75, 503-506
- EL-AGAMEY A, Lowe GM, McGarvey DJ, Mortensen A, Phillip DM, Truscott TG, Young AJ (2004): Carotenoid radical chemistry and antioxidant/pro-oxidant properties. *Arch Biochem Biophys* 430, 37-48
- FEINGOLD KR (2007): Thematic review series: skin lipids. The role of epidermal lipids in cutaneous permeability barrier homeostasis. *J Lipid Res.* (12), 2531-2546

- FERRAZ TP, Fiuza MC, Dos Santos MLA; Pontes de Carvalho L; Soares NM (2004): Comparison of six methods for the extraction of lipids from serum in terms of effectiveness and protein preservation. *J. Biochem. Biophys. Methods* 58, 187-193
- FOKKEMA MR, Brouwer DA, Hasperhoven MB, Martini IA, Muskiet FA (2000): Short-term supplementation of low-dose gamma-linolenic acid (GLA), alpha-linolenic acid (ALA), or GLA plus ALA does not augment LCP omega 3 status of Dutch vegans to an appreciable extent. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 63, 287-292
- FOLCH J, Lees M (1951): Proteolipides, a new type of tissue lipoproteins; their isolation from brain. *J Biol. Chem* 191, 807-817.
- FRANZKE C (1990): *Lehrbuch der Lebensmittelchemie. Band 1 Akademie- Verlag Berlin* S.66ff
- FREDERICK JE, Lubin D (1988): Possible long- term changes in biologically active ultraviolet radiation reaching the ground. *Photochem. Photobiol* 47, 571-578
- GÄRTNER C, Stahl W, Sies H (1997): Lycopene is more bioavailable from tomato paste than from fresh tomatoes. *Am J Clin. Nutr* 66, 116-122
- GASSMANN B (2006): Lipide. *Ernährungsumschau* 53 (7), 272-278
- GODAR DE, Wengraitis SP, Shreffler J, Sliney DH (2001): UV- Doses of Americans. *Photochem. Photobiol* 73 (6), 787-793
- GODAR DE. (1999) UVA1 radiation triggers two different final apoptotic pathways. *J Invest Dermatol*. 112(1), 3-12
- GOODENOUGH DA, Goliger JA, Paul DL (1996): Connexins, connexons and intercellular communication. *Annu Rev Biochem* 65, 475-502.
- GRETHER- BECK S, Wlaschek M, Krutmann J, Scharffetter- Kochanek K (2005): Photoschädigung und Photoalterung- Prävention und Behandlung, *JDDG Supplement* 2, 19-25
- GRUNE T (2000): Oxidative stress, aging and the proteasomal system. *Biogerontology* 1, 31-40
- GUERIN M, Huntley ME, Olaizola M (2003): Haematococcus astaxanthin: applications for human health and nutrition. *Trends Biotechnol* 21, 210-216

- HAASS NK, Smalley KSM, Herlyn M (2004): The role of altered cell–cell communication in melanoma progression *J Mol Histol* 35, 309–318
- HALLIWELL B, Gutteridge JM (1989): *Free Radicals in Biology and Medicine* Oxford University Press, New York., 2nd. edition
- HANUSCH M, Stahl W, Schulz WA, Sies H (1995): Induction of gap junctional communication by 4-oxoretinoic acid generated from its precursor canthaxanthin. *Arch Biochem Biophys* 317 (2), 1-6
- HARRIS WS, Von Schacky C (2004): The Omega-3 Index: a new risk factor for death from coronary heart disease? *Prev Med* 39, 212-220
- HEINRICH U, Koop U, Leneveu-Duchemin MC, Osterrieder K, Bielfeldt S, Chkarnat C, Degwert J, Haentschel D, Jaspers S, Nissen HP, Rohr M, Schneider G, Tronnier H (2003a): Multicenter comparison of skin hydration in terms of physical-, physiological- and product dependent parameters by the capacitive method (Corneometer CM 825). *Intern. J Cosm Sci* 25, 45-53
- HEINRICH U, Gärtner C, Wiebusch M, Eichler O, Sies H, Tronnier H, Stahl W (2003b): Supplementation with β -Carotene or a Similar Amount of Mixed Carotenoids Protects Humans from UV-Induced Erythema. *J. Nutr.* 133 98-101
- HEINRICH U, Neukam K, Tronnier H, Sies H, Stahl W (2006a): Long-term ingestion of high flavanol cocoa provides photoprotection against UV-induced erythema and improves skin condition in women. *J Nutr.* 36(6), 1565-1569
- HEINRICH U, Tronnier H, Stahl W, Béjot M, Maurette JM (2006b): Antioxidant supplements improve parameters related to skin structure in humans. *Skin Pharmacol Physiol* 19(4), 224-231
- HELLMER S (2001): *Lipid- und strahlungsinduzierte Störungen des humanen epidermalen Stratum corneums*. Habilitationsschrift Universität Halle- Wittenberg
- HIEBER AD, King TJ, Morioka S, Fukushima LH, Franke AA, Bertram JS (2000): Comparative effects of all-trans β -carotene vs. 9-cis β -carotene on carcinogeninduced neoplastic transformation and connexin 43 expression in murine 10T1/2 cells and on the differentiation of human keratinocytes. *Nutr Cancer* 37, 234-244
- HORROBIN DF (2000): Essential fatty acid metabolism and its modification in atopic eczema. *Am J Clin Nutr.* 71(1 Suppl), 367-372

- HOSSAIN MZ, Zhang L-X, Bertram JS (1993): Retinoids and carotenoids upregulate gapjunctional communication: correlation with enhanced growth control and cancer prevention. *Progress Cell Res* 3, 301-9
- HSU M-Y, Andl T, Li G, Meinkoth JL, Herlyn M (2000): Cadherin repertoire determines partner-specific gap junctional communication during melanoma progression. *J Cell Sci.* 113, 1535-1542
- JAMAL S, Schneider RJ (2002): UV- induction of keratinocytes endothelin-1 downregulates E- cadherin in melanocytes and melanoma cells. *J Clin. Invest* 110, 443-452
- JAMES MJ, Gibson RA, Cleland LG (2000): Dietary polyunsaturated fatty acids and inflammatory mediator production. *Am J Clin Nutr*; 71 (suppl), 343-348
- JANSEN LAM, Mesnil M, Jongen WMF (1996): Inhibition of gap junctional intercellular communication and delocalization of the cell adhesion molecule E-cadherin by tumor promoters *Carcinogenesis* 17 (7), 1527-1531
- JONGEN WMF, Fitzgerald DJ, Asamoto M, Piccoli C, Slaga TJ, Gros D, Takeichi M, Yamasaka H (1991): Regulation of connexin 43- mediated gap junctional intercellular communication by Ca^{2+} in mouse epidermal cells is controlled by E-cadherin. *J Cell Biol* 114, 545-555
- KANEMITSU MY, Lau AF (1993): Epidermal growth factor stimulates the disruption of gap junctional communication and connexin43 phosphorylation independent of 12-0-tetradecanoylphorbol 13-acetate-sensitive protein kinase C: the possible involvement of mitogen-activated protein kinase. *Mol Biol Cell.* 4(8), 837-848
- KANNO Y, Sasaki Y, Shiba Y, Yoshida- Noro C, Takeichi M (1984): Monoclonal antibody ECCD-1 inhibits intercellular communication in teratocarcinoma PCC3 cells. *Exp. Cell Res.* 152, 270-273
- KELLER A, Mohamed A, Dröse S, Brandt U, Fleming I, Brandes RP (2004): Analysis of dichlorodihydrofluorescein and dihydrocalcein as probes for the detection of intracellular reactive oxygen species. *Free Radic Res* 38, 1257–1267
- KEYSE SM, Tyrrell RM (1987). Both near ultraviolet radiation and the oxidizing agent hydrogen peroxide induce a 32-kDa stress protein in normal human skin fibroblasts. *J Biol Chem.* 262(30), 14821-14825

- KHACHIK F, Carvalho L, Bernstein PS, Muir GJ, Zhao DY, Katz NB (2002): Chemistry, distribution, and metabolism of tomato carotenoids and their impact on human health. *Exp Biol Med (Maywood)* 227, 845-851
- KIM HK, Cho S, Lee S, Kim KH, Cho KH, Eun HC, Chung JH (2006): Photoprotective and anti-skin aging effects of eicosapentaenoic acid in human *in-vivo*. *J Lipid Res* 47(5), 921-930
- KINDL G, Raab W (1998): Licht und Haut. Kindl G, Raab W (Hrsg.), 4. Aufl., Govi, Eschborn, S. 47-133
- KLOTZ LO, Patak P, Ale-Agha N, Buchczyk DP, Abdelmohsen K, Gerber PA, von Montfort C, Sies H (2002): 2-Methyl-1,4-naphthoquinone, vitamin K(3), decreases gap-junctional intercellular communication via activation of the epidermal growth factor receptor/extracellular signal-regulated kinase cascade. *Cancer Res.* 62(17):4922-4928
- KO K, Arora P, Lee W, McCulloch C. (2000): Biochemical and functional characterization of intercellular adhesion and gap junctions in fibroblasts. *Am J Physiol Cell Physiol.* 279(1):147-157
- KOLB B (2003): Gaschromatographie in Bildern- Eine Einführung. 2. Auflage Wiley-VCH Verlag Weinheim: S. 223
- KOOLMAN J, Röhm K-H (2002): Taschenatlas der Biochemie. 3. Auflage. Georg Thieme Verlag Stuttgart/ New York: S. 390f
- KRÄMER U, Schikowski T (2006): Recent demographic changes and consequences for dermatology. In: *Skin Aging*, Gilchrest BA, Krutmann J (Hrsg), 1. Auflage, Springer Verlag Berlin Heidelberg, S. 1-8
- KRUTMANN J, Gilchrest BA (2006): Photoaging of skin. In: *Skin Aging*, Gilchrest BA, Krutmann J (Hrsg), 1. Auflage, Springer Verlag Berlin Heidelberg, S. 33-43
- KULMS D, Pöppelmann B, Yarosh D, Luger TA, Krutmann J, Schwarz T (1999): Nuclear and cell membrane effects contribute independently to the induction of apoptosis in human cells exposed to UVB radiation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 6;96(14):7974-7979
- LAMPE PD, Lau AF (2000): Regulation of gap junctions by phosphorylation of connexins. *Arch Biochem Biophys.* 15: 205-215

- LAMPE PD, Lau AF (2004): The effects of connexin phosphorylation on gap junctional communication. *Int J Biochem Cell Biol* 36: 1171-1186
- LANDRUM JT, Bone RA (2004): Mechanistic evidence for eye diseases and carotenoids. In *Carotenoids in Health and Disease*, Krinsky NI, Mayne ST, Sies H (Hrsg). Marcel Dekker Verlag New York, Basel, S445-472
- LARSSON P, Ollinger K, Rosdahl I. (2006) Ultraviolet (UV)A- and UVB-induced redox alterations and activation of nuclear-factor-kappaB in human melanocytes- protective effects of alpha-tocopherol. *Br J Dermatol.* 155(2), 292-300
- LEBENSMITTEL-, BEDARFSGEGENSTÄNDE- UND FUTTERMITTELGESETZBUCH (Lebensmittel- und Futtermittelgesetzbuch - LFGB) (2005) Ausfertigungsdatum: 01.09.2005 Quelle: www.juris.de
- LEE SH, Jeong SK, Ahn SK (2006): An update of the defensive barrier function of skin. *Yonsei Medical Journal* 47, 293-306
- LEITLINIE "DERMOKOSMETIKA FÜR DIE PFLEGE DER TROCKENEN HAUT" (1999) in der Fassung vom 17. Februar 2000; *Deutsche Apotheker Zeitung* 139, 2397 – 2399
- LEITLINIE DER DEUTSCHEN DERMATOLOGISCHEN GESELLSCHAFT DDG (2005): Täglicher Lichtschutz in der Prävention chronischer UV-Schäden der Haut. AWMF Online
- LI G, Herlyn M (2000): Dynamics of intercellular communication during melanoma development. *Mol Med Today* 6(4), 163-169
- LINSEISEN J, Schulze MB, Saadatian-Elahi M, Kroke A, Miller AB, Boeing H (2003): Quantity and quality of dietary fat, carbohydrate, and fiber intake in the German EPIC cohorts. *Ann Nutr Metab* 47, 37-46
- LIVNY O, Kaplan I, Reifen R, Polak-Charcon S, Madar Z, Schwartz B (2002): Lycopene inhibits proliferation and enhances gap-junction communication of KB-1 human oral tumor cells. *J Nutr* 132, 3754-3759
- LODISH H (Hrsg), Berk A, Zipursky SL, Matsudaira P, Baltimore D, Darnell J (2002): *Molekulare Zellbiologie* 4. Auflage; Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg, Berlin: S. 1054
- MAKRANTONAKI E (2006): The molecular mechanisms of endogenous human skin aging. Dissertation FU Berlin

- MANTZIORIS E, James MJ, Gibson RA, Cleland LG (1994): Dietary substitution with an alpha-linolenic acid-rich vegetable oil increases eicosapentaenoic acid concentrations in tissues. *Am J Clin Nutr.* 59(6), 1304-1309
- MATESIC DF, Rupp HL, Bonney WJ, Ruch RJ, Trosko JE (1994): Changes in gap-junction permeability, phosphorylation, and number mediated by phorbol ester and non-phorbol-ester tumor promoters in rat liver epithelial cells. *Mol Carcinog* 10, 226-236
- MATHEWS-ROTH, MM, Pathak, MA, Parrish, JA, Fitzpatrick, TB, Kass, EH, Toda, K, Clemens, W (1972) A clinical trial of the effects of oral β -carotene on the responses of human skin to solar radiation. *J Invest Dermatol* 59, 349-353
- MATSUI MS, DeLeo VA (1990): Induction of protein kinase C activity by ultraviolet radiation. *Carcinogenesis* 11, 229-234
- MAYNE ST (2003): Antioxidant nutrients and chronic disease: Use of biomarkers of exposure and oxidative stress status in epidemiologic research. *J Nutr* 133, 933-940
- MAYSER P, Grimm H, Grimminger F (2002): n-3 fatty acids in psoriasis. *Br J Nutr.* 87 Suppl, 77-82
- MCLEAN CH, Issa AM, Newberry SJ, Mojica WA, Morton SC, Garland RH, Hilton LG, Traina SB, Shekelle PG (2005): Effects of Omega-3 Fatty Acids on Cognitive Function with Aging, Dementia, and Neurological Diseases. *Evid Rep Technol Assess (Summ)* 114, 1-3
- MEŞE G, Richard G, White TW (2007): Gap Junctions: Basic structure and function. *J Invest Dermatol* 127, 2516-2524
- MIKI W (1991): Biological functions and activities of animal carotenoids. *Pure & Appl Chem* 63: 141-146
- MÖLLER, Umbach W (Hrsg.), Eds. (1995): *Kosmetik, Entwicklung, Herstellung und Anwendung kosmetischer Mittel.* Thieme- Verlag Stuttgart, New York: S25-36
- MORENO AP (2005): Connexin phosphorylation as a regulatory event linked to channel gating. *Biochimica et Biophysica Acta* 1711, 164-71
- MORLIÈRE P, Moysan A, Santus R, Hüppe G, Mazière J-C, Dubertert L (1991): UVA-induced lipid peroxidation in cultured human fibroblasts. *Biochim Biophys Acta* 1084, 261-268

- MOURET S, Baudouin C, Charveron M, Favier A, Cadet J, Douki T (2006): Cyclobutane pyrimidine dimers are predominant DNA lesions in whole human skin exposed to UV- A radiation. PNAS 12: 13765-13770
- MOYSAN A, Marquis I, Gaboriau F, Santus R, Dubertret L, Morlière P. (1993) Ultraviolet A-induced lipid peroxidation and antioxidant defense systems in cultured human skin fibroblasts. J Invest Dermatol. 100(5):692-8
- MUSIL LS, Goodenough DA (1993): Multisubunit assembly of an integral plasma membrane channel protein, gap junction connexin43, occurs after exit from the ER. Cell 74 (6), 1065-77
- NELSON TL, Stevens JR, Hickey MS (2007): Inflammatory markers are not altered by an eight week dietary alpha linolenic acid intervention in healthy abdominally obese adult males and females. Cytokine 38, 101-106
- NEUKAM K (2006): Interventionsstudien und *in-vitro*-Untersuchungen zum Effekt von Polyphenolen und w-3-Fettsäuren auf Endothelialfunktionen und Hautphysiologie. Dissertation Universität Düsseldorf
- OETTE K, Doss M (1968): A micromethod for rapid transesterification of lipids on thin layer plates with sodium methylate for gas chromatographic analysis of fatty acid methyl ester. J Chromatogr 6, 439-50
- PALOZZA P, Krinsky N (Hrsg), Mayne S (Hrsg) Sies H (Hrsg) (2004): Carotenoids in Health and Disease. Carotenoid antioxidant activity in carotenoids in health and disease. Marcel Dekker Verlag New York S. 127ff
- PALOZZA P, Krinsky NI (1992): Astaxanthin and canthaxanthin are potent antioxidants in a membrane model. Arch Biochem Biophys 297(2), 291-295
- PARRISH AR, Catania JM, Orozco J, Gandolfi AJ (1999) Chemically induced oxidative stress disrupts the E-cadherin/catenin cell adhesion complex. Toxicol Sci. 51(1), 80-86
- PAWLOSKY RJ, Hibbeln JR, Novotny JA, Salem N Jr (2001): Physiological compartmental analysis of alpha-linolenic acid metabolism in adult humans. J Lipid Res. 42(8), 1257-1265
- PENG YM, Peng YS, Lin Y (1993): A nonsaponification method for the determination of carotenoids, retinoids, and tocopherols in solid human tissues. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. (2), 139-144

- PICHE E, Häfner H-M, Hoffmann J, Jünger M (2002): Neue Ansätze zur 3D-Rauhigkeitsanalyse menschlicher Haut. *Z Hautkr* 77, 140-146
- PRIMAVERA G, Berardesca E (2005): Sensitive skin: Mechanism and diagnosis. *Int. J Cosmet Sci* 27, 1-10
- PROKSCH E, Fölster-Holst R, Jensen JM (2006). Skin barrier function, epidermal proliferation and differentiation in eczema. *J Dermatol Sci.*: 43(3), 159-169
- PROVOST N, Moreau M, Leturque A, Nizard C (2003): Ultraviolet A radiation transiently disrupts gap junctional communication in human keratinocytes. *Am J Physiol* 284, 51-59
- RAWLINGS AV (2003): Trends in stratum corneum research and the management of dry skin conditions. *Int J. Cosmet. Sci* 25, 63-95
- REN J, Chung SH (2007): Anti- inflammatory effect of alpha- Linolenic acid and its mode of action through the inhibition of nitric oxide production and inducible nitric oxide Synthase gene expression via NF-kappaB and mitogen- activated protein kinase pathways. *J Agric Food Chem* 55 (13), 5073-5080
- RICHARD G (2000): Connexins: a connection with the skin. *Exp Dermatol* 9, 77-96
- RIEGER-CHRIST KM, Hanley R, Lodowsky C, Bernier T, Vemulapalli P, Roth M, Kim J, Yee AS, Le SM, Marie PJ, Libertino JA, Summerhayes IC (2007): The green tea compound, (-)-epigallocatechin-3-gallate downregulates N-cadherin and suppresses migration of bladder carcinoma cells. *J Cell Biochem.* 1;102(2),377-88.
- RISÉ P, Eligini S, Ghezzi S, Colli S, Galli C (2007): Fatty acid composition of plasma, blood cells and whole blood: Relevance for the assessment of the fatty acid status in humans. *Prostaglandins Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 76, 363-369
- RODRIGUES LM, Pinto PC, Magro JM, Fernandes M, Alves J (2004): Exploring the influence of skin perfusion on transepidermal water loss. *Skin Res and Techn* 10, 257-262
- ROGERS J, Harding C, Mayo A, Banks J, Rawlings A.(1996): Stratum corneum lipids:the effect of ageing and the seasons. *Arch.Dermatol.Res.* 288, 765-770
- RUCH RJ, Trosko JE, Madhukar BV (2001): Inhibition of connexin43 gap junctional intercellular communication by TPA requires ERK activation. *J Cell Biochem.* 83(1), 163-169

- RUNDHAUG JE, Mikulec C, Pavone A, Fischer SM (2007): A role for cyclooxygenase-2 in ultraviolet light- induced skin carcinogenesis. *Mol Carcinog* 46 (8), 692-698
- RYTER S, Kvam E, Tyrrell RM. (1999) Heme oxygenase activity determination by high-performance liquid chromatography. *Methods Enzymol.* 300:322-336
- SÁEZ JC, Nairn AC, Czernik AJ, Fishman GI, Spray DC, Hertzberg EL (1997): Phosphorylation of connexin43 and the regulation of neonatal rat cardiac myocyte gap junctions. *J Mol Cell Cardiol.* 29, 2131-2145
- SALOMON D, Saurat JH, Meda P (1988): Cell-to-cell communication within intact human skin. *J Clin Invest* 82, 248–254
- SALOMON D, Saurat JH, Meda P (1988) Cell-to-cell communication within intact human skin. *J Clin Invest.* 82(1), 248-254
- SANDERS TA, Younger KM (1981): The effect of dietary supplements of omega 3 polyunsaturated fatty acids on the fatty acid composition of platelets and plasma choline phosphoglycerides. *Br J Nutr* 45, 613-616
- SCHMELZ M, Schmid VJ, Parrish AR (2001): Selective disruption of cadherin/catenin complexes by oxidative stress in precision-cut mouse liver slices. *Toxicol Sci.* 61(2), 389-394
- SCHROEDER P, Pohl C, Calles C, Marks C, Wild S, Krutmann J (2007): Cellular response to infrared radiation involves retrograde mitochondrial signaling. *Free Radic Biol Med* 43(1), 128-235
- SCHROEDER P, Schieke SM, Morita A (2006): Premature skin aging by infrared radiation, tobacco smoke and ozone. In: *Skin Aging*, Gilchrist BA, Krutmann J (Hrsg), 1. Auflage, Springer Verlag Berlin Heidelberg, S. 45-53
- SCHUBERT R, Kitz R, Beermann C, Rose MA, Baer PC, Zielen S, Boehles H (2007): Influence of low-dose polyunsaturated fatty acids supplementation on the inflammatory response of healthy adults. *Nutrition* 23(10), 724-730
- SCHÜRER NY (2002): Implementation of fatty acid carriers to skin irritation and the epidermal barrier. *Clinical Dermatits* 47, 199-205
- SHARONI Y, Stahl W, Danilenko M, Levy J (2004): Anticancer activity of carotenoids: From human studies to cellular processes and gene regulation. In *Carotenoids in Health and Disease*, Krinsky NI, Mayne ST, Sies H (Hrsg). Marcel Dekker Verlag New York, Basel, S165-196

- SIES H (1991): Oxidative stress: from basic research to clinical application. *Am J Med*, 91(3C), 31–38
- SIES H, Stahl W (1995): Vitamins E and C, beta-carotene, and other carotenoids as antioxidants. *Am J Clin Nutr*. 62(6 Suppl):1315-1321
- SIES H, Stahl W (2004): Nutritional protection against skin damage from sunlight. *Annu Rev Nutr* 24, 173-200
- SIMOPOULOS AP (2002a): The importance of the ration of omega-6/omega-3 essentiell fatty acids. *Biomed Pharmacother* 56, 365-379
- SIMOPOULOS AP (2002b): Omega-3 Fatty acids in inflammation and autoimmune diseases. *J Am Coll Nutr* 21 (6), 495-505
- SINCLAIR AJ, Attar- Bashi NM, Li D (2002): What is the role of α - Linolenic acid for mammals? *Lipids* 37, 1113-1123
- SINGER P (2000): Was sind, wie wirken Omega-3-Fettsäuren? 3. Auflage Neuer Umschau Buchverlag Neustadt
- SKEHAN P, Storeng R, Scudiero D, Monks A, McMahon J, Vistica D, Warren JT, Bokesch H, Kenney S, Boyd MR (1990): New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer- drug screening. *J Natl Cancer Inst* 82, 1107-1112
- SOLER C, Grangeasse C, Baggetto LG, Damour O (1999): Dermal fibroblast proliferation is improved by β - Catenin overexpression an inhibited by E- cadherin expression. *FEBS Letters* 42(2-3), 178-182
- STAHL W, Heinrich U, Jungmann H, Sies H, Tronnier H. (2000): Carotenoids and carotenoids plus vitamin E protect against ultraviolet light-induced erythema in humans. *Am J Clin Nutr*. 71(3), 795-798
- STAHL W, Heinrich U, Jungmann H, von Laar J, Schietzel M, Sies H, Tronnier H. (1998): Increased dermal carotenoid levels assessed by noninvasive reflection spectrophotometry correlate with serum levels in women ingesting Betatene *J Nutr*. 128(5), 903-907
- STAHL W, Heinrich U, Wiseman S, Eichler O, Sies H; Tronnier H (2001): Dietary tomato paste protects against ultraviolet light- induced erythema in humans. *J Nutr* 131 (5), 1449-1451

- STAHL W, Nicolai S, Briviba K, Hanusch M, Broszeit G, Peters M, Martin H-D, Sies H (1997): Biological activities of natural and synthetic carotenoids: induction of gap junctional communication and singlet oxygen quenching. *Carcinogenesis* 18, 89-92
- STAHL W, Sies H (2005): Bioactivity and protective effects of natural carotenoids. *Biochim Biophys Acta* 1740, 101-107.
- STAHL W, Sies H (2007): Carotenoids and flavonoids contribute to nutritional protection against skin damage from sunlight. *Mol Biotechnol.* 37(1), 26-30
- STAHL W, Sies H. (2002): Carotenoids and protection against solar UV radiation. *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol.* 15(5), 291-296
- STAHL W, Sies H (2003): Antioxidant activity of carotenoids. *Mol Aspects Med* 24: 345-51
- STAHL W, Sundquist AR, Hanusch M, Schwarz W, Sies H. (1993): Separation of beta-carotene and lycopene geometrical isomers in biological samples. *Clin Chem.* 39(5):810-814
- STOCKER R, Yamamoto Y, McDonagh AF, Glazer AN, Ames BN (1987): Bilirubin is an antioxidant of possible physiological importance. *Science* 27, 1043-1046
- STRYER L (Hrsg), Berg JM, Tymoczko JL, (2003): *Biochemie.* 5. Auflage. Spektrum Akad. Verlag Heidelberg/ Berlin: S.686ff
- SUN Q, Ma J, Campos H, Hankinson SE, Hu FB (2007): Comparison between plasma and erythrocyte fatty acid content as biomarker of fatty acid intake in US women. *Am J Clin Nutr* 86, 74-81
- TAGAMI H (2007): Functional characteristics of the stratum corneum in photoaged skin in comparison with those found in intrinsic aging. *Arch Dermatol Res.* 30
- TANAKA K, Hasegawa J, Asamitsu K, Okamoto T (2005): Prevention of the Ultraviolet B-Mediated Skin Photoaging by a Nuclear Factor κ B Inhibitor, Partheolide. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 315 (2), 624-630
- TEICHER VB, Kucharski N, Martin HD, van der Saag P, Sies H, Stahl W (1999): Biological activities of apo-canthaxanthinoic acids related to gap junctional communication. *Arch Biochem Biophys* 365, 150-155.

- THIES F, Nebe-von-Caron G, Powell JR, Yaqoob P, Newsholme EA, Calder PC (2001): Dietary supplementation with gamma-linolenic acid or fish oil decreases T lymphocyte proliferation in healthy older humans. *J Nutr.* 131(7), 1918-1927
- TREKLI M C, Riss G, Goralczyk R, Tyrell RM (2003): Beta- Carotene supresses UVA-induced HO-1 Gene Expression in cultured FEK4. *Free Radic Med* 34 (4), 456-464
- TRONNIER H, Wibusch M, Heinrich U, Stute R (1999): Surface evaluation of living skin. *Adv Exp Med Biol* 455, 507-516
- TROSKO JE, Chang CC (2001): Mechanism of up-regulated junctional intercellular communication during chemoprevention and chemotherapy of cancer. *Mutat Res* 480-481, 219-229
- TYRRELL RM (2004): Solar ultraviolet A radiation: an oxidizing skin carcinogen that activates heme oxygenase-1. *Antioxid Redox Signal.* 6(5), 835-840
- VILE GF, Tanew-Ilitschew A, Tyrrell RM (1995): Activation of NF-kappa B in human skin fibroblasts by the oxidative stress generated by UVA radiation. *Photochem Photobiol. Sep*;62(3), 463-468
- VINE AL, Bertram JS (2002): Cancer chemoprevention by connexins. *Cancer Metastasis Rev* 21, 199-216
- WAGENER FA, van Beurden HE, von den Hoff JW, Adema GJ, Figdor CG (2003): The heme-heme oxygenase system: a molecular switch in wound healing. *Blood* 15, 521-528
- WALLACE FA, Miles EA, Calder PC (2003): Comparision of the effects of linseed oil and different doses of fish oil on mononuclear cell function in healthy human subjects. *Br J Nutr.* 89, 679-689
- WEI CJ, Francis R, Xu X, Lo CW (2005): Connexin43 associated with an N-cadherin-containing multiprotein complex is required for gap junction formation in NIH3T3 cells. *J Biol Chem.* 280(20), 1925-1936
- WERTZ PW (2000): Lipids and barrier function of the skin. *Acta Derm Venerol Supp* 208, 7-11
- WIRTHS W(2000): Kleine Nährwerttabelle der Deutschen Gesellschaft der Ernährung e.V. Umschau/ Braus Verlag Frankfurt am Main, S. 76

- YANG Y, Sharma R, Sharma A, Awasthi S, Awasthi YC (2003): Lipid peroxidation and cell cycle signaling: 4-hydroxynonenal, a key molecule in stress mediated signaling. *Acta Biochim Pol*: 50(2), 319-336.
- YOUNG AJ, Phillip DM, Lowe GM, Krinsky N (Hrsg), Mayne S (Hrsg) Sies H (Hrsg) (2004): Carotenoid antioxidant activity in carotenoids in health and disease. Marcel Dekker Verlag New York S 107 ff
- ZELLMER S (2001): Lipid- und strahlungsinduzierte Störungen des humanen epidermalen Stratum corneums. Habilitationsschrift Martin Luther Universität Halle Wittenberg
- ZHANG LX, Cooney RV, Bertram JS (1991): Carotenoids enhance gap junctional communication and inhibit lipid peroxidation in C3H/10T1/2 cells: relationship to their cancer chemopreventive action. *Carcinogenesis* 12 (11), 2109-2114.
- ZHANG LX, Cooney RV, Bertram JS (1992): Carotenoids up-regulate connexin43 gene expression independent of their provitamin A or antioxidant properties. *Cancer Res* 52, 5707-5712
- ZIBOH VA, Cho Y, Mani I, Xi S (2002) Biological significance of essential fatty acids/ prostanoids/ lipoxygenase-derived monohydroxy fatty acids in the skin. *Arch Pharm Res.* 6, 747-758
- ZIBOH VA, Miller CC, Cho Y (2000): Metabolism of polyunsaturated fatty acids by skin epidermal enzymes: generation of anti-inflammatory and antiproliferative metabolites. *Am J Clin Nutr* 72 (suppl), 361-366

Internetseiten:

<http://rsb.info.nih.gov/ij>

<http://www.pubmed.de/data/nlm.link.html>

www.acdlabs.com

www.hautkrebs.de

www.zusatzstoffe-online.de

8 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Wilhelm Stahl für die Überlassung des interessanten Themas, seinen Anregungen, sein Vertrauen in mich, seiner Geduld, sowie seiner wissenschaftlichen Betreuung bei der Durchführung und Anfertigung der Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Dr. Sies danke ich ebenfalls für sein Vertrauen und der Überlassung des Arbeitsplatzes an seinem Institut.

Frau Prof. Dr. Staudt danke ich herzlich für die Übernahme des Koreferates und dem großen Interesse an meiner Arbeit.

Ich danke dem Graduiertenkolleg 1033 für die Unterstützung im Verlauf meiner Arbeit, insbesondere möchte ich meinen Kollegen im Graduiertenkolleg und meinen Kobetreuern danken.

Frau PD Dr. Heinrich (Institut für Experimentelle Dermatologie, Universität Witten-Herdecke) und ihrer Arbeitsgruppe danke ich für die Zusammenarbeit in den Interventionsstudien..

Herrn PD Dr. Marx (Institut für Lebensmittelwissenschaften, Universität Bonn) danke ich für die Durchführung der GC-MS Messungen.

Bedanken möchte ich mich bei allen Mitarbeitern bzw. ehemaligen Mitarbeitern meines Institutes für das außergewöhnliche Arbeitsklima und den Hilfestellungen. Insbesondere möchte ich den Mitarbeitern meiner Arbeitsgruppe Frau Kaya Lutter, Frau Tanja Wagener, Frau Tatjana Brossette, Frau Dr. Anne Kiene, Frau Thais Guaratini, Frau Dr. Karin Neukam, Herrn Dr. Juan-Carlos Carrillo, Herrn Amir Roushan, Frau Dr. Felicitas Daubrawa, Frau Dr. Emanuela Camera, Frau PD Dr. Christina Polidori und Herrn Peter Graf danken. Frau Heide Krahl danke ich herzlich für ihre Unterstützung und Hilfsbereitschaft. Frau Marlies Scholtes danke ich für ihre herzliche Art und Unterstützung in administrativen Fragestellungen. Herrn Thomas Becher danke ich für seine Geduld und zahlreichen Ideen bei EDV-Problemen. Herrn Prof Dr. Peter Brenneisen und Herrn Dr. Dominik Stuhlmann danke ich für Bereitstellung der Hautzellen. Frau Dr. Karin Neukam danke ich herzlich für die Zusammenarbeit in der Interventionsstudie II. Frau Kaya Lutter, Frau Dr. Anne Kiene und Frau Tanja Wagener danke ich insbesondere auch für ihre Geduld und gute Freundschaft die weit über das kollegiale hinausgeht.

Frau Dr. Niloofar Ale- Agha danke ich für die fachlichen Diskussionen und Mitgefühl.

Danksagung

Herrn Dr. Olivier Aust danke ich herzlich für seine Unterstützung und Freundschaft, sowie fachlichen Rat vor, während und hoffentlich auch noch nach meiner Promotion.

Frau Andrea Link, Frau Kristine Oelkers und Frau Petra Wiegard danke ich für ihre Freundschaft und Unterstützung in allen Lebenssituationen. Ohne sie wäre meine Ausbildung und die letzten Jahre nur halb so schön gewesen.

Ganz besonders und aus tiefstem Herzen möchte ich meinen Eltern, meinem Bruder und Frau Kerstin Brandt, sowie meiner ganzen Familie für ihre Unterstützung, Liebe und ihrem Vertrauen in mich danken. Ohne sie hätte ich meine Ausbildung und diese Arbeit nicht durchführen können. Danke.

Anhang

Carotinoide und UV-A Strahlung: Untersuchungen an humanen Hautfibroblasten

Im Ergebnisteil sind zum besseren Verständnis teilweise nur Ausschnitte von Western Blots dargestellt. Die originalen Blots sind diesem Anhang aufgeführt.

Im Abschnitt 6.1.8 ist auf densitometrische Auswertungen, sowie auf immunozytochemische Untersuchungen verwiesen worden ohne die Ergebnisse näher darzustellen. Die Abbildungen sind hier abgebildet

Zell- Zell- Kommunikation über Gap Junctions (GJC) nach UV-A Bestrahlung

Expression und Phosphorylierungsmuster von Connexin 43

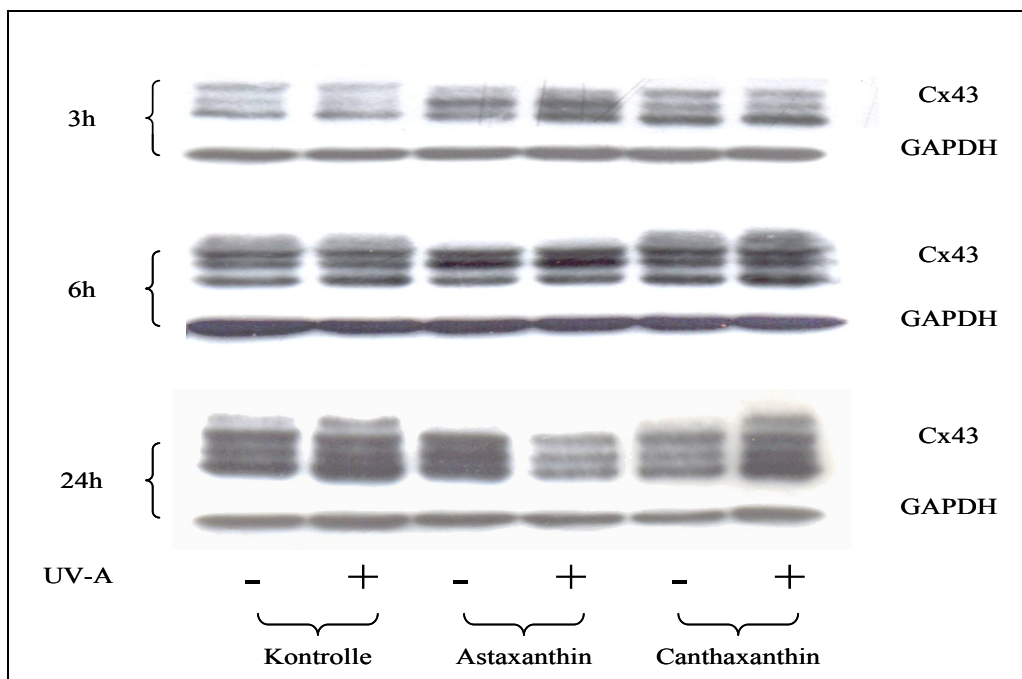


Abb. A-1 *Effekt von UV-A Bestrahlung (10 J/cm²) und Präinkubation mit Astaxanthin und Canthaxanthin auf die Expression und das Phosphorylierungsmuster von Cx43 in HdF exemplarische Darstellung von einem der drei durchgeführten Western Blots*

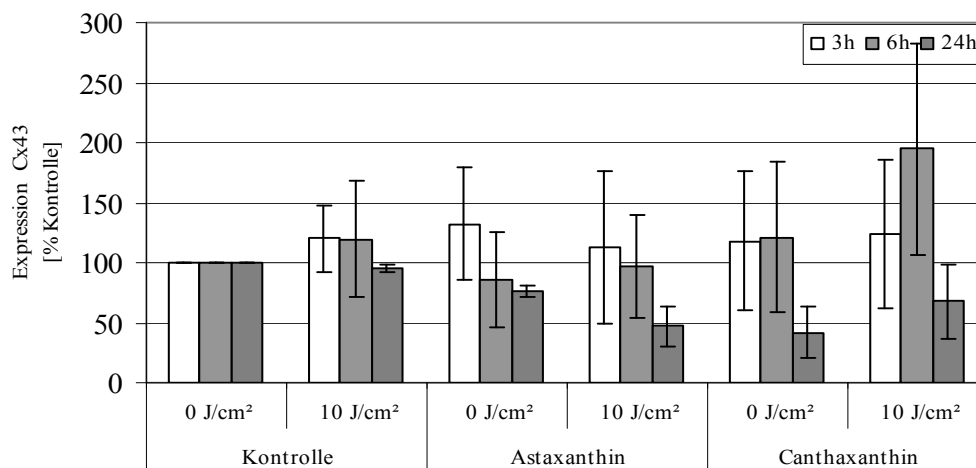


Abb. A-2 Expression von Cx43 in HdF nach Präinkubation mit Astaxanthin und Canthaxanthin und UV-A Bestrahlung (10 J/cm²)
Densitometrische Auswertung der Cx43 Western Blots; Gesamtexpressionen im Verhältnis zur unbestrahlten Kontrolle verschiedener Postinkubationszeiten; Mittelwert ± SD (n=3)

Tabelle A.1 Verhältnis der Intensitäten der Phosphorylierungsbanden von Cx43 im Western Blot nach UV-A Bestrahlung und Präinkubation mit Astaxanthin und Canthaxanthin 3h nach der Bestrahlung (10 J/cm²)
Werte bezogen auf die P0 Bande; Mittelwert ±SD (n=4)

	Phosphorylierungsmuster					
	Postinkubationzeitpunkt 3h					
	Kontrolle		Astaxanthin		Canthaxanthin	
	0 J/cm ²	10 J/cm ²	0 J/cm ²	10 J/cm ²	0 J/cm ²	10 J/cm ²
P3	n.n.	0,3±0,4	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
P2	1,5±1,0	1,0±0,6	0,9±0,6	0,7±0,5	1,0±0,6	1,2±1,2
P1	0,8±0,3	0,8±0,3	1,7±0,7	1,4±0,6	0,7±0,4	0,7±0,7
P0	1	1	1	1	1	1

n.n. = nicht nachweisbar (P3 ≤ 0,2)

Tabelle A.2 Verhältnis der Intensitäten der Phosphorylierungsbanden von Cx43 im Western Blot nach UV-A Bestrahlung und Präinkubation mit Astaxanthin und Canthaxanthin 6h nach der Bestrahlung (10 J/cm²)
Werte bezogen auf die P0 Bande; Mittelwert ±SD (n=3)

	Phosphorylierungsmuster					
	Postinkubationzeitpunkt 6h					
	Kontrolle		Astaxanthin		Canthaxanthin	
	0 J/cm ²	10 J/cm ²	0 J/cm ²	10 J/cm ²	0 J/cm ²	10 J/cm ²
P3	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	0,3±0,3
P2	1,8±0,9	1,3±0,5	1,0±0,4	1,0±0,3	1,3±0,5	0,9±0,3
P1	0,9±0,2	0,8±0,1	1,8±0,6	1,6±0,5	0,8±0,3	0,7±0,2
P0	1	1	1	1	1	1

n.n.=nicht nachweisbar (P3≤0,2)

Tabelle A.3 Verhältnis der Intensitäten der Phosphorylierungsbanden von Connexin43 im Western Blot nach UV-A Bestrahlung und Präinkubation mit Astaxanthin und Canthaxanthin 24h nach der Bestrahlung (10 J/cm²)
Werte bezogen auf die P0 Bande; Mittelwert ±SD (n=4)

	Phosphorylierungsmuster					
	Postinkubationzeitpunkt 24h					
	Kontrolle		Astaxanthin		Canthaxanthin	
	0 J/cm ²	10 J/cm ²	0 J/cm ²	10 J/cm ²	0 J/cm ²	10 J/cm ²
P3	n.n.	0,5±0,2	n.n.	n.n.	n.n.	0,3±0,2
P2	1,3±0,5	0,7±0,1	1,1±0,1	1,0±0,1	1,3±0,2	0,7±0,2
P1	0,8±0,1	0,6±0,1	1,1±0,2	1,0±0,2	0,7±0,2	0,5±0,1
P0	1	1	1	1	1	1

n.n. = nicht nachweisbar (P3≤0,2)

Subzelluläre Lokalisation von Cx43

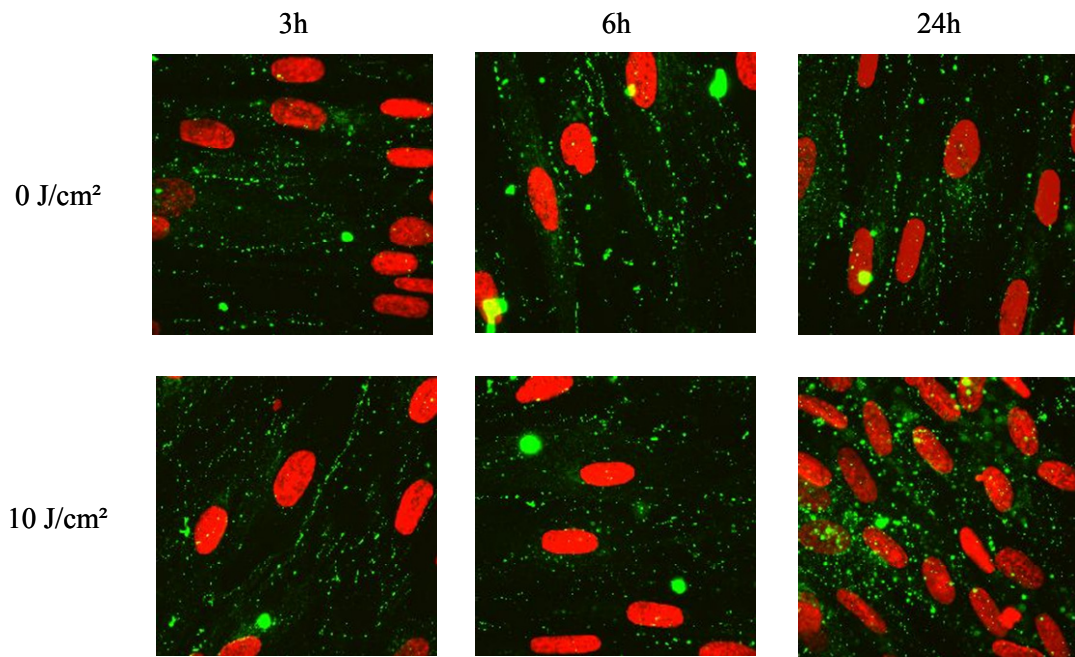


Abb. A-3 Subzellulären Verteilung von Cx43; unbestrahlte und bestrahlte mit Astaxanthin präinkubierte Zellen (UV-A 10 J/cm²) zu verschiedenen Postinkubationszeiten

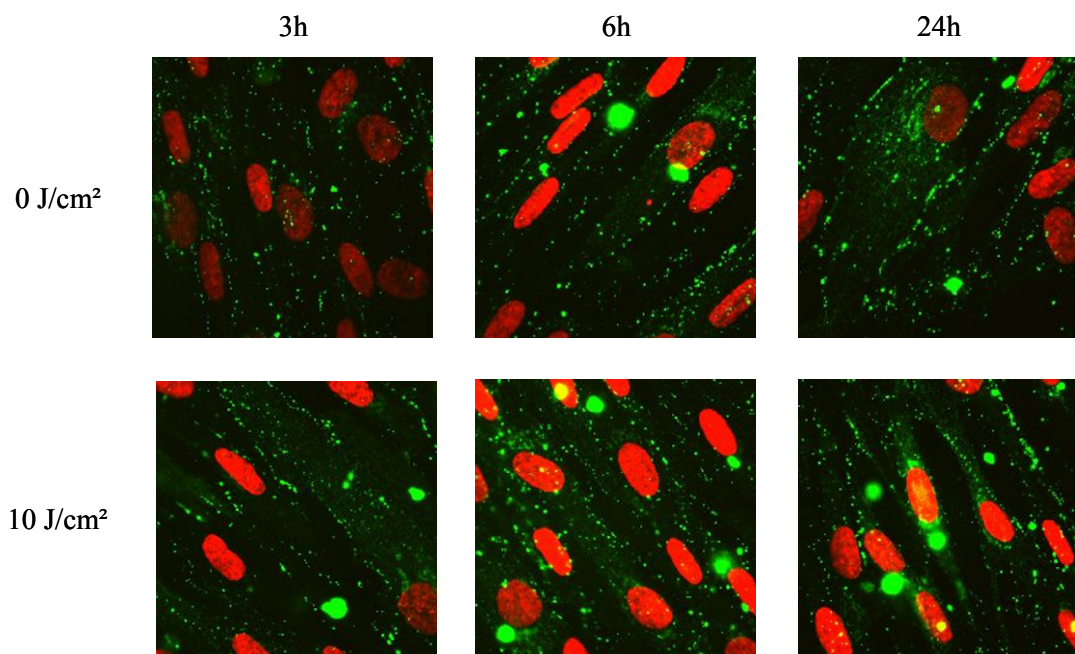


Abb. A-4 Subzellulären Verteilung von Cx43; unbestrahlte und bestrahlte mit Canthaxanthin präinkubierte Zellen (UV-A 10 J/cm²) zu verschiedenen Postinkubationszeiten

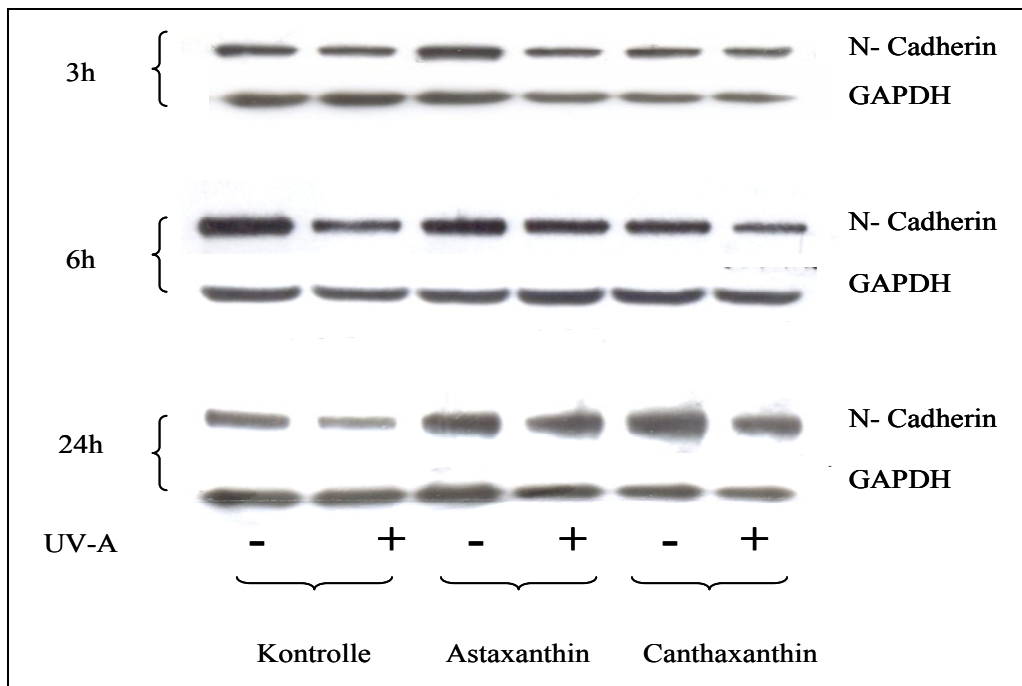
Expression von N-Cadherin und β -Catenin

Abb. A-5 Effekt von UV-A Bestrahlung (10 J/cm^2) und Präinkubation mit Astaxanthin und Canthaxanthin auf die Expression von N-Cadherin in HdF
exemplarische Darstellung von einem der drei durchgeführten Western Blots

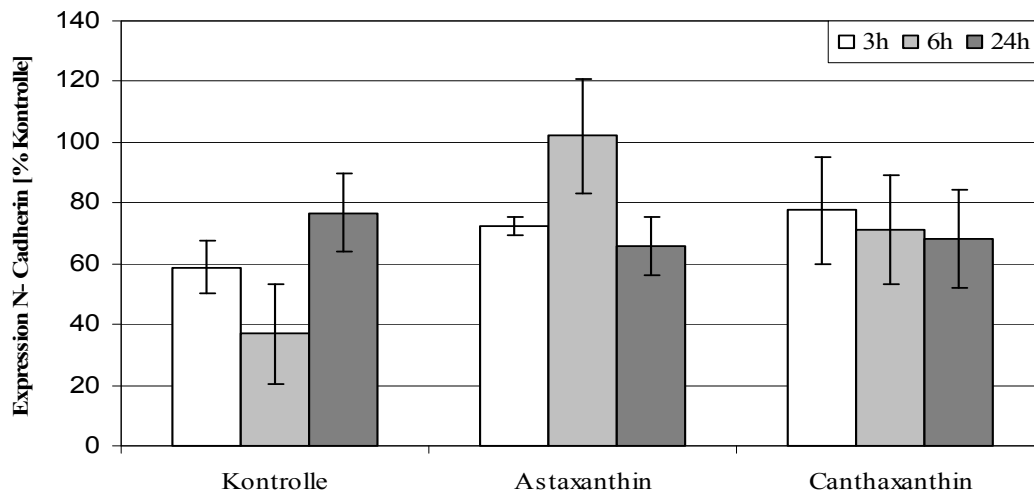


Abb. A-6 Expression von N-Cadherin in HdF nach Präinkubation mit Astaxanthin und Canthaxanthin und UV-A Bestrahlung (10 J/cm^2)
Densitometrische Auswertung der N-Cadherin Western Blots;
Gesamtexpressionen im Verhältnis zur unbestrahlten Kontrolle verschiedener Postinkubationszeiten; Mittelwert \pm SD ($n=3$)

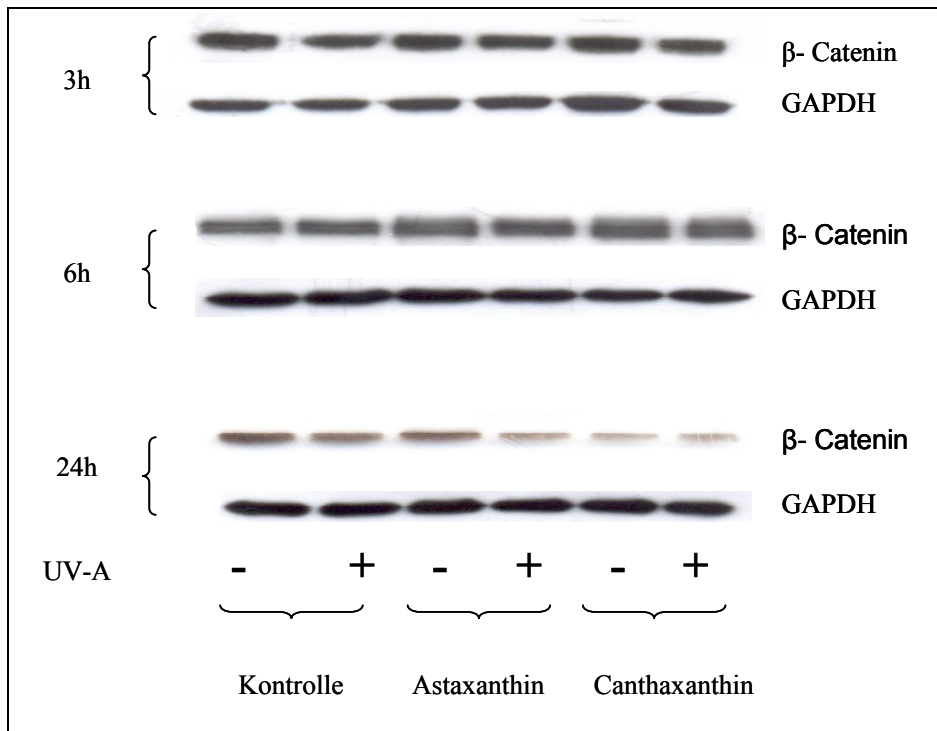


Abb. A-7 *Effekt von UV-A Bestrahlung (10 J/cm^2) und Präinkubation mit Astaxanthin und Canthaxanthin auf die Expression von β -Catenin in HdF exemplarische Darstellung von einem der drei durchgeführten Western Blots*

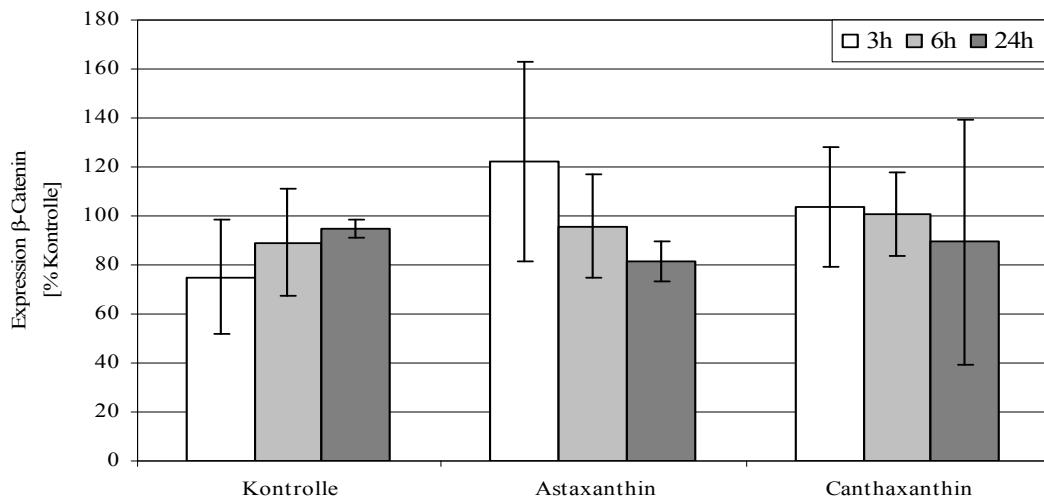


Abb. A-8 *Expression von β -Catenin in HdF nach Präinkubation mit Astaxanthin und Canthaxanthin und UV-A Bestrahlung (10 J/cm^2) Densitometrische Auswertung der β -Catenin Western Blots; Gesamtexpressionen im Verhältnis zur unbestrahlten Kontrolle verschiedener Postinkubationszeiten; Mittelwert \pm SD ($n=3$)*

Einfluss der UV-A Strahlung auf die subzelluläre Lokalisation von N-Cadherin

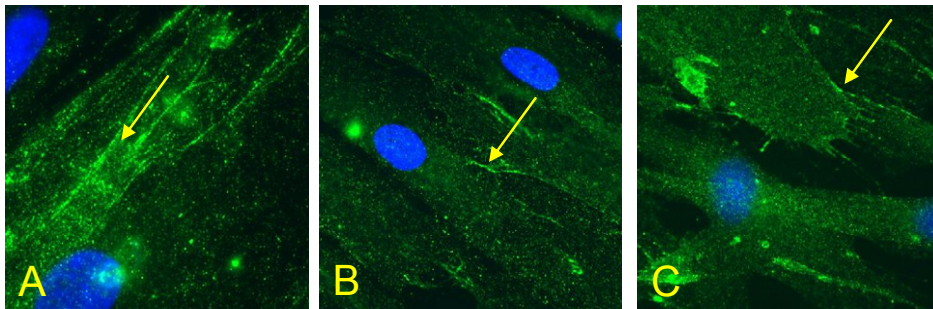


Abb. A-9 Subzellulären Verteilung von N-Cadherin, nach Inkubation mit den Carotinoiden Astaxanthin (B) und Canthaxanthin (C) im Vergleich zur Kontrolle (A); Gelber Pfeil: N-Cadherin in der Zellmembran

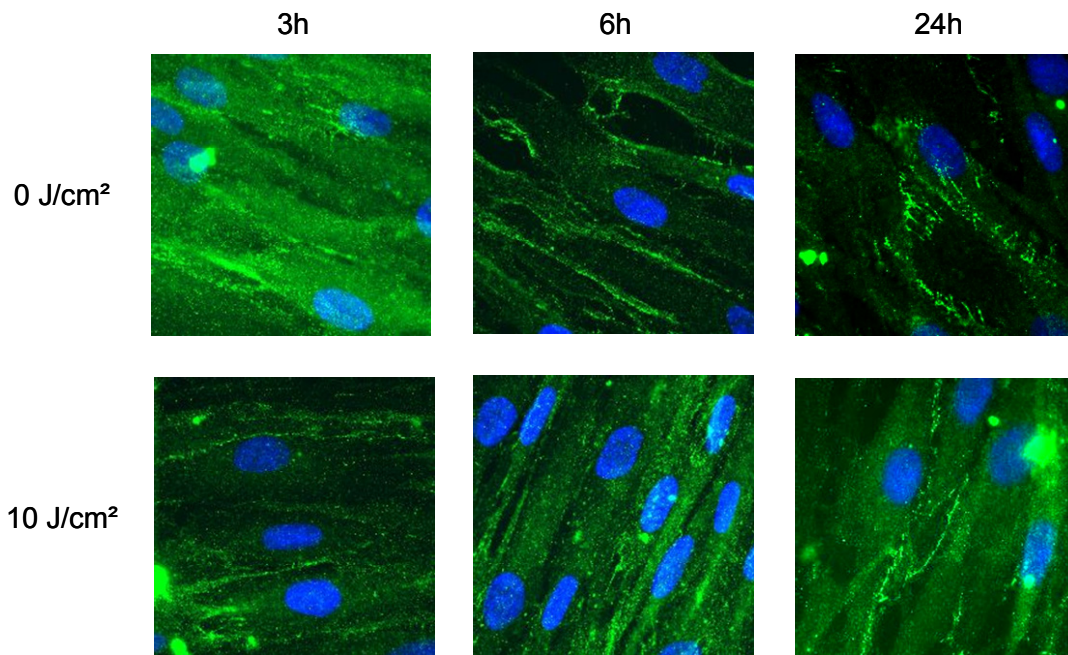


Abb. A-10 Subzellulären Verteilung von N-Cadherin; unbestrahlte und bestrahlte mit Astaxanthin präinkubierte Zellen (UV-A) zu verschiedenen Postinkubationszeiten

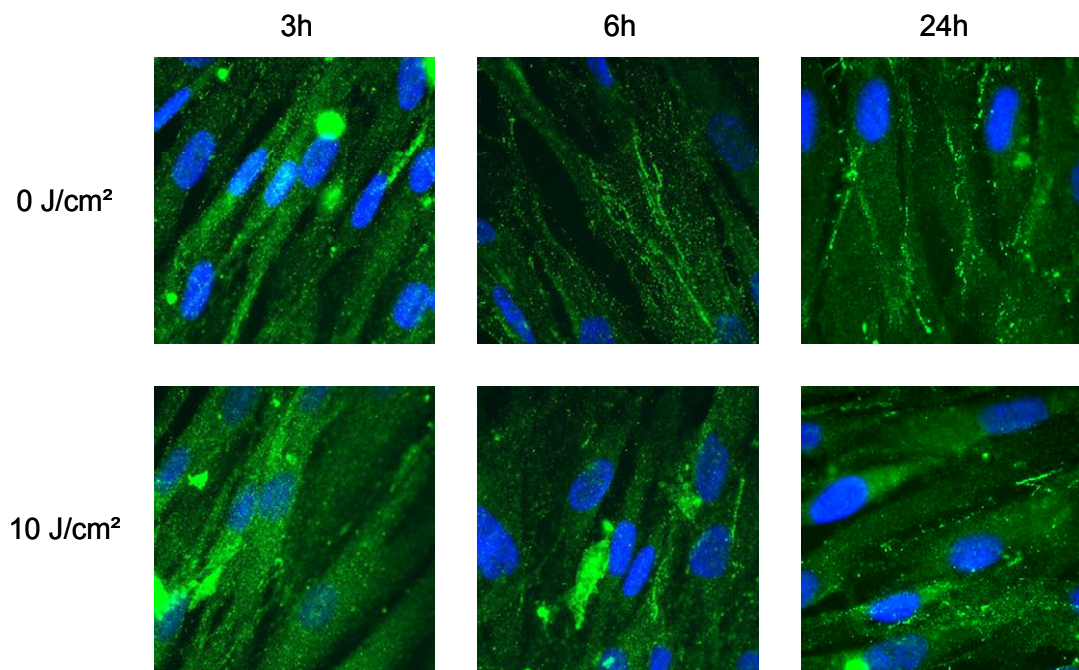


Abb. A-11 Verteilung von N-Cadherin; unbestrahlte und bestrahlte mit Canthaxanthin präinkubierte Zellen (UV-A) zu verschiedenen Postinkubationszeiten

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Die Arbeit wurde bisher keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegt und auch noch nicht veröffentlicht (Veröffentlichungen nach §4 (3) der Promotionsordnung bleiben hiervon ausgenommen).

Düsseldorf, 17.03.08

.....

Silke De Spirt