

**Carotinoide in liposomalen Systemen:
Pro- und antioxidative Eigenschaften und synergistische Wirkungen**

INAUGURAL-DISSERTATION

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

**vorgelegt von
Angelika Junghans
aus Plettenberg**

Düsseldorf, Juni 2000

„Dosis sola facit venenum“
Theophrastus Bombastus von Hohenheim
(1493-1541)

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
1.1	Carotinoide	1
1.1.1	Struktur und Reaktivität von Carotinoiden	2
1.1.2	Vorkommen von Carotinoiden	7
1.1.3	Resorption, Verteilung und Metabolismus von Carotinoiden	7
1.1.4	Die Rolle der Carotinoide in der Krankheitsprävention	10
1.1.5	Lutein und Zeaxanthin in der Macula lutea	12
1.2	Lipide	15
1.2.1	Struktur und Eigenschaften der Phospholipide	15
1.2.2	Lipiddoppelschichten und Liposomen	16
1.2.3	Orientierung und Wirkung von Carotinoiden in liposomalen Membranen	17
1.3	Problemstellung	19
2.	Material und Methoden	20
2.1	Chemikalien und Lösungsmittel	20
2.2	Geräte	20
2.2.1	HPLC-Analytik	20
2.2.2	UV/VIS Spektroskopie	21
2.2.3	Fluoreszenzspektroskopie	21
2.2.4	Transmissionselektronenmikroskopie	21
2.2.5	Extrusionsapparatur	21
2.2.6	Zentrifugen	22
2.2.7	Sonstige Geräte	22
2.3	Methoden	23
2.3.1	Präparation multilamellarer Liposomen	23
2.3.2	Präparation unilamellarer Liposomen	23
2.3.3	Präparation unilamellarer Liposomen beladen mit Glutathion oder Lucifer Gelb	24
2.3.4	Reinigung unilamellarer Liposomen von nicht eingeschlossenem Glutathion, bzw. Lucifer Gelb	24
2.3.5	Initiation der oxidativen Reaktionen	25
2.3.6	Analyse von thiobarbitursäurereaktiven Substanzen (TBARS); Malondialdehyd (MDA)	26

2.3.7	Glutathionanalyse	27
2.3.8	Carotinoidanalytik	28
2.3.9	Carotinoidstammlösungen	28
2.3.10	Carotinoidarbeitslösungen	28
2.3.11	Konzentrationsbestimmung von Carotinoiden und α -Tocopherol	29
3.	Ergebnisse	30
3.1	Multilamellare Liposomen	30
3.1.1	Antioxidative Wirkung verschiedener natürlicher Antioxidantien	30
3.1.2	Synergistische Wirkungen von Mischungen von Antioxidantien	32
3.1.3	Lutein und Lykopen: Ursache des synergistischen lipidprotektiven Effekts von Carotinoidkombinationen	34
3.1.4	Konzentrationsabhängigkeit am Beispiel von Lutein und β -Carotin	37
3.1.5	Der Konzentrationsverlauf verschiedener Carotinoide in multilamellaren Liposomen während der Inkubation mit AMVN	38
3.2	Unilamellare Liposomen	42
3.2.1	Antioxidatives und prooxidatives Verhalten verschiedener Carotinoide in unilamellaren Liposomen	42
3.2.2	Entwicklung einer Methode zur Präparation unilamellarer Liposomen beladen mit GSH	44
3.2.3	Charakterisierung der unilamellaren GSH-beladenen Liposomen	47
3.2.4	Wechselwirkung von hydrophilen und lipophilen Antioxidantien in unilamellaren Liposomen	49
3.2.5	Zeitabhängige Änderung verschiedener Oxidationsparameter in GSH-beladenen Liposomen während vierstündiger Inkubation mit AMVN	53
3.3	GSH-beladene Liposomen mit definierter Lipidzusammensetzung	70
3.3.1	Charakterisierung der 1,2-Dipalmitoyl- <i>sn</i> -Glycero-phosphatidylcholin-(DPPC)-Liposomen	70
3.3.2	Effekt von reaktiven Sauerstoffverbindungen auf GSH-beladene DPPC-Liposomen	73
3.3.3	UV/VIS-Spektren von Carotinoiden in liposomalen Membranen	80
3.4	Carotinoide als Blaulichtfilter im Modellsystem unilamellarer Liposomen	85
3.4.1	Lucifer-Gelb-beladene unilamellare Liposomen	85
3.4.2	Vergleich des Absorptions- und Emissionsspektrums von Lucifer Gelb in wässriger Lösung und eingelagert in Liposomen	87

3.4.3	Vergleich der Blaulichtfilteraktivität von Carotinoiden	92
4.	Diskussion	101
4.1	Antioxidative Wirkung von Einzelsubstanzen in multilamellaren Liposomen	101
4.2	Synergismus von Antioxidantien verschiedener Substanzklassen	103
4.3	Vergleich der Wirkung von Carotinoiden in multilamellaren und unilamellaren Liposomen	104
4.4	Liposomen beladen mit hydrophilen Substanzen	105
4.5	Antioxidative Wirkung von Carotinoiden und GSH in unilamellaren Liposomen	106
4.6	Lipidperoxidation und GSH-Verbrauch in unilamellaren Liposomen in Abhängigkeit von der Zeit	108
4.7	UV/VIS-Spektren von carotinoidhaltigen Liposomen	110
4.8	Zusammensetzung der Membran und Eigenschaften der Liposomen	111
4.9	Einfluß von Zeaxanthin auf die physikalischen Eigenschaften der DPPC-Membran	111
4.10	Lutein und Zeaxanthin als Blaulichtfilter	113
5.	Zusammenfassung	115
6.	Literatur	117

Abkürzungen

AMVN	2,2'-Azobis[2,4dimethylvaleronitril]
BHT	2,6-Di-tertiär-butyl-4-methylphenol
DPPC	1,2-Dipalmitoyl- <i>sn</i> -glycero-phosphatidylcholin
EDTA	Ethyldiamintetraessigsäure
GSH	Glutathion
GSSG	Glutathiondisulfid
HPLC	Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie
MDA	Malondialdehyd
TBARS	thiobarbitursäurereaktive Substanzen
THF	Tetrahydrofuran
UV	Ultraviolettstrahlung
VIS	sichtbarer Bereich der elektromagnetischen Strahlung

1. Einleitung

1.1 Carotinoide

Ausschließlich von Pflanzen und niederen Organismen synthetisiert, stellt die Substanzklasse der Carotinoide eine der wichtigsten Gruppen natürlicher Pigmente im Tier- und Pflanzenreich dar. Ob in Blütenblättern verschiedener Pflanzen, im Gefieder unterschiedlicher Vögel oder als Farbstoff in Früchten und Gemüse, ziehen sie die Aufmerksamkeit auf sich und sind von wissenschaftlichem Interesse. Schon die Chemiker des 19. Jahrhunderts erforschten nicht nur ihre Eigenschaften, sondern versuchten auch, die Funktionen der Carotinoide zu entschlüsseln. Bereits 1831 schlug Wackenroder den Namen „Carotin“ für das von ihm aus Möhren extrahierte Kohlenwasserstoffmolekül vor^[1]. Schon bald darauf stellte Berzelius seine aus Laub kristallin erhaltenen polarerer Verbindungen unter dem Namen „Xanthophylle“ vor^[2]. Schließlich nannte Tswett, der eine Vielzahl dieser Moleküle aus Pflanzen isolierte, die gesamte Pigmentgruppe „Carotinoide“^[3].

Bisher wurden über 600 Carotinoide charakterisiert. Ihre Funktionen sind so weitreichend wie unterschiedlich. Störungen in der Carotinoidsynthese höherer Pflanzen durch Mutationen führen zu ihrem Absterben^[4]. Carotinoide haben essentielle Bedeutung als Lichtabsorbentien und Photoprotektoren bei der Photosynthese von Pflanzen und Mikroorganismen^[5]. Für den menschlichen Organismus sind einige Vertreter der Carotinoide besonders aufgrund ihrer Provitamin-A-Wirkung relevant^[6]. Zusätzlich konnten durch epidemiologische Studien Hinweise auf ein verringertes Risiko, an verschiedenen degenerativen Krankheiten, insbesondere Herz-Kreislauf-Erkrankungen und Krebs, zu erkranken, verbunden mit dem Verzehr carotinoidreicher Nahrung gesammelt werden^[7-9]. Neben ihren antioxidativen Eigenschaften^[10-13] werden die Beteiligung von Carotinoiden an der Stimulation der Zell-Zell-Kommunikation (ZZK) und ihr Einfluß auf retinoidvermittelte Signalkaskaden als krebspräventive Wirkmechanismen diskutiert.

1.1.1 Struktur und Reaktivität von Carotinoiden

Die Substanzklasse der Carotinoide wird grundsätzlich in zwei Gruppen unterteilt. Reine Kohlenwasserstoffmoleküle werden den Carotinen zugeordnet, während die Xanthophylle^[14] (auch Oxocarotinoide) mindestens ein weiteres Sauerstoffatom enthalten (s. Abb.1).

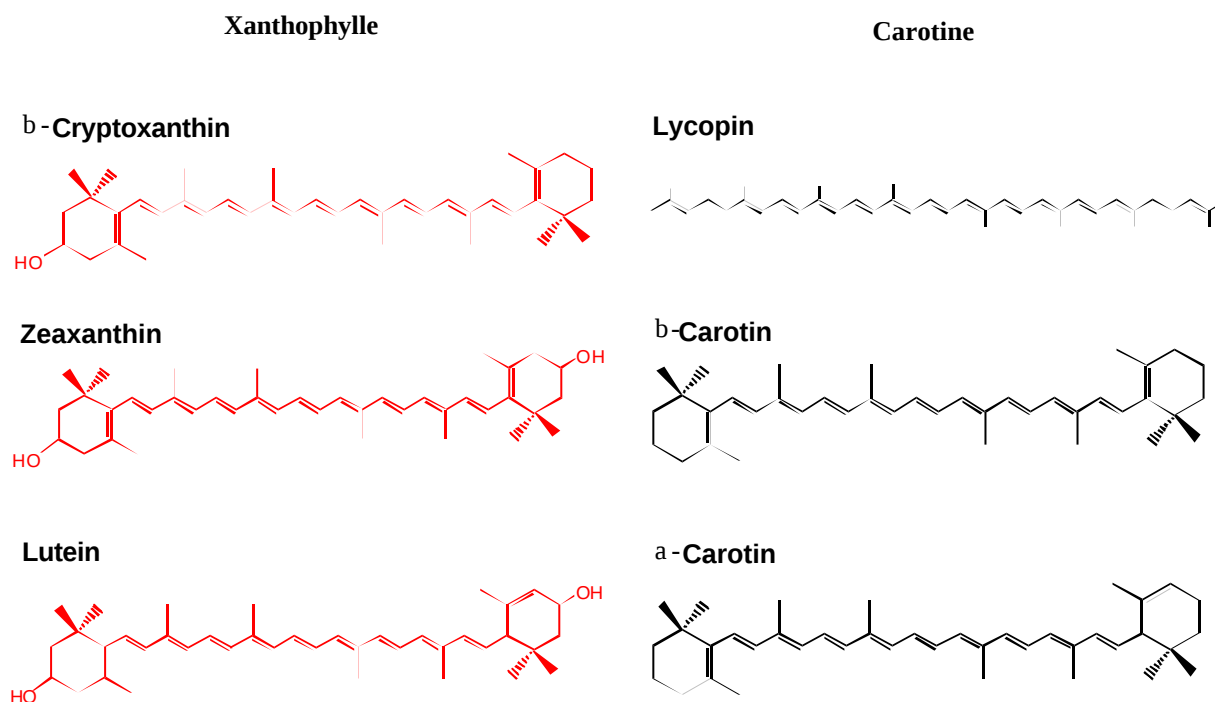


Abb. 1: Strukturformeln ausgewählter Carotinoide.

Dabei zählen zu den häufigsten Funktionen Hydroxy-, Oxo-, Epoxy- und Estergruppen^[15]. Aufgrund ihrer Struktur sind die Carotine extrem hydrophob und assoziieren in wässrigen Lösungen. Im Organismus findet man sie in lipophilen Kompartimenten, wie Biomembranen, im Inneren von Lipoproteinen oder assoziiert an hydrophobe Bereiche von Proteinen^[16]. Durch den Einbau eines oder mehrerer Sauerstoffatome sind die Xanthophylle weniger lipophil als die Carotine. Nicht zuletzt wird dadurch ihr Löseverhalten in organischen Lösungsmitteln und ihre Orientierung in Membranen beeinflusst. Es konnte gezeigt werden, daß Xanthophylle, wie z. B. Zeaxanthin oder Violaxanthin, die Membran senkrecht durchspannen. Dabei sind die sauerstoffhaltigen Endgruppen jeweils in den polaren Bereichen der Lipiddoppelschicht verankert^[17,18]. Die vollständig unpolaren Carotine, wie Lycopin oder β -Carotin, verbleiben im inneren Teil der Membran, wo sie über eine gewisse Beweglichkeit verfügen^[16].

Carotinoide entstehen durch die Kondensation von acht Isopreneinheiten. Sie besitzen in der Regel ein System von 9-13 konjugierten Doppelbindungen. Die intensive Farbe dieser Stoffklasse lässt sich auf das ausgedehnte Doppelbindungssystem zurückführen. Eine Verlängerung der Polyenkette durch zusätzliche Doppelbindungen führt zu einer bathochromen Verschiebung der Absorptionsbanden, da die für den $\pi \rightarrow \pi^*$ -Übergang benötigte Energie sinkt. Dieser Effekt lässt sich in Stufen vom Phytoen (3 konjugierte Doppelbindungen, $\lambda_{\max}$ 286 nm, farblos) bis zum Lycopin (11 konjugierte Doppelbindungen, $\lambda_{\max}$ 470 nm, dunkelrot) verfolgen. Die Torsion von Polyenkette und Endgruppen entzieht der π -Konjugation teilweise die endocyclischen Doppelbindungen. Als Folge wird eine Hypsochromie beobachtet^[19]. Die UV/VIS-Spektren der Carotinoide zeigen im allgemeinen drei charakteristische Absorptionsbanden (s. Abb. 2), deren Lage unter Berücksichtigung der Feinstruktur des Spektrums und den chromatographischen Eigenschaften zur vorläufigen Identifizierung dienen kann^[20]. *Cis*-Isomere (s. Abb. 3, S. 4) zeigen eine zusätzliche Absorptionsbande ca. 140 nm hypsochrom vom Absorptionsmaximum („*cis*-Peak“; s. Abb.2).

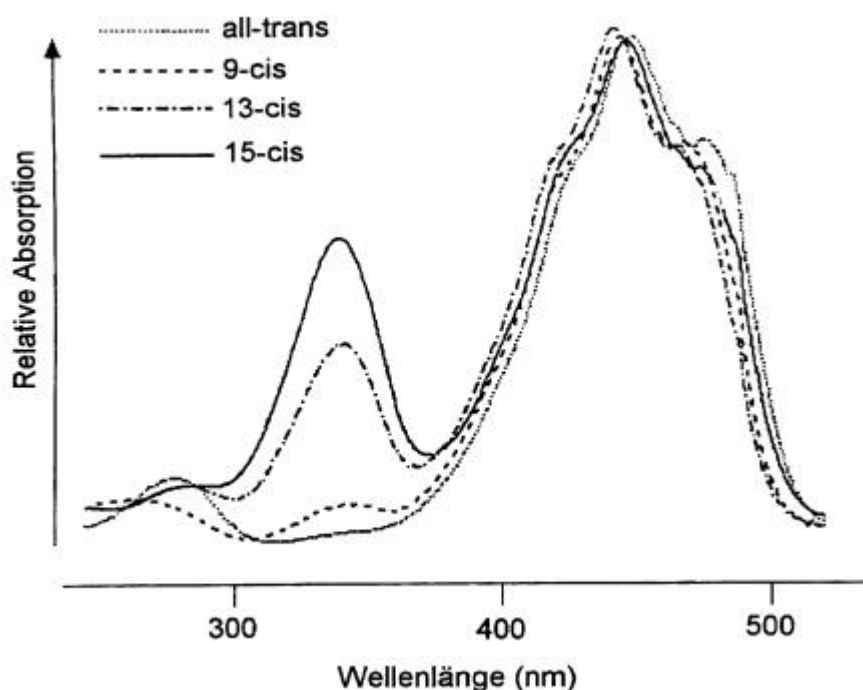


Abb. 2: UV/VIS-Spektren von *all-trans* β -Carotin und ausgewählten *cis*-Isomeren in $\text{CH}_3\text{CN}/\text{CH}_3\text{OH}/\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{n-Hexan}$ (85:5:5:5).

15 - *cis* b - Carotin

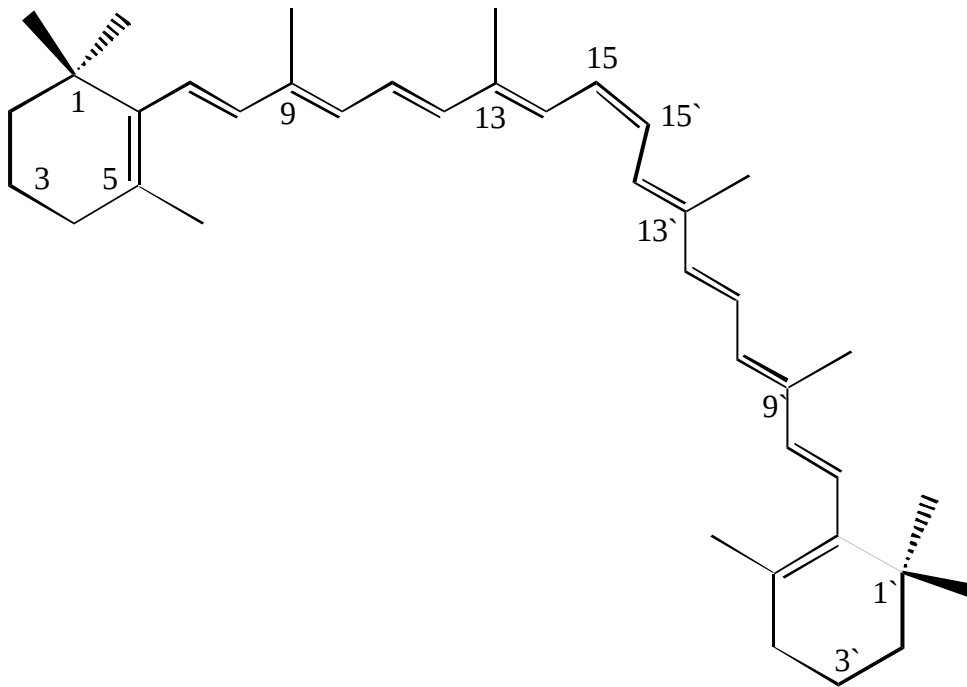


Abb. 3: Beispiel eines *cis*-Isomers des β -Carotins.

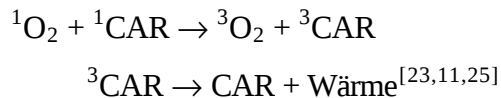
Je näher die *cis*-konfigurierte Doppelbindung am Molekülzentrum liegt, desto stärker wird die Intensität dieser Absorptionsbande. Kombiniert mit einer hypsochromen Verschiebung der Absorptionsmaxima ist es daher möglich, aus UV/VIS-Spektren Rückschlüsse auf die *cis/trans*-Konfiguration des Carotinoids zu ziehen^[21].

Das Gerüst des Lycopins zeigt den Grundbaustein der Carotinoide^[16]. Abgeleitet von diesem Molekül werden folgende Variationen beobachtet:

1. Cyclisierung einer (γ -Carotin) oder beider Endgruppen (β -Carotin),
2. Einführung von Sauerstoff (Zeaxanthin) oder
3. Unterschiedliche Anzahl der Doppelbindungen (Phytofluene).

Die Struktur der Carotinoide ermöglicht deren Teilnahme am intermolekularen Energietransfer. Sie stellen für Pflanzen wichtige Schutzfaktoren während der Photosynthese dar^[22]. Ein Energietransfer von angeregten Chlorophyllmolekülen oder anderen Porphyrinen zu den Carotinoiden findet leichter statt, als ein vergleichbarer Übergang zum Sauerstoff. So kann die unerwünschte Bildung von hochreaktivem Singulett-Sauerstoff verringert werden^[16]. Carotinoide senken nicht nur die Bildung von Singulett-Sauerstoff, sondern sind auch in der

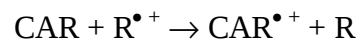
Lage, diesen zu desaktivieren^[23]. Dabei nehmen sie von $^1\text{O}_2$ Energie auf und geben diese in Form von Wärme an die Umgebung ab.



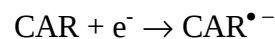
Bedingung für einen effektiven Energietransfer ist die räumliche Nähe der beteiligten Moleküle und eine passende Orientierung des Carotinoids. Diese kann z. B. durch eine Bindung an ein Lipid oder Protein gewährleistet werden^[22].

Zur Bewertung der antioxidativen Wirkung von Carotinoiden müssen die Reaktionswege mit reaktiven Molekülen betrachtet werden. Der Reaktion von Carotinoiden mit freien Radikalen wurde viel Aufmerksamkeit geschenkt. Die Produkte solcher Umsetzungen führen meist auf verschiedenen Wegen zu Carotinoidradikalen^[16].

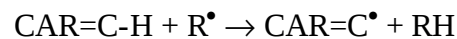
1. Oxidation: Ein Radikal mit hohem Redoxpotential entfernt ein Elektron aus dem Carotinoid. Es entsteht ein Carotinoidradikalkation.



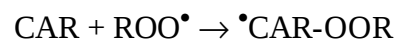
2. Reduktion: Die Aufnahme eines Elektrons führt zu einem Carotinoidradikalanion.



3. Abstraktion eines Wasserstoffatoms: Die Abstraktion eines Wasserstoffatoms von einem Kohlenstoffatom in allylischer Stellung generiert ein resonanzstabilisiertes neutrales Radikal.



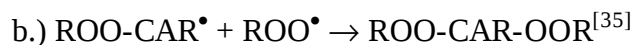
4. Additionsreaktion: Die Addition einer radikalischen Spezies, z. B. des Peroxylradikals $\text{ROO}^{\bullet}$, an ein Carotinoidmolekül bildet ein Carotinoid-Adduktradikal.



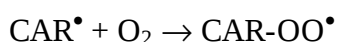
Allgemein gilt für alle Carotinoidradikale, daß das ungepaarte Elektron über die konjugierte Polyenkette delokalisiert ist, was nicht nur eine Stabilisierung ermöglicht, sondern auch Folgereaktionen erlaubt^[26]. Dadurch läßt sich die extrem kurze Lebensdauer einer solchen Spezies begründen. Anionische oder kationische Radikale lassen sich durch ihre intensive Absorption im nahen Infrarotbereich nachweisen^[27,28].

Eine wichtige chemische Reaktion von Carotinoiden ist deren Oxidation. Durch ihre elektronenreiche Polyenkette sind sie elektrophilen Angriffen ausgesetzt. So werden reine Carotinoide im kristallinen Zustand schon in Anwesenheit von Spuren von Sauerstoff oxidativ abgebaut. Selbst in vivo, stabilisiert von Lipiden und Proteinen, sind sie immer noch anfällig gegen oxidierende Spezies. Ein typisches Merkmal des Carotinoidabbaus ist das Bleichen der Probe durch den Verlust des Chromophors. Der oxidative Abbau kann auch durch Radikale oder Singulett-Sauerstoff initiiert werden^[11]. In zahlreichen Studien zur Aufklärung der antioxidativen Eigenschaften von Carotinoiden werden Peroxylradikale durch „Azoinitiatoren“, wie z. B. 2,2'-Azobis[2,4-dimethylvaleronitril] (AMVN), über kontrollierten thermischen Zerfall^[29] oder Pulsradiolyse^[30,31] erzeugt. Dabei werden unter anderem die Abbauprodukte (Apocarotenale, Apocarotinoone, Carotinoidepoxide^[32,33]) untersucht. Die Primärprodukte einer solchen Oxidation können wegen ihrer Kurzlebigkeit meist nicht isoliert werden.

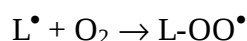
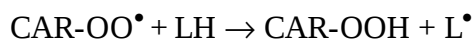
Ein mögliches Beispiel einer solchen Folgereaktion schlugen Burton und Ingold 1984^[34] vor. An die Reaktion von β -Carotin mit einem Peroxylradikal schließt sich direkt eine weitere Addition an:



Bei niedrigem Sauerstoffpartialdruck werden durch diese Umsetzung Peroxylradikale verbraucht und das Carotinoid wirkt als Antioxidans. Bei höherem Sauerstoffgehalt im Reaktionsmedium kehrt sich diese Eigenschaft um. Das Carotinoidradikal reagiert mit dem freien Sauerstoff und es entsteht ein Carotinoidperoxylradikal, das prooxidativ wirksam ist^[36,37].



Ein Beispiel für den prooxidativen Charakter solcher Reaktionen ist die anschließende Initiation der Lipidperoxidation ungesättigter Fettsäuren (LH) als mögliche Folge^[33]:



Die Reaktion mit Radikalen oder anderen oxidierenden Substanzen ist charakteristisch für alle Carotinoide. Die Reaktivität ist jedoch von der Länge der Polyenkette abhängig^[16]. Es existieren, bedingt durch die ungleichmäßige Elektronendichte im Molekül, bevorzugte Angriffsorte für elektrophile Angriffe, die durch gezielte Epoxidierung bestimmt werden können^[38].

1.1.2 Vorkommen von Carotinoiden

Mensch und Tier sind nicht in der Lage, Carotinoide zu synthetisieren. Sie sind auf die Versorgung durch die Nahrung angewiesen. Hauptcarotinoidquellen für den Menschen sind Obst und Gemüse.

Die Carotinoide der roten bis gelben Früchte und Gemüsearten liegen in den verschiedenen Chromoplastentypen vor^[39]. Die meisten Früchte und Gemüse enthalten ein breites Spektrum an Carotinoiden. β -Carotin findet sich in fast allen Nahrungsmitteln. Beispiele für Pflanzen, die spezifische Carotinoide anreichern, sind Tomate (Lykopen), Karotte (α -Carotin)^[40-42], Zitrusfrüchte (β -Cryptoxanthin)^[43-45] oder Mais (Zeaxanthin)^[42].

In grünen Gemüsesorten, wie Broccoli oder Spinat, sind die Carotinoide in den Chloroplasten lokalisiert. Hier sind hauptsächlich die sogenannten Hauptchloroplastencarotinoide, Neoxanthin, Violaxanthin, Lutein und β -Carotin nachweisbar^[46,47].

Die Beschaffenheit der biologischen Matrix, in der die Carotinoide in den unterschiedlichen Obst- bzw. Gemüsesorten eingebunden sind, beeinflusst auch ihre Resorption und damit die Bioverfügbarkeit^[16,48].

Chloroplastencarotinoide, wie Lutein und β -Carotin, gelangen über die Nahrungskette in den tierischen Organismus und werden auch über Butter, Milch und Eigelb vom Menschen aufgenommen^[49,50]. In der Nahrungsmittelindustrie finden Carotinoide breite Anwendung als Farbstoffe und Futtermittelzusätze^[51]. Allgemein sind auch Carotinoidsupplementierungen gebräuchlich^[52].

1.1.3 Resorption, Verteilung und Metabolismus von Carotinoiden

Die Aufnahme von Carotinoiden in den Organismus folgt dem Weg der Lipidaufnahme^[53-55]. Die Resorption ist teilweise gering; 50-98% der Carotinoide werden nicht resorbiert^[53]. Dabei ist einer der wichtigsten limitierenden Faktoren für ihre Bioverfügbarkeit die Freisetzung aus der biologischen Matrix^[55,56]. Hier spielt nicht nur die Assoziation der Carotinoide an Nahrungsbestandteilen eine Rolle, sondern auch die durch Kauen und enzymatischen Verdau erhaltene Partikelgröße der Matrix. Auch Kochen verbessert die Carotinoidaufnahme, wie anhand der Resorption des Lycopins aus Tomatenprodukten gezeigt werden konnte^[57,58]. Vermutlich ist dieser Effekt auf Dissoziationseffekte oder Schwächung der Interaktion des Carotinoid-Proteinkomplexes zurückzuführen^[55]. Herausgelöst aus ihrer biologischen Matrix,

verteilen sich die lipophilen Carotinoide in den im Gastrointestinaltrakt gebildeten Fetttropfchen (s. Abb. 4).

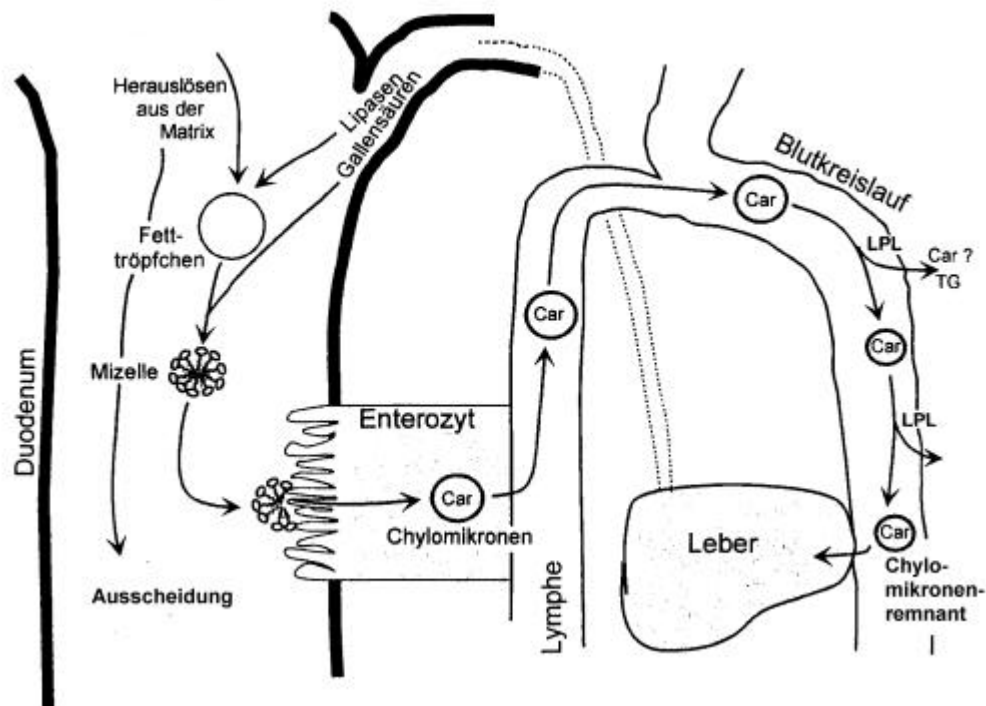


Abb. 4: Carotinoidresorption aus der Nahrung (Car: Carotinoid, LPL: Lipoproteinlipase, TG: Triglycerid) ^[55].

Diese werden durch Emulgation von Nahrungsfetten im Magen und Duodenum gebildet ^[55]. Die an deren Oberfläche angreifende Pankreaslipase spaltet Triglyceride in Monoglyceride, welche danach zusammen mit Gallensäuren Mizellen bilden ^[59]. An Modellsystemen konnte nachgewiesen werden, daß Mizellen über eine begrenzte β -Carotinaufnahmekapazität verfügen ^[60]. Dabei muß berücksichtigt werden, daß der Einbau verschiedener Carotinoide bedingt durch deren unterschiedliche Strukturen nicht einheitlich ist. Nach Wanderung der Mizellen zur Darmwand werden die lipophilen Bestandteile von den dort befindlichen Enterozyten über passive Diffusion aufgenommen ^[61-63] (vergl. Abb.4). Aufgrund der hydrophoben Eigenschaften der Carotinoide muß für eine Aufnahme in die Mucosazellen ein Kontakt zwischen deren Membran und den Mizellen hergestellt werden. Daher können fasrige oder unverdauliche fettähnliche Stoffe, die die Mobilität der Mizellen im Darm beeinträchtigen, die Carotinoidaufnahme herabsetzen ^[64,65]. Wechselwirkungen der Carotinoide untereinander bei der Resorption werden ebenfalls diskutiert ^[66]. So wurde gezeigt, daß eine Gabe von Canthaxanthin oder Lycopin in hohen Dosen die

Plasmakonzentration an β -Carotin beim Menschen und Frettchen verminderte^[67,68]. Der Mechanismus des intrazellulären Transports zum endoplasmatischen Reticulum und Golgi-Apparat ist zur Zeit Thema verschiedener Forschungsprojekte. Im Gegensatz zum Retinol sind für Carotinoide bisher keine spezifischen Transportproteine beschrieben worden^[69]. Die Tatsache, daß der menschliche Organismus eine Vielfalt von strukturell unterschiedlichen Carotinoiden resorbiert, läßt auf einen unspezifischen Transport schließen. Bei hoher Carotinoidzufuhr ist eine Sättigung des Carotinoidplasmaspiegels zu beobachten. Diese kann entweder auf den begrenzten mizellären Transport oder auf die limitierte intrazelluläre Translokation zurückzuführen sein^[55]. Im Golgi-Apparat befindliche Carotinoide werden gemeinsam mit Triglyceriden, Cholesterin, Retinylestern und Apolipoproteinen zu Chylomikronen assoziiert und gelangen anschließend über das Lymphsystem in den Blutkreislauf^[63]. In der Leber werden sie in Lipoproteine eingebaut. Die Struktur und Polarität der Carotinoide beeinflusst auch ihren Transfer in Lipoproteine. Im Humanblut läßt sich ein Gemisch an Carotinoiden detektieren, wobei α -Carotin, β -Carotin, Lycopin, β -Cryptoxanthin, Zeaxanthin, Lutein und 2',3'-Anhydrolutein den Hauptanteil stellen. Die Verteilung einiger Carotinoide in verschiedene Lipoproteine wurde mit Hilfe der Ultrazentrifugation und anschließender HPLC-Auftrennung untersucht^[70,71]. Die unpolaren Verbindungen β -Carotin, α -Carotin und Lycopin wurden hauptsächlich (58-73%) in den „low-density“ Lipoproteinen (LDL) detektiert. Lutein und Zeaxanthin wurden vorwiegend (53%) in den „high-density“ Lipoproteinen (HDL) gefunden, während sich β -Cryptoxanthin gleichmäßig auf LDLs und HDLs verteilte. Aufgrund dieser Verteilung kann davon ausgegangen werden, daß die Strukturcharakteristika der Carotinoide den Einbau in Lipoproteinen mit spezieller Lipidzusammensetzung bestimmen^[55]. Die Gründe hierfür sind zur Zeit noch ungeklärt.

β -Carotin wird in den Enterozyten mit Hilfe von Enzymen und molekularem Sauerstoff metabolisiert. Dabei werden zwei Wege vorgeschlagen (s. Abb. 5, S. 10):

1. die zentrale Spaltung durch eine 15,15'-Dioxygenase^[6] zu zwei Molekülen Retinal, die weiter zu Retinol oder Retinsäure reduziert, bzw. oxidiert werden können. Die 15,15'-Dioxygenase konnte bisher noch nicht isoliert werden; Enzymanreicherungen zeigen eine Aktivität ausschließlich gegenüber den Provitamin-A-Carotinoiden^[72].
2. der Abbau des Moleküls von der Peripherie, welcher zu Apo-Carotenalen führt. Endprodukte können hier, wie im ersten Fall, Retinol und Retinsäure sein^[73,74].

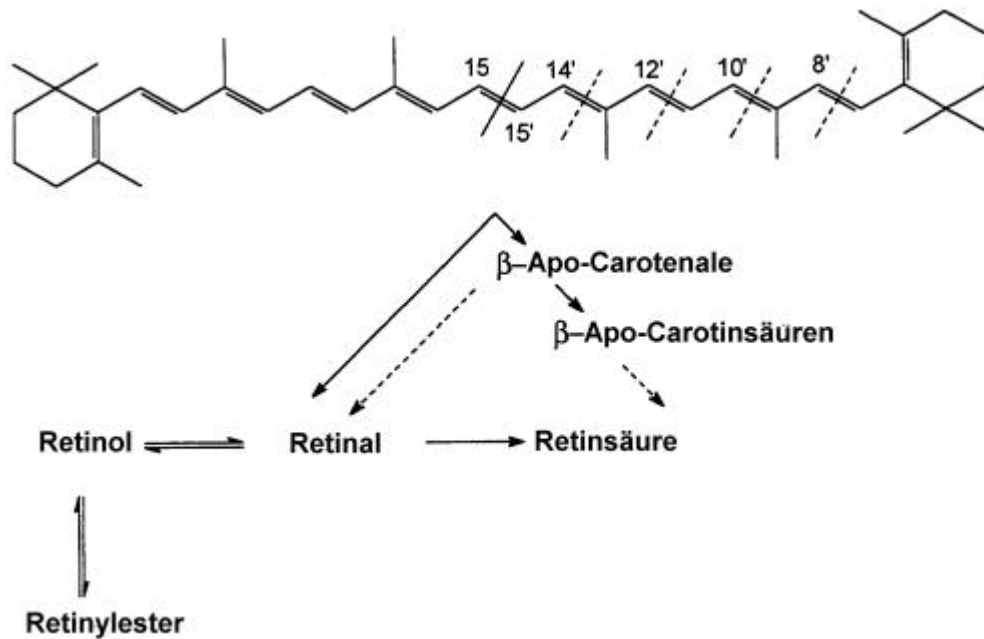


Abb. 5: Abbauwege von β -Carotin im Organismus.

Untersuchungen zeigten, daß der Abbau von β -Carotin zu Vitamin A kontrolliert verläuft. Er ist sowohl von der Konzentration des bereits vorhandenen Vitamin A^[75], als auch von der Menge des zugeführten β -Carotins abhängig^[75]. Quantitative Zusammenhänge zwischen der β -Carotinaufnahme und der Vitamin-A-Bildung sind noch unklar. Zu Beginn der 90er Jahre wurden erstmals Tiermodelle (Frettchen, präruminante Kälber) etabliert, deren Carotinoidmetabolismus dem des Menschen ähnelt^[76-78]. Durch Verwendung von Isotopen kombiniert mit hochauflösender Massenspektrometrie können quantitative Studien zu Resorption und Abbau der Carotinoide durchgeführt werden^[75,79].

1.1.4 Die Rolle der Carotinoide in der Krankheitsprävention

Es wird angenommen, daß reaktive Sauerstoffspezies, wie Wasserstoffperoxid (H_2O_2) oder das Hydroxyl -, Peroxyl - und Nitrosylradikal ($\text{OH}^\bullet$, $\text{ROO}^\bullet$, bzw. $\text{NO}^\bullet$), die unter anderem in physiologischen Prozessen erzeugt werden, durch Schädigung von DNA, Proteinen und Lipiden an der Pathogenese von Krebs, Arteriosklerose, sowie altersbedingter Maculadegeneration (AMD) beteiligt sind^[80,81]. So konnte gezeigt werden, daß sie oxidative Schäden an der DNA, wie Strangbrüche oder Basenmodifikationen, hervorrufen^[82]. Durch die Oxidation von Lipiden kann sowohl die Membranintegrität gestört, als auch die Funktion von LDLs beeinträchtigt werden. Diese Prozesse werden mit vorzeitigem Altern^[83,84] und

kardiovaskulären Krankheiten^[85] in Verbindung gebracht. Als Antioxidantien sind Carotinoide in der Lage, Radikale und Singulett-Sauerstoff^[86,87] zu deaktivieren. Verschiedene epidemiologische Studien zeigten, daß positive Gesundheitseffekte^[88] verbunden sind mit der erhöhten Aufnahme von Obst und Gemüse, das reich an Carotinoiden ist. Es wird vermutet, daß ein Zusammenhang besteht zwischen Krankheitsprävention und der antioxidativen Wirkung^[89-91]. So korreliert z. B. ein hoher Serumgehalt an Lycopin mit einem verminderten Prostatacarcinomrisiko^[92] und dem verminderten Risiko eines myokardialen Infarkts^[93]. Weitere Studien belegen, daß ein erhöhter Serumcarotinoidspiegel mit erniedrigtem Krebsrisiko einhergeht^[94-97]. Versuche mit Tieren und Zellkulturen bestätigen die anticancerogenen und antimutagenen Eigenschaften dieser Stoffklasse^[98,99]. So hemmt Lycopin in verschiedenen humanen epithelialen Krebszelllinien^[100] und unterschiedlichen Tiermodellen^[101,102] die Zellproliferation, bzw. die Initiation und Progression von Tumoren sogar stärker als β -Carotin.

Jedoch lieferte die 1994 veröffentlichte Alpha Tocopherol, Beta-Carotene-Studie (ATBC)^[103] gegensätzliche Ergebnisse. Es wurde eine deutlich erhöhte Lungencarcinominzidenz bei männlichen Rauchern festgestellt, denen über einen längeren Zeitraum hohe β -Carotindosen verabreicht wurden. Der US Carotene und Retinol Efficiency Trial (CARET)^[104] ergab ähnliche Ergebnisse nach β -Carotinsupplementierung. Die Einnahme einer Mischung aus β -Carotin und Retinol steigerte ebenfalls die Lungentumorinzidenz von Rauchern um 28%.

Die Gründe für diese unerwarteten Ergebnisse bei β -Carotinsupplementierung müssen weiter untersucht werden^[105], um die Effekte von Carotinoiden auf die Gesundheit besser abschätzen zu können. Es wird vermutet, daß bei hohen Gaben von β -Carotin Wechselwirkungen mit Signalkaskaden^[106-108] und prooxidative Effekte auftreten^[109].

Lowe et al. zeigten, daß lediglich niedrige Dosen von β -Carotin und Lycopin HT29-Zellen vor oxidativen Schäden an DNA und Membran schützen^[110]. Mit steigender Dosis nehmen die protektiven Effekte ab.

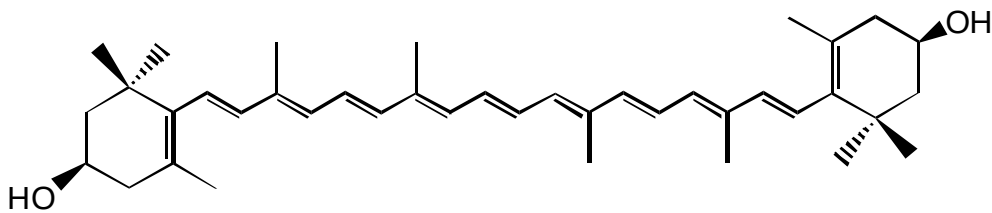
Dieser Befund stimmt auch mit dem Ergebnis der Arbeitsgruppe von Cook überein^[111]. Es konnte gezeigt werden, daß eine Gabe von β -Carotin das Prostatakrebsrisiko von Probanden mit niedrigem Carotinoidserumgehalt absenkt. Im Gegensatz zur ATBC und CARET Studie liegt hier zu Beginn des Versuchs ein „Carotinoiddefizit“ vor, und die Serumkonzentration wird durch Supplementierung auf normales bis leicht erhöhtes Niveau angehoben. Extrem hohe Carotinoidwerte, wie bei der ATBC oder CARET Studie, werden nicht erreicht, wodurch möglicherweise die bei hohen Konzentrationen beobachteten negativen Wirkungen nicht zur Geltung kommen.

Eine Korrelation zwischen dem Plasmagehalt an Hydroxycarotinoiden und dem Auftreten von koronaren Herzkrankheiten wurde durch Howard et al.^[112] erstellt. In einer Studie verglich er den Carotinoidgehalt und das Carotinoidmuster im Blut von Testgruppen aus Toulouse und Belfast. Es wurde eine verminderte Herzkrankungsinzidenz verbunden mit einem höheren Serumspiegel der Hydroxycarotinoide bei der „Toulouse-Gruppe“ festgestellt.

1.1.5 Lutein und Zeaxanthin in der Macula lutea

Den im Blut vorkommenden Carotinoiden Lutein und Zeaxanthin wird eine weitere physiologisch wichtige Rolle zugeschrieben. Zusammen mit meso-Zeaxanthin, (3R,3'S)- β,β -Carotin-3,3'-diol (s. Abb. 6), stellen sie die einzigen in der Retina und Macula lutea (gelber Fleck) des menschlichen Auges vorkommenden Carotinoide dar^[113,114].

Zeaxanthin



meso - Zeaxanthin

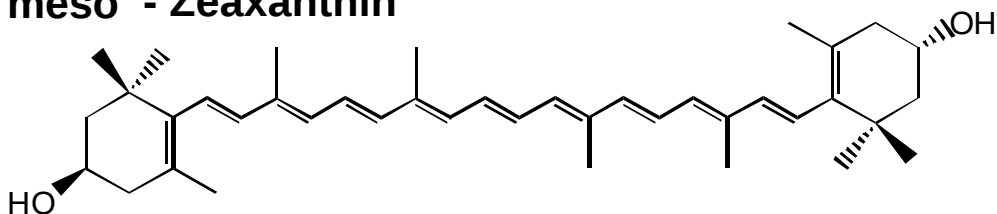


Abb. 6: Strukturunterschied zwischen Zeaxanthin und meso-Zeaxanthin.

Ihnen verdankt der „gelbe Fleck“ seinen Namen (s. Abb. 7, S. 13). Diese Xanthophylle sind assoziiert mit den Photorezeptoren der menschlichen Retina^[115] und liegen somit im Lichtweg vor dem funktionellen Teil der Photorezeptorzellen^[116].

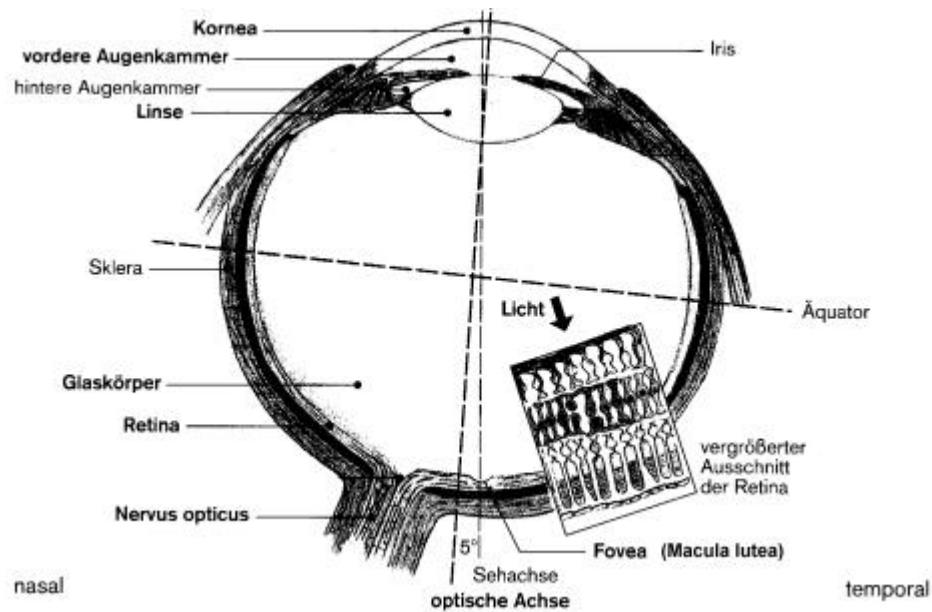


Abb. 7: Aufbau des menschlichen Auges und Lage des gelben Flecks.

Die in das menschliche Auge einfallende Strahlung wird durch verschiedene Gewebe absorbiert. Während die Kornea die UV-B-Strahlung filtert, absorbiert die Linse UV-A-Strahlung. Das Blaulicht hingegen fällt auf die Retina. Aufgrund ihres Absorptionsmaximums in diesem Bereich sind Carotinoide vermutlich im Stande, die gegen Blaulicht hochempfindlichen Photorezeptoren zu schützen^[117,118]. Experimente mit Kaninchenretinazellen zeigten, daß die Exposition mit Blaulicht eine Störung der Blut-Retina-Schranke bewirkt^[119]. Lipofuscin, das während des Alterungsprozesses in das Retinapigmentepithel eingelagert wird, steigert die Anfälligkeit gegenüber Blaulicht, da es als Photosensibilisator wirkt^[120].

Die Strahlung ist im Stande über Reaktionen, wie z. B. Photooxidation, akute und chronische Läsionen der Retina hervorzurufen^[123]. Über die Absorption von Blaulicht durch photosensitive Stoffe können hochreaktive Spezies, u. a. Singulett-Sauerstoff oder Hydroxylradikale, erzeugt werden, welche mit ungesättigten Fettsäuren, wie sie in den Außensegmenten der retinalen Photorezeptoren zu finden sind, reagieren^[124].

Carotinoide besitzen zwei wichtige Eigenschaften:

- a) die Fähigkeit, Singulett-Sauerstoff zu deaktivieren^[124,163,125] und
- b) ihre Reaktivität gegenüber anderen reaktiven Sauerstoffspezies, wie Peroxylradikalen^[34,126,149].

Es wird vermutet, daß Lutein und Zeaxanthin auch aufgrund ihrer antioxidativen Wirkung in die Retina eingelagert werden^[122].

Die altersbedingte Maculadegeneration (AMD) ist eine irreversible Degeneration des Pigmentepithels, die in schweren Fällen zur Blindheit führen kann. Die Pathogenese dieser Krankheit ist noch unklar. Vermutlich spielen Oxidationsreaktionen eine wichtige Rolle. Da die Retina über eine hohe metabolische Aktivität verfügt, ist der Blutstrom ebenso wie der Sauerstoffpartialdruck im Vergleich zu anderen Geweben hoch. Eines der Ziele des oxidativen Angriffs stellen die ungesättigten Fettsäuren dar, die ein wichtiger Bestandteil der Photorezeptoren^[124] und des Pigmentepithels sind. Dessen Schädigung führt zur Entstehung der AMD.

Es wird vermutet, daß Lutein und Zeaxanthin als in der Macula lutea lokalisierte Carotinoide die Entwicklung einer AMD verlangsamen^[122,127,128]. Zwar unterscheidet sich die Lutein- und Zeaxanthinblutkonzentration der AMD-Patienten nicht von der der Kontrollen^[129], jedoch ist die Dichte dieser Pigmente in der Retina der Erkrankten niedriger als in denen gesunder Menschen^[121]. Eingebaut in Lipidmembranen zeigen sowohl Lutein, als auch Zeaxanthin einen Schutz vor UV-induzierter Oxidation^[130]. Unterstützt wird die Vermutung durch eine Untersuchung der Eye Disease Case-Control Study Group^[131], bei der eine gesteigerte Aufnahme von carotinoidreicher Nahrung, insbesondere von grünem Blattgemüse, das Risiko, an AMD zu erkranken, senkte. Dunkelgrüne Gemüsesorten sind eine Hauptquelle der Maculapigmente Lutein und Zeaxanthin^[132].

1.2 Lipide

Fette und fettähnliche Stoffe werden als Lipide bezeichnet. Bei den Phospholipiden handelt es sich um Ester höherer Carbonsäuren, bestehend aus 12 bis 36 Kohlenstoffatomen. Sie dienen in höheren Organismen nicht nur als Energieträger und Signalmoleküle, sondern sind auch Bausteine von Membranen.

1.2.1 Struktur und Eigenschaften der Phospholipide

Phospholipide sind wasserunlöslich, lösen sich dagegen gut in organischen Lösungsmitteln wie Chloroform oder Tetrahydrofuran (THF). Man kann sie aufgrund ihres Aufbaus in zwei Gruppen unterteilen^[133]:

1. Phospholipide, die Glycerin, einen dreiwertigen Alkohol, enthalten
2. Phospholipide, deren Alkoholkomponente Sphingosin ist.

Das Phosphoglycerid besteht aus einem Glycerinrückgrat, welches über Esterbindungen mit zwei Fettsäuremolekülen und einem phosphorylierten Alkohol verbunden ist. Dabei handelt sich bei der Alkoholkomponente entweder um Serin, Ethanolamin, Inositol oder Cholin. Die Phosphatidylcholine (s. Abb. 8) sind der wichtigste Bestandteil der Membranen höherer Organismen.

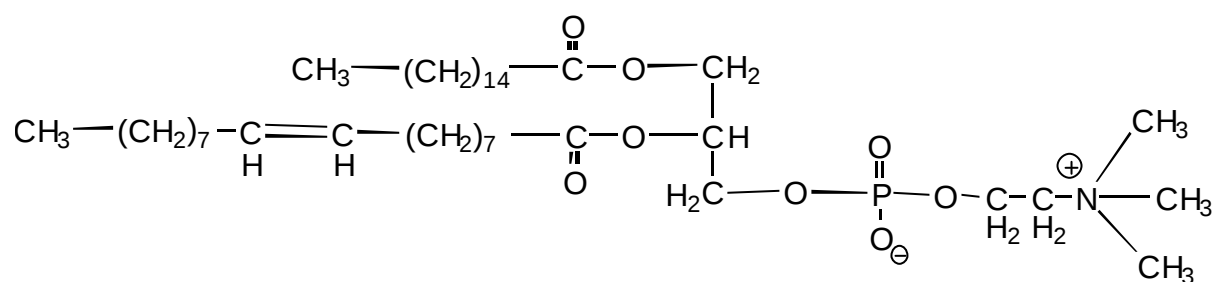


Abb. 8: 1-Palmityl-2-oleyl-phosphatidylcholin.

Die in Phospholipiden häufig auftretenden Fettsäuren enthalten zwischen 14 und 24 Kohlenstoffatome, wobei solche mit 16 bis 18 am häufigsten vertreten sind. Phospholipide können sowohl gesättigte, als auch ungesättigte Fettsäuren enthalten. Dabei ist die Doppelbindung der Fettsäuren fast immer *cis*-konfiguriert.

1.2.2 Lipiddoppelschichten und Liposomen

Das auffälligste und zugleich wichtigste Merkmal der Membranlipide ist ihr amphipathischer Charakter^[133]. Sie bestehen, wie im Fall der Phospholipide, aus einer polaren Kopfregion und hydrophoben Kohlenwasserstoffresten. Bei Kontakt mit wässrigen Lösungen werden die Kohlenwasserstoffreste von der polaren Umgebung abgestoßen, während sich die polaren Köpfe ihr zuwenden, wodurch eine Mizelle (s. Abb. 9, links) oder eine Lipiddoppelschicht (s. Abb. 9, Mitte) entsteht. Phospholipide ordnen sich bevorzugt zu einer Lipiddoppelschicht an, da die langen Kohlenwasserstoffketten keinen Raum im Inneren der Mizelle finden.

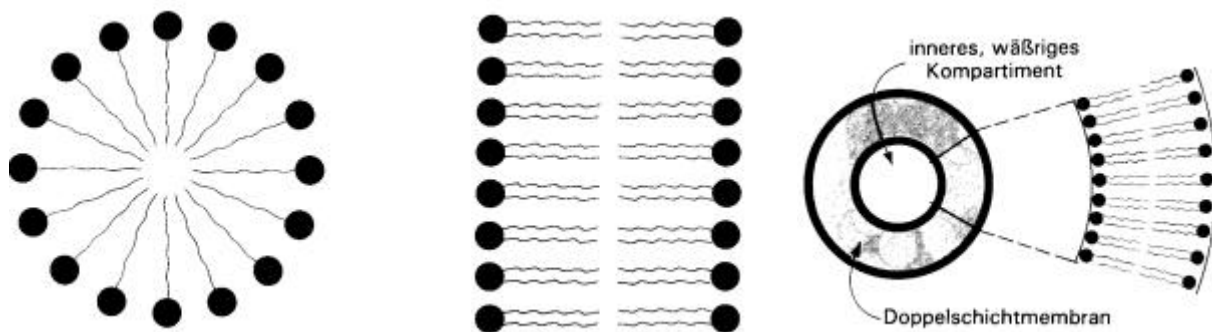


Abb. 9: Anordnungsmöglichkeiten von Lipiden in wässriger Lösung (links: Mizelle, Mitte: Lipiddoppelschicht, rechts: Liposom).

Lipiddoppelschichten dienen im Organismus als Permeabilitätsschranken zwischen Zellen und unterschiedlichen Zellkompartimenten und werden Membran genannt, wobei die Länge der Kohlenwasserstoffketten und Anzahl der Doppelbindungen die Membranfluidität beeinflusst. Charakteristisch für das Ausbilden einer Lipiddoppelschicht ist, daß dieser Prozeß spontan vor sich geht („self-assembly“)^[133]. Verantwortlich dafür sind hydrophobe Kräfte; zwischen Kohlenwasserstoffketten wirken *van-der-Waalskräfte*. Zusätzlich stabilisierend wirken die elektrostatischen Bindungen und Wasserstoffbrücken zwischen den polaren Kopfregionen und den Wassermolekülen der Lösung.

Ein energetisch ungünstiger Kontakt der hydrophoben Kohlenwasserstoffketten mit der wässrigen Umgebung wird durch die Ausbildung von Lipidvesikeln, sogenannten Liposomen (s. Abb. 9, rechts, S. 16), verhindert. Liposomen finden sowohl in der Forschung, als auch in der Medizin Anwendung^[134]. Im Vesikelinnenraum werden z. B. Arzneimittel oder auch Peptide, bzw. Proteine transportiert. Sie werden oft zur transcutanen Applikation von Wirkstoffen eingesetzt. In der Wissenschaft dienen Liposomen als Membranmodelle, um Informationen über die Funktionen der Biomembran und ihre Permeabilität zu gewinnen; membranständige Proteine können in solche Systeme eingebaut und untersucht werden.

1.2.3 Orientierung und Wirkung von Carotinoiden in liposomalen Membranen

Von besonderem Interesse ist es, die antioxidative Wirkung der Carotinoide unter möglichst physiologischen Bedingungen zu untersuchen. So gilt die Aufmerksamkeit vor allem dem Schutz von Zellkomponenten, bzw. zellulären Bestandteilen. Wegen ihrer unpolaren Struktur lösen sich Carotinoide jedoch ausschließlich in organischen Lösungsmitteln. Der Einbau dieser Moleküle in die Lipidmembran von Liposomen ermöglicht eine relativ gleichmäßige Verteilung von Carotinoiden im wässrigen Medium und stellt gleichzeitig eine Nachahmung physiologischer Bedingungen dar.

Mit Hilfe des liposomalen Systems konnte gezeigt werden, daß einige Carotinoide die Membran vor radikalischen Angriffen zu schützen vermögen^[136,137]. Bei verschiedenen Carotinoiden wurde eine Abstufung ihres protektiven Effekts beobachtet, der vermutlich mit der unterschiedlichen Struktur in Zusammenhang steht. So haben beispielsweise Hydroxylgruppen als Substituenten, wie im Fall von Lutein und Zeaxanthin, einen erheblichen Einfluß auf die Polarität und damit auf die Orientierung in der Membran. In Arbeiten von Gabrielska und Gruszecki^[138,17] wurde gezeigt, daß das unpolare β -Carotin waagrecht in der Lipiddoppelschicht eingebettet ist und somit nicht mit dem umgebenden wässrigen Medium in Kontakt kommt (s. Abb. 10, S. 18).

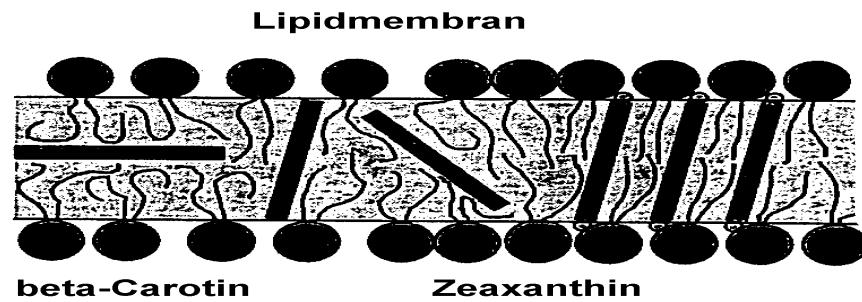


Abb. 10: Orientierung von Carotinoiden verschiedener Polarität in der Lipidmembran^[17].

Im Gegensatz dazu liegt Zeaxanthin fast senkrecht in der Membran, die polaren Gruppen in den polaren Bereichen der Doppelschicht verankert. Ähnliche Befunde lieferten Messungen mit Violaxanthin, einem weiteren Xanthophyll. Zusätzlich wurde auch eine Verdickung der mit Xanthophyll beladenen Membran festgestellt. β -Carotin erhöht die Bewegungsfreiheit der polaren Kopfgruppen der Lipide und schwächt die Membranstruktur^[138-140]. Als Folge erhöht sich die Durchlässigkeit der Lipiddoppelschicht für Ionen. Im Gegensatz dazu führt der Einbau von Zeaxanthin zu einer starrereren Membranstruktur, und erniedrigt die Eindringmöglichkeit für polare Substanzen. Dies lässt auch auf eine physiologische Funktion der Carotinoide im Hinblick auf die Modulation der Membranfluidität schließen.

1.3 Problemstellung

Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Präparation und Charakterisierung von multilamellaren und unilamellaren Liposomen, die mit unterschiedlichen Antioxidantien beladen sind. Als lipophile Antioxidantien sollen Carotinoide und α -Tocopherol in die Liposomenmembran eingebaut werden; der hydrophile Innenraum unilamellarer Liposomen wird mit Glutathion beladen.

Mit Hilfe dieses Systems sollen die pro- und antioxidativen Eigenschaften der genannten Antioxidantien im lipophilen/hydrophilen Kompartimentenmodell untersucht und quantifiziert werden. Desweiteren sollen Studien zur Interaktion von Antioxidantien durchgeführt und eventuelle synergistische Effekte aufgezeigt werden. Mit Glutathion und Carotinoiden beladene Liposomen sollen eingesetzt werden, um den möglichen Transport einer „radikalischen Last“ über die Membranbarriere zu studieren. Zudem soll der Effekt von Carotinoiden auf die Membranstabilität ermittelt und Blaulichtfiltereffekte ausgewählter Carotinoide exemplarisch untersucht werden.

Die Arbeiten stehen im Zusammenhang mit den Schutzwirkungen von Carotinoiden und anderen Antioxidantien bei degenerativen Erkrankungen und sollen Rückschlüsse auf die biochemischen, chemischen und physikalischen Mechanismen erlauben, die solchen präventiven Effekten zugrunde liegen.

2. Material und Methoden

2.1 Chemikalien und Lösungsmittel

β -Carotin, Lutein, Zeaxanthin und β -Cryptoxanthin wurden von Hoffmann-La Roche (Basel, Schweiz) zur Verfügung gestellt. Lykopen, α -Carotin, Glutathion, Katalase, 1,2-Dipalmitoyl-*sn*-Glycero-phosphatidylcholin, Lucifer Gelb CH und 2,6-Di-tertiär-butyl-4-methylphenol (BHT) wurden von Sigma (Deisenhofen, Deutschland) bezogen. 3-*sn*-Phosphatidylcholin aus Eigelb, Fluorescamin (Fluram) und β -Apo-8'-carotenal stammten von Fluka (Buchs, Schweiz). 2,2'-Azobis[2,4dimethylvaleronitril] (AMVN) wurde von Wako (Osaka, Japan) geliefert. Xanthin-Oxidase wurde von Boehringer (Ingelheim, Deutschland) geliefert. Alle übrigen verwendeten Lösungsmittel und Chemikalien wurden von Merck (Darmstadt, Deutschland), Sigma (Deisenhofen, Deutschland), Fluka (Buchs, Schweiz), Aldrich (Steinheim, Deutschland) und Riedel-de Haën (Seelze, Deutschland) bezogen und hatten mindestens p. A. Qualität. Stickstoff der Reinheit 5.0 wurde von Linde (Höllriegelskreuth, Deutschland) geliefert.

2.2 Geräte

2.2.1 HPLC-Analytik

Pumpe: LaChrom L-7100 (Merck-Hitachi, Darmstadt, Deutschland)
 Detektor: L-4200 UV-VIS Detector (Merck-Hitachi, Darmstadt, Deutschland)
 LaChrom UV-VIS Detector L-7420 (Merck-Hitachi, Darmstadt, Deutschland)
 Fluorescence Detector L-7480 (Merck-Hitachi, Darmstadt, Deutschland)
 Integrator: D-2500 Chromato-Integrator 7480 (Merck-Hitachi, Darmstadt, Deutschland)
 D-7500 Integrator 7480 (Merck-Hitachi, Darmstadt, Deutschland)
 Autosampler: 655 A-40 Autosampler 7480 (Merck-Hitachi, Darmstadt, Deutschland)

- Säulen:
- a) TBARS-Analyse: 5×250 -mm Lichrospher 100 RP 18-e Säule (Merck, Darmstadt, Deutschland)
 - b) Glutathionanalyse: 5×250 -mm Lichrospher 100 RP 18-e Säule (Merck, Darmstadt, Deutschland)
 - c) Carotinoidanalyse: Suplex pKb-100; $5 \mu\text{m}$ (Supelco; Bellefonte; Pennsylvania; U.S.A.)

2.2.2 UV/VIS Spektroskopie

UV/VIS Spectrometer Lamda 2 (Perkin-Elmer, Überlingen, Deutschland)

Pharmacia LKB, Ultraspec III (Amersham, Freiburg, Deutschland)

DU[®] 530 Life Science UV/VIS Spectrometer (Beckman, München, Deutschland)

2.2.3 Fluoreszenzspektroskopie

LS-5 Luminescence Spectrometer (Perkin-Elmer, Überlingen, Deutschland)

2.2.4 Transmissionselektronenmikroskopie

Philips EM 400 (Philips, Berlin, Deutschland)

2.2.5 Extrusionsapparatur

Liposo Fast (Milsch Equipment, Laudenbach, Deutschland)

2 Hamilton 500 μl Spritzen, #1750 TLL ohne Kolbenstop (Hamilton, Reno, Nevada, U.S.A.)

Polycarbonat Membranfilter, Porengröße 100 nm und 400 nm (Milsch Equipment, Laudenbach, Deutschland)

2.2.6 Zentrifugen

Beckman Spinco L2-65B (Beckman, München, Deutschland)

Beckman L8-60M Ultrazentrifuge (Beckman, München, Deutschland)

Sorvall RC-5B Zentrifuge (Sorvall; DuPont Instruments, Newtown, Missouri, U.S.A.).

Hettich Universal 30 RF (Hettich, Tuttlingen, Deutschland)

2.2.7 Sonstige Geräte

Membranfiltration: Amicon, Rührzelle 8010 (Millipore Corporation, Bedford, Maine, U.S.A.)

2.3 Methoden

2.3.1 Präparation multilamellarer Liposomen

In Reagenzgläsern werden Stammlösungen aus Carotinoiden, α -Tocopherol, Quercetin bzw. eine Mischung bestehend aus bis zu sieben dieser Komponenten gelöst in THF mit 3-*sn*-Phosphatidylcholin in Chloroform vermischt und unter einem leichten Stickstoffstrom getrocknet. Zu dem so an der Wand des Glases entstandenen Lipidfilm wird 100 mM Natriumphosphatpuffer (pH 7,4) zugefügt und die hydrophoben Komponenten durch 5 min Ultraschallbehandlung in Suspension gebracht. Die Endkonzentration des Lipids beträgt 1 mg/ml. Die Suspensionen werden zu jeder Zeit im Dunkeln gehalten. Kontrollliposomen enthalten weder Carotinoid noch α -Tocopherol, bzw. Quercetin.

2.3.2 Präparation unilamellarer Liposomen

In einem 50 ml Rundkolben wird eine geeignete Menge einer 3-*sn*-Phosphatidylcholin-, bzw. 1,2-Dipalmitoyl-*sn*-Glycero-phosphatidylcholinstammlösung abgemessen. Nach Zugabe des Carotinoids wird das Lösungsmittel im Rotationsverdampfer evaporiert bis ein dünner Film an der Kolbenwand zurückbleibt. Dieser wird in 100 mM Natriumphosphatpuffer (pH 7,4) aufgenommen (1 mg/ml Lipidendkonzentration) und im Wasserbad bei ca. 30°C unter vorsichtigem Schwenken suspendiert. Die entstandene Suspension wird in ein Reagenzglas umgefüllt und für 20 min bei 20 – 25°C mit Ultraschall behandelt. Es bilden sich multilamellare Vesikel unterschiedlicher Größe. Um unilamellare Liposomen zu erhalten, wird die Lipidsuspension extrudiert^[135]. Dabei wird die Vesikelsuspension wiederholt (20 ×) durch eine Polycarbonatmembran (Porendurchmesser 100 nm) filtriert. Jeder Arbeitsschritt wird unter Abdunklung durchgeführt. Kontrollliposomen werden ohne Zugabe von Carotinoiden auf gleichem Weg präpariert.

2.3.3 Präparation unilamellarer Liposomen beladen mit Glutathion oder Lucifer Gelb

Definierte Mengen von 3-*sn*-Phosphatidylcholin, bzw. 1,2-Dipalmitoyl-*sn*-Glycerophosphatidylcholin werden in einem 50 ml Rundkolben in Chloroform gelöst, mit Carotinoidstammlösung (Kontrollen enthalten keine Carotinoide) vermischt und durch einen Rotationsverdampfer zur Trockene eingeeengt. Zu dem an der Kolbenwand verbliebenen Lipidfilm wird 100 mM Glutathion, bzw. 1,25 mM Lucifer Gelb enthaltender 100 mM Natriumphosphatpuffer (pH 7,4) zugefügt. Die Lipidendkonzentration beträgt 5 mg/ml. Nach 20 min Ultraschallbehandlung wird die Suspension durch eine Polycarbonatmembran (Porendurchmesser 400 nm) wiederholt (20 ×) extrudiert. Bis zur anschließenden Reinigung wird die Liposomensuspension in einem Schraubdeckelreagenzglas bei 4°C im Dunkeln gelagert.

2.3.4 Reinigung unilamellarer Liposomen von nicht eingeschlossenem Glutathion, bzw. Lucifer Gelb

Zur Aufreinigung der unter 2.3.3 erhaltenen unilamellaren Lipidvesikel stehen vier Methoden zur Verfügung.

a) Dialyse

Ein Dialyseschlauch von ca. 3 cm Länge wird mit 500 µl Liposomensuspension beladen und verschlossen. Zur Dialyse wird dieser in ein Gefäß mit 5 l 100 mM Natriumphosphatpuffer (pH 7,4) gegeben und über Nacht bei 4°C gerührt. Daraufhin wird eine Probe zur Bestimmung des GSH-Gehalts im Liposomeninnenraum und des umgebenden Mediums entnommen.

b) Gelfiltration

Ca. 40 ml einer Sepharose 4B-Gelsuspension werden erst mit 100 ml destilliertem Wasser vorgequollen und anschließend in 100 ml Natriumphosphatpuffer äquilibriert. Nach dem Abdekantieren wird das Säulenmaterial in ca. 30 ml Puffer aufgenommen und eine 1,2 × 25 cm Säule auf eine Füllhöhe von ca. 17 cm gepackt. Zur Reinigung wird die unter 2.3.3 erhaltene Vesikelsuspension auf die Säule gegeben, sobald der Pufferstand auf Höhe der obersten Schicht des Säulenmaterials ist. Ist die zu ladende Suspension in das Gel

eingedrungen, werden wieder langsam einige Tropfen Puffer als Laufmittel hinzugefügt. Zur Beschleunigung des Laufs kann von außen Druck durch Stickstoffbegasung angelegt werden. Es werden 3-ml-Fractionen gesammelt und auf Glutathion überprüft.

c) Zentrifugation

Das nicht eingeschlossene Glutathion, bzw. Lucifer Gelb, kann auch durch zweimaliges Zentrifugieren in einem SS 34 Rotor bei RT entfernt werden. Beide Läufe werden 10 min bei 47800 g durchgeführt. Anschließend wird das anfallende Pellet in 100 mM Natriumphosphatpuffer (pH 7,4) aufgenommen. Sollten sich die Vesikel nicht ausreichend sedimentieren lassen, so kann die Suspension 1:1 verdünnt und erneut zentrifugiert werden.

Die Reinigung kann auch über Ultrazentrifugation durch zwei Läufe für je 1 h bei 110000 g (35000 Upm im Ti 50 Rotor) und 4°C erfolgen.

Sollwert der Lipidkonzentration der Glutathion-Liposomen: 5 mg/ml

Sollwert der Lipidkonzentration der Lucifer Gelb-Liposomen: 2,5 mg/ml.

d) Membranfiltration durch eine Amicon-Rührzelle

Die Vesikelpräparation aus 2.3.3 (S. 24) wird in eine Amicon-Rührzelle pipettiert. Durch Druck (Stickstoffbegasung) wird das die Liposomen umgebende Medium durch eine Filtermembran mit einer Ausschlußgrenze von 3000 Da gepreßt. Abhängig vom eingesetzten Volumen und Druck wird in regelmäßigen Abständen frischer Puffer zugesetzt, wobei darauf geachtet werden muß, daß die auf der Filtermembran verbliebenen Vesikel wieder aufgeschlämmt werden. Dieser Schritt wird so oft wiederholt, bis im Eluent kein GSH oder Lucifer Gelb mehr nachweisbar ist.

2.3.5 Initiation der oxidativen Reaktionen

Abhängig von der Fragestellung können verschiedene radikalgenerierende Systeme verwendet werden. Soll die Schutzwirkung der Carotinoide in der Membran untersucht werden, so werden lipophile Oxidantien eingesetzt. Studien, bei denen eine Diffusion von Radikalen durch die Membran vermieden werden muß, erfordern die Produktion von hydrophilen reaktiven Spezies.

Die Lipidperoxidation wird durch Zugabe von in peroxidfreiem THF gelösten 2,2'-Azobis[2,4-dimethylvaleronitril] (AMVN) zu dem Inkubationsmedium

(Endkonzentration 10 mM) initiiert. Der THF-Gehalt der Lösungen beträgt in allen Fällen 1%. Die Reaktionen werden im Dunkeln bei Atmosphärensauerstoffgehalt^[141] ausgeführt. Für die Analyse der Endpunkte wird jede Stunde ein Aliquot entnommen und in flüssigem Stickstoff eingefroren. In Vesikelsuspensionen bestehend aus gesättigten Lipiden kann die Oxidation durch Xanthin-Oxidase in verschiedenen Konzentrationen in 2,0 mM Xanthin-Lösung induziert werden. Um sicherzustellen, daß ausschließlich das Superoxidanion an der Oxidation beteiligt ist, wird der Ansatz mit Katalase (1160 U/ml) versetzt. Die Inkubation erfolgt über 60 min bei 30, bzw. 37°C unter Lichtausschluß. Eine zweite Möglichkeit zur Generierung wasserlöslicher Radikale bietet der Einsatz von 1,2 mM Ammoniumperoxodisulfat bei 25°C. Die Reaktion wird durch Einfrieren in flüssigem Stickstoff gestoppt.

2.3.6 Analyse von thiobarbitursäurereaktiven Substanzen (TBARS); Malondialdehyd (MDA)

Die Bildung von TBARS gilt als Indikator für die Lipidperoxidation. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit werden zwei prinzipiell ähnliche Verfahren zur Messung und Quantifizierung angewandt.

0,5 ml Proben werden mit 1,5 ml Puffer (2×10^{-4} M EDTA; 1 % Phosphorsäure; 2×10^{-5} mM BHT), 0,5 ml 0,5 %iger Thiobarbitursäure und 50 µl BHT (10 %ig, gelöst in Ethanol) versetzt. Die Reaktionslösung wird anschließend in einem Wasserbad 30 min auf 100°C erhitzt. Nach dem Abkühlen kann man den entstandenen roten Farbstoff (s. Abb. 11, S. 27) auf verschiedenen Wegen quantitativ analysieren.

- a) Zu der vollständig abgekühlten Lösung wird die Hälfte des Volumens an Butanol zugefügt und der Farbstoff durch kräftiges Schütteln in die organische Phase überführt. Im Spektrometer werden Spektren im Wellenlängenbereich von 515 bis 550 nm aufgenommen. Die MDA-Äquivalente können mit Hilfe des Extinktionskoeffizienten für das MDA-Addukt ($\epsilon_{532} = 1,56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) ermittelt werden.
- b) Die mit Thiobarbitursäure umgesetzten Proben werden mit Hilfe eines Autosamplers auf die HPLC gespritzt. Dabei erfolgt die Trennung über eine 5×250-mm Lichrospher 100 RP 18-e Säule. Die Fluoreszenz wird bei einer Anregungswellenlänge von 513 nm und Emissionswellenlänge von 550 nm detektiert. Das Fließmittel besteht aus 55 % 50 mM Kaliumphosphatpuffer (pH 5,5) und 45 % Methanol. Die Fließgeschwindigkeit liegt bei

0,75 ml/min. Die Konzentrationen werden mit Hilfe eines MDA-Mengenstandards und einer Eichgerade ermittelt.

Es muß darauf geachtet werden, daß Abbauprodukte der Carotinoide keine interferierenden Signale ergeben. Beide Methoden sind nicht selektiv für MDA. Daher wird in der vorliegenden Arbeit der Begriff TBARS verwendet.

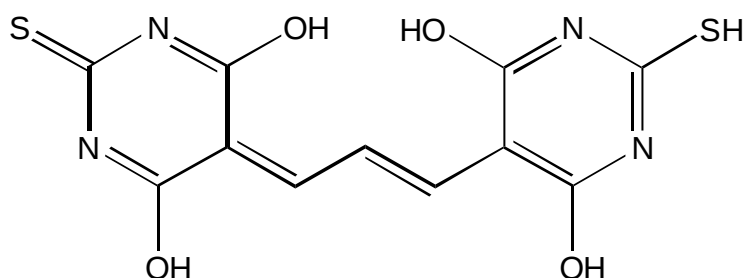


Abb. 11: Strukturformel des Reaktionsprodukts aus Malondialdehyd und Thiobarbitursäure^[142].

2.3.7 Glutathionanalyse

Folgende zwei Methoden können für die quantitative Analyse von Glutathion angewandt werden:

- a) 0,9 ml einer 1,1 mM Diethylentriaminpentaessigsäurelösung (gelöst in Phosphatpuffer, PBS: 15 mM Kaliumdihydrogenphosphat; 81 mM Dinatriumhydrogenphosphat; 1,37 M Natriumchlorid; 27 mM Kaliumchlorid; pH 7,4), 0,1 ml 2,5 mM ethanolische 5,5'-Dithiobis-(2-Nitrobenzoesäure)lösung und 20 µl der zu analysierenden Probe werden gut gemischt und ca. 30 sec stehen gelassen. Die entstandene gelbe Lösung kann im Photometer bei 412 nm vermessen und die GSH-Konzentration mit Hilfe einer Eichgerade ermittelt werden.
- b) Zu 0,75 ml 100 mM Boratpuffer (pH 8,0) werden 50 µl der Analyselösung pipettiert und mit 0,2 ml Fluorescamin (0,5mg/ml Aceton) versetzt. Nach erfolgter Derivatisierung wird die Fluoreszenz nach Auftrennung durch HPLC bei einer Anregungswellenlänge von 390 nm und einer Emissionswellenlänge von 475 nm gemessen. Das Laufmittel besteht aus

70 % 0,1 M Citratpuffer (pH 3,0) und 30 % Acetonitril. Die Fließgeschwindigkeit beträgt 0,8 ml/min^[143]. Die GSH-Konzentration wird über eine Eichgerade ermittelt.

2.3.8 Carotinoidanalytik

Die Liposomenproben werden mit 2 mM Kaliumphosphatpuffer (pH 7,2; 250 mg/ml EDTA), internem Standard (β -Apo-8'-carotinal) und Ethanol vermischt^[144]. Nach Zugabe eines n-Hexan/Dichlormethangemischs (5:1, v:v) und BHT (Endkonzentration 0,01 %) wird die Probe für 1 min geschüttelt, 5 min ultraschallbehandelt, 30 sec geschüttelt und anschließend 10 min bei 4500 Upm (Hettich Universal 30 RF), 16°C zentrifugiert. Die organische Phase wird in ein frisches Reagenzglas überführt und das Lösungsmittel unter einem leichten Stickstoffstrom abgeblasen. An der Glaswand zurückgebliebene Carotinoidreste werden mit Diethylether heruntergespült und erneut getrocknet. Die verbliebenen Carotinoide werden in 20 μ l Dichlormethan und 180 μ l des Laufmittels (Methanol/Acetonitril/2-Propanol, 54:44:2) aufgenommen, über HPLC getrennt und bei einer Wellenlänge von 450 nm, bzw. 472 nm (Lycopin) detektiert. Die Quantifizierung erfolgt über Eichgerade mit internem Standard. Alle Schritte werden im Dunkeln ausgeführt.

2.3.9 Carotinoidstammlösungen

Die Carotinoidkristalle werden in n-Hexan/Dichlormethan (1:1, v:v) oder peroxidfreiem THF gelöst und bei -70°C gelagert. Nicht gelöste Partikel können durch Filtration (Millipore SJHVLO4NS, 0,45 μ m Porengröße) entfernt werden. Es wurden nur Lösungen mit einem Reinheitsgrad größer 93 % verwendet (bestimmt über HPLC).

2.3.10 Carotinoidarbeitslösungen

Für die Analytik werden alle Stammlösungen auf eine Konzentration von ca. 3 μ g/ml verdünnt. Zusätzlich wird eine β -Apo-8'-carotinallösung präpariert, die eine Extinktion von ca. 0,2 bei 450 nm aufweist.

2.3.11 Konzentrationsbestimmung von Carotinoiden und α -Tocopherol

Die Stammlösungen werden 1:40, bzw. 1:160 in n-Hexan, bzw. Ethanol (α -Tocopherol) verdünnt und die Extinktion gegen n-Hexan, bzw. Ethanol bei den entsprechenden Wellenlängen gemessen.

Der Konzentrationsberechnung liegt das Lambert-Beer'sche Gesetz zugrunde, dabei werden folgende Extinktionskoeffizienten verwendet^[145,20]:

α -Carotin	$\epsilon_{446} = 145\,500 \text{ [M}^{-1}\text{cm}^{-1}\text{]}$
β -Carotin	$\epsilon_{450} = 139\,000 \text{ [M}^{-1}\text{cm}^{-1}\text{]}$
Lutein	$\epsilon_{450} = 136\,600 \text{ [M}^{-1}\text{cm}^{-1}\text{]}$
Zeaxanthin	$\epsilon_{450} = 132\,912 \text{ [M}^{-1}\text{cm}^{-1}\text{]}$
β -Cryptoxanthin	$\epsilon_{451} = 136\,000 \text{ [M}^{-1}\text{cm}^{-1}\text{]}$
Lykopen	$\epsilon_{472} = 184\,575 \text{ [M}^{-1}\text{cm}^{-1}\text{]}$
α -Tocopherol	$\epsilon_{292} = 3267 \text{ [M}^{-1}\text{cm}^{-1}\text{]}$

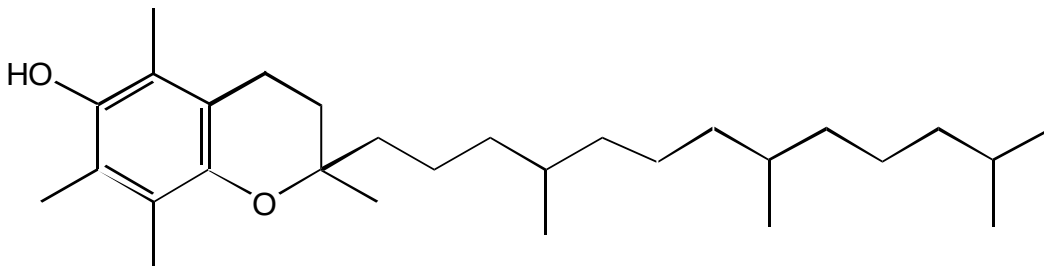
3. Ergebnisse

3.1 Multilamellare Liposomen

3.1.1 Antioxidative Wirkung verschiedener natürlicher Antioxidantien

Carotinoide, Tocopherole und Flavonoide zählen zu den natürlichen Antioxidantien, die mit der Nahrung aufgenommen werden. Um die antioxidative Wirkung dieser Substanzen quantitativ bestimmen zu können und Carotinoide verschiedener Strukturen untereinander und mit α -Tocopherol, bzw. Quercetin (Abb. 12) zu vergleichen, werden multilamellare Liposomen als Modellsystem verwendet.

α - Tocopherol



Quercetin

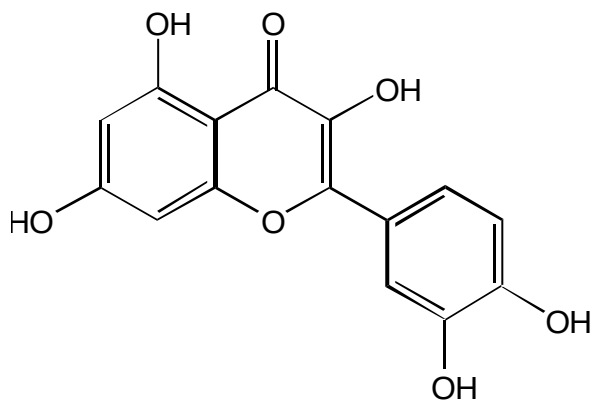


Abb. 12: Strukturformeln von α -Tocopherol und Quercetin.

Als Indikator der Lipidperoxidation dienen dabei die während der Inkubation mit 10 mM AMVN (2h, 37°C) entstandenen thiobarbitursäurereaktiven Substanzen (TBARS). Die TBARS-Bildung wird im Fall der multilamellaren Liposomen spektrophotometrisch bestimmt und mit Hilfe des MDA-Extinktionskoeffizienten als MDA-Äquivalente ausgewertet (Kap. 2.3.6, S. 26).

Tab. 1 zeigt einen quantitativen Vergleich der verschiedenen Wirkungen der untersuchten Antioxidantien nach zweistündiger Inkubation mit 10 mM AMVN. Alle Komponenten werden in einer Konzentration von 3 μ M (3 nmol Antioxidans/mg Phospholipid) eingesetzt und mit den Werten der Kontrollsuspension ohne eingelagerte Antioxidantien verglichen. Die in der Kontrolle erhaltene TBARS-Menge von $2,1 \pm 0,2$ nmol/mg Phospholipid wird auf 100 % gesetzt. Zur Bestimmung der Autoxidation, wird parallel zu jeder Probe ein Ansatz bei 0°C inkubiert; die hier gemessene TBARS-Menge wird von der entsprechenden Probe subtrahiert.

Tab. 1: TBARS-Bildung in multilamellaren Liposomen initiiert durch 10 mM AMVN (Vergleich der Wirkung verschiedener Carotinoide in der Konzentration 3 μ M, bzw. 3 nmol/mg Phospholipid).

Probe	TBARS/[%] ^a	n
Kontrolle ^a	100 $\pm$ 9	35
Lykopin	25 $\pm$ 10	17
α -Carotin	51 $\pm$ 8	33
β -Carotin	73 $\pm$ 9	30
β -Cryptoxanthin	55 $\pm$ 8	30
Zeaxanthin	73 $\pm$ 9	23
Lutein	77 $\pm$ 9	14
α -Tocopherol	43 $\pm$ 7	5
Quercetin	81 $\pm$ 17	4

^a 100% entsprechen $2,1 \pm 0,2$ nmol/mg Phospholipid

Mit einer 75 %igen Absenkung auf einen Wert von 25 % des in den Kontrollliposomen gemessenen TBARS-Gehaltes zeigt Lykopin die stärkste antioxidative Wirkung aller

getesteten Substanzen. Alle weiteren untersuchten Carotinoide inhibieren die Lipidoxidation im geringeren Maße. Unter den vorliegenden Bedingungen wird eine Abstufung des antioxidativen Effekts in der Reihenfolge:

Lykopen > α -Tocopherol > α -Carotin > β -Cryptoxanthin > Zeaxanthin = β -Carotin > Lutein > Quercetin beobachtet (vergl. Tab. 1, S. 31). Das lipidlösliche α -Tocopherol zeigt mit 43 % des Kontrollwerts eine starke inhibitorische Wirkung. Auffällig ist der große Unterschied zwischen α - und β -Carotin. Obwohl sich beide strukturell lediglich durch die Position der Doppelbindung im Iononring unterscheiden, beträgt die Differenz der TBARS-Werte 22 %. Dabei ist α -Carotin das stärkere Antioxidans. Betrachtet man die übrigen Verbindungen, so stellt man, mit Ausnahme des β -Carotins, eine Abschwächung der antioxidativen Wirkung fest, die mit einer Zunahme der Anzahl polarer Gruppen einhergeht. Das Flavonoid Quercetin zeigt in diesem System die geringste protektive Wirkung.

3.1.2 Synergistische Wirkungen von Mischungen von Antioxidantien

Da im Humanserum immer Carotinoidkombinationen vorhanden sind, sollen im System der multilamellaren Liposomen diese Mischungsverhältnisse möglichst nachempfunden und die Gemische auf ihre lipidschützenden Eigenschaften hin untersucht werden. Mögliche Interaktionen mit α -Tocopherol und Quercetin werden dabei ebenfalls überprüft. Um die kombinierte Wirkung mehrerer Antioxidantien abschätzen zu können, werden basierend auf den Einzelwerten aus Tab. 1 (S. 31) theoretische additive „Erwartungswerte“ nach folgender Formel berechnet:

$$\text{Theoretischer Wert} = (\sum \text{Experimenteller Einzelwert}[\%] \times \text{Molarität}[\mu\text{M}]) : 3[\mu\text{M}] \text{ (Formel 1)}$$

In Tab. 2 (S. 33) sind die Zusammensetzungen und Kennzeichnungen aller eingesetzten Mischungen aufgelistet. Allen Kombinationen liegt die Mischung M1 zugrunde. Sie enthält die im Blut hauptsächlich vorkommenden Carotinoide.

Tab. 2: Zusammensetzung der auf antioxidative Aktivität getesteten Carotinoid-, Carotinoid/ α -Tocopherol- und Carotinoid/Quercetin-mischungen (Endkonzentration aller Mischungen in der Liposomensuspension: 3 μ M, bzw. 3 nmol/mg Phospholipid).

Kennzeichnung	Lykopen	α -Carotin	β -Carotin	β -Cryptoxanthin	Zeaxanthin	Lutein	α -Tocopherol	Quercetin
	[nmol/mg Phospholipid]							
M1	0,66	0,33	0,66	0,33	0,33	0,66	-	-
M2	-	0,43	0,86	0,43	0,43	0,86	-	-
M3	0,86	0,43	0,86	0,43	0,43	-	-	-
M4	-	0,60	1,20	0,60	0,60	-	-	-
M5	1,20	0,60	-	0,60	0,60	-	-	-
M6	0,07	0,03	0,07	0,03	0,03	0,07	2,70	-
M7	1,50	1,50	-	-	-	-	-	-
M8	2,00	1,00	-	-	-	-	-	-
M9	2,00	-	-	1,00	-	-	-	-
M10	1,50	-	-	-	-	1,50	-	-
M11	2,00	-	-	-	1,00	-	-	-
M12	-	-	1,00	-	-	2,00	-	-
M13	-	1,00	2,00	-	-	-	-	-
M14	0,07	0,03	0,07	0,03	0,03	0,07	-	2,70

Der erwartete additive TBARS-Wert für M1 berechnet nach *Formel 1* (s. S. 32) beträgt 59 % der Kontrolle. Gemessen wird hingegen ein Wert von 37 % der Kontrolle (s. Tab. 3). Die Differenz zwischen berechnetem und experimentell bestimmten Wert beträgt 22 % und weist somit auf eine synergistische, d. h. höhere als aus dem Mittelwert aller in der Kombination enthaltenen Carotinoideinzelwerte zu erwartende, protektive Wirkung hin. Dieser „supraadditive“ Effekt kann auch in einer mit α -Tocopherol (M6) oder Quercetin (M14) modifizierten Carotinoidmischung (M1) beobachtet werden (vergl. Tab. 3). Im Fall von α -Tocopherol liegt der synergistische Effekt bei 21 %. Eine Zugabe von Quercetin erhöht die Differenz zwischen Erwartungswert und gemessenem Wert auf 26 %. So kann aufgrund dieser Ergebnisse von einer substanzklassenübergreifenden Wechselwirkung verschiedener Antioxidantien ausgegangen werden, die eine erhöhte Protektion der Membranlipide bedingt.

Tab. 3: Vergleich der TBARS-Bildung in multilamellaren Liposomen beladen mit verschiedenen Carotinoidmischungen
(Endkonzentration 3 μ M, bzw. 3 nmol/mg Phospholipid).

Mischung	Zusammensetzung	TBARS/[%] ^a	TBARS/[%] (berechnet) ^b	Δ^c	n
M1		37 $\pm$ 7	59	22	8
M6	M1 + α -Tocopherol	24 $\pm$ 9	45	21	6
M14	M1 + Quercetin	52 $\pm$ 7	78	26	9

^a Lipidperoxidation induziert mit 10 mM AMVN (100% entsprechen 2,1 $\pm$ 0,2 nmol TBARS/mg Phospholipid).

^b berechneter additiver Wert (*Formel 1*, S. 32).

^c Differenz zwischen theoretischem und experimentell ermitteltem Wert.

3.1.3 Lutein und Lykopen: Ursache des synergistischen lipidprotektiven Effekts von Carotinoidkombinationen

Um Erkenntnisse über die für den supraadditiven Effekt verantwortlichen Substanzen zu gewinnen, werden verschiedene auf der Carotinoidkombination M1 basierende Mischungen auf ihre Wirkung hin untersucht (s. Tab. 4, S. 35). Durch die Modifikation der Mischung können die für den synergistischen Effekt verantwortlichen Komponenten bestimmt werden.

Tab. 4: Mischungen zur Bestimmung der für den Synergismus verantwortlichen Substanzen - Vergleich mit M1

(Gesamtkonzentration 3 μM , bzw. 3 nmol/mg Phospholipid).

Mischung	Zusammensetzung	TBARS/[%] ^a	TBARS/[%] (berechnet) ^b	Δ^c	n
M1		37 $\pm$ 7	59	22	8
M2	M1 – Lykopin	34 $\pm$ 14	68	34	6
M3	M1 – Lutein	43 $\pm$ 11	54	11	5
M4	M1 – Lykopin - Lutein	58 $\pm$ 10	65	7	7
M5	M1 – Lutein - β -Carotin	27 $\pm$ 18	46	19	5

^a Lipidperoxidation induziert mit 10 mM AMVN (100% entsprechen 2,1 $\pm$ 0,2 nmol TBARS/mg Phospholipid).

^b berechneter additiver Wert (*Formel 1*, S. 32).

^c Differenz zwischen theoretischem und experimentell ermittelten Wert.

Wird Lykopin aus der Mischung M1 entfernt und die Konzentration der übrigen Carotinoide erhöht, um eine Gesamtkonzentration von 3 μM (3 nmol Carotinoid/mg Phospholipid) zu erhalten (M2), so beobachtet man weiterhin die supraadditive Wirkung (Differenz zwischen theoretischem und experimentellem TBARS-Wert: 34 %). Der Synergismus bleibt auch erhalten, wenn Lutein in der Mischung fehlt (M3). Jedoch ist dieser Effekt nun stark abgeschwächt mit einer Differenz von 11 %. Fehlen beide Carotinoide, Lykopin und Lutein (M4), so kann nur noch eine additive Wirkung gemessen werden. Die in diesem Fall bestimmte Differenz liegt mit 7 % innerhalb der Fehlergrenzen der Messung. Da in Abwesenheit von Lutein und β -Carotin (M5) hingegen wieder Synergismus beobachtet wird, ist zu vermuten, daß der Effekt von Lutein und Lykopin abhängt.

Auf diesen Befunden basierend wird das Verhalten von Lykopin und Lutein in Zweikomponentenmischungen näher analysiert (Tab. 5, S. 36).

Tab. 5: Vergleich von Zweikomponentenmischungen (Gesamtkonzentration der Carotinoide: 3 μ M, bzw. 3 nmol/mg Phospholipid)

Mischung	Zusammensetzung	TBARS/[%] ^a	TBARS/[%] (berechnet) ^b	Δ^c	n
M7	Lykopin + β -Carotin	31 $\pm$ 10	49	18	5
M8	Lykopin + α -Carotin	21 $\pm$ 4	34	13	5
M9	Lykopin + β -Cryptoxanthin	25 $\pm$ 8	35	10	3
M10	Lykopin + Lutein	16 $\pm$ 8	51	35	4
M11	Lykopin + Zeaxanthin	22 $\pm$ 7	41	19	4
M12	Lutein + β -Carotin	44 $\pm$ 8	76	32	9
M13	β -Carotin + α -Carotin	60 $\pm$ 11	66	6	6

^a Lipidperoxidation induziert mit 10 mM AMVN (100% entsprechen

2,1 $\pm$ 0,2 nmol TBARS/mg Phospholipid).

^b berechneter additiver Wert (*Formel 1*, S. 32).

^c Differenz zwischen theoretischem und experimentell ermittelten Wert.

Der durch Lykopin hervorgerufene synergistische Effekt kann verbunden mit jeder in M1 enthaltenen Einzelkomponente (M7 – M11) bestätigt werden. Die stärkste supraadditive Wirkung (Differenz: 35 %) zeigt jedoch die Lutein/Lycopin-Kombination. Auch Lutein wirkt in Kombination mit nur einer weiteren Komponente (β -Carotin; M12) synergistisch. Dagegen zeigt die Carotinoidmischung aus α -Carotin und β -Carotin (M13) lediglich additive Effekte. Die Differenz vom theoretischen zum experimentellen Wert liegt bei nur 6 % und ist damit innerhalb der Fehlergrenze der Messung. Diese Ergebnisse bestärken die Vermutung, daß der Synergismus an die Anwesenheit von Lykopin und Lutein gebunden ist.

3.1.4 Konzentrationsabhängigkeit am Beispiel von Lutein und β -Carotin

Um eine mögliche Konzentrationsabhängigkeit der antioxidativen Wirkung der Carotinoide abschätzen zu können, wird die Konzentration der Carotinoide Lutein und β -Carotin von 3 μ M (3 nmol Carotinoid/mg Phospholipid) auf 30 μ M (30 nmol/mg Phospholipid) erhöht. Zusätzlich wird eine Mischung aus Lutein und β -Carotin im Verhältnis 2:1 (Gesamtkonzentration der Carotinoide: 30 μ M) auf eine mögliche synergistische Wirkung hin untersucht und mit der 3 μ M Kombination der Carotinoide verglichen. Aus Tab. 6 ist ersichtlich, daß eine Steigerung der Carotinoidkonzentration um den Faktor 10 einen unterschiedlichen Effekt auf die TBARS-Bildung zur Folge hat.

Tab. 6: Vergleich der konzentrationsabhängigen Wirkung von Lutein und β -Carotin.

Komponente/ Konzentration	Zusammensetzung/ Molverhältnis	TBARS/[%] ^a	TBARS/[%] (berechnet) ^b	Δ^c	n
β -Carotin 3 μ M	-	73 $\pm$ 9	-	-	30
β -Carotin 30 μ M	-	24 $\pm$ 5	-	-	4
Lutein 3 μ M	-	77 $\pm$ 9	-	-	14
Lutein 30 μ M	-	52 $\pm$ 6	-	-	4
M12 3 μ M	Lutein + β -Carotin (2 : 1)	44 $\pm$ 8	76	32	9
M12 30 μ M	Lutein + β -Carotin (2 : 1)	45 $\pm$ 11	43	-2	4

^a Lipidperoxidation induziert mit 10 mM AMVN (100% entsprechen

2,1 $\pm$ 0,2 nmol TBARS/mg Phospholipid).

^b berechneter additiver Wert (Formel 1, S. 32).

^c Differenz zwischen theoretischem und experimentell ermittelten Wert.

So führt die Konzentrationserhöhung im Fall von β -Carotin zu einer deutlich verminderten TBARS-Bildung; der Effekt ist bei Lutein deutlich geringer ausgeprägt. Auffällig ist, daß der

Synergismus bei erhöhter Konzentration nicht mehr beobachtet wird und lediglich ein additiver Effekt gemessen werden kann.

3.1.5 Der Konzentrationsverlauf verschiedener Carotinoide in multilamellaren Liposomen während der Inkubation mit AMVN

Aufgrund der unterschiedlichen protektiven Effekte in Zweikomponentenmischungen werden zwei Kombinationen ausgewählt und der Carotinoidkonzentrationsverlauf während der Inkubationszeit verfolgt. Dabei handelt es sich um M10 (synergistischer Effekt) und M13 (additiver Effekt). Tab. 7 zeigt die in regelmäßigen Abständen aufgenommenen Meßwerte der vier Carotinoide, Lykopen, Lutein, α -Carotin und β -Carotin.

Tab. 7: Carotinoidkonzentrationen in multilamellaren Liposomen während der Inkubation mit AMVN .

t/[min]	M10			M13			
	Lykopen ^a	Lutein ^a	n	α -Carotin ^a	n	β -Carotin ^a	n
0	1,5±0,15	1,5±0,12	4	1,00±0,15	3	2,00±0,18	3
20	1,44±0,11	1,12±0,19	4	0,83±0,05	3	1,63±0,23	3
40	1,36±0,14	0,97±0,14	4	0,69±0,10	3	1,33±0,15	3
60	1,47±0,05	0,80±0,07	4	0,43±0,05	3	0,80±0,08	3
80	1,27±0,23	0,70±0,08	4	0,24±0,02	3	0,45±0,03	3
100	1,04±0,27	0,69±0,11	4	0,24±0,02	3	0,45±0,05	3
120	1,45±0,09	0,51±0,10	4	0,11±0,02	3	0,40±0,03	3

^a Konzentrationsangaben in nmol Carotinoid/mg Phospholipid.

Es lassen sich zwei unterschiedliche Zeitverläufe feststellen. Die Lutein-, α -Carotin- und β -Carotinkonzentrationen nehmen während der Inkubation ab, während die Lykopenmenge in der Liposomensuspension sich nur geringfügig ändert (s. Abb. 13 und 14, S. 39). In Tabelle 9 (S. 41) sind die aus den Meßdaten berechneten Gleichungen der Konzentrations-Zeitabhängigkeit aufgelistet.

Abb. 13: Carotinoidkonzentrations-Zeitverlauf von Lykopen und Lutein in der Mischung M10 während der Inkubation mit AMVN (♦: Lykopen; ●: Lutein).

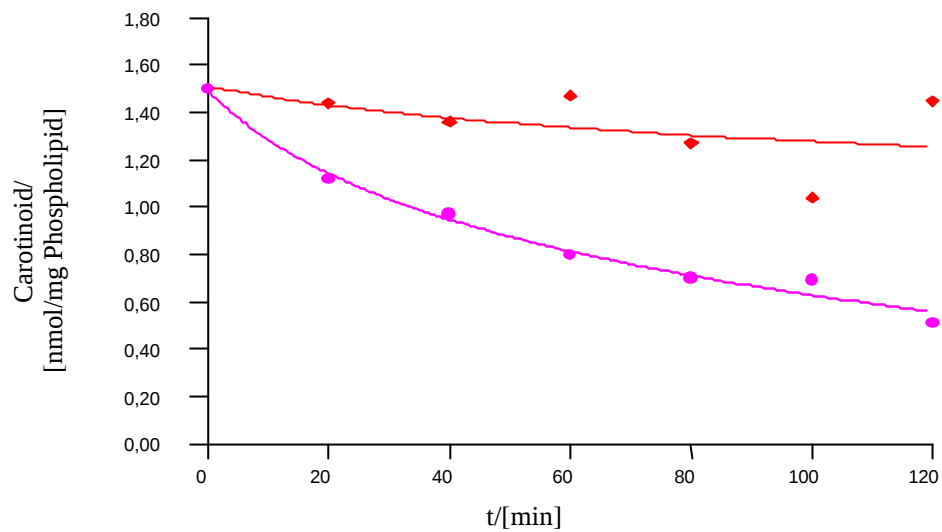
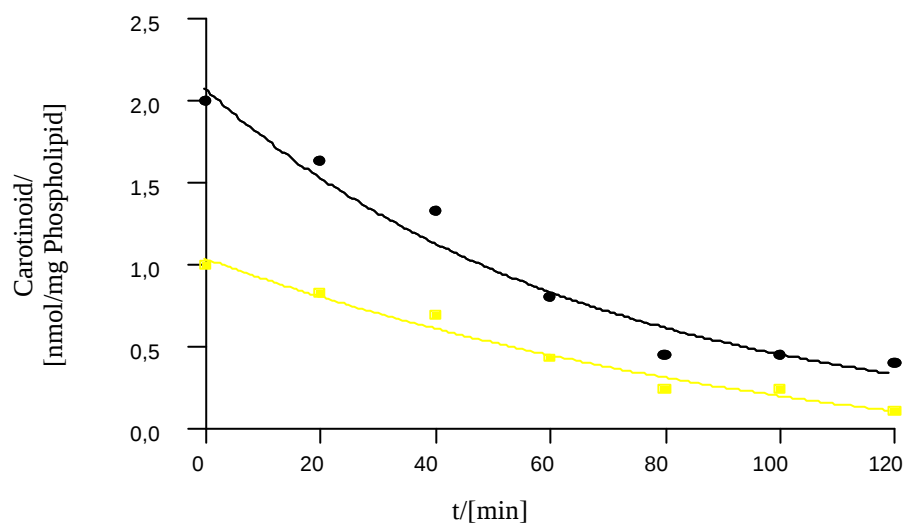


Abb. 14: Carotinoidkonzentrations-Zeitverlauf von α -Carotin und β -Carotin in der Mischung M13 während der Inkubation mit AMVN (■: α -Carotin; ●: β -Carotin).



Wegen des untypischen Verhaltens in der Kombination Lutein/Lycopin wird der Konzentrationsverlauf von Lycopin als Einzelkomponente in Liposomen bei verschiedenen Startmengen (3 nmol Lycopin/mg Phospholipid, bzw. 0,3 nmol Lycopin/mg Phospholipid) näher untersucht. Die Ergebnisse der Messungen sind in Tab. 8 dargestellt.

Tab. 8: Konzentrations-Zeitverlauf von Lycopin in multilamellaren Liposomen während der AMVN-Inkubation.

t/[min]	Lykopin ^a	n	Lykopin ^a	n
0	3,00±0,25	5	0,30±0,02	3
20	2,98±0,03	5	0,11±0,01	3
40	2,76±0,54	5	0,06±0,02	3
60	2,92±0,19	5	0,06±0,01	3
80	2,90±0,22	5	0,06±0,01	3
100	3,00±0,00	5	0,06±0,01	3
120	2,93±0,16	5	0,05±0,01	3

^a Konzentrationsangaben in nmol Carotinoid/mg Phospholipid.

Wie die Daten zeigen, bleibt der Lykopingehalt bei einer Anfangskonzentration von 3 nmol/mg Phospholipid auch dann konstant, wenn dieses Carotinoid allein in die Membranen der Liposomen eingebaut wird. Wird die Konzentration auf ein Zehntel verringert, so beobachtet man zunächst eine Abnahme der Lykopinkonzentration in den ersten 40 min, danach jedoch bleibt der Carotinoidgehalt nahezu konstant (s. Abb. 15, S. 41 und 16, S. 42).

Aus den experimentellen Daten werden Gleichungen für die Konzentrations-Zeit-Kurven berechnet (Tab. 9, S. 41).

Tab. 9: Aus den experimentellen Daten berechnete Konzentrations-Zeit-Kurven.

Carotinoid/Mischung	Zusammensetzung/ Startkonzentration ^a	Carotinoidabnahmefunktion	r ^b
M10	Lutein/Lycopin [1,5/1,5]	[Lutein] = $-0,4 \times \ln(t+16,1) + 2,7$ Lycopin: annähernd konstant	0,99 -
M13	α -Carotin/ β -Carotin [1,0/2,0]	[α -Carotin] = $1,4 \times e^{(-0,01 \times t)} - 0,4$ [β -Carotin] = $2,1 \times e^{(-0,02 \times t)}$	0,99 0,97
	Lycopin [3,0]	konstant	-
	Lycopin [0,3]	[Lycopin] = $-0,03 \times \ln(t+0,02) + 0,2$	1,00

^a Konzentrationsangaben in nmol Carotinoid/mg Phospholipid.^b Korrelationskoeffizient.

Abb. 15: Darstellung des Konzentrations-Zeitverlaufs von Lycopin (●) während der Inkubation mit AMVN; Anfangskonzentration 3 nmol/mg Phospholipid.

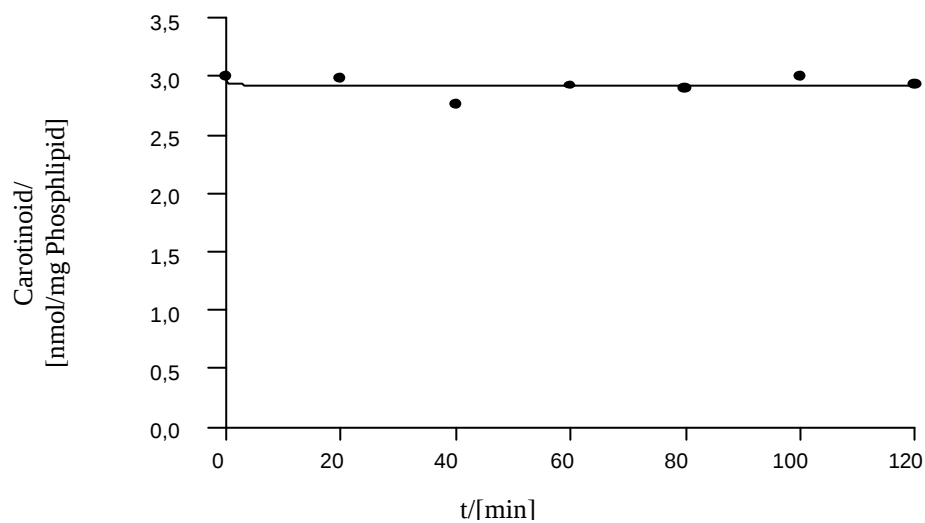
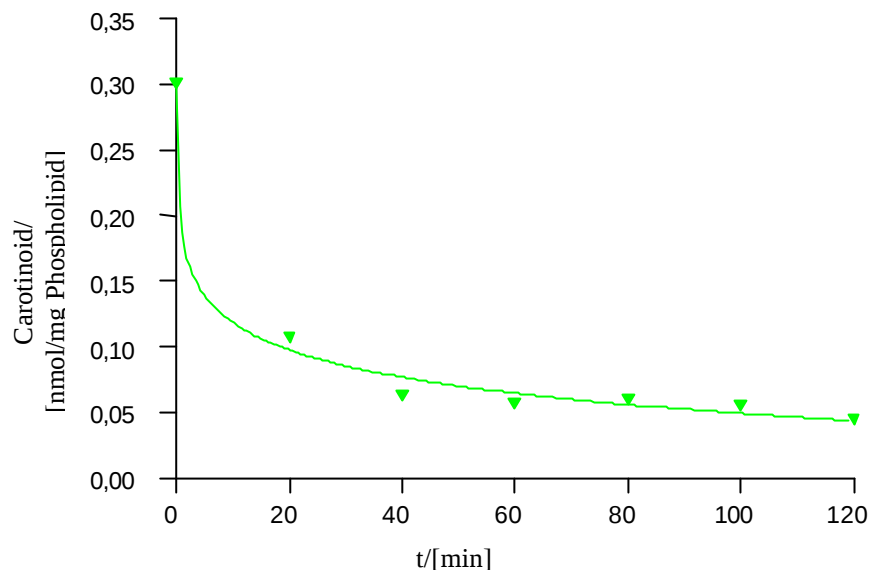


Abb. 16: Darstellung des Konzentrations-Zeitverlaufs von Lykopen (▼) während der Inkubation mit AMVN; Anfangskonzentration 0,3 nmol/mg Phospholipid.



3.2 Unilamellare Liposomen

3.2.1 Antioxidatives und prooxidatives Verhalten verschiedener Carotinoide in unilamellaren Liposomen

Um den Bedingungen einer Biomembran möglichst nahe zu kommen, werden verschiedene Carotinoide in die Lipiddoppelschicht von unilamellaren Liposomen, die durch Extrusion (Polycarbonatmembran, Porengröße 100 nm) erhalten werden, inkorporiert. Die Suspensionen werden mit 10 mM AMVN inkubiert und die TBARS-Entwicklung als Indikator der Lipidperoxidation bestimmt. Aufgrund ihrer unterschiedlichen Struktur und der Befunde aus dem multilamellaren Liposomensystem werden β -Carotin, Lykopen und Lutein für die Untersuchung verwendet. Um mögliche Konzentrationseffekte beobachten zu können, werden unterschiedliche Mengen der Carotinoide eingesetzt und die Bildung von TBARS im Vergleich zu einer Kontrollsuspension ohne Carotinoide analysiert. Im Fall der unilamellaren Liposomen wird zur Bestimmung der TBARS die HPLC-Auftrennung verwendet (s. Kap. 2.3.6 b, S. 26) und das entsprechende Signal als MDA-Äquivalent ausgewertet. Da

auch andere Dialdehyde mit vergleichbarer Retentionszeit auftreten, wird weiterhin der Begriff TBARS verwendet.

Die Ergebnisse aus dem Modell mit unilamellaren Liposomen (s. Tab. 10, S. 44) unterscheiden sich von denen aus dem Modell multilamellarer Liposomen:

- 1) Die in den Kontrollliposomen gebildete TBARS-Menge ist um den Faktor zehn höher (24,2 nmol TBARS/mg Phospholipid) als in der vergleichbaren Suspension multilamellarer Liposomen (2,1 nmol TBARS/mg Phospholipid), obwohl die Lipidkonzentration in beiden Ansätzen gleich ist.
- 2) Die antioxidativen Eigenschaften der Carotinoide sind verändert.

β -Carotin zeigt hier einen stark prooxidativen Effekt, der konzentrationsabhängig ist. Bei einer Menge von 3 nmol eingebautem Carotinoid/mg Phospholipid werden 62 nmol TBARS/mg Phospholipid gebildet, was verglichen mit den 24 nmol TBARS/mg Phospholipid im Fall der Kontrolle die 2,6fache Menge ist (s. Tab. 10, S. 44). Mit sinkendem β -Carotingehalt nimmt der prooxidative Effekt ab, liegt aber bei einer Konzentration von 0,003 nmol Carotinoid/mg Phospholipid noch bei 160 %. Andere Effekte werden im Fall von Lycopin und Lutein beobachtet. Die lipidprotektive Wirkung des Lycopins (43 % TBARS verglichen mit der Kontrolle) nimmt in Vergleich zu der antioxidativen Aktivität im multilamellaren System ab (25 % TBARS-Entwicklung). Eine schützende Wirkung ist bei geringerem Lycopingehalt nicht nachweisbar, wenngleich auch kein prooxidativer Effekt beobachtet wird. Lutein zeigt innerhalb der getesteten Konzentrationen keine (3 nmol/mg Phospholipid), bzw. in kleineren Konzentrationen schwach prooxidative Wirkungen (0,3 nmol/mg Phospholipid). Die Lycopin/Lutein-Kombination, welche in multilamellaren Vesikelsuspensionen den stärksten Synergismus zeigt, wirkt inkorporiert in unilamellare Liposomen prooxidativ. Wie auch bei Lutein und Lycopin allein, scheint eine höhere Carotinoidkonzentration die Oxidation zu begünstigen.

Tab. 10: TBARS-Bildung in unilamellaren Liposomen (induziert durch 10 mM AMVN; 37°C; 2 h; 100 nm Polycarbonatmembranfilter)

Probe	Carotinoid/ [nmol/mg Phospholipid]	TBARS/ [nmol/mg Phospholipid]	TBARS/ [%] ^a	TBARS (berechnet) ^b / [%]	Δ ^c	n
Kontrolle	-	24,2±2	100±8	-	-	190
β-Carotin	3	62,2±10	257±17	-	-	69
	0,3	40,8±4	169±11	-	-	80
	0,03	37,7±4	156±12	-	-	30
	0,003	39,0±4	161±11	-	-	30
Lykopen	3	10,3±1	43±13	-	-	20
	0,3	25,3±1	105±3	-	-	20
Lutein	3	24,8±3	103±14	-	-	20
	0,3	29,2±0	121±1	-	-	20
M10 ^d	3	36,7±6	152±17	73	79	19
	0,3	40,0±10	165±20	113	52	20

^a 100% entsprechen 24,2 ± 2 nmol TBARS/mg Phospholipid.

^b berechneter additiver Wert (*Formel 1*, S. 32).

^c Differenz zwischen theoretischem und experimentell ermittelten Wert.

^d M10: Lykopen/Lutein-Kombination im Verhältnis 1:1.

3.2.2 Entwicklung einer Methode zur Präparation unilamellarer Liposomen beladen mit GSH

Um die Interaktionen von hydrophilen und lipophilen Antioxidantien in einem Modellsystem zu untersuchen, werden unilamellare Liposomen mit dem hydrophilen Glutathion beladen; die Membranen enthalten Carotinoide. Nach der Präparation muß das nicht eingeschlossene Antioxidans außerhalb der Vesikel entfernt werden. Eine weitere Anforderung an das zu entwickelnde Modell ist eine kurze Präparationszeit. Schließlich muß beachtet werden, daß durch die Präparation ausreichende Mengen an Liposomen hergestellt werden können.

Die Extrusion als erster Schritt der Präparation, nach der Bildung multilamellarer Liposomen, dient dazu, die Vesikel von ihren zahlreichen Membranschichten zu befreien (vergl. Abb. 17).

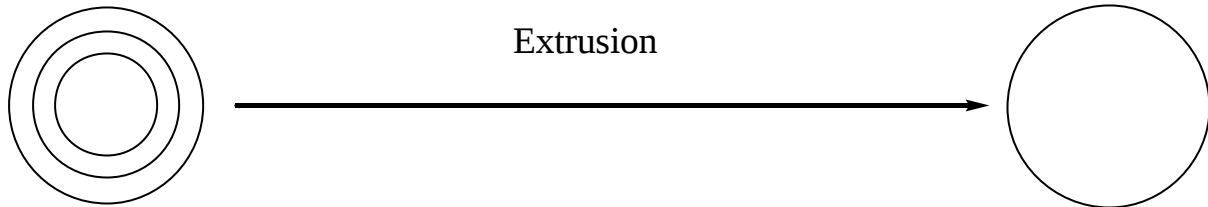


Abb. 17: Schema der Präparation unilamellarer Liposomen.

Durch wiederholtes Extrudieren (abhängig von der Lipidkonzentration sind 19-23 Extrusionen notwendig) der Suspension multilamellarer Liposomen werden die Vesikel gezwungen, sich der Porengröße der Polycarbonatfilters (s. Abb. 18) anzupassen. Dabei wird bei jedem Durchgang eine Membranschicht „abgeschält“; die Vesikel verändern ihre Form, werden dadurch instabil und formieren sich auf der gegenüberliegenden Seite des Filters zu kleineren Liposomen. Dies führt zu einer homogenen Größenverteilung. Werden zu viele Extrusionsdurchgänge ausgeführt, so ist die Neubildung der Vesikel nicht mehr möglich und unter dem Elektronenmikroskop sind nur noch Membranfragmente sichtbar.

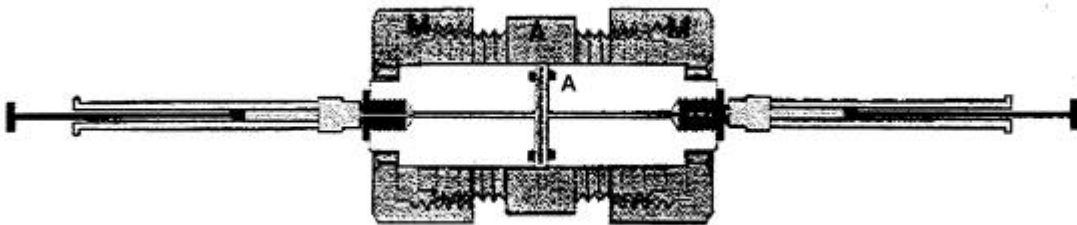


Abb. 18: Schema einer Extrusionsapparatur (A: Polycarbonatmembran).

Für die Reinigung stehen mehrere Methoden zur Verfügung:

- 1.) Dialyse
- 2.) Gelfiltration
- 3.) Zentrifugation
- 4.) Membranfiltration.

Aufgrund der langen Präparationsdauer und der damit verbundenen Gefahr, daß die oxidationsempfindlichen Substanzen abgebaut werden, ist die Dialyse als Reinigungsschritt

bei der Liposomensuspension wenig geeignet. Die Gelfiltration nimmt wesentlich weniger Zeit in Anspruch und die Elution der gefärbten Carotinoidliposomen kann direkt auf der Säule verfolgt werden. Das Ergebnis dieser Aufreinigung ist befriedigend, jedoch sind die resultierenden Vesikelfractionen sehr verdünnt, woraus sich analytische Probleme ergeben. Schließlich muß berücksichtigt werden, daß bei ansteigendem Volumen der zu reinigenden Suspension das Füllvolumen gesteigert werden muß und somit nur eingeschränkte Mengen an Liposomen präpariert werden können. Die schnellste Aufreinigungsmethode stellt die Zentrifugation, bzw. Ultrazentrifugation dar. Jedoch darf die g-Zahl, besonders im Fall der Ultrazentrifugation, nicht zu hoch gewählt werden, da die Liposomen aufgrund der hohen Beschleunigung zerstört werden und als unlösliches Pellet zurückbleiben. Gleiches gilt auch für die Membranfiltration (s. Abb. 19). Bei zu hohem Druck werden die Vesikel auf den Filterboden gepreßt und platzen.

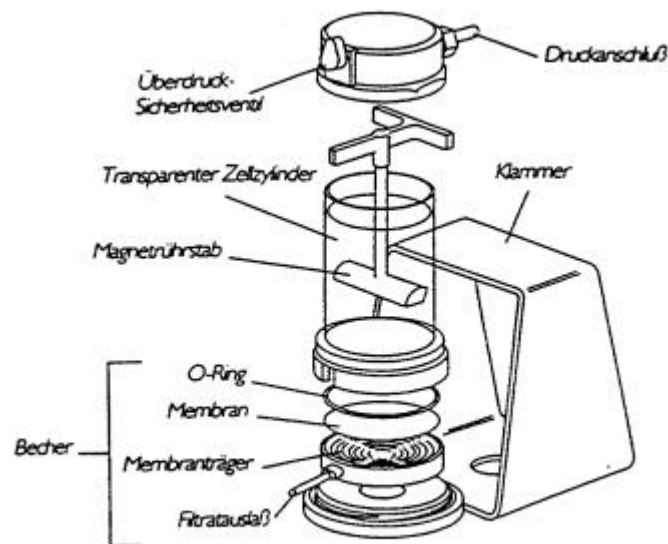


Abb. 19: Amicon-Rührzelle zur Membranfiltration.

Für die meisten Präparationen in dieser Arbeit wurde die Zentrifugationsmethode gewählt. Die nach Aufreinigung erhaltenen Liposomen können bis zur weiteren Verwendung ein bis zwei Tage bei 4°C aufbewahrt werden.

3.2.3 Charakterisierung der unilamellaren GSH-beladenen Liposomen

Für die Untersuchung der Wechselwirkung von hydrophilen und lipophilen Antioxidantien werden unilamellare Liposomen präpariert, die sowohl Glutathion als auch verschiedene Carotinoide enthalten. Die Form und Beschaffenheit der Vesikel wird elektronenmikroskopisch untersucht, der GSH-Gehalt mittels HPLC bestimmt.

Die aus 3-*sn*-Phosphatidylcholin gebildeten Liposomen enthalten ungesättigte und gesättigte Fettsäuren und zeichnen sich durch eine gleichmäßig runde Form aus (s. Abb. 20).

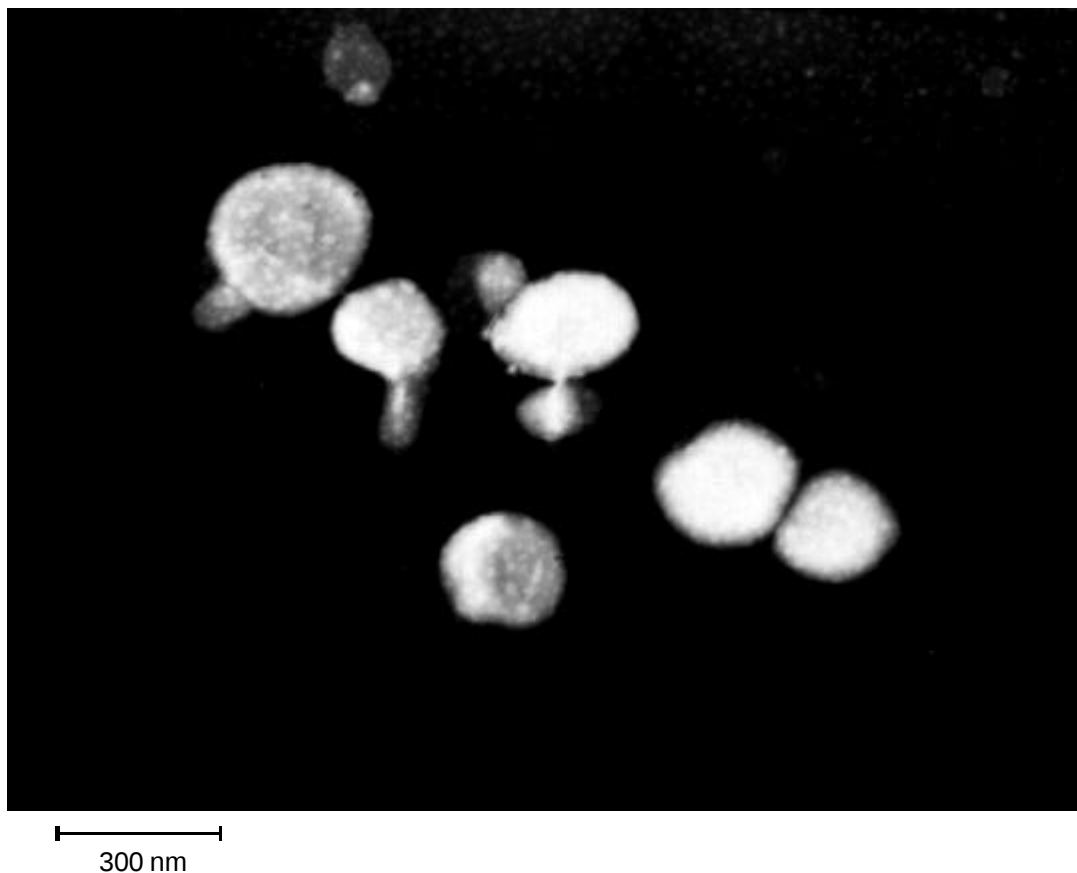


Abb. 20: Elektronenmikroskopische Aufnahme GSH-beladener unilamellarer Liposomen (Vergrößerung 13000fach).

Der Einbau von Carotinoiden in die Membran beeinflusst nicht die Gestalt der Vesikel. Durch Anfärbung der Umgebung mit Phosphorwolframsäure werden die Vesikel hell hervorgehoben. Gleichzeitig kann man mit diesem Verfahren feststellen, ob die Membranintegrität während der Präparation erhalten geblieben ist. Eine durchlässige Lipiddoppelschicht führt zur Dunkelfärbung des Liposomeninnenraums, da die Phosphorwolframsäure in diesen gelangen kann. Dies ist bei keiner der

elektronenmikroskopisch untersuchten Liposomenproben der Fall. Ebenso werden keine multilamellaren Vesikel gefunden, die von mehreren geschwärzten Membranen umgeben sind. Eine Möglichkeit, die Lipidschicht sichtbar zu machen, bietet der Einbau von „DiI“ (1,1'-Diocadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindocarbocyaninperchlorat), einem rot fluoreszierenden lipidlöslichen Farbstoff. Abb. 21 zeigt eine fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von markierten Vesikeln (Anregungswellenlänge: 450-490 nm; Detektion: 570-610 nm).

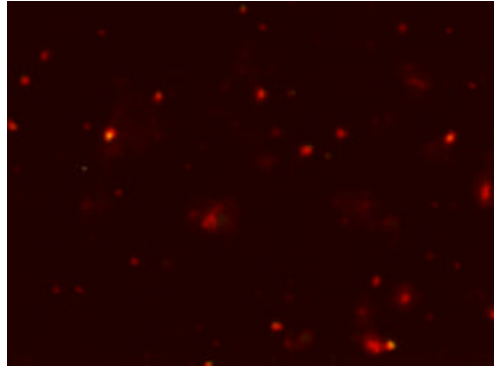
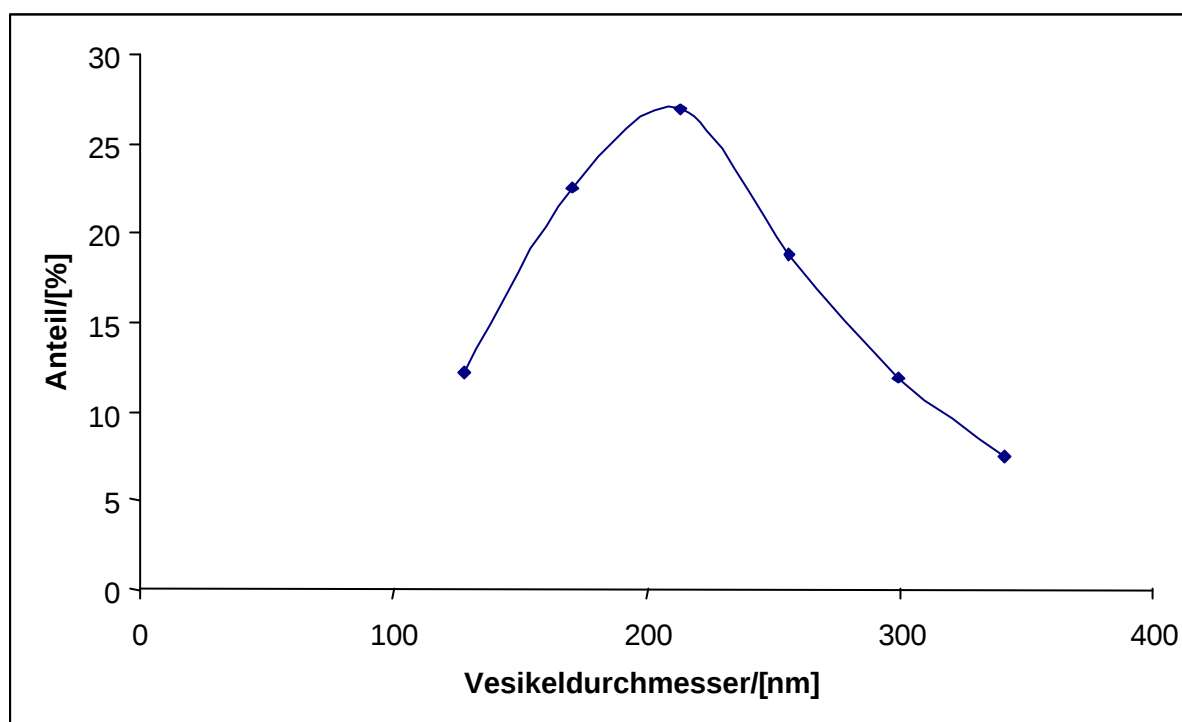


Abb. 21: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von „DiI“-markierten Liposomen.

Die Größenverteilung von Kontroll- und Carotinoidliposomen folgt der Gauß-Funktion (s. Abb. 22; S. 49) mit einem Maximum bei 214 ± 20 nm bei Verwendung eines Polycarbonatfilters mit 400 nm Porendurchmesser.

Abb. 22: Größenverteilung GSH-beladener Liposomen (Filterdurchmesser: 400 nm).



Bei Verwendung eines 100 mM GSH-Puffers beträgt die Menge des eingelagerten wasserlöslichen Antioxidans 20 ± 2 μmol GSH/mg Phospholipid ($n = 19$).

Nach Aufreinigen der Liposomen werden nur noch geringe Mengen an nicht eingeschlossenem GSH nachgewiesen. In der Kontrolle sind dies 6,7 % und in carotinoidbeladenen Liposomen 6,4 % des Gesamt-GSH-Gehalts.

Die Effizienz des Carotinoideinbaus ist abhängig vom verwendeten Carotinoid. So lassen sich bis zu 2,6 nmol Lutein /mg Phospholipid und 2,0 nmol β -Carotin/mg Phospholipid, jedoch lediglich 0,6 nmol Lykopen/mg Phospholipid in die Membran einbauen. Je unpolarer das verwendete Carotinoid ist, desto geringere Mengen werden in die Membran eingelagert.

3.2.4 Wechselwirkung von hydrophilen und lipophilen Antioxidantien in unilamellaren Liposomen

Um die Wechselwirkung von Glutathion und Carotinoiden zu untersuchen, werden unilamellare Liposomen mit 10 mM AMVN für 2 h inkubiert. Die aus 3-*sn*-Phosphatidylcholin gebildeten Liposomen enthalten ungesättigte und gesättigte Fettsäuren. Als Indikator der Oxidation werden die Bildung von TBARS und der Verbrauch an Glutathion und Carotinoiden gemessen.

In Liposomensuspensionen ohne GSH bilden sich 119 ± 6 nmol TBARS/mg Phospholipid. Dagegen zeigen GSH-gefüllte Vesikel eine deutlich verringerte TBARS-Bildung von 57 ± 8 nmol/mg Phospholipid (Tab. 11).

Tab. 11: TBARS-Bildung und Verbrauch an GSH in unilamellaren Liposomen während der zweistündigen Inkubation mit 10 mM AMVN (t = 0 TBARS-Werte wurden von jedem Meßwert subtrahiert, GSH-Startkonzentration: 20 μ mol/mg Phospholipid).

	Carotinoid (nmol/mg Phospholipid)	Carotinoidver- brauch (nmol/mg Phospholipid)	TBARS (nmol/mg Phospholipid)	GSH- Verbrauch (μ mol/mg Phospholipid)
Kontrolle - GSH	-	-	119 ± 6	-
Kontrolle + GSH	-	-	57 ± 8 ^{*a}	5.0 ± 0.8
+ Lutein	0.02	0.012 ± 0.002	76 ± 9 ^{*b}	7.4 ± 0.2
	0.16	0.116 ± 0.006	69 ± 3 ^{*c}	4.2 ± 0.2
	0.52	0.328 ± 0.010	61 ± 5	4.2 ± 2.2
	2.60	1.334 ± 0.064	44 ± 2 ^{*c}	3.0 ± 2.6
+ β -Carotin	0.02	0.018 ± 0.001	48 ± 8 ^{*d}	1.8 ± 1.6
	0.16	0.116 ± 0.008	57 ± 1	2.2 ± 0.0
	0.52	0.484 ± 0.002	62 ± 4	2.0 ± 0.4
	2.00	1.700 ± 0.018	64 ± 2 ^{*e}	5.6 ± 1.4
+ Lycopin	0.02	0.010 ± 0.002	41 ± 4 ^{*a}	5.4 ± 3.2
	0.06	0.012 ± 0.001	25 ± 7 ^{*a}	4.2 ± 2.6
	0.10	0.014 ± 0.030	55 ± 3	3.0 ± 0.8
	0.12	0.012 ± 0.008	71 ± 5 ^{*c}	2.6 ± 2.0

Kontrolle + GSH vs. Kontrolle - GSH:

Carotinoidliposomen vs. Kontrolle + GSH:

^{*a}: $P < 0.0005$

^{*a}: $P < 0.0005$

^{*b}: $P < 0.001$

^{*c}: $P < 0.005$

^{*d}: $P < 0.025$

^{*e}: $P < 0.05$.

Der zusätzliche Einbau von Carotinoiden in die Membran GSH-beladener Vesikel modifiziert den Schutz gegen Oxidation. Der Einbau von Lutein senkt die TBARS-Bildung lediglich in der höchsten untersuchten Konzentration (2,6 nmol Carotinoid/mg Phospholipid) signifikant auf 44 nmol TBARS/mg Phospholipid. Die lipidprotektive Wirkung nimmt mit geringerer Luteinkonzentration ab (Abb. 23, S. 52). Bei einem Carotinoidgehalt von 0,02 nmol Lutein/mg Phospholipid findet man mit 76 nmol TBARS/mg Phospholipid im Vergleich zur Kontrolle eine prooxidative Wirkung. Ähnliche Ergebnisse liefert auch die GSH-Messung. Bei Konzentrationen von 2,6 nmol Lutein/mg Phospholipid wird im Vergleich zur Kontrolle weniger GSH oxidiert; 3,0 μ mol/mg Phospholipid gegen 5,0 μ mol/mg Phospholipid. In Übereinstimmung mit dem bei 0,02 nmol Lutein/mg Phospholipid gefundenen prooxidativen Effekt (TBARS-Messung) beobachtet man bei dieser Konzentration einen höheren GSH-Verbrauch als in der Kontrolle mit 7,4 μ mol/mg Phospholipid.

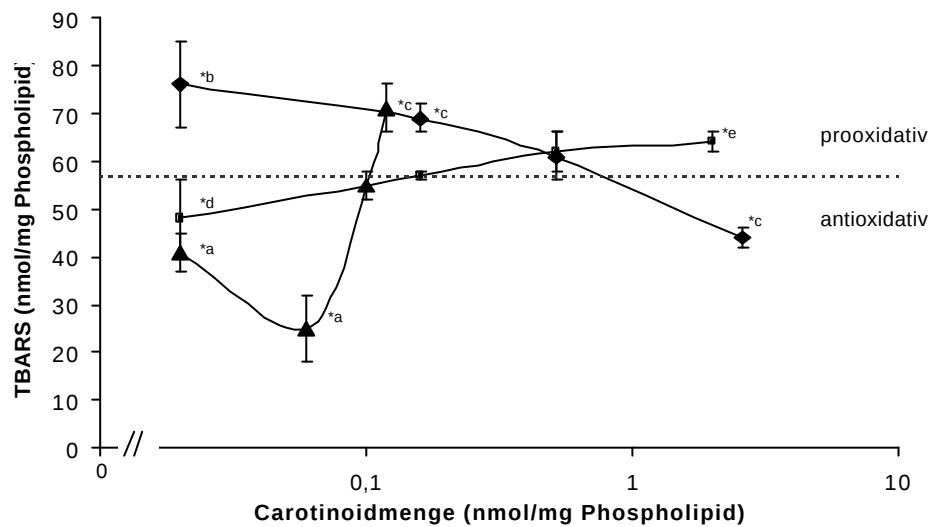
Im Gegensatz dazu kann bei einem Gehalt von 0,02 nmol β -Carotin/mg Phospholipid ein zwar geringer, aber statistisch signifikanter lipidprotektiver Effekt beobachtet werden. Die TBARS-Bildung sinkt von 57 nmol/mg Phospholipid ohne Carotinoid auf 48 nmol/mg Phospholipid. Der Einbau größerer Mengen dieses Carotinoids hemmt die Lipidperoxidation nicht weiter (Abb. 23, S. 52). Vielmehr wird ein Trend zur prooxidativen Wirkung festgestellt, die bei 2,0 nmol Carotinoid/mg Phospholipid statistisch signifikant ist (64 nmol TBARS/mg Phospholipid). In Bezug auf den Schutz des GSH vor Oxidation zeigt β -Carotin eine bessere Wirkung als Lutein. Niedrige Konzentrationen sind effektiver als höhere Konzentrationen. In einem Bereich von 0,02-0,52 nmol β -Carotin/mg Phospholipid wird der Verlust an GSH auf etwa 2,0 μ mol/mg Phospholipid vermindert.

Im Vergleich zu Lutein und β -Carotin können nur geringe Mengen an Lycopin in die Membran eingebaut werden. Daher erstreckt sich der untersuchte Konzentrationsbereich von 0,02 bis 0,12 nmol Lycopin/mg Phospholipid. Ein optimaler Effekt wird bei 0,06 nmol Lycopin/mg Phospholipid mit einer TBARS-Bildung von 25 nmol/mg Phospholipid beobachtet. Bei niedrigerer Konzentration verringert sich dieser Effekt, während bei höheren Konzentrationen (0,12 nmol Lycopin/mg Phospholipid) eine prooxidative Wirkung nachweisbar ist. Der Einbau von Lycopin in die Membran vermindert die Oxidation von GSH ähnlich dem Lutein konzentrationsabhängig. Mit steigender Menge des Carotinoids wird weniger GSH oxidiert.

Auch beim Carotinoidverbrauch werden unterschiedliche Beobachtungen gemacht. Der Carotinoidgehalt in Lutein- und β -Carotinesikeln nimmt während der Inkubation deutlich

ab, während die Lycopinkonzentration unabhängig von der anfangs eingesetzten Menge nahezu konstant bleibt.

Abb. 23: Effekt verschiedener Carotinoide (Lutein (◆), β -Carotin (■) und Lycopin (▲)) auf die Lipidperoxidation in GSH-beladenen Liposomen (Inkubation mit 10 mM AMVN bei 2 h, 37°C; die gestrichelte Linie entspricht dem TBARS-Wert der Kontrollvesikel).



*a: $P < 0.0005$

*b: $P < 0.001$

*c: $P < 0.005$

*d: $P < 0.025$

*e: $P < 0.05$.

3.2.5 Zeitabhängige Änderung verschiedener Oxidationsparameter in GSH-beladenen Liposomen während vierstündiger Inkubation mit AMVN

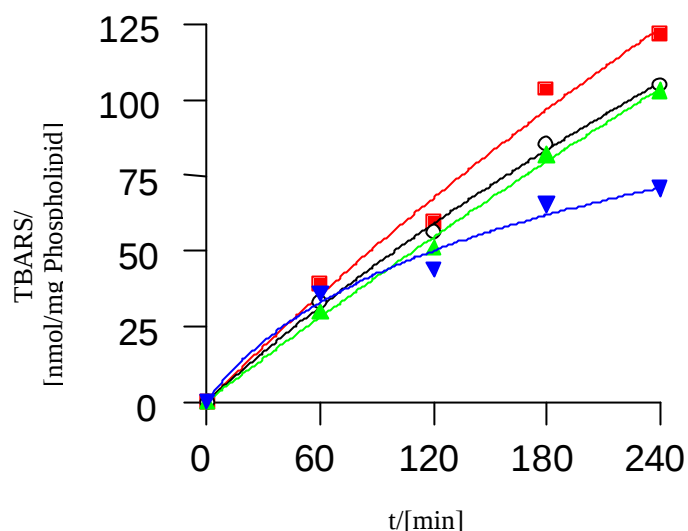
Der Verlauf der TBARS-Bildung ist ein Parameter für die Oxidation der Liposomenmembran ($n = 2-4$). Abb. 24-26 (S. 54-57) zeigen die Zunahme der TBARS-Menge in Abhängigkeit der Zeit. In der Kontrolle wird nach vierstündiger Inkubation mit 10 mM AMVN ein Wert von 105 nmol TBARS/mg Phospholipid gemessen (Tab. 12). Der TBARS-Anstieg verläuft linear. Der Einbau von Carotinoiden in die liposomale Membran modifiziert die zeitabhängige TBARS-Bildung.

Bei hohem Luteingehalt von 2,6 nmol/mg Phospholipid erreicht die TBARS-Menge nach 4 h 67 % des Wertes (71 nmol TBARS/mg Phospholipid), der für die Kontrollvesikel gemessen wird (Abb. 24, S. 54 und Tab. 12). Der lipidprotektive Effekt nimmt mit sinkender Carotinoidkonzentration ab. Bei einem Gehalt von 0,16 nmol Lutein/mg Phospholipid zeigt sich mit 122 nmol TBARS/mg Phospholipid eine prooxidative Wirkung.

Tab. 12: TBARS-Bildung in Kontroll- und luteinbeladenen Liposomen (10 mM AMVN; 37°C; 2 h; 400 nm Polycarbonatfilter).

t[min.]	Kontrolle	0,16 nmol Lutein/mg Phospholipid	0,52 nmol Lutein/mg Phospholipid	2,60 nmol Lutein/mg Phospholipid
	nmol TBARS/mg Phospholipid			
0	0	0	0	0
60	33,2±6	38,8±0,4	29,9±1,1	36,1±3,7
120	56,3±9,7	59,8±2,2	51,3±4,1	43,9±4,3
180	85,6±14,2	103,7±9,6	81,9±11,3	65,5±6,2
240	105,2±17,7	121,8±9,6	103,8±2,2	70,7±04

Abb. 24: Zeitabhängige Bildung von TBARS in luteinbeladenen Liposomen (0,16 nmol/mg Phospholipid (■), 0,52 nmol/mg Phospholipid (▲) und 2,6 nmol/mg Phospholipid (▼)) im Vergleich zur Kontrolle (○).

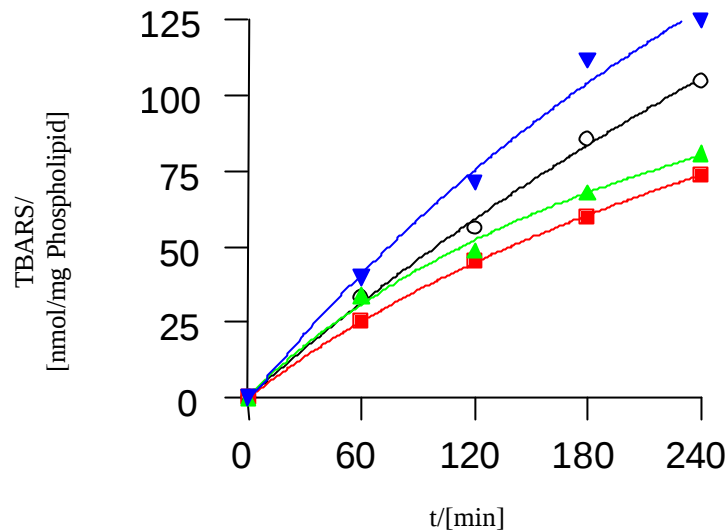


Bei β -Carotinkonzentrationen von 0,02 nmol/mg Phospholipid und 0,16 nmol/mg Phospholipid nimmt die TBARS-Bildung nach 4 h auf Werte von 70 % (74 nmol TBARS/mg Phospholipid; Tab. 13), bzw. 77 % (81 nmol TBARS/mg Phospholipid) verglichen mit der Kontrolle ab. In der höchsten Konzentration zeigt β -Carotin eine prooxidative Wirkung; 126 nmol TBARS/mg Phospholipid. Die Ergebnisse für β -carotin- und lykopenbeladene Liposomen sind in Abb. 25 (S. 55) und 26 (S. 57) dargestellt.

Tab. 13: TBARS-Bildung in β -carotinbeladenen Liposomen verschiedener Konzentration (10 mM AMVN; 37°C; 2 h; 400 nm Polycarbonatfilter; die Daten für die zeitabhängige TBARS-Bildung in Kontrollliposomen sind in Tab. 12, S. 53 dargestellt).

t/[min.]	0,02 nmol β -Carotin/mg Phospholipid	0,16 nmol β -Carotin/mg Phospholipid	0,52 nmol β -Carotin/mg Phospholipid
	nmol TBARS/mg Phospholipid		
0	0	0	0
60	25,2 $\pm$ 6,8	34,1 $\pm$ 6,2	40,1 $\pm$ 3,0
120	45,2 $\pm$ 2,3	48,8 $\pm$ 1,4	71,3 $\pm$ 3,6
180	59,7 $\pm$ 0,7	68,1 $\pm$ 5,4	111,8 $\pm$ 0,8
240	74,0 $\pm$ 11,5	80,9 $\pm$ 12,1	126,0 $\pm$ 4,6

Abb. 25: Zeitabhängige Bildung von TBARS in β -carotinbeladenen Liposomen (0,02 nmol/mg Phospholipid (■), 0,16 nmol/mg Phospholipid (▲) und 0,52 nmol/mg Phospholipid (▼)) im Vergleich zur Kontrolle (○).



Da der Einbau von Lykopen in Membranen, die ungesättigte und gesättigte Fettsäuren enthalten, gering ist, liegen auch in diesem Experiment nur Ergebnisse im Konzentrationsbereich von 0,02 bis 0,12 nmol Lykopen/mg Phospholipid vor (Tab. 14, S. 56; Abb. 26, S. 57). Ein Minimum an Lipidperoxidation wird bei einer Lykopenmenge von 0,06 nmol/mg Phospholipid mit einer TBARS-Endkonzentration (4 h Inkubation) von 37 nmol/mg Phospholipid (entspricht 35 % der Kontrollvesikel) beobachtet. Wie auch bei der zweistündigen Inkubation, bietet ein niedrigerer Lykopingehalt weniger Schutz (49 nmol TBARS/mg Phospholipid). Bei höheren Carotinoidkonzentrationen wird eine geringere antioxidative Aktivität gefunden.

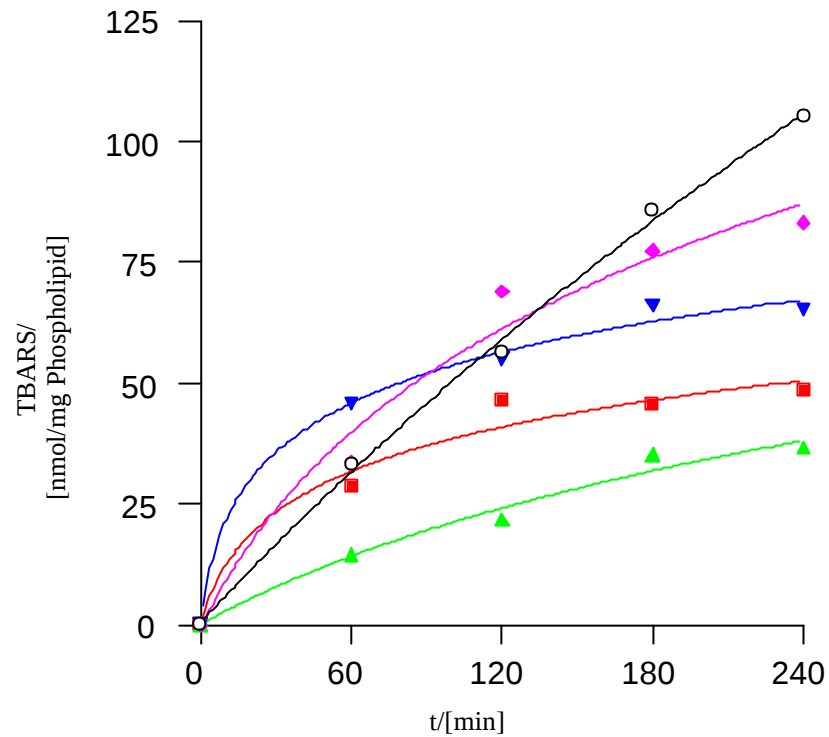
Tab. 14: TBARS-Bildung in lykopinbeladenen Liposomen verschiedener Konzentration (10 mM AMVN; 37°C; 2 h; 400 nm Polycarbonatfilter; die Daten für die zeitabhängige TBARS-Bildung in Kontrollliposomen sind in Tab. 12, S. 53 dargestellt).

t/[min.]	0,02 nmol Lykopin/mg Phospholipid	0,06 nmol Lykopin/mg Phospholipid	0,10 nmol Lykopin/mg Phospholipid	0,12 nmol Lykopin/mg Phospholipid
	nmol TBARS/mg Phospholipid			
0	0	0	0	0
60	28,8±4,1	14,5±0,9	45,8±6,3	33,6±2,4
120	46,3±4,3	21,8±2,0	55,0±6,3	69,0±17
180	45,7±0,8	35,1±3,2	66,0±2,8	77,3±4,3
240	48,5±0,5	36,6±1,9	65,3±11	83,2±3,7

Die Daten sind in guter Übereinstimmung mit den in Kap. 3.2.4, S. 49 erhaltenen Ergebnissen.

Basierend auf den erhaltenen Meßdaten können zeitabhängige Funktionen der TBARS-Bildung berechnet werden (Tab. 15, S. 58).

Abb. 26: Zeitabhängige Bildung von TBARS in lykopinbeladenen Liposomen (0,02 nmol/mg Phospholipid (■), 0,06 nmol/mg Phospholipid (▲), 0,1 nmol/mg Phospholipid (▼) und 0,12 nmol/mg Phospholipid (◆)) im Vergleich zur Kontrolle (○).



Tab. 15: Aus experimentellen Daten berechnete zeitabhängige Funktionen und Korrelationskoeffizienten (r) für den Verlauf von TBARS-Entwicklung und GSH-Verbrauch in Kontroll- und Carotinoidliposomen.

Carotinoid ^a		TBARS-Bildung ^b (Funktion)	r	GSH-Abnahme ^c (Funktion)	r
Kontrolle	-	$[TBARS]=0,5 \times t$	0,99	$[GSH]=-0,04 \times t + 20,0$	1,00
Lutein	0,16	$[TBARS]=377,3 \times \ln(t+619,3) - 2424,8$	0,99	$[GSH]=-3,6 \times \ln(t+27,3) + 31,8$	0,92
	0,52	$[TBARS]=526,8 \times \ln(t+1111,1) - 3689,5$	1,00	$[GSH]=-22,8 \times \ln(t+579,4) + 164,6$	0,99
	2,60	$[TBARS]=38,0 \times \ln(t+44,4) - 143,9$	0,99	$[GSH]=-36,7 \times \ln(t+1101,1) + 277,1$	0,99
β -Carotin	0,02	$[TBARS]=83,9 \times \ln(t+170,7) - 431,3$	1,00	$[GSH]=-25,0 \times \ln(t+1101,1) + 195,7$	0,96
	0,16	$[TBARS]=63,3 \times \ln(t+95,2) - 287,8$	1,00	$[GSH]=-28,5 \times \ln(t+1101,1) + 220,3$	0,98
	0,52	$[TBARS]=194,3 \times \ln(t+251,3) - 1074,6$	1,00	$[GSH]=-36,6 \times \ln(t+1101,1) + 276,7$	0,96
Lykopen	0,02	$[TBARS]=14,5 \times \ln(t+7,5) - 29,3$	0,99	$[GSH]=-2,9 \times \ln(t+18,6) + 28,4$	1,00
	0,06	$[TBARS]=34,2 \times \ln(t+117,3) - 163,1$	0,99	$[GSH]=-2,5 \times \ln(t+28,2) + 28,5$	1,00
	0,10	$[TBARS]=15,9 \times \ln(t+3,6) - 20,4$	1,00	$[GSH]=-28,2 \times \ln(t+1101,1) + 217,8$	0,99
	0,12	$[TBARS]=47,1 \times \ln(t+43,9) - 179,1$	0,99	$[GSH]=-29,8 \times \ln(t+1101,1) + 229,0$	0,97

^a Konzentrationsangabe in nmol Carotinoid/mg Phospholipid.

^b TBARS in nmol/mg Phospholipid.

^c GSH in μ mol/mg Phospholipid.

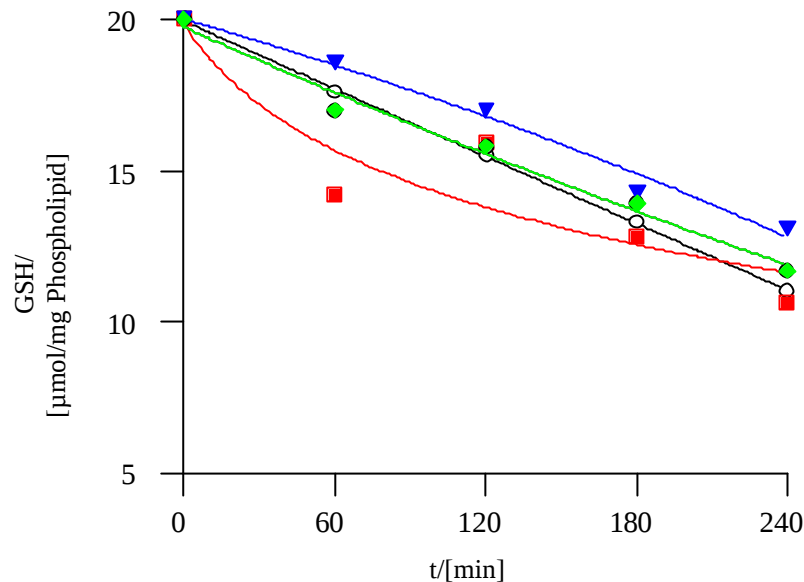
Während der Inkubation der Kontrollvesikel mit AMVN nimmt der GSH-Gehalt im Liposomeninnenraum kontinuierlich ab (s. Tab. 16 und Abb. 27, S. 60). Durch die Einlagerung von Carotinoiden in die liposomale Membran ändert sich die GSH-Abnahme (s. Abb. 27-29, S. 60-63; n = 2-4).

Der GSH-Verbrauch in luteinbeladenen Liposomen ist abhängig von der Carotinoidkonzentration, d. h. je größer die Menge an eingesetztem Carotinoid ist, desto weniger GSH wird oxidiert (Tab. 16). Nach vierstündiger Inkubation liegt der GSH-Gehalt bei Liposomen mit einer Luteinkonzentration von 2,6 nmol/mg Phospholipid bei 13,1 μ mol GSH/mg Phospholipid, was 66 % der Anfangskonzentration (20 μ mol GSH/mg Phospholipid) entspricht. In Kontrollvesikeln zeigt sich ein höherer Verbrauch mit einem GSH-Endwert von 11 μ mol/mg Phospholipid (55 % der Startkonzentration). In Gegenwart von 0,52 nmol Lutein/mg Phospholipid wird lediglich ein schwacher antioxidativer Effekt beobachtet (s. Abb. 27, S. 60).

Tab. 16: GSH-Verbrauch in Kontroll- und luteinbeladenen Liposomen.

t/[min.]	Kontrolle	0,16 nmol Lutein/mg Phospholipid	0,52 nmol Lutein/mg Phospholipid	2,60 nmol Lutein/mg Phospholipid
	μ mol GSH/mg Phospholipid / (% der Anfangskonzentration)			
0	20,0 $\pm$ 2,0 (100)	20,0 $\pm$ 2,0 (100)	20,0 $\pm$ 2,0 (100)	20,0 $\pm$ 2,0 (100)
60	17,6 $\pm$ 1,6 (88)	14,2 $\pm$ 0,5 (74)	17,0 $\pm$ 1,7 (85)	18,6 $\pm$ 2,7 (93)
120	15,5 $\pm$ 1,2 (77)	15,9 $\pm$ 2,1 (79)	15,8 $\pm$ 2,1 (79)	17,0 $\pm$ 3,0 (85)
180	13,3 $\pm$ 2,1 (67)	12,8 $\pm$ 2,4 (64)	13,9 $\pm$ 1,8 (69)	14,3 $\pm$ 1,2 (71)
240	11,0 $\pm$ 2,0 (55)	10,6 $\pm$ 0,7 (53)	11,7 $\pm$ 1,7 (58)	13,1 $\pm$ 1,1 (66)

Abb. 27: Abnahme des GSH in luteinbeladenen Liposomen (0,16 nmol Lutein/mg Phospholipid (■), 0,52 nmol Lutein/mg Phospholipid (◆) und 2,6 nmol Lutein/mg Phospholipid (▼)) im Vergleich zu Kontrollvesikeln (○).

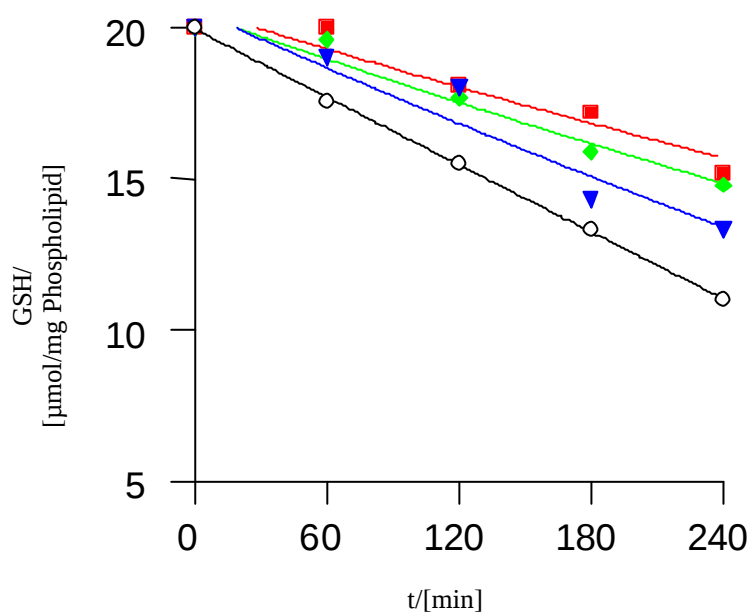


In β -carotinbeladenen Vesikeln nimmt der GSH-Verbrauch mit steigender Carotinoidkonzentration zu (s. Tab. 17, S. 61 und Abb. 28, S. 61). Dies stimmt mit den TBARS-Messungen überein. Die GSH-Menge in Liposomen mit einer β -Carotinkonzentration von 0,02 nmol/mg Phospholipid bleibt während der ersten Inkubationsstunde konstant, dann wird eine Abnahme beobachtet. 0,16, bzw. 0,52 nmol Carotinoid/mg Phospholipid bewirken eine GSH-Abnahme auf 15, bzw. 13 μ mol GSH/mg Phospholipid. Den geringsten Gesamtverbrauch an GSH zeigt die Vesikelsuspension mit einem β -Carotingehalt von 0,02 nmol/mg Phospholipid und einer GSH-Endkonzentration von 15 μ mol/mg Phospholipid.

Tab. 17: GSH-Verbrauch in β -carotinbeladenen Liposomen (die entsprechenden Daten des GSH-Verbrauchs der Kontrolle sind in Tab. 16, S. 59 wiedergegeben).

t/[min.]	0,02 nmol β -Carotin/mg Phospholipid	0,16 nmol β -Carotin/mg Phospholipid	0,52 nmol β -Carotin/mg Phospholipid
	$\mu\text{mol GSH/mg Phospholipid} /$ (% der Anfangskonzentration)		
0	20,0 $\pm$ 2,0 (100)	20,0 $\pm$ 2,0 (100)	20,0 $\pm$ 2,0 (100)
60	20,0 $\pm$ 3,7 (100)	19,6 $\pm$ 1,1 (98)	19,0 $\pm$ 2,7 (95)
120	18,1 $\pm$ 1,5 (91)	17,7 $\pm$ 0,1 (89)	18,0 $\pm$ 0,4 (90)
180	17,2 $\pm$ 0,6 (86)	15,9 $\pm$ 0,9 (79)	14,3 $\pm$ 0,4 (71)
240	15,2 $\pm$ 0,8 (76)	14,8 $\pm$ 0,9 (74)	13,3 $\pm$ 0,7 (67)

Abb. 28: Abnahme des GSH in β -carotinbeladenen Liposomen (0,02 nmol β -Carotin/mg Phospholipid (■), 0,16 nmol β -Carotin/mg Phospholipid (◆) und 0,52 nmol β -Carotin/mg Phospholipid (▼)) im Vergleich zu Kontrollvesikeln (○).



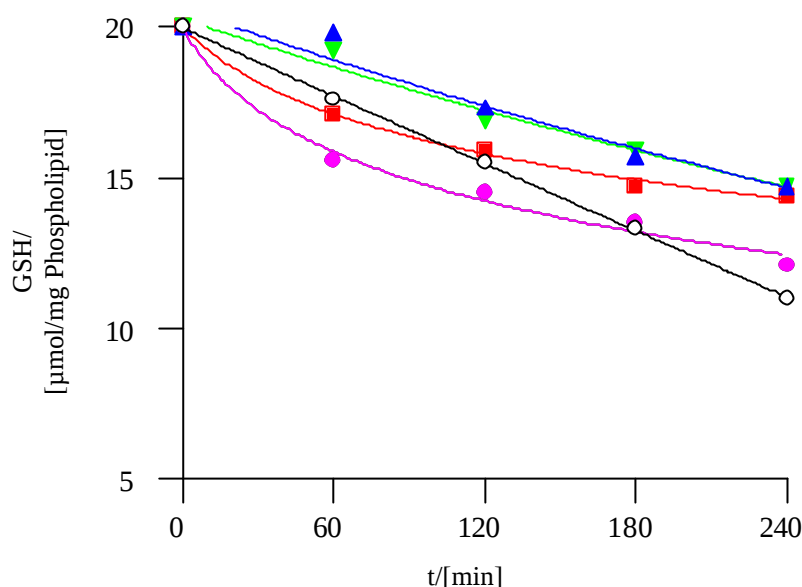
Die Daten der GSH-Abnahme lykopinbeladener Liposomen korrelieren nicht mit den Ergebnissen der entsprechenden TBARS-Messung (s. Tab. 18, S. 62 und Abb. 29, S. 63). Konzentrationen im Bereich von 0,1 bis 0,12 nmol Carotinoid/mg bewirken einen

verminderten Verlust an GSH (15 μmol GSH/mg Phospholipid). Bei einer Konzentration von 0,06 nmol Lykopen/mg Phospholipid tritt ein Schutzeffekt erst verspätet auf. Bei einer Konzentration von 0,02 nmol Carotinoid/mg Phospholipid wird zunächst ein höherer GSH-Verbrauch beobachtet, später jedoch nimmt dieser Effekt ab. Die aus den experimentellen Daten des GSH-Verbrauchs aller Liposomenproben berechneten zeitabhängigen GSH-Abnahmefunktionen sind in Tab. 15 (S. 58) wiedergegeben.

Tab. 18: GSH-Verbrauch in lykopenbeladenen Liposomen (die entsprechenden Daten des GSH-Verbrauchs der Kontrolle sind in Tab. 16, S. 59 wiedergegeben).

t/[min.]	0,02 nmol Lykopen/mg Phospholipid	0,06 nmol Lykopen/mg Phospholipid	0,10 nmol Lykopen/mg Phospholipid	0,12 nmol Lykopen/mg Phospholipid
	μmol GSH/mg Phospholipid / (% der Anfangskonzentration)			
0	20,0 $\pm$ 2,0 (100)	20,0 $\pm$ 2,0 (100)	20,0 $\pm$ 2,0 (100)	20,0 $\pm$ 2,0 (100)
60	15,6 $\pm$ 0,7	17,1 $\pm$ 1,6	19,2 $\pm$ 0,09	19,8 $\pm$ 1,1
120	14,5 $\pm$ 3,2	15,9 $\pm$ 2,6	16,9 $\pm$ 0,9	17,3 $\pm$ 2,0
180	13,5 $\pm$ 3,0	14,7 $\pm$ 0,5	15,9 $\pm$ 0,8	15,7 $\pm$ 0,8
240	12,1 $\pm$ 2,5	14,4 $\pm$ 1,5	14,7 $\pm$ 1,1	14,7 $\pm$ 1,5

Abb. 29: Abnahme des GSH in lykopinbeladenen Liposomen (0,02 nmol Lykopen/mg Phospholipid (●), 0,06 nmol Lykopen/mg Phospholipid (■), 0,1 nmol Lykopen/mg Phospholipid (▼) und 0,12 nmol Lykopen/mg Phospholipid (▲)) im Vergleich zu Kontrollvesikeln (○).



Die Konzentrationsverläufe der verschiedenen Carotinoide zeigen während der Inkubation starke Unterschiede (Tab. 19, Abb. 30, S. 64 und Abb. 31, S. 65). Anhand der Daten kann für den Luteingehalt eine exponentielle Abnahme und für β -Carotin ein logarithmischer Verlauf berechnet werden (Tab. 20, S. 64). Wie aus Abb. 31 (S. 65) hervorgeht zeigt das unpolare Carotinoid eine stärkere Konzentrationsabnahme als Lutein. Im Gegensatz dazu nimmt die Lykopinmenge nur in sehr geringem Maße ab. Nach einer anfänglichen leichten Abnahme bleibt die Lykopinkonzentration annähernd konstant (Tab. 19).

Tab. 19: Konzentration verschiedener Carotinoide in Liposomen während der Inkubation mit AMVN.

t/[min.]	Lutein	Lutein	β -Carotin	β -Carotin	Lykopen
	nmol Carotinoid/mg Phospholipid				
0	0,160±0,012	0,520±0,031	0,160±0,009	0,520±0,034	0,128±0,002
60	0,086±0,006	0,327±0,011	0,061±0,005	0,086±0,017	0,100±0,019
120	0,042±0,005	0,192±0,011	0,044±0,009	0,036±0,002	0,102±0,008
180	0,030±0,005	0,111±0,011	0,029±0,010	0,018±0,004	0,098±0,001
240	0,017±0,002	0,067±0,009	0,021±0,000	0,015±0,001	0,100±0,006

Tab. 20: Funktionen der zeitabhängigen Carotinoidkonzentration in der liposomalen Membran.

nmol Carotinoid/ mg Phospholipid		Funktion der Carotinoidkonzentration	r^a
Lutein	0,16	$[Lutein]=0,2 \times e^{(-0,010 \times t)} + 0,006$	1,00
	0,52	$[Lutein]=0,5 \times e^{(0,008 \times t)} - 0,007$	1,00
β -Carotin	0,16	$[\beta\text{-Carotin}]=-0,03 \times \ln(t+2,3)+0,2$	1,00
	0,52	$[\beta\text{-Carotin}]=-0,05 \times \ln(t+0,02)+0,3$	1,00

^a Korrelationskoeffizient.

Abb. 30: Abnahme der Carotinoidkonzentration in Liposomen (Lutein (○), β -Carotin (■) und Lykopen (▼)).

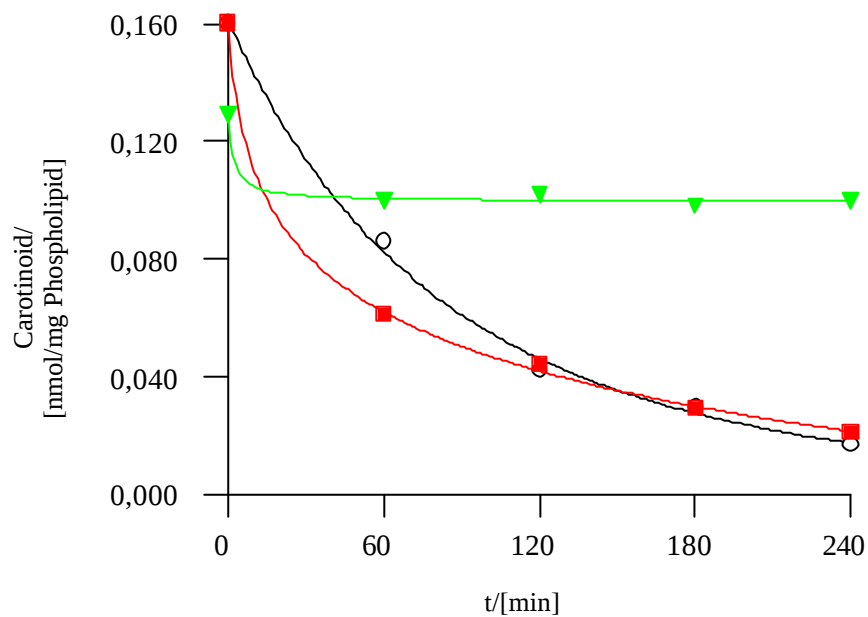
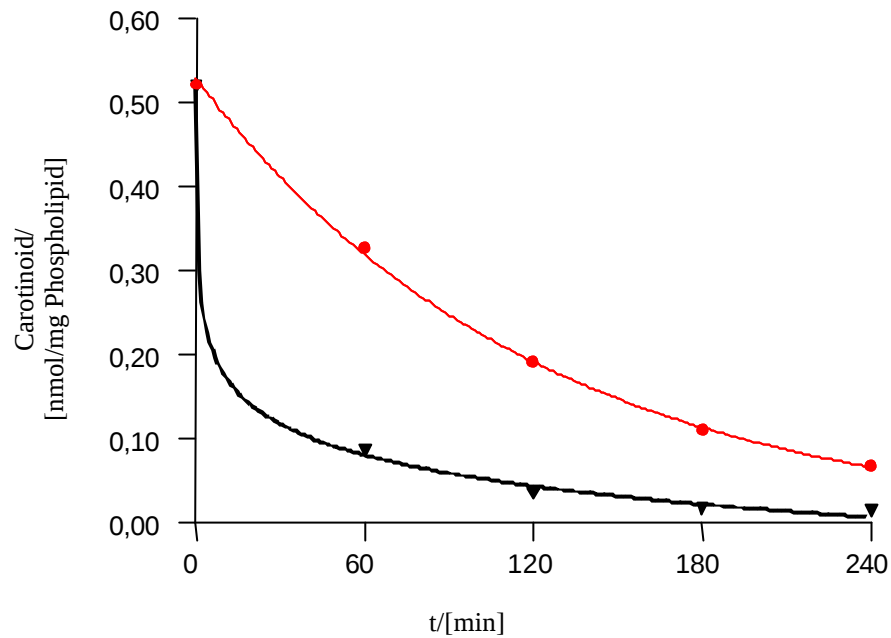
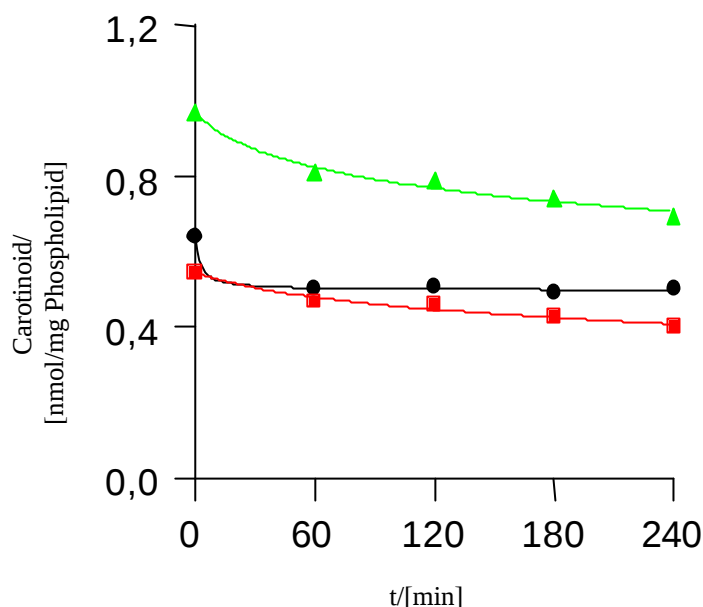


Abb. 31: Abnahme der Carotinoidkonzentration in Liposomen (β -Carotin (▼) und Lutein (●)).



Aufgrund des unerwarteten Lykopinverhaltens werden mehrere Experimente mit unterschiedlichen Lykopinmengen durchgeführt. Wie in Abb. 32 (S. 66) ersichtlich, wird der für dieses Carotinoid typische Verlauf bei allen Konzentrationen beobachtet. Nach einer anfänglichen Abnahme bleibt die Lykopinkonzentration annähernd konstant.

Abb. 32: Lykopinkonzentration während der Inkubation mit AMVN bei verschiedenen Startkonzentrationen an Lykopen (0,55 nmol Lykopen/mg Phospholipid (■), 0,64 nmol Lykopen/mg Phospholipid (●) und 0,97 nmol Lykopen/mg Phospholipid (▲)).



Aufgrund der Befunde in multilamellaren Liposomen wird eine Lutein/Lykopenmischung in unilamellare GSH-beladene Vesikeln eingebaut und auf ihre antioxidativen Eigenschaften hin untersucht. Als Oxidationsparameter werden die Bildung an TBARS, bzw. die GSH-Abnahme verwendet. Getestet werden zwei Kombinationen mit unterschiedlichem Gesamtcarotinoidgehalt. In Bezug auf den GSH-Verbrauch bestätigt sich das bereits bei Einzelkomponenten beobachtete Ergebnis, wonach ein höherer Carotinoidgehalt einen stärkeren Schutz des GSH vor Oxidation bewirkt (s. Tab. 21, S. 67; Abb. 33, S. 68). Die Lutein/Lykopen-Mischung der Carotinoidgesamtkonzentration von 0,22 nmol/mg Phospholipid (Tab. 21, S. 67, oben) zeigt mit einer GSH-Endkonzentration von 10,8 μmol GSH/mg Phospholipid keine Wirkung im Vergleich zur Kontrolle (11 μmol GSH/mg Phospholipid; Tab. 16, S. 59). Wird die Carotinoidkonzentration auf 0,66 nmol Carotinoid/mg Phospholipid erhöht (Tab. 21, S. 67, unten), so wird ein leichter GSH-protektiver Effekt verglichen mit der Kontrolle beobachtet; 12,4 μmol GSH/mg Phospholipid im Vergleich zu 11 μmol GSH/mg Phospholipid.

Obwohl der Gehalt an Lykopen in den untersuchten Mischungen stets viel geringer ist als der Luteinanteil, verhält sich die Carotinoidkombination ähnlich wie Lykopen als

Einzelkomponente. Bei niedriger Konzentration (0,22 nmol/mg Phospholipid; Tab. 21, oben) zeigt sich nach vierstündiger Inkubation eine geringere TBARS-Bildung von 56,7 nmol/mg Phospholipid als bei der höheren Carotinoidgesamtkonzentration (0,66 nmol/mg Phospholipid) mit 72,4 nmol TBARS/mg Phospholipid beobachtet wird (s. Tab. 21; Abb. 34, S. 68). Verglichen mit einer TBARS-Bildung von 105,2 nmol/mg Phospholipid (s. Tab 12, S. 53) im Fall der Kontrollliposomen, wirken beide Carotinoidmischungen protektiv.

Tab. 21: Lutein/Lykopin-Mischung (M10).

M10	Carotinoid ^a	t[min]	GSH ^b	TBARS ^c
Lutein	0,194±0,02	0	20±2	0
Lykopin	0,027±0,00	60	13,6±1	27,6±4
gesamt	0,221	120	12,6±2	35,0±5
		180	11,6±1	56,7±1
		240	10,8±2	56,7±1
Lutein	0,592±0,02	0	20±2	0
Lykopin	0,07±0,01	60	16,7±2	41,3±0
gesamt	0,662	120	13,6±3	38,3±1
		180	13,9±0	66,2±1
		240	12,4±1	72,4±9

^a Carotinoidkonzentration in [nmol/mg Phospholipid].

^b GSH-Gehalt in [µmol/mg Phospholipid].

^c TBARS-Konzentration in [nmol/mg Phospholipid].

Abb. 33: Abnahme des GSH in lutein- und lykopinbeladenen Liposomen ((■) 0,194 nmol Lutein/mg Phospholipid und 0,027 nmol Lykopin/mg Phospholipid; (▲) 0,592 nmol Lutein/mg Phospholipid und 0,07 nmol Lykopin/mg Phospholipid) im Vergleich zu (○) Kontrollvesikeln.

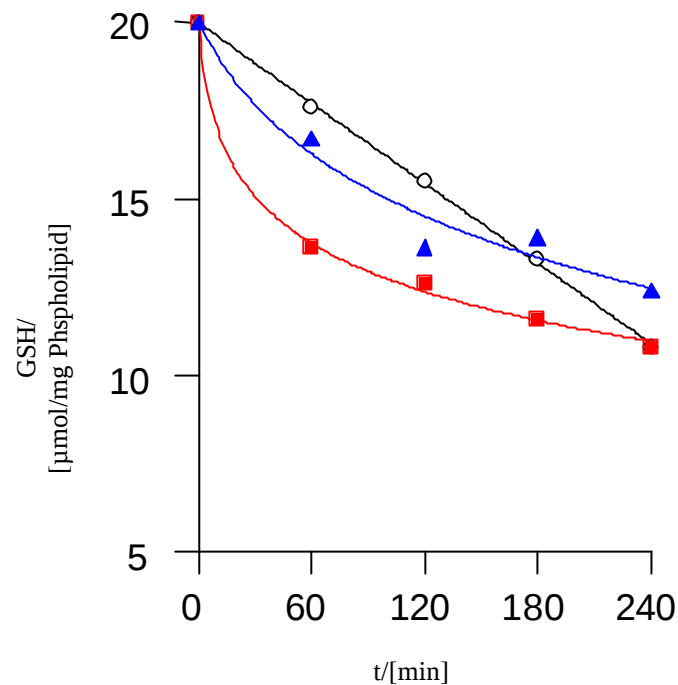
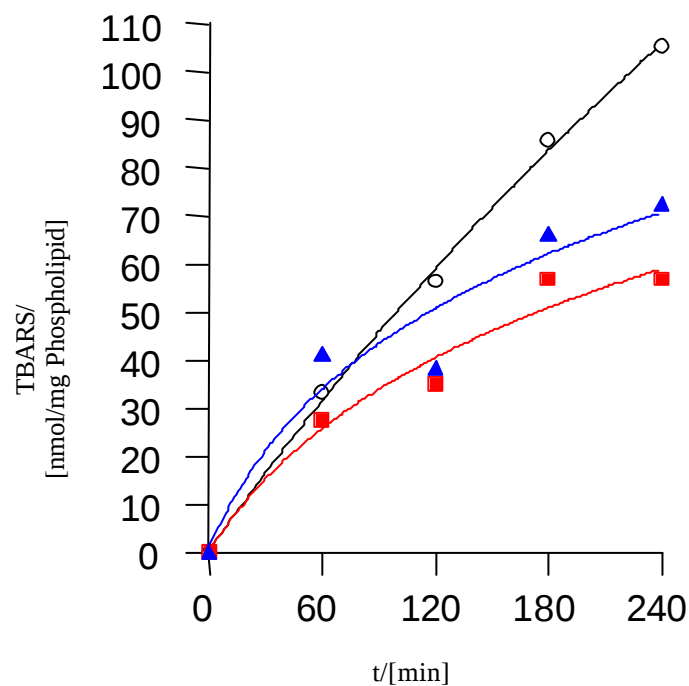


Abb. 34: Zeitabhängige Bildung von TBARS in lutein- und lykopinbeladenen Liposomen ((■) 0,194 nmol Lutein/mg Phospholipid und 0,027 nmol Lykopin/mg Phospholipid; (▲) 0,592 nmol Lutein/mg Phospholipid und 0,07 nmol Lykopin/mg Phospholipid) im Vergleich zur (○) Kontrolle.



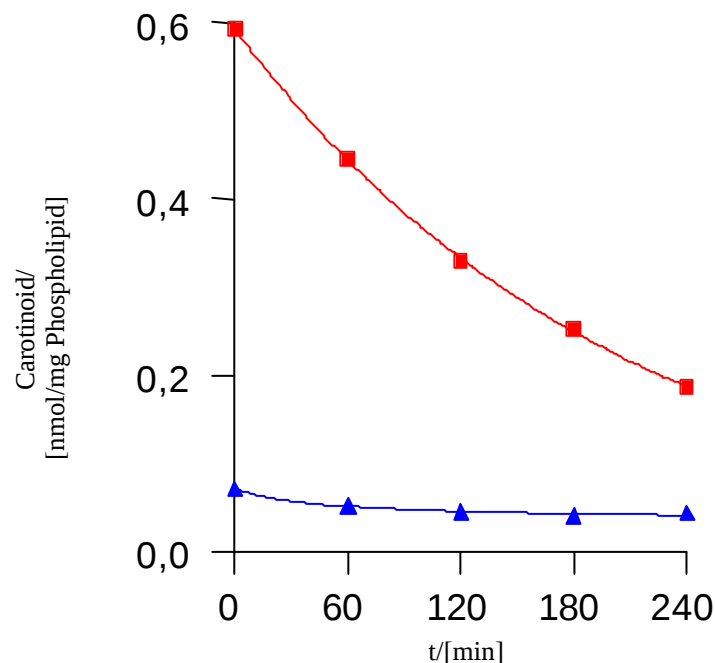
Der Verlauf der Carotinoidkonzentration in der Mischung während der vierstündigen Inkubation ähnelt dem der Einzelkomponenten. Der Luteingehalt nimmt stark ab, während die Lykopinkonzentration nach einer Abnahme in der ersten Stunde annähernd konstant bleibt. Tab. 22 gibt die experimentellen Daten wieder. Der unterschiedliche Verlauf ist exemplarisch in Abb. 35 für eine der beiden Mischungen dargestellt.

Tab. 22: Abnahme der Carotinoidkonzentration in lutein- und lykopinbeladenen Liposomen.

	1		2	
t[min]	Lutein ^a	Lykopin ^a	Lutein ^a	Lykopin ^a
0	0,194 $\pm$ 0,020	0,027 $\pm$ 0,001	0,592 $\pm$ 0,020	0,070 $\pm$ 0,010
60	0,134 $\pm$ 0,003	0,013 $\pm$ 0,001	0,445 $\pm$ 0,004	0,051 $\pm$ 0,010
120	0,101 $\pm$ 0,010	0,008 $\pm$ 0,002	0,329 $\pm$ 0,010	0,045 $\pm$ 0,002
180	0,077 $\pm$ 0,012	0,007 $\pm$ 0,001	0,251 $\pm$ 0,013	0,039 $\pm$ 0,003
240	0,051 $\pm$ 0,010	0,006 $\pm$ 0,001	0,186 $\pm$ 0,015	0,043 $\pm$ 0,002

^a Konzentrationsangaben in nmol Carotinoid/mg Phospholipid.

Abb. 35: Konzentrationsverlauf der verschiedenen Carotinoide in der Lutein (■)/Lykopinmischung (▲) (Startkonzentration: 0,592 nmol Lutein/mg Phospholipid und 0,07 nmol Lykopin/mg Phospholipid).



3.3 *GSH-beladene Liposomen mit definierter Lipidzusammensetzung*

3.3.1 Charakterisierung der 1,2-Dipalmitoyl-*sn*-Glycero-phosphatidylcholin (DPPC)-Liposomen

Im Folgenden soll die Fragestellung untersucht werden, ob in Membranen eingelagerte Carotinoide in der Lage sind, Elektronen über ihre Polyenkette durch die Lipidbarriere hindurch von einem wässrigen Kompartiment in ein anderes zu transportieren. Dafür werden Lykopen und Zeaxanthin in eine Membran eingebaut, die aus DPPC gebildet ist. Die Membranlipide enthalten nur gesättigte Fettsäuren und sind daher inert gegen Lipidperoxidation. Als Oxidationsindikator innerhalb des Liposoms wird Glutathion verwendet.

Die Liposomen werden mittels Elektronenmikroskopie charakterisiert. In der Form gleichen die DPPC-Liposomen denen, die aus Eigelblipiden aufgebaut sind und sowohl gesättigte, wie auch ungesättigte Fettsäuren enthalten (s. Abb. 36).

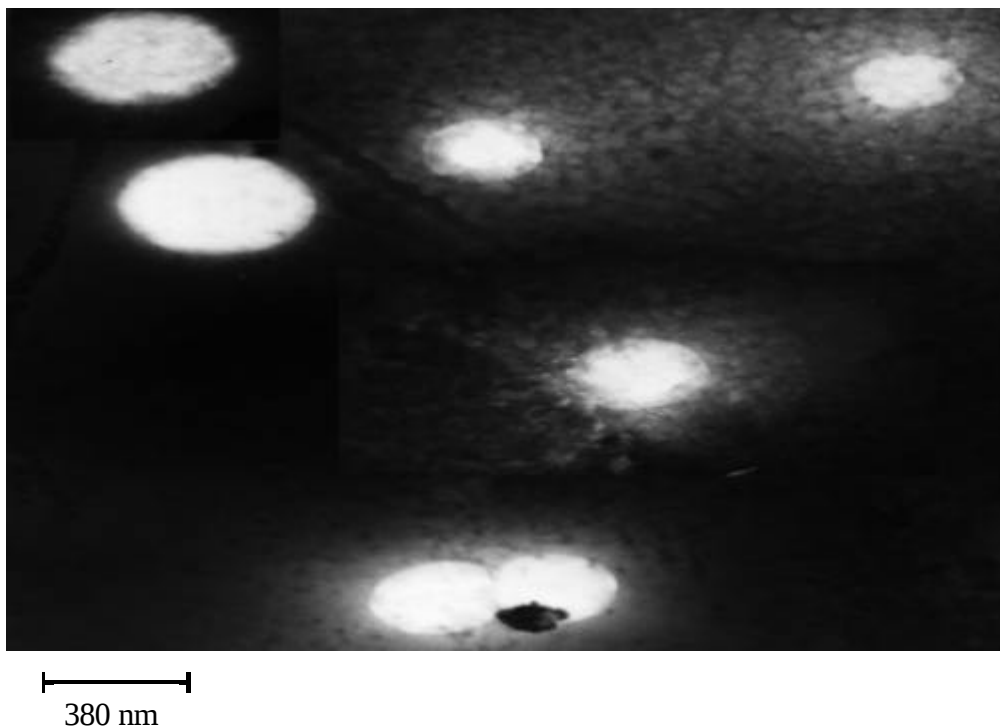


Abb. 36: Elektronenmikroskopische Aufnahme von unilamellaren DPPC-Liposomen beladen mit Lykopen (Vergrößerung 13000fach).

Auffällig ist, daß die Vesikel mit 385 ± 20 nm größer sind als Liposomen, die ungesättigte und gesättigte Fettsäuren enthalten (s. Abb. 37-39, S. 71-72). Die Einlagerung von Carotinoiden kann die Größenverteilung und den GSH-Inhalt beeinflussen.

Kontroll- und Lykopinvesikel zeigen eine ähnliche Größenverteilung mit einem Mittelwert bei 385 ± 20 nm, während die Zeaxanthinliposomen im Mittel um 43 nm kleiner sind (s. Abb. 39, S. 72).

Abb. 37: Größenverteilung von DPPC-Kontrollliposomen (Angabe ± 20 nm).

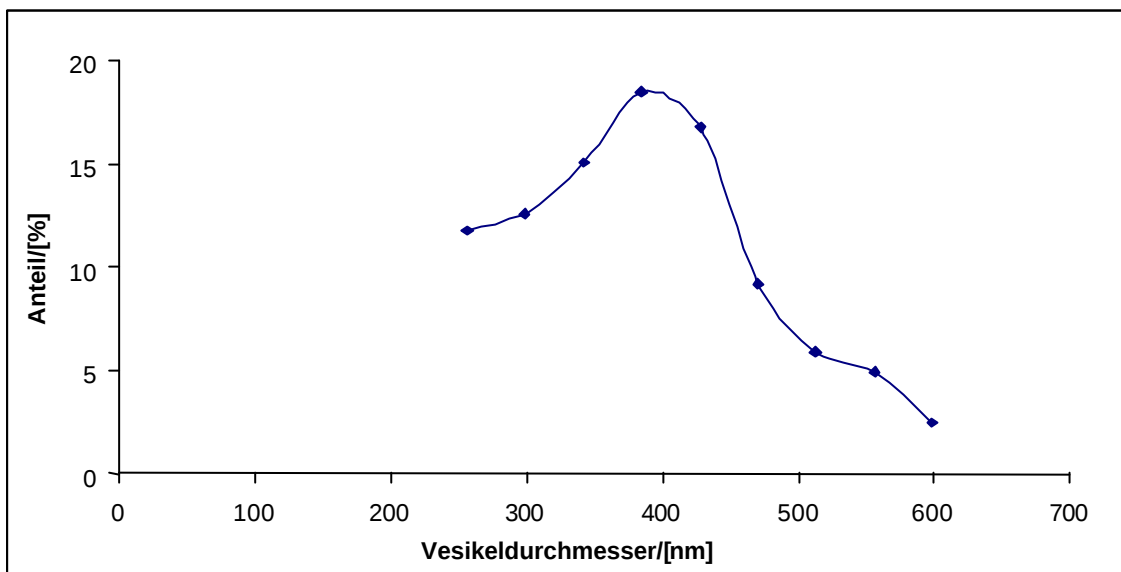


Abb. 38: Größenverteilung von lykopinbeladenen DPPC-Liposomen (Angabe ± 20 nm, 8 nmol Lykopin/mg Phospholipid).

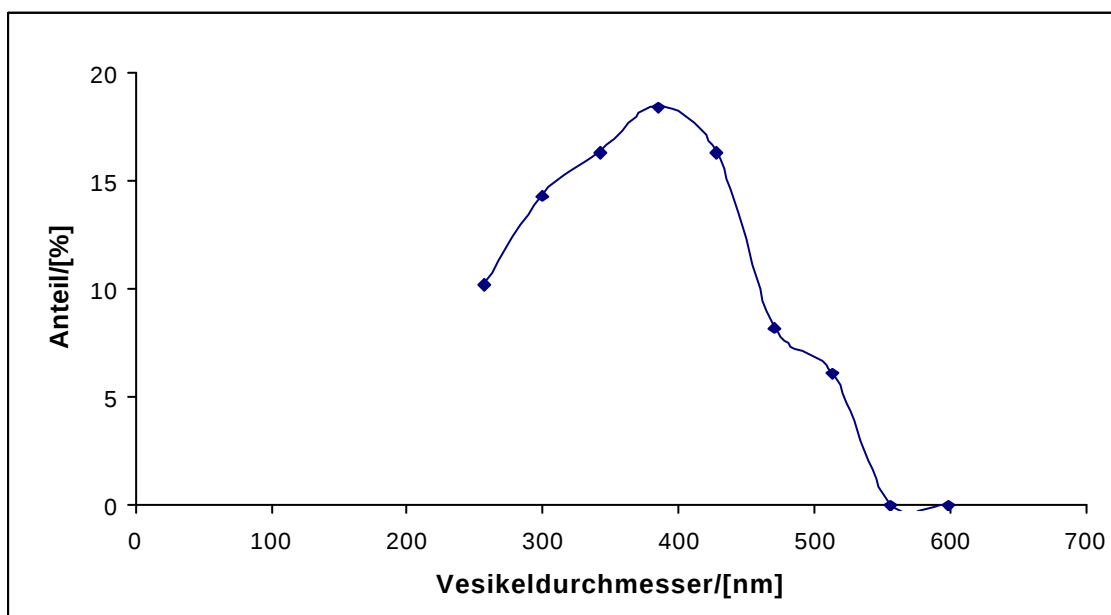
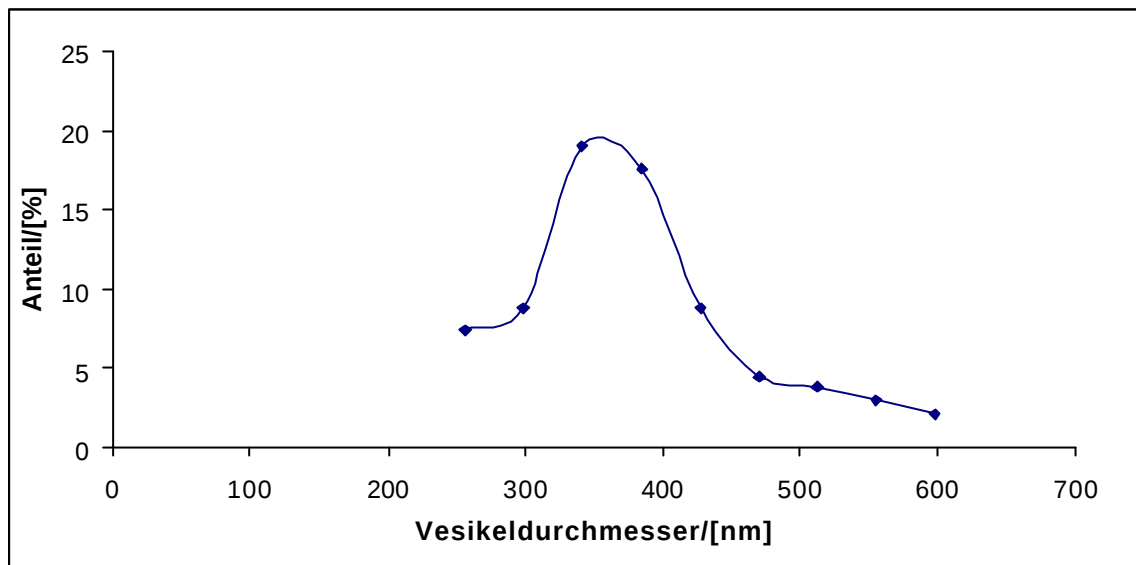


Abb. 39: Größenverteilung von zeaxanthinbeladenen DPPC-Liposomen
(Angabe ± 20 nm; 7,7 nmol Zeaxanthin/mg Phospholipid).



Der GSH-Gehalt der Zeaxanthinliposomen ist mit 23 $\mu\text{mol/mg}$ Phospholipid um 16 % höher als bei den Kontrollvesikeln (Tab. 23). Dagegen vermindert sich beim Einbau von Lykopen die Menge an eingeschlossenem GSH um ca. 27 % von 20 auf 15 $\mu\text{mol/mg}$ Phospholipid. Nach der Aufreinigung sind $6,6 \pm 1,0$ % des GSH-Gesamtgehalts an Glutathion in der Suspension von Kontrollvesikeln, bzw. $6,3 \pm 0,9$ % bei Suspensionen von carotinoidbeladenen Vesikeln nicht eingeschlossen.

Tab. 23: GSH-Einbau in verschiedenen Carotinoidliposomen im Vergleich zur Kontrolle:

Liposom	GSH-Inhalt [$\mu\text{mol/mg}$ Phospholipid]	n
Kontrolle	20,0 $\pm$ 2	10
Zeaxanthin	23,2 $\pm$ 2	9
Lykopen	14,7 $\pm$ 2	5

3.3.2 Effekt von reaktiven Sauerstoffverbindungen auf GSH-beladene DPPC-Liposomen

Um sicher zu stellen, daß eine mögliche GSH-Oxidation durch einen Elektronentransport über die Polyenkette des in die inerte Membran eingelagerten Carotinoids erfolgt, wird für die Initiation radikalischer Reaktionen ein hydrophiles radikalgenerierendes System gewählt. Dazu eignen sich:

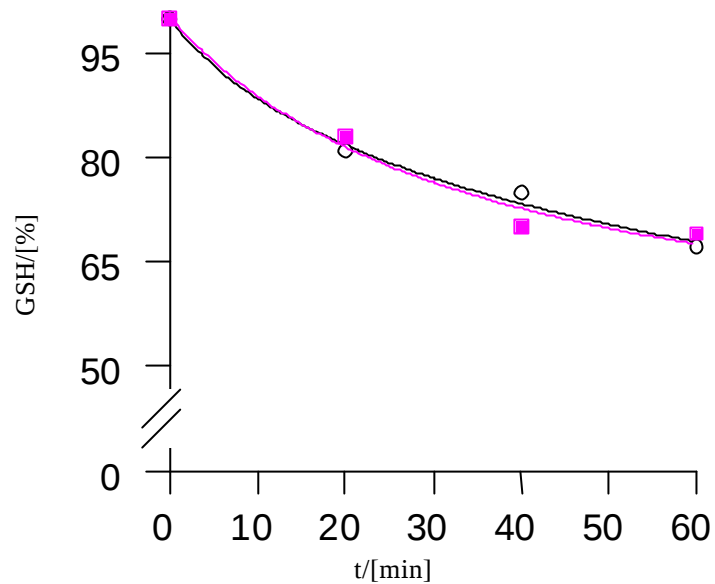
a) Xanthin/Xanthin-Oxidase

b) Ammoniumperoxodisulfat.

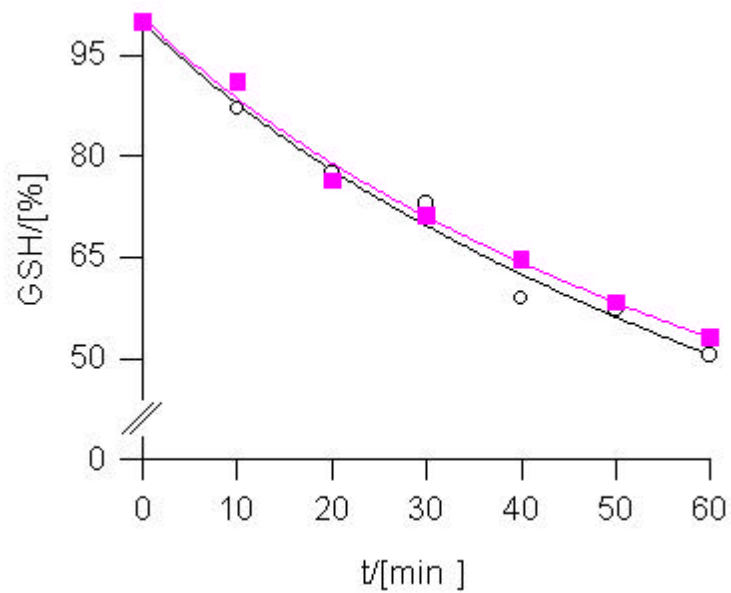
Eine einstündige Inkubation von zeaxanthinbeladenen Liposomen (Zeaxanthinkonzentration: $7,68 \pm 0,1$ nmol/mg Phospholipid) mit Xanthin/Xanthin-Oxidase zur Generierung von Superoxidanionradikalen bewirkt eine deutliche GSH-Abnahme. Wie aus den Abb. 40a,b,c (S. 74-75) zu entnehmen ist, verändert der Einbau dieses Carotinoids aber nicht die GSH-Abnahme im Vergleich zu den Kontrollliposomen. Es wird aber ein Bezug zwischen eingesetzter Enzymmenge und GSH-Oxidation deutlich. Je mehr Enzym eingesetzt wird, umso geringer ist, unabhängig vom Carotinoidgehalt der Liposomen, die verbliebene GSH-Menge (Tab. 24, S. 75).

Abb. 40: GSH-Konzentration (1 h, 37°C, n = 2) in

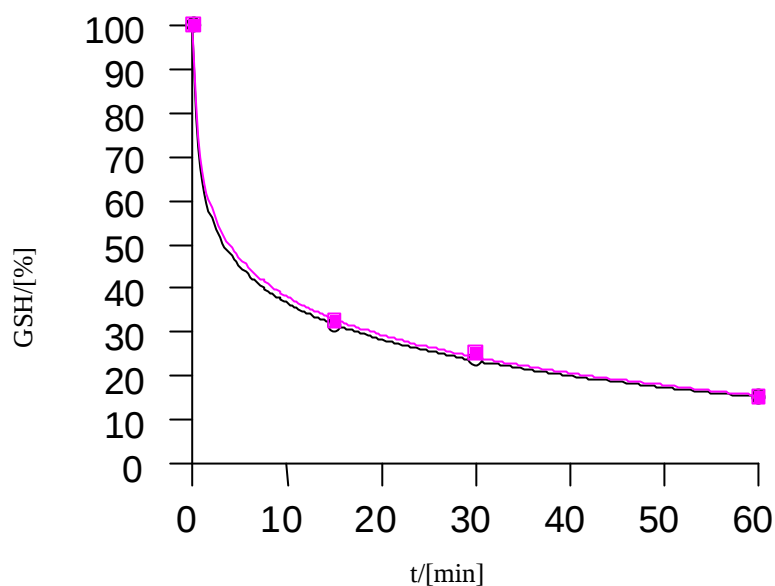
a) Kontroll-(○) und zeaxanthinbeladenen Liposomen (■) bei Inkubation mit 10 mU Xanthin-Oxidase.



b) Kontroll-(○) und zeaxanthinbeladenen Liposomen (■) bei Inkubation mit 30 mU Xanthin-Oxidase.



c) Kontroll-(○) und zeaxanthinbeladenen Liposomen (■) bei Inkubation mit 250 mU Xanthin-Oxidase.



Tab. 24: Funktionen der zeitabhängigen GSH-Abnahme in unilamellaren DPPC-Liposomen (1 h, 37°C, Zeaxanthingehalt: $7,68 \pm 0,1$ nmol/mg Phospholipid).

Probe	Xanthin-Oxidase/ [mU]	Funktion der GSH-Abnahme ^a	r ^b
Kontrolle	10	%GSH = $-29,2 \times \ln(t+23,0) + 191,4$	1,00
	30	%GSH = $-54,1 \times \ln(t+40,3) + 299,7$	0,99
	250	%GSH = $-12,0 \times \ln(t+0,05) + 64,3$	1,00
Zeaxanthin	10	%GSH = $30,7 \times \ln(t+23,7) + 197,7$	0,98
	30	%GSH = $-46,6 \times \ln(t+33,7) + 264,7$	1,00
	250	%GSH = $-12,6 \times \ln(t+0,07) + 67,1$	1,00

^a 100 % GSH entsprechen in Kontrollvesikeln 20 ± 2 μ mol/mg Phospholipid, in zeaxanthinbeladenen Liposomen $23,2 \pm 2$ μ mol/mg Phospholipid.

^b Korrelationskoeffizient.

Die hier beobachteten Effekte könnten zumindest teilweise auf eine temperaturbedingt erhöhte Membranfluidität zurückzuführen sein. Daher wird der Versuch mit 30 mU Xanthin-Oxidase bei 30°C erneut durchgeführt. Zum Vergleich der Wirkung von Carotinoiden unterschiedlicher Struktur und Polarität werden Zeaxanthin ($7,7 \pm 0,1$ nmol/mg Phospholipid) und Lycopin ($8,0 \pm 0,5$ nmol/mg Phospholipid) in die liposomale Membran eingelagert (Tab. 25 und Abb. 41, S. 77).

Tab. 25: Vergleich der Wirkung von Xanthin-Oxidase (30 mU) auf den GSH-Gehalt von DPPC-Liposomen (1 h, 30°C; n = 3-5).

t[min.]	Kontrolle ^a	Zeaxanthin ^b	Lycopin ^c
	GSH/[%]		
0	100	100	100
10	72,9±8,1	83,7±5,3	78,6±14,1
20	69,7±10,6	84,8±10,4	69,6±12,3
30	58,4±9,3	77,2±12,5	58,8±10,3
40	52,1±9,0	72,2±13,5	43,4±8,5
60	42,0±7,8	66,6±19,0	31,3±2,8

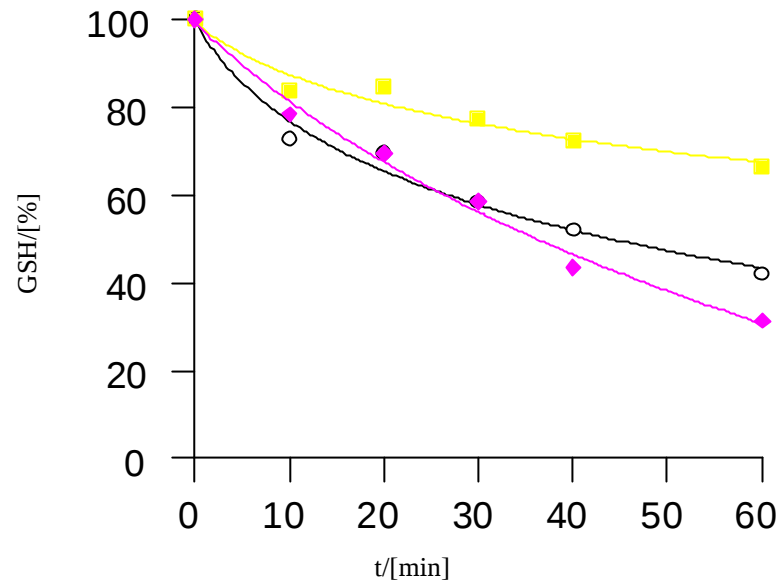
^a 100 % GSH entsprechen $20,0 \pm 2$ µmol/mg Phospholipid.

^b 100 % GSH entsprechen $23,2 \pm 2$ µmol/mg Phospholipid;
Zeaxanthinkonzentration: $7,7 \pm 0,1$ nmol/mg Phospholipid.

^c 100 % GSH entsprechen $14,7 \pm 2$ µmol/mg Phospholipid;
Lycopinkonzentration: $8,0 \pm 0,5$ nmol/mg Phospholipid.

Die GSH-Konzentration nimmt sowohl in der Kontrollsuspension, als auch in Suspensionen carotinoidbeladener Vesikel ab. Der Verlauf der GSH-Abnahme in den Proben ist unterschiedlich. Während der GSH-Verbrauch in den lycopinbeladenen Liposomen annähernd konstant ist (s. Tab. 25 und Abb. 41, S. 77), verlangsamt sich die GSH-Abnahme in zeaxanthinbeladenen Vesikeln nach den ersten zehn Minuten. Beim Vergleich beider carotinoidbeladener Vesikelsuspensionen mit der Kontrolle zeigt sich in der Probe lycopinbeladener Liposomen ein höherer Verlust an GSH. Dagegen nimmt die GSH-Konzentration in den zeaxanthinbeladenen Liposomen weniger stark ab. Aus den vorliegenden Daten ergibt sich kein Hinweis auf einen Transport der „radikalischen Last“ über die Membranbarriere in den Liposomeninnenraum.

Abb. 41: Abnahme von GSH in DPPC-Liposomen induziert durch 30 mU Xanthin-Oxidase (30°C; Kontrollvesikel (○), lykopinbeladene- (◆) und zeaxanthinbeladene Liposomen (■)).



In Tab. 26 sind die Funktionen der zeitabhängigen GSH-Abnahme aller Liposomenproben wiedergegeben.

Tab. 26: Funktionen der zeitabhängigen GSH-Abnahme in DPPC-Liposomen induziert durch 30 mU Xanthin-Oxidase bei 30°C.

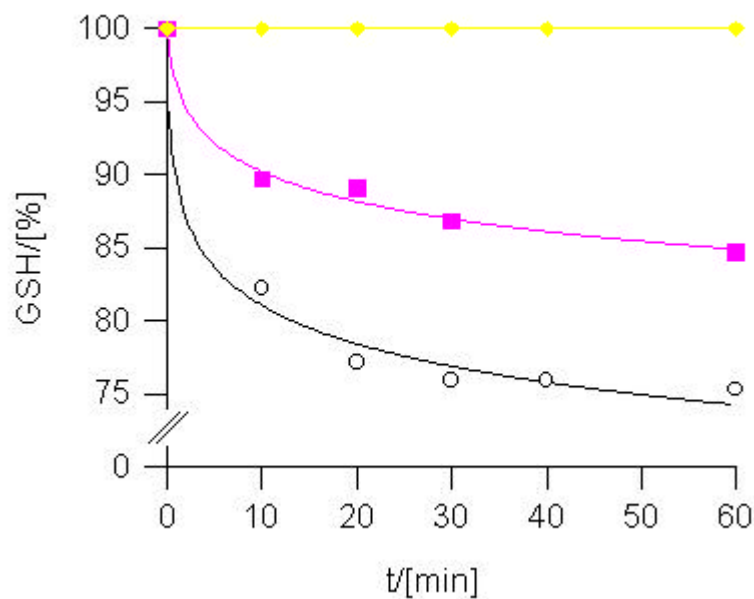
Probe	Funktion der GSH-Abnahme ^a	r ^b
Kontrolle	%GSH = -21,9 × ln(t+6,4) + 143,6	0,99
Lykopen	%GSH = -63,4 × ln(t+30,8) + 316,7	1,00
Zeaxanthin	%GSH = -15,3 × ln(t+8,6) + 132,3	0,98

^a 100 % GSH entsprechen in Kontrollvesikeln 20 ± 2 $\mu\text{mol/mg}$ Phospholipid, in zeaxanthinbeladenen Liposomen $23,2 \pm 2$ $\mu\text{mol/mg}$ Phospholipid und $14,7 \pm 2$ $\mu\text{mol/mg}$ Phospholipid in lykopenbeladenen Liposomen.

^b Korrelationskoeffizient.

In einem weiteren Experiment werden GSH-beladene Liposomen mit Ammoniumperoxodisulfat als radikalgenerierendem System bei 25°C inkubiert und der Gehalt an GSH zu verschiedenen Zeitpunkten bestimmt. Der GSH-Gehalt in Kontrollliposomen (ohne Carotinoid) nimmt kontinuierlich ab (s. Abb. 42, Tab. 27, S. 79). Nach 60 minütiger Inkubation werden nur noch 75 % des Ausgangswerts gefunden. Die Abnahme der GSH-Konzentration ist in lykopinbeladenen Liposomen geringer als in der Kontrolle; nach 60 Minuten ist der GSH-Gehalt lediglich auf 85 % des Ausgangswerts gesunken. Es wird keine signifikante Änderung des GSH-Gehalts bei der Inkubation von luteinbeladenen Liposomen beobachtet.

Abb. 42: Abnahme von GSH in DPPC-Liposomen induziert durch 1,2 mM Ammoniumperoxodisulfat (25°C; Kontrollvesikel (○), lykopinbeladene- (■) und zeaxanthinbeladene Liposomen (◆)).



Tab. 27: Vergleich der Wirkung von 1,2 mM Ammoniumperoxodisulfat auf den GSH-Gehalt von DPPC-Liposomen (1 h, 25°C; n = 3).

t/[min.]	Kontrolle	Lykopen	Zeaxanthin
	GSH/[%] ^a		
0	100	100	100
10	82,2±2,5	89,7±1,1	100
20	77,2±1,3	89,1±0,1	100
30	75,9±8,6	86,8±2,8	100
40	75,9±2,4		100
60	75,3±0,7	84,7±2,1	100

^a 100 % GSH entsprechen in Kontrollvesikeln 20±2 µmol/mg Phospholipid, in zeaxanthinbeladenen Liposomen 23,2±2 µmol/mg Phospholipid und 14,7±2 µmol/mg Phospholipid in lykopenbeladenen Liposomen.

Tab. 28: Funktionen der zeitabhängigen GSH-Abnahme in DPPC-Liposomen induziert durch 1,2 mM Ammoniumperoxodisulfat bei 25°C.

Probe	Funktion der GSH-Oxidation ^a	r ^b
Kontrolle	%GSH=-3,8×ln(t+0,07)+89,8	0,99
Lykopen	%GSH=-3,0×ln(t+0,4)+97,2	1,00
Zeaxanthin	GSH-Inhalt konstant	-

^a 100 % GSH entsprechen in Kontrollvesikeln 20±2 µmol/mg Phospholipid, in zeaxanthinbeladenen Liposomen 23,2±2 µmol/mg Phospholipid und 14,7±2 µmol/mg Phospholipid in lykopenbeladenen Liposomen.

^b Korrelationskoeffizient.

3.3.3 UV/VIS-Spektren von Carotinoiden in liposomalen Membranen

Aufgrund der Ergebnisse zum Lykopinkonzentrationsverlauf während der Inkubation von Liposomen mit AMVN (s. Kap. 3.2.5, S. 53) und der Beobachtung, daß ein Einbau dieses Carotinoids in die liposomale Membran zu einer vollständig farblosen Suspension führt, werden UV/VIS-Spektren verschiedener Vesikelpuben aufgenommen. Die Liposomen werden mit Eigelbblipiden hergestellt und enthalten ungesättigte Fettsäuren in der Membran.

Bis auf Lycopin weisen alle in eine solche Membran eingelagerten Carotinoide das charakteristische Carotinoidspektrum auf (s. Abb. 43 und 44, S. 81 und 82). Da Lycopin sich nur in geringen Mengen in die Membran dieser Vesikel einbringen läßt, werden in Abb. 43 (S. 81) jeweils die Spektren von Lycopin und β -Carotin eingebaut in die Membranen in vergleichbarer Konzentration gegenüber gestellt. Abb. 43 (S. 81) zeigt die Spektren von Lycopin in unilamellaren Liposomen in der Konzentration 0,24 (A) und 0,72 nmol/mg Phospholipid (C). Es ist kein charakteristisches Lykopinspektrum zu erkennen. Im Fall von β -Carotin erhält man in Konzentrationen von 0,2 (B) und 0,66 (D) nmol/mg Phospholipid ein vom Lipidspektrum überlagertes charakteristisches Carotinoidspektrum. Die Hauptabsorptionsbande von β -Carotin ist aufgrund von Membraneinflüssen von 450 nm um 14 nm nach 464 nm verschoben.

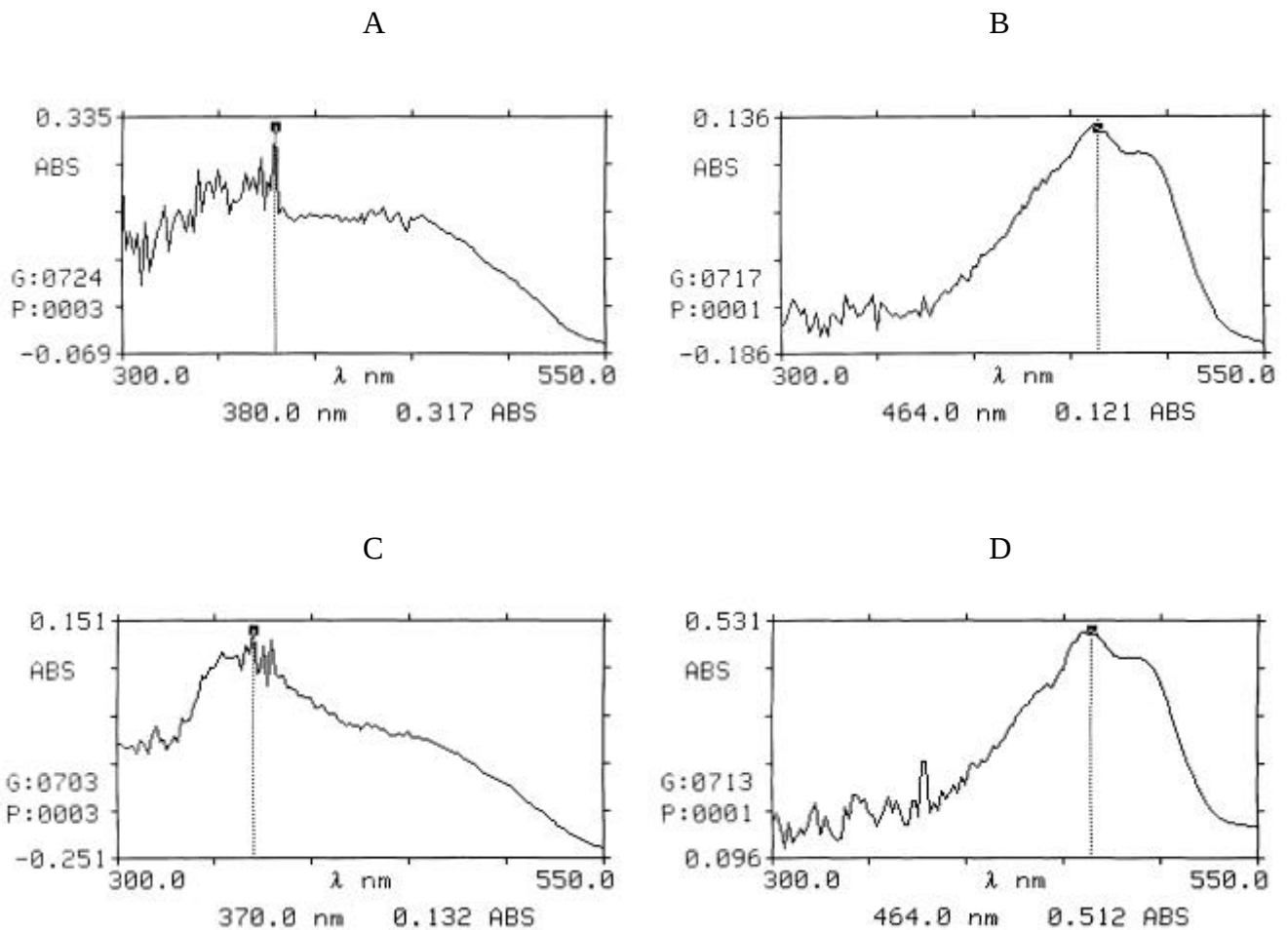


Abb. 43: UV/VIS-Spektrenvergleich zwischen Lycopodium und β -Carotin eingelagert in 3-*sn*-Phosphatidylcholin-Liposomen:

A: Lycopodium, 0,24 nmol/mg Phospholipid B: β -Carotin, 0,2 nmol/mg Phospholipid
 C: Lycopodium, 0,72 nmol/mg Phospholipid D: β -Carotin, 0,66 nmol/mg Phospholipid.

Die Absorptionsspektren von Kontrollliposomen und Vesikeln beladen mit Lycopodium sind sehr ähnlich (Beispiel eines Spektrums von Kontrollliposomen s. Abb. 51A, S. 90).

Wie in Abb. 44 (S. 82) gezeigt, zeigen auch die Xanthophylle, eingebaut in Liposomen, ein typisches Spektrum. Die Verschiebung des Maximums bei Lutein beträgt 6 nm (von 450 nm nach 456 nm), während bei Zeaxanthin eine Verschiebung um 14 nm von 450 nm nach 464 nm zu beobachten ist.

Die Absorptionsspektren von Liposomen, die Lycopodium enthalten, unterscheiden sich abhängig von der Lipidzusammensetzung. Wie in Abb. 45C (S. 84) dargestellt, zeigt die Aufnahme eines Spektrums lycopodiumbeladener Liposomen bestehend aus DPPC die charakteristischen Lycopodiumabsorptionsbanden.

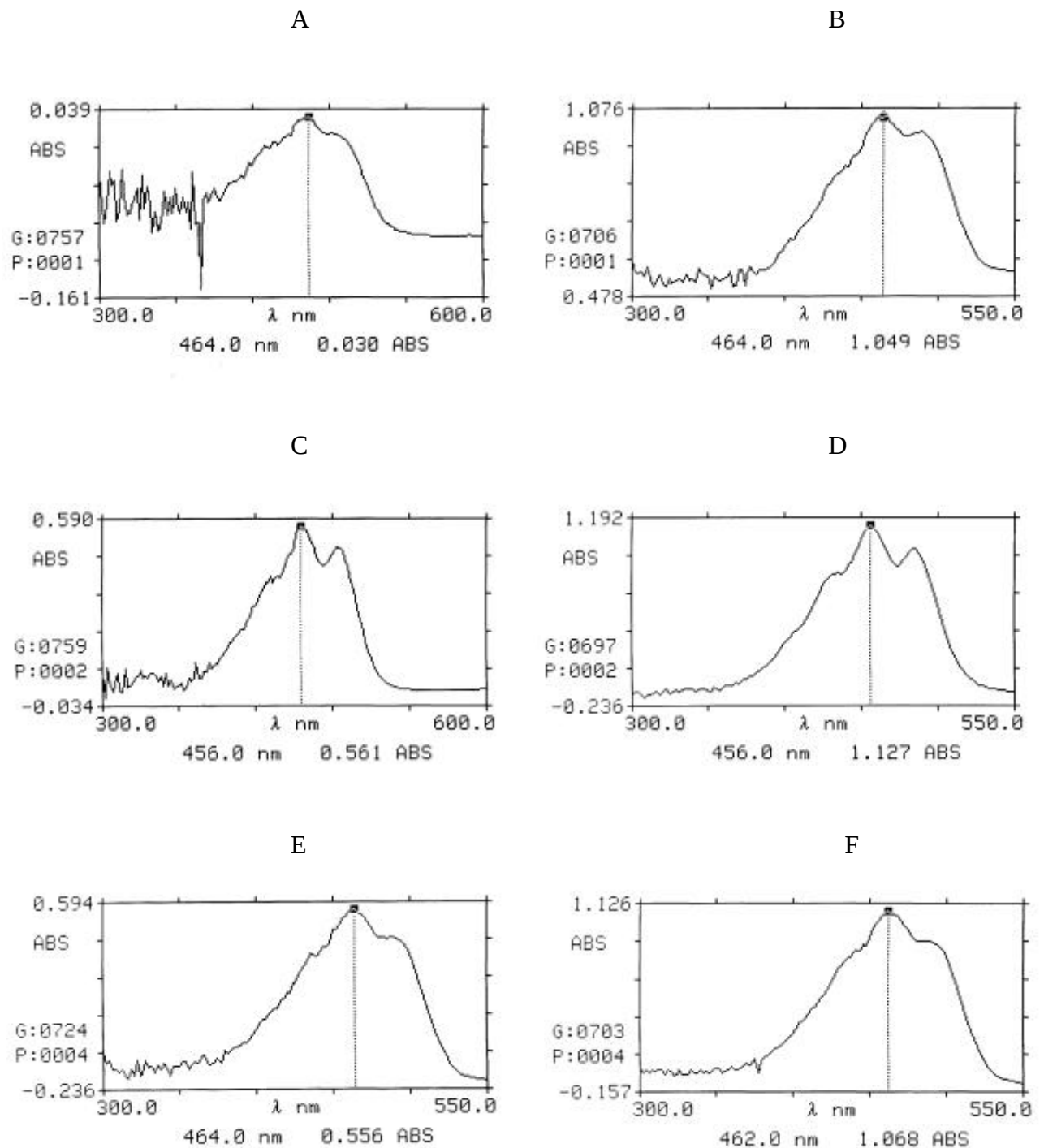


Abb. 44: UV/VIS-Spektren verschiedener Carotinoide eingebaut in 3-*sn*-Phosphatidylcholin-Liposomen:

A: β -Carotin, 0,12 nmol/mg Phospholipid

B: β -Carotin, 1,2 nmol/mg Phospholipid

C: Lutein, 0,62 nmol/mg Phospholipid

D: Lutein, 2 nmol/mg Phospholipid

E: Zeaxanthin, 0,76 nmol/mg Phospholipid

F: Zeaxanthin, 1,8 nmol/mg Phospholipid.

Wie bereits bei eingebautem β -Carotin, Lutein und Zeaxanthin beobachtet, ergibt sich auch hier ein Shift im Absorptionsmaximum von 11 nm von 472 nm nach 483 nm (C).

Zusätzlich zeigt sich eine auch im Spektrum der 3-*sn*-Phosphatidylcholin-Membran auftretende scharfe Bande bei 379 nm. In den Abbildungen 45 B und D (S. 84) sind die UV/VIS-Spektren des Lykopins in organischer Phase nach Extraktion aus der Lipidschicht dargestellt. Dies zeigt, daß Lykopen in der aus einem Gemisch aus ungesättigten und gesättigten Fettsäuren bestehenden liposomalen Membran (Abb. 45A und 45B, S. 84) eingelagert und intakt war.

Bei einer Erhöhung der Lykopenmenge um den Faktor 1,7 (s. Abb. 45E, S. 84) verschwindet die Bandenauflösung vollständig, wogegen die Signale bei 348 nm und 380 nm stark zunehmen.

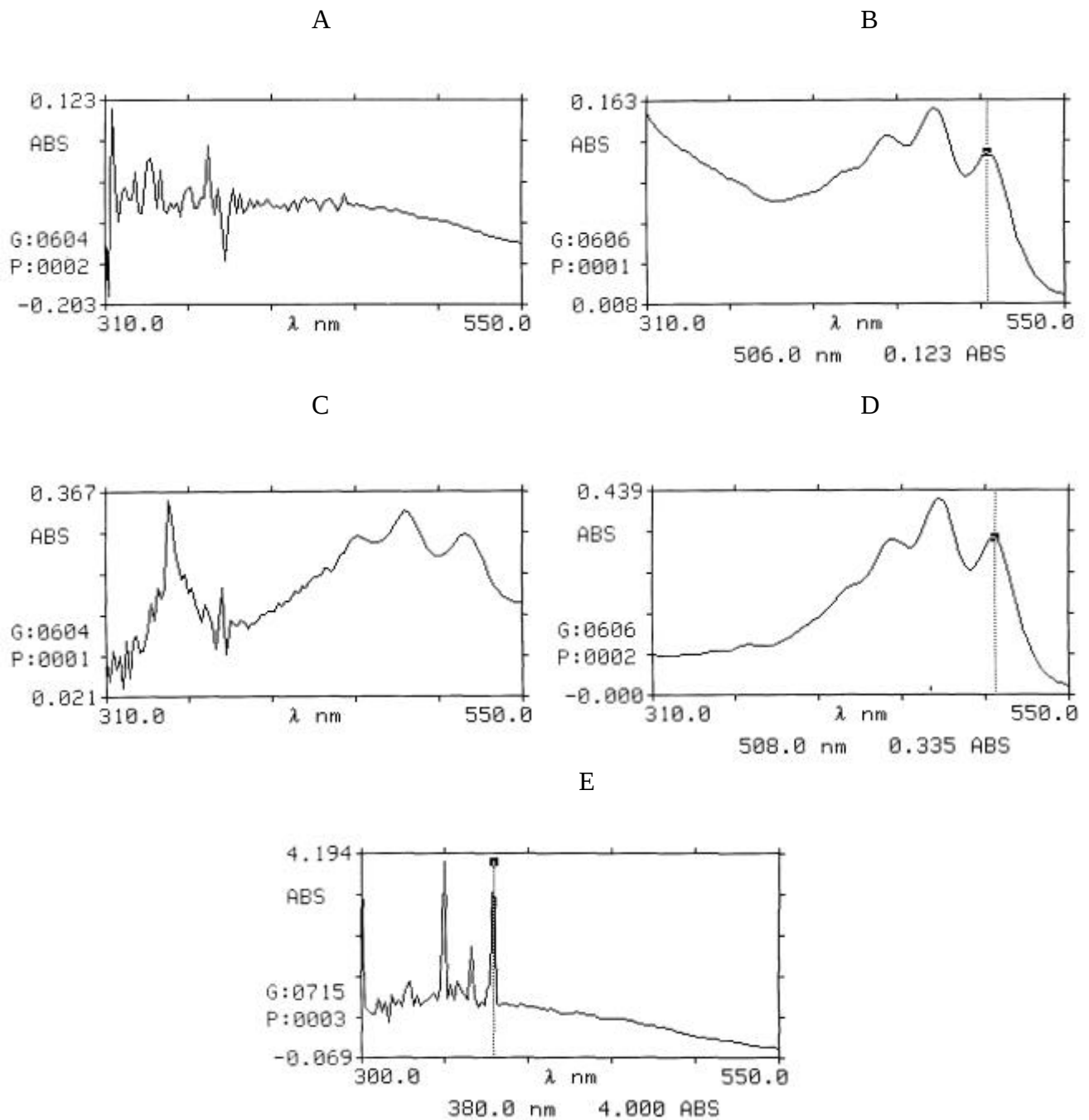


Abb. 45: Vergleich der Spektren von Lycopin eingelagert in 3-*sn*-Phosphatidylcholin-, bzw. DPPC-Membran bei verschiedenen Konzentrationen:

A: Lycopin in Phosphatidylcholinmembran (0,6 nmol/mg Phospholipid),

B: Lycopin in organischer Phase nach Extraktion aus der Membran (Bedingungen s. A),

C: Lycopin in DPPC-Membran (0,46 nmol/mg Phospholipid),

D: Lycopin nach Extraktion aus der DPPC-Lipiddoppelschicht in organischer Phase (Bedingungen s. C),

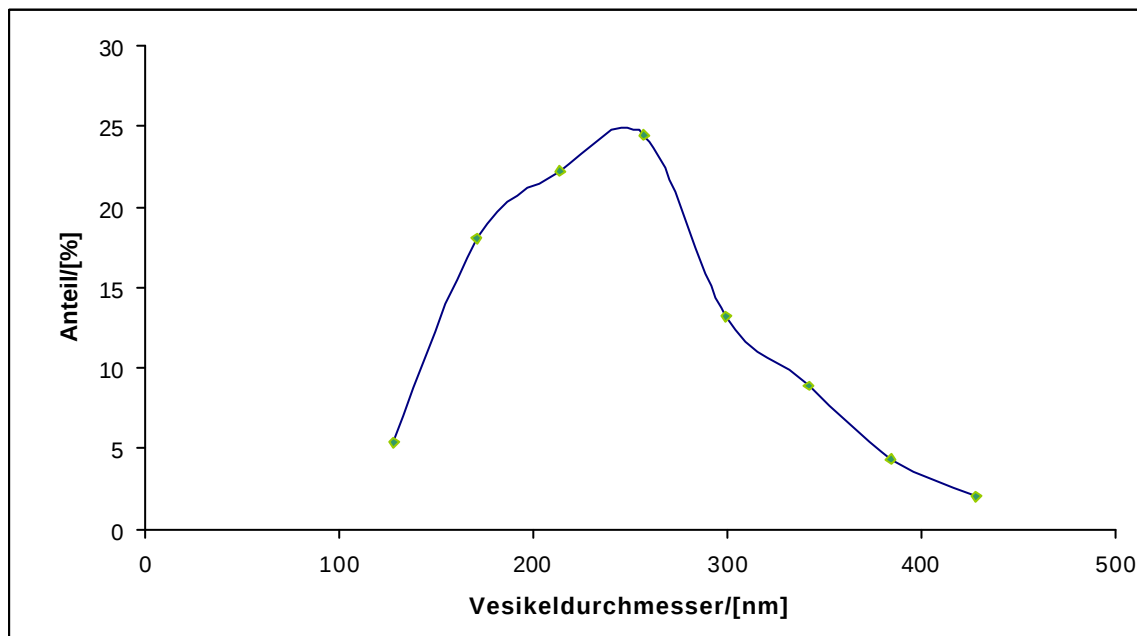
E: Lycopin in DPPC-Membran (0,76 nmol/mg Phospholipid).

3.4 Carotinoide als Blaulichtfilter im Modellsystem unilamellarer Liposomen

3.4.1 Lucifer-Gelb-beladene unilamellare Liposomen

Auf die gleiche Weise wie GSH-beladene Liposomen können auch unilamellare Vesikel präpariert werden, die mit dem grün fluoreszierenden Farbstoff Lucifer Gelb gefüllt sind. Um sicher zu stellen, daß es sich auch hierbei um Liposomen handelt, die nur von einer Lipiddoppelschicht umgeben sind, wird wiederum die Elektronenmikroskopie herangezogen. Abb. 46 stellt die Größenverteilung der Liposomen dar. Wie auch im Fall der GSH-beladenen Vesikel beobachtet, beeinflusst eine zusätzliche Einlagerung von Carotinoiden in die Membran den Durchmesser der Liposomen nicht. Der mittlere Durchmesser liegt mit 256 ± 20 nm um 20 % über der bei GSH-beladenen Liposomen gemessenen Durchschnittsgröße von 214 nm.

Abb. 46: Durchmesser unilamellarer Lucifer-Gelb-beladener Liposomen (Extrusion durch 400 nm Polycarbonatmembran; Angaben in nm $\pm$ 20 nm)



Die Menge des in die Vesikel inkorporierten Lucifer Gelbs ist unabhängig vom Carotinoidgehalt $0,5 \pm 0,05 \mu\text{mol/mg}$ Phospholipid. In ihrer Form ähneln die Lucifer-Gelb-beladenen Liposomen den GSH-beladenen (Abb. 47). Die fehlende Dunkelfärbung des Vesikelinneren zeugt auch hier von einer intakten Membran. Um die Reinheit der Suspensionen und die Beladung mit Farbstoff beurteilen zu können, werden floureszenzmikroskopische Aufnahmen angefertigt. Abb. 48 (S. 87) zeigt, daß sich der zugeführte Fluoreszenzfarbstoff ausschließlich im Vesikelinnenraum befindet, da die umgebende Lösung dunkel gefärbt ist.

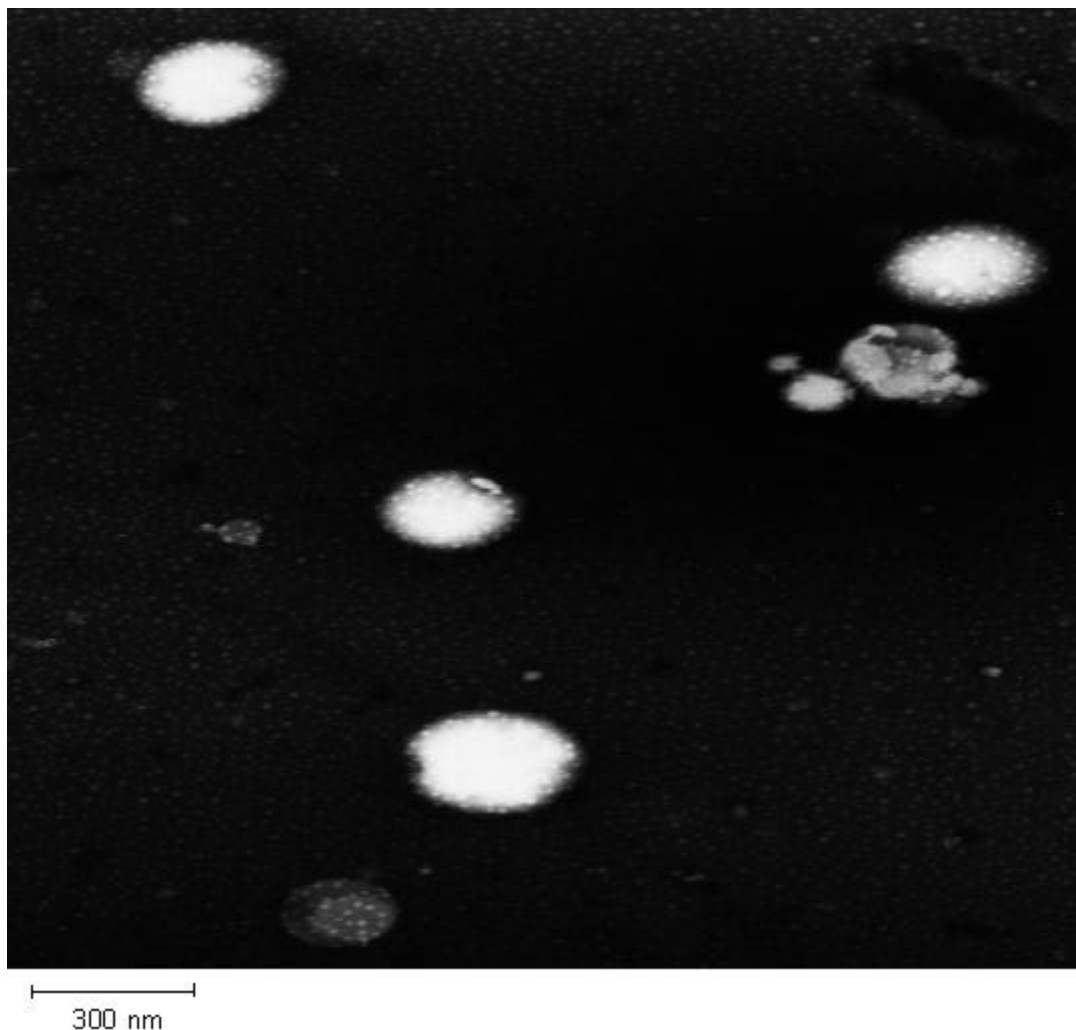


Abb. 47: Aufnahme Lucifer-Gelb-gefüllter Vesikel (Vergrößerung 13000fach).

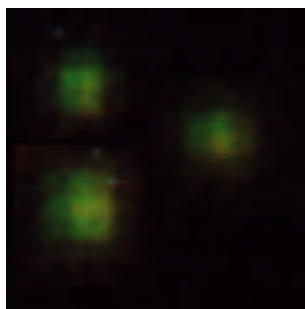


Abb. 48: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme der Lucifer-Gelb-beladenen Liposomen.

3.4.2 Vergleich des Absorptions- und Emissionsspektrums von Lucifer Gelb in wässriger Lösung und eingelagert in Liposomen

Für Fluoreszenzmessungen von Lucifer Gelb wird durch Aufnahme des Fluoreszenzspektrums die für die Untersuchungen optimale Wellenlänge bestimmt. Gleichzeitig werden auch die Spektren des Fluoreszenzfarbstoffes in wässriger Lösung und innerhalb der Vesikel miteinander verglichen. Abb. 49 zeigt die Struktur und das Absorptionsspektrum von Lucifer Gelb. Eines der Absorptionsmaxima liegt zwischen 424 nm und 428 nm, dem Blaulichtbereich. In den Abb. 50 bis 52 (S. 89-91) sind jeweils das Absorptions- und Emissionsspektrum von Lucifer Gelb in den verschiedenen Proben dargestellt.

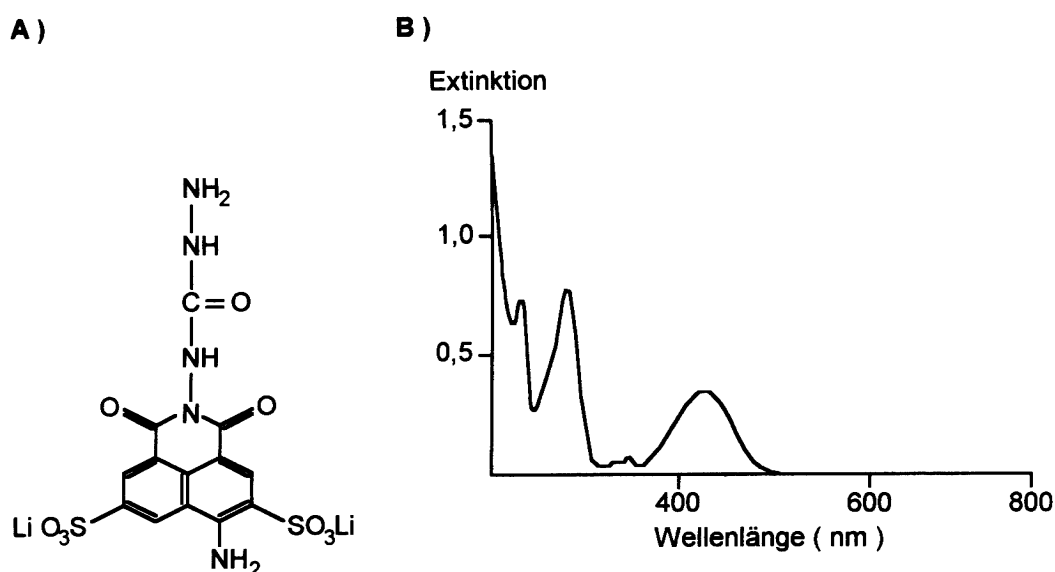


Abb. 49: Struktur (A) und Absorptionsspektrum (B) von Lucifer Gelb CH.

Die Lucifer-Gelb-Konzentration in der im Experiment verwendeten Pufferlösung ist sehr gering. Daher wird kein charakteristisches Lucifer-Gelb-Absorptionsspektrum gemessen (s. Abb. 50A, S. 89). Auch nach Einbau in Liposomen wird kein charakteristisches Spektrum erhalten (s. Abb. 51A, S. 90).

Sind Carotinoide, wie z. B. Zeaxanthin, in der liposomalen Membran eingebettet, so überlagert deren Absorptionsspektrum das Liposomenspektrum (Abb. 52A, S. 91). Das Emissionsmaximum der Fluoreszenzstrahlung von Lucifer Gelb liegt bei 548 nm (Abb. 50B und C, S. 89), eingeschlossen in Liposomen jedoch bei 545 nm (Abb. 51 und 52, S. 90-91).

Da die Blaulichtfilteraktivität der Macula-lutea-Carotinoide analysiert werden soll, wird für den folgenden unter Kap. 3.4.3 (S. 92) beschriebenen Versuch Licht der Anregungswellenlänge 426 nm gewählt. Hier zeigt Lucifer Gelb sein Absorptionsmaximum. Die Fluoreszenz wird bei dem in Liposomen bestimmten Maximum des Fluoreszenzfarbstoffes von 545 nm detektiert.

Abb. 50: Absorptions- und Emissionsspektrum von Lucifer Gelb gelöst in Puffer (A: Absorptionsspektrum; B: Emissionsspektrum; C: Ausschnitt des Emissionsspektrums).

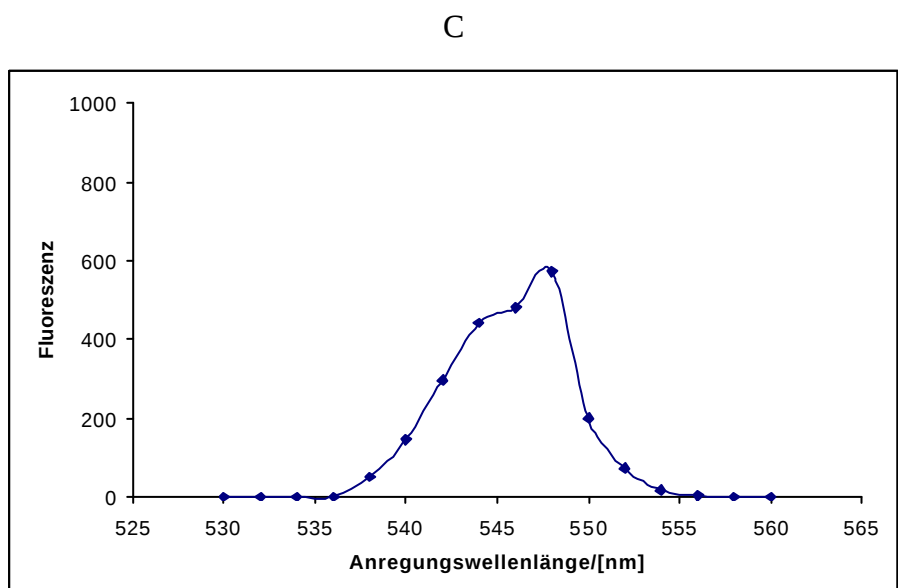
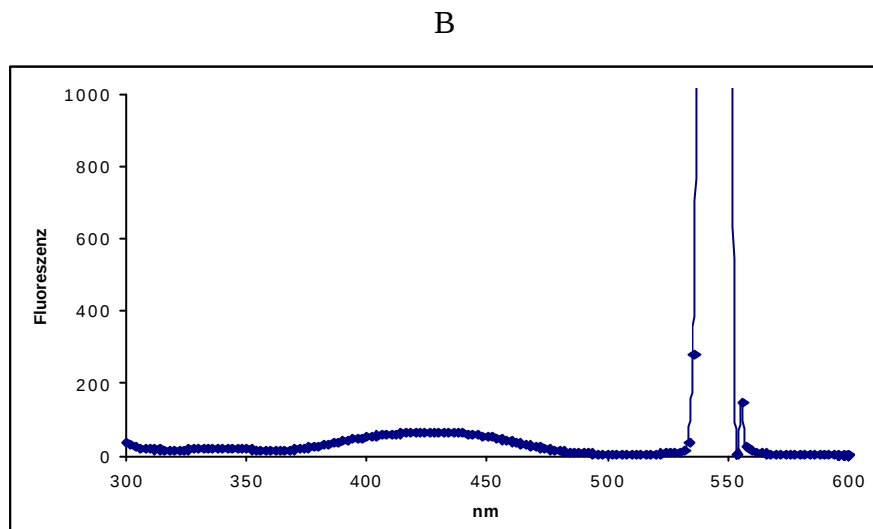
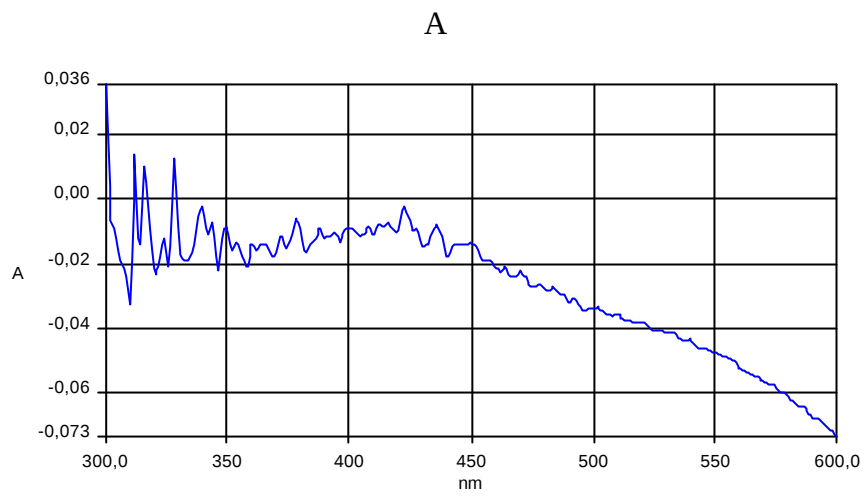


Abb. 51: Absorptions- und Emissionsspektrum von Lucifer-Gelb-beladenen Kontroll-liposomen

(A: Absorptionsspektrum; B: Emissionsspektrum; C: Ausschnitt des Emissionsspektrums).

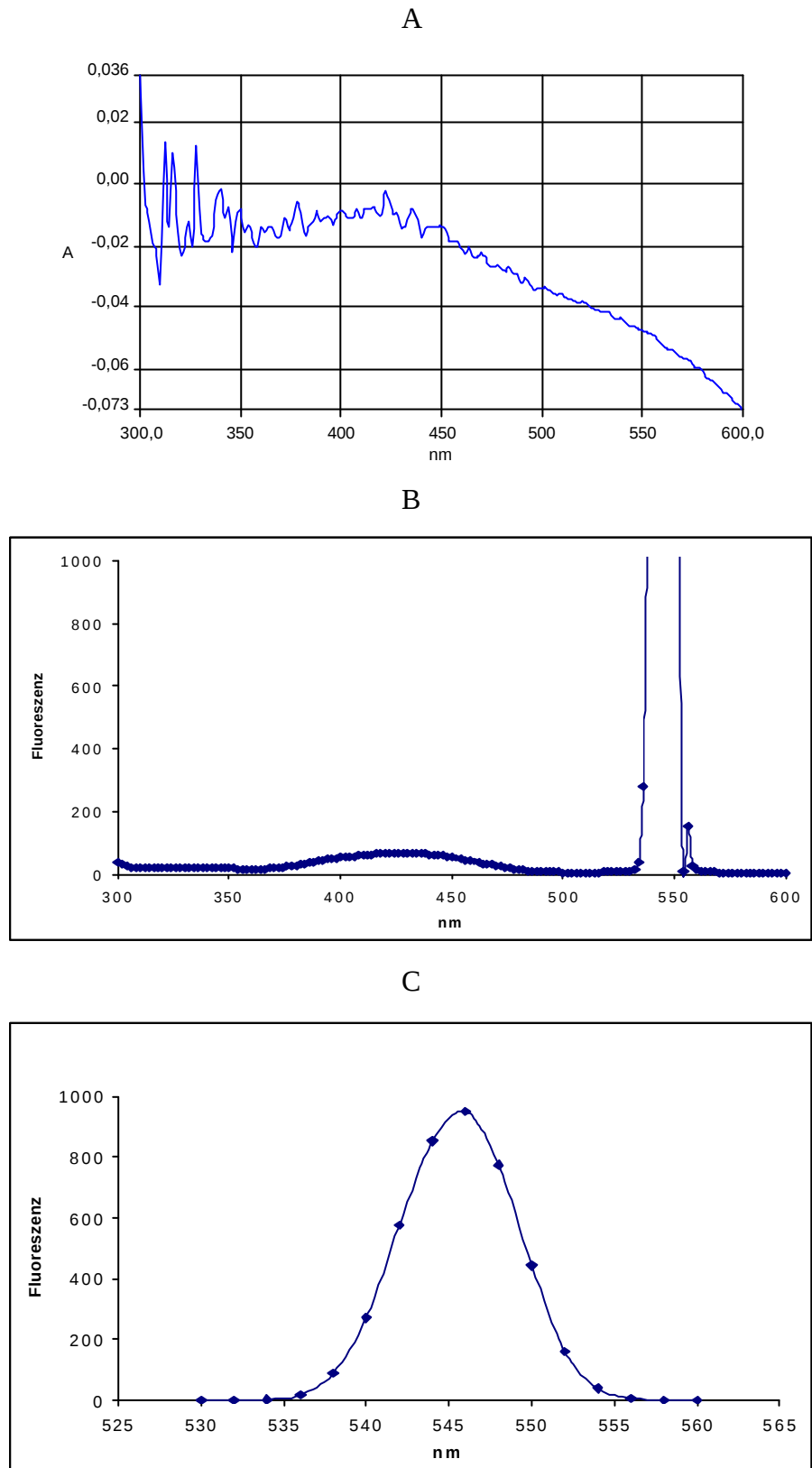
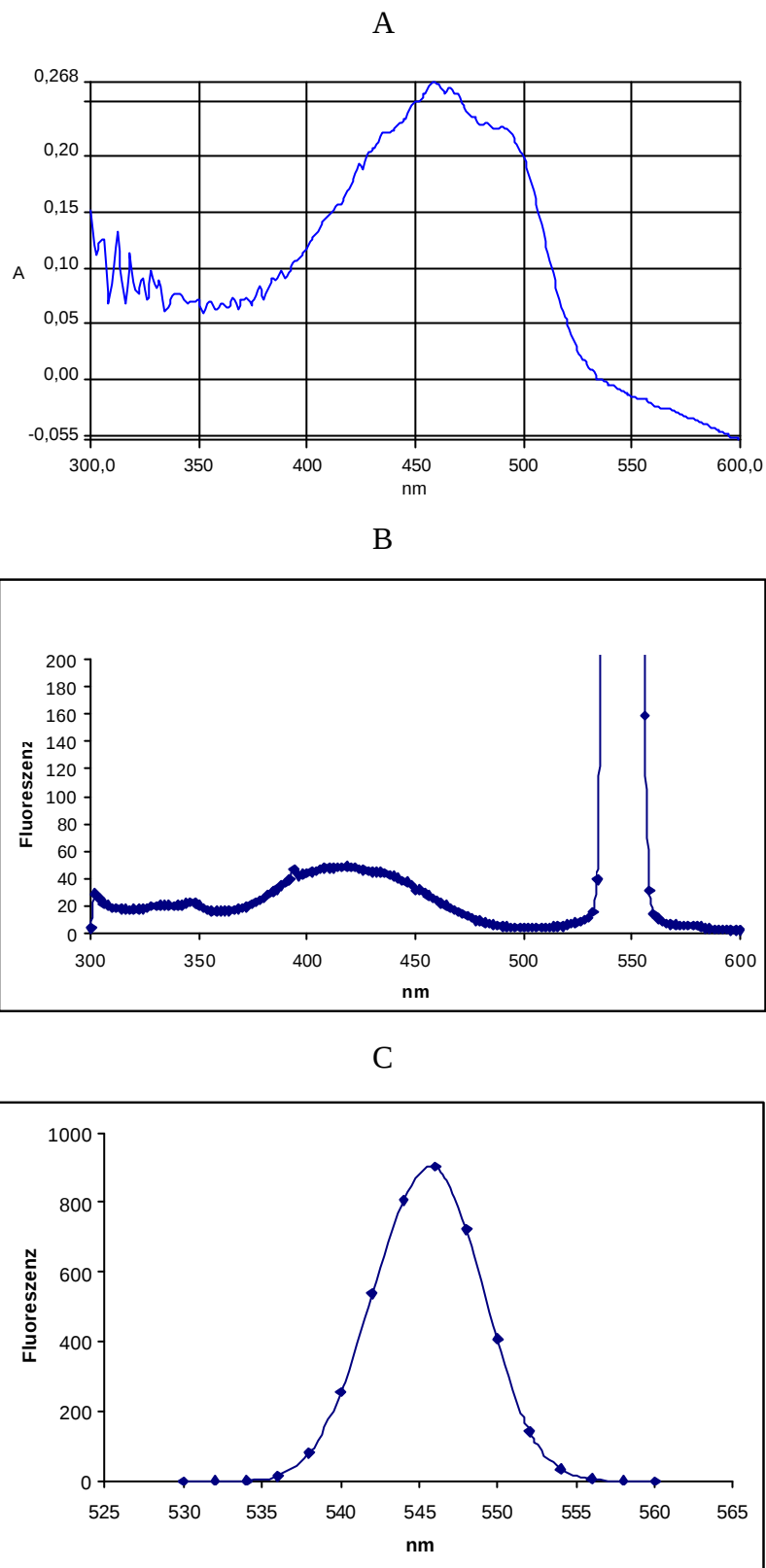


Abb. 52: Absorptions- und Emissionsspektrum von Lucifer-Gelb- und zeaxanthinbeladenen Liposomen (A: Absorptionsspektrum; B: Emissionsspektrum; C: Ausschnitt des Emissionsspektrums; 1,5 nmol Zeaxanthin/mg Phospholipid).



3.4.3 Vergleich der Blaulichtfilteraktivität von Carotinoiden

Die Macula lutea des Menschen enthält die mit der Nahrung zugeführten Carotinoide Lutein und Zeaxanthin. Es wird vermutet, daß diese Xanthophylle als Blaulichtfilter und/oder Antioxidantien wirken und zum Schutz der Macula lutea vor photooxidativem Stress beitragen. Der Blaulichtfiltereffekt soll mittels Lucifer-Gelb-beladener Liposomen, die Strahlung der Wellenlänge 426 nm ausgesetzt werden, überprüft werden. Gemessen wird die Fluoreszenz nach Einstrahlung bei 545 nm. Je mehr Licht in den Liposomeninnenraum zu dem dort befindlichen Fluoreszenzfarbstoff durchdringt, desto stärker wird dieser zum Fluoreszieren angeregt. Stellt man dabei eine im Vergleich zu Kontrollvesikeln verringerte Fluoreszenzstärke mit in der Membran inkorporierten Carotinoiden fest, so kann man Rückschlüsse auf die Absorption des Blaulichts durch diese Pigmente ziehen.

Zunächst werden die Xanthophylle auf ihre Blaulichtfilteraktivität getestet. Als Referenz wird der für Kontrollvesikel unter den gleichen Bedingungen erhaltene Fluoreszenzwert verwendet und 100 % gesetzt. Um sicher zu gehen, daß die beobachteten Effekte nicht durch unterschiedliche Lucifer-Gelb-Mengen in den verschiedenen Proben bewirkt werden, wird jede Vesikelpräparation über ihren Lucifer-Gelb-Inhalt normiert. Beide Xanthophylle verringern die Lichtdurchlässigkeit der Membran, wie die verminderte Fluoreszenz zeigt. Sowohl Lutein, als auch Zeaxanthin zeigen einen Konzentrations-Wirkungsbezug (s. Abb. 53 und 54, S. 94-95 und Tab. 29 und Tab. 30, S. 93-94). Im Bereich von 0,2 bis 1,8 nmol Lutein/mg Phospholipid bewirken bereits geringe Erhöhungen der Carotinoidmenge eine verminderte Fluoreszenz (Tab. 29, S. 93).

Ähnliches wird beim Einbau von Zeaxanthin im Bereich von 0,07 bis 1,5 nmol/mg Phospholipid beobachtet (Tab. 30, S. 94).

Tab. 29: Blaulichtfilteraktivität von Lutein im Vergleich zu Kontrollvesikeln (100 % Fluoreszenz).

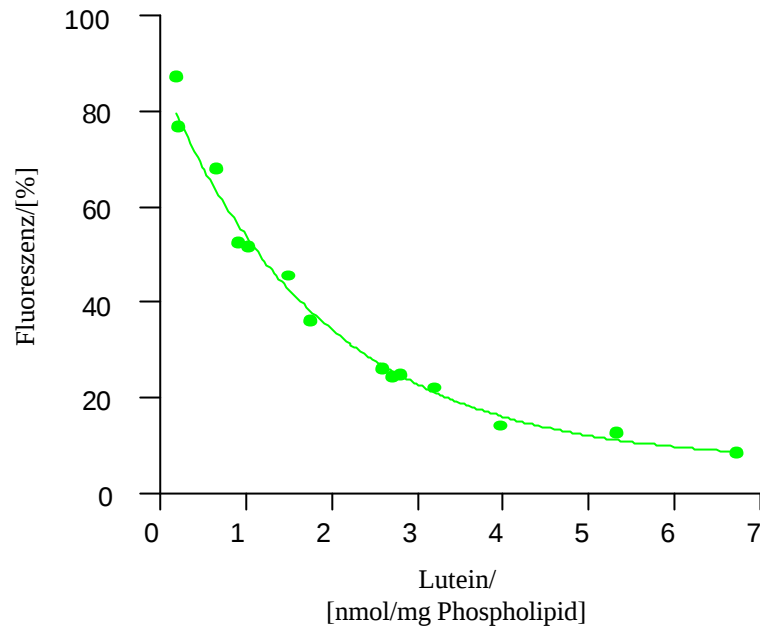
Anregungswellenlänge: 426 ± 5 nm (a) und 426 ± 10 nm (b);

Detektionswellenlänge: 545 ± 5 nm (a) und 545 ± 10 nm (b);

Angaben ± 3 %.

Lutein/[nmol/mg Phospholipid]	Fluoreszenz (a)/[%]	Fluoreszenz (b)/[%]
0,188	87,3	83,4
0,212	76,8	77,8
0,656	67,9	70,6
0,916	52,5	53,8
1,044	51,4	53,6
1,500	45,4	45,1
1,756	36,1	36,9
2,588	25,8	28,6
2,720	24,2	27,2
2,804	24,7	31,3
3,208	21,9	24,0
3,980	14,0	16,2
5,320	12,5	17,1
6,732	8,4	9,5

Abb. 53: Konzentrationsabhängigkeit der Filteraktivität von Lutein (●)
(100% = Kontrolle).



Tab. 30: Blaulichtfilteraktivität von Zeaxanthin im Vergleich zu Kontrollvesikeln
(100 % Fluoreszenz).

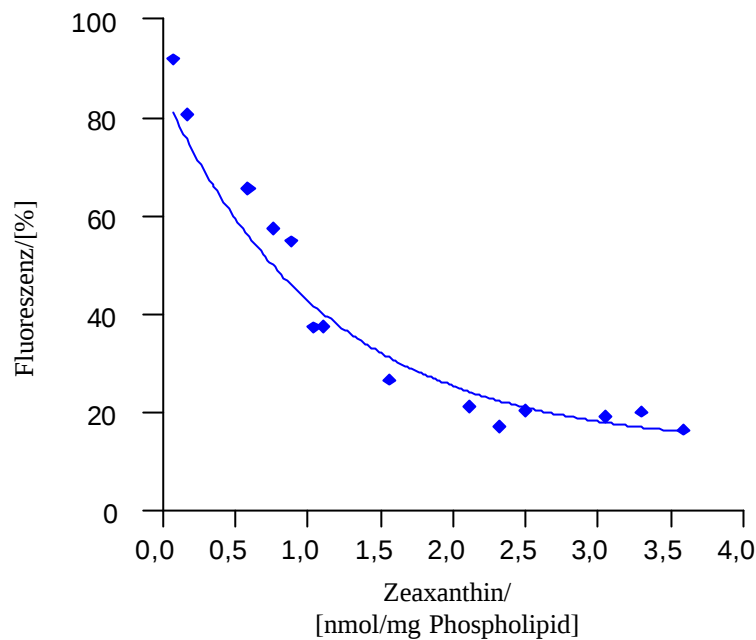
Anregungswellenlänge: 426 ± 5 nm (a) und 426 ± 10 nm (b);

Detektionswellenlänge: 545 ± 5 nm (a) und 545 ± 10 nm (b);

Angaben ± 3 %.

Zeaxanthin/[nmol/mg Phospholipid]	Fluoreszenz (a)/[%]	Fluoreszenz (b)/[%]
0,068	91,9	93,3
0,164	80,7	86,4
0,588	65,5	66,9
0,760	57,3	59,5
0,884	54,9	56,5
1,040	37,3	36,5
1,108	37,5	40,3
1,560	26,6	28,5
2,112	21,2	23,4
2,320	17,1	18,8
2,496	20,4	21,8
3,048	19,1	20,1
3,300	20,0	21,8
3,584	16,5	17,9

Abb. 54: Konzentrationsabhängigkeit der Filteraktivität von Zeaxanthin (◆)
(100% = Kontrolle).



Die Filteraktivität beider Xanthophylle nähert sich mit steigendem Gehalt in der Membran einem Grenzwert, der bei Lutein bei ca. 9 % und im Fall von Zeaxanthin bei 17 % der Kontrolle liegt. Lykopen (Abb. 55, S. 96, Tab. 31, S. 96) und β -Carotin (Abb. 56, S. 98 und Tab. 32, S. 97) weisen eine weniger ausgeprägte Filteraktivität auf. Die schwächste Wirkung besitzt Lykopen. Dabei ist zu berücksichtigen, daß die Experimente mit diesem Carotinoid nur bis zu einem Gehalt von 1,4 nmol Lykopen/mg Phospholipid durchgeführt werden können. Die Einlagerung von größeren Mengen in die Membran ist unter den Versuchsbedingungen nicht möglich.

Tab. 31: Blaulichtfilteraktivität von Lycopin im Vergleich zu Kontrollvesikeln (100 % Fluoreszenz).

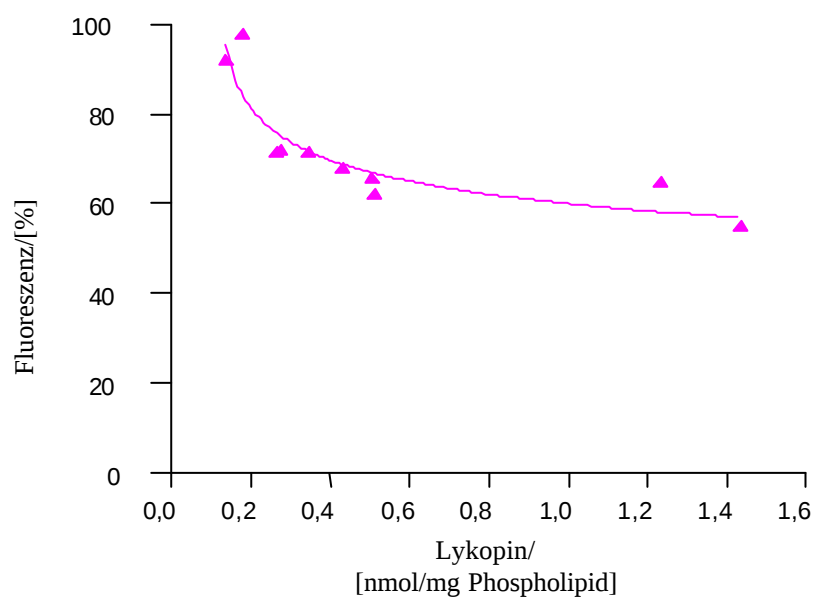
Anregungswellenlänge: 426 ± 5 nm (a) und 426 ± 10 nm (b);

Detektionswellenlänge: 545 ± 5 nm (a) und 545 ± 10 nm (b);

Angaben ± 3 %.

Lykopin/[nmol/mg Phospholipid]	Fluoreszenz (a)/[%]	Fluoreszenz (b)/[%]
0,136	91,9	94,2
0,180	97,5	99,1
0,264	71,1	68,9
0,276	72,0	69,5
0,344	71,7	65,4
0,432	68,0	68,7
0,504	65,6	67,6
0,512	62,3	64,0
1,232	64,9	67,8
1,436	54,9	55,7

Abb. 55: Konzentrationsabhängigkeit der Filteraktivität von Lycopin (▲)
(100% = Kontrolle).



Auch β -Carotin liegt in seiner Wirksamkeit unterhalb der des Luteins und Zeaxanthins (Tab. 32, Abb. 56, S. 98). Die in Tab. 33 (S. 98) beschriebenen Funktionen für den carotinoidmengenabhängigen Wirkungsverlauf sind in Abb. 57 (S. 99) zum Vergleich wiedergegeben. Es ist ersichtlich, daß Lutein schon in geringen Mengen die beste Wirkung besitzt. Etwas höhere Konzentrationen von Zeaxanthin führen ebenso zu einem Absinken der Lichtdurchlässigkeit. Aus der Graphik läßt sich eine Abstufung der Carotinoide entnehmen; β -Carotin und Lykopen zeigen eine deutlich schwächere Wirkung bei der Filterung des Blaulichts als die Xanthophylle Lutein und Zeaxanthin.

Tab. 32: Blaulichtfilteraktivität von β -Carotin im Vergleich zu Kontrollvesikeln (100 % Fluoreszenz).

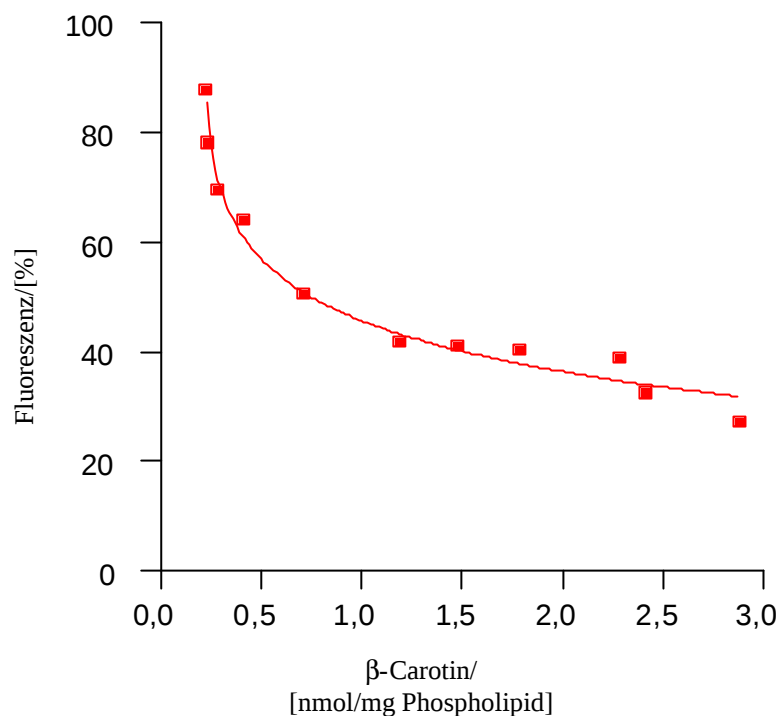
Anregungswellenlänge: 426 ± 5 nm (a) und 426 ± 10 nm (b);

Detektionswellenlänge: 545 ± 5 nm (a) und 545 ± 10 nm (b);

Angaben ± 3 %.

β -Carotin /[nmol/mg Phospholipid]	Fluoreszenz (a)/[%]	Fluoreszenz (b)/[%]
0,228	87,8	90,5
0,240	78,0	75,5
0,288	69,5	69,8
0,416	64,0	65,9
0,716	50,6	52,4
1,192	41,7	44,3
1,484	41,0	44,7
1,788	40,2	43,8
2,288	38,7	42,2
2,412	32,4	34,6
2,880	27,1	29,6

Abb. 56: Konzentrationsabhängigkeit der Filteraktivität von β -Carotin (■)
(100% = Kontrolle).



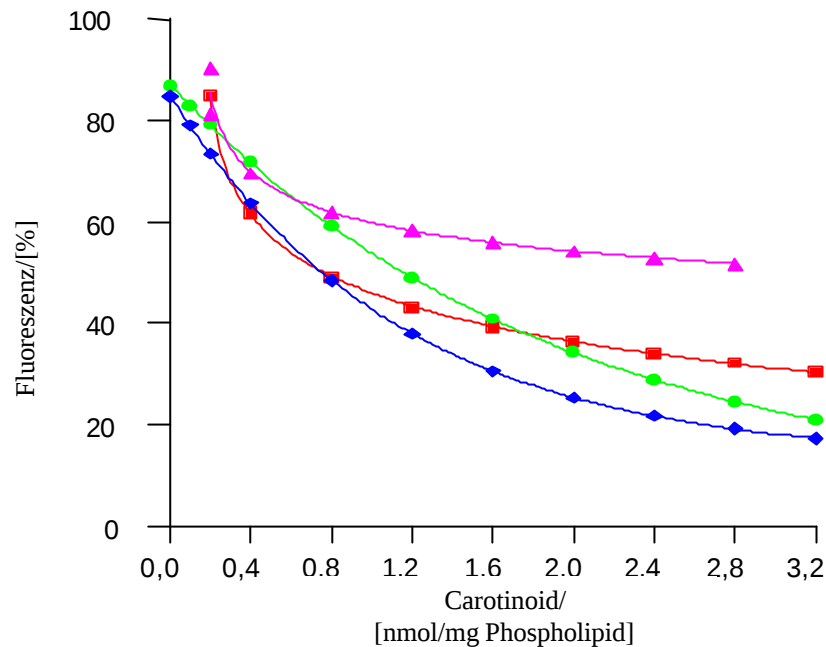
Tab. 33: Funktionen der konzentrationsabhängigen Filteraktivität verschiedener Carotinoide.

Probe	Funktion der konzentrationsabhängigen Blaulichtfilteraktivität ^a	^b
Lutein	$\% \text{Fluoreszenz} = 81,0 \times e^{(-0,53 \times [\text{Lutein}])} + 6,3$	0,99
Zeaxanthin	$\% \text{Fluoreszenz} = 72,1 \times e^{(-0,89 \times [\text{Zeaxanthin}])} + 13,1$	0,95
Lykopen	$\% \text{Fluoreszenz} = 59,0 \times ([\text{Lykopen}] - 0,11)^{-0,13}$	0,91
β -Carotin	$\% \text{Fluoreszenz} = -11,4 \times \ln([\beta\text{-Carotin}] - 0,20) + 43,0$	0,99

^a 100 % = Kontrolle ohne Carotinoid.

^b Korrelationskoeffizient.

Abb. 57: Vergleich: Lutein (◆), Zeaxanthin (●), Lykopin (▲) und β-Carotin (■) als Blaulichtfilter (100% = Kontrolle).



Aufgrund der vorliegenden Ergebnisse und der spezifischen Anreicherung von Lutein und Zeaxanthin in der Macula lutea, wird eine Mischung auf ihre Filterwirkung hin untersucht (Berechnung analog des unter Kap. 3.1.2, S. 32, erläuterten additiven Werts). Das Verhältnis Lutein zu Zeaxanthin beträgt in allen Testsuspensionen 1:1,4. Ein theoretischer additiver Schutzeffekt wird nach:

Theoretischer Wert

$$= (\sum \text{Experimenteller Einzelwert}^a \times \text{Menge} [\text{Carotinoid}]^b) : \text{Gesamtcarotinoidgehalt}^a \text{ (Formel 2)}$$

mit

^a Fluoreszenz in % des Kontrollwertes

^b Carotinoidkonzentration in nmol/mg Phospholipid

berechnet.

Der genaue Fluoreszenzwert des betreffenden Einzelcarotinoids bei der jeweiligen Konzentration wird unter Zuhilfenahme der berechneten Funktionen (Tab. 33, S. 98) bestimmt. Unabhängig von der Carotinoidgesamtmenge in diesem Konzentrationsbereich liegt der gefundene Fluoreszenzwert bei $34.0 \pm 4,3$ % der Kontrollfluoreszenz und somit stets unter dem berechneten additiven Wert. Daraus ergibt sich eine synergistische Wirkung der beiden Xanthophylle, die in Tab. 34 für jede getestete Probe quantitativ angegeben ist.

Tab. 34: Lutein und Zeaxanthin als Blaulichtfilter (n = 2-3).

Carotinoid	Konzentration/ [nmol/mg Phospholipid]	Fluoreszenz/ [%] ^a	Theoret. Fluoreszenz/ [%] ^{a,b}	Δ^c
Lutein	0,70	35,3	52,0	16,7
Zeaxanthin	0,98			
Lutein	0,75	33,8	49,2	15,4
Zeaxanthin	1,06			
Lutein	0,56	31,4	60,2	28,8
Zeaxanthin	0,80			
Lutein	0,50	34,5	65,0	30,5
Zeaxanthin	0,72			

^a 100% Fluoreszenz entsprechen der Lichtdurchlässigkeit der Kontrolle.

^b Normierter Fluoreszenzmittelwert berechnet aus Einzelkomponenten (Formel 2 S. 99) und aus den aus konzentrationsabhängigen Funktionen enthaltenen Daten.

^c Differenz zwischen theoretischem und experimentell ermitteltem Wert.

4. Diskussion

4.1 Antioxidative Wirkung von Einzelsubstanzen in multilamellaren Liposomen

Carotinoide und Tocopherole sind effektive Antioxidantien und reagieren mit einer Reihe verschiedener reaktiver Sauerstoffspezies (ROS), wie Singulett-Sauerstoff ($^1\text{O}_2$), Stickstoffmonoxid (NO) oder dem Superoxidradikalanion ($\text{O}_2^{\bullet-}$)^[86,87]. Im Zusammenhang mit dem Schutz von Lipiden vor Lipidperoxidation ist vor allem ihre Interaktion mit Peroxylradikalen von Interesse, die auch im vorliegenden Modell untersucht wurde. Verschiedene Carotinoide, sowie α -Tocopherol und Quercetin wurden in die Membran multilamellarer Liposomen eingelagert; die Lipidperoxidation wurde mit AMVN initiiert. Dabei ergaben sich deutliche Abstufungen in der antioxidativen Wirkung der Einzelverbindungen mit der Reihenfolge:

Lykopen > α -Tocopherol > α -Carotin > β -Cryptoxanthin > Zeaxanthin = β -Carotin > Lutein > Quercetin^[146].

α -Tocopherol ist ein typisches sogenanntes „chain-breaking antioxidant“ und wird als wichtigste Komponente der low density Lipoproteine (LDLs) zum Schutz vor Lipidperoxidation angesehen^[147]. Auch in dem verwendeten System zeigt α -Tocopherol eine ausgeprägte antioxidative Wirkung und wird nur von dem lipophilen Carotinoid Lykopen übertroffen. Das deutlich hydrophilere Flavonoid Quercetin weist von den untersuchten Substanzen die geringste Wirkung auf. Die Lipophilie allein kann aber nicht der bestimmende Faktor für die antioxidative Wirkung in diesem System sein. Die meisten untersuchten Carotinoide sind lipophiler als α -Tocopherol und hier geringer wirksam. Auch aus der Reihenfolge der Carotinoide ist zu erkennen, daß die Lipophilie der Verbindung nur bedingt mit der antioxidativen Wirkung korreliert ist. β -Carotin ist lipophiler als β -Cryptoxanthin, aber deutlich geringer wirksam. Neben den physikochemischen Eigenschaften der Substanzen spielen in solchen Modellsystemen eine Reihe anderer Faktoren eine wichtige Rolle. Dazu gehören u. a. die Struktur und chemische Zusammensetzung der Matrix (Liposomen), verwendetes Prooxidans, Lösungsmittel, pH-Wert oder Temperatur. Ein korrekter Vergleich der antioxidativen Wirkung von Einzelverbindungen miteinander ist somit nur in identischen Modellsystemen zulässig. Daher ist ein Vergleich der hier erhaltenen Ergebnisse mit Literaturdaten nur bedingt möglich.

In Übereinstimmung mit den hier erhobenen Daten zeigte sich doch in den meisten Untersuchungen, daß α -Tocopherol ein besseres Antioxidans als β -Carotin ist, wenn Peroxylradikale in einem lipophilen Modellsystem erzeugt wurden. Zur vergleichenden Wirksamkeit von Carotinoiden gibt es bisher nur wenige Studien mit teils widersprüchlichen Ergebnissen. Untersuchungen mit $\text{ABTS}^{\bullet+}$ -Radikalen (ABTS: 2,2'-Azinobis-[-3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonsäure]) ergaben, daß auch in diesem System Lykopen die besten antioxidativen Eigenschaften aus einer Serie von Carotinoiden aufweist^[148]. Die Reihung der anderen Carotinoide entspricht aber nicht der hier gefundenen.

In einem ähnlichen liposomalen System zeigte sich ebenfalls eine andere Abstufung der antioxidativen Wirkung der Carotinoide. Die polaren Xanthophylle, Zeaxanthin und β -Cryptoxanthin schützten hier die liposomale Membran effektiver als β -Carotin. Lykopen hingegen erwies sich als schwächstes Antioxidans^[150].

Die starken Abweichungen zwischen den doch sehr ähnlich aufgebauten Studien könnten neben den oben genannten Faktoren auch auf die unterschiedlichen Konzentrationen der eingesetzten Carotinoide zurückzuführen sein.

Wie erwähnt, ist auch das zur Radikalgenerierung ausgewählte System von Bedeutung. So finden radikalische Reaktionen, die durch AMVN, einem lipophilen Radikalgenerator, initiiert werden im unpolaren Teil der Membran statt (s. Abb. 58). Im Fall von wasserlöslichen Radikalstartern sollte der Reaktionsort an der Grenzfläche zwischen polarer Membranregion und wässriger Lösung liegen.

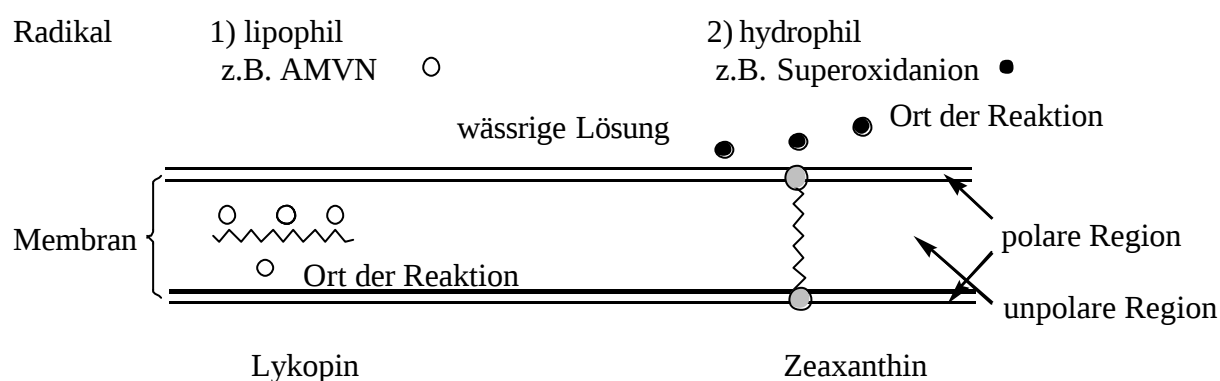


Abb. 58: Schema zur Klärung des mit AMVN beobachteten Effekts, nach dem mit steigender Polarität die lipidprotektive Wirkung der Testsubstanzen sinkt.

4.2 Synergismus von Antioxidantien verschiedener Substanzklassen

Wie bereits in Kap. 3.1.2 und 3.1.3 (S. 32 und S. 34) dargelegt, wurden Mischungen der untersuchten Einzelkomponenten in Liposomen eingebaut und ihre antioxidative Wirkung mit einem Erwartungswert verglichen. Der Erwartungswert wurde additiv aus den experimentellen Daten der Einzelkomponenten berechnet. Dabei zeigte sich, daß eine Carotinoidkombination ähnlich dem Carotinoidmuster im Serum des Menschen eine wesentlich höhere Schutzwirkung erzielt, als der aus Daten der Einzelkomponenten berechnete additive Wert erwarten läßt. Dieser Effekt weist auf einen Synergismus hin. Weiter konnte gezeigt werden, daß es sich hierbei um ein stoffklassenübergreifendes Phänomen handelt, welches sowohl bei einer Kombination von Carotinoiden allein, als auch bei Kombinationen von Carotinoiden mit α -Tocopherol oder Quercetin auftritt. Die synergistische Wirkung ist mit der Anwesenheit von Lycopin und Lutein verknüpft. Die Zwei-Komponenten-Mischung aus diesen Carotinoiden zeigt den stärksten Synergismus.

Es können verschiedene Ursachen für diesen Effekt diskutiert werden. Er könnte mit den physikalisch-chemischen Eigenschaften von Lycopin und Lutein in Verbindung stehen, die auch für die Positionierung von Carotinoiden in der Membran verantwortlich sind. Lutein gehört mit seinen beiden Hydroxylfunktionen zu den Xanthophyllen, von denen gezeigt werden konnte, daß sie senkrecht orientiert die Membran durchspannen^[17,18]. Dabei sind die polaren Endgruppen jeweils im polaren Teil der Lipiddoppelschicht verankert. Lycopin ist vollständig unpolar und liegt als solches waagrecht innerhalb der Membran und besitzt hier eine gewisse Mobilität^[16]. Eine Kombination beider Carotinoide mit ihren unterschiedlichen Membranlokalisationen könnte die mit jeder Orientierung spezifisch auftretende Schutzwirkung vorteilhaft miteinander vereinbaren und somit einen optimalen Schutz im vorliegenden System bedingen. Die verschiedenen Angriffspunkte des Radikals sind durch die unterschiedlichen Eigenschaften der beiden Carotinoide abgedeckt. Da auch α -Tocopherol und Quercetin zusammen mit den Carotinoiden eine synergistische Wirkung zeigen, kann davon ausgegangen werden, daß Carotinoide mit beiden Antioxidantien in Wechselwirkung stehen. Krinsky et al. beschrieben bereits 1992 eine synergistische Wirkung von β -Carotin und α -Tocopherol^[151].

Zur Abklärung des Mechanismus der synergistischen Effekte sind weitere Untersuchungen notwendig. Im Zusammenhang mit der präventiven Wirkung von Mikronährstoffen, wie Carotinoiden, Tocopherolen, Flavonoiden und Polyphenolen, wird angenommen, daß ein

ausgewogenes Muster im Organismus besseren Schutz gewährleistet, als hohe Konzentrationen an Einzelsubstanzen. Erst im Zusammenspiel der endogenen und exogenen Antioxidantien wird ein optimaler Schutz bereitgestellt. Synergistische Wirkungen spielen hierbei vermutlich eine große Rolle.

4.3 Vergleich der Wirkung von Carotinoiden in multilamellaren und unilamellaren Liposomen

Die Konzentrationsabhängigkeit der lipidprotektiven Wirkung von Carotinoiden in multilamellaren Vesikeln wurde in Kap. 3.1.4 (S. 37) dargelegt. Dabei ergibt sich bei einer Steigerung des Carotinoidgehalts um den Faktor 10 lediglich eine 1,5 bis 3fache Erhöhung der antioxidativen Wirkung von Lutein, bzw. β -Carotin. Gleichzeitig läßt sich bei höheren Konzentrationen kein Synergismus zwischen beiden Komponenten mehr nachweisen.

Ein ebenso überraschendes Ergebnis ergibt die Untersuchung von β -Carotin, Lutein und Lykopin, sowie einer Kombination aus Lutein und Lykopin in unilamellaren Vesikeln; Kap 3.2.1 (S.42). Bei einer Konzentration von 3 nmol Carotinoid/mg Phospholipid, wie sie auch in der Studie der multilamellaren Liposomen angewandt wurde, zeigen Lutein und β -Carotin eine deutliche prooxidative Wirkung. Die antioxidative Wirkung von Lykopin nimmt ab. Dabei hat eine Senkung der Lykopin- und Luteinmenge den Verlust der protektiven Wirkung, bzw. einen prooxidativen Effekt zur Folge. Gleichzeitig wird bereits in den unilamellaren Kontrollvesikeln ein ca. 10fach höherer Gehalt an TBARS (24,2 nmol/mg Phospholipid) gemessen, als dies im Fall der multilamellaren Liposomen (2,1 nmol/mg Phospholipid) gezeigt werden konnte.

Die hier beobachteten Effekte lassen sich vermutlich alle mit dem Aufbau der Liposomen erklären. Unilamellare Liposomen sind aus einer Lipiddoppelschicht aufgebaut, während multilamellare Liposomen mehrere Membranschichten enthalten, die zwiebelschalenförmig angeordnet sind. Aus dem Aufbau ergibt sich, daß die Zahl der Angriffspunkte für außerhalb des Liposoms erzeugte Radikale im Fall der unilamellaren Liposomen größer ist als bei multilamellaren. Daraus erklärt sich vermutlich der höhere TBARS-Wert.

In multilamellaren Liposomen führt eine Steigerung des Carotinoideinbaus aufgrund der Struktur des Vesikels nicht zu einer weiteren Erhöhung des Carotinoidgehalts in der äußeren Lipidschicht. Da auch mehrere innen liegende Schichten vorhanden sind, wird nur ein

proportionaler Anteil des Carotinoids in die äußere Membran eingebaut. Die äußere Membran ist im vorliegenden System vermutlich der bevorzugte Angriffspunkt. Es ist daher nicht verwunderlich, daß keine konzentrationsabhängige Steigerung der antioxidativen Wirkung beobachtet wird. Ähnliche Effekte dürften für den „Verlust“ des Synergismus von Lutein und Lykopin verantwortlich sein. Zudem sollte bedacht werden, daß sich mit steigender Carotinoidkonzentration die Fluidität der Membran ändern kann, was ebenfalls zu Änderungen von Wechselwirkungen führen könnte.

Die prooxidative Wirkung von Carotinoiden wurde schon mehrfach in der Literatur beschrieben^[152] und auch als mögliche Ursache für die erhöhte Lungenkrebsinzidenz diskutiert^[153], die bei Rauchern unter Supplementierung mit β -Carotin in hohen Dosen beobachtet wird^[103,104]. Prooxidative Effekte von β -Carotin werden vor allem bei höherer Sauerstoffkonzentration beobachtet^[36,37]. Intermediär werden vermutlich Carotinoidperoxyradikale gebildet, die in Folgereaktionen weitere reaktive Sauerstoffspezies bilden^[159,160,154].

Im System multilamellarer Liposomen dürfte zumindest im Bereich der inneren Schichten die Konzentration an Sauerstoff geringer sein als in den äußeren Schichten. Die Wahrscheinlichkeit einer Bildung von Carotinoidperoxyradikalen ist im Vergleich zu multilamellaren Liposomen geringer.

4.4 Liposomen beladen mit hydrophilen Substanzen

Mit der in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Methode zur Präparation unilamellarer mit hydrophilen Stoffen beladener Liposomen (Kap. 3.2.2, S. 44) ist es möglich, reproduzierbar Suspensionen solcher Vesikeln herzustellen. Die Größenverteilung der Liposomen folgt einer Gauß-Verteilung, deren Grenzen ein Intervall von 171 bis 257 nm umfassen. Der Vorteil dieser Methode liegt in der Reproduzierbarkeit des Einbaus von wasserlöslichen und lipophilen Substanzen in die entsprechenden Kompartimente. Zusätzlich ist es möglich, die nicht eingebauten Bestandteile auf verschiedenen Wegen schnell und unkompliziert zu entfernen. Dabei ist der zeitliche Rahmen der Präparation so gesetzt, daß oxidationsempfindliche Stoffe eingesetzt werden können, ohne während der Präparation abgebaut zu werden. Durch den Einsatz der HPLC kann die Qualität der Liposomenpräparation kontrolliert werden. Gleichzeitig gewährleistet die ausreichend hohe

Startkonzentration des hydrophilen Antioxidans in den Liposomen lange Inkubationszeiten ohne Regeneration des hydrophilen Antioxidans.

Das hier beschriebene System erlaubt die einfache Herstellung unilamellarer Liposomen. Die Präparation wird jedoch durch verschiedene Parameter beeinflusst. Insbesondere muß auf eine konstante Temperatur während der Extrusion geachtet werden. Ein zu hoher Druck während der Extrusion ist unbedingt zu vermeiden, um ein Reißen der Membran zu verhindern.

Mit Hilfe des vorliegenden Systems lassen sich Interaktionen von hydrophilen und lipophilen Antioxidantien untersuchen. Vorteil des Modells ist die Kompartimentierung der Antioxidantien, die der Situation im lebenden Organismus (Zelle) nachempfunden wurde, d. h. Lokalisation der hydrophilen Antioxidantien im wässrigen Kompartiment, umgeben von einer lipophilen Membran beladen mit lipophilen Antioxidantien. Es soll hier auch erwähnt werden, daß mit diesem Modell auch weitere Untersuchungen möglich sind. So können z. B. Zielmoleküle eines oxidativen Angriffs in die Membran oder den hydrophilen Innenraum eingebaut werden. Die anschließende Analyse der Reaktionsprodukte erlaubt dann einen Aufschluß über Reaktionswege, Reaktionsmechanismen und Diffusionsfähigkeit verschiedener Prooxidantien.

4.5 Antioxidative Wirkung von Carotinoiden und GSH in unilamellaren Liposomen

Durch die Einlagerung von GSH, einem wasserlöslichen Antioxidans, kann die Lipidperoxidation unter gleichzeitigem Verbrauch des GSH auf ca. die Hälfte im Vergleich zu Kontrollvesikeln herabgesetzt werden (Kap. 3.2.4, S. 49). Dieser Schutzeffekt wird durch den zusätzlichen Einbau von Carotinoiden in die Membran modifiziert. Dabei zeigen sich konzentrationsabhängig unterschiedliche Effekte. Eine Erhöhung der β -Carotinmenge führt zu einer verstärkten Lipidperoxidation und einem erhöhten Verbrauch an GSH. Dagegen vermindert eine Erhöhung von Lutein den Abbau beider Substanzen. Im Fall des Lykopins läßt sich ein Konzentrations/Wirkungsverlauf beschreiben, der ein deutliches Minimum der Lipidperoxidation bei 0,06 nmol Carotinoid/mg Phospholipid aufweist. Höhere, wie auch niedrigere Mengen an Lycopin zeigen eine geringere Lipidprotektion. Dies weist darauf hin, daß im vorliegenden System für einen optimalen Schutz vor Lipidperoxidation ein bestimmtes Verhältnis von Lycopin zu Membranlipiden notwendig ist.

In multilamellaren Liposomen wurde die antioxidative Kapazität von Lykopen bei Konzentrationen von bis zu 130 mM untersucht^[157]. Hier fand sich eine dosisabhängige Steigerung der Schutzwirkung.

Wie auch in Fall der multilamellaren Liposomen (s. Kap. 4.1, S. 101) stehen die verschiedenen antioxidativen Aktivitäten der unterschiedlichen Carotinoide vermutlich in Zusammenhang mit ihrer Struktur und Polarität, die ihre Membranorientierung bestimmen. Verglichen mit β -Carotin (2 nmol/mg Phospholipid) und Lutein (2,6 nmol/mg Phospholipid) ist die Einbaumenge von Lykopen (0,12 nmol/mg Phospholipid) in die Vesikelmembran sehr niedrig. Es kann davon ausgegangen werden, daß dieses Carotinoid aufgrund seiner unpolaren und offenkettigen Struktur waagrecht in der Lipiddoppelschicht vorliegt. So nimmt es pro Molekül einen großen Raum ein und stört die Einlagerung eines weiteren Lykopenmoleküls in direkter Nachbarschaft. Große Mengen dieses Carotinoids in der Membran beeinflussen vermutlich die Lipiddoppelschicht und stören die Membranintegrität. Dies steht im Einklang mit der Studie von Lowe et al.^[110], die eine erhöhte Membrandurchlässigkeit in Folge von gesteigertem Lykopeneinbau bei HT29-Zellen zeigt.

Obermüller-Jevic et al.^[158] fanden einen prooxidativen Effekt in Verbindung mit β -Carotin in humanen Hautfibroblasten, die UVA-Licht exponiert wurden. An dieser Stelle soll noch einmal darauf hingewiesen werden, daß Membraneffekte und prooxidative Wirkungen von Carotinoiden im Zusammenhang mit ihrer toxikologischen Beurteilung von Bedeutung sind. Möglicherweise stehen die hier beschriebenen Effekte im Zusammenhang mit Wirkmechanismen, die in der ATBC^[103]- und CARET-Studie^[104] zu einer erhöhten Tumorinzidenz der mit relativ hohen Dosen an β -Carotin supplementierten Rauchern führten.

Lediglich niedrige Mengen an Lykopen und β -Carotin bewirken einen deutlichen Lipidschutz. Ein ähnlicher Effekt wurde auch bei der β -Carotinsupplementierung von Probanden mit niedrigem Carotinoidserumgehalt beschrieben^[111]. Hier äußert sich die positive Wirkung in Form eines reduzierten Risikos, an Prostatacarcinom zu erkranken. Es wird diskutiert, daß auch zum optimalen Schutz eine optimale Konzentration an Antioxidantien notwendig ist. Bei höheren Konzentrationen könnten toxische Effekte auftreten, bei niedrigeren ein unzureichender Schutz gegeben sein.

Anhand der vorliegenden Ergebnisse mit GSH-gefüllten Liposomen kann die Wechselwirkung von wasserlöslichen und lipophilen Antioxidantien gezeigt werden. Solche Wechselwirkungen sind bereits für das System α -Tocopherol/Ascorbat beschrieben^[155,156]. Hier wird Tocopherol regeneriert, indem Ascorbat mit dem Tocopherylradikal reagiert und die radikalische Last in das wässrige Kompartiment transportiert wird. Im vorliegenden

System ist eine Regeneration des Carotinoids durch GSH nicht gegeben. Durch Wechselwirkungen an der Grenzschicht zwischen hydrophiler und lipophiler Phase ergänzen sich die Antioxidantien jedoch in ihrer Wirkung.

4.6 Lipidperoxidation und GSH-Verbrauch in unilamellaren Liposomen in Abhängigkeit von der Zeit

Im Rahmen der vorliegenden Studie wurde auch die Zeitabhängigkeit der Reaktion untersucht. Unilamellare Liposomen, beladen mit lipophilen und hydrophilen Antioxidantien, wurden über einen Zeitraum von 4 h mit AMVN inkubiert und zu bestimmten Zeiten Proben entnommen (Kap. 3.2.5, S. 53). Die Ergebnisse dieser Untersuchungen stimmen sehr gut mit den Daten der 2 h-Inkubation überein (s. Kap. 3.2.4, S. 49). Es werden auch hier die für β -Carotin, Lutein und Lykopen bestimmten Konzentrationsabhängigkeiten beobachtet. Lutein zeigt in Bezug auf Lipidprotektion und Schutz des inkorporierten GSH eine Dosis/Wirkungs-Beziehung, während die inhibitorische Wirkung im Fall von β -Carotin umgekehrt zur eingesetzten Carotinoidmenge ist. Niedrige Mengen an Lutein und hohe Konzentrationen von β -Carotin wirken prooxidativ. Lykopen erweist sich als in hohen Konzentrationen GSH-protektives, in niedrigen hingegen lipidprotektives Antioxidans (s. Kap. 3.2.5, S. 53). Die beobachteten Effekte könnten durch die bereits in Kap. 4.1 (S. 101) unterschiedlichen strukturbedingten Membranorientierungen erklärt werden.

Vergleicht man die Verläufe der TBARS-Bildung in Liposomen, deren eingelagerte Carotinoide antioxidativ wirksam sind mit Kontrollvesikeln, so lässt sich ein deutlicher Unterschied der Graphen feststellen. Während die Lipidperoxidation der ungeschützten Membran kontinuierlich fortschreitet, flacht die TBARS-Entwicklung in Anwesenheit von Carotinoiden zunehmend ab. Dieser Befund gilt für alle untersuchten Carotinoide gleichermaßen. Liegt ein lipidprotektiver Effekt vor, so stellt sich dieser nach ca. einer Stunde Inkubation durch einen verlangsamten TBARS-Anstieg verglichen mit der Kontrolle dar. Die berechneten Regressionskurven zeigen ausnahmslos eine logarithmische Funktion, deren Abflachung mit steigender antioxidativer Aktivität stärker ausgeprägt ist. Einen vergleichbaren Verlauf der Oxidation von β -carotinbeladenen Phosphatidylcholinliposomen bei der Bestrahlung mit Licht der Wellenlänge > 530 nm zeigten Krinsky et al.^[24]. Auch hierbei handelt es sich um eine radikalische Reaktion. Vesikel mit prooxidativ wirksamen

Mengen an Carotinoiden zeigten einen eher linearen Verlauf der TBARS-Entwicklung, deren Steigung hingegen steiler ist, als die in Kontrollliposomen.

Beobachtet man den GSH-Verbrauch, unterscheiden sich die Carotinoide in ihrer Wirkung grundlegend voneinander. Bei Suspensionen mit antioxidativer Wirkung läßt sich häufig ein verzögerter Reaktionsbeginn feststellen, bei dem der GSH-Inhalt während der ersten Stunde der Inkubation nahezu konstant bleibt und erst später langsamer als in Fall der Kontrolle abnimmt. Bei prooxidativen Reaktionen hingegen verläuft die Oxidation direkt zu Beginn der Inkubation mit einer höheren Rate, als sie in Fall der Kontrolle gemessen wird. Daraus kann geschlossen werden, daß die beschleunigende, wie auch schützende Komponente der Reaktion bereits vor Inkubationsstart vorliegt.

Im Rahmen der Studie wurde auch der Verbrauch an Carotinoiden während der Inkubation verfolgt. Obwohl Lutein und β -Carotin grundsätzlich verschiedene Konzentrations/Wirkungs-Beziehungen zeigen, werden beide während des Reaktionsablaufs verbraucht. Es könnten dennoch aufgrund der unterschiedlichen Typen der angepassten Regressionskurven verschiedene Kinetiken vorliegen, zu deren Bestimmung jedoch häufigere und genaue Konzentrationsmessungen durchgeführt werden müssen. Unabhängig hingegen vom vorliegenden Mechanismus deutet die Tatsache, daß die Carotinoidmenge abnimmt auf einen irreversiblen Prozeß hin. Dieser könnte durch die Bildung eines Addukts zwischen Carotinoid und Radikal oder eines Carotinoidradikalkations erklärt werden^[159,160]. Es wurde in der Literatur bereits beschrieben, daß Carotinoidradikaladdukte als Prooxidantien reagieren können^[160]. Besonders im Fall von β -Carotin wäre eine erhöhte Wahrscheinlichkeit für die Bildung solcher prooxidativen Zwischenstufen mit steigendem Carotinoidgehalt denkbar, wodurch neben des Verlusts der Membranintegrität durch hohe Carotinoidmengen die stärkere TBARS-Bildung erklärt werden könnte.

Nach einem anfänglichen Abfall bleibt die Lykopinkonzentration hingegen in allen gemessenen Proben nahezu konstant. Experimente in multilamellaren Liposomen (Kap. 3.1.5, S. 38) führen zu ähnlichen Ergebnissen. Diese Beobachtung steht im Gegensatz zur ausgeprägten Instabilität des Lycopins in homogener Lösung. Es handelt sich bei diesem Carotinoid um eine extrem oxidationsempfindliche Substanz, die in homogener organischer Lösung mit Methyllineolat schneller abgebaut wird als β -Carotin oder α -Carotin^[161]. Aufgrund seiner hohen Reaktivität mit oxidierenden Agentien wurde Lykopin als starkes Antioxidans eingestuft^[162].

Die Mechanismen, die dem ungewöhnlichen Verhalten von Lykopin unterliegen, sind noch ungeklärt.

4.7 UV/VIS-Spektren von carotinoidhaltigen Liposomen

Aufgrund seiner hohen antioxidativen Kapazität (vergl. Kap. 4.1 und 4.5, S. 101 und 106) und der überraschenden Stabilität während vierstündiger Inkubation mit AMVN (s. Kap. 4.6, S. 108) wurden Spektren von lykopinhaltigen Liposomen aufgenommen und mit denen anderer carotinoidhaltiger Liposomen und entsprechenden Kontrollen verglichen. Dabei fällt auf, daß sich UV/VIS-Spektren von Phosphatidylcholinliposomen nicht von solchen unterscheiden, die Lykopen in verschiedenen Konzentrationen enthalten (Kap. 3.3.3, S. 80). Im Vergleich dazu zeigt sich bei der Einlagerung von β -Carotin, Lutein und Zeaxanthin in ähnlichen Konzentrationen das für Carotinoide charakteristische Spektrum, dessen Hauptpeak lediglich um wenige nm in den langwelligen Bereich verschoben ist. Bereits während der Bildung der lykopenbeladenen Liposomen kann man die Entfärbung der Suspension beobachten.

Extrahiert man die Liposomen mit organischem Lösungsmittel, kann im Extrakt wieder Lykopen nachgewiesen werden. Der Effekt ist also nicht auf einen Abbau des Lykopins zurückzuführen. In Abhängigkeit von der Löslichkeit tendieren Carotinoide dahin, Aggregate zu bilden, ein Prozeß, der dazu führt, daß keine typischen Spektren mehr zu erhalten sind. Eine solche Aggregatbildung könnte den Beobachtungen zugrunde liegen. Im Gegensatz dazu steht, daß keine für die Aggregatbildung typischen Absorptionen im Bereich von 340 nm in den Spektren gefunden werden. Die Zusammensetzung der Membran hat ebenfalls Einfluß auf den oben beschriebenen Effekt. Wird Lykopen in Liposomen eingebaut, die ausschließlich gesättigte Fettsäuren enthalten, lassen sich zum einen größere Mengen einbauen, zum anderen werden typische Lykopinspektren erhalten. Es läßt sich vermuten, daß die Zusammensetzung der Membran Einfluß auf die Aggregatbildung hat.

4.8 Zusammensetzung der Membran und Eigenschaften der Liposomen

In Abhängigkeit von der Lipidzusammensetzung der Membran unterscheiden sich die Liposomen im Hinblick auf Größe und Beladungskapazität. Untersucht wurden Liposomen, die nur gesättigte Fettsäuren in der Membran enthalten (DPPC-Liposomen; Kap. 3.3.1, S. 70) und solche, die gesättigte und ungesättigte Fettsäuren enthalten (3-*sn*-Phosphatidylcholin-Liposomen; Kap. 3.2.3, S. 47). DPPC-Liposomen sind mit einem mittleren Durchmesser von 385 nm ca. 80 % größer als die 3-*sn*-Phosphatidylcholin-Liposomen (214 nm). Während der GSH-Beladungsgrad (20 µmol/mg Phospholipid) in 3-*sn*-Phosphatidylcholin-Liposomen von der Inkorporation verschiedener Carotinoide vollkommen unabhängig ist, beeinflussen Carotinoide den GSH-Inhalt von DPPC-Liposomen erheblich. In lykopinhaltigen Liposomen ist der GSH-Einbau mit 15 µmol/mg Phospholipid um 25 % vermindert verglichen mit den entsprechenden Kontrollen. Das Einlagern von Zeaxanthin in Membranen mit gesättigten Fettsäuren erhöht die GSH-Konzentration im Vesikelinneren um 15 % (23 µmol/mg Phospholipid) bei gleichzeitiger Verminderung der Liposomengröße um 11 %.

Eine mögliche Erklärung für die Variabilität in Größe und Inhalt in Abhängigkeit der eingelagerten Carotinoide ist die Membranbeschaffenheit. Im Vergleich zur Lipiddoppelschicht mit ungesättigten Fettsäuren ist die DPPC-Membran wesentlich rigider. Die Membran von 3-*sn*-Phosphatidylcholin verfügt über eine hohe Fluidität, die es möglich macht, kleinere Vesikel zu bilden, ohne daß die Membran bei der Präparation durchlässig wird oder reißt und nur Membranfragmente zurückbleiben. Durch diesen Mangel an Fluidität in DPPC-Liposomen kann die Einlagerung von Fremdmolekülen nicht „abgefedert“ werden und die Antwort des Systems sind veränderte den Gegebenheiten angepaßte physikalische Eigenschaften, wie z. B. die Beladungskapazität.

4.9 Einfluß von Zeaxanthin auf die physikalischen Eigenschaften der DPPC-Membran

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden hohe Konzentrationen von Zeaxanthin (7,7 nmol/mg Phospholipid), bzw. Lycopin (8 nmol/mg Phospholipid) in die aus gesättigten Fettsäuren bestehende DPPC-Membran eingelagert. Dabei konnte ein Unterschied zu den 3-*sn*-Phosphatidylcholin-Liposomen bezüglich des GSH-Einbaus und der Vesikelgröße

festgestellt werden (s. Kap. 3.3.1, S. 70). Zur Erzeugung der oxidativen Bedingungen wurden zwei radikalbildende Systeme zur Generierung von ionischen Radikalen verwendet (Xanthin/Xanthin-Oxidase und Ammoniumperoxodisulfat, s. Kap. 3.3.2, S. 73).

Die einstündige Inkubation von Kontroll- und Zeaxanthinliposomen mit unterschiedlichen Xanthin-Oxidasemengen bei 37°C bewirkt eine vergleichbare GSH-Abnahme im Vesikelinneren. Dagegen lassen sich bei 30°C antioxidative Effekte deutlich messen. Vergleicht man nun den Schutzeffekt der Xanthophylle mit Lykopen, so kann man feststellen, daß ein Einbau von Lykopen zunächst ebenfalls die GSH-Abnahme verlangsamt. Nach 30 min hingegen wird der Oxidationsprozeß beschleunigt und die Wirkung dieses Carotinoids auf das wasserlösliche GSH ist prooxidativ.

Wird Ammoniumperoxodisulfat bei 25°C zur Initiation der radikalischen Reaktionen verwendet, so beobachtet man bei Zeaxanthinliposomen eine ähnliche Wirkung wie bereits bei Einsatz der Xanthin-Oxidase als radikalgenerierendem System. GSH wird auch hier vor Oxidation vollständig geschützt. In Lykopenliposomen kann hier man trotz des GSH-Abbaus einen antioxidativen Effekt feststellen.

Aus diesen Beobachtungen läßt sich schließen, daß die Temperatur einen wesentlichen Einfluß auf den Effekt der Carotinoide hat. Bei niedriger Temperatur sind die antioxidativen Eigenschaften stärker. Dies kann mit einer geringeren Fluidität der Membran bei niedrigen Temperaturen in Verbindung stehen. Bei höherer Temperatur nimmt die Beweglichkeit der Membranmoleküle und damit der Grad der Unordnung stark zu. So kann es vermehrt zum Auftreten von „durchlässigen“ Stellen kommen, durch die die hydrophilen Radikale von einem wässrigen Kompartiment in das andere wechseln können. Gleichzeitig sind die Voraussetzungen für einen optimalen Schutz durch das Carotinoid nicht mehr gegeben.

Wie beobachtet, kann die GSH-Abnahme bei Raumtemperatur durch den Einbau von Zeaxanthin nahezu vollständig verhindert werden. Für diesen Effekt können zwei Gründe genannt werden. Zum einen könnte das eingelagerte Zeaxanthin unter den herrschenden Bedingungen seine optimale Schutzwirkung durch Interaktion mit dem Radikal selbst und dessen Neutralisation entfalten. Dabei ist zu berücksichtigen, daß, wie bereits in Kap. 4.1 (S. 101) näher dargelegt, beide Spezies, sowohl Carotinoid, als auch Radikal, über einen polaren Charakter verfügen. Dadurch kommt es zu einer besseren Schutzwirkung verglichen mit dem unpolaren Lykopen, das sich vollständig im Membraninneren befindet. Gegen eine solche Erklärung des beobachteten Effekts spricht jedoch die Tatsache, daß die Temperatur einen großen Einfluß auf die Carotinoidaktivität besitzt und außerhalb eines relativ engen Temperaturbereichs kein Unterschied zwischen Carotinoid- und Kontrollvesikeln gemessen

werden kann. So kann der unterschiedliche Effekt der Carotinoide auch rein physikalischer Natur sein. In Arbeiten von Gruszecki et al.^[17,18,140] wurde mit Hilfe von ESR-Spektroskopie gezeigt, daß im Gegensatz zu der Einlagerung von β -Carotin, Zeaxanthin die Beweglichkeit der Phosphatidylcholinmoleküle stark einschränkt. Die Rigidität der Membran nimmt zu und die Permeabilität für Ionen ab. Durch seinen phospholipidanalogen Aufbau (polare Endregion, unpolare Polyenkette) kann das Xanthophyll parallel zu den Phosphatidylcholinmolekülen in die Membran eingelagert werden und mit diesen in Wechselwirkung treten. Da Zeaxanthin einen kleineren Raum einnimmt als die Lipide, wirkt es somit als „Niete“ in der Lipiddoppelschicht. Als Folge ist die Durchlässigkeit der Membran für Ionen stark erschwert, wie im Fall der DPPC-zeaxanthinbeladenen Liposomen beobachtet.

4.10 Lutein und Zeaxanthin als Blaulichtfilter

Lutein und Zeaxanthin wurden in Liposomen, die ungesättigte und gesättigte Fettsäuren enthalten, eingelagert. Durch im Vesikelinnenraum befindliches Lucifer Gelb kann die Lichtdurchlässigkeit der Membran gemessen werden (s. Kap. 3.4.3, S. 92). Dabei ergab sich eine konzentrationsabhängige Blaulichtfilteraktivität der betreffenden Xanthophylle. Im Vergleich mit zusätzlich untersuchtem β -Carotin, bzw. Lycopin erwiesen sich Lutein und Zeaxanthin als wirksamerer Filter. In allen Fällen kann ein Grenzwert für die Lichtdurchlässigkeit annäherungsweise bestimmt werden, der auch bei sehr hohen Carotinoidkonzentrationen nicht unterschritten wird.

Die Tatsache, daß alle untersuchten Carotinoide eine Blaulichtfilteraktivität besitzen, läßt sich daraus ableiten, daß ihr Absorptionsmaximum im Bereich dieser Wellenlänge liegt. Dies zeigt sich durch die intensive rote bis gelbe Färbung der Stoffklasse. So hindern gefärbte Carotinoide blaues Licht aufgrund ihrer Eigenabsorption gleichermaßen am Durchdringen der Membran.

Bemerkenswert hingegen ist der Befund, daß Lutein und Zeaxanthin eine sehr viel stärkere Blaulichtfilteraktivität besitzen als β -Carotin und Lycopin. Ursache hierfür kann wiederum, wie im Fall der antioxidativen Wirkung, die unterschiedliche Membranorientierung sein. Um Licht effektiv absorbieren zu können, muß vom Absorbens eine bestimmte Position gegenüber dem Lichtvektor eingenommen werden. Die Position der Liposomen in der Suspension ist statistisch gestreut. Da Xanthophylle wegen ihrer polaren Gruppen die

Membran senkrecht durchspannen^[17,18], ist es ihnen möglich, eine parallele Anordnung einzunehmen. So ist die Wahrscheinlichkeit, daß der Lichtvektor auf ein für die Absorption ideal positioniertes Xanthophyllmolekül trifft, höher als dies die Membranorientierung von Lykopen und β -Carotin im Schichtinneren erwarten läßt. Die Abstufung der Filteraktivität von Lutein und Zeaxanthin kann durch die um eine Position verschobene Lage der Doppelbindung erklärt werden. Dadurch erhält Lutein die Möglichkeit zur freien Drehung um die Bindungsachse und kann somit eine gestreckte, wie auch gewinkelte Struktur einnehmen. Die Konsequenz ist eine Kombination aus senkrechter und waagerechter Membranorientierung, was eine vermehrte Lichtabsorption zur Folge hat.

Der beobachtete Synergismus von Lutein und Zeaxanthin kann somit, wie auch bei der lipidprotektiven Wirkung (Kap. 4.2, S. 103), durch eine optimale Kombination der unterschiedlichen Membranorientierungen erklärt werden.

5. Zusammenfassung

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden die antioxidativen Eigenschaften sowie die Blaulichtfilteraktivität von Carotinoiden in liposomalen Systemen untersucht. Dazu wurden zwei verschiedene Modelle etabliert. Zum quantitativen Vergleich der protektiven Wirkung von Antioxidantien wurde das einfachere System multilamellarer Liposomen verwendet. Um die Interaktion von hydrophilen und lipophilen Antioxidantien, bzw. die Lichtdurchlässigkeit carotinoidbeladener Membranen zu untersuchen, wurde das Modell der unilamellaren Liposomen etabliert.

- 1) Multilamellare Liposomen wurden mit Carotinoiden beladen. Die Exposition mit Peroxylradikalen erfolgte durch die Thermolyse von AMVN (2,2'-Azobis[2,4-dimethylvaleronitril]). Als Indikator der Lipidperoxidation wurde das gebildete Malondialdehyd als thiobarbitursäurereaktive Substanzen (TBARS) verwendet. In diesem System zeigte sich folgende Abstufung der antioxidativen Wirkung der untersuchten Antioxidantien: Lycopin > α -Tocopherol > α -Carotin > β -Cryptoxanthin > Zeaxanthin = β -Carotin > Lutein > Quercetin.

Es wurde eine synergistische antioxidative Wirkung von Carotinoidgemischen nachgewiesen. Hierbei zeigte sich, daß ein Synergismus für Lutein und Lycopin besteht und vermutlich mit der Orientierung dieser Carotinoide in der Lipidmembran zusammenhängt.

- 2) Unilamellare Liposomen wurden mit Carotinoiden in der Lipidphase und GSH in der wässrigen Phase beladen und die Interaktionen der Antioxidantien untersucht. Die Lipidperoxidation wurde wiederum mit AMVN induziert. In Anwesenheit von GSH war die Lipidperoxidation (TBARS-Bildung) im Vergleich zur Kontrolle auf die Hälfte verringert. In Abhängigkeit von der eingebauten Carotinoidmenge wurden antioxidative oder prooxidative Effekte gemessen. Es wurde ein optimales Mengenverhältnis Carotinoid/Membranlipid gefunden, welches den besten Schutz vor Oxidation bietet. Messungen der Carotinoidkonzentration in der Membran zeigten, daß die eingebaute Lycopinmenge im Gegensatz zu Lutein, α -Carotin und β -Carotin nahezu konstant bleibt.
- 3) Eingebaut in einer aus 3-*sn*-Phosphatidylcholin bestehenden Membran (enthält gesättigte und ungesättigte Fettsäuren) zeigten alle Carotinoide bis auf Lycopin das charakteristische Carotinoidspektrum. In Lipidmembranen aus 1,2-Dipalmitoyl-*sn*-Glycerophosphatidylcholin (enthält ausschließlich gesättigte Fettsäuren) inkorporiert, zeigte

Lykopen sein charakteristisches Spektrum. Dieser Effekt könnte auf unterschiedliche Aggregatbildungen zurückzuführen sein.

- 4) Im Modell unilamellarer Liposomen wurden Blaulichtfilteraktivitäten von Carotinoiden untersucht. Dazu wurden unilamellare Vesikel mit dem Fluoreszenzfarbstoff Lucifer Gelb und Carotinoiden beladen. Die Liposomen wurden mit Blaulicht (Wellenlänge: 426 nm) bestrahlt und die Fluoreszenzintensität (Wellenlänge: 545 nm) im Vergleich zu Kontrollen bestimmt. Insbesondere die in der Macula lutea vorkommenden Carotinoide Lutein und Zeaxanthin weisen eine ausgeprägte Blaulichtfilteraktivität auf (Maximum: 9 %, bzw. 17 % Fluoreszenz des Kontrollwerts). β -Carotin und Lykopen sind weniger aktiv (Maximum: 30 %, bzw. 55 % Fluoreszenz des Kontrollwerts). Eine Kombination aus Lutein und Zeaxanthin zeigte einen synergistischen Effekt in Bezug auf die Blaulichtfilteraktivität.

6. Literatur

- [1] Straub, O. (1987) Key to Carotenoids, 2nd ed. (Pfander, H. ed.) Birkhäuser, Basel.
- [2] Kull, D., and Pfander, H. (1995) in: Carotenoids: Isolation and Analysis (Britton, C., Liaaen-Jensen, S. und Pfander, H. eds.), Vol. 1A, 295-317, Birkhäuser, Basel.
- [3] Britton, G., Liaaen-Jensen, S., and Pfander, H. eds. (1995) in: Carotenoids: Isolation and Analysis, Vol. 1A, Birkhäuser, Basel.
- [4] Krinsky, N. I. (1979) Pure Appl. Chem. 51, 649-660.
- [5] Armstrong, G. A., and Hearst, J. E. (1996) FASEB J. 10, 228-237.
- [6] Olson, J. A. (1989) J. Nutr. 119, 105-108.
- [7] Ziegler, R. G., Subar, A. F., Craft, N. E., Ursin, G., Patterson, B. H., and Graubard, B. I. (1992) Canc. Res. 52, 2026-2066.
- [8] Block, G., Patterson, B., and Subar, A. (1992) Nutr. Cancer 18, 1-29.
- [9] Mayne, S. T. (1996) FASEB J. 10, 690-701.
- [10] Gerster, H. (1993) Int. J. Vit. Nutr. Res. 63, 93-121.
- [11] Krinsky, N. I. (1989) Free Rad. Biol. Med. 7, 617-635.
- [12] Krinsky, N. I. (1993) Ann. Rev. Nutr. 13, 561-587.
- [13] Olson, J. A., and Krinsky, N. I. (1995) FASEB J. 9, 1547-1550.
- [14] Isler, O. (1971) in: Carotenoids (Isler, O., ed.), Birkhäuser, Basel.
- [15] Gross, J. (1991) Pigments in vegetables, Van Nostrand Reinhold, New York.
- [16] Britton, G. (1995) FASEB J. 9, 1551-1558.
- [17] Gabrielska, J. and Gruszecki, W. I. (1996) Biochim. Biophys. Acta 1285, 167-174.
- [18] Subczynski, W. K., Markowska, E., Gruszecki, W. I., and Siewewiesiuk, F. (1992) Biochim. Biophys. Acta 1105, 97-108.
- [19] Braude, E., Jones, R. H., Koch, H. P., Richardson, R. W., Sondheimer, F., and Togod, J. B. (1949) J. Chem. Soc., 1890.
- [20] Britton, G. (1995) in: Carotenoids (Britton, G. Liaaen-Jensen, S., and Pfander, H., eds.) Birkhäuser, Basel, Vol 1B, 13-62.
- [21] Stahl, W., and Sies, H. (1994) Meth. Enzymol. 234, 388-400.
- [22] Frank, H. A., and Cogdell, R. J. (1993), in: Carotenoids in Photosynthesis (Young, A., and Britton, C., eds.), Chapman and Hall, London.

- [23] Baltschun, D., Beutner, S., Briviba, K., Martin, H.-D., Paust, J., Peters, M., Röver, S., Sies, H., Stahl, W., Steigel, A., and Stenhorst, F. (1997) *Liebigs Ann./Recueil*, 1887-1893.
- [24] Krinsky, N. I., and Deneke, S. M. (1982) *JNCI* 69, 205-210.
- [25] Truscott, T. G. (1990) *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* 6, 359-371.
- [26] Mortensen, A., and Skibsted, L. H. (1996) *Free Rad. Res.* 25, 515-523.
- [27] Simie, M. C. (1992) *Meth. Enzymol.* 213, 444-453.
- [28] Lafferty, J., Truscott, T. G., and Land, E. J. (1978) *J. Chem. Soc. Faraday Trans.I* 74, 2760-2762.
- [29] Yamamoto, Y., Haga, S., Niki, E., and Kamiya, Y. (1984) *Bull. Chem. Soc. Jpn.* 57, 1260-1264.
- [30] Packer, J. E., Mahood, J. S., Mora-Arellano, V. O., Slater, T. F., Willson, R. L., and Wolfenden, B. S. (1981) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 98, 901-906.
- [31] Mortensen, A., Skibsted, L. H., Sampson, J., Rice-Evans, C., Everett, S. A., (1997) *FEBS Lett.* 418, 91-97.
- [32] Palozza, P., and Krinsky, N. I. (1992) *Methods Enzymol.* 213, 103-120.
- [33] Liebler, D. C. (1993) *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 669, 20-31.
- [34] Burton, G. W., and Ingold, K. U. (1984) *Science* 224, 569-573.
- [35] Krinsky, N. I. (1988) *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 551, 17-33.
- [36] Kennedy, T. A., and Liebler, C. L. (1992) *J. Biol. Chem.* 267, 4658-4663.
- [37] Burton, G. W. (1989) *J. Nutr.* 119, 109-111.
- [38] Woodall, A. A., Lee, S. W., Weesie, R. J., Jackson, M. J., and Britton, G. (1997) *Biochim. Biophys. Acta* 1336, 33-42.
- [39] Sitte, P., Falk, H., and Liedvogel, B. (1980) in: *Pigments and Plants* (Czygan, F. C., ed.), 2nd ed., Gustav Fischer, Stuttgart, New York.
- [40] Chug-Ahuja, J. K., Holden, J. M., Forman, M. R., Mangels, A. R., Beecher, G. R., and Lanza, E. (1993) *J. Am. Diet Assoc.* 93, 318-323.
- [41] Scott, K. J., Thurnham, D. I., Hart, D. J., Bingham, S. A., and Day, K. (1996) *J. Nutr.* 75, 409-418.
- [42] Stahl, W., and Sies, H. (1999), in: *Antioxidant Food Supplements in Human Health* (Packer, L., Hiramatsu, M., Yoshikawa, T., eds.), Academic Press, London.
- [43] Khachik, F., Beecher, G. R., and Whittaker, F. N. (1986) *J. Agric. Food Chem.* 34, 603-616.
- [44] Khachik, F., Beecher, G. R., and Goli, M. B. (1991) *Pure Appl. Chem.* 63, 71-80.

- [45] Mangels, A. R., Holden, J. M., Beecher, G. R., Forman, M. R., Lanza, E. (1993) *J. Am. Diet Assoc.* 93, 284-296.
- [46] Kühlbrandt, W., Wang, D. N., and Fujiyoshi, Y. (1994) *Nature* 367, 614-621.
- [47] Young, A. J. (1993), in: *Carotenoids in Photosynthesis* (Young, A. J., and Britton, G., eds.), Chapman & Hall, London, 16-71.
- [48] de Pee, S., West, C. E. (1996) *Eur. J. Clin. Nutr.* 50, S38-S53.
- [49] Ollilainen, V., Heinonen, M., Linkola, E., Varo, P., and Koivistoinen, P. (1989) *J. Dairy Sci.* 72, 2257-2265.
- [50] Heinonen, M. (1991) *J. Vit. Nutr. Res.* 61, 3-9.
- [51] Bauernfeind, J. C. (1981) *Carotenoids as colorants and vitamin A precursors*, Academic Press, New York.
- [52] Williams, J. O. (1991), in: *Carotenoids as colorants and vitamin A precursors* (Bauernfeind, J. C. ed.), Academic Press, New York.
- [53] Erdman, J. W., Jr., Bierer, T. L., and Gugger, E. T. (1993) *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 691, 76-85.
- [54] Olson, J. A. (1994) *Pure Appl. Chem.* 66, 1011-1016.
- [55] Parker, R. S. (1996) *FASEB J.* 10, 542-551.
- [56] Castenmiller, J. J. M., West, C. E., Linssen, J. P. H., van het Hof, K. H., and Voragen, A. G. J., (1999) *J. Nutr.* 129, 349-355.
- [57] Stahl, W., and Sies, H. (1992) *J. Nutr.* 122, 2161-2166.
- [58] Gärtner, C., Stahl, W., and Sies, H. (1997) *Am. J. Clin. Nutr.* 66, 116-122.
- [59] Hemell, O., Staggars, J. E., and Carey, M. C. (1991) *Biochemistry* 29, 2041-2056.
- [60] Canfield, L. M., Fritz, T. A., and Tarara, T. E. (1990) *Methods Enzymol.* 189, 418-422.
- [61] El-Corab, M. I., Underwood, B. A., and Loerch, J. D. (1975) *Biochim. Biophys. Acta* 401, 265-277.
- [62] Hollander, D., and Ruble, P. E., Jr. (1978) *Am. J. Physiol.* 235, E686-E691.
- [63] Tso, P. (1994) in: *Physiology of the Gastrointestinal Tract* (Johnson, L. R., ed.), Raven Press, New York.
- [64] Rock, C. L., and Swendseid, M. E. (1992) *Am. J. Clin. Nutr.* 55, 96-99.
- [65] Weststrate, J. A., and van het Hof, K. H. (1995) *Am. J. Clin. Nutr.* 62, 591-597.
- [66] Micozzi, M. S., Brown, E. D., Edwards, B. K., Bieri, J. G., Taylor, P. R., Khachik, F., Beecher, G. R., and Smith, J. C., Jr. (1992) *Am. J. Clin. Nutr.* 55, 1120-1125.

- [67] White, W. S., Peck, K. M., Bierer, T. L., Gugger, E. T., and Erdman, J. W., Jr. (1993) *J. Nutr.* 123, 1405-1213.
- [68] White, W. S., Stacewicz-Sapuntzakis, M., Erdman, J. W., Jr., and Bowen, P. E. (1994) *J. Am. Coll. Nutr.* 13, 665-671.
- [69] Gugger, E. T., and Erdman, J. W., Jr. (1996) *J. Nutr.* 126, 1470-1474.
- [70] Reddy, P. P., Clevidence, B. A., Berlin, E., Taylor, P. R., Bieri, J. G., and Smith, J. C. (1989) *FASEB J.* 3, A955.
- [71] Clevidence, B. A., and Bieri, J. G. (1993) *Methods Enzymol.* 214, 33-46.
- [72] van Vliet, T., van Schaik, F., Schreurs, W. H. P., and van den Berg, H. (1996) *Internat. J. Vit. Nutr. Res.* 66, 77-85.
- [73] Tang, G., Wang, X. D., Russell, R. M., and Krinsky, N. I. (1991) *Biochemistry* 30, 9829-9834.
- [74] Wang, X. D. (1994) *J. Am. Coll. Nutr.* 13, 314-325.
- [75] Parker, R. S. (1996) 11th International Symposium on Carotenoids, Abstracts of Oral Presentations.
- [76] Poor, C. L., Bierer, T. L., Merchen, N. R., Fahey, G. C., Jr., Murphy, M. R. and Erdman, J. W. (1992) *J. Nutr.* 122, 262-268.
- [77] Wang, X. D., Krinsky, N. I., Marini, R. P., Tang, G., Yu, J., Hurley, R., Fox, J. G., and Russell, R. M. (1992) *Am. J. Physiol.* 263, G480-486.
- [78] White, W. S., Peck, K., Ulman, E. A., and Erdman, J. W. (1993) *J. Nutr.* 123, 1129-1139.
- [79] You, C. S., Parker, Goodman, K. J., Swanson, J. E., and Corso, T. N. (1996) *Am. J. Clin. Nutr.* 64, 177-183.
- [80] Sies, H. (1986), *Angew. Chem.* 98, 1061-1075.
- [81] Halliwell, (1996), *Angew. Chem.* 98, 1061-1075.
- [82] Diplock, A. T., Charleux, J.-L., Crozier-Willi, G., Kok, F.J., Rice-Evans, C., Roberfroid, M., Stahl, W. and Vina-Ribes, J. (1998) *British Journal of Nutrition* 80, 77-112
- [83] Polidori, M. C., Mecocci, P., Reimann, A (1999) *J. Am. Geriatr. Soc.* 47, 1038-1039.
- [84] Sies, H. (1991), *Am. J. Med.* 91, 31-38.
- [85] Diaz, M. N., Frei, B. Vita, J. A. and Keaney, J. F. Jr. (1997) *N. Engl. J. Med.* 337, 408-416.
- [86] Packer, J. E., Mahood, J. S., Mora-Arellano, V. O., Slater, T. F., Willson, R. L. and Wolfenden, B. S. (1981) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 98, 901-906.

- [87] Hill, T. J., Land, E. J., McGarvey, D. J., Schalch, W., Tinkler, J. H. and Truscott, T. G. (1995) *J. Am. Chem. Soc.* 117, 8322-8326.
- [88] Ziegler, R. G. (1989) *J. Nutr.* 119, 116-122.
- [89] Krinsky, N. I. (1994) in: *Natural Antioxidants in Human Health and Disease* (Frei, B. ed.), Academic Press, New York.
- [90] Sies, H. and Stahl, W. (1995) *Am. J. Clin. Nutr.* 62, 1315S-1321S.
- [91] Traber, M. G. and Sies, H. (1996) *Ann. Rev. Nutr.* 16, 321-347.
- [92] Giovannucci, E., Ascherio, A., Rimm, E. B., Stampfer, M. J., Colditz, G. A. and Willett, W. C. (1995) *J. Natl. Cancer Inst.* 87, 1767-1776.
- [93] Kohlmeier, L., Kark, J. D., Gomez-Gracia, E., Martin, B. C., Steck, S. E., Kardinaal, A. F., Ringstad, J., Thamm, M., Masaev, V., Riemersma, R., Martin-Moreno, J. M., Huttunen, J. K. and Kok, F. J. (1997) *Am. J. Epidemiol.* 146, 618-626.
- [94] Franceschi, S., Bidoli, E., La Vecchia, C., Talamini, R., D'Avanzo, B. and Negri, E. (1994) *Int. J. Cancer* 59 181-184.
- [95] Burney, P. G. J., Comstock, G. W. and Morris, J. S. (1989) *Am. J. Clin. Nutr.* 49, 895-900.
- [96] Helzsouer, K. J., Comstock, G. W. and Morris, J. S. (1989) *Cancer Res.* 49, 6144-6148.
- [97] VanEenwyk, J., Davis, F. G. and Bowen, P. E. (1991) *Int. J. Cancer* 48, 34-38.
- [98] Krinsky, N. I. (1989) *J. Nutr.* 119, 123-126.
- [99] Hall, A. K. (1996) *Anticancer-Drugs* 7, 312-320.
- [100] Levy, J., Bosin, E., Feldman, B., Giat, J., Miinister, A., Danilenko, M., and Sharoni, Y. (1995) *Nutr. Cancer* 24, 257-266.
- [101] Nagasawa, H., Mitamura, T., Sakamoto, S., and Yamamoto, K. (1995) *Anticancer Res.* 15, 1173-1178.
- [102] Sharoni, Y., Giron, E., Rise, M., and Levy, J. (1997) *Cancer Detect. Prevent.* 21, 118-123.
- [103] Alpha Tocopherol, beta carotene cancer prevention study group (ABTC) (1994) *N. Engl. J. Med.* 330, 1029-1035.
- [104] Omenn, G. S., Goodman, G. E., Thornquist, M. D., Balmes, J., Cullen, M. R., Glass, A., Keogh, J. P., Meyskens, F. L., Valanis, B., Williams, J. H., Bamhart, S., Cherniack, M. G., Brodin, C. A. and Hammar, S. (1996) *J. Natl. Cancer Inst.* 88, 1550-1558.

- [105] Pryor, W. A., Stahl, W. and Rock, C. L. (2000) *Nutr. Rev.* 58, 39-53.
- [106] Stahl, W. and Sies, H. (1998) *Int. J. Vitam. Nutr. Res.* 68, 354-359.
- [107] Levy, J., Karas, M., Amir, H., Giat, J., Danilenko, M., and Sharoni, Y. (1996) 11th International Symposium on Carotenoids, Abstracts of Oral Presentations.
- [108] Sharoni, Y., Karas, M., Amir, H., Giat, J., Danilenko, M., and Levy, J. (1996) 11th International Symposium on Carotenoids, Abstracts of Oral Presentations.
- [109] Wang, X. D. and Russell, R. M. (1999) *Nutr. Rev.* 57, 263-272.
- [110] Lowe, G. M., Booth, L. A., Young, A. J. and Bilton, R. F. (1999) *Free Rad. Res.* 30, 141-151.
- [111] Cook, N. R., Stampfer, M. J., Ma, J., Mason, J. E., Sacks, F. M., Burin, J. E. and Hennekens, C. H. (1999) *Cancer* 86, 1783-1792.
- [112] Howard, A. N., Williams, N. R., Palmer, C. R., Cambou, J. P., Evan, A. E., Foote, J. W., Marques-Vidal, P., McCrum, E. E., Ruidavets, J. B., Nigdikar, S. V., Rajput-Williams, J., and Thurnham, D. I. (1996) *J. Vit. Nutr. Res.* 66, 113-118.
- [113] Handelman, J., Dratz, E. A., Reay, C. C., and van Kujik, F. J. G. M. (1988) *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 29, 850-855.
- [114] Bone, R. A., Landrum, J. T., Hime, G. W., Cains, A., and Zamor, J. (1993) *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 34, 2033-3040.
- [115] Sommerburg, O., Siems, W. G., Hurst, J. S., Lewis, J. W., Kliger, D. S., and van Kuijk, F. J. G. M. (1999) *Curr. Eye Res.* 19, 491-495.
- [116] Landrum, J. T., Bone, R. A., and Kilburn, M. D. (1997), *Adv. Pharmacol.* 38, 537-556.
- [117] Schalch, W. (1999) *Nutrition* 23, 53-57.
- [118] Ham, W. T., and Mueller, W. A. (1989) in: *Laser Applications in Medicine and Biology* (Wolbarsht, M. L. ed.), Plenum Press, New York.
- [119] Delori, F. C., Dorey, C. K., Staurenghi, G., Arend, O., Goger, D. G., and Weiter, J. J. (1995) *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 36, 718-729.
- [120] Wihlmark, U., Wrigstad, A., Roberg, K., Nilson, S. E. G., and Brunk, U. T. (1997) *Free Radic. Biol. Med.* 22, 1229-1234.
- [121] Hammond, B. R., Wooten, B. R., and Snodderly, D. M. (1997) *Optom. Vis. Sci.* 74, 499-504.
- [122] Schalch, W., Dayhaw-Barker, P., and Barker, F. M. (1999) in: *Nutritional and Enviromental Influences on the Eye* (Taylor, A. ed.), CRC Press, Boca Raton.
- [123] Marshall, J. (1985) *Ophthalmic Physiol. Opt.* 5, 241-263.
- [124] Stone, W. L., Farnsworth, C.C., and Dratz, E. A. (1979) *Exp. Eye Res.* 28, 387-397.

- [125] Devasagayam, T. P. A., Ippendorf, H., Werner, T., Martin, H.-D., and Sies, H. (1992) in: *Lipid-soluble Antioxidants: Biochemistry and Clinical Applications* (Ong, A. S. H., Packer, L., eds.), Birkhäuser, Basel.
- [126] Conn, P. F., Schalch, W., and Truscott, G. T. (1991) *J. Photochem. Photobiol. B-Biology* 11, 41-47.
- [127] Snodderly, D. M. (1995) *Am. J. Clin. Nutr.* 62, 1448-1461.
- [128] Schalch, W. (1992) *EXS* 62, 280-298.
- [129] Mares-Perlman, J. A., Brady, W. E., Klein, B. E. K., Bowen, P. E., Stacewicz-Sapuntzakis, M., and Palta, M. (1995) *Arch. Ophthalmol.* 113, 1518-1523.
- [130] Sujak, A., Gabrielska, J., Grudzinski, W., Borc, R., Mazurek, P., and Gruszecki W. I. (1999) *Arch. Biochim. Biophys.* 371, 301-307.
- [131] Seddon, J. M., Ajani, U. A., Sperduto, R. D., Hiller, R., Blair, N., Burton, T C., Farber, M. D., Gragoudas, E. S., Haller, J., Miller, D. T., et al. (1994) *JAMA* 272, 1413-1420.
- [132] Sommerburg, O., Keunen, J. E., Bird, A. C., and van Kujik, F. J. (1998) *Br. J. Ophthalmol.* 82, 907-910.
- [133] Stryer, L. (1994) *Biochemie*, Spektrum Akad. Verl. GmbH, Heidelberg.
- [134] Beyer, H., Walter, W. (1991) *Lehrbuch der Organischen Chemie* 22. Aufl., Hirzel Verl., Stuttgart.
- [135] Mac Donald, R. C., Mac Donald, R. I., Menco, B. Ph. M., Takeshita, K., Subbarao, N. K. and Hu, L. (1991) *Biochim. Biophys. Acta* 1061, 297-303.
- [136] Lim, B. P., Nagao, A., Terao, J., Tanaka, K., Suzuki, T., and Takama, K. (1992) *Biochim. Biophys. Acta* 1126, 178-184.
- [137] Woodall, A. A., Britton, G., and Jackson, M. J. (1997) *Biochim. Biophys. Acta* 1336, 575-586.
- [138] Gruszecki, W. I., and Sielewiesiuk, J. (1990) *Biochim. Biophys. Acta* 1023, 405-412.
- [139] Strzalska, K., and Gruszecki, W. I. (1994) *Biochim. Biophys. Acta* 1194, 138-142.
- [140] Jezowska, I., Wolak, A., Gruszecki, W. I., and Strzalka, K. (1994) *Biochim. Biophys. Acta* 1194, 143-148.
- [141] Niki, E., Takahashi, M. and Komuro, E. (1986) *Chem. Lett.* 1573-1576.
- [142] Mihara, M., and Uchiyama, M. (1978) *Anal. Biochem.* 86, 271-278.
- [143] Stahl, W., Krauth-Siegel, R. L., Schirmer, R. H., and Eisenbrand G. (1987) *IARC Sci. Publ.* 84, 191-193.
- [144] Stahl, W., Sundquist, A. R., Hanusch, M., Schwarz, W., and Sies H. (1993) *Clin. Chem.* 39, 810-814.

- [145] Schwieter, U., Gutman, H., Lindlar, H., Marbert, N., Rigassi, N., Rüegg, R., Scaeren, S. F., and Isler, O. (1966) *Helv. Chim. Acta* 49, 369-390.
- [146] Stahl, W., Junghans, A., de Boer, B., Driomina, E. S., Briviba, K., and Sies, H. (1998) *FEBS Lett.* 427, 305-308.
- [147] Smith, D., O'Leavy, V. J., and Darley-USmar, V. M. (1993) *Biochem. Pharmacol.* 45, 2195-2201.
- [148] Miller, N. J., Sampson, J., Cadeias, L. P., Bramley, P. M., and Rice-Evans, C. A. (1996) *FEBS Lett.* 384, 240-242.
- [149] Liebler, D. C., Stratton, S. P., and Kaysen, K. L. (1997) *Arch. Biochem. Biophys.* 338, 244-250.
- [150] Woodall, A. A., Britton, G., and Jackson, M. J. (1997) *Biochim. Biophys. Acta* 1336, 575-586.
- [151] Palozza, P., and Krinsky, N. I. (1992) *Arch. Biochem. Biophys.* 297, 184-187.
- [152] Palozza, P. (1998) *Nutr. Rev.* 56, 257-265.
- [153] Baker, D. L., Krol, E. S., Jacobsen, N., and Liebler, D. C. (1999) *Chem. Res. Toxicol.* 12, 535-543.
- [154] Böhm, D. L., Tinkler, J. H., and Truscott, T. G. (1995) *Nat. Med.* 1, 98-99.
- [155] Chan, A. C. (1993) *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 71, 725-731.
- [156] Mukai, K., Kikuchi, S., and Urano, S. (1990) *Biochim. Biophys. Acta* 1035, 77-82.
- [157] Klebanov, G. I., Kapitanov, A. B., Teselkin, Yu. O., Babenkova, I. V., Zhambalova, B. A., Lyubitsky, O. B., Nesterova, O. A., Vasil'eva, O. V., Popov, I. N., Lewin, G., and Vladimirov, Yu. A. (1998) *Membr. Cell Biol.* 12, 287-300.
- [158] Obermüller-Jevic, U. C., Francz, P. I., Frank, J., Flaccus, A. and Biesalski, H. K. (1999) *FEBS Lett.* 460, 212-216.
- [159] Liebler, D. C., and McClure, T. D. (1996) *Chem. Res. Toxicol.* 9, 8-11.
- [160] Kikugawa, K., Hiramoto, K., Tomiyama, S., and Asano, Y. (1997) *FEBS Lett.* 404, 175-178.
- [161] Anguelova, T., and Warthesen, J. (2000) *J. Food Sci.* 65, 71-75.
- [162] Woodall, A. A., Lee, S. W., Weesie, R. J., Jackson, M. J., and Britton, G. (1997) *Biochim. Biophys. Acta* 1336, 33-42.
- [163] Conn, P. F., Lambert, C., Land, E. J., Schalch, W., and Truscott, T. G. (1992) *Free Rad. Res. Comms.* 16, 401-408.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich ganz herzlich bei allen bedanken, die mir während der Promotionszeit fachlich, wie auch privat zur Seite gestanden haben:

Herrn Prof. Dr. H. Sies und Herrn PD Dr. W. Stahl danke besonders ich für die Vergabe des interessanten Themas, für die wissenschaftliche Betreuung und vielfältigen Anregungen während der Anfertigung dieser Arbeit.

Ich möchte mich bei Herrn Prof. Dr. H.-D. Martin herzlich für die Übernahme des Koreferats und die fachliche Unterstützung, sowie das Interesse an dieser Arbeit bedanken.

Herrn Prof. Dr. W. Hamel danke ich herzlich für die im Rahmen des Rigorosums gewährten Einblicke in die Betriebswirtschaftslehre sowie die interessanten Exkursionen.

Ein besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. R. Kahl und Herrn Prof. Dr. H. M. Bolt, die stets ein offenes Ohr für mich hatten, für die Unterstützung und ihre Hilfsbereitschaft.

Der DFG danke ich für die Förderung im Rahmen des Graduiertenkollegs Toxikologie.

Frau Prof. Dr. V. Kolb-Bachofen danke ich für die Bereitstellung des Elektronenmikroskops.

Bei Frau A. Borchardt und Frau M. Turken bedanke ich mich für die Aufnahme und Entwicklung der elektronenmikroskopischen Bilder.

Herrn Dr. H. Possel danke ich für die Aufnahme und Auswertung der fluoreszenzmikroskopischen Bilder.

Frau H. Krahel danke ich herzlich für die Carotinoidmessungen, die meine Arbeit erleichterten.

Bedanken möchte ich mich ferner bei Herrn Dr. G. Wagner und Herrn Dipl. chem. J. Schmitz für die zahlreichen Diskussionen und ihre Ermunterungen.

Ich danke allen Kollegen der Arbeitsgruppe Carotinoide für die gute Zusammenarbeit, viele interessante, wie auch aufbauende Gespräche und das mir entgegengebrachte Vertrauen.

Ein ganz besonderer Dank gilt Herrn Dipl. chem. O. Eichler für seine ständige Hilfsbereitschaft, die vielen Stunden des Beistands im Labor, wie auch privat. Viele Diskussionen ermöglichten mir eine neue Sichtweise besonders hartnäckiger Probleme und bestärkten mich.

Zum Schluß möchte ich mich herzlich bei meinen Eltern, meiner Großmutter und Herrn Dr. Th. Badautsek für ihre vielfältige Unterstützung in jedem Bereich bedanken. Sie ermöglichten mir mein Studium und diese Arbeit.

Wer Wind sät, wird Sturm ernten.

(Hosea 8,7)

Hiermit versichere ich, daß ich meine Disseration eigenständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und diese in der vorgelegten Form oder in ähnlicher Form noch keiner anderen Institution eingereicht habe.