

Photoprotektion der Haut durch Carotinoide

INAUGURAL-DISSERTATION

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

**vorgelegt von
Olaf Eichler
aus Gießen**

Düsseldorf, Dezember 2000

**„Lerne die Zeichen zu erkennen
und folge ihnen“,
hatte der alte König gesagt.**

(Paulo Coelho • Der Alchimist)

1. EINLEITUNG	1
1.1. DIE HAUT	3
1.1.1. Anatomie der Haut	3
1.1.2. Schädigung der Haut durch ultraviolette Strahlung	4
1.1.3. Sonnenschutzmechanismen der Haut	5
1.2. CAROTINOIDE.....	7
1.2.2. Photooxidativer Streß und Reaktivität der Carotinoide.....	8
1.2.3. In vivo Studien zum UV-Schutz von Carotinoiden	13
1.2.4. Carotinoide in Blut und Haut.....	14
1.2.5. Mögliche Krankheitsprävention durch Carotinoide	16
1.3. PROBLEMSTELLUNG.....	18
2. MATERIAL UND METHODEN	19
2.1. MATERIAL UND GERÄTE.....	19
2.1.1. Chemikalien und Lösungsmittel	19
2.1.2. Medien, Lösungen und Materialien für die Zellkultur	19
2.1.3. Zellen.....	20
2.1.4. HPLC-Analytik.....	20
2.1.5. UV/VIS Spektroskopie	20
2.1.6. Sonstige Geräte	20
2.2. METHODEN	21
2.2.1. Carotinoidarbeitslösungen.....	21
2.2.2. Analyse der Carotinoide im Serum [66]	22
2.2.3. Analyse von thiobarbitursäurereaktiven Substanzen (TBARS) [102].....	22
2.2.4. Multilamellare Liposomen	23
2.2.5. Proteinbestimmung [103].....	24
2.3. ZELLKULTUR.....	24
2.3.1. Stammhaltung und Anzucht der Zellen.....	24
2.3.2. Einfrieren von Zellen.....	24
2.3.3. Induktion der Lipidperoxidation durch Bestrahlung mit UVB-Licht.....	25
2.3.4. LDH-Toxizitätstest.....	25
2.4. INTERVENTIONSSTUDIEN	27
2.4.1. Probandenauswahl.....	27
2.4.2. Supplementierung in der Studie II.....	27
2.4.3. Supplementierung in der Studie III	28
2.4.4. Erytheminduktion und Messung der Hautfarbe	28
2.4.5. Reflektionsspektroskopie [85].....	29
2.4.6. Statistik.....	30

3. ERGEBNISSE	31
3.1. NICHT-ENZYMATISCHE ANTIOXIDANTIEN IM BLUTSERUM	31
3.1.1. Häufigkeitsverteilungen lipophiler und hydrophiler Antioxidantien im Blutserum.....	31
3.1.2. Mittelwerte lipophiler und hydrophiler Antioxidantien im Blutserum: geschlechtsspezifische und alters- bzw. regionspezifische Unterschiede.....	37
3.1.3. Gegenseitige Abhängigkeiten lipophiler und hydrophiler Antioxidantien, sowie der Lipide, des Eisengehalts im Serum.....	46
3.2. UV-INDUZIERTER LIPIDPEROXIDATION IN HUMANEN HAUTFIBROBLASTEN	52
3.2.1. Beschreibung des Hautfibroblastenmodellsystems zur Untersuchung UV-induzierter Lipidperoxidation.....	52
3.2.1. Konzentrationsabhängigkeit der photoprotektiven Wirkung einzelner Carotinoide.....	55
3.2.2. UV-Schutz der Zelle durch Kombinationen verschiedener Carotinoide.....	60
3.3. CAROTINOIDE ALS ORALE SONNENSCHUTZMITTEL IN INTERVENTIONSSTUDIEN.....	66
3.3.1. Verminderung der Intensität der Erythembildung durch erhöhten Verzehr von Tomatenmark und Olivenöl (Studie II).....	67
3.3.2. Vergleich eines β -Carotinsupplementes mit einer Carotinoidkombination aus Lutein, Lycopin und β -Carotin in ihrer Wirkung als oraler Sonnenschutz (Studie III).....	74
4. DISKUSSION	83
4.1. CAROTINOIDE IM BLUT	83
4.1.1. Das Carotinoidprofil im Blutserum: Studie I, Studien II u. III im Vergleich zu anderen Studien	83
4.1.2. Vergleich der Korrelationen der Carotinoidkonzentrationen im Serum der Studien I, II u. III mit anderen Studien	87
4.2. SCHUTZWIRKUNGEN DER CAROTINOIDE GEGEN PHOTOOXIDATIVEN STREß.....	88
4.2.1. Das Hautfibroblastenmodell	88
4.2.2. Hypothese zum photoprotektiven Wirkungsmechanismus der Carotinoide.....	88
4.3. SYSTEMISCHE PROTEKTION VOR UV-INDUZIERTEM ERYTHEM	91
4.3.1. Lycopin in Form von Tomatenmark als orales Sonnenschutzmittel.....	91
4.3.2. Diskussion der Studie III.....	92
4.3.2. Mögliche Schlußfolgerungen aus Teilergebnissen der Studie III	94
4.4. ALLGEMEINES ZUM PHOTOPROTEKTIVEN EFFEKT DER CAROTINOIDE.....	95
5. ZUSAMMENFASSUNG.....	97
6. LITERATUR	98

Abkürzungen

BHT	2,6-Di-tertiär-butyl-4-methylphenol
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Deoxyribonucleic acid = Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylen-diamin-tetra-acetat
EPP	erythroetischer Protoporphyrin
FCS	fetal calf serum = Fötales Kälber Serum
HBSS	Hanks' Balanced Salt Solution
HDL	high density lipoprotein
HPLC	high performance liquid chromatography = Hochleistungs Flüssigkeitschromatographie
LDH	Lactatdehydrogenase
LDL	low density lipoprotein
MDA	Malondialdehyd
MED	Minimale Erythemdosis
NADH	Dihydro-nicotinamid-adenin-dinukleotid
ROS	reactive oxygen species = Reaktive Sauerstoffverbindungen
TBA	Thiobarbitursäure
TBARS	thiobarbitursäurereaktive Substanzen
UV	ultraviolett
VLDL	very low density lipoprotein

1. Einleitung

Akute und chronische Sonnenlichtexposition haben pathologische Folgen für die Haut. Insbesondere die Exposition gegenüber der energiereichen ultravioletten Strahlung im Sonnenlichtspektrum wird mit einer Reihe von negativen Effekten für die Haut, wie Photoalterung, Photocancerogenese, Photoallergie, verschiedene Photodermatosen, Phototoxizität und der Verschlechterung bereits existierender Hauterkrankungen, in Verbindung gebracht.

Photooxidativer Streß ist ein biochemischer Mechanismus, mit dem sich die cytotoxischen und cancerogenen Effekte des Sonnenlichts erklären lassen. Unter anderem führt dabei die Lichtabsorption von endogenen Biomolekülen zur Erzeugung reaktiver Sauerstoffverbindungen (ROS = reactive oxygen species).

Gegen Prooxidantien gibt es in biologischen Systemen eine Reihe von antioxidativ wirkenden Verteidigungsmechanismen, zu denen die enzymatischen und die nicht-enzymatischen Antioxidantien gehören. Zu den wesentlichen enzymatischen Antioxidantien einer Zelle zählen z.B. die Superoxiddismutase (Abfangen von $O_2^{\cdot-}$), die Katalase (Reduktion von H_2O_2) und die Glutathionperoxidasen (Reduktion von organischen Hydroperoxiden: ROOH). Die nicht-enzymatischen Antioxidantien sind eine Gruppe von Verbindungen mit niedrigem Molekulargewicht wie z.B. die Carotinoide. Carotinoide inaktivieren z.B. den bei photooxidativem Streß entstehenden Singulett-Sauerstoff oder/und reagieren chemisch mit ROS oder freien Radikalen. Folgereaktionen führen zu inaktivierten Molekülen, die nicht mehr prooxidativ wirken [1].

Es gibt wasserlösliche (hydrophile) und fettlösliche (lipophile) Antioxidantien. Vitamin C (Ascorbinsäure) und Glutathion gehören zu den hydrophilen nicht-enzymatischen Antioxidantien. Vitamin E (Tocopherole) und die Substanzklasse der Carotinoide zählen zu den lipophilen nicht-enzymatischen Antioxidantien (Abbildung 1).

Speziell aufgrund der im Vergleich zu anderen Antioxidantien deutlich höheren bimolekularen Reaktionskonstante der Singulett-Sauerstoffinaktivierung (Tabelle 1, Kapitel 1.1.3., Seite 6) [2] und der hohen möglichen Hautkonzentration bei Supplementierung (bis zur Carotinodermie), wurden Carotinoide erfolgreich zur Behandlung von erythropoetischer Protoporphyrinurie (EPP) [3] eingesetzt. Die Symptome der EPP sind vermutlich das Ergebnis

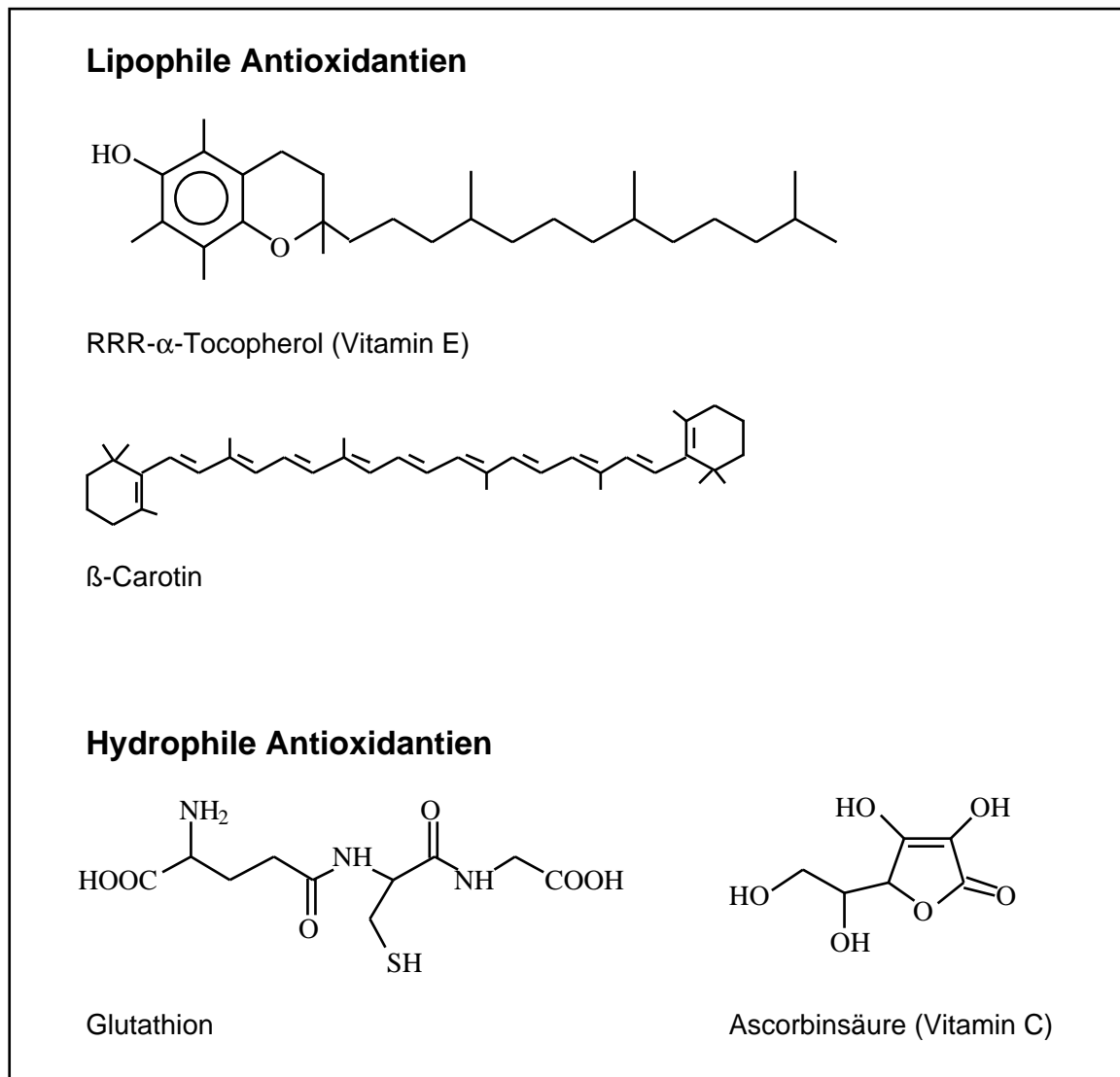


Abbildung 1: Lipophile und hydrophile nicht-enzymatische Antioxidantien. β -Carotin steht hier als Vertreter der Substanzklasse der Carotinoide.

der Photoanregung von Protoporphyrin und darauf folgender Bildung von Singulett-Sauerstoff und/oder freien Radikalen [4].

Während man sich beim Sonnenbaden leicht gegen die negativen Folgen der UV-Strahlung (z.B. UV-Erythem, Hautkrebs) durch Anwendung eines topischen Sonnenschutzmittels schützen kann, ist dieses für die vielen kurzen Sonnenexpositionen kaum praktikabel. Hier stellt sich die Frage, ob eine Prävention der oben beschriebenen Hautschäden auf systemischem Wege durch eine allgemeine Ernährungsempfehlung für die Bevölkerung oder durch Supplementierung zu erreichen ist. Eine Lichtschutzwirkung für den gesunden

Menschen durch Supplementierung mit β -Carotin ist in Interventionsstudien gezeigt worden [5-9]. Für andere Carotinoide ist eine solche Schutzwirkung in Interventionsstudien noch nicht erforscht worden. Auch existieren nur wenige Daten über den Einfluß von Carotinoiden auf den photooxidativen Streß in humanen Hautzellkulturen.

1.1. Die Haut

1.1.1. Anatomie der Haut

Man unterscheidet mehrere strukturelle Bereiche der Haut. Das *Stratum corneum*, oder auch die Hornhaut, ist die oberste Schicht der Epidermis und besteht aus abgestorbenen Hautzellen, die einen mechanischen Schutzwall darstellen. Die restliche Epidermis besteht zu 90% aus Keratinozyten. Wichtige mit Spezialfunktionen ausgestattete Zelltypen der Epidermis sind die dendritischen Melanozyten, Langerhanszellen und die Merkelzellen (Druckrezeptoren). Das *Korium* (Dermis, Lederhaut) besteht überwiegend aus von den Fibrozyten gebildeten

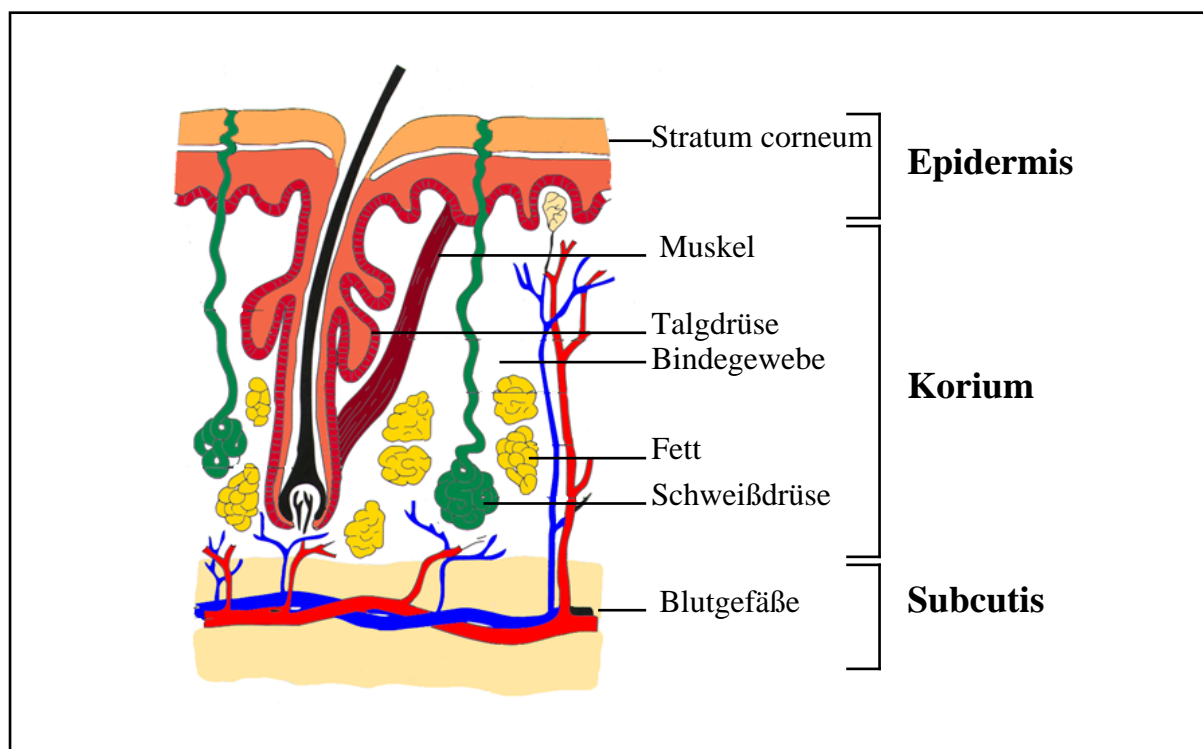


Abbildung 2: Struktur der Haut [10].

Kollagenfasern und verleiht der Haut ihre Zugfestigkeit und Dehnbarkeit. Die Lederhaut ist mit der Epidermis durch Papillen verzahnt. Hier liegen die meisten Hautsinnesorgane und sowohl die Schweiß-, als auch die Talgdrüsen der Haut. Im Gegensatz zur Epidermis verfügt die Lederhaut über Blutgefäße. Die *Subcutis* (Unterhaut) besteht aus lockerem fettgewebsreichen Bindegewebe [10, 11] (Abbildung 2; Seite 3).

1.1.2. Schädigung der Haut durch ultraviolette Strahlung

Das ultraviolette Licht ist nur ein kleiner Teil des Sonnenlichtspektrums. Dieses energiereiche Licht wird in drei Bereiche UVA-Licht (315-380 nm), UVB-Licht (280-315 nm) und UVC-Licht (200-280 nm) unterteilt. Da die Ozonschicht der Stratosphäre UVC-Licht komplett absorbiert, ist es physiologisch von geringer Bedeutung. UVC-Strahlung führt in hohem Maße zu schädigenden DNA- und Proteinmodifikationen. Die DNA-Modifikationen können zu DNA-Mutationen führen, die das initiale Ereignis für Krebs sein können. Daher wird in Zukunft durch das Ozonloch auf der Südhalbkugel dort ein Anstieg der Hautkrebsrate für möglich gehalten [12].

95% der die Erdoberfläche erreichenden UV-Strahlung ist UVA-Strahlung. UVA-Licht induziert ein verzögertes Erythem, das sein langanhaltendes Maximum erst bis zu 24 Stunden nach UVA-Exposition erreicht [13]. Im Fall von UVA-Licht wird die Beteiligung der ROS vermutet, weil die Bildung dieses Erythems sauerstoffabhängig ist. Da UVA-Licht weniger effektiv absorbiert wird als UVB- und UVC-Licht, kann es tiefer in die Haut, bis in die Dermis hinein, eindringen [14]. Chronische Schädigungen der Haut durch UVA-Licht führen zu Veränderungen der elastischen Kollagenfasern des Koriums. Zellen der Schweiß- und Talgdrüsen werden ebenfalls geschädigt, und die Blutversorgung verschlechtert sich. Dies alles führt zu einer trockenen, spröden und faltigen Haut [15; S. 88-90].

Ein akuter Sonnenbrand ist das direkteste und bekannteste Zeichen einer UVB-Überexposition. Er ist das Resultat kumulierter Hautzellschädigungen, die zum Absterben der Zellen führen. Die Hautrötung (Erythem) entwickelt sich nach einigen Stunden und erreicht nach 8 Stunden ihr Maximum [4].

Die zellphysiologischen Mechanismen, durch welche UVA- und UVB-Strahlung pathologische Effekte in der Haut erzielen, unterscheiden sich. UVB-Licht schädigt zelluläre

Strukturen, wie Proteine und DNA, hauptsächlich direkt [16, 17], was weiterreichende Folgen haben kann. Sind z.B. die direkten DNA-Schädigungen, wie Oxidation, Strangbruch und Thymidindimerisierung, weder letal für die Zelle, noch durch DNA-Reparatursysteme beseitigt worden, kann durch Akkumulation von Mutationen in den Stammzellen der Epidermis Hautkrebs entstehen [18]. Die cytotoxischen und cancerogenen Effekte von UVA-Licht in der Haut, welches weniger von DNA und Proteinen absorbiert wird, sind indirekt, sauerstoffabhängig und involvieren die Bildung von ROS [19]. UVA-Licht bewirkt auch die Freisetzung von Eisen aus Ferritin, was wiederum die Bildung freier Radikale katalysiert [20]. Die Effekte von UVA-Strahlung scheinen dabei insbesondere durch exogen zugeführte, aber auch endogene Photosensibilatoren, wie Flavine [21], Ubichinon, Porphyrine und NADH [21, 22], vermittelt zu werden. Mit dem in Kapitel 1.2.2. (Seite 7) erläuterten molekularen Mechanismus des photooxidativen Stresses läßt sich die indirekte hautschädigende Wirkung von UVA-Licht erklären.

Darüber hinaus werden durch UV-Strahlung wichtige enzymatische Antioxidantien inaktiviert (Katalase, Superoxiddismutase und Glutathionperoxidase [23-25]) und nicht-enzymatische Antioxidantien, wie α -Tocopherol, Vitamin C und Carotinoide zerstört [23, 26].

1.1.3. Sonnenschutzmechanismen der Haut

Ein sichtbarer Schutzmechanismus der Haut gegen UV-Strahlung ist die Bräunung. Dabei unterscheidet man zwischen direkter und indirekter Bräunung. UVA-Bestrahlung ruft die direkte Bräunung durch Photooxidation von bereits in die Epidermis eingelagerten Melaninvorstufen hervor. UVB-Licht löst die indirekte Bräunung aus, die erst etwa 24 Stunden nach UV-Exposition sichtbar wird und Folge der Melanineusynthese in den Melanosomen ist. Bei Farbigen sind die Melanosomen deutlich größer als bei Hellhäutigen. Melanin absorbiert nicht nur UV-Strahlung, sondern auch sichtbares Licht, was sich als Bräunung (induzierte Melaninproduktion), bzw. Hautfarbe oder Hauttyp (genetisch determinierte Melaninproduktion) zeigt.

Der zweite Schutzmechanismus der Haut ist die Möglichkeit, die Hornschicht (Stratum corneum) zu verdicken. Dieser Schutzwall aus abgestorbenen Zellen absorbiert, streut und reflektiert UV-Strahlung. Ein wichtiger weiterer zellulärer Schutzmechanismus der Haut ist,

neben der DNA-Reparatur durch spezielle UV-induzierte Enzyme [15 S. 51], die Apoptose, durch die stark geschädigte Zellen eliminiert werden [27].

Bei chronischer Sonnenlichtexposition werden Verteidigungsenzyme gegen oxidativen Streß (Hämoxygenase-1, Superoxiddismutase [28, 29]) der Hautzellen hochreguliert.

Die nicht-enzymatischen Antioxidantien gehören zum Abwehrsystem der Zelle gegen oxidativen Streß. Besonders die Carotinoide sind von den nicht-enzymatischen Antioxidantien aufgrund ihrer Eigenschaft effektive Singulett-sauerstoffinaktivatoren zu sein, geeignet, die oben beschriebenen sauerstoffabhängigen Schädigungen der UVA-Strahlung zu vermindern (Tabelle 1). Darüber hinaus können Carotinoide auch chemisch mit anderen bei UV-Strahlung gebildeten ROS oder freien Radikalen reagieren [30]. Folgereaktionen führen zu neutralen Molekülen, die in der Zelle nicht mehr prooxidativ wirken. Desweiteren lagern sich Carotinoide in die Haut ein, wobei bei hoher Carotinoidzufuhr eine Verfärbung der Haut beobachtet wird (Carotinodermie).

Tabelle 1: Bimolekulare Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten von Singulett-sauerstoff mit ausgewählten nicht-enzymatischen Antioxidantien (nach:[2]).

	[mol l ⁻¹ s ⁻¹]
RRR- α -Tocopherol	8 x 10 ⁷
L-Ascorbat	1 x 10 ⁷
β -Carotin	5 x 10 ⁹
Lycopin	9 x 10 ⁹

1.2. Carotinoide

Auffällig sind die in der Natur fast allgegenwärtigen Carotinoide vor allem als gelb bis rote Farbpigmente von Obst und Gemüse (Mais, Tomaten, Karotten und Zitrusfrüchte). Carotinoide besitzen aber auch die Eigenschaft, als nicht-enzymatische Antioxidantien zu wirken. Diese wird als Erklärung für den in epidemiologischen Studien gefundenen Zusammenhang zwischen hohem Verzehr von Obst und Gemüse und dem geringeren Risiko an bestimmten Krebsarten und/oder degenerativen Krankheiten zu erkranken, diskutiert [31-33].

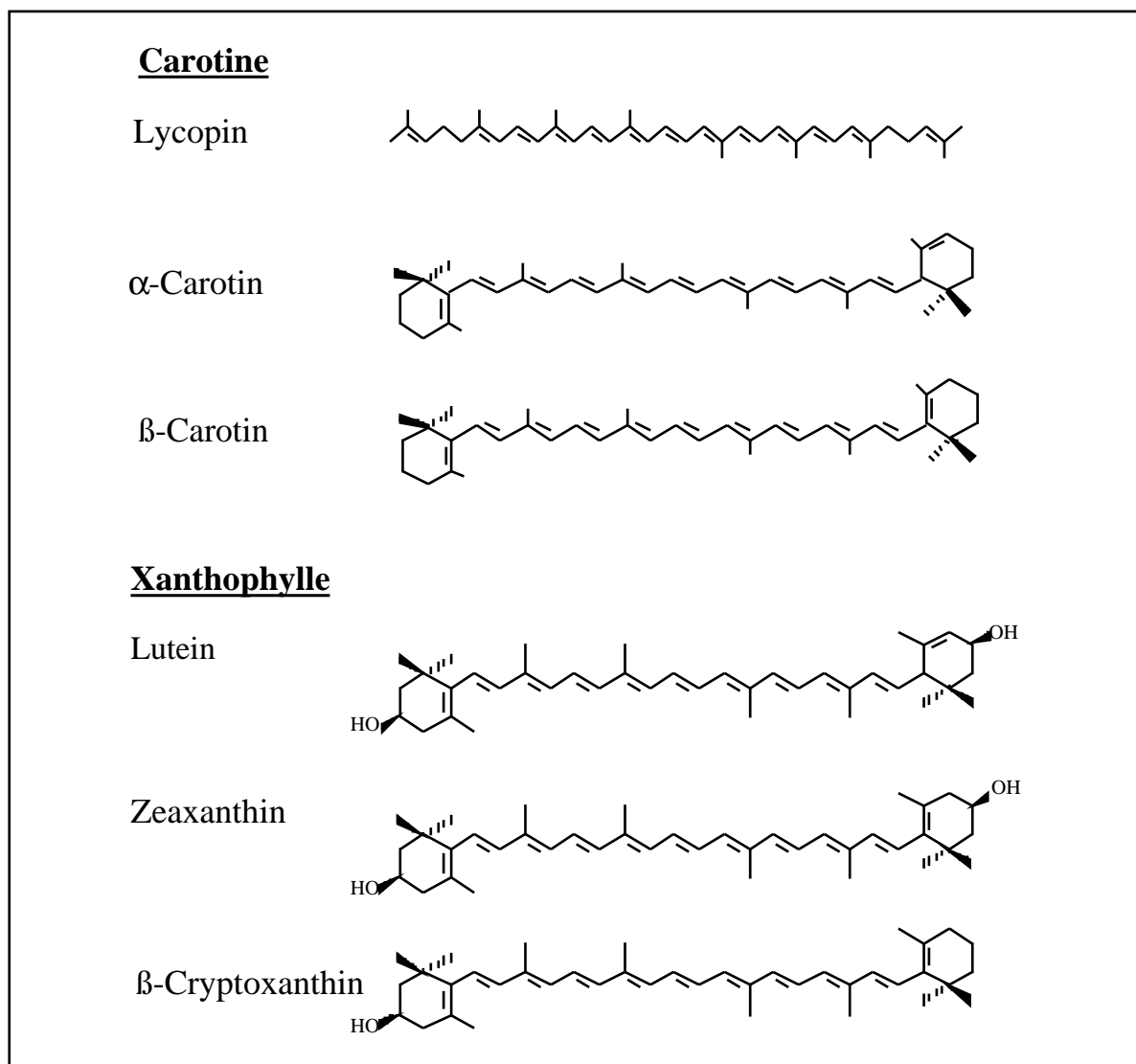


Abbildung 3: Die Hauptcarotinoide im Blut des Menschen.

Charakteristisch für Carotinoide ist ihre lange Polyenkette. Vom Lycopin lassen sich alle anderen Carotinoide durch Modifikationen an einem oder beiden Enden des Moleküls, wie Cyclisierungen und Einführung von Sauerstofffunktionen, ableiten [34]. *Trans*-Isomere der Carotinoide sind in der Regel häufiger in der Natur zu finden als *cis*-Isomere [35]. Da Carotinoide extrem hydrophob sind, findet man sie in lipophilen Kompartimenten des Organismus wie Biomembranen, im Inneren von Lipoproteinen oder assoziiert an hydrophobe Bereiche von Proteinen [34, 36, 37]. Die Stoffklasse der Carotinoide teilt sich in zwei Untergruppen. Reine Kohlenwasserstoffmoleküle werden den Carotinen zugeordnet, während die Xanthophylle [38] (auch Oxocarotinoide) mindestens ein weiteres Sauerstoffatom enthalten (Abbildung 3, Seite 7). Die häufigsten Funktionen sind Hydroxy-, Oxo-, Epoxy- und Estergruppen [39]. Durch den Einbau eines oder mehrerer Sauerstoffatome sind die Xanthophylle weniger lipophil als die Carotine. Die unterschiedliche Lipophilie der Carotine und Xanthophylle beeinflusst ihr Löseverhalten in organischen Lösemitteln und möglicherweise auch ihre Ausrichtung in Membranen [34, 40, 41].

1.2.2. Photooxidativer Streß und Reaktivität der Carotinoide

Die Funktionen der Carotinoide werden durch ihre physikalischen und chemischen Eigenschaften bestimmt. Das strukturelle Hauptmerkmal der Carotinoide ist ihr Isoprenoidgrundgerüst. Dieses bildet mit seinen alternierenden Doppel- und Einfachbindungen ein ausgedehntes π -System delokalisierter Elektronen. Die Energiedifferenz zwischen besetzten π -Orbitalen und unbesetzten π^* -Orbitalen ist im Vergleich zur isolierten Doppelbindung verringert. Als Folge liegt die Absorptionsbande für $\pi \rightarrow \pi^*$ -Übergänge der Carotinoide im sichtbaren Wellenlängenbereich bei ca. 450 nm. Drei eng beieinander liegende intensive Absorptionsbanden (S_2 , S_1 , T_1) sind für Carotinoide charakteristisch [34, 42]. Aus diesem Grund erscheinen sie gelb, orange bis rot.

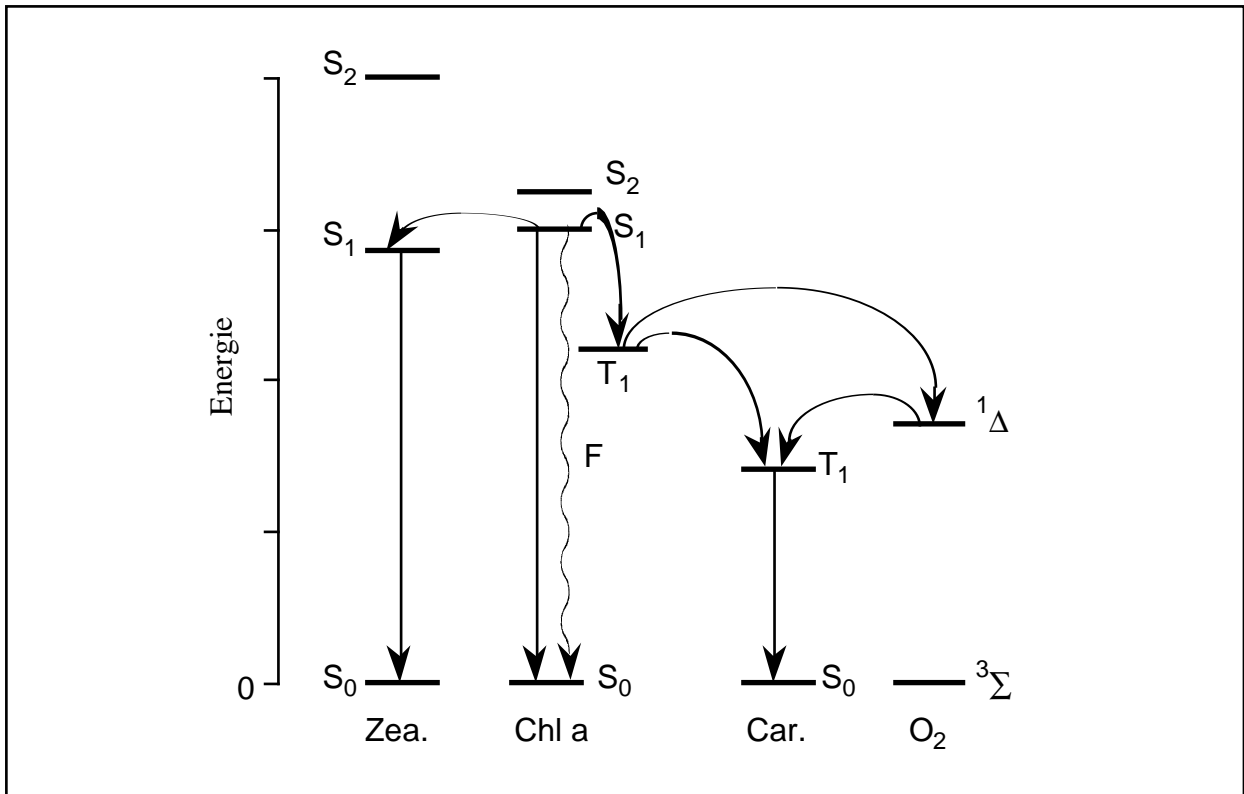


Abbildung 4: Schematische Zeichnung der photoprotektiven Funktion der Carotinoide in den Chloroplasten. Energietransfers vom Singulett-Sauerstoff ($^1\Delta$) und vom Chlorophyll im Triplettzustand (T_1) des Chlorophyllmoleküls (Chl a) auf verschiedene Carotinoide (Car.), sowie vom Chlorophyll im angeregten Singulettzustand (S_1) auf Zeaxanthin (Zea.) sind möglich. Die Singulettanregungszustände der Carotinoide (Car.) und der Triplettzustand von Zeaxanthin (Zea.) werden nicht gezeigt. F = Fluoreszenz (Abbildung leicht modifiziert aus [43] übernommen).

In der Natur wird diese photochemische Eigenschaft z.B. im Lichtsammelkomplex der Chloroplasten genutzt. Durch Licht angeregte Carotinoide (S_2) übertragen die absorbierte Energie auf das Chlorophyll [44]. Diese Energie wird anschließend zur Photosynthese genutzt. Carotinoide sammeln in diesem Fall Licht in einem Spektralbereich, der dem Chlorophyll sonst nicht zugänglich wäre. Doch nicht nur die Lichtsammlung ist Folge der photochemischen Eigenschaften der Carotinoide, sondern auch der Lichtschutz (Abbildung 4). Bei Lichtüberschuß bildet sich vermehrt angeregtes Chlorophyll im Triplettzustand, welches seine Anregungsenergie auf Sauerstoff übertragen kann. Es entsteht Singulett-Sauerstoff, der zu oxidativen Modifikationen an Proteinen, Lipiden und DNA in den

Chloroplasten führen kann. Chlorophyll wirkt in diesem Fall als Photosensibilisator. Nach dem Mechanismus des photooxidativen Stresses (Abbildung 5) gibt es zwei Möglichkeiten der Reaktion eines angeregten Photosensibilisators. Die Typ I-Reaktionen sind ein direkter Elektronen- oder Wasserstofftransfer zwischen Photosensibilisator und Substrat, dabei entstehen Radikale. Bei der Typ II-Reaktion erzeugt der Photosensibilisator Singulett-Sauerstoff.

Die unter diesen prooxidativen Bedingungen vermehrte Modifizierung von Proteinen oder Lipiden kann z.B. cytotoxische Folgen haben. So kann z.B. die Oxidation von Proteinen ihre Struktur beeinflussen, so daß diese Proteine ihre Funktion verlieren. Oxidation der Lipide kann zum Verlust der Membranintegrität der Zelle führen. DNA-Modifizierungen können DNA-Mutationen als Folge haben, die das initiale Ereignis der Tumorgenese sein können [45-48].

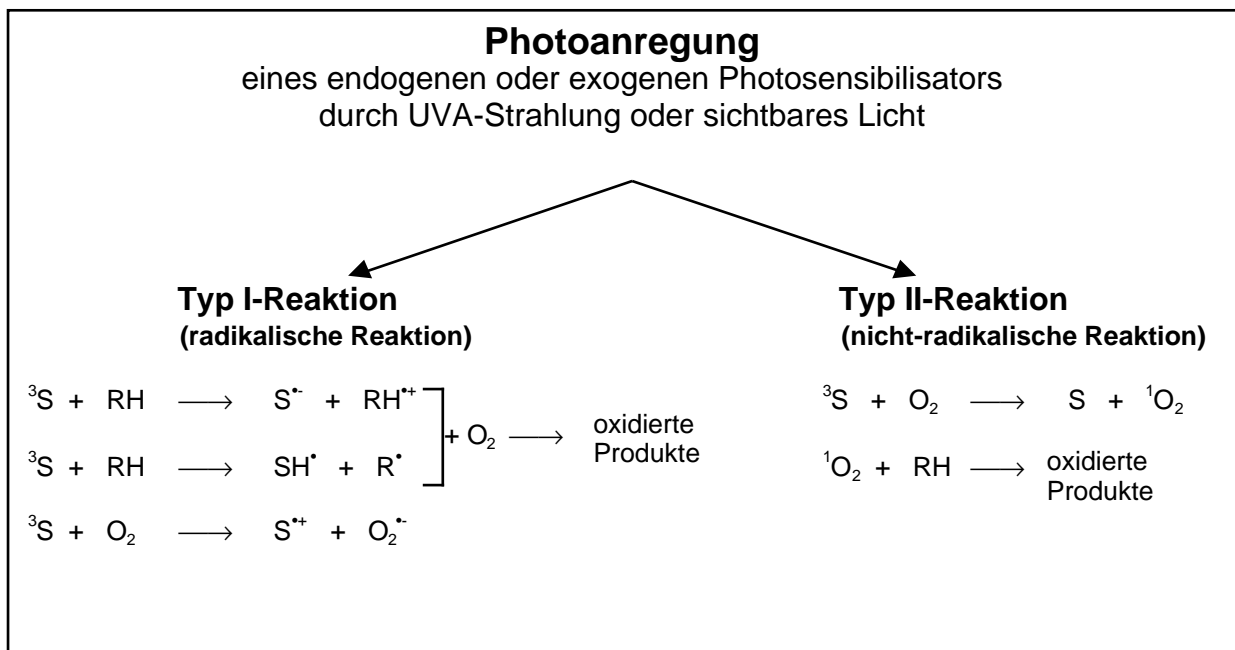


Abbildung 5: Schema der Typ I/Typ II-Reaktionen nach dem Mechanismus des photooxidativen Stresses. Der Photosensibilisator S wird aus seinem Singulettgrundzustand in den ersten angeregten Singulettzustand angehoben. Danach geht er durch ein „Intersystem Crossing“ in den ersten angeregten Triplettzustand 3S über und reagiert mit Sauerstoff und Biomolekülen (RH) [4]. Die Verknüpfungen Typ I - radikalisch und Typ II-Reaktionen nicht-radikalisch folgen einem Vorschlag von Gollnick [49].

Aufgrund ihrer antioxidativen Eigenschaften und der räumlichen Nähe zum Chlorophyll vermögen die Carotinoide des Lichtsammelkomplexes in den Chloroplasten, sowohl den Triplettzustand des Chlorophylls als auch den gebildeten Singulett-Sauerstoff zu inaktivieren [42, 44]. Dabei entstehen Carotinoide im energiearmen Triplettzustand, die Anregungsenergie als Wärme abgeben [44]. Da Carotinoide nicht nur in diesem speziellen Beispiel effektive Singulett-Sauerstoffinaktivatoren sind, könnten sie in der Haut ebenfalls durch Photosensibilatoren nach dem Modell des photooxidativen Stresses gebildeten Singulett-Sauerstoff inaktivieren. Dabei ist das Lycopin das effektivste Carotinoid zur Inaktivierung von Singulett-Sauerstoff (Tabelle 1, Seite 6, [2, 50]).

Carotinoide besitzen aber nicht nur photochemische Eigenschaften, sondern die elektronenreiche Polyenkette ist auch elektrophilen Angriffen ausgesetzt. Eine wichtige chemische Reaktion der Carotinoide ist die Oxidation. Der oxidative Abbau kann durch Peroxylradikale oder Singulett-Sauerstoff initiiert werden [51, 52]. Das Bleichen der Carotinoide ist der Verlust des Chromophors, d.h. des konjugierten Doppelbindungssystems und ist die Folge des oxidativen Abbaus. Reine Carotinoide werden im kristallinen Zustand schon in Anwesenheit von Spuren von Sauerstoff oxidativ abgebaut. Auch in vivo, stabilisiert von Proteinen, sind sie anfällig gegen oxidierende Verbindungen.

Reaktionen der Carotinoide mit Peroxylradikalen, aber auch anderen Radikalen sind intensiv erforscht worden (Abbildung 6, Seite 12). Die entstehenden Carotinoidradikale können z.B. durch eine von Burton und Ingold [30] vorgeschlagene Radikaldimerisierungsreaktion zum Kettenabbruch der z.B. durch Peroxylradikale initiierten Radikalreaktion führen (Abbildung 6, Seite 12). Bei diesen chemischen Reaktionen werden Carotinoide zwar zerstört, wirken aber dabei antioxidativ, weil pro Carotinoidmolekül zwei Peroxylradikalkettenreaktionen abgebrochen werden. Die extrem kurze Lebensdauer, der durch ihre intensive Absorption im nahen Infrarotbereich nachgewiesenen Carotinoidradikale, begründet sich durch die Delokalisation des ungepaarten Elektrons über die gesamte Polyenkette [53, 54] und den damit möglichen schnellen Folgereaktionen [30].

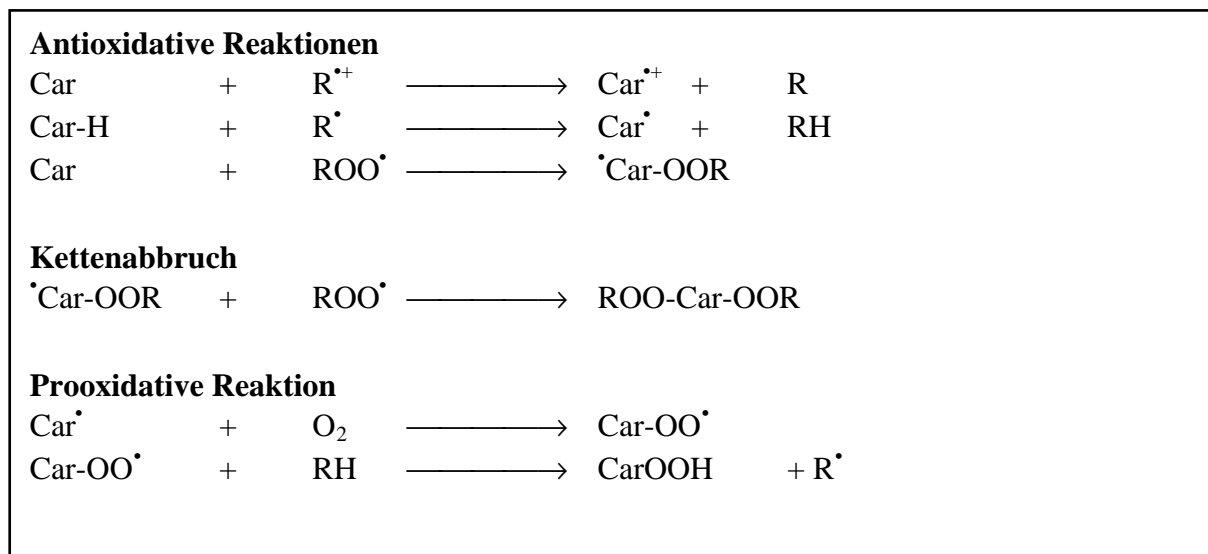


Abbildung 6: Beispiele radikalischer Reaktionen der Carotinoide [34].

Durch antioxidative Reaktionen und Kettenabbruch stoppen Carotinoide Radikalreaktionen, die durch Typ I-Reaktionen nach dem Modell des photooxidativen Stresses initiiert werden (Abbildungen 5, Seite 10 u. 6). Eingehend studiert wurden die antioxidativen Effekte der Carotinoide in organischer Lösung [30] und an multilamellaren Liposomen [55]. Bei multilamellaren Liposomen, welche physiologischen Bedingungen ähnlicher sind, wurden synergistische antioxidative Wirkungen der Carotinoide nachgewiesen [55].

Einschränkend muß an dieser Stelle erwähnt werden, daß Carotinoide nicht nur antioxidativ wirken, sondern bei hohem Sauerstoffpartialdruck ebenso prooxidativ sind. Triplett-Sauerstoff kann mit Carotinoidradikalen, die unter prooxidativen Bedingungen gebildet werden, reagieren. Dabei entsteht ein Carotinoidperoxyradikal, das eine neue Radikalkettenreaktion initiieren kann [56]. Auch die Carotinoidkonzentration spielt eine bedeutende Rolle bei der Wirkung der Carotinoide als Antioxidantien. An unilamellaren Liposomen zeigte sich nach radikalischer Initiation der Lipidperoxidation eine deutliche Konzentrationsabhängigkeit der antioxidativen Wirkung der Carotinoide. Für Lutein, β -Carotin und Lycopin wurde bei entsprechenden Konzentrationen sogar eine prooxidative Wirkung gefunden [57]. In Zellsystemen ist über die Wirkung der Carotinoide auf die Lipidperoxidation bis jetzt noch wenig bekannt.

1.2.3. In vivo Studien zum UV-Schutz von Carotinoiden

Ein Schutz vor einigen, der im Kapitel 1.1.2. beschriebenen, hautschädlichen Wirkungen von UV-Licht ist für β -Carotin sowohl im Tiermodell als auch beim Menschen nachgewiesen.

Im Tiermodell ist die photoprotektive Wirkung von Carotinoiden an Nacktmäusen durch topische äußere Applikation oder durch Injektion in die Haut getestet und nachgewiesen worden. Die meisten Daten wurden dabei mit β -Carotin gewonnen. Als Endpunkte wurden die Bildung thiobarbitursäurereaktiver Substanzen (TBARS) [58], die Inhibierung des UVB-induzierten Erythems [4] und die Photocancerogenese [59] untersucht. Die Inhibierung der Photocancerogenese konnte auch durch Canthaxanthin gezeigt werden, so daß die Inhibierung der Photocancerogenese kein Effekt des aus β -Carotin gebildeten Vitamin A ist [60]. Mögliche Konzentrationsabhängigkeiten der photoprotektiven Wirkungen der Carotinoide wurden noch nicht näher untersucht.

Seit langem erfolgreich eingesetzt wird hochdosiertes β -Carotin (100-150 mg/Tag) bei der Behandlung der erythropoetischen Protoporphyrinurie (EPP), deren Krankheitsmechanismus vermutlich auf Singulett-Sauerstofferzeugung durch das lipidlösliche Protoporphyrin als Photosensibilisator beruht. Die Patienten zeigen nach Behandlung eine deutliche Hautverfärbung (Carotinodermie). Es ist postuliert worden, daß der Hautschutz allein auf der Lichtabsorption des β -Carotins beruht [61]. Gegen eine Lichtabsorption als Schutzmechanismus spricht aber, daß die chronische hepatische Porphyrie (Porphyria cutanea tarda), bei der das im Gegensatz zu Protoporphyrin hydrophile Uroporphyrin Singulett-Sauerstoff erzeugt, nicht oder kaum behandelt werden kann [4]. Eine reine Lichtabschirmung der Zelle müßte vor der Singulett-Sauerstoffbildung durch das in der Zelle befindliche Uroporphyrin ebenfalls schützen. Im Fall des lipidlöslichen Protoporphyrins bei EPP ist eine Inhibierung der Singulett-Sauerstofferzeugung analog der Photoprotektion der Carotinoide in Pflanzen [43] prinzipiell denkbar, da Chlorophyll dem menschlichen Porphyrin strukturell sehr ähnlich ist und es mit den ebenfalls lipidlöslichen Carotinoiden in der Membran direkt wechselwirken kann. Das hydrophile Uroporphyrin im Cytosol, welches der Photosensibilisator der hepatischen Porphyrie ist, kann nicht mit dem β -Carotin wechselwirken. Möglicherweise kann daher β -Carotin in der Therapie der hepatischen Porphyrie nicht wirken.

Die Verminderung des UV-induzierten Erythems wurde in zahlreiche Studien untersucht. Dabei zeigt sich in neueren Studien eine photoprotektive Wirkung von β -Carotin [6, 8, 9]. In

einer Studie ohne photoprotektive Wirkung des β -Carotins [7] war vermutlich die Supplementierungsdauer mit ca. 3 Wochen zu kurz gewählt worden, da neueren Studien erst nach 8 Wochen Supplementierung einen UV-Schutzeffekte beobachten [8, 9]. Andere Carotinoide wurden noch nicht auf Verminderung des UV-induzierten Erythems nach Supplementierung getestet.

1.2.4. Carotinoide in Blut und Haut

Lutein, β -Cryptoxanthin, Lycopin, β -Carotin, Zeaxanthin und α -Carotin sind mit einem Anteil von mehr als 90% die Hauptcarotinoide im menschlichem Blutserum [62] (Abbildung 3, Seite 7). Insgesamt sind im Serum bereits über 20 verschiedene Carotinoide, geometrische Isomere und mögliche Carotinoidmetabolite identifiziert worden [63-66]. Weder Mensch noch Tier verfügen über die Möglichkeit zur Biosynthese von Carotinoiden. Sie sind deshalb gezwungen, ihren Carotinoidbedarf insbesondere durch Verzehr von Obst und Gemüse zu decken. Der Resorptionsweg der Carotinoide ist kurz in Abbildung 7 dargestellt [67].

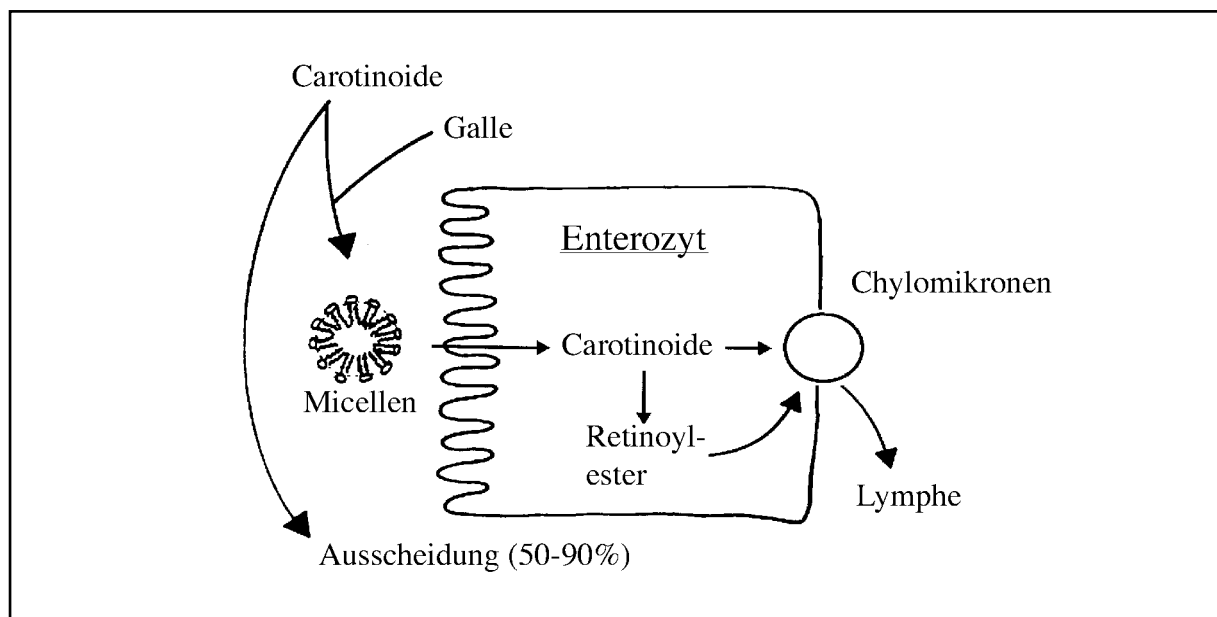


Abbildung 7: Schematische Darstellung der Aufnahme und Metabolisierung von Carotinoiden

Der Carotinoidgehalt im Blutplasma korreliert nicht linear mit der verzehrten Carotinoidmenge. Beim Menschen bestehen darüber hinaus starke individuelle Unterschiede sowie eine gegenseitige Beeinflussung der Carotinoide in ihrer Resorption [68, 69].

30-90% des resorbierten β -Carotins wird in Vitamin A umgewandelt [70-73]. Der Hauptweg zur Vitamin A-Synthese ist die zentrale Spaltung des Carotinoids durch die 15,15'-Dioxygenase [74] zu zwei Retinalmolekülen, die von der Retinalreduktase zu Retinol reduziert werden. Die Umwandlung von β -Carotin zu Retinol wird vom Organismus kontrolliert und ist sowohl von der Menge des zur Verfügung stehenden β -Carotins als auch von der Vitamin A-Konzentration abhängig [75].

Der Gehalt der einzelnen Carotinoide (Tabelle 2, [76-78]) im Blut unterliegt saisonalen und regionalen Schwankungen und wird durch verschiedene individuelle Faktoren, wie z.B. Geschlecht, Alter, sowie Ernährungsgewohnheiten, Rauchen und Alkoholkonsum, beeinflusst [76, 79, 80].

Tabelle 2: Vergleich des Carotinoidgehalts ($\mu\text{mol/l}$) im Blutserum oder Blutplasma in der Bevölkerung verschiedener Staaten. Angegeben ist der Mittelwert oder Median* des Gehalts der einzelnen Carotinoide [76-78].

Staat	Lutein + Zeaxanthin		β -Cryptoxanthin		Lycopin		α -Carotin		β -Carotin	
	w	m	w	m	w	m	w	m	w	m
England ^{*P} w=938/m=938 volljährig	0,29	0,29	0,16	0,13	0,25	0,25	0,07	0,06	0,32	0,24
Japan ^{*S} w=1196/m=618 7-86 Jahre	0,69	0,62	0,60	0,36	0,50	0,38	0,18	0,12	0,64	0,35
USA ^P w=408/m=230 67-96 Jahre	0,51	0,48	0,26	0,20	0,59	0,64	0,11	0,09	0,49	0,35

^S im Serum; ^P im Blutplasma; w weiblich; m männlich

Im Blut werden Carotinoide im allgemeinen in Lipoproteinen transportiert. Neu resorbierte Carotinoide zirkulieren noch bis zur Aufnahme in die Leber in Chylomicronen [67, 81]. Dort werden die Carotinoide in Lipoproteinen wieder in den Blutkreislauf sezerniert [67]. Die einzelnen Carotinoide verteilen sich unterschiedlich auf die verschiedenen Lipoproteinfraktionen. Die sehr unpolaren Carotine Lycopin, α -Carotin und β -Carotin findet man zu 58-75% in den LDLs und nur zu 17-26 % in den HDLs. Dagegen sind die polareren Dihydroxycarotinoide Lutein und Zeaxanthin zu 53% in den HDLs und nur zu 31% in den

LDLs zu finden. Alle Carotinoide lassen sich mit einem Anteil von ungefähr 16% in der VLDL-Fraktion nachweisen. β -Cryptoxanthin verteilt sich gleichmäßig zu jeweils ungefähr 40% auf die LDL- und HDL-Fraktion [37, 82, 83].

Mit HPLC-Methoden und Reflektionsspektroskopie wurde in der Haut im Durchschnitt 0,1-0,2 nmol β -Carotin/ g Feuchtgewebe [84, 85] gefunden, doch unterscheiden diese Arbeiten nicht zwischen Epidermis und Dermis. In Hautproben die subcutanes Fettgewebe mit einschließen findet man einen deutlich höheren Gehalt von ca. 1,4 nmol β -Carotin/g Feuchtgewebe bzw. 1,6 nmol Lycopin/ g Feuchtgewebe [26]. Je nach Hautregion unterscheidet sich der β -Carotingehalt der Haut drastisch. Dabei weisen sonnenlichtexponierte Stellen, wie z.B. die Stirn mit 0,4 nmol β -Carotin/ g Feuchtgewebe einen deutlich höheren Gehalt auf als weniger exponierte Stellen wie z.B. der Innenarm mit 0,07 nmol β -Carotin/ g Feuchtgewebe [87]. In Versuchen mit einem aus Algen gewonnenen β -Carotin-Supplement (Betatene™) konnte eine sehr gute Korrelation zwischen dem β -Carotinserumgehalt und der β -Carotingehalt in verschiedenen Hautregionen, insbesondere der Handinnenfläche ($r^2 = 0,94$) und der Stirn ($r^2 = 0,89$), gezeigt werden [85].

1.2.5. Mögliche Krankheitsprävention durch Carotinoide

Viele epidemiologische Studien zeigen eine inverse Korrelation zwischen dem Verzehr von Obst und Gemüse und einer ganzen Reihe von degenerativen Zivilisationskrankheiten, wie Krebs [86, 87], Artherosklerose [88, 89] und bestimmten Augenerkrankungen [90, 91]. Reaktive Sauerstoffspezies sind vermutlich an der Pathogenese dieser Krankheiten beteiligt [1]. Da Carotinoide als Antioxidantien in der Lage sind ROS zu inaktivieren, wird vermutet, daß sie die chemische Grundlage für diese Assoziation bilden. Hinweise aus der Grundlagenforschung lassen eine Krankheitsprävention durch Zufuhr von Antioxidantien ebenfalls möglich erscheinen [55, 57].

Eine deutliche Prävention von Prostata- und Magenkrebs zeigte sich nach Gabe von β -Carotin bei niedrigem bis defizitärem Carotinoidserumspiegel [92, 93]. Tier- und Zellversuche weisen seit neuerem auf eine krebspräventive Wirkung von Lycopin hin [94, 95]. Diese Ergebnisse decken sich mit der Beobachtung eines verminderten Risikos für Prostatakrebs durch Verzehr gekochter Tomatenprodukte [96]. Die Physician Health Studie zeigte nach fünf Jahren

Supplementierung ein Reduktion der cardiovasculären Erkrankungen um 50%. Der deutliche Effekt nivellierte sich aber nach einem Beobachtungszeitraum von 12 Jahren, so daß β -Carotin vermutlich Herz-Kreislauf-Erkrankungen lediglich hinauszögert [97,98].

Doch zeigten sich bei Supplementierung mit β -Carotin trotz des plausiblen Schutzmechanismus auch widersprüchliche Ergebnisse. Sowohl in der ATBC- Studie[99] als auch in der folgenden CARET-Studie [100] wurden signifikant höhere Lungentumorraten bei Rauchern bzw. Arbeitern einer Astbestfabrik gefunden. Auch die Prävention von Herz-Kreislauf-Erkrankungen wurde in diesen beiden Studien nicht gefunden.

Das antioxidative Verteidigungssystem des Menschen ist ein komplexes Netzwerk wechselseitiger Beziehungen der Antioxidantien untereinander. Aus diesem Grund ist es für eine Abschätzung eines möglichen Krankheitsrisikos oder möglichen Krankheitsprävention notwendig, die Konzentrationen möglichst vieler Antioxidantien einzeln zu erfassen.

Für die Untersuchung des Antioxidantien- bzw. Carotinoidprofils in der Bevölkerung sind Blutuntersuchungen aus verschiedenen Gründen am besten geeignet: Blutproben geben einen Aufschluß über die tatsächlich resorbierten und dem Körper zur Verfügung stehenden Antioxidantien. Da eine Abhängigkeit zwischen Antioxidantiengehalt im Blut und im Gewebe wahrscheinlich ist, kann man begrenzt Rückschlüsse auf den Carotinoidgehalt im Gewebe ziehen. Blutproben lassen sich leicht gewinnen und die zu untersuchenden Substanzen lassen sich im Gegensatz zum Gewebe leicht daraus extrahieren.

1.3. Problemstellung

Das Risiko einer Hautschädigung (z.B. Hautkrebs, UV-induziertes Erythem) durch Sonneneinstrahlung hat sich in den letzten Jahren erhöht. Nicht nur veränderte Bräunungsgewohnheiten, sondern auch die Zerstörung der Ozonschicht haben dazu beigetragen. Photooxidativer Streß, der durch reaktive Sauerstoffverbindungen (ROS) vermittelt wird, ist hierbei ein bedeutender Schädigungsmechanismus der Haut. Antioxidantien, wie z.B. Carotinoide, bieten die Möglichkeit einer Prävention oder Verzögerung der Pathogenese solcher ROS-abhängiger Schädigungsmechanismen. Doch der Einsatz von Carotinoiden zur Prävention UV-induzierter Hautschädigungen setzt Kenntnisse über die Menge und das Verhalten dieser Substanzen im menschlichen Organismus voraus.

Im Rahmen dieser Arbeit sollen in diesem Zusammenhang folgende Fragestellungen bearbeitet werden:

- 1.) Umfassende Analyse des Antioxidantienprofils im Blutserum dreier Probandengruppen in Deutschland (Studie I, Studie II u. III vor Supplementierung (s.u.)). Von besonderem Interesse ist dabei der Carotinoidgehalt im Blutserum, der auch auf alters- und regiospezifische Unterschiede hin untersucht werden soll.
- 2.) Hautfibroblasten sollen in dieser Arbeit als in vitro Modell verwendet werden, um an Hand der TBARS-Bildung in den Zellen nach UV-Bestrahlung photooxidativen Streß zu untersuchen. Dabei soll die Konzentrationsabhängigkeit und das Ausmaß der Verminderung der TBARS-Bildung durch die Carotinoide Lutein, Lycopin und β -Carotin, sowie deren Kombinationen quantifiziert werden.
- 3.) Die Verminderung der UV-induzierten Hautschädigung durch Carotinoid-supplementierung soll an Hand der Erythemintensität nach UV-Bestrahlung in Humanstudien untersucht werden. Dabei geht es im Besonderen um eine UV-Schutzwirkung durch ein carotinoidreiches Lebensmittel (Tomatenmark; Studie II) und den Vergleich (Studie III) einer Kombination von Carotinoiden (Lutein, Lycopin und β -Carotin) mit einem einzelnen Carotinoid (β -Carotin).

2. Material und Methoden

2.1. Material und Geräte

2.1.1. Chemikalien und Lösungsmittel

Betatene™, ein β -carotinreiches extrakt der Alge *Dunaliella salina* wurde freundlicherweise von Betatene (Cheltenham, Australien) zur Verfügung gestellt. Zeaxanthin und β -Cryptoxanthin wurden von Hoffmann-La Roche (Basel, Schweiz) gespendet. Lutein, Lycopin, α -Carotin, 2,6-Di-tertiär-butyl-4-methylphenol (BHT) wurden von Sigma (Deisenhofen, Deutschland) bezogen. β -Carotin und β -Apo-8'-carotenal stammten von Fluka (Buchs, Schweiz). Das Bradford Farbstoffkonzentrat wurde von BioRad Laboratories (München, Deutschland) geliefert. 1,2-Dipalmitoyl-*sn*-Glycero-phosphatidylcholin (C16:0) stammt von Sigma (Deisenhofen, Deutschland). Alle übrigen verwendeten Lösungsmittel und Chemikalien wurden von Merck (Darmstadt, Deutschland), Sigma (Deisenhofen, Deutschland), Fluka (Buchs, Schweiz), Aldrich (Steinheim, Deutschland) und Riedel-de Haen (Seelze, Deutschland) bezogen und hatten mindestens p. A. Qualität. Stickstoff der Reinheit 5.0 wurde von Linde (Höllriegelskreuth, Deutschland) geliefert.

2.1.2. Medien, Lösungen und Materialien für die Zellkultur

Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, Lot 119H2406), Hanks' Balanced Salt Solution (HBSS, Lot 189H2301), Trypsin EDTA Solution (Lot 9002077), Streptomycin/Penicillin Solution und Glutamin wurden von Sigma Cellculture (Sigma Aldrich Co Ltd., Irvine, United Kingdom) bezogen. Fötale Kälber Serum (FCS, Lot 633075), sterile Plastikpipetten (5, 10, 25 ml), 600 ml-Kulturflaschen und 9 cm-Petrischalen stammten von Greiner (Greiner Labortechnik, Frickenhausen, Deutschland)

2.1.3. Zellen

Junge primäre dermale Fibroblasten (F33) stammen aus dem Präputium eines männlichen Donors und wurden freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. Krutmann zur Verfügung gestellt. Die Zellen wurden maximal bis zur zwanzigsten Passage gehalten.

2.1.4. HPLC-Analytik

LaChrom L-7100 (Pumpe), L-4200 UV-VIS und L-7480 FL (Detektoren), D-2500 Chromato-Integrator und der 655 A-40 Autosampler waren von Merck-Hitachi (Darmstadt, Deutschland)

- Säulen:
- a) TBARS-Analyse: 5 × 250-mm Lichrospher 100 RP 18-e Säule (Merck, Darmstadt, Deutschland)
 - b) Carotinoidanalyse: Suplex pKb-100; 5 µm (Supelco; Bellefonte; Pennsylvania; U.S.A.)

2.1.5. UV/VIS Spektroskopie

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

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

2.1.6. Sonstige Geräte

Zentrifuge: Hettich Universal 30 RF (Hettich, Tuttlingen, Deutschland)

UV-Lichtquelle: Solar Simulator SOL3 (Hönle, München, Deutschland)

UV 800 (Waldmann, Villingen-Schwenningen, Deutschland)

Chromameter: Chromameter CR 200 (Minolta, Ahrensburg, Deutschland)

Ultraschallbad: Sonorex Super Digital DK255 (Bandelin, Berlin, Deutschland)

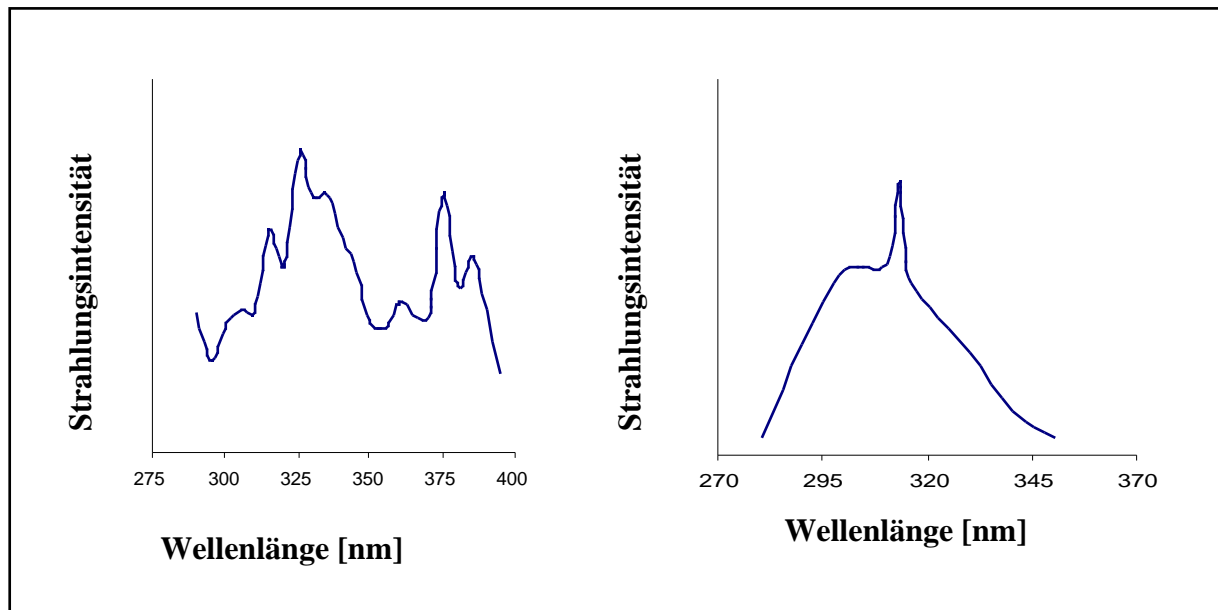


Abbildung 6: Emissionsspektren des Solar Simulator SOL 3 (links) und des UV 8000 (rechts).

2.2. Methoden

2.2.1. Carotinoidarbeitslösungen

Für die Analytik werden alle Carotinoidstammlösungen auf eine Konzentration von ca. 3 µg/ml verdünnt. Zur photometrischen Konzentrationsbestimmung der Carotinoide werden die Stammlösungen 1:11 in n-Hexan verdünnt und die Extinktion gegen n-Hexan bei den entsprechenden Wellenlängen gemessen. Der Konzentrationsberechnung liegt das Lambert-Beer'sche Gesetz zugrunde, dabei wurden folgende Extinktionskoeffizienten verwendet [101]:

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	$\epsilon_{451} = 136\,000 \text{ [M}^{-1}\text{cm}^{-1}\text{]}$
Lycopin	$\epsilon_{472} = 184\,575 \text{ [M}^{-1}\text{cm}^{-1}\text{]}$

Zusätzlich wird eine β -Apo-8'-carotinallösung präpariert, die bei einer 1:11 Verdünnung eine Extinktion von ca. 0,02 bei 450 nm aufweist.

2.2.2. Analyse der Carotinoide im Serum [66]

Zu 850 μ l Puffer (2 mM KPi; pH 7,2; 1mM EDTA) gibt man 150 μ l Serumprobe und 20 μ l β -Apo-8'-carotinal als internen Standard. Durch Zugabe von 1 ml Ethanol und kurzes Schütteln werden die Serumproteine gefällt, bevor 6 ml eines n-Hexan:/Dichlormethangemisches (5:1, v:v + 0,01% BHT) hinzu gegeben werden. Nach einer Minute intensivem Schütteln, 5 min Ultraschallbehandlung und 30 sec erneutem intensiven Schütteln, wird die Probe 10 min bei 4500 Upm und 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 und über HPLC bei einer Wellenlänge von 450 nm, bzw. 472 nm (Lycopin) detektiert. Alle Schritte werden im Dunkeln ausgeführt. Die Konzentrationen der einzelnen Carotinoide im Serum werden mittels einer Eichgeraden bestimmt.

2.2.3. Analyse von thiobarbitursäurereaktiven Substanzen (TBARS) [102]

500 μ l Aliquots werden mit 250 μ l Puffer (1 mM EDTA; 6 %iger Phosphorsäure), 500 μ l 0,5 %iger Thiobarbitursäure und 50 μ l 10 %igem BHT (gelöst in Ethanol) versetzt. Zur Bildung des Thiobarbitursäure-Dialdehydkomplexes wird die Reaktionslösung anschließend in einem Wasserbad 30 min auf 100°C erhitzt. Nach dem Abkühlen werden die umgesetzten Proben mit Hilfe eines Autosamplers auf die HPLC gespritzt und über eine 5 \times 250-mm Lichrospher 100 RP 18-e Säule bei einer Fließgeschwindigkeit von 0,75 ml/min aufgetrennt. Das Fließmittel besteht aus 55 % 50 mM Kaliumphosphatpuffer (pH 5,5) und 45 %Methanol. Die Fluoreszenz wird bei einer Anregungswellenlänge von 513 nm und Emissionswellenlänge von 550 nm detektiert. Die TBARS-Konzentrationen können mit Hilfe einer Eichgeraden eines MDA-Mengenstandards als MDA-Äquivalente ermittelt werden.

(MDA-Extinktionskoeffizient $\epsilon_{532} = 1,56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)

Es wurde stets darauf geachtet werden, daß Abbauprodukte der Carotinoide keine interferierenden Signale ergeben.

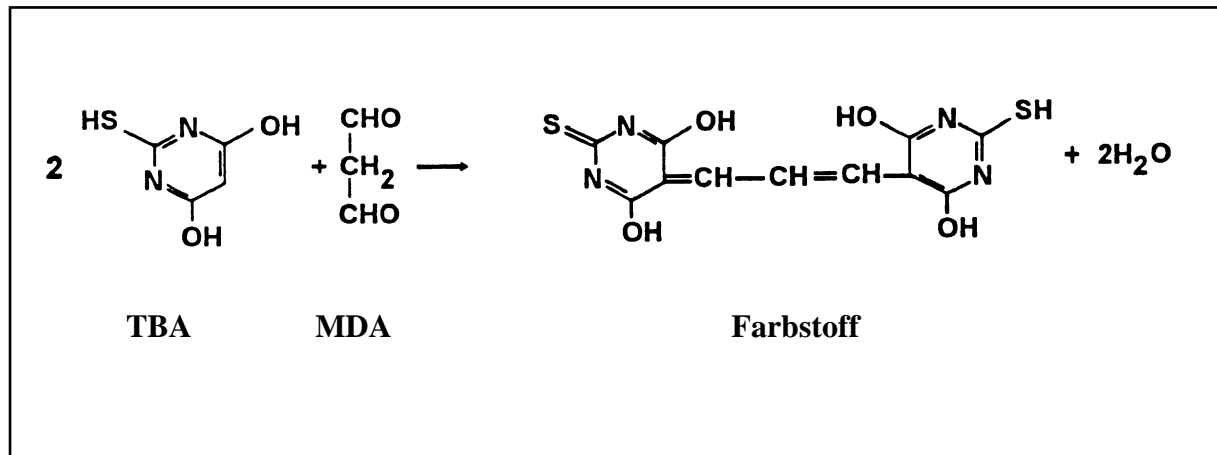


Abbildung 7: Nachweisreaktion von Malondialdehyd als Beispiel für eine TBARS (TBA = Thiobarbitursäure, MDA = Malondialdehyd)

2.2.4. Multilamellare Liposomen

Zur Herstellung multilamillarer Carotinoidliposomen als Transportvesikel zur Integration von Carotinoiden in Zellmembranen werden in n-Hexan/Dichlormethan (1:1, v:v) gelöste Carotinoide zu 12 mg 1,2-Dipalmitoyl-*sn*-Glycero-phosphatidylcholin (C16:0) in einen Rundkolben gegeben, welches in 3 ml Chloroform gelöst ist. Phosphatidylcholin mit ausschließlich gesättigten Fettsäuren wurde verwendet, um im folgenden Zellversuch keine zusätzlichen oxidierbaren Fette einzutragen. Durch Abblasen mit Stickstoff beseitigt man die Lösungsmittel. Der entstandene Lipidfilm wird, nachdem unter sterilen Bedingungen 6 ml DMEM-Medium hinzu gegeben wurden, durch 10 min Ultraschallbehandlung in Suspension gebracht.

2.2.5. Proteinbestimmung [103]

In eine 1 ml Mikroküvette werden 50 µl der proteinhaltigen Probe (ca. 100 µg Protein/ml), 850 µl destilliertes Wasser und 200 µl Biorad Farbstoff Konzentrat gegeben und mit einem Rührspatel durchmischt. Nachdem die Proben 5 min stehengelassen wurden, wird die Extinktion bei einer Wellenlänge von 595 nm gemessen. Die Konzentrationsberechnung erfolgt mittels einer Eichgerade mit Rinderserumalbumin.

2.3. Zellkultur

2.3.1. Stammhaltung und Anzucht der Zellen

F33 Hautfibroblasten werden in DMEM-Medium, dem 10%FCS (30 min 56°C Hitze inaktiviert), 2 mM L-Glutamin, 20 mg/ml Streptomycin und 20000 IU/l Penizillin zugesetzt wurden, bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Die Fibroblasten in 600 ml-Kulturflaschen (175 cm² Wachstumsfläche) mit 30 ml Medium sind etwa 5 Tagen nach dem Aussäen 80-100% konfluent, was einer Gesamtzahl von etwa 6 Mio. Zellen entspricht. Zum Splitten der Zellen löst man die Zellen durch Trypsinbehandlung vom Boden der Kulturflasche ab. Nach Abstoppen der Trypsinierung durch Mediumzugabe, wird die Zellsuspension im Verhältnis 1:4 mit Medium verdünnt. Von der Zellsuspension werden:

- a) 30 ml zur Stammhaltung in eine 600 ml-Kulturflaschen gegeben
- b) jeweils 9 ml auf 9 cm-Petrischalen (54 cm² Wachstumsfläche) ausplattiert.

2.3.2. Einfrieren von Zellen

Zellsuspensionen früher Passagen aus 600 ml-Kulturflaschen werden nach dem Abstoppen der Trypsinaktivität durch FCS-haltiges Medium 5 min bei 1000 Upm zentrifugiert. Das Zellpellet wird in 1 ml Einfriermedium (10% DMSO, 90% FCS) eingefroren und bei -80°C

gelagert.

2.3.3. Induktion der Lipidperoxidation durch Bestrahlung mit UVB-Licht

9 cm-Petrischalen mit konfluenten Zellen werden 16 Stunden mit 1 ml multilamillaren Carotinoidliposomen bzw. carotinoidfreien Kontrollliposomen im Brutschrank inkubiert. Anschließend entfernt man Medium und Liposomen von den Zellen und wäscht zweimal mit 9 ml PBS bevor man 4 ml HBSS (Hanks' Balanced Salt Solution, Dulbecco) auf die Zellen gibt. Bestrahlt werden die Zellen 20 min mit UVB-Licht ($0,8 \text{ mW/cm}^2$). Nach einer Stunde Postinkubation im Brutschrank entnimmt man 200 μl Medium für den LDH-Toxizitätstest. Die Zellen werden danach mit einem Zellschaber abgekratzt und nachdem eine 100 μl Probe für die Proteinbestimmung entnommen wurde mit 4 ml Butanol gesprengt. In der wässrigen Phase wird die TBARS-Bildung und in der organischen Phase wird der Carotinoideinbau nach den oben beschriebenen Methoden analysiert (Aufarbeitungsschema in Abbildung 8, Seite 26)

2.3.4. LDH-Toxizitätstest

Die Freisetzung der cytosolischen Lactatdehydrogenase (LDH) in das Bestrahlungsmedium dient als Maß der Zellschädigung. 50 μl Medium werden zu 600 μl Reaktionspuffer (0,62 mM Na-Pyruvat, 0,4 mM NADH, 100 mM Tris/Triethanolamin pH 7,6) pipettiert. Die Enzymaktivität wird durch die zeitabhängige Abnahme der Extinktion von NADH ($\epsilon_{366} = 3,5 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) gemessen.

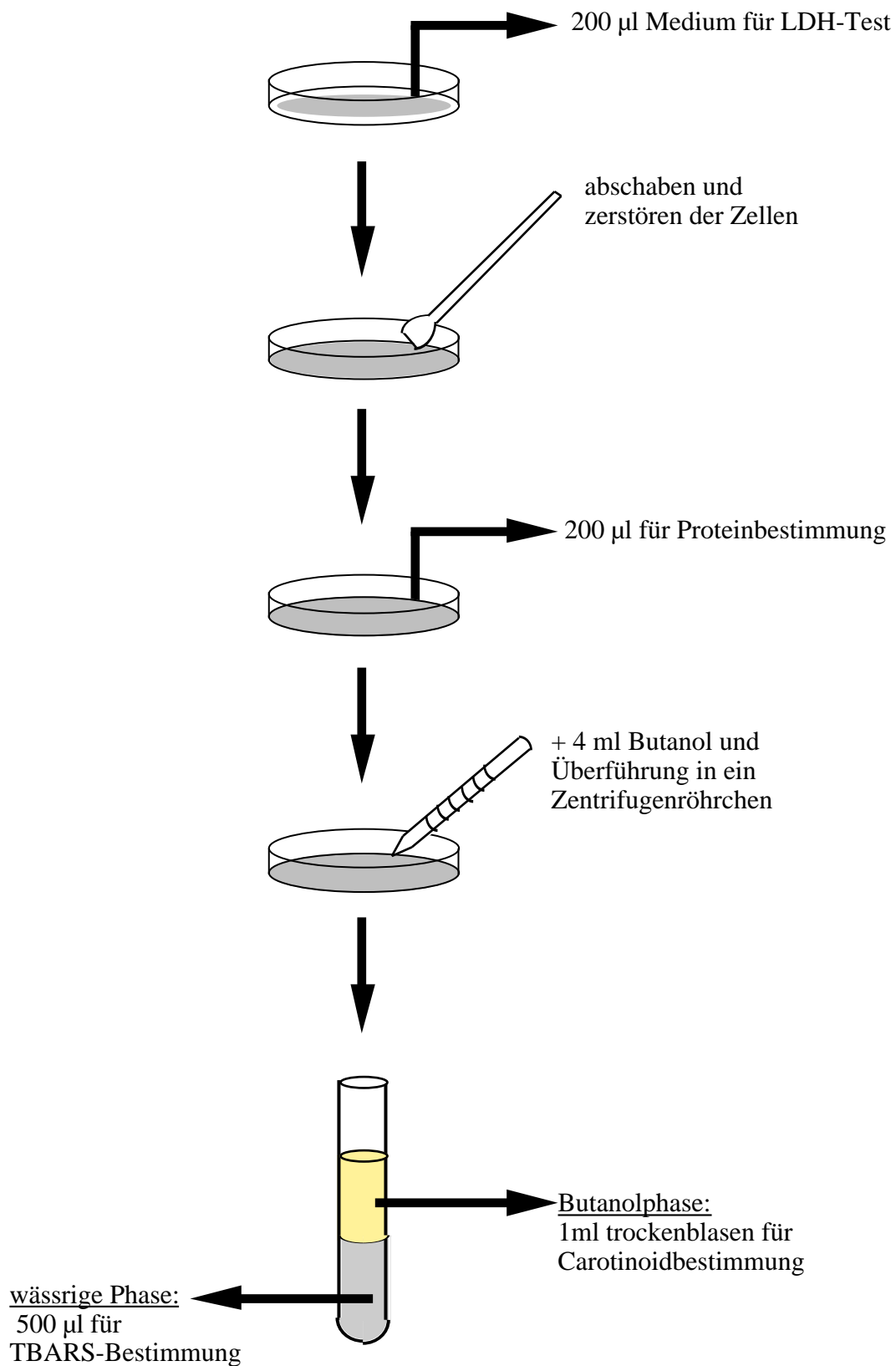


Abbildung 8: Schema der Aufarbeitung von Hautfibroblasten nach UV-Bestrahlung für die Bestimmung der TBARS und der Carotinoide.

2.4. *Interventionsstudien*

2.4.1. Probandenauswahl

Alle Probanden, die an den Carotinoidinterventionsstudien teilnahmen, haben helle Haut, die sonnenempfindlich ist und nur wenig bräunt, blonde oder hellbraune Haare und blaue Augen (Hauttyp 1 oder 2 [89]). Darüber hinaus waren alle Studienteilnehmer Nichtraucher, hatten eine Körpermassenzahl (= body mass index = (Körpergewicht) [kg]/ (Körperlänge)² [m²]) zwischen 18 und 25 kg/m², nahmen keine Vitaminpräparate ein und ernährten sich „normal“. Sie hatten während der Studie keinen Auslandsaufenthalt in südlichen Ländern und waren gesund. Insbesondere wurde nach möglichen Stoffwechselstörungen, Lebererkrankungen und krankhaften Lichtreaktionen gefragt. Während der Studie sollten die Probanden ihre Ernährungsgewohnheiten nicht ändern. Die Verlässlichkeit der Probanden wurde sowohl zweimal während jeder Studie durch einen Fragebogen, als auch durch Bestimmung der Carotinoidkonzentration aller 6 Hauptcarotinoide im Blutserum zu den Zeitpunkten der Erythemmessungen überprüft und verfolgt. Die Methode zur Analyse der Carotinoide im Blutserum wurde oben bereits beschrieben.

2.4.2. Supplementierung in der Studie II

An der Studie II nahmen 22 gesunde erwachsene Personen, 14 Frauen und 8 Männer, im Alter von 26-67 Jahren teil. Die Probanden wurden randomisiert der Placebogruppe (Gruppe I) oder der Verumgruppe (Gruppe II) zugeordnet. Die Probanden der Gruppe I nahmen täglich einmal 10g Olivenöl zur Hauptmahlzeit zu sich. Studienteilnehmer der zweiten Gruppe aßen täglich 40g Tomatenmark zusammen mit 10 g Olivenöl ebenfalls zur Hauptmahlzeit. Die tägliche Aufnahme von 40 g Tomatenmark entspricht einer Zufuhr von 16 mg/Tag Lycopin durch dieses natürliche Nahrungssupplement. Die Studiendauer betrug insgesamt 10 Wochen. Erythemreaktionen der Haut wurden in der vierten und zehnten Woche quantitativ untersucht.

2.4.3. Supplementierung in der Studie III

Die Studie III wurde mit 25 Frauen und 11 Männern im Alter von 21-53 Jahren durchgeführt. Vor Studienbeginn wurden die insgesamt 36 Studienteilnehmer randomisiert in drei gleich große Versuchsgruppen eingeteilt. Gruppe I nahm täglich eine Gelatinekapsel mit 9,7 mg β -Carotin und 0,3 mg α -Carotin in Sojaöl als Supplement zu sich. Die Gelatinekapsel der Gruppe II enthielten 3,2 mg Lutein, 4,0 mg Lycopin und 3,4 mg β -Carotin in Sojaöl. Die dritte Gruppe (Kontrollgruppe) nahm die ausschließlich mit Sojaöl gefüllte Gelatinekapsel zu sich. Durch Sojaöl als Trägermatrix für die Carotinoide, nahmen alle Probanden täglich 0,3 mg Tocopherol (80% γ -Tocopherol) zu sich. Alle Gruppen nahmen ihre entsprechende Gelatinekapseln über einen Zeitraum von 12 Wochen täglich zur Hauptmahlzeit ein.

2.4.4. Erytheminduktion und Messung der Hautfarbe

Vor Studienbeginn wurde für jeden Teilnehmer die individuelle MED (**m**inimale **E**rythem **D**osis) bestimmt. Während der Studie II wurde die Erythemreaktion (Rötung) der Haut zu Beginn, nach 4 und nach 10 Wochen durch Bestrahlung mit der 1,25- bzw. 1,6-fachen MED ausgelöst. In der Studie III wurden die Bestrahlungen der Haut zu Beginn der Studie, nach 6 und 12 Wochen durchgeführt. Alle UV-Bestrahlungen erfolgten am Rücken im Bereich der Schulterblätter, wobei jede Stelle des Rückens nur einmal bestrahlt wurde. In den Studien II u. III wird die Hautfarbe nach dem dreidimensionalen Farbwertsystem (L-, a-, b-Wert) mit dem Minolta Chromameter CR-200 quantitativ bestimmt. In diesem Farbsystem (Abbildung 9, Seite 29) gibt der L-Wert die Helligkeit, der b-Wert den Gelbanteil und der a-Wert den Rotanteil der Hautfarbe an. Das Erythem wurde 24 Stunden nach Bestrahlung quantifiziert. Als Maß für die Intensität des Erythems dient die Differenz der a-Werte unmittelbar vor und 24 Stunden nach Bestrahlung (Δa -Wert). Diese Messungen wurden vom Institut für experimentelle Dermatologie der Universität Witten-Herdecke durchgeführt.

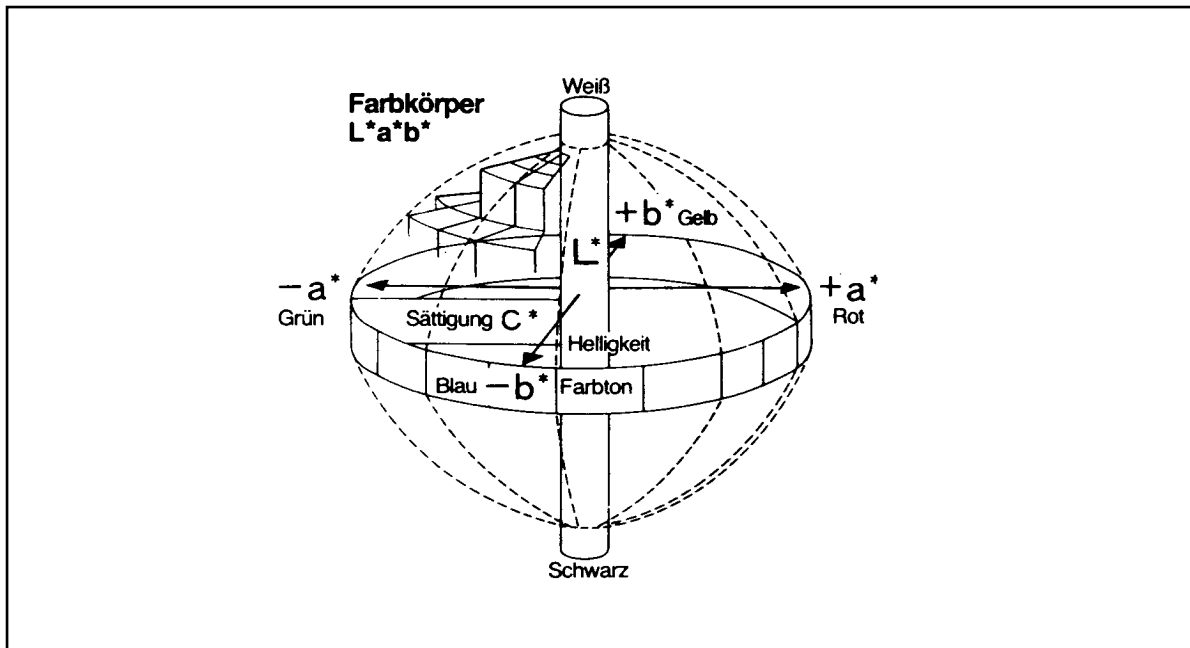


Abbildung 9: Darstellung des L, a, b, Farbsystems. Der a-Wert gibt der Rotanteil der Farbe wieder. Sinkt der Rotanteil einer Farbe auf einen negativen Wert bleibt nur die Komplementärfarbe Grün übrig. Gleiches gilt mit entsprechenden Änderungen für den Gelbanteil. Im Zentrum des Farbsystems sind alle Spektralfarben zu gleichen Anteilen gemischt, so daß ein grauer Farbton entsteht (Bedienungsanleitung Minolta Chromameter CR-200).

2.4.5. Reflektionsspektroskopie [85]

Der Gesamtcarotinoidgehalt der Haut wurde reflektionsspektroskopisch an der Handfläche oder am Innenarm bestimmt. Diese nichtinvasive Meßmethode sammelt 8 Reflektionsspektren der Haut zwischen 350 und 850 nm in 1,2 nm Schritten (MultiscanOS 20 Spectrophotometer, MBR GmbH, Herdecke, Deutschland). Das Spektrum wurde gegen Titandioxid als Referenzstandard gemessen. Als Lichtquelle diente eine 5 W Halogenlampe. Die Aufnahme eines Einzelspektrums dauerte nur 124 msec, weshalb sich die Haut weniger als 0,5°C erwärmt. Die Eindringtiefe in die Haut für Licht der Wellenlänge von 200-800 nm beträgt 0,1-0,8 mm, so daß nur Carotinoide der Epidermis und der oberen Dermis gemessen werden. Diese Messungen wurden vom Institut für experimentelle Dermatologie der Universität Witten-Herdecke durchgeführt.

2.4.6. Statistik

Zur statistischen Auswertung der Studien und Experimente wurde das Programm Excel 5.0 (Pc) oder Excel 98 (Mac) verwendet (Microsoft Corp., Unterschleißheim, Germany).

3. Ergebnisse

3.1. Nicht-enzymatische Antioxidantien im Blutserum

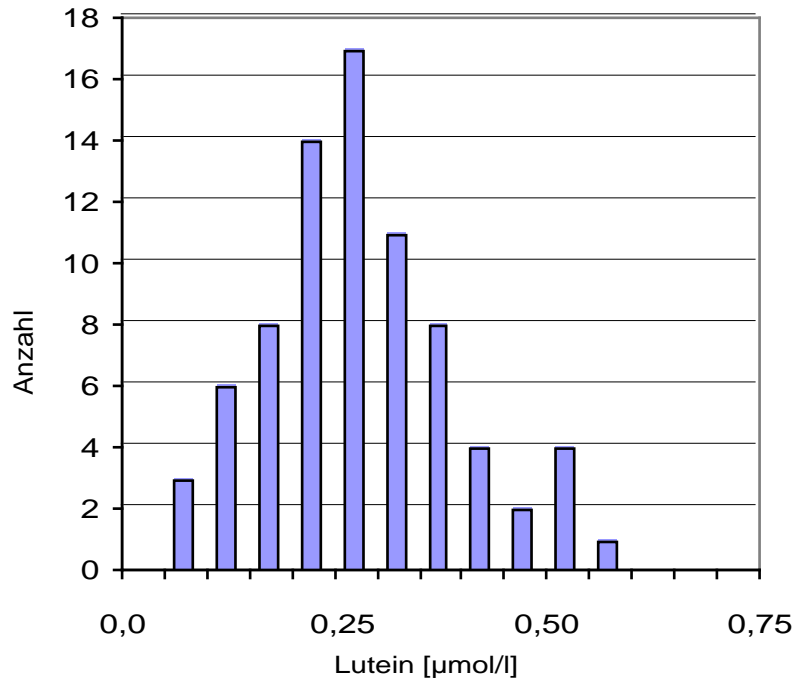
3.1.1. Häufigkeitsverteilungen lipophiler und hydrophiler Antioxidantien im Blutserum

Durch die Betrachtung der Häufigkeitsverteilung der Antioxidantienkonzentrationen im Blutserum lassen sich mögliche Unregelmäßigkeiten in der Probandengruppe aufzeigen, die z.B. auf Untergruppen hinweisen können. Bi- oder multimodale Verteilungen, d.h. Verteilungsfunktionen mit zwei oder mehr Maxima, sind ein Indiz dafür. Außerdem ist in der Häufigkeitsverteilung zu erkennen, ob Mittelwert, Median und Modalwert der untersuchten Gruppe zusammenfallen. Der Mittelwert ist das arithmetische Mittel und der Median der Zentralwert, d.h. 50% der Messwerte liegen ober- bzw. unterhalb dieses Wertes. Der Modalwert gibt den häufigsten gemessenen Wert, d.h. das Maximum der Häufigkeitsverteilung an. Fallen diese drei Werte nicht zusammen, sind die Messwerte nicht normalverteilt. Dies hat Folgen für die Anwendung statistischer Testverfahren zur Beurteilung der Unterschiede zwischen den Probandengruppen. Die Verteilungen werden als linksgipflig, bzw. rechtsgipflig bezeichnet, wenn der Modalwert kleiner, bzw. größer als der Mittelwert ist. Um die Häufigkeitsverteilung des Antioxidantiengehalts im Blutserum von Männern und Frauen zu untersuchen, sind möglichst große Teilnehmergruppen notwendig.

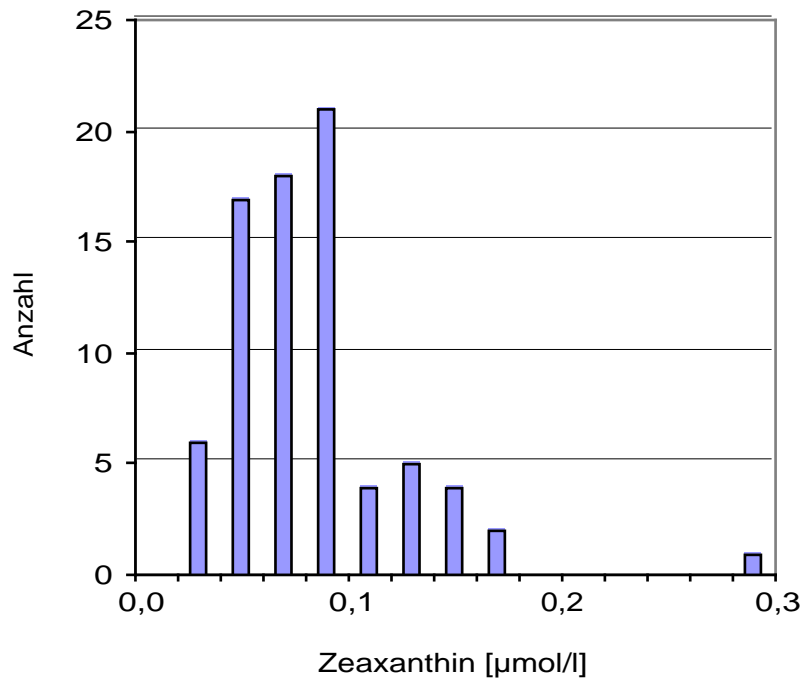
In Kooperation mit der Privatklinik Obertal (Kurklinik in Baiersbrunn, Schwarzwald) wurde der Carotinoid-, der α -Tocopherol- und der Vitamin C-Gehalt in Seren von gesunden älteren Frauen und Männern im Alter von 50 bis 90 Jahren durch HPLC-Chromatographie bestimmt. 78 Frauen und 30 Männer bekamen weder Vitaminpräparate verschrieben, noch waren bei den Studienteilnehmern das Blutbild beeinflussende Krankheiten diagnostiziert worden. Diese Studie wird im Folgendem als Studie I bezeichnet. Die Gruppe der Männer in der Studie I ist relativ klein. Daher wird auf eine genaue Betrachtung und Abbildung der Häufigkeitsverteilungen der Männer verzichtet. Nur die wesentlichen Unterschiede zu den Häufigkeitsverteilungen des Antioxidantiengehalts im Serum der Frauen werden kurz beschrieben. Die Häufigkeitsverteilungen werden durch Zuordnung der Meßwerte zu definierten Konzentrationsintervallen gebildet (Abbildung 10 a-h, Seite 32-35).

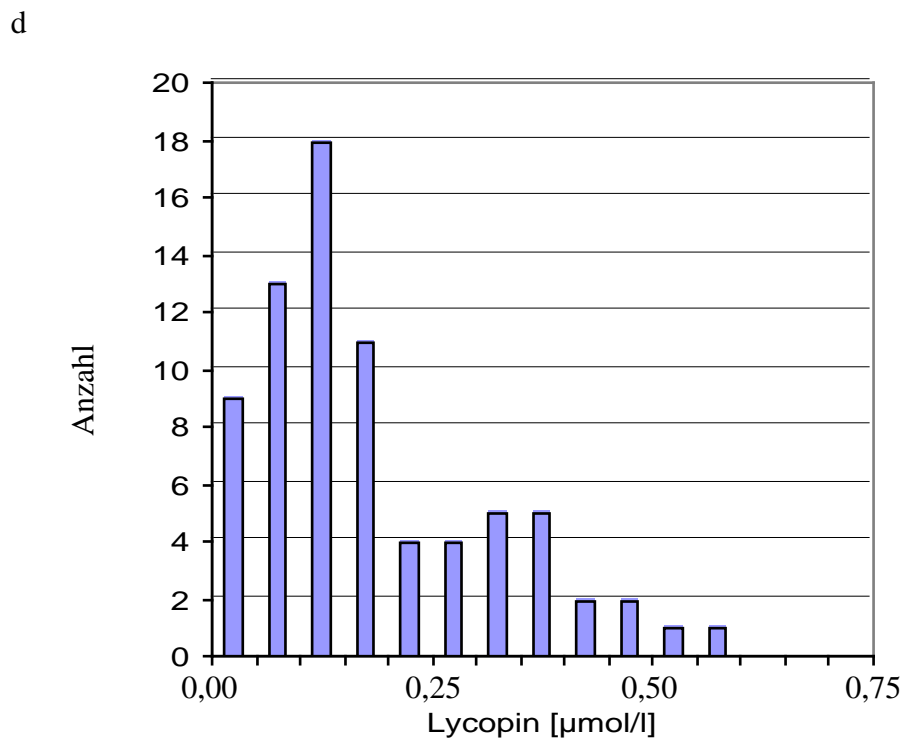
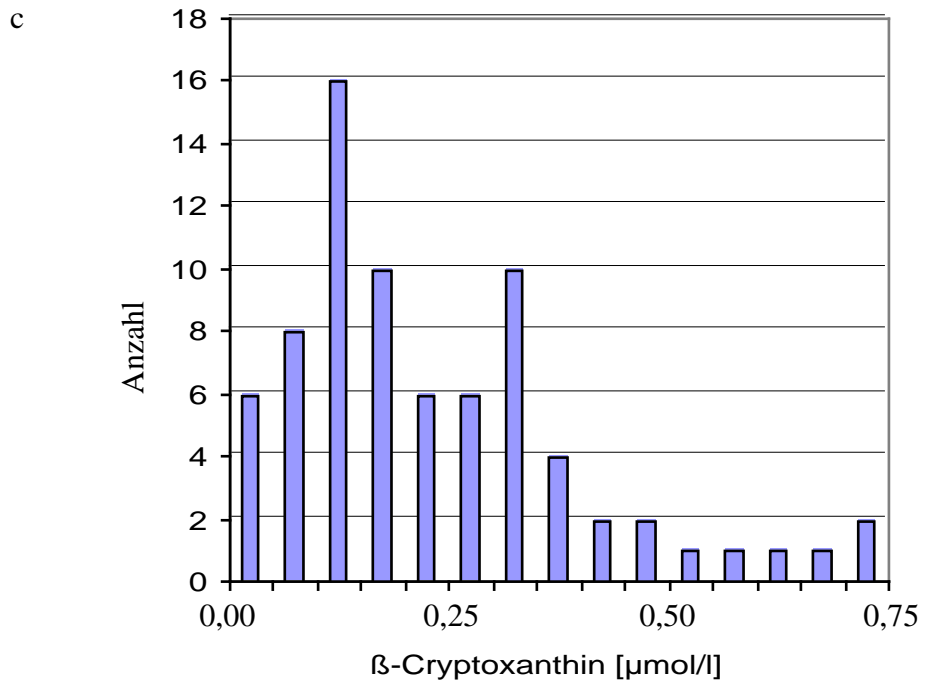
Abbildung 10 a-h: Häufigkeitsverteilungen des Gehalts lipophiler und hydrophiler Antioxidantien im Serum bei den Frauen der Studie I (n =78). Einige Extremwerte der Häufigkeitsverteilungen sind nicht gezeigt (Anzahl der nicht gezeigten Extremwerte: 2 bei β -Cryptoxanthin, 2 bei Lycopin, 5 bei α -Carotin, 1 bei β -Carotin und 1 bei Vitamin C).

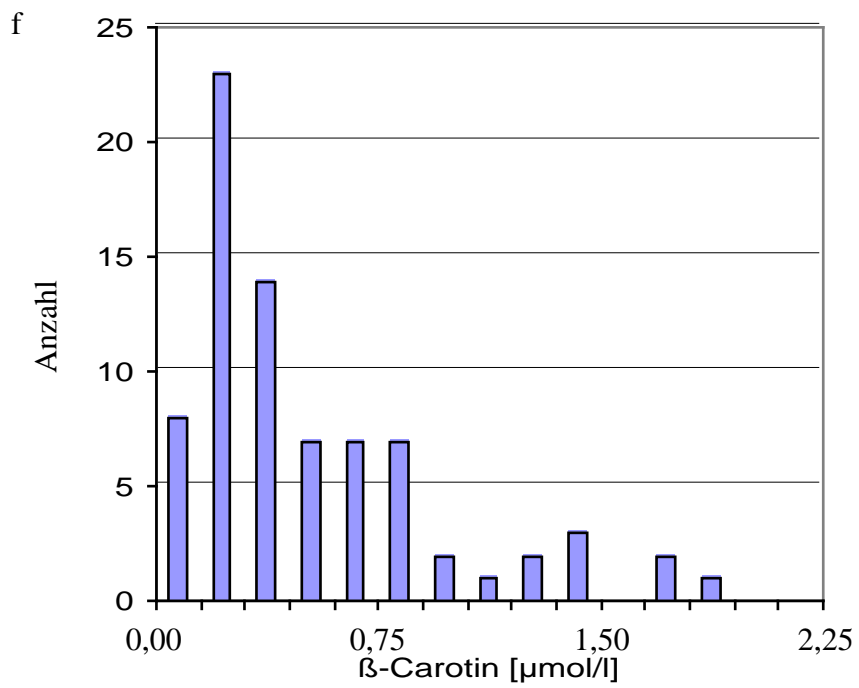
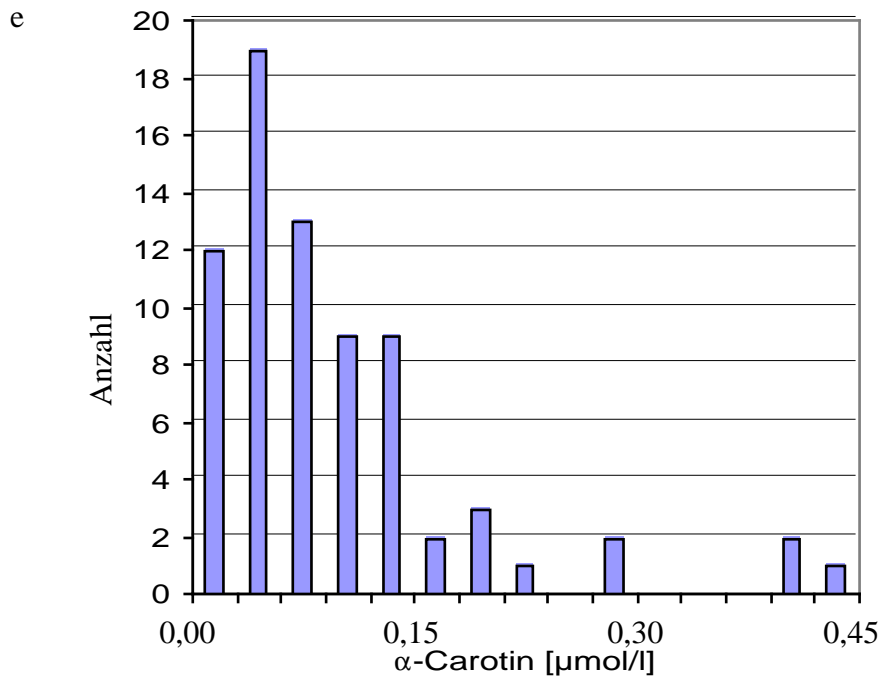
a

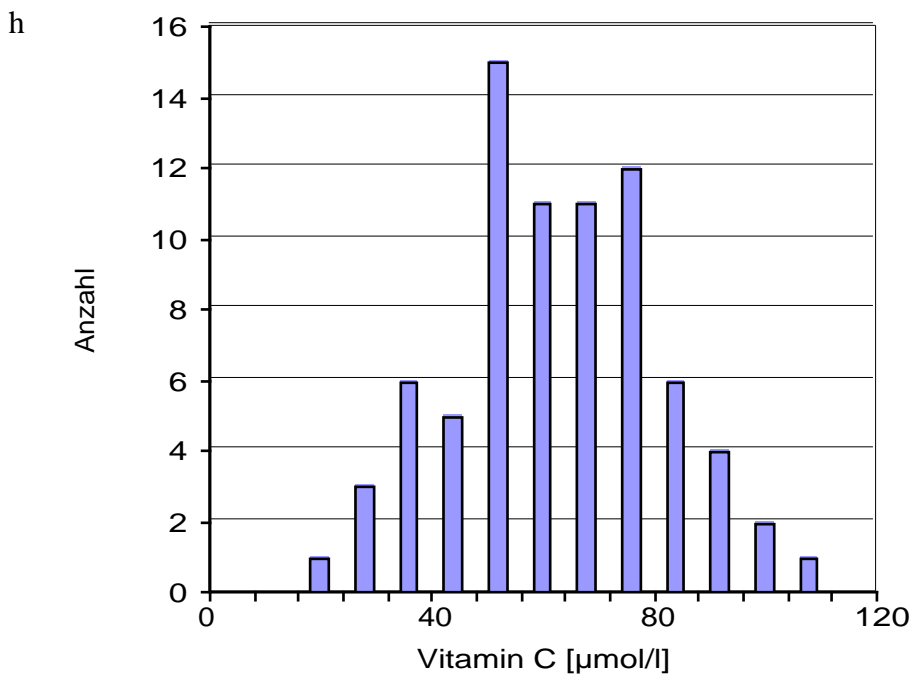
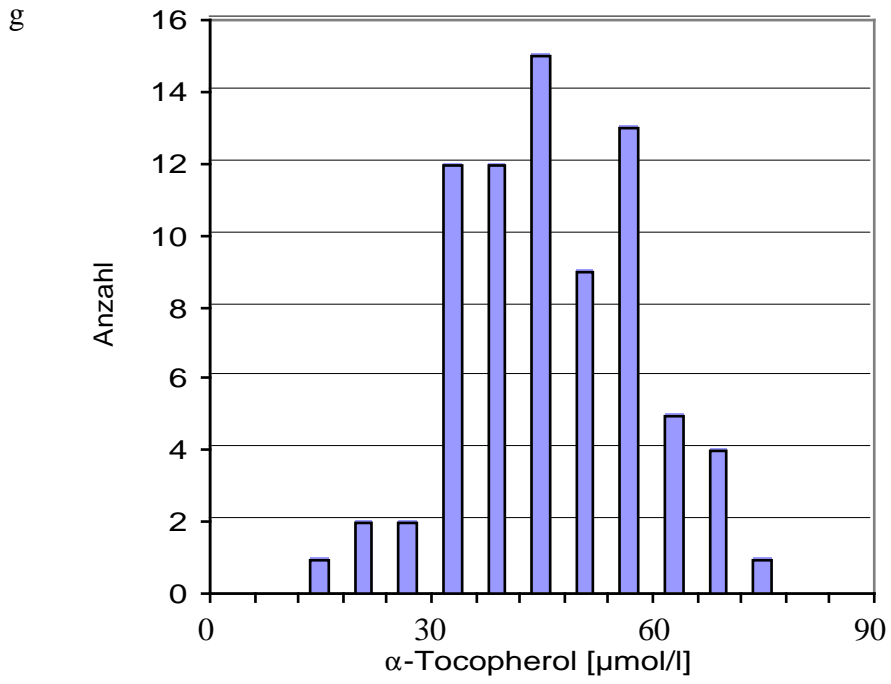


b









Die Häufigkeitsverteilungen des Antioxidantiengehalts im Serum der Frauen der Studie I zeigen für den Gehalt von Lutein und α -Tocopherol eine unimodale Verteilung. Bei Zeaxanthin, β -Cryptoxanthin, Lycopin und Vitamin C scheint eine bimodale Verteilung der Meßwerte vorzuliegen. Im Gegensatz zu Vitamin C, ist bei den Häufigkeitsverteilungen des Zeaxanthin-, β -Cryptoxanthin- und Lycopingehalts die Untergruppe mit niedrigem Antioxidantiengehalt im Serum größer als die Untergruppe mit höherem Antioxidantiengehalt.

Die Meßwerte von α - und β -Carotin zeigen linksgipflige Verteilungen. Der Modalwert für β -Carotin liegt zwischen 0,3 und 0,45 $\mu\text{mol/l}$. Der Mittelwert mit 0,56 $\mu\text{mol/l}$ ist im Vergleich dazu höher (Tabelle 3, Seite 38). Der β -Carotingehalt im Serum von 23 Studienteilnehmern lag im Konzentrationsintervall des Modalwertes. Im Vergleich dazu lag nur bei 7 Studienteilnehmern der β -Carotingehalt im Serum im Konzentrationsintervall des berechneten Mittelwertes. Ähnliches gilt für den gemessenen α -Carotingehalt. Der α -Carotingehalt im Serum von 19 Studienteilnehmern lag im Konzentrationsintervall des Modalwertes. Im Vergleich dazu lag nur im Serum von 9 Studienteilnehmern der α -Carotingehalt im Konzentrationsintervall des berechneten Mittelwertes. In beiden Fällen beschreibt der Modalwert, der den am häufigsten gemessenen Serumgehalt angibt, den in der Studie I im Serum gefundenen Carotinoidgehalt besser als der Mittelwert.

Im Vergleich zu der Frauen der Studie I findet man unterschiedliche Häufigkeitsverteilungen bei den Männern für Serumgehalt von Lutein, Lycopin, β -Carotin und α -Tocopherol. Die Häufigkeitsverteilung des Luteinserumgehalts ist trimodal im Gegensatz zur unimodalen Verteilung bei den Frauen. Die Verteilungsfunktion des Lycopinserumgehalts bei den Männern zeigt nur ein Maximum. Die Messwerte des β -Carotingehalts im Serum sind annähernd normalverteilt. Auffällig ist das Doppelmaximum der Häufigkeitsverteilung des α -Tocopherolgehalts. Beide Maxima 42-48 $\mu\text{mol/l}$ und 60-66 $\mu\text{mol/l}$ sind gleich ausgeprägt und vereinigen je 1/6 der Messwerte auf sich.

3.1.2. Mittelwerte lipophiler und hydrophiler Antioxidantien im Blutserum: geschlechtsspezifische und alters- bzw. regionspezifische Unterschiede

In Kooperation mit der Privatklinik Obertal wurden von den Probanden der Studie I außer dem Antioxidantienprofil im Blut noch Lipide, Lipoproteine, wasserlösliche Bestandteile und die Eisenbalance untersucht. Die Mittelwerte, sowie die in der Untersuchung gefundenen Minimal- und Maximalwerte aller untersuchten Blutparameter werden in Tabelle 3 (Frauen, Seite 38, 39) und Tabelle 4 (Männer, Seite 40, 41) gezeigt. Weichen Mittelwert und Median deutlich von einander ab, wird der Median dem Mittelwert in den nachfolgenden Betrachtungen vorgezogen. Daraus ergibt sich, daß Anstelle des t-Tests der Mann-Whitney-Wilcoxon-Test (U-Test) zur Berechnung der Signifikanz eines Unterschieds zwischen zwei Gruppen benutzt werden muß.

Bei den im Durchschnitt 70 ± 11 jährigen Frauen dieser Studie weichen die Mittelwerte des Serumgehalts von β -Carotin, α -Carotin, Lycopin, β -Cryptoxanthin und Serumferritin über 20% von den entsprechenden Medianen ab. Bei den im Durchschnitt 69 ± 10 jährigen Männern der Studie I findet sich nur für α -Carotin eine Abweichung des Mittelwertes vom Median, die größer als 20% ist. Somit werden diese Messwerte auf der Basis des Medians miteinander verglichen. Für die vergleichende Betrachtung der Blutwerte zwischen Männern und Frauen wurde der Blutwert der Männer gleich 100% gesetzt.

Insbesondere beim Serumgehalt der Antioxidantien gibt es erhebliche Unterschiede zwischen den Geschlechtern. Die Medianwerte der folgenden lipophilen und hydrophilen Antioxidantien sind bei den Frauen der Studie I gegenüber Männern erhöht: β -Carotin um 32% ($p_{(U\text{-Test})} = 0,04$), α -Carotin um 60% ($p_{(U\text{-Test})} = 0,03$), β -Cryptoxanthin um 40% ($p_{(U\text{-Test})} = 0,01$) und Vitamin C um 23% ($p = 0,01$). Der Median des Lycopingehalts im Serum der Frauen ist in dieser Studie um 33% niedriger als bei den Männern, doch ist dieser Unterschied mit einem $p > 0,05$ im U-Test nicht signifikant. Trotz des deutlich höheren Gehalts an β -Carotin (Provitamin A) im Serum der Frauen, ist der Retinolgehalt (Vitamin A) signifikant niedriger als bei den Männern (14%, $p = 0,01$).

Tabelle 3: Median, Mittel-, Minimal- und Maximalwerte hydrophiler und lipophiler Antioxidantien, sowie der Lipide und der Eisenbalance im Serum der 78 Frauen in Studie I. Wenn nicht anders angegeben wurde die Signifikanz des Unterschiedes der jeweiligen Meßwerte zwischen den Frauen und den Männern der Studie I mit dem Student's t-Test berechnet.

Parameter	Einheiten	Mittelwerte	± S.D.	Min.	Median	Max.	Signifikanz^a
Alter	Jahre	70,4	10,5	50	71	90	
Antioxidantien							
Vitamine & Provitamine							
α-Tocopherol (Vitamin E)	µmol/L	47,7	14,0	16,1	45,7	88,0	
γ-Tocopherol (Vitamin E)	µmol/L	2,15	1,14	0,00	2,06	8,04	
β-Carotin	µmol/L	0,56	0,48	0,07	0,41	2,60	0,04 ^b
α-Carotin	µmol/L	0,13	0,15	0,01	0,08	0,72	0,03 ^b
Lycopin	µmol/L	0,21	0,18	0,03	0,14	0,93	
β-Cryptoxanthin	µmol/L	0,25	0,19	0,02	0,20	0,85	0,01 ^b
Lutein	µmol/L	0,28	0,11	0,06	0,27	0,58	
Zeaxanthin	µmol/L	0,08	0,04	0,02	0,08	0,30	
Retinol (Vitamin A)	µmol/L	1,85	0,57	0,83	1,79	3,24	0,01
Vitamin C	µmol/L	64,2	21,9	17,1	61,8	165,2	0,01

Tabelle 3 (Fortsetzung)

Parameter	Einheiten	Mittelwerte	± S.D.	Min.	Median	Max.	Signifikanz^a
Lipoproteine, Lipide							
Cholesterin	mg/dl	224	41,2	133	224	310	0,03
LDL-Cholesterin	mg/dl	143	39,2	64	140	290	
Apolipoprotein B	mg/dl	107	24,8	51	106	184	
HDL-Cholesterin	mg/dl	66,1	18,0	29	65	104	0,0002
Triglyceride	mg/dl	110	48,5	35	94	225	
Wasserlösliche Substanzen							
Harnsäure	mg/dl	4,68	1,45	2,3	4,3	10,4	0,001
Albumin	mg/dl	4165	404	3143	4238	4910	
Blutzucker (Glukose)	mg/dl	91,2	13,2	65,0	89,5	143,0	0,005
Bilirubin	mg/dl	0,54	0,20	0,20	0,50	1,30	5×10^{-5}
Bilirubin (direkt)	mg/dl	0,14	0,07	0,10	0,10	0,40	0,01
Eisenbalance							
Eisen (im Serum)	µmol/L	93	34	26	89	197	
Ferritin (Serum)	µg/L	87	65	8	70	339	5×10^{-7} c
Transferrin	mg/dl	286	52	102	283	462	
Transferrin-Sättigung	%	23	10	5	23	62	

a sofern nicht anders angegeben: Signifikanz des Unterschiedes zu den männlichen Teilnehmern der Studie im t-Test

b signifikanter Unterschied zu den männlichen Teilnehmern der Studie im Mann-Whitney-Wilcoxon-Test (U-Test)

c Der p-Wert der Signifikanz wäre beim Mann-Whitney-Wilcoxon-Test (U-Test) noch kleiner, da die Mediane weiter auseinander liegen.

Tabelle 4: Median Mittel-, Minimal- und Maximalwerte hydrophiler und lipophiler Antioxidantien, sowie der Lipide und der Eisenbalance im Blutserum der 30 Männer in Studie I. Wenn nicht anders angegeben wurde die Signifikanz des Unterschiedes in der jeweiligen Meßwerte zwischen den Frauen und den Männern der Studie I mit dem Student's t-Test berechnet.

Parameter	Einheiten	Mittelwerte	± S.D.	Min.	Median	Max.	Signifikanz^a
Alter	Jahre	68,6	9,7	53	69	86	
Fettlösliche Antioxidantien							
Vitamine & Provitamine							
α-Tocopherol (Vitamin E)	µmol/L	45,7	15,4	17,8	43,6	73,5	
γ-Tocopherol (Vitamin E)	µmol/L	2,45	1,21	0,37	2,32	6,12	
β-Carotin	µmol/L	0,36	0,23	0,05	0,31	1,01	0,04 ^b
α-Carotin	µmol/L	0,08	0,09	0,01	0,05	0,33	0,03 ^b
Lycopin	µmol/L	0,25	0,20	0,05	0,21	1,03	
β-Cryptoxanthin	µmol/L	0,16	0,10	0,05	0,14	0,38	0,01 ^b
Lutein	µmol/L	0,28	0,13	0,06	0,28	0,55	
Zeaxanthin	µmol/L	0,07	0,03	0,03	0,08	0,12	
Retinol (Vitamin A)	µmol/L	2,15	0,68	0,77	2,17	3,82	0,01
Vitamin C	µmol/L	52,3	19,4	16,5	56,3	81,5	0,01

Tabelle 4 (Fortsetzung)

Parameter	Einheiten	Mittelwerte	± S.D.	Min.	Median	Max.	Signifikanz ^a
Lipoproteine, Lipide							
Cholesterin	mg/dl	205	40,6	142	211	298	0,03
LDL-Cholesterin	mg/dl	137	37,0	76	133	212	
Apolipoprotein B	mg/dl	102	21,9	53	103	139	
HDL-Cholesterin	mg/dl	52,0	15,5	24	51	90	0,0002
Triglyceride	mg/dl	108	39,8	49	99	203	
Wasserlösliche Substanzen							
Harnsäure	mg/dl	5,70	1,50	3,20	5,70	10,8	0,001
Albumin	mg/dl	4238	453	3247	4164	4940	
Blutzucker (Glukose)	mg/dl	106	41,1	65,0	98,0	272	0,005
Bilirubin	mg/dl	0,80	0,30	0,40	0,70	1,50	5×10^{-5}
Bilirubin (direkt)	mg/dl	0,19	0,07	0,10	0,20	0,30	0,01
Eisenbalance							
Eisen (im Serum)	µmol/L	104	22	71	102	151	
Ferritin (Serum)	µg/L	182	117	34	175	492	5×10^{-7} ^c
Transferrin	mg/dl	289	51	201	283	415	
Transferrin-Sättigung	%	26	7	15	24	42	

a sofern nicht anders angegeben: Signifikanz des Unterschiedes zu den männlichen Teilnehmern der Studie im t-Test

b signifikanter Unterschied zu den männlichen Teilnehmern der Studie im Mann-Whitney-Wilcoxon-Test (U-Test)

c Der p-Wert der Signifikanz wäre beim Mann-Whitney-Wilcoxon-Test (U-Test) noch kleiner, da die Mediane weiter auseinander liegen.

Während bei den Antioxidantien meistens Frauen einen höheren Gehalt im Serum zeigen, haben sie bei den zusätzlich im Blut bestimmten wasserlöslichen Substanzen meist niedrigere Mittelwerte als die Männer: Harnsäure ist um 19% ($p = 0,001$), der Blutzucker ist um 14% ($p = 0,005$) und das Bilirubin ist um ca. 28% ($p < 0,0001$) niedriger als im Serum der Männer.

Desweiteren ist bei den Frauen ein um 27% höhere HDL-Cholesterinwert ($p = 0,0002$) und bei den Männern ein doppelt so hoher Ferritinwert ($p < 0,0001$) in der Studie I auffällig. Ferritin ist eine wichtige Transport und Speicherform des Eisens (Fe^{2+}) im Organismus. Aus diesem Speicher läßt sich Eisen leicht freisetzen.

Weitere Unterschiede in den Serumwerten zwischen den Geschlechtern sind nicht signifikant ($p > 0,05$).

Im Rahmen zweier Interventionsstudien (Studie II u. III) zur Sonnenschutzwirkung der Carotinoide wurde das Carotinoidprofil der teilnehmenden Probanden vor Studienbeginn untersucht. Die Probanden der Studie II u. III unterscheiden sich von der Gruppe der Studie I (Schwarzwald) dadurch, daß ihr Durchschnittsalter um ca. 40 Jahre geringer ist und aus der Umgebung von Witten (Nordrhein-Westfalen) stammen.

Im Gegensatz zu den Teilnehmern der Studie I zeigt sich in den Studien II u. III kein signifikanter geschlechtsabhängiger Unterschied im Carotinoidprofil (Tabellen 5 u. 6, Seite 43). Die geringe Fallzahl, insbesondere bei den Männern ($n = 15$) könnte möglicherweise ein Grund für das von Studie I abweichende Ergebnis sein. Doch ist der durchschnittliche Altersunterschied (ca. 30 Jahre) zwischen den Teilnehmern der Studie I und den Studien II u. III wahrscheinlich ein weiterer Grund für das von Studie I abweichende Ergebnis. Ein Vergleich der Studie I mit den Studien II u. III zeigt, daß sich das Carotinoidprofil der Studie I insgesamt signifikant vom Carotinoidprofil der Teilnehmer von Studie II u. III unterscheidet. (Tabellen 7 u. 8, Seite 44, 45). Dies gilt insbesondere für die untersuchten Frauen.

Tabelle 5: Carotinoidprofil der weiblichen Probanden der Studien II u. III vor Supplementierungsbeginn (n = 37)

Parameter	Einheiten	Mittelwerte	± SD	Min.	Median	Max.
Alter	Jahre	39,9	11,0	19	42	58
Carotinoide						
β-Carotin	μmol/L	0,67	0,49	0,10	0,56	2,83
α-Carotin	μmol/L	0,16	0,15	0,02	0,14	0,83
Lycopin	μmol/L	0,37	0,13	0,14	0,33	0,63
β-Cryptoxanthin	μmol/L	0,14	0,07	0,05	0,13	0,36
Lutein	μmol/L	0,21	0,07	0,08	0,19	0,38
Zeaxanthin	μmol/L	0,07	0,02	0,03	0,06	0,11

Tabelle 6: Carotinoidprofil der männlichen Probanden der Studien II u. III vor Supplementierungsbeginn (n = 15)

Parameter	Einheiten	Mittelwerte	± SD	Min.	Median	Max.
Alter	Jahre	35,5	9,4	21	35	53
Carotinoide						
β-Carotin	μmol/L	0,50	0,40	0,06	0,45	1,72
α-Carotin	μmol/L	0,13	0,13	0,03	0,10	0,47
Lycopin	μmol/L	0,44	0,19	0,14	0,43	0,89
β-Cryptoxanthin	μmol/L	0,11	0,05	0,05	0,11	0,22
Lutein	μmol/L	0,21	0,10	0,10	0,19	0,47
Zeaxanthin	μmol/L	0,07	0,04	0,03	0,07	0,16

Tabelle 7: Vergleich des Carotinoidprofils der Frauen der Studie I (Alter = 70 Jahre; n = 78) und der Studien II u. III (Alter = 40 Jahre; n = 37).

Parameter	Einheiten	Studie II u. III			Studie I			Signifikanz ^a
		Mittelwerte	± SD	Median	Mittelwerte	± SD	Median	
Alter	Jahre	39,9	11,0	41	70,4	10,5	71	
Carotinoide								
β-Carotin	µmol/L	0,67	0,49	0,45	0,56	0,48	0,41	0,03 ^b
α-Carotin	µmol/L	0,16	0,15	0,10	0,13	0,15	0,08	0,002 ^b
Lycopin	µmol/L	0,37	0,13	0,43	0,21	0,18	0,14	8 x 10 ^{-6c}
β-Cryptoxanthin	µmol/L	0,14	0,07	0,11	0,25	0,19	0,20	0,001 ^b
Lutein	µmol/L	0,21	0,07	0,19	0,28	0,11	0,27	0,0002
Zeaxanthin	µmol/L	0,07	0,02	0,07	0,08	0,04	0,08	0,007

a sofern nicht anders angegeben: Signifikanz des Unterschiedes zwischen der Studie I und den Studien II u. III mit dem Student's t-Test berechnet.

b signifikanter Unterschied beim Mann-Whitney-Wilcoxon-Test (U-Test)

c Der p-Wert der Signifikanz wäre beim Mann-Whitney-Wilcoxon-Test (U-Test) noch kleiner, da die Mediane weiter auseinander liegen.

Tabelle 8: Vergleich des Carotinoidealprofils der Männer der Studie I (Alter = 69 Jahre; n = 30) und der Studien II u. III (Alter = 36 Jahre; n = 15).

Parameter	Einheiten	Studie II u. III			Studie I			Signifikanz ^a
		Mittelwerte	± SD	Median	Mittelwerte	± SD	Median	
Alter	Jahre	35,5	9,4	35	68,6	9,7	69,0	
Carotinoide								
β-Carotin	μmol/L	0,50	0,40	0,45	0,36	0,228	0,31	
α-Carotin	μmol/L	0,13	0,13	0,10	0,082	0,09	0,05	0,01b
Lycopin	μmol/L	0,44	0,19	0,43	0,250	0,20	0,21	0,004
β-Cryptoxanthin	μmol/L	0,11	0,05	0,11	0,162	0,10	0,14	0,059
Lutein	μmol/L	0,21	0,10	0,19	0,278	0,13	0,28	
Zeaxanthin	μmol/L	0,07	0,04	0,07	0,074	0,03	0,08	

a sofern nicht anders angegeben: Signifikanz des Unterschiedes zwischen der Studie I und den Studien II u. III mit dem Student's t-Test berechnet.

b signifikanter Unterschied beim Mann-Whitney-Wilcoxon-Test (U-Test)

Bei den jüngeren Frauen der Studien II u. III ist die Serumgehalt an Cryptoxanthin (Median) um 50% ($p_{(U\text{-Test})} = 0,001$), an Lutein (Mittelwert) um 24% ($p = 0,0002$) und an Zeaxanthin (Mittelwert) um 23% ($p = 0,007$) niedriger als bei den älteren Frauen der Studie I. Der Lycopinmedian im Serum ist dagegen in der Studie II u. III um 200% ($p_{(U\text{-Test})} < 0,0001$) höher. Bei den Frauen der Studien II u. III sind die Mediane des β -Carotingehalts (10% $p_{(U\text{-Test})} = 0,03$) und α -Carotingehalts (24% $p_{(U\text{-Test})} = 0,002$) ebenfalls im Vergleich zu den Frauen der Studie I signifikant erhöht.

Auch der Vergleich der männlichen Teilnehmern der Studie I und der Studie II u. III zeigt signifikante Unterschiede. Wie bei den Frauen, ist bei den jüngeren Männern (Studien II u. III) der Lycopinwert um 117% ($p = 0,004$) höher und der Cryptoxanthinwert um 35% ($p = 0,059$) niedriger als die entsprechenden Werte der älteren Männer der Studien I. Bei den Männern sind noch die höheren α -Carotin- und β -Carotinmedianwerte im Serum bei den Probanden der Studien II u. III auffällig (98% bzw. 46%). Doch ist nur der Unterschied für den α -Carotingehalt im U-Test signifikant ($p = 0,01$).

3.1.3. Gegenseitige Abhängigkeiten lipophiler und hydrophiler Antioxidantien, sowie der Lipide, des Eisengehalts im Serum

Um mögliche Abhängigkeiten des Gehalts ausgewählter Serumparameter und des Alters aufzuzeigen, wurden in einem systematischen Verfahren alle Permutationen der Serumwerte der Probanden zueinander in Beziehung gesetzt. Dabei wurde ein linearer Zusammenhang zwischen den Parametern vorausgesetzt. Bestimmt wurde der Korrelationskoeffizient r . Dieser erlaubt eine Aussage über die Stärke der mathematischen Abhängigkeit der beiden getesteten Parameter und gibt zusätzlich durch das Vorzeichen an, ob die Abhängigkeit proportional oder umgekehrt proportional ist. Die Korrelationskoeffizienten der Meßwerte des Serumgehalts und des Alters der Studie I sind in Tabellen 9 und 10 (Seite 47, 48) gezeigt. Die in diesem Kapitel angegebenen Signifikanzen wurden mit dem Student's t-Test berechnet.

Tabelle 9: Korrelationen zwischen dem Gehalt von Antioxidantien, Vitaminen und Lipiden im Serum angegeben als Bestimmtheitsmaß r . Die untersuchte Gruppe besteht aus 78 Frauen im Alter von 50-90 Jahren (Studie D). Für alle fettgedruckten r gilt: $r \neq 0$ ($p = 0,01$) und ein linearer Trend ($p = 0,001$).

	Zea.	β -Cry.	Lyc.	α -Car.	β -Car.	α -Toc.	γ -Toc.	Vit.C	Ret.	Trigly.	HDL	LDL	Alb.	Harns.	Eisen	Alter
Lut.	0,50	0,20	0,09	0,33	0,28	0,11	-0,03	0,18	0,03	-0,25	0,37	-0,03	0,09	-0,09	0,15	-0,15
Zea.		0,34	0,02	0,25	0,16	0,17	0,00	0,23	0,04	-0,22	0,27	0,04	0,24	-0,21	0,21	-0,24
β -Cry.			0,25	0,27	0,41	-0,03	0,14	0,29	-0,11	-0,24	0,16	0,06	0,26	-0,21	0,11	-0,20
Lyc.				0,06	0,27	-0,13	0,27	0,04	-0,23	-0,10	0,11	0,22	0,04	0,06	0,02	-0,17
α -Car.					0,06	-0,08	0,00	0,30	-0,33	-0,26	0,14	0,03	0,18	-0,26	0,24	-0,09
β -Car.						0,00	-0,02	0,46	-0,21	-0,29	0,16	0,07	0,23	-0,09	0,19	-0,13
α -Toc.						0,09	0,13	0,30	0,30	0,20	0,03	0,28	0,01	0,10	-0,13	0,08
γ -Toc.							-0,03	-0,03	0,09	-0,02	0,07	0,12	-0,05	-0,16	-0,02	-0,02
Vit.C									-0,14	-0,10	0,27	0,12	0,43	-0,17	0,30	-0,03
Ret.										0,26	-0,15	-0,13	-0,32	0,09	-0,15	-0,10
Trigly.											-0,48	0,35	0,29	0,48	-0,07	-0,28
HDL												-0,04	0,23	-0,28	0,30	-0,04
LDL													0,37	0,27	0,00	0,11
Alb.														0,01	0,21	0,00
Harns.															-0,12	0,32
Eisen																-0,20

Lut. = Lutein Zea. = Zeaxanthin β -Cry. = β -Cryptoxanthin Lyc. = Lycopin α -Car. = α -Carotin
 β -Car. = β -Carotin α -Toc. = α -Tocopherol γ -Toc. = γ -Tocopherol Vit.C = Vitamin C Ret. = Retinol (Vitamin A)
Trigly. = Triglyceride HDL = HDL-Cholesterin LDL = LDL-Cholesterin Alb. = Serumalbumin Harns. = Harnsäure

Tabelle 10: Korrelationen zwischen dem Gehalt von Antioxidantien, Vitaminen und Lipiden im Serum angegeben als Bestimmtheitsmaß r . Die untersuchte Gruppe besteht aus 30 Männern im Alter von 53-86 Jahren (Studie I). Für alle fettgedruckten r gilt: $r \neq 0$ ($p = 0,01$) und ein linearer Trend ($p = 0,001$).

	Zea.	β -Cry.	Lyc.	α -Car.	β -Car.	α -Toc.	γ -Toc.	Vit.C	Ret.	Trigly.	HDL	LDL	Alb.	Harns.	Eisen	Alter
Lut.	0,87	0,37	-0,05	0,55	0,46	0,06	-0,31	0,24	0,06	-0,33	0,27	-0,14	-0,17	0,01	-0,41	-0,09
Zea.		0,31	0,06	0,43	0,33	0,09	-0,21	0,09	0,17	-0,20	0,34	-0,05	-0,11	0,13	-0,35	0,00
β -Cry.			-0,03	0,31	0,24	0,01	0,15	0,32	0,20	-0,15	0,12	0,05	0,31	0,13	-0,36	-0,37
Lyc.				0,15	0,21	-0,34	-0,32	0,16	-0,40	-0,09	0,17	0,18	0,24	0,23	0,10	-0,07
α -Car.					0,02	-0,39	-0,35	0,22	-0,29	-0,36	0,21	-0,14	0,08	-0,04	-0,12	-0,30
β -Car.						-0,24	-0,24	0,42	-0,17	-0,34	0,12	-0,11	-0,03	0,10	-0,10	-0,21
α -Toc.							0,31	0,06	0,64	0,35	-0,24	0,15	-0,43	-0,18	-0,07	0,08
γ -Toc.								-0,26	0,53	0,21	-0,29	-0,01	0,00	0,13	-0,25	-0,16
Vit.C									-0,23	-0,35	0,13	0,02	-0,16	0,11	-0,33	0,04
Ret.										0,36	-0,08	0,25	-0,05	0,19	-0,01	0,05
Trigly.											-0,33	0,46	-0,29	0,05	0,14	0,25
HDL												0,02	0,45	0,53	0,00	0,11
LDL													0,33	0,04	0,03	0,04
Alb.														0,34	0,33	-0,21
Harns.															0,03	0,02
Eisen																-0,8

Lut. = Lutein Zea. = Zeaxanthin β -Cry. = β -Cryptoxanthin Lyc. = Lycopin α -Car. = α -Carotin
 β -Car. = β -Carotin α -Toc. = α -Tocopherol γ -Toc. = γ -Tocopherol Vit.C = Vitamin C Ret. = Retinol (Vitamin A)
Trigly. = Triglyceride HDL = HDL-Cholesterin LDL = LDL-Cholesterin Alb. = Serumalbumin Harns. = Harnsäure

Bei den Frauen der Studie I wurden insgesamt 14 statistisch signifikante lineare Korrelationen mit $p < 0,01$ gefunden. 32 weitere Korrelationen weisen eine Signifikanz von $p < 0,05$ auf. Auf letztere soll im Folgendem nur in besonderen Fällen eingegangen werden.

Die stärkste lineare Abhängigkeit zeigt sich bei den Frauen der Studie I (Tabelle 9, Seite 47) zwischen dem Lutein- und Zeaxanthingehalt ($r = 0,5$) im Serum. Desweiteren korreliert der Lutein- mit dem HDL-Cholesterin- ($r = 0,37$) und dem α -Carotingehalt ($r = 0,33$) im Serum. Beide Korrelationen lassen sich, wenn auch schwächer ($p < 0,05$) für den Zeaxanthingehalt finden (HDL: $r = 0,27$; α -Carotin: $r = 0,25$). Darüber hinaus gibt es eine Abhängigkeit zwischen dem Zeaxanthin- und dem β -Cryptoxanthingehalt ($r = 0,34$) im Blutserum. Ein weiteres Netzwerk von sich gegenseitig bedingender Abhängigkeiten besteht zwischen dem β -Cryptoxanthin-, dem β -Carotin- und dem Vitamin C-Gehalt im Serum. Der β -Carotingehalt korreliert stark mit dem Vitamin C-Gehalt ($r = 0,46$) und dem β -Cryptoxanthingehalt ($r = 0,41$) im Serum. Die Korrelation zwischen dem Vitamin C-Gehalt und dem β -Cryptoxanthingehalt ($r = 0,29$) im Serum ist in diesem Netzwerk von Abhängigkeiten ebenfalls vorhanden, doch schwächer ($p < 0,05$). Eine schwächere Korrelation mit einer niedrigeren Signifikanz spricht dafür, daß es keine direkte Korrelation zwischen dem Vitamin C-Gehalt und dem β -Cryptoxanthingehalt im Serum gibt. Dieser Korrelation entsteht indirekt durch β -Carotin, weil sowohl der β -Cryptoxanthingehalt, als auch dem Vitamin C-Gehalt eine starke Korrelation zum β -Carotingehalt im Serum aufweisen.

Eine deutliche Korrelation ($p < 0,01$) zeigt sich zwischen dem Vitamin C-Gehalt und dem Albumingehalt ($r = 0,43$) im Serum. Ebenso zeigen sich die damit verknüpften Korrelationen zum β -Cryptoxanthingehalt ($r = 0,26$) und zum β -Carotingehalt ($r = 0,23$), die wiederum schwächer sind ($p < 0,05$).

Der Retinolgehalt korreliert signifikant negativ mit dem α -Carotingehalt ($r = - 0,33$) und signifikant positiv mit dem Albumingehalt ($r = - 0,32$) im Serum. In diesem Fall sind aber die indirekten Folgekorrelationen zwischen dem α -Carotingehalt und dem Albumingehalt nicht mehr signifikant. Die beiden Korrelationen des Retinolgehalts sind zu schwach, um sich über ein weiteres Glied signifikant fortzupflanzen, da ein Korrelationskoeffizient von $r = 0,31$ die Grenze für hohe Signifikanzen ($p = 0,01$) bildet.

Der Gehalt an Triglyceriden im Serum korreliert negativ mit dem HDL- und positiv mit dem LDL-Cholesteringehalt ($r = - 0,48$, bzw. $r = 0,35$), sowie ebenfalls positiv mit dem Harnsäuregehalt ($r = 0,48$). Der Harnsäuregehalt korreliert wiederum signifikant ($p < 0,01$; $r = 0,32$) mit dem Alter. Auch die sich aus den Korrelationen des Gehalts an Triglyceriden und

der Harnsäure ergebenen Folgekorrelationen lassen sich, wenn auch mit niedriger Signifikanz ($p < 0,05$), finden.

In der Männergruppe (Tabelle 10, Seite 48) wurden 7 statistisch signifikante Korrelationen mit $p < 0,01$ und 27 weitere Korrelationen mit einer Signifikanz von $p < 0,05$ gefunden. Auf Grund der geringen Gruppengröße sind nur hohe Korrelationskoeffizienten signifikant. Der Luteingehalt korreliert auch in dieser Gruppe signifikant ($p < 0,01$) mit dem Zeaxanthingehalt ($r = 0,87$) und dem α -Carotingehalt ($r = 0,55$) im Serum. Die bei Frauen gefundene Korrelation zwischen dem Lutein- und dem HDL-Cholesteringehalt im Serum wird bei den Männern nicht gefunden. Die Signifikanz der Abhängigkeit zwischen dem Lutein- und dem β -Carotingehalt ($r = 0,46$; $p = 0,01$) ist bei den Männern größer als bei den Frauen ($p < 0,05$). Durch die starke Korrelation zwischen dem Zeaxanthin- und dem Luteingehalt findet sich ebenfalls ein signifikanter Zusammenhang ($p < 0,05$) zwischen dem Zeaxanthin- und dem α - bzw. dem β -Carotingehalt ($r = 0,43$ bzw. $r = 0,33$) im Serum.

Anders als bei den Frauen der Studie I korreliert Retinolgehalt im Serum der Männer signifikant mit dem α - und dem γ -Tocopherolgehalt ($r = 0,64$, $p < 0,01$). Bei den Frauen wird nur die Korrelation zum α -Tocopherolgehalt ($p = 0,05$) mit geringerer Signifikanz als bei den Männern ($p < 0,01$) gefunden.

Weitere signifikante Korrelationen ($p < 0,01$) in der Männergruppe werden zwischen dem Gehalt an Triglyceriden und dem LDL-Cholesteringehalt ($r = 0,46$) und dem Harnsäuregehalt und dem HDL-Cholesteringehalt ($r = 0,53$) im Serum gefunden.

Auffällig bei den Männern der Studie I ist die negative Korrelation des Gehalts sämtlicher Xanthophylle mit dem Eisengehalt des Serums (Lutein: $r = -0,41$; Zeaxanthin $r = -0,35$; β -Cryptoxanthin $= -0,36$), wenn auch die Signifikanz mit $p < 0,05$ gering ist. Für die Frauen der Studie I zeigt sich im Serum nur für den Zeaxanthingehalt eine gering signifikante Korrelation ($p = 0,05$) zum Eisengehalt im Serum, diese Korrelation ist aber positiv.

Die Abhängigkeitsbeziehungen des Gehalts der Serumcarotinoide wurde ebenso für die Männer und Frauen der Studien II u. III berechnet. Auch hier bestätigen sich die in den Daten der Studie I gefundenen Zusammenhänge. Der Luteingehalt im Serum korreliert mit dem Zeaxanthingehalt ($r = 0,78$ Frauen; $r = 0,70$ Männer) und dem α -Carotingehalt ($r = 0,45$ Frauen; $r = 0,40$ Männer). Genauso wird für die Korrelation zwischen dem Zeaxanthingehalt und dem β -Cryptoxanthingehalt im Serum der Frauen ein deutlich höherer Korrelationskoeffizient gefunden als bei den Männern ($r = 0,51$ Frauen; $r = 0,30$ Männer). Der einzige Unterschied ist, daß sowohl bei den Frauen als auch bei den Männern der Studien

II u. III eine Korrelation zwischen dem α -Carotingehalt und dem β -Carotingehalt im Serum gefunden wurde ($r = 0,78$ Frauen; $r = 0,59$ Männer). Alle bei den Frauen der Studien II u. III angegebenen Korrelationen sind hoch signifikant ($p = 0,01$). Aufgrund der geringen Anzahl männlicher Probanden in den Studien II u. III haben nur Abhängigkeitsbeziehungen zwischen dem Luteingehalt und dem Zeaxanthingehalt, sowie zwischen dem α - und dem β -Carotingehalt eine nur Signifikanz von $p < 0,5$. Da in den Studien II u. III mit geringerer Teilnehmerzahl, abgesehen von der signifikanten Korrelation zwischen dem α - und dem β -Carotingehalt, keine neuen Informationen aus den Abhängigkeitsbeziehungen des Gehalts der verschiedenen Serumcarotinoide gewonnen wurden, sind die Einzelwerte für r nicht extra in einer Tabelle aufgeführt.

3.2. *UV-induzierte Lipidperoxidation in humanen Hautfibroblasten*

Im vorigem Abschnitt ist der allgemeine Antioxidantienstatus im Blutserum zweier Gruppen (Studie I und Studie II u. III) untersucht worden. Ein besonderes Augenmerk wurde dabei auf das Carotinoidprofil der Probanden gelegt. Wie in der Literatur bereits beschrieben, korreliert der Carotinoidserumgehalt mit dem Carotinoidgehalt in der Haut [85]. Ebenso haben Interventionsstudien gezeigt, daß β -Carotinsupplementierung die UV-induzierte Erythembildung in der Haut vermindert. Das UV-induzierte Erythem ist ein anerkanntes Maß für die Strahlungsschädigung der Haut. Photooxidativer Streß ist ein Mechanismus der Hautschädigung durch UV-Strahlung, der zur Erzeugung von ROS führt. Folge der durch ROS bedingten Verschiebung des Redoxgleichgewichtes der Zelle zu oxidativen Bedingungen hin ist unter anderem ein Anstieg der Lipidperoxidation in den Zellmembranen, wogegen die lipidlöslichen Carotinoide die Zelle schützen könnten.

3.2.1. Beschreibung des Hautfibroblastenmodellsystems zur Untersuchung UV-induzierter Lipidperoxidation

Hautfibroblasten dienen in dieser Arbeit als Modell, um die Konzentrationsabhängigkeit und die Stärke der Schutzwirkungen der einzelnen Carotinoide und deren Kombinationen an Hand der TBARS-Bildung nach UV-Bestrahlung zu quantifizieren. In der Literatur ist von Morlière et al. [47] eine UV-induzierte Lipidperoxidation an Hand der Bildung thiobarbitursäurereaktiver Substanzen (TBARS) in Hautfibroblasten bereits gezeigt worden. Der Versuchsaufbau, mit dem hier die photoprotektive Wirkung der Carotinoide untersucht werden soll, ist in Abbildung 11 (Seite 53) gezeigt und entspricht in Bezug auf Strahlungs-dosis, Intensität und Postinkubationszeit der Versuchsanordnung von Morlière et al. [47, 105]. Erweitert wurde dieses System um Liposomen als Transportvehikel für Carotinoide in die Hautfibroblasten. Dabei wird 1,2-Dipalmitoyl-sn-Glycero-phosphatidylcholin als Trägerlipid verwendet, um keine ungesättigten Fettsäuren, die zur TBARS-Bildung beitragen könnten, in das System einzuschleusen. Aufgrund der begrenzten Aufnahme der Liposomen (Einbaueffizienz der Carotinoide 0,6-3%) innerhalb der 16 Stunden Inkubation werden die Zellen mit Liposomen hoher Carotinoidkonzentration (2-28 μ M im Zellmedium) inkubiert. Vor der UV-Bestrahlung werden Medium und Liposomen entfernt

und durch HBSS-Puffer ersetzt, um Effekte des Kulturmediums und der Liposomen auf den Versuch auszuschließen [106]. Durch eine Messung der Lactatdehydrogenaseaktivität im HBSS-Puffer, soll die Möglichkeit einer Zellyse der Fibroblasten während des Versuchs untersucht werden.

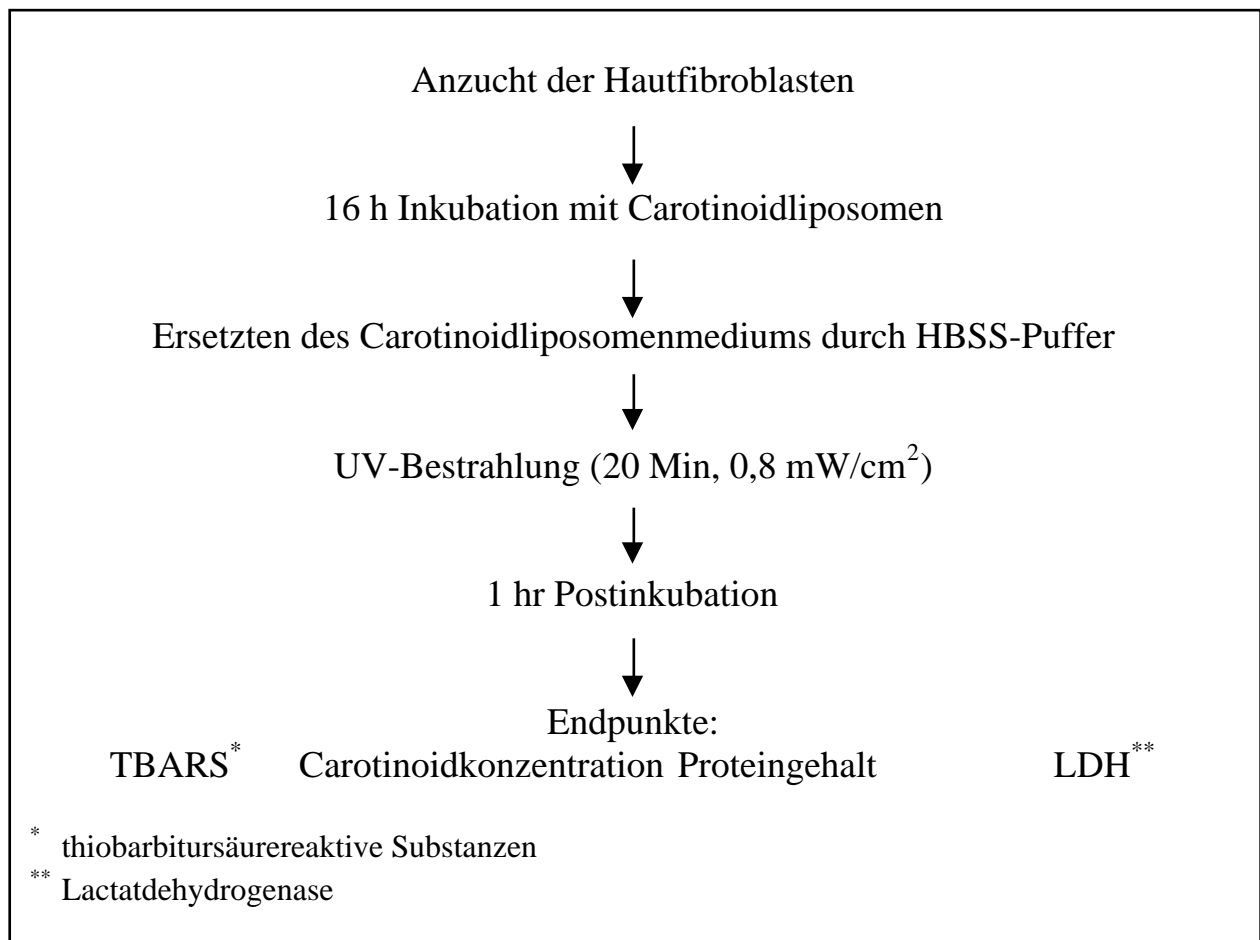


Abbildung 11: Versuchsaufbau zur Testung der photoprotektiven Wirkung von Carotinoiden und anderer Substanzen im Hautfibroblastenmodell.

Quantifiziert werden die TBARS in der vorliegenden Arbeit als MDA-Äquivalente. Das bedeutet, daß das Reaktionsprodukt aus Thiobarbitursäure und Malondialdehyd (MDA) als Mengenstandard für die Gesamtheit aller im Versuch entstandenen TBARS verwendet wurde. Zur besseren Vergleichbarkeit der Versuche werden die gebildeten TBARS auf den Proteingehalt der Zellen normiert, um damit Schwankungen in der Zelldichte in den einzelnen

Versuchsansätzen auszugleichen. Folgende Versuche dienen der Charakterisierung des verwendeten Hautfibroblastenmodells (Tabelle 11).

Auch bei unbestrahlten Hautfibroblasten wird TBARS-Bildung nachgewiesen ($0,34 \pm 0,14$ pmol/ μ g Protein). Nach Bestrahlung erhöht sich der Gehalt an TBARS in den Hautfibroblasten um den Faktor 4 auf $1,4 \pm 0,14$ pmol/ μ g Protein. Der Effekt der UV-induzierten Lipidperoxidation ist somit in diesem System nachweisbar.

Das Maximum der TBARS-Bildung, das unter den vorgegebenen Versuchsbedingungen nach UV-Bestrahlung und der 1 stündigen Postinkubation erreicht wird, sollte durch Zugabe von FeSO₄ als Katalysator der Lipidperoxidation nach der Bestrahlung untersucht werden. Wird FeSO₄ nach der Bestrahlung zu den Zellen gegeben, werden $14,07 \pm 1,54$ pmol TBARS / μ g Protein gebildet. Dies ist die zehnfache Menge des Experimentes ohne FeSO₄. Auch in diesem Experiment ist die Zellmembran der Hautfibroblasten nach der Postinkubation noch intakt. Im Bestrahlungsmedium wird Lactatdehydrogenase nur nach mechanischer Zertrümmerung der Zellmembran der Fibroblasten nachgewiesen. Somit lassen sich mit dem Hautfibroblastenmodell auch mögliche prooxidative Effekte der Carotinoide untersuchen. In unbestrahlten Hautfibroblasten wird unter Zugabe von FeSO₄ als Katalysator der Lipidperoxidation nur etwa die Hälfte an TBARS ($6,79 \pm 0,14$ pmol/ μ g Protein) im Vergleich zu der entsprechenden bestrahlten Zellen gefunden.

Tabelle 11: Vergleich der TBARS-Bildung mit und ohne UV-Bestrahlung in Hautfibroblasten

	bestrahlt		unbestrahlt	
	TBARS/Protein pmol/ μ g	\pm S.D.	TBARS/Protein pmol/ μ g	\pm S.D.
unbeladene Liposomen	1,40	0,19	0,34	0,14
0,5 mM Fe ₂ SO ₄ + unbeladene Liposomen	14,07	1,54	6,79	0,14

3.2.1. Konzentrationsabhängigkeit der photoprotektiven Wirkung einzelner Carotinoide

Die Abbildungen 12-14 (Seite 56-58) zeigen die TBARS-Bildung nach UV-Bestrahlung in Abhängigkeit des Carotinoidgehalts bezogen auf den Proteingehalt der Hautfibroblasten für β -Carotin, Lycopin und Lutein. Alle getesteten Carotinoide zeigen einen ähnlichen Verlauf der Abhängigkeit zwischen der UV-induzierten TBARS-Bildung und dem Carotinoidgehalt der Hautfibroblasten. Charakterisiert werden diese Kurven durch drei Merkmale:

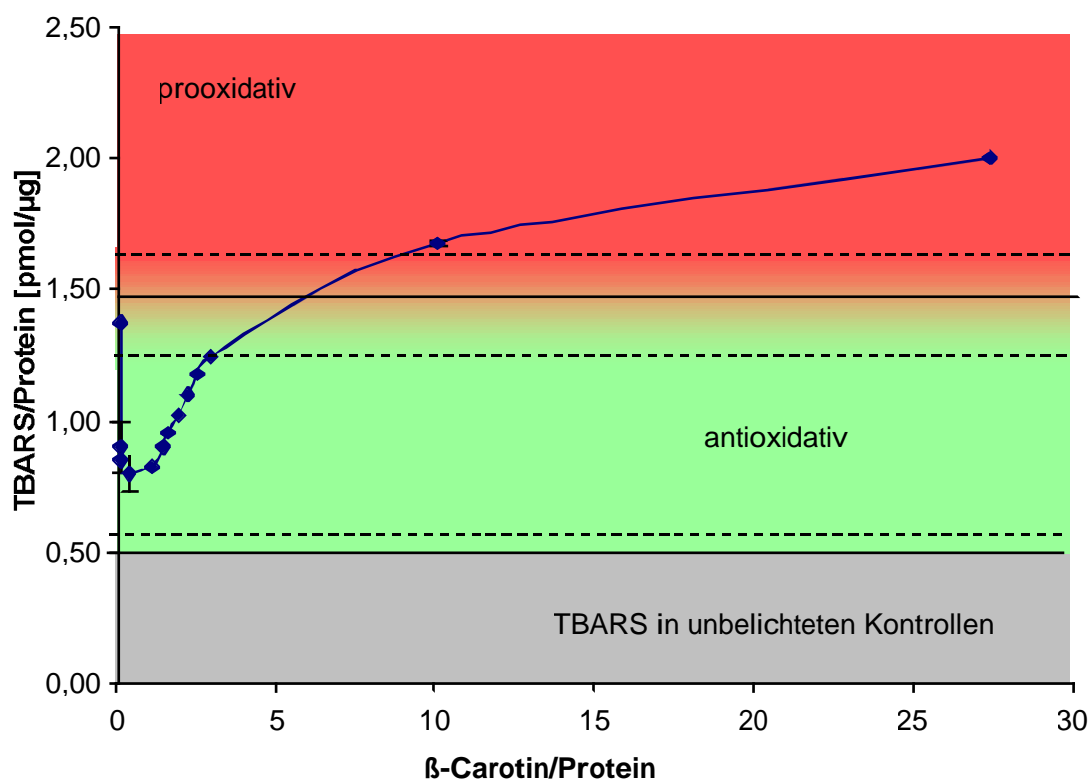
- **maximale Schutzwirkung:** maximale Verminderung der UV-induzierten TBARS-Bildung durch das Carotinoid
- **optimale Schutzkonzentration:** Carotinoidgehalt der Hautfibroblasten, bei dem das Carotinoid die maximale Schutzwirkung gegen UV-induzierte TBARS-Bildung zeigt.
- **Größe des Konzentrationsbereichs,** in dem eine Schutzwirkung gegen UV-induzierte TBARS-Bildung der Carotinoide zu beobachten ist.

Abbildung 12 (Seite 56) zeigt die TBARS-Bildung nach UV-Bestrahlung in Abhängigkeit von der β -Carotiningehalt bezogen auf den Proteingehalt der Hautfibroblasten. Die optimale Schutzkonzentration gegen Lipidperoxidation ist bei 0,4 pmol β -Carotin/ μ g Protein zu beobachten. Bei diesem Carotinoidgehalt ist die TBARS-Bildung gegenüber den ebenfalls bestrahlten Kontrollzellen um 45% vermindert (β -Carotin: $0,8 \pm 0,07$ pmol TBARS/ μ g Protein; Kontrolle $1,44 \pm 0,23$ pmol TBARS/ μ g). Ein höherer β -Carotiningehalt der Zellen führt zu keiner Steigerung des Schutzes vor photooxidativem Streß, sondern β -Carotin wirkt im Gegenteil bei einem Gehalt > 10 pmol/ μ g prooxidativ. Die Größe des Konzentrationsbereichs von β -Carotin, in dem eine Schutzwirkung gegen UV-induzierte TBARS-Bildung erreicht wird, reicht von 0,13 bis 2,97 pmol β -Carotin/ μ g Protein.

Die Konzentrationsabhängigkeit der TBARS-Bildung für Lycopin (Abbildung 13, Seite 57) zeigt eine optimale Schutzkonzentration für die Lipide in der Fibroblastenzelle bei 0,05 pmol Lycopin/ μ g Protein. Diese liegt bei ungefähr einem Achtel der optimalen

Abbildung 12: Abhängigkeit des photoprotektiven Effektes vom β -Carotiningehalt in Hautfibroblasten

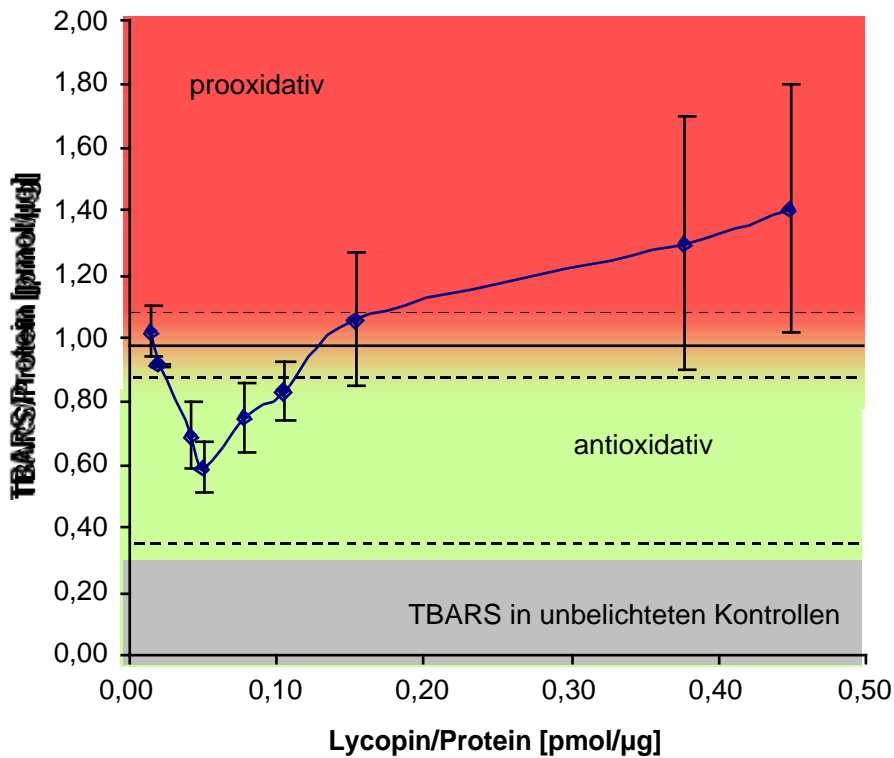
β-Carotin				Kontrolle	
bestrahlt				bestrahlt	unbestrahlt
β -Car./Prot.	TBARS/Prot.	\pm S.D.	Anzahl der	TBARS/Prot.	TBARS/Prot.
$\mu\text{mol}/\mu\text{g}$	$\mu\text{mol}/\mu\text{g}$		Messungen	$\mu\text{mol}/\mu\text{g}$	$\mu\text{mol}/\mu\text{g}$
0,11	1,38			1,40	0,47
0,13	0,90	0,098	4	1,33	0,48
0,17	0,85			1,25	0,59
0,40	0,80	0,067	4	1,88	0,48
1,10	0,83			1,45	0,35
1,48	0,90			1,28	0,46
1,62	0,95			1,33	
2,00	1,03			1,64	
2,27	1,10			1,41	
2,51	1,18			1,30	
2,97	1,25			1,59	
10,07	1,68	0,007	2	1,58	
27,42	2,00			1,02	
				1,77	
				Mittelwert	1,44
				\pm S.D.	0,23
					0,47
					0,08



— Mittelwert der Kontrolle S.D. Standardabweichung der Kontrolle
 - - - Standardabweichung der Kontrolle

Abbildung 13: Abhängigkeit des photoprotektiven Effektes vom Lycopingehalt in Hautfibroblasten

Lycopin				Kontrolle	
belichtet				belichtet	unbelichtet
Car./Prot.	TBARS/Prot.	±S.D.	Anzahl der	TBARS/Prot.	TBARS/Prot.
pmol/µg	pmol/µg		Messungen	pmol/µg	pmol/µg
0,016	1,02	0,08	3	1,06	0,26
0,021	0,92	0,00	2	1,05	0,34
0,043	0,70	0,10	2	0,87	0,34
0,050	0,59	0,08	2	1,05	0,33
0,079	0,75	0,11	7	1,06	0,27
0,106	0,83	0,10	5	1,15	0,44
0,153	1,06	0,21	5	0,95	
0,378	1,30	0,40	3	0,84	
0,448	1,41	0,39	3	0,83	
				0,91	
				Mittelwert	0,98
				± S.D.	0,11
					0,33
					0,06



— Mittelwert der Kontrolle S.D. Standardabweichung der Kontrolle
 - - - - Standardabweichung der Kontrolle

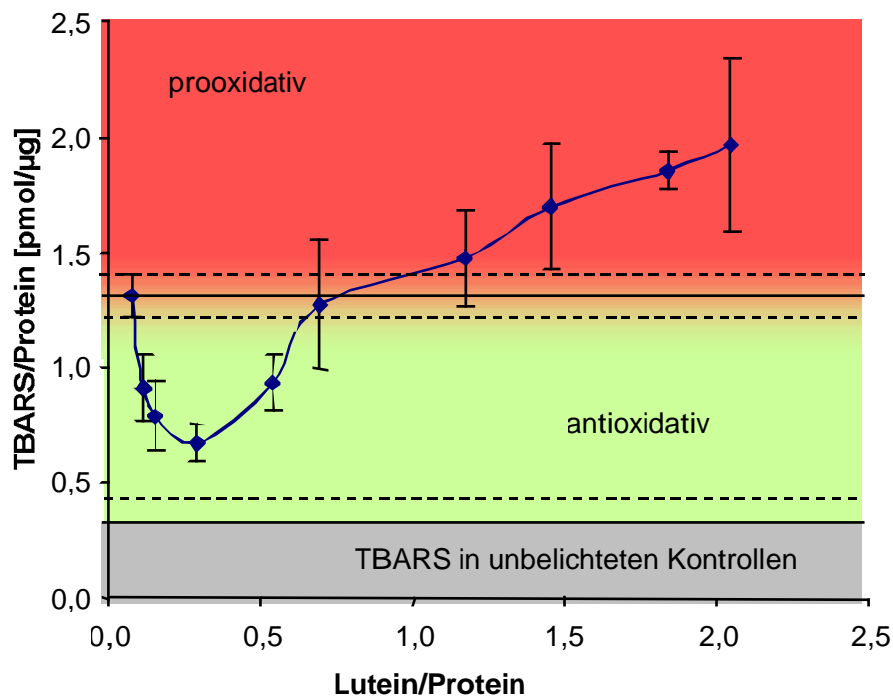
Abbildung 14: Abhängigkeit des photoprotektiven Effektes vom Luteingehalt in Hautfibroblasten

Lutein

belichtet Car./Prot. pmol/µg	TBARS/Prot. pmol/µg	±S.D.	Anzahl der Messungen
0,074	1,32	0,09	3
0,115	0,91	0,14	2
0,154	0,79	0,15	4
0,286	0,67	0,08	3
0,537	0,93	0,12	3
0,691	1,28	0,28	7
1,172	1,48	0,21	6
1,453	1,70	0,27	5
1,841	1,86	0,08	2
2,045	1,96	0,38	3

Kontrolle

belichtet TBARS/Prot. pmol/µg	unbelichtet TBARS/Prot. pmol/µg
1,18	0,48
1,42	0,29
1,24	0,43
1,33	0,29
1,43	
1,32	
1,20	
1,45	
1,46	
1,38	
Mittelwert	1,30
± S.D.	0,10



S.D. Standardabweichung der Kontrolle

Standardabweichung der Kontrolle

— Mittelwert der Kontrolle

Schutzkonzentration von β -Carotin. In diesem niedrigen Konzentrationsbereich vermag β -Carotin die Zellen noch gar nicht zu schützen (0,11 pmol β -Carotin / μ g Protein \Rightarrow 1,38 pmol TBARS/ μ g Protein). Für Lycopin wird aber bereits bei einer Konzentration von ca. 0,15 pmol Lycopin/ μ g Protein eine Steigerung der TBARS-Bildung gefunden. In diesem Bereich beginnt β -Carotin überhaupt erst eine photoprotektive Wirkung zu zeigen. Lycopin besitzt somit diesem Modellsystem nur einen sehr schmale Konzentrationsbereich von 0,02-0,15 pmol Lycopin/ μ g Protein in dem eine Schutzwirkung zu beobachten ist. Im Hautfibroblastenmodell zeigt Lycopin eine maximale Schutzwirkung von 40% (Kontrolle $0,97 \pm 0,11$ pmol/ μ g Protein; Lycopin: $0,59 \pm 0,08$ pmol/ μ g Protein).

Eine Konzentrationsabhängigkeit, die zwischen den beiden Extremen von Lycopin und β -Carotin liegt, zeigt Lutein (Abbildung 14, Seite 58). Für Lutein liegt die optimale Schutzkonzentration bei 0,29 pmol Lutein/ μ g Protein (Kontrolle: $1,30 \pm 0,10$ pmol TBARS/ μ g Protein; Lutein: $0,67 \pm 0,08$ pmol TBARS/ μ g Protein). In diesem Fall beträgt die maximale Schutzwirkung 49 % gegenüber der Kontrolle. Lutein wirkt ab einem Gehalt von 1,2 pmol/ μ g Protein prooxidativ in der Hautfibroblastenkultur. Der Konzentrationsbereich in dem eine Schutzwirkung von Lutein erreicht wird, reicht von 0,07 bis 0,69 pmol Lutein/ μ g Protein.

In diesem Modellsystem zeigt Lutein bei optimaler Schutzkonzentration die größte maximale Schutzwirkung (ca. 49%). Doch ist der Unterschied zu β -Carotin (ca. 45%) und Lycopin (ca. 40%) nicht sehr groß. Einen deutlichen Unterschied zwischen den Carotinoiden findet man bei der optimalen Schutzkonzentration. Lycopin zeigt seine maximale Schutzwirkung bei einer Konzentration, die 6 bzw. 8 fach niedriger ist als bei Lutein bzw. β -Carotin.

Somit ist Lycopin (optimale Schutzkonzentration: 0,05 pmol Lycopin/ μ g Protein) von den getesteten Carotinoiden das potenteste Carotinoid zur Verminderung der UV-induzierten TBARS-Bildung. Die auffällige Eigenschaft von β -Carotin ist, daß es von den getesteten Carotinoiden den größten Konzentrationsbereich, in dem eine Schutzwirkung vor UV-induzierter TBARS-Bildung erreicht wird, besitzt (von 0,13 bis 2,97 pmol β -Carotin/ μ g Protein). Der Konzentrationsbereich, in dem β -Carotin seine Schutzwirkung zeigt, ist fünfmal größer als der von Lutein und 22 mal größer als der von Lycopin. Zudem scheint die antioxidative Wirkung von β -Carotin in einem Bereich von ca. 0,25 pmol/ μ g Protein bis 1,2 pmol/ μ g Protein unabhängig vom β -Carotingehalt der Hautfibroblasten zu sein.

3.2.2. UV-Schutz der Zelle durch Kombinationen verschiedener Carotinoide

Um eine mögliche Wechselwirkung der Carotinoide miteinander bei der Verminderung des UV-induzierten TBARS-Bildung abzuschätzen, soll im Folgenden die photoprotektive Wirkung von Carotinoidmischungen aus β -Carotin, Lycopin und Lutein untersucht werden. Ebenso soll die Frage beantwortet werden, ob sich die für alle Carotinoide maximale Schutzwirkung von 40-50% Verminderung der UV-induzierten TBARS-Bildung mit einer Carotinoidkombination steigern läßt. Jedes Carotinoid soll dabei in seiner optimalen Schutzkonzentration eingesetzt werden. Daraus ergibt sich ein molares Verhältnis für die Carotinoide von 39:7:54 (Lutein:Lycopin: β -Carotin) in den Fibroblastenzellen. In den Versuchen zeigte sich jedoch, daß sich die Carotinoide beim Einbau in die Fibroblastenzellen gegenseitig beeinflussen und der Carotinoidgehalt der Hautfibroblasten nur bedingt einzustellen war. Daraufhin wurden Carotinoidmischungen mit verschiedenen Anteilen an Lutein, β -Carotin und Lycopin getestet (Abbildungen 15-18, Seite 61-64). Auch die UV-induzierte TBARS-Bildung in Abhängigkeit vom Gesamtcarotinoidgehalt läßt sich durch die maximale Schutzwirkung, die optimale Schutzkonzentration und dem Konzentrationsbereich des Schutzes vor UV-induzierten TBARS-Bildung charakterisieren.

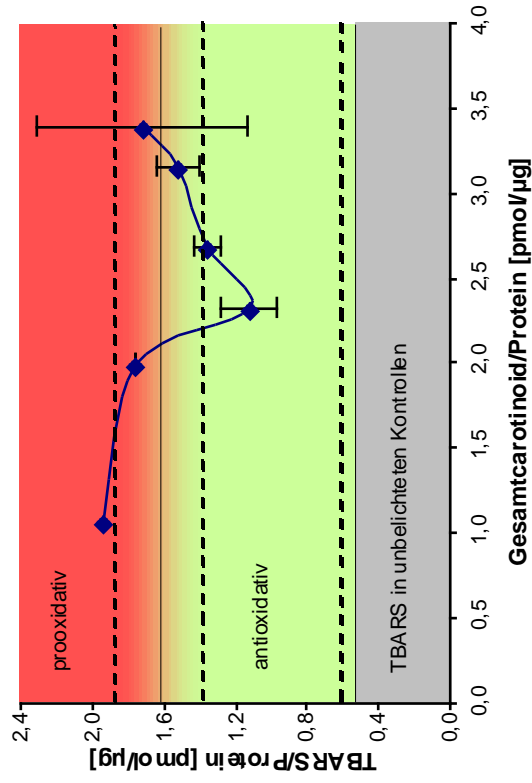
Abbildung 15 (Seite 61) veranschaulicht die Konzentrationsabhängigkeit der TBARS-Bildung für ein Carotinoidverhältnis 47:4:49 (Lutein:Lycopin: β -Carotin). Es zeigt sich, daß diese Kombination der Carotinoide weniger vor TBARS-Bildung schützt als die einzelnen Carotinoide. Der Maximale Schutzwirkung liegt bei 30%, (Carotinoidmix: $1,1 \pm 0,18$ pmol TBARS/ μ g Protein; Kontrolle $1,6 \pm 0,25$ pmol TBARS/ μ g Protein). Die optimale Schutzkonzentration wird zudem erst bei einem sehr hohen Gesamtcarotinoidgehalt von 2,3 pmol/ μ g Protein erreicht.

Eine Mischung mit einem erhöhten Luteinanteil (molares Mischungsverhältnis 72:7:21 Lutein:Lycopin: β -Carotin) ist in Abbildung 16 (Seite 62) gezeigt. Für den getesteten Konzentrationsbereich wird nur eine maximale Schutzwirkung von 23% gefunden (Carotinoidmischung: $1,18 \pm 0,01$ pmol TBARS/ μ g Protein; Kontrolle $1,53 \pm 0,09$ pmol TBARS/ μ g Protein).

Abbildung 15: Abhängigkeit des Schutzes vor photooxidativem Streß der Carotinoidmischung (47:4:49) vom Gesamtcarotinoidgehalt.

Lut-Lyc-βCar (47-4-49)

bestrahlt		unbestrahlt	
Σ Car./Prot. pmol/µg	TBARS/Prot. pmol/µg ± S.D.	TBARS/Prot. pmol/µg	TBARS/Prot. pmol/µg
1,068	1,93	1,42	0,37
1,992	1,76	1,52	0,42
2,318	1,13	1,84	0,59
2,687	1,36	2,07	
3,160	1,53	1,48	
3,384	1,72	1,36	
		1,48	



Mittelwert ± S.D.
 1,60 0,46
 0,26 0,12

— Mittelwert der Kontrolle
 - - - Standardabweichung der Kontrolle
 S.D. Standardabweichung der Kontrolle

Abbildung 16: Abhängigkeit des Schutzes vor photooxidativem Streß der Carotinoïdmischung (72:7:21) vom Gesamtcarotinoïdgehalt.

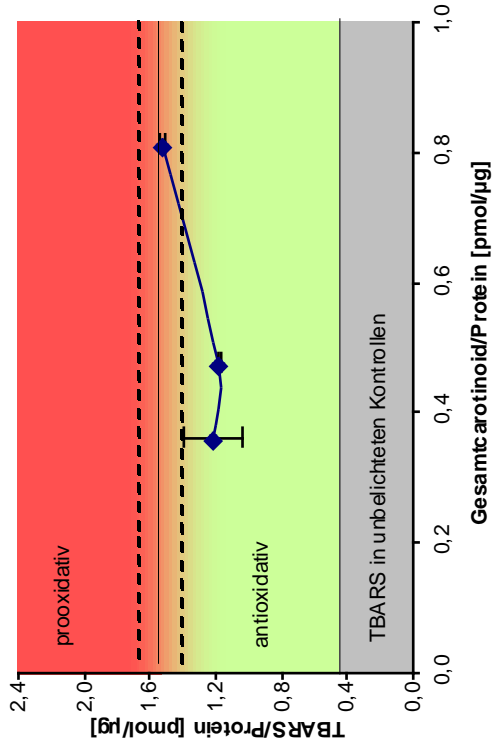
Lut-Lyc-βCar (72-7-21)

bestrahlt	Σ Car./Prot. pmol/μg	TBARS/Prot. pmol/μg	± S.D.	Anzahl der Messungen
	0,361	1,21	0,18	2
	0,475	1,18	0,01	2
	0,813	1,52	0,02	2

Kontrolle

bestrahlt	unbestrahlt
TBARS/Prot. pmol/μg	TBARS/Prot. pmol/μg
1,64	0,48
1,48	
1,47	

Mittelwert ± S.D. 1,53 0,09 0,48



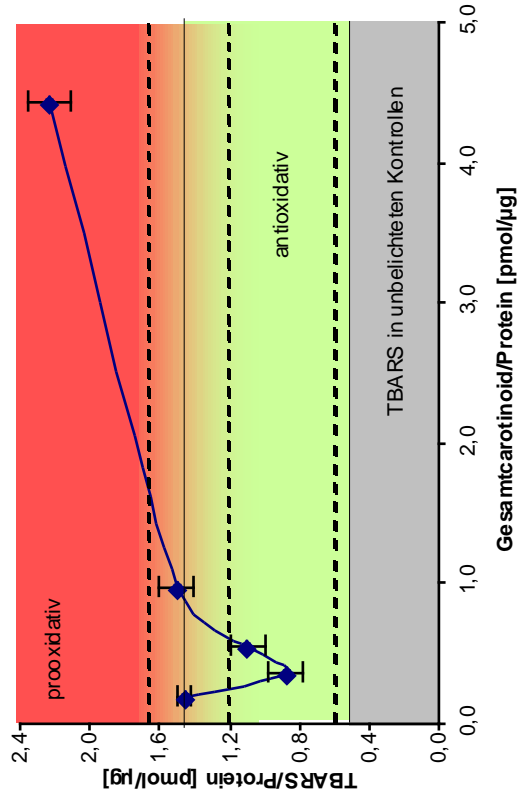
— Mittelwert der Kontrolle
 - - - Standardabweichung der Kontrolle

S.D. Standardabweichung der Kontrolle

Abbildung 17: Abhängigkeit des Schutzes vor photooxidativem Streß der Carotinoïdmischung (21:7:72) vom Gesamtcarotinoïdgehalt.

Lut-Lyc-βCar (21-7-72)

bestrahlt	Σ Car./Prot. pmol/μg	TBARS/Prot. pmol/μg	± S.D.	Anzahl der Messungen
	0,197	1,46	0,04	2
	0,370	0,88	0,10	2
	0,547	1,10	0,10	2
	0,977	1,51	0,10	2
	4,427	2,24	0,12	2



Mittelwert ± S.D.
 1,44 0,48
 0,25 0,11

Kontrolle

bestrahlt	unbestrahlt
TBARS/Prot pmol/μg	TBARS/Prot pmol/μg
1,35	0,55
1,63	0,37
1,13	0,42
1,16	0,59
1,42	
1,52	
1,84	

S.D. Standardabweichung der Kontrolle

— Mittelwert der Kontrolle
 - - - Standardabweichung der Kontrolle

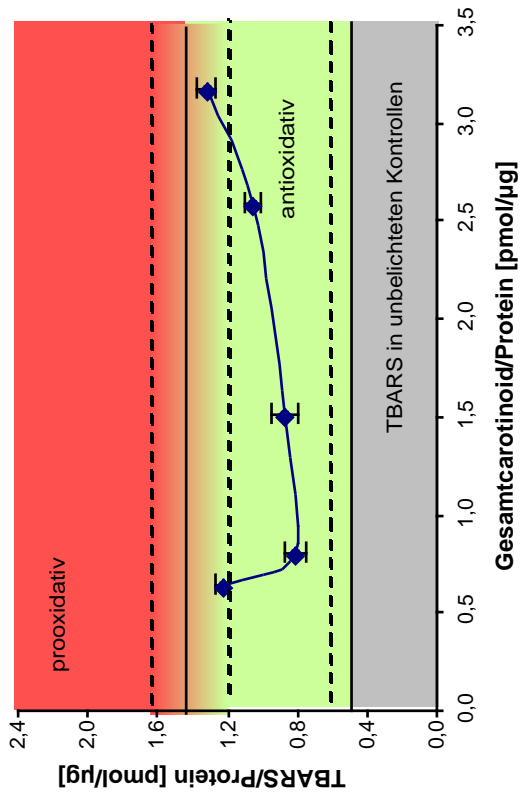
Abbildung 18: Abhängigkeit des Schutzes vor photooxidativem Stress der Carotinoide (7:14:79) vom Gesamtcarotinoidgehalt.

Lut-Lyc-βCar (7-14-79)

bestrahlt	Σ Car./Prot.	TBARS/Prot.	± S.D.	Anzahl der Messungen
	0,640	1,23	0,04	2
	0,801	0,81	0,06	2
	1,511	0,88	0,08	2
	2,583	1,06	0,05	2
	3,177	1,32	0,05	3

Kontrolle

bestrahlt	unbestrahlt
TBARS/Prot.	TBARS/Prot.
pmol/µg	pmol/µg
1,35	0,55
1,63	0,42
1,13	0,59
1,27	
1,64	
1,42	
1,55	



Mittelwert
± S.D.

1,43
0,19

0,52
0,09

— Mittelwert der Kontrolle

- - - Standardabweichung der Kontrolle

S.D. Standardabweichung der Kontrolle

Erhöht man dagegen den β -Carotinanteil zu einem Mischungsverhältnis 21:7:72 (Lutein:Lycopin: β -Carotin), so steigert sich die maximale Schutzwirkung der Carotinoidmischung vor UV-induzierter TBARS-Bildung (Abbildung 17, Seite 63). Die optimale Schutzkonzentration wird bei einem Carotinoidgehalt von 0,37 pmol/ μ g Protein gefunden. Die maximale Schutzwirkung beträgt in diesem Fall 39% (Carotinoidmischung: $0,88 \pm 0,11$ pmol TBARS/ μ g Protein; Kontrolle $144 \pm 0,25$ pmol TBARS/ μ g Protein). Diese Carotinoidmischung zeigt über einen Konzentrationsbereich von 0,2 bis 1,5 pmol Gesamtcarotinoid/ μ g Protein eine Schutzwirkung vor UV-induzierter TBARS-Bildung.

Für das Mischungsverhältnis 7:14:79 (Lutein:Lycopin: β -Carotin) ergibt sich die in Abbildung 18 (Seite 64) gezeigte Abhängigkeit der UV-induzierten TBARS-Bildung von der Gesamtcarotinoidmenge. Diese Carotinoidmischung zeigt von den getesteten Carotinoidmischungen die größte maximale Schutzwirkung. Bei der optimalen Schutzkonzentration von 0,8 pmol/ μ g Protein bilden sich 47% weniger TBARS (Carotinoidmischung: $0,81 \pm 0,06$ pmol TBARS/ μ g Protein; Kontrolle $143 \pm 0,19$ pmol TBARS/ μ g Protein). Dieses Carotinoidgemisch hat zudem ein relativ großen Konzentrationsbereich von 0,6 bis 3,1 pmol Gesamtcarotinoid/ μ g Protein in dem eine Schutzwirkung vor UV-induzierter TBARS-Bildung beobachtet wird.

Durch eine Kombination der Carotinoide wurde in diesem Modellsystem keine Steigerung der maximalen Schutzwirkung vor UV-induzierter TBARS-Bildung gefunden. In zwei Fällen wurde sogar eine Verminderung der maximalen Schutzwirkung beobachtet. Der Konzentrationsbereich, in dem eine Schutzwirkung beobachtet wird ist bei allen Mischungen kleiner als bei β -Carotin alleine. Darüber hinaus hat das molare Verhältnis der Carotinoide zueinander einen deutlichen Einfluß auf die UV-induzierte TBARS-Bildung. Es läßt sich aber keine regelmäßige Abstufung der Größe des Konzentrationsbereichs, in dem eine Schutzwirkung vor UV-induzierter TBARS-Bildung beobachtet wird, oder der optimalen Schutzkonzentration feststellen. Die Mischungsverhältnisse 72:7:21 und 21:7:72 (Lutein:Lycopin: β -Carotin) zeigen einen dem Lutein ähnlichen Verlauf, wohin gegen die Mischungsverhältnisse 47:4:49 und 7:14:79 einen dem β -Carotin ähnlichen Kurvenverlauf zeigen. In einem Konzentrationsbereich von 1-3 pmol/ μ g Protein schützt die Carotinoidmischung 7:14:79 (Lutein:Lycopin: β -Carotin) 2-20 % effektiver vor der UV-induzierten TBARS-Bildung als β -Carotin alleine.

Im Hautfibroblastenmodell zeigen alle drei einzeln getesteten Carotinoide, sowie zwei der vier untersuchten Carotinoidmischungen, eine maximale Schutzwirkung von etwa 40-50% bei optimaler Schutzkonzentration. Diese scheint unter den gegebenen Versuchsbedingungen das Limit der maximalen Schutzwirkung zu sein.

3.3. Carotinoide als orale Sonnenschutzmittel in Interventionsstudien

Die vorigen Kapitel befaßten sich mit der Untersuchung der Carotinoide als Schutz gegen photooxidativen Streß in humanen Hautfibroblasten. Am Beispiel der UV-induzierten Lipidperoxidation konnte in diesem in vitro System ein Schutzeffekt für alle untersuchten Carotinoide, Lycopin, β -Carotin, Lutein und deren Kombination gezeigt werden. Im folgenden Kapitel soll, auch aufgrund der Hinweise aus den Experimenten mit humanen Hautfibroblasten, untersucht werden, ob in Interventionsstudien Lycopin (Studie II) und eine Carotinoidkombination aus Lutein, Lycopin und β -Carotin (Studie III) einen möglichen Hautschutz vor der UV-Strahlung der Sonne bieten können.

Ein Maß für eine Strahlungsschädigung der Haut ist das UV-induzierte Erythem, welches sich nur entwickelt, wenn eine bestimmte Strahlungsdosis überschritten ist. Ein Erythem ist eine entzündliche Rötung der Haut, die durch Hyperämie, das heißt Eindringen des Blutes ins Gewebe, bedingt wird. Die niedrigste Strahlungsdosis, die ein Erythem hervorruft, wird **Minimale Erythem Dosis (MED)** genannt. Als Folge von UVB-Bestrahlung entwickelt sich bereits nach einigen Stunden ein Erythem. Es erreicht nach 8 Stunden ein Maximum und klingt dann wieder ab [4]. Die Bildung dieses Erythems ist sauerstoffunabhängig und beruht hauptsächlich auf der direkten Wechselwirkung von UVB-Strahlung mit Biomolekülen (Proteine, Lipide, DNA). UVA-Strahlung induziert ein verzögertes Erythem, das sein langanhaltendes Maximum erst bis zu ca. 24 Stunden nach UVA-Exposition erreicht [13]. Da die Bildung dieses Erythems sauerstoffabhängig ist, wird die Beteiligung der ROS, die unter photooxidativen Bedingungen gebildet werden, vermutet. Die Erzeugung von ROS führt unter anderem zum Anstieg der Lipidperoxidation in den Zellmembranen, was im vorigen Kapitel an Hand der UV-induzierten TBARS-Bildung an Hautfibroblasten untersucht wurde.

In den folgenden Studien wird die Hautfarbe nach dem dreidimensionalen Farbwertsystem (L-, a-, b-Wert) gemessen. In diesem Farbsystem (siehe Kapitel 2.4.4., Seite 29) gibt der L-Wert die Helligkeit, der b-Wert den Gelbanteil und der a-Wert den Rotanteil der Farbe an. Das Erythem wurde erst 24 Stunden nach Bestrahlung quantifiziert, da nur das verzögerte Erythem, wie oben beschrieben, auf photooxidativen Streß zurückzuführen ist. Als Maß für die Intensität des Erythems dient die Differenz der a-Werte unmittelbar vor und 24 Stunden nach Bestrahlung (Δa -Wert). Während den Studien wurde das Carotinoidprofil der Hauptcarotinoide im Serum, sowie der Gesamtcarotinoidgehalt der Haut aller Probanden zu den Zeitpunkten der Erytheminduktion gemessen.

Die Interventionsstudien wurden in Kooperation mit den Firmen Unilever und Cognis sowie dem Institut für experimentelle Dermatologie der Universität Witten-Herdecke durchgeführt.

3.3.1. Verminderung der Intensität der Erythembildung durch erhöhten Verzehr von Tomatenmark und Olivenöl (Studie II)

In der Studie II wurde Tomatenmark als Quelle für Lycopin benutzt. Da Tomatenmark ein komplexes Substanzgemisch ist, nehmen die Probanden noch weitere Substanzen außer Lycopin zu sich. Gleiches gilt für das verabreichte Olivenöl. Analysiert wurden die Carotinoide im Tomatenmark, sowie die Tocopherole im Olivenöl (Abbildung 19, Seite 68). Im Tomatenmark finden sich außer Lycopin nur Spuren anderer Carotinoide. Eine Ausnahme bildet β -Carotin, welches mit einem Gewichtsanteil von ca. 3% im Tomatenmark zu finden ist. In einem Liter Olivenöl werden ca. 150 mg α -Tocopherol nachgewiesen. Der tägliche Verzehr von 40 g Tomatenmark mit 10 g Olivenöl zur Tageshauptmahlzeit der Probanden der Verumgruppe entspricht einer Zufuhr von 16 mg Lycopin pro Tag. Damit wurden dem Körper zusätzlich ca. 0,5 mg β -Carotin aus dem Tomatenmark und ca. 1,5 mg α -Tocopherol aus dem Olivenöl verabreicht. Die Placebogruppe nahm täglich 10 g Olivenöl und damit 1,5 mg α -Tocopherol zu sich.

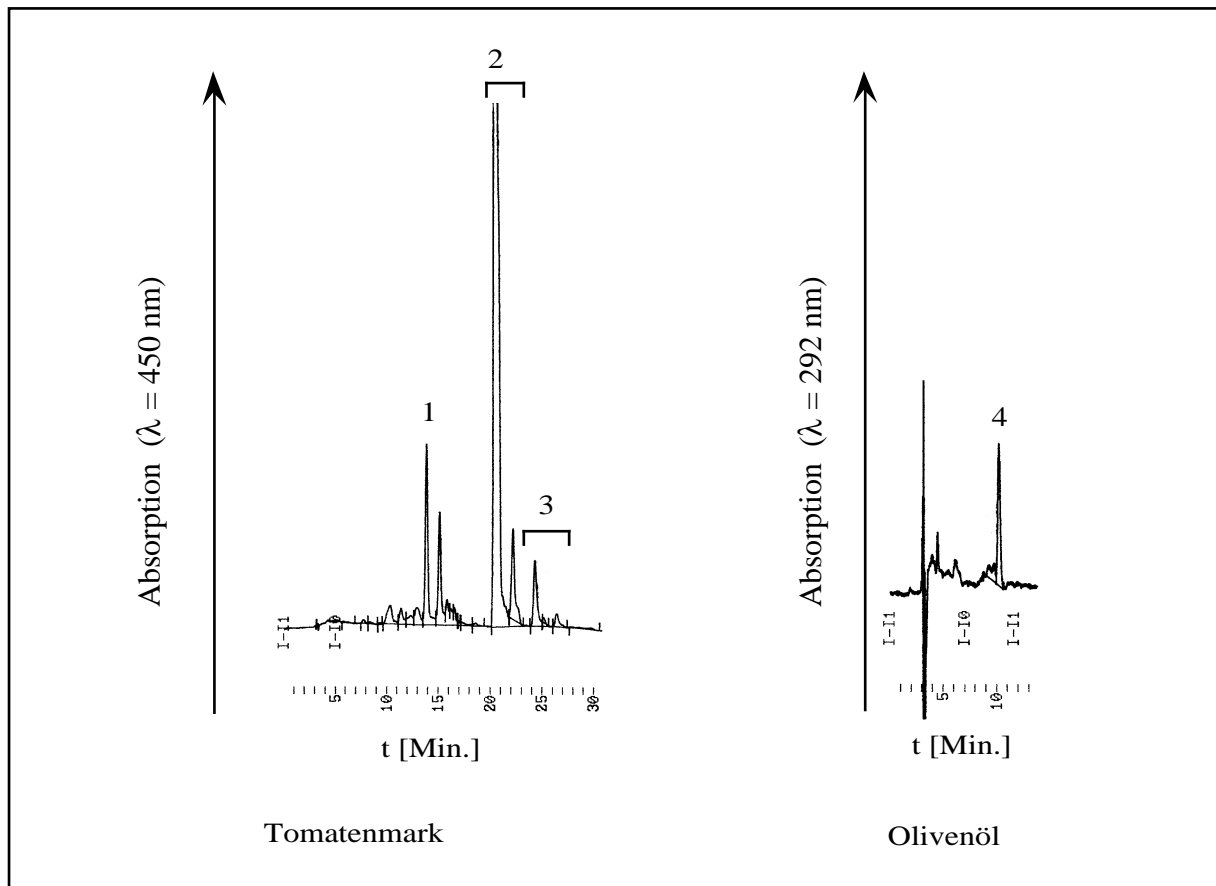


Abbildung 19: Die Carotinoidanalyse des Tomatenmarks und die Tocopherolanalyse des Olivenöls der Studie II (1 = Interner Standard; 2 = Lycopin; 3 = β -Carotin; 4 = α -Tocopherol).

Während der Studien wurden die Carotinoide im Blutserum aller Probanden zu den Zeitpunkten der Erytheminduktion gemessen. Damit sollte die Verlässlichkeit (Compliance) der Studienteilnehmer kontrolliert und gleichzeitig die Auswirkungen der Supplementierung auf den Lycopinserumgehalt nachgewiesen werden. Beispielhaft sind in Abbildung 20 (Seite 69) die HPLC-Chromatogramme des Probanden 2 der Verumgruppe zu Beginn und zum Ende der Studie II gezeigt. Man erkennt einen deutlichen Anstieg des Lycopinserumgehalts nach zehnwöchiger Supplementierung. Der β -Cryptoxanthin- und β -Carotingehalt im Serum sind während der Studie bei diesem Probanden ebenfalls leicht angestiegen.

Proband 2

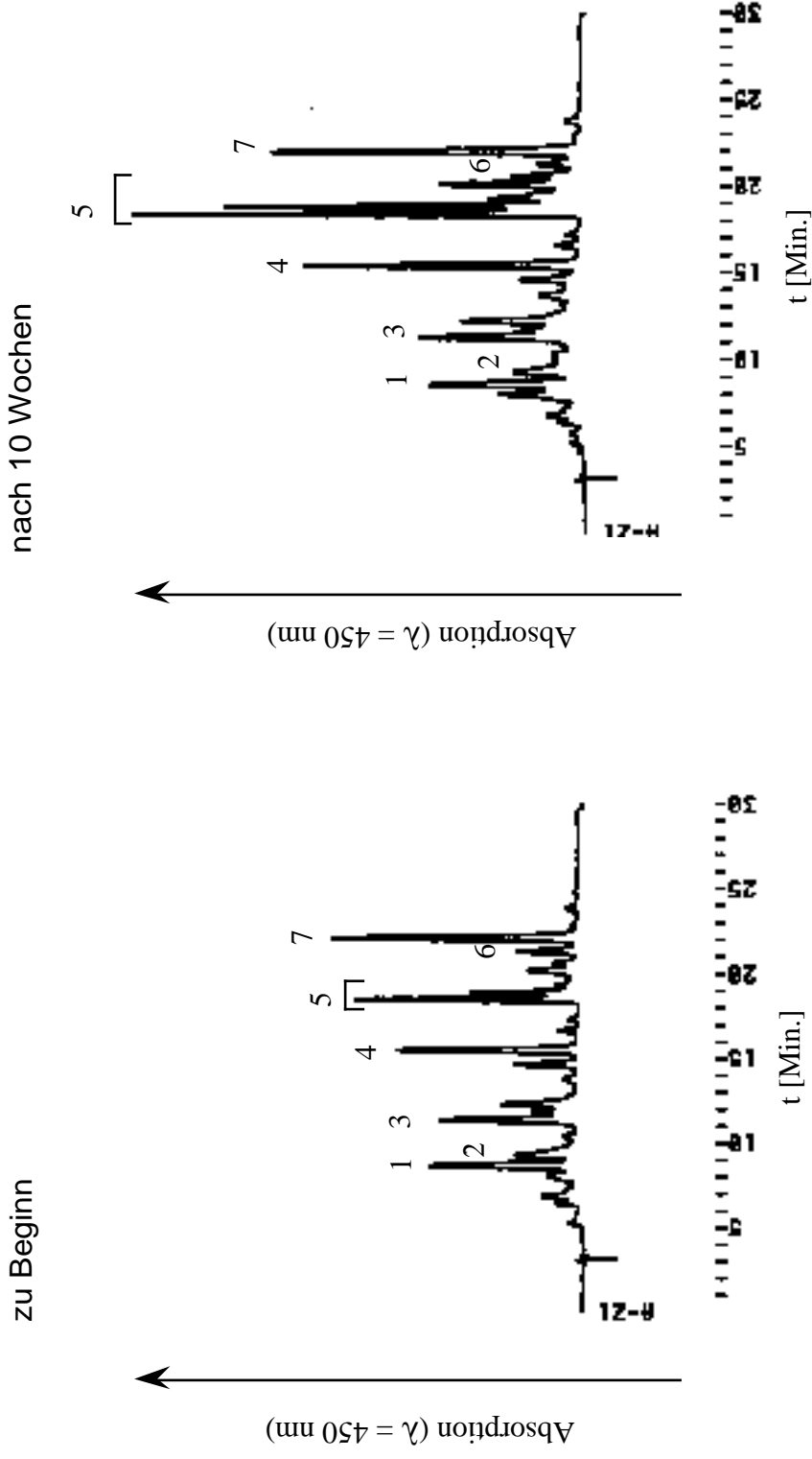


Abbildung 20: HPLC-Chromatogramme der Carotinoide im Serum des Probanden 2 (Verumgruppe) zu Beginn der Studie und nach 10 Wochen Supplementierung. (1 = Lutein; 2 = Zeaxanthin; 3 = interner Standard; 4 = β -Cryptoxanthin, 5 = Lycopin; 6 = α -Carotin; 7 = β -Carotin).

Das Profil der Hauptcarotinoide im Blutserum der Probanden in der Studie II ist in Tabelle 12 (Seite 71) gezeigt. Bis auf Lycopin in der Verumgruppe veränderte sich kein Carotinoidgehalt im Serum der Probanden im Verlauf der Studie signifikant. Der Gesamtlycopingehalt im Blutserum verdoppelt sich von $0,37 \pm 0,25$ nmol/ml auf $0,72 \pm 0,22$ nmol/ml durch Tomatenmark mit Olivenöl als Supplement ($p < 0,02$ bzw. $p < 0,006$).

Trotzdem sind im Verlauf der Studie einige nicht signifikante Trends im Serumgehalt einzelner Carotinoide zu beobachten, die an dieser Stelle erwähnt werden sollen. Die mittlere Serumgehalt für β -Cryptoxanthin steigt sowohl in der Verumgruppe (von $0,14 \pm 0,08$ nmol/ml auf $0,20 \pm 0,13$ nmol/ml), als auch in der Placebogruppe (von $0,18 \pm 0,08$ auf $0,29 \pm 0,27$) an. Da beide Trends die gleiche Richtung besitzen, ändert sich der relative Unterschied im β -Cryptoxanthingehalt im Serum zwischen den beiden Gruppen nur etwa um 10 %. In der Verumgruppe ist darüber hinaus eine deutliche Verringerung des α -Carotingehalts um 34% nach 4 Wochen zu beobachten. Diese Änderung bleibt dann bis zum Ende der Studie konstant (von $0,17 \pm 0,21$ auf $0,10 \pm 0,09$). Gleiches gilt für den β -Carotinserumgehalt in der Placebogruppe (-21%, von $0,51 \pm 0,27$ auf $0,46 \pm 0,27$).

Der Gesamtgehalt der Carotinoide im Blutserum ändert sich während der Studie kaum. Die Verdopplung des Serumlycopin macht sich nur als 18% Steigerung des Gesamtcarotinoidgehalts im Serum der Verumgruppe bemerkbar (Abbildung 21, Seite 72). In der Placebogruppe fällt der Gesamtcarotinoidgehalt zunächst um 12% ab, ist aber zum Ende der Studie wieder auf seine Ausgangskonzentration angestiegen. Eine Verringerung des Gesamtcarotinoidgehalts im Blutserum der Placebogruppe wird parallel zum Blutwert auch in der Haut beobachtet. Doch sinkt hier der Gesamtcarotinoidgehalt nach 4 Wochen weiter und erreicht zum Ende der Studie einen Wert, der nur noch 56% des Ausgangswertes entspricht (von $0,34$ nmol/g Haut auf $0,19$ nmol/g Haut). In der Verumgruppe steigt der Gesamtcarotinoidgehalt in der Haut zunächst um 38% an. Bei der letzten Bestrahlung liegt der Gesamtcarotinoidgehalt der Haut nur noch 15% über dem Ausgangswert.

Tabelle 12: Carotinoidprofil der Verum- und der Placebogruppe in der Studie II (Verum n = 9; Placebo n = 10)

Verum

Carotinoid		Woche		
		0	4	10
Lutein (nmol/ml)	Mittelwert	0,22	0,20	0,24
	S.D.	0,05	0,07	0,12
Zeaxanthin (nmol/ml)	Mittelwert	0,07	0,06	0,07
	S.D.	0,04	0,02	0,03
β-Cryptoxanthin (nmol/ml)	Mittelwert	0,14	0,14	0,20
	S.D.	0,08	0,06	0,13
Lycopin (gesamt) (nmol/ml)	Mittelwert	0,37	0,62*	0,72**
	S.D.	0,25	0,20	0,22
α-Carotin (nmol/ml)	Mittelwert	0,17	0,10	0,11
	S.D.	0,21	0,09	0,13
β-Carotin (nmol/ml)	Mittelwert	0,39	0,39	0,35
	S.D.	0,26	0,16	0,17

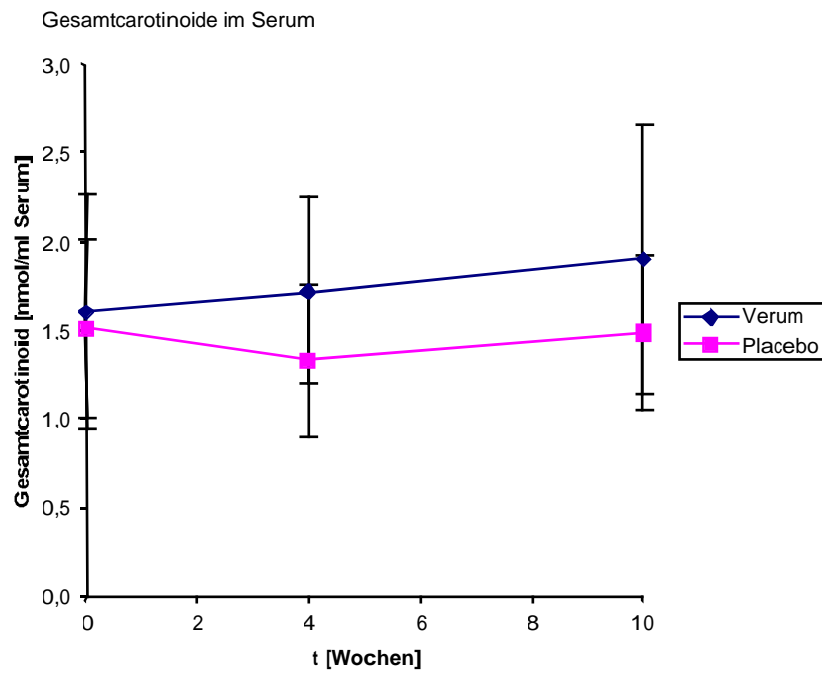
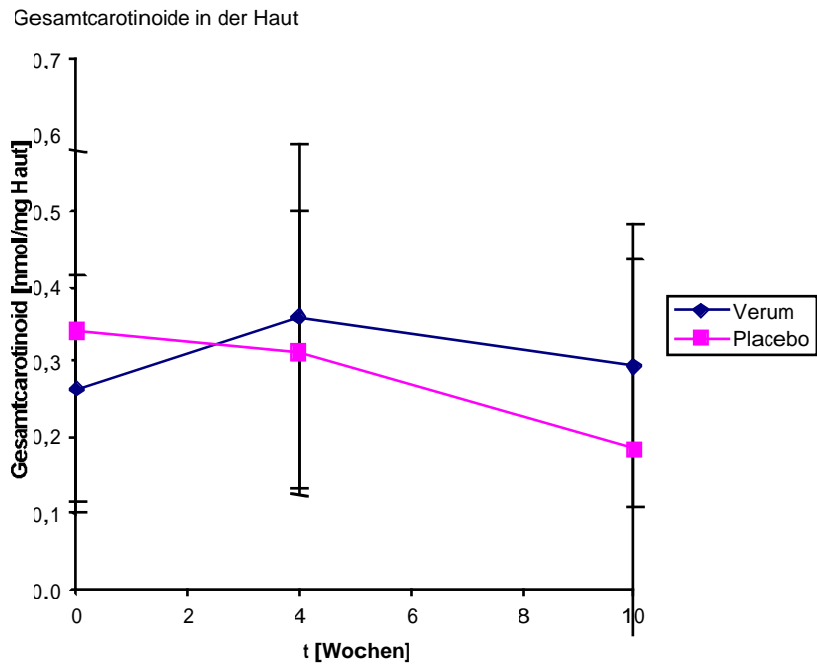
Placebo

Carotinoid		Woche		
		0	4	10
Lutein (nmol/ml)	Mittelwert	0,22	0,22	0,24
	S.D.	0,11	0,12	0,09
Zeaxanthin (nmol/ml)	Mittelwert	0,07	0,06	0,07
	S.D.	0,02	0,02	0,02
β-Cryptoxanthin (nmol/ml)	Mittelwert	0,18	0,18	0,29
	S.D.	0,08	0,14	0,27
Lycopin (gesamt) (nmol/ml)	Mittelwert	0,39	0,33	0,36
	S.D.	0,11	0,12	0,15
α-Carotin (nmol/ml)	Mittelwert	0,18	0,18	0,17
	S.D.	0,13	0,11	0,09
β-Carotin (nmol/ml)	Mittelwert	0,51	0,46	0,45
	S.D.	0,27	0,27	0,23

* signifikanter Unterschied zu Woche 0: $p < 0,02$

** signifikanter Unterschied zu Woche 0: $p < 0,01$

Abbildung 21: Vergleich des Gesamtcarotinoidgehalts in der Haut und Serum



Zu Beginn der Studie, nach 4 Wochen und nach 10 Wochen Supplementierung mit Tomatenmark wurden die Probanden mit der 1,25-fachen Dosis der individuellen MED bestrahlt, die vor Studienbeginn bestimmt worden ist. Die MED eines Probanden hat sich zwischen MED-Bestimmung und Studie geändert, so daß in der Studie kein Erythem durch UV-Bestrahlung induziert wurde (schwach negative Δa -Werte). Aus diesem Grund wurde dieser Proband (Placebogruppe) aus der Studie ausgeschlossen. Zwei Probanden der Verumgruppe mußten aus gesundheitlichen Gründen, die nicht mit der Studie assoziiert waren, die Studie abbrechen und wurden ebenfalls in der Auswertung der Ergebnisse nicht berücksichtigt.

Tabelle 13 zeigt die Intensität des durch UV-Bestrahlung induzierten verzögerten Erythems (Δa -Wert) zu Beginn, nach vierwöchiger und nach zehnwöchiger Supplementierung der Probanden mit Lycopin in Form von Tomatenmark (Verum) im Vergleich zur Kontrollgruppe. In der Kontrollgruppe, die während der Studie Olivenöl zu sich nahm (Placebo), wurde während der gesamten Studie II keine Änderung der UV-Induzierbarkeit eines Erythems beobachtet. Nach vierwöchiger Supplementierung wurde noch kein Unterschied in der Erythembildung der beiden Probandengruppen festgestellt. Zu diesem Zeitpunkt ist der Gesamtcarotinoidgehalt in der Haut der Placebogruppe 14% niedriger als in der Verumgruppe. Eine signifikante Verminderung ($p < 0,05$) der Intensität der Erythembildung der Verumgruppe ($3,8 \pm 3,2$) gegenüber der Kontrollgruppe ($6,3 \pm 2,3$) zeigt sich nach zehn Wochen Supplementierung. Zu diesem Zeitpunkt ist der Unterschied des Gesamtcarotinoidgehalts in der Haut mit 36% mehr als doppelt so groß wie nach 4 Wochen Supplementierung.

Tabelle 13: Erythembildung, in der Lycopininterventionsstudie angegeben als Δa -Wert (Placebogruppe n = 10; Verumgruppe n = 9).

Woche	0	4	10
Δa-Wert (Erythem)			
Placebo	$6,0 \pm 2,0$	$5,4 \pm 1,9$	$6,3 \pm 2,3$
Verum	$5,6 \pm 3,5$	$5,1 \pm 2,4$	$3,8 \pm 3,2^*$

* $p < 0,05$ (t-Test)

3.3.2. Vergleich eines β -Carotinsupplementes mit einer Carotinoidkombination aus Lutein, Lycopin und β -Carotin in ihrer Wirkung als oraler Sonnenschutz (Studie III)

In dieser Interventionsstudie (Studie III) soll die bereits in der Literatur beschriebene Verminderung der Erythembildung durch Supplementierung mit β -Carotin [9] mit der möglichen Schutzwirkung einer Carotinoidkombination von Lutein, Lycopin und β -Carotin verglichen werden. Die Gruppe I nahm täglich 9,7 mg β -Carotin (all trans + 9 cis β -Carotin) und 0,3 mg α -Carotin mit Sojaöl als Carotinoidträgermatrix in einer Gelatinekapsel zu sich.

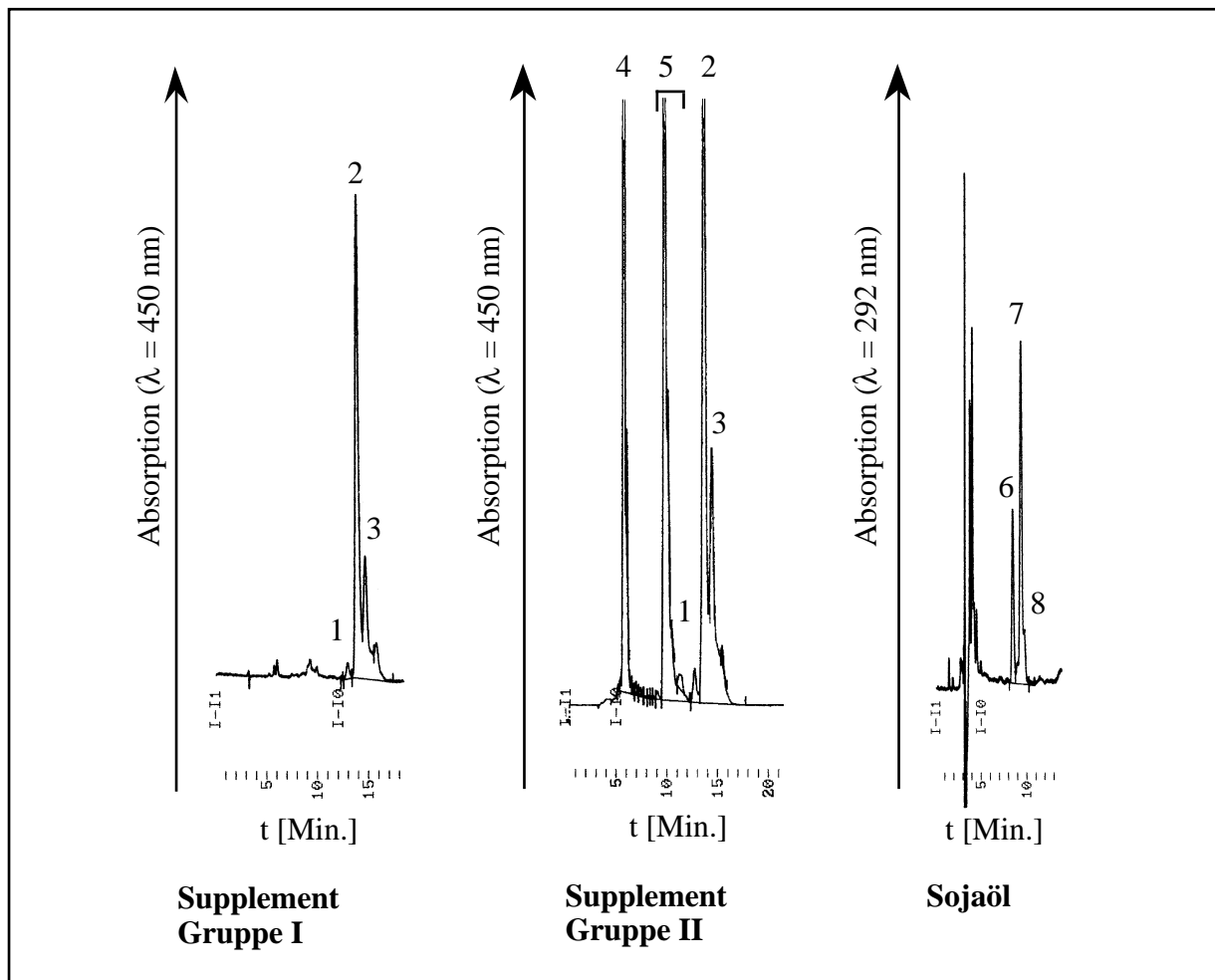


Abbildung 22: HPLC-Chromatogramme: Tocopherole im Sojaöl und Carotinoide in den Supplementen der Probandengruppen I u. II (1 = α -Carotin; 2 = all trans β -Carotin; 3 = 9-cis β -Carotin; 4 = Lutein; 5 = Lycopin; 6 = δ -Tocopherol (Standard); 7 = γ -Tocopherol, 8 = α -Tocopherol).

Das Supplement der Gruppe II enthielt neben Sojaöl, 3,2 mg Lutein, 4,0 mg Lycopin und 3,4 mg β -Carotin (all trans + 9 cis β -Carotin). Die Kontrollgruppe nahm Kapseln, die nur die Trägermatrix (Sojaöl) enthielten, zu sich. Die Analyse des Inhaltes der verabreichten Gelatine-Kapseln ist in Abbildung 22 (Seite 74) gezeigt. Das Naturprodukt Sojaöl ist ein komplexes Gemisch. Es enthält insbesondere Tocopherole (263 μg /Kapsel), von denen 80% γ -Tocopherol sind. Im HPLC-Chromatogramm des Supplementes in Gruppe II ist noch α -Carotin in Spuren zu erkennen (0,09 mg/Kapsel, < 1%). α -Carotin findet sich im Supplement der Gruppen I u. II, weil als Quelle für β -Carotin das Extrakt der Meeresalge *Dunaliella salina* (Betatene™) verwendet wurde. Betatene™ enthält ca. 75% all trans β -Carotin, 22% 9-cis β -Carotin, 3% α -Carotin und <1% andere Carotinoide.

Wie auch schon in der Studie II wurden die Carotinoide im Blutserum aller Probanden zu den Zeitpunkten der Erytheminduktion gemessen. Damit sollte die Verlässlichkeit (Compliance) der Studienteilnehmer kontrolliert und gleichzeitig die Veränderungen des Carotinidgehalts im Serum aufgrund der Supplementierung nachgewiesen werden. Beispielhaft sind in Abbildung 23 und Abbildung 24 (Seite 76, 77) die HPLC-Chromatogramme des Probanden 10 der Gruppe I und des Probanden 19 der Gruppe II am Anfang und am Ende der Studie III gezeigt. Bei Proband 10 ist ein deutlicher Anstieg des β -Carotinserumgehalts nach zwölfwöchiger Supplementierung zu erkennen. Der α -Carotiningehalt im Blutserum ist nur unwesentlich erhöht. Der β -Cryptoxanthin- und Lycopiningehalt im Serum sind während der Studie bei diesem Probanden ebenfalls leicht angestiegen. Entsprechend der Supplementierung haben sich der Gehalt von Lutein, Lycopin und β -Carotin im Serum deutlich erhöht. Auffällig ist darüber hinaus eine relativ starke Erhöhung des Zeaxanthinserumgehalts.

Aufgrund erheblicher Änderungen in des β -Carotiningehalts im Serum werden in dieser Studie zwei Probanden der Kontrollgruppe aus dieser Studie ausgeschlossen (non-compliance).

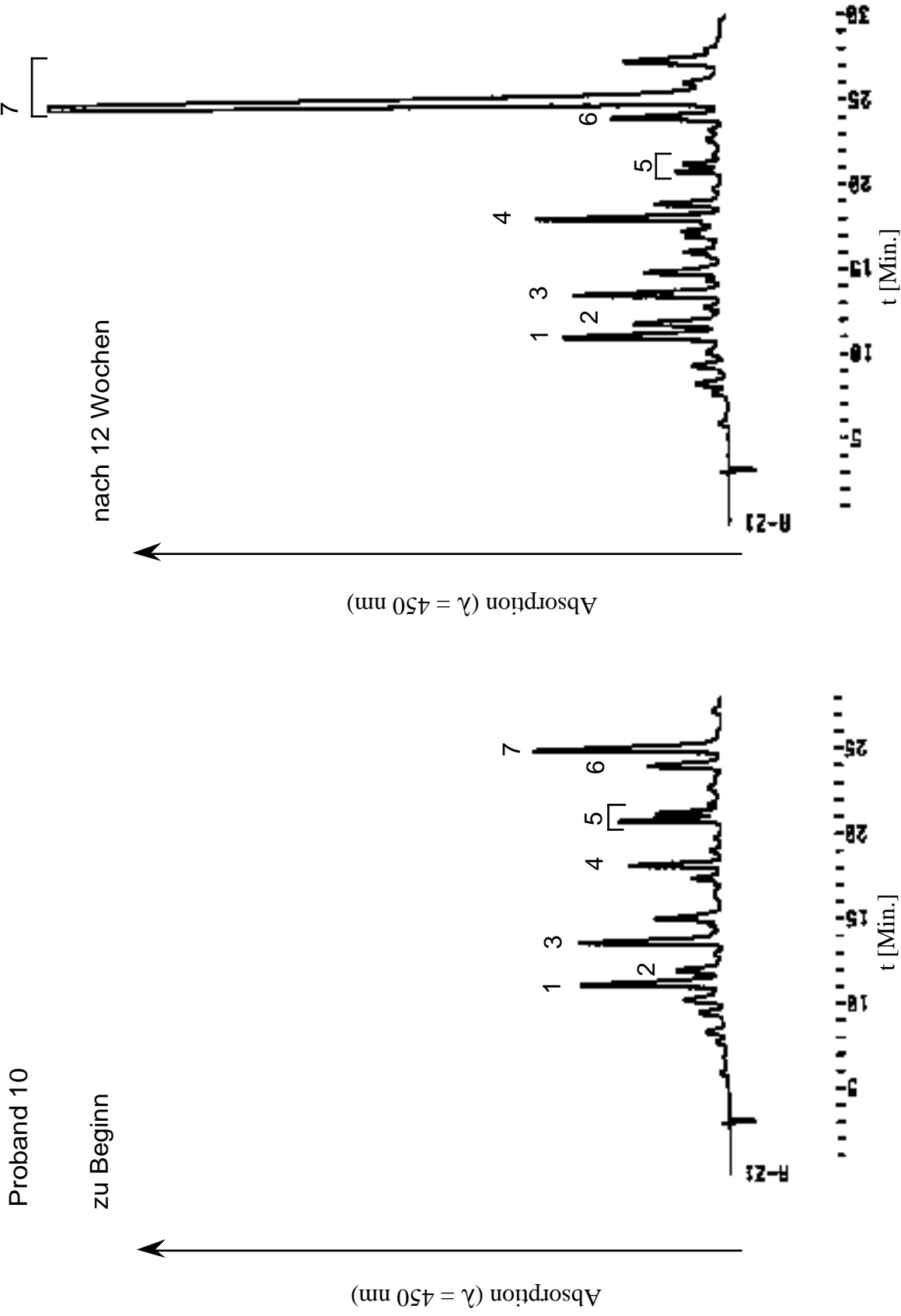
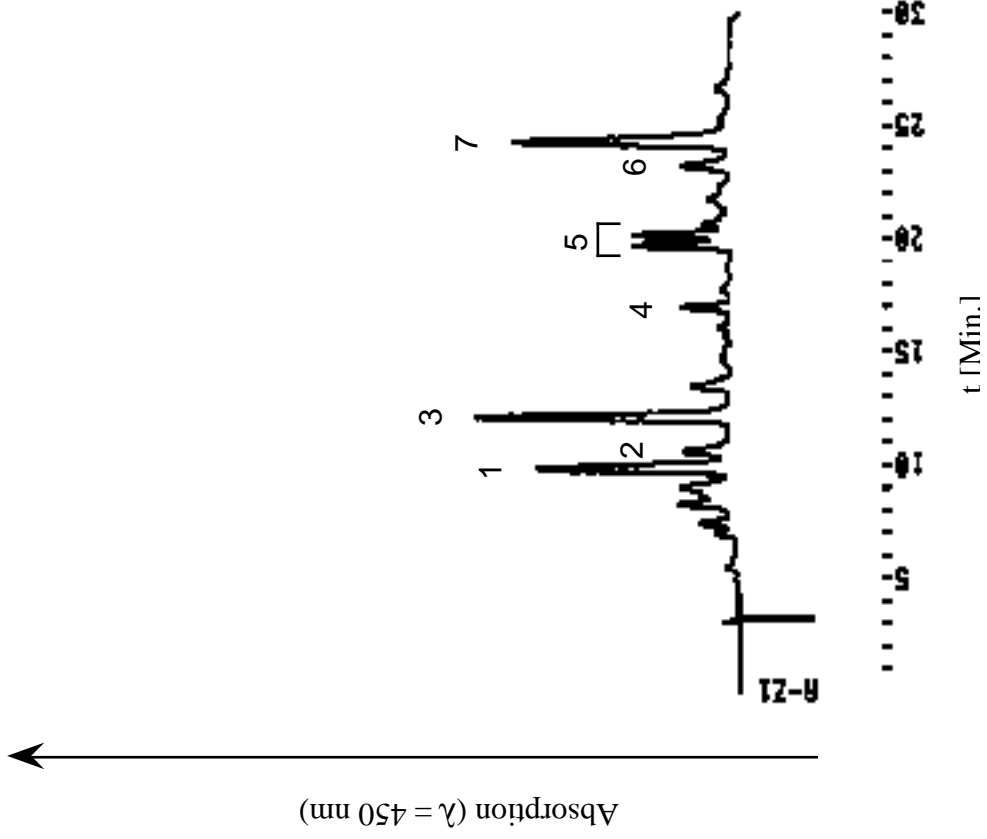


Abbildung 23: HPLC-Chromatogramme der Serumcarotinoide des Probanden 10 (Gruppe I) zu Beginn der Studie und nach 12 Wochen Supplementierung. (1 = Lutein; 2 = Zeaxanthin; 3 = interner Standard; 4 = β -Cryptoxanthin, 5 = Lycopin; 6 = α -Carotin; 7 = β -Carotin).

Proband 19

zu Beginn



nach 12 Wochen

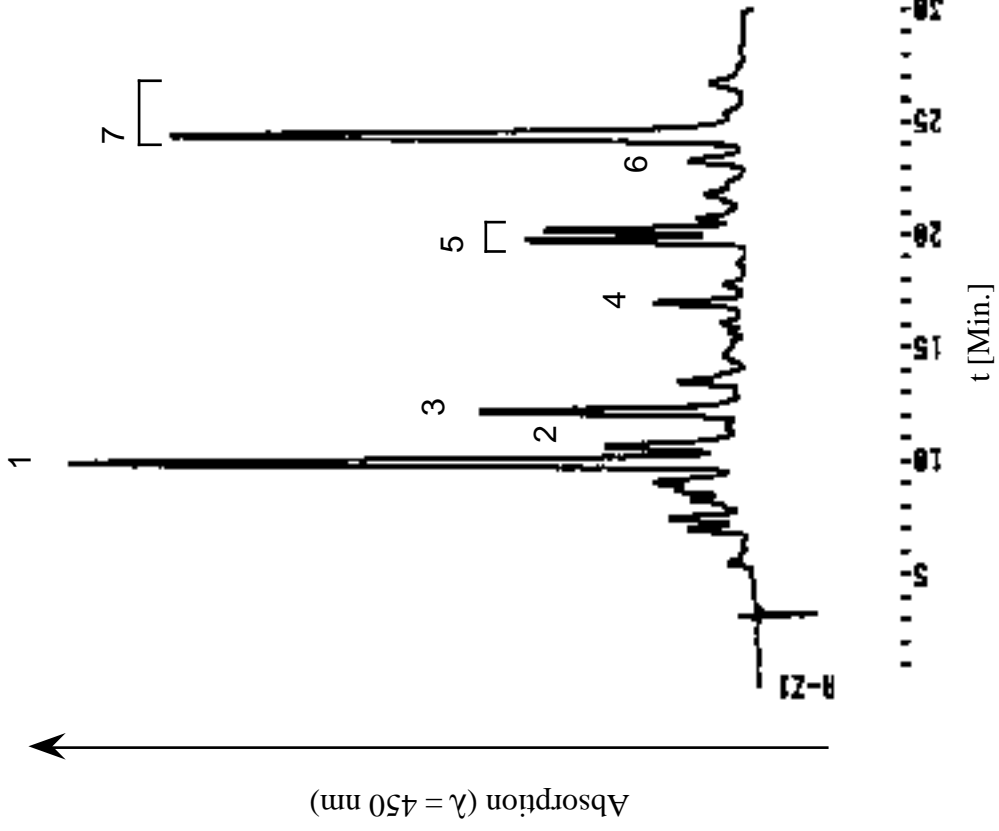


Abbildung 24: HPLC-Chromatogramme der Serumcarotinoide des Probanden 19 (Gruppe II) zu Beginn der Studie und nach 12 Wochen Supplementierung. (1 = Lutein; 2 = Zeaxanthin; 3 = interner Standard; 4 = β -Cryptoxanthin, 5 = Lycopin; 6 = α -Carotinin; 7 = β -Carotinin).

Während der Studie wurden die Hauptcarotinoide im Serum der Studienteilnehmer zu den Zeitpunkten der Erytheminduktion untersucht (Tabelle 14a-c). In der Kontrollgruppe ist keine signifikante Änderung im Carotinoidprofil zu sehen. Trotzdem ist auch hier wieder, wie in der Studie II, ein Anstieg (34%) des β -Cryptoxanthingehalts im Serum zu beobachten, der jedoch aufgrund der Streuung der Messwerte nicht signifikant ist. Auch in den beiden anderen Gruppen ist dieser Anstieg zu beobachten. In der Gruppe I ist der auf Supplementierung zurückzuführende deutliche Anstieg des α -Carotingehalts um 76% von $0,16 \pm 0,10$ nmol/ml auf $0,28 \pm 0,10$ nmol/ml ($p = 0,01$) bzw. des β -Carotingehalts um 400% von $0,75 \pm 0,42$ nmol/ml auf $3,49$ nmol/ml ($p = 0,0001$) zu beobachten. Für die Gruppe I beobachtet man ansonsten einen deutlichen, aber nicht signifikanten Anstieg des β -Cryptoxanthingehalts. In der Gruppe II sind dagegen, außer den durch Supplementierung bewirkten signifikanten Änderungen des Serumgehalts an Lutein, Lycopin und β -Carotin, der Anstieg des β -Cryptoxanthingehalts (95%) mit einem $p = 0,3$ und die Erhöhung des Zeaxanthingehalts um 140% im Serum mit einem $p = 0,0001$ signifikant.

Tabelle 14: Carotinoidprofil der verschiedenen Probandengruppen der Studie II (a) Gruppe I n = 11; b) Gruppe II n = 12; c) Kontrollgruppe n = 10).

a)

Gruppe I		Woche		
Carotinoid		0	6	12
Lutein (nmol/ml)	Mittelwert	0,17	0,23	0,20
	S.D.	0,08	0,17	0,08
Zeaxanthin (nmol/ml)	Mittelwert	0,06	0,08	0,08
	S.D.	0,02	0,04	0,04
β-Cryptoxanthin (nmol/ml)	Mittelwert	0,12	0,15	0,20
	S.D.	0,05	0,07	0,14
Lycopin (nmol/ml)	Mittelwert	0,45	0,44	0,44
	S.D.	0,15	0,26	0,17
α-Carotin (nmol/ml)	Mittelwert	0,16	0,24	0,28 ^{****}
	S.D.	0,10	0,12	0,10
β-Carotin (nmol/ml)	Mittelwert	0,75	3,22	3,84 ^{**}
	S.D.	0,42	1,64	1,73

b)

Gruppe II

Carotinoid		Woche		
		0	6	12
Lutein (nmol/ml)	Mittelwert	0,25	1,06*	1,01*
	S.D.	0,10	0,23	0,45
Zeaxanthin (nmol/ml)	Mittelwert	0,07	0,17*	0,18**
	S.D.	0,03	0,03	0,07
β-Cryptoxanthin (nmol/ml)	Mittelwert	0,11	0,15	0,22****
	S.D.	0,07	0,09	0,15
Lycopin (nmol/ml)	Mittelwert	0,35	0,76**	0,62***
	S.D.	0,14	0,24	0,23
α-Carotin (nmol/ml)	Mittelwert	0,19	0,20	0,17
	S.D.	0,23	0,11	0,14
β-Carotin (nmol/ml)	Mittelwert	0,66	1,65***	1,33****
	S.D.	0,71	0,66	0,63

c)

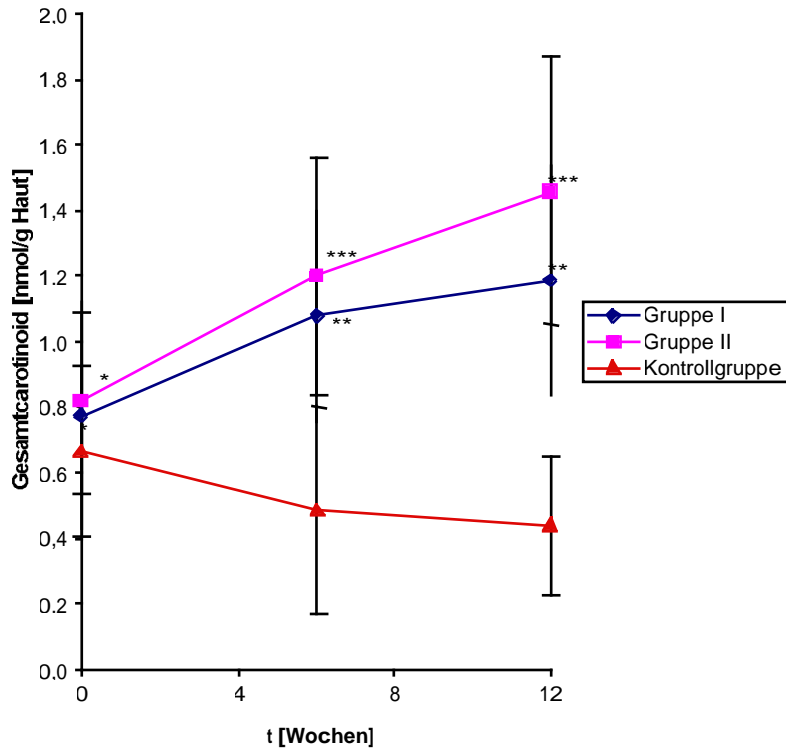
Kontrollgruppe

Kontrolle		Woche		
		0	6	12
Lutein (nmol/ml)	Mittelwert	0,17	0,21	0,21
	S.D.	0,04	0,07	0,07
Zeaxanthin (nmol/ml)	Mittelwert	0,06	0,07	0,07
	S.D.	0,02	0,02	0,02
β-Cryptoxanthin (nmol/ml)	Mittelwert	0,12	0,14	0,16
	S.D.	0,06	0,07	0,09
Lycopin (nmol/ml)	Mittelwert	0,38	0,37	0,32
	S.D.	0,22	0,18	0,19
α-Carotin (nmol/ml)	Mittelwert	0,10	0,08	0,07
	S.D.	0,06	0,05	0,03
β-Carotin (nmol/ml)	Mittelwert	0,49	0,44	0,43
	S.D.	0,40	0,37	0,29

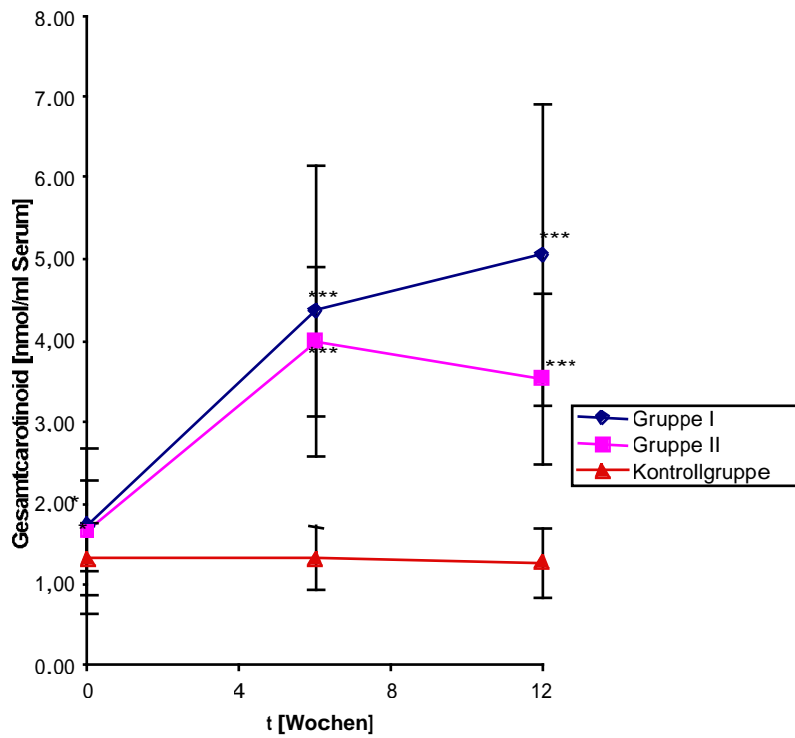
- * signifikanter Unterschied zur Woche 0: $p < 0,00001$
- ** signifikanter Unterschied zur Woche 0: $p < 0,0001$
- *** signifikanter Unterschied zur Woche 0: $p < 0,002$
- **** signifikanter Unterschied zur Woche 0: $p < 0,02$
- ***** signifikanter Unterschied zur Woche 0: $p < 0,05$

Abbildung 25: Vergleich des Gesamtcarotinoidgehalts in der Haut und im Serum

Gesamtcarotinoide in der Haut



Gesamtcarotinoide im Serum



* kein signifikanter Unterschied $p > 0,05$
 ** Signifikanter Unterschied zur Kontrolle $p < 0,001$
 *** Signifikanter Unterschied zur Kontrolle $p < 0,00005$

Der Gehalt der supplementierten Carotinoide in den Seren der Gruppe II ändert sich für: Lutein von $0,25 \pm 0,10$ nmol/ml auf $1,01 \pm 0,45$ nmol/ml (um 300%, $p < 0,00001$); Lycopin von $0,35 \pm 0,14$ nmol/ml auf $0,62 \pm 0,23$ nmol/ml (um 78%, $p < 0,002$); β -Carotin von $0,66 \pm 0,71$ nmol/ml auf $1,33 \pm 0,63$ nmol/ml (um 100%, $p = 0,02$)

Der Vergleich der Gesamtcarotinoide im Blutserum und der Haut in Abbildung 25 (Seite 79) zeigt, daß der im Serum durch Supplementierung erhöhte Gesamtcarotinoidgehalt sich auch in der Haut widerspiegelt. In der Haut steigt der Carotinoidgehalt um 53% in der Gruppe I und um 78% in der Gruppe II an. Auffällig ist, daß der Gesamtcarotinoidgehalt in der Haut der Kontrollgruppe um 35% sinkt. Ein ähnlicher Effekt ist bereits in der Lycopinstudie beobachtet worden. Im Serum zeigt sich dagegen in der Kontrollgruppe keine Änderung des Gesamtcarotinoidgehalts. Anders als in der Haut steigt die Carotinoidgehalt im Serum in der Gruppe I (um 195%) stärker an als in der Gruppe II (um 115%).

In dieser Studie wurde das Erythem bei den Probanden mit der 1,6-fachen individuellen MED induziert. Ein deutlicher Trend in der Erythemintensität wird auch in der Kontrollgruppe gefunden, bei der sich die durchschnittliche Lichtempfindlichkeit um 36% ($p = 0,01$) von $5,6 \pm 2,1$ auf $7,6 \pm 2,4$ erhöht. Diese erhebliche Änderung der Erythemintensität der Kontrollgruppe liegt in der Größenordnung des beobachteten Effektes.

Vergleicht man die Erythemintensität zwischen den verschiedenen Gruppen zu Beginn der Studie so sind die Kontrollgruppe und die Gruppe I von vornherein signifikant verschieden (-37% , $p < 0,05$). Die Erythemintensität der Kontrollgruppe ist ebenfalls niedriger als die der Gruppe II (14%), doch ist dieser Unterschied nicht mehr signifikant. Der starke Trend in der Kontrollgruppe führt dazu, daß bei einem Vergleich der Erythembildung der Gruppen untereinander nach zwölf Wochen in der Gruppe I um 42% ($p = 0,01$) und in der Gruppe II um 32% ($p = 0,03$) gegenüber der Kontrollgruppe vermindert sind. Doch wenn man die Erythemwerte der Gruppe I und der Gruppe II mit den Δa -Wert der Kontrollgruppe zu Beginn der Studie vergleicht zeigt sich kein signifikanter Unterschied. Ein Vergleich der Gruppen I u. II mit der Kontrollgruppe ist daher nicht sinnvoll. Da die Kontrollgruppe dieser Studie wegen ihres Trends nicht gewertet werden kann, läßt sich diese Studie nur aufgrund der Tendenzen innerhalb der Probandengruppe auswerten.

Betrachtet man die Intensität der Erythembildung 24 h nach UV-Bestrahlung innerhalb einer Gruppe (Tabelle 15, Seite 82) so zeigt die Gruppe I eine deutliche Verminderung der Intensität der Erythembildung um 43% ($p < 0,001$). Von Beginn der Studie bis zur sechsten Woche vermindert sich die Intensität der Erythembildung 24 h nach UV- Bestrahlung in der

Gruppe II um 25% ($p = 0,03$). Doch bis 12 Woche steigt die Lichtsensitivität der Haut in diese Gruppe wieder an, so daß zum Ende der Studie nur noch eine Verminderung der Erythemintensität um 19% gefunden wird, die mit einem $p = 0,09$ nicht mehr als signifikant gelten kann.

Tabelle 15: Erythembildung angegeben als Δa -Wert in der Studie III (Gruppe I $n = 11$; Gruppe II $n = 12$; Kontrollgruppe $n = 10$).

Woche	0	6	12
Δa-Wert (Erythem)			
Gruppe I	$7,7 \pm 2,1^d$	$6,7 \pm 2,6$	$4,4 \pm 2,1^{a,e}$
Gruppe II	$6,4 \pm 2,7$	$4,8 \pm 3,0^b$	$5,2 \pm 2,1^f$
Kontrollgruppe	$5,6 \pm 2,1$	$6,4 \pm 2,4$	$7,6 \pm 2,4^c$

a $p = 0,001$ Signifikanz des Trends innerhalb der Gruppe I

b $p = 0,03$ Signifikanz des Trends innerhalb der Gruppe II

c $p = 0,01$ Signifikanz des Trends innerhalb der Kontrollgruppe

d $p < 0,05$ Signifikanz des Unterschiedes zwischen Gruppe I und der Kontrollgruppe

e $p = 0,01$ Signifikanz des Unterschiedes zwischen Gruppe I und der Kontrollgruppe

f $p = 0,03$ Signifikanz des Unterschiedes zwischen Gruppe II und der Kontrollgruppe

4. Diskussion

4.1. Carotinoide im Blut

4.1.1. Das Carotinoidprofil im Blutserum: Studie I, Studien II u. III im Vergleich zu anderen Studien

In den USA, Japan und verschiedenen europäischen Staaten wurden bereits umfangreiche Studien über den Serumgehalt der Hauptcarotinoide im Blut durchgeführt [76-78, 107-109]. Für Deutschland wurden für Erwachsene bis jetzt im Blutplasma nur die Werte für β -Carotin bestimmt [110] und lediglich Abschätzungen zur täglichen Aufnahme der verschiedenen Carotinoide anhand von Fragebögen gemacht [111]. Eine Studie mit 129 Kindern und Heranwachsenden (1-18 Jahre) aus Deutschland bestimmte nur den Blutplasmagehalt für Cryptoxanthin, Lycopin, α - und β -Carotin [112].

Meistens wird in Studien der Median und nicht der Mittelwert angegeben. Der Median ist der Zentralwert der Meßwerte. Dieser Wert ist im Verhältnis zum Mittelwert deutlich unempfindlicher gegen einseitige Extremwerte („Ausreißer“). Damit beschreibt der Median auch nicht-normalverteilte Meßwerte (schiefgipflige Häufigkeitsverteilungen). Dies soll hier kurz an der linksgipfligen Häufigkeitsverteilung des β -Carotinserumgehalts der Frauen der Studie I erläutert werden. Der Mittelwert des β -Carotingehalts liegt bei $0,56 \mu\text{mol/l}$ und weicht um mehr als 20% vom Modalwert (häufigster gemessener Serumgehalt) im Intervall zwischen $0,3$ - $0,45 \mu\text{mol/l}$ ab. Der Modalwert wurde mehr als dreimal so häufig gemessen wie der Mittelwert und beschreibt daher die Probandengruppe besser als der Mittelwert. Doch ein exakter Modalwert läßt sich nur schwer berechnen, da hierfür erst eine Häufigkeitsverteilungsfunktion bestimmt werden müßte. Der Median läßt sich direkt aus den Meßwerten berechnen und liegt in diesen Fällen bei $0,41 \mu\text{mol/l}$ für β -Carotin. Folglich beschreibt er den Serumgehalt genauso korrekt wie der Modalwert. Aus diesem Grund werden in Tabelle 16 (Seite 84) die Mediane der Studie I und der Studien II u. III mit anderen Studien verglichen.

Tabelle 16: Vergleich des Carotinoidserumgehalts ($\mu\text{mol/l}$) verschiedener Carotinoide in der Bevölkerung verschiedener Staaten. Angegeben ist der Mittelwert* oder Median der Carotinoide im Blutserum oder Blutplasma.

Staat	Lutein		Zeaxanthin		β -Cryptoxanthin		Lycopin		α -Carotin		β -Carotin	
	w	m	w	m	w	m	w	m	w	m	w	m
Studie I ^{SX} w=78/m=30 50-90 Jahre	0,27	0,28	0,08	0,08	0,20	0,14	0,14	0,21	0,08	0,05	0,41	0,31
Studie II/III ^{SX} w=37/m=15 19-58 Jahre	0,19	0,19	0,06	0,07	0,13	0,11	0,34	0,43	0,14	0,10	0,56	0,45
Spanien ^S w=240/m=210 5-79 Jahre	0,18	0,19	0,06	0,06	0,39	0,28	0,36	0,35	0,06	0,05	0,28	0,22
Italien ^{*P} w = 48/m = 27 Mittelw. 77 Jahre	0,32		0,12		0,32		0,75		0,06		0,58	
England ^P w=938/m=938 volljährig	0,29	0,29 ^Y			0,16	0,13	0,25	0,25	0,07	0,06	0,32	0,24
Japan ^S w=1196/m=618 7-86 Jahre	0,69	0,62 ^Y			0,60	0,36	0,50	0,38	0,18	0,12	0,64	0,35
USA I ^{*P} w=408/m=230 67-96 Jahre	0,51	0,48 ^Y			0,26	0,20	0,59	0,64	0,11	0,09	0,49	0,35
USA II ^{*P} w=186/m=121 45-65 Jahre	0,27	0,28	0,06	0,07			0,76	0,82	0,12	0,11	0,58	0,46

^S = im Blutserum

^P = im Blutplasma

m = männlich

w = weiblich

^X = diese Arbeit

^Y = Lutein + Zeaxanthin

Im allgemeinen Vergleich der Carotinoidstudien zeigt sich, daß das in Studie I, II u. III gefundene Carotinoidprofil gut mit dem Carotinoidprofil der Studien jener Staaten korreliert, die einen westlichen Lebensstil zeigen (Spanien, Italien, England und USA). Größer sind die Abweichungen im Vergleich mit der japanischen Studie. Die Ähnlichkeit der westlichen Industrienationen im Carotinoidprofil gilt auch für die verschiedenen Altersschichten, was sich an folgenden Beispielen zeigt.

Beispiel 1: Für Lutein liegen die Mittelwerte bzw. Mediane der Älteren bei 0,27 $\mu\text{mol/l}$ (Studie I), 0,32 $\mu\text{mol/l}$ (Italien) und 0,27 $\mu\text{mol/l}$ (USA I) und die Mittelwerte bzw. Mediane der Jüngeren 0,18 $\mu\text{mol/l}$ (Spanien) und 0,19 $\mu\text{mol/l}$ (Studie II/III) jeweils nahe beieinander.

Beispiel 2: Die Mittelwerte bzw. Mediane der jüngeren Frauen für β -Carotin von den USA II (0,58 $\mu\text{mol/l}$) und Studie II/III (0,56 $\mu\text{mol/l}$), sowie der älteren Frauen der USA I (0,49 $\mu\text{mol/l}$) und Studie I (0,41 $\mu\text{mol/l}$) liegen jeweils im gleichen Konzentrationsbereich.

Der Vergleich mit den Studien anderer Staaten zeigt damit, daß die zwischen der Studie I und der Studie II u. III gefundenen signifikanten Unterschiede altersbedingt sind. Die beobachtete Altersabhängigkeit ist aber möglicherweise auf Änderung der Ernährungsgewohnheiten im Alter zurückzuführen. Denn, obwohl der Lycopinserumgehalt in der Studie I und der Studie II in den USA mit älteren Teilnehmern niedrigerer ist als die in den entsprechenden Studien mit jüngere Teilnehmern, findet sich diese Altersabhängigkeit nicht, wenn man alle Studien der westlichen Länder gemeinsam vergleicht.

Trotz des im allgemeinen ähnlichen Carotinoidprofils westlicher Industrienationen zeigen sich im Einzelnen deutliche regionspezifische Unterschiede. In mediterranen Ländern wird im Vergleich zu anderen westlichen Staaten im Durchschnitt fast der zweifachen β -Cryptoxanthingehalt gefunden. Die Teilnehmer der italienischen und der beiden amerikanischen Studien zeigen deutlich höhere Lycopinwerte. Diese Auffälligkeiten spiegeln wahrscheinlich spezifische Ernährungsgewohnheiten wider.

Alle Studien zeigen einen Unterschied im Serumgehalt der provitamin-A-aktiven Carotinoide β -Carotin und β -Cryptoxanthin zwischen den Geschlechtern. In Spanien, England ($p < 0,001$) und in der Studie I ($p = 0,01$, Tabelle 3, Kapitel 3.1.2., Seite 37, 38) liegt der Gehalt für β -Cryptoxanthin bei den Frauen um 30% höher als bei den Männern. In der japanischen Studie beträgt der Unterschied sogar 45%. Die Studien aus den USA und die Studien II u. III finden einen Unterschied von etwa 15 % (Tabellen 5 u. 6, Kapitel 3.1.2., Seite 43). Die bimodale Häufigkeitsverteilung (Abbildung 10 Kapitel 3.1.1, Seite 33) des β -Cryptoxanthinserumgehalts in der Studie I deutet bereits an, daß bei Frauen möglicherweise zwei Subpopulationen mit hohem (0,35-0,40 $\mu\text{mol/l}$) und niedrigem (0,20-0,25 $\mu\text{mol/l}$) β -Cryptoxanthinserumgehalt existieren. Diese Modalwerte liegen ca. 20, bzw. 50 % höher als der Modalwert der Männer bei 0,15-0,20 $\mu\text{mol/l}$. Ebenso ist ein geschlechtsspezifischer Unterschied des β -Carotins serumgehalts von mehr als 20% in allen Studien zu erkennen. Möglicherweise könnte ein geschlechtsspezifischer Unterschied in der Carotinoidresorption oder dem Carotinoidmetabolismus dafür verantwortlich sein, da Pelz et al. [111] z.B. in ihrer Studie für Deutschland keinen Unterschied in der Nahrungszufuhr von β -Carotin oder β -Cryptoxanthin finden. Einen signifikant höherem Retinolgehalt ($p = 0,001$) bei Männern trotz eines signifikant niedrigeren β -Carotingehalts ($p = 0,001$) beobachten auch Olmedilla et al. [109]. Den gleichen Sachverhalt finden auch Thurnham et al. [76] und Ascherio et al. [108], doch geben sie keine Signifikanz für diese Unterschiede an. Ein signifikant höherer Retinolwert der Männer in der Studie I Studie ($p = 0,01$), obwohl der β -Carotingehalt und der

β -Cryptoxanthingehalt signifikant niedriger sind als bei Frauen ($p = 0,04$, $p = 0,01$, Tabellen 3 u. 4, Kapitel 3.1.2., Seite 37-40), läßt einen geschlechtsspezifischen Unterschied im Metabolismus dieser Carotinoide vermuten. In vivo Studien an Mensch und Tier zeigten, daß bis zu 90% des resorbierten β -Carotins in Retinol bzw. Retinylester umgewandelt wird [68, 69, 72, 73]. Daher wäre ein möglicher Erklärungsansatz, daß Männer β -Carotin bzw. β -Cryptoxanthin schneller zu Retinol metabolisieren.

In der vorliegenden Arbeit und in den USA findet sich bei den Männern ein höherer Lycopingehalt im Blut. Doch für England, Spanien und Japan ist dies nicht der Fall. In Japan wird sogar bei den Frauen ein 30% höherer Lycopinwert auf als bei Männern gefunden. Aufgrund der verschiedenen Ergebnisse der einzelnen Staaten spiegelt der unterschiedliche Lycopingehalt zwischen Männern und Frauen wahrscheinlich eher Differenzen im Ernährungsverhalten als geschlechtsspezifische Unterschiede wider. Für Lycopin lassen die Häufigkeitsverteilungen der Frauen aus Studie I zwei Untergruppen erkennen. Die deutlich größere Untergruppe zeigt ein enges Maximum bei 0,15-0,20 $\mu\text{mol/l}$. Die zweite deutlich kleinere Gruppe zeigt einen weiten Maximalbereich zwischen 0,35-0,45 $\mu\text{mol/l}$. Dieser Maximalbereich fällt mit dem Mittelwert der jüngeren Frauen (Studie II u. III) bei 0,37 $\mu\text{mol/l}$ zusammen. Dieses führt zu der Annahme, daß der signifikante Altersunterschied der Lycopinkonzentration auf verschiedene Ernährungsgewohnheiten der Altersgruppen zurückzuführen ist.

Die Beobachtung, daß der Carotinoidgehalt im Blutplasma bzw. Serum, bis auf den Gehalt von β -Carotin und β -Cryptoxanthin, im wesentlichen Ernährungsgewohnheiten widerspiegelt, ist bedeutsam für eine mögliche Empfehlung, die tägliche Carotinoidzufuhr zu erhöhen und der damit verbundenen möglichen Prävention degenerativer Zivilisationskrankheiten. Prinzipiell lassen sich zwei Wege zur Erhöhung des Carotinoidprofils beschreiten: Zum einen die Änderung der Ernährungsgewohnheiten der Bevölkerung durch Empfehlungen für bestimmte carotinoidhaltige Lebensmittel. Der zweite Weg ist die Anreicherung von Nahrungsmitteln mit Carotinoiden.

4.1.2. Vergleich der Korrelationen der Carotinoidkonzentrationen im Serum der Studien I, II u. III mit anderen Studien

Die in der Studie I gefundenen hohen Korrelationskoeffizienten von $r = 0,50$ für Frauen und $r = 0,87$ für Männer zwischen dem Lutein- und dem Zeaxanthingehalt im Serum finden auch Ascherio et al. (Plasma) [108] und Olmedilla et al. (Serum) [107]. Sie geben vergleichbare Korrelationskoeffizienten von $r = 0,64$ bzw. zwischen $0,61-0,71$ an. In allen im vorigen Kapitel aufgeführten Studien ist das Verhältnis von 3:1 zwischen dem Lutein- und dem Zeaxanthingehalt im Plasma bzw. Serum beobachtet worden.

Die von Ascherio et al. [108] und Olmedilla et al. [107] beobachtete Korrelation zwischen dem α - und dem β -Carotingehalt ($r = 0,74$ Frauen; $r = 0,69$ Männer) wird in der Studie I nicht gefunden. Dagegen zeigt sich diese Korrelation deutlich in den Studien II u. III. ($r = 0,78$, $p < 0,01$ Frauen; $r = 0,59$ Männer $p < 0,03$). Da die Korrelation zwischen dem α - und dem β -Carotingehalt nur bei den im Durchschnitt 30 Jahre jüngeren Teilnehmern der Studien II u. III beobachtet wird, scheint sie möglicherweise altersabhängig zu sein.

Der von Ascherio et al. und Olmedilla et al. [108, 107] gefundene Zusammenhang zwischen dem Lycopin- und dem β -Carotingehalt im Plasma bzw. Serum wird nur in der Frauengruppe der Studie I mit einer niedrigen Signifikanz gefunden ($r = 0,27$; $p < 0,05$). Der Korrelationskoeffizient der Männergruppe ist ähnlich hoch, aber aufgrund der kleineren Gruppengröße nicht mehr signifikant ($r = 0,21$, $p > 0,05$).

Die in der Studie I gefundenen signifikanten Abhängigkeiten des Lutein- und des Zeaxanthinserumgehalts vom HDL-Cholesteringehalt (Lutein $r = 0,37$, $p < 0,01$; Zeaxanthin $r = 0,27$, $p < 0,05$) lassen sich durch den gemeinsamen Transport in den HDL-Lipoproteinen erklären [67]. In der Männergruppe zeigt sich ein signifikanter Zusammenhang nur zwischen dem Zeaxanthingehalt und dem HDL-Cholesteringehalt ($r = 0,34$, $p < 0,05$). Da Carotine im Blut in LDLs transportiert werden, wäre in Studie I eine signifikante Korrelation des Serumgehalts dieser Carotinoide mit dem LDL-Cholesteringehalt im Serum erwartet worden. Doch dieses wird nicht beobachtet.

Der in der Studie I gefundene Zusammenhang ($r = 0,41$; $p < 0,01$) zwischen dem β -Carotin- und der β -Cryptoxanthinserumgehalt wurde von Olmedilla et al. [107] nicht beobachtet. Ascherio et al. [108] haben den β -Cryptoxanthingehalt nicht bestimmt.

4.2. *Schutzwirkungen der Carotinoide gegen photooxidativen Streß*

4.2.1. Das Hautfibroblastenmodell

Das in der vorliegenden Arbeit verwendete Hautfibroblastenmodell wurde in ähnlicher Form bereits von Morlière et al. [47, 105] benutzt. Diese Arbeitsgruppe untersuchte ausschließlich die UV-induzierte Bildung thiobarbitursäurereaktiver Substanzen (TBARS). Die in der vorliegenden Arbeit gefundene Menge an TBARS in den Kontrollfibroblasten nach UV-Bestrahlung betrug ca. 1,4 pmol/µg Protein. Dieser Wert entspricht der von Morlière et al. nach UV-Bestrahlung gefundenen TBARS-Menge von etwa 1,3 pmol/µg Protein. Die zur Beladung der Zellen mit Carotinoiden in der vorliegenden Arbeit verwendeten Liposomen mit gesättigten Fettsäuren haben somit keinen oder nur einen geringen Einfluß auf die TBARS-Bildung in diesem Modell. Dieses Ergebnis zeigt, daß das verwendete Hautfibroblastenmodell geeignet ist, den Einfluß der Carotinoide auf die TBARS-Bildung nach UV-Bestrahlung zu untersuchen.

4.2.2. Hypothese zum photoprotektiven Wirkungsmechanismus der Carotinoide

Alle getesteten Carotinoide und deren Kombination können Hautfibroblasten vor UV-induzierter Lipidperoxidation schützen. Die Konzentrationsabhängigkeit der UV-induzierten TBARS-Bildung zeigt für alle getesteten Carotinoide einen ähnlichen Kurvenverlauf. Charakterisiert werden diese Kurven wie im Kapitel 3.2.1. (Seite 52) beschrieben durch:

- die **optimale Schutzkonzentration**,
- die **Größe des Konzentrationsbereichs**, in dem eine Schutzwirkung zu beobachten ist, und
- die **maximale Schutzwirkung**.

Im Hautfibroblastenmodell zeigen alle drei einzeln getesteten Carotinoide, sowie zwei der vier untersuchten Carotinoidmischungen, eine maximale Schutzwirkung von etwa 40-50% bei optimaler Schutzkonzentration. Dieses wirft die Frage auf, ob 40-50% Verminderung der TBARS-Bildung ein Limit des Schutzes vor Lipidperoxidation in diesem in vitro System darstellt. Es ist wahrscheinlich, daß β -Carotin, Lycopin und Lutein nach dem gleichen

Mechanismus schützen und dabei möglicherweise sowohl die Peroxylradikale, als auch Singulett-Sauerstoff effektiv inaktivieren [2]. Die Größe der bimolekularen Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten scheint in diesem Modellsystem eine untergeordnete Rolle zu spielen.

Unterschiede in der Konzentrationsabhängigkeit der verschiedenen Carotinoide zeigen sich vor allem bei der optimalen Schutzkonzentration und der Größe des Konzentrationsbereichs, in dem eine Schutzwirkung zu beobachten ist. Lycopin wirkt bereits bei 6-8 fach geringerem Gehalt in den Hautfibroblasten als β -Carotin oder Lutein. Es wirkt bereits in einem Gehalt prooxidativ, in dem die anderen Carotinoide noch kaum eine Schutzwirkung zeigen. Zur Erklärung kann man folgende Hypothese aufstellen. Aufgrund seiner hohen Lipophilie liegt Lycopin vermutlich horizontal, vollständig innerhalb der Zellmembran. Es besitzt einen großen Raumbedarf in der Zellmembran, da es quer zur Ausrichtung der Phospholipide liegt. Damit kann Lycopin aber gleichzeitig mit vielen verschiedenen Lipidmolekülen wechselwirken. Somit bildet Lycopin schon bei einem geringen Gehalt in den Hautfibroblasten (0,05 pmol/ μ g Protein) einen antioxidativ wirkenden Schutzschild für die gesamte Zellmembran. Doch andererseits stört der Raumbedarf von Lycopin bereits bei einem Lycopingehalt der Hautfibroblasten von $> 0,15$ pmol/ μ g Protein die Membranstruktur und erleichtert damit den Angriff durch photooxidativen Streß erzeugter ROS, was zu der vermehrten TBARS-Bildung nach UV-Bestrahlung bei hohem Lycopingehalt führt. Diese Erhöhung ist im Einklang mit dem von Lowe et al. [113] gefundenen Verlust der Membranintegrität von HT29 Zellen bei hoher Lycopinkonzentration. Bei unilamellaren Liposomen wurde ebenfalls eine Störung der Membranstruktur durch Lycopin vermutet, da sich nur eine begrenzte Lycopinmenge in die Liposomen einbauen ließ [57]. Lutein mit seinen polaren OH-Gruppen kann die Zellmembran vertikal durchspannen [114]. Sein Raumbedarf in der Zellmembran ist geringer, da es parallel zu den Phospholipiden der Zellmembran liegt. Als Folge wird experimentell gefunden, daß eine in diesem Fall ein sechsfach höherer Gehalt an Lutein (Lutein: 0,29 pmol/ μ g Protein; Lycopin: 0,05 pmol/ μ g Protein) für einen die Zelle umgebenden Schutzschild benötigt wird. Nach obiger Hypothese müsste die Größe des Konzentrationsbereichs, in dem eine Schutzwirkung zu beobachten ist, für Lutein ebenso um ungefähr den Faktor 6 größer sein. Für Lutein wird ein um den Faktor 5 größerer Konzentrationsbereich, in dem eine Verminderung der TBARS-Bildung erreicht wird, gefunden (Kapitel 3.2.1., Seite 58).

Eine Besonderheit muß nach obiger Hypothese für β -Carotin vorliegen. Da dieses ebenfalls wie Lycopin wegen seiner geringen Polarität horizontal in der Membran liegen sollte, wäre eine niedrigere optimale Schutzkonzentration und ein kleinerer Konzentrationsbereich, in dem ein Schutz vor photooxidativem Streß erreicht wird, als für Lutein erwartet worden. Zwar erreicht β -Carotin (0,17 pmol β -Carotin/ μ g Protein) bei einem niedrigeren Gehalt als Lutein (0,29 pmol Lutein/ μ g Protein) eine fast maximale Schutzwirkung (41% statt 45% = maximale Schutzwirkung), doch ist der Konzentrationsbereich, in dem eine Schutzwirkung zu beobachten ist, um den Faktor 8 größer als bei Lutein, bzw. um den Faktor 48 größer als bei Lycopin. Der Schutzeffekt von β -Carotin scheint über ein Konzentrationsbereich von 0,25 pmol/ μ g Protein bis 1,25 pmol/ μ g Protein unabhängig vom β -Carotingehalt der Hautfibroblasten zu sein.

Möglicherweise beeinflußt β -Carotin zusätzlich Signalwege in der Zelle. Hinweise auf die Beeinflussung eines Signalweges in der Zelle geben die Ergebnisse zweier anderer Arbeitsgruppen:

a.) Obermüller-Jevic et al. [115] zeigen verstärkte Expression der Hämoxygenase1 in UV-bestrahlten β -carotinbehandelten Keratinozyten. Möglicherweise werden durch UV-Strahlung und β -Carotin zusammen noch weitere spezifische Enzyme aktiviert. Der große Konzentrationsbereich, in dem eine Verminderung der TBARS-Bildung durch β -Carotin erreicht wird, wäre dann eine Folge einer induzierten enzymatischen Verteidigung gegen photooxidativen Streß.

b.) Von Stivala et al. [116] wird eine Verlängerung der G_1 -Phase des Zellzyklus durch β -Carotin in Hautfibroblasten beobachtet. Eine Verlängerung der G_1 -Phase des Zellzyklus bedeutet eine Verringerung der DNA-Replikation (weniger Mitosen), aber bietet die Möglichkeit zur verstärkten Genexpression in den Zellen. Darüber hinaus postuliert diese Arbeitsgruppe, daß die Verlängerung der G_1 -Phase des Zellzyklus von β -Carotin direkt und nicht auf Umwandlung von β -Carotin in Retinoide zurückzuführen ist.

4.3. Systemische Protektion vor UV-induziertem Erythem

4.3.1. Lycopin in Form von Tomatenmark als orales Sonnenschutzmittel

In der Studie II bewirkt die zehnwöchige tägliche Aufnahme von 40 g Tomatenmark (16 mg Lycopin) und 10 g Olivenöl zur Tageshauptmahlzeit eine Verdopplung des Lycopinserumgehalts der Verumgruppe im Durchschnitt von $0,37 \pm 0,25$ nmol/ml auf $0,72 \pm 0,22$ nmol/ml. Dieser Anstieg ist im Vergleich zum Anstieg des β -Carotingehalts in der Studie III relativ niedrig. Dort verfünffachte sich der mittlere Serumgehalt auf einen Endwert von ca. 4 nmol/ml durch die tägliche Einnahme von ca. 10 mg β -Carotin als Supplement. Der Grund für diese relativ geringe Steigerung des Lycopingehalts im Serum könnte eine schlechte Bioverfügbarkeit des Lycopin aus der Nahrung sein. Einflußfaktoren der Bioverfügbarkeit des Tomatenlycopins in dieser Studie sind z.B. die Freisetzung des Lycopins aus den Chromoplasten der Tomate und die Micellenbildung von Lycopin mit dem verabreichten Olivenöl. Sowohl der Lycopingehalt zu Beginn der Studie als auch die Erhöhung des Lycopinserumgehalts durch den Verzehr von Tomatenmark mit Olivenöl stimmen mit in der Literatur gefundenen Werten überein [117, 118].

Im Bezug zum Gesamtcarotinoidgehalt des Blutserums wirkt sich die Verdopplung des Serumlycopins in einer 18%igen Steigerung des Gesamtcarotinoidgehalts aus, die mit der zum Ende der Studie erreichten 15%igen Steigerung der Hautcarotinoide übereinstimmt.

Bei einer Strahlungs-dosis von 1,25 MED wurde in der Studie II eine signifikante Verminderung der Erythemintensität um ungefähr 40% durch Lycopinsupplementierung erreicht. Für die β -Carotingruppe in der Studie III wurde bei einer Strahlungs-dosis von 1,6 MED ebenfalls eine Verminderung der Erythemintensität um ca. 40% beobachtet. Unter Berücksichtigung der höheren Strahlungs-dosis ist dieser Wert aber stärker zu gewichten als die entsprechende Verminderung bei Lycopin. Auf Grund der Versuchsanordnung ist die Bestimmung eines Lichtschutzfaktors analog der DIN-Norm bzw. der COLIPA-Methode nicht möglich [119, 120]. In der Studie von Stahl et al. [9] wurde nach achtwöchiger Supplementierung mit β -Carotin eine vergleichbare Verminderung der Erythemintensität von 35% bei 1,5 MED gefunden. In jener Studie ist für β -Carotin ein Lichtschutzfaktor 2 aufgrund physikalischer Reflektionsmessungen abgeschätzt worden [121, Seite 76, 77]. Da sich β -

Carotin und Lycopin in ihrer Schutzwirkung in den Studien nur marginal unterscheiden, ist für Lycopin ein ähnlicher Lichtschuttfaktor zu erwarten.

Kritisch ist in diesem Fall, daß Lycopin bei UV-Einwirkung auf die Haut bevorzugt gegenüber β -Carotin verbraucht wird [26]. Somit könnte der Lycopinschutz bei längerer Strahlungsexposition in der Haut gegenüber β -Carotin nachlassen, weil das Lycopin in einem zu starken Maße verbraucht wird.

Die Schutzwirkung durch Lycopin wurde erst nach einer Supplementierungsdauer von 10 Wochen beobachtet. Die Erhöhung der Lycopinzufuhr über einen Zeitraum von vier Wochen reicht nicht aus, um einen Schutzeffekt für Lycopin zu zeigen, obwohl eine Erhöhung des Lycopingehalts im Serum und eine Erhöhung des Gesamtcarotinoidgehalts in der Haut bereits nach vier Wochen gezeigt werden konnte. Möglicherweise hat zu diesem Zeitpunkt das Lycopin zwar die Haut, doch noch nicht seinen eigentlichen Wirkort erreicht. In der Studie III wurde 6 Wochen bis zur ersten Bestrahlung supplementiert. Parallel dazu ist in Gruppe I (β -Carotin) bereits ein messbarer, wenn auch noch nicht signifikanter, Schutz (im Gruppentrend) zu erkennen. Die lange Zeit von ca. 6 Wochen, die die Carotinoide benötigen, um einen Schutzeffekt zu erreichen oder an ihren Wirkort zu gelangen, ist eine mögliche Erklärung, warum in einer 23 Tage-Studie zur Sonnenschutz Wirkung von β -Carotin von Garmyn et al. kein Effekt beobachtet wurde [7].

4.3.2. Diskussion der Studie III

Das Hauptproblem in der Auswertung der Vergleichsstudie zwischen β -Carotin und einer Kombination von Lutein, Lycopin und β -Carotin (Studie III) ist ein signifikanter Trend in der Kontrollgruppe. Während der zwölfwöchigen Studie stieg die Erythemintensität nach UV-Bestrahlung in dieser Gruppe um 36%. Ein Vergleich mit den anderen beiden Gruppen ist daher nicht mehr sinnvoll. Ein zweites Problem dieser Studie besteht darin, daß bereits zu Beginn der Studie die Intensität des induzierten Erythems in der Kontrollgruppe signifikant niedriger war als in der β -Carotingrouppe. Ein signifikanter Unterschied in der Erythemintensität bereits zu Beginn der Studie ist ein mögliches Risiko des vor Studienbeginn festgelegten Studiendesigns, bei dem die Probanden vor der ersten Messung randomisiert in die drei verschiedenen Gruppen der Studie eingeteilt werden. Eine mögliche

Alternative wäre in diesem Fall ein *matching* der Probanden nach der ersten Erythemmessung zu drei Gruppen mit gleicher Erythemintensität der Haut gewesen. Doch auch ein *matching* der Probanden hätte den Trend der Intensität des induzierten Erythems in der Kontrollgruppe nicht verhindern können.

In der Kontrollgruppe wurde parallel zur 35%igen Steigerung der Erythembildung eine 35%ige Abnahme der Hautcarotinoide festgestellt, doch erniedrigte sich der Gesamtcarotinoidgehalt der Haut auch in der Placebogruppe der Lycopinstudie ohne eine Auswirkung auf die Erythemintensität zu zeigen. Somit kann die Verringerung der Carotinoide in der Haut nicht als alleinige Erklärung für den signifikanten Trend der Erythemintensität in der Kontrollgruppe dienen.

Da die Kontrollgruppe dieser Studie aus obigen Gründen insgesamt nicht gewertet werden kann, läßt sich diese Studie nur aufgrund einer Tendenz innerhalb einer Probandengruppe auswerten. In der Gruppe I zeigt sich eine deutliche und signifikante Verringerung der Erythembildung nach 12 Wochen (40%, $p < 0,01$). Doch ist dieses Ergebnis bereits bekannt [9].

In der Gruppe II zeigt sich nach 6 Wochen eine signifikante Verminderung der Erythembildung in dieser Gruppe (25%, $p = 0,03$). Zu diesem Zeitpunkt wird durch Supplementierung mit der Carotinoidmischung ein deutlich stärkerer Schutzeffekt erreicht als mit β -Carotinsupplementierung. Nach 12 Wochen ist in dieser Gruppe kein signifikanter Schutzeffekt mehr zu beobachten. Die Betrachtung der Rohdaten dieses Versuchs zeigte eine für dieses Ergebnis mögliche Fehlerquelle auf. Vergleicht man den Rotanteil in der Hautfarbe zwischen der 6. und der 12. Woche vor UV-Bestrahlung, so fällt eine Änderung des Rotanteils bei ca. der Hälfte der Probanden auf. Bei fünf Probanden erniedrigt sich der a-Wert vor Bestrahlung um ca. 40%. Ein über die Studie konstanter Rotwert der Haut vor Bestrahlung ist aber Voraussetzung, um eine Erythemintensität nach UV-Bestrahlung einzuschätzen. Die absoluten a-Werte 24 h nach UV-Bestrahlung der 6. und der 12. Woche unterscheiden sich kaum und folglich wäre in der 12. Woche eine ähnliche Erythemintensität nach UV-Bestrahlung erwartet worden.

Resümiert man alle möglichen Fehlerquellen in dieser Studie so ergibt sich, daß aufgrund der möglichen Fehler in dieser Studie eine Aussage über die Stärke der Schutzwirkung einer Carotinoidmischung gegen ein UV-induziertes Erythem nicht möglich ist. Eine Wiederholung der Studie scheint aber vielversprechend, da die Erythembildung in der Gruppe II in der 6. Woche signifikant um 25% herabgesetzt war und sich eine Verminderung der absoluten

Hautröte am Erythemmaximum sowohl in der 6., als auch in der 12. Woche gefunden wurde. Zur Vermeidung der in dieser Studie eingetretenen Fehler könnte die Einteilung in die verschiedenen Gruppen der Studie nach der ersten Erythemmessung erfolgen, um, durch entsprechendes *matching*, Gruppen gleicher Erythemintensität nach UV-Bestrahlung als Ausgangspunkt der Studie zu haben. Der zweite Verbesserungsvorschlag ist, die Abstände zwischen den Meßpunkten zu verkürzen. Da die Hautfarbe jahreszeitlichen Schwankungen unterliegt, sind 12 Wochen möglicherweise ein zu langer Zeitraum für die Studie. Ein zusätzlicher Meßpunkt nach 8 Wochen würde sich anbieten, da in der bereits veröffentlichten β -Carotinstudie nach 8 Wochen ein deutlicher Schutzeffekt für β -Carotin beobachtet wurde und in dieser Studie sowohl die a -Werte, als auch die Δa -Werte zeigen, daß bereits nach 6 Wochen Supplementierung eine 25 %ige Schutzwirkung durch die Carotinoidmischung erzielt wurde, die aber noch nicht signifikant war.

4.3.2. Mögliche Schlußfolgerungen aus Teilergebnissen der Studie III

Die β -Carotingroupe für sich genommen bestätigt die bereits von Stahl et al. [9] beschriebene UV-Schutzwirkung von β -Carotin. In jener Studie enthielt das β -Carotin-Supplement ungefähr 2,5 mal soviel β -Carotin wie in der Studie III, trotzdem sind die gefundenen β -Carotinkonzentrationen beider Studien im Mittel in etwa gleich (ca. 3-4 nmol/ml). In beiden Studien wird im Mittel nach der 4. bzw. 6. Wochen keine deutliche Änderung des β -Carotingehalts mehr im Serum festgestellt. Stahl et al. fanden nach 4 Wochen Supplementierung 2,75 nmol β -Carotin/ml Serum und nach 12 Wochen 2,92 nmol β -Carotin/ml Serum. In der Studie III werden nach 6 Wochen 3,22 nmol β -Carotin/ml Serum und nach 12 Wochen 3,84 nmol β -Carotin/ml Serum gefunden. Daher scheint möglicherweise bei täglicher Gabe von 9 mg β -Carotin eine Sättigung im Blut oder bei der Resorption von β -Carotin erreicht zu sein. Dabei kann es aber durchaus deutliche individuelle Unterschiede geben. Zwei Probanden zeigten in dieser Studie mit einem β -Carotinsерumgehalt von etwa 6,5 nmol/ml nach 12 Wochen Supplementierung einen deutlich höheren β -Carotinsерumgehalt als die restlichen 10 Probanden.

Die Gruppe II wurde mit β -Carotin, Lycopin und Lutein supplementiert. Obwohl keine Supplementierung mit Zeaxanthin erfolgte, änderte sich der Zeaxanthinsерumgehalt signifikant ($p < 0,0001$) um 123% (Tabelle 14b, Kapitel 3.3.2., Seite 79). Ein Anstieg des

Zeaxanthingehalts im Blutserum nach Luteinsupplementierung gibt einen Hinweis auf eine mögliche enzymatische Umwandlung von Lutein in Zeaxanthin. Eine enzymatische Umwandlung von Lutein in Zeaxanthin bzw. *meso*-Zeaxantin postulierten bereits Bone et al. 1993 [122] aufgrund des ausschließlich in der Macula lutea des Auges nachweisbaren *meso*-Zeaxantins. Die Umwandlung von Lutein durch Verschiebung einer Doppelbindung in das Racemat aus Zeaxanthin und *meso*-Zeaxanthin zeigten Bone et al. [122] in einer chemischen Reaktion unter nicht-physiologischen Bedingungen. Ein Enzym, das diese Umwandlung katalysiert, wurde jedoch bis jetzt noch nicht gefunden. Doch gibt es im menschlichen Körper entsprechende Enzyme, wie z.B. die Enoyl-CoA Isomerase des Fettsäureabbaus ungesättigter Fettsäuren, die dort die Verschiebung einer Doppelbindung katalysiert.

4.4. Allgemeines zum photoprotektiven Effekt der Carotinoide

Sowohl im Hautfibroblastenmodell als auch in den durchgeführten Interventionsstudien (Studie II u. III) zeigte sich für β -Carotin und Lycopin eine photoprotektive Wirkung. Lutein ist nicht als Einzelsubstanz in einer Interventionsstudie getestet worden. Im Hautfibroblastenmodell zeigte sich, daß möglicherweise das Verhältnis der Carotinoide zueinander den Schutzeffekt gegen UV-induzierte TBARS-Bildung relativ stark beeinflussen und sich die maximale Schutzwirkung in bestimmten Mischungsverhältnissen sogar verringern kann.

Ein direkter Vergleich der Ergebnisse des Hautfibroblastenmodells und der Interventionsstudien ist qualitativ möglich. Sowohl im Fibroblastenmodell, als auch in den Interventionsstudien zeigt Lycopin eine dem β -Carotin vergleichbare Schutzwirkung bei einem deutlich niedrigerem Gehalt. Bei Hautfibroblasten wurde für Lycopin eine um den Faktor 8 niedrigere optimale Schutzkonzentration gefunden als für β -Carotin. In den Interventionsstudien war der Lycopingehalt im Blutserum um den Faktor 5,4 niedriger als β -Carotingehalt. Für die Haut steht nur der Gesamtcarotinoidgehalt zur Verfügung.

Vor einer möglichen Empfehlung, die tägliche Carotinoidzufuhr durch Supplementierung oder Änderung der Ernährungsgewohnheiten zu erhöhen, und der damit verbundenen

möglichen Prävention eines UV-induzierten Erythems oder anderer durch photooxidativen Streß bedingter Hautschädigungen sind folgende Aspekte zu bedenken:

Ein hoher Carotinoidgehalt in den Hautfibroblasten führt zu einer Steigerung des photooxidativen Stresses, was auf Grund vermehrter TBARS-Bildung gezeigt wurde. Dieses ist ein gravierendes Problem bei einer Supplementierung, da die Möglichkeit einer Überdosierung ausgeschlossen werden sollte.

Pharmakologisch betrachtet ist Lycopin zwar das wirkungsvollere Carotinoid zum Schutz vor negativen Auswirkungen der UV-Strahlung auf die Haut (Faktor 5-8), doch ist der nach dem Hautfibroblastenmodell deutlich engere Konzentrationsbereich, in dem ein UV-Schutz erreicht wird, gegenüber β -Carotin kritisch zu beurteilen.

Nach dem Hautfibroblastenmodell scheint β -Carotin möglicherweise nicht ausschließlich über seine antioxidativen Eigenschaften einen Schutzeffekt zu erzielen. Die über einen großen Bereich vollkommen konzentrationsunabhängige Wirkung legte bereits während der Versuche die Vermutung nahe, daß ein Regulierungsmechanismus oder die Aktivierung einer Signalkaskade ab einer bestimmten Grenzkonzentration beteiligt ist. Bestätigt wird diese Hypothese durch veränderte Genexpression, z.B. Hämoxygenase-1 [107], und eine Verlängerung der G₁-Phase des Zellzyklus durch β -Carotin [115]. Die Auswirkung eines Eingriffs in zelluläre Signalkaskaden ist bei Langzeitsupplementierung schwer abzuschätzen.

Nach dem Hautfibroblastenmodell bietet sich auch Lutein als oraler Sonnenschutz an, da es die TBARS-Bildung um 10 % mehr als Lycopin bei optimaler Schutzkonzentration senkt. Zudem wird über einen größeren Konzentrationsbereich eine Schutzwirkung vor UV-induzierter TBARS-Bildung gefunden. Doch muß dieses erst noch in einer Interventionsstudie bestätigt werden.

5. Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde der Gehalt der 6 Hauptcarotinoide (Lutein, Zeaxanthin, β -Cryptoxanthin, Lycopin, α - und β -Carotin) im Blutserum von 115 Frauen und 45 Männern verschiedener Altersgruppen in Deutschland bestimmt. Das gefundene Serumcarotinoidprofil korreliert gut mit den Ergebnissen in Studien anderer Staaten mit westlichem Lebensstil (Spanien, Italien, England und USA). Signifikante geschlechtsspezifische Unterschiede werden im Serumgehalt der provitamin-A-aktiven Carotinoide β -Carotin und β -Cryptoxanthin gefunden. Ein möglicher Erklärungsansatz ist, daß Männer β -Carotin bzw. β -Cryptoxanthin schneller zu Retinol metabolisieren, da bei Männern signifikant höhere Retinolserumwerte gefunden wurden. Der Carotinoidserumgehalt der übrigen Carotinoide, einschließlich der Unterschiede in den Altersgruppen, spiegelt vermutlich im wesentlichen Ernährungsgewohnheiten wider.

Die im Hautfibroblastenmodell getesteten Carotinoide, Lutein, Lycopin und β -Carotin, zeigen eine ähnliche Konzentrationsabhängigkeit der UV-induzierten TBARS-Bildung. Charakterisiert werden diese Kurven durch eine optimale Schutzkonzentration, einen Konzentrationsbereich, in dem eine Schutzwirkung erreicht wird, und eine maximale Schutzwirkung. Unterschiede in der Konzentrationsabhängigkeit der verschiedenen Carotinoide zeigen sich vor allem in optimalen Schutzkonzentration und der Größe des Konzentrationsbereichs, in dem eine Schutzwirkung erreicht wird. Lycopin zeigt seine maximale Schutzwirkung bei einer Konzentration, die 6 bzw. 8 fach niedriger ist als bei Lutein bzw. β -Carotin. β -Carotin zeigt von den getesteten Carotinoiden den größten Konzentrationsbereich, in dem eine Schutzwirkung erreicht wird. Alle drei getesteten Carotinoide, sowie zwei der vier untersuchten Carotinoidmischungen, zeigten eine maximale Schutzwirkung von etwa 40-50% bei optimaler Schutzkonzentration.

In der vorliegenden Arbeit wurde in einer Interventionsstudie 10 Wochen mit Tomatenmark supplementiert. Dabei wurde eine signifikante Verminderung der Erythemintensität (Hautrötung) um 40%, 24 h nach UV-Bestrahlung mit der 1,25 fachen individuellen Minimalen Erythemdosis (MED), beobachtet. Von besonderer Bedeutung ist, daß ein systemischer Schutz vor UV-induzierten Hautschäden (Erythem) durch ein frei verfügbares Lebensmittel (Tomatenmark) nachgewiesen wurde. In einer weiteren Interventionsstudie zeigte sich nach 12 Wochen Supplementierung mit β -Carotin ebenfalls eine Verminderung des Erythems der Probanden um ca. 40% 24 h nach UV-Bestrahlung mit der 1,6 fachen individuellen MED. Bei Probanden, die mit einer Carotinoidkombination aus Lutein, Lycopin und β -Carotin supplementiert wurden, konnte aufgrund von Veränderungen des Farbtons der Haut bei 5 der 12 Probanden keine endgültige Aussage über eine mögliche Schutzwirkung getroffen werden.

6. Literatur

- [1] Sies H, Stahl W. Antioxidants in human health. In: Vitamin C: the state of the art in disease prevention sixty years after the Nobel Prize. (Paoletti R, Sies H, ug J, Grossi E, Poli A, eds.) Springer Verlag 1998, Milano, S. 1-11.
- [2] Sies H, Stahl W. Vitamins E and C, β -carotene, and other carotenoids as antioxidants. *Am J Clin Nutr* 1995; 62:1315S-21S.
- [3] Mathews-Roth MM. Carotenoids in erythropoietic protoporphyria and other photosensitivity diseases. *Ann NY Acad Sci*; 691:127-138.
- [4] Fuchs J. Potentials and limitations of the natural antioxidants RRR-alpha-tocopherol, L-ascorbic acid and β -carotene in cutaneous photoprotection. *Free Radic Biol Med* 1998; 25:848-73.
- [5] Mathews-Roth MM, Pathak MA, Parrish J, Fitzpatrick TB, Kass EH, Toda K, Clemens WA. Clinical trial of the effects of oral beta-carotene on the responses of human skin to solar radiation. *J Invest Dermatol* 1972; 59:349-53.
- [6] Gollnick PM, Hopfenmüller W, Hemmes C, Chun SC, Sundermeier K, Biesalski HK. Systemic β -carotene plus topical sunscreen are an optimal protection against harmful effects of natural UV-sunlight: results of the Berlin-Eilath study. *Eur J Dermatol* 1996; 6:200-5.
- [7] Garmyn M, Ribaya-Mercado JD, Russell RM, Bhawan J, Gilchrest BA. Effect of beta-carotene supplementation on the human sunburn reaction. *Exp Dermatol* 1995; 4:101-11.
- [8] Lee J, Jiang S, Levine N, Watson RR. Carotenoid supplementation reduces erythema in human skin after stimulated solar radiation exposure. *Proc Soc Exp Med*. 2000; 223:170-4.
- [9] Stahl W, Heinrich U, Jungmann H, Sies H, Tronnier H. Carotenoids and carotenoids plus vitamin E protect against ultraviolet light-induced erythema in humans. *Am J Clin Nutr* 2000; 71:795-8.
- [10] Lehrbuch der Toxikologie (Marquardt H, Schäfer SG, eds.) Spektrum Akademischer Verlag GmbH 1994, Heidelberg.
- [11] Speckmann EJ., Wittkowski W. Bau und Funktion des menschlichen Körpers. 19 Aufl., Urban & Schwarzberg 1998, München, S 98-105.
- [12] Moan J, Dahlback A. The relation between skin cancer, solar radiation and ozone depletion. *Br J Cancer* 1992; 65:916-921.
- [13] Diffey BL, Farr PM, Oakley AM. Quantitative studies on UVA-induced erythema in human skin. *Br J Dermatol* 1987;117:57-66.

- [14] Vam E, Tyrrell RM. Induction of oxidative DNA base damage in human skin cells by UV and near visible radiation. *Carcinogenesis* 1997; 18:2379-84.
- [15] Giese AC. *Living with our sun's ultraviolet rays*. Plenum Press New York 1976.
- [16] Cadet J, Anselmino C, Douki T, Voituriez L. Photochemistry of nucleic acids in cells. *J Photochem Photobiol B*. 1992 15; 15:277-98.
- [17] Smith GJ. New trends in photobiology (invited review) Photodegradation of keratin and other structural proteins *J Photochem Photobiol B Biol* 1995; 27:187-198.
- [18] Black HS. The defensive role of antioxidants in skin cancerogenesis. In: *Oxidative stress in dermatology* (Fuchs J, Packer L , eds.) Dekker M, New York 1993, 243-269.
- [19] Auletta M, Gange RW, Tan OT, Matzinger E. Effect of cutaneous hypoxia upon erythema and pigment responses to UVA, UVB, and PUVA (8-MOP + UVA) in human skin. *J Invest Dermatol* 1986; 86:649-52.
- [20] Trenam CW, Dabbagh AJ, Blake DR, Morris CJ. The role of iron in an acute model of skin inflammation induced by reactive oxygen species (ROS). *Br J Dermatol* 1992; 126:250-6.
- [21] Cunningham ML, Krinsky NI, Giovanazzi SM, Peak MJ. Superoxide anion is generated from cellular metabolites by solar radiation and its components. *J Free Radic Biol Med* 1985; 1:381-5.
- [22] Stoien JD, Wang RJ. Effect of near-ultraviolet and visible light on mammalian cells in culture II. Formation of toxic photoproducts in tissue culture medium by blacklight. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1974; 71:3961-5.
- [23] Fuchs J, Huflejt ME, Rothfuss LM, Wilson DS, Carcamo G, Packer L. Acute effects of near ultraviolet and visible light on the cutaneous antioxidant defense system. *Photochem Photobiol* 1989; 50:739-44.
- [24] Punnonen K, Jansen CT, Puntala A, Ahotupa M. Effects of in vitro UVA irradiation and PUVA treatment on membrane fatty acids and activities of antioxidant enzymes in human keratinocytes. *J Invest Dermatol* 1991; 96:255-9.
- [25] Miyachi Y, Imamura S, Niwa Y. Decreased skin superoxide dismutase activity by a single exposure of ultraviolet radiation is reduced by liposomal dismutase pre-treatment. *J Invest Dermatol* 1987; 89:111-2.
- [26] Ribaya-Mercado JD, Garmyn M, Gilchrest BA, Russell RM. Skin lycopene is destroyed preferentially over beta-carotene during ultraviolet irradiation in humans. *J Nutr* 1995; 125:1854-9.
- [27] Godar DE. Light and death: photons and apoptosis. *J Invest Dermatol Symp Proc* 1999; 4:17-23.
- [28] Keyse SM, Tyrrell RM. Induction of the heme oxygenase gene in human skin fibroblasts by hydrogen peroxide and UVA (365 nm): evidence for the involvement of the hydroxyl radical. *Carcinogenesis* 1990 May;11(5):787-91.

- [29] Punnonen K, Lehtola K, Autio P, Kiistala U, Ahotupa M. Chronic UVB irradiation induces superoxide dismutase activity in human epidermis in vivo. *J Photochem Photobiol B* 1995; 30:43-8.
- [30] Burton GW, Ingold KU. beta-Carotene: an unusual type of lipid antioxidant. *Science* 1984; 224:569-73.
- [31] Mayne ST. Beta-carotene; carotenoids and disease prevention in humans. *FASEB J* 1995:690-701.
- [32] Astorg P. Food carotenoids and cancer prevention: an overview of current research. *Trends Fd Sci Tech* 1997; 8:406-13.
- [33] Cooper DA, Eldridge AL, Peters JC. Dietary carotenoids and certain cancers, heart diseases and age-related macula degeneration. *Nutr Rev* 1999; 57:201-214.
- [34] Britton G. Structure and properties of carotenoids in relation to function. *FASEB J* 1995:1551-8.
- [35] Weedon BCL, Moss GP. Structure and nomenclature. In *Carotenoids : Isolation and analysis* (Britton G, Liaaen-Jensen S, Pfander H, eds.) Birkhäuser 1995, Basel; Vol 1A, S. 27-70.
- [36] Sitte P, Falk H, Liedvogel B. Chromoplasts. In: *Pigments in plants* (Czygan FC, ed.), 1980, 2nd ed, Gustav Fischer, Stuttgart.
- [37] Clevidence BA, Bieri JC. Association of carotenoids with human plasma lipoproteins. *Meth Enzymol* 1993; 214:33-46.
- [38] Isler O. *Carotenoids* (Isler O, ed) Birkhäuser 1971, Basel.
- [39] Gross J. *Pigments in vegetables* Van Nostrand Reinhold 1991, New York.
- [40] Gabrielska J, Gruszecki WI. Zeaxanthin (dihydroxy-beta-carotene) but not beta-carotene rigidifies lipid membranes: a ¹H-NMR study of carotenoid-egg phosphatidylcholine liposomes. *Biochim Biophys Acta* 1996; 1285:167-74.
- [41] Subczynski WK, Markowska E, Gruszecki WI, Siewiewsiuk J. Effects of polar carotenoids on dimyristoylphosphatidylcholine membranes: a spin-label study. *Biochim Biophys Acta* 1992; 1105:97-108.
- [42] Frank HA, Cua A, Chynwat V, Young A, Gosztola D, Wasielewski MR. Photophysics of the carotenoids associated with the xanthophyll cycle in photosynthesis. *Photosynth Res* 1994; 41:389-95.
- [43] Demming-Adams B, Gilmore AM, Adams WW III. In vivo functions of carotenoids in higher plants *FASEB J* 1995:403-12.
- [44] Siefermann-Harms D. The light harvesting and protective functions of carotenoids in photosynthetic membranes. *Physiol Plant* 1987; 69:561-8.

- [45] Cadet J, Anselmino C, Douki T, Voituriez L. Photochemistry of nucleic acids in cells. *J Photochem Photobiol B* 1992; 15:277-98.
- [46] Beehler BC, Przybyszewski J, Box HB, Kulesz-Martin MF. Formation of 8-hydroxydeoxyguanosine within DNA of mouse keratinocytes exposed in culture to UVB and H₂O₂. *Carcinogenesis* 1992; 13:2003-7.
- [47] Morlière P, Moysan A, Tirache I. Action spectrum for UV-induced lipid peroxidation in cultured human skin fibroblasts. *Free Radic Biol Med* 1995; 19:365-71.
- [48] Hu ML, Tappel AL. Potentiation of oxidative damage to proteins by ultraviolet-A and protection by antioxidants. *Photochem Photobiol* 1992; 56:357-63.
- [49] Gollnick, K. Type II photooxygenation reactions in solution. *Adv Photochem* 1968; 6:1-122.
- [50] Di Mascio P, Kaiser S, Sies H. Lycopene as the most efficient biological carotenoid singlet oxygen quencher. *Arch Biochem Biophys* 1989; 274:532-8.
- [51] Packer JE, Mahood JS, Mora-Arellano VO, Slater TF, Willson RL, Wolfenden BS. Free radicals and singlet oxygen scavengers: reaction of a peroxy-radical with beta-carotene, diphenyl furan and 1,4-diazobicyclo (2,2,2)-octane. *Biochem Biophys Res Commun* 1981; 98:901-6.
- [52] Mortensen A, Skibsted LH. Kinetics of parallel electron transfer from beta-carotene to phenoxyl radical and adduct formation between phenoxyl radical and beta-carotene. *Free Radic Res* 1996; 25:515-23.
- [53] Bauernfeind, JC. Carotenoids as colorants and vitamin A precursors. Academic Press 1981, New York.
- [54] Krinsky NI. Membrane antioxidants. *N Y Acad Sci.* 1988; 551:17-33.
- [55] Stahl W, Junghans A, de Boer B, Driomina ES, Briviba K, Sies H. Carotenoid mixtures protect multilamellar liposomes against oxidative damage: synergistic effects of lycopene and lutein. *FEBS Lett.* 1998; 427:305-8.
- [56] Liebler DC. Antioxidant reactions of carotenoids. *Ann N Y Acad Sci* 1993; 691:20-31.
- [57] Junghans A; Sies H, Stahl W. Carotenoid-containing unilamellar liposomes loaded with glutathione: a model to study hydrophobic-hydrophilic antioxidant interaction. *Free Rad Res* 2000; in press.
- [58] Pugliese PT, Lampley CB. Biochemical assessment on the anti-ageing effects of cosmetic products. *J Appl Cosmetol* 1985; 3:129-38.
- [59] Epstein JH. Effects of beta-carotene on ultraviolet induced cancer formation in the hairless mouse skin. *Photochem Photobiol* 1977; 25:211-3.
- [60] Mathews-Roth MM. Antitumor activity of beta-carotene, canthaxanthin and phytoene. *Oncology* 1982; 39:33-7.

- [61] Mathews-Roth MM, Pathak MA, Fitzpatrick TB, Harber LH, Kass EH. Beta carotene therapy for erythropoietic protoporphyria and other photosensitivity diseases. *Arch Dermatol* 1977; 113:1229-32.
- [62] Krinsky NJ, Russett MD, Handelman GJ, Snodderly DM. Structural and geometrical isomers of carotenoids in human plasma. *J Nutr* 1990; 120:1654-62.
- [63] Nells HJCF, de Leenheer AP. Isocratic nonaqueous reversed-phase liquid chromatography of carotenoids. *Anal Chem* 1983; 55:270-74.
- [64] Khachik F, Beecher GR, Goli MB, Lusby WR, Smith JC Jr. Separation and identification of carotenoids and their oxidation products in the extracts of human plasma. *Anal Chem* 1992; 64:2111-22.
- [65] Khachik F, Beecher GR, Smith JC Jr. Lutein, lycopene and their oxidative metabolites in chemoprevention of cancer. *J Cell Biochem* 1995; 22:236S-46S.
- [66] Stahl W, Sundquist AR, Hanusch M, Schwarz W, Sies H. Separation of β -carotene and lycopene geometrical isomers in biological samples. *Clin Chem* 1993; 39:810-4.
- [67] Parker RS. Absorption, metabolism and transport of carotenoids. *FASEB J* 1995 :542-51.
- [68] White WS, Peck KM, Bierer TL, Gugger ET, Erdman JW Jr. Interaction of oral β -carotene and canthaxanthin in ferrets. *J Nutr* 1994; 123:1405-13.
- [69] Kostic D, White WS, Olson JA. Intestinal absorption, serum clearance and interactions between lutein and β -carotene when administered to human adults in separate or combined oral doses. *Am J Clin Nutr* 1995; 62:604-10.
- [70] van Vliet T, Schreurs WHP, van den Berg H. Intestinal β -carotene absorption and retinylesters in the lipoprotein fraction after a single oral dose of β -carotene. *Am J Clin Nutr* 1995; 62:110-6.
- [71] Krinsky NI, Mathews-Roth MM, Welankiwar S, Sehgal PK, Lausen NCG, Russell RM. The metabolism of [^{14}C] β -carotene and the presence of other carotenoids in rat and monkeys. *J Nutr* 1990; 120:81-7.
- [72] Goodman DS, Blomstrand R, Werner B, Huang HS, Shirattori T. The intestinal absorption and metabolism of vitamin A and β -carotene in man. *J Clin Invest* 1966; 45:1615-23.
- [73] Blomstrand R, Werner B. Studies on the intestinal absorption of radioactive β -carotene and vitamin A in man. *Scand J Clin Lab Invest* 1967; 19:339-45.
- [74] Wyss A, Wirtz G, Woggon W, Brugger R, Wyss M, Friedlein A, Bachmann H, Hunziker W. Cloning and expression of beta,beta-carotene 15,15'-dioxygenase. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; 271:334-6.
- [75] Parker RS. Absorption and metabolism of [^{13}C] β -carotene in humans. 11th International Symposium on carotenoids, Abstracts of Oral Presentations.

- [76] Turnham DI. Do higher vitamin A requirements in men explain the difference between the sexes in plasma provitamin A carotenoids. *Proc Nutr Soc* 1988; 47:181.
- [77] Ito Y, Ochiai J, Sasaki R, Suzuli S, Kasuhara Y, Morimitsu Y, Otani M, Aoki K. Serum concentrations of carotenoids, retinol and α -tocopherol in healthy persons determined by high-performance liquid chromatography. *Clin Chim Acta* 1990; 194:131-34.
- [78] Stacewicz-Sapuntzakis M, Bowen PE, Kikendall JW, Burgess M. Simultaneous determination of serum retinol and various carotenoid: their distribution in middle aged men and women. *J Micronut Anal* 1987; 3:27-45.
- [79] Thurnham DI, Tyler HA. Factors influencing plasma carotenoids in British adults Ninth International Symposium on Carotenoids 1990; A6-2:27.
- [80] Olmedilla B, Granado F, Blanco I, Rojas-Hidalgo E. Seasonal and sex-related variations in six serum carotenoids, retinol and α -tocopherol. *Am J Clin Nutr* 1994; 60:106-10.
- [81] Wingerath T, Stahl W, Sies H. beta-Cryptoxanthin selectively increases in human chylomicrons upon ingestion of tangerine concentrate rich in beta-cryptoxanthin esters. *Arch Biochem Biophys* 1995; 324:385-90.
- [82] Reddy PP, Clevidence BA, Berlin E, Taylor PR, Bieri JC, Smith JC. Plasma carotenoid and vitamin E profile of lipoprotein fractions of men fed with a controlled typical U.S. diet. *FASEB J* 1989; 3:A955.
- [83] Johnson EJ, Russell RM. Distribution of orally administered β -carotene among lipoproteins in healthy men. *Am J Clin Nutr* 1992; 56:128-35.
- [84] Peng YM, Peng YS, Lin Y. A nonsaponification method for the determination of carotenoids, retinoids, and tocopherols in solid human tissues. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1993; 2:139-44.
- [85] Stahl W, Heinrich U, Jungmann H, von Laar J, Schietzel M, Sies H, Tronnier H. Increased dermal carotenoid levels assessed by non-invasive reflection spectrophotometry correlate with serum in women ingesting Betatene. *J Nutr* 1998; 128:903-7.
- [86] Le Marchand L, Hankin JH, Kolonel LN, Beecher GR, Wilkens LR, Zhao LP. Intake of specific carotenoids and lung cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers & Prev* 1993; 2:183-7.
- [87] Ziegler RG, Colavito EA, Hartge P, McAdams MJ, Schoenberg JB, Mason TJ, Fraumeni JF Jr. Importance of alpha-carotene, beta-carotene, and other phytochemicals in the etiology of lung cancer. *J Natl Cancer Inst.* 1996; 88:612-5.
- [88] Gazianno JM, Hennekens CH. The role of β -carotene in the prevention of cardiovascular disease. *Ann NY Acad Sci* 1993; 691:148--55.
- [89] Gey KF, Moser UK, Jordan P, Stähelin HB, Eichholzer M, Lüdin E. Increased risk of cardiovascular disease at suboptimal plasma concentrations of essential antioxidants:

- an epidemiological update with special attention to carotene and vitamin C. *Am J Clin Nutr* 1993; 57:787S-97S.
- [90] Seddon JM, Ajani UA, Speduto RD, Hiller R, Blair N, Burton TC, Farber MD, Gragoudos ES, Haller J, Miller DT, Yanuzzi LA, Willet W, for the Eye-Disease-Case-Control-Study-Group. Dietary carotenoids, vitamin A, C and E and advanced age-related macular degeneration. *JAMA*. 1994; 272:1413-20.
- [91] Taylor A. Cataract: relationship between nutrition and oxidation. *J Am Coll Nutr* 1993; 12:138-46.
- [92] Blot WJ, Li JY, Taylor PR, Guo W, Dawsey S, Wang GQ, Yang CS, Zheng SF, Gail M, Li GY, et al. Nutrition intervention trials in Linxian, China: supplementation with specific vitamin/mineral combinations, cancer incidence, and disease-specific mortality in the general population. *J Natl Cancer Inst*. 1993 Sep 15;85(18):1483-92.
- [93] Cook NR, Stampfer MJ, Ma J, Manson JE, Sacks FM, Buring JE, Hennekens CH. Beta-carotene supplementation for patients with low baseline levels and decreased risks of total and prostate carcinoma. *Cancer* 1999; 86: 1783-92.
- [94] Levy J, Bosin E, Feldman B, Giat Y, Miinster A, Danilenko M, Sharoni Y. Lycopene is a more potent inhibitor of human cancer cell proliferation than either alpha-carotene or beta-carotene. *Nutr Cancer*. 1995; 24:257-66.
- [95] Sharoni Y, Giron E, Rise M, Levy J. Effects of lycopene-enriched tomato oleoresin on 7,12-dimethyl-benz[a]anthracene-induced rat mammary tumors. *Detect Prev*. 1997; 21:118-23.
- [96] Giovannucci E, Ascherio A, Rimm EB, Stampfer MJ, Colditz GA, Willett WC. Intake of carotenoids and retinol in relation to risk of prostate cancer. *J Natl Cancer Inst*. 1995; 87:1767-76.
- [97] Gaziano JM. Antioxidant vitamins and coronary artery disease risk. *Am J Med*. 1994; 97:18S-21S.
- [98] Gaziano JM. Antioxidants in cardiovascular disease: randomized trials. *Nutr Rev*. 1996; 54:175-7.
- [99] Alpha Tocopherol, beta carotene cancer prevention study group (ABTC). The Effect of vitamin E and β -carotene on the incidence of lung cancer and other cancers in male smokers. *N Engl J Med* 1994; 330:1029-35.
- [100] 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. Effects of a combination of β -Carotene and vitamin A on lung cancer and cardiovascular disease. *N Engl J Med* 1996; 334:1150-5.
- [101] Britton G. UV/Visible Spectroscopy. In *Carotenoids : Isolation and analysis* (Britton G, Liaaen-jensen S, Pfander H, eds.) Birkhäuser 1995, Basel; Vol 1B, S. 13-62.

- [102] Mihara M, Uchiyama, M. Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test. *Anal Biochem* 1978; 86: 271-278.
- [103] Bradford, MM. A rapid and sensitive method for the quantification microgram quantities of protein utilising the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976; 72:248-54.
- [104] Pathak MA. Sunscreens: topical and systemic approaches for protection of human skin against harmful effects of solar radiation. *J Am Acad Dermatol* 1982; 7:285-312.
- [105] Morlière P, Moysan A, Santus R, Hüppe G, Mazière J-C, Dubertert L. UVA-induced lipid peroxidation in cultured human fibroblasts. *Biochim Biophys Acta* 1991; 1084:261-8.
- [106] Wang RJ, Nixon BR. Identification of hydroperoxide as a Photoproduct toxic to human cells in tissue-culture medium irradiated with daylight fluorescent light. *In Vitro* 1978; 14:715-22.
- [107] Olmedilla B, Granado F, Gil-Martinez E, Blanco I, Rojas-Hidalgo E. Reference values for retinol and main carotenoids in serum of control and insulin-dependent diabetic Spanish subjects. *Clinical Chemistry* 1997; 43: 1066-71.
- [108] Ascherio A, Stampfer MJ, Colditz GA, Rimm EB, Litin L, Willett WC. Correlations of vitamin A and E intakes with the plasma concentrations and tocopherols among American men and women. *J Nutr* 1992; 122: 1972-801.
- [109] Polidori MC, Stahl W, Eichler O, Niestroj I, Sies H. Profiles of antioxidants in human plasma. *Free Radic Biol Med.* 2001; 30:456-462.
- [110] Schneider R, Eberhardt W, Hesecker H, Kübler W. Vitamin intake and status in Germany. *Bibl Nutr Dieta* 1995; 52:116-27.
- [111] Pelz R, Schmidt-Faber B, Hesecker H. Die Karotinoidzufuhr in der nationalen Verzehrstudie. *Z Ernährungswiss* 1998; 37: 319-327.
- [112] Lenhartz H, Schweitzer R, Bötticher D, Leichsenring M. Plasma carotenoids in German children and adolescents. *Eur J Pediatr* 1997; 51:71-3.
- [113] Lowe GM, Booth LA, Young AJ, Bilton RF. Lycopene and beta-carotene protect against oxidative damage in HT29 cells at low concentrations but rapidly lose this capacity at higher doses. *Free Radic Res* 1999; 30:141-51.
- [114] Sujak A, Gabrielska J, Grudzinski W, Broc R, Mazurek P, Gruszecki WI. Lutein and zeaxanthin as protectors of lipid membranes against oxidative damage: The structural aspects. *Arch Biochem Biophys* 1999; 371: 301-7.
- [115] Obermüller-Jevic UC, Francz PI, Frank J, Flaccus A, Biesalski HK. Enhancement of the UVA induction of haem oxygenase-1 expression by beta-carotene in human skin fibroblasts. *FEBS Lett* 1999; 460:212-6.
- [116] Stivala LA, Savio M, Cazzalini O, Pizzala R, Rehak L, Bianchi L, Vannini V, Prospero E. Effect of β -carotene on cell cycle progression of human fibroblasts. *Carcinogenesis* 1996; 19:2395-2401.

- [117] Stahl W, Sies H. Lycopene: a biologically important carotenoid for humans? Arch Biochem Biophys 1996; 336:1-9.
- [118] Riso P, Pinder A, Santangelo A, Porrini M. Does tomato consumption effectively increase the resistance of lymphocyte DNA to oxidative damage? Am J Clin Nutr 1999; 69:712-8.
- [119] Die Bestimmung des Lichtschutzzfaktors nach der COLIPA-Methode. Indutrieverband Körperpflege-Waschmittel (IKW)1995 .
- [120] Din-Norm 67501: Experimentelle dermatologische Bewertung des Erythemschutzes von externen Sonnenschutzmitteln für die menschliche Haut. Deutsches Institut für Normung 1984, Revision 1995.
- [121] Heinrich U. Reflektionsspektroskopische Untersuchungen als Beispiel einer nicht-invasiven Meßmethode zur quantitativen Substanzanalyse in vivo. Verlag Dr Markus Hänsel-Hohenhausen 1999, Egelsbach. (Habilitationsschrift).
- [122] Bone RA, Landrum GW, Cains A, Zamor J. Stereochemistry of human macular carotenoids. Invest Ophthalmol Vis Sci 1993; 34:2033-40.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich all denen herzlich zu danken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Herrn Prof. Dr. Dr. H. Sies danke ich für die Vergabe des interessanten Themas, die Betreuung und die Möglichkeit diese Arbeit an seinem Institut durchzuführen sowie für die Übernahme des Referates.

Herrn Prof. Dr. H.-D. Martin vom Institut für Organische Chemie und Makromolekulare Chemie spreche ich meinen herzlichen Dank für die Übernahme des Koreferates, die fachliche Betreuung und das gezeigte Interesse an dieser Arbeit aus.

Herrn PD Dr. W. Stahl möchte ich an dieser Stelle für hilfreichen Diskussionen, die wertvollen Anregungen und Ratschläge sowie das große Engagement danken.

Frau Prof. Dr. R. Kahl danke ich für die sehr gute Betreuung und der DFG für die Förderung im Rahmen des Graduiertenkollegs Toxikologie.

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

Frau Heide Krahl möchte ich mich besonders für die tatkräftige Unterstützung bei der Analyse der Serumproben der Studie I bedanken.

Frau Dr. I. Niestroj von der Privatklinik Obertal (Baiersbrunn) möchte ich für die Blutproben und die zur Verfügung gestellten Patientendaten danken.

Bei Frau PD Dr. U. Heinrich und Herrn Prof. Dr. H. Tronnier von Institut für Experimentelle Dermatologie der Universität Witten/Herdecke möchte ich mich für die gute Zusammenarbeit bedanken.

Danken möchte ich ebenso Frau Dr. C. Gärtner von Cognis und Frau Dr. S. Wiseman von Unilever für die wertvolle Unterstützung.

Ich danke allen Arbeitskollegen von der Arbeitsgruppe PD Dr. W. Stahl sowie allen vom Institut für Physiologische Chemie I für stete Hilfsbereitschaft und die vielen Gespräche.

Der größte Dank gilt Dr. A. Junghans für die vielen Stunden des Beistands, der Stärkung und der Hilfe in den schweren Zeiten im Labor wie auch im Privaten. Sie war immer für mich da, fand tröstende Worte und half mir auch aus scheinbar aussichtslosen Situationen heraus.

Zum Schluß möchte ich mich herzlichst bei meinen Eltern und meinem Stiefvater für ihre vielfältige Unterstützung während meiner Studien- und Promotionszeit bedanken.