

**Untersuchungen zu UV-protectiven Effekten
von Nahrungscarotinoiden *in vivo* und *in vitro***

INAUGURAL-DISSERTATION

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

vorgelegt von
Olivier Aust
aus Mainz

Düsseldorf, Januar 2003

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

Referent: Prof. Dr. Wilhelm Stahl

Korreferent: Prof. Dr. Hans-Dieter Martin

Tage der mündlichen Prüfung: 04.02.2003 und 06.02.2003

meinen Eltern

*„Die Wissenschaft fängt eigentlich erst an interessant zu werden,
wo sie aufhört“*

Justus von Liebig

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
1.1	Die menschliche Haut	1
1.1.1	<i>Aufbau der Haut</i>	1
1.1.2	<i>Funktionen der Haut</i>	3
1.1.3	<i>Schädigung der Haut durch UV-Exposition</i>	3
1.1.4	<i>Lichtschutz der Haut</i>	8
1.2	Carotinoide	10
1.2.1	<i>Carotinoide als Naturstoffe</i>	10
1.2.2	<i>Carotinoide als physiologische Antioxidantien</i>	13
1.2.3	<i>Carotinoide in der Photoprotektion</i>	15
1.2.4	<i>Carotinoidaufnahme</i>	19
1.3	Ziel der Arbeit	20
2.	Material und Methoden	21
2.1	Chemikalien	21
2.2	Analytische Verfahren zur Carotinoidbestimmung	21
2.2.1	<i>Carotinoidarbeitslösungen</i>	21
2.2.2	<i>Geräte</i>	23
2.2.3	<i>Bestimmung von Carotinoiden in Serum-, Zellmedium- und Zelllysatproben</i>	23
2.2.4	<i>Bestimmung von Carotinen in Serum- und Lebensmittelproben</i>	24
2.3	Interventionsstudie	26
2.3.1	<i>Studiendesign</i>	26
2.3.2	<i>Induktion des Erythems und Messung der Hautrötung</i>	28
2.3.3	<i>Bestimmung von Carotinoiden in der Haut und im Serum</i>	28

2.4	Zellkultursystem	29
2.4.1	<i>Fibroblasten und Keratinozytenkulturen</i>	29
2.4.2	<i>Inkubation mit Carotinoiden und UV-Bestrahlung der Kulturen</i>	29
2.4.3	<i>Bestimmung der Matrix-Metalloprotease-1-Expression (MMP-1)</i>	30
2.4.4	<i>Bestimmung der Interleukin-6-Expression (IL-6)</i>	31
2.4.5	<i>Bestimmung der Gesamtproteinkonzentration im Zelllysate</i>	31
2.4.6	<i>Bestimmung des Carotinoidgehaltes in Zellmedium und Zelllysate</i>	31
2.5	Unilamellares Liposomensystem	32
2.5.1	<i>Herstellung und Charakterisierung unilamellarer Liposomen (IUV)</i>	32
2.5.2	<i>Initiation der Lipidoxidation in unilamellaren Liposomen</i>	32
2.5.3	<i>Messung der Lipidoxidation in unilamellaren Liposomen</i>	33
2.5.4	<i>Bestimmung der lag-Phase und des k-Wertes</i>	33
2.6	Statistik	34
3.	Ergebnisse	35
3.1	Analytik	35
3.1.1	<i>Methode zur Bestimmung von Carotinoiden im Serum</i>	35
3.1.2	<i>Entwicklung einer Methode zur Bestimmung von Carotinen im Serum und in Lebensmitteln</i>	37
3.2	Interventionsstudie	47
3.2.1	<i>Studiendesign</i>	47
3.2.2	<i>Carotinoide im Serum</i>	49
3.2.3	<i>Bestimmung des Carotinoidgehaltes in der Haut</i>	53
3.2.4	<i>Induktion und Messung des Erythems</i>	54
3.3	Carotinoidgehalt eines Lycopinkarottensaftes und anderer lycopin- und β-carotinreicher Lebensmittel	57

3.4	Zellkultur	60
3.4.1	<i>MMP-1-Expression in Fibroblasten nach UV-Bestrahlung</i>	60
3.4.1.1	<i>Inkubation mit Lycopin</i>	61
3.4.1.2	<i>Inkubation mit Phytoen/Phytofluen</i>	64
3.4.2	<i>IL-6-Expression in Keratinozyten nach UV-Bestrahlung</i>	67
3.4.2.1	<i>Voruntersuchungen mit HaCaT-Zellen</i>	67
3.4.2.2	<i>Untersuchungen mit Keratinozyten</i>	68
3.4.3	<i>Carotinoidgehalte in Fibroblasten und Kulturmedium</i>	71
3.5	Unilamellare Liposomen	72
3.5.1	<i>Charakterisierung der Liposomen</i>	73
3.5.2	<i>Bildung von konjugierten Dienen in unilamellaren Liposomen</i>	74
3.5.3	<i>Bestimmung der lag-Phasen und des k-Wertes</i>	83
4.	Diskussion	87
4.1	Interventionsstudie zur Photoprotektion durch Carotinoide	87
4.1.1	<i>Carotinoidbestimmung im Serum und in Lebensmitteln mittels HPLC</i>	87
4.1.2	<i>Carotinoidgehalte im Serum</i>	88
4.1.3	<i>Carotinoidgehalte in der Haut</i>	90
4.1.4	<i>Photoprotektion durch lycopinreiche Supplemente</i>	91
4.2	Untersuchungen zur Photoprotektion durch Carotinoide in Zellkultur	93
4.2.1	<i>Einfluss auf den MMP-1-Signalweg</i>	93
4.2.2	<i>Einfluss auf den IL-6-Signalweg</i>	95
4.3	Anti- und prooxidatives Verhalten von Carotinoiden in unilamellaren Liposomen	96
5.	Zusammenfassung	100
6.	Literatur	102

Abkürzungen

AAPH	2,2'-Azo-bis-(amidinopropan)-hydrochlorid
ABTS	2,2'-Azino-bis-(3-ethylbenzothiazolin-6-sulphonsäure) - diammonium Salz
AIBN	2,2'-Azo-bis-isobutyronitril
AMD	altersbedingte Macula-Degeneration
AMVN	2,2'-Azo-bis-(2,4-dimethylvalerionitril)
AP-1	Aktivatorprotein-1
BHT	2,6-Di-tert-butyl-4-methylphenol
Car	Carotinoid
CD	Konjugierte Diene (conjugated dienes)
COX-2	Cyclooxygenase-2
DNA	Desoxyribonukleinsäure (desoxyribonucleic acid)
DOPA	3,4-Dihydroxyphenylalanin
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure (ethylenediaminetetraacetic acid)
ELISA	Enzyme linked immune assay
EPP	Erythropoetische Protoporphyrinurie
FCS	Fötale Kälber Serum (fetal calf serum)
FF(DA)	Spenderspezifische Hautfibroblasten
H	Wasserstoffatom
HDL	Lipoprotein hoher Dichte (high density lipoprotein)
HaCaT	Immortalisierte Keratinozyten-Zelllinie (Human adult low Calcium and high Temperature)
HO-1	Hämoxygenase-1
HPLC	Hochleistungsflüssigkeits-Chromatographie (high performance liquid chromatography)
IL-6	Interleukin-6
IUV	Unilamellare Liposomen mittlerer Größe (intermediate unilamellar liposomes)
KPi	Kalium-Phosphatpuffer
LDL	Lipoprotein niedriger Dichte (low density lipoprotein)
MDA	Malondialdehyd
MeCN	Acetonitril
MED	Minimale Erythemdosis

MeOH	Methanol
MMP-1	Matrix-Metalloproteinase-1 (Kollagenase)
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure (messenger ribonucleic acid)
p A	pro Analysi
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung (phosphate buffered saline)
PGE ₂	Prostaglandin E ₂
PP	Polypropylen
ROS	Reaktive Sauerstoff-Spezies (reactive oxygen species)
RP	Umkehrphase (reversed phase)
rpm	Umdrehungen pro Minute (rounds per minute)
SD	Standardabweichung (standard deviation)
SDS	Natrium-Dodecylsulfat (sodium dodecylsulfate)
τ	<i>lag</i> -Phase in Min
THF	Tetrahydrofuran
t_r	Retentionszeit
UV	Ultraviolettstrahlung
v	Volumen
vis	sichtbarer Teil des Strahlungsspektrums (visible)
VLDL	Lipoprotein sehr niedriger Dichte (very low density lipoprotein)

1. Einleitung

1.1 Die menschliche Haut

1.1.1 Aufbau der Haut

Die Haut stellt das größte Organ des Menschen dar. Als komplex aufgebautes Organ macht es etwa 8-12 % des Körpergewichtes aus. Eine erste Einteilung der Hautschichten ergibt sich entsprechend den histomorphologischen Kriterien wie in Abb. 1.1 dargestellt (Möller und Matthies, 1995).

Die Oberhaut wird als *Epidermis* bezeichnet und besteht zu 90 % aus Keratinozyten. Ihr Name leitet sich vom Keratin (Hornstoff, schwefelreiches Skleroprotein) ab, das aus der extrazellulären Vorstufe Keratohyalin gebildet wird (Pschyrembel, 1994). Von innen nach aussen ist eine kontinuierliche Differenzierung der Keratinozyten festzustellen, so dass die außenliegenden Zellen (verhornte und z.T. schon abgestorbene Zellen des Stratum corneum = Hornschicht) als die ältesten anzusehen sind. Der Durchmesser der Epidermis schwankt zwischen 4 und 30 mm je nach Hautgebiet abhängig von sich verändernden Umweltbedingungen. Starke mechanische Beanspruchungen lassen so die Haut der Hohlhand, der Fußsohlen, der Fingerbeere und der Zehenballen stark verhornen. Die Dicke der Hornhaut kann bis zu 1,2 mm betragen. Diese Verhornungen werden durch die Hornschicht verursacht. Tieferliegende Zellen, die meistens klein, dicht und regelmäßig aneinandergesetzt sind, bilden die Basalschicht und sind mit der Basalmembran verbunden (Merk, 1994).

Neben den Keratinozyten kommen die Melanozyten und die Langerhans'schen Zellen in der Epidermis vor.

Die Basalmembran ist zapfenartig mit der *Dermis* (Lederhaut, Corium) verbunden (Papillen), die von Fibroblasten gebildet wird. Zusammen mit der extrazellulären Matrix bestehend aus Kollagen und anderen Biopolymeren wie Elastin und Retikulin entsteht das faserige Netzwerk des Bindegewebes.

Subkutanes Fettgewebe folgt schließlich der Dermis als letzte der drei Hautschichten.

Haare und follikuläre Gänge durchziehen sowohl die Dermis als auch die Epidermis.

Die Epidermis besitzt keine Blutgefäße und kann daher nur durch Diffusion von Nährstoffen aus dem kapillaren Netz, das durch die Dermis bis an die Basalmembran heranreicht, versorgt werden (Bucher und Wartenberg, 1989).

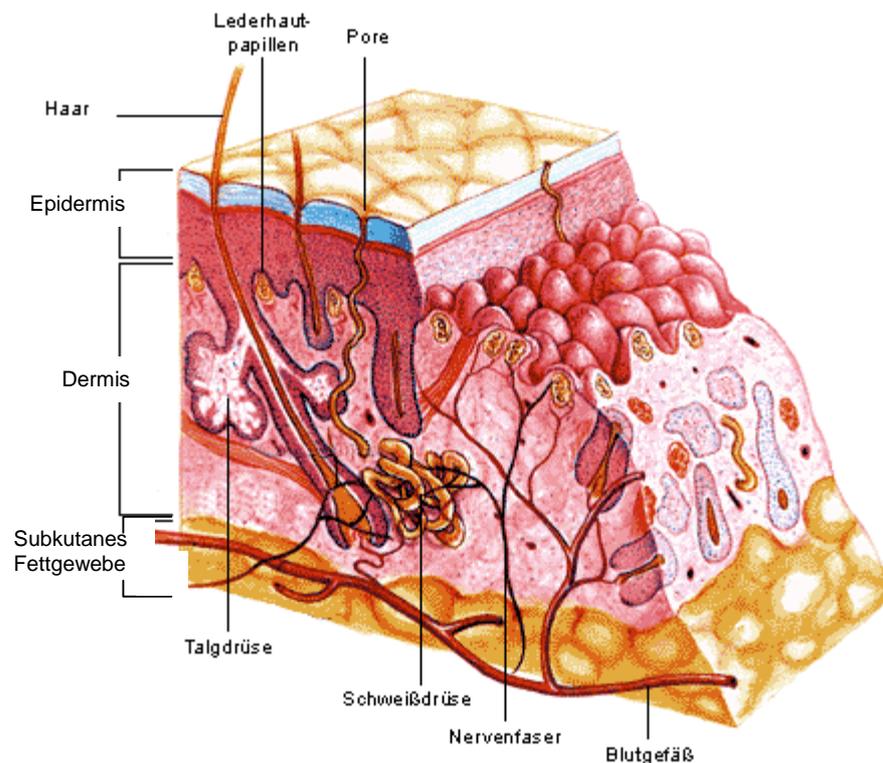


Abb. 1.1: Aufbau der menschlichen Haut. Die Epidermis mit der Hornschicht (blau) und der Basalschicht (rot), die Dermis (Lederhaut, rosa) und das subkutane Fettgewebe sind zu erkennen. Epidermis und Dermis werden durch die Basalmembran voneinander getrennt.

1.1.2 Funktionen der Haut

Aufgrund der großen Oberfläche von etwa 1,8 m² ist die Haut ein wichtiges Kontaktorgan zur Umwelt. Eine Aufgabe der Haut ist es, den Wasserhaushalt des Gesamtorganismus zu regulieren; sie schützt vor Austrocknung. Eine erhöhte Transpiration hat die Abgabe von Wärme zur Folge, so dass die Haut auch zur Temperaturregulierung beiträgt. Als Barriere dient die Haut zum Schutz vor mechanischen Beanspruchungen, aber auch vor Infektionen durch Bakterien und Pilze. Diese schützende Eigenschaft wird durch immunologische Eigenschaften der Haut verstärkt, so dass die Haut ein wichtiger Bestandteil des gesamten Immunsystems ist. Bis zu 10 % der Zellen der Haut können dem Immunsystem entstammen und mittels spezifischer oder unspezifischer Abwehrmechanismen eindringende Fremdstoffe oder Erreger bekämpfen. Manche Erkrankungsbilder manifestieren sich alleinig in der Haut und sind ein wichtiges diagnostisches Kriterium von Allgemeinerkrankungen wie Masern, Scharlach und Gelbsucht (Bucher und Wartenberg, 1989).

Daneben ist die Haut u.a. ultravioletter Strahlung ausgesetzt. Von physiologischer Bedeutung ist die UV-abhängige Synthese des antirachitischen Vitamins D₃ aus 7-Dehydrocholesterin. Zugleich übt die Haut auch eine Schutzwirkung gegenüber den schädigenden Wirkungen der UV-Strahlung aus.

1.1.3 Schädigung der Haut durch UV-Exposition

Die auf die Erdoberfläche auftreffende Sonnenstrahlung lässt sich in drei Wellenlängenbereiche aufteilen. Es sind das sichtbare Sonnenlicht, das Infrarotlicht und die UV-Strahlung, die in UV A (320 – 400 nm) und UV B (280 – 320 nm) unterteilt wird. Tab. 1.1 gibt die prozentuale Verteilung der Strahlenbereiche an, die sich aus den Bestrahlungsintensitäten (W/m²) ergeben.

Tab. 1.1: Prozentuale Verteilung der spektralen Bereiche des Sonnenlichtes auf der Erdoberfläche (ca. $1100 \text{ W/m}^2 = 100 \%$, nach Finkel, 1995).

Spektraler Bereich	Anteil an der Gesamtstrahlung (%)
Sichtbares Sonnenlicht	52,0
Infrarotlicht	42,0
UV	6,0
(UV A)	(5,6)
(UV B)	(0,4)

UV-Licht dringt unterschiedlich tief in die Haut ein. Kurzwelliges UV B wird von der Haut mehr als UV A reflektiert oder absorbiert. UV A durchstrahlt die Dermis, während UV B nur bis zur Basalmembran der Epidermis gelangt (Bruls et al., 1984). UV C-Licht wird in der Stratosphäre der Erde absorbiert und spielt für die biologische Welt keine Rolle (Crutzen, 1992).

Physiologisch betrachtet lassen sich positive und negative Effekte der Sonnenstrahlung auf den menschlichen Organismus beschreiben. Sonnenlicht steigert das Wohlbefinden und damit auch die Leistungsbereitschaft. Eine gebräunte Haut ist weitgehend ein begehrtes Erscheinungsbild und gilt als ein Zeichen des Wohlstandes.

Eine Bräunung der Haut geht auf eine UV B-induzierte Pigmentierung durch das in den Melanozyten gebildeten Melanin zurück. Die UV-Strahlung bewirkt eine Steigerung der mitotischen Aktivität von Melanozyten, die mit einer Induktion des Enzyms Tyrosinase verbunden ist. Tyrosin wird enzymatisch zu Dopa und schließlich zu einem Dopa-Chinon oxidiert. Das polymere Melaninpigment entsteht in weiteren Reaktionsschritten und wird schließlich zu den Keratinozyten transportiert. Die so entstandene indirekte Bräunung bleibt über mehrere Wochen erhalten.

Eine direkte Bräunung, die jedoch nur von kurzer Dauer ist, wird durch UV A erzielt. Farblose Vorstufen des Melanins werden photochemisch oxidiert, so dass auch hier schließlich das polymere Melanin gebildet wird.

Eine übermäßige Exposition mit UV-Strahlung kann akute aber auch chronische Schädigungen der Haut mit sich bringen. Akute übermäßige UV B-Bestrahlung führt zu einem Sonnenbrand. Das Erythema solare zeigt sich durch die auffällige Rötung der Haut nach 4 - 6 Stunden und ist ein Zeichen eines komplexen Entzündungsgeschehens (UV-induzierte Dermatitis) (Kindl und Raab, 1998). Die DNA wird geschädigt und kann in Abhängigkeit des Schweregrads der Schädigung durch ein zelluläres „repair“-System repariert werden (Hemminki et al., 2002, Schwarz et al., 2002). Eine typische Veränderung der DNA ist die Bildung von Cyclobutan-Pyrimidindimeren (Chadwick et al., 1995, Clingen et al., 1995).

Oxidativer Stress in der Haut (Sies, 1991) ist die Folge einer übermäßigen UV A-Bestrahlung und bedeutet eine vermehrte Bildung von intrazellulären reaktiven Sauerstoff-Spezies (ROS) wie Singulett-Sauerstoff ($^1\text{O}_2$), Superoxidationen ($\text{O}_2^{\bullet-}$), Wasserstoffperoxid (H_2O_2), Hydroxylradikalen (HO^{\bullet}) und Stickstoffmonoxid (NO) und deren Folgeprodukte (Black, 1987, Jurkiewicz und Buettner, 1994, Masaki et al., 1995, Klotz et al., 2001, Suschek et al., 2001).

Oxidative Prozesse im Hautgewebe werden für eine Reihe chronischer Veränderungen verantwortlich gemacht. Chronische Exposition mit UV A-Licht steht im Zusammenhang mit dem Prozess der Photoalterung. Spröde, trockene und faltenbildende Haut sind Kennzeichen der Hautalterung (Yaar und Gilchrist, 1990, Scharffetter-Kochanek et al., 1997, Blattner et al., 1998). In dermalen Fibroblasten wird durch UV A-Licht die Synthese der Matrix-Metalloproteinase-1 (MMP-1) und MMP-2 sowie MMP-3 stimuliert (Scharffetter et al., 1991, Herrmann et al., 1993). Als Folge wird vermehrt Kollagen abgebaut und die Haut verliert ihre Zug- und Dehnungsfähigkeit. Das Risiko einer Invasion von Tumorzellen in derart verändertes Bindegewebe erhöht sich.

Die chronische UV-Exposition der Haut wird im Zusammenhang mit dem Risiko für Hauttumore gesehen. Weltweit wird in den letzten Jahren eine steigende Inzidenz der Melanombildung beobachtet (Langley und Sober, 1997, Serraino et al., 1998, Dennis, 1999). Melanome entstehen in sonnenlichtgeschädigter Haut aus einer Lentigo maligna (Leberfleck, ungleichmäßig pigmentierter, langsam größer werdender Fleck in der Epidermis), werden aber nicht zwangsläufig durch UV-Licht initiiert. Es liegen genetische Dispositionen vor, aber die Tumorpromotion wird mit

UV-Expositionen der Haut und einer verbundenen Immunsuppression in Verbindung gebracht (Krutmann et al., 1996).

Die Inzidenz der Epitheliome (Basalzell- und Plattenepithelkarzinom der Epidermis) der weissen Bevölkerung liegt bei 300 pro 100 000 Einwohner und ist proportional zum Quadrat der durchschnittlichen, jährlichen Strahlenbelastung (Kindl und Raab, 1998). Hier besteht eine direkte Korrelation zwischen dem Krebsrisiko und der UV-Exposition.

Das allgemeine Risiko für Hautkrebs ist mit der Dauer der chronischen UV A-Expositionen, aber auch mit der Häufigkeit einzelner akuter UV B-induzierter Sonnenbrände korreliert (Berneburg et al., 1997). Selbst geringe Dosen an UV-Strahlung führen nicht nur zu mutagenen Veränderungen an DNA-Molekülen (Mutationen), sondern auch zu strukturellen Veränderungen des Chromosoms (Chromosomenaberrationen) (Emri et al., 2000). Damit geht ein erhöhtes Risiko für Hautkrebs einher (Armstrong und Kricger, 2001).

Beobachtet werden auch Differenzierungs- und Umbauvorgänge des Hautgewebes und Veränderungen des Blutkapillarsystems, beispielsweise durch Angiogenese. Zytoplasmatische Signalkaskaden, die in die Genexpression eingreifen, steuern nach UV-Stimulation diese Prozesse (Devary et al., 1993, Brenneisen et al., 1999). Deutlich wird dies durch die UV-induzierte Bildung von sogenannten „sun-burn cells“, veränderte Keratinozyten mit aktiviertem Zelltodprogramm (Apoptose). Geschädigte Zellen werden durch Apoptose aus dem Gewebe entfernt, ohne dass weitere Schädigungen des umliegenden Gewebes auftreten (Godar, 1999, Kulms et al., 1999).

Es gibt eine Reihe von Zellsignalwegen, die auf eine UV-Exposition reagieren. Lange schon ist bekannt, dass UV-Strahlung die Phospholipase A₂ aktiviert, die aus einem Phospholipid Arachidonsäure freisetzt. Über den Cyclooxygenase-2-Weg (COX-2) werden in der Folge Signalmoleküle der Prostaglandin-Gruppe gebildet (Hawk et al., 1983). Dominierendes Prostaglandin im Hautgewebe ist PGE₂ (Ziboh et al., 1978, Hammarström et al., 1979, Hanson und De Leo, 1989, 1990, Hruza und Pentland, 1993). Prostaglandine sind mitverantwortlich für die Gefäßerweiterung in entzündlichen Geweben wie bei einem Erythem (Williams und Peck, 1977, Pentland

et al., 1999). COX-2 wird durch Faktoren stimuliert, die mit Signalwegen des Aktivatorproteins-1 (AP-1) und dem Nekrosefaktor κ B (NF κ B) in Verbindung stehen. Die Aktivierung und vermehrte Expression dieser Faktoren gilt als tumorprogressiv (Devary et al., 1993, Vile et al., 1995, Djavaheri-Mergny et al., 1996, Isoherranen et al., 1998, 1999, Chen et al., 2001). Die UV-Bestrahlung von Hautzellen bewirkt eine gesteigerte COX-2-Expression, die ROS-vermittelt ist (Feng et al., 1995, Buckmann et al., 1998). Für die Induktion eines anderen „stress-response“ Proteins (Keyse und Tyrrell, 1989), die Hämoxygenase-1 (HO-1), wurden oxidierte Lipidmetabolite als Induktoren verantwortlich gemacht (Basu-Modak et al., 1996).

Fibroblasten und Keratinozyten reagieren nach UV-Stimulierung auch auf immunologischem Weg mit einer parakrinen Signalvermittlung. Mediatoren wie Zytokine werden bei entzündlichen Prozessen nach einer übermäßigen UV-Bestrahlung extrazellulär an das umgebende Gewebe abgegeben (Kondo et al., 1997). Interleukin-6 (IL-6) wirkt als systemischer Mediator und wird nach einer UV-Bestrahlung der Haut in erhöhter Konzentration im Blutkreislauf gefunden (Urbanski et al., 1990). Es regt in Fibroblasten (parakrin und autokrin) die MMP-1-Synthese an (Brenneisen et al., 1999) und ist in der Lage, das Wachstum von Melanomen zu stimulieren (McKenzie et al., 1994).

Die UV-Bestrahlung löst in der Haut eine Reihe physiologischer und pathophysiologischer Reaktionen aus. Zudem sind komplexe immunologische Prozesse involviert. Eine zentrale Rolle jedoch scheinen (photo) oxidative Vorgänge zu spielen, welche sowohl durch UV A als auch durch UV B initiiert werden.

1.1.4 Lichtschutz der Haut

Der Lichtschutz der Haut bedeutet Schutz vor UV-Strahlung. Prinzipiell gibt es folgende Schutzmöglichkeiten:

Primärer Schutz	-	Absorption Streuung und Reflexion von UV-Strahlung
Sekundärer Schutz	-	Verteidigung gegen photooxidative und Oxidative Schädigungen der Haut und Minderung der Folgereaktionen
		Reparatur von Schädigungen

Der einfachste und effektivste Schutz ist die Absorption von UV-Strahlen und/oder eine Verringerung der UV-Exposition. Die Haut verfügt dazu über einen Selbstschutzmechanismus. Eine Verdickung der Hornhaut führt zu einer erhöhten Absorption und Lichtstreuung. Die während der Bräunung gebildeten partikulären Melaninpigmente sind zudem in der Lage, UV-Licht zu absorbieren, aber auch zu reflektieren und zu streuen. Der kosmetische Einsatz von topisch aufgetragenen Sonnenschutzmitteln soll ebenfalls einen primären Schutz durch UV-Filter bestehend aus Zimtsäure- und Bornanderivaten sowie reflektierenden Partikeln wie Titandioxid-Pigmenten gewährleisten.

Beim Eigenschutz der Haut ist die Bildung von Melanin als sekundärer Sonnenschutzmechanismus anzusehen. Die während photooxidativer Reaktionen gebildeten reaktiven Sauerstoff-Spezies können nicht nur durch Melanin, sondern effektiver durch Antioxidantien wie Ascorbinsäure (Vitamin C) und α -Tocopherol (Vitamin E) abgefangen werden. Die Kombination von α -Tocopherol und Ascorbinsäure wird als Recycler-System verstanden, in dem oxidativ gebildete Tocopheryloxy-Radikale durch Ascorbinsäure wieder zu Tocopherol reduziert werden (Kagan et al., 1992). Der antioxidative Status charakterisiert die Fähigkeit des

Hautgewebes, sich gegen photooxidative Reaktionen zu verteidigen (Podda et al., 1998).

Zu den enzymatischen Verteidigungssystemen gehören die Enzyme Katalase und Superoxiddismutase. Wie Untersuchungen mit Fibroblasten ergaben, sind ansteigende Gehalte an endogenem Glutathion ebenfalls als adaptive Reaktion auf UV-Stress zu sehen (Jones et al., 1999). In vitro konnte durch Supplementierung mit Vitamin E in einem Keratinozytenmodell der zelluläre Gehalt an Glutathion erhöht werden (Masaki et al., 2002).

Die topische Applikation von Antioxidantien wie Vitamin E zeigte protektive Effekte (McVean und Liebler, 1999, Sorg et al., 2001). Schutzeffekte wurden ferner für das zu den Flavonoiden zählende Epigallocatechin und das sich davon ableitende Gallat-Derivat berichtet (Soriani et al., 1998, Katiyar et al., 1999). Orale Anwendungen von Vitamin E in Kombination mit Carotinoiden ergaben gegenüber dem UV-induziertem Erythem einen Schutzeffekt, wie in Humanstudien nachgewiesen wurde (Stahl et al., 2000).

Auch Carotinoide sind effektive Antioxidantien, die als endogene Sonnenschutzmittel Verwendung finden (siehe 1.2).

1.2 Carotinoide

1.2.1 Carotinoide als Naturstoffe

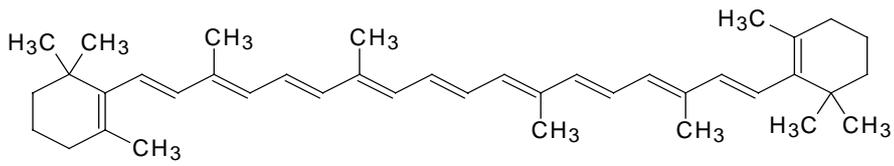
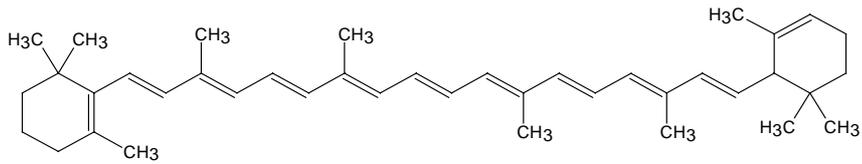
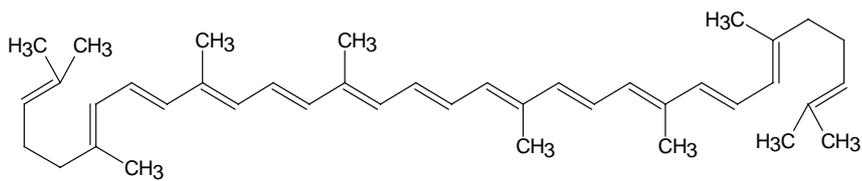
Die Carotinoide zählen zu einer Gruppe von Pigmenten, die von höheren Pflanzen und einigen Mikroorganismen synthetisiert werden. Bis jetzt sind mehr als 700 Carotinoide identifiziert worden. Ihre auffallende Farbigkeit zeigt sich in vielen Obst- und Gemüsesorten (Karotte, Tomate, Mais, Zitrusfrüchte, Pfirsich, Melone). Aber auch grüne Gemüse wie Spinat, Brokkoli oder Erbsen enthalten teils erhebliche Mengen an Carotinoiden. Hier wird die Farbe aber durch das dominierende Chlorophyll überdeckt.

Carotinoide weisen eine Vielzahl von biologischen Aktivitäten auf. Sie sind in höheren Pflanzen Bestandteil des „light-harvesting-Komplexes“ und tragen zur Photoprotektion in Pflanzen und Mikroorganismen bei.

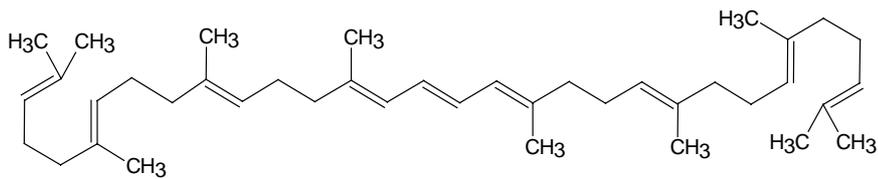
Natürlicherweise vorkommende Carotinoide besitzen eine Kette aus 40 Kohlenstoffatomen. Der zentrale Bereich der Kette stellt das eigentliche Chromophor dar, das aus einem konjugierten Polyensystem besteht. Die Anzahl der konjugierten Doppelbindungen beeinflusst die physikalischen Eigenschaften wie das Lichtabsorptionsverhalten. Verbindungen wie beispielsweise Lycopin, Phytoen oder Phytofluen sind acyclische Carotinoide, während Cyclisierungen zu 6-Ringsystemen an den Enden der Kohlenstoffkette Carotinoide mit β -Iononstruktur bilden können. Das β -Carotin oder andere provitamin A-aktive Verbindungen sind Beispiele hierfür. Die Bildung anderer Ringsysteme (z.B. 5-Ring-Carotinoide) ist auch möglich.

Die Klasse der Carotinoide lässt sich in zwei Gruppen unterteilen. Carotine sind Kohlenwasserstoffverbindungen ohne funktionelle Gruppen. Oxo-Carotinoide (Xanthophylle) tragen mindestens eine Sauerstoffunktionalität in Form einer Hydroxyl-, Carbonyl- oder Epoxygruppe. Xanthophylle mit Hydroxylgruppen liegen in der Natur oftmals mit Fettsäuren verestert vor (Wingerath et al., 1998).

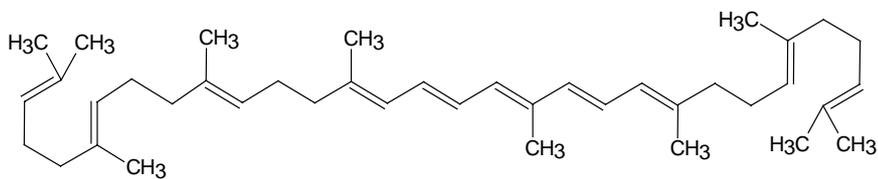
Die Strukturen der Hauptcarotinoide, die im Blut und Gewebe des Menschen vorkommen, sind in Abb. 1.2 und in Abb. 1.3 dargestellt.

 β -Carotin α -Carotin

Lycopin



Phytoen



Phytofluen

Abb. 1.2: Strukturen der Hauptcarotine im Blut und Gewebe des Menschen.

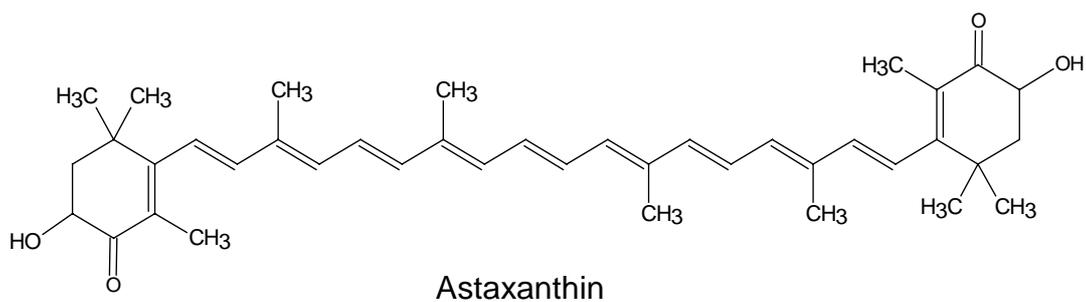
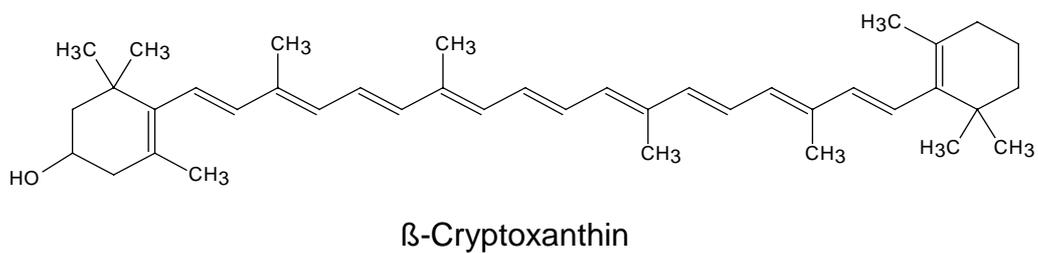
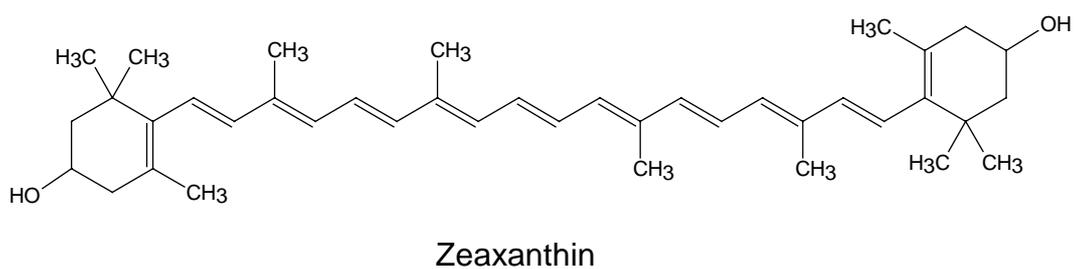
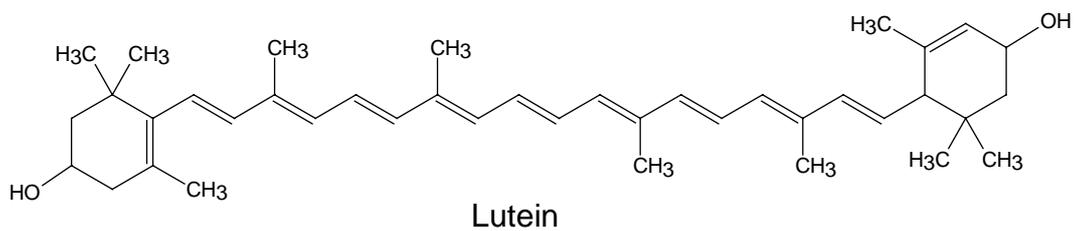


Abb. 1.3: Strukturen der Xanthophylle. Mit Ausnahme von Astaxanthin kommen alle anderen Oxo-Carotinoide im Blut und Gewebe des Menschen vor.

Die im Blut vorkommenden Hauptcarotinoide sind Lycopin, α -Carotin, β -Carotin, Lutein, β -Cryptoxanthin und Zeaxanthin. Astaxanthin lässt sich im menschlichen Blut nur nach dem Verzehr von astaxanthinreicher Nahrung wie dem Seelachs nachweisen.

1.2.2 Carotinoide als Antioxidantien

Die Funktionen der Carotinoide als Bestandteil des Photosystems sind für die Pflanzenwelt, einige Algen und Bakterien von Bedeutung (Martin, 1995). Protektiv wirken sie vor allem aber durch ihre Fähigkeit Singulett-Sauerstoff zu desaktivieren („quenchen“), der in den photosynthetisch aktiven Chloroplasten entsteht (Frank und Cogdell, 1996). Als Quencheffekt wird die Fähigkeit bezeichnet, Singulett-Sauerstoff über eine Energietransferreaktion zu desaktivieren (Baltschun, et al., 1997, Junghans et al., 2001a).

Lycopin und Singulett-Sauerstoff interagieren mit der höchsten Desaktivierungsrate, so dass Lycopin unter den Carotinoiden der effektivste Quencher für Singulett-Sauerstoff ist (Di Mascio et al., 1989, Beutner et al., 2000). Dieser Wert liegt um den Faktor 100 höher als der für die Antioxidantien Vitamin E und Vitamin C (Sies et al., 1992). Da Singulett-Sauerstoff in photooxidativen Prozessen auch in der Haut gebildet werden kann, dürften Carotinoide auch zum Schutz der Haut vor oxidativen Schäden beitragen (Stahl et al., 2001).

Carotinoide zeigen darüber hinaus auch noch andere antioxidativen Eigenschaften (Ruck et al., 2001); sie sind sogenannte „chain breaking antioxidants“, welche in pathobiochemischen Prozessen intermediär gebildete Lipidperoxyradikale abfangen können. Da Lipidoxidationen autokatalytisch ablaufen, stellt die Verminderung von Peroxyradikalen durch Carotinoide eine Unterbrechung dieser Kettenreaktion dar (chain breaking). Hierbei wirken sie wie klassische Antioxidantien, z.B. Tocopherole oder Flavonoide.

Basierend auf *in vitro* Untersuchungen wird postuliert, dass Carotinoide auch prooxidativ *in vivo* wirken können (Mayne 1996, Mayne et al., 1996, Wang und Russell, 1999). Solche prooxidativen Eigenschaften werden im Zusammenhang mit

den negativen Ergebnissen zweier Interventionsstudien mit β -Carotin diskutiert. Nach mehrjähriger Intervention mit 20 mg β -Carotin pro Tag fand sich ein um 20 % erhöhtes Risiko für Lungenkrebs bei Rauchern und Asbestarbeitern. Oxidativ gebildete apo-Carotinale sollen durch Interaktion mit zellulären Signalwegen für die erhöhte Tumorbildung verantwortlich sein (ATBC-Study Group, 1994, Omenn et al., 1996).

Carotinoide reagieren mit Peroxylradikalen, die im Verlaufe von Lipidautoxidationsprozessen gebildet werden, u.a. zu Intermediaten, von denen sowohl anti- als auch prooxidative Reaktionswege ausgehen können. Schematisch ist dies in Abb. 1.4 (B) dargestellt.

A



B

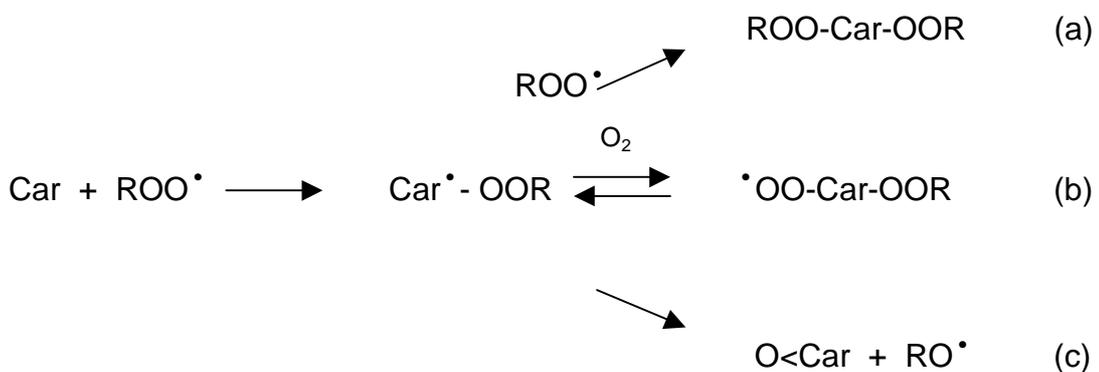


Abb. 1.4: Schema zu anti- und prooxidativen Eigenschaften von Carotinoiden. (A) Desaktivierung von Singulett-Sauerstoff und (B) Reaktion mit Peroxylradikalen zu einem neutralen Addukt (a), radikalischen Addukt (b), oder Carotenoid-Epoxid und Alkoxyradikal (c) (Burton und Ingold, 1984, Kennedy und Liebler, 1992, Britton, 1995a).

Die Desaktivierung von energiereichem und reaktionsfähigem Singulett-sauerstoff erfolgt durch Energietransfer auf ein Carotinoidmolekül im Singulett-Zustand (Abb. 1.4 A). Das resultierende Carotinoid im Triplett-Zustand erreicht den energetisch günstigeren Singulett-Zustand wieder durch Energieabgabe in Form von Wärme an die Umgebung (Britton, 1995a).

Die Reaktion mit Lipidperoxyradikalen kann zu anti- oder prooxidativen Folgereaktionen führen. Resonanzstabilisierte Carotinoid-Peroxy-Addukte können mit weiteren Peroxyradikalen zu nicht-radikalischen Produkten reagieren (Abb. 1.4 B (a)). Die Kettenreaktion der Lipidautoxidation wird hierbei unterbrochen (antioxidativ). Alternativ kann sich Sauerstoff an das radikalische Addukt anlagern. So entsteht ein neues Radikal (prooxidativ). Da dieser Reaktionsweg reversibel ist, lässt sich gemäß Massenwirkungsgesetz bei erhöhtem Sauerstoffpartialdruck das Gleichgewicht der Reaktion zugunsten der Produktseite verschieben (b). Weiterhin ist auch eine Spaltung der Peroxygruppe des Addukts möglich, die ein reaktives Alkoxyradikal entstehen lässt. Alkoxyradikale sind reaktiver als Peroxyradikale, so dass dieser Reaktionsweg ebenfalls als prooxidativ anzusehen ist (Kennedy und Liebler, 1992). Die resultierende Carotenoidverbindung kann ein Epoxid sein (Britton, 1995a, Martin, et al., 1999). Aus den erhaltenen Peroxyverbindungen in (a) und (b) werden weitere Abbauprodukte gebildet.

1.2.3 Carotinoide in der Photoprotektion

Oxidative Schädigungen spielen eine wichtige Rolle in der Pathogenese zahlreicher degenerativer Erkrankungen. Epidemiologische Studien zeigen, dass die erhöhte Aufnahme von Antioxidantien mit einem verminderten Risiko für solche Erkrankungen korreliert ist. So bestehen Korrelationen zwischen einer geringen Carotinoideaufnahme oder niedrige Carotinoidwerte im menschlichen Serum und einem erhöhten Risiko für eine Krebserkrankung, altersbedingte Macula-Degeneration, einen Katarakt oder für eine kardiovaskuläre Erkrankung (Sies und Krinsky, 1995, Stahl und Sies, 1996, Sies und Stahl, 1998, Mayne et al., 1998, Suter, 2000, Mecocci et al., 2002, Polidori et al., 2002).

Carotinoide sind vermutlich am Schutz lichtexponierter Gewebe beteiligt. Auffällig ist das Vorkommen der polaren Carotinoide Lutein und Zeaxanthin in der Macula lutea der menschlichen Retina (Wald, 1945, Bone et al., 1985, Handelman et al., 1988). Das gelb erscheinende Pigment ist lokal beschränkt in der zentralen Retina im Fokus der optischen Achse (Ort höchster Sehschärfe) zu finden. Es ist für die Verminderung der chromatischen Aberration im Auge aber auch für die Entstehung des psychophysikalischen Phänomens der Haidinger'schen Figur verantwortlich (Reading und Weale, 1974, Bone und Landrum, 1984). Als Ursache wird eine definierte, planare Anordnung der Carotinoide im retinalen Gewebe angenommen, die eine optimale Wechselwirkung des einfallenden Lichtvektors mit den Carotinoiden durch Absorption ermöglicht. Zugleich lassen sich dadurch photoprotektive Wirkungen, z.B. durch Filtereffekte, erzielen.

Im Auge wird kurzwelliges UV B-Licht von der Hornhaut, längerwelliges UV A-Licht hingegen von der Linse absorbiert. Intensive Einstrahlung des sichtbaren Anteils der Sonnenstrahlung kann zu Schädigungen der Retina führen (Marshall, 1985, Young, 1988, Taylor et al., 1990, Young, 1994). Blaulicht im Wellenlängenbereich von 400 – 450 nm wirkt besonders schädigend (Ham et al., 1984). Insbesondere im Bereich der Macula weist die Retina im Vergleich zum übrigen retinalen Gewebe einen geringeren Durchmesser auf, was mit einem verminderten Absorptionsverhalten einhergeht (Schalch, 1992). Die für das Farbsehen verantwortliche Zapfen werden durch Blaulicht eher geschädigt (Marshall, 1985), als die für das Schwarzweisssehen verantwortlichen Stäbchen. Das maculare Pigment zeigt ein Absorptionsmaximum bei 460 nm und stellt somit einen idealen Blaulichtfilter dar (Bone et al., 1992, Junghans et al., 2001a).

Eine der Hauptursachen für irreversible Blindheit in der westlichen Welt ist die altersbedingte Maculadegeneration (AMD) (Vingerling et al., 1995). Es wird angenommen, dass photooxidative Schädigungen von Zellbestandteilen der Macula lutea eine Rolle spielen (Seddon, 1994, Sparrow, 2002). Es wird diskutiert, dass die Maculapigmente Lutein und Zeaxanthin als Blaulichtfilter wirken und einen protektiven Effekt aufweisen (Schalch und Weber 1994, Bone et al., 2001, Mares-Perlman, 2002). Vergleichende Studien (Eye Disease Case-Control Study Group) zeigten, dass ein erhöhter Verzehr von lutein- und zeaxanthinreicher Nahrung mit

einem vermindertem Risiko korreliert ist, an AMD zu erkranken (Seddon et al., 1994). Diese Korrelation gilt besonders für den lutein- und zeaxanthinreichen Spinat (Müller, 1996). Weitere Studien zeigten auch, dass die Serumkonzentrationen der Maculacarotinoide mit der Dichte des Maculapigments im Auge positiv korreliert sind (Hammond et al., 1996). Durch den Verzehr von Spinat ließen sich sowohl die Serumgehalte von Lutein und Zeaxanthin als auch die Dichte des Maculapigments erhöhen (Hammond et al., 1997). Hingegen wurden in einer früheren Studie keine positive Korrelation zwischen den Serumgehalten von Lutein und Zeaxanthin und der Inzidenz für eine AMD festgestellt (Mares-Perlman, 1995).

Bisher sind nur wenige Untersuchungen zu photoprotektiven Effekten von Carotinoiden in der Haut durchgeführt worden. Die meisten Untersuchungen waren auf die Anwendung von β -Carotin beschränkt. Zu unterscheiden sind hierbei Untersuchungen mit topischen Anwendungen direkt auf der Haut und einer systemischen, oralen Applikation.

Schon früh erwies sich β -Carotin als geeignet für die Behandlung von Lichtdermatosen wie der erythropoetischen Protoporphyrin (EPP) (Mathews-Roth et al., 1977). Bei der EPP liegt eine Hypersensitivität gegenüber Sonnenlicht vor, die zu sonnenbrandähnlichen Symptomaten führt. Aufgrund eines genetischen Defektes kommt es zu einer massiven Erhöhung des Protoporphyrins im Blut, das als Photosensibilisator wirkt. Durch Energietransfer auf molekularen Sauerstoff im Triplett-Zustand entsteht reaktiver Singulett-Sauerstoff bei gleichzeitiger Regeneration von Protoporphyrin im Singulettgrundzustand. Eine β -Carotin-Supplementierung erniedrigt die Empfindlichkeit der Haut durch Desaktivierung des Singulett-Sauerstoffs (Whitcombe et al., 1991).

Die Verwendung von Carotinoiden im systemischen Sonnenschutz findet erst seit einigen Jahren Aufmerksamkeit, obwohl Interventionsstudien zufriedenstellende Ergebnisse schon früh beschrieben hatten (Mathews-Roth et al., 1972, Fuller et al. 1992). Das Maß einer Protektion wird hierbei durch das Ausmaß des UV-induzierten Erythems oder durch die Menge der dafür erforderlichen Strahlungsdosis bestimmt.

Mathews-Roth und Kollegen (1972) berichteten von einem protektiven Effekt durch Gabe von 150 mg β -Carotin pro Tag über 10 Wochen. Ähnliche Ergebnisse

wurden auch mit Carotinoidgemischen (Lee et al., 2000) und Carotinoidapplikationen in Kombination mit topischen Sonnenschutzmitteln erzielt (Gollnick et al., 1996).

Im Gegensatz dazu wurden in anderen Studien, die über einen kürzeren Zeitraum (4 Wochen) durchgeführt worden waren, keine protektiven Effekte beobachtet. Die tägliche Gabe von 90 mg β -Carotin oder 150 mg Carotinoiden in Form eines β -Carotin-Canthaxanthin-Gemisches ergab keinen UV-Schutz (Wolf et al., 1988, Garmyn et al., 1995).

Lycopin als endogene UV-Schutzsubstanz wurde nur in wenigen Interventionsstudien untersucht. Die tägliche Gabe von 40 mg einer Tomatenpaste erzeugte signifikant photoprotektive Effekte jedoch erst ab einer Supplementierungsdauer von 4 Wochen. Verglichen mit den hohen Dosen an β -Carotin waren die täglichen Dosen von 16 mg Lycopin durch den Verzehr der Tomatenpaste niedriger (Stahl et al., 2001).

In den genannten Studien wurden die Carotinoide β -Carotin und Lycopin auf ihre UV-protektive Wirkung hin untersucht. Insbesondere die Verwendung von Carotinoidsupplementen aus Algenextrakten oder die Verwendung von Lebensmitteln z.B. Tomatenmark macht es notwendig, das Carotinoidprofil der eingesetzten Formulierungen zu prüfen, um eine Beziehung zwischen Exposition und Wirkung beschreiben zu können. Weitere Carotinoide wie Phytoen sind in Tomaten zu finden und können je nach Varietät bis zu 50 % des Lycopingehaltes ausmachen (Belitz und Grosch, 1992). Phytoen ist ein neben dem chemisch verwandten Phytofluen biosynthetisches Vorläufermolekül der Carotinoide in Pflanzen (siehe Abb. 1.2), welches schon früh von Mathews-Roth und Pathak (1975) im Tiermodell des Frettchens untersucht wurde. Es konnte gezeigt werden, dass es ein UV-protektives Agens der Haut ist, wenn es intraperitoneal (unter die Bauchdecke) appliziert wird.

1.2.4 Carotinoideaufnahme

Voraussetzung für eine protektive Wirkung ist die Absorption der Substanz und die anschließende Verteilung in das Zielgewebe. Daher sind Untersuchungen zur Biokinetik von Carotinoiden notwendig, um Aussagen über protektive Effekte treffen zu können.

Carotinoide sind stets mit lipophilen Kompartimenten assoziiert. Im Verdauungstrakt des Menschen werden sie unspezifisch mit sezernierten Gallensäuren und Nahrungsfetten zu Mizellen assoziiert, die über die Darmmucosa aufgenommen werden. Im Lymphsystem erfolgt der Weitertransport über Chylomikronen, die in das Blut abgegeben werden. Über den Blutkreislauf gelangen die Carotinoide zu verschiedenen Zielgeweben (Goodman et al., 1966, Erdman et al., 1993).

In der Leber erfolgt der Einbau in Lipoproteine sehr niedriger Dichte (VLDL), welche anschließend im Blut enzymatisch zu Lipoproteinen niedriger Dichte (LDL) umgebaut werden. Wie in der Leber ist die Aufnahme von Carotinoiden in die Zielzellen oftmals LDL-Rezeptor-vermittelt. Einen Großteil der polaren Xanthophylle lassen sich hingegen in den Lipoproteinen hoher Dichte (HDL) nachweisen (Olson, 1994). Eine weitere Metabolisierung ist bei Provitamin A-Carotinoiden zum Retinal bzw. Retinol, bei allen übrigen Carotinoiden zu den β -Apo-Carotenalen möglich (Krinsky, 1993).

Der Transportweg der Carotinoide in das Blut und die Leber ist eingehend untersucht. Die Anreicherung in bestimmten Zielgeweben lässt sich bislang jedoch nicht hinreichend erklären. Hohe Carotinoidgehalte in der Nebeniere und in den Testes lassen sich mit einer hohen Ausstattung an LDL-Rezeptoren erklären (Krinsky et al., 1958, Kaplan et al., 1990, Johnson and Russel, 1992, Stahl et al., 1992).

1.3 Ziel der Arbeit

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, in einer Interventionsstudie am Menschen photoprotektive Effekte von Carotinoiden gegenüber UV-induzierten Schädigungen in der Haut nachzuweisen. Dazu sollten Probanden täglich mit lycopinreichen Nahrungsergänzungsmitteln und mit einem lycopinreichen Lebensmittel für die Dauer von 12 Wochen supplementiert werden. Der Carotinoidgehalt sollte im Blut und im Zielgewebe der Haut nachgewiesen und quantifiziert werden, um Aussagen über die Verfügbarkeit der Carotinoide aus den verschiedenen Supplementformulierungen zu treffen.

Die Verminderung der UV-induzierten Erythemintensität der Haut nach einer Solarsimulation sollte gemessen und das Ausmaß des photoprotektiven Effektes bestimmt werden.

Weiterführend sollten in einem Zellkultursystem die UV-protektiven Effekte von Carotinoiden untersucht werden. Als Modell dienten Kulturen von Hautfibroblasten und Keratinozyten. Die UV-induzierte Expression des Enzyms Kollagenase (MMP-1) und des Zytokins Interleukin-6 (IL-6) sollte in Anwesenheit von Lycopin, Phytoen oder Phytofluen bestimmt werden, um den Einfluß dieser Carotinoide auf UV-induzierte Signalwege in Hautzellen beschreiben zu können.

Schließlich sollten die antioxidativen Eigenschaften von Carotinoiden in einem geeigneten Biomembranmodell untersucht werden, indem Carotinoide in ein unilamellares Liposomensystem eingebaut werden. Zum Vergleich wurden weitere Antioxidantien exemplarisch untersucht. Mit einer neuen methodischen Konzeption sollten lipidprotektive Effekte der Carotinoide in den Liposomen aufgezeigt werden.

2. Material und Methoden

2.1 Chemikalien

Alle verwendeten Carotinoide waren synthetisch hergestellte Verbindungen, die freundlicherweise von Dr. Ernst (BASF, Ludwigshafen, Deutschland) zur Verfügung gestellt wurden. Die Reinheit betrug mindestens 90 % (HPLC); Lycopin wies eine Reinheit von 86 % auf. Isomerenreines Phytoen wurde von Dr. Paust (BASF) bezogen. Ein Gemisch aus Phytoen und Phytofluon wurde von LycoRed, Natural Prod. Industr. Ltd. (Beer-Sheva, Israel) geliefert. Epicatechin, Diphenylhexatrien und L- α -Di-lineoyl-phosphatidyl-cholin wurden von Sigma-Aldrich bezogen (Deisenhofen, Deutschland). 2,2'-Azo-bis-(amidinopropan)-hydrochlorid wurde von Polysciences (Warrington, PA, USA) geliefert. Alle übrigen Chemikalien in p.A. und HPLC- Qualität waren von Merck (Darmstadt, Deutschland). Stickstoff der Reinheit 5.0 war von Linde (Höllriegelskreuth, Deutschland). Wasser wurde membranfiltriert (Millipore, Eschborn, Deutschland). β -Apo-8'-Carotinal wurde durch Reduktion von β -Apo-8'-Carotinal (Fluka, Deisenhofen, Deutschland) mit Natrium-Borhydrid hergestellt (Khachik und Beecher, 1988).

2.2 Analytische Verfahren zur Carotinoidbestimmung

2.2.1 Carotinoidarbeitslösungen

Stammlösungen von Carotinoiden wurden durch Lösen der Festsubstanzen in Hexan/Dichlormethan (4/1, v/v) hergestellt. Der Gehalt wurde jeweils photometrisch unter Verwendung folgender Lösungsmittel zur Verdünnung der Stammlösung, molarer Extinktionskoeffizienten (Britton, 1995b) und Wellenlängen bestimmt (Tab. 2.1):

Tab. 2.1: Extinktionskoeffizienten von Carotinoiden in organischen Lösungsmitteln

Verbindung	ε (l mol ⁻¹ cm ⁻¹)	λ (nm)	Lösungsmittel
α -Carotin	145 300	445	Hexan
β -Carotin	138 900	450	Hexan
Lycopin	184 000	470	Hexan
β -Cryptoxanthin	138 900	450	Hexan
Lutein	144 000	445	Ethanol
Zeaxanthin	140 000	450	Ethanol
Phytoen	49 800	276	Hexan
Phytofluen	85 500	348	Hexan

Es wurden Arbeitslösungen im Bereich von 0,001 μ M – 2,0 μ M erstellt.

2.2.2 Geräte

Die chromatographische Trennung der Carotinoide erfolgte mit folgenden Geräten:

Pumpe:	La Chrom L7100 (Merck-Hitachi, Darmstadt, Deutschland)
Detektor:	La Chrom UV-Vis Detektor L-7420 (Merck-Hitachi, Darmstadt)
Integrator:	D-2500 Chromato-Integrator (Merck-Hitachi, Darmstadt)
Autosampler:	Autosampler 655 A (Merck-Hitachi, Darmstadt)
Säulenofen:	Column-Thermostat Jetstream 2 plus (Alltech, Associates, Deerfield, IL, USA)
Photometer:	DU [®] 530 Life Science UV/Vis Spektrophotometer (Beckmann, München, Deutschland)
Zentrifuge:	Hettich, Universal Zentrifuge 30 RF (Hettich, Tuttlingen, Deutschland)
Ultraschallbad:	Sonorex Super Digital DK 255 (Bandelin, Berlin, Deutschland)

2.2.3 Bestimmung von Carotinoiden in Serum-, Zellmedium- und Zelllysatsproben (Routineverfahren nach Gärtner, 1997)

In einem Polypropylen-Reaktionsgefäß (PP) wurden zu 1 ml KPi-Puffer (2 mM KPi, pH 7,2, 250 mg/l EDTA, 250 mg/l Ascorbinsäure) 200 µl einer Serum-, Zellmedium- oder Zelllysatsprobe gegeben. Als interner Standard (IS) wurden 20 µl einer propanolischen Lösung von β -Apo-8'-Carotinol zugegeben, die bei 450 nm eine Extinktion von etwa 0,2 aufwies. Proteine wurden nach Zugabe von 1 ml Ethanol durch intensives Schütteln gefällt. Nach Proteinfällung wurden 6 ml eines Extraktionsmittels (n-Hexan/Dichlormethan, 5/1, v/v, 0,01 % BHT) zur Probe gegeben. Es wurde 1 Minute vortex-geschüttelt, 10 Minuten ultraschallbehandelt, wiederum geschüttelt und dann 3 Minuten zur Phasentrennung bei 3000 rpm zentrifugiert. Ein Aliquot von 5 ml der organischen Phase wurde in ein weiteres Reaktionsgefäß (PP) überführt und unter einem Stickstoffstrom bis zur Trockne

eingedampft. Das Reaktionsgefäß wurde mit Diethylether nachgespült und die etherische Phase wiederum bis zur Trockne eingedampft.

Die Carotinoide waren bei 4 ° C und unter Stickstoff gelagert mindestens 1 Tag stabil.

Die Carotinoide wurden nach Zugabe von 20 µl Dichlormethan mit 180 µl der mobilen Phase A siehe (s.u.) rekonstituiert.

Die Probenaufgabe erfolgte mit einem Autosampler durch Injektion von 50 µl der Analysenlösung. Die HPLC-Bedingungen waren (HPLC-System A):

Säule:	Suplex pKb 100, 25 cm x 4,6 mm, 5 µm (Supelco, Bellefonte, Pennsylvania, USA)
Mobile Phase:	A Methanol/Acetonitril/ 2-Propanol, 54/44/2, v/v/v, B Methanol/Acetonitril/H ₂ O/2-Propanol, 46/37/15/2, v/v/v/v
Gradient:	0 - 5 Min 64 % A, 36 % B 5 - 15 Min 64 % A → 100 % A 15 - 27 Min 100 % A 27 - 32 Min 64 % A, 36 % B
Fluß:	1 ml/Min
Temperatur:	Raumtemperatur
Detektion:	450 nm

2.2.4 Bestimmung von Carotinen in Serum- und Lebensmittelproben

Zu den in der vorliegenden Arbeit bestimmten Carotinen gehören β-Carotin, α-Carotin, Lycopin, Phytoen und Phytofluen. Im folgenden wird ein Trennsystem beschrieben, welches entwickelt wurde, um ein dem Verfahren zur Carotinoidanalytik (2.2.3) vergleichbares System zu erhalten. Die Eingliederung der Verfahren in einen routinemäßigen Laborbetrieb sollte somit möglich sein.

Serumproben

In einem PP-Reaktionsgefäß wurden 500 µl Serum zu 1 ml KPi- Puffer (2 mM KPi, pH 7,2 , 250 mg/l EDTA, 250 mg/l Ascorbinsäure) gegeben und mit 1ml Ethanol die Proteine gefällt. Extrahiert wurden die Carotine mit n-Hexan/Dichlormethan (5/1, v/v, 0,01 % BHT). Es wurde 1 Minute geschüttelt, 10 Minuten ultraschallbehandelt, wiederum geschüttelt und dann für 3 Minuten zur Phasentrennung bei 3000 rpm zentrifugiert. Ein Aliquot von 5 ml der organischen Phase wurde in ein weiteres Reaktionsgefäß (PP) überführt und unter einem Stickstoffstrom bis zur Trockne eingedampft. Das Reaktionsgefäß wurde mit Diethylether nachgespült und die etherische Phase wiederum bis zur Trockne eingedampft. Die Rekonstitution erfolgte mit 100 µl Dichlormethan und 100 µl Methanol.

Lebensmittelproben

Als Lebensmittelproben wurden trübe Säfte sowie pulpenähnliche und pastöse Proben aus der Tomate und Karotte untersucht. Ferner wurde auch ein Tomatenextrakt auf Oleoresin-Basis (Lyc-o-Mato[®]) untersucht. Die Probenvorbereitung war an das Verfahren von Hart und Scott (1995) angelehnt.

Etwa 100 g des Lebensmittels wurden homogenisiert (Ultra-Turrax, IKA, Staufen, Deutschland). 1 bis 5 g des Homogenats wurden in 50 ml H₂O aufgeschlämmt, für 10 Min im Ultraschallbad und für weitere 2 Min mit einem Ultraschall-Sonifizierer behandelt (Sonifier 250, Branson, Danbury, CT). Feste Bestandteile wurden über einen Filter (Schwarzband, Schleicher & Schüll, Einbeck, Deutschland) abgenutscht und der Filtrückstand mit 100 ml Methanol/THF (1/1, v/v) gewaschen. Die wässrige Phase wurde jeweils 3 x mit 400 ml Hexan im Scheidetrichter ausgeschüttelt und ein Aliquot von 4 ml der vereinigten Hexan-Phasen unter einem Stickstoffstrom eingedampft. Der Rückstand wurde in 100 µl Dichlormethan aufgenommen und mit 900 µl Hexan vollständig rekonstituiert.

Kapsel-Supplemente (Lyc-o-Mato[®]) wurden in 30 ml Hexan/Dichlormethan (5/1, v/v) mit einem Skalpell geöffnet und solange gerührt bis die Gelkapsel farblos war. Die stark gefärbte Lösung wurde bis zu einem leichten Gelbton verdünnt.

Die so erhaltenen Analysenlösungen wurden direkt in das HPLC-System gegeben.

Die HPLC-Trennung erfolgte mit (HPLC-System B):

Säule:	Suplex pKb 100, 25 cm x 4,6 mm, 5 µm (Supelco, Bellefonte, Pennsylvania, USA)
Mobile Phase:	Acetonitril/Methanol, 85/15, v/v
Gradient:	isokratisch
Fluß:	1 ml/Min
Temperatur:	20 °C
UV/vis-Detektion:	276 nm (Phytoen) 348 nm (Phytofluen) 450 nm (β-Carotin, Lycopin)
Fluoreszenz-Detektion:	348 nm (Anregung) (in Reihe mit UV) 480 nm (Emission) (Phytofluen)

Die Fluoreszenz-Detektion wurde zum Nachweis von Phytofluen bei einer Anregungswellenlänge von 348 nm und einer Emissionswellenlänge von 480 nm durchgeführt. Der Fluoreszenz- und der UV-Detektor waren dabei in Reihe geschaltet.

2.3 Interventionsstudie

2.3.1 Studiendesign

An der Studie nahmen 48 Erwachsene teil. Sie wurden vom Institut für Experimentelle Dermatologie der Universität Witten-Herdecke rekrutiert. An die Probanden der Studie wurden folgende Kriterien gestellt: ein guter allgemeiner Gesundheitszustand, keine Malabsorption, kein pathogener Lipidmetabolismus und keine Lebererkrankungen. Die Teilnehmer waren Nichtraucher mit einem Body Mass Index (BMI) von 18 – 25 kg/m², sie waren nicht schwanger oder in einer

Laktationsphase. Ferner nahmen sie während der Studie keine Vitaminsupplemente oder Medikamente ein. Photosensibilisierende Erkrankungen der Teilnehmer waren nicht bekannt. Einen Monat vor Beginn der Studie wurden intensive Sonnenbestrahlungen vermieden. Die Teilnehmer waren von Hauttyp II (weisse Haut, blond oder hell-braunes Haar, blaue oder hellbraune Augen und leichte Hautbräunung) (Pathak, 1982).

Die Studienteilnehmer wurden randomisiert in 4 Gruppen eingeteilt. Die erste Gruppe erhielt pro Tag 2 Kapseln einer synthetischen Lycopin-Formulierung (Gruppe Lycopin). Jede Kapsel enthielt 5,1 mg Lycopin mikroverkapselt als Beadlet.

Die zweite Gruppe nahm pro Tag zwei Kapseln eines Tomatenextraktes ein (Lyc-o-Mato[®]), welcher als Oleoresin rekonstituiert war (Gruppe *Lyc-o-Mato*). Der Gehalt an Carotinoiden betrug in jeder Kapsel (Herstellerangaben): Lycopin 4,9 mg, Phytofluen 0,4 mg und Phytoen 0,5 mg.

Die dritte Gruppe trank täglich 2 x 250 ml eines als Drink (Lyc-o-Guard Drink[®]) rekonstituierten Tomatenextraktes (Gruppe *Lyc-o-Guard*). Der Extrakt war in Form von Beadlets wässrig mikrodispersiert. Die Gehalte an Carotinoiden waren dabei folgende (Herstellerangaben): Lycopin 16,4 mg/l, Phytofluen 6,4 mg/l und Phytoen 8,0 mg/l.

Die vierte Gruppe nahm täglich 2 x 200 ml eines Saftes einer Lycopinkarotte ein (Gruppe *Lycopinkarotte*). Die Gehalte der Carotinoide betragen für Lycopin 25,1 mg/l, β -Carotin 12,9 mg/l, Phytoen 4,8 mg/l und Phytofluen 1,0 mg/l (eigene Untersuchungen).

Die Studie wurde über einen Zeitraum von 12 Wochen durchgeführt. Die Verlässlichkeit der Probanden hinsichtlich einer carotinarmen Ernährung und der Einnahme der Supplemente während der Studie wurde sowohl durch Befragung als auch durch die Bestimmung der Carotinoide im Serum überprüft. Jeder Proband stimmte der Teilnahme an dieser Studie schriftlich zu. Das Studiendesign wurde von der Ethikkommission der Universität Witten-Herdecke genehmigt.

2.3.2 *Induktion des Erythems und Messung der Hautrötung*

Dorsale Hautbereiche in Höhe der Scapularegion wurden jeweils nur einmal mit einem Solarsimulator (SOL 3, Hönle, München, Deutschland) bestrahlt. Die spektrale Verteilung des Simulators entsprach der des Tageslichts. Im UV-Bereich zwischen 310 und 350 nm wies der Simulator eine Zunahme der Strahlungsintensität auf mit einem Maximum bei 330 nm. Ein Nebenmaximum lag bei 360 nm.

Für jeden Probanden wurde die minimale Erythemdosis (MED) vor Beginn der Studie ermittelt. Am Tag 0 der Studie, nach 4 und 12 Wochen erfolgte dann eine Bestrahlung mit der individuellen 1,25-fachen MED. Die Bildung eines Erythems wurde durch den Hautrötungswert vor und 24 Stunden nach Bestrahlung mit einem Chromatometer (Chromameter CR 200, Minolta, Ahrensburg, Deutschland) als jeweiliger a -Wert gemessen und als differenzieller Δa -Wert ausgedrückt (a -Wert 24 h nach Bestrahlung minus a -Wert vor Bestrahlung).

2.3.3 *Bestimmung der Carotinoide in Haut und Serum*

Carotinoidgehalte in der Haut der Probanden wurden nicht-invasiv reflektionsspektrophotometrisch bestimmt (Stahl et al, 1998). Ein Spektrophotometer (MultiscanOS 20, MBR Herdecke, Deutschland) registrierte Reflektionsspektren im Bereich von 350 bis 850 nm. Licht dieser Wellenlängen erreicht eine Eindringtiefe in die Haut von bis zu 0,8 mm, so dass eine Detektion der Carotinoide in der Dermis möglich ist. Subkutane Carotinoide wurden nicht erfaßt. Als Referenz wurde Titandioxid benutzt. Die Messungen wurden am Tag 0, nach 4 und 12 Wochen der Studie am Institut für Experimentelle Dermatologie der Universität Witten-Herdecke durchgeführt.

Carotinoidgehalte im Serum wurden mittels HPLC nach 2.1.3 bestimmt.

2.4 Zellkultursystem

2.4.1 Fibroblasten und Keratinozytenkulturen

Humane Hautfibroblasten mit der Bezeichnung FF(DA) eines männlichen Spenders (Präputium-Biopsiematerial, freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. Brenneisen) wurden auf 6 cm Plastik-Kulturschalen (Greiner, Frickenhausen, Deutschland) angezogen und in Dulbecco's modified Eagle's Medium (DMEM, Sigma, Deisenhofen, Deutschland) kultiviert. Dem Medium wurde fötales Kälberserum (FCS, Endkonzentration 10 %, Greiner) , L-Glutamin (2 mM, Sigma) und Penicillin /Streptomycin (20 mg/ml, Sigma) zugesetzt. Die Zellen wurden in einer wasserdampfgesättigten Atmosphäre bei 37 °C mit 5 % CO₂ bis zur Konfluenz inkubiert.

Keratinozyten der HaCaT-Linie wurden auf 3 cm Plastik-Kulturschalen (Greiner) angezogen und unter denselben Bedingungen wie die Fibroblasten in RPMI 1640 – Medium (Sigma) kultiviert.

Keratinozyten aus Biopsiematerial (zur Verfügung gestellt von Dr. Brenneisen) wurden unter denselben Bedingungen wie die Fibroblasten in Epi-Life-Medium (Sigma) mit einem Zusatz von Gentamycin (Endkonzentration 0,1 %) und einem Keratinozyten-Supplement (Endkonzentration 10 %, Sigma) bis zu einer Konfluenz von etwa 80 % kultiviert .

2.4.2 Inkubation mit Carotinoiden und UV-Bestrahlung der Kulturen

Die konfluenten Zellen wurden zunächst für 24 Stunden ohne FCS konditioniert. Arbeitslösungen von Lycopin, Phytoen und Phytofluen in THF wurden den Zellkulturen mit FCS-freiem Medium zugegeben. Der Anteil an organischem Lösungsmittel im Medium betrug dabei maximal 0,2 %. Die Endkonzentrationen der Carotinoide im Inkubationsmedium lagen zwischen 0,03 µM und 5,0 µM. Die Prä-Inkubationszeit betrug zwischen 16 und 48 Stunden. Nach Entfernung des

Inkubationsmediums wurde zweimal mit Phosphatpuffer (PBS, 2 mM Kaliumhydrogenphosphat, pH 7,2) gewaschen und die Zellen mit PBS überschichtet.

Bestrahlt wurde jeweils eine geöffnete Kulturschale bei Raumtemperatur mit einem UV A-Strahler (UV-A 700 - Strahler, Waldmann, Villingen-Schwenningen, Deutschland). Das Emissionsmaximum lag bei 365 nm. Die Intensität war auf etwa 40 mW/cm² für 13 Minuten eingestellt. Die Dosis betrug 30 J/cm². Nach Entfernung des PBS wurden die Zellen mit FCS-freiem Medium überschichtet und für 20 Stunden bei 37° C post-inkubiert.

Mit THF prä-inkubierte bestrahlte bzw. unbestrahlte Zellkulturen dienten als Positiv- bzw. als Negativkontrolle. Alle Untersuchungen wurden in einem dreifachen Ansatz durchgeführt.

UV B-Bestrahlungen wurden mit einer UV B-Handlampe mit einem Maximum bei 312 nm (Volber Lourmat, Iff- Labortechnik, Wasserburg, Deutschland) durchgeführt. Die Intensität betrug 1 mW/cm² und die Dosis 30 mJ/cm². Um restliche UV C-Strahlungen zu eliminieren, wurden die Kulturen während der Bestrahlungen mit einem Quarzglas abgedeckt.

2.4.3 Bestimmung der Matrix-Metalloprotease-1-Expression (MMP-1)

Die quantitative Bestimmung der sezernierten MMP-1 aus Fibroblasten wurde mittels eines kommerziell erhältlichen ELISA Test- Kits 20 Stunden post-Inkubation aus dem Zellmedium durchgeführt (MMP-1, human, Biotrak ELISA system, Amersham-Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland). Die photometrische Auswertung der in den 96-Well Platten gebildeten gelben Farbstoffe erfolgte in einem automatischen Platten-Reader (Victor 1420 Multilabel counter, Wallac, Freiburg, Deutschland).

2.4.4 Bestimmung der Interleukin-6-Expression (IL-6)

Interleukin-6 stellt ebenso wie MMP-1 ein extrazellulär sezerniertes Protein der Keratinozyten (einschließlich HaCaT) dar, das quantitativ im Zellmedium nach 24 Stunden post-Inkubation mit einem ELISA-System bestimmt wurde (ChemiKine™, human interleukin-6 sandwich ELISA kit, Chemicon International, Inc., Temecula, CA). Die photometrische Auswertung erfolgte im Plattenreader (Victor 1420, Wallac).

2.4.5 Bestimmung der Gesamtproteinkonzentration im Zelllysat

Die Zellkulturen wurden nach der Inkubation mit PBS gewaschen und mit 500 µl einer SDS-Lösung (0,1 %) lysiert. Das Lysat wurde bei –80 °C eingefroren und nach dem Auftauen ultraschallbehandelt. Das so aufbereitete Lysat wurde direkt für die Proteinbestimmung nach Lowry eingesetzt (D_C-Protein Assay, Bio-Rad, München Deutschland). Die photometrische Auswertung erfolgte im Plattenreader (Victor 1420, Wallac).

2.4.6 Bestimmung des Carotinoidgehaltes in Zellmedium und Zelllysat

Carotinoide in Zellmedium (Zellkulturüberstand nach 24-stündiger Inkubation) und in Zelllysatproben von Fibroblastenkulturen wurden mittels HPLC nach 2.1.3 bestimmt.

2.5 Unilamellares Liposomensystem

2.5.1 Herstellung und Charakterisierung unilamellarer Liposomen (IUV)

Es wurden Liposomen der IUV-Klasse hergestellt (intermediate unilamellar liposomes). Dazu wurden 50 µl des in Dichlormethan gelösten Lipids (10 mg/ml) und die Mengen einer Carotinoid-Stammlösung in ein Zentrifugenglas gegeben, welche einem molaren Gehalt bis zu 0,5 mol % im Fall der Carotine und bis zu 5,0 mol % im Fall aller übrigen Testsubstanzen entsprach. Die Lösemittel wurden unter einem kontinuierlichem Stickstoffstrom entfernt. Zu dem trockenen Rückstand wurden 5 ml eines Kalium-Phosphatpuffers (100 mM, pH 7,4) gegeben. Die Lösung wurde mit Ultraschall behandelt (Ultraschall-Sonifizierer Sonifier 250, Branson, Danbury, CT) und die entstandene klare Suspension direkt für die Messung der konjugierten Diene (siehe 2.4.2) verwendet. Nicht mit Testsubstanzen beladene Liposomen dienten als Kontrolle.

Die Liposomensuspensionen wurden elektronenmikroskopisch untersucht (EM 9 S-2, Zeiss, Göttingen, Deutschland). Liposomen wurden dazu auf Kupferdrahtnetzchen (mesh 400, Plano, Wetzlar, Deutschland) aufgezogen und der Untergrund mit Phosphorwolframsäure markiert (Negativ-Färbung). Die Größe der Vesikel wurde bestimmt und so die Liposomen nach Ostro (1983) klassifiziert.

2.5.2 Initiation der Lipidoxidation in unilamellaren Liposomen

1 ml der zuvor auf Eis gekühlten Liposomensuspension wurde für 10 Minuten bei 37 ° C prä-inkubiert und anschließend mit 10 µl des wasserlöslichen Radikalstarters AAPH (100 mM) versetzt und so die Oxidationsreaktion initiiert.

2.5.3 Messung der Lipidoxidation in unilamellaren Liposomen

Die Liposomensuspension wurde direkt zur Messung der Lipidoxidation eingesetzt. Die Konzentrationen der Liposomen und die Art der Liposomen bedingten, dass eine photometrische Erfassung der Lipidoxidation aufgrund der primären Bildung von konjugierten Peroxyl-Dienen bei 234 nm möglich war. Der zeitliche Verlauf der Bildung an konjugierten Dienen wurde photometrisch in einem bei 37°C beheiztem Küvettenhalter verfolgt, indem die Extinktion mit einem zeitlichen Abstand von 90 Sek registriert wurde (UV/vis-Spektrophotometer Lambda 2 mit 6-fach Küvettenwechsler, Perkin-Elmer, Überlingen, Deutschland; ausgerüstet mit Auswertungssoftware UV KinLab Vers. 2.85.00 Perkin Elmer).

2.5.4 Bestimmung der lag-Phase und des k-Wertes

Die Zunahme der konjugierten Diene (CD) wurde als Absorptions-Zeit-Graphen dargestellt. Der anfänglichen zeitlichen Verzögerung der CD-Bildung (lag-Phase) folgte die lineare Kettenwachstumsphase, deren graphische Extrapolation die Bestimmung des Schnittpunktes mit der Abszisse ermöglichte (Tangentenmethode). Der erhaltene Abszissenwert entsprach der lag-Phase und wurde als τ_+ (Testsubstanz in das Lipid eingebaut) oder τ_- (Kontrolle; keine Testsubstanz in das Lipid eingebaut) bezeichnet. Der Quotient aus τ_+ und τ_- wurde berechnet und graphisch gegen die Konzentration der im Lipid eingebauten Testsubstanzen (nmol/mg) abgebildet. Ein linearer funktionaler Zusammenhang wurde gebildet und aus der Steigung der Funktion der k-Wert berechnet, der ein Maß für die lipidprotektiven Eigenschaften der jeweiligen Testsubstanz ist.

2.6 Statistik

Statistische Analysen wurden mit dem Software-Programm Excel 5.0 (Microsoft Corp., Unterschleissheim, Germany) durchgeführt. Zur Varianzanalyse wurde zuerst ein F-Test durchgeführt. Unabhängige Proben konnten mit dem Tukey-Test überprüft werden; abhängige Proben eines Kollektivs wurden mit dem zweiseitigen, gepaarten t-Test für abhängige Variablen getestet (Glantz, 1998). Unterschiede wurden als signifikant bezeichnet, wenn das α -Niveau mindestens $P < 0,05$ betrug. Alle Daten wurden als Mittelwerte \pm SD angegeben.

3. Ergebnisse

3.1 Analytik

3.1.1 Methode zur Bestimmung von Carotinoiden im Serum

Durch die Messung des Carotinoidgehaltes im Serum sollte die Verfügbarkeit der Hauptcarotinoide aus den Supplementen und dem Saft der Lycopinkarotte nachgewiesen werden. Desweiteren sollte das Ernährungsverhalten der Probanden während der Interventionsstudie entsprechend den Vorgaben des Studiendesigns kontrolliert werden.

Es wurden 6 Carotinoide im Serum mit einem Routineverfahren (Gärtner, 1997) für die Carotinoidanalytik bestimmt (HPLC-System A). Die Verwendung eines Gradienten-Systems und eine gemeinsame Detektionswellenlänge von 450 nm ermöglichte die Erfassung folgender Carotinoide in einem HPLC-Lauf:

Lutein, Zeaxanthin, interner Standard (IS), β -Cryptoxanthin, Lycopin und Isomere, α -Carotin sowie β -Carotin und seine Isomere wurden detektiert. Die Identifizierung der Carotinoide erfolgte mit Referenzverbindungen. Serumproben von Probanden, die nicht an der Interventionsstudie teilnahmen, wurden in regelmäßigen Abständen analysiert und dienten als Qualitätskontrollen der Carotinoidanalytik. Als interner Standard wurde β -Apo-8'-Carotinal verwendet, das durch Reduktion von β -Apo-8'-Carotinal mit Natrium-Borhydrid hergestellt wurde. Die Verwendung des IS ermöglichte es u.a. auch, Aussagen über die Wiederfindung eines Carotinoids nach Extraktion und Chromatographie zu treffen. Die Wiederfindung des IS war reproduzierbar über die Dauer der Studie, und der Variationskoeffizient der Signalhöhe des IS im Chromatogramm betrug 20 %. Quantifizierungen erfolgten mittels des externen Standards mit internem Standard; es wurde das Verhältnis der Signalhöhe des entsprechenden Carotinoids zur Signalhöhe des IS gebildet. Kalibrierfunktionen wurden durch ungewichtete, lineare Regression erstellt. Zur quantitativen Auswertung wurden nur die Kalibrierfunktionen herangezogen, deren Korrelationskoeffizient r mindestens 0,999 betrug. Ein typisches Chromatogramm einer Serumprobe (Qualitätskontrolle) ist in Abbildung 3.1 dargestellt.

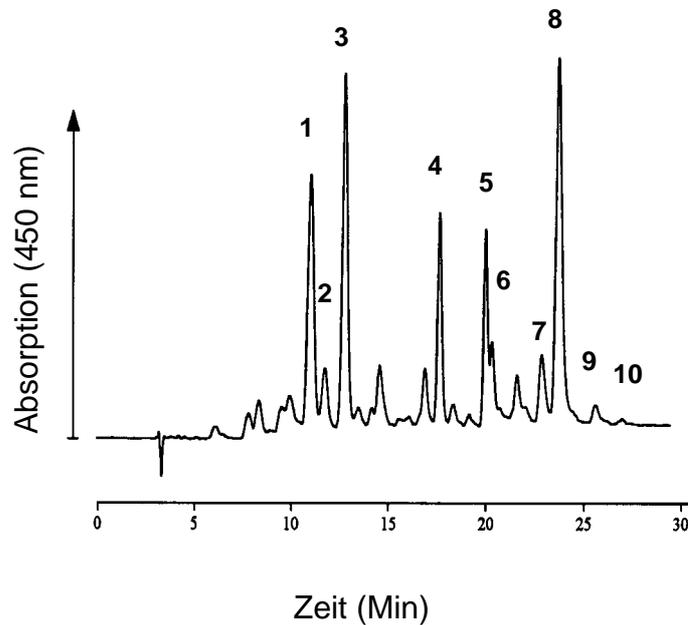


Abb. 3.1: HPLC-Chromatogramm eines Serumextraktes (Qualitätskontrolle) zur Carotinoidanalytik (HPLC-System A); $\lambda = 450 \text{ nm}$, Raumtemperatur; 1 Lutein, 2 Zeaxanthin, 3 interner Standard (IS), 4 β -Cryptoxanthin, 5 all-trans-Lycopin, 6 cis-Isomere des Lycopin, 7 α -Carotin, 8 β -Carotin, 9 13-cis- β -Carotin, 10 15-cis- β -Carotin

Die Xanthophylle Lutein und Zeaxanthin waren nahezu basisliniengetrennt. Der interne Standard interferierte mit keinem Analyten. Lycopin in all-trans-Konfiguration wurde von seinen 5-cis- und 13-cis- Isomeren getrennt. Die strukturell verwandten Carotine α -Carotin sowie β -Carotin und die Isomere 13-cis- und 15-cis- β -Carotin ließen sich ebenfalls chromatographisch trennen. Weitere Carotinoide wurden nicht zugeordnet. Die Analysenzeit betrug weniger als 28 Min.

3.1.2 Entwicklung einer Methode zur Bestimmung von Carotinen im Serum und in Lebensmitteln

Die zu den Carotinen gehörenden Verbindungen Phytoen und Phytofluen wurden sowohl im Serum als auch in den als Supplementen verabreichten Tomatenextrakten analysiert, da beide Verbindungen in größeren Mengen in den Produkten vorhanden sein sollten (Herstellerangaben). Im Tomatenextrakt auf Oleoresin-Basis (Lyc-o-Mato[®]) betrug der prozentuale Anteil von Phytoen und Phytofluen bezogen auf Lycopin etwa jeweils 10 %. Für den Tomatenextrakt, der als trinkbare, wässrige Dispersion formuliert wurde (Lyc-o-Guard Drink[®]), ergab sich sogar ein Phytoenanteil von 55 % und ein Phytofluenanteil von 39 % bezogen auf Lycopin. Die Gehalte im Saft der Lycopinkarotte waren unbekannt. Zur Analyse wurde eine HPLC-Methode entwickelt, die spezifisch und selektiv die Carotine erfassen konnte. Zugleich war es mit dieser Methode möglich, zusätzlich die Carotine Lycopin und β -Carotin als Hauptcarotinoide der Supplemente und des Saftes der Lycopinkarotte zu quantifizieren.

Voruntersuchungen hatten ungenügende Trennungen auf herkömmlichen C18-Umkehrphasen (RP-18, LiChrospher Merck, Darmstadt) ergeben. Zudem war stets ein Gradientensystem erforderlich, um Analysenzeiten unter 35 Min zu gewährleisten.

Gute Trennungen wurden mit der modifizierten RP-Phase der pKb-100 Säule unter Verwendung eines isokratischen Systems mit einem Acetonitril/Methanol-Gemisch bei 20 °C erhalten (HPLC-System B). Alle Carotine ließen sich ausreichend gut auftrennen. Die Analysenzeit lag unter 30 Min.

Die Methode wurde in Anlehnung an die Kriterien für die analytische Beschreibung von Analyseverfahren überprüft. Grundlage waren die Anleitungen zur Abfassung von Methoden im Bereich der Lebensmittelanalytik (Amtl. Sammlung von Untersuchungsverfahren gem. § 35 LMBG). Die *Spezifität* der Methode wurde durch die Verwendung von zwei verschiedenen Wellenlängen für jeweils Phytoen (276 nm) und Phytofluen (348 nm) nachgewiesen. Phytofluen zeigte stets zwei Signale, deren Zuordnung (cis/trans-Isomere) bislang nicht möglich ist (Khachik et al., 1997). Die *Genauigkeit* wurde durch Überprüfung der Richtigkeit charakterisiert. Eine externe Kalibrierung macht in der Regel eine Wiederfindungskorrektur

notwendig; jedoch wurden die externen Kalibrierstandards in das Probenvorbereitungsschema mit eingebunden, so dass eine Bestimmung der Wiederfindung nicht notwendig war.

Die *Nachweisgrenze* (NG) beschreibt die Konzentration, die sich durch das höchste Signal einer analytfreien Probe über eine Kalibrierfunktion darstellen lässt (DIN 32645). Für die Chromatographie ergibt das Rauschen der Basislinie den gemittelten Blindwert und ein Signal/Rausch-Verhältnis von 3 definiert die NG (Doerffel et al., 1986, Kunze, 1990). In der Chromatographie wird die NG auch als *Detektionsgrenze* beschrieben, da sie nicht der Definition der DIN entspricht. Für Phytofluen und Phytoen wurde eine Konzentration von 0,005 μM als *Detektionsgrenze* festgelegt. Die *Erfassungsgrenze* (EG) ist doppelt so groß wie die NG und lässt ein falsch-negatives Ergebnis mit nur 5 % zu, einen Analyten als „nachgewiesen“ zu erkennen. Eine Quantifizierung ist jedoch nicht zulässig, da immer noch eine Überlappung der statistischen Streubereiche von NG und EG besteht. Erst die 3-fache Konzentration der NG ergibt eine *Bestimmungsgrenze* (BG), oberhalb derer eine Bestimmung erlaubt ist (Hädrich und Vogelsang, 1996).

In Anlehnung daran wurde hier die *Quantifizierungsgrenze* als die 6-fache Detektionsgrenze definiert. Phytoen und Phytofluen besitzen mit dem hier verwendeten HPLC-System folglich eine *Quantifizierungsgrenze* von 0,03 μM .

Kalibrierfunktionen wurden durch ungewichtete, lineare Regression erstellt und zur Auswertung verwendet, wenn der Korrelationskoeffizient r mindestens 0,99 betrug.

Die HPLC-Chromatogramme eines Phytoen-Standards sind in Abbildung 3.2, die eines Phytofluen-Standards in Abbildung 3.3 gezeigt. Die Retentionszeit liegen für Phytoen bei 29,4 Min und für Phytofluen bei 24,6 und 25,9 Min für die Isomere.

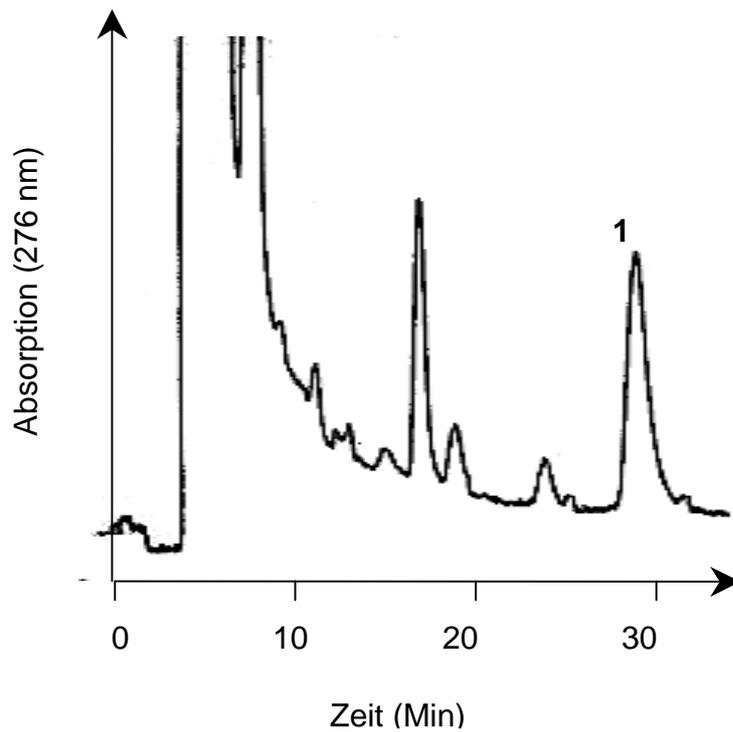


Abb. 3.2: HPLC-Chromatogramm nach Extraktion eines Phytoen-Standards (1) mit $t_r = 29,4$ Min bei $\lambda = 276$ nm und $T = 20$ °C, mobile Phase: MeCN/MeOH (85/15, v/v).

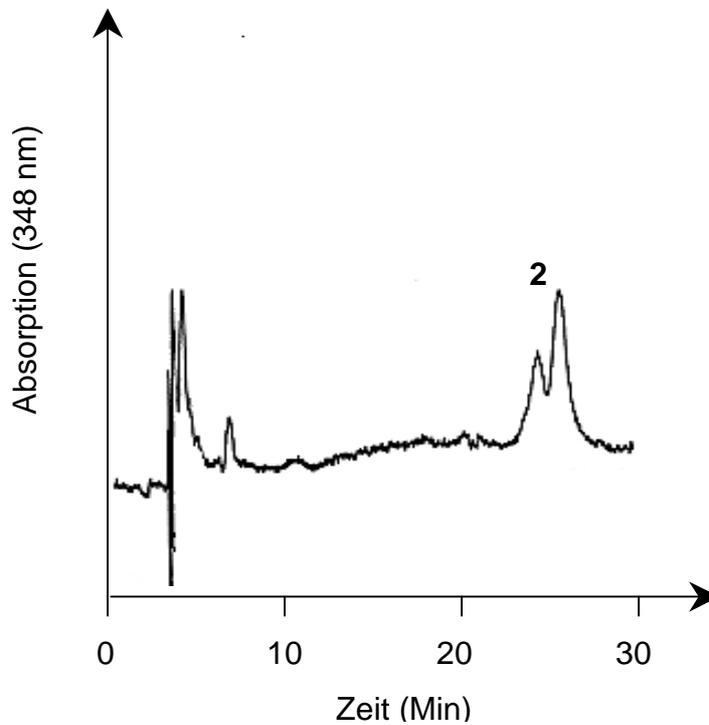


Abb. 3.3: HPLC-Chromatogramm nach Extraktion eines Phytofluen-Standards (2) mit $t_r = 24,6$ und $25,9$ Min bei $\lambda = 348$ nm und $T = 20$ °C, mobile Phase: MeCN/MeOH (85/15, v/v).

Die Analyse der Carotine im Serum war an das Routineverfahren zur Carotinoidanalytik angelehnt. Lediglich das Probenvolumen wurde von 200 μl auf 500 μl erhöht, um auch im Serum von nicht-supplementierten Probanden eine ausreichende Nachweisempfindlichkeit zu erhalten. Die Rekonstitution des eingedampften Hexan/Dichlormethan-Extraktes erfolgte zunächst mit 100 μl anstatt mit 20 μl Dichlormethan, da zu geringe Mengen an Dichlormethan zu einer unvollständigen Lösung des trockenen Serum-Rückstandes geführt hatten.

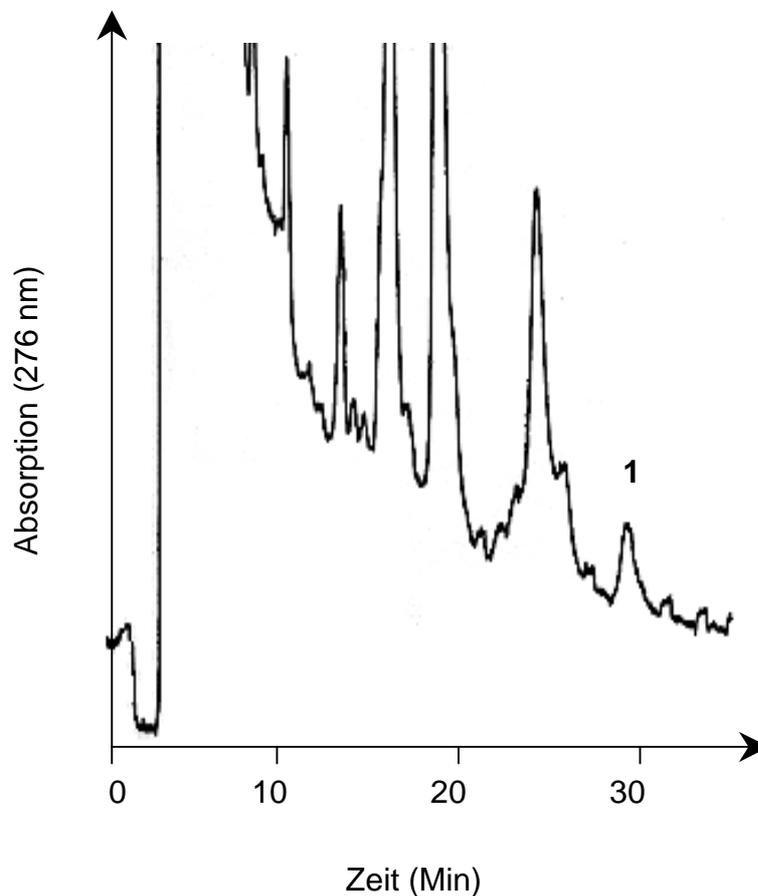


Abb. 3.4: HPLC-Chromatogramm des Serum-Extraktes eines Probanden der Gruppe Lyc-o-Mato vor Supplementierung bei $\lambda = 276 \text{ nm}$ und $T = 20 \text{ }^\circ\text{C}$. Phytoen (1) kann identifiziert werden ($t_r = 29,1 \text{ Min}$).

Beispielhaft ist in Abbildung 3.4 die Zuordnung des Phytoen über die Retentionszeit von 29,1 Min im Serum eines Probanden der Gruppe Lyc-o-Mato gezeigt, welcher zu Beginn der Studie in Woche 0 nicht supplementiert war. Die Zunahme des Phytoengehalts im Serum desselben Probanden nach 12-wöchiger Supplementierung mit dem Oleoresin Lyc-o-Mato[®] ist in Abbildung 3.5 zu erkennen.

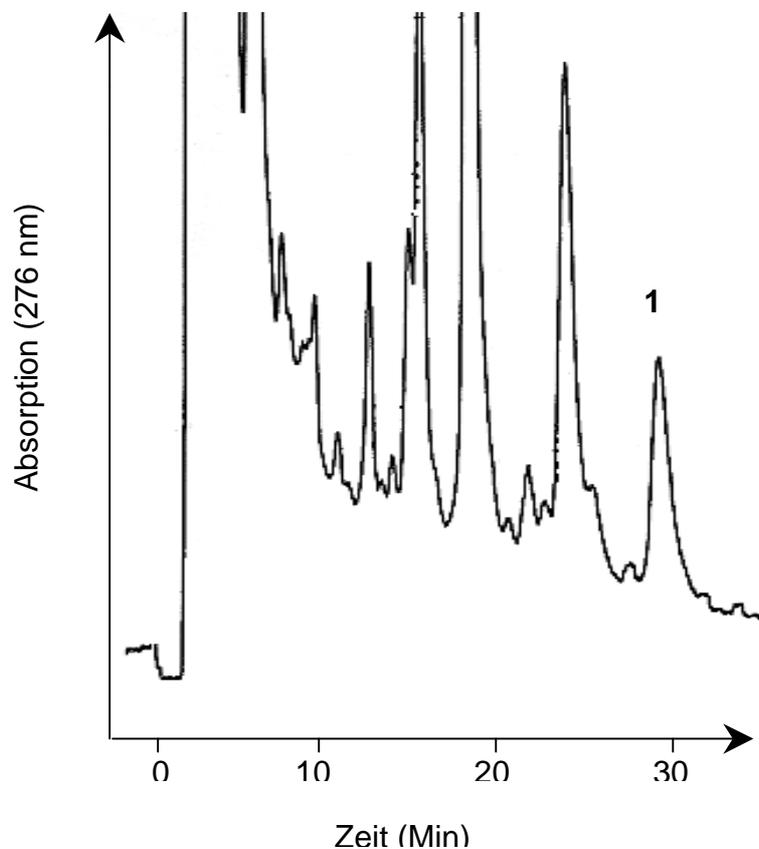


Abb. 3.5: HPLC-Chromatogramm des Serum-Extraktes eines Probanden der Gruppe Lyc-o-Mato in Woche 12 nach Supplementierung bei $\lambda = 276 \text{ nm}$ und $T = 20 \text{ °C}$. Die Zunahme von Phytoen (1) gegenüber der Woche 0 (Abb. 3.4) ist zu erkennen ($t_r = 29,1 \text{ Min}$).

Phytofluen ließ sich ebenso wie Phytoen eindeutig über die Retentionszeiten bei 24 Minuten und 25 Minuten identifizieren. Die Signale des Phytofluen im Serum

des Probanden der Gruppe Lyc-o-Mato zu Beginn der Studie und nach 12 Wochen sind in Abbildung 3.6 und 3.7 dargestellt. Es fällt auf, dass das Isomerenmuster des Standards mit dem Muster des Serums übereinstimmt. Das Phytofluensignal bei 25 Min dominiert über das Signal bei 24 Min. Dies gilt für nahezu alle untersuchten Standards und Seren. Das Verhältnis Signalthöhe ($t_r = 25$ Min) / Signalthöhe ($t_r = 24$ Min) beträgt $2,3 \pm 0,8$. Es zeigte sich dabei, dass ein Trend zur Zunahme des zweiten Signals in den Seren nach Supplementierung besteht.

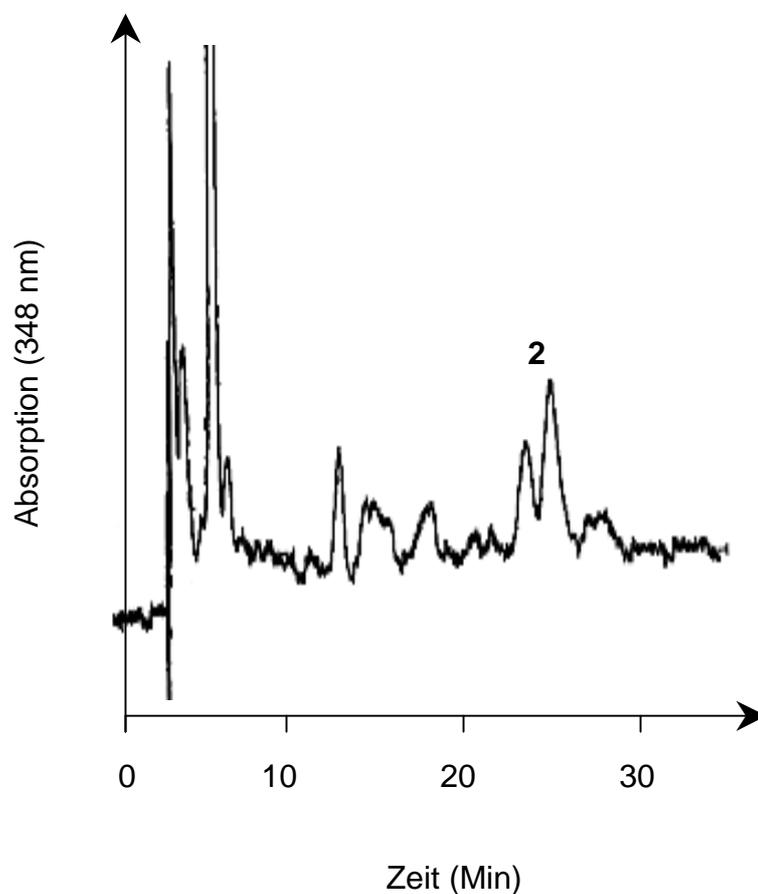


Abb. 3.6: HPLC-Chromatogramm des Serum-Extraktes eines Probanden der Gruppe Lyc-o-Mato vor Supplementierung bei $\lambda = 348$ nm und $T = 20$ °C. Es lassen sich die Phytofluens-Isomeren (2) nachweisen ($t_r = 24,0$ und $25,4$ Min).

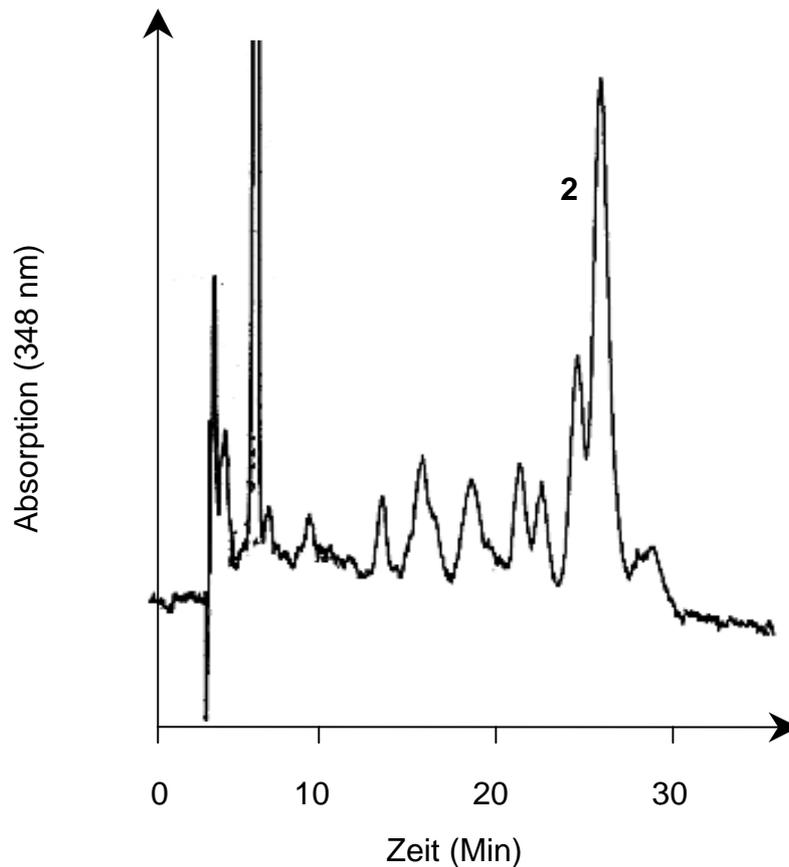


Abb. 3.7: HPLC-Chromatogramm des Serum-Extraktes eines Probanden der Gruppe Lyc-o-Mato nach 12 Wochen Supplementierung bei $\lambda = 348 \text{ nm}$ und $T = 20 \text{ }^\circ\text{C}$. Eine starke Zunahme des Phytofluengehaltes (2) wird beobachtet ($t_r = 24,1$ und $25,4 \text{ Min}$).

Sowohl bei einer Detektionswellenlänge von 276 nm als auch bei 348 nm zeigen die Chromatogramme basisliniengetrennte Signale für Phytoen und Phytofluen. Eine Zuordnung anderer Signale bei 276 nm und 348 nm war nicht möglich.

Phytofluen zeichnet sich durch eine ausgeprägte Fluoreszenz bei einer Wellenlänge von 480 nm aus, wenn die Verbindung bei 348 nm angeregt wird. Weitere Verbindungen der Carotin-Klasse wie Neurosporin und Tetrahydrolycopin besitzen ebenso die Fähigkeit zu fluoreszieren. Daher wurde während der Analytik der Seren mit dem HPLC-System B nach der UV-Detektion eine Fluoreszenzdetektion in Reihe geschaltet (Abb. 3.8). Eine sehr stark ausgeprägte Fluoreszenz zeigten Retinol bei einer Retentionszeit von 6 Min (überprüft durch einen externen Standard) und Phytofluen bei 25 Min. Unter diesen Bedingungen waren keine weiteren Signale mit entsprechend hoher Fluoreszenz zu beobachten.

Es ließen sich zwei Signale im Retentionszeitfenster des Phytofluen feststellen, die dem Isomerenmuster des Phytofluen bei der UV-Detektion entsprachen. Jedoch betrug das Verhältnis der Signalhöhe ($t_r = 25$ Min) / Signalhöhe ($t_r = 24$ Min) etwa 10 und ist somit um das 5-fache höher als bei der UV-Detektion.

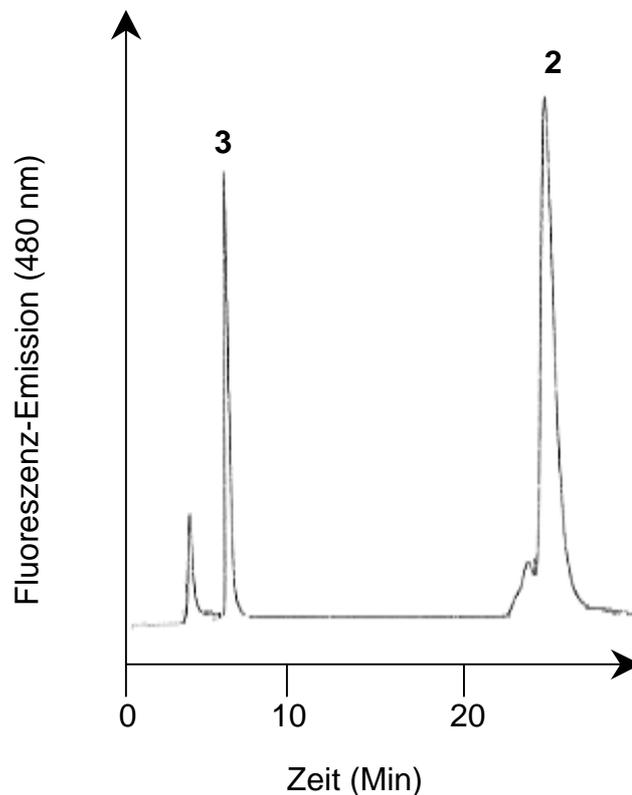


Abb. 3.8: HPLC-Chromatogramm des Serum-Extraktes eines Probanden der Gruppe Lyc-o-Mato vor Supplementierung bei $\lambda_{\text{(Anregung)}} = 348$ nm, $\lambda_{\text{(Emission)}} = 480$ nm und $T = 20$ °C. Phytoen (2) und Retinol (3) lassen sich zuordnen.

Das entwickelte Trennsystem (HPLC-System B) eignete sich bei einer Detektionswellenlänge von 450 nm auch für die Bestimmung der Carotine Lycopin, α -Carotin und β -Carotin.

In Abbildung 3.9 ist die Trennung des Lycopin und des β -Carotin nach Chromatographie eines Extraktes der Lycopinkarotte dargestellt.

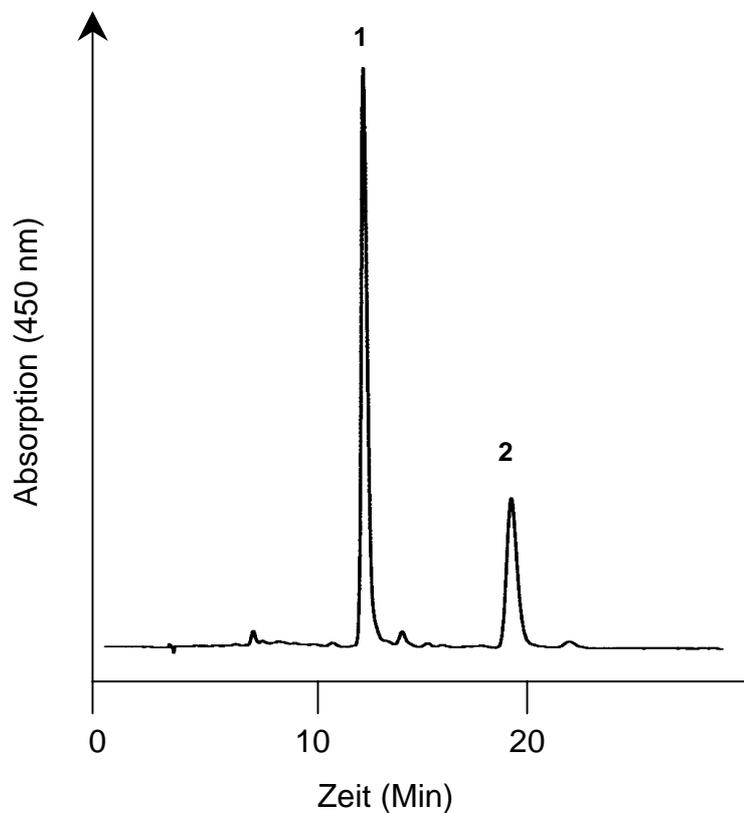


Abb. 3.9: HPLC-Chromatogramm des Extraktes der Lycopinkarotte; $\lambda = 450 \text{ nm}$, $T = 20 \text{ }^\circ\text{C}$; Lycopin (1) mit $t_r = 12,6 \text{ Min}$ und β -Carotin (2) mit $t_r = 19,6 \text{ Min}$ lassen sich detektieren.

Bei einer Wellenlänge von 450 nm wurden die Hauptcarotinoide Lycopin bei einer Retentionszeit von 12,6 Min und β -Carotin bei einer Retentionszeit von 19,6 Min detektiert. Andere Carotinoide wurden nicht nachgewiesen. Die Analysenzeit betrug 25 Min.

Es wurde weiterhin überprüft, ob diese Methode auch für andere carotinreiche Lebensmittel anzuwenden ist. Eine Probe einer karottenhaltigen Baby-Nahrung mit Kartoffeln wurde dazu gleichermaßen extrahiert und mit HPLC-System B chromatographiert (Abb. 3.10).

Lycopin wurde nicht detektiert. β -Carotin sowie α -Carotin ließen sich bei einer Retentionszeit von 19,5 Min und 18,0 Min nachweisen.

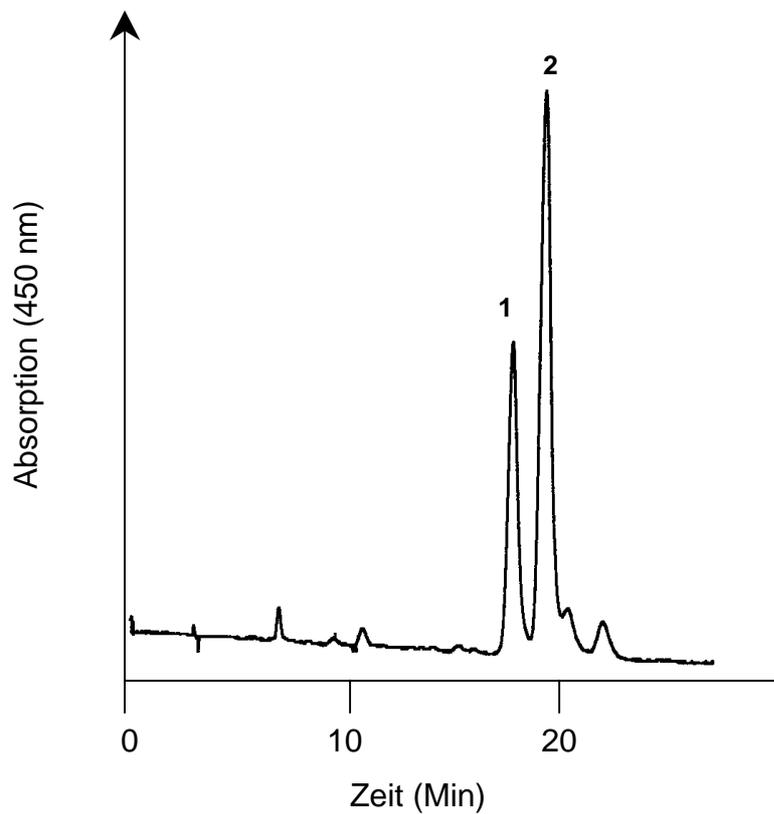


Abb. 3.10: HPLC-Chromatogramm des Extraktes der karottenhaltigen Baby-Nahrung; $\lambda = 450 \text{ nm}$, $T = 20 \text{ }^\circ\text{C}$; α -Carotin (1) mit $t_r = 18,0 \text{ Min}$ und β -Carotin (2) mit $t_r = 19,5 \text{ Min}$ wurden bestimmt.

Hinsichtlich der Quantifizierung der Carotine bei 450 nm wurden die gleichen Kriterien verwendet wie bei Gärtner (1997) beschrieben. Es wurden Kalibrierfunktionen mit einem Korrelationskoeffizient von mindestens $r = 0,999$ verwendet.

3.2 Interventionsstudie

3.2.1 Studiendesign

In mehreren Interventionsstudien ist bereits gezeigt worden, dass eine erhöhte Aufnahme von Carotinoiden – insbesondere von β -Carotin und Lycopin – einen Schutz vor dem UV-induzierten Erythem vermittelt. Der Verzehr von Tomatenpaste als Quelle für Lycopin hatte so die Bildung eines Erythems nach Bestrahlung mit einem Solarsimulator signifikant vermindert. Es sollte nun untersucht werden, ob die tägliche Zufuhr verschiedener Lycopinquellen wie ein synthetisches Lycopinpräparat (Kapselsupplement), ein Tomatenextrakt auf einer Oleoresin-Basis (Kapselsupplement, Lyc-o-Mato[®]), ein Tomatenextrakt in einer wässrig dispergierten Form (Getränk, Lyc-o-Guard[®]) und ein Saft hergestellt aus einer Karotte, die neben β -Carotin auch Lycopin enthielt (Lycopinkarotte), einen vergleichbaren UV- protektiven Effekt bewirkt. Dazu sollten die Carotinoidgehalte in der Haut und die Carotinoidgehalte im Serum während der Studien bestimmt werden. Als Maß für die Schutzwirkung wurde der Rötungswert vor und 24 Stunden nach der Bestrahlung ermittelt. Das Studiendesign ist in Abb. 3.11 wiedergeben.

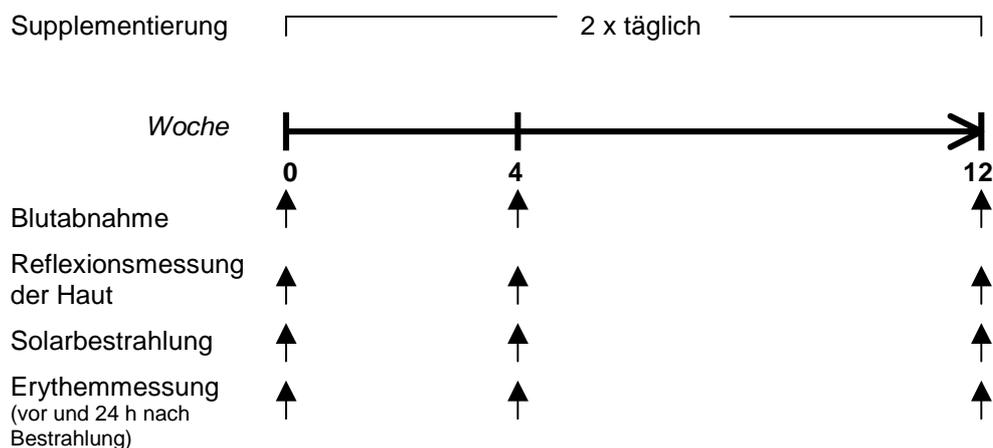


Abb. 3.11: Studiendesign der Interventionsstudie. Während der Studie mit lycopinhaltigen bzw. lycopin- und β -carotinhaltigen Nahrungsergänzungen wurden zu ausgewählten Zeitpunkten Blutabnahmen für die Carotinoideanalytik, Reflexionsmessungen zur Carotinoidebestimmung in der Haut und die Bestrahlungen mit dem Solarsimulator durchgeführt. Die Bestimmung des Erythems erfolgte durch Messung des Rötungswertes vor und 24 h nach der Bestrahlung (Δa -Wert).

Die täglichen Aufnahmemengen der einzelnen Carotinoide in den Studiengruppen sind in Tabelle 3.1 dargestellt. Die Angaben errechnen sich aus den Gehaltsangaben des Herstellers. Die Carotinoidgehalte im Saft der Lycopinkarotte wurden in eigenen Untersuchungen bestimmt (3.1.2).

Tab. 3.1. Tägliche Aufnahmemengen von Carotinoiden in der Interventionsstudie

Carotinoid	Gruppe Lycopin	Gruppe Lyc-o-Mato	Gruppe Lyc-o-Guard	Gruppe Lycopinkarotte #
	(mg/Tag)			
Lycopin	10,2	9,8	8,2	10,0
β-Carotin	—	—	—	5,1
Phytofluen	—	0,8	3,2	0,4
Phytoen	—	1,0	4,6	1,9

eigene Untersuchungen

Die aufgenommenen Mengen Lycopin lagen zwischen 8 und 10 mg pro Tag und sind somit in den verschiedenen Gruppen vergleichbar. Alle natürlichen Quellen für Lycopin (Tomatenextrakt und Lycopinkarotte) enthielten als weitere Carotinoide Phytofluen und Phytoen. Ersteres wurde zwischen 0,4 und 3,2 mg pro Tag aufgenommen und letzteres zwischen 1,0 und 4,6 mg pro Tag. Den höchsten Gehalt an Phytoen und Phytofluen wies dabei das Tomatenextrakt-Getränk Lyc-o-Guard[®] auf. Zusätzliches β-Carotin wurde nur mit dem Saft der Lycopinkarotte in einer Menge von 5,1 mg pro Tag aufgenommen.

3.2.2 Carotinoide im Serum

Die im Serum bestimmten Carotinoidgehalte sind in Tab. 3.2 bis 3.5 zusammengefasst.

In keiner der untersuchten Gruppen veränderten sich die Gehalte der Xanthophylle Lutein, Zeaxanthin und β -Cryptoxanthin im Serum signifikant während der Studie. Die Gehalte waren zwischen den Gruppen vergleichbar für *Lutein* von $0,11 \pm 0,06 \mu\text{M}$ bis $0,18 \pm 0,05 \mu\text{M}$, für *Zeaxanthin* von $0,02 \pm 0,01$ bis $0,06 \pm 0,02 \mu\text{M}$ und für *β -Cryptoxanthin* von $0,16 \pm 0,11 \mu\text{M}$ bis $0,21 \pm 0,17 \mu\text{M}$.

α -Carotin im Serum war während der Studie nahezu konstant in der Gruppe Lycopin und der Gruppe Lyc-o-Guard von $0,10 \pm 0,05 \mu\text{M}$ bis $0,15 \pm 0,08 \mu\text{M}$. Ein nicht signifikanter Anstieg wurde in der Gruppe Tomaten Oleoresin von $0,17 \pm 0,13 \mu\text{M}$ zu Beginn der Studie bis $0,29 \pm 0,47 \mu\text{M}$ nach Woche 12 festgestellt. Eine leichte, aber statistisch signifikant Zunahme von $0,06 \pm 0,05 \mu\text{M}$ (Woche 0) auf $0,11 \pm 0,05 \mu\text{M}$ konnte hingegen für die Gruppe Lycopinkarotte beobachtet werden ($P < 0,05$).

β -Carotin im Serum nahm in der Gruppe Lycopin von $0,39 \pm 0,20 \mu\text{M}$ auf $0,29 \pm 0,22 \mu\text{M}$ nach Woche 12 ab ($P < 0,05$). Eine nicht signifikante Zunahme wurde in der Gruppe Lyc-o-Mato von $0,44 \pm 0,29$ auf $0,72 \pm 0,89 \mu\text{M}$ nach 12 Wochen beobachtet. Hingegen ist die Zunahme in der Gruppe Lyc-o-Guard von $0,30 \pm 0,13 \mu\text{M}$ auf $0,45 \pm 0,16$ nach 12 Wochen statistisch signifikant ($P < 0,05$). Ebenfalls signifikant war der Anstieg in der Gruppe Lycopinkarotte; hier nahm der Gehalt von $0,20 \pm 0,13 \mu\text{M}$ auf $0,34 \pm 0,19 \mu\text{M}$ zu ($P < 0,001$).

Keine statistisch signifikanten Unterschiede wurden zwischen den *Lycopingehalten* im Serum der einzelnen Gruppen zu Beginn der Studie festgestellt. Es wurde ein mittlerer Lycopingehalt mit $0,32 \pm 0,17 \mu\text{M}$ berechnet. Lycopin zeigte in allen Gruppen schon nach 4 Wochen eine signifikante Zunahme gegenüber Woche 0 und eine im Mittel etwa 2-fache Steigerung des Basiswertes nach 12 Wochen. Statistisch signifikant ist die Zunahme in jeder Gruppe.

In der Gruppe Lycopin ließ sich eine 2,2-fache Zunahme von $0,28 \pm 0,15 \mu\text{M}$ auf $0,62 \pm 0,17 \mu\text{M}$ beobachten ($P < 0,001$). In der Gruppe Lyc-o-Mato nahm der Lycopingehalt von $0,28 \pm 0,13 \mu\text{M}$ auf $0,55 \pm 0,19 \mu\text{M}$ um das 2-fache und in der Gruppe Lyc-o-Guard von $0,37 \pm 0,0,17 \mu\text{M}$ auf $0,88 \pm 0,26 \mu\text{M}$ um das 2,4-fache zu

($P < 0,002$). Gesteigert wurde der Lycopingehalt in der Gruppe Lycopinkarotte um das 1,6-fache von $0,36 \pm 0,23 \mu\text{M}$ auf $0,58 \pm 0,25 \mu\text{M}$ ($P < 0,05$). Die nach 12 Wochen Supplementierung erhaltenen Lycopingehalte im Serum unterschieden sich nicht signifikant zwischen den Gruppen. Ausnahme war die Gruppe Lyc-o-Guard. Hier wurde mit $0,88 \mu\text{M}$ ein höherer Gehalt an Lycopin als in den anderen Gruppen gefunden ($P < 0,05$).

Der *Phytofluengehalt* im Serum lag im Vergleich aller Studiengruppen zu Beginn zwischen $0,23 \pm 0,11$ und $0,44 \pm 0,18 \mu\text{M}$ mit einem Mittelwert von $0,32 \pm 0,16 \mu\text{M}$ ($n = 35$). In der Gruppe Lycopin war kein Anstieg während der Studiendauer zu beobachten. In allen anderen Gruppen nahm der Phytofluengehalt schon ab der Woche 4 signifikant zu. Bezogen auf die Woche 0 wurden in der Gruppe Lyc-o-Mato eine 2,1-fache Steigerung von $0,44 \pm 0,18 \mu\text{M}$ auf $0,94 \pm 0,52$ nach Woche 12 beobachtet ($P < 0,02$), in der Gruppe Lyc-o-Guard eine 3,2-fache Steigerung von $0,27 \pm 0,16 \mu\text{M}$ auf $0,87 \pm 0,39 \mu\text{M}$ ($P < 0,001$) und in der Gruppe Lycopinkarotte eine Steigerung um das 3,8-fache von $0,23 \pm 0,11 \mu\text{M}$ auf $0,87 \pm 0,53 \mu\text{M}$ ($P < 0,05$). Der Vergleich der Phytofluengehalte in den einzelnen Gruppen untereinander verdeutlicht, dass sich die Serumkonzentrationen in den Gruppen nach 12 Wochen Supplementierung statistisch signifikant nur im Vergleich zur Gruppe Lycopin unterscheiden (Gruppe Lyc-o-Mato mit $P < 0,01$, Gruppe Lyc-o-Guard mit $P < 0,05$ und Gruppe Lycopinkarotte mit $P < 0,05$).

Die *Phytoengehalte* im Serum waren zu Beginn der Studie niedriger als die Phytofluenwerte und betragen im Mittel $0,08 \pm 0,04 \mu\text{M}$ ($n = 26$). Eine signifikante Zunahme des Phytoengehaltes während der Studie konnte nur in 2 Gruppen beobachtet werden. In der Gruppe Lyc-o-Mato stieg der Gehalt um das 1,8-fache von $0,08 \pm 0,03 \mu\text{M}$ auf $0,14 \pm 0,10 \mu\text{M}$ nach 12 Wochen an ($P < 0,05$). Eine 2,3-fache Steigerung wurde in der Gruppe Lyc-o-Guard von $0,08 \pm 0,06 \mu\text{M}$ auf $0,18 \pm 0,11$ festgestellt ($P < 0,02$). In der Gruppe Lycopinkarotte nahm der Gehalt statistisch nicht signifikant von $0,05 \pm 0,01 \mu\text{M}$ auf $0,17 \pm 0,12 \mu\text{M}$ zu. Kein Anstieg wurde in der Gruppe Lycopin beobachtet.

Tab. 3.2: Carotinoidgehalte im Serum der Gruppe Lycopin (n = 12)

	Carotinoidgehalt (µM)		
	Woche		
	0	4	12
Lutein	0,11 ± 0,06	0,13 ± 0,08	0,12 ± 0,04
Zeaxanthin	0,02 ± 0,01	0,04 ± 0,03	0,04 ± 0,02
β-Cryptoxanthin	0,17 ± 0,11	0,21 ± 0,17	0,18 ± 0,17
Lycopin	0,28 ± 0,15	0,61 ± 0,29 *	0,62 ± 0,17 *
α-Carotin	0,10 ± 0,05	0,10 ± 0,06	0,10 ± 0,06
β-Carotin	0,39 ± 0,20	0,31 ± 0,27	0,29 ± 0,22
Phytofluen	0,33 ± 0,15	0,32 ± 0,20	0,31 ± 0,15
Phytoen	0,08 ± 0,03	0,07 ± 0,04	0,07 ± 0,03

* signifikant unterschiedlich zur Woche 0; $P < 0,001$

Tab. 3.3: Carotinoidgehalte im Serum der Gruppe Lyc-o-Mato (n = 12)

	Carotinoidgehalt (µM)		
	Woche		
	0	4	12
Lutein	0,17 ± 0,05	0,14 ± 0,08	0,14 ± 0,04
Zeaxanthin	0,05 ± 0,02	0,04 ± 0,02	0,05 ± 0,02
β-Cryptoxanthin	0,20 ± 0,13	0,23 ± 0,13	0,17 ± 0,10
Lycopin	0,28 ± 0,13	0,55 ± 0,19 ****	0,55 ± 0,19 ****
α-Carotin	0,17 ± 0,13	0,14 ± 0,11	0,29 ± 0,47
β-Carotin	0,44 ± 0,29	0,49 ± 0,54	0,72 ± 0,89
Phytofluen	0,44 ± 0,18	0,73 ± 0,25 **	0,94 ± 0,52 **
Phytoen	0,08 ± 0,03	0,14 ± 0,06 ***	0,14 ± 0,10 *

* signifikant unterschiedlich zur Woche 0; $P > 0,05$

** signifikant unterschiedlich zur Woche 0; $P < 0,02$

*** signifikant unterschiedlich zur Woche 0; $P < 0,005$

**** signifikant unterschiedlich zur Woche 0; $P < 0,001$

Tab. 3.4: Carotinoidgehalte im Serum der Gruppe Lyc-o-Guard (n = 12)

	Carotinoidgehalt (µM)		
	Woche		
	0	4	12
Lutein	0,14 ± 0,06	0,14 ± 0,08	0,13 ± 0,07
Zeaxanthin	0,05 ± 0,03	0,05 ± 0,02	0,04 ± 0,01
β-Cryptoxanthin	0,20 ± 0,13	0,16 ± 0,11	0,17 ± 0,11
Lycopin	0,37 ± 0,17	0,84 ± 0,26 ***	0,88 ± 0,26 ****
α-Carotin	0,10 ± 0,05	0,15 ± 0,08	0,14 ± 0,07
β-Carotin	0,30 ± 0,13	0,41 ± 0,17 **	0,45 ± 0,16 *
Phytofluen	0,27 ± 0,16	0,93 ± 0,34 ***	0,87 ± 0,39 ****
Phytoen	0,08 ± 0,06	0,19 ± 0,07 *	0,18 ± 0,11*

* signifikant unterschiedlich zur Woche 0; $P < 0,02$
 ** signifikant unterschiedlich zur Woche 0; $P < 0,005$
 *** signifikant unterschiedlich zur Woche 0; $P < 0,002$
 **** signifikant unterschiedlich zur Woche 0; $P < 0,001$

Tab. 3.5: Carotinoidgehalte im Serum der Gruppe Lycopinkarotte (n = 10)

	Carotinoidgehalt (µM)		
	Woche		
	0	4	12
Lutein	0,18 ± 0,05	0,17 ± 0,05	0,17 ± 0,04
Zeaxanthin	0,06 ± 0,02	0,06 ± 0,03	0,06 ± 0,02
β-Cryptoxanthin	0,19 ± 0,08	0,19 ± 0,09	0,16 ± 0,06
Lycopin	0,36 ± 0,23	0,58 ± 0,17 **	0,58 ± 0,25 **
α-Carotin	0,06 ± 0,05	0,09 ± 0,03	0,11 ± 0,05
β-Carotin	0,20 ± 0,13	0,38 ± 0,19 ***	0,34 ± 0,19
Phytofluen	0,23 ± 0,11	1,01 ± 0,56 *	0,87 ± 0,53 *
Phytoen	0,05 ± 0,01	0,27 ± 0,18	0,17 ± 0,12

* signifikant unterschiedlich zur Woche 0; $P < 0,05$
 ** signifikant unterschiedlich zur Woche 0; $P < 0,005$
 *** signifikant unterschiedlich zur Woche 0; $P < 0,001$

3.2.3 Bestimmung des Carotinoidgehaltes in der Haut

Es konnte gezeigt werden, dass sich unter Supplementierung mit synthetischem Lycopin, Tomatenextrakten in Form eines Oleoresins oder eines Getränkes oder mit dem Saft der Lycopinkarotte der Lycopingehalt im Serum der Probanden ab der 4. Woche der Studie signifikant erhöhte. Mittels der Reflektionsspektroskopie konnte die Zunahme der Carotinoidgehalte in dem Zielgewebe Haut während der Studiendauer untersucht werden.

Die Gesamtcarotinoidgehalte der Haut wurden zu Beginn der Studie, nach 4 Wochen und 12 Wochen Supplementierung gemessen und sind in Tabelle 3.6 zusammengefasst.

Tab. 3.6: Gesamtcarotinoidgehalte der Haut während der Supplementierung

	Carotinoidgehalt (nmol/g)		
	0	Woche 4	12
Gruppe Lycopin	0,18 ± 0,03	0,23 ± 0,06 *	0,23 ± 0,06 *
Gruppe Lyc-o-Mato	0,16 ± 0,08	0,18 ± 0,06	0,22 ± 0,04 *
Gruppe Lyc-o-Guard	0,16 ± 0,06	0,20 ± 0,05	0,21 ± 0,06
Gruppe Lycopinkarotte	0,16 ± 0,06	0,20 ± 0,05	0,21 ± 0,06 **

* signifikant unterschiedlich zur Woche 0; $P < 0,005$

** signifikant unterschiedlich zur Woche 0; $P < 0,002$

Zu Beginn der Studie wies die Haut der Probanden in allen Gruppen einen mittleren Carotinoidgehalt von $0,16 \pm 0,06$ nmol/g auf, der sich im Mittel auf $0,22$ nmol/g nach 12 Wochen Supplementierung erhöhte. Innerhalb der Gruppe Lyc-o-Mato war der Anstieg nach 12 Wochen statistisch nicht signifikant.

3.2.4 Induktion und Messung des Erythems

Eine UV-Bestrahlung der Haut führt ab einer Schwellendosis zu einem Erythem, die für jeden Probanden individuell verschieden ist und als minimale Erythemdosis (MED) bezeichnet wird. Vor Beginn der Studie wurde für jeden Studienteilnehmer die MED bestimmt. Während der Studie wurde das Erythem anschließend durch die 1,25-fache MED induziert. Die individuelle Dosis wurde auch nach 4 und 12 Wochen beibehalten und das Ausmaß der Rötung gemessen. Die zur Erytheminduktion benötigten Dosen lagen zwischen 16 und 26 mJ/cm² mit einer gemittelten Dosis von etwa 20 mJ/cm². Die Differenz des chromatometrisch festgestellten Rötungswertes vor und 24 Stunden nach der Bestrahlung ergab den Δa -Wert als Indikator für das Ausmaß des Erythems.

Die für die einzelnen Studiengruppen bestimmten Δa -Werte sind in Tabelle 3.7 aufgeführt. Der Δa -Wert vor Beginn der Studie ist für alle Gruppen mit einem Wert von etwa 5 ähnlich; ausgenommen in der Gruppe Lycopin mit einem Wert von 3,5. Innerhalb jeder Gruppe zeigte sich eine Abnahme der Δa -Werte in Woche 4 und 12 und weist somit auf einen UV-Schutz hin. Für die Gruppe Lycopin sank der Δa -Wert statistisch nicht signifikant von $3,5 \pm 1,7$ auf $2,5 \pm 2,7$ nach 12 Wochen. Statistisch signifikant war die Abnahme in der Gruppe Lyc-o-Mato von $5,2 \pm 0,8$ auf $3,2 \pm 1,4$ ($P < 0,001$), in der Gruppe Lyc-o-Guard von $4,9 \pm 1,6$ ($P < 0,001$) auf $2,4 \pm 1,7$ und in der Gruppe Lycopinkarotte von $5,0 \pm 1,8$ auf $2,7 \pm 1,7$ ($P < 0,005$). Dies entsprach einer Erythemminderung zwischen 29 und 46 % (Tab. 3.8).

Tabelle 3.7 gibt die Δa -Werte während der Supplementierung über 12 Wochen in den Gruppen bezogen auf die Woche 0 (100 %) wieder.

Tab. 3.7: Chromatometrisch ermittelte a -Werte der Haut (Rücken) in der Interventionsstudie nach Supplementierung über 12 Wochen.

a- Wert	Woche		
	0	4	12
Gruppe Lycopin			
vor Bestrahlung	8,2 ± 1,7	8,2 ± 1,7	8,1 ± 2,0
24 h nach Bestrahlung	11,7 ± 2,0	11,4 ± 1,6	10,7 ± 1,6
Δa	3,5 ± 1,7	3,2 ± 2,0	2,5 ± 2,3
Gruppe Lyc-o-Mato			
vor Bestrahlung	7,1 ± 2,1	7,2 ± 2,1	6,8 ± 2,2
24 h nach Bestrahlung	12,3 ± 2,6	11,3 ± 2,1	10,0 ± 2,6
Δa	5,2 ± 0,8	4,1 ± 1,7 **	3,2 ± 1,4 ***
Gruppe Lyc-o-Guard			
vor Bestrahlung	6,9 ± 1,9	6,7 ± 1,7	6,9 ± 1,6
24 h nach Bestrahlung	11,9 ± 1,6	11,1 ± 2,3	9,5 ± 2,1
Δa	4,9 ± 1,6	4,4 ± 2,7	2,4 ± 1,7 ***
Gruppe Lycopinkarotte			
vor Bestrahlung	8,5 ± 1,3	8,8 ± 1,6	9,0 ± 1,2
24 h nach Bestrahlung	13,5 ± 1,2	12,4 ± 1,3	11,7 ± 1,6
Δa	5,0 ± 1,8	3,6 ± 2,3	2,7 ± 1,7 *

* signifikant unterschiedlich zur Woche 0; $P < 0,01$

** signifikant unterschiedlich zur Woche 0; $P < 0,001$

*** signifikant unterschiedlich zur Woche 0; $P < 0,005$

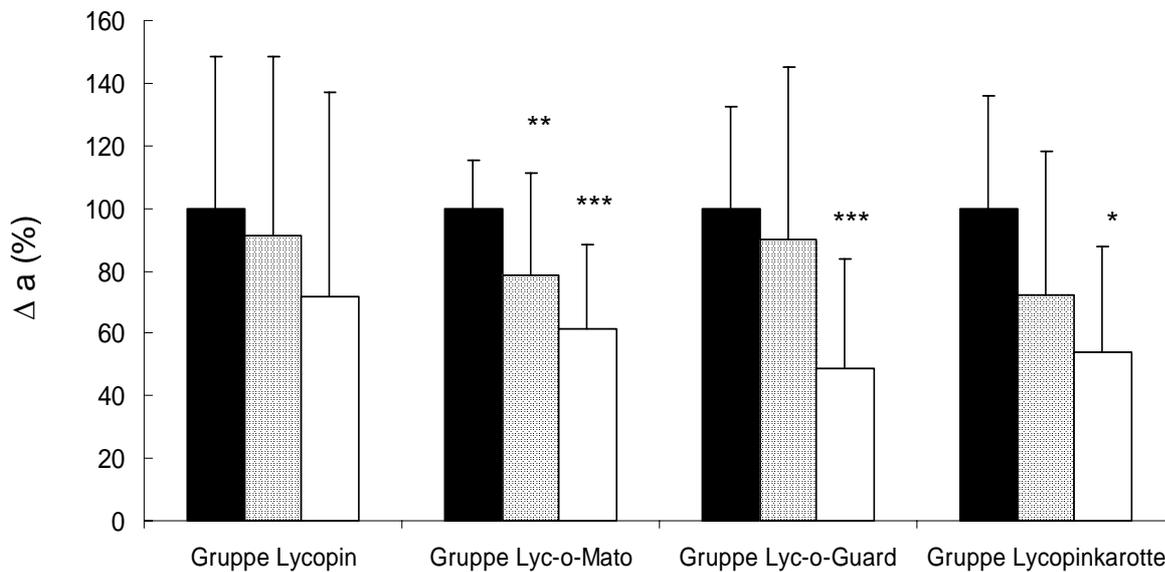


Abb. 3.12: Erythemmminderung nach Supplementierung über 12 Wochen in den einzelnen Gruppen. Dargestellt ist die Abnahme der Δa -Werte in (%) bezogen auf den Δa -Wert in Woche 0 (100%). Schwarze Balken: Woche 0, graue Balken: Woche 4, offene Balken: Woche 12; * signifikant unterschiedlich zur Woche 0 ($P < 0,01$), ** signifikant unterschiedlich zur Woche 0 ($P < 0,005$), *** signifikant unterschiedlich zur Woche 0 ($P < 0,001$).

Die Erythemmminderung nach 12 Wochen Supplementierung lässt sich ausgehend von den dargestellten Abnahmen der Δa -Werte in Abb. 3.12 für die einzelnen Gruppen in Tab. 3.8 zusammenfassen.

Tab. 3.8: Erythemmminderung (%) in der Interventionsstudie nach 12 Wochen bezogen auf Woche 0 (100%).

Erythemmminderung (%)	
Gruppe Lycopin	29
Gruppe Lyc-o-Mato	38
Gruppe Lyc-o-Guard	51
Gruppe Lycopinkarotte	46

3.3 Carotinoidgehalt eines Lycopinkarotten-Safts und anderer lycopin- und β -carotinreicher Lebensmitteln

Aus den Carotinoidgehalten der in der Studie verwendeten Supplemente und des Lycopinkarotten-Saftes wurden die täglichen Carotinoiddosen errechnet. Dabei wurden für die Supplemente die Angaben des Herstellers verwendet. Nur für die Lycop-Mato[®] Kapseln und für den Lycopinkarotten-Saft war eine Bestimmung der Carotinoide möglich. Die dabei ermittelten Gehalte entsprachen den Herstellerangaben (Tab. 3.1).

Die Datenlage für die Gehaltsangaben von Carotinoiden in Lebensmitteln ist bislang auf die bekannten physiologisch relevanten Carotinoide Lutein, Zeaxanthin, β -Cryptoxanthin, Lycopin, α - und β -Carotin beschränkt. Im Zusammenhang mit den hier erhobenen Daten zur Bioverfügbarkeit von Phytoen und Phytofluen (s. 3.1.2) stellte sich die Frage, ob auch andere kommerziell erhältliche Lebensmittel, die reich an Lycopin und β -Carotin sind, physiologisch relevante Mengen an diesen Carotinen besitzen. Daher wurden ein herkömmlicher Tomaten-Saft (Pulpe), ein Tomatenkonzentrat (Tomatenmark) und eine Baby-Nahrung aus Karotten und Kartoffeln als Vertreter eines diätetischen Lebensmittels auf ihren Carotinoidgehalt untersucht.

Für jedes dieser Lebensmittel sind die Carotinoidgehalte in den Tabellen 3.9 und 3.10 angegeben.

Der Gehalt an Carotinoiden im Saft der Lycopinkarotte änderte sich während der Lagerung nicht, so dass der Saft für mindestens 12 Wochen im ungeöffneten, kühlen und lichtgeschützten Zustand als haltbares Lebensmittel anzusehen war.

Lycopin wies im Saft der Lycopinkarotte den höchsten Gehalt auf. Bezieht man die übrigen Gehalte prozentual auf Lycopin (100 %), so betrug der Anteil an β -Carotin 50,0 %, Phytoen 16,4 % und an Phytofluen 3,5 % (Tab. 3.9).

Tab. 3.9: Carotinoidgehalt des Lycopinkarotten-Saftes vor Beginn der Studie und nach 12 Wochen Lagerung (n = 3)

	Carotinoidgehalt (mg/l)	
	vor der Studie	nach der Studie
Lycopin	25,6 ± 4,3	24,6 ± 2,3
β-Carotin	12,8 ± 2,7	12,9 ± 0,4
α-Carotin	n.d.	n.d.
Phytoen	4,2 ± 1,1	4,3 ± 0,8
Phytofluen	0,9 ± 0,4	1,0 ± 0,2

n.d. nicht detektierbar

Ein Vergleich mit anderen Lebensmitteln zeigte, dass Lycopin in den Tomatenprodukten das dominierende Carotinoid ist (Tab. 3.10). Auch die Gehalte an Phytoen, Phytofluen und β-Carotin sind hoch. Die prozentualen Anteile bezogen auf Lycopin (100 %) ließen sich für den Tomaten-Saft berechnen zu: Phytoen 10,8 %, Phytofluen 6,8 % und β-Carotin 2,7 %. Vergleichbare Anteile wurden für das Tomatenkonzentrat bestimmt mit: Phytoen 11,1 %, Phytofluen 6,5 % und β-Carotin 2,4 %. α-Carotin wurde nicht detektiert.

In der Baby-Nahrung, die nur Karotten als Carotinoidquelle aufwies, stellte β-Carotin das Hauptcarotinoid dar. Lycopin wurde nicht nachgewiesen. Einen sehr hohen Anteil machte das α-Carotin mit 43 % des Hauptcarotinoids aus. Die relativen Anteile an Phytoen und Phytofluen betragen 10,8 % und 4,6 %.

Tab. 3.10: Carotinoidgehalt eines herkömmlichen, kommerziellen Tomaten-Saftes, eines Tomatenkonzentrats und einer Baby-Nahrung aus Kartoffeln und Karotten ($n = 3$)

	Carotinoidgehalt (mg/kg)		
	Tomaten-Saft #	Tomatenkonzentrat	Baby-Nahrung
Lycopin	74,0 ± 4,5	404,2 ± 24,1	n.d.
β-Carotin	1,9 ± 0,4	9,8 ± 2,0	92,7 ± 9,0
α-Carotin	n.d.	n.d.	39,9 ± 3,3
Phytoen	8,6 ± 2,1	45,1 ± 4,2	10,3 ± 1,0
Phytofluen	5,0 ± 0,1	26,3 ± 0,7	4,3 ± 0,9

in (mg/l)

n.d. nicht detektierbar

3.4 Zellkultur

Die Ergebnisse der Interventionsstudie zeigten, dass die Gabe von Lycopin mit einem Anstieg des Carotinoids im Blut verbunden ist und damit eine Minderung des UV-induzierten Erythems korreliert ist. Dieser protektive Effekt wurde auch nach Gabe von Gemischen beobachtet, die aus Lycopin, Phytoen, Phytofluen und β -Carotin in verschiedenen Formulierungen bestanden.

Mit Hilfe eines Hautzellenmodells sollte untersucht werden, inwieweit die photoprotektiven Effekte in Fibroblasten- und Keratinozytenkulturen mit den Einzelsubstanzen Lycopin, Phytoen und Phytofluen *in vitro* nachvollzogen werden können.

Die in der Interventionsstudie beobachtete Erythembildung in der Haut 24 Stunden nach der Bestrahlung stellt eine Reaktion auf UV B- aber auch auf UV A-induzierten Stress des Zellgewebes dar.

Hautfibroblasten reagieren als Bindegewebszellen auf UV A-induzierten Stress über komplexe Signalwege mit einer gesteigerten Expression des Enzyms Kollagenase (MMP-1), welche extrazelluläres Kollagen abbaut und so *in vivo* schließlich zur lichtinduzierten Hautalterung beiträgt.

Immunkompetente Keratinozyten geben nach UV-Stimulation Zytokine wie das Interleukin-6 (IL-6) extrazellulär ab.

Der Einfluß von Lycopin, Phytoen und Phytofluen auf die beschriebenen UV-induzierten Reaktionen sollte in den genannten Zellkulturen überprüft werden.

3.4.1 *MMP-1- Expression in Fibroblasten nach UV-Bestrahlung*

Konfluente Fibroblastenkulturen wurden mit UV A (30 J/cm^2) bestrahlt und die Menge an MMP-1 nach 24 Stunden im Zellüberstand mittels ELISA gemessen. Die Zellen wurden zuvor mit den Carotinoiden im Konzentrationsbereich von $0,03 - 5,0 \mu\text{M}$ (Endkonzentration im Medium) für 16, 24 und 48 Stunden prä-inkubiert.

3.4.1.1 Inkubation mit Lycopin

Fibroblasten wurden mit Lycopin für 16, 24 und 48 Stunden inkubiert. Unbehandelte und unbestrahlte Fibroblastenkulturen dienten als Negativkontrolle, während unbehandelte und bestrahlte Kulturen als Positivkontrolle verwendet wurden. Die gebildeten Mengen an MMP-1 24 Stunden nach der Bestrahlung sind in Tabelle 3.11 aufgeführt. Die Angaben sind in (%) ausgedrückt und auf die Negativkontrolle (100 %, n = 39) bezogen.

Tab. 3.11: MMP-1-Bildung in Fibroblasten nach 16, 24 und 48 h Prä-Inkubation mit Lycopin mit und ohne UV A –Bestrahlung. Für die Negativkontrolle wurden n = 39 und für die übrigen Untersuchungen n = 3-12 Experimente durchgeführt.

	MMP-1-Bildung (% der Negativkontrolle)		
	16 h	24 h	48 h
Negativkontrolle (unbehandelt, unbestrahlt)	100,0 ± 17,9	100,0 ± 29,8	100,0 ± 33,2
Positivkontrolle (unbehandelt, bestrahlt mit UV A)	266,4 ± 27,3	579,9 ± 50,3	700,0 ± 45,1
0,1 µM	146,5 ± 17,9	n.b.	n.b.
5,0 µM	144,2 ± 17,1	n.b.	n.b.
0,03 µM + UV A	n.b.	536,1 ± 75,7	734,3 ± 131,7
0,1 µM + UV A	416,6 ± 34,3	486,7 ± 214,5	512,2 ± 80,5
5,0 µM + UV A	405,5 ± 86,7	467,1 ± 39,2	242,5 ± 23,3

n.b. nicht bestimmt

In den hier verwendeten Hautfibroblasten wurde durch die Bestrahlung mit UV A (30 J/cm²) die MMP-1- Synthese im Vergleich zu unbehandelten und unbestrahlten Kulturen stimuliert. In Abhängigkeit der Prä-Inkubationszeit betrug die Stimulation

nach 16 Stunden das 2,7-fache, nach 24 Stunden das 5,8-fache und nach 48 Stunden das 7,0-fache der Kontrolle. Die Supplementierung der Fibroblasten mit Lycopin in einer Konzentration von 0,1 μM und 5,0 μM für 16 Stunden ohne anschließende Bestrahlung führte zu einer leichten Steigerung der MMP-1-Bildung um das 1,5- bzw. 1,4-fache der Kontrolle. Nach Zugabe von 0,1 μM bzw. 5,0 μM Lycopin und anschließender UV A-Bestrahlung ließ sich hingegen eine Steigerung der MMP-1-Expression um das 4,2-fache und um das 4,1-fache feststellen. Die MMP-1-Bildung war demnach in den mit Lycopin prä-inkubierten und UV A-bestrahlten Kulturen höher als in der Positivkontrolle (Abb. 3.13).

In weiteren Ansätzen wurden Fibroblasten für 24 Stunden mit 0,03 μM , 0,1 μM und 5,0 μM Lycopin versetzt und mit UV A bestrahlt. Die MMP-Stimulation bei einer Konzentration von 0,03 μM unterschied sich nicht signifikant von der Positivkontrolle. Eine geringere Stimulation war bei den höheren Konzentrationen von 0,1 und 5,0 μM Lycopin messbar (Abb. 3.14).

Eine deutliche Verminderung der MMP-1-Bildung ließ sich nach einer Prä-Inkubationszeit von 48 Stunden bei Konzentrationen von 0,1 und 5,0 μM Lycopin feststellen. Die Abnahme der Stimulation von dem 7,0-fachen (Positivkontrolle) auf das 5,1- bzw. 2,4-fache der unbehandelten und unbestrahlten Negativkontrolle war statistisch signifikant (Abb. 3.15).

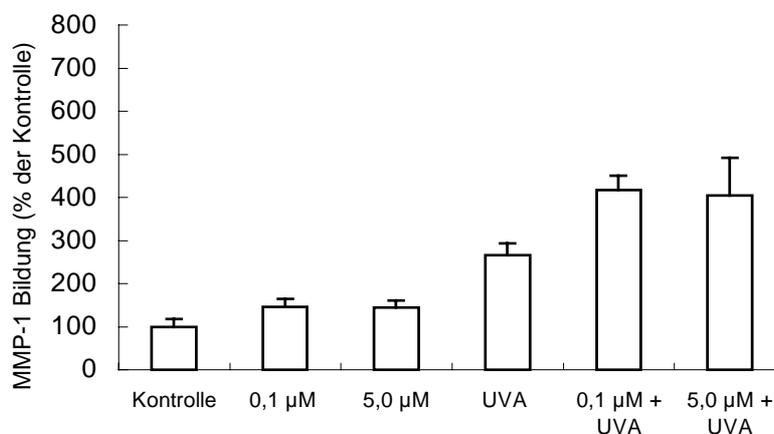


Abb. 3.13: MMP-1-Bildung in Fibroblasten nach 16 h Inkubation mit Lycopin und UV A-Bestrahlung.

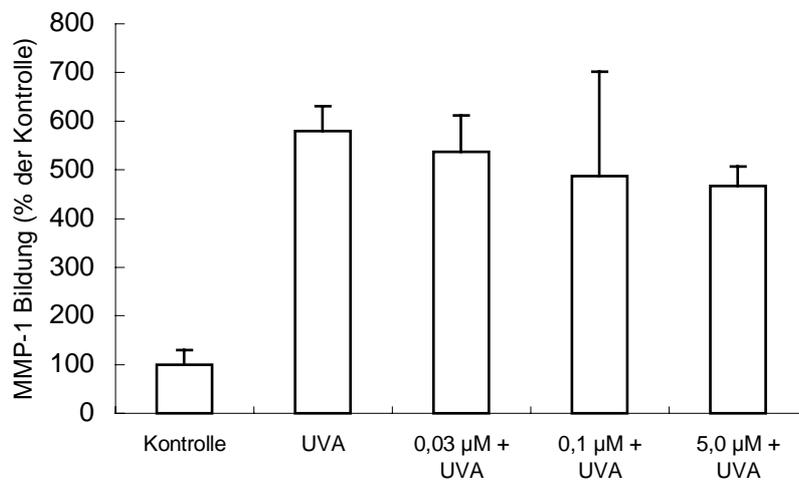


Abb. 3.14: MMP-1-Bildung in Fibroblasten nach 24 h Inkubation mit Lycopodium und UV A-Bestrahlung.

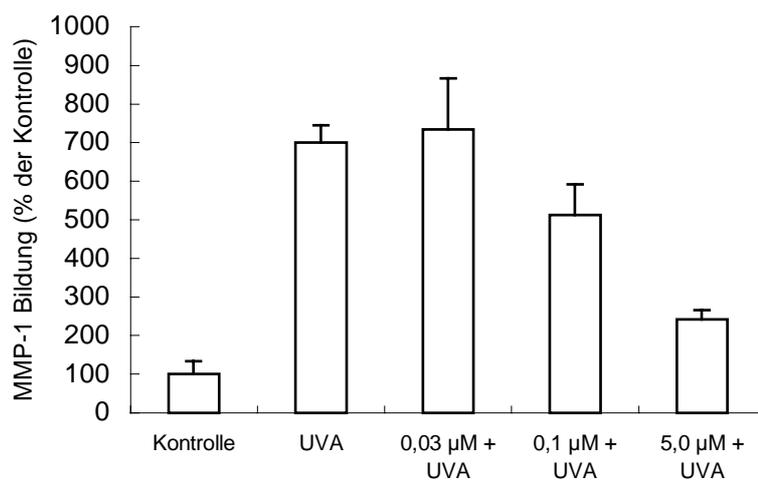


Abb. 3.15: MMP-1-Bildung in Fibroblasten nach 48 h Inkubation mit Lycopodium und UV A-Bestrahlung.

3.4.1.2 Inkubation mit Phytoen/Phytofluen

Fibroblasten wurden mit einem Gemisch aus Phytoen und Phytofluen (Massenverhältnis 10 : 1) für 2,5 und 16 Stunden prä-inkubiert und die Zellen anschließend mit UV A bestrahlt. Phytofluen besitzt ein Absorptionsspektrum mit einem Maximum bei 320 nm, das dem Intensitätsmaximum des hier benutzten UV A-Strahlers bei 316 nm entspricht. Um einen möglichen protektiven Effekt auf die MMP-1-Bildung aufgrund eines UV-Filtereffekts zu untersuchen, wurde eine kurze Prä-Inkubationszeit von 2,5 Stunden gewählt. Mit dieser kurzen Verweilzeit im Zellkulturmedium sollte gewährleistet sein, dass Phytofluen nicht abgebaut wird.

Tabelle 3.12 gibt die Bildung des MMP-1 bezogen auf die Kontrolle (100 %) nach 24 Stunden post Exposition wieder (n = 3). Positivkontrolle sind UV A-bestrahlte Zellen. Eine 1,9-fache und 2,0-fache Steigerung der MMP-1-Bildung wurde nach 2,5 und nach 16 Stunden gegenüber der Negativkontrolle beobachtet. Die Stimulation der Positivkontrolle lag daher bei diesen Untersuchungen niedriger als zuvor beschrieben wurde (s. 3.4.1.1). Nach einer Prä-Inkubationszeit von 2,5 Stunden (Abb. 3.16) wiesen Kulturen, die mit Phytoen/Phytofluen im Konzentrationsbereich von 0,1 µM bis 2,0 µM inkubiert wurden, gegenüber der Positivkontrolle keine gesteigerten MMP-1-Expressionen auf. Kulturen, die nach der Inkubation mit Phytoen/Phytofluen bestrahlt wurden, bildeten die gleiche Menge an MMP-1 wie die Positivkontrolle. Vergleichbare Ergebnisse wurden für Experimente mit Prä-Inkubationszeiten von 16 Stunden erhalten (Abb. 3.17).

Tab. 3.12: MMP-1-Bildung in Fibroblasten nach 2,5 und 16 h Prä-Inkubation mit Phytoen/Phytofluen mit und ohne UV A–Bestrahlung; die Konzentrationsangaben sind auf Phytofluen bezogen.

	MMP-1-Bildung (% der Negativkontrolle)	
	2,5 h	16 h
Negativkontrolle (unbehandelt, unbestrahlt)	100,0 ± 17,2	100,0 ± 7,4
Positivkontrolle (unbehandelt, UV A)	189,0 ± 8,3	195,5 ± 11,4
0,1 µM	130,7 ± 17,2	68,2 ± 6,2
1,0 µM	95,1 ± 10,7	112,4 ± 45,9
2,0 µM	85,5 ± 1,6	131,5 ± 26,1
0,1 µM + UV A	195,0 ± 20,9	196,5
1,0 µM + UV A	181,6 ± 13,2	200,7 ± 27,7
2,0 µM + UV A	189,7 ± 8,1	239,2 ± 65,2

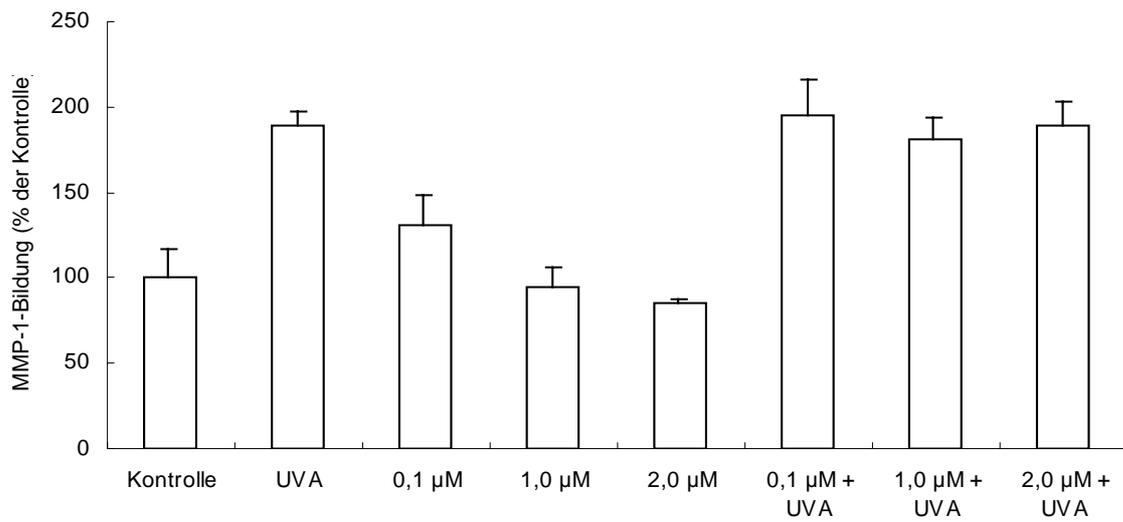


Abb. 3.16: MMP-1-Bildung in Fibroblasten nach 2,5 h Prä-Inkubation mit Phytoen/Phytofluene und UV A-Bestrahlung.

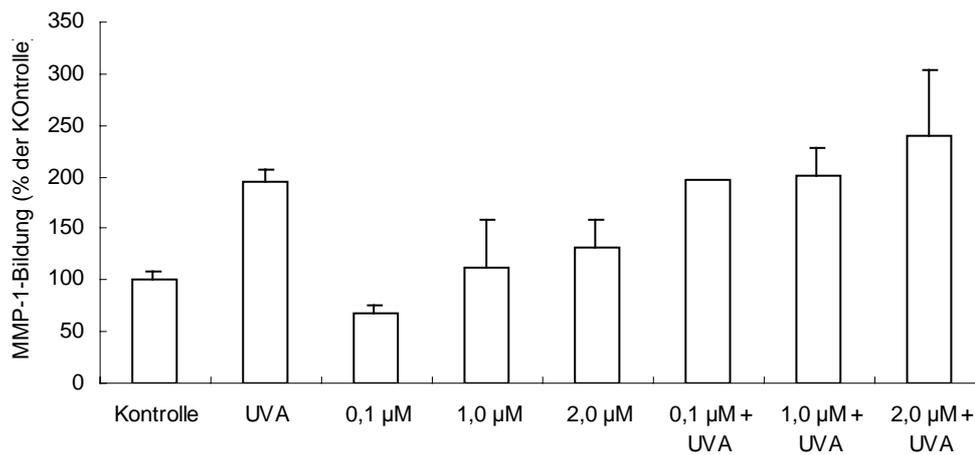


Abb. 3.17: MMP-1-Bildung in Fibroblasten nach 16 h Prä-Inkubation mit Phytoen/Phytofluene und UV A-Bestrahlung.

3.4.2 IL-6 Expression in Keratinozyten nach UV-Bestrahlung

Keratinozyten exprimieren sowohl nach UV B- als auch nach UV A-Exposition das Zytokin IL-6. Zellkulturen wurden mit UV B (30 mJ/cm^2) oder mit UV A (30 J/cm^2) bestrahlt. Der Einfluss von Lycopin und eines Gemischs aus Phytoen und Phytofluen auf die IL-6-Expression nach einer UV-Bestrahlung sollte hier untersucht werden. Im Zellüberstand wurde mittels ELISA der Gehalt an IL-6 ermittelt und vergleichbar mit 3.3.1 auf die unbehandelte und unbestrahlte Kontrolle normiert (100 %).

3.4.2.1 Voruntersuchungen mit HaCaT

In Kulturen der HaCaT-Zelllinie wurde zunächst der Einfluss von Lycopin ($1 \mu\text{M}$) und eines Gemisches aus Phytoen und Phytofluen ($4 \mu\text{M}$ bezogen auf Phytofluen) nach 24 Stunden Prä-Inkubation und anschließender UV A Bestrahlung untersucht. Diese Keratinozyten lassen sich aufgrund ihres schnellen Wachstums einfach kultivieren. Da HaCaT-Zellen sich im Differenzierungsverhalten von regulären Keratinozyten unterscheiden, wurden die Versuche als Voruntersuchungen angesehen.

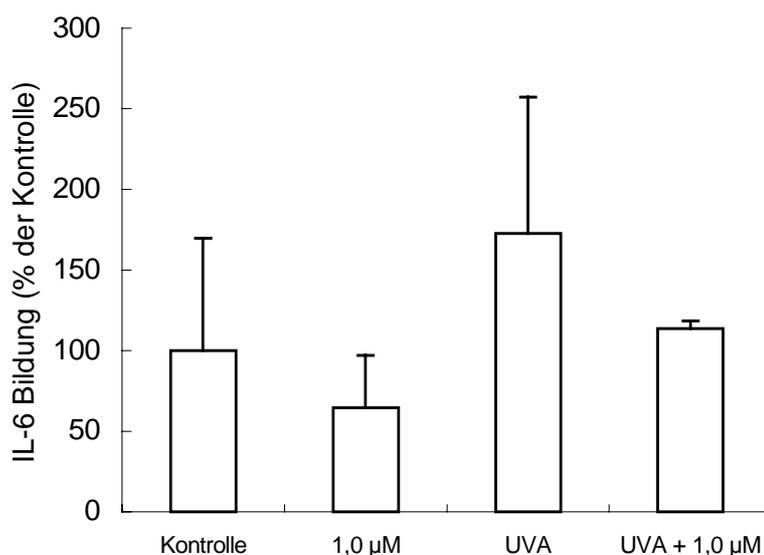


Abb. 3.18: IL-6-Bildung in HaCaT-Zellen nach 24 h Inkubation mit Lycopin und UV A-Bestrahlung ($n = 3$).

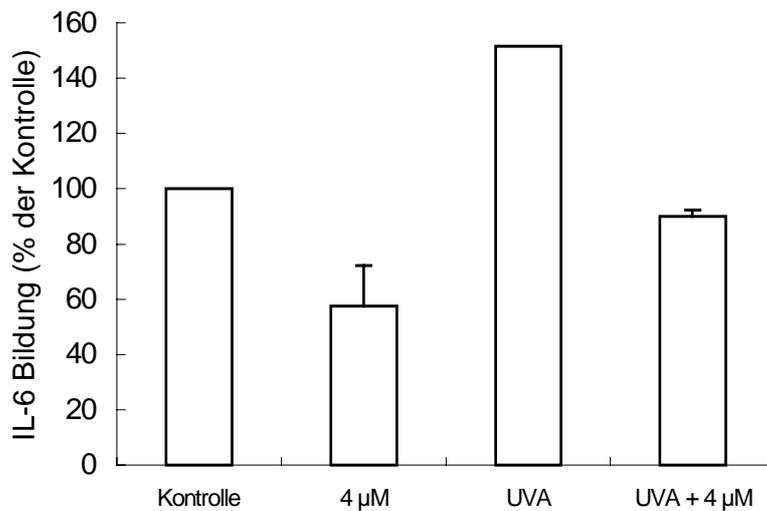


Abb. 3.19: IL-6-Bildung in HaCaT-Zellen nach 24 h Inkubation mit 4 µM Phytofluen und UV A-Bestrahlung (n = 2 - 5).

Die UV A-Bestrahlung in beiden Experimenten führte zu einer 1,7- und 1,5-fachen Erhöhung der IL-6-Produktion im Vergleich zur Negativkontrolle. Die Prä-Inkubation sowohl mit Lycopin (Abb. 3.18) als auch mit Phytoen/Phytofluen (Abb. 3.19) und folgender UV A-Bestrahlung verringerten die IL-6-Stimulation auf das 1,1-fache bzw. auf das 0,9-fache der Negativkontrolle.

In unbestrahlten Kulturen beeinflusste die Inkubation der HaCaT-Zellen mit Lycopin und Phytoen/Phytofluen die IL-6-Bildung statistisch nicht signifikant.

3.4.2.2 Untersuchungen mit Keratinozyten

Keratinozyten wurden mit 0,1 µM und 1,0 µM Lycopin für 24 Stunden prä-inkubiert (n = 3). Der IL-6-Gehalt stieg in der Positivkontrolle nach einer UV B-Bestrahlung von 30 mJ/cm² um das 23-fache. Die Behandlung der Zellen mit 0,1 und 1,0 µM Lycopin bewirkte einen Anstieg des IL-6-Gehaltes um das 81- und 57-fache

der Negativkontrolle. Hingegen zeigte in unbestrahlten Kulturen die Inkubation mit 1,0 μM Lycopin keinen Effekt (Abb. 3.20).

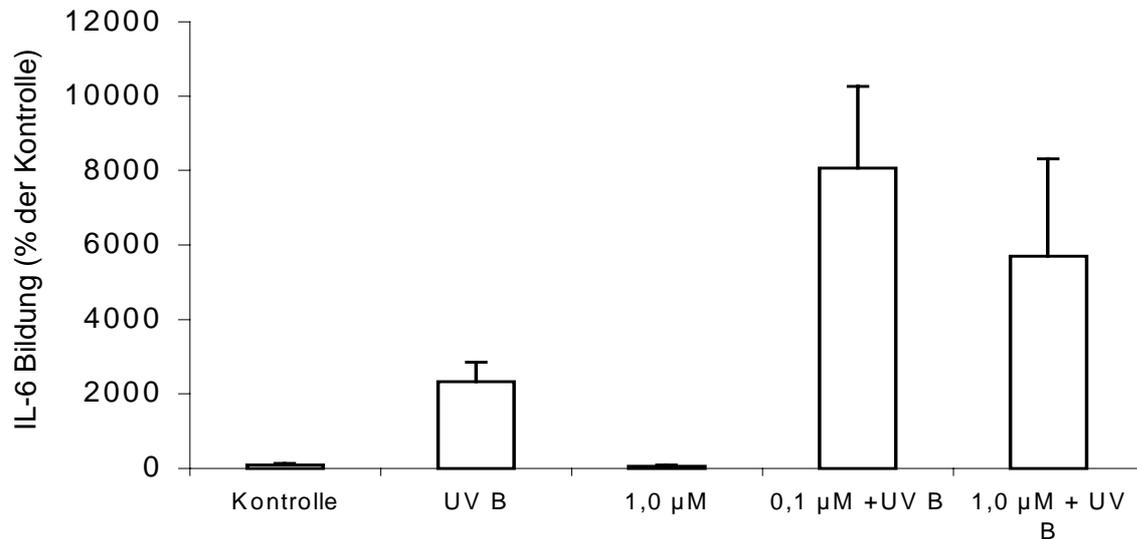


Abb. 3.20: IL-6 Bildung nach Prä-Inkubation mit 0,1 und 1,0 μM Lycopin und UV B-Bestrahlung ($n = 3$).

Die Prä-Inkubationen der Keratinozyten mit einem Gemisch aus Phytoen und Phytofluen (1,0 und 2,0 μM bezogen auf Phytoen) hingegen führte nach einer UV B-Bestrahlung zu einer 10-fachen Erhöhung des IL-6-Bildung im Vergleich zu einem 22-fachen Anstieg der IL-6-Produktion der Positivkontrolle. In unbestrahlten Kulturen beeinflusste Phytoen/Phytofluen (2,0 μM) die IL-6-Expression im Vergleich zur Negativkontrolle nicht (Abb. 3.21).

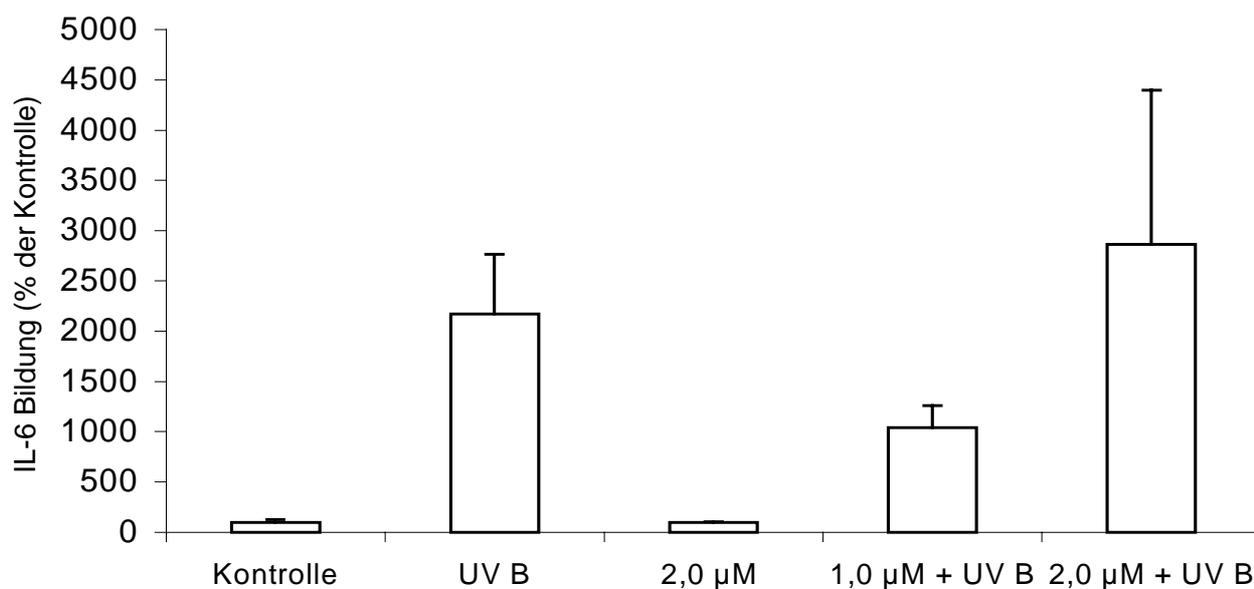


Abb. 3.21: IL-6 Bildung nach Prä-Inkubation mit 1,0 und 2,0 µM Phytoen/Phytofluen und UV-B-Bestrahlung.

3.4.3 Carotinoidgehalte in Fibroblasten und Kulturmedium

Fibroblasten wurden mit Lycopin inkubiert wie in Kapitel 3.4.1 beschrieben. Um die Wiederfindung des Lycopins im Zellkulturmedium und in den Fibroblasten zu bestimmen, wurden Kulturen von Fibroblasten für 24 Stunden mit Lycopin in Konzentrationen von 0,1 – 1,9 μM inkubiert. Sowohl im Zellkulturmedium als auch im Zelllysate war nach 24 Stunden kein Lycopin nachweisbar (HPLC). Die Wiederfindungen sind in Tab. 3.13 aufgeführt.

Zusätzlich wurden Dispersionen von Lycopin in Zellkulturmedium mit Konzentrationen von 0,12 – 11,0 μM hergestellt und anschließend der Gehalt mittels HPLC überprüft. Aus den bestimmten Gehalten wurde die Wiederfindungen von 42 – 67 % berechnet.

Tab. 3.13: Wiederfindungen von Lycopin in Zellkultur

Soll (μM)	Lycopingehalt	
	Ist (μM)	Wiederfindung (%)
Medium		
0,12	0,05	42
1,20	0,92	77
5,30	3,11	59
11,00	7,38	67
Fibroblastenkultur		
Medium, 24 h		
0,1 - 1,9	n.d.	—
Zelllysate, 24 h		
0,1 - 1,9	n.d.	—

n.d. nicht detektierbar

3.5 Unilamellare Liposomen

Carotinoide sind effektive Antioxidantien, die u.a. auch die Lipidperoxidation hemmen. In unilamellaren Liposomen, die als Modellsystem einer Biomembran gelten, sollten die antioxidativen Eigenschaften von Carotinoiden untersucht werden. Die Lipidperoxidation wurde unter physiologischen Bedingungen (pH 7,4 und 37 ° C) durch Zusatz eines wasserlöslichen Radikalstarters 2,2'-Azo-bis-(amidinopropan)-hydrochlorid (AAPH) initiiert. Es wurde ein Meßverfahren etabliert, welches die kontinuierliche Bildung der primären Oxidationsprodukte (Peroxyradikale) verfolgt. Dazu wurde mittels einer photometrischen Methode die Zunahme der Absorption bei einer Wellenlänge von 234 nm verfolgt, die ein Maß für die Bildung von konjugierten Dienen (CD) ist. Die mit dem Phosphatidylcholin-Rest des verwendeten Lipids veresterten Fettsäuren waren Linolsäuren (18:2); das Pentadien-System der Linolsäure lässt sich leicht radikalisch unter H-Abstraktion angreifen, so dass ein resonanzstabilisiertes Pentadienyl-Radikal resultiert. Das konjugierte Dien entsteht schließlich durch Addition von Sauerstoff. Der Reaktionsweg zur Bildung des konjugierten Diens aus der Linolsäure ist in Abbildung 3.21 wiedergegeben.

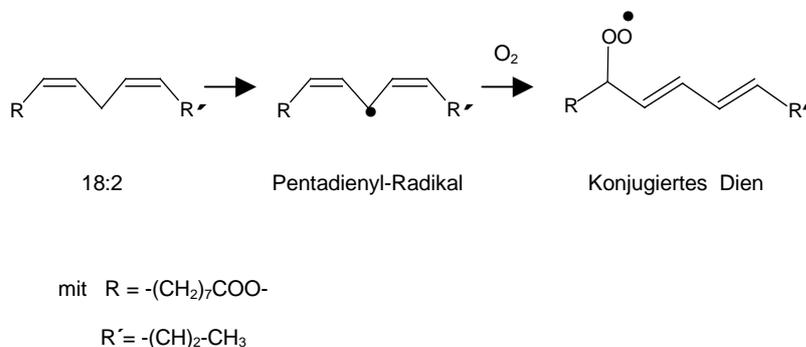


Abb. 3.21: Reaktionsschema zur Bildung des konjugierten Diens aus der Linolsäure (18:2) mit zwei isolierten Doppelbindungen.

3.5.1 Charakterisierung der Liposomen

Die in dieser Studie verwendeten Liposomen wurden mittels einer Ultraschalltechnik hergestellt, um unilamellare Vesikel zu erhalten. Elektronenmikroskopische Untersuchungen sollten klären, ob die hergestellten Liposomen aufgrund ihrer Größe und ihrer Form unilamellare Liposomen sind und damit als Modell einer Biomembran (Doppelmembran) angesehen werden können

Eine elektronenmikroskopische Aufnahme der Liposomen ist in Abbildung 3.22 dargestellt. Die Aufnahme zeigt bei einer Vergrößerung von etwa 21 000 gleichmäßig geformte Lipidvesikel mit einem durchschnittlichen Durchmesser von 180 nm ($n = 6$).

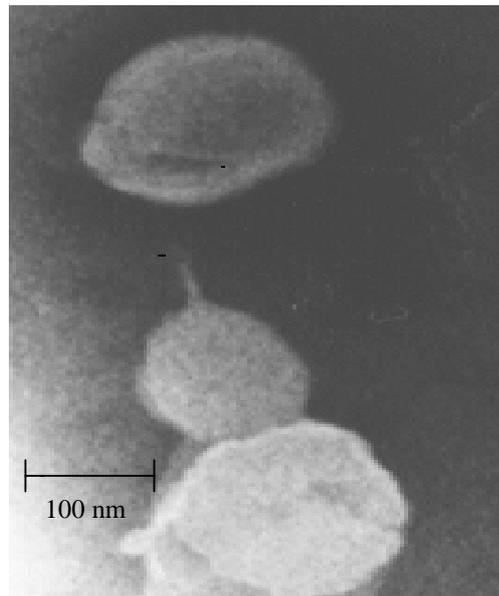


Abb. 3.22: Elektronenmikroskopische Aufnahme einer Liposomensuspension bei 21 000-facher Vergrößerung (Negativ-Färbung mit Phosphorwolframsäure). Die durchschnittliche Liposomengröße beträgt 180 nm.

3.5.2 Bildung der konjugierten Diene in unilamellaren Liposomen

Die Bildung der konjugierten Diene wurde kontinuierlich registriert. Die erhaltenen Absorptions-Zeit-Kurven (Abb. 3.23) ließen sich in drei Bereiche unterteilen. Dien- bzw. Peroxylradikal-Bildung fand zu Beginn der Reaktionen in geringerem Maße statt (Initiationsphase I). Die Beschleunigung der Lipidperoxidation war zeitlich verzögert (Kettenwachstumsphase II). Kettenabbruch bzw. Abnahme der Dien-Bildung schließt an die lineare Kettenwachstumsphase an (Kettenabbruchsphase III). Abbildung 3.23 gibt einen typischen Verlauf der Lipidperoxidation wieder. Durch Extrapolation (lineare Phase II) wird der Schnittpunkt mit der Abszisse bestimmt (τ). τ wird auch als *lag*-Phase bezeichnet und ist bei der Anwesenheit von Antioxidantien verlängert und ist somit ein geeignetes Maß für die antioxidative Wirkung von Substanzen (Cadenas und Sies, 1998).

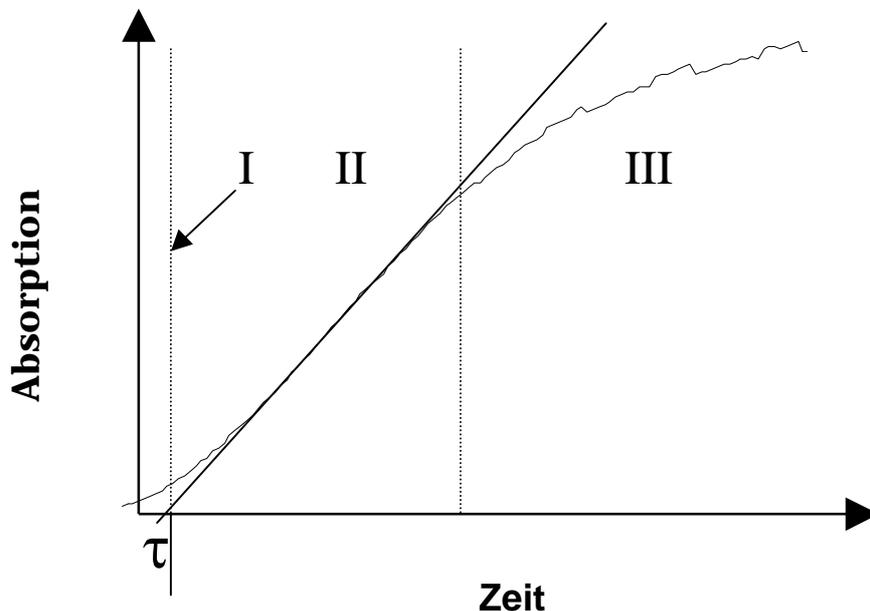


Abb. 3.23: Bildung konjugierter Diene mit der Zeit: Initiationsphase I, Kettenwachstumsphase II und Kettenabbruchsphase III.

Die Ergebnisse der Bildung konjugierter Diene (CD) in den unilamellaren Liposomen sind in Tabelle 3.14 dargestellt und sind bezogen auf die Kontrolle (ohne Testsubstanz) in (%) \pm SD ausgedrückt. Ermittelt wurde die CD-Bildung aus den Kurven zu den Zeitpunkten 30 Min, 60 Min und 120 Min nach Reaktionsstart durch AAPH (10 mM) bei 37 °C. Neben den Carotinoiden β -Carotin, Lycopin, Phytoen, Lutein, Zeaxanthin und Astaxanthin wurden auch das natürlich vorkommende Flavonoid Epicatechin und das Diphenylhexatrien in die Liposomen eingebaut.

Für die Kontrolle wurden n = 7 voneinander unabhängige Experimente und für alle übrigen Testansätze mindestens n = 3 Experimente durchgeführt.

β -Carotin mit einem Gehalt von 0,1 mol % in den Liposomen zeigte nach 30 Min eine Verringerung der CD-Bildung. Kein weiterer Unterschied zur Kontrolle wurde zu anderen Zeitpunkten und mit einem höheren Gehalt von 0,5 mol % beobachtet (Abb. 3.24).

Lycopin bewirkte in allen getesteten Konzentrationen von 0,01 – 0,4 mol % im Vergleich zur Kontrolle eine Zunahme der CD-Bildung. Mit ansteigender Konzentration des Lycopins in den Liposomen erhöhte sich auch die Bildung der CD (Abb. 3.25).

Phytoen führte zu einer deutlich verringerten Bildung an Dienen. Ein Gehalt von 0,5 mol% bewirkte nach 120 Min eine Zunahme von 30 % der Kontrolle (Abb. 3.26).

Die Xanthophylle Zeaxanthin, Lutein und Astaxanthin wurden bis zu einem Gehalt von 5,0 mol % untersucht.

Zeaxanthin verminderte ab einem Gehalt von 5,0 mol % die Bildung der CD deutlich ab 30 Min (Abb. 3.27). Nach 120 Min betrug der Gehalt an Dienen 12 % der Kontrolle. Ähnliche Ergebnisse wurden für Lutein erhalten (Abb. 3.28). Ansteigende Gehalte bis zu 5,0 mol % an Lutein in den Liposomen verringerten zu jedem Zeitpunkt den Gehalt an Dienen verglichen mit der Kontrolle. Nach 120 Min betrug der Anteil der gebildeten CD 41 % der Kontrolle.

Deutlich protektivere Eigenschaften zeigte *Astaxanthin* (Abb. 3.29). Hier verringerte sich die Bildung der CD ab einem Gehalt von 0,1 mol % Astaxanthin in den Liposomen. Nach dem Einbau von 5,0 mol % betrug der CD-Anteil nach 120 Min bezogen auf die Kontrolle 5 %.

Zwei weitere Substanzen wurden zum Vergleich untersucht.

Epicatechin gilt als klassisches Antioxidans und verminderte die Bildung von konjugierten Dienen bei einem Gehalt von 0,1 mol % nicht; erst der Einbau von 0,5 mol % bewirkte eine deutliche Verringerung bis zu 22 % der Kontrolle nach 30 Min und der Einbau von 2,0 mol % bis zu 23 % der Kontrolle (Abb. 3.30).

Diphenylhexatrien (DPH) wurde getestet, da es ähnlich dem Phytoen ein konjugiertes Trien-System aufweist, das jedoch mit zwei aromatischen Phenylsystemen in Konjugation steht. DPH bewirkte schon nach 30 Min eine Verringerung der Bildung an konjugierten Dienen mit 35 % bzw. 53 % der Kontrolle bei einem Gehalt von 0,1 mol % bzw. 0,5 mol % (Abb. 3.31).

Tab. 3.14: Bildung konjugierter Diene in unilamellaren Liposomen nach Initiierung durch 10M AAPH bei 37 ° C

Bildung konjugierter Diene bei 0,1 mol % Testsubstanz									
(% der Kontrolle)									
t (Min)	Kontrolle	β- Carotin	Lycopin	Phytoen	Zeaxanthin	Lutein	Astaxanthin	Epicatechin	DPH ^b
30	100,0 ± 29,5	57,7 ± 9,4	152,7 ± 11,7	36,6 ± 31,9	n. b. ^a	73,7 ± 8,9	22,3 ± 3,2	101,4 ± 22,7	34,7 ± 33,5
60	100,0 ± 23,2	88,8 ± 5,6	143,1 ± 6,5	64,7 ± 21,3	n. b. ^a	97,1 ± 10,0	47,9 ± 4,3	113,7 ± 7,4	57,5 ± 22,2
120	100,0 ± 10,4	113,5 ± 1,9	124,4 ± 3,1	95,2 ± 4,6	n. b. ^a	115,8 ± 6,1	78,9 ± 4,0	115,2 ± 2,0	82,8 ± 8,9

Bildung konjugierter Diene bei 0,5 mol % Testsubstanz									
(% der Kontrolle)									
t (Min)	Kontrolle	β- Carotin	Lycopin ^c	Phytoen	Zeaxanthin	Lutein	Astaxanthin	Epicatechin	DPH ^b
30	100,0 ± 29,5	81,5 ± 23,3	188,5 ± 13,7	0,0 ± 0,6	73,8 ± 6,8	43,7 ± 2,0	27,7 ± 14,9	21,9 ± 1,7	53,3 ± 30,0
60	100,0 ± 23,2	97,3 ± 13,5	172,4 ± 5,0	3,1 ± 1,5	86,0 ± 7,3	71,9 ± 1,9	41,5 ± 8,2	35,2 ± 5,3	64,1 ± 21,6
120	100,0 ± 10,4	109,0 ± 3,8	150,2 ± 6,7	29,7 ± 19,3	85,9 ± 3,7	101,7 ± 0,7	72,5 ± 7,6	103,9 ± 7,6	82,6 ± 14,1

Fortsetzung Tab. 3.14: Bildung konjugierter Diene in unilamellaren Liposomen nach Initiierung durch 10 mM AAPH bei 37 ° C

Bildung konjugierter Diene bei 5,0 mol % Testsubstanz (% der Kontrolle)									
t (min)	Kontrolle	β- Carotin	Lycopin	Phytoen	Zeaxanthin	Lutein	Astaxanthin	Epicatechin ^d	DPH ^b
30	100,0 ± 29,5	n.b. ^a	n.b. ^a	n.b. ^a	3,7 ± 14,7	3,6 ± 2,4	0,0 ± 5,5	23,0 ± 0,3	n.b. ^a
60	100,0 ± 23,2	n.b. ^a	n.b. ^a	n.b. ^a	5,5 ± 7,2	10,4 ± 2,6	0,3 ± 2,1	27,3 ± 0,9	n.b. ^a
120	100,0 ± 10,4	n.b. ^a	n.b. ^a	n.b. ^a	11,5 ± 6,3	40,7 ± 6,4	4,7 ± 1,1	36,8 ± 1,8	n.b. ^a

^a n.b. nicht bestimmt
^b Diphenylhexatrien (DPH)
^c 0,4 mol %
^d 2,0 mol %

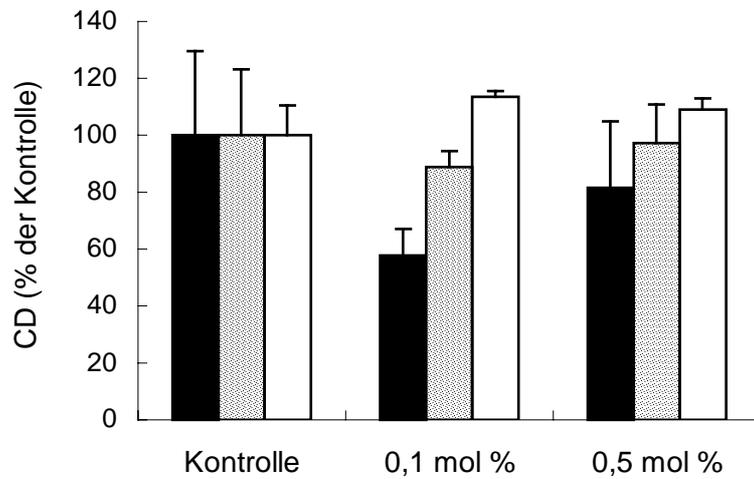


Abb. 3.24: Bildung konjugierter Diene (CD) in unilamellaren Liposomen nach Initiation durch 10 mM AAPH bei 37 ° C ohne Einbau (Kontrolle) und mit Einbau von β - Carotin (0,1 mol % und 0,5 mol %) ; schwarze Balken: Inkubation nach 30 min, graue Balken: Inkubation nach 60 min, offene Balken: Inkubation nach 120 min; Ergebnisse sind dargestellt als Mittelwerte \pm SD aus mindestens 3 unabhängigen Experimenten.

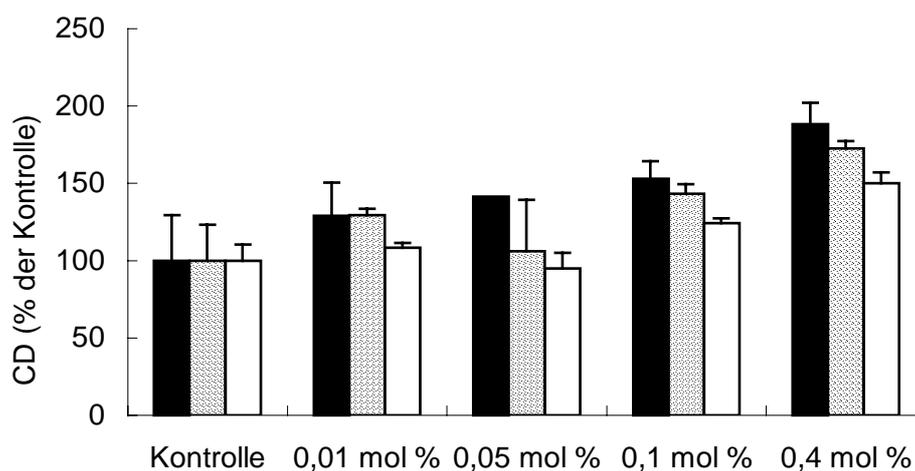


Abb. 3.25: Bildung konjugierter Diene nach Einbau von 0,01 mol %, 0,05 mol %, 0,1 mol % und 0,4 mol % Lycopin in Liposomen; siehe Abb. 3.24.

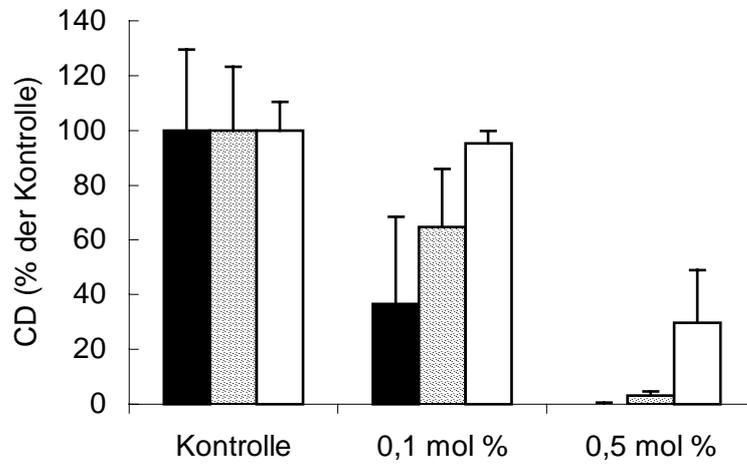


Abb. 3.26: Bildung konjugierter Diene nach Einbau von 0,1 mol % und 0,5 mol % Phytoen in Liposomen; siehe Abb. 3.24.

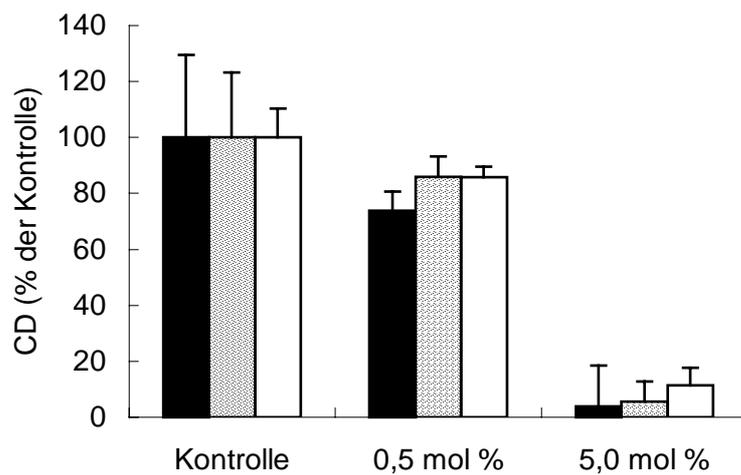


Abb. 3.27: Bildung konjugierter Diene nach Einbau von 0,5 mol % und 5,0 mol % Zeaxanthin in Liposomen; siehe Abb. 3.24.

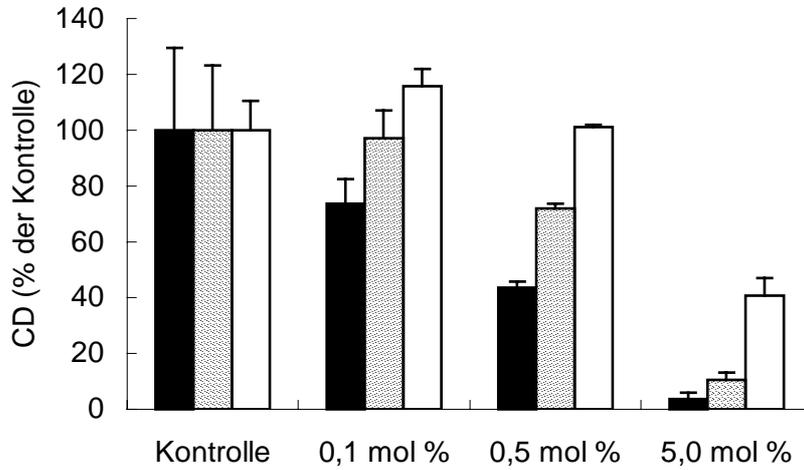


Abb. 3.28: Bildung konjugierter Diene nach Einbau von 0,1 mol %, 0,5 mol % und 5,0 mol % Lutein in Liposomen; siehe Abb. 3.24.

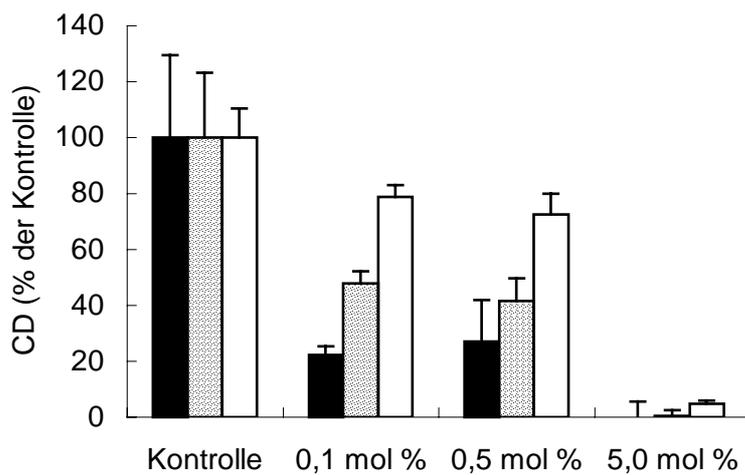


Abb. 3.29: Bildung konjugierter Diene nach Einbau von 0,1 mol %, 0,5 mol % und 5,0 mol % Astaxanthin in Liposomen; siehe Abb. 3.24.

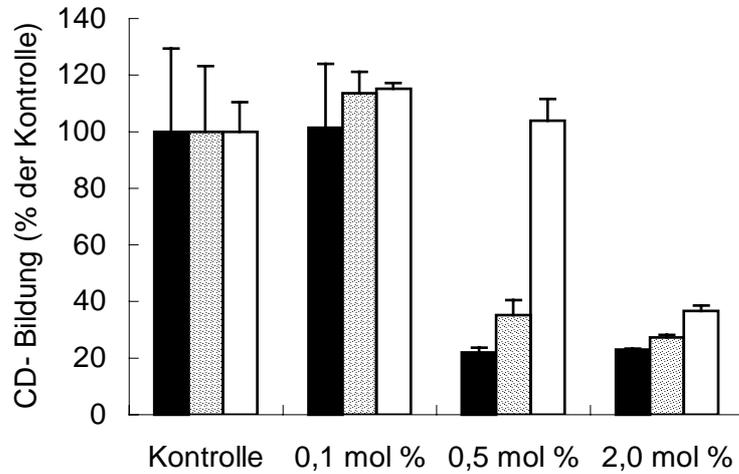


Abb. 3.30: Bildung konjugierter Diene nach Einbau von 0,1 mol %, 0,5 mol % und 2,0 mol % Epicatechin in Liposomen; siehe Abb. 3.23

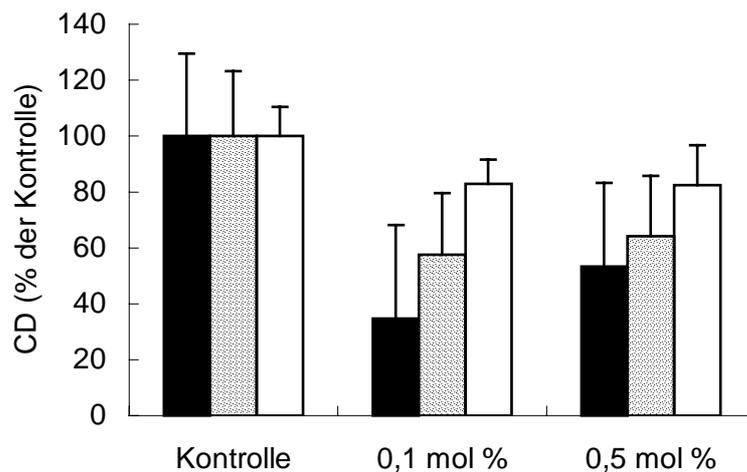


Abb. 3.31: Bildung konjugierter Diene nach Einbau von 0,1 mol % und 0,5 mol % Diphenylhexatrien; siehe Abb. 3.24

Für β -Carotin wurde weder ein anti- noch ein prooxidativer Effekt gefunden; Lycopin erwies sich als prooxidative Substanz in den Liposomen. Unter Berücksichtigung der Ergebnisse in Abb. 3.24 – Abb. 3.29 lässt sich eine Reihenfolge für die Lipidprotektion aufstellen:

Phytoen > Astaxanthin > Lutein = Zeaxanthin > β - Carotin > Lycopin.

3.5.3 Bestimmung der lag-Phase und des k -Wertes

Die τ - Werte wurden bestimmt wie in Kapitel 2.5.4 beschrieben und sind in Tab. 3.15 aufgeführt. Der Quotient aus τ_+ und τ_- repräsentiert das zeitunabhängige Maß für den lipidprotektiven Effekt. Ein linearer funktionaler Zusammenhang wurde erstellt, indem der Quotient aus τ_+ und τ_- gegen die Konzentration der im Lipid eingebauten Testsubstanz (nmol/mg) abgebildet wurde (Abb. 3.32 und Abb. 3.33). Der k -Wert ist das zeit- und konzentrationsunabhängige Maß für den lipidprotektiven Effekt und lässt sich durch Gleichung 1 darstellen.

$$\text{Gl. 1} \quad k = ((\tau_+ / \tau_-) - 1) / ([\text{Testsubstanz}])$$

mit [Testsubstanz] = Konzentration der in dem Lipid eingebauten Testsubstanz in (nmol/mg).

Die graphische Auswertung erlaubt die Bestimmung des k -Wertes aus der Steigung der linearen Funktionen in Abb. 3.32 und Abb. 3.33. Die Ergebnisse für die Bestimmung der τ - und k -Werte sind in Tab. 3.15 zusammengefasst.

Testsubstanzen, für die sich hohe k -Werte berechnen lassen, schützen das Lipid besser als Substanzen mit kleinerem k -Wert.

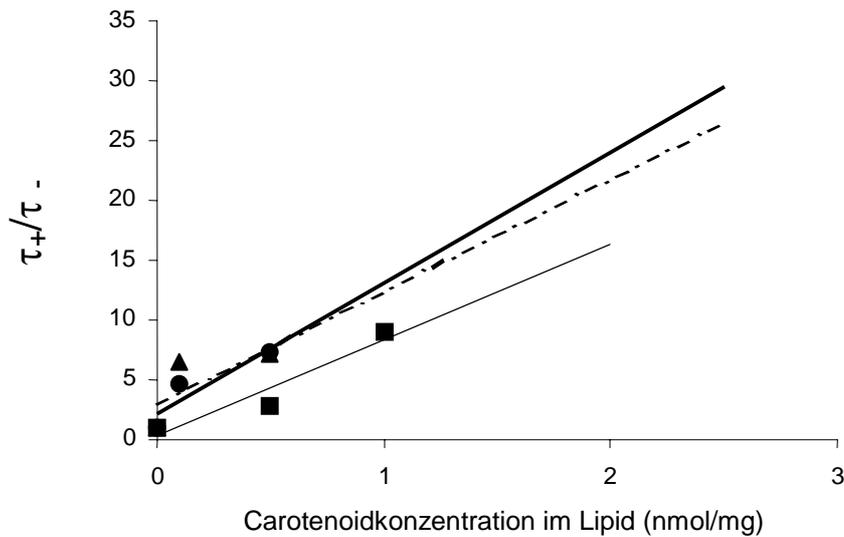


Abb. 3.32: Beziehung zwischen dem Verhältnis τ_+/τ_- und dem Gehalt an den Carotinoiden im Lipid (nmol/mg); Phytoen (●—), Astaxanthin (▲—) und Zeaxanthin (■—) in Liposomen.

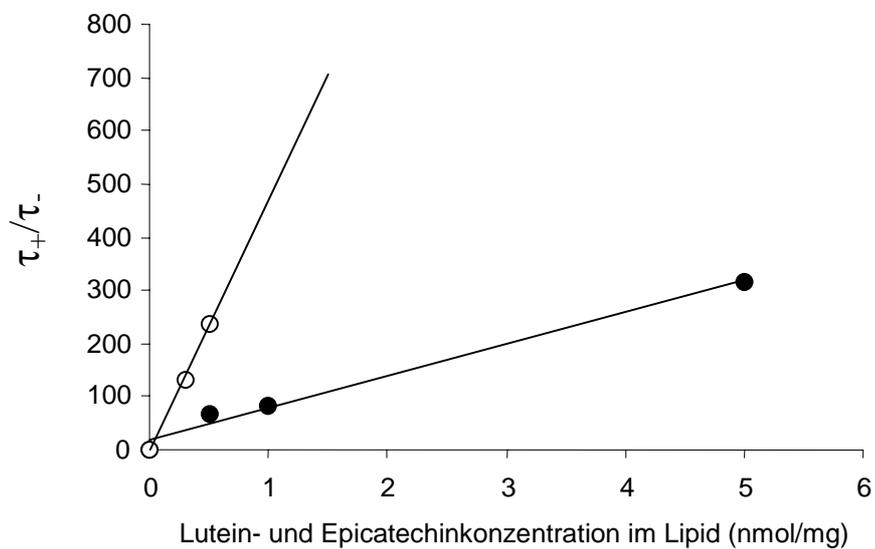


Abb. 3.33 Beziehung zwischen dem Verhältnis τ_+/τ_- und dem Gehalt an Lutein (●) und Epicatechin (○) in Liposomen (nmol/mg).

Tab. 3.15 Bestimmung der τ -Werte und der k -Werte in unilamellaren Liposomen

	(nmol /mg Lipid)	τ_- (Min)	τ_+ (Min)	τ_+/τ_-	k (10^9 mg/nmol)
β -Carotin		0,2			n. b. ^a
Lycopin		0,2			n. b. ^a
Phytoen					
(0,1 mol %)	1,28	6	27,7	4,6	
Phytoen					
(0,5 mol %)	6,39	6	43,6	7,3	10,9
Zeaxanthin					
(0,5 mol %)	6,39	6	17,6	2,9	
Zeaxanthin					
(1,0 mol %)	12,79	6	54,0	9,0	
Zeaxanthin					
(5,0 mol %)	63,93	6	> 135	22,5	8,0
Lutein					
(0,5 mol %)	6,39	0,2	13,4	67,0	
Lutein					
(1,0 mol %)	12,79	0,2	16,7	83,5	
Lutein					
(5,0 mol %)	63,93	0,2	63,1	315,5	59,6
Astaxanthin					
(0,1 mol %)	1,28	6	38,9	6,5	
Astaxanthin					
(0,5 mol %)	6,39	6	43,1	7,2	
Astaxanthin					
(5,0 mol %)	63,93	6	> 135	22,5	9,4
Epicatechin					
(0,3 mol %)	3,83	0,2	26,4	132,0	
Epicatechin					
(0,5 mol %)	6,39	0,2	47,6	238,0	471,1
DPH					
(0,5 mol %)	6,39	6	32,1	5,4	n. b. ^a

^a nicht bestimmbar

Abbildung 3.32 zeigt die graphische Auswertung für Zeaxanthin, Astaxanthin und Phytoen. In der genannten Reihenfolge der Carotinoide nimmt der k -Wert von $8,0 \times 10^9$ und $9,4 \times 10^9$ auf $10,9 \times 10^9$ (mg/nmol) zu.

Für Lutein und Epicatechin wurden k -Werte von $59,6 \times 10^9$ und $471,1 \times 10^9$ (mg/nmol) ermittelt, die sich aus der Auswertung in Abbildung 3.33 ergeben. Es fällt auf, dass die k -Werte für Lutein und Epicatechin systematisch höher liegen als für die anderen getesteten Substanzen. Dies lässt sich mit der verlängerten *lag*-Phase der Kontrollen (τ) erklären. Ein Vergleich der k -Werte von Lutein mit den Werten von Phytoen, Astaxanthin und Zeaxanthin ist deshalb nicht möglich. Die lipidprotektive Reihenfolge für Phytoen > Astaxanthin > Zeaxanthin (s. 3.5.2) ist jedoch auch hier zu erkennen.

4. Diskussion

4.1 Interventionsstudie zur Photoprotektion durch Carotinoide

4.1.1 Carotinoidbestimmung in Serum- und in Lebensmittelproben mittels HPLC

Die Carotinoide im Serum der Probanden wurden nach Extraktion mittels HPLC bestimmt (Gärtner, 1997). Die verwendete Methode ermöglichte die Erfassung der Hauptcarotinoide im Organismus des Menschen. Die Chromatogramme zeigten bei einer gemeinsamen Detektionswellenlänge von 450 nm basisliniengetrennte Signale aller Carotinoide. Die Trennung der strukturell verwandten Xanthophylle Lutein und Zeaxanthin gelingt mit vielen HPLC-Methoden nicht, jedoch konnten diese Carotinoide hier hinreichend getrennt und quantifiziert werden (Aust et al., 2001). Darüberhinaus war eine Trennung der Lycopin- und β -Carotin-Isomere möglich. Die hier vorgestellte Methode kann routinemäßig zur Carotinoidanalytik im Serum angewandt werden.

Ergänzend zu den erwähnten Carotinoiden wurden die UV-aktiven Carotine Phytoen und Phytofluen chromatographisch erfasst. Deren Gehalt im Serum konnte allerdings nicht mit der beschriebenen Methode bestimmt werden, da die Trennung unzureichend war. Die bislang in der Literatur beschriebene HPLC-Methode zur Bestimmung von Phytoen und Phytofluen im Serum (Khachik et al., 1997) erfordert die Verwendung von stationären und mobilen Phasen, die sich von denen für die routinemäßige Carotinoidanalytik (Gärtner, 1997) unterscheiden. Deshalb wurde eine neue HPLC-Methode entwickelt, mit der Phytoen und Phytofluen innerhalb einer Analysenzeit von 30 Min getrennt und quantifiziert werden konnten. Es wurde dieselbe stationäre Phase eingesetzt, die auch im Rahmen der routinemäßigen Carotinoidanalytik benutzt wurde. Die Zusammensetzung der mobilen Phase unterschied sich nur geringfügig von dem Eluenten, den Gärtner (1997) verwendete, so dass ein schneller HPLC-Systemwechsel möglich und die Methode im Laborbetrieb praktikabel war.

Die Detektions- und Quantifizierungsgrenzen von 0,005 μM und 0,03 μM für die Bestimmung von Phytoen und Phytofluen im Serum liegen höher als die Grenzen anderer Carotinoide (Gärtner, 1997). Dafür werden die im Vergleich zu anderen

Carotinoiden kleineren Extinktionskoeffizienten von Phytoen und Phytofluen (Britton, 1995b) verantwortlich gemacht, die eine geringere Empfindlichkeit in der UV-Detektion von Phytoen und Phytofluen bewirken. Die Quantifizierungsgrenzen genügen aber einer statistisch hinreichend sicheren Bestimmung von Phytoen und Phytofluen im Serum, da diese niedriger sind als der durchschnittliche Serumgehalt beim Menschen von 0,3 μM für Phytofluen und 0,1 μM für Phytoen (Khachik et al., 1997, Paetau et al., 1998).

Die entwickelte Methode wurde auch auf die Bestimmung von Phytoen und Phytofluen in Lebensmitteln angewandt.

4.1.2 Carotinoidgehalte im Serum

Während der Studie veränderten sich die Gehalte an Lutein, Zeaxanthin und β -Cryptoxanthin in den Seren der Probanden nicht. Die Gehalte an Lycopin wurden zu Beginn der Studie als Basiswert ermittelt und nach 4 und 12 Wochen Supplementierung mit lycopinreichen Nahrungsergänzungs- und lycopinreichen Lebensmitteln bestimmt. Der durchschnittliche Gehalt zu Beginn der Studie war in allen Studiengruppen mit 0,3 μM vergleichbar mit in der Literatur beschriebenen Werten (Sies et al., 1992, Khachik et al., 1997, Paetau et al., 1998). Eine signifikante Zunahme des Gehaltes an Lycopin um das 2-fache nach 4 und 12 Wochen ließ sich in allen Gruppen feststellen. Diese Erhöhung steht im Einklang mit Untersuchungen, in denen Probanden täglich 12 und 16 mg Lycopin einnahmen (Bowen et al., 1993, Stahl et al., 2001). Paetau und Kollegen (1998) verwendeten in ihren Supplementierungsstudien mit vergleichbaren Lycopinpräparaten (synthetisches Lycopin, Tomatenextrakt auf Oleoresin-Basis und in Wasser mikrodispers verteilter Tomatenextrakt) um bis zu 7-fach höhere tägliche Dosen und beobachteten ebenfalls eine 2-fache Erhöhung des Lycopingehaltes im Serum. Die Lycopinspiegel im Blut sind gegen Ende beider Studien ähnlich hoch und unabhängig von der Art der Lycopinformulierung in den Präparaten. Es scheint, dass bei der Supplementierung mit Lycopin der Gehalt an Lycopin im Serum nicht über 1 μM erhöht werden kann. Im Gegensatz dazu ist bei einer β -Carotinsupplementierung die Erhöhung der β -Carotinkonzentration im Serum über 1 μM möglich (Stahl et al., 1998). Physiko-

chemische Eigenschaften wie die Neigung von Lycopin zur Aggregatbildung in wässriger Umgebung (Britton, 1995a) könnten den Einbau von Lycopin in Lipoproteine des Blutes limitieren und so zu niedrigen oberen Grenzwerten für Lycopinplasmaspiegel führen. Niedrige Werte in einem Fließgleichgewicht (steady state) können auch durch kinetische Parameter wie eine schnelle Clearance oder einen raschen Metabolismus von Lycopin erklärt werden.

Die Basisgehalte von Phytoen mit $0,1 \mu\text{M}$ und Phytofluen mit $0,3 \mu\text{M}$ im Serum zu Beginn der Studie sind in Übereinstimmung mit Literaturdaten (Khachik et al., 1997, Paetau et al., 1998). Während sich mit Supplementierung mit synthetischem Lycopin die Phytofluen- und Phytoengehalte nicht veränderten, erhöhten sich die Gehalte nach Gabe der Tomatenextrakte um das 2-fache. Auch diese Beobachtungen sind in Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Paetau und Mitarbeitern (1998). Durch die Supplementierung mit dem Saft der Lycopinkarotte stieg der Phytofluengehalt sogar um das 4-fache auf bis zu $1 \mu\text{M}$ an und lag damit höher als die höchsten Lycopingehalte, die in der Studie gemessen wurden. Unabhängig von den unterschiedlichen täglichen Phytofluendosen scheint wie im Falle des Lycopins ein oberer Grenzwert für den Phytofluenspiegel erreicht zu werden. Hieraus wird gefolgert, dass die apparente Verfügbarkeit von Phytofluen größer ist als die des Lycopins, obwohl die täglich aufgenommenen Dosen an Phytofluen um den Faktor 10 niedriger lagen als die Lycopindosen.

Strukturelle Unterschiede zum Lycopin könnten für die hohen Phytofluenplasmaspiegel verantwortlich sein. Da unter den in Pflanzen vorkommenden cis/trans-Isomeren des Phytofluens das cis-konfigurierte Isomer dominiert, könnte die gewinkelte Struktur des Moleküls eine geringere Aggregationsneigung in wässriger Umgebung bewirken und so einen vermehrten Einbau in Mizellen oder Lipoproteine ermöglichen. Generell werden Carotinoide mit cis-Konformation bevorzugt in Lipidkompartimente eingebaut (Britton, 1995a).

4.1.3 Carotinoidgehalte in der Haut

Die Untersuchung von photoprotektiven Effekten von Carotinoiden beim Menschen wurde in dieser Studie an der Haut durchgeführt. Daher wurde auch der Gehalt an Carotinoiden in der Haut bestimmt. Da Lycopin in den Supplementen das Hauptcarotinoid war, wurde davon ausgegangen, dass die Steigerung der ermittelten Gesamtcarotinoidgehalte hauptsächlich auf das Lycopin zurückzuführen waren. Andere Carotinoide des Blutes wie Lutein, Zeaxanthin und deren Ester werden ebenfalls in die Haut transportiert; sie lassen sich allerdings nur in geringen Mengen nachweisen (Wingerath et al., 1998). Die angewandte Methode der Reflektionsspektrophotometrie ermöglichte jedoch nur die Bestimmung der im sichtbaren Bereich absorbierenden Carotinoide. Die UV-aktiven Verbindungen Phytoen und Phytofluen wurden nicht detektiert.

Der Gesamtcarotinoidgehalt wurde in einem kleinen Hautareal des Rückens bestimmt und stieg während der Supplementierung mit lycopinreichen Nahrungsergänzungs- und Lebensmitteln von 0,1 auf 0,2 nmol/g an. Der Basiswert zu Beginn der Studie ist vergleichbar mit den Gehalten, die Ribaya-Mercado et al. (1995) und Stahl et al. (1998, 2001) beschrieben. Die Akkumulation von Lycopin in der Haut scheint vergleichbar mit der Anreicherung im Serum begrenzt und unabhängig von der Art der Präparate zu sein.

Einen vergleichbare Erhöhung des Gesamtcarotinoidgehalts durch Supplementierung von 0,3 nmol/g erzielten Stahl et al. (2001) nach 12 Wochen, wenn täglich mit 16 mg Lycopin (40 g Tomatenpaste) supplementiert wurde. Hingegen war nach Supplementierung mit β -Carotin in Form eines Algenextraktes ein höherer Gesamtcarotinoidgehalt in der Haut mit 1 nmol/g festzustellen (Stahl et al., 2000). Zugleich stieg in dieser Studie die β -Carotinkonzentration im Serum über 1 μ M (siehe 4.1.2). Die Erhöhung der Carotinoidgehalte von Lycopin oder β -Carotin in der Haut folgt somit dem Anstieg der Carotinoide im Blut. Darüberhinaus scheint Lycopin in der Haut einem rascheren Metabolismus zu unterliegen als β -Carotin, so dass niedrigere Lycopinwerte in der Haut zu erwarten sind. Untersuchungen von Ribaya-Mercado und Mitarbeiter zeigten, dass Lycopin in der Haut schneller als β -Carotin abgebaut wird (Ribaya-Mercado et al., 1995).

4.1.4 Photoprotektion durch lycopinreiche Supplemente

Die durch Supplementierung mit Carotinoiden erzielte Zunahme der Carotinoidgehalte im Serum der Probanden korrelierte mit einem erhöhten Gesamtcarotinoidgehalt in der Haut. Das Ausmaß eines photoprotektiven Effektes wurde durch die Intensität der Sonnenbrand-Reaktion in der Haut ermittelt. Die Sonnenbrand-Reaktion ist mit einem UV-induzierten Erythem (Rötung) verbunden, dessen Bildung in einem kleinen Hautareal des Rückens durch Bestrahlung mit einem Solarsimulator hervorgerufen wurde. Die Zunahme der Intensität des Erythems 24 Stunden nach einer Bestrahlung war ein Maß für die Sonnenbrand-Reaktion und wurde chromatometrisch als a -Wert bestimmt. Da die Haut auch im unbestrahlten Zustand einen Eigenrotwert besitzt, wurde nicht der a -Wert sondern die Rötungsdifferenz Δa vor und 24 Stunden nach der Bestrahlung als Indikator für die Erythemintensität verwendet.

Für die Studiengruppen, die mit den Tomatenextrakten und dem Lycopinkarotten-Saft supplementiert wurden, ließ sich im Mittel ein Ausgangswert von $\Delta a = 5$ zu Beginn der Studie bestimmen. Der Variationskoeffizient für Δa betrug zwischen 15 und 36 %. Dieser Wert ist mit dem Basiswert in den Untersuchungen von Stahl et al. (2001) vergleichbar. Für die Studiengruppe, die mit synthetischem Lycopin supplementiert wurde, ließ sich die Rötungsdifferenz zu Beginn der Studie mit $\Delta a = 3,5$ berechnen. Der hier höhere Variationskoeffizient von 49 % könnte die individuell unterschiedlichen Empfindlichkeiten gegenüber der UV-Stimulation bei den Probanden widerspiegeln und so den geringeren Δa -Wert zu Beginn der Studie erklären.

Eine Photoprotektion durch die verwendeten Supplemente war gegeben, wenn während der Studie eine Abnahme von Δa zu beobachten war. Diese Photoprotektion wurde durch die Einnahme jedes der verwendeten Supplemente erhalten, so dass eine Korrelation zwischen erhöhten Lycopingehalten im Serum, erhöhten Gesamtcarotinoidgehalten in der Haut und der UV-Protektion aufgestellt werden kann. Mit Ausnahme der Gruppe, die mit synthetischem Lycopin supplementiert war, wurde für alle übrigen Studiengruppen eine statistisch

signifikante Abnahme von Δa im Mittel von 5,0 (Woche 0) auf 3,2 (Woche 12) beobachtet. Hier waren die photoprotektiven Effekte statistisch signifikant.

Die HPLC-Untersuchungen der Seren ergaben, dass auch die Blutspiegel an Phytoen und Phytofluen bei den Probanden signifikant anstiegen, die mit Lycopin aus natürlichen Quellen supplementiert wurden. Phytoen und Phytofluen sind Vorläufermoleküle in der Biosynthese von Carotinoiden in höheren Pflanzen. Ihr Vorkommen ist dabei nicht nur auf die in dieser Studie verwendeten Supplemente beschränkt. Phytoen und Phytofluen wurden in lycopin- und β -carotinreichen, verarbeiteten Lebensmitteln (Tomatensaft, Tomatenkonzentrat und ein diätetisches Lebensmittel für die Kleinkinderernährung) in größeren Mengen nachgewiesen, die bis zu 12 % des Hauptcarotinoidgehaltes betragen. Systematische Untersuchungen zum Gehalt von Phytoen und Phytofluen in Lebensmitteln liegen bisher nicht vor (Pelz et al., 1998).

Aufgrund ihrer UV-absorbierenden Eigenschaften im Bereich des UV A- und UV B-Lichts (Andersson et al., 2001) könnten Phytoen und Phytofluen auch als UV-Filter in der Haut wirken und so die erythemauslösenden Strahlungen mindern. *In vivo* Untersuchungen am Frettchen zeigten, dass die intraperitoneale (unter die Bauchdecke) Applikation von Phytoen das Ausmaß der Sonnenbrand-Reaktion deutlich abschwächt (Mathews-Roth und Pathak, 1975). Untersuchungen zur Verteilung und Bioverfügbarkeit der Substanzen im Tiermodell liegen nicht vor.

Ähnliche Studien zu photoprotektiven Effekten durch lycopinreiche Supplementierungen finden sich bei Stahl et al. (2001) (lycopinreiche Tomatenpaste) und bei Heinrich et al. (2003) (Kapsel supplement eines Carotinoidgemisches). Die signifikant protektiven Effekte ließen sich auch in diesen Studien erst ab einer längeren Studiendauer von mindestens 10 Wochen aufzeigen. Ähnliche Ergebnisse wurden in Studien mit einer β -Carotin-Supplementierung erhalten. Untersuchungen, in denen Carotenoid-Dosen von 30 mg oder 150 mg β -Carotin über 10 Wochen verabreicht wurden, ergaben schützende Effekte (Mathews-Roth et al., 1972, Lee et al., 2000). Im Gegensatz dazu erzielten Wolf et al. (1988) durch Gabe von 150 mg eines β -Carotin-Canthaxanthin-Gemisches für eine Zeit von 4 Wochen keinen protektiven Effekt. Auch Garmyn und Mitarbeiter (1995) konnten nach Gabe von 90 mg β -Carotin für 3 Wochen keinen Sonnenschutzeffekt nachweisen.

Nicht nur die tägliche Höhe der Dosis von Carotinoiden scheint einen Einfluss auf die UV-Protektion zu haben, sondern auch die Interventionsdauer. Zeitabhängige Prozesse, in denen Carotinoide aus subkutanem Fettgewebe in die Dermis oder Epidermis transportiert werden müssten, könnten so die verzögerten Schutzwirkungen erklären.

Obwohl der endogene Sonnenschutz relativ gering ist und im Vergleich zu topisch angewandten Sonnenschutzmitteln einen Lichtschutzfaktor von 3 aufweist (persönliche Mitteilung PD Dr. Ulrike Heinrich, Universität Witten-Herdecke), hat die systemische Anwendung von oralen Sonnenschutzmitteln auch Vorteile. Die ständige Verfügbarkeit der protektiven Substanzen trägt zum permanenten Schutz der Haut vor sonnenlicht-induzierten Schädigungen bei. Jedoch ersetzt der endogene Sonnenschutz nicht die Anwendung von Sonnenschutzcremes bei intensiver Sonnenbestrahlung der Haut wie im Hochgebirge oder am Meer.

4.2 Untersuchungen in Zellkultur zur Photoprotektion durch Carotinoide

4.2.1 Einfluss auf den MMP-1-Signalweg

UV-Bestrahlung der Haut führt u.a zu oxidativem Stress in der Haut, wobei das zelluläre antioxidative Verteidigungssystem geschwächt wird (Podda et al., 1998, Sorg et al., 2001). Die Folge kann eine Schädigung der Keratinozyten- und Fibroblastenmembran durch intermediär gebildete reaktive Sauerstoff-Spezies sein (Gaboriau et al., 1993). Das Ausmaß der Schädigung hängt dabei vom antioxidativen Status der Zellen ab (Moysan et al., 1992). Für die *in vitro*-Untersuchung von oxidativen Vorgängen in Hautzellen nach einer UV-Bestrahlung eignen sich Zellkulturen von Fibroblasten (Morliere et al., 1991, 1995).

Daher wurde in der vorliegenden Arbeit der Einfluß von Lycopin und einem Gemisch aus Phytoen und Phytofluen auf die durch photooxidativen Stress induzierte Bildung des Enzyms MMP-1 (Kollagenase) in Fibroblasten untersucht (Scharffetter-Kochanek et al., 1993, Wlaschek et al., 1995). Die verwendeten Konzentrationen des Lycopins im Zellkulturmedium von 0,03 – 0,5 µM entsprachen den Gehalten im Blutplasma (physiologische Konzentrationen).

In den Fibroblasten betrug die UV A-induzierte MMP-Expression der Positiv-Kontrolle im Mittel das 5,2-fache der unbestrahlten Kontrolle, was in Übereinstimmung mit der 5-fachen Induktion ist, die Herrmann et al. (1993) in Fibroblastenkulturen bei gleicher Strahlungsdosis von 30 J/cm² erhielten.

Die Prä-Inkubation der Fibroblasten mit Lycopin für 48 Stunden verminderte die UV A-induzierte MMP-1-Bildung gegenüber der Positiv-Kontrolle signifikant ab einer Konzentration von 0,1 µM im Zellkulturmedium.

Ähnliche Untersuchungen zum Einfluss von Carotinoiden auf die UV-induzierte MMP-1-Bildung wurden bislang nur von Offord und Mitarbeitern (2002) durchgeführt. Die Ergebnisse dieser Studien können jedoch nicht mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit verglichen werden. Offord et al. verwendeten eine höhere UV A-Dosis von 50 J/cm², was die in dieser Studie beobachtete, starke Induktion der MMP-1 in der Positiv-Kontrolle mit dem 15-fachen der unbestrahlten Kontrolle erklären könnte. Die Prä-Inkubation der Fibroblasten mit Lycopin für 24 Stunden verminderte die MMP-1-Expression nach der UV A-Bestrahlung nicht. Inkubationen der Zellen mit Lycopin für 48 Stunden wurden von Offord et al. nicht durchgeführt.

Es wird vermutet, dass für die in der vorliegenden Studie beobachtete Erniedrigung der UV-stimulierten Bildung der MMP-1 (oxidierte) Abbauprodukte des Lycopins verantwortlich sein könnten. Lycopin war mit den hier verwendeten Konzentrationen nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden weder im Zellkulturmedium noch im Zelllysat der Fibroblasten nachzuweisen. Deshalb sind genregulatorische Wirkungen von Carotinoidabbauprodukten auf die Expression von MMP-1 denkbar. Solche regulatorischen Effekte wurden bereits für Abbauprodukte des β-Carotins und Lycopins beschrieben (Siems et al., 2000, Ben-Dor et al., 2001, Müller et al., 2002, Aust et al., 2002).

Die Untersuchungen zum Einfluss von Phytofluen und Phytoen auf die MMP-1-Expression ergaben, dass die Supplementierung der Zellkulturen mit diesen Carotinen die UV-induzierte MMP-1-Bildung nicht verminderte. Die in den Versuchen eingesetzte Konzentration (2 µM bezogen auf Phytofluen) in dem Zellkulturmedium könnte u.U. nicht ausreichend gewesen sein, genügend Substanz in die Fibroblastenzellen einzubauen. Das Absorptionsmaximum von Phytofluen liegt bei

350 nm (in organischer Lösung) (Andersson et al., 2001) und zugleich in dem Wellenlängenbereich des UV A-Lichtes. Eine UV-Filterwirkung, die eine MMP-1-Induktion reduzieren könnte, war somit in den Fibroblastenkulturen nicht nachweisbar. Auch scheinen Abbauprodukte des Phytoens keine regulatorische Wirkungen zu haben.

4.2.2 Einfluss der Carotinoide auf den IL-6-Signalweg

Die Interaktion von UV-Licht mit den Keratinozyten der Epidermis kann zu entzündlichen Prozessen führen, in deren Verlauf Zytokine wie das Interleukin-6 (IL-6) als Signalmediatoren wirken (Petit-Frere et al., 1998). Keratinozyten werden durch UV-Licht zur IL-6-Produktion stimuliert (Grundmann et al., 2001). IL-6 seinerseits induziert über parakrine Mechanismen (Kondo et al., 1997) die MMP-1-Expression in Fibroblasten (Brenneisen et al., 1999). Der Einfluss von Carotinoiden auf den IL-6-Signalweg nach UV-Bestrahlung ist bislang nicht untersucht worden.

In dieser Arbeit wurden Keratinozyten mit einer UV B-Dosis von 30 mJ/cm bestrahlt und somit die Bildung von IL-6 stimuliert. Die Supplementierung der Keratinozyten mit Lycopin für 24 Stunden beeinflusste den IL-6-Signalweg nicht, wohingegen die Prä-Inkubation der Keratinozyten mit Phytoen für 24 Stunden die IL-6-Produktion um 55 % gegenüber der Positiv-Kontrolle verringerte. Das Absorptionsmaximum des Phytoens (in organischer Lösung) liegt bei 280 nm (Andersson et al., 2001) und zugleich im Wellenlängenbereich des UV B-Lichtes. UV-Filtereffekte könnten für die Verminderung der UV-induzierten IL-6-Bildung in Keratinozyten verantwortlich sein.

Ein Erythem ist ein Zeichen für eine Entzündungsreaktion. Die in der Interventionsstudie am Menschen beobachtete verminderte Erythembildung (siehe 4.1.4) könnte auch mit einer schwächeren Immunantwort aufgrund einer gedrosselten IL-6-Produktion assoziiert sein. Mathews-Roth und Pathak (1975) zeigten einen UV-protektiven Effekt an der Haut des Frettchens, wenn Phytoen intra-peritoneal (unter die Bauchdecke) verabreicht wurde. Zusätzlich berichtete Mathews-Roth (1982), dass UV B-induzierte Hauttumore von Mäusen nach intra-peritonealer

Applikation von Phytoen verzögert auftraten. Antioxidative Effekte wurden für diese Wirkungen verantwortlich gemacht.

4.3 Anti- und prooxidatives Verhalten von Carotinoiden in unilamellaren Liposomen

Die in dieser Arbeit *in vivo* und *in vitro* beobachteten UV-protectiven Effekte können mit den antioxidativen Eigenschaften von Carotinoiden in Verbindung gebracht werden. Der Einfluss von Carotinoiden auf die Lipidperoxidation wurde hier in einem Biomembranmodell bestehend aus unilamellaren Liposomen (Ostro, 1983) untersucht. Die Lipidperoxidation ist ein Indikator für oxidative, radikalische Reaktionen, wie sie auch in Liposomen nach einer UV-Bestrahlung auftreten (Sujak et al., 1999).

In der vorliegenden Studie wurde daher ein Verfahren etabliert, welches die kontinuierliche Bildung der Peroxylradikale als sogenannte konjugierte Diene in einem unilamellaren Liposomensystem direkt nach Radikalstart mit dem wasserlöslichen Radikalstarter AAPH registrierte. Im Hinblick auf die lipidprotectiven Eigenschaften in diesem Modell ließ sich eine Reaktivitätsreihenfolge für die folgenden Carotinoide aufstellen:

Phytoen > Astaxanthin > Lutein = Zeaxanthin > β -Carotin > Lycopin.

In dem vorliegenden Liposomensystem wirkte Phytoen als stärkstes Antioxidans, während β -Carotin keine antioxidativen Effekte zeigte. Lycopin hingegen beschleunigte stets die Lipidoxidation und wurde daher als Prooxidans eingestuft.

In vielen Untersuchungen zu den antioxidativen Eigenschaften von Carotinoiden wurden sowohl anti- als auch prooxidative Effekte beobachtet, die von den jeweiligen Versuchsanordnungen abhängen. Es sind Variablen wie der Sauerstoffpartialdruck (Burton und Ingold, 1984), die Gegenwart von Metallionen (Palozza, 1998, Lowe et al., 1999, Young and Lowe, 2001) oder weiterer Antioxidantien (z.B. Tocopherol) (Junghans et al., 2001b), die eine entscheidende Rolle spielen.

Die für Astaxanthin, Lutein, Zeaxanthin, β -Carotin und Lycopin beobachteten Ergebnisse entsprechen den Resultaten anderer Untersuchungen (Miki, 1991, Palozza und Krinsky, 1992, Woodall et al., 1997a). Lim et al. (1992) beobachteten allgemein einen besseren Lipidschutz vor Oxidation durch Xanthophylle als durch Carotine. Zu ähnlichen Ergebnissen kamen Rengel et al. (2000). Chen und Djuric (2001) beobachteten in einem vergleichbaren unilamellaren Liposomensystem keine signifikanten anti- oder prooxidative Eigenschaften von Lycopin, β -Carotin, Lutein und Zeaxanthin. Stahl und Mitarbeiter (1998) und Junghans et al. (2001b) hingegen beschrieben in einem unilamellaren Liposomensystem Lycopin als effektives Antioxidans. Im Vergleich zur vorliegenden Arbeit ergeben sich allerdings Unterschiede in der Methodik der Untersuchungen. Als Reaktionsstart verwendeten Junghans et al. und Stahl et al. den lipophilen Radikalbildner AMVN und gaben das Ausmaß der Lipidoxidation durch die Menge an gebildetem Malondialdehyd (MDA)-Äquivalenten an. MDA entsteht als sekundäres Produkt gegen Ende einer Oxidationskettenreaktion aus intermediär gebildetem endo-Peroxiden (Belitz und Grosch, 1992), deren Bildung zudem von Faktoren wie Temperatur und der Menge an Prooxidantien abhängig ist. Die Messungen unterschiedlicher (primärer und sekundärer) Oxidationsprodukte zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Lipidperoxidation könnten zu unterschiedlichen Ergebnissen der beiden Studien geführt haben.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit unterstützen die Hypothese, dass Xanthophylle Liposomenmembranen vor Oxidation besser schützen als Carotine. In diesem Zusammenhang scheinen die strukturellen Aspekte in der Membran eine wichtige Rolle zu spielen. Reaktivitätseigenschaften der Carotinoidmoleküle (El Tinay und Chicester, 1970, und Woodall et al., 1997a) haben eine nachrangige Bedeutung. Xanthophylle weisen in Lipiddoppelmembran-Strukturen eine nahezu senkrechte Orientierung auf, wobei die polaren Hydroxylgruppen der Xanthophylle einen Kontakt zum wässrigen Aussenmedium der Doppelmembran ermöglichen (Gruszecki und Siewiesiuk, 1990). Mit dieser Orientierung geht schließlich auch eine Erhöhung der Rigidität der Membran einher (Gabrielska und Gruszecki, 1996). Ein radikalischer Angriff der Lipide wird anscheinend erschwert. β -Carotin hingegen lagert sich derart in die Lipiddoppelmembran ein; der Kontakt mit dem wässrigen Kompartiment ist eingeschränkt. Beim Einbau von β -Carotin und Lycopin in die Membran könnte die

Beweglichkeit der polaren Kopfgruppen der Phosphatidycholine erhöht werden, was die Stabilität der Membran verringert (Jezowska et al., 1994) und ein Angriff von Radikalen erleichtert.

Das Carotin Phytoen wies in dem in dieser Arbeit verwendeten Modell lipidprotektive Eigenschaften auf. Aufgrund seiner Struktur mit lediglich 3 konjugierten Doppelbindungen gilt Phytoen nicht als Antioxidans (Martin et al., 1999), da es kein ausgedehntes Elektronensystem besitzt. Radikalische Zwischenstufen können nicht über Resonanzen, wie sie bei den übrigen Carotinoiden in der Regel vorkommen, stabilisiert werden. Im Gegensatz zum β -Carotin liegen bisher keine Literaturdaten über die Orientierung von Phytoen in einer Lipidmembran vor. Aufgrund der freien Drehbarkeiten des Phytoenmoleküls ist eine coplanare Anordnung zu den Lipidmolekülen der Membran denkbar und damit ein membranstraffender (protektiver) Effekt möglich. Die erhöhte Reaktionsfähigkeit von Phytoen (erleichterte H-Abstraktion durch freie Radikale bevorzugt an Kohlenstoffatomen in allylischer Position) sollte mit einer verminderten Elektronegativität längs der Kohlenstoffkette des Phytoens verbunden sein. Semiempirische Berechnungen der Elektronendichteverteilungen für Lycopin und Phytoen zeigen diesen Unterschied zwischen den beiden Carotinen auf (Abb. 4.1 und 4.2).

Die Elektronenverteilung in der Kohlenstoffkette weist an den Kohlenstoffatomen der Doppelbindungen, die nicht methylsubstituiert sind, die höchste Elektronendichte auf. α - und β -ständige Kohlenstoffatome sind daher bevorzugte Positionen für eine H-Abstraktion.

Die Ergebnisse der Liposomenstudie lassen erkennen, dass auch Carotine mit nicht ausgedehntem konjugierten Elektronensystem Membranlipide (im Modellsystem von Liposomen) vor Oxidation schützen. Sie zeigen zugleich auf, dass antioxidative Effekte des Phytoen in der UV-induzierten Erythembildung der Haut eine Rolle spielen könnte.

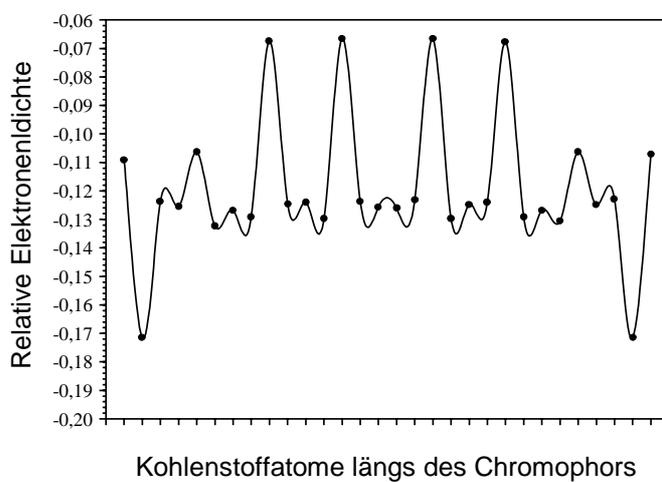


Abb. 4.1: Elektronendichteverteilung des Lycopins. Dargestellt sind die Verteilungen längs der Kohlenstoffatome in der Hauptkette.

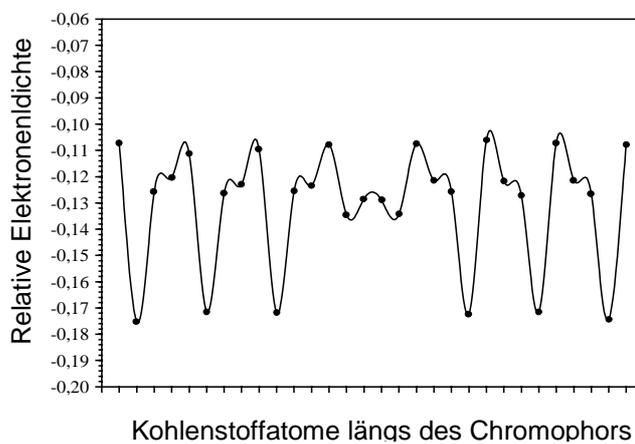


Abb. 4.2: Elektronendichteverteilung des Phytoens. Dargestellt sind die Verteilungen längs der Kohlenstoffatome in der Hauptkette.

5. Zusammenfassung

Carotinoide sind effektive Antioxidantien und dienen in höheren Pflanzen als Lichtschutzfaktoren. Die Wirkung von Carotinoiden als Photoprotektoren beim Menschen zur Verminderung von UV-induzierten Hautreaktionen (Sonnenbrand-Erythem) ist nur wenig untersucht. Die bisherigen Studien hierzu wurden mit β -Carotin durchgeführt. In der vorliegenden Arbeit wurden daher Lichtschutzeffekte des Tomatencarotinoids Lycopin untersucht. Hierzu wurden Probanden verschiedener Gruppen über einen Zeitraum von 12 Wochen synthetisches Lycopin, lycopinreiche Supplemente (Nahrungsergänzungsmittel) oder lycopinreicher Saft verabreicht. Zu Beginn der Studie und nach 4 und 12 Wochen Supplementierung wurde mit einem Sonnenlichtsimulator ein Erythem induziert. Zu den gleichen Zeitpunkten wurde der Gehalt an Carotinoiden im Serum und in der Haut der Teilnehmer untersucht. In allen Gruppen konnte ein Lichtschutzeffekt durch die Behandlung mit Lycopin nachgewiesen werden. Die Intensität des mit gleicher Strahlungsdosis induzierten Erythems war am Ende der Studie geringer als zu Beginn. Die Schutzwirkung war in allen Gruppen, die Lycopin aus natürlichen Quellen zu sich nahmen, statistisch signifikant. Weniger ausgeprägt und deshalb nicht statistisch signifikant war der Effekt nach 12-wöchiger Gabe von synthetischem Lycopin. Die UV-protective Wirkung korrelierte mit dem Anstieg des Lycopins im Serum und der Gesamtcarotinoide in der Haut.

In den Supplementen aus natürlichen Quellen waren zusätzlich zum Lycopin insbesondere noch die im UV-Bereich absorbierenden Carotinoide Phytoen und Phytofluen vorhanden. Untersuchungen des Serums zeigten, dass die Konzentrationen dieser Carotinoide ebenfalls während der Studie anstiegen. Der Anstieg war besonders ausgeprägt beim Phytofluen; hier konnten Serumwerte gemessen werden, die die der anderen Carotinoide (auch des Lycopins) übertrafen. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit weisen darauf hin, dass auch Phytoen und Phytofluen UV-protective Wirkung beim Menschen haben und zum UV-Schutz beitragen können.

In vitro Untersuchungen zeigten auch, dass Lycopin, Phytoen und Phytofluen UV-induzierte Signalkaskaden in Fibroblasten und Keratinozyten beeinflussen

können. Die UV-induzierte Expression der Kollagenase (MMP-1) in Fibroblasten wurde vermindert, wenn die Zellen mit Lycopin für 48 Stunden inkubiert wurden.

Die durch UV-Bestrahlung erhöhte Interleukin-6-Produktion in Keratinozyten konnte durch die Inkubation der Zellen mit einem Phytoen/Phytofluen-Gemisch für 24 Stunden verringert werden.

Mithilfe eines Biomembranmodells wurden weiterhin die antioxidativen Eigenschaften von Carotinoiden untersucht. Dazu wurde eine Methode zur Bestimmung der Lipidperoxidation in unilamellaren Liposomen etabliert. Den besten Schutz der Lipidmembranen vor Oxidation wurde durch die polaren Xanthophylle und das apolare Phytoen erreicht. Keinen Effekt zeigte β -Carotin, während Lycopin sich als Prooxidans erwies.

Die vorliegende Arbeit zeigt auf, dass ein endogener Sonnenschutz durch Nahrungscarotinoide erzielt werden kann. Lycopin oder Abbauprodukte des Lycopins leisten einen Beitrag zur Photoprotektion der menschlichen Haut. Darüberhinaus scheinen Phytoen und Phytofluen einen zusätzlichen Schutzeffekt auszuüben.

6. Literatur

Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 35 des Lebensmittel- und Bedarfsgegenstände-Gesetz (LMBG), C Anleitung zur Erstellung von Rückstandsnachweisverfahren für die Amtliche Sammlung nach § 35 LMBG im Bereich der Tierarzneimittelrückstände in Lebensmitteln, Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin (BgVV, Hrsg.), S. 4

Andersson, PO, Takaichi, S, Cogdell, R, Gillbro, T (2001) Photophysical characterization of natural cis-carotenoids. *Photochem Photobiol* 74, 549-557

Armstrong, BK, Krickler, A (2001) The epidemiology of UV-induced skin cancer. *J Photochem Photobiol B* 63, 8-18

ATBC-Study Group (1994) The effect of vitamin E and beta-carotene on the incidence of lung cancer and other cancers in male smokers. *N Engl J Med* 330, 1029-1035

Aust, O, Sies, H, Stahl, W, Polidori, MC (2001) Analysis of lipophilic antioxidants in human serum and tissues: tocopherols and carotenoids. *J Chromatogr A* 936, 83-93

Aust, O, Ale-Agha, N, Zhang, L, Wollersen, H, Sies, H, Stahl, W (2002) Lycopene oxidation product enhances gap junctional communication. *Nutr Cancer* (eingereicht)

Baltschun, D, Beutner, S, Briviba, K, Martin, HD, Paust, J, Peters, M, Röver, S, Sies, H, Stahl, W, Steigel, A, Stenhorst, F (1997) Singlet oxygen quenching abilities of carotenoids. *Liebigs Ann/Recueil*, 1887-1893

Basu-Modak, S, Lüscher, P, Tyrrell, RM (1996) Lipid metabolite involvement in the activation of the human heme oxygenase-1 gene. *Free Radic Biol Med* 20, 887-897

Belitz, HD, Grosch, W (1992) *Lehrbuch der Lebensmittelchemie*, Belitz, HD, Grosch, W (Hrsg.), 4. Aufl., Springer, Berlin, S. 172-206

Ben-Dor, A, Nahum, A, Danilenko, M, Giat, Y, Stahl, W, Martin, HD, Emmerich, T, Noy, N, Levy, J, Sharoni, Y (2001) Effects of acyclo-retinoic acid and lycopene on activation of the retinoic acid receptor and proliferation of mammary cancer cells. *Arch Biochem Biophys* 391, 295-302

Berneburg, M, Gattermann, N, Stege, H, Grewe, M, Vogelsang, K, Ruzicka, T, Krutmann, J (1997) Chronically ultraviolet-exposed human skin shows a higher mutation frequency of mitochondrial DNA as compared to unexposed skin and the hematopoietic system. *Photochem Photobiol* 66, 271-275

Beutner, S, Bloedorn, B, Hoffmann, T, Martin, HD (2000) Synthetic singlet oxygen quenchers. *Methods Enzymol*, 319, 226-241

Black, HS (1987) Potential involvement of free radical reactions in ultraviolet light-mediated cutaneous damage. *Photochem Photobiol* 46, 213-221

Blattner, C, Bender, K, Herrlich, P, Rahmsdorf, HJ (1998) Photoproducts in transcriptionally active DNA induce signal transduction to the delayed U.V.-responsive genes for collagenase and metallothionein. *Oncogene* 16, 2827-2834

Bone, RA, Landrum, JT (1984) Macular pigment in Henle fiber membranes: a model for Haidinger's brushes. *Vision Res* 24, 103-108

Bone, RA, Landrum, JT, Tarsis, SL (1985) Preliminary identification of the human macular pigment. *Vision Res* 25, 1531-1535

Bone, RA, Landrum, JT, Cains, A (1992) Optical density spectra of the macular pigment in vivo and in vitro. *Vision Res* 32, 105-110

Bone, RA, Landrum, JT, Mayne, ST, Gomez, CM, Tibor, SE, Twaroska, EE (2001) Macular pigment in donor eyes with and without AMD: a case-control study. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 42, 235-240

Bowen, PE, Garg, V, Stacewicz-Sapuntzakis, M, Yelton, L, Schreiner, RS (1993) Variability of serum carotenoids in response to controlled diets containing six servings of fruits and vegetables per day. *Ann N Y Acad Sci* 691, 241-243

Brenneisen, P, Wlaschek, K, Wenk, J, Blaudschun, R, Hinrichs, R, Dissemond, J, Krieg, T, Scharffetter-Kochanek, K (1999) Ultraviolet-B induction of interstitial collagenase and stromelysin-1 occurs in human dermal fibroblasts via an autocrine interleukin-6 dependent loop. *FEBS Lett* 449, 36-40

Britton, G (1995a) Structure and properties of carotenoids in relation to function. *FASEB J* 9, 1551-1558

Britton, G (1995b) UV/visible spectroscopy, in: *Carotenoids, volume 1B: spectroscopy*, Britton, G, Liaaen-Jensen, Pfander, H (Hrsg.), Birkhäuser, Basel, Boston, Berlin, S. 13-62

Bruls, WA, Slaper, H, van der Leun, JC, Berrens, L (1984) Transmission of human epidermis and stratum corneum as a function of thickness in the ultraviolet and visible wavelengths. *Photochem Photobiol* 40, 485-494

Bucher, O, Wartenberg, H (1989) *Cytologie, Histologie und mikroskopische Anatomie des Menschen*, Bucher, O, Wartenberg, H (Hrsg.), 11. Aufl., Huber, Bern, Stuttgart, Toronto, S. 557-573

Buckmann, SY, Gresham, A, Hale, P, Hruza, G, Anast, J, Masferrer, J, Pentland, A (1998) COX-2 expression is induced by UVB in human skin: implications for the development of skin cancer. *Carcinogenesis* 19, 723-729

Burton, GW, Ingold, KU (1984) β -Carotene: an unusual type of lipid antioxidant. *Science* 224, 569-573

Cadenas, E, Sies, H (1998) The lag phase. *Free Radic Res* 28, 601-609

Chadwick, CA, Potten, CS, Nikaido, O, Matsunaga, T, Proby, C, Young, AR (1995) The detection of cyclobutane thymine dimers, (6-4) photolesions and the dewar photoisomers in sections of UV-irradiated human skin using specific antibodies, and the demonstration of depth penetration effects. *J Photochem Photobiol B* 28, 163-170

Chen, G, Djuric, Z (2001) Carotenoids are degraded by free radicals but do not affect lipid peroxidation in unilamellar liposomes under different oxygen tensions. *FEBS Lett* 505, 151-154

Chen, W, Tang, Q, Gonzales, MS, Bowden, GT (2001) Role of p38 MAP kinases and ERK in mediating ultraviolet B-induced cyclooxygenase-2 expression in human keratinocytes. *Oncogene* 20, 3921-3926

Clingen, PH, Arlett, CF, Cole, J, Waugh, APW, Lowe, JE, Harcourt, SA, Hermanova, N, Roza, L, Mori, T, Nikaido, O, Green, MHL (1995) Correlation of UVC and UVB cytotoxicity with the induction of specific photoproducts in T-lymphocytes and fibroblasts from normal human donors. *Photochem Photobiol* 61, 163-170

Crutzen, PJ (1992) Ultraviolet on the increase. *Nature* 356, 104-105

Dennis, LK (1999) Analysis of the melanoma epidemic, both apparent and real: data from the 1973 through 1994 surveillance, epidemiology and end results program registry. *Arch Dermatol* 135, 275-280

Devary, Y, Rosette, C, DiDonato, JA, Karin, M (1993) NF κ B activation by ultraviolet light is not dependent on a nuclear signal. *Science* 261, 1442-1445

Di Mascio, P, Kaiser, S, Sies, H (1989) Lycopene as the most efficient biological carotenoid singlet oxygen quencher. *Arch Biochem Biophys* 274, 532-538

DIN 32645 (1994) Chemische Analytik; Nachweis-, Erfassungs- und Bestimmungsgrenze; Ermittlung unter Wiederholbedingungen; Begriffe, Verfahren und Auswertung. Deutsches Institut für Normung e.V., Berlin

Djavaheri-Mergny, M, Mergny, JL, Bertrand, F, Santus, R, Masiere, C, Dubertret, L, Maziere, JC (1996) Ultraviolet A induces activation of AP-1 in cultured human keratinocytes. *FEBS Lett* 384, 92-96

Doerffel, K, Müller, H, Uhlmann, M (1986) *Prozeßanalytik*, VEB Deutscher Verlag für Grundstoffindustrie, Leipzig

El-Tinay, AH, Chichester, CO (1970) Oxidation of beta-carotene. Site of initial attack. *J Org Chem* 35, 2290-2293

Emri, G, Wenczl, E, van Erp, P, Jans, J, Roza, L, Horkay, I, Schothorst, AA (2000) Low doses of UVB or UVA induce chromosomal aberrations in cultured human skin cells. *J Invest Dermatol* 115, 435-440

Erdman, JW, Bierer, TL, Gugger, E (1993) Absorption and transport of carotenoids. *Ann NY Acad Sci* 691, 76-85

Feng, L, Xia, Y, Garcia, GE, Hwang, D, Wilson, CB (1995) Involvement of reactive oxygen intermediates in cyclooxygenase-2 expression induced by interleukin-1, tumor necrosis factor- α , and lipopolysaccharide. *J Clin Invest* 95, 1669-1675

Finkel, P (1995) Lichtschutzmittel, in: *Kosmetik*, Umbach, W (Hrsg.), 2.Aufl., Thieme, Stuttgart, New York, S. 147-164

Frank, HA, Cogdell, RJ (1996) Carotenoids in photosynthesis. *Photochem Photobiol.* 63, 257-264

Fuller, CJ, Faulkner, H, Bendich, A, Parker, RS, Roe, DA (1992) Effect of beta-carotene supplementation on photosuppression of delayed-type hypersensitivity in normal young men. *Am J Clin Nutr* 56, 684-690

Gaboriau, F, Morliere, P, Marquis, I, Moysan, A, Geze, M, Dubertret, L (1993) Membrane damage induced in cultured human skin fibroblasts by UVA irradiation. *Photochem Photobiol* 58, 515-520

Gabrielska, J, Gruszecki, WI (1996) Zeaxanthin (dihydroxy-beta-carotene) but not beta-carotene rigidifies lipid membranes: a ¹H-NMR study of carotenoid-egg phosphatidylcholine liposomes. *Biochim Biophys Acta* 1285, 167-174

Gärtner, C, Dissertation, Universität Potsdam, 1997

Garmyn, M, Ribaya-Mercado, JD, Russell, RM, Bhawan, J, Gilchrest, BA (1995) Effect of beta-carotene supplementation on the human sunburn reaction. *Exp Dermatol* 4, 104-111

Glantz, SA (1998) *Biostatistik*, Heinecke, A, Köpcke, W (Hrsg.), 4. Aufl., McGraw-Hill, Frankfurt /Main

Godar, DE (1999) Light and death: photons and apoptosis. *J Investig Dermatol Symp Proc* 4, 17-23

Gollnick, HPM, Hopfenmüller, W, Hemmes, C, Chun, SC, Schmid, C, Sundermeier, K, Biesalski, HK (1996) Systematic beta- carotene plus topical UV-screen are an optimal protection against harmful effects of natural UV-sunlight: results of the Berlin-Eilath study. *Eur J Dermatol* 6, 200-205

Goodman, DS, Blomstrand, R, Werner, B, Huang, HS, Shiratori, T (1966) The intestinal absorption and metabolism of vitamin A and β -carotene in men. *J Clin Invest* 45, 1615-1623

Grundmann, JU, Bockelmann, R, Bonnekoh, B, Gollnick, HP (2001) UV erythema reducing capacity of mizolastine compared to acetylsalicylic acid or both combined in comparison to indomethacin. *Photochem Photobiol* 74, 587-592

Gruszecki, WI, Siewewiesiuk, J (1990) Orientation of xanthophylls in phosphatidylcholine multibilayers. *Biochim Biophys Acta* 1023, 405-412

Hädrich, J, Vogelsang, J (1996) Konzept '96 zur Ermittlung von Nachweis-, Erfassungs- und Bestimmungsgrenze. Deutsche Lebensmittel Rundschau 92, 341-350

Ham, WT Jr, Mueller, HA, Ruffollo, JJ, Millen, JE, Cleary, SF, Guerry, RK, Guerry, D (1984) Basic mechanisms underlying the production of photochemical lesions in the mammalian retina. *Curr Eye Res* 3, 165-174

Hammarström, S, Lindgren, JA, Marcello, C, Duell, EA, Anderson, TE, Voorhees, JJ (1979) Arachidonic acid transformations in normal and psoriatic skin. *J Invest Dermatol* 73, 180-183

Hammond, BR Jr, Curran-Celentano, J, Judd, S, Fuld, K, Krinsky, NI, Wooten, BR, Snodderly, DM (1996) Sex differences in macular pigment optical density: relation to plasma carotenoid concentrations and dietary patterns. *Vision Res* 36, 2001-2012

Hammond, BR Jr, Johnson, E, Russell, RM, Krinsky, NI, Yeum, KJ, Edwards, RB, Snodderly, DM (1997) Dietary modification of human macular pigment density. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 38, 1795-1801

Handelman, GJ, Dratz, EA, Reay, CC, van Kuijk, FJGM (1988) Carotenoids in the human macula and whole retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 29, 850-855

Hanson, DL, De Leo, VA (1989) Long-wave ultraviolet radiation stimulates arachidonic acid release and cyclooxygenase activity in mammalian cells in culture. *Photochem Photobiol* 49, 423-430

Hanson, DL, De Leo, VA (1990) Long- wave ultraviolet light induces phospholipase activation in cultured human epidermal keratinocytes. *J Invest Dermatol* 95, 158-163

Hart, DJ, Scott, KJ (1995) Development and evaluation of an HPLC method for the analysis of carotenoids in foods, and the measurement of the carotenoid content of vegetables and fruits commonly consumed in the UK. *Food Chem* 54, 101-111

Hawk, JLM, Black, AK, Jaenicke, KF, Barr, RM, Soter, NA, Mallett, A, Gilchrest, BA, Hensby, CN, Parrish, JA, Greaves, MW (1983) Increased concentrations of arachidonic acid, prostaglandins E2, D2, and 6-oxo-F_{1α} and histamine in human skin following UVA irradiation. *J Invest Dermatol* 80, 496-499

Heinrich, U, Gärtner, C, Wiebusch, M, Eichler, O, Sies, H, Tronnier, H, Stahl, W (2003) Supplementation with beta-carotene or a similar amount of mixed carotenoids protects humans against UV-induced erythema. *J Nutr* 133, 98-101

Hemminki, K, Xu, G, Kause, L, Koulu, LM, Zhao, C, Jansen, CT (2002) Demonstration of UV-dimers in human skin DNA in situ 3 weeks after exposure. *Carcinogenesis* 23, 605-609

Herrmann, G, Wlaschek, M, Lange, TS, Prenzel, K, Goerz, G, Scharffetter-Kochanek, K (1993) UVA irradiation stimulates the synthesis of various matrix-metalloproteinases (MMPs) in cultured human fibroblasts. *Exp Dermatol* 2, 92-97

Hruza, LL, Pentland, AP (1993) Mechanism of UV-induced inflammation. *J Invest Dermatol* 100, 355-415

Isoherranen, K, Westermarck, J, Kahari, VM, Jansen, C, Punnonen, K (1998) Differential regulation of the AP-1 family members by UV irradiation in vitro and in vivo. *Cell Signal* 10, 191-195

Isoherranen, K, Punnonen, K, Jansen, C, Uotila, P (1999) Ultraviolet irradiation induces cyclooxygenase-2 expression in keratinocytes. *Br J Dermatol* 140, 1017-1022

Jezowska, I, Wolak, A, Gruszecki, WI, Strzalka, K (1994) Effect of beta-carotene on structural and dynamic properties of model phosphatidylcholine membranes. II. a 31 P-NMR and 13 C-NMR study. *Biochim Biophys Acta* 1194, 143-148

Johnson, EJ, Russell, RM (1992) Distribution of orally administered β-carotene among lipoproteins in healthy men. *Am J Clin Nutr* 56, 128-135

Jones, SA, McArdle, F, Jack, CI, Jackson, MJ (1999) Effect of antioxidant supplementation on the adaptive response of human skin fibroblasts to UV-induced oxidative stress. *Redox Rep* 4, 291-299

Junghans, A, Sies, H, Stahl, W (2001a) Macular pigments lutein and zeaxanthin as blue light filters studied in liposomes. *Arch Biochem Biophys* 391,160-164

Junghans, A, Sies, H, Stahl, W (2001b) Carotenoid-containing unilamellar liposomes loaded with glutathione: a model to study hydrophobic-hydrophilic antioxidant interactions. *Free Radic Res* 33, 801-808

Jurkiewicz, BA, Buettner, GR (1994) Ultraviolet-induced free radical formation in skin: an electron paramagnetic resonance study. *Photochem Photobiol* 59, 1-4

Kagan, V, Witt, E, Goldman, R, Scita, G, Packer, L (1992) Ultraviolet light-induced generation of vitamin E radicals and their recycling. A possible photosensitizing effect of vitamin E in skin. *Free Radic Res Commun* 16, 51-64

Kaplan, LA, Lau, JM, Stein, EA (1990) Carotenoid composition, concentrations, and relationships in various human organs. *Clin Physiol Biochem* 8, 1-10

Katiyar, SK, Matsui, MS, Elmets, CA, Mukhtar, H (1999) Polyphenolic antioxidant (-)-epigallocatechin-3-gallate from green tea reduces UVB-induced inflammatory responses and infiltration of leukocytes in human skin. *Photochem Photobiol* 69, 148 -153

Kennedy, TA, Liebler, DC (1992) Peroxyl radical scavenging by β -carotene in lipid bilayers. *J Biol Chem* 267, 4658-4663

Keyse, SM, Tyrrell, RM (1989) Heme oxygenase is the major 32-kDa stress protein induced in human skin fibroblasts by UVA radiation, hydrogen peroxide, and sodium arsenite. *Proc Natl Acad Sci USA* 86, 99-103

Khachik, F, Beecher, GR (1988) Separation and identification of carotenoids and carotenol fatty acid esters in some squash products by liquid chromatography. Quantification of carotenoids and related esters by HPLC. *J Agric Food Chem* 36, 926-937

Khachik, F, Spangler, CJ, Smith, JC Jr (1997) Identification, quantification, and relative concentrations of carotenoids and their metabolites in human milk and serum. *Anal Chem* 69, 1873-1881

Kindl, G, Raab, W (1998) *Licht und Haut*, Kindl, G, Raab, W (Hrsg.), 4. Aufl., Govi, Eschborn, S. 47-133

Klotz, LO, Holbrook, NJ, Sies, H (2001) UVA and singlet oxygen as inducers of cutaneous signaling events. *Curr Probl Dermatol* 29, 95-113

Kondo, S, Kooshesh, F, Sauder, DN (1997) Penetration of keratinocyte-derived cytokines into basement membrane. *J Cell Physiol* 171, 190-195

Krinsky, NI, Cornwell, DG, Oncley, JL (1958) The transport of vitamin A and carotenoids in human plasma. *Arch Biochem Biophys* 73, 233-246

Krinsky, NI (1993) Actions of carotenoids in biological systems. *Annu Rev Nutr* 13, 561-587

Krutmann, J, Ahrens, C, Roza, L, Arlett, CF (1996) The role of DNA damage and repair in ultraviolet B radiation-induced immunomodulation: relevance for human photocarcinogenesis. *Photochem Photobiol* 63, 394-396

Kulms, D, Pöppelmann, B, Yarosh, B, Luger, TA, Krutmann, J, Schwarz, T (1999) Nuclear and cell membrane effects contribute independently to the induction of apoptosis in human cells exposed to UVB radiation. *Proc Natl Acad Sci USA* 96, 7974-7979

Kunze, UR (1990) Grundlagen der quantitativen Analyse, Kunze, UR (Hrsg.), 3. Aufl., Thieme Verlag, Stuttgart, S. 8

Langley, RG, Sober, AJ (1997) A clinical review of the evidence for the role of ultraviolet radiation in the etiology of cutaneous melanoma. *Cancer Invest* 15, 561-567

Lee, J, Jiang, S, Levine, N, Watson, RR (2000) Carotenoid supplementation reduces erythema in human skin after simulated solar radiation exposure. *Proc Soc Exp Biol Med*, 223, 170-174

Lim, BP, Nagao, A, Terao, J, Tanaka, K, Suzuki, T, Takama, K (1992) Antioxidant activity of xanthophylls on peroxy radical-mediated phospholipid peroxidation. *Biochim Biophys Acta* 1126, 178-184

Lowe, GM, Booth, LA, Young, AJ, Bilton, RF (1999) Lycopene and β -carotene protect against oxidative damage in HT29 cells at low concentrations but rapidly lose this capacity at higher doses. *Free Radic Res* 30, 141-151

Mares-Perlman, JA, Brady, WE, Klein, R, Klein, BE, Bowen, P, Stacewicz-Sapuntzakis, M, Palta M (1995) Serum antioxidants and age-related macular degeneration in a population-based case-control study. *Arch Ophthalmol* 113, 1518-1523

Mares-Perlman, JA, Millen, AE, Ficek, TL, Hankinson, SE (2002) The body of evidence to support a protective role for lutein and zeaxanthin in delaying chronic disease. Overview. *J Nutr* 132, 518S-524S

Marshall, J (1985) Radiation and the ageing eye. *Ophthal Physiol Opt* 5, 241-263

Martin, HD (1995) The function of natural colorants: the biochromes. *Chimica* 49, 45-68

Martin, HD, Ruck, C, Schmidt, M, Sell, S, Beutner, S, Mayer, B, Walsh, R (1999) Chemistry of carotenoid oxidation and free radical reactions. *Pure Appl Chem* 71, 2253-2262

Masaki, H, Atsumi, T, Sakurai, H (1995) Detection of hydrogen peroxide and hydroxyl radicals in murine skin fibroblasts under UVB irradiation. *Biochem Biophys Res Commun* 206, 474-479

Masaki, H, Okano, Y, Ochiai, Y, Obayashi, K, Akamatsu, H, Sakurai, H (2002) α -Tocopherol increases the intracellular glutathione level in HaCaT keratinocytes. *Free Radic Res* 36, 705-709

Mathews-Roth, MM, Pathak, MA, Parrish, JA, Fitzpatrick, TB, Kass, EH, Toda, K, Clemens, W (1972) A clinical trial of the effects of oral β -carotene on the responses of human skin to solar radiation. *J Invest Dermatol* 59, 349-353

Mathews-Roth, MM, Pathak, MA (1975) Phytoene as a protective agent against sunburn (> 280 nm) radiation in guinea pigs. *Photochem Photobiol* 21, 261-263

Mathews-Roth, MM, Pathak, MA, Fitzpatrick, TB, Harber, LH, Kass, EH (1977) Beta-carotene therapy for erythropoietic protoporphyria and other photosensitivity diseases. *Arch Dermatol* 113, 1229-1232

Mathews-Roth, MM (1982) Antitumor activity of β -carotene, canthaxanthin and phytoene. *Oncology* 39, 33-37

Mayne, ST (1996) Beta-carotene, carotenoids, and disease prevention in humans. *FASEB J* 10, 690-701

Mayne, ST, Handelman, GJ, Beecher, G (1996) Beta-Carotene and lung cancer promotion in heavy smokers-a plausible relationship? *J Natl Cancer Inst* 88, 1513-1515

Mayne, ST, Cartmel, B, Silva, F, Kim, CS, Fallon, BG, Briskin, K, Zheng, T, Baum, M, Shor-Posner, G, Goodwin, WJ Jr (1998) Effect of supplemental beta-carotene on plasma concentrations of carotenoids, retinol, and alpha-tocopherol in humans. *Am J Clin Nutr* 68, 642-647

McKenzie, C, Park, RS, Brown, WR, Shivji, GS, Sauder, DN (1994) Effect of ultraviolet-inducible cytokines on melanoma growth in vivo: stimulation of melanoma growth by interleukin-1 and 6. *Photodermatol Photoimmunol Photomed* 10, 74-79

McVean, M, Liebler, DC (1999) Prevention of DNA photodamage by vitamin E compounds and sunscreens: role of ultraviolet absorbance and cellular uptake. *Mol Carcinog* 24, 169-176

Mecocci, P, Polidori, MC, Cherubini, A, Ingegneri, T, Mattioli, P, Catani, M, Rinaldi, P, Cecchetti, R, Stahl, W, Senin, U, Beal, MF (2002) Lymphocyte oxidative DNA damage and plasma antioxidants in Alzheimer disease. *Arch Neurol* 59, 794-798

Merk, H (1994) Haut, in: *Lehrbuch der Toxikologie*, Marquardt, H, Schäfer, SG (Hrsg.), BI-Wissenschaftsverlag, Mannheim, Leipzig, Wien, Zürich, S. 271-286

Miki, W (1991) Biological functions and activities of animal carotenoids. *Pure Appl Chem* 63, 141-146

Möller, H, Matthies, W (1995) Anwendungsgebiete kosmetischer Mittel, in: *Kosmetik*, Umbach, W (Hrsg.), 2. Aufl., Thieme, Stuttgart, New York, S. 25-57

Morliere, P, Moysan, A, Santus, R, Hüppe, G, Maziere, JC, Dubertret, L (1991) UVA-induced lipid peroxidation in cultured human skin fibroblasts. *Biochim Biophys Acta* 1084, 261-268

Morliere, P, Moysan, A, Tirache, I (1995) Action spectrum for UV-induced lipid peroxidation in cultured human skin fibroblasts. *Free Radic Biol Med* 19, 365-371

Moysan, A, Marquis, I, Gaboriau, F, Santus, R, Dubertret, L, Morliere, P (1992) Ultraviolet A-induced lipid peroxidation and antioxidant defense systems in cultured human skin fibroblasts. *J Invest Dermatol* 100, 692-698

Müller, H (1996) Determination of the carotenoid content in selected vegetables and fruit by HPLC and photodiode array detection. *Z Lebensm Unters Forsch A* 204, 88-94

Müller, K, Carpenter, KLH, Challis, IR, Skepper, JN, Arends, MJ (2002) Carotenoids induce apoptosis in the T-lymphoblast cell line Jurkat E6.1. *Free Radic Res* 36, 791-802

Offord, EA, Gautier, JC, Avanti, O, Scaletta, C, Runge, F, Kramer, K, Applegate, LA (2002) Photoprotective potential of lycopene, beta-carotene, vitamin E, vitamin C and carnolic acid in UVA-irradiated human skin fibroblasts. *Free Radic Biol Med* 32, 1293-1303

Olson, JA (1994) Absorption, transport, and metabolism of carotenoids in humans. *Pure Appl Chem* 66, 1011-1016

Omenn, GS, Goodman, GE, Thornquist, MD, Balmes, J, Cullen, MR, Glass, A, Keogh, JP, Meyskens, FL, Valanis, B, Williams, JH, Barnhart, S, Cherniack, MG, Brodtkin, CA, Hammar, S (1996) Risk factors for lung cancer and for intervention effects in CARET, the beta-carotene and retinol efficacy trial. *J Natl Cancer Inst* 88, 1550-1559

Ostro, MJ (1983) *Liposomes*, Ostro, MJ (Hrsg.), M Dekker, New York, Basel

Paetau, I, Khachik, F, Brown, ED, Beecher, GR, Kramer, TR, Chittams, J, Clevidence, BA (1998) Chronic ingestion of lycopene-rich tomato juice or lycopene supplements significantly increases plasma concentration of lycopene and related tomato carotenoids in humans. *Am J Clin Nutr* 68, 1187-1195

Palozza, P, Krinsky, NI (1992) Astaxanthin and canthaxanthin are potent antioxidants in a membrane model. Arch Biochem Biophys, 297, 291-295

Palozza, P (1998) Prooxidant actions of carotenoids in biological systems. Nutr Rev 56, 257-265

Pathak, MA (1982) Sunscreens: topical and systematic approaches for protection of human skin against harmful effects of solar radiation. J Am Acad Dermatol 7, 285-312

Pelz, R, Schmidt-Faber, B, Hesecker, H (1998) Die Carotinoidzufuhr in der Nationalen Verzehrsstudie. Z Ernährungswiss 37, 319-327

Pentland, AP, Mahoney, MH, Jakobs, S, Holtzmann, MJ (1999) Enhanced prostaglandine synthesis after ultraviolet injury is mediated by endogenous histamine stimulation. J Clin Invest 86, 566-574

Petit-Frere, C, Clinger, PH, Grewe, M, Krutmann, J, Roza, L, Arlett, CF, Green, MHL (1998) Induction of interleukin-6 production by ultraviolet radiation in normal human epidermal keratinocytes and in a human keratinocyte cell line is mediated by DNA damage. J invest Dermatol 111, 354-359

Podda, M, Traber, MG, Weber, C, Yan, LJ, Packer, L (1998). UV-irradiation depletes antioxidants and causes oxidative damage in a model of human skin. Free Rad Biol Med 24, 55-65

Polidori, MC, Cherubini, A, Stahl, W, Senin, U, Sies, H, Mecocci, P (2002) Plasma carotenoid and malondialdehyde levels in ischemic stroke patients: relationship to early outcome. Free Radic Res 36, 265-268

Pschyrembel (1994), Klinisches Wörterbuch, 257. Aufl., de Gruyter, Berlin, New York, S. 771

Reading, VM, Weale, RA (1974) Macular pigment and chromatic aberration.
J Opt Soc Am 64, 231-234

Rengel, D, Diez-Navajas, A, Serna-Rico, A, Veiga, P, Muga, A, Milicua, JC (2000)
Exogenously incorporated ketocarotenoids in large unilamellar vesicles. Protective
activity against peroxidation. Biochim Biophys Acta 1463, 179-187

Ribaya-Mercado, JD, Garmyn, M, Gilchrest, BA, Russell, RM, (1995) Skin lycopene
is destroyed preferentially over β -carotene during ultraviolet irradiation in humans.
J Nutr 125, 1854-1859

Ruck, C, Schmidt, M, Frixel, S, Ernst, H, Walsh, R, Martin, HD (2001) Assessment of
carotenoid function during antioxidant activity, in: Biologically-active phytochemicals
in food, Pfannhauser, EW, Fenwick, GR, Khokhar, S (Hrsg.), Royal Society of
Chemistry, Cambridge 2001, S. 307-310

Schalch W, Weber P (1994) Vitamins and carotenoids-a promising approach to
reducing the risk of coronary heart disease, cancer and eye diseases. Adv Exp Med
Biol 366, 335-350

Scharffetter, K, Wlaschek, M, Hogg, A, Bolsen, K, Schothorst, A, Goerz, G, Krieg, T,
Plewig, G (1991) UVA irradiation induces collagenase in human dermal fibroblasts in
vitro and in vivo. Arch Dermatol Res 283, 506-511

Scharffetter-Kochanek, K, Wlaschek M, Briviba K, Sies H (1993) Singlet oxygen
induces collagenase expression in human skin fibroblasts. FEBS Lett 33, 1304-1306

Scharffetter-Kochanek K, Wlaschek M, Brenneisen P, Schauen M, Blandschun R,
Wenk J (1997) UV-induced reactive oxygen species in photocarcinogenesis and
photoaging. Biol Chem. 378, 1247-1257

Schwarz, A, Ständer, S, Berneburg, M, Böhm, M, Kulms, D, van Steeg, H, Grosse-
Heitmeyer, K, Krutmann, J, Schwarz, T (2002) Interleukin-12 suppresses ultraviolet
radiation-induced apoptosis by inducing DNA repair. Nat Cell Biol 4, 26-31

Seddon, JM, Ajani, UA, Sperduto, RD, Hiller, R, Blair, N, Burton, TC, Farber, MD, Gragoudas, ES, Haller, J, Miller DT, Yannuzzi, LA, Willett, W (1994) Dietary carotenoids, vitamins A, C, and E, and advanced age-related macular degeneration. Eye Disease Case-Control Study Group. *J Am Med Assoc* 272, 1413-1420

Serraino, D, Fratino, L, Gianni, W, Campisi, C, Petropalo, M, Trimarco, G, Marigliano, V (1998) Epidemiological aspects of cutaneous malignant melanoma. *Oncol Rep* 5, 905-909

Siems, WG, Sommerburg, O, Hurst, JS, van Kuijk, JGM (2000) Carotenoid oxidative degradation products inhibit Na⁺-K⁺-ATPase. *Free Radic Res* 33, 427-435

Sies, H (1991) *Oxidative Stress: Oxidants and Antioxidants*, Sies, H (Hrsg.), Academic Press, New York

Sies, H, Stahl, W, Sundquist, AR (1992) Antioxidant functions of vitamins. Vitamins E and C, beta-carotene, and other carotenoids. *Ann N Y Acad Sci*, 669, 7-20

Sies, H, Krinsky, NI (1995) The present status of antioxidant vitamins and beta-carotene. *Am J Clin Nutr* 62 (Suppl), 1299S-1300S

Sies, H, Stahl, W (1998) Lycopene: antioxidant and biological effects and its bioavailability in the human. *Proc Soc Exp Biol Med* 218, 121-124

Sorg, O, Tran, C, Saurat, JH (2001) Cutaneous vitamins A and E in the context of ultraviolet- or chemically induced oxidative stress. *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol* 14, 363-372

Soriani, M, Rice-Evans, C, Tyrrell, RM (1998) Modulation of the UVA activation of haem oxygenase, collagenase, and cyclooxygenase gene expression by epigallocatechin in human skin cells. *FEBS Lett* 439, 253-257

Sparrow, JR, Zhou, J, Ben-Shabat, S, Vollmer, H, Itagaki, Y, Nakanishi, K (2002) Involvement of oxidative mechanisms in blue-light-induced damage to A2E-laden RPE. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 43, 1222-1227

Stahl, W, Schwarz, W, Sundquist, AR, Sies, H (1992) cis-trans Isomers of lycopene and β -carotene in human serum and tissues. *Arch Biochem Biophys* 294, 173-177

Stahl, W, Sies, H (1996) Lycopene: a biologically important carotenoid for humans? *Arch Biochem Biophys* 336,1-9

Stahl, W, Heinrich, U, Jungmann, H, von Laar, J, Schietzel, M, Sies, H, Tronnier, H (1998) Increased dermal carotenoid levels assessed by non-invasive reflection spectrophotometry correlate with serum in women ingesting Betatene. *J Nutr* 128, 903-907

Stahl, W, Heinrich, U, Jungmann, H, Sies H, Tronnier, H (2000) Carotenoids and carotenoids plus vitamin E protect against ultraviolet light-induced erythema in humans. *Am J Clin Nutr* 71, 795-798

Stahl, W, Heinrich, U, Wiseman, R, Eichler, O, Sies, H, Tronnier, H (2001) Dietary tomato paste protects against ultraviolet light-induced erythema in humans. *J Nutr* 131, 1449-1451

Sujak, A, Gabrielska, J, Grudzinski, W, Borc, R, Mazurek, P, Gruszecki, WI (1999) Lutein and zeaxanthin as protectors of lipid membranes against oxidative damage: the structural aspects. *Arch Biochem Biophys* 371, 301-307

Suschek, CV, Bruch-Gerharz, D, Kleinert, H, Forstermann, U, Kolb-Bachofen, V (2001) Ultraviolet A1 radiation induces nitric oxide synthase-2 expression in human skin endothelial cells in the absence of proinflammatory cytokines. *J Invest Dermatol* 117, 1200-1205

Suter, PM (2000) Effect of vitamin E, vitamin C, and beta-carotene on stroke risk. *Nutr Rev* 58, 184-187

Taylor, HR, Munoz, B, West, S, Bressler, NM, Rosenthal, FS (1990) Visible light and risk of age-related macular degeneration. *Am Ophth Soc* 88, 165-177

Urbanski, A, Schwarz, T, Neuner, P, Krutmann, J, Kirnbaum, R, Kock, A, Luger, TA (1990) Ultraviolet light induces increased circulating interleukin-6 in humans. *J Invest Dermatol* 94, 808-811

Vile, GF, Tanen-Ilitschew, A, Tyrrell, RM (1995) Activation of NF κ B in human skin fibroblasts by the oxidative stress generated by UVA radiation. *Photochem Photobiol* 62, 463-468

Vingerling, JR, Klaver, CCW, Hofman, A, de Jong, PT (1995) Epidemiology of age-related maculopathy. *Epidemiol Rev* 17, 347-360

Wald, G (1945) Human vision and the spectrum. *Science* 101, 653-658

Wang, XD, Russell, RM (1999) Procarcinogenic and anticarcinogenic effects of beta-carotene. *Nutr Rev* 57, 263-272

Whitcombe, DM, Carter, NP, Albertson, DG, Smith, SJ, Rhodes, DA, Cox, TM (1991) Assignment of the human ferrochelatase gene (FECH) and a locus for protoporphyria to chromosome 18q22. *Genomics* 11, 1152-1154

Williams, TJ, Peck, MJ (1977) Role of prostaglandin mediated vasodilatation in inflammation, *Nature* 270, 530-532

Wingerath, T, Sies, H, Stahl, W (1998) Xanthophyll esters in human skin. *Arch Biochem Biophys*, 355, 271-274

Wlaschek, M, Briviba, K, Stricklin, GP, Sies, H, Scharffetter-Kochanek, K (1995) Singlet oxygen may mediate the ultraviolet A-induced synthesis of interstitial collagenase. *J Invest Dermatol* 104, 194-198.

Wolf, C, Steiner, A, Hönigsmann, H (1988) Do oral carotenoids protect human skin against ultraviolet erythema, psoralen phototoxicity, and ultraviolet-induced damage? *J Invest Dermatol* 90, 55-57

Woodall, AA, Britton, G, Jackson, MJ (1997a) Carotenoids and protection of phospholipids in solution or in liposomes against oxidation by peroxy radicals: relationship between carotenoid structure and protective ability. *Biochim Biophys Acta* 1336, 575-586

Woodall, AA, Lee, SWM, Weesie, RJ, Jackson, MJ, Britton, G (1997b) Oxidation of carotenoids by free radicals: relationship between structure and reactivity. *Biochim Biophys Acta* 1336, 33-42

Yaar, MD, Gilchrist, BA (1990) Cellular and molecular mechanisms of cutaneous aging. *J Dermatol Surg Oncol* 16, 915-922

Young, A, Lowe, GM (2001) Antioxidant and prooxidant properties of carotenoids. *Arch Biochem Biophys* 385, 20-27

Young, RW (1988) Solar radiation and age-related macular degeneration. *Survey Ophthalmol* 32, 252-269

Young, RW (1994) The family of sunlight-related eye diseases. *Optom Vis Sci* 71, 125-144

Ziboh, VH, Lord, JT, Uematsu, S, Blick, G (1978) Activation of phospholipase A₂ and increased release of prostaglandin precursor from skin by ultraviolet irradiation. *J Invest Dermatol* 70, 211-224

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von 1999 – 2002 im Institut für Physiologische Chemie I der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf durchgeführt.

Mein besonderer Dank gilt daher Herrn Professor Dr. Wilhelm Stahl für die Überlassung des überaus interessanten Themas dieser Arbeit sowie die wissenschaftliche Betreuung im Verlauf der Durchführung.

Ebenso gilt mein Dank Herrn Professor Dr. Dr. Helmut Sies für vielfältige Anregungen und für die Möglichkeit, diese Arbeit in seinem Institut durchführen zu können.

Herrn Professor Dr. Hans-Dieter Martin (Institut für Organische und Makromolekulare Chemie I, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf) danke ich sehr für sein großes Interesse an dieser Arbeit und für die Übernahme des Korreferates.

Frau PD Dr. Ulrike Heinrich und Herrn Professor Dr. Hagen Tronnier (Institut für Experimentelle Dermatologie, Universität Witten-Herdecke) danke ich für die Kooperation. Darüber hinaus möchte ich mich sehr bei PD Dr. Peter Brenneisen, PD Dr. Lars-Oliver Klotz und Professor Dr. Tankred Schewe, aber auch bei Dr. Holger Steinbrenner, Cristy Ramos und Domink Stuhlmann für ihr stetes Bemühen um fachliche Beratungen und konstruktive Gespräche bedanken. Ein besonderer Dank gilt auch für Dr. Antonio Perez-Galvez für seine unermüdliche Hilfestellungen im Fach der organischen Chemie. Andrea Borchardt und Ferdinand Grawe (Institut für Genetik, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf) danke ich herzlich für die Aufnahme und Entwicklung der elektronenmikroskopischen Aufnahmen.

Ich danke weiterhin allen weiteren Mitarbeitern des Instituts für ein ausgezeichnetes Arbeitsklima aber auch für zahlreiche Hilfestellungen, insbesondere Dr. Darius Buchczk, Dr. Peet Schröder, PD Dr. Cristina Maria Polidori-Nelles, Nilofaar Ale-Agha, Alejandro Betancor, Ira Melchheier, Sabrina de Almeida Marques und Marlies Scholtes. Mein besonderer Dank gilt aber auch meinem Laborkollegen Peter Graf für seine stetige Hilfsbereitschaft in technischen und inhaltlichen Fragen und für die herausragend gute Arbeitsatmosphäre.

Nicht zuletzt möchte ich mich auch bei meinen Eltern, die mir diese Ausbildung erst ermöglichten, meiner Großmutter und bei meiner Sandra Quinting herzlichst bedanken, die mich während der Arbeit nach besten Kräften unterstützt haben und so zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.