

Aus dem Institut für
Physiologie, Physiologische Chemie und Tierernährung
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München

Geschäftsführender Vorstand:

Univ.-Prof. Dr. H.-J. Gabius

Arbeit angefertigt unter der Leitung von
Prof. Dr. W. A. Rambeck

**Der Einfluss der Carotinoide Lycopin und Lutein
auf den antioxidativen Status des Hundes**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von

Nicole Marion Nitschke, geb. Seiler
aus München

München 2005

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. A Stolle
Referent: Prof. Dr. W. Rambeck
Korreferent: Prof. Dr. M. El-Matbouli

Tag der Promotion: 11. Februar 2005

Meinen Eltern

INHALTSVERZEICHNIS

1. EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG	14
2. LITERATURÜBERSICHT.....	17
2.1. Carotinoide	17
2.1.1. Vorkommen	17
2.1.2. Chemische Struktur	17
2.1.3. Absorption, Transport und Verteilung im Körper	22
2.2. Allgemeine Funktionen und Wirkungen der Carotinoide	26
2.2.1. Carotinoide als farbgebende Pigmente.....	26
2.2.2. Carotinoide als Provitamine A	28
2.2.3. Einfluss von Carotinoiden auf das Fruchtbarkeitsgeschehen.....	29
2.2.4. Einfluss von Carotinoiden auf die Genexpression.....	31
2.2.4.1. Verbesserung der interzellulären Kommunikation über „Gap Junctions“	32
2.2.4.2. Einfluss auf Enzyme des Fremdstoffmetabolismus	33
2.2.5. Einfluss von Carotinoiden auf das Immunsystem	34
2.3. Antioxidative Wirkung	39
2.3.1. Reaktive Spezies.....	39
2.3.2. Schädigung von Biomolekülen	41
2.3.2.1. Lipidperoxidation	41
2.3.2.2. DNA-Schädigung	41
2.3.2.3. Schädigung von Aminosäuren und Proteinen	42
2.3.3. Schutzmechanismen des Körpers	42
2.3.3.1. Das antioxidative enzymatische System	43
2.3.3.2. Das antioxidative nicht-enzymatische System	44
2.3.3.3. Antioxidative Wirkmechanismen von Carotinoiden.....	47
2.3.3.3.1. Inaktivierung von Molekülen im Erregungszustand.....	47
2.3.3.3.2. Interaktion mit freien Radikalen.....	50
2.3.4. Oxidativer Stress	51
2.3.5. Degenerative Erkrankungen und oxidative Prozesse.....	53
2.3.5.1. Lungenerkrankungen – COPD.....	53
2.3.5.2. Vasculäre Erkrankungen – Atherosklerose / Coronary Heart Disease / Myokardinfarkt.....	55
2.3.5.3. Alterung und Tumorgenese	57
2.3.6. Antioxidative Effekte von Carotinoiden und deren chemopräventive Wirkungen.....	58
2.3.6.1. Antioxidative Effekte von Carotinoiden	59

2.3.6.2.	Positive Beeinflussung der Lungenfunktion bei Lungenerkrankungen	61
2.3.6.3.	Schutz vor dem Krankheitskomplex Artherosklerose / Coronary Heart Disease / Myokardinfarkt	62
2.3.6.4.	Anticancerogene Effekte von Carotinoiden.....	65
3.	MATERIAL UND METHODEN	71
3.1.	Versuchsaufbau	71
3.1.1.	Vorversuch	71
3.1.2.	Hauptversuch.....	73
3.1.2.1.	Versuchsperiode I	74
3.1.2.2.	Washout-Periode	75
3.1.2.3.	Versuchsperiode II.....	75
3.2.	Versuchstiere und ihre Haltung	77
3.2.1.	Hunde des Vorversuches.....	77
3.2.2.	Hunde des Hauptversuches	78
3.3.	Versuchsfutter	79
3.4.	Kapseln.....	81
3.5.	Blutentnahme.....	81
3.6.	Bearbeitung und Aufbewahrung der Proben.....	82
3.7.	Allgemeine Untersuchungsparameter.....	83
3.7.1.	Gesundheitszustand	83
3.7.2.	Gewichtsentwicklung	83
3.8.	Bestimmung der Plasmaresponse	84
3.9.	Untersuchung des antioxidativen Status	84
3.9.1.	Bestimmung der Trolox Equivalent Antioxidant Capacity (TEAC)	84
3.9.2.	Bestimmung der Vitamin E-Konzentration im Serum	88
3.9.3.	Bestimmung der Vitamin C-Konzentration im Serum	90
3.9.4.	Bestimmung der Enzyme Creatinkinase (CK) und Aspartat-Aminotransferase (AST).....	92
3.9.4.1.	Bestimmung der Creatinkinase (CK).....	92
3.9.4.2.	Bestimmung der Aspartat-Aminotransferase (AST)	93
3.9.5.	Bestimmung der Totalen und Latenten Eisenbindungskapazität (TEBK und LEBK).....	94
3.9.5.1.	Totale Eisenbindungskapazität (TEBK).....	94
3.9.5.2.	Latente Eisenbindungskapazität (LEBK).....	97

3.10.	Immunantwort.....	97
3.11.	Bestimmung des roten und weißen Blutbilds	98
3.12.	Statistische Methoden.....	98
4.	ERGEBNISSE	99
4.1.	Klinische Beobachtungen	99
4.1.1.	Gesundheitszustand	99
4.1.2.	Gewichtsentwicklung	99
4.2.	Plasmaresponse.....	100
4.2.1.	Vorversuch	100
4.2.1.1.	Lycopin	100
4.2.1.2.	Lutein	102
4.2.2.	Hauptversuch.....	103
4.2.2.1.	Lycopin	103
4.2.2.2.	Lutein	105
4.3.	Antioxidativer Status	108
4.3.1.	Trolox Equivalent Antioxidant Capacity (TEAC)	108
4.3.2.	Vitamine E und C	110
4.3.2.1.	Vitamin E	110
4.3.2.2.	Vitamin C.....	112
4.3.3.	Aspartat-Aminotransferase (AST) und Creatinkinase (CK)	114
4.3.3.1.	Aspartat-Aminotransferase (AST)	114
4.3.3.2.	Creatinkinase.....	116
4.3.4.	Totale und Latente Eisenbindungskapazität (TEBK und LEBK)	118
4.3.4.1.	Totale Eisenbindungskapazität	118
4.3.4.2.	Latente Eisenbindungskapazität.....	120
5.	DISKUSSION.....	123
5.1.	Diskussion des Versuchaufbaus und der Versuchsdurchführung	123
5.1.1.	Versuchstiere und ihre Haltung.....	123
5.1.1.1.	Vorversuch.....	123
5.1.1.2.	Hauptversuch.....	123
5.1.2.	Wirkstoffzuteilung und -verbreichung.....	124
5.1.3.	Laborbestimmungen	125

5.2. Diskussion der Ergebnisse	126
5.2.1. Plasmaperantwort.....	126
5.2.1.1. Vorversuch.....	126
5.2.1.2. Hauptversuch.....	129
5.2.2. Parameter des antioxidativen Status.....	134
5.2.2.1. Trolox Equivalent Antioxidant Capacity (TEAC).....	134
5.2.2.2. Vitamine E und C	138
5.2.2.3. Aspartat-Aminotransferase (AST) und Creatinkinase (CK).....	139
5.2.2.4. Totale und Latente Eisenbindungskapazität (TEBK und LEBK).....	142
6. ZUSAMMENFASSUNG.....	146
7. SUMMARY	148
8. LITERATURVERZEICHNIS.....	150
9. DANKSAGUNG.....	173
10. LEBENS LAUF.....	175

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

ABBILDUNG 1:	STRUKTURFORMEL VON LYCOPIN	19
ABBILDUNG 2:	STRUKTURFORMEL VON LUTEIN.....	20
ABBILDUNG 3:	BEISPIEL EINER KALIBRIERKURVE FÜR DIE TEAC-BESTIMMUNG	87
ABBILDUNG 4:	ENTWICKLUNG DES MITTLEREN KÖRPERGEWICHTS (KG) IN KG DER SECHS GRUPPEN WÄHREND DER VERSUCHSPERIODE I.....	99
ABBILDUNG 5:	ENTWICKLUNG DES MITTLEREN KÖRPERGEWICHTS (KG) IN KG DER FÜNF GRUPPEN WÄHREND DER VERSUCHSPERIODE II.....	100
ABBILDUNG 6:	PLASMAGEHALT AN LYCOPIN IN $\mu\text{G/L}$ INNERHALB VON 24 STUNDEN NACH EINMALIGER ORALER GABE VON 2 MG/KG KG LYCOPIN.....	127
ABBILDUNG 7:	PLASMAGEHALT AN LUTEIN IN $\mu\text{G/L}$ INNERHALB VON 24 STUNDEN NACH EINMALIGER ORALER GABE VON 2 MG/KG KG LUTEIN	128
ABBILDUNG 8:	PLASMAGEHALT AN LYCOPIN IN $\mu\text{G/L}$ DER SECHS VERSUCHSGRUPPEN WÄHREND DER VERSUCHSPERIODE I	132
ABBILDUNG 9:	PLASMAGEHALT AN LYCOPIN IN $\mu\text{G/L}$ DER FÜNF VERSUCHSGRUPPEN WÄHREND DER VERSUCHSPERIODE II	132
ABBILDUNG 10:	PLASMAGEHALT AN LUTEIN IN $\mu\text{G/L}$ DER SECHS VERSUCHSGRUPPEN WÄHREND DER VERSUCHSPERIODE I	133
ABBILDUNG 11:	PLASMAGEHALT AN LUTEIN IN $\mu\text{G/L}$ DER FÜNF VERSUCHSGRUPPEN WÄHREND DER VERSUCHSPERIODE II	133
ABBILDUNG 12:	BILDUNG DES MITTELWERTES AUS DEN ZEITPUNKTEN DER SUPPLEMENTIERUNGSPHASE (TAG 7 BIS 84).....	135
ABBILDUNG 13:	ZU- BZW. ABNAHME DES MITTELWERTES DER TEAC DER SUPPLEMENTIERUNGSPHASE (TAG 7 BIS 84) IM VERGLEICH ZUM AUSGANGSWERT (TAG 0) IN DER VERSUCHSPERIODE I OHNE BERÜCKSICHTIGUNG DES TAGES 7 IN %	135
ABBILDUNG 14:	ZU- BZW. ABNAHME DES MITTELWERTES DER TEAC DER SUPPLEMENTIERUNGSPHASE IM VERGLEICH ZUM AUSGANGSWERT (TAG 0) IN DER VERSUCHSPERIODE II IN %	137
ABBILDUNG 15:	ZU- BZW. ABNAHME DES MITTELWERTES DER AST UND CK DER SUPPLEMENTIERUNGSPHASE (TAG 7 BIS 84) IM VERGLEICH ZUM AUSGANGSWERT (TAG 0) IN DER VERSUCHSPERIODE I IN %.....	140
ABBILDUNG 16:	ZU- BZW. ABNAHME DES MITTELWERTES DER AST UND CK DER SUPPLEMENTIERUNGSPHASE (TAG 7 BIS 84) IM VERGLEICH ZUM AUSGANGSWERT (TAG 0) IN DER VERSUCHSPERIODE II IN %.....	141

ABBILDUNG 17: ZU- BZW. ABNAHME DES MITTELWERTES DER TEBK UND LEBK DER SUPPLEMENTIERUNGSPHASE (TAG 7 BIS 84) IM VERGLEICH ZUM AUSGANGSWERT (TAG 0) IN DER VERSUCHSPERIODE I IN %..... 143

ABBILDUNG 18: ZU- BZW. ABNAHME DES MITTELWERTES DER TEBK UND LEBK DER SUPPLEMENTIERUNGSPHASE (TAG 7 BIS 84) IM VERGLEICH ZUM AUSGANGSWERT (TAG 0) IN DER VERSUCHSPERIODE II IN %..... 144

TABELLENVERZEICHNIS

TABELLE 1: VORKOMMEN VERSCHIEDENER CAROTINOIDE IN DER NAHRUNG (HOLDEN ET AL., 1999)..... 17

TABELLE 2: LYCOPIN-GEHALTE VERSCHIEDENER OBST- UND GEMÜSESORTEN IN $\mu\text{G}/100\text{G}$ (HOLDEN ET AL., 1999) 19

TABELLE 3: LYCOPIN-GEHALTE VERSCHIEDENER TOMATENPRODUKTE IN $\mu\text{G}/100\text{G}$ (HOLDEN ET AL., 1999)..... 20

TABELLE 4: LUTEIN + ZEAXANTHIN-GEHALTE VERSCHIEDENER OBST- UND GEMÜSESORTEN IN $\mu\text{G}/100\text{G}$ (HOLDEN ET AL., 1999) 21

TABELLE 5: $^1\text{O}_2^*$ -QUENCHINGRATEN-KONSTANTEN (K_Q) IN BENZEN VON CAROTINOIDEN MIT UNTERSCHIEDLICHER ANZAHL VON DOPPELBINDUNGEN (N)..... 49

TABELLE 6: $^1\text{O}_2^*$ -QUENCHINGRATEN-KONSTANTEN (K_Q) IN BENZEN VON CAROTINOIDEN MIT GLEICHER ANZAHL VON DOPPELBINDUNGEN (N) UND UNTERSCHIEDLICHEN WELLENLÄNGEN DER MAXIMALEN ABSORPTION (λ_{MAX}) 49

TABELLE 7: ÜBERSICHT VERSUCHSPLAN VORVERSUCH LYCOPIN/LUTEIN (N=3 / GRUPPE) MIT DEN HUNDEN 1-9 UND DOSIERUNG DER WIRKSTOFFE IN MG/KG KÖRPERGEWICHT (KG)..... 73

TABELLE 8: WIRKSTOFFZUTEILUNG IN MG/KG KÖRPERGEWICHT (KG) IN VERSUCHSPERIODE I UND II DES HAUPTVERSUCHES (LYCO: LYCOPIN, LUT: LUTEIN)..... 76

TABELLE 9: VERSUCHSTIERE DES VORVERSUCHES, ALTER ZU VERSUCHSBEGINN IN JAHREN, GESCHLECHT (W: WEIBLICH) UND KÖRPERGEWICHT DER HUNDE (IN KG) WÄHREND DES ZEITRAUMES DES VORVERSUCHES 77

TABELLE 10: VERSUCHSTIERE DER VERSUCHSPERIODE I DES HAUPTVERSUCHES, VERSUCHSGRUPPE, ALTER ZU VERSUCHSBEGINN IN JAHREN, GESCHLECHT (M: MÄNNLICH, W: WEIBLICH, WK: WEIBLICH KASTRIERT) UND DURCHSCHNITTLICHES KÖRPERGEWICHT ($\text{MW} \pm \text{STABW}$) WÄHREND DES VERSUCHES (IN KG)..... 78

TABELLE 11:	VERSUCHSTIERE DER VERSUCHSPERIODE II DES HAUPTVERSUCHES, VERSUCHSGRUPPE, ALTER ZU VERSUCHSBEGINN IN JAHREN, GESCHLECHT (M: MÄNNLICH, W: WEIBLICH, WK: WEIBLICH KASTRIERT) UND DURCHSCHNITTLICHES KÖRPERGEWICHT (MW ± STABW) WÄHREND DES VERSUCHES (IN KG).....	79
TABELLE 12:	NÄHRSTOFFGEHALT DES VERSUCHSFUTTERS MERADOG LIGHT, NACH ANGABEN DES HERSTELLERS, IN PROZENT DER URSPRÜNGLICHEN SUBSTANZ (% US) UND IN PROZENT DER TROCKENSUBSTANZ (% TS).....	79
TABELLE 13:	MINERALSTOFF- UND VITAMINGEHALT DES VERSUCHSFUTTERS MERADOG LIGHT, NACH ANGABEN DES HERSTELLERS, IN G, MG BZW. INTERNATIONALEN EINHEITEN (I.E.) PRO KG FUTTER.....	80
TABELLE 14:	STANDARDS AUS VERDÜNNUNGEN DER 2,5 MM TROLOX-STAMMLÖSUNG MIT PBS-PUFFER ZUR ERSTELLUNG DER KALIBRIERKURVE	86
TABELLE 15:	PIPETTIERSHEMA FÜR DIE BESTIMMUNG DER TEBK.....	96
TABELLE 16:	MITTLERER LYCOPIN-GEHALT IM PLASMA DER DREI GRUPPEN IM VORVERSUCH ZU DEN ZEITPUNKTEN 0, 15 MINUTEN, 30 MINUTEN, EINE, ZWEI, DREI, VIER, FÜNF, SECHS, ACHT, ZEHN, ZWÖLF, 18 UND 24 STUNDEN NACH KAPSELGABE IN µG/L (MW ± STABW)	101
TABELLE 17:	MITTLERER LUTEIN-GEHALT IM PLASMA DER DREI GRUPPEN IM VORVERSUCH ZU DEN ZEITPUNKTEN 0, 15 MINUTEN, 30 MINUTEN, EINE, ZWEI, DREI, VIER, FÜNF, SECHS, ACHT, ZEHN, ZWÖLF, 18 UND 24 STUNDEN NACH KAPSELGABE IN µG/L (MW ± STABW)	102
TABELLE 18:	MITTLERER LYCOPIN-GEHALT IM SERUM DER SECHS GRUPPEN IN VERSUCHSPERIODE I ZU DEN ZEITPUNKTEN TAG 0, 7, 21, 56 UND 84 IN µG/L (MW ± STABW).....	104
TABELLE 19:	MITTLERER LYCOPIN-GEHALT IM SERUM DER FÜNF GRUPPEN IN VERSUCHSPERIODE II ZU DEN ZEITPUNKTEN TAG 0, 7, 21, 56 UND 84 IN µG/L (MW ± STABW).....	105
TABELLE 20:	MITTLERER LUTEIN-GEHALT IM SERUM DER SECHS GRUPPEN IN VERSUCHSPERIODE I ZU DEN ZEITPUNKTEN TAG 0, 7, 21, 56 UND 84 IN µG/L (MW ± STABW).....	106
TABELLE 21:	MITTLERER LUTEIN-GEHALT IM SERUM DER FÜNF GRUPPEN IN VERSUCHSPERIODE II ZU DEN ZEITPUNKTEN TAG 0, 7, 21, 56 UND 84 IN µG/L (MW ± STABW).....	107
TABELLE 22:	MITTLERE TROLOX EQUIVALENT ANTIOXIDANT CAPACITY (TEAC) IM SERUM DER SECHS GRUPPEN IN VERSUCHSPERIODE I ZU DEN ZEITPUNKTEN TAG 0, 7, 21, 56 UND 84 IN MMOL/L (MW ± STABW).....	108
TABELLE 23:	MITTLERE TROLOX EQUIVALENT ANTIOXIDANT CAPACITY (TEAC) IM SERUM DER FÜNF GRUPPEN IN VERSUCHSPERIODE II ZU DEN ZEITPUNKTEN TAG 0, 7, 21, 56 UND 84 IN MMOL/L (MW ± STABW).....	109

TABELLE 24:	MITTLERER VITAMIN E-GEHALT IM SERUM DER SECHS GRUPPEN IN VERSUCHSPERIODE I ZU DEN ZEITPUNKTEN TAG 0, 7, 21, 56 UND 84 IN $\mu\text{G/ML}$ (MW \pm STABW).....	111
TABELLE 25:	MITTLERER VITAMIN E-GEHALT IM SERUM DER FÜNF GRUPPEN IN VERSUCHSPERIODE II ZU DEN ZEITPUNKTEN TAG 0, 7, 21, 56 UND 84 IN $\mu\text{G/ML}$ (MW \pm STABW).....	112
TABELLE 26:	MITTLERER VITAMIN C-GEHALT IM SERUM DER SECHS GRUPPEN IN VERSUCHSPERIODE I ZU DEN ZEITPUNKTEN TAG 0, 7, 21, 56 UND 84 IN $\mu\text{G/ML}$ (MW \pm STABW).....	113
TABELLE 27:	MITTLERER VITAMIN C-GEHALT IM SERUM DER FÜNF GRUPPEN IN VERSUCHSPERIODE II ZU DEN ZEITPUNKTEN TAG 0, 7, 21, 56 UND 84 IN $\mu\text{G/ML}$ (MW \pm STABW).....	114
TABELLE 28:	MITTLERER ASPARTAT-AMINOTRANSFERASE (AST)-GEHALT IM SERUM DER SECHS GRUPPEN IN VERSUCHSPERIODE I ZU DEN ZEITPUNKTEN TAG 0, 7, 21, 56 UND 84 IN IU/L (MW \pm STABW).....	115
TABELLE 29:	MITTLERER ASPARTAT-AMINOTRANSFERASE (AST)-GEHALT IM SERUM DER FÜNF GRUPPEN IN VERSUCHSPERIODE II ZU DEN ZEITPUNKTEN TAG 0, 7, 21, 56 UND 84 IN IU/L (MW \pm STABW).....	116
TABELLE 30:	MITTLERER CREATINKINASE (CK)-GEHALT IM SERUM DER SECHS GRUPPEN IN VERSUCHSPERIODE I ZU DEN ZEITPUNKTEN TAG 0, 7, 21, 56 UND 84 IN IU/L (MW \pm STABW).....	117
TABELLE 31:	MITTLERER CREATINKINASE (CK)-GEHALT IM SERUM DER FÜNF GRUPPEN IN VERSUCHSPERIODE II ZU DEN ZEITPUNKTEN TAG 0, 7, 21, 56 UND 84 IN IU/L (MW \pm STABW).....	118
TABELLE 32:	MITTLERE TOTALE EISENBINDUNGSKAPAZITÄT (TEBK) DES SERUMS DER SECHS GRUPPEN IN VERSUCHSPERIODE I ZU DEN ZEITPUNKTEN TAG 0, 7, 21, 56 UND 84 IN MG/DL (MW \pm STABW).....	119
TABELLE 33:	MITTLERE TOTALE EISENBINDUNGSKAPAZITÄT (TEBK) DES SERUMS DER FÜNF GRUPPEN IN VERSUCHSPERIODE II ZU DEN ZEITPUNKTEN TAG 0, 7, 21, 56 UND 84 IN MG/DL (MW \pm STABW).....	120
TABELLE 34:	MITTLERE LATENTE EISENBINDUNGSKAPAZITÄT (LEBK) DES SERUMS DER SECHS GRUPPEN IN VERSUCHSPERIODE I ZU DEN ZEITPUNKTEN TAG 0, 7, 21, 56 UND 84 IN MG/DL (MW \pm STABW).....	121
TABELLE 35:	MITTLERE LATENTE EISENBINDUNGSKAPAZITÄT (LEBK) DES SERUMS DER FÜNF GRUPPEN IN VERSUCHSPERIODE II ZU DEN ZEITPUNKTEN TAG 0, 7, 21, 56 UND 84 IN MG/DL (MW \pm STABW).....	121

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ABTS	2,2'-Azino-bis(3-ethylbenz-thiazoline-6-sulfonsäure) diammonium Salz
ACF	aberrante Krypten (engl. Aberrant Crypt Foci)
ADP	Adenosindiphosphat
AFB ₁	Aflatoxin B ₁
AFM ₁	Aflatoxin M ₁
ALT	Alanin-Aminotransferase
AMD	Age related Macula Degeneration
Asc	Ascorbat
Asc [•]	Ascorbyl-Radikale
AST	Aspartat-Aminotransferase
ATP	Adenosintriphosphat
CAR	Carotinoid
CAT	Katalase
CCl ₃ [•]	Trichloromethyl-Radikal
CCl ₄	Tetrachlorkohlenstoff
CHD	Coronary Heart Disease
CD	Cluster of Differentiation
CHL	Chlorophyll
³ CHL *	Chlorophyll im Triplett-Zustand
COPD	chronische obstruktive Lungenerkrankung (engl. Chronic Obstructive Pulmonary Disease)
CoQ [•]	Ubisemichinon-Radikal
CoQH ₂	Coenzym Q10, reduzierte Form (Ubichinol)
CK	Creatinkinase
CuZnSOD	Kupfer-Zink-Superoxid-Dismutase
CYP	Cytochrom P450
d	Tag
DEN	Diethylnitrosamin
DMBA	7,12-dimethylbenz(a)anthrazen
DNA	Desoxyribonukleinsäure (engl. Desoxyribonucleic Acid)
DTH	verzögerte zelluläre Typ-IV-Reaktion (engl. Delayed Type Hypersensitivity)

EIA	Exercise-Induced Asthma
Fe ²⁺	Eisen (II)-Ion
Fe ³⁺	Eisen (III)-Ion
FEV ₁	exspiratorische Sekundenkapazität (engl. Forced Expiratory Volume)
FG	Füllgewicht
g	Gramm
GGPP	Geranylgeranyl-pyrophosphat
G6P-DH	Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase
GPT	Glutamat-Pyruvat-Transaminase
GPX	Glutathion-Peroxidase
GJC	Gap Junctional Communication
GSH	Glutathion, reduzierte Form
GSF	Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit
GSSG	Glutathion, oxidierte Form
GST	Glutathion-S-Transferase
GST-P1	Glutathion-S-Transferase-P1
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HDL	High Density Lipoprotein
HK	Hexokinase
HPLC	High Performance Liquid Chromatography, Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
hν	Photonen des Sonnenlichts
I.E.	Internationale Einheit
IFCC	International Federation of Clinical Chemistry
IFN-γ	Interferon-γ
IgG	Immunglobulin G
IgM	Immunglobulin M
IL	Interleukin
IMT	Intima-Media Thickness
IPP	Isopentenyl-diphosphat
isc	intersystem-crossing
IU	International Unit
K-EDTA	Kalium-Ethylen-Diamin-Tetra-Acetat
k _{et}	Ratenkonstante des Elektronentransfers

kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
k_{isc}	Ratenkonstante der Spinumkehr
$KM^{0,75}$	metabolische Körpermasse
k_q	$^1O_2^*$ -Quenchingraten-Konstante
L^\bullet	Alkyl-Radikal
LAAS	Los Angeles Atherosclerosis Study
LDH	Laktat-Dehydrogenase
LDL	Low Density Lipoprotein
LH	Fettsäure
LO_2H	Lipidperoxid
LO_2^\bullet	Lipidperoxid-Radikal
m	männlich
m^2	Quadratmeter
MCH	mittlerer Hämoglobingehalt der Einzelerythrozyten (engl. Mean Corpuscular Hemoglobin)
MCHC	mittlere Hämoglobinkonzentration der Erythrozyten (engl. Mean Corpuscular Hemoglobin Concentration)
MCP-1	Monozyten-Chemotaktisches-Protein-1
M-CSF	Makrophagen-Kolonie stimulierender Faktor
MCV	mittleres Erythrozytenvolumen (engl. Mean Corpuscular Volume)
MDA	Malondialdehyd
MDH	Malat-Dehydrogenase
mEH	mikrosomale Epoxid-Hydrolase
mg	Milligramm
MHC	Haupthistokompatibilitäts-Genkomplex (engl. Major Histocompatibility Complex)
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mm-LDL	minimally modified LDL
mmol	Millimol
mM	millimolar
MnSOD	Mangan-Superoxid-Dismutase

MW	arithmetischer Mittelwert
n	Anzahl
NADH	Nicotinamid-Adenosin-Dinucleotid, reduzierte Form
NADP	Nicotinamid-Adenin-Dinucleotidphosphat
NADPH	Nicotinamid-Adenin-Dinucleotidphosphat, reduzierte Form
NfE	stickstofffreie Extraktstoffe
nm	Nanometer
NO [•]	Stickstoffmonoxid
NO ₂ [•]	Stickstoffdioxid
OH [•]	Hydroxyl-Radikal
¹ O ₂ [*]	Singulett-Sauerstoff
O ₂	Sauerstoff
O ₂ ^{•-}	Superoxid-Radikal
ONOO ⁻	Peroxynitrit
oxLDL	oxidiertes Low Density Lipoprotein
PBMC	Peripheral Blood Mononuclear Cells
PBS	Phosphate Buffered Solution
PHA	Phytohämagglutinin
PNF	präneoplastische Herde (engl. Preneoplastic Foci)
ppm	parts per million
RO ₂ [•]	Peroxyl-Radikal
RO ₂ H	Hydroperoxid
ROS	reaktive Sauerstoffspezies (engl. Reactive Oxygen Species)
RNS	reaktive Stickstoffspezies (engl. Reactive Nitrogen Species)
SCC	Plattenepithelcarcinom (engl. Squamous Cell Carcinoma)
SENS	Sensitizer
¹ SENS*	Sensitizer im Singulettzustand
³ SENS*	Sensitizer im Triplettzustand
SOD	Superoxid-Dismutase
SRA	Scavenger Rezeptor A
Stabw	Standardabweichung
TAA	Total Antioxidant Activity
TBARS	Thiobarbitursäure-reaktive Substanzen (engl. Thiobarbituric Acid Reactive Substances)

TEAC	Trolox Equivalent Antioxidant Capacity
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
TS	Trockensubstanz
U/min	Umdrehungen pro Minute
uS	ursprüngliche Substanz
VLDL	Very Low Density Lipoprotein
w	weiblich
wk	weiblich kastriert
XME	Xenobiotic Metabolizing Enzyme
ZNS	zentrales Nervensystem
α -TH	α -Tocopherol
α -T \bullet	Tocopheryl-Radikale
λ_{\max}	Wellenlänge der maximalen Absorption
μ l	Mikroliter
μ m	Mikrometer
8-OhdG	8-Hydroxy-2'-deoxyguanosin

1. Einleitung und Problemstellung

Wie in der Humanmedizin nahm auch in der Tiermedizin die Häufigkeit von Neoplasien und degenerativen Erkrankungen drastisch zu. In der westlichen Welt sind Krebs und Herz-Kreislauf-Erkrankungen die häufigste Todesursache beim Menschen. Aber auch bei unseren Haustieren, unter anderem beim Hund, werden in zunehmendem Maße Tumorerkrankungen diagnostiziert.

Neben verschiedenen anderen Ursachen bestehen zahlreiche Hinweise darauf, dass oxidative Prozesse an der Entstehung und dem Fortschreiten dieser chronischen Erkrankungen sowie auch am Alterungsprozess beteiligt sind. Reaktive Spezies, z. B. Sauerstoffradikale, greifen Proteine, Lipide und die DNA an – es kommt zur Störung der normalen Zellfunktionen. Wenn reaktive Spezies die DNA beschädigen, kann es zu Mutationen und schließlich zur Veränderung des Genoms kommen. Zumal am Anfang jeder Tumorgenese immer die genetische Schädigung einer Zelle steht, kann das vermehrte Auftreten von reaktiven Spezies so die Entstehung von entarteten Zellen und somit schließlich von Tumoren fördern.

Unter physiologischen Umständen stellen diese reaktiven Spezies keine Bedrohung für den Organismus dar, da der Körper mit effizienten Schutzmechanismen ausgestattet ist. Ein Teil dieses Schutzes wird durch die im Blut enthaltenen Antioxidantien, wie z. B. den Carotinoiden, gewährleistet. Unter bestimmten Bedingungen kommt es jedoch zu oxidativem Stress. „Wird das Gleichgewicht zwischen oxidativer Belastung und antioxidativen Verteidigungssystemen auf die Seite der Prooxidantien verschoben, bezeichnet man dies als oxidativen Stress“ (Stahl, 2004). Dieses Ungleichgewicht ist u. a. darauf zurückzuführen, dass in der heutigen Zeit sowohl Mensch als auch Tier in zunehmendem Maße exogenen Faktoren wie Umwelt- und Luftverschmutzung ausgesetzt sind, die zum Entstehen von oxidativem Stress führen.

Mediziner, sowie Patienten und Tierbesitzer streben, auch angesichts der eingeschränkten Therapiemöglichkeiten chronischer degenerativer Erkrankungen, danach, alle Möglichkeiten auszuschöpfen, präventive Maßnahmen zu ergreifen, um derartige Erkrankungen gar nicht erst entstehen zu lassen. Die Ernährung kann

hierbei eine wichtige Rolle spielen. Epidemiologische Studien brachten zutage, dass der Konsum von Gemüse und Obst eine Reduktion des Risikos verschiedener Krebserkrankungen zur Folge hat (Block et al. 1992; Riboli und Norat, 2003). Da Obst und Gemüse hohe Gehalte an Carotinoiden aufweisen, lag die Annahme nah, dass diese in erster Linie für die protektiven Effekte verantwortlich sein könnten. Tatsächlich wurde auch eine inverse Beziehung zwischen der Carotinoidaufnahme bzw. dem Carotinoidgehalt des Serums und dem Auftreten verschiedener Krebserkrankungen festgestellt (Helzlsouer et al., 1989; Giovannucci et al., 1995; Van Poppel und Goldbohm, 1995).

Carotinoide sind Pigmente, die von vielen Pflanzen synthetisiert werden und ihnen ihre typische gelbe bis rote Färbung verleihen. Aufgrund ihrer chemischen Struktur sind sie dazu befähigt, Energie z. B. von Singulett-Sauerstoff zu übernehmen bzw. Elektronen an Radikale abzugeben – sie sind Antioxidantien. Dadurch werden andere empfindliche Moleküle vor oxidativen Schäden bewahrt. In vitro Studien zeigten, dass Carotinoide, wie z. B. Lycopin, sehr effiziente Inaktivatoren von Singulett-Sauerstoff sind (Di Mascio et al., 1989). Ergebnisse aus tierexperimentellen Studien wiesen auch auf eine antioxidative und anticancerogene Wirkung von Carotinoiden in vivo hin (Jain et al., 1999; Park et al., 1998).

So lag die Annahme nah, dass durch Zusatz dieser Antioxidantien zur Nahrung positive Effekte erzielt werden könnten. Da Hunde bestimmte Carotinoide, darunter Lycopin oder Lutein, aus der Nahrung aufnehmen können (Korytko et al., 2003; Cervený et al., 1998), besteht großes Interesse an der unterstützenden Verwendung und den möglichen antioxidativen Wirkungen verschiedener Carotinoide wie z. B. Lycopin oder Lutein im Futter der Tiere.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, in einem Vorversuch zunächst festzustellen, ob und in welchem Maße die Carotinoide Lycopin und Lutein nach einmaliger oraler Verabreichung von Hunden absorbiert werden und nach welcher Zeit ein Maximum im Blut erreicht wird. Anschließend sollte in einem aus zwei Versuchsperioden bestehenden Fütterungsversuch untersucht werden, inwieweit die Wirkstoffe nach täglicher oraler Verabreichung einen positiven Einfluss auf den antioxidativen Status der Hunde ausüben. Hierzu erhielten die Tiere die Carotinoide

einzelnen oder in Kombination mittels Gelatine-Kapseln zusammen mit dem Futter über einen Zeitraum von zweimal 84 Tagen. Die zur Beurteilung des antioxidativen Status im Serum bestimmten Parameter umfassten die antioxidative Kapazität, sowie antioxidative Vitamine und Enzyme als Indikatoren von Zellschädigung. Da auch Eisenionen an der Entstehung von Radikalen beteiligt sein können, wurden zusätzlich die Totale und die Latente Eisenbindungskapazität des Serums bestimmt.

2. Literaturübersicht

2.1. Carotinoide

2.1.1. Vorkommen

Carotinoide sind gelbe bis dunkelrote Pigmente, die von vielen Pflanzen, aber auch von photosynthesebetreibenden Mikroorganismen, synthetisiert werden und ihnen ihre typische gelbe bis rote Färbung verleihen. Gemüse wie Karotten und Süßkartoffeln enthalten große Mengen dieser Farbstoffe, doch auch in grünem Gemüse, z. B. Spinat und Grünkohl, sind sie anzutreffen, wobei ihre Farbe jedoch durch die dunkelgrüne Färbung des Chlorophylls überdeckt wird (siehe Tabelle 1).

Tabelle 1: Vorkommen verschiedener Carotinoide in der Nahrung (Holden et al., 1999)

Carotinoid	Vorkommen
β -Carotin	Karotten, Kürbis, Spinat, Süßkartoffel, Grünkohl
Lutein und Zeaxanthin	Spinat, Brokkoli, Erbse, Petersilie, Aprikose
Lycopin	Tomate, Wassermelone, Pink Grapefruit
Cryptoxanthin	Papaya, rote Paprika, Wassermelone, Orange

2.1.2. Chemische Struktur

Mehr als 600 Carotinoide wurden bis heute identifiziert, das bekannteste unter ihnen ist das β -Carotin. Die Carotinoide werden in zwei Hauptgruppen eingeteilt. Die erste Gruppe stellen die Carotine dar, die ausschließlich aus Kohlenwasserstoffverbindungen bestehen, wie z. B. β -Carotin und Lycopin. Die zweite Gruppe bilden

die Xanthophylle, auch Oxocarotinoide genannt, die ein oder mehrere Sauerstoffatome in Form von Hydroxyl-, Epoxy-, Aldehyd- oder Ketogruppen enthalten. Beispiele für Vertreter der Xanthophylle sind Zeaxanthin, Canthaxanthin oder Lutein.

Allen Carotinoiden gemeinsam ist ihre Zugehörigkeit zur Gruppe der Isoprenoide, d. h. sie sind aus Einheiten aus fünf Kohlenstoffatomen (Isopentenylpyrophosphaten, IPP) aufgebaut. Je ein Molekül IPP und Dimethylallyl-pyrophosphat, ein Isomer des IPP, bilden wiederum Geranyl-pyrophosphat, aus dem durch Anlagerung von zwei weiteren IPP schließlich Geranylgeranyl-pyrophosphat (GGPP) entsteht. Durch eine „Schwanz-zu-Schwanz-“ Verbindung durch Kondensation von zwei GGPP mittels Phytoensynthasen entsteht schließlich Phytoen, eine grundlegende Isoprenoidstruktur aus 40 Kohlenstoffatomen. Nach vier durch Phytoendesaturasen vermittelten Dehydrogenierungsschritten resultiert aus Phytoen letztlich Lycopin. Die Endgruppen dieses Grundgerüsts werden bei vielen Carotinoiden mit Hilfe von Zykласen zu Ringstrukturen modifiziert, woraus bei beidseitiger Modifizierung dizyklische und bei einseitiger monozyklische Carotinoide hervorgehen. Weiterhin können die Ringstrukturen mit Oxogruppen substituiert werden, woraus sich die Zugehörigkeit zur Gruppe der Xanthophylle ergibt (Hirschberg, 2001; Sandman, 2001). Aus ihrer Struktur erklärt sich, dass alle Carotinoide lipophil sind, wobei diese Eigenschaft bei den Carotinen noch ausgeprägter ist als bei den Xanthophyllen. Für die biologische Aktivität als Vorstufe von Vitamin A (sog. Provitamin A) ist das Vorhandensein einer nicht substituierten β -Ionon-Ringstruktur von Bedeutung.

Ein grundlegendes Merkmal aller Carotinoide ist das System aus konjugierten Doppelbindungen, das ihnen erlaubt, Lichtenergie zu absorbieren. Diese Tatsache erklärt auch ihre typische Färbung. Hier gehören die Elektronen nicht einem einzelnen Atom an, sondern vielmehr dem ganzen System, wodurch bei der Absorption von Licht die Energie des Photons auf das gesamte Molekül übertragen wird. Dieses wird dadurch vom energiearmen Grundzustand in einen energiereicheren Erregungszustand angehoben. Das Absorptionsspektrum der Carotinoide bewegt sich im blauen bis grünen Bereich des sichtbaren Lichts, d. h. zwischen 400 und 500 nm, so dass die meisten von ihnen als ein Gelbton wahrgenommen werden.

Lycopin, ein Carotin

Lycopin gehört der Gruppe der Carotine an, es besteht aus 40 Kohlenstoffatomen in linearer Anordnung ohne Ringstrukturen und enthält 13 Doppelbindungen, von denen elf miteinander in Konjugation stehen (siehe Abbildung 1). Dieses Carotinoid zeichnet sich durch seine extreme Lipophilie aus.

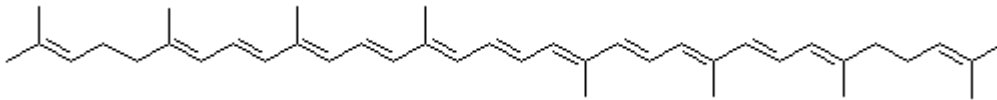


Abbildung 1: Strukturformel von Lycopin

Lycopin ist im Gegensatz zu anderen Carotinoiden, die in einer Vielzahl von Früchten und Gemüsesorten nachweisbar sind, vorwiegend in wenigen roten Früchten und Gemüsesorten anzutreffen, in denen es für die charakteristische Farbe verantwortlich ist: Hohe Konzentrationen sind in Tomaten und Tomatenprodukten wie Tomatenpaste („Tomatenmark“), -saft und -sauce nachzuweisen, daneben enthalten aber auch Wassermelone und Pink Grapefruit Lycopin (siehe Tabelle 2 und Tabelle 3). In der Ernährung des Menschen stammt der Großteil des aufgenommenen Lycopins aus Tomaten und Tomatenprodukten (Rao und Agarwal, 1999).

Tabelle 2: Lycopin-Gehalte verschiedener Obst- und Gemüsesorten in $\mu\text{g}/100\text{g}$ (Holden et al., 1999)

Obst- / Gemüsesorte	Lycopin in $\mu\text{g}/100\text{g}$
Wassermelone	4868
Tomaten	3025
Pink Grapefruit	1462
Persimmon	158
Aprikose	5

Tabelle 3: Lycopin-Gehalte verschiedener Tomatenprodukte in $\mu\text{g}/100\text{g}$ (Holden et al., 1999)

Tomatenprodukt	Lycopin in $\mu\text{g}/100\text{g}$
Tomatenpaste	29330
Ketchup	17008
Tomatensauce	15990
Tomatensaft	9318

Lutein, ein Xanthophyll

Lutein ist in der Natur vielfach anzutreffen und vorwiegend in gelben und grünen Gemüsen wie Spinat, Brokkoli, Kohlsorten und im Eidotter enthalten (siehe Tabelle 4). Es besteht wie Lycopin aus 40 Kohlenstoffatomen in linearer Anordnung und enthält elf konjugierte Doppelbindungen. An jedem Ende befinden sich jedoch zusätzlich eine Ringstruktur und eine Hydroxylgruppe, womit Lutein der Gruppe der Xanthophylle zuzuordnen ist (siehe Abbildung 2). Hieraus erklärt sich auch seine etwas geringere Lipophilie. Sowohl in Pflanzen als auch in Tieren kommt Lutein meist vergesellschaftet mit einem weiteren Xanthophyll, dem Zeaxanthin, vor. Deswegen werden diese beiden Xanthophylle oft gemeinsam aufgeführt.

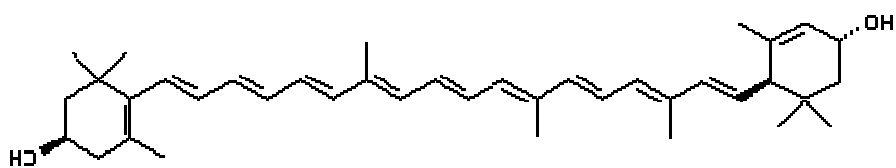
**Abbildung 2: Strukturformel von Lutein**

Tabelle 4: Lutein + Zeaxanthin-Gehalte verschiedener Obst- und Gemüsesorten in $\mu\text{g}/100\text{g}$ (Holden et al., 1999)

Obst- / Gemüsesorte	Lutein + Zeaxanthin in $\mu\text{g}/100\text{g}$
Grünkohl	39550
Spinat	11938
Brokkoli	2445
Rosenkohl	1590

Isomere

Carotinoide treten in verschiedenen Isomeren in Erscheinung. In den Pflanzen sind vorrangig all-trans-Konfigurationen anzutreffen, doch kann unter bestimmten Einflüssen wie Licht- und Hitzeexposition eine cis-trans-Isomerisierung stattfinden. So wird bei der Herstellung von Nahrungsmitteln genauso wie von Tierfuttermitteln die Bildung von cis-Isomeren induziert.

Bei Mensch und Tier ist im Plasma und den Organen im Gegensatz zur pflanzlichen Nahrung ein Großteil der Carotinoide als cis-Isomere vorzufinden (Boileau et al., 2002; Korytko et al., 2003). Man geht davon aus, dass im Körper eine Isomerisierung von trans- in cis-Konfigurationen stattfindet (Stahl et al., 1992).

Des Weiteren besteht die Annahme, dass in verschiedenen Organen, wie z. B. der Prostata oder der Leber, eine selektive Aufnahme bestimmter Isomere stattfindet (Stahl et al., 1992; Clinton et al., 1996). Verschiedene Faktoren können dabei eine Rolle spielen. So fanden Boileau et al. (2000) heraus, dass bei der Aufnahme von Lycopin in der Leber von Ratten neben dem Gehalt des Carotinoids in der Ration auch der Androgenstatus der Tiere einen Einfluss auf die Selektion der Isomere ausübte. Der Anteil an cis-Isomeren in der Leber von mit Lycopin supplementierten männlichen Ratten nahm zu, noch deutlicher war dieser Effekt bei orchiektomierten Ratten.

Eine andere Vermutung lässt jedoch die Erkenntnis aus Studien am lymphcannulierten Frettchen zu. Hiernach resultiert der erhöhte Gehalt von cis-Isomeren im Blut und in den Organen aus der Tatsache, dass cis-Lycopin besser bioverfügbar ist als trans-Lycopin. Boileau et al. (1999) führten diesen Effekt auf eine bessere Löslichkeit der cis-Isomere in den Gallensäuremizellen und eine bevorzugte

Inkorporation in die Chylomikronen zurück (siehe 2.1.3). Auch beim Vergleich der Aufnahme von Lycopin und seiner geometrischen Isomere aus hitzebehandeltem und unbehandeltem Tomatensaft beim Menschen ergab sich eine bessere Absorption von cis- als von all-trans-Isomeren (Stahl und Sies, 1992).

Im Widerspruch dazu stehen jedoch Studien von Stahl et al., die ergaben, dass die Konzentration der 9-cis-Form von β -Carotin nach oraler Verabreichung im Gegensatz zur all-trans-Form im Serum nicht (1993) und in den Chylomikronen bzw. VLDL des Serums viel schwächer anstieg (1995). Die Autoren sahen in der selektiven intestinalen Aufnahme eine mögliche Erklärung dieser Beobachtungen.

2.1.3. Absorption, Transport und Verteilung im Körper

Carotinoide werden von der Schleimhaut des Dünndarms, vornehmlich des Duodenums, absorbiert. Hierzu werden sie in Mizellen inkorporiert, die aus Gallensäuren, freien Fettsäuren, Monoglyzeriden und Phospholipiden zusammengesetzt sind. Dabei befinden sich die unpolaren Carotine fast ausschließlich im Inneren, die polareren Xanthophylle vorrangig an der Oberfläche der Mizellen, die schließlich von den Enterozyten aufgenommen werden. Man geht davon aus, dass es sich bei diesem konzentrationsabhängigen Prozess um passive Diffusion handelt (Erdman et al., 1993; Moore et al., 1996).

In den Enterozyten werden die Carotinoide entweder in Vitamin A umgewandelt oder unverändert in Chylomikronen eingegliedert und über das Lymphsystem in den Blutkreislauf abgegeben, mit dem sie schließlich in die Leber transportiert werden. Dort werden sie wiederum an Lipoproteine gebunden, die sie als Träger von der Leber aus im Organismus verteilen. Dabei ist zu beobachten, dass unpolare Carotine wie β -Carotin oder Lycopin vorrangig von LDL (Low Density Lipoproteine) (Traber et al., 1994), polarere Xanthophylle, wie z. B. Lutein, jedoch nahezu zu gleichen Teilen von HDL (High Density Lipoproteine) und LDL transportiert werden (Romanchik et al., 1995).

Die Carotinoide sind in den meisten Körperorganen nachzuweisen. In den Zielorganen bestehen Hinweise auf eine selektive Aufnahme. So lässt sich feststellen, dass Lycopin das vorrangige Carotinoid in der Prostata oder den Hoden

darstellt (Clinton et al., 1996; Stahl et al., 1992). In okulären Geweben wie der Retina und dem Ziliarkörper sind dagegen hauptsächlich Lutein und Zeaxanthin anzutreffen (Bernstein et al., 2001).

Hinsichtlich der Absorption von Carotinoiden bestehen große tierartliche Unterschiede. Carotinoide mit Provitamin A-Aktivität werden zu großen Teilen in den Enterozyten konvertiert und schließlich als Vitamin A absorbiert. Die Aufnahme von intakten Carotinoiden verhält sich zwischen verschiedenen Spezies sehr uneinheitlich. Diese großen Unterschiede müssen bei der Auswahl von Tiermodellen im Allgemeinen, aber insbesondere für die Humanmedizin berücksichtigt werden. Das ideale Modell müsste Carotinoide bei physiologischer Konzentration intakt absorbieren, sie in gleicher Weise wie der Mensch im Serum und den Geweben verteilen, geeignet für die zu untersuchenden Krankheiten und daneben noch leicht zu handhaben und kostengünstig sein. Da kein bekanntes Tiermodell all diese Voraussetzungen erfüllt, muss für jeden Zweck das jeweils geeignetste Modell ausgewählt werden (Lee et al., 1999).

Der Mensch wird zu den Spezies gezählt, die Carotinoide wie z. B. β -Carotin in einem gewissen Maß auch intakt absorbieren (Goodman et al., 1966). Dieses Ergebnis unterstützten viele Studien, die zeigten, dass der Anteil des vom Menschen intakt aufgenommenen β -Carotins trotz einer niedrigen Dosierung bei der Supplementierung bis zu 17,8% beträgt (Novotny et al., 1995).

Im Gegensatz dazu erwies eine Studie mit radioaktiv markiertem β -Carotin an Ratten bereits 1965, dass diese Tierart β -Carotin praktisch gar nicht intakt absorbieren kann (Huang und Goodman, 1965). Ribay-Mercado et al. (1989) und Krinsky et al. (1990) stimmten darin überein, dass nach oraler Gabe nur sehr geringe oder keine Konzentrationen des Carotinoids im Serum oder der Leber nachweisbar waren. Canthaxanthin und Lycopin konnten jedoch in verschiedenen Studien intakt von Ratten absorbiert werden (Mathews-Roth et al., 1990; Clark et al., 1998). Man geht heute davon aus, dass Ratten Carotinoide mit Provitamin A-Aktivität sehr effizient in Vitamin A umwandeln. In gewissem Maße und v. a. bei einer Fütterung von Diäten mit hohen Carotinoidkonzentrationen können sie jedoch auch intakt aufgenommen werden. Bei Mäusen verhielt es sich ähnlich. Es wurde die Absorption verschiedener Carotinoide wie z. B. Lutein (Park et al., 1998) oder Canthaxanthin (Palozza et al., 1998) nachgewiesen. Mongolische Gerbils absorbierten β -Carotin

auch bei physiologischer Konzentration in der Ration intakt (Pollack et al., 1994), beim domestizierten Frettchen ist ebenfalls die Absorption von β -Carotin (Ribaya-Mercado et al., 1989), daneben auch von anderen Carotinoiden wie z. B. Lycopin (Boileau et al., 1999) belegt. Bierer et al. (1995) wiesen nach, dass präruminante Kälber sowohl Xanthophylle (Lutein und Canthaxanthin) als auch Carotine (α -, β -Carotin und Lycopin) intakt absorbieren. Die Autorengruppe um Chew, Wong, Kim und Park führten mehrere Studien an Katzen und Hunden durch. Ihren Ergebnissen zu Folge wird β -Carotin sowohl von Katzen (Chew et al., 2000b) als auch von Hunden (Chew et al., 2000a; Chew et al., 2000c) intakt absorbiert. Daneben nehmen Hunde außerdem Lutein nach oraler Gabe auf (Kim et al., 2000a). Korytko et al. (2003) stellten bei Hunden eine Absorption von Lycopin nach oraler Verabreichung fest. Um einen vergleichbaren Plasmagehalt wie beim Menschen zu erreichen, war beim Hund jedoch eine wesentlich höhere Dosierung des Carotinoids nötig. Da Lycopin sichtbar mit dem Kot ausgeschieden wurde, vermuteten die Autoren beim Hund eine geringere Absorptionsrate als beim Menschen. Bei Primaten muss man zwischen Spezies unterscheiden, die Carotinoide kaum und solchen, die sie in größerem Maße absorbieren. Rhesusaffen gehören beispielsweise zu den Spezies, die in der Lage sind, Carotinoide wie z. B. β -Carotin (Krinsky et al., 1990), Canthaxanthin und Lycopin (Mathews-Roth et al., 1990) intakt aufzunehmen.

Einfluss auf die Absorption

Die Absorption von Carotinoiden im Darm ist von zahlreichen Faktoren abhängig. So spielt die Matrix der pflanzlichen Nahrung, in der die Pigmente enthalten sind, eine große Rolle (Castenmiller et al., 1998). Aus einer Triacylglycerol-Matrix, wie sie z. B. in rotem Palmöl anzutreffen ist, wird β -Carotin beispielsweise in sehr hohem Maße absorbiert. Ist es jedoch in Chloroplasten oder in Chromoplasten enthalten, sinkt der Grad der Absorption (Handelmann, 2001). Dies erklärt sich dadurch, dass die Carotinoide hier nicht frei, sondern an Proteine gebunden vorliegen und erst aus der jeweiligen Matrix freigesetzt werden müssen.

Des Weiteren hat auch die Lipophilie der Carotinoide einen Einfluss auf die Absorption aus dem Darm, welche in engem Zusammenhang mit der Fettverdauung und -absorption und damit mit dem Gallenfluss steht. So ist der Einbau in die Mizellen sowohl von der Polarität des Carotinoids als auch der

Fettsäurezusammensetzung der Mizelle abhängig (Borel et al., 1996). Abgesehen davon stellten Roels et al. bereits 1958 fest, dass der Zusatz von Fett zur Ration deutlich die Absorption von Carotinoiden verbesserte. Auch Jayarajan et al. (1980) beobachteten eine verbesserte Aufnahme und Utilisation von β -Carotin nach Zusatz von Öl zur Nahrung von Vitamin A-unterversorgten Kindern. Daraus wurde geschlossen, dass für die Aufnahme dieser Stoffe eine Mindestmenge an Fett in der Ration vorhanden sein muss (Castenmiller et al., 1998).

Bierer et al. stellten 1995 fest, dass beim präruminanten Kalb die polareren Xanthophylle Canthaxanthin und Lutein früher im Serum nachzuweisen waren und auch schneller wieder ausgewaschen wurden als die unpolaren Carotine α -Carotin, β -Carotin und Lycopin. Bei Versuchen mit Ratten, deren Mesenteriallymphgefäß cannuliert war, ergab sich zwar ein ähnlicher zeitlicher Verlauf der Absorption bei Canthaxanthin (Xanthophyll) und Lycopin (Carotin), es bestanden jedoch Unterschiede im Ausmaß der Absorption, die bei Canthaxanthin mit 16% deutlich höher war als bei Lycopin (6%) (Clark et al., 1998).

Wie bereits erwähnt spielt auch die cis-trans-Isomerisierung eine Rolle bei der Absorption der Carotinoide. Es bestehen jedoch widersprüchliche Ansichten über eine bessere Absorption von cis- bzw. trans-Isomeren (siehe 2.1.2).

Auch die Versorgung mit Vitamin A hat einen Einfluss auf die Absorption von Carotinoiden. So zeigten Sklan et al. (1989), dass nach Vitamin A-Supplementation nicht nur die Aufnahme von β -Carotin, einem Carotinoid mit Provitamin A-Aktivität (siehe 2.2.2), vermindert wird, sondern auch die von Canthaxanthin, das keine Provitamin A-Aktivität besitzt.

2.2. Allgemeine Funktionen und Wirkungen der Carotinoide

2.2.1. Carotinoide als farbgebende Pigmente

Carotinoide sind die am weitesten verbreiteten natürlichen Pigmente, sie sind in vielen Pflanzen und Tieren nachzuweisen und verleihen ihnen ihre typische Färbung. So erhalten Purpurbakterien ihre Purpur-, Braunalgen ihre Braunfärbung, Lachs sein rosafarbenes und Muscheln ihr gelbliches Muskelfleisch, Flusskrebse ihren schwarzen Panzer, eine Vielzahl von Vögeln und Reptilien ihre Gefieder- bzw. Hautfärbung durch Carotinoide (Vershinin, 1998).

In vielen Pflanzen sind verschiedene Carotinoide vorhanden, ihre Färbung spiegelt jedoch nur die Farbe des prädominanten Pigments wieder. So werden Carotinoide oft durch die dunkelgrüne Farbe des Chlorophylls überdeckt, z. B. in Gras, Spinat oder Grünkohl. Die Farbänderung von Blättern im Herbst, oft auch als „Indian Summer“ bezeichnet, veranschaulicht diese Tatsache sehr eindrucksvoll. Erst durch den Abbau von Chlorophyll werden die stabileren Carotinoide, wie z. B. β -Carotin aber v. a. Lutein, demaskiert und ihre gelbe Farbe tritt in Erscheinung (Henry et al., 1987; Matile, 2000).

Die Farbstoffe absorbieren mit Hilfe ihres Systems aus konjugierten Doppelbindungen (siehe 2.1.2) Licht im sichtbaren Bereich vornehmlich zwischen 400 und 500 nm. In den Lichtsammelfallen der photosynthesebetreibenden Pflanzen wird die aufgenommene Lichtenergie dann von den Carotinoiden an das Chlorophyll weitergeleitet, womit sie den Pflanzen neben Chlorophyll als akzessorische Pigmente zur Photosynthese dienen, indem sie das Absorptionsspektrum von Chlorophyll ergänzen (Siefertmann-Harms, 1985). Außerdem schützen sie das Chlorophyll und den Photosyntheseapparat vor Photooxidation (siehe 2.3.3.3.1).

Die Färbung von Blumen und Früchten durch Carotinoide besitzt überdies eine Lockfunktion. So wirkt die Farbe einer Vielzahl, insbesondere gelber und orangefarbener, Blumen und Früchte anziehend auf Tiere, auf die sie für ihre Fortpflanzung und Verbreitung angewiesen sind.

Auch in der Tierwelt haben die Carotinoide wichtige Funktionen als Farbstoffe inne. Die Färbung zahlreicher Tierarten stellt ein wichtiges spezies- und geschlechtsspezifisches Erkennungsmerkmal dar. So ist z. B. das Federkleid vieler Vogelarten durch Carotinoide gefärbt, die anhand dessen Artgenossen und Geschlechtspartner erkennen. Die Tiere nehmen die Pigmente über ihre Nahrung auf und lagern sie, z. T. sehr selektiv in die Federn ein. Beim Goldwaldsänger (*Dendroica petechia*), Weidengelbkehlchen (*Geothlypis trichas*) oder Abendkernbeißer (*Coccothraustes vespertinus*) z. B. wird deren intensive Gelbfärbung allein durch Lutein erzielt, wohingegen die meisten Spezies eine Mischung verschiedener Pigmente zum Färben ihres Federkleids benutzen (McGraw et al., 2003). Bei bestimmten Korallenfischen wird auch der soziale Status durch ein durch Carotinoide verändertes Farbmuster demonstriert. Ein weiteres Beispiel für deren vielfältige Funktionen in der Fauna stellt das Chamäleon dar, das Carotinoide in der Haut zu seiner Tarnung nutzt (Vershinin, 1998). Verschiedene Tiere, z. B. Pfeilgiftfrösche, weisen eine aposematische Färbung auf. Sie nutzen das durch ihre sehr bunten Farben auffällige Erscheinungsbild zur Warnung und Abschreckung von Fressfeinden.

In der modernen Nahrungsmittelindustrie finden Carotinoide als natürliche Farbstoffe Anwendung. So sind beispielsweise Lycopin und Lutein nach der Zusatzstoff-Zulassungsverordnung als E 160d bzw. E161b als Lebensmittelfarbstoffe zugelassen. In vielen Erfrischungsgetränken, Molkereiprodukten, Süßwaren, Saucen usw. werden sie zugesetzt, um eine für den Verbraucher ansprechende Färbung der Produkte zu erreichen. Daneben werden Carotinoide auch zur Färbung von Arzneimitteln und Kosmetikartikeln verwendet.

Carotinoide werden darüber hinaus auch Geflügel- und Fischfutter zugesetzt und dienen damit als indirekter Lebensmittelfarbstoff für Eidotter, Geflügelfleisch und -haut, sowie Muskulatur von Lachsen und Forellen.

2.2.2. Carotinoide als Provitamine A

Einige Carotinoide besitzen eine seit langem bekannte wichtige Funktion. Sie stellen die Vorläufer des Vitamin A, die sog. Provitamine A, dar. Essentiell für diese biologische Aktivität ist das Vorhandensein einer nicht substituierten β -Ionon-Ringstruktur. Mit einigen Ausnahmen wie der Katze und dem Nerz sind die meisten Säugetiere dazu befähigt, die Provitamine A in Vitamin A umzuwandeln. Hierzu werden die in den Pflanzen enthaltenen und mit der Nahrung aufgenommenen Carotinoide mit Hilfe von Enzymen der Darmschleimhaut, den sog. Oxygenasen, gespalten.

In vitro wurden zwei verschiedene Wege für diese Biokonversion nachgewiesen: Bei der zentralen Spaltung von β -Carotin teilt das Enzym β,β -Carotin-15,15'-monooxygenase (früher bezeichnet als β,β -Carotin-15,15'-dioxygenase) das β -Carotin an der zentralen Doppelbindung, wodurch aus einem Molekül β -Carotin zwei Moleküle Retinal hervorgehen (Leuenberger et al., 2001; Wyss et al., 2000), die anschließend zu Retinol reduziert werden. Wang et al. (1991-1993) beschrieben auch eine exzentrische Spaltung der Carotinoide in apo-Retinale und Retinoide (Retinal, Retinsäure) in vitro und in vivo, woraus aus einem Molekül β -Carotin demnach ein Molekül Vitamin A resultiert. Zu diesem Ergebnis kamen auch Brubacher und Weiser (1985), die die aus β -Carotin gewonnene Menge an Retinol bei Ratten und Hühnern bestimmten. Es gibt jedoch Hinweise darauf, dass die theoretisch maximale Umwandlungsrate nicht ausgeschöpft wird.

Nach der Umwandlung in das aktive Vitamin A wird dieses von den Enterozyten absorbiert, in Chylomikronen verpackt und über das lymphatische System in den Blutkreislauf abgegeben. Es wird vornehmlich in der Leber, in geringem Ausmaß auch in anderen Organen wie Niere, Lunge und Blut, gespeichert. Bei Hunden ist ein außergewöhnlich hoher Gehalt an Vitamin A in den Nieren nachzuweisen, dessen Ursache und Funktion noch nicht vollständig geklärt sind. Man stellte jedoch fest, dass die Niere im Vitamin A-Stoffwechsel bei Hunden aus eine besonderen Stellung einnimmt (Raila und Schweigert, 2002).

Einfluss auf die Konversion

Eine Vielzahl von Faktoren übt Einfluss auf die Umwandlung von β -Carotin aus. Es wurde festgestellt, dass die Konversions- genauso wie die Absorptionsrate von β -Carotin vom Vitamin A-Status des Körpers abhängig ist. So zeigte sich, dass bei Ratten, die eine Ration mit niedrigem Vitamin A-Gehalt erhielten, eine erhöhte Aktivität der Oxygenase im Darm nachweisbar war (Van Vliet et al., 1996a). Im Vergleich dazu war die Enzymaktivität von Tieren, die mit Vitamin A-reichem Futter gefüttert wurden, um 90% niedriger.

Daneben gibt es auch Hinweise darauf, dass andere Carotinoide wie z. B. Lutein die Konversion von β -Carotin in Retinal behindern können (Van Vliet et al., 1996b).

Die Zusammensetzung der Nahrung spielt ebenso eine Rolle bei der Gewinnung von Vitamin A aus Carotinoiden. Aus β -Carotin aus grünem Blattgemüse kann erheblich weniger Vitamin A gewonnen werden als beispielsweise aus in Öl gelöstem β -Carotin. Castenmiller et al. (1998) erklären sich dies anhand der Tatsache, dass hier die Matrix Einfluss auf die Absorption ausübt (siehe 2.1.3).

Im Übrigen ist im Hinblick auf die Konversion der Proteingehalt der Ration von Bedeutung, so stellten Gronowska-Senger und Wolf (1970) fest, dass ein niedriger Proteingehalt von 5% in der Ration die Oxygenase-Aktivität in Ratten vermindert.

2.2.3. Einfluss von Carotinoiden auf das Fruchtbarkeitsgeschehen

Es gibt viele Berichte, denen zufolge Carotinoide wie z. B. β -Carotin unabhängig von ihrer Vitamin A-Wirkung das Fruchtbarkeitsgeschehen positiv beeinflussen können. Bereits 1957 vermuteten Brüggemann und Niesar eine Beziehung zwischen β -Carotin und der Reproduktion des Rindes. Eine Reihe von Studien ergaben seither, dass sich ein β -Carotin-Mangel bei ausreichendem Vitamin A-Angebot negativ auf das Fruchtbarkeitsgeschehen von Milchvieh in Form von weniger stark ausgeprägten Brunstsymptomen, verzögerter Ovulation, einer erhöhten Brunstdauer, Ovarialzysten und einem schlechteren Befruchtungsergebnis auswirkte (Meyer et al., 1975; Lotthammer et al., 1976; Schams et al., 1977). Durch

eine anschließende β -Carotin-Supplementierung konnten die negativen Erscheinungen wieder weitgehend kompensiert werden. Es bestehen auch Hinweise darauf, dass der Mangel an β -Carotin zu frühembryonale Entwicklungsstörungen führen kann (Meyer et al., 1975; Lotthammer et al., 1976). All diese negativen Effekte wurden durch einen niedrigen β -Carotin-Gehalt der Ration bei ausreichender Vitamin A-Versorgung hervorgerufen, wodurch die Vitamin A-unabhängige Wirkung von β -Carotin belegt wurde. Cooke und Comden (1980) stellten bei Milchkühen mit β -Carotin-reichem Futter ebenfalls eine höhere Konzeptionsrate fest als bei Tieren mit geringer β -Carotin-Versorgung.

Auch bei anderen Tierarten wurde ein Einfluss von β -Carotin auf das Fortpflanzungsgeschehen nachgewiesen. So verringerten z. B. β -Carotin-Injektionen bei Sauen die embryonale Mortalität und erhöhten die Wurfgröße sowie die Ferkelgewichte (Chew, 1993). Einige Studien an Stuten ergaben ebenso positive Effekte, z. B. bei Atrophie der Ovarien (Azyklie, Anöstrie) oder Störungen der Follikelreifung (Ahlsweide und Konermann, 1980).

Auf der Suche nach Erklärungen für diese Wirkung auf das Fruchtbarkeitsgeschehen wurde ein direkter Zusammenhang zwischen β -Carotin und der Progesteronproduktion und -sekretion in den Corpora lutea festgestellt. Vor dem Hintergrund, dass in diesen grundsätzlich eine höhere Konzentration von β -Carotin nachweisbar ist als in anderen Organen, wie z. B. der Leber (Chew et al., 1984), wurde herausgefunden, dass der Progesterongehalt (Schultz et al., 1974) sowie die Entwicklung und die Größe der Corpora lutea (Meyer et al., 1975) bei Kühen mit niedriger β -Carotin-Versorgung vermindert waren. Auch in vitro-Versuche ergaben einen positiven Effekt von β -Carotin auf die Progesteronproduktion von bovinen und porcinen Lutealzellen (Talavera und Chew 1987 und 1988), bei dem Young et al. (1995) damit, dass das Carotinoid ein für die Synthese von Steroidhormonen wichtiges Enzym vor Schädigung durch Radikale schützt, einen Ansatz zur Erklärung dieses Effekts liefern wollten.

Grundsätzlich muss jedoch angemerkt werden, dass bei allen Tierarten zahlreiche Studien auch gegenteilige Ergebnisse hervorbrachten. So konnten Aréchiga et al. (1998b) im Widerspruch zu einer vorhergegangenen Studie (Aréchiga et al., 1998a), in der β -Carotin bei Gabe von mehr als 90 Tagen in einer erhöhten

Trächtigkeitsrate am Tag 120 resultierte, keinen positiven Effekt von β -Carotin auf das Fruchtbarkeitsgeschehen von Milchkühen nachweisen. Wie schon Meyer et al. (1975) und Lotthammer et al. (1976) feststellten, ist ein β -Carotin-Mangel in der Praxis meist nur ein Bestandteil des Ursachenkomplexes von Fertilitätsproblemen. Die positiven Auswirkungen einer β -Carotin-Supplementierung waren bei extremem β -Carotin-Mangel sehr deutlich. Dieser tritt unter praktischen Verhältnissen jedoch selten auf.

Auch bei einigen Untersuchungen an Stuten wurde kein Einfluss der Supplementierung von β -Carotin auf Parameter des Fruchtbarkeitsgeschehen wie z. B. die Progesteron- und Östradiolsekretion, den Follikeldurchmesser oder die Trächtigkeitsrate festgestellt (Peltier et al., 1997; Eitzer und Rapp, 1985). Peltier et al. (1997) schlussfolgerten aus den widersprüchlichen Ergebnissen, dass eine Supplementierung bei Tieren mit ausreichender β -Carotin-Versorgung keine Erhöhung der Progesteronproduktion hervorruft, dass bei unterversorgten Stuten jedoch eventuell Wirkungen erzielt werden könnten und deswegen weitere Untersuchungen angezeigt sind.

2.2.4. Einfluss von Carotinoiden auf die Genexpression

Carotinoide sind in der Lage, Einfluss auf die Genexpression zu nehmen. Diese Eigenschaft wird neben verschiedenen anderen als möglicher Mechanismus der anticancerogenen Effekte von Carotinoiden angesehen. Nachgewiesen wurden Wirkungen sowohl auf Transmembranproteine, die für die Zell-zu-Zell-Kommunikation verantwortlich sind als auch auf Enzyme, die bei der Entsorgung reaktiver Stoffe eine wichtige Rolle spielen. Es wird angenommen, dass Carotinoide und deren Derivate dabei an Rezeptoren im Zellkern binden und die Transkription modulieren (Sharoni et al., 2003).

2.2.4.1. Verbesserung der interzellulären Kommunikation über „Gap Junctions“

Eine Möglichkeit, mit Hilfe von Carotinoiden auf die Tumorgenese einzuwirken, stellt die Verbesserung der Zell-zu-Zell-Kommunikation über sog. „Gap Junctions“ dar.

Gap Junctions sind wassergefüllte, auch Connexons genannte Poren, die benachbarte Zellen miteinander verbinden. Sie setzen sich aus zwölf Transmembranproteinen, sog. Connexinen, zusammen, von denen sich je sechs in der Zellmembran der beteiligten Zelle befinden. Die Gap Junctions ermöglichen so den Austausch von kleinen Molekülen und Ionen zwischen den Zytoplasmen von Zellen durch passive Diffusion. Dadurch wird ein Synzytium geschaffen, das den Zellen erlaubt, Nährstoffe und Abfallprodukte, aber auch Signalstoffe untereinander auszutauschen. Es wird angenommen, dass die Kommunikation über Gap Junctions (Gap Junctional Communication (GJC)) damit eine wichtige Rolle bei der Regulierung des Zellwachstums, der Zelldifferenzierung und der Apoptose spielt. Loewenstein (1979) stellte die Hypothese auf, dass das Zellwachstum über die GJC kontrolliert wird, durch ausreichende GJC mit gesunden benachbarten Zellen soll die Zellproliferation gehemmt werden. Fällt diese Hemmung über Signalstoffe weg, könne es zu gesteigerter Proliferation und damit zur Entstehung von Tumoren kommen.

Tumorzellen stehen generell in geringem Informationsaustausch mit anderen Zellen, sie zeigen keine oder kaum GJC (Trosko und Chang, 2001) und entziehen sich so der Wachstumshemmung. Verschiedene Carotinoide, darunter β -Carotin, Canthaxanthin, Lutein, Lycopin und α -Carotin, konnten diese interzelluläre Verständigung nachweislich anregen (Zhang et al., 1991). Dadurch kann möglicherweise auch die Proliferation von Tumorzellen verhindert werden. Aust et al. (2003) wiesen nach, dass auch ein Abbauprodukt von Lycopin einen stimulierenden Effekt auf die GJC in Leberepithelzellen von Ratten hat. Da die Carotinoide lediglich vor der Entwicklung solider Tumore Wirkung zeigten, wird davon ausgegangen, dass sie als präventiv und nicht als therapeutisch wirksam einzustufen sind (Bertram, 1999).

Als Mechanismus der Verbesserung der GJC wird der Einfluss der Carotinoide auf die Genexpression angesehen. Es wurde eine Stimulation desjenigen Genes durch verschiedene Carotinoide (Lycopin, β -Carotin, Canthaxanthin) nachgewiesen, welches für das Transmembranprotein Connexin 43 kodiert (Zhang et al., 1992; Livny et al., 2002). Unter den bislang identifizierten Connexinen ist Connexin 43 das Transmembranprotein, welches am häufigsten vorkommt. Dieser Effekt war unabhängig von der Provitamin A-Aktivität und den antioxidativen Eigenschaften der Carotinoide. Bisher wurden im Zellkern keine Rezeptoren für Carotinoide gefunden (Silveira und Moreno, 1998), es wird jedoch vermutet, dass von Carotinoiden abgeleitete Moleküle an Retinsäure-Rezeptoren binden. Diese nukleären Rezeptoren binden selbst an bestimmte Sequenzen der DNA und beeinflussen so die Genexpression (Bertram, 1999).

2.2.4.2. Einfluss auf Enzyme des Fremdstoffmetabolismus

Carotinoide können außerdem die Enzyme der Fremdstoffmetabolismus, sog. Xenobiotic Metabolizing Enzymes (XME), beeinflussen, die für die Entsorgung schädlicher Stoffe im Körper zuständig sind. Es wird vermutet, dass sie im Zellkern auf Rezeptoren dieser Fremdstoffe einwirken, die die Expression von Cytochrom-Enzymen regulieren (Sharoni et al., 2003). Jewell und O'Brien (1999) untersuchten die Wirkung verschiedener Carotinoide auf die Induktion von Cytochrom P450 (CYP)-Isoenzymen. Dabei hatten Canthaxanthin und Astaxanthin eine Erhöhung bestimmter Isoenzyme sowohl in der Leber als auch in der Lunge und der Niere zur Folge. Die Autoren sind der Meinung, dass diese Modulation der Enzymaktivität von Cytochrom P450 die toxische Wirkung endo- und exogener Stoffe, und somit letztlich auch cancerogene, mutagene oder teratogene Prozesse beeinflussen kann. Diese Annahme wird durch die Ergebnisse der Studie von Gradelet et al. (1998) untermauert, bei der festgestellt wurde, dass die Cytochrom P450-induzierenden Carotinoide Canthaxanthin und Astaxanthin durch Aflatoxin B₁ (AFB₁) hervorgerufene präneoplastische Herde und DNA-Schäden in der Leber von Ratten verhindern können. So wurde beispielsweise das Ausmaß an DNA-Strangbrüchen vermindert und die Umwandlung des AFB₁ in das weniger genotoxische Aflatoxin M₁ (AFM₁) gefördert.

Es darf jedoch nicht vergessen werden, dass durch die Induktion von Cytochrom P450-Enzymen auch Reaktionen gefördert werden können, die eventuell negative Auswirkungen haben. Neben der Umwandlung von CCl_4 in CCl_3^\bullet können beispielsweise auch Procarcinogene durch das induzierte Cytochrom P450 in aktive Metabolite umgewandelt werden. Rauscher et al. (1998) stellten fest, dass durch Cryptoxanthin, β -Carotin und Lutein die Aktivität von Cytochrom P450-Enzymen reduziert wurde. Sie sahen darin die Ursache für die Herabsetzung der Mutagenität verschiedener Mutagene, da die metabolische Aktivierung ihrer Promutagene verhindert wurde. Somit verminderten Carotinoide auch in diesem Fall negative Prozesse, jedoch nicht durch die Induktion sondern durch die Hemmung der Induktion von Cytochrom P450-Enzymen.

Auch Astorg et al. (1997) sehen in der modulierenden Wirkung von Lycopin auf Cytochrom P450 die Ursache für die Verminderung von Diethylnitrosamin (DEN)-induzierten präneoplastischen Herde in der Leber von Ratten. Sie wiesen nach Lycopin-Supplementierung eine Abnahme der Größe und des Leberanteils von Rattenlebern nach, in dem diese präneoplastischen Herde vorkamen (Astorg et al., 1997). Damit sehen sie die Modulierung von CYP als einen Ansatz zur Erklärung anticancerogenen Wirkung von Carotinoiden. Die gleichen Autoren zeigten in einer früheren Studie (Gradelet et al., 1996), dass Lycopin die Aktivität desjenigen Isoenzym von Cytochrom P450 (CYP 2E1) erniedrigt, das für die Aktivierung des Carcinogens DEN verantwortlich ist.

2.2.5. Einfluss von Carotinoiden auf das Immunsystem

Carotinoide können das Immunsystem beeinflussen. Bereits 1930 zeigte eine Studie an Ratten ohne ausreichende Vitamin A-Versorgung, dass die Anzahl und der Schweregrad verschiedener Infektionen durch die Gabe von β -Carotin vermindert werden konnte (Green und Mellanby, 1930).

Kühe wiesen bei Zufütterung von β -Carotin und Vitamin A, jedoch nicht bei alleiniger Zufuhr von Vitamin A, einen geringeren Zellgehalt der Milch und eine geringere Inzidenz von Mastitiden nach dem Trockenstellen auf (Chew und Johnston, 1985; Dahlquist und Chew, 1985). Dies und die Tatsache, dass auch

Carotinoide ohne Provitamin A-Aktivität Effekte zeigen, wies auf eine Vitamin A-unabhängige Wirkung von Carotinoiden auf das Immunsystem hin. Bestätigt wurde dies auch durch Untersuchungen an Tieren wie der Katze, die β -Carotin nicht in Vitamin A konvertieren. Bei verschiedenen Tierarten wie z. B. dem Hund (Chew et al., 2000c), der Katze (Chew et al., 2000b), dem Kalb (Chew et al., 1993) oder dem Schwein (Chew et al., 1991a; Chew et al., 1991b) wurde eine Aufnahme von β -Carotin in die Lymphozyten nachgewiesen. In zahlreichen Studien wurden Effekte von Carotinoiden sowohl auf die humorale als auch auf die zelluläre Immunantwort demonstriert.

Humorale Immunantwort

In Studien an verschiedenen Tierarten wurde festgestellt, dass Carotinoide einen positiven Einfluss auf die humorale Immunantwort ausüben können. Sowohl in vitro als auch in vivo wurde eine Steigerung der Antikörperproduktion nach dem Kontakt mit Antigenen festgestellt. Daneben konnte die Anzahl der antikörperproduzierenden Zellen durch Carotinoide erhöht werden.

Jyonouchi et al. (1994) fanden heraus, dass Mäuse, denen Lutein, Astaxanthin oder β -Carotin verabreicht wurde, nach dem Kontakt mit einem T-Zell-abhängigen Antigen eine vermehrte Produktion von Antikörpern aufwiesen als Mäuse ohne Carotinoidgabe. Abgesehen davon war auch die Anzahl der IgM- und IgG-sezernierenden Zellen erhöht. Die Autoren stellten außerdem fest, dass ältere Mäuse eine geringere Antikörperproduktion zeigten als junge, und dass Astaxanthin diese reduzierte Produktion in älteren Tieren verbessern konnte. Sie nahmen an, dass dies auf eine Verstärkung der humoralen Immunantwort durch Carotinoide bei älteren Tieren hinweisen könnte. Des Weiteren zeigten Hunde, die über zwölf Wochen mit Lutein supplementiert wurden, nach der Impfung mit einer polyvalenten Vakzine deutlich erhöhte Plasmakonzentrationen von IgG (Kim et al., 2000a). Die Autoren sahen darin eine Möglichkeit, durch orale Gabe von Lutein die Antikörperproduktion nach Routineimpfungen verbessern zu können. Eine Erhöhung der IgG-Konzentration ließ sich auch bei mit Lutein supplementierten Katzen (Kim et al., 2000b) und bei mit β -Carotin supplementierten Hunden (Chew et al., 2000a) nachweisen.

Auch zahlreiche in vitro-Experimente mit Zellkulturen ergaben Hinweise auf eine Wirkung auf die humorale Immunantwort. Astaxanthin erhöhte z. B. sowohl die Anzahl von IgM- als auch von IgG-sezernierenden Zellen bei suboptimaler Antigenexposition (Jyonouchi et al., 1995). Okai und Higashi-Okai wiesen 1996 eine ebenfalls starke Erhöhung der Antikörperproduktion (IgM und IgG) von murinen Milzzellen unter Einfluss von Astaxanthin nach. Canthaxanthin erzielte eine mäßige Zunahme und bei β -Carotin war eine dosisabhängige Wirkung nachweisbar, bei der bei einer niedrigen β -Carotin-Konzentration im Gegensatz zu einer hohen keine Steigerung der Antikörperproduktion beobachtet wurde. Dass Unterschiede hinsichtlich der Wirkungen verschiedener Carotinoide bestehen, stellten auch Jyonouchi et al. (1996) fest.

Zelluläre Immunantwort

Doch nicht nur auf die humorale, sondern auch auf die zellvermittelte Immunreaktion zeigten Carotinoide Effekte. In vielen Studien wurde die Delayed-Type Hypersensitivity (DTH)-Reaktion der Haut als in vivo-Test zur Beurteilung der zellvermittelten Immunantwort herangezogen. Hierbei wurden Antigene (Vakzinen oder Phytohämagglutinin PHA) intradermal injiziert und daraufhin die Zunahme der Hautdicke als Folge der zellulären, vornehmlich durch T-Lymphozyten vermittelten, Immunantwort untersucht. Eine starke Zunahme der Hautdicke wies dabei auf eine gute zellvermittelte Immunantwort hin. Kim et al. stellten fest, dass die orale Gabe von Lutein eine erhöhte DTH-Antwort auf Vakzine und PHA bei Hunden (2000a) und auf Vakzine bei Katzen (2000b) hervorrief. Auch β -Carotin ergab bei Hunden eine Verstärkung dieser Hautreaktion (Chew et al., 2000a).

Nach Exposition von UV-Licht wird die DTH-Reaktion der Haut supprimiert. In einer Studie an jungen Männern kamen Fuller et al. (1992) zu dem Ergebnis, dass diese Unterdrückung durch die orale Gabe von β -Carotin bei Konsum einer ansonsten carotinoidarmen Diät vermindert werden kann. Herraiz et al. (1998) stellten eine inverse Beziehung des Plasma- β -Carotin-Gehalts und der Unterdrückung der DTH-Reaktion durch UV-Licht fest: Bei älteren Männern mit höherer Plasmakonzentration wurde diese Reaktion weniger stark unterdrückt. Daraus wurde geschlossen, dass β -Carotin gegen die Photosuppression der Immunabwehr schützen kann.

Während die DTH-Reaktion ein *in vivo*-Test ist, ermöglicht es die Betrachtung der Fähigkeit von isolierten Lymphoidzellen, in Anwesenheit eines Mitogens zu proliferieren, die T- und B-Zellfunktion *in vitro* zu beurteilen. Häufig dazu verwendete Mitogene sind Concanavalin A und PHA, die die T-Lymphozyten, Lipopolysaccharid, das die B-Lymphozyten und Pokeweed Mitogen, das sowohl die T- als auch die B-Lymphozyten stimuliert. Studien an Lymphozyten von zahlreichen Tierarten, wie z. B. Hunden (Kim et al., 2000a), Mäusen (Chew et al., 1996), Ratten (Bendich und Shapiro, 1986) oder Hühnern (Haq et al., 1996) zeigten, dass verschiedene Carotinoide, unter ihnen Lutein, Astaxanthin, β -Carotin und Canthaxanthin, die Rate der Lymphozytenproliferation erhöhen können. Auch auf der Suche nach einer Erklärung der möglichen Effekte von β -Carotin, das Euter von Milchkühen vor peripartalen Infektionen zu schützen, wurde bei mononukleären Zellen präpartal durch β -Carotin eine Steigerung der Concanavalin A-induzierten Proliferation hervorgerufen (Daniel et al., 1991b). Abgesehen davon waren Phagozyten von Milchkühen im peripartalen Zeitraum in Gegenwart von β -Carotin in erhöhtem Maße dazu in der Lage, *Staphylococcus aureus* *in vitro* zu töten (Daniel et al., 1991a).

Die DTH-Reaktion und die Ermittlung der Lymphozytenproliferationsrate stellen Tests dar, anhand derer die Lymphozytenfunktion beurteilt werden kann. Mit der Betrachtung der verschiedenen Lymphozytensubpopulationen und der Oberflächenmarker von antigenpräsentierenden Monozyten (z. B. Major Histocompatibility Complex (MHC) II) können Ansätze dazu geliefert werden, welche Mechanismen bei der Modellierung der zellulären Immunantwort durch Carotinoide eine Rolle spielen. Es wurde eine Erhöhung der Anzahl verschiedener Lymphozytensubpopulationen und MHC II festgestellt. Ein Anstieg der T-Helfer-Zellen ($CD4^+$) war z. B. bei Mensch (Alexander et al., 1985) und Hund (Chew et al., 2000a) nach β -Carotin-Gabe sowie bei Hund (Kim et al., 2000a) und Katze (Kim et al., 2000b) nach Lutein-Gabe zu verzeichnen. Kim et al. (2000a) stellten nach Luteinsupplementierung bei Hunden daneben auch eine Zunahme von zytotoxischen T-Zellen ($CD8^+$) fest.

Eine effektive zellvermittelte Immunabwehr setzt jedoch nicht nur eine ausreichende Anzahl von T-Zellen voraus, sondern auch eine funktionierende Zusammenarbeit zwischen diesen und den antigenpräsentierenden Zellen. Dabei erkennen die T-Helferzellen Antigene nur, wenn diese von den Monozyten, an den

MHC II gebunden, präsentiert werden. Kim et al. (2000a) fanden heraus, dass nach Luteingabe bei Hunden erhöhte Zahlen an Monozyten nachweisbar waren, die den Marker MHC II auf ihrer Oberfläche aufwiesen. Auch beim Menschen wurde ein vermehrtes Auftreten von Monozyten mit MHC II nach Verabreichung von β -Carotin festgestellt (Hughes et al., 1997).

Daraus konnte gefolgert werden, dass die Zunahme dieser Oberflächenmoleküle durch Carotinoide eine Ursache der verbesserten zellvermittelten Immunantwort darstellt.

Zytokine

Auch die von Makrophagen und T-Helferzellen produzierten Zytokine besitzen wichtige Funktionen der zellvermittelten Immunreaktion. So ist z. B. Interferon- γ (IFN- γ) unter anderem für die Makrophagenaktivierung, Interleukin-1 (IL-1) daneben auch für die Aktivierung von T-Zellen von Bedeutung. Andere Zytokine wie z. B. IL-4 und IL-5 leisten antikörperproduzierenden B-Zellen Hilfe und unterstützen damit die humorale Immunantwort. Es gibt Studien, die zeigten, dass Carotinoide die Produktion von Zytokinen beeinflussen und somit die Immunreaktion modulieren können. Okai und Higashi-Okai (1996) ermittelten eine erhöhte Freisetzung von IL-1 α und TNF- α aus murinen Makrophagen in vitro nach Zusatz von Astaxanthin, Canthaxanthin und β -Carotin. Beim Hamster wurde nach lokaler Injektion von β -Carotin oder Canthaxanthin neben der Regression von chemisch induzierten Backentaschentumoren auch eine Erhöhung der TNF- α -Produktion von Makrophagen in diesem Gewebe festgestellt (Schwartz et al., 1986).

Es wurden jedoch in zahlreichen Studien auch Ergebnisse gewonnen, die im Widerspruch zu den bisher genannten stehen. Einige Autoren konnten keine signifikanten positiven Effekte von Carotinoiden auf die DTH-Reaktion (Santos et al., 1997), die Lymphozytenproliferation (Brown et al., 1997; Santos et al., 1997; Chew et al., 2000a; Corridan et al., 2001) oder die Lymphozytensubpopulationen (Murata et al., 1994; Santos et al., 1997) und die Oberflächenmoleküle (Corridan et al., 2001) feststellen. Auch hinsichtlich der Zytokinproduktion gibt es sowohl aus in vivo (Kim et al., 2000a; Chew et al., 2000a; Corridan et al., 2001; Santos et al., 1997) als auch aus in vitro Versuchen (Jyonouchi et al., 1996) vielfach Ergebnisse, die nicht auf eine derartige Wirkung von Carotinoiden hinweisen.

Einige Autoren schlussfolgerten aus ihren Untersuchungen, dass die zellvermittelten Immunreaktionen von Individuen ohne Mangelsituationen in ihrer Ernährung nicht durch den Zusatz von Carotinoiden zur Nahrung zu beeinflussen sei (Watzl et al., 2000; Corridan et al., 2001).

In ihrer Eigenschaft, das Immunsystem positiv beeinflussen zu können, wird ein weiterer Erklärungsansatz für die anticancerogene Wirkung der Carotinoide gesehen. Das Erkennen und die Eliminierung von Tumorzellen durch Zellen des Immunsystems stellen einen wichtigen Bestandteil der Abwehr der Tumorgenese dar. Hierzu ist eine funktionierende Kommunikation unter den Immunzellen essentiell, die durch Oberflächenmoleküle und Zytokine gewährleistet wird. Zytokine wirken allgemein zellregulatorisch, bestimmte von ihnen, wie z. B. TNF- α und IFN- γ , haben auch antiproliferative Effekte (siehe 2.3.6.4). Vorrangig werden jedoch die antioxidativen Effekte der Carotinoide für die anticancerogene Wirkung verantwortlich gemacht.

2.3. Antioxidative Wirkung

2.3.1. Reaktive Spezies

Lebende Zellen von Mensch und Tier sind einerseits zur Energieproduktion auf molekularen Sauerstoff (O_2) angewiesen, andererseits besitzt Sauerstoff jedoch auch Eigenschaften, die für den Körper Gefahren darstellen. Dass aerobe Spezies ohne Sauerstoff nicht überleben können, dieser jedoch gleichzeitig eines der stärksten natürlichen Oxidantien ist, hat dazu geführt, diese Situation auch als „oxygen paradox“ zu bezeichnen (Elsayed, 2001). So entstehen aus O_2 ständig in kleinen Mengen toxische Substanzen, sozusagen als Abfallprodukte der Stoffwechselforgänge, die man unter dem Begriff „reaktive Sauerstoffspezies“ (engl. Reactive Oxygen Species, ROS) zusammenfasst.

Zur Gruppe der ROS gehören sowohl Sauerstoffradikale wie Superoxid-Radikale ($O_2^{\bullet-}$) und Hydroxyl-Radikale (OH^{\bullet}), die sich durch das Vorhandensein von ungepaarten Elektronen auszeichnen, aber auch reaktive Nicht-Radikale wie Singulett-Sauerstoff ($^1O_2^*$) und Wasserstoffperoxid (H_2O_2).

Die Elektronentransportvorgänge in Mitochondrien und Mikrosomen, die unspezifische Immunabwehr und körpereigene Enzymsysteme wie die NADPH-Oxidase, die Xanthin-Oxidase und die peroxisomale Cytochrom P-450-Oxidase sind Hauptquellen der ROS im Körper. Die plasmamembrangebundenen NADPH-Oxidasen, die in vielen Zellen mesodermalen Ursprungs vorkommen, katalysieren z. B. die Produktion von $O_2^{\bullet-}$ aus Sauerstoff, bei der NADPH als Elektronendonator fungiert. Phagozyten wie z. B. neutrophile Granulozyten verwenden im Rahmen der Immunabwehr von diesen Superoxid-Radikalen abgeleitete Oxidantien, wie $^1O_2^*$ und H_2O_2 , um eindringende Mikroorganismen zu töten. Dieser Vorgang wird auch „respiratory burst“ genannt. Den Makrophagen stehen dabei zusätzlich zu den ROS auch die „reaktiven Stickstoffspezies“ (engl. Reactive Nitrogen Species, RNS) zur Verfügung.

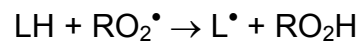
Ein Vertreter dieser weiteren Gruppe reagierfreudiger Spezies ist z. B. das Stickstoffmonoxid-Radikal (NO^{\bullet}), das durch enzymatische Oxidation von L-Arginin entsteht. Ein Beispiel für aus NO^{\bullet} und ROS abgeleitete sekundäre Angehörige dieser Gruppe ist z. B. Peroxynitrit ($ONOO^-$) (Koppenol et al., 1992).

Den ROS und RNS gemeinsam ist ihre extreme Reaktivität, sie alle sind starke Oxidationsmittel, d. h. sie entreißen anderen Molekülen Elektronen. Diese oxidative Schädigung betrifft verschiedene Zellkompartimente wie Lipide, Proteine und Aminosäuren sowie die DNA (Sies, 1991; Halliwell, 1996), wodurch es zur Störung der normalen Zellfunktionen kommen kann.

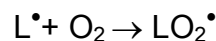
2.3.2. Schädigung von Biomolekülen

2.3.2.1. Lipidperoxidation

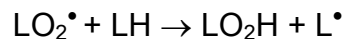
Wie bereits erwähnt, können reaktive Spezies Lipide im Körper oxidativ schädigen. Diese Schädigung beeinträchtigt in erster Linie die Lipidmembranen, wobei in diesen insbesondere ungesättigte Fettsäuren gefährdet sind. Reaktive Spezies wie z. B. Peroxyl-Radikale (RO_2^\bullet) entreißen den, insbesondere mehrfach ungesättigten, Fettsäuren (LH) Wasserstoffatome. Hieraus resultieren Alkyl-Radikale (L^\bullet) und Hydroperoxide (RO_2H).



Unter Einfluss von Sauerstoff entstehen aus Alkyl-Radikalen wiederum sehr schnell Lipidperoxyl-Radikale (LO_2^\bullet).



Diese greifen ihrerseits wieder benachbarten ungesättigten Fettsäuren an und entreißen ihnen Wasserstoffatome.



Durch die entstandene Kettenreaktion kommt es zur Anhäufung von Lipidperoxiden in der Zellmembran. Dies führt schließlich zum Verlust der strukturellen Integrität und somit zur Störung der normalen Zellfunktionen. Der gesamte Vorgang wird als Lipidperoxidation bezeichnet.

Aber nicht nur Lipide der Zellmembranen, sondern auch Lipoproteine im Plasma können oxidative Schädigungen erfahren. So wurde nachgewiesen, dass oxidierte LDL eine Rolle beim atherosklerotischen Geschehen spielen (siehe 2.3.5.2).

2.3.2.2. DNA-Schädigung

Abgesehen von den Lipiden kann jedoch auch das Erbgut, die DNA, durch reaktive Spezies geschädigt werden. Sowohl die Basen als auch die Zuckerreste der Nukleinsäuren sind dabei betroffen. Durch die oxidative Schädigung kommt es zu Mutationen, z. B. in Form von Transversion bestimmter Basen. Auch DNA-

Strangbrüche sind eine Folge der Einwirkung von Oxidantien. Derartige Schädigungen der DNA können schwerwiegende Konsequenzen wie z. B. eine gestörte Proteinsynthese nach sich ziehen. Der Körper besitzt Mechanismen, um beschädigte oder veränderte DNA-Abschnitte zu reparieren oder zu ersetzen (siehe antioxidatives Abwehrsystem). Heute besteht jedoch heute die Meinung, dass eine fortlaufende oxidative Schädigung der DNA über einen langen Zeitraum hinweg eine Hauptursache für im Alter auftretende Tumorerkrankungen darstellt (siehe 2.3.5.3).

2.3.2.3. Schädigung von Aminosäuren und Proteinen

Aminosäuren und Proteine üben im Organismus vielfältige Funktionen aus. Sie sind unter anderem für Enzymwirkungen, Rezeptorfunktionen und Transportprozesse verantwortlich. Durch oxidative Einwirkung auf die Proteine können somit viele Vorgänge im Organismus beeinträchtigt werden. Sulfhydrylgruppen sind hierfür beispielsweise ein Hauptangriffspunkt. Die Oxidation dieser Gruppen des Cysteins durch OH^\bullet und ONOO^- im Enzym Glyceraldehyd-3-phosphat Dehydrogenase z. B. führt zu einer Inaktivierung dieses Enzyms, was eine Beeinträchtigung der Glykolyse in den betroffenen Zellen zur Folge hat (Souza und Radi, 1998). Auffällig ist auch das Vorkommen von Nitrotyrosin, das durch Nitrierung von Tyrosin durch das starke Oxidans ONOO^- entsteht, in verschiedenen erkrankten Geweben wie dem ZNS bei der Alzheimer'schen Krankheit (Smith et al., 1997) oder erkranktem Lungengewebe (Kooy et al., 1995).

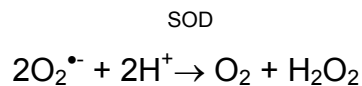
2.3.3. Schutzmechanismen des Körpers

Da aerob lebende Zellen, wie bereits erwähnt, in ihrem Stoffwechsel auf molekularen Sauerstoff angewiesen sind, kann die Entstehung einer gewissen Menge an reaktiven Spezies nicht verhindert werden. Alle Körperzellen enthalten deshalb zum Schutz gegen ROS und RNS ein Abwehrsystem, das eine oxidative Schädigung verhindern soll. Dieses System umfasst verschiedene enzymatische und nicht-enzymatische Mechanismen. Erstere beinhalten die Enzyme Superoxid-

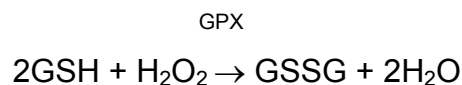
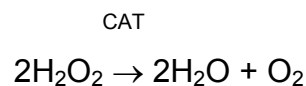
Dismutase, Katalase, Glutathion-Peroxidase, GSH-Reduktase und Thioredoxin-Reduktase. Eisen- und kupferbindende Proteine, Reparaturmechanismen des Körpers sowie verschiedene hydro- und lipophile Antioxidantien stellen die nicht-enzymatische Abwehr dar.

2.3.3.1. Das antioxidative enzymatische System

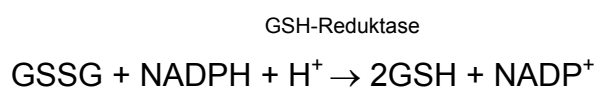
Das antioxidative enzymatische System beinhaltet Enzyme wie die Superoxid-Dismutase (SOD), die die Disproportionierung zweier sehr reaktiver $O_2^{\bullet-}$ in O_2 und das weniger toxische H_2O_2 katalysiert.



Im Zytoplasma und im Extrazellularraum ist die Kupfer-Zink-SOD (CuZnSOD), in den Mitochondrien die Mangan-SOD (MnSOD) anzutreffen. Weiterhin gehören zum antioxidativen enzymatischen System die Enzyme Katalase (CAT) und Glutathion-Peroxidase (GPX), die das entstandene H_2O_2 schließlich in O_2 und H_2O umwandeln.



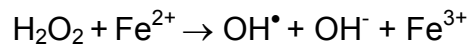
Enzyme wie die GSH-Reduktase oder die Thioredoxin-Reduktase tragen ebenfalls zur antioxidativen Abwehr des Körpers bei, indem sie bereits oxidierte Antioxidantien oder redoxaktive Thiol-Gruppen (z. B. im Glutathion, siehe 2.3.3.2) wieder reduzieren, die somit der Abwehr erneut zur Verfügung stehen.



Die GSH-Reduktase kann außerdem auch Lipidperoxide entsorgen, indem es sie in Alkohole umwandelt.

2.3.3.2. Das antioxidative nicht-enzymatische System

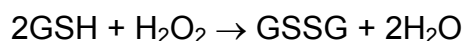
Eisen- und Kupferionen können die Entstehung bestimmter reaktiver Spezies unterstützen. In der Fenton-Reaktion katalysieren Eisenionen (Fe^{2+}) u. a. die Entstehung von Hydroxyl-Radikalen (OH^\bullet), der reaktivsten Vertreter der ROS, aus H_2O_2 .



Auch Kupferionen können die Formation von OH^\bullet aus H_2O_2 katalysieren. Daher hat der Körper Mechanismen entwickelt, das Vorkommen von freien Eisen- und Kupferionen zu kontrollieren und zu reduzieren. Im Serum befinden sich die eisenbindenden Proteine Transferrin und Ferritin und das kupferbindende Caeruloplasmin. Transferrin stellt das Transportprotein der Eisenionen im Blut dar, überzählige Ionen werden an Apoferritin gebunden und schließlich als Ferritin intrazellulär gespeichert. Damit wird eine Teilnahme dieser Übergangsmetallionen an der Erschaffung reaktiver Spezies verhindert.

Daneben tragen die Reparaturmechanismen des Körpers zum Schutz vor oxidativen Schäden bei. So werden z. B. DNA-Schäden mittels Exzisionsreparatur entfernt. Hierzu schneidet eine spezifische Exzisionsendonuklease den betroffenen Abschnitt heraus. Anhand der Sequenz des Gegenstrangs ersetzt eine DNA-Polymerase das fehlende Stück, das durch eine DNA-Ligase in die entstandene Lücke eingefügt wird. Spezielle Enzyme (Lipasen, Proteasen) bauen geschädigte Lipide und Proteine ab. Durch diese Mechanismen wird eine Anhäufung von defekten Biomolekülen und von ihnen ausgehende weitere schädigende Auswirkungen verhindert.

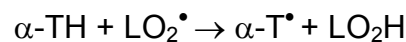
Auch die hydro- und lipophilen Antioxidantien gehören den nicht-enzymatischen Abwehrmechanismen an. Sie sind Reduktionsmittel, die leicht mit oxidierenden Substanzen reagieren, selbst oxidiert werden und damit andere Moleküle vor oxidativer Schädigung bewahren. Hydrophile Antioxidantien sind beispielsweise Vitamin C, Harnsäure und Glutathion (GSH). Letzteres ist ein wichtiges Tripeptid, das als redoxaktive Gruppe die Thiol-Gruppe (SH-Gruppe) seines Cystein-Restes besitzt. Bei der Oxidation werden zwei Moleküle der reduzierten Form (GSH) zu einem Disulfid (GSSG) verknüpft.



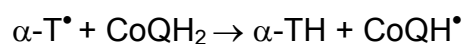
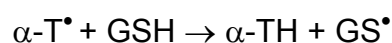
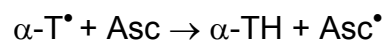
Vitamin C (Ascorbinsäure) ist ein potenter Radikalfänger von $O_2^{\bullet-}$, H_2O_2 , OH^{\bullet} , Hypochloritionen, RO_2^{\bullet} und $^1O_2^*$ im wässrigen Milieu des Zytosols, des Plasmas und anderer Körperflüssigkeiten. Es kann außerdem auch Tocopheroxyl-Radikale zu Vitamin E regenerieren (Sies et al., 1992). Die Regeneration des Vitamin C selbst erfolgt schließlich durch die Reduktionsmittel NADH, NADPH oder GSH.

Harnsäure zählt für den Menschen zu den wichtigsten Antioxidantien. Es fällt beim Abbau von Purinbasen an. Da die Harnsäure bei Tieren jedoch größtenteils mit Hilfe des Enzyms Uricase weiter in Allantoin umgewandelt wird, spielt sie in der Tiermedizin eine untergeordnete Rolle.

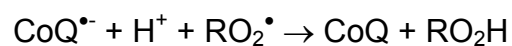
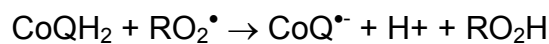
Zu den lipophilen Antioxidantien gehören neben Vitamin E auch die reduzierte Form von CoEnzym Q, Flavonoide und Carotinoide. Vitamin E (hauptsächlich α -, daneben aber auch β -, γ -, δ -Tocopherol und Tocotrienole) ist schon lange dafür bekannt, dem Verderb von Fetten und Ölen der Nahrung („ranzig werden“) entgegenzuwirken. Es schützt gegenüber Oxidation empfindliche Strukturen jedoch nicht nur außerhalb, sondern auch innerhalb des Körpers. So werden Zellmembranen vor Peroxidationsschäden bewahrt, indem α -Tocopherol (α -TH) Lipidperoxyl-Radikale abfängt, bevor sie mit anderen Lipiden weiterreagieren und damit eine Kettenreaktionen beginnen können (Sies und Stahl, 1995).



Abgesehen davon entschärft Vitamin E auch zahlreiche freie Radikale wie z. B. OH^{\bullet} und $^1O_2^*$ (Sies und Stahl, 1995). Stickstoffdioxid wird insbesondere sehr effizient von γ -Tocopherol abgefangen (Cooney et al., 1993). Die entstehenden Tocopheroxyl-Radikale ($\alpha\text{-T}^{\bullet}$) sind weit weniger reaktiv, sie können von Vitamin C (Asc), GSH oder Coenzym Q10 ($CoQH_2$) wieder zum Vitamin E regeneriert werden.



Coenzym Q (Ubichinon/ Ubichinol) übernimmt in der oxidierten Form als Ubichinon in der Atmungskette die Funktion eines Überträgers von Reduktionsäquivalenten, d. h. von Elektronen und Protonen. Die reduzierte Form Ubichinol (CoQH₂) besitzt eine Wirkung als Antioxidans und geht durch Abgabe von Wasserstoffatomen in seine oxidierte Form Ubichinon über. Ubichinol kann damit mit einer mit Vitamin E vergleichbaren Effektivität vor Lipidperoxidation schützen, indem es Peroxyl-Radikale reduziert (Frei et al., 1990). Das entstandene Ubisemichinon-Radikal (CoQ[•]) kann ein weiteres Peroxyl-Radikal entschärfen.



Außerdem ist Ubichinol, wie bereits erwähnt, in der Lage, Vitamin E-Radikale zu regenerieren (Kagan et al., 1990). Ubichinon selbst wird innerhalb der Atmungskette durch Übertragung von Reduktionsäquivalenten mittels Dehydrogenasen wieder zu Ubichinol reduziert.

Flavonoide sind natürlich vorkommende Benzo- γ -Pyron-Derivate, die in vielen Pflanzen anzutreffen sind. Ihre antioxidative Wirkung erzielen sie durch ihre Fähigkeiten, sowohl freie Radikale abfangen (Chen et al., 1990) als auch Eisenionen binden zu können (Sestili et al., 1998).

Auch unkonjugiertes Bilirubin spielt eine Rolle als Fänger von Superoxid- und Peroxylradikalen sowie von Singulett-Sauerstoff. Im Blut von Neugeborenen wurden erhöhte Konzentrationen von Bilirubin festgestellt, die zu einer Verbesserung des antioxidativen Status beitrugen (Maisels, 1988; Dennery et al., 1995).

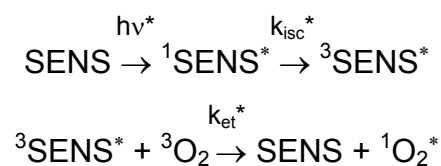
Schließlich sind auch die Carotinoide wichtige Vertreter der lipophilen Antioxidantien.

2.3.3.3. Antioxidative Wirkmechanismen von Carotinoiden

Carotinoide spielen als Antioxidantien eine bedeutende Rolle. Ein ihnen allen gemeinsames Merkmal ist ihr System aus konjugierten Doppelbindungen, d. h. sie selbst sind Reduktionsmittel und reagieren somit leicht mit oxidierenden Substanzen, werden selbst oxidiert, indem sie „bereitwillig“ Elektronen abgeben, und schützen dadurch andere Moleküle vor Oxidation. Abgesehen davon können sie Energie von Molekülen im Erregungszustand übernehmen.

2.3.3.3.1. Inaktivierung von Molekülen im Erregungszustand

Moleküle können durch Aufnahme von Energie in einen höheren Energiezustand, den sog. Erregungszustand, überführt werden. Ein Vertreter dieser Moleküle im Erregungszustand ist Singulett-Sauerstoff ($^1\text{O}_2^*$). Er entsteht durch Übertragung von Energie über Elektronen eines sog. Sensitizers (SENS) im erregten Triplett-Zustand ($^3\text{SENS}^*$) auf Sauerstoff ($^3\text{O}_2$).



* $h\nu$: Photonen des Sonnenlichts

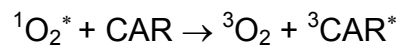
k_{isc} : Ratenkonstante der Spinumkehr (intersystem-crossing, isc)

k_{et} : Ratenkonstante des Elektronentransfers

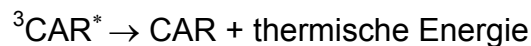
In biologischen Systemen sind diese Sensitizer beispielsweise Porphyrine, Chlorophyll oder Riboflavin (Edge et al., 1997), die durch Aufnahme von Photonen des Sonnenlichts ($h\nu$) zunächst in den Singulettzustand ($^1\text{SENS}^*$) und anschließend durch Spinumkehr (sog. intersystem-crossing, isc) in den erregten Triplettzustand ($^3\text{SENS}^*$) überführt wurden. Singulett-Sauerstoff ist eine sehr reaktive Spezies und Verursacher von Photooxidationsprozessen.

Schon 1968 zeigten Foote und Denny, dass β -Carotin photosensibilisierte Oxidationsprozesse verhindern kann und damit ein Inaktivator („Quencher“) von Singulett-Sauerstoff ist. Seitdem wurde dieser Effekt auch bei zahlreichen anderen

Carotinoiden nachgewiesen. Es gibt zwei verschiedene Mechanismen, durch die Carotinoide Singulett-Sauerstoff entschärfen. In seltenen Fällen kommt es zu einem chemischen Deaktivierungsprozess, der zu einer Zerstörung des beteiligten Carotinoids führt (Liebler, 1993). Hauptsächlich bewirken Carotinoide (CAR) jedoch einen Energietransfer über Elektronenaustausch, wodurch sie den Triplett-Zustand erreichen (Farmilo und Wilkinson, 1973).



Durch Abgabe der erhaltenen Energie als Wärme kann das Carotinoid aus dem Triplett-Zustand wieder in den Grundzustand zurückkehren und steht somit für weitere Reaktionen zur Verfügung.



Es besteht ein Zusammenhang zwischen der Anzahl der konjugierten Doppelbindungen (n) des Carotinoids und seiner Fähigkeit, Singulett-Sauerstoff zu inaktivieren. Zahlreiche Autoren stimmen darin überein, dass grundsätzlich mit steigender Zahl von Doppelbindungen die Inaktivierungsrate ansteigt. Lee und Min (1990) wiesen nach, dass Carotinoide mit elf (z. B. Lycopin, Zeaxanthin) oder 13 (z. B. Astaxanthin) konjugierten Doppelbindungen die Bildung von Peroxiden in Sojabohnenöl signifikant besser verhinderten als Carotinoide mit nur zehn (z. B. Lutein) dieser Doppelbindungen. Auch die ${}^1\text{O}_2^*$ -Quenchingraten-Konstanten (k_q) stiegen mit Zunahme der konjugierten Doppelbindungen. Danach haben z. B. Carotinoide mit fünf oder weniger Doppelbindungen keine Quenching-Aktivität (Edge et al., 1997). Bei Lutein ($n = 10$), Lycopin ($n = 11$) und Dodecapreno- β -Carotin ($n = 19$) nahm der k_q -Wert in der genannten Reihenfolge zu (Conn et al., 1991) (siehe Tabelle 5).

Tabelle 5: $^1\text{O}_2^*$ -Quenchingraten-Konstanten (k_q) in Benzen von Carotinoiden mit unterschiedlicher Anzahl von Doppelbindungen (n)

Carotinoid	n	k_q in $10^9\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$	Quelle
	≤ 5	$\leq 0,01$	Edge et al., 1997
Lutein	10	16	Conn et al., 1991
Lycopin	11	17	Conn et al., 1991
Dodecapreno- β -Carotin	12	23	Conn et al., 1991

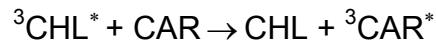
Die cis-trans-Isomerisierung scheint einen geringen Einfluss auf die $^1\text{O}_2^*$ -Quenching-Aktivität von Carotinoiden zu haben. Conn et al. (1991) stellten fest, dass verschiedene cis-Isomere von β -Carotin eine geringfügig niedrigere Reaktivität gegenüber Singulett-Sauerstoff als all-trans β -Carotin aufwiesen. Aus den Daten von Conn et al. (1991) schlossen Edge et al. (1997) außerdem, dass bei Carotinoiden mit gleicher Anzahl an konjugierten Doppelbindungen eine Abhängigkeit der Quenching-Aktivität von der Wellenlänge der maximalen Absorption (λ_{max}) besteht. So war in Benzen bei der Untersuchung von 9-cis- β -Carotin ($\lambda_{\text{max}} = 458$ nm), Zeaxanthin ($\lambda_{\text{max}} = 463$ nm), all-trans- β -Carotin ($\lambda_{\text{max}} = 466$ nm) und Lycopin ($\lambda_{\text{max}} = 485$ nm) eine Zunahme des k_q -Werts zu beobachten (siehe Tabelle 6).

Tabelle 6: $^1\text{O}_2^*$ -Quenchingraten-Konstanten (k_q) in Benzen von Carotinoiden mit gleicher Anzahl von Doppelbindungen (n) und unterschiedlichen Wellenlängen der maximalen Absorption (λ_{max})

Carotinoid	n	λ_{max} in nm	k_q in $10^9\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$	Quelle
9-cis- β -Carotin	11	458	11,0	Conn et al., 1991 Edge et al., 1997
Zeaxanthin	11	463	12,0	Conn et al., 1991 Edge et al., 1997
all-trans- β -Carotin	11	466	13,0	Conn et al., 1991 Edge et al., 1997
Lycopin	11	485	17,0	Conn et al., 1991 Edge et al., 1997

Die Ergebnisse von Di Mascio et al. (1989) standen im Einklang damit und bestätigten ebenfalls Lycopin als den effizientesten $^1\text{O}_2^*$ -Quencher unter den natürlichen Carotinoiden. Ihr ermittelter k_q -Wert liegt jedoch mit $31,0 \times 10^9 \text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ deutlich höher als der der anderen Forschungsgruppen.

In Pflanzen haben Carotinoide neben ihrer Funktion als akzessorische Photosynthesepigmente die wichtige Aufgabe des Schutzes des Photosyntheseapparates vor Photooxidation inne. Bei der Photosynthese werden Chlorophyll-Moleküle (CHL) durch Aufnahme von Lichtenergie in einen Erregungszustand, den sog. Triplett-Zustand ($^3\text{CHL}^*$), überführt, der sehr instabil ist und die Zerstörung des Chlorophylls zur Folge hat. Carotinoide (CAR) übernehmen Energie des Triplett-Chlorophylls, bevor dieses Schaden erleiden oder anrichten kann.



2.3.3.3.2. Interaktion mit freien Radikalen

Carotinoide interagieren jedoch nicht nur mit Molekülen im Erregungszustand, sondern auch mit freien Radikalen (R^*). Dabei findet entweder ein Transfer von Elektronen statt, wodurch Carotinoid-Radikal-Kationen entstehen (1). Abgesehen davon können bei einer Abspaltung von Wasserstoff Carotinoid-Radikale hervorgehen (2). Durch Additionsreaktionen kann es außerdem zur Bildung von Addukt-Radikalen kommen (3).



Die Radikale, die als Produkte aus diesen Reaktionen hervorgehen, sind weniger reaktiv als die ursprünglichen Radikale und damit unschädlicher.

Interaktionen von Carotinoiden mit zahlreichen Radikalen sind belegt, unter ihnen auch das hepatotoxische Trichloromethylperoxyl-Radikal ($\text{CCl}_3\text{-O}_2^\bullet$) (Yaping et al., 2001), Thiol- (RS^\bullet), Sulfonyl- (RSO_2^\bullet) und Stickstoffdioxid- (NO_2^\bullet) Radikale, die Lipidperoxidationsprozesse induzieren können (Everett et al., 1996).

2.3.4. Oxidativer Stress

Da der Organismus zur Energiegewinnung auf Sauerstoff angewiesen ist und sich das Immunsystems im Rahmen seiner Abwehrmechanismen reaktiver Spezies bedient, um eindringende Mikroorganismen abzuwehren, ist die endogene Produktion von ROS und RNS in Körper unvermeidlich. Unter physiologischen Umständen stellt das Auftreten dieser reaktiven Spezies jedoch keine Bedrohung für den Organismus dar. Der Körper ist mit einer ausreichenden Menge an effizienten Schutzmechanismen ausgestattet, die es ihm ermöglichen, die Zahl der produzierten ROS und RNS zu reduzieren. Bereits entstandene reaktive Spezies können durch Antioxidantien abgefangen und entschärft werden, bevor sie Biomoleküle schädigen. Wenn eine oxidative Schädigung eingetreten ist, wird deren Ausmaß in Grenzen gehalten, indem betroffene Biomoleküle repariert oder entfernt werden.

Unter bestimmten Bedingungen kommt es jedoch zu einem Ungleichgewicht zwischen dem Auftreten von reaktiven Spezies und den antioxidativen Abwehrmechanismen. Ist das Gleichgewicht zu Gunsten der reaktiven Spezies verschoben, spricht man von oxidativem Stress, durch welchen Schaden im Körper angerichtet werden kann (Sies, 1985).

Man unterscheidet endogene und exogene Faktoren, die diese Imbalanz verursachen. Endogen kann oxidativer Stress beispielsweise durch erhebliche körperliche Belastung verursacht werden, welche mit verstärkter Atmung und einer damit einhergehenden erhöhten Aufnahme von Sauerstoff verbunden ist. Es kommt zu einer gesteigerten Produktion von Radikalen (Davies et al., 1982; Jenkins, 1988). Durch diese kann es nach körperlicher Belastung zu oxidativer Schädigung von verschiedenen Strukturen wie z. B. von Muskelzellen und Lipiden kommen (Stohrer et al., 2001).

Auch im Rahmen des Alterungsprozesses (siehe 2.3.5.3) kommt es zum gehäuften Auftreten von ROS und RNS im Körper. Mit steigendem Alter arbeitet das antioxidative Abwehrsystem zunehmend schlechter, die Bekämpfung der reaktiven Spezies wird ineffizient.

Exogene Faktoren spielen bei der Verursachung von oxidativem Stress eine immer wichtigere Rolle. Beim Menschen ist in diesem Zusammenhang an erster Stelle der Konsum von Tabak zu erwähnen. Tabakrauch enthält große Mengen an freien Radikalen und anderen Oxidantien, durch die das antioxidative Abwehrsystem überfordert wird. Ein Zug Zigarettenrauch enthält etwa 10^{15} sehr reaktive organische Radikale, Stickstoffmonoxid ist im Zigarettenrauch in einer Konzentration von bis zu 300 ppm enthalten (Pryor und Stone, 1993). Die Schädigung durch Zigarettenrauch betrifft jedoch nicht nur die weltweit 1,1 Milliarden Raucher, sondern auch die Gesundheit menschlicher und tierischer Nichtraucher wird durch passives Rauchen in Mitleidenschaft gezogen.

Die steigende Umwelt- und Luftverschmutzung trägt ebenfalls einen großen Teil dazu bei, den exogenen oxidativen Stress zu steigern. Durch die Verbrennung fossiler Brennstoffe in Kraftfahrzeugen sowie in Elektrizitäts- und Heizkraftwerken werden große Mengen der Oxidantien Stickstoffmonoxid (NO^*) und -dioxid (NO_2^*) freigesetzt. Ihnen ist der Organismus, genauso wie auch dem erhöhten Ozongehalt der Luft, permanent ausgesetzt.

Auch zahlreiche Medikamente leisten einen Beitrag zu oxidativem Stress. Durch das Antibiotikum Ciprofloxacin z. B. (Gürbay et al., 2001) entstehen bei dessen Verstoffwechslung in den Lebermikrosomen reaktive Spezies. Auch das Immunsuppressivum Cyclosporin A führte zu einem erhöhten Anfall von ROS in Leberzellen (Wolf et al., 1996).

2.3.5. Degenerative Erkrankungen und oxidative Prozesse

Bei vielen Erkrankungen wird von einer Beteiligung reaktiver Spezies und oxidativer Prozesse an der Entstehung, der Entwicklung und dem Fortschreiten ausgegangen. Dazu gehören verschiedene Lungenerkrankungen wie die chronische obstruktive Lungenerkrankung, sowie vaskuläre Erkrankungen wie Atherosklerose oder Krebs.

Daneben stehen oxidative Prozesse auch im Verdacht, zu zahlreichen neurodegenerativen (Alzheimersche, Parkinsonsche Krankheit, Multiple Sklerose, Demenz), Autoimmun- (Rheumatoide Arthritis, Immune-complex-mediated Vasculitis) und Augenerkrankungen (Katarakt, Age-related Macular Degeneration (AMD), Retinopathie) beizutragen.

2.3.5.1. Lungenerkrankungen – COPD

Neben verschiedenen anderen Lungenerkrankungen wie Pneumonie und zystischer Fibrose sind auch bei der chronischen obstruktiven Lungenerkrankung (engl. Chronic Obstructive Pulmonary Disease, COPD) oxidative Prozesse am Krankheitsgeschehen involviert.

Unter dem Begriff COPD werden die Krankheitsbilder der chronischen Bronchitis, chronische Formen des Asthma bronchiale und das Lungenemphysem zusammengefasst. Die Krankheit ist charakterisiert durch eine Verengung und Verlegung der Atemwege. Die Ätiologie dieser Erkrankung ist noch nicht vollständig geklärt. Man vermutet ein allergisches Geschehen, eine chronische bakterielle Infektion oder die Inhalation von reizenden Substanzen wie Zigarettenrauch oder Schadstoffen aus der Luft als Auslöser des Krankheitsgeschehens. Schadstoffe in der Luft, darunter Stickstoffoxide und Ozon, aber auch Zigarettenrauch belasten die Atemwege. Mit Chronizität des entzündlichen Geschehens geht schließlich eine Verengung der Luftwege einher, durch die eine Ventilwirkung entsteht: Die Expiration ist stärker eingeschränkt als die Inspiration, so dass die eingeatmete Luft z. T. in den Alveolen gefangen wird (engl. „air trapping“). Dieser Vorgang verstärkt sich bei jedem Atemzug, so dass schließlich ein Lungenemphysem die Folge ist.

Sowohl beim Menschen als auch in der Tiermedizin, hier v. a. beim Pferd, ist dieses progressive Krankheitsgeschehen zu beobachten. Es wird dabei ein starker Zusammenhang zwischen dem Einwirken von oxidativem Stress und der Entwicklung des Krankheitsbildes der COPD angenommen. Zunächst steht die Lunge über ihre enorme epitheliale Oberfläche (ca. 80 m² beim Menschen) in intensivem direkten Kontakt mit der Umwelt und ist daher besonders exogenen oxidativen Einflüssen ausgeliefert. Zusätzlich dazu werden durch den chronischen Entzündungsprozess bei der COPD große Mengen an ROS und RNS von den Leukozyten und Makrophagen im Rahmen der Immunabwehr freigesetzt.

Eine Vielzahl von Studien ergab Hinweise auf eine Beteiligung von reaktiven Spezies an der Entstehung und Entwicklung der COPD. Die Reinigung der oberen Atemwege wird durch die Zilien des Flimmerepithels der Nasen-, Rachen-, Luftröhren- und Bronchialschleimhaut gewährleistet. Schmutzpartikel sowie überschüssiger Schleim werden durch koordiniertes Schlagen Richtung Mundhöhle transportiert. Feldman et al. (1994) fanden heraus, dass die Exposition von H₂O₂ beispielsweise eine Verlangsamung dieses Schlagens bis hin zum völligen Stillstand zur Folge hatte. Diese Situation wird noch durch die Tatsache verschlimmert, dass unter dem Einfluss von Oxidantien in Folge der erhöhten Prostaglandin F_{2a}-Produktion zusätzlich auch noch mehr Schleim von den tracheobronchalen Epithelzellen sezerniert wird (Adler et al., 1990). Dies alles führt zu einer Ansammlung von viskösem Schleim in den Atemwegen, was zu einer weiteren Verschlechterung der Situation führt.

Untersuchungen an COPD-Patienten ergaben erhöhte Werte von Thiobarbitursäure-reaktiven Substanzen (engl. Thiobarbituric Acid Reactive Substances, TBARS) im Kondensat der Expirationsluft (Nowak et al., 1999), einen erhöhten Isoprostan F_{2α}-III-Gehalt im Urin (Praticò et al., 1998), erhöhte Werte von 4-Hydroxy-2-Nonenal im Lungengewebe (Rahman et al., 2002) und einen erhöhten Gehalt der Expirationsluft an Ethan (Paredi et al., 2000). All diese Parameter sind Marker zur Detektion und Beurteilung von Peroxidationsprozessen (Mayne, 2003) und weisen auf ein verstärktes Auftreten oxidativer Prozesse hin.

Oxidative Prozesse beeinflussen auch die Zytokinproduktion, die wiederum Effekte auf die Entwicklung der COPD zeigen können. Davalia et al. (1993) stellten fest, dass humane bronchiale Epithelzellen in Kultur nach dem Einwirken von NO_2^* z. B. vermehrt die Zytokine IL-8 und $\text{TNF-}\alpha$ freisetzen. Beide weisen selbst wiederum proinflammatorische Wirkungen auf und setzen somit den Entzündungsprozess fort.

2.3.5.2. Vaskuläre Erkrankungen – Atherosklerose / Coronary Heart Disease / Myokardinfarkt

Auch bei verschiedenen vaskulären Erkrankungen, wie z. B. dem Komplex Atherosklerose – Coronary Heart Disease (CHD) – Myokardinfarkt, die heute in der westlichen Welt mit die häufigste Todesursache beim Menschen darstellen, spielen reaktive Spezies in deren Pathogenese eine große Rolle. In der Tiermedizin treten atheromatöse Prozesse weniger häufig und vorrangig bei bestimmten Spezies wie Schwein, Vogel und Affe auf, bei den meisten anderen Gewebsproliferationen und Verkalkungen der Arterien handelt es sich gewöhnlich um ein arteriosklerotisches Geschehen.

Die Atherosklerose ist eine multifaktorielle Erkrankung, die durch eine Verdickung und Verhärtung der Arterienwand charakterisiert ist. Chronische Hypertonien, Hyperlipidämien oder Endothelläsionen durch Toxine werden unter anderem als Kausalfaktoren angesehen. All diese Vorgänge bedingen Perfusionsstörungen in der Arterienwand, es treten Thrombozyten- und Fibrinaggregationen (sog. Mikrothrombosen) an der Gefäßinnenhaut auf. Durch folgende Endothel- und Intimaprolierationen kommt es weiterhin zu kissen- oder beetartigen Intimaverdickung, die zusätzlich zum Gefäßwandödem die Perfusion weiter erschwert. In diesen Bereichen werden in Abhängigkeit vom Lipidgehalt des Blutes Lipide eingelagert. Mit zunehmender Chronizität der Veränderungen beginnen auch Kalzifizierungsprozesse. Das Krankheitsgeschehen führt letztendlich zu hochgradiger Lumeneinschränkung mit daraus folgender Ischämie der zugehörigen Organe.

Treten atherosklerotische Veränderungen in den Herzkranzgefäßen auf, spricht man von CHD. Zunehmend weniger Blut kann durch diese Gefäße strömen, die die Herzmuskelzellen mit Sauerstoff und Nährstoffen versorgen. Es kommt schließlich zur kardialen Ischämie, d. h. zur Unterversorgung der Myokardzellen mit Sauerstoff. Wird die Sauerstoffversorgung plötzlich nahezu vollständig oder vollständig unterbrochen, ist ein Myokardinfarkt die Folge, bei dem der betroffene Bereich des Herzmuskels geschädigt wird und schließlich zu Grunde geht.

Lipide werden im Körper mittels der Lipoprotein-Komplexe transportiert, wobei Low Density Lipoproteine (LDL) die Gewebe mit Cholesterol versorgen und High Density Lipoproteine (HDL) überschüssiges Cholesterol wieder zurück zur Leber führen. An den Zielzellen findet eine Bindung bestimmter Proteine der LDL-Hülle (ApoB-100 und ApoE) an zellmembranständige Rezeptoren statt, die Lipoproteine werden durch Endozytose aufgenommen. Es wurde festgestellt, dass in den Zellen der arteriellen Läsionsstellen eine Ansammlung von Cholesterol stattfindet, die jedoch nicht durch eine übermäßige Aufnahme ursprünglicher LDL nach Bindung an die ApoB-100 Rezeptoren entsteht. Es entstehen vielmehr durch oxidative Prozesse modifizierte LDL (oxLDL) („Oxidations-Hypothese“ der Atherosklerose). Dieser Hypothese zufolge werden LDL im Subendothelialraum der Arterien zunächst leicht oxidiert zu sog. mm-LDL (minimally modified LDL). Diese mm-LDL führen zu einer vermehrten Produktion von verschiedenen Faktoren durch die Endothelzellen, die zu einer Aufnahme von Monozyten in die Arterienwand und deren Differenzierung zu Makrophagen führt. Hier stimulieren letztere wiederum die weitere Oxidation von mm-LDL zu oxLDL, welche proatherogene Eigenschaften besitzen (Navab et al., 1996). Erstens werden sie bei ihrer Aufnahme an Scavenger Rezeptoren A (SRA) gebunden, die im Gegensatz zu ApoB-100 Rezeptoren nicht durch einen steigenden Cholesterolgehalt herunterreguliert werden. Es kommt zur Bildung von Schaumzellen, die schließlich zugrunde gehen und ihren Inhalt freilassen, der dann zur Atherombildung führt. Abgesehen davon wirken oxLDL chemotaktisch auf Monozyten und erniedrigen die Beweglichkeit von Makrophagen. oxLDL ist zytotoxisch für Endothelzellen, mitogen für glatte Muskelzellen sowie Makrophagen und induziert Superoxid-Entstehung in den Zellen.

2.3.5.3. Alterung und Tumorgenese

Seit längerem ist bekannt, dass Lebewesen mit einer hohen metabolischen Rate eine geringere Lebenserwartung haben, damit also schneller altern. Gerontologen vermuteten den gesteigerten Energieverbrauch dieser Organismen als Ursache dafür, sie nannten diese Vorstellung die „rate of living“-Theorie (Pearl, 1928).

Harman stellte schon 1956 die Hypothese auf, dass im Laufe des Lebens oxidative Schäden akkumulieren, zu altersbedingten Erkrankungen und schließlich zum Tod führen („free radical theory of aging“). Mit der Erkenntnis, dass reaktive Spezies während der Energiegewinnung in den Mitochondrien entstehen, wurde der Kreis zwischen der „rate of living“-Theorie und der „free radical theory of aging“ geschlossen. Je höher die metabolische Rate ist, desto höher ist auch die Atemfrequenz und damit die Aufnahme von Sauerstoff und die Produktion von reaktiven Spezies. Diese bewirken wiederum den beschleunigten Alterungsprozess.

Im alternden Organismus wird dessen antioxidatives Abwehrsystem zunehmend schlechter, die Bekämpfung der reaktiven Spezies ist ineffizienter. Daraus folgt, dass sich mit zunehmendem Alter Mutationen der DNA ansammeln, es kommt zu Veränderungen des Genoms. Dieser Vorgang wird durch die verminderte DNA-Reparaturkapazität noch verstärkt. Da am Anfang jeder Tumorgenese immer die genetische Schädigung einer Zelle steht, wird im vermehrten Auftreten von Mutationen im Alter ein Ansatz zur Erklärung der Entstehung altersbedingter Tumorerkrankungen gesehen (Ames et al., 1993).

Durch Veränderungen der DNA kann es weiterhin infolge fehlerhafter Transkription und Translation zur Synthese defekter Proteine kommen. Proteine werden auch durch direkte Einwirkung von Oxidantien geschädigt, so dass es insgesamt zu einer Anhäufung fehlerhafter Biomoleküle kommt. Auch die Verknüpfung von Proteinen mit anderen Molekülen wie DNA oder Zuckern („Crosslinks“) findet durch den gesteigerten Angriff reaktiver Spezies häufiger statt. Nahezu alle Enzyme des Körpers sind Proteine, wodurch eine Proteinschädigung weit reichende Auswirkungen auf sämtliche enzymatische Reaktionen hat. So können beispielsweise die am antioxidativen Abwehrsystem des Körpers oder der DNA-Reparatur beteiligten Enzyme weiter beeinträchtigt werden. Dies führt wiederum zu oxidativen Prozessen, wodurch ein Teufelskreis entsteht.

Mit Hilfe der Biomarker für Lipidperoxidation, DNA- und Proteinschädigung konnte nachgewiesen werden, dass ältere Individuen tatsächlich in vermehrte Maße Hinweise auf oxidative Schäden aufweisen. Z. B. konnte mit zunehmendem Alter ein Anstieg des 8-Hydroxy-2'-deoxyguanosins (8-OhdG) gemessen werden (Hamilton et al., 2001, Shi et al., 2004). 8-OhdG ist ein Biomarker für die DNA-Oxidation (Mayne, 2001). Ähnlich verhielt es sich mit dem Carbonylgehalt der Proteine von Erythrozyten und Fibroblasten. Diese wurden als Modelle für die zelluläre Alterung verwendet. Durch die Bestimmung des Parameters lässt sich die oxidative Schädigung von Proteinen abschätzen. Ein erhöhter Gehalt an Carbonylen weist dabei auf eine oxidative Schädigung von Proteinen hin. Oliver et al. (1987) fanden heraus, dass der Gehalt in Erythrozyten mit deren Alter zunahm. Weitere Studien zeigten, dass in den Fibroblasten die Proteine von an Progerie oder der Wernerschen Krankheit erkrankten Patienten im Vergleich zu Proben gesunder Kontrollindividuen einen höheren Carbonylgehalt aufwiesen. Diese zwei Krankheiten sind durch die vorzeitige Alterung der Patienten charakterisiert. Auch bei Fibroblastenkulturen von Spendern über 60 Jahren wurde ein Anstieg im Carbonylgehalt der Proteine festgestellt (Oliver et al., 1987). Die durch oxidative Prozesse entstandenen Crosslinks treten bei älteren Individuen ebenfalls gehäuft auf. Ein bei vielen Spezies beschriebener Vertreter dieser Gruppe ist das Lipofuszin. Dieses gelb-braune Pigment besteht aus verknüpften Lipiden und Proteinen, die durch Peroxidation und Polymerisation von Lipoproteinen der Zellmembranen entstanden sind. Es wird als nichtverdaulicher Rest in autophagischen Vakuolen in den Zellen abgelagert. Auch bei anderen Proteinen, wie z. B. Kollagen oder Linsenkristallinen, treten Crosslinks auf, wobei Verknüpfungen zu Zuckern hergestellt werden.

2.3.6. Antioxidative Effekte von Carotinoiden und deren chemopräventive Wirkungen

Es existieren zahlreiche epidemiologische Studien, die belegen, dass ein hoher Konsum von Früchten und Gemüse negativ mit dem Auftreten von degenerativen Erkrankungen wie Atherosklerose, CHD oder Krebs korreliert (Block et al. 1992; Riboli und Norat, 2003; Trichopoulou et al., 2003). Da Früchte und Gemüse hohe Gehalte an Carotinoiden aufweisen, besteht die Annahme, dass in

erster Linie diese Stoffe für die positiven Effekte verantwortlich sein könnten. Ein Ansatz zur Erklärung dieser Effekte der Carotinoide besteht in ihrer Eigenschaft, antioxidativ wirksam zu sein. Da man bei den aufgeführten Erkrankungen von einer Beteiligung von oxidativen Prozessen am Krankheitsgeschehen ausgehen kann, würden diese durch die Carotinoide vermindert.

2.3.6.1. Antioxidative Effekte von Carotinoiden

Schutz vor Lipidperoxidation in vitro

Balachandran und Rao (2002) wiesen Effekte von Carotinoiden auf die Lipidperoxidation, gemessen in der Produktion von TBARS, nach. Sie verwendeten hierzu Liposomen als Modell für die Doppelschichtstruktur von Zellmembranen und stellten zunächst fest, dass Lycopin in die Liposomen inkorporiert wurde. Des Weiteren fanden sie heraus, dass der Zusatz von Lycopin die Formation von TBARS nach durch FeSO₄ induzierter Lipidperoxidation in Liposomen herabsetzte. Dieser Effekt war konzentrationsabhängig und überdies stärker als nach Zusatz von Vitamin E.

Leal et al. (1998) untersuchten die zellschützenden Effekte von Lutein und Lycopin auf Leberzellen von Hühnern. Sie verwendeten hierzu das Toxin T-2, um Oxidationsprozesse auszulösen. Dieses Mykotoxin, das zur Gruppe der Trichothecene gehört, wird von verschiedenen Fusarienspezies produziert und kontaminiert Nahrungs- und Futtermittel wie z. B. Getreide. Es kann Oxidationsprozesse hervorrufen, indem es beispielsweise zur Bildung freier Radikale und zur Verminderung der GSH-Konzentration führt. Durch seine lipidperoxidativen Eigenschaften wirkt T-2 zytotoxisch. Der zellschützende Effekt der verwendeten Carotinoide wurde mittels der Bestimmung von GSH und Laktat-Dehydrogenase (LDH) beurteilt. Ein erhöhter Verbrauch von GSH wies dabei auf Oxidationsprozesse, ein Verlust von LDH auf eine Schädigung der Zellmembranen hin. Die Autoren stellten fest, dass sowohl Lycopin als auch Lutein zellschützende Eigenschaften zeigten. Am stärksten war der Effekt von Lycopin auf Hepatozyten, die zuerst mit dem Carotinoid und anschließend nach 30 Minuten mit T-2 inkubiert wurden. Hier wurde ein 51%iger Schutz vor LDH-Verlust und ein 57%iger Schutz vor GSH-Verbrauch erzielt.

Kim (1995) erhielt in seiner Studie über die protektiven Effekte von Carotinoiden gegen Schädigung von Hepatozyten von Ratten durch Tetrachlorkohlenstoff (CCl₄) ähnliche Ergebnisse. CCl₄ wird in der Leber unter Mithilfe des Enzyms Cytochrom P450 (siehe 2.2.4.2) zum hochreaktiven Trichloromethyl-Radikal (CCl₃[•]) umgewandelt, das Lipidperoxidationsprozesse hervorruft. Auch hier erniedrigten Lycopin und Lutein, außerdem auch noch α- und β-Carotin, die Freisetzung von LDH aufgrund von Zellschädigung. Das Maß der Lipidperoxidation wurde ebenfalls herabgesetzt, wobei das entstandene Malondialdehyd (MDA), ein Endprodukt der Lipidoxidation, als Marker diente.

Tierexperimentelle Studien

In den Studien, die an Tieren durchgeführt wurden, sollte verifiziert werden, ob Carotinoide neben ihrer nachgewiesenen in vitro-Wirkung tatsächlich auch in vivo antioxidative Effekte zeigen. Brown et al. (1997) supplementierten Ratten mit lycopinreichem Tomatenmark und stellten eine Abnahme der SOD-Aktivität in der Leber fest. Sie erklärten diesen Effekt damit, dass durch die antioxidativen Eigenschaften des Lycopins SOD in geringerem Ausmaß induziert und auf einem niedrigeren Level gehalten wurde. Ähnliche Resultate erzielten Blakely et al. (1988), als sie nach β-Carotin-Gabe die SOD-Aktivität bei Ratten bestimmten, denen hohe Konzentrationen an Maiskeimöl gefüttert wurden.

Jain et al. (1999) führten ebenfalls Untersuchungen an Ratten durch, sie bestimmten den Einfluss der Supplementierung der Tiere mit Lycopin auf die Lipid- und Proteinoxidation. Es zeigte sich eine Abnahme der TBARS im Serum, was auf ein vermindertes Auftreten von Lipidoxidationsprozessen hinwies. Der Gehalt des Serums an Thiolen nahm zu, woraus sich auf eine ebenfalls reduzierte oxidative Schädigung der Proteine schließen ließ. Zu denselben Ergebnissen kamen auch Rao und Shen (2002) bei Untersuchungen nach Lycopingabe beim Menschen. Sie stellten ebenfalls einen reduzierten Gehalt an TBARS und einen erhöhten Gehalt an Thiolen im Serum fest. In einer anderen Studie erhielten Männer über zwei Wochen täglich Tomatensaft (Bub et al., 2000). Nach Konsum des Tomatensafts waren auch hier die TBARS erniedrigt. Abgesehen davon wurde nach Isolierung der LDL-Fraktion aus dem Plasma die Oxidation der Lipoproteine induziert. In der verlängerten Lag-Time dieser Oxidationsprozesse zeigte sich eine erhöhte Resistenz

der Lipoproteine gegenüber oxidativer Schädigung. Dass der Lycopingehalt in den Lipoproteinen signifikant zunahm, ließ die Autoren vermuten, dass der schützende Effekt auf das Carotinoid zurückzuführen war. Woodall et al. (1996) führten eine Studie an Hühnern durch und stellten fest, dass in Homogenisaten aus Hühnerlebern das Ausmaß an induzierter Lipidperoxidation nach Fütterung von β -Carotin bzw. Zeaxanthin, jedoch nicht von Canthaxanthin, signifikant erniedrigt wurde.

Auch bei Schlittenhunden konnte nach Supplementierung mit β -Carotin, Lutein und Vitamin E das Ausmaß der oxidativen Lipid- und Proteinschädigung im Vergleich zu unsupplementierten Tieren reduziert werden (Baskin et al., 2000). Nach dem Rennen nahm die Konzentration von 8-OhdG, einem Marker für DNA-Schädigung, hier ab, wohingegen sie in der Kontrollgruppe anstieg. Abgesehen davon wurde auch eine erhöhte Resistenz der Lipoproteine gegenüber oxidativer Schädigung festgestellt.

2.3.6.2. Positive Beeinflussung der Lungenfunktion bei Lungenerkrankungen

Wie bereits erwähnt, gibt es zahlreiche Hinweise darauf, dass oxidative Prozesse an der Pathogenese von Lungenerkrankungen, wie z. B. COPD beteiligt sind (siehe 3.5.1.). Aus diesem Grund kam man zu der Überlegung, dass Antioxidantien einen positiven Einfluss auf das Krankheitsgeschehen ausüben könnten (MacNee and Rahman, 1999). Hu et al. (2000) stellten fest, dass eine höhere Aufnahme und eine höhere Serumkonzentration verschiedener Antioxidantien, darunter auch β -Carotin, die Lungenfunktion verbesserten. Diese Verbesserung wurde gemessen in der Zunahme des FEV₁ (expiratorische Sekundenkapazität, engl. Forced Expiratory Volume), die das in der ersten Sekunde maximal ausatembare Volumen beschreibt. In einer Studie, in der Patienten mit Exercise-induced Asthma (EIA) über eine Woche täglich Lycopin erhielten, war das Absinken des FEV₁ nach körperlicher Anstrengung geringer als in der Kontrollgruppe. Bei 55% der Probanden schützte die Supplementierung signifikant vor EIA (Neuman et al., 2000).

Carotinoide können wie im Kapitel 2.4. beschrieben, Einfluss auf die Genexpression nehmen und so auch modulierende Wirkung auf die Enzyme ausüben, die bei der Entsorgung von reaktiven Stoffen im Körper eine wichtige Rolle

spielen (Xenobiotic Metabolizing Enzymes, XME). So stellten Smith und Harrison (1997) eine Verbindung zwischen der Ausprägung des Allels für die mikrosomale Epoxid-Hydrolase (mEH) und der Anfälligkeit der Lunge für Schädigung durch Epoxide her. mEH ist ein XME, das in den bronchialen Epithelzellen vorzufinden ist und reaktive Epoxide durch Hydrierung in löslichere Dihydrodiole umwandelt, welche vom Körper schneller ausgeschieden werden. Die Autoren beobachteten, dass bei Patienten mit COPD oder Lungenemphysem die homozygote Ausprägung des mEH-Allels mit langsamer mEH-Aktivität signifikant häufiger auftrat. Es bestehen somit Hinweise darauf, dass durch die verminderte Produktion von mEH die Lunge schlechter gegen Schädigung durch Epoxide geschützt ist.

Neben der mEH trägt auch die GST-P1, die der Enzymfamilie der Glutathion-S-Transferasen (GST) angehört, zur lokalen Entgiftung toxischer Stoffe in den Alveolen und Bronchioli bei und spielt damit ebenfalls eine Rolle im Abwehrmechanismus gegen toxische Verbindungen aus Zigarettenrauch. In einer japanischen Studie war die Anzahl von COPD-Patienten, die eine homozygote Ausprägung des Isoleucin-Allels der GST-P1 aufwiesen, signifikant erhöht. Die Autoren schlussfolgerten daraus, dass diese Patienten damit stärker durch Xenobiotika aus dem Tabakrauch gefährdet waren (Ishii et al., 1999). Es besteht die Möglichkeit, dass Carotinoide durch ihre modulierende Wirkung auf die XME so das Krankheitsgeschehen positiv beeinflussen können.

2.3.6.3. Schutz vor dem Krankheitskomplex Atherosklerose / Coronary Heart Disease / Myokardinfarkt

Epidemiologische Studien

Viele epidemiologische Studien brachten an den Tag, dass in der Nahrung enthaltene Antioxidantien invers mit dem Risiko von Herz-Kreislauf-Erkrankungen korreliert sind. In der EURAMIC Studie wurden in zehn europäischen Ländern Feinnadelaspirationen des Fettgewebes von Myokardinfarktpatienten im Vergleich zu gesunden Kontrollpersonen auf ihren Gehalt an α -Carotin, β -Carotin und Lycopin hin untersucht. Die im Fettgewebe enthaltenen Carotinoide entstammen größtenteils der Nahrung und sind ein guter Indikator für die Aufnahme dieser Stoffe über einen längeren Zeitraum hinweg (Kohlmeier und Kohlmeier, 1995). Es wurde festgestellt, dass Personen mit höherem Lycopingehalt im Fettgewebe ein signifikant erniedrigtes

Risiko eines Myokardinfarktes aufwiesen (Kohlmeier et al., 1997). In der Rotterdam Studie erfasste man die Aufnahme von β -Carotin und kam zu dem Ergebnis, dass die Probanden mit der höchsten Aufnahme das geringste Myokardrisiko aufwiesen (Klipstein-Grobusch et al., 1999). Die Autoren beider Studien sehen in einer hohen Zufuhr des jeweiligen Carotinoids eine Möglichkeit, vor Myokardinfarkten zu schützen.

Durch die Los Angeles Atherosclerosis Study (LAAS) sollten Erkenntnisse darüber gewonnen werden, inwieweit Carotinoide die Progression von frühen Stadien der Atherosklerose beeinflussen können (Dwyer et al., 2001; Dwyer et al., 2004). Dazu schloss die LAAS sowohl epidemiologische als auch in vitro Untersuchungen sowie in vivo Untersuchungen am Tiermodell ein, deren Ergebnisse allesamt darauf hinwiesen, dass eine erhöhte Aufnahme von bestimmten Carotinoiden in der frühen Phase der Atherosklerose schützende Effekte zeigt. So war beispielsweise die Zunahme Intima-Media Dicke (Intima-Media Thickness, IMT) der Carotisarterien bei den Patienten mit höherem Plasmagehalt an Lutein, β -Cryptoxanthin, Zeaxanthin und α -Carotin weniger stark ausgeprägt. In vitro wurde untersucht, ob sich nach Inkubation mit Lutein die Anzahl der in die Arterienwand auswandernden Monozyten ändern würde. Diese Monozyten werden durch modifiziertes LDL in der Arterienwand chemotaktisch angezogen. Als Ergebnis ergab sich, dass das Carotinoid diese Migration und damit die durch Monozyten vermittelte Entzündungsreaktion dosisabhängig verhinderte. Weitere Hinweise auf schützende Effekte von Lutein erbrachten auch Versuche an verschiedenen Mäusemodellen. Sowohl ApolipoproteinE-null Mäuse als auch LDL-Rezeptor-null Mäuse entwickeln bei lipidreicher Nahrung schwere atherosklerotische Läsionen, die morphologisch den Veränderungen der arteriellen Läsionen beim Menschen ähneln. Durch Supplementierung der Mäuse mit Lutein konnte die Größe dieser Läsionen um über 40% reduziert werden.

Schutz vor LDL-Oxidation

Viele Studien beschäftigten sich auch mit der antioxidativen Wirkung der Carotinoide auf die LDL-Oxidation, die eine bedeutende Rolle bei der Entstehung von Atherosklerose spielt (siehe 2.3.5.2). Dugas et al. (1998 und 1999) untersuchten den Einfluss von Carotinoiden auf die in vitro Oxidation von LDL durch humane Endothelialzellen. Sie ermittelten ein vermindertes Auftreten von Lipidhydroperoxiden als Maß für die LDL-Oxidation sowohl nach in vitro-Zusatz von β -Carotin als auch, sogar noch deutlicher, nach Supplementierung der Probanden mit β -Carotin. Keinen Effekt zeigte in diesen Studien Lycopin, wohingegen in einer Arbeit von Bub et al. (2000) wiederum bei einem erhöhten Lycopingehalt der LDL nach Konsum von Tomatensaft die LDL-Oxidation, gemessen in der verlängerten Lag-Time der induzierten Oxidationsprozesse, reduziert wurde.

Auch beim Hund gibt es Hinweise auf eine schützende Wirkung von Carotinoiden vor der oxidativen Schädigung der Lipoproteine. Baskin et al. (2000) verabreichten Schlittenhunden vor dem Rennen über eine Dauer von einem Monat hinweg β -Carotin, Lutein und Vitamin E. Nach dem Rennen zeigten die LDL der supplementierten Hunde eine längere Lag-Time und damit eine erhöhte Resistenz der LDL vor Oxidationsprozessen.

Mehrere Interventionsstudien gaben jedoch keine Hinweise auf eine schützende Wirkung von Carotinoiden vor Herz-Kreislauf-Erkrankungen. Sowohl in der ATBC- (The Alpha-Tocopherol, Beta Carotene Cancer Prevention Study Group, 1994) als auch in der CARET- (Omenn et al., 1996), der PHS- (Hennekens et al., 1996) und der WHS-Studie (Lee et al., 1999) zeigte β -Carotin keine Reduktion des Risikos von Herz-Kreislauf-Erkrankungen. Auch bei der Betrachtung des Gesamtcarotinoidgehalts wurde kein signifikanter positiver Effekt auf das Risiko von Myokardinfarkten oder des Todes durch CHD festgestellt (Evans et al., 1998).

2.3.6.4. Anticancerogene Effekte von Carotinoiden

Es gibt viele Hinweise darauf, dass Carotinoide die Tumorentstehung und das Tumorstadium beeinflussen können. In erster Linie werden diese anticancerogenen Eigenschaften der Carotinoide auf ihre antioxidative Wirkung zurückgeführt. Daneben spielen jedoch auch die Beeinflussung der Genexpression (siehe 2.2.4) und des Immunsystems (siehe 2.2.5) eine Rolle bei den anticancerogenen Effekten.

Zahlreiche epidemiologische Studien zeigten eine inverse Beziehung zwischen der Carotinoideaufnahme und dem Risiko für die Entwicklung verschiedener Arten von Krebs. So konnte beispielsweise eine negative Korrelation der Lycopinaufnahme und des Risikos von Prostatakrebs (Giovannucci et al., 1995; Giovannucci et al., 2002) oder cervikaler Neoplasien (VanEenwyk et al., 1991) nachgewiesen werden. Daneben ergab sich auch eine inverse Relation zwischen dem Serumgehalt von Lycopin und dem Auftreten von Brust- (Dorgan et al., 1998) oder Harnblasenkrebs (Helzlsouer et al., 1989). Zahlreiche epidemiologische Studien beschäftigten sich auch mit dem Einfluss von β -Carotin auf die Inzidenz von Krebs, insbesondere von Lungenkrebs. Viele von ihnen wiesen auf ein geringeres Auftreten derartiger Erkrankungen bei hoher Aufnahme oder hohen Serumkonzentrationen von β -Carotin hin (Van Poppel und Goldbohm, 1995). Auch Goodman et al. (2003) stellten im Zusammenhang mit Lungenkrebs erniedrigte Serumkonzentrationen von verschiedenen Carotinoiden (Lutein, Zeaxanthin, β -Cryptoxanthin, Lycopin, α -Carotin, β -Carotin) fest. Diese inverse Beziehung war besonders ausgeprägt bei weiblichen Versuchsteilnehmern. Männistö et al. (2004) fanden bei der Betrachtung der Daten aus sieben Kohortenstudien keine Beziehung zwischen der β -Carotinaufnahme, jedoch eine inverse Beziehung zwischen der β -Cryptoxanthinaufnahme und dem Lungenkrebsrisiko der Teilnehmer. Zu denselben Ergebnissen kamen Yuan et al. (2003) bei Untersuchungen an 63257 Chinesen in Singapur. Auch bei Krebserkrankungen des Digestionstraktes gibt es Hinweise auf einen schützenden Effekt der Carotinoide, so wurde beispielsweise eine Erniedrigung des Auftretens von Colonkrebs bei hoher Luteinaufnahme (Slattery et al., 2000) und von Rectumkrebs bei Frauen bei hoher Lycopinaufnahme (Murtaugh et al., 2003) festgestellt.

Auch in vitro Studien an Zellkulturen erbrachten Ergebnisse, die auf eine anticancerogene Wirkung von Carotinoiden hindeuten. Sie gaben auch Hinweise auf deren Wirkmechanismen. Palozza et al. stellten 2002 fest, dass β -Carotin das Wachstum verschiedener humaner Zelllinien von Adenocarcinomen des Colons hemmt, indem es ein Sistieren des Zellzykluses und Apoptose induzierte. Diese Effekte wurden durch eine Herunterregulierung bestimmter Proteine erreicht, die für die Progression des Zellzykluses bzw. für die Blockierung der Apoptose verantwortlich sind. Ein weiterer Mechanismus der anticancerogenen Wirkung von Carotinoiden, die Verbesserung der GJC, wurde ebenfalls an Zellkulturen untersucht. Lycopin zeigte in der Kultur humaner Zellen aus Tumoren der Mundhöhle eine deutliche Hemmung deren Proliferation. Gleichzeitig bewirkte es auch eine signifikante Heraufregulierung der Transkription und Expression des Genes von Connexin 43, einem wichtigen Protein der Gap Junctions. Die gemessene GJC zwischen den Tumorzellen war verbessert (Livny et al., 2002).

Auch zahlreiche tierexperimentelle Studien wurden durchgeführt. Jain et al. (1999) untersuchten Ratten, denen nach Lycopin-Supplementierung das colonspezifische chemische Carcinogen Azoxymethan intraperitonäal verabreicht wurde. Neben einer Erniedrigung des TBARS-Gehalts (verminderte Lipidperoxidation) und erhöhter Thiol-Gehalte im Serum, einem Anzeichen für reduzierte Proteinoxidation, wies das Colon der supplementierten Ratten eine erniedrigte Anzahl von aberranten Krypten (engl. Aberrant Crypt Foci, ACF) auf. Diese ACF sind Folge einer Zellüberproduktion, die zu einer Ausdehnung und Verlängerung der Krypten führte. Sie sind im Frühstadium der Colonicarcinogenese anzutreffen und entwickeln sich im Folgenden zu Polypen und Adenomen, oft schließlich zu Carcinomen. Daher werden sie bei Kurzzeitstudien als Biomarker für Colonkrebs nachgewiesen (Bruce et al., 1993). Dieser Effekt zeigte sich bei Verabreichung von Lycopin in der Promotionsphase noch deutlicher als bei Verabreichung in der Initiationsphase.

Astorg et al. (1997) untersuchten den Effekt von Lycopin auf die Initiation der Hepatocarcinogenese. Hierzu supplementierten sie Ratten mit dem Carotinoid, verabreichten das Carcinogen DEN intraperitonäal und wiesen präneoplastische Herde (engl. Preneoplastic Foci, PNF) in der Leber nach. Sie stellten fest, dass nach Lycopingabe sowohl die Größe als auch der Anteil der betroffenen Leberbezirke signifikant erniedrigt war.

Die gleichen Autoren fanden ebenfalls heraus, dass die Induktion von PNF in der Leber durch AFB₁ mit der Gabe von β -Carotin, β -Apo-8'-carotenal, Canthaxanthin und Astaxanthin beeinflusst werden kann. So waren hier Anzahl und Größe der PNF vermindert (Gradelet et al., 1998). Abgesehen davon reduzierten β -Apo-8'-carotenal, Canthaxanthin und Astaxanthin auch das Vorkommen von AFB₁-induzierten DNA-Schäden.

Mehrfach untersucht wurde die anticancerogene Wirkung von Carotinoiden am Modell der induzierten Backentaschentumoren bei Hamstern. Schwartz und Shklar (1988) induzierten durch Applikation von 7,12-dimethylbenz(a)anthrazen (DMBA) in die Backentasche Veränderungen in Form von Plattenepithelcarcinomen. Durch lokale Injektionen von β -Carotin oder Canthaxanthin wurde eine signifikante Tumorregression erreicht. Mohan und Nagini (2003) konnten ebenfalls durch in Tomatenmark enthaltenes Lycopin die Carcinogenese DMBA-induzierter Tumoren in Form von Plattenepithelcarcinomen (engl. Squamous Cell Carcinoma, SCC), sowie hyperplastische und dysplastische Läsionen der Backentaschen von Hamstern vermindern. Durch Verabreichung von Lycopin aus Tomaten über eine Magensonde konnte die Inzidenz der Tumoren auf 60% und deren Volumen auf 12% erniedrigt werden. Auch das Auftreten von SCC und hyper- und dysplastischer Veränderungen wurde signifikant vermindert. Die Autoren sahen die Ursache hierfür in den antioxidativen Fähigkeiten von Lycopin. Sie vermuteten eine Modulierung der oxidativen und antioxidativen Vorgänge sowohl im Zielorgan als auch in Leber und Erythrozyten durch das Carotinoid. Die Tatsache, dass die Aktivitäten von SOD, CAT und GPX, alles Enzyme des antioxidativen Abwehrsystems des Körpers, hier signifikant erhöht waren, stand im Einklang mit dieser Annahme.

Abgesehen von der Induktion der Carcinogenese durch Verabreichung verschiedener Carcinogene kann die Tumorgenese auch durch Inokulierung von Tumorzellen initiiert werden. Park et al. (1998) fanden heraus, dass hierbei durch supplementiertes Lutein in niedrigen Konzentrationen sowohl die Tumorzinzidenz, als auch das Tumorgewicht und das Tumolvolumen von Mammartumoren erniedrigt wurde. Auch das Ausmaß der Lipidoxidation (TBARS-Gehalt) im Tumorgewebe war vermindert.

Chew et al. (1999) wiesen nach, dass auch β -Carotin, Canthaxanthin und Astaxanthin der Entwicklung von Mammartumoren entgegenwirken. Sie stellten fest, dass nach Inokulierung von Tumorzellen das Volumen der Mammartumoren von Mäusen bei Fütterung der genannten Carotinoide geringer war. Den stärksten Effekt erbrachte Astaxanthin mit einem Tumolvolumen von 50 bis 60% im Vergleich zur Kontrollgruppe. Auch der TBARS-Gehalt im Tumorgewebe war nach Astaxanthingabe signifikant erniedrigt.

Aufgrund der viel versprechenden Ergebnisse der epidemiologischen Studien wurden vier groß angelegte Interventionsstudien mit β -Carotin beim Menschen durchgeführt. In einer der ersten, der Alpha-Tocopherol β -Carotene (ATBC) Cancer Prevention Study, in der 29133 männliche Raucher über durchschnittlich sechseinhalb Jahre hinweg täglich mit β -Carotin und/oder α -Tocopherol supplementiert wurden, zeigte β -Carotin jedoch keine Verminderung des Lungenkrebsrisikos. Es wurde vielmehr ein um 18% erhöhtes Risiko bei diesen Rauchern festgestellt (The Alpha-Tocopherol, Beta Carotene Cancer Prevention Study Group, 1994). Die Ergebnisse des β -Carotene and Retinol Efficacy Trial (CARET), in dem 18314 Raucher, ehemalige Raucher und mit Asbest vorbelastete Männer und Frauen über die Dauer von vier Jahren täglich β -Carotin und Retinol erhielten, bestätigten die unerwarteten Erkenntnisse aus der ATBC Studie. Auch hier ergab sich eine erhöhte Inzidenz von Lungenkrebs und eine erhöhte Mortalitätsrate im Vergleich zur Kontrollgruppe (Omenn et al., 1996). Die Physicians' Health Study (PHS) umfasste 22071 Ärzte, die über einen Zeitraum von zwölf Jahren jeden zweiten Tag β -Carotin erhielten. Hier wurde kein signifikanter Effekt von β -Carotin auf die Inzidenz von Lungenkrebs festgestellt (Hennekens et al., 1996). Im Gegensatz zu den drei genannten Interventionsstudien, bei denen die Teilnehmer nicht mangelernährt waren, untersuchten Blot et al. (1993) den Effekt von β -Carotin auf 29584 mit Vitaminen und Mineralstoffen unterversorgte Menschen in Linxian, China. Es wurde eine Abnahme der Mortalitäts- und Krebsrate, insbesondere von Magenkrebs, in der Gruppe festgestellt, die eine Kombination von β -Carotin, Vitamin E und Selen erhielt. Die Bewohner von Linxian weisen weltweit eine der höchsten Raten des Auftretens von Speiseröhren- und Magenkrebs auf.

Mayne et al. fanden (2001) in ihrer Studie keine signifikanten Unterschiede zwischen dem Auftreten von Tumoren des Kopfes, des Halses oder der Lunge bei β -Carotin supplementierten Patienten und der Kontrollgruppe. Die Ergebnisse deuten jedoch ebenfalls auf eine mögliche Erhöhung des Risikos von Lungenkrebs hin, wohingegen das Auftreten von Tumoren des Kopfes und Halses tendenziell seltener war. Keine Effekte zeigte die Supplementierung mit β -Carotin auf die Inzidenz von verschiedenen Krebsarten in der Women`s Health Study (WHS) mit 39876 Frauen (Lee et al., 1999).

Andere Interventionsstudien erbrachten positive Effekte der Gabe von β -Carotin im Sinne einer signifikanten Regression von präcancerösen Läsionen der Magenschleimhaut (Correa et al., 2000).

Nach der Publikation der ATBC und des CARET wurden einige laufende Studien unterbrochen. Viele Autoren suchen seither nach einer Erklärung für diese Beobachtungen. Eine Hypothese von Bendich (2004) besagt, dass die negativen Effekte der β -Carotin Supplementierung bei Rauchern auf eine Verbesserung der Lungenfunktion zurückzuführen sein könnten: Einige Studien gaben Hinweise auf eine verbesserte Lungenfunktion bei höherem Serumgehalt an β -Carotin und anderen Carotinoiden (Grievink et al., 2000; Schünemann et al., 2001), unter anderem auch bei Rauchern (Hu und Cassano, 2000). Dadurch käme es zu einer verstärkten Aufnahme von Carcinogenen mit dem Zigarettenrauch und damit zu einer erhöhten Exposition der Lunge mit diesen schädlichen Stoffen. Somit hätte ein grundsätzlich positiver Effekt der Carotinoide, die Verbesserung der Lungenfunktion, bei Rauchern negative Auswirkungen im Sinne einer höheren Aufnahme von Schadstoffen und einer damit verbundenen größeren Belastung der Lunge.

Es wurde *in vitro* jedoch auch nachgewiesen, dass unter bestimmten Bedingungen die antioxidativen Effekte der Carotinoide umgekehrt werden und schließlich eine prooxidative Wirkung auftritt. Burton und Ingold (1984) stellten fest, dass β -Carotin in hohen Konzentrationen und unter hohem Sauerstoffpartialdruck prooxidativ wirken kann. Abgesehen davon konnte sowohl β -Carotin als auch Lycopin in Abhängigkeit von den verwendeten Oxidantien prooxidative Effekte zeigen (Yeh und Hu, 2000). Verantwortlich für diese Wirkung werden u. a. oxidative Spaltprodukte der Carotinoide gemacht (Yeh und Hu, 2001)

Die Carotinoide verhalten sich jedoch hinsichtlich der prooxidativen Eigenschaften nicht alle gleich. Martin et al. (1999) teilten Carotinoide mit starker antioxidativer Kapazität in zwei Gruppen ein: Die erste Gruppe, der u. a. β -Carotin und Lycopin angehören, wird vertreten von Carotinoiden, die unter bestimmten Umständen auch prooxidative Eigenschaften haben. Die zweite Gruppe umfasst diejenigen Carotinoide, die trotz starker antioxidativer Wirkung keine prooxidativen Effekte zeigen und alle konjugierte Oxogruppen enthalten. Astaxanthin und Canthaxanthin gehören dieser zweiten Gruppe an.

Es besteht die Möglichkeit, dass prooxidative Eigenschaften der Carotinoide zu einer Schädigung von Geweben oder Organen führen können. Da insbesondere in der Lunge hohe Konzentrationen an Sauerstoff herrschen, könnte das vermehrte Auftreten von Lungenkrebs nach Carotinoidgabe unter anderem auch auf deren prooxidative Effekte zurückzuführen sein. Es gibt jedoch bisher keine Belege für das Auftreten von prooxidativen Mechanismen der Carotinoide in vivo (Lowe et al., 2003).

3. Material und Methoden

3.1. Versuchsaufbau

Die vorliegenden Untersuchungen umfassten einen Vorversuch, der aus drei Versuchsdurchläufen bestand, sowie einen Hauptversuch, der sich aus zwei Versuchsperioden zusammensetzte.

Im Vorversuch wurde bei neun Hunden die Plasmaresponse von Lycopin und Lutein über den Zeitraum von 24 Stunden hinweg nach einmaliger oraler Gabe bestimmt. In den beiden Versuchsperioden des Hauptversuches wurden 36 bzw. 30 Hunde mit den beiden Carotinoiden in verschiedenen Kombinationen und Verhältnissen über einen Zeitraum von zwölf Wochen supplementiert. In bestimmten Intervallen wurden Blutproben gewonnen, die neben der Plasmaresponse auch auf ihren antioxidativen Status hin untersucht wurden.

Zusätzlich dazu wurden im Rahmen der Dissertation von Hellweg (Wien, 2005) Parameter des Immunsystems bestimmt.

3.1.1. Vorversuch

Ziel des Vorversuches

Ziel des Vorversuchs war es, die Bioverfügbarkeit von Lycopin und Lutein zu ermitteln. Hierzu wurde nach einmaliger oraler Gabe der beiden Substanzen mittels Gelatinekapseln der jeweilige Plasmaresponse innerhalb eines Zeitraumes von 24 Stunden bestimmt. Es sollten dabei folgende Fragestellungen beantwortet werden:

- Werden die Stoffe nach oraler Verabreichung vom Körper aufgenommen?
- In welchen Mengen werden die Stoffe aufgenommen?
- In welchem zeitlichen Abstand nach der Verabreichung wird eine maximale Konzentration im Blut erreicht?

Für die Studie wurde in Übereinstimmung mit den gesetzlichen Vorgaben von der Regierung von Oberbayern eine Genehmigung von Eingriffen und Behandlungen an Tieren zu wissenschaftlichen Zwecken erteilt.

Versuchsablauf des Vorversuches

Im Rahmen dieses Vorversuches wurden neun Hunde (Hund 1-9) auf drei Versuchsgruppen verteilt:

Gruppe A: Kontrollgruppe

keine Verabreichung von Lycopin und Lutein

Gruppe B: Versuchsgruppe Lycopin

Verabreichung von Lycopin

Dosierung: 2,0 mg/kg Körpergewicht

Gruppe C: Versuchsgruppe Lutein

Verabreichung von Lutein

Dosierung: 2,0 mg/kg Körpergewicht

Zu Beginn des Vorversuches (Zeitpunkt 0) wurden 2,0 mg des jeweiligen Stoffes pro kg Körpergewicht (KG) in einer Gelatine kapsel (Gruppe B und C) bzw. eine Leerkapsel (Gruppe A) oral verabreicht.

Zum Zeitpunkt 0 sowie 15 Minuten, 30 Minuten, 60 Minuten, 90 Minuten, zwei, drei, vier, fünf, sechs, acht, zehn, zwölf, 18 und 24 Stunden nach Eingabe der Kapsel wurde von jedem Tier eine Blutprobe genommen.

Die Versuchsdurchführung erfolgte nach dem Prinzip des „Latin Square“. Dies bedeutet, dass der Versuchsaufbau insgesamt dreimal durchlaufen wurde (Versuchsdurchlauf I-III), wobei jeder der neun Hunde einmal der Gruppe A, B und C angehörte (siehe Tabelle 7). Zwischen den drei Versuchsdurchläufen wurde jeweils eine Washout-Phase von mindestens sechs Wochen eingeschoben.

Tabelle 7: Übersicht Versuchsplan Vorversuch Lycopin/Lutein (n=3 / Gruppe) mit den Hunden 1-9 und Dosierung der Wirkstoffe in mg/kg Körpergewicht (KG)

		Versuchsdurchlauf		
		I	II	III
Gruppe A	Kontrollgruppe kein Wirkstoff	Hund 1, 2, 3	Hund 4, 5, 6	Hund 7, 8, 9
Gruppe B	Versuchsgruppe Lycopin 2,0 mg/kg KG	Hund 4, 5, 6	Hund 7, 8, 9	Hund 1, 2, 3
Gruppe C	Versuchsgruppe Lutein 2,0 mg/kg KG	Hund 7, 8, 9	Hund 1, 2, 3	Hund 4, 5, 6

3.1.2. Hauptversuch

Ziel des Hauptversuches

In der vorliegenden Arbeit wurden neben der Plasmaresponse von Lycopin und Lutein auch die Wirkungen der beiden Carotinoide auf den antioxidativen Status der Hunde untersucht. Dazu wurden verschiedene Parameter aus dem Blut bestimmt.

Zusätzlich dazu wurde ermittelt, inwieweit die beiden Substanzen das Immunsystem der Hunde beeinflussen. Dabei wurden sowohl Parameter der zellvermittelten als auch der humoralen Immunität beurteilt. Diese Untersuchungen wurden im Rahmen der Dissertation von Hellweg (2005) unter der Leitung von Prof. Jürgen Zentek, Institut für Tierernährung, Universität der Tiermedizin Wien durchgeführt.

Für die Studie wurde in Übereinstimmung mit den gesetzlichen Vorgaben eine Anzeige von Eingriffen und Behandlungen an Tieren zu wissenschaftlichen Zwecken bei der Regierung von Oberbayern eingereicht.

Ablauf des Hauptversuches

Nach einer Vorperiode von zwei Wochen ohne Supplementierung wurden den Hunden die Carotinoide Lycopin und Lutein in Versuchsperiode I über einen Zeitraum von zwölf Wochen verabreicht. Nach einer Washout-Periode von elf Wochen schloss sich die zwölfwöchige Versuchsperiode II an. In beiden Versuchsabschnitten erhielten die Hunde insgesamt 2 mg/kg KG an Wirkstoff bzw. Wirkstoffen einzeln oder in Kombination und in verschiedenen Verhältnissen oral mittels Gelatine kapseln (siehe Tabelle 8). Die Eingabe der Kapseln erfolgte täglich zur gleichen Zeit mit der Fütterung.

In beiden Versuchsperioden wurden jeweils an Tag 0, 7, 21, 56 und 84 Blutproben genommen, klinische Untersuchungen durchgeführt, sowie das Körpergewicht der Tiere festgehalten.

3.1.2.1. Versuchsperiode I

36 Beagles wurden nach Geschlecht, Alter und Gewicht randomisiert den sechs Versuchsgruppen zugeteilt, wobei jede Versuchsgruppe aus sechs Hunden bestand:

Kontrollgruppe (Hunde 1-6):

Keine Verabreichung von Lycopin und Lutein

Versuchsgruppe Lycopin (Hunde 7-12):

Verabreichung von Lycopin

Dosierung: 2,0 mg/kg KG

Versuchsgruppe Lutein (Hunde 13-18):

Verabreichung von Lutein

Dosierung: 2,0 mg/kg KG

Versuchsgruppe Lycopin:Lutein 1:1 (Hunde 19-24):

Verabreichung von Lycopin und Lutein

Dosierung: 1,0 mg/kg KG Lycopin und 1,0 mg/kg KG Lutein

Versuchsgruppe Lycopin:Lutein 1:2 (Hunde 25-30):

Verabreichung von Lycopin und Lutein

Dosierung: 0,67 mg/kg KG Lycopin und 1,33 mg/kg KG Lutein

Versuchsgruppe Lycopin:Lutein 2:1 (Hunde 31-36):

Verabreichung von Lycopin und Lutein

Dosierung: 1,33 mg/kg KG Lycopin und 0,67 mg/kg KG Lutein

3.1.2.2. Washout-Periode

Im Anschluss daran folgte eine Washout-Periode von elf Wochen, in der den Tieren wiederum kein Wirkstoff verabreicht wurde. Hierdurch wurde eine Auswaschung der Substanzen aus dem Blut erreicht.

3.1.2.3. Versuchsperiode II

Für die ebenfalls zwölfwöchige Versuchsperiode II wurden 30 Beagles nach Geschlecht, Alter und Gewicht randomisiert fünf Versuchsgruppen zugeteilt, wobei jede Gruppe aus jeweils sechs Hunden (Hundennummer 1-30) bestand:

Kontrollgruppe (Hunde 1-6):

keine Verabreichung von Lycopin und Lutein

Versuchsgruppe Lycopin (Hunde 7-12):

Verabreichung von Lycopin

Dosierung: 2,0 mg/kg Körpergewicht Lycopin

Versuchsgruppe Lutein (Hunde 13-18):

Verabreichung von Lutein

Dosierung: 2,0 mg/kg KG Lutein

Versuchsgruppe Lycopin:Lutein 1:2 (Hunde 19-24):

Verabreichung von Lycopin und Lutein

Dosierung: 0,67 mg/kg KG Lycopin und 1,33 mg/kg KG Lutein

Versuchsgruppe Lycopin:Lutein 2:1 (Hunde 25-30):

Verabreichung von Lycopin und Lutein

Dosierung: 1,33 mg/kg KG Lycopin und 0,67 mg/kg KG Lutein

Tabelle 8: Wirkstoffzuteilung in mg/kg Körpergewicht (KG) in Versuchsperiode I und II des Hauptversuches (Lyco: Lycopin, Lut: Lutein)

Gruppe	Wirkstoffzuteilung in mg/kg KG			
	Vor- periode	Versuchs- periode I	Washout -Periode	Versuchs- periode II
Kontrolle	-	-	-	-
Lycopin	-	2,0 mg/kg KG Lycopin	-	2,0 mg/kg KG Lycopin
Lutein	-	2,0 mg/kg KG Lutein	-	2,0 mg/kg KG Lutein
Lyco:Lut 1:1	-	1,0 mg/kg KG Lycopin + 1,0 mg/kg KG Lutein	-	
Lyco:Lut 1:2	-	0,67mg/kg KG Lycopin + 1,33 mg/kg KG Lutein	-	0,67 mg/kg KG Lycopin + 1,33 mg/kg KG Lutein
Lyco:Lut 2:1	-	1,33 mg/kg KG Lycopin + 0,67 mg/kg KG Lutein	-	1,33 mg/kg KG Lycopin + 0,67mg/kg KG Lutein
Zeitdauer	2 Wochen	12 Wochen	11 Wochen	12 Wochen

3.2. Versuchstiere und ihre Haltung

Insgesamt nahmen 45 Beagles verschiedener Altersstufen, verschiedenen Geschlechts und verschiedenen Gewichts an der Studie teil. Es handelte sich dabei um zwölf institutseigene Beagles und 33 Tiere, die von der GSF (Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit GmbH, München, Neuherberg) zur Verfügung gestellt wurden. Das Alter der Tiere variierte zu Versuchsbeginn zwischen anderthalb und elf Jahren, das Körpergewicht zwischen 10,5 kg und 25,8 kg. Es nahmen 25 weibliche und 20 männliche Tiere teil. Alle Tiere wurden regelmäßig geimpft und entwurmt.

3.2.1. Hunde des Vorversuches

Die neun Hunde des Vorversuches (siehe Tabelle 9) waren in der Außenstelle Oberwiesenfeld des Instituts für Physiologie, Physiologische Chemie und Tierernährung der Tiermedizinischen Fakultät jeweils zu zweit in Boxen auf Gummimatten mit Decken untergebracht.

Tabelle 9: Versuchstiere des Vorversuches, Alter zu Versuchsbeginn in Jahren, Geschlecht (w: weiblich) und Körpergewicht der Hunde (in kg) während des Zeitraumes des Vorversuches

Hundennummer	Alter	Geschlecht	Körpergewicht
1	4	w	11,8 ± 0,3
2	2	w	10,8 ± 0,2
3	2	w	11,1 ± 0,3
4	1	w	10,7 ± 0,2
5	1	w	10,8 ± 0,3
6	1	w	11,0 ± 0,3
7	1	w	11,1 ± 0,3
8	1	w	10,9 ± 0,3
9	1	w	10,7 ± 0,2

Sie erhielten tagsüber Auslauf in Gruppen in etwa 25 m² großen Außenzwingern, die mit einem Unterstand zum Schutz vor Witterungseinflüssen ausgestattet waren.

3.2.2. Hunde des Hauptversuches

Die Hunde des Hauptversuches waren in Gruppen von zwei bis vier Tieren, fünf Tiere in Einzelhaltung in Zwingern von jeweils 3 m x 5 m Größe mit je einem angeschlossenen, zur freien Verfügung stehenden Auslauf von 6 m x 2 m Größe in einer Außenstelle der GSF in Gröbenried, Bergkirchen, untergebracht.

Sie wurden nach Alter, Gewicht und Geschlecht randomisiert den Versuchsgruppen zugeteilt (siehe Tabelle 10 und Tabelle 11).

Tabelle 10: Versuchstiere der Versuchsperiode I des Hauptversuches, Versuchsgruppe, Alter zu Versuchsbeginn in Jahren, Geschlecht (m: männlich, w: weiblich, wk: weiblich kastriert) und durchschnittliches Körpergewicht (MW ± Stabw) während des Versuches (in kg)

Gruppe	Hundennummer	Alter	Geschlecht	Körpergewicht
Kontrolle	1-6	7,8	3m, 3w	18,0 ± 0,4
Lycopin	6-12	7,3	3m, 2w, 1wk	19,5 ± 0,4
Lutein	13-18	7,3	4m, 1w, 1wk	20,2 ± 0,2
Lyco:Lut 1:1	19-24	8,0	3m, 3w	20,5 ± 0,8
Lyco:Lut 1:2	25-30	7,2	3m, 2w, 1wk	18,6 ± 0,5
Lyco:Lut 2:1	31-36	7,8	4m, 2w	18,4 ± 0,2

Tabelle 11: Versuchstiere der Versuchsperiode II des Hauptversuches, Versuchsgruppe, Alter zu Versuchsbeginn in Jahren, Geschlecht (m: männlich, w: weiblich, wk: weiblich kastriert) und durchschnittliches Körpergewicht (MW ± Stabw) während des Versuches (in kg)

Gruppe	Hundennummer	Alter	Geschlecht	Körpergewicht
Kontrolle	1-6	7,5	4m, 1w, 1wk	19,6 ± 0,6
Lycopin	6-12	8,3	5m, 1w	21,3 ± 0,3
Lutein	13-18	8,5	4m, 2w	19,7 ± 0,5
Lyco:Lut 1:2	19-24	7,3	3m, 1w, 2wk	20,3 ± 0,8
Lyco:Lut 2:1	25-30	8,5	3m, 3w	21,3 ± 0,3

3.3. Versuchsfutter

Die Hunde erhielten das Trockenfutter MeraDog light (Mera Tiernahrung, Kevelaer-Wetten), dessen Zusammensetzung handelsüblichen Produkten entspricht (siehe Tabelle 12 und Tabelle 13).

Tabelle 12: Nährstoffgehalt des Versuchsfutters MeraDog light, nach Angaben des Herstellers, in Prozent der ursprünglichen Substanz (% uS) und in Prozent der Trockensubstanz (% TS)

Nährstoffe	Gehalt im Futter	
	% uS	% TS
Rohprotein	21,0	22,5
Rohfett	8,5	9,1
Rohasche	5,7	6,1
Rohfaser	5,1	5,5
Stickstofffreie Extrakte	53,1	56,9
Feuchte	6,6	
Trockensubstanz	93,4	

Tabelle 13: Mineralstoff- und Vitamingehalt des Versuchsfutters MeraDog light, nach Angaben des Herstellers, in g, mg bzw. Internationalen Einheiten (I.E.) pro kg Futter

Elemente	Gehalt pro kg Futter	Elemente	Gehalt pro kg Futter
Calcium	10 g	Vitamin B ₁	15,0 mg
Phosphor	8 g	Vitamin B ₂	15,0 mg
Natrium	3 g	Vitamin B ₆	10,0 mg
Kalium	6,8 g	Vitamin B ₁₂	200,0 mg
Magnesium	1 g	Vitamin C	50 mg
Eisen	220 mg	Vitamin D ₃	1000 I.E.
Zink	220 mg	Vitamin E	200 mg
Kupfer	25 mg	Nicotinsäure	40,0 mg
Mangan	60 mg	Pantothensäure	35,0 mg
Selen	0,41 mg	Folsäure	1,5 mg
Jod	2,2 mg	Biotin (Vitamin H)	500 mg
Vitamin A	12000 I.E.	Cholinchlorid	2500 mg
β-Carotin	10 mg	L-Carnitin	40 mg

Den Hunden wurden bedarfsdeckend im Tagesdurchschnitt 0,45 MJ/kg KM^{0,75} zugeteilt. Die Fütterung erfolgte einmal täglich gegen 10 Uhr, wobei das Futter zuvor mit Wasser eingeweicht wurde. Leitungswasser stand den Hunden ad libitum zur Verfügung.

3.4. Kapseln

Im Vorversuch wurde die jeweilige Menge an Wirkstoff (Lycopin: Lycopene 5% TG, Roche, Basel, Schweiz; Lutein: Lutein 5% TG, Roche, Basel, Schweiz) für jede Kapsel einzeln abgewogen (Waage Mettler AE160, Mettler-Toledo GmbH, Giessen) und in Hartgelatineleerkapseln der Größe 000 (Wepa, Höhr-Grenzhausen) gefüllt.

Die zu verabreichenden Wirkstoffe des Hauptversuches wurden zusammen mit dem Füllstoff Placebo 5% TG (Roche, Basel, Schweiz) in die Kapseln eingefüllt. Hierzu wurden sie je nach Gewicht und Versuchsgruppe in die entsprechende Menge an Füllstoff eingemischt und mittels des Kapselfüll- und Schließgerätes Aponorm (Fa. Wepa, Höhr-Grenzhausen) in Hartgelatineleerkapseln der Größe 000 gefüllt.

Die maximal zulässige Gewichtsschwankung der Kapseln wurde mit 5% festgelegt, was bedeutet, dass nur Kapseln verwendet wurden, deren Inhalt zwischen 95% und 105% der errechneten Füllmenge lag. Damit betrug folglich auch die Schwankungsbreite der Wirkstoffe maximal $\pm 5\%$.

3.5. Blutentnahme

Die Blutproben wurden zu den jeweiligen Zeitpunkten durch Punktion der Vena cephalica antebrachii mit sterilen Einmalkanülen (0,9 x 40 mm, Fa. Terumo, Leuven, Belgien) genommen. Im Vorversuch wurden hierzu je 2 ml Blut in mit K-EDTA beschichtete Röhrchen zur Plasmagewinnung verbracht (Fa. Sarstedt AG & Co., Nümbrecht).

An den Entnahmezeitpunkten des Hauptversuches wurden jedem Hund 23 ml Vollblut entnommen. Davon wurden je 10 ml in Röhrchen mit Gerinnungsaktivator zur Serumgewinnung (Fa. Sarstedt AG & Co. AG & Co., Nümbrecht), 2 ml in mit K-EDTA beschichtete Röhrchen zur Plasmagewinnung, 2 ml in K-EDTA-Röhrchen zur Bestimmung des roten und weißen Blutbildes, viermal 2 ml in K-EDTA-Röhrchen und

1 ml in heparinisierte Röhrchen (Fa. Sarstedt AG & Co., Nümbrecht) für die Bestimmung der Immunparameter verbracht.

Bis zur weiteren Bearbeitung wurden die Proben lichtgeschützt und nach ca. 15 Minuten kühl aufbewahrt.

3.6. Bearbeitung und Aufbewahrung der Proben

Serumgewinnung

Die Röhrchen mit Gerinnungsaktivator zur Serumgewinnung wurden bis zur vollständigen Gerinnung des Blutes senkrecht stehend bei Raumtemperatur aufbewahrt. Durch Zentrifugation des Blutes bei 3000 U/min für die Dauer von 10 Minuten (Zentrifuge Heraeus Sepatech, Hereaus Holding GmbH, Hanau) innerhalb von vier Stunden nach Entnahme wurde das Serum abgetrennt und die zur jeweiligen Untersuchung benötigten Aliquots in Reagiergefäße (Fa. Sarstedt AG & Co., Nümbrecht) überführt.

Plasmagewinnung

Das Blut in den K-EDTA-Röhrchen zur Plasmagewinnung wurde ebenfalls innerhalb von vier Stunden mit 3000 U/min 10 Minuten lang zentrifugiert und das Plasma mittels Pasteurpipetten (Fa. VWR, Darmstadt) in Reagiergefäße verbracht.

Bearbeitung der Proben zur Vitamin C-Bestimmung

Bei der Vorbereitung der Proben zur Bestimmung des Vitamin C-Gehalts im Serum wurden nach der Gewinnung des Serums Aliquots von 500 µl in Reagiergefäße überführt. Unmittelbar danach wurde jede Probe entsprechend einem Verhältnis von 1:1 mit 500 µl 5%iger meta-Phosphorsäure (Fa. Merck KGaA, Darmstadt) versetzt.

Aufbewahrung der Proben

Alle genannten Proben wurden auf Trockeneis (Fa. Air Liquide GmbH, München) zum Institut für Tierernährung transportiert. Dort wurden das Material für die Vitamin E- und Vitamin C-, Creatinkinase (CK)- und Aspartat-Aminotransferase (AST)-Bestimmung bei -20°C , die Proben für die Bestimmung der Trolox Equivalent Antioxidant Capacity (TEAC) und der Totalen und Latenten Eisenbindungskapazität (TEBK und LEBK), sowie der Plasmaresponse bei -80°C bis zur weiteren Untersuchung aufbewahrt.

Für die Bestimmung des roten und weißen Blutbildes wurden von jedem Tier 2 ml mittels K-EDTA gerinnungsgehemmtes Blut gekühlt bis zur Bestimmung am selben Tag aufbewahrt.

Die Proben für die Bestimmung der Immunparameter wurden gekühlt innerhalb von 24 Stunden nach Gewinnung zur Untersuchung an Prof. Jürgen Zentek, Institut für Ernährung, Universität der Tiermedizin Wien geschickt.

3.7. Allgemeine Untersuchungsparameter

3.7.1. Gesundheitszustand

Bei der täglichen Fütterung wurden der Gesundheitszustand und das Verhalten der Tiere kontrolliert.

3.7.2. Gewichtsentwicklung

Die Entwicklung des Körpergewichts der Hunde wurde durch Wiegen an den Tagen 0, 7, 21, 56 und 84 in beiden Versuchsperioden verfolgt.

3.8. Bestimmung der Plasmaresponse

Die Plasmaresponse von Lycopin und Lutein wurde im Labor der Fa. DSM Nutritional Products AG, Kaiseraugst, Schweiz (ehemals Roche Vitamins AG, Basel, Schweiz) mittels HPLC (High Performance Liquid Chromatography, Hochleistungsflüssigkeitschromatographie) bestimmt.

Hierzu wurden die Plasmaproteine zunächst mit Ethanol gefällt. Die Carotinoide wurden mit n-Hexan/BHT aus der wässrigen Lösung extrahiert. Nach Zentrifugation wurde ein Aliquot der organischen Phase getrocknet, in einem Lösungsmittelgemisch aufgenommen und auf einer apolaren Säule (C18) isokratisch mittels HPLC aufgetrennt. Die Detektion und Quantifizierung der Carotinoide erfolgte schließlich photometrisch.

3.9. Untersuchung des antioxidativen Status

Die Untersuchung des antioxidativen Status umfasste die Bestimmung der Trolox Equivalent Antioxidant Capacity (TEAC), der Vitamin E- und C-Konzentration, der Enzyme Creatinkinase (CK) und Aspartat-Aminotransferase (AST), sowie der Totalen und Latenten Eisenbindungskapazität (TEBK und LEBK) im Serum.

3.9.1. Bestimmung der Trolox Equivalent Antioxidant Capacity (TEAC)

Die Bestimmung der TEAC erfolgte photometrisch in Anlehnung an die Methode von Miller et al. (1996). Die TEAC ist definiert als die Konzentration von Trolox, einem wasserlöslichen Vitamin E-Analog, in mmol/l, die die gleiche antioxidative Kapazität wie eine 1,0 mmol/l Lösung der zu untersuchenden Substanz, in diesem Fall Serum, besitzt.

Prinzip

Nach Zugabe des Probenaliquots zu einer ABTS-Radikal-Kationen (ABTS^{•+})-Lösung reduzierten die im Serum enthaltenen Antioxidantien, vornehmlich Albumin, Harnsäure, Ascorbinsäure, α -Tocopherol und Bilirubin, die chromogenen ABTS^{•+}, wodurch die Farbintensität der Lösung verringert und ihre Extinktion erniedrigt wurde. Aus der photometrisch bei einer Wellenlänge von 734 nm ermittelten Extinktion wurde zunächst die TAA (Total Antioxidant Activity), aus dieser wiederum die TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity) errechnet.

Reagenzien und Material

- 2,2'-Azino-bis(3-ethylbenz-thiazoline-6-sulfonsäure) diammonium Salz (ABTS), Fa. Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
- PBS-Puffer-Lösung (phosphate buffered solution, 5 mM, pH = 7,4): Mischen von Na₂HPO₄ x 12 H₂O (1,7907 g/l) und NaH₂PO₄ x H₂O (0,655 g/l) zu einem pH von 7,4 und Zugabe von 9,0 g/l NaCl
- Mangandioxid („manganese dioxid, activated“), Fa. Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
- Whatman No.5 Filterpapier, Fa. VWR International GmbH, Darmstadt
- Whatman PVDF syringe filter, Fa. VWR International GmbH, Darmstadt
- Trolox (6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carbonsäure), Fa. Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
- PS-1/2-Mikroküvette, Fa. Brand GmbH + Co KG, Wertheim

Apparate

- Photometer Genesys 10uv, Fa. Thermo-Spectronic Deutschland, Dreieich
- Vortex-Schüttler, Fa. Bender & Hobein AG, Zürich, Schweiz

Zunächst wurde durch Lösen von 2,2'-Azino-bis(3-ethylbenz-thiazoline-6-sulfonsäure) diammonium Salz in PBS-Puffer-Lösung eine 5 mM ABTS-Stammlösung hergestellt. Aus ABTS entstand durch Durchfließen von Mangandioxid

mittels eines Whatman No.5 Filterpapiers das ABTS-Radikal-Kation (ABTS^{•+}). Überschüssiges Mangandioxid wurde durch Filtration durch einen Whatman PVDF syringe filter mit einer Porengröße von 0,2 µm entfernt. Danach erfolgte die Einstellung dieser ABTS^{•+}-Lösung mit PBS-Puffer auf eine Extinktion von $0,700 \pm 0,002$ bei 734 nm.

Vor jeder Messung wurde der Nullwert am Photometer bei einer Wellenlänge von 734 nm mit PBS-Pufferlösung abgeglichen. Von jeder Probe wurde eine Doppelbestimmung durchgeführt.

Erstellung einer Kalibrierkurve

Zunächst wurde täglich vor Messbeginn eine Kalibrierkurve erstellt. Hierzu erfolgte die Herstellung einer 2,5 mM Trolox-Stammlösung aus Trolox und PBS-Puffer, wobei die Trolox-Kristalle mit Ultraschall in Lösung gebracht wurden. Aus dieser Stammlösung wurden wiederum durch Verdünnung mit PBS-Puffer die Standards für die Kalibrierkurve bereitet (siehe Tabelle 14).

Tabelle 14: Standards aus Verdünnungen der 2,5 mM Trolox-Stammlösung mit PBS-Puffer zur Erstellung der Kalibrierkurve

Standard	Trolox-Stammlösung (2,5 mM)	PBS-Puffer
2,5 mM	500 µl	-
2,0 mM	100 µl	25 µl
1,5 mM	100 µl	66 µl
1,0 mM	100 µl	150 µl
0,5 mM	100 µl	400 µl
0 mM	-	500 µl

Nach dem Pipettieren von 10 µl des entsprechenden Standards in eine PS-1/2-Mikroküvette wurden 990 µl ABTS^{•+}-Lösung zugegeben, die Mikroküvette kurz geschüttelt und nach exakt einer Minute die Extinktion bei 734 abgelesen.

Nach Ermittlung des Extinktionsmittelwertes der beiden Messwerte der Doppelbestimmung wurde die TAA nach folgender Formel berechnet:

$$\text{TAA} = (\text{Extinktion}_{\text{Nullwert}} - \text{Extinktion}_{\text{Standard}}) / \text{Extinktion}_{\text{Nullwert}}$$

An Hand dieser Werte wurde eine Kalibrierkurve erstellt, wobei auf der x-Achse die Troloxkonzentration, auf der y-Achse die zugehörige berechnete TAA aufgetragen wurde (siehe Abbildung 3).

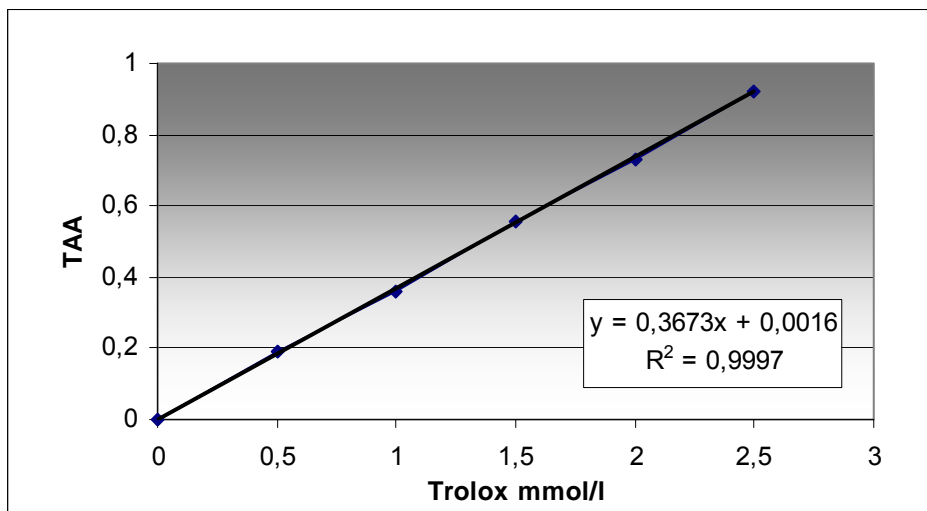


Abbildung 3: Beispiel einer Kalibrierkurve für die TEAC-Bestimmung

Alle weiteren Berechnungen sollen anhand dieses Beispiels demonstriert werden. Nach Ermittlung der Formel der Trendlinie der Kalibrierkurve, in diesem Beispiel $\text{TAA}_{\text{Probe}} (y) = 0,3673 \text{ TEAC}_{\text{Probe}} (x) + 0,0016$, die mittels eines Tabellenkalkulationsprogrammes (Microsoft[®] Excel 97) in das Diagramm gezeichnet wurde, und deren Auflösung nach x konnte folgende Formel für die Berechnung der TEAC ermittelt werden:

$$\text{TEAC (mmol/l)} = (\text{TAA} - 0,0016) / 0,3673$$

Analyse der Proben

Nach dem Auftauen bei Raumtemperatur erfolgte die Messung der Extinktionen der Proben entsprechend der Vorgehensweise bei den Standards. Nach dem Pipettieren von 10 µl Serum in eine PS-1/2-Mikroküvette, der Zugabe von 990 µl

ABTS^{•+}-Lösung und kurzem Schütteln auf einem Vortex-Schüttler wurde die Extinktion nach exakt einer Minute bei 734 nm abgelesen. Aus dem Extinktionsmittelwert der beiden Messwerte der Doppelbestimmung wurden die TAA und schließlich die TEAC nach folgenden Formeln errechnet.

$$\text{TAA}_{\text{Probe}} = (\text{Extinktion}_{\text{Nullwert}} - \text{Extinktion}_{\text{Probe}}) / \text{Extinktion}_{\text{Nullwert}}$$

$$\text{TEAC}_{\text{Probe}} \text{ (mmol/l)} = (\text{TAA}_{\text{Probe}} + 0,0016) / 0,3673$$

3.9.2. Bestimmung der Vitamin E-Konzentration im Serum

Der Gehalt der Serumproben an Vitamin E wurde mittels HPLC mit Fluoreszenzdetektor in Anlehnung an die Methode nach Vuilleumier et al. (1983) bestimmt.

Prinzip

Das im Serum enthaltenen Vitamin E wurde nach dem Ausfällen der Serumproteine mit Ethanol unter Verwendung des Lösungsmittels Hexan extrahiert, dieses durch Abdampfen unter Stickstoffgaszufluss wieder entfernt und das trockene Vitamin E in einem Methanol-Ethanol-Gemisch (80:20) aufgenommen. Die Analyse erfolgte chromatographisch mittels HPLC.

Reagenzien und Material

- Reinstwasser für die Chromatographie, hauseigene Herstellung (Anlage Seralpur delta, Fa. Seral Reinstwasser-Systeme, Ransbach-Baumbach)
- Ethanol 96% vergällt, Fa. Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
- n-Hexan, Rotisolv® HPLC, Fa. Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
- Methanol, LiChrosolv, Fa. Merck KGaA, Darmstadt
- α -Tocopherol, Fa. Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
- HPLC-Fläschchen G8-1,5 br, 1,5 ml, 32x11,5, braun, Fa. Chromatographie Handel Müller, Fridolfing

- Mikroeinsätze für HPLC-Fläschchen, Öffn=5mm, 0,1 ml, 30x5 mm, farblos, rund, Fa. Chromatographie Handel Müller, Fridolfing
- Schraubkappe G8 für HPLC-Fläschchen, 1,3 mm, 35S, Silicon-weiß/PTFE-rot, Fa. Chromatographie Handel Müller, Fridolfing
- PS-1/2-Mikroküvette, Fa. Brand GmbH + Co KG, Wertheim

Apparate

- Vortex-Schüttler, Fa. Bender & Hobein AG, Zürich, Schweiz
- Zentrifuge Eppendorf Centrifuge 5702 R, Fa. Eppendorf AG, Hamburg
- HPLC-Anlage
 - Class-vp Chromatography Data System Version 4.2 mit Computer Pentium I 90, 128 MB RAM, Fa. Shimadzu, Neufahrn bei Freising
 - Fluoreszenzdetektor, Jasco FP-920 Intelligent Fluorescence Detector, Fa. Jasco Labor- und Datentechnik GmbH Deutschland, Groß-Umstadt
 - Pumpe Merck Hitachi L-6200 Intelligent Pump, Fa. Merck KGaA, Darmstadt
 - Probengeber Shimadzu SIL 10 AD VP Auto Injector, mit integrierter Probenkühlung, Fa. Shimadzu, Neufahrn bei Freising
 - Chromatographiesäule LiChrosorb SI 60, 5 µm, 125 x 4 mm, Fa. Grom Chromatography GmbH, Rottenburg-Hailfingen

Bestimmung

Zunächst wurden die Proben bei Raumtemperatur aufgetaut. 200 µl Serum wurden in Glaszentrifugenröhrchen mit 200 µl Reinstwasser verdünnt. Durch Zugabe von 750 µl 96%igem Ethanol und Schütteln auf einem Vortex-Schüttler wurde die Ausfällung der Serumproteine erreicht. Zur Extraktion des Vitamin E wurde 1 ml n-Hexan zugeben, erneut mit Hilfe des Vortex-Schüttlers gemischt und anschließend bei 3000 U/min 5 Minuten lang zentrifugiert.

Nach dem Abpipettieren der Hexanphase in ein zweites Glasröhrchen erfolgte die Extraktion nach dem gleichen Schema ein zweites Mal. Der Überstand der zweiten Extraktion wurde mit dem der ersten vereinigt und unter Stickstoffgas im 30°C warmen Wasserbad bis zur Trockene abgedampft.

Der Rückstand wurde mit 200 μl eines Methanol-Ethanol-Gemisches (80:20) aufgenommen. Davon wurde ein Aliquot von 150 μl in ein HPLC-Fläschchen mit Einsatz überführt.

Die weitere Bestimmung erfolgte mittels HPLC, wobei eine Standardlösung mit bekanntem Vitamin E-Gehalt ins Verhältnis zu den gemessenen Peaks gesetzt wurde. Diese Standardlösung wurde durch Lösen eines Tropfens α -Tocopherol in 100 ml Ethanol hergestellt und ihre Extinktion bei 295 nm in einer PS-1/2-Mikroküvette photometrisch gemessen. Mittels des Extinktionskoeffizienten von α -Tocopherol (75,8) und des Molekulargewichts (430,69 g/mol) wurde die molare Konzentration der Standardlösung bestimmt. Sie wurde mit anschließend mit Ethanol soweit verdünnt, bis ein dem Hundeserum entsprechender Vitamin E-Gehalt erreicht wurde.

Als mobile Phase diente Methanol. Die Elution des Vitamin E erfolgte bei einer Flussrate von 1,0 ml/min. Der Vitamin E-Gehalt wurde bei einer Exzitation von 295 nm und einer Emission von 330 nm fluoreszenzphotometrisch bestimmt.

3.9.3. Bestimmung der Vitamin C-Konzentration im Serum

Die Bestimmung der Vitamin C-Gehalte im Serum erfolgte nach einer in unserem Institut entwickelten Methode mittels HPLC.

Prinzip

In einem Fällungsschritt wurden höhermolekulare Substanzen abgetrennt. Anschließend erfolgte die Auftrennung mittels HPLC unter Verwendung eines UV-Detektors.

Reagenzien und Material

- L-ascorbic acid, Fa. Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
- Acetonitril, LiChrosolv, Fa. Merck KGaA, Darmstadt
- Ammoniumdihydrogenphosphat-Lösung, 50 mM:

Lösen der Ammoniumdihydrogenphosphat-Kristalle (reinst, Fa. Merck KGaA, Darmstadt) mit Hilfe eines Magnetrührstabes in Reinstwasser für die Chromatographie, hauseigene Herstellung (Anlage Seralpur delta, Fa. Seral Reinstwasser-Systeme, Ransbach-Baumbach)

- meta-Phosphorsäure 5%, Fa. Merck KGaA, Darmstadt: Lösen der Kristalle mit Hilfe eines Magnetrührstabes in Reinstwasser für die Chromatographie, hauseigene Herstellung (Anlage Seralpur delta, Fa. Seral Reinstwasser-Systeme, Ransbach-Baumbach)
- HPLC-Fläschchen G8-1,5 br, 1,5 ml, 32x11,5, braun, Fa. Chromatographie Handel Müller, Fridolfing
- Mikroinserte für HPLC-Fläschchen, Öffn=5mm, 0,1 ml, 30x5 mm, farblos, rund, Fa. Chromatographie Handel Müller, Fridolfing
- Schraubkappe G8 für HPLC-Fläschchen, 1,3 mm, 35S, Silicon-weiß/PTFE-rot, Fa. Chromatographie Handel Müller, Fridolfing
- Elutionsmittel
- Mischen von Acetonitril (LiChrosolv, Fa. Merck KGaA, Darmstadt) mit einer 50mM Ammoniumdihydrogenphosphat-Lösung im Verhältnis 7:3

Apparate

- Präzisionswaage Mettler AE160, Fa. Mettler-Toledo GmbH, Giessen
- Zentrifuge: Eppendorf Centrifuge 5702 R, Fa. Eppendorf AG, Hamburg
- HPLC-Anlage
 - Class-vp Chromatography Data System Version 4.2 mit Computer Pentium I 90, 128 MB RAM, Fa. Shimadzu, Neufahrn bei Freising
 - UV-Detektor, Shimadzu SPD-10A VP UV-Vis Detector, Fa. Shimadzu, Neufahrn bei Freising
 - Pumpe Merck Hitachi L-6200 Intelligent Pump, Fa. Merck KGaA, Darmstadt
 - Probengeber Shimadzu SIL 10 AD VP Auto Injector, mit integrierter Probenkühlung, Fa. Shimadzu, Neufahrn bei Freising
 - Chromatographiesäule Grom SIL 120-Amino-2PA, 5 μ m, 250 x 4 mm, Fa. Grom Chromatography GmbH, Rottenburg-Hailfingen

Bestimmung

Die 1:1 mit meta-Phosphorsäure versetzten Serumproben wurden bei Raumtemperatur aufgetaut und bei 3000 U/min fünf Minuten lang zentrifugiert. Der Überstand wurde abpipettiert und zur vollständigen Entfernung der Proteine 1:1 mit Acetonitril versetzt. Nach erneutem Zentrifugieren und Abpipettieren wurde ein Aliquot von 80 µl in die HPLC-Anlage injiziert. Als Elutionsmittel diente ein Acetonitril-Ammoniumdihydrogenphosphat-Gemisch im Verhältnis 7:3, die Durchflussrate betrug 1,0 ml/min.

Die bei 250 nm gemessenen Peaks wurden mit einer Standardlösung mit bekanntem Vitamin C-Gehalt verglichen und daraus der Gehalt der Probe an Vitamin C ermittelt. Die hierzu benötigte Standardlösung wurde hergestellt, indem 100 mg L-Ascorbinsäure auf einer Präzisionswaage abgewogen und auf 100 ml meta-Phosphorsäure aufgefüllt wurde. Diese Stammlösung wurde mit meta-Phosphorsäure entsprechend der Konzentration der Proben verdünnt

3.9.4. Bestimmung der Enzyme Creatinkinase (CK) und Aspartat-Aminotransferase (AST)

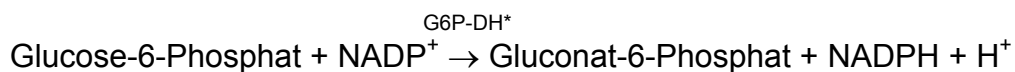
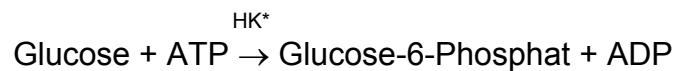
3.9.4.1. Bestimmung der Creatinkinase (CK)

Die Bestimmung von CK (in IU/l) erfolgte im Labor der I. Medizinischen Klinik der Ludwig-Maximilians-Universität München mittels Creatinphosphat und Adenosindiphosphat (ADP) nach einer Methode, die von Szasz et al. (1976) auf optimale Testbedingungen verbessert wurde. Photometrisch gemessen wurde die Extinktionszunahme durch Entstehung von NADPH, die der Aktivität der CK im Serum proportional war.

Die Probe wurde zunächst mit einer Puffer/Enzym/Coenzym-Lösung (gebrauchsfertige Lösung R1, Fa. Roche, Diagnostics GmbH, Mannheim) versetzt, die sicherstellte, dass die sehr rasch durch Oxidation ihrer zentralen Sulfhydrylgruppen inaktivierte CK reaktiviert wurde.

Durch Zugabe einer Puffer/Substrat-Lösung (gebrauchsfertige Lösung R2, Fa. Roche, Diagnostics GmbH, Mannheim) wurde eine Kaskade von Reaktionen gestartet. Creatinphosphat und ADP reagierten unter dem Einfluss von CK als Katalysator zu Creatin und Adenosintriphosphat (ATP). ATP wiederum wurde mit Glucose zu ADP und Glucose-6-Phosphat umgewandelt, von denen letzteres mit NADP⁺ zu Gluconat-6-P, NADPH und H⁺ reagierte. Die Extinktionszunahme durch NADPH wurde schließlich photometrisch gemessen, wobei die Geschwindigkeit der NADPH-Bildung der CK-Aktivität proportional war.

Übersicht über die ablaufenden Reaktionen



*CK: Creatinkinase

HK: Hexokinase

G6P-DH: Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase

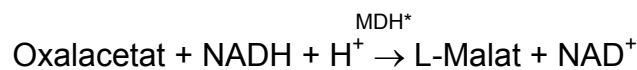
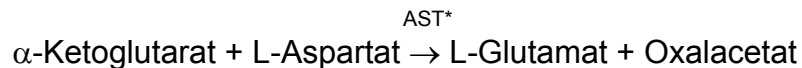
3.9.4.2. Bestimmung der Aspartat-Aminotransferase (AST)

Die Bestimmung von AST (in IU/l) erfolgte ebenfalls im Labor der I. Medizinischen Klinik der Ludwig-Maximilians-Universität München mittels einer von der Referenzmethode nach IFCC (International Federation of Clinical Chemistry) abgeleiteten Methode, bei der die Abnahme der NADH-Konzentration im Zeitablauf photometrisch gemessen und daraus die AST-Aktivität bestimmt wurde.

Die Probe wurde zunächst mit einer Puffer/Enzym/Coenzym-Lösung (gebrauchsfertige Lösung R1, Fa. Roche, Diagnostics GmbH, Mannheim) versetzt, die die Vermeidung von unerwünscht ablaufenden Nebenreaktionen sicherstellte. Durch Zugabe der Substrat-Lösung (gebrauchsfertige Lösung R2, Fa. Roche, Diagnostics GmbH, Mannheim) wurde folgende Reaktion gestartet: α -Ketoglutarat und L-Aspartat reagierten unter dem Einfluss von AST als Katalysator zu L-Glutamat

und Oxalacetat. Die Zunahme von Oxalacetat wurde mit einer Indikatorreaktion bestimmt. Hierbei reagierten Oxalacetat, NADH und H^+ zu L-Malat und NAD^+ , wobei NADH oxidiert wurde. Die Geschwindigkeit der photometrisch gemessenen Abnahme von NADH war direkt proportional der Bildungsgeschwindigkeit von Oxalacetat und somit der AST-Aktivität.

Übersicht über die ablaufenden Reaktionen



* AST: Aspartat-Aminotransferase

MDH: Malat-Dehydrogenase

3.9.5. Bestimmung der Totalen und Latenten Eisenbindungskapazität (TEBK und LEBK)

3.9.5.1. Totale Eisenbindungskapazität (TEBK)

Die Totale Eisenbindungskapazität wurde mit Hilfe von kommerziellen Testkits für die kolorimetrische Bestimmung von Eisen und der Eisenbindungskapazität (Randox Laboratories GmbH, Krefeld) ermittelt.

Prinzip

Zur Bestimmung der TEBK wurde das Serum zunächst mit einem Überschuss an Eisen versetzt, um das eisenbindende Transferrin zu sättigen. Das übrige ungebundene Eisen wurde mit basischem Magnesiumcarbonat ausgefällt. Nach Zentrifugation wurde im Überstand mit Hilfe des Testkits für die Eisenbestimmung das enthaltene Eisen bestimmt. Hierzu wurde dieses Eisen (III) in saurer Umgebung von seinem Trägerprotein Transferrin getrennt und zu Eisen (II) reduziert. Letzteres wurde durch das Chromogen Feren, ein auf Eisen sensibler Farbindikator, zu einem

blauen Chromophor komplexiert, welches bei einer Wellenlänge von 595 nm photometrisch nachgewiesen wurde. Die Menge des gemessenen Eisens entsprach der des Transferrins und stellte damit die Totale Eisenbindungskapazität der untersuchten Probe dar.

Reagenzien und Material

- Folgende Reagenzien wurden den beiden Testkits „Eisen im Serum“ (SI 257) und „Eisenbindungskapazität“ (TI 1010) der Firma Randox Laboratories GmbH, Krefeld entnommen:
 - Eisen-Lösung 500 µg/100ml
 - Magnesiumhydroxidcarbonat
 - Chromogen: Feren-Lösung 22 mmol/l
 - Reduziermittel: Ascorbinsäure-Lösung 1,3 mol/l
 - Puffer-Lösung (Acetat-Puffer, Dimethyl-Sulphoxyd, Netzmittel): 0,087 mol/l, pH 4,65
 - Eichmaß 200 µg/dl
- Reinstwasser, hauseigene Herstellung (Anlage Seralpur delta, Fa. Seral Reinstwasser-Systeme)
- PS-1/2-Mikroküvette, Fa. Brand GmbH + Co KG, Wertheim

Apparate

- Vortex-Schüttler, Fa. Bender & Hobein AG, Zürich, Schweiz
- Zentrifuge Eppendorf Centrifuge 5702 R, Fa. Eppendorf AG, Hamburg
- Photometer Genesys 10uv, Fa. Thermo-Spectronic Deutschland, Dreieich

Testdurchführung

Zunächst wurden 0,5 ml Serum und 1,0 ml Eisenlösung in ein 10 ml Zentrifugenröhrchen pipettiert. Nach sorgfältigem Mischen auf dem Vortex-Schüttler wurden die Ansätze bei +20 bis +25°C für 30 Minuten stehen gelassen. Anschließend wurden 180 mg Magnesiumhydroxidcarbonat hinzugefügt und die

Ansätze weitere 60 Minuten bei +20 bis +25°C stehen gelassen, wobei sie während dieser Zeit hin und wieder gemischt wurden. Anschließend wurden sie bei 3000 U/min 10 Minuten lang zentrifugiert und der Überstand abpipettiert.

0,25 ml dieses Überstandes wurden schließlich für den Testkit „Eisen im Serum“ nach dem Semi-Mikro-Verfahren verwendet. Hierzu wurden Ansätze nach folgendem Schema in Mikroküvetten pipettiert (siehe Tabelle 15).

Tabelle 15: Pipettierschema für die Bestimmung der TEBK

	Blindreagenz	Probe	Eichmaß
Puffer	1,00 ml	1,00 ml	1,00 ml
Reduziermittel	0,05 ml	0,05 ml	0,05 ml
Eisenfreies Wasser	0,25 ml	-	-
Eichmaß	-	-	0,25 ml
Probe	-	0,25 ml	-

Nach sorgfältigem Mischen wurde die Anfangsextinktionsdifferenz (INITIAL) der Probe und des Eichmaßes gegen die Blindreagenz bei einer Wellenlänge von 595 nm abgelesen.

Anschließend wurde zu jedem Ansatz 0,05 ml Chromogen-Lösung zugegeben. Die Ansätze wurden erneut gemischt und bei +20 bis +25°C 15 Minuten lang inkubiert. Danach wurde die Endextinktion (FINAL) der Probe und des Eichmaßes gegen die Blindreagenz bei 595 nm abgelesen. Die Konzentration des enthaltenen Eisens, und damit die Transferrinkonzentration und die TEBK, wurde nach folgenden Formeln berechnet:

$$\Delta \text{ Probe} = \text{FINAL}_{\text{Probe}} - \text{INITIAL}_{\text{Probe}}$$

$$\Delta \text{ Eichmaß} = \text{FINAL}_{\text{Eichmaß}} - \text{INITIAL}_{\text{Eichmaß}}$$

$$\text{TEBK (mg/dl)} = \Delta \text{ Probe} / \Delta \text{ Eichmaß} \times 0,6$$

3.9.5.2. Latente Eisenbindungskapazität (LEBK)

Für die Berechnung der LEBK wurde zunächst die Serumeisenkonzentration bestimmt. Hierzu wurde ebenfalls der Testkit „Eisen im Serum“ nach dem Semi-Mikro-Verfahren angewandt (siehe Testdurchführung TEBK), wobei jedoch als Probenmaterial 0,25 ml Serum verwendet wurden. Der Gehalt der Probe an Eisen wurde nach folgender Formel berechnet:

$$\text{Eisen im Serum (mg/dl)} = \Delta \text{ Probe} / \Delta \text{ Eichmaß} \times 0,2^*$$

* Konzentration des Eichmaßes (mg/dl)

Schließlich konnte aus der TEBK und dem Eisengehalt die LEBK berechnet werden:

$$\text{LEBK (mg/dl)} = \text{TEBK} - \text{Serumeisenkonzentration}$$

3.10. Immunantwort

Die Bestimmung folgender Parameter werden im Rahmen der Dissertation von Hellweg (2005) unter der Leitung von Prof. Jürgen Zentek, Institut für Ernährung, Universität der Tiermedizin Wien, veröffentlicht und sollen an dieser Stelle nur kurz aufgeführt werden.

- IgG und IgM
- Mitogen-induzierte Proliferation der PBMC (Peripheral Blood Mononuclear Cells)
- Leukozyten-Subpopulationen
- Hypersensitivität vom verzögerten Typ
- Produktion von Interleukin-2

3.11. Bestimmung des roten und weißen Blutbilds

Die Bestimmung des roten und weißen Blutbilds wurde im Labor der I. Medizinischen Klinik der Ludwig-Maximilians-Universität München mit Hilfe des Gerätes Cell Dyn[®] 3500R (Fa. Abbott GmbH & Co. KG, Wiesbaden) durchgeführt.

Dabei wurden folgende Parameter gemessen: Hämoglobingehalt, Hämatokrit, Erythrozytenzahl, MCHC (Mean Corpuscular Hemoglobin Concentration, mittlere Hämoglobinkonzentration der Erythrozyten), MCH (Mean Corpuscular Hemoglobin, mittlerer Hämoglobingehalt der Einzelerythrozyten), MCV (Mean Corpuscular Volume, mittleres Erythrozytenvolumen), Thrombozytenzahl, Leukozytenzahl, Zahl der neutrophilen Granulozyten, Zahl der eosinophilen Granulozyten, Zahl der basophilen Granulozyten, Lymphozytenzahl, Monozytenzahl.

3.12. Statistische Methoden

Die Ergebnisse sind als arithmetische Mittel der einzelnen Versuchsgruppen mit der dazugehörigen Standardabweichung angegeben. Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe des Statistikprogramms SAS (Statistical Analysis System) für Windows, Version 6.12.

Zur Erfassung signifikanter Unterschiede innerhalb der Gruppen zu den verschiedenen Zeitpunkten wurden die Varianzanalyse und der LSD-Test angewandt. Die Unterschiede der Mittelwerte der Versuchsgruppen im Vergleich zur Kontrollgruppe an den verschiedenen Zeitpunkten wurden mit Hilfe des Dunnett-Tests auf ihre Signifikanz hin überprüft. Eine Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ wurde dabei als signifikant angesehen.

4. Ergebnisse

4.1. Klinische Beobachtungen

4.1.1. Gesundheitszustand

Das Allgemeinbefinden der Hunde war bis auf wenige Ausnahmen ungestört. Vereinzelt kam es aufgrund von Aggressionsverhalten der Hunde untereinander zu Verletzungen, die mit Wundversorgung und z. T. mit Antibiose behandelt wurden.

Zwei Hunde mussten während des Versuches euthanasiert werden. Bei Hund 24 aus Versuchsperiode I ergab die pathologische Untersuchung mehrere Schleimhautpolypen sowie ein Lymphom, bei Hund 16 aus Versuchsperiode II wurde bei der Sektion ein undifferenziertes Karzinom der Glandula parotis festgestellt.

4.1.2. Gewichtsentwicklung

Das Gewicht der Tiere betrug zu Versuchsbeginn zwischen 10,5 kg und 25,8 kg und blieb während der Versuchsdauer weitgehend konstant (siehe Abbildung 4 und Abbildung 5).

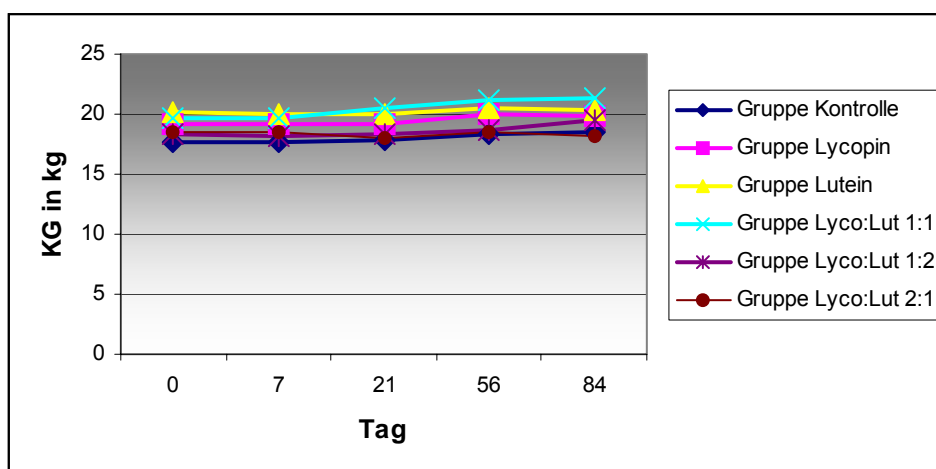


Abbildung 4: Entwicklung des mittleren Körpergewichts (KG) in kg der sechs Gruppen während der Versuchsperiode I

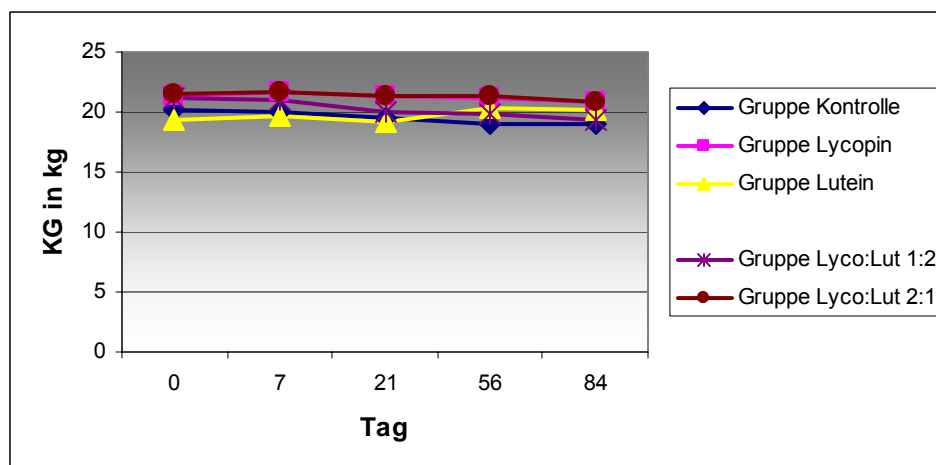


Abbildung 5: Entwicklung des mittleren Körpergewichts (KG) in kg der fünf Gruppen während der Versuchsperiode II

4.2. Plasmaresponse

Die Untersuchung der Plasmaproben auf ihren Gehalt an Lycopin und Lutein wurde im Labor der Fa. DSM Nutritional Products AG, Kaiseraugst, Schweiz, durchgeführt.

4.2.1. Vorversuch

4.2.1.1. Lycopin

Die Gruppenmittelwerte der Lycopingehalte (in $\mu\text{g/l}$) im Plasma der Hunde während des Vorversuches sind Tabelle 16 zu entnehmen.

Vor der Kapselgabe war bei keinem der Hunde Lycopin im Plasma nachweisbar. Weiterhin konnte in der Kontrollgruppe und der Gruppe Lutein zu keinem Zeitpunkt Lycopin im Plasma festgestellt werden.

In der Gruppe Lycopin war der Wirkstoff erstmals 60 Minuten nach Kapselgabe im Plasma nachweisbar und stieg signifikant an, um 18 Stunden nach Kapselgabe einen Maximalwert von $57,67 \mu\text{g/l}$ zu erreichen. Danach sank der Plasmagehalt wieder ab.

Tabelle 16: Mittlerer Lycopin-Gehalt im Plasma der drei Gruppen im Vorversuch zu den Zeitpunkten 0, 15 Minuten, 30 Minuten, eine, zwei, drei, vier, fünf, sechs, acht, zehn, zwölf, 18 und 24 Stunden nach Kapselgabe in µg/l (MW ± Stabw)

	Gruppe Kontrolle	Gruppe Lutein	Gruppe Lycopin
0	n.n ^a	n.n ^a	n.n ^a
15 Min	n.n ^a	n.n ^a	n.n ^a
30 Min	n.n ^a	n.n ^a	n.n ^a
60 Min	n.n ^a	n.n ^a	6,56 ± 3,81 ^{ab}
90 Min	n.n ^a	n.n ^a	16,78 ± 11,53 ^{abc}
2 Std	n.n ^a	n.n ^a	18,38 ± 10,98 ^{abc}
3 Std	n.n ^a	n.n ^a	27,67 ± 20,92 ^{bcd}
4 Std	n.n ^a	n.n ^a	27,78 ± 19,51 ^{bcd}
5 Std	n.n ^a	n.n ^a	28,67 ± 15,42 ^{bcd}
6 Std	n.n ^a	n.n ^a	40,78 ± 29,16 ^{cde}
8 Std	n.n ^a	n.n ^a	48,11 ± 36,61 ^{de}
10 Std	n.n ^a	n.n ^a	51,56 ± 43,68 ^{de}
12 Std	n.n ^a	n.n ^a	55,89 ± 42,38 ^e
18 Std	n.n ^a	n.n ^a	57,67 ± 45,22 ^e
24 Std	n.n ^a	n.n ^a	53,78 ± 45,10 ^e

a, b, c, d, e: unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede (p < 0,05) zwischen den verschiedenen Zeitpunkten innerhalb einer Gruppe

n.n.: nicht nachweisbar; Werte unterhalb der Nachweisgrenze wurden bei der statistischen Auswertung als 0 gerechnet

4.2.1.2. Lutein

In Tabelle 17 sind die Gruppenmittelwerte des Luteingehalts (in µg/l) im Plasma der Hunde während des Vorversuches zusammengefasst.

Tabelle 17: Mittlerer Lutein-Gehalt im Plasma der drei Gruppen im Vorversuch zu den Zeitpunkten 0, 15 Minuten, 30 Minuten, eine, zwei, drei, vier, fünf, sechs, acht, zehn, zwölf, 18 und 24 Stunden nach Kapselgabe in µg/l (MW ± Stabw)

	Gruppe Kontrolle	Gruppe Lutein	Gruppe Lycopin
0	0,89 ± 1,36 ^a	0,22 ± 0,67 ^a	1,56 ± 2,19 ^a
15 Min	0,56 ± 1,13 ^a	0,11 ± 0,33 ^a	1,44 ± 2,19 ^a
30 Min	0,67 ± 1,00 ^a	0,22 ± 0,67 ^a	1,22 ± 1,92 ^a
60 Min	0,78 ± 0,97 ^a	2,78 ± 3,23 ^{ac}	1,33 ± 2,40 ^a
90 Min	1,89 ± 3,55 ^a	4,11 ± 2,80 ^{acd}	1,00 ± 1,73 ^a
2 Std	0,56 ± 0,88 ^a	8,11 ± 9,13 ^{abcd}	1,11 ± 1,53 ^a
3 Std	0,67 ± 1,12 ^a	11,67 ± 12,80 ^{abcd}	1,00 ± 1,22 ^a
4 Std	1,22 ± 1,20 ^a	16,33 ± 19,71 ^{bcd}	1,00 ± 1,22 ^a
5 Std	1,33 ± 1,25 ^a	19,78 ± 27,85 ^b	1,56 ± 1,59 ^a
6 Std	1,89 ± 1,62 ^a	18,22 ± 26,50 ^{bd}	1,33 ± 1,66 ^a
8 Std	2,33 ± 3,16 ^a	17,78 ± 25,07 ^{bd}	1,44 ± 2,30 ^a
10 Std	2,11 ± 3,18 ^a	11,78 ± 17,90 ^{abcd}	1,44 ± 2,24 ^a
12 Std	2,67 ± 4,27 ^a	10,89 ± 17,59 ^{abcd}	3,00 ± 5,20 ^a
18 Std	2,44 ± 4,00 ^a	5,89 ± 9,12 ^{abcd}	1,11 ± 1,69 ^a
24 Std	1,44 ± 2,51 ^a	2,78 ± 4,26 ^{ac}	0,67 ± 1,41 ^a

a, b, c, d, e: unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede (p < 0,05) zwischen den verschiedenen Zeitpunkten innerhalb einer Gruppe

n.n.: nicht nachweisbar; Werte unterhalb der Nachweisgrenze wurden bei der statistischen Auswertung als 0 gerechnet

Sowohl in der Kontrollgruppe als auch in der Gruppe Lycopin waren bei einigen Hunden geringe Mengen von Lutein im Plasma nachweisbar. Diese Werte bewegten sich während des gesamten Zeitraumes des Vorversuches im Mittel zwischen 0,56 und 3,00 µg/l.

In der Gruppe Lutein war ab 60 Minuten nach Kapselgabe ein steter Anstieg des Plasmagehalts zu verzeichnen, der nach fünf Stunden ein Maximum von 19,78 µg/l im Gruppenmittel erreichte. Bis 24 Stunden nach Verabreichung des Wirkstoffes nahm der Wert kontinuierlich wieder ab. Der Anstieg der Plasmakonzentration von Lutein war in dieser Gruppe signifikant.

4.2.2. Hauptversuch

4.2.2.1. Lycopin

Die mittleren Lycopingehalte der Gruppen im Plasma (in µg/l) während der Versuchsperioden I und II sind Tabelle 18 und Tabelle 19 zu entnehmen.

Zu Beginn der Versuchsperiode I war in keiner Gruppe Lycopin im Plasma nachweisbar. In allen Gruppen, denen der Wirkstoff verabreicht wurde, stieg der Plasmagehalt innerhalb der Gruppen signifikant an und erreichte seinen Maximalwert am Tag 21. Einzige Ausnahme stellt hier Gruppe Lyco:Lut 2:1 dar, in der das Maximum erst am Tag 56 erreicht wurde. Danach war wieder eine Abnahme zu verzeichnen. In den Gruppen Lycopin, Lyco:Lut 1:1 und Lyco:Lut 2:1 stieg der Plasmagehalt auf Werte von über 400 µg/l an, die zu allen Zeitpunkten signifikant höher waren als die der Kontrollgruppe. Der höchste Wert wurde mit 462,67 µg/l in der Gruppe Lyco:Lut 2:1 erreicht. In der Gruppe Lyco:Lut 1:2 nahm der Plasmagehalt an Lycopin weniger stark zu (Maximalwert 276,83 µg/l) als in den Gruppen Lycopin (441,83 µg/l), Lyco:Lut 1:1 (418,60 µg/l) und Lyco:Lut 2:1 (462,67 µg/l).

Sowohl in der Kontrollgruppe als auch in der Gruppe Lutein waren vereinzelt geringe Mengen von Lycopin im Plasma nachweisbar.

Tabelle 18: Mittlerer Lycopin-Gehalt im Serum der sechs Gruppen in Versuchsperiode I zu den Zeitpunkten Tag 0, 7, 21, 56 und 84 in $\mu\text{g/l}$ (MW \pm Stabw)

	Tag 0	Tag 7	Tag 21	Tag 56	Tag 84
Kontrolle	n.n. ^a	26,67 \pm 42,00 ^a	14,67 \pm 35,93 ^a	n.n. ^a	6,17 \pm 15,11 ^a
Lycopin	n.n. ^a	306,67 \pm 97,42 ^{b*}	441,83 \pm 292,63 ^{b*}	315,00 \pm 53,43 ^{b*}	394,17 \pm 192,60 ^{b*}
Lutein	n.n. ^a	24,00 \pm 58,79 ^a	17,33 \pm 36,04 ^a	29,00 \pm 49,27 ^a	30,00 \pm 51,48 ^a
Lyco:Lut 1:1	n.n. ^a	290,67 \pm 161,16 ^{b*}	418,60 \pm 312,65 ^{b*}	333,00 \pm 291,79 ^{b*}	332,00 \pm 241,56 ^{b*}
Lyco:Lut 1:2	n.n. ^b	220,83 \pm 99,95 ^a	276,83 \pm 132,40 ^a	258,33 \pm 64,67 ^a	190,83 \pm 94,34 ^a
Lyco:Lut 2:1	n.n. ^b	315,17 \pm 251,56 ^{ab*}	435,67 \pm 333,03 ^{a*}	462,67 \pm 334,24 ^{a*}	399,33 \pm 306,15 ^{a*}

a, b, c, d: unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) zwischen den verschiedenen Zeitpunkten innerhalb einer Gruppe

*: signifikanter Unterschied ($p < 0,05$) der jeweiligen Versuchsgruppe zur Kontrollgruppe zum jeweiligen Zeitpunkt

n.n.: nicht nachweisbar; Werte unterhalb der Nachweisgrenze wurden bei der statistischen Auswertung als 0 gerechnet

In Versuchsperiode II verhielten sich die Plasmaresponsekurven von Lycopin ähnlich. Die Maximalwerte wurden jedoch erst am Tag 56 (Gruppe Lycopin und Gruppe Lyco:Lut 2:1) bzw. am Tag 84 (Gruppe Lyco:Lut 1:2) erreicht. Der Plasmagehalt stieg in der Gruppe Lycopin mit einem Wert von 489,50 $\mu\text{g/l}$ am stärksten an und überschritt damit nur in dieser Gruppe den Wert von 400 $\mu\text{g/l}$. Neben den Werten der Gruppen Lycopin und Lyco:Lut 2:1 war auch der Plasmalycopingehalt der Gruppe Lyco:Lut 1:2 in der Supplementierungsphase signifikant höher als der der Kontrollgruppe.

Tabelle 19: Mittlerer Lycopin-Gehalt im Serum der fünf Gruppen in Versuchsperiode II zu den Zeitpunkten Tag 0, 7, 21, 56 und 84 in µg/l (MW ± Stabw)

	Tag 0	Tag 7	Tag 21	Tag 56	Tag 84
Kontrolle	1,67 ± 4,08 ^a	9,17 ± 22,45 ^a	n.n. ^a	16,50 ± 40,42 ^a	9,00 ± 20,12 ^a
Lycopin	3,17 ± 7,76 ^c	311,60 ± 83,06 ^{b*}	450,50 ± 31,14 ^{a*}	489,50 ± 50,25 ^{a*}	404,60 ± 84,21 ^{ab*}
Lutein	6,00 ± 14,70 ^a	2,33 ± 5,72 ^a	4,67 ± 11,43 ^a	3,60 ± 5,68 ^a	n.n. ^a
Lyco:Lut 1:2	n.n. ^c	172,83 ± 77,39 ^{b*}	213,67 ± 160,31 ^{ab*}	290,17 ± 84,45 ^{ab*}	306,33 ± 127,89 ^{a*}
Lyco:Lut 2:1	n.n. ^a	318,83 ± 175,37 ^{b*}	343,50 ± 108,65 ^{b*}	347,00 ± 113,75 ^{b*}	317,17 ± 60,90 ^{b*}

^{a, b, c, d}: unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) zwischen den verschiedenen Zeitpunkten innerhalb einer Gruppe

*: signifikanter Unterschied ($p < 0,05$) der jeweiligen Versuchsgruppe zur Kontrollgruppe zum jeweiligen Zeitpunkt

n.n.: nicht nachweisbar; Werte unterhalb der Nachweisgrenze wurden bei der statistischen Auswertung als 0 gerechnet

4.2.2.2. Lutein

In Tabelle 20 und Tabelle 21 sind die Gruppenmittelwerte des Plasmas an Lutein (in µg/l) während der Versuchsperioden I und II des Hauptversuchs an den Tagen 0, 7, 21, 56 und 84 aufgeführt.

Zum Zeitpunkt 0 konnte in keiner Gruppe Lutein nachgewiesen werden. In allen Gruppen, die Lutein erhielten, war im Verlauf des Versuchs eine Zunahme des Plasmagehalts dieses Wirkstoffs zu beobachten, die innerhalb der Gruppen signifikant war. Mit Ausnahme der Gruppe Lyco:Lut 1:1 (Maximalwert am Tag 21) erreichte der Wert all dieser Gruppen sein Maximum am Tag 56, wobei in der Gruppe Lutein der Plasmagehalt mit einem Maximalwert von 27,83 µg/l am stärksten

anstieg. Die Gruppe Lyco:Lut 2:1 erreichte einen Maximalwert (9,33 µg/l), der deutlich unter dem der Gruppen Lyco:Lut 1:1 (16,60 µg/l) und Lyco:Lut 1:2 (14,33 µg/l) lag. Nach Erreichen des Maximalwerts war in allen supplementierten Gruppen ein Abfall des Plasmagehalts an Lutein festzustellen.

Tabelle 20: Mittlerer Lutein-Gehalt im Serum der sechs Gruppen in Versuchsperiode I zu den Zeitpunkten Tag 0, 7, 21, 56 und 84 in µg/l (MW ± Stabw)

	Tag 0	Tag 7	Tag 21	Tag 56	Tag 84
Kontrolle	n.n. ^b	n.n. ^b	n.n. ^b	n.n. ^b	n.n. ^b
Lycopin	n.n. ^a	n.n. ^a	n.n. ^a	n.n. ^a	1,33 ± 3,27 ^a
Lutein	n.n. ^d	14,33 ± 5,43 ^{c*}	19,67 ± 4,72 ^{bc*}	27,83 ± 10,38 ^{a*}	23,00 ± 7,32 ^{ab*}
Lyco:Lut 1:1	n.n. ^a	11,33 ± 4,03 ^{ab*}	16,60 ± 14,94 ^{b*}	15,20 ± 11,03 ^{b*}	14,00 ± 13,00 ^{b*}
Lyco:Lut 1:2	n.n. ^b	11,00 ± 3,22 ^{a*}	11,33 ± 5,89 ^{a*}	14,33 ± 5,68 ^{a*}	11,00 ± 6,63 ^{a*}
Lyco:Lut 2:1	n.n. ^b	6,50 ± 2,43 ^{a*}	6,83 ± 3,63 ^a	9,33 ± 4,89 ^a	6,17 ± 3,13 ^a

^{a, b, c, d}: unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede (p < 0,05) zwischen den verschiedenen Zeitpunkten innerhalb einer Gruppe

*: signifikanter Unterschied (p < 0,05) der jeweiligen Versuchsgruppe zur Kontrollgruppe zum jeweiligen Zeitpunkt

n.n.: nicht nachweisbar; Werte unterhalb der Nachweisgrenze wurden bei der statistischen Auswertung als 0 gerechnet

An allen Zeitpunkten der Supplementierungsphase (Tag 7, 21, 56 und 84) waren die Werte der Gruppen Lutein, Lyco:Lut 1:1, Lyco:Lut 1:2, am Tag 7 zusätzlich auch noch die der Gruppe Lyco:Lut 2:1, signifikant höher als die der Kontrollgruppe.

In der Kontrollgruppe und der Gruppe Lycopin waren mit Ausnahme von einem Hund zu keinem Zeitpunkt Lutein im Plasma nachweisbar.

Tabelle 21: Mittlerer Lutein-Gehalt im Serum der fünf Gruppen in Versuchsperiode II zu den Zeitpunkten Tag 0, 7, 21, 56 und 84 in µg/l (MW ± Stabw)

	Tag 0	Tag 7	Tag 21	Tag 56	Tag 84
Kontrolle	n.n. ^a	n.n. ^a	n.n. ^a	n.n. ^a	n.n. ^a
Lycopin	n.n. ^a	n.n. ^a	n.n. ^a	n.n. ^a	n.n. ^a
Lutein	n.n. ^a	14,00 ± 8,81 ^{b*}	16,00 ± 5,80 ^{b*}	19,4 ± 5,03 ^{b*}	21,00 ± 7,14 ^{b*}
Lyco:Lut 1:2	n.n. ^c	7,00 ± 5,87 ^b	11,17 ± 5,71 ^{ab*}	13,83 ± 6,24 ^{a*}	13,67 ± 5,92 ^{a*}
Lyco:Lut 2:1	n.n. ^c	2,17 ± 5,31 ^{bc}	8,00 ± 4,20 ^{a*}	8,00 ± 4,3 ^{ab}	6,67 ± 3,01 ^{ab*}

a, b, c, d: unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) zwischen den verschiedenen Zeitpunkten innerhalb einer Gruppe

*: signifikanter Unterschied ($p < 0,05$) der jeweiligen Versuchsgruppe zur Kontrollgruppe zum jeweiligen Zeitpunkt

n.n.: nicht nachweisbar; Werte unterhalb der Nachweisgrenze wurden bei der statistischen Auswertung als 0 gerechnet

In Versuchsperiode II stellte sich der Verlauf der Plasmaresponsekurven von Lutein ähnlich dar. Der Maximalwert der Gruppe Lutein (21,00 µg/l) wurde jedoch erst am Tag 84 erreicht und die Maximalwerte aller supplementierten Gruppen blieben etwas unter denen der Versuchsperiode I zurück.

In der Gruppe Lutein war der Plasmagehalt an Lutein zu jedem Zeitpunkt der Supplementierungsphase, in der Gruppe Lyco:Lut 1:2 an den Tagen 21, 56 und 84 und in der Gruppe Lyco:Lut 2:1 an den Tagen 21 und 84 statistisch signifikant höher als in der Kontrollgruppe.

Sowohl in der Kontrollgruppe als auch in der Gruppe Lycopin war zu keinem Zeitpunkt Lutein im Plasma nachzuweisen.

4.3. Antioxidativer Status

4.3.1. Trolox Equivalent Antioxidant Capacity (TEAC)

Die mittleren Werte der TEAC der sechs Versuchsgruppen der Versuchsperiode I und der fünf Versuchsgruppen der Versuchsperiode II zu den Zeitpunkten Tag 0, 7, 21, 56 und 84, angegeben in mmol/l, sind Tabelle 22 und Tabelle 23 zu entnehmen.

Tabelle 22: Mittlere Trolox Equivalent Antioxidant Capacity (TEAC) im Serum der sechs Gruppen in Versuchsperiode I zu den Zeitpunkten Tag 0, 7, 21, 56 und 84 in mmol/l (MW ± Stabw)

	Tag 0	Tag 7	Tag 21	Tag 56	Tag 84
Kontrolle	0,335 ± 0,089 ^a	0,223 ± 0,021 ^b	0,371 ± 0,137 ^a	0,312 ± 0,038 ^{ab}	0,368 ± 0,055 ^a
Lycopin	0,251 ± 0,097 ^a	0,242 ± 0,058 ^a	0,335 ± 0,077 ^a	0,320 ± 0,051 ^a	0,307 ± 0,106 ^a
Lutein	0,291 ± 0,062 ^b	0,075 ± 0,034 ^{c*}	0,375 ± 0,045 ^a	0,374 ± 0,056 ^a	0,397 ± 0,091 ^a
Lyco:Lut 1:1	0,303 ± 0,074 ^a	0,108 ± 0,031 ^{b*}	0,324 ± 0,046 ^a	0,359 ± 0,039 ^{ac}	0,411 ± 0,073 ^c
Lyco:Lut 1:2	0,266 ± 0,107 ^c	0,580 ± 0,096 ^{a*}	0,347 ± 0,099 ^{bc}	0,340 ± 0,052 ^{bc}	0,405 ± 0,071 ^b
Lyco:Lut 2:1	0,333 ± 0,052 ^b	0,608 ± 0,031 ^{a*}	0,372 ± 0,050 ^b	0,358 ± 0,056 ^b	0,375 ± 0,052 ^b

a, b, c, d: unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) zwischen den verschiedenen Zeitpunkten innerhalb einer Gruppe

*: signifikanter Unterschied ($p < 0,05$) der jeweiligen Versuchsgruppe zur Kontrollgruppe zum jeweiligen Zeitpunkt

In Versuchsperiode I schwankte die TEAC in der Kontrollgruppe um einen Wert von 0,322 mmol/l. In allen supplementierten Gruppen lagen die Gruppenmittelwerte aller Zeitpunkte, mit Ausnahme des Tages 7, über dem

Ausgangswert von Tag 0. In der Gruppe Lycopin waren diese Werte alle um die 25% höher, in der Gruppe Lutein um die 30%. In der Gruppe Lyco:Lut 1:1 nahm die TEAC der Tage 21, 56 und 84 um bis zu 36% stetig zu, in der Gruppe Lyco:Lut 1:2 erreichte die Zunahme am Tag 84 52%. Um die 11% bewegte sich der Anstieg des Wertes zu diesen Zeitpunkten in der Gruppe Lyco:Lut 2:1.

Am Tag 7 verhielt sich die TEAC der verschiedenen Gruppen sehr unterschiedlich. Während der Wert in der Gruppe Lycopin leicht absank, nahm er in den Gruppen Lutein und Lyco:Lut 1:1 stark ab (-74% bzw. -64%). Diese Werte waren im Vergleich zur Kontrollgruppe statistisch signifikant niedriger. Ganz im Gegensatz dazu war in den Gruppen Lyco:Lut 1:2 und Lyco:Lut 2:1 ein deutlicher Anstieg zu verzeichnen (+118% bzw. +183%), die TEAC war hier statistisch signifikant höher als die der Kontrollgruppe.

Tabelle 23: Mittlere Trolox Equivalent Antioxidant Capacity (TEAC) im Serum der fünf Gruppen in Versuchsperiode II zu den Zeitpunkten Tag 0, 7, 21, 56 und 84 in mmol/l (MW ± Stabw)

	Tag 0	Tag 7	Tag 21	Tag 56	Tag 84
Kontrolle	0,302 ± 0,036 ^b	0,252 ± 0,042 ^c	0,241 ± 0,042 ^c	0,317 ± 0,041 ^b	0,374 ± 0,045 ^a
Lycopin	0,308 ± 0,051 ^c	0,322 ± 0,067 ^{bc}	0,353 ± 0,036 ^{abc*}	0,382 ± 0,030 ^a	0,372 ± 0,045 ^{ab}
Lutein	0,333 ± 0,059 ^a	0,357 ± 0,049 ^{a*}	0,373 ± 0,012 ^{a*}	0,358 ± 0,042 ^a	0,353 ± 0,018 ^a
Lyco:Lut 1:2	0,345 ± 0,074 ^b	0,416 ± 0,031 ^{a*}	0,336 ± 0,060 ^{b*}	0,371 ± 0,068 ^{ab}	0,313 ± 0,046 ^b
Lyco:Lut 2:1	0,372 ± 0,046 ^a	0,379 ± 0,036 ^{a*}	0,374 ± 0,034 ^{a*}	0,381 ± 0,049 ^a	0,356 ± 0,048 ^a

^{a, b, c, d}: unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede (p < 0,05) zwischen den verschiedenen Zeitpunkten innerhalb einer Gruppe

*: signifikanter Unterschied (p < 0,05) der jeweiligen Versuchsgruppe zur Kontrollgruppe zum jeweiligen Zeitpunkt

In Versuchsperiode II nahm die TEAC in der Kontrollgruppe erst leicht ab, um anschließend wieder zuzunehmen. In den Gruppen Lycopin und Lutein war zu allen Zeitpunkten im Vergleich zum Tag 0 eine Zunahme der TEAC um bis zu 24% bzw. 12% zu beobachten. In den Gruppen Lyco:Lut 1:2 und Lyco:Lut 2:1 schwankte der Wert um 0,356 mmol/l bzw. 0,372 mmol/l.

Im Vergleich zur Kontrollgruppe waren am Tag 7 die TEAC der Gruppen Lutein, Lyco:Lut 1:2 und Lyco:Lut 2:1, am Tag 21 zusätzlich auch die der Gruppe Lycopin signifikant höher.

4.3.2. Vitamine E und C

4.3.2.1. Vitamin E

In Tabelle 24 und Tabelle 25 werden die bei der Analyse der Serumproben der Hunde erhaltenen Gruppenmittelwerte des Vitamin E-Gehalts zu den Zeitpunkten Tag 0, 7, 21, 56 und 84 beider Versuchsperioden, angegeben in $\mu\text{g/ml}$, dargestellt.

In allen Gruppen, einschließlich der Kontrollgruppe, war in Versuchsperiode I insgesamt ein Anstieg des Vitamin E-Gehalts im Serum festzustellen. Am deutlichsten war dieser in der Kontrollgruppe, bei dem der Vitamin E-Gehalt um bis zu 61% zunahm.

Innerhalb der supplementierten Gruppen waren die Veränderungen mit einer Ausnahme (Gruppe Lycopin Tag 0 und 84) nicht statistisch signifikant, beim Vergleich der Gruppen mit der Kontrollgruppe waren ebenfalls zu keinem Zeitpunkt statistisch signifikante Veränderungen festzustellen.

Tabelle 24: Mittlerer Vitamin E-Gehalt im Serum der sechs Gruppen in Versuchsperiode I zu den Zeitpunkten Tag 0, 7, 21, 56 und 84 in $\mu\text{g/ml}$ (MW \pm Stabw)

	Tag 0	Tag 7	Tag 21	Tag 56	Tag 84
Kontrolle	21,70 \pm 5,41 ^c	26,44 \pm 4,54 ^{bc}	25,80 \pm 5,48 ^{bc}	32,27 \pm 9,38 ^{ab}	34,87 \pm 6,23 ^a
Lycopin	22,56 \pm 5,17 ^a	26,16 \pm 5,50 ^{ab}	23,81 \pm 13,22 ^{ab}	26,90 \pm 4,30 ^{ab}	32,72 \pm 7,43 ^b
Lutein	24,08 \pm 5,84 ^a	30,04 \pm 7,89 ^a	29,05 \pm 5,41 ^a	30,42 \pm 8,75 ^a	28,15 \pm 5,26 ^a
Lyco:Lut 1:1	31,34 \pm 10,61 ^a	31,75 \pm 12,17 ^a	34,69 \pm 14,98 ^a	37,05 \pm 16,75 ^a	36,70 \pm 16,28 ^a
Lyco:Lut 1:2	23,77 \pm 7,80 ^a	26,98 \pm 11,58 ^a	24,97 \pm 9,96 ^a	28,92 \pm 9,84 ^a	29,40 \pm 9,82 ^a
Lyco:Lut 2:1	29,59 \pm 4,88 ^a	32,40 \pm 5,59 ^a	32,29 \pm 5,59 ^a	35,48 \pm 10,40 ^a	33,31 \pm 8,96 ^a

a, b, c, d: unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) zwischen den verschiedenen Zeitpunkten innerhalb einer Gruppe

*: signifikanter Unterschied ($p < 0,05$) der jeweiligen Versuchsgruppe zur Kontrollgruppe zum jeweiligen Zeitpunkt

In Versuchsperiode II war der Serumgehalt an Vitamin E ebenfalls in allen Gruppen zu allen Zeitpunkten höher als der zum Zeitpunkt 0. Die zwei einzigen Ausnahmen stellen hier die Gruppe Lutein und Lyco:Lut 1:2 dar, bei denen am Tag 21 (Gruppe Lutein) bzw. am Tag 84 (Gruppe Lyco:Lut 1:2) etwas niedrigere Werte ermittelt wurden. Am deutlichsten war die Zunahme mit bis zu 33% (Tag 56) in der Gruppe Lyco:Lut 2:1.

Die Unterschiede des Vitamin E-Gehalts waren in Versuchsperiode II weder innerhalb der Gruppen noch im Vergleich der Gruppen zur Kontrollgruppe statistisch signifikant.

Tabelle 25: Mittlerer Vitamin E-Gehalt im Serum der fünf Gruppen in Versuchsperiode II zu den Zeitpunkten Tag 0, 7, 21, 56 und 84 in µg/ml (MW ± Stabw)

	Tag 0	Tag 7	Tag 21	Tag 56	Tag 84
Kontrolle	21,51 ± 3,80 ^a	25,49 ± 5,75 ^a	24,23 ± 5,15 ^a	26,70 ± 5,34 ^a	22,65 ± 4,69 ^a
Lycopin	28,53 ± 6,63 ^a	31,04 ± 8,18 ^a	32,32 ± 2,27 ^a	33,53 ± 4,70 ^a	30,53 ± 5,65 ^a
Lutein	31,16 ± 10,28 ^a	33,03 ± 11,06 ^a	30,87 ± 6,77 ^a	36,64 ± 7,04 ^a	31,18 ± 4,51 ^a
Lyco:Lut 1:2	23,90 ± 5,65 ^a	25,31 ± 7,32 ^a	24,69 ± 7,40 ^a	29,76 ± 8,67 ^a	23,78 ± 7,27 ^a
Lyco:Lut 2:1	27,16 ± 7,73 ^a	30,93 ± 11,46 ^a	33,72 ± 15,02 ^a	36,32 ± 14,22 ^a	35,67 ± 20,73 ^a

^{a, b, c, d}: unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) zwischen den verschiedenen Zeitpunkten innerhalb einer Gruppe

*: signifikanter Unterschied ($p < 0,05$) der jeweiligen Versuchsgruppe zur Kontrollgruppe zum jeweiligen Zeitpunkt

4.3.2.2. Vitamin C

In Tabelle 26 und Tabelle 27 sind die bei der Analyse der Serumproben der Hunde erhaltenen Gruppenmittelwerte des Vitamin C-Gehalts zu den Zeitpunkten Tag 0, 7, 21, 56 und 84 beider Versuchsperioden, angegeben in µg/ml, dargestellt.

Im Verlauf der Versuchsperiode I war der Vitamin C-Gehalt des Serums in der Kontrollgruppe signifikant um rund 200% höher als am Tag 0. Auch in den Gruppen Lycopin und Lutein war ein Anstieg zu beobachten, der jedoch mit rund 18% bzw. 88% geringer war als der der Kontrollgruppe. Der Gruppenmittelwert der Gruppe Lyco:Lut 1:1 lag zu allen Zeitpunkten deutlich über dem Ausgangswert, mit einer sehr starken Zunahme von +455% am Tag 7, die im Vergleich zur Kontrollgruppe statistisch signifikant war. Auch der Vitamin C-Gehalt der Gruppen Lyco:Lut 1:2 und Lyco:Lut 2:1 war zu jedem Zeitpunkt höher als der des Tages 0. Am Tag 56 waren die Werte dieser beiden Gruppen jedoch statistisch signifikant niedriger als der der Kontrollgruppe.

Tabelle 26: Mittlerer Vitamin C-Gehalt im Serum der sechs Gruppen in Versuchsperiode I zu den Zeitpunkten Tag 0, 7, 21, 56 und 84 in $\mu\text{g/ml}$ (MW \pm Stabw)

	Tag 0	Tag 7	Tag 21	Tag 56	Tag 84
Kontrolle	3,93 \pm 0,49 ^b	11,53 \pm 1,99 ^a	12,40 \pm 1,14 ^a	10,97 \pm 1,55 ^a	12,93 \pm 5,11 ^a
Lycopin	9,38 \pm 1,27 ^{a*}	10,63 \pm 2,10 ^a	10,88 \pm 2,46 ^a	10,53 \pm 1,77 ^a	12,35 \pm 5,12 ^a
Lutein	5,43 \pm 2,61 ^b	12,21 \pm 3,54 ^a	9,46 \pm 2,02 ^a	9,37 \pm 1,82 ^a	9,68 \pm 5,01 ^a
Lyco:Lut 1:1	4,16 \pm 1,55 ^a	23,10 \pm 4,03 ^{b*}	12,13 \pm 1,72 ^{cd}	11,70 \pm 3,12 ^c	16,69 \pm 2,99 ^d
Lyco:Lut 1:2	4,26 \pm 1,56 ^a	11,31 \pm 5,24 ^b	12,52 \pm 1,58 ^b	6,43 \pm 2,64 ^{a*}	9,95 \pm 1,56 ^b
Lyco:Lut 2:1	3,26 \pm 1,01 ^b	12,59 \pm 3,91 ^a	12,09 \pm 3,03 ^a	4,61 \pm 0,82 ^{b*}	11,33 \pm 2,17 ^a

^{a, b, c, d}: unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) zwischen den verschiedenen Zeitpunkten innerhalb einer Gruppe

*: signifikanter Unterschied ($p < 0,05$) der jeweiligen Versuchsgruppe zur Kontrollgruppe zum jeweiligen Zeitpunkt

In Versuchsperiode II war bei allen Gruppen eine Zunahme des Serumgehalts an Vitamin C ab dem Tag 56 zu verzeichnen. Besonders deutlich war hierbei der Anstieg am Tag 84, der knapp 100% (Gruppe Kontrolle) bis hin zu 200% (Gruppe Lutein) betrug.

Tabelle 27: Mittlerer Vitamin C-Gehalt im Serum der fünf Gruppen in Versuchsperiode II zu den Zeitpunkten Tag 0, 7, 21, 56 und 84 in µg/ml (MW ± Stabw)

	Tag 0	Tag 7	Tag 21	Tag 56	Tag 84
Kontrolle	4,06 ± 0,60 ^a	3,84 ± 1,00 ^a	4,24 ± 0,32 ^a	4,28 ± 1,28 ^a	8,06 ± 1,48 ^b
Lycopin	3,59 ± 0,57 ^{bc}	4,16 ± 0,84 ^b	3,09 ± 0,99 ^{c*}	4,38 ± 0,64 ^b	7,18 ± 0,68 ^a
Lutein	2,82 ± 0,86 ^{c*}	3,78 ± 0,50 ^b	3,69 ± 0,63 ^{bc}	4,23 ± 0,74 ^b	8,47 ± 0,49 ^a
Lyco:Lut 1:2	3,83 ± 0,34 ^a	3,29 ± 0,24 ^a	— [#]	4,44 ± 0,96 ^a	7,98 ± 1,20 ^b
Lyco:Lut 2:1	3,69 ± 0,40 ^{bc}	3,48 ± 0,95 ^b	— [#]	5,43 ± 2,20 ^c	9,35 ± 1,20 ^a

a, b, c, d: unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) zwischen den verschiedenen Zeitpunkten innerhalb einer Gruppe

*: signifikanter Unterschied ($p < 0,05$) der jeweiligen Versuchsgruppe zur Kontrollgruppe zum jeweiligen Zeitpunkt

#: keine Analysewerte vorhanden

4.3.3. Aspartat-Aminotransferase (AST) und Creatinkinase (CK)

Die Gruppenmittelwerte der Analysen der Serumproben auf ihren AST (Aspartat-Aminotransferase)- und CK (Creatinkinase)-Gehalt in Versuchsperiode I und II zu den Zeitpunkten Tag 0, 7, 21, 56 und 84, angegeben in IU/l, sind in Tabelle 28, Tabelle 29, Tabelle 30 und Tabelle 31 aufgeführt.

4.3.3.1. Aspartat-Aminotransferase (AST)

In allen Gruppen war im Verlauf der Versuchsperiode I zunächst ein Absinken, anschließend wieder ein Ansteigen der AST im Serum zu beobachten. Dabei stieg die AST in der Kontrollgruppe, sowie in den Gruppen Lyco:Lut 1:1 und Lyco:Lut 1:2 schließlich auf einen Wert an, der höher als der Ausgangswert am Tag 0 war. In den Gruppen Lycopin, Lutein und Lyco:Lut 2:1 erreichte die AST ihren Ausgangswert nicht wieder. Alle Gruppen blieben jedoch hinter dem Maximalwert der

Kontrollgruppe von 36,3 IU/l im Gruppenmittel zurück. Die AST veränderte sich innerhalb der Gruppen z. T. signifikant, im Vergleich zur Kontrollgruppe war diese Veränderung jedoch zu keinem Zeitpunkt signifikant.

Tabelle 28: Mittlerer Aspartat-Aminotransferase (AST)-Gehalt im Serum der sechs Gruppen in Versuchsperiode I zu den Zeitpunkten Tag 0, 7, 21, 56 und 84 in IU/l (MW ± Stabw)

	Tag 0	Tag 7	Tag 21	Tag 56	Tag 84
Kontrolle	29,7 ± 12,2 ^{ab}	22,2 ± 8,9 ^b	22,2 ± 3,6 ^b	28,7 ± 6,7 ^{ab}	36,3 ± 15,8 ^a
Lycopin	32,8 ± 10,2 ^a	24,0 ± 4,9 ^a	26,3 ± 11,5 ^a	28,8 ± 5,4 ^a	28,0 ± 8,8 ^a
Lutein	35,5 ± 13,7 ^a	24,0 ± 4,6 ^{bc}	21,3 ± 4,4 ^c	27,0 ± 4,4 ^{abc}	34,0 ± 14,1 ^{ab}
Lyco:Lut 1:1	30,2 ± 12,1 ^a	24,5 ± 11,7 ^a	25,6 ± 15,4 ^a	31,6 ± 14,4 ^a	32,6 ± 20,8 ^a
Lyco:Lut 1:2	30,3 ± 4,0 ^a	22,5 ± 3,7 ^a	22,7 ± 5,2 ^a	27,5 ± 3,9 ^a	35,0 ± 24,8 ^a
Lyco:Lut 2:1	33,3 ± 10,0 ^a	26,5 ± 7,9 ^{ab}	21,8 ± 5,3 ^b	29,2 ± 5,3 ^{ab}	28,3 ± 8,3 ^{ab}

^{a, b, c, d}: unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) zwischen den verschiedenen Zeitpunkten innerhalb einer Gruppe

*: signifikanter Unterschied ($p < 0,05$) der jeweiligen Versuchsgruppe zur Kontrollgruppe zum jeweiligen Zeitpunkt

Insgesamt lagen in Versuchsperiode II die Ausgangswerte aller Gruppen niedriger als in Versuchsperiode I. Mit Ausnahme des Zeitpunktes Tag 7 in der Kontrollgruppe sowie den Gruppen Lycopin und Lutein war wieder eine Ab- und eine anschließende Zunahme des AST-Gehalts im Serum aller Gruppen festzustellen, die jedoch weniger ausgeprägt war als in Versuchsperiode I. In den Gruppen Lycopin und Lyco:Lut 2:1 wurde im Gegensatz zu den übrigen Gruppen der Ausgangswert nicht wieder erreicht. Auch in diesem zweiten Abschnitt des Versuches blieben die Gruppenmittel aller Gruppen hinter dem der Kontrollgruppe (28,5 IU/l) zurück. Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede der Versuchsgruppen zur Kontrollgruppe.

Tabelle 29: Mittlerer Aspartat-Aminotransferase (AST)-Gehalt im Serum der fünf Gruppen in Versuchsperiode II zu den Zeitpunkten Tag 0, 7, 21, 56 und 84 in IU/l (MW \pm Stabw)

	Tag 0	Tag 7	Tag 21	Tag 56	Tag 84
Kontrolle	25,5 \pm 26,3 ^a	26,3 \pm 4,7 ^a	22,8 \pm 5,0 ^a	24,2 \pm 5,2 ^a	28,5 \pm 8,7 ^a
Lycopin	21,7 \pm 3,4 ^{ab}	23,8 \pm 3,5 ^a	17,8 \pm 2,5 ^b	20,3 \pm 3,5 ^{ab}	21,3 \pm 4,3 ^{ab}
Lutein	22,8 \pm 6,0 ^{ab}	26,3 \pm 5,3 ^a	19,2 \pm 4,5 ^b	23,2 \pm 4,3 ^{ab}	24,2 \pm 7,5 ^{ab}
Lyco:Lut 1:2	24,7 \pm 4,6 ^{ab}	21,3 \pm 3,4 ^b	20,5 \pm 4,0 ^b	27,0 \pm 5,5 ^a	25,5 \pm 4,6 ^{ab}
Lyco:Lut 2:1	24,2 \pm 0,8 ^a	22,5 \pm 4,8 ^{ab}	18,8 \pm 1,6 ^b	22,7 \pm 3,9 ^{ab}	22,0 \pm 4,6 ^{ab}

a, b, c, d: unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) zwischen den verschiedenen Zeitpunkten innerhalb einer Gruppe

*: signifikanter Unterschied ($p < 0,05$) der jeweiligen Versuchsgruppe zur Kontrollgruppe zum jeweiligen Zeitpunkt

4.3.3.2. Creatinkinase

In beiden Versuchsperioden nahm die CK, ähnlich der AST, im Versuchsverlauf erst ab und anschließend wieder zu. Lediglich die Werte der Gruppe Lyco:Lut 1:1 der Versuchsperiode I sowie der Kontrollgruppe und der Gruppe Lyco:Lut 1:2 der Versuchsperiode II stiegen über ihren Ausgangswert hinaus an. Auch die Ab- und Zunahme des CK-Gehalts des Serums war in Versuchsperiode II weniger stark ausgeprägt als in Versuchsperiode I.

Innerhalb der Gruppen waren hinsichtlich des CK-Gehalts z. T. Signifikanzen festzustellen, es zeigte jedoch keine Gruppe signifikant unterschiedliche Werte zur Kontrollgruppe.

Tabelle 30: Mittlerer Creatinkinase (CK)-Gehalt im Serum der sechs Gruppen in Versuchsperiode I zu den Zeitpunkten Tag 0, 7, 21, 56 und 84 in IU/l (MW ± Stabw)

	Tag 0	Tag 7	Tag 21	Tag 56	Tag 84
Kontrolle	183,2 ± 141,8 ^a	111,0 ± 70,6 ^a	117,7 ± 38,3 ^a	172,8 ± 50,1 ^a	138,5 ± 67,1 ^a
Lycopin	223,2 ± 184,5 ^a	106,8 ± 44,6 ^b	99,5 ± 20,2 ^b	145,2 ± 35,3 ^{ab}	117,5 ± 31,3 ^{ab}
Lutein	257,7 ± 256,0 ^a	91,2 ± 28,9 ^b	86,2 ± 16,4 ^b	119,0 ± 38,7 ^{ab}	141,0 ± 44,6 ^{ab}
Lyco:Lut 1:1	194,5 ± 64,3 ^a	128,8 ± 68,8 ^a	165,2 ± 113,2 ^a	181,6 ± 97,0 ^a	207,0 ± 158,0 ^a
Lyco:Lut 1:2	180,2 ± 85,9 ^a	95,8 ± 35,0 ^b	97,8 ± 27,5 ^b	131,2 ± 30,0 ^{ab}	128,7 ± 47,1 ^{ab}
Lyco:Lut 2:1	238,5 ± 157,5 ^a	126,3 ± 55,7 ^b	100,7 ± 20,1 ^b	140,8 ± 53,5 ^{ab}	185,7 ± 59,1 ^{ab}

^{a, b, c, d}: unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) zwischen den verschiedenen Zeitpunkten innerhalb einer Gruppe

*: signifikanter Unterschied ($p < 0,05$) der jeweiligen Versuchsgruppe zur Kontrollgruppe zum jeweiligen Zeitpunkt

Tabelle 31: Mittlerer Creatinkinase (CK)-Gehalt im Serum der fünf Gruppen in Versuchsperiode II zu den Zeitpunkten Tag 0, 7, 21, 56 und 84 in IU/l (MW ± Stabw)

	Tag 0	Tag 7	Tag 21	Tag 56	Tag 84
Kontrolle	96,8 ± 39,4 ^a	84,7 ± 24,5 ^a	78,8 ± 28,2 ^a	84,7 ± 20,6 ^a	127,7 ± 92,7 ^a
Lycopin	97,8 ± 15,3 ^a	93,8 ± 35,1 ^a	68,5 ± 7,7 ^b	80,0 ± 5,4 ^{ab}	82,8 ± 15,8 ^{ab}
Lutein	91,0 ± 19,7 ^a	79,8 ± 26,6 ^a	67,5 ± 12,9 ^a	80,4 ± 22,7 ^a	84,8 ± 21,3 ^a
Lyco:Lut 1:2	81,2 ± 18,7 ^{ab}	74,0 ± 17,7 ^{ab}	64,7 ± 4,4 ^b	79,8 ± 11,5 ^{ab}	90,5 ± 19,1 ^a
Lyco:Lut 2:1	113,8 ± 41,6 ^a	85,3 ± 10,0 ^b	79,3 ± 8,4 ^b	94,2 ± 8,6 ^{ab}	89,7 ± 18,0 ^{ab}

a, b, c, d: unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) zwischen den verschiedenen Zeitpunkten innerhalb einer Gruppe

*: signifikanter Unterschied ($p < 0,05$) der jeweiligen Versuchsgruppe zur Kontrollgruppe zum jeweiligen Zeitpunkt

4.3.4. Totale und Latente Eisenbindungskapazität (TEBK und LEBK)

Zunächst muss angemerkt werden, dass aufgrund mangelnden Probenmaterials diese zwei Parameter nicht bei allen Hunden bestimmt werden konnten, die Gruppenmittelwerte setzten sich aus einem bis zu sechs Einzelwerten zusammen. Es fand keine statistische Auswertung statt. Diese Tatsachen müssen bei der Beurteilung der Ergebnisse berücksichtigt werden.

4.3.4.1. Totale Eisenbindungskapazität

Die mittleren Werte der Totalen Eisenbindungskapazität (TEBK) der sechs Versuchsgruppen der Versuchsperiode I und der fünf Versuchsgruppen der Versuchsperiode II zu den Zeitpunkten Tag 0, 7, 21, 56 und 84, angegeben in mg/dl, sind Tabelle 32 und Tabelle 33 zu entnehmen.

Tabelle 32: Mittlere Totale Eisenbindungskapazität (TEBK) des Serums der sechs Gruppen in Versuchsperiode I zu den Zeitpunkten Tag 0, 7, 21, 56 und 84 in mg/dl (MW ± Stabw)

	Tag 0	Tag 7	Tag 21	Tag 56	Tag 84
Kontrolle	0,552 ± 0,090	0,529 ± 0,114	0,583 ± 0,096	0,638 ± 0,113	0,548 ± 0,153
Lycopin	0,529 ± 0,078	0,571 ± 0,088	0,601 ± 0,090	0,574	0,491 ± 0,206
Lutein	0,515	0,593 ± 0,080	0,597 ± 0,077	0,639 ± 0,087	0,556 ± 0,148
Lyco:Lut 1:1	0,412 ± 0,022	0,577 ± 0,037	0,669 ± 0,049	0,712 ± 0,040	0,696 ± 0,129
Lyco:Lut 1:2	0,426 ± 0,037	0,569 ± 0,164	0,606 ± 0,168	0,515 ± 0,080	0,760 ± 0,159
Lyco:Lut 2:1	0,386 ± 0,065	0,618 ± 0,105	0,619 ± 0,081	0,644 ± 0,071	0,687 ± 0,060

In Versuchsperiode I schwankte die TEBK in der Kontrollgruppe um einen Wert von 0,570 mg/dl. In den Gruppen Lycopin und Lutein nahm die TEBK zunächst zu, um anschließend wieder abzusinken, wobei jedoch nur in der Gruppe Lycopin der Wert seinen Ausgangswert unterschritt. In den Gruppen Lyco:Lut 1:1, Lyco:Lut 1:2 und Lyco:Lut 2:1 lagen alle Werte der TEBK während der Supplementierungsphase deutlich über dem Wert von Tag 0. Am stärksten war die Steigerung in der Gruppe Lyco:Lut 1:2 am Tag 84, an dem der Wert 78% höher war als am Tag 0.

Die TEBK der Kontrollgruppe bewegte sich im Verlauf der Versuchsperiode II um einen Wert von 0,350 mg/dl. Mit Ausnahme der Zeitpunkte Tag 84 in der Gruppe Lycopin und dem Tag 21 der Gruppe Lutein war auch in der zweiten Versuchsperiode ein leichter Anstieg und Abfall der TEBK zu beobachten. Die Mittelwerte der Gruppen Lyco:Lut 1:2 und Lyco:Lut 2:1 lagen ebenfalls alle über dem Ausgangswert, jedoch nicht so deutlich wie in Versuchsperiode I.

Tabelle 33: Mittlere Totale Eisenbindungskapazität (TEBK) des Serums der fünf Gruppen in Versuchsperiode II zu den Zeitpunkten Tag 0, 7, 21, 56 und 84 in mg/dl (MW ± Stabw)

	Tag 0	Tag 7	Tag 21	Tag 56	Tag 84
Kontrolle	0,322 ± 0,074	0,395 ± 0,058	0,361 ± 0,048	0,301 ± 0,184	0,373 ± 0,055
Lycopin	0,352 ± 0,088	0,398 ± 0,128	0,396 ± 0,075	0,360 ± 0,070	0,390 ± 0,068
Lutein	0,342 ± 0,103	0,485 ± 0,079	0,354 ± 0,067	0,387 ± 0,034	0,375 ± 0,042
Lyco:Lut 1:2	0,314 ± 0,111	0,389 ± 0,058	0,412 ± 0,111	0,422 ± 0,104	0,384 ± 0,099
Lyco:Lut 2:1	0,342	— [#]	0,454 ± 0,176	0,389 ± 0,066	0,402 ± 0,062

[#]: keine Analysewerte vorhanden

4.3.4.2. Latente Eisenbindungskapazität

In Tabelle 34 und Tabelle 35 werden die bei der Analyse der Serumproben der Hunde erhaltenen Gruppenmittelwerte der Latenten Eisenbindungskapazität (LEBK) zu den Zeitpunkten Tag 0, 7, 21, 56 und 84 beider Versuchsperioden, angegeben in mg/dl, dargestellt.

Sehr ähnlich wie die TEBK verhielt sich auch die LEBK. In der Kontrollgruppe schwankte sie im Verlauf der Versuchsperiode I um den Wert 0,426 mg/dl. In den Gruppen Lycopin und Lutein war eine geringe Zu- und wieder Abnahme des Wertes zu verzeichnen, der wie in der ersten Versuchsperiode in der Gruppe Lycopin seinen Ausgangswert unterschritt. In den übrigen drei Gruppen fanden starke Anstiege der LEBK statt, die höchste darunter war mit 128% in der Gruppe Lyco:Lut 1:1 am Tag 84 zu beobachten.

Tabelle 34: Mittlere Latente Eisenbindungskapazität (LEBK) des Serums der sechs Gruppen in Versuchsperiode I zu den Zeitpunkten Tag 0, 7, 21, 56 und 84 in mg/dl (MW ± Stabw)

	Tag 0	Tag 7	Tag 21	Tag 56	Tag 84
Kontrolle	0,428 ± 0,106	0,392 ± 0,105	0,452 ± 0,063	0,473 ± 0,065	0,384 ± 0,130
Lycopin	0,401 ± 0,078	0,400 ± 0,087	0,487 ± 0,076	0,442	0,312 ± 0,167
Lutein	0,398	0,445 ± 0,067	0,468 ± 0,077	0,503 ± 0,098	0,410 ± 0,142
Lyco:Lut 1:1	0,253 ± 0,025	0,424 ± 0,030	0,531 ± 0,068	0,554 ± 0,085	0,576 ± 0,141
Lyco:Lut 1:2	0,292 ± 0,032	0,455 ± 0,128	0,483 ± 0,159	0,335 ± 0,035	0,639 ± 0,021
Lyco:Lut 2:1	0,250 ± 0,077	0,474 ± 0,105	0,478 ± 0,090	0,468 ± 0,117	0,562 ± 0,065

Tabelle 35: Mittlere Latente Eisenbindungskapazität (LEBK) des Serums der fünf Gruppen in Versuchsperiode II zu den Zeitpunkten Tag 0, 7, 21, 56 und 84 in mg/dl (MW ± Stabw)

	Tag 0	Tag 7	Tag 21	Tag 56	Tag 84
Kontrolle	0,153 ± 0,123	0,230 ± 0,043	0,231 ± 0,042	0,161 ± 0,178	0,255 ± 0,044
Lycopin	0,182 ± 0,099	0,214 ± 0,157	0,231 ± 0,093	0,197 ± 0,090	0,245 ± 0,047
Lutein	0,184 ± 0,083	0,300 ± 0,056	0,181 ± 0,087	0,247 ± 0,030	0,237 ± 0,035
Lyco:Lut 1:2	0,134 ± 0,064	0,253 ± 0,024	0,282 ± 0,086	0,293 ± 0,074	0,269 ± 0,079
Lyco:Lut 2:1	0,215	— [#]	0,235 ± 0,210	0,220 ± 0,063	0,229 ± 0,059

[#]: keine Analysewerte vorhanden

Die LEBK der Kontrollgruppe bewegte sich im Verlauf der Versuchsperiode II um einen Wert von 0,200 mg/dl. Genauso wie bei der TEBK war auch bei der LEBK mit Ausnahme der Zeitpunkte Tag 84 in der Gruppe Lycopin und Tag 21 der Gruppe Lutein in der zweiten Versuchsperiode ein leichter Anstieg und Abfall zu beobachten. Die Mittelwerte der Gruppen Lyco:Lut 1:2 und Lyco:Lut 2.1 lagen ebenfalls alle über dem Ausgangswert, jedoch mit einer maximalen Zunahme von 119% (Gruppe Lyco:Lut 1:2) und +9% (Gruppe Lyco:Lut 2:1) weniger deutlich als in Versuchsperiode I.

5. Diskussion

5.1. Diskussion des Versuchaufbaus und der Versuchsdurchführung

5.1.1. Versuchstiere und ihre Haltung

5.1.1.1. Vorversuch

Der Vorversuch wurde an neun institutseigenen, weiblichen Beagles durchgeführt. Die Durchführung mit drei Versuchsdurchläufen erfolgte nach dem Prinzip des „Latin Square“, wobei jeder Hund einmal jeder Gruppe angehörte. Damit wurde eine Beeinflussung der Ergebnisse durch Gewicht, Alter oder individuelle Einflüsse des Einzeltieres weitgehend ausgeschlossen.

Während des gesamten Zeitraumes der drei Versuchsdurchläufe mit den dazwischenliegenden Washout-Phasen war keine Beeinträchtigung des Allgemeinbefindens der Hunde festzustellen.

5.1.1.2. Hauptversuch

Der Hauptversuch wurde an insgesamt 36 Beagles durchgeführt. Die Einteilung der Hunde in die sechs (Versuchsperiode I) bzw. fünf (Versuchsperiode II) Versuchsgruppen erfolgte nach Gewicht und Alter randomisiert, so dass trotz der z. T. großen Gewichts- und Altersunterschiede zwischen den Hunden innerhalb der Gruppen annähernd gleiche Durchschnittsgewichte und -alter erreicht wurden. Hierdurch kann eine gewichts- oder altersbedingte Beeinflussung der Ergebnisse vernachlässigt werden.

Alle Hunde des Hauptversuches wurden bis auf fünf Ausnahmen in Gruppen von zwei bis vier Tieren gehalten. Da Hunde Rudeltiere sind und ein ausgeprägtes Sozialverhalten zeigen, wurde aus Gründen des Tierschutzes die Gruppenhaltung der Einzelhaltung vorgezogen. Ausnahmen bildeten fünf Hunde, die sich vor Versuchsbeginn auch nach mehrmaligen Versuchen mit verschiedenen Hunden und Hundegruppen nicht erfolgreich in eine Gruppe eingliedern ließen und deshalb einzeln gehalten werden mussten.

Die Eingabe der Kapseln erfolgte unmittelbar mit der Fütterung, bei der sich jeder Hund an seinem eigenen angestammten Fressplatz befand. Während der gesamten Dauer der Fütterung hielt sich eine Person im Zwinger auf, die die Hunde beaufsichtigte und eine mögliche Aufnahme von Futter aus einem fremden Futternapf verhinderte. Auch nach der Fütterung wurden die Zwinger in Abständen kontrolliert.

Vereinzelt kam es zu Aggressionsverhalten der Tiere untereinander. So mussten einige Hunde mit Bissverletzungen versorgt werden.

Die zwei euthanasierten Hunde waren zehn bzw. neun Jahre alt, die Euthanasie erfolgte am Tag 10 bzw. Tag 47 der jeweiligen Versuchsperiode. Vor dem Hintergrund, dass sich um ältere Tiere handelte und die Erkrankung schon bereits zu einem relativ frühen Zeitpunkt im Versuchsverlauf auftrat, ist die Möglichkeit eines Zusammenhangs der Tumorerkrankungen mit dem Versuchsablauf zu vernachlässigen.

5.1.2. Wirkstoffzuteilung und -verabreichung

Bei der Auswahl der Dosierung der Wirkstoffe orientierte man sich an Interventionsstudien am Menschen. Mit der Dosierung von 2 mg/kg KG befand man sich in der gleichen Größenordnung wie in Interventionsstudien mit β -Carotin beim Menschen, bei denen trotz hoher Dosierung keine klinisch relevanten negativen Effekte auftraten (Bendich, 1992). Es wurden beim Hund bereits verschiedene Studien durchgeführt, bei denen sich die Dosierung der Carotinoide zwischen 0,3 und 14,3 mg/kg KG bewegte (Chew et al., 2000a; Chew et al., 2000c). Korytko et al. (2003) stellten bei Hunden auch bei einer täglichen Dosierung von 30 mg/kg KG über

28 Tage hinweg keine Anzeichen einer Toxizität von Lycopin fest. Da beschrieben wurde, dass Lycopin und Lutein bei kombinierter Gabe synergistische Effekte aufweisen können (Stahl et al., 1998), wurden im Hauptversuch einige Gruppen mit beiden Wirkstoffen in Kombination in verschiedenen Verhältnissen supplementiert.

Die einmalige Verabreichung der Wirkstoffe im Vorversuch erfolgte durch orale Eingabe von Kapseln, in die der jeweilige Wirkstoff bzw. das Placebo einzeln eingewogen wurden. Nach Überprüfung des Schluckreflexes war eine exakt auf das Körpergewicht abgestimmte und sichere Aufnahme garantiert.

Im Hauptversuch musste sichergestellt werden, dass jeder Hund über den gesamten Versuchszeitraum hinweg die entsprechende Dosierung von 2 mg/kg KG an Wirkstoff bzw. an Wirkstoffkombination erhielt. Hierzu wurde ebenfalls eine Verabreichung mittels Kapseln gewählt, bei der die Wirkstoffmenge genau auf das Körpergewicht der Tiere eingestellt werden konnte. Dies ist insbesondere wichtig bei großen Gewichtsunterschieden zwischen den Hunden, wie es in dieser Studie der Fall war, bei der das Körpergewicht zwischen 10,5 kg und 27,1 kg betrug. Außerdem wurde durch die orale Eingabe der Kapseln und Kontrolle des Schluckvorganges eine sichere Aufnahme der Carotinoide erreicht.

Des Weiteren musste verhindert werden, dass große Schwankungen innerhalb der Wirkstoffzubereitung auftraten. Um dies zu erreichen, wurden nur Wirkstoffe derselben Charge verwendet. Die Wirkstoffe und die fertigen Kapseln wurden während des gesamten Versuchszeitraumes dunkel, weitestgehend luftdicht abgeschlossen und bei 8°C aufbewahrt.

5.1.3. Laborbestimmungen

Im Vorversuch traten trotz der Anzahl von 15 Blutentnahmezeitpunkten innerhalb von 24 Stunden bei der Probengewinnung keinerlei Probleme auf. Die betroffenen Gliedmaßen wurden am Ende des Versuchs mit Heparinsalbe und einem Verband versorgt.

Die Gewinnung der Blutproben des Hauptversuches verlief ebenfalls problemlos und erfolgte stets zur gleichen Uhrzeit an nüchternen Tieren, wodurch circadiane Einflüsse vermieden werden sollten.

Es wurde stets darauf geachtet, dass das Blut möglichst rasch nach der Entnahme zentrifugiert, das Serum bzw. Plasma abpipettiert und auf Trockeneis bei -80°C tiefgefroren wurde. Dies ist insbesondere von Bedeutung für die Bestimmung präanalytisch instabiler Parameter wie z. B. TEAC oder Vitamin C, um eine Verfälschung der Ergebnisse zu vermeiden. Des Weiteren wurde ein schonendes Auftauen der Proben vor der Analyse bei Raumtemperatur gewährleistet und ein mehrfaches Auftauen und wieder Einfrieren vermieden.

5.2. Diskussion der Ergebnisse

5.2.1. Plasmaresponse

5.2.1.1. Vorversuch

Ziel des Vorversuches war es, festzustellen, inwieweit die Carotinoide Lycopin und Lutein nach oraler Verabreichung von Hunden absorbiert werden und nach welcher Zeit eine maximale Konzentration im Blut erreicht wird. Hierzu wurde nach einmaliger oraler Gabe die Plasmaresponse der beiden Wirkstoffe innerhalb eines Zeitraums von 24 Stunden bestimmt.

Bei Hunden ohne Lycopingabe war dieses Carotinoid zu keinem Zeitpunkt im Plasma nachweisbar. 60 Minuten nach Verabreichung wurde es erstmals im Plasma nachgewiesen, danach stieg es kontinuierlich bis 18 Stunden nach der Kapselgabe an. Anschließend war ein Abfall der Konzentration zu beobachten (siehe Abbildung 6). Die maximale Plasmakonzentration betrug $57,7 \mu\text{g/l}$. Einen ähnlichen Verlauf der Plasmaresponse ermittelten auch Korytko et al. (2003), die Hunden 10, 30 oder 50 mg/kg KG Lycopin eingaben. In dieser Studie wurde der Maximalwert etwa 15 Stunden nach Verabreichung erreicht. Die Konzentration war trotz der Dosierung von 10 mg/kg KG ähnlich hoch ($49,4 \mu\text{g/l}$), was darauf schließen lässt, dass eine Erhöhung der Dosis nicht immer eine Erhöhung der maximal erreichten

Plasmakonzentration bedingt. Auch nach der Gabe von 30 mg/kg KG bzw. 50 mg/kg KG Lycopin trat in jener Studie kein deutlicher Unterschied des Maximalwertes im Plasma auf.

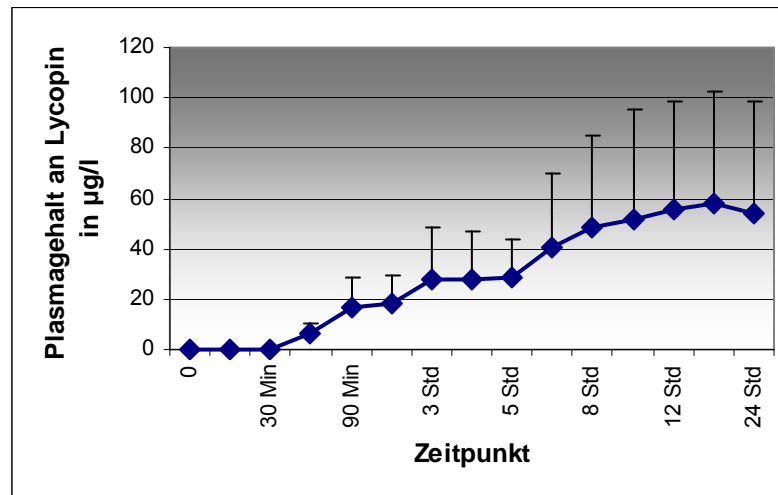


Abbildung 6: Plasmagehalt an Lycopin in µg/l innerhalb von 24 Stunden nach einmaliger oraler Gabe von 2 mg/kg KG Lycopin

Lutein war schon vor der Kapselgabe und auch in der Kontroll- sowie in der Lycopin-Gruppe in geringen Mengen im Plasma von einigen Hunden nachweisbar. Eine mögliche Erklärung hierfür ist in der Fütterung der Hunde zu finden, da das Futter der Tiere Geflügelprodukte und -fett enthielt. Carotinoide, darunter auch Lutein, sind als färbende Stoffe für Geflügelfutter zugelassen (bis zu 80 mg/kg Alleinfutter für Geflügel), sie werden häufig zur Dotter- und Hautfärbung eingesetzt. In einer Studie von Kim et al. (2000a) konnte Lutein bei den teilnehmenden Beagles vor der Verabreichung nicht im Plasma nachgewiesen werden, dieselben Autoren fanden jedoch bei Katzen ebenfalls schon vor der Supplementierung Luteingehalte im Blut. Während in den beiden Gruppen der vorliegenden Studie, die kein Lutein erhielten, die Plasmakonzentration in diesem niedrigen Bereich blieb, stieg sie in der Gruppe, der Lutein verabreicht wurde, ab 60 Minuten nach Verabreichung an, um nach fünf Stunden ein Maximum von 19,8 µg/l im Gruppenmittel zu erreichen. Danach sank der Wert stetig wieder nahezu bis zum Ausgangswert ab (siehe Abbildung 7). Somit stieg die Plasmakonzentration von Lutein wesentlich früher auf ihren Maximalwert an, nahm jedoch auch viel eher wieder ab als die von Lycopin. Diese Beobachtung kann anhand der chemischen Struktur der beiden Carotinoide erklärt werden. Da polarere Xanthophylle schneller resorbiert aber auch wieder ausgewaschen werden als die unpolaren Carotine, erreichte Lutein eher seine

Maximalkonzentration als das lipophilere Lycopin, sank jedoch auch früher wieder ab. Dies steht in Übereinstimmung mit den Ergebnissen einer Studie von Bierer et al. (1995), in der die Absorption verschiedener Carotinoide beim präruminanten Kalb untersucht wurde. Die Autoren stellten fest, dass die Polarität der Carotinoide die Dauer bis zum Erreichen des Peaks beeinflusste. Die polareren Xanthophylle erreichten wesentlich eher ihre Maximalkonzentration im Blut, verschwanden jedoch auch sehr viel schneller wieder.

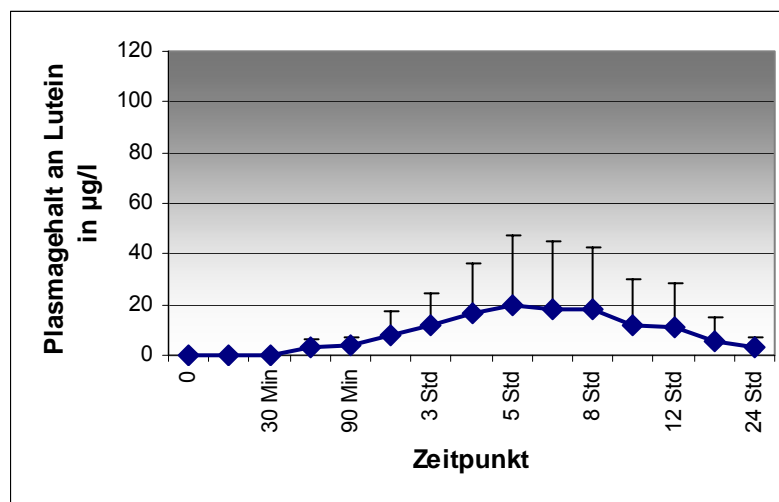


Abbildung 7: Plasmagehalt an Lutein in µg/l innerhalb von 24 Stunden nach einmaliger oraler Gabe von 2 mg/kg KG Lutein

Auffällig ist die hohe Standardabweichung der Werte, die im Zeitraum um den Maximalwert bis zu $\pm 45 \mu\text{g/l}$ ($\pm 80\%$) bei Lycopin bzw. $\pm 28 \mu\text{g/l}$ ($\pm 140\%$) bei Lutein betrug. Bei der Betrachtung der Werte der einzelnen Hunde fielen deutliche Unterschiede hinsichtlich der Zunahme der Plasmakonzentration auf. Während diese bei einigen Hunden z. T. auf Maximalwerte von bis zu $140 \mu\text{g/l}$ (Lycopin) bzw. $87 \mu\text{g/l}$ (Lutein) stieg, erreichte sie bei anderen Tieren lediglich $7 \mu\text{g/l}$ bzw. $3 \mu\text{g/l}$. Dies könnte im Auftreten von „Non-Respondern“ oder „Low-Respondern“ begründet sein. Darunter versteht man Individuen, die bei Verabreichung des entsprechenden Carotinoids keinen oder nur einen geringen Anstieg des Wirkstoffs im Blut aufweisen. Im Gegensatz dazu stehen die „High-Responder“, bei denen die Konzentration im Blut stark ansteigt. Bei Hunden, Kälbern oder Katzen (Chew et al., 2000a; Bierer et al., 1995; Chew et al., 2000b) beispielsweise wurden in einigen Studien Non- bzw. Low-Responder angetroffen, während in anderen Studien, u. a. auch beim Hund

keine derartigen Beobachtungen gemacht wurden (Chew et al., 2000c). Chew et al. (2000b) stellten fest, dass zwei Katzen ihrer Studie, die sich bei einer Dosierung von 5 mg β -Carotin als Low-Responder herausstellten, bei einer höheren Dosierung des Carotinoids durchaus einen signifikanten Anstieg der Plasmakonzentration aufwiesen. Sie vermuteten deshalb, dass das Auftreten von Low-Respondern von der Dosis des verabreichten Carotinoids abhängen könnte. Da in der vorliegenden Studie mit 2 mg/kg KG eine niedrigere Dosierung gewählt wurde als beispielsweise in der Studie von Chew et al. (2000c), könnte ein Low-Responder-Effekt aufgetreten sein.

5.2.1.2. Hauptversuch

Zu Beginn des Versuchs war bei den meisten Hunden weder Lycopin noch Lutein im Plasma nachweisbar, die Konzentration der jeweiligen Carotinoide stieg bei allen Hunden zu Beginn der Supplementierung deutlich an. Nach dem Erreichen des Maximums (am Tag 21, 56 oder 84) war im Gruppenmittel wieder eine Abnahme zu verzeichnen (Abbildung 8, Abbildung 9, Abbildung 10 und Abbildung 11). Warum die Plasmakonzentrationen trotz andauernder Supplementierung zum Versuchsende hin wieder abfielen, ist unklar. Es besteht die Möglichkeit, dass sich der Plasmagehalt nach dem anfänglich starken Ansteigen bei einem gewissen Spiegel einpendeln würde, um den er schließlich schwankt. Um dies zu bestätigen, müssten die Hunde über einen noch längeren Zeitraum supplementiert und die Plasmakonzentration bestimmt werden. Andere Autoren (Kim et al., 2000a; Korytko et al., 2003; Chew et al., 2000) stellten bei einer mehrwöchigen Supplementierung von Beagles mit verschiedenen Carotinoiden ebenfalls zunächst einen deutlichen Anstieg der Plasmakonzentration fest. Während die Konzentration von Lutein jedoch bis zum Versuchsende (Tag 84) hin anstieg (Kim et al., 2000a), war bei der von β -Carotin ab Tag 28 vergleichbar mit den Carotinoiden der vorliegenden Studie ein leichter Rückgang zu verzeichnen (Chew et al., 2000a). In der Studie von Korytko et al. (2003), in der die Hunde täglich 30 mg/kg KG Lycopin erhielten, war schon vier Tage nach der ersten Verabreichung ein konstanter Spiegel zwischen 421 und 535 $\mu\text{g/l}$ erreicht.

In der vorliegenden Studie stiegen die Werte über einen längeren Zeitraum an, die Höhe der erreichten Konzentrationen lag in den Gruppen Lyco:Lut 2:1 und Lycopin mit etwa 450 µg/l jedoch in der gleichen Größenordnung wie bei der Supplementierung mit 30 mg/kg KG (Korytko et al., 2003). Dies lässt die Annahme zu, dass bei einer höheren Dosierung die maximale Konzentration zwar schneller erreicht wird, die absolute Höhe sich jedoch ab einer bestimmten Dosierung nicht mehr steigern lässt. Auffällig war, dass die Lycopinkonzentrationen mit bis über 450 µg/l wesentlich höhere Werte erreichten als Lutein, bei dem die Konzentrationen unter 30 µg/l blieben. Somit wurde Lycopin in deutlich höherem Maße aufgenommen als Lutein und schien besser bioverfügbar gewesen zu sein. Eine mögliche Erklärung könnten Interaktionen der beiden Carotinoide untereinander oder mit im Futter enthaltenen β-Carotin darstellen. In zahlreichen Studien wurde eine gegenseitige Beeinflussung der Absorption von β-Carotin und Lutein festgestellt, wohingegen Interaktionen zwischen β-Carotin und Lycopin weniger gut belegt sind (van den Berg, 1999).

Es schien eine Dosisabhängigkeit erkennbar zu sein. Die Gruppen, die mehr Wirkstoff erhielten, zeigten in der Regel auch eine höhere Plasmakonzentration des Wirkstoffes. Da die Wirkstoffe in Kombination verabreicht wurden und deswegen Wechselwirkungen möglich waren, konnte die Dosisabhängigkeit jedoch nicht uneingeschränkt beurteilt werden. Die kombinierte Gabe schien insgesamt dennoch keinen Einfluss auszuüben. Eine Ausnahme stellte die Gruppe Lyco:Lut 2:1 in Versuchsperiode I dar, die 1,33 mg/kg KG Lycopin erhielt und dessen ungeachtet einen höheren maximalen Plasmagehalt dieses Carotinoids aufwies als die Gruppe Lycopin (2 mg/kg KG). Eine mögliche Erklärung für diese Entwicklung in Versuchsperiode I ist die Verteilung von Low- und High-Respondern unter den Gruppen. Tatsächlich fiel bei Betrachtung der Einzelwerte der Hunde auf, dass ein Tier der Gruppe Lyco:Lut 2:1 sich durch einen besonders hohen Anstieg der Lycopinkonzentration im Plasma (auf bis zu 1011 µg/l) auszeichnete. Nach Herausnahme der Werte dieses High-Responders blieb die Plasmakonzentration im Gruppenmittel hinter der der Gruppe Lycopin zurück. In Versuchsperiode II verhielten sich alle Plasmaresponsekurven dosisabhängig. Auch bei Verabreichung einzelner Wirkstoffe in verschiedenen anderen Studien wurde eine deutliche Dosisabhängigkeit der Plasmakonzentration von Carotinoiden beim Hund festgestellt (Chew et al., 2000a; Chew et al., 2000c; Kim et al., 2000a).

Die Gruppe Lyco:Lut 1:1 nimmt eine Sonderstellung ein. Die Plasmakonzentration von Lycopin bzw. Lutein war in dieser Gruppe höher als in den Gruppen Lyco:Lut 2:1 (nach Herausnahme des einzelnen High-Responders) bzw. Lyco:Lut 1:2, was bedeutet, dass trotz niedrigerer Dosierung in dieser Gruppe (je 1 mg/kg KG) das Plasma einen höheren Gehalt des jeweiligen Wirkstoffs erreichte als bei einer Dosierung von 1,33 mg/kg KG. Dieses Verhalten ist möglicherweise darauf zurückzuführen, dass bei der Verabreichung der beiden Carotinoide in der gleichen Dosierung doch Wechselwirkungen aufgetreten sein könnten.

Zu einigen Zeitpunkten waren auch in den Gruppen, die keine Carotinoide erhielten, bei vereinzelt Hundes Wirkstoffe im Plasma nachweisbar. Die Ursache für diese Beobachtung könnte möglicherweise in Analyseungenauigkeiten zu finden sein. Auch geringe Schwankungen in der Futterzusammensetzung sind als Grund denkbar. Ein etwas höherer Anteil von carotinoidenthaltenden Geflügelprodukten oder -fett könnten beispielsweise zu einer nachweisbaren Konzentration dieser Stoffe im Plasma geführt haben. Entgegen aller Sorgfalt kann außerdem bei einer Gruppenhaltung der Hunde nicht ausgeschlossen werden, dass ein Hund z. B. durch Aufnahme von Erbrochenem eines anderen Hundes eventuell darin enthaltene Wirkstoffe aufnahm. Auch trotz gewissenhafter Überwachung insbesondere während und nach der Fütterung müssen derartige Faktoren in Betracht gezogen werden.

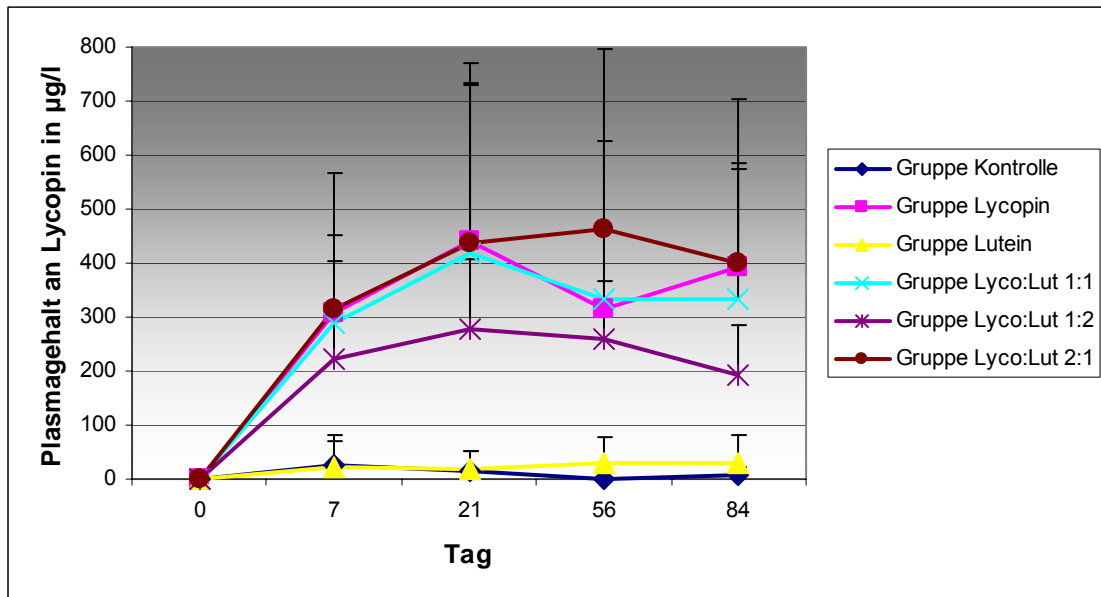


Abbildung 8: Plasmagehalt an Lycopin in µg/l der sechs Versuchsgruppen während der Versuchsperiode I

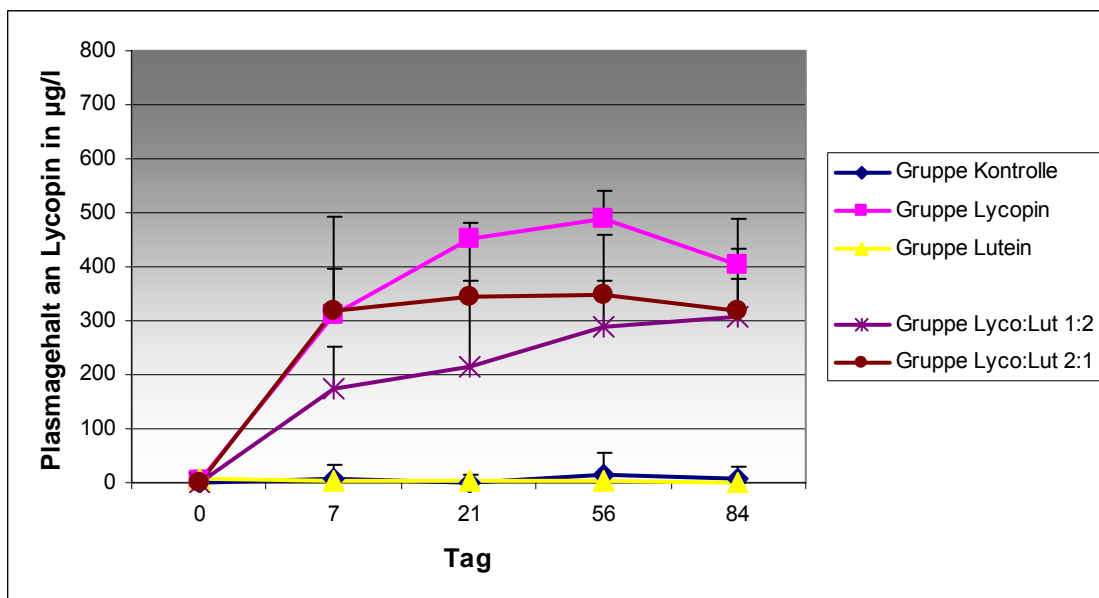


Abbildung 9: Plasmagehalt an Lycopin in µg/l der fünf Versuchsgruppen während der Versuchsperiode II

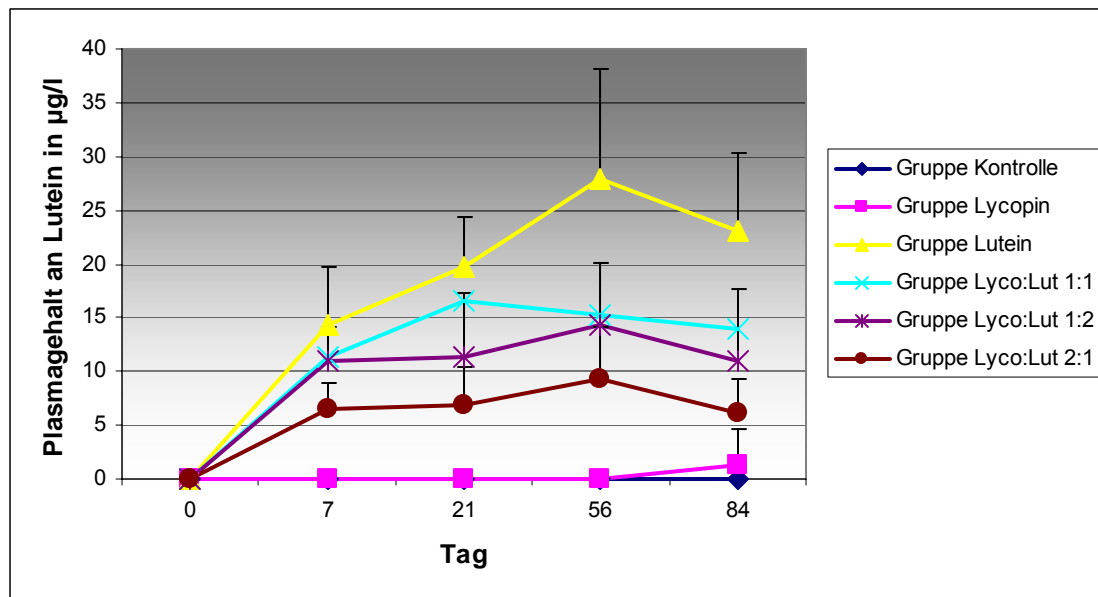


Abbildung 10: Plasmagehalt an Lutein in $\mu\text{g/l}$ der sechs Versuchsgruppen während der Versuchsperiode I

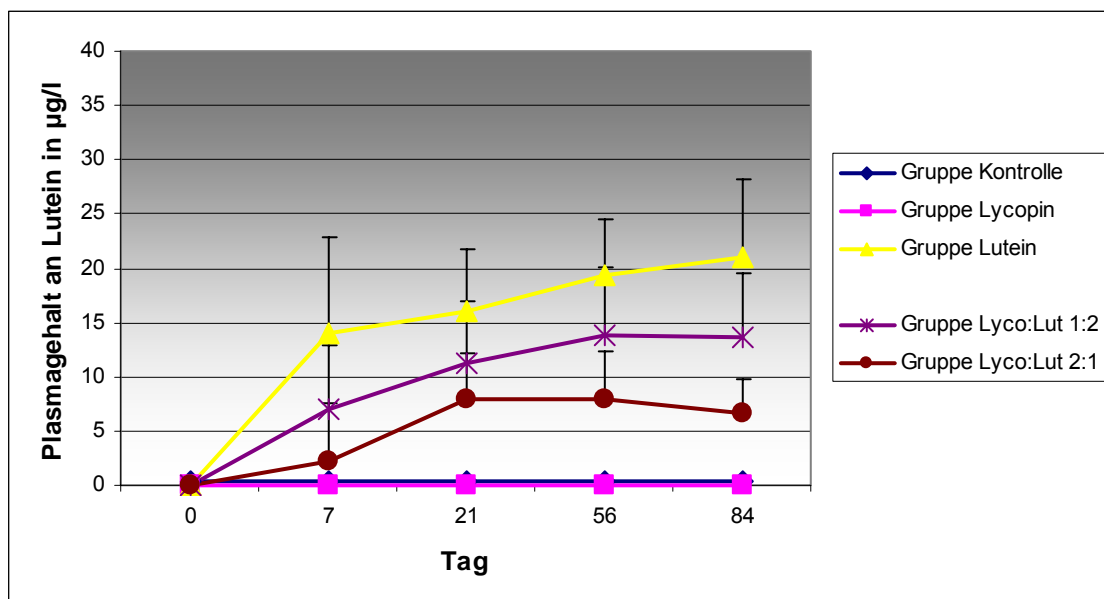


Abbildung 11: Plasmagehalt an Lutein in $\mu\text{g/l}$ der fünf Versuchsgruppen während der Versuchsperiode II

5.2.2. Parameter des antioxidativen Status

5.2.2.1. Trolox Equivalent Antioxidant Capacity (TEAC)

Die TEAC wurde photometrisch bestimmt. Dieser Parameter beschreibt das Vermögen der im Serum enthaltenen Antioxidantien, ABTS-Radikal-Kationen (ABTS^{•+}) zu reduzieren. Ein hoher Wert der TEAC bedeutet demnach, dass im Serum eine größere Menge an Antioxidantien vorhanden ist, die vor Radikalen und damit vor oxidativer Schädigung schützen können, die antioxidative Kapazität ist hoch.

Bislang ist kein Referenzbereich der TEAC beim Hund ermittelt. In den vorliegenden Untersuchungen wurde dieser Parameter deshalb auf Veränderungen innerhalb der Gruppen bzw. zwischen den supplementierten Gruppen und der Kontrollgruppe hin untersucht und beurteilt.

Während die TEAC in der Kontrollgruppe um einen Wert von 0,32 mmol/l schwankte, lagen in den supplementierten Gruppen die Gruppenmittelwerte aller übrigen Zeitpunkte, mit Ausnahme des Zeitpunktes Tag 7, über ihrem Ausgangswert von Tag 0. Am wenigsten ausgeprägt war dieser Anstieg mit um die 11% in der Gruppe Lyco:Lut 2:1, am stärksten war er mit +52% in der Gruppe Lyco:Lut 1:2 am Tag 84.

Am Tag 7 war zwischen den Mittelwerten der einzelnen Gruppen eine sehr große Streuung festzustellen. Während die TEAC in der Gruppe Lycopin leicht absank, nahm sie in den Gruppen Lutein und Lyco:Lut 1:1 stark ab (-74% bzw. -64%). Diese Werte waren im Vergleich zur Kontrollgruppe statistisch signifikant niedriger. Ganz im Gegensatz dazu war in den Gruppen Lyco:Lut 1:2 und Lyco:Lut 2:1 ein deutlicher Anstieg zu verzeichnen (+118% bzw. +183%), die TEAC war hier statistisch signifikant höher als die der Kontrollgruppe. Betrachtet man die weitere Entwicklung der TEAC, bei der dieser Parameter in den supplementierten Gruppen insgesamt allmählich anstieg, lässt sich vermuten, dass die Carotinoide am Tag 7 zu diesem frühen Zeitpunkt der 84-tägigen Supplementierungsphase noch nicht völlig ihre Wirkung auf die TEAC erreicht hatten. Deshalb sollen die stark abweichenden Werte des Tages 7 der Versuchsperiode I unberücksichtigt bleiben.

Um die unterschiedliche Entwicklung der TEAC in den verschiedenen Gruppen infolge der Carotinoidgabe zu verdeutlichen, wurden Gruppenmittelwerte des gesamten Supplementierungszeitraums gebildet und mit dem jeweiligen Ausgangswert von Tag 0 verglichen (Abbildung 12).



Abbildung 12: Bildung des Mittelwertes aus den Zeitpunkten der Supplementierungsphase (Tag 7 bis 84)

In Versuchsperiode I war in allen supplementierten Gruppen ein deutlicher Anstieg der TEAC zum Ausgangswert nachzuweisen, wohingegen die Werte der Kontrollgruppe kaum anstiegen. Die Gruppe Lutein zeigte mit +31% einen leicht höheren Wert als die Gruppe Lycopin (+28%), noch deutlicher war dieser Unterschied zwischen der Gruppe Lyco:Lut 1:2 (+37%) im Vergleich zur Gruppe Lyco:Lut 2:1 (+11%). Dies deutet auf eine marginal bessere Wirkung von Lutein auf die TEAC hin. In der Gruppe Lyco:Lut 1:1 nahm die TEAC im Supplementierungszeitraum um 20% im Vergleich zum Tag 0 zu (siehe Abbildung 13).

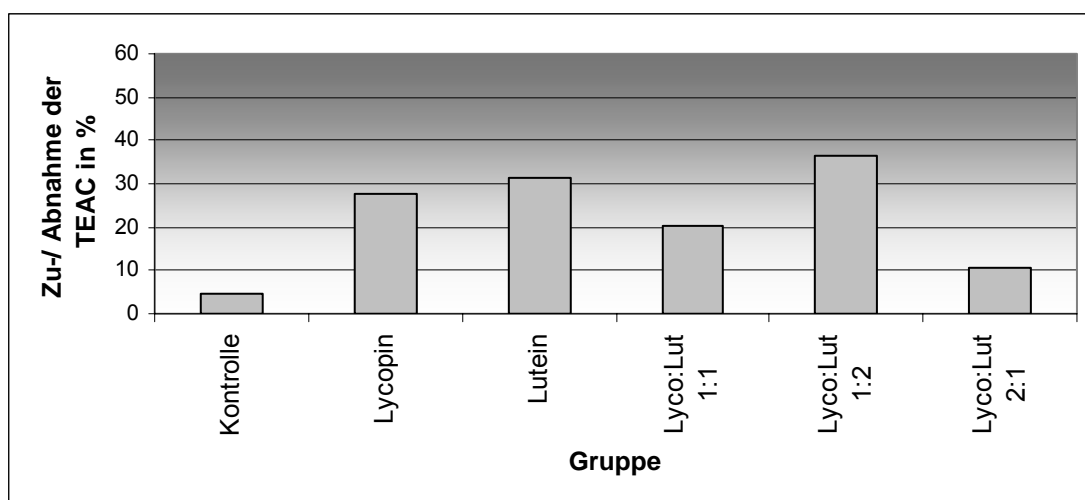


Abbildung 13: Zu- bzw. Abnahme des Mittelwertes der TEAC der Supplementierungsphase im Vergleich zum Ausgangswert (Tag 0) in der Versuchsperiode I ohne Berücksichtigung des Tages 7 in %

Obwohl die Unterschiede zwischen den supplementierten Gruppen und der Kontrollgruppe zu keinem Zeitpunkt statistisch signifikant waren, wiesen die Ergebnisse darauf hin, dass die Supplementierung der Hunde mit den gewählten Carotinoiden die TEAC des Serums steigerte. Sehr ausgeprägt war diese Wirkung v. a. in den Gruppen Lycopin, Lutein und Lyco:Lut 1:2. Diese Beobachtung bestätigt Schlussfolgerungen von Djuric et al. (2003), in deren Studie festgestellt wurde, dass v. a. Lycopin, aber auch Lutein und Zeaxanthin, in humanen Plasma stark mit der TEAC des Plasmas korrelierten. Die Autoren vermuteten deshalb, dass Interventionen, die den Plasmagehalt an Lycopin erhöhen, auch die TEAC erhöhen könnten.

Im wässrigen Medium Serum können stark hydrophobe Stoffe wie Carotinoide schlecht direkt mit Hilfe des TEAC-Assays beurteilt werden (Miller et al., 1993). Um die Fähigkeit von Carotinoiden zu untersuchen, ABTS-Radikal-Kationen (ABTS^{•+}) reduzieren zu können, müssen sie in einem Lösungsmittel wie z. B. Aceton in Lösung gebracht werden (Miller et al., 1996). Da es sich bei dem Probenmaterial in dieser Studie um Serum handelte, wurden die Carotinoide bei der Bestimmung der TEAC nicht direkt miterfasst. Bei der beobachteten Steigerung der TEAC durch die Verabreichung von Lycopin und Lutein handelte es sich folglich um indirekte Effekte. So könnten die Carotinoide zu einer Erhöhung der TEAC geführt haben, in dem sie z. B. die Konzentration der übrigen Antioxidantien im Plasma steigerten. Da die Ergebnisse der Bestimmung der Vitamine E und C keinen Hinweis auf eine Wirkung von Lycopin und Lutein auf diese antioxidativen Vitamine im Blut gaben (siehe 5.2.2.2.), ist anzunehmen, dass sie nicht vorrangig für die Erhöhung der TEAC verantwortlich waren. Diese Vitamine tragen jedoch auch lediglich einen geringen Anteil zur Gesamt-TEAC des Plasmas bei (Miller et al., 1993). Um festzustellen, ob Lycopin und Lutein einen Einfluss auf andere wichtige Antioxidantien wie Albumin ausüben, müssten weitere Untersuchungen durchgeführt werden.

Eine weitere Möglichkeit, wie die verabreichten Carotinoide indirekt zu einer Steigerung der TEAC geführt haben könnten, ist durch die Beeinflussung des enzymatischen antioxidativen Systems. Schon mehrfach wurde nachgewiesen, dass Carotinoide in der Lage sind, die Genexpression zu beeinflussen und Enzyme zu induzieren (siehe 2.2.4). Mohan et al. (2003) stellten fest, dass die Verabreichung von Lycopin die antioxidativen Aktivitäten der Enzyme SOD und CAT signifikant

erhöhte. Daher ist es vorstellbar, dass durch die Wirkung dieser Enzyme die Antioxidantien im Blut weniger stark „verbraucht“ wurden und so zu einer erhöhten TEAC führten.

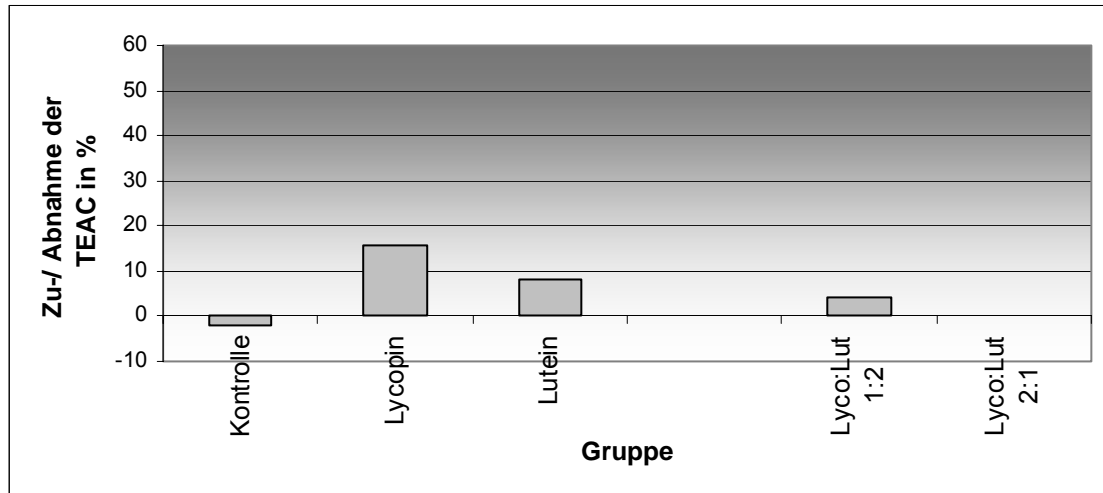


Abbildung 14: Zu- bzw. Abnahme des Mittelwertes der TEAC der Supplementierungsphase (Tag 7 bis 84) im Vergleich zum Ausgangswert (Tag 0) in der Versuchsperiode II in %

In der zweiten Versuchsperiode war der positive Effekt auf die TEAC vorhanden, jedoch bei weitem nicht so ausgeprägt wie in der ersten (siehe Abbildung 14). Mögliche Erklärungen dafür sind beispielsweise in der Tatsache zu finden, dass die zwei Abschnitte des Hauptversuches in unterschiedlichen Jahreszeiten stattfanden. So wurde Versuchsperiode I im Frühjahr und Sommer durchlaufen, Versuchsperiode II hingegen im Herbst und Winter. Abgesehen davon stammten die Wirkstoffe beider Versuchsperioden aus derselben Charge, was bedeutet, dass sie im zweiten Abschnitt des Versuches bereits etwas älter waren als im ersten. Aufgrund der sorgfältigen Lagerung, bei der darauf geachtet wurde, dass die Carotinoide stets kühl, lichtgeschützt und weitestgehend luftdicht aufbewahrt wurden, ist das Alter der Wirkstoffe als Ursache aber eher als unwahrscheinlich einzustufen. Am ehesten scheint die Ursache der reduzierten Effekte in der Versuchsperiode II darin zu liegen, dass die Carotinoide den Hunden bereits in Versuchsperiode I über einen Zeitraum von 84 Tagen verabreicht worden und so trotz der langen Washout-Phase noch Auswirkungen aus der Versuchsperiode I vorhanden waren. Diese Annahme wird unterstützt durch die Tatsache, dass die Ausgangswerte der TEAC am Tag 0 von Versuchsperiode II insgesamt bereits höher lagen als in Versuchsperiode I. Auch die extreme Schwankung am Tag 7 war nicht zu

beobachten. Aus diesen Gründen wurde der Tag 7 in der Versuchsperiode II im Gegensatz zur Versuchsperiode I bei Berechnung des Mittelwertes der Supplementierungsphase mit berücksichtigt.

5.2.2.2. Vitamine E und C

Die Konzentration des fettlöslichen Vitamin E und des wasserlöslichen Vitamin C, beides Antioxidantien im Serum, wurde bestimmt, um einen möglichen Einfluss der Carotinoide auf deren Serumgehalt zu untersuchen. Außerdem sollten Informationen darüber gewonnen werden, inwieweit diese zwei Vitamine an der Veränderung der TEAC beteiligt waren.

Innerhalb der Gruppen war insgesamt eine Zunahme der Vitamin E-Konzentration während beider Versuchsperioden festzustellen. Dies traf auch für die Kontrollgruppe zu. Zu keinem Zeitpunkt unterschieden sich die Werte der supplementierten Gruppen jedoch signifikant von denen der Kontrollgruppe. Dies steht in Übereinstimmung mit zahlreichen Studien, in denen bei vergleichbarer Dosierung ebenfalls kein Einfluss der Supplementierung von Carotinoiden auf den Serumgehalt von Vitamin E nachgewiesen wurde (Kim et al., 2000a; Chew et al., 2000a; Chew et al., 2000c).

Beim Vergleich der Mittelwerte der Supplementierungsphase (Tag 0 bis 84) mit dem Ausgangswert war die Zunahme der Vitamin E-Konzentration in der Kontrollgruppe mit +38% am deutlichsten. Im Gegensatz dazu stieg die TEAC in dieser Gruppe am wenigsten an. Daraus kann man schließen, dass Vitamin E nicht in großem Ausmaß zur antioxidativen Kapazität des Serums (gemessen als TEAC) beitrug. Miller et al. (1993) führten Untersuchungen an humanem Plasma durch und bestimmten, zu welchem Anteil die enthaltenen Antioxidantien an der TEAC beteiligt sind. Auch sie kamen zu dem Ergebnis, dass Vitamin E nur zu etwa 3% zur Gesamt-TEAC des Plasmas beiträgt.

Der Vitamin C-Gehalt des Serums nahm in allen Gruppen insgesamt zu. Dabei verhielten sich die Gruppen im Allgemeinen ähnlich wie die Kontrollgruppe. In Versuchsperiode I wichen wenige Gruppenmittelwerte von diesem Verlauf ab. Ein möglicher Grund dafür könnte z. B. in der unterschiedlichen Reaktion der einzelnen

Hunde auf Hitzebelastung zu finden sein, da der Versuch z. T. im Sommer durchgeführt wurde. Obwohl die Tiere stets Zugang zu Schatten und dem kühleren Innenbereich hatten und Hunde in der Lage sind, Vitamin C selbständig zu synthetisieren, wird die Serumkonzentration u. a. von diesem Faktor beeinflusst. Insgesamt kann man davon ausgehen, dass die Carotinoide Lycopin und Lutein keinen Einfluss auf die Serumkonzentration von Vitamin C ausübten.

5.2.2.3. Aspartat-Aminotransferase (AST) und Creatinkinase (CK)

Die Aspartat-Aminotransferase (AST) ist in zahlreichen Geweben und Organen nachzuweisen, sie stellt demnach kein organspezifisches Enzym dar. Hohe AST-Aktivitäten sind im Herz- und Skelettmuskel, aber auch in der Leber anzutreffen. Ein starker Anstieg (über das Dreifache des Referenzwertes) im Serum wird bei Muskel- und Lebererkrankungen beobachtet. Da das Enzym sowohl im Zytoplasma als auch in den Mitochondrien lokalisiert ist, erfolgt eine Erhöhung in erster Linie bei Zellnekrose, ist aber auch bereits bei Membranschädigung festzustellen (Kraft und Dürr, 1997).

Sowohl beim Menschen als auch beim Tier lassen sich drei Isoenzyme der Creatinkinase (CK) nachweisen. Diese sind die Muskel-CK, die Herzmuskel-CK und die Gehirn-CK. Da die Gehirn-CK jedoch nicht in das Blut übertritt, wird die CK im Serum als muskelspezifisches Enzym angesehen, was bedeutet, dass eine Erhöhung ihrer Aktivität im Serum ausschließlich bei Muskelerkrankungen oder -mitterkrankungen in der Folge von anderweitigen Grunderkrankungen anzutreffen ist. Sie eignet sich hierdurch sehr gut zur Untersuchung und Beurteilung der Muskelzellintegrität (Kraft und Dürr, 1997). Ist eine Erhöhung der CK festgestellt, kann auf eine Schädigung von Muskelzellen rückgeschlossen werden. Diese kann unter anderem durch Muskeltraumata, extreme körperliche Belastung, Myositiden oder auch Stoffwechselstörungen der Muskulatur wie beim Kreislaufschock hervorgerufen werden.

Aber auch reaktive Spezies können die Zellmembranen der Körperzellen schädigen und so zum Verlust deren struktureller Integrität führen. Da die AST und die CK Parameter zur Untersuchung und Beurteilung der Zellintegrität darstellen,

wurden sie in dieser Studie dazu verwandt, auf mögliche Schädigungen der Zellmembranen, in diesem Fall der Muskel- und Leberzellmembranen, durch reaktive Spezies bzw. auf die Verhinderung der schädlichen Vorgänge durch die Supplementierung mit den Carotinoiden Lycopin und Lutein rückzuschließen. Carotinoide sind eine ausgesprochen lipophile Stoffklasse. Diese Eigenschaft ist bei den unpolaren Carotinen noch ausgeprägter als bei den polareren Xanthophyllen. Daraus folgt ihr starker Bezug zu lipophilen Strukturen und Zellkompartimenten wie z. B. Zellmembranen. Eingelagert in die Lipiddoppelschicht können die Carotinoide hier reaktive Spezies entschärfen und damit Zellmembranen vor oxidativer Schädigung schützen.

Zunächst wurde im zeitlichen Verlauf ein Absinken und anschließend wieder ein Ansteigen der beiden Enzyme festgestellt. Beim Vergleich der niedrigsten Werte mit den jeweiligen Ausgangswerten wurde deutlich, dass diese Abnahme in den Gruppen Lutein, Lyco:Lut 2:1, Lycopin und Lyco:Lut 1:2 stärker war als in der Kontrollgruppe. Hier sanken die AST bzw. die CK um 40% bzw. 67%, 35% bzw. 58%, 27% bzw. 55% und 26% bzw. 47%, während in der Kontrollgruppe die AST lediglich um 25%, die CK um 39% abfiel.

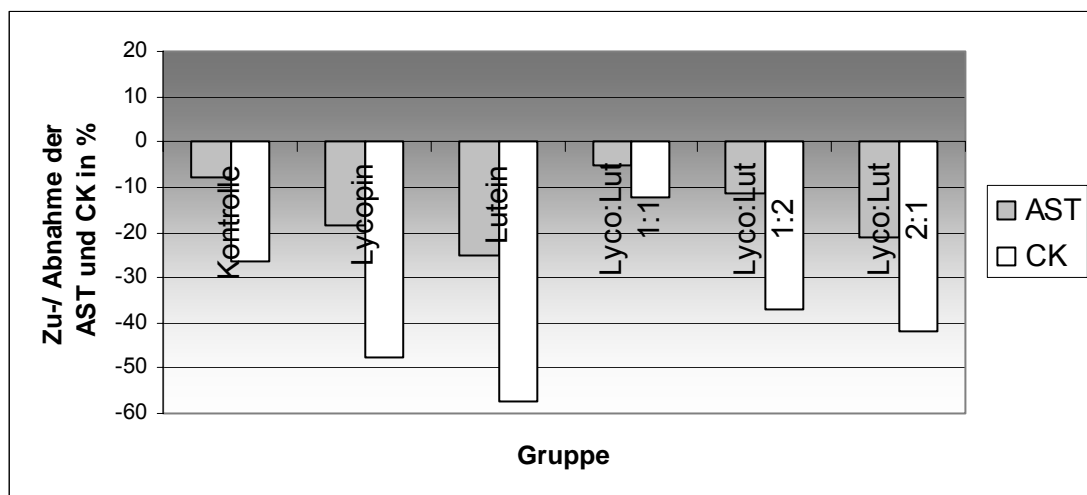


Abbildung 15: Zu- bzw. Abnahme des Mittelwertes der AST und CK der Supplementierungsphase (Tag 7 bis 84) im Vergleich zum Ausgangswert (Tag 0) in der Versuchsperiode I in %

Auch bei Betrachtung der Mittelwerte aus Tag 7 bis 84 im Vergleich zum Tag 0 ergab sich in allen Gruppen, die Carotinoide erhielten, eine stärkere Abnahme der beiden Enzyme während der Supplementierungsphase als in der Kontrollgruppe. Einzige Ausnahme bildete auch hier die Gruppe Lyco:Lut 1:1 (AST: 5%, CK: 12%), in

der die Abnahme geringer war als in der Kontrollgruppe (8% / 26%) (siehe Abbildung 15). Am prägnantesten war der Rückgang mit 25% / 57% in der Gruppe Lutein, gefolgt von der Gruppe Lyco:Lut 2:1 (21% / 42%), der Gruppe Lycopin (18% / 47%) und der Gruppe Lyco:Lut 1:2 (11% / 37%).

In Versuchsperiode II zeigte sich ein ähnliches Bild wie in Versuchsperiode I, lediglich in der Gruppe Lutein nahm die AST im Mittel der Tage 7 bis 84 im Vergleich zum Tag 0 etwas zu (siehe Abbildung 16). Die Veränderungen waren insgesamt jedoch deutlich weniger ausgeprägt. Es könnten die gleichen möglichen Ursachen zugrunde liegen wie beim Parameter TEAC (siehe 5.2.2.1), jedoch unterstützt auch hier die Tatsache, dass die mittleren Ausgangswerte aller Gruppen im zweiten Abschnitt des Versuches (21,7 bis 25,5 IU/l) deutlich unter denen der ersten (29,7 bis 35,5 IU/l) lagen, die Annahme, dass die verabreichten Carotinoide aus Versuchsperiode I noch Wirkungen zeigten, die in die zweite Versuchsperiode hinein andauerten.

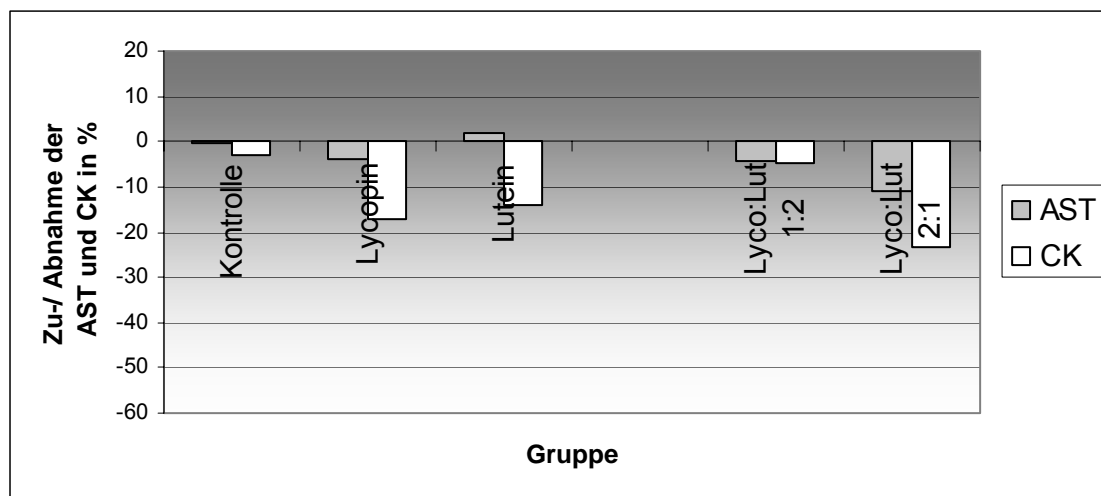


Abbildung 16: Zu- bzw. Abnahme des Mittelwertes der AST und CK der Supplementierungsphase (Tag 7 bis 84) im Vergleich zum Ausgangswert (Tag 0) in der Versuchsperiode II in %

Obwohl zu keinem Zeitpunkt signifikante Unterschiede zur Kontrollgruppe bestanden, weisen die Ergebnisse insgesamt auf eine Abnahme der Aktivität der beiden Enzyme im Serum in den mit Carotinoiden supplementierten Gruppen hin. Mit Ausnahme der Gruppe, die Lycopin und Lutein im Verhältnis 1:1 erhielt, sanken die Werte während des Supplementierungszeitraums im Vergleich zum Tag 0 stärker als in der Kontrollgruppe. Aus diesen erniedrigten Enzymaktivitäten im Serum lässt sich schließen, dass die strukturelle Integrität sowohl der Leber- als auch der

Muskelzellmembranen der Hunde besser aufrechterhalten werden konnte. Da die Belastung mit reaktiven Spezies eine mögliche Ursache der Schädigung der Zellmembranen ist, könnten die erniedrigten Enzymaktivitäten ein Indikator für den besseren Schutz der Zellen vor oxidativer Schädigung durch reaktive Spezies sein. Ähnliche Schlussfolgerungen zogen Stohrer et al. (2001) aus den Ergebnissen ihrer Studie, in der Schlittenhunde vor dem Rennen drei Monate lang mit Vitamin E supplementiert wurden. Durch Gabe dieses Antioxidans war die Aktivität des Enzyms CK nach dem Rennen geringer als bei nicht supplementierten Tieren. Dies wurde ebenfalls als Hinweis auf eine geringere oxidative Schädigung der Skelettmuskelzellen betrachtet.

Insgesamt betrachtet bestehen Hinweise auf eine eventuell etwas stärkere Wirkung von Lycopin auf die Enzymaktivität von AST und CK. In Versuchsperiode I wurde in der Gruppe Lutein der stärkste Effekt erzielt, die Gruppen Lycopin und Lyco:Lut 2:1 zeigten jedoch in beiden Versuchsperioden ebenfalls eine starke Abnahme der Enzymaktivitäten, die in Versuchsperiode II wesentlich deutlicher war als in der Gruppe Lutein. In beiden Versuchsabschnitten nahm in den Gruppen mit kombinierter Verabreichung von Lycopin und Lutein die Aktivität beider Enzyme in derjenigen Gruppe stärker ab, die mehr Lycopin erhielt (Gruppe Lyco:Lut 2:1). Möglicherweise kann dies zurückgeführt werden auf die Eigenschaft von Lycopin, als apolares Carotin annähernd senkrecht zu den Phospholipidmolekülen in der Lipiddoppelschicht zu liegen, wohingegen Lutein sich als Xanthophyll aufgrund seiner etwas höheren Polarität (seine Hydroxylgruppen gehen Wechselwirkungen mit den polaren Anteilen der Phospholipide ein) eher parallel anordnet (Krinsky, 2002). So besteht die Möglichkeit, dass Lycopin etwas besser in der Lage war, eine Art Schutzschild gegen Angriffe von reaktiven Spezies zu bilden.

5.2.2.4. Totale und Latente Eisenbindungskapazität (TEBK und LEBK)

Eisenionen können im Blut zur Entstehung von reaktiven Spezies beitragen, indem sie Fenton-Reaktionen katalysieren, aus denen u. a. hoch reaktive Hydroxyl-Radikale hervorgehen. Das vorrangige Protein, das Eisenionen im Serum bindet und somit an der Teilnahme bei der Erschaffung reaktiver Spezies hindert, ist das Transferrin. Der Gehalt des Serums an Transferrin ist in hohem Maße korreliert mit

der Totalen Eisenbindungskapazität (TEBK) des Serums. Die TEBK spiegelt demnach wider, wie viel Transferrin im Serum vorhanden ist und wie viel Eisen von diesem maximal gebunden werden kann. Das Transferrin ist im Serum jedoch meist nicht vollständig mit Eisen gesättigt. Der restliche, nicht gesättigte Anteil steht als Latente Eisenbindungskapazität (LEBK) zur Verfügung, so dass in der Regel keine katalytisch wirksamen freien Eisenionen im Serum vorkommen. Beim erwachsenen Menschen ist nur etwa ein Drittel des Transferrins gesättigt, wohingegen bei Neugeborenen die TEBK überschritten werden kann, so dass freie Eisenionen im Blut nachweisbar sind (Evans et al., 1992; Lindeman et al., 1992). Bei diesen Neugeborenen gibt es aufgrund der 100%igen Transferrinsättigung keine LEBK.

Bei Betrachtung der Ergebnisse aus Versuchsperiode I wurde ersichtlich, dass in allen Gruppen sowohl die TEBK als auch die LEBK im Vergleich zur Kontrollgruppe zunahm. Besonders ausgeprägt war diese Zunahme in den Gruppen, die beide Carotinoide in Kombination erhielten. Der Vergleich des Mittelwertes der Zeitpunkte der Supplementierungsphase (Tag 7 bis 84) im Vergleich zum Ausgangswert macht die Entwicklung der beiden Parameter deutlich (siehe Abbildung 17).

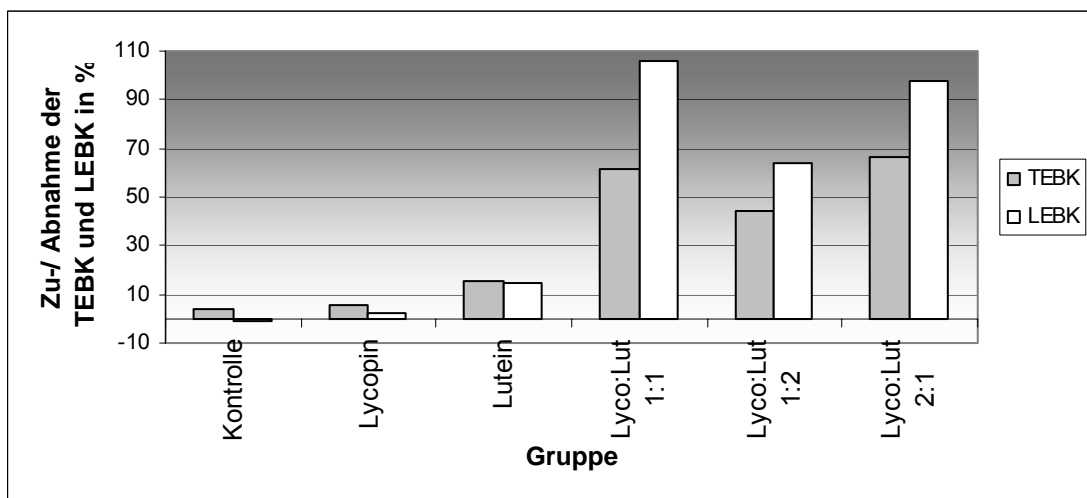


Abbildung 17: Zu- bzw. Abnahme des Mittelwertes der TEBK und LEBK der Supplementierungsphase (Tag 7 bis 84) im Vergleich zum Ausgangswert (Tag 0) in der Versuchsperiode I in %

Den stärksten Zuwachs im Mittel des Supplementierungszeitraums zeigte die TEBK bzw. die LEBK in den Gruppen Lyco:Lut 1:1 (61% / 106%) und Lyco:Lut 2:1 (66% / 98%). Einen ebenfalls deutlichen Anstieg mit 44% bzw. 64% konnte in der

Gruppe Lyco:Lut 1:2 festgestellt werden. In Versuchsperiode II tendierten die TEBK und die LEBK der meisten Gruppen, die Lycopin und Lutein in Kombination bekamen, ebenfalls zu einem Anstieg, der jedoch nicht so deutlich war.

Eine Erhöhung der TEBK bedeutet, dass das Blut in der Lage war, eine größere maximale Menge an Eisenionen zu binden – der Gehalt an Transferrin war erhöht. Wie bei der Steigerung der TEAC kann auch hier ein Einfluss auf die Genexpression die Ursache gewesen sein. Es wurde nachgewiesen, dass Carotinoide bestimmte Gene stimulieren können, die für Proteine kodieren (siehe 2.2.4). Es besteht die Möglichkeit, dass in dieser Studie Lycopin und Lutein in Kombination einen stimulierenden Effekt auf die Gene hatte, die für Transferrin kodieren. Warum diese Wirkung nur bei kombinierter Verabreichung der beiden Carotinoide auftrat, kann nur spekuliert werden. Es gibt Berichte über eine synergistische Wirkung der beiden Wirkstoffe (Stahl et al., 1998). In jener Studie wurden jedoch antioxidative Eigenschaften der beiden Carotinoide und nicht ihr Einfluss auf die Genexpression untersucht.

Aus der Zunahme der TEBK folgte auch eine Zunahme der LEBK. Die Tatsache, dass die LEBK prozentuell stärker zunahm als die TEBK lässt sich daraus erklären, dass die LEBK einen geringeren absoluten Wert hatte. Bei einer gleichen Zunahme der TEBK und der LEBK stieg die LEBK folglich prozentual stärker an. Bei Betrachtung der absoluten Werte wird deutlich, dass sich das Ausmaß des Zuwachses der TEBK und der LEBK in derselben Größenordnung bewegte.

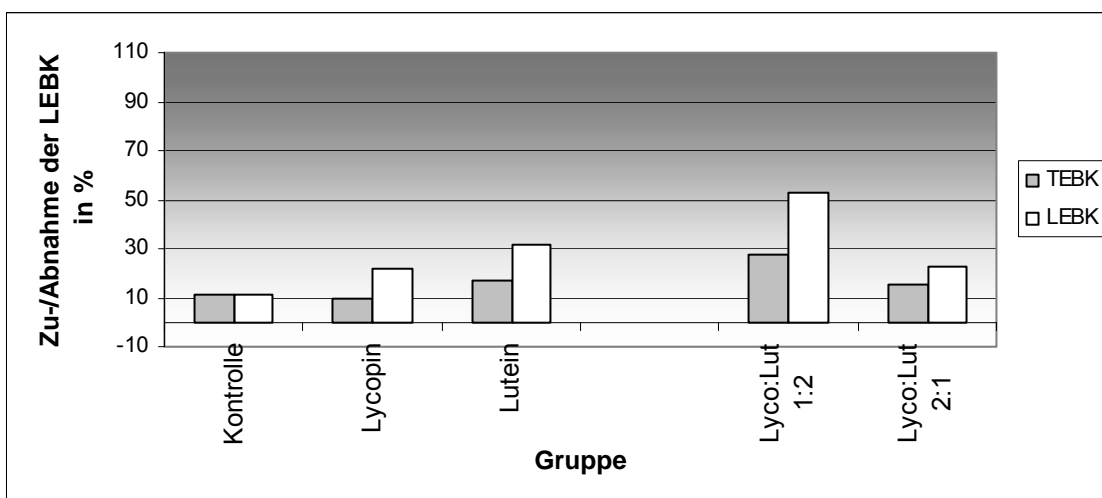


Abbildung 18: Zu- bzw. Abnahme des Mittelwertes der TEBK und LEBK der Supplementierungsphase (Tag 7 bis 84) im Vergleich zum Ausgangswert (Tag 0) in der Versuchsperiode II in %

Auch auf diese beiden Parameter zeigten die Carotinoide in Versuchsperiode II weniger stark ausgeprägte Effekte als in Versuchsperiode I. Lediglich in der Gruppe Lyco:Lut 1:2 war im Mittel der Tage 7 bis 84 im Vergleich zum Tag 0 eine prägnantere Steigerung als in der Kontrollgruppe festzustellen (siehe Abbildung 18). Als Ursache kommen hierfür die gleichen möglichen Einflüsse in Betracht wie bei den Parametern TEAC, AST und CK.

An dieser Stelle sei nochmals darauf verwiesen, dass aufgrund mangelnden Probenmaterials die TEBK und die LEBK nicht bei allen Hunden bestimmt werden konnten. Deswegen setzten sich die Gruppenmittelwerte aus einem bis zu sechs Einzelwerten zusammen, was bei der Bewertung der Ergebnisse berücksichtigt werden muss. Bei einer geringeren Anzahl von Einzelwerten, die in die gebildeten Mittelwerte eingingen, können diese Einzelwerte einen wesentlich größeren Effekt hervorrufen. Auffällig ist bei Betrachtung der Ergebnisse der TEBK und der LEBK auch, dass die Gruppe Lyco:Lut 1:1 hier die stärkste Wirkung zeigte, obwohl in dieser Gruppe bei den Parametern TEAC, AST und CK der geringste Effekt erzielt wurde. Deshalb ist die starke Zunahme der TEBK und der LEBK sehr vorsichtig zu beurteilen.

6. Zusammenfassung

Die Ergebnisse zahlreicher Studien weisen darauf hin, dass oxidative Prozesse an der Entstehung und dem Fortschreiten von Krebs und chronischen degenerativen Erkrankungen beteiligt sind. Carotinoide sind dazu befähigt, reaktive Spezies wie Singulett-Sauerstoff oder Radikale zu entschärfen und können so vor oxidativer Schädigung – und damit möglicherweise auch vor degenerativen Erkrankungen – schützen.

In der vorliegenden Arbeit wurde in einem Vorversuch zunächst die Plasmaprofilantwort der Carotinoide Lycopin und Lutein von Hunden über einen Zeitraum von 24 Stunden hinweg nach einmaliger oraler Verabreichung ermittelt. Anschließend wurde in einem Fütterungsversuch, der aus zwei zwölfwöchigen Versuchsperioden bestand, untersucht, inwieweit sie nach täglicher oraler Supplementierung mittels Gelatine kapseln einen positiven Einfluss auf den antioxidativen Status der Hunde ausüben. Hierzu erhielten 36 bzw. 30 nach Alter und Gewicht randomisierte Hunde Lycopin und Lutein einzeln oder in Kombination zusammen mit dem Futter. Die Gesamtmenge der verabreichten Carotinoide betrug stets 2 mg/kg KG, wobei eine Gruppe nur Lycopin, eine andere nur Lutein erhielt. In drei weiteren Gruppen wurden die Carotinoide in den Verhältnissen 1:1, 1:2 und 2:1 in Kombination verabreicht. Jeweils sechs Hunde dienten als Kontrollgruppe.

In jeder Versuchsperiode wurde an den Tagen 0, 7, 21, 56 und 84 gewonnenes Serum auf den antioxidativen Status hin untersucht. Hierzu wurde die Trolox Equivalent Antioxidant Capacity (TEAC) bestimmt. Zusätzliche Hinweise auf den antioxidativen Status sollten durch die Bestimmung der antioxidativen Vitamine E und C sowie der Enzyme Aspartat-Aminotransferase (AST) und Creatinkinase (CK) gewonnen werden. Eine Erhöhung dieser beiden Enzyme würde auf eine Zellschädigung, u. a. durch oxidative Prozesse, hinweisen. Da auch Eisenionen an der Entstehung von Radikalen beteiligt sein können, wurden die Totale und die Latente Eisenbindungskapazität (TEBK und LEBK) des Serums bestimmt.

Sowohl Lycopin als auch Lutein wurden nach einmaliger oraler Verabreichung von den Hunden absorbiert, wobei die Konzentration im Plasma nach 18 bzw. fünf Stunden ihr Maximum erreichte. Es wurde festgestellt, dass einige Tiere eine sehr hohe Plasmaresponse („High-Responder“), andere eine niedrige („Low-Responder“) zeigten.

In Versuchsperiode I des Hauptversuches konnte eine Erhöhung der TEAC durch die Carotinoide bewirkt werden, wobei Lutein einen marginal stärkeren Einfluss auf diesen Parameter des antioxidativen Status zu haben schien. Die Enzymaktivitäten von AST und CK konnten durch die Carotinoidgabe vermindert werden, wodurch auf ein geringeres Ausmaß an Zellschädigung geschlossen werden kann. Möglicherweise vermochte Lycopin insgesamt die Zellintegrität etwas besser zu schützen als Lutein. Die Wirkstoffe zeigten keinen Effekt auf die Vitamine E und C. Es ergaben sich Hinweise darauf, dass eine kombinierte Verabreichung der Carotinoide sowohl die TEBK als auch die LEBK erhöhen kann.

In Versuchsperiode II waren die beobachteten Effekte in ähnlicher Weise vorhanden, jedoch wesentlich weniger stark ausgeprägt. Möglicherweise waren trotz der langen Washout-Phase von elf Wochen zwischen den Versuchsperioden noch Auswirkungen aus der Versuchsperiode I vorhanden.

Insgesamt konnten positive Effekte der Carotinoide Lycopin und Lutein auf den antioxidativen Status des Hundes festgestellt werden. Deshalb könnte die Supplementierung von Hundefutter mit Lycopin und Lutein für die Gesundheit der Tiere von Interesse sein.

7. Summary

Nicole Nitschke

Influence of the carotenoids lycopene and lutein on the antioxidant status of dogs

There is consistent indication that oxidant processes take part in the etiology and progression of cancer and other chronic degenerative diseases. Carotenoids are capable to quench reactive species like singlet oxygen or radicals and hence are able to protect against oxidative damage – and possibly against degenerative diseases as well.

In the present study initially the plasma response of the two carotenoids lycopene and lutein was examined in dogs during 24 hours after a single oral dose as a pilot test. Subsequently in a feeding trial consisting of two parts of twelve weeks each, it was examined if they provide a positive effect on the antioxidant status of the dogs after daily oral doses. For this reason 36, respectively 30 dogs randomized by age and weight received lycopene and lutein singly or in combination via gelatine capsules with their food. The total amount of supplemented carotenoids was 2 mg/kg bodyweight, one group receiving solely lycopene, another solely lutein. To three additional groups the carotenoids were administered in combination in the ratios 1:1, 1:2 and 2:1. Six dogs functioned as a control group.

In each part of the feeding trial serum samples were taken on day 0, 7, 21, 56 and 84 in which the antioxidant status was examined. For this reason the trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) was measured. Additional information about the antioxidant status was meant to be obtained by the determination of the antioxidant vitamins E and C as well as the enzymes aspartate-amino-transferase (AST) and creatinekinase (CK). An increase of these two enzymes would indicate cell damage, which could have been caused by oxidative processes. As ferric ions can catalyze radical formation the total and latent iron binding capacity (TEBK and LEBK) of the serum were investigated.

Lycopene as well as lutein was absorbed by the dogs after a single oral dose, the plasma concentration peaking after 18 respectively five hours. Some animals showed a very high plasma response (“high-responders”), whereas others showed a low plasma response (“low-responders”).

In the first part of the feeding trial the carotenoids managed to increase TEAC, lutein appearing to have a marginally stronger effect. The enzyme activities could be decreased by the supplementation with the carotenoids, which indicated a reduced amount of cell damage. It seemed that lycopene was able to protect cell integrity slightly better than lutein. Dietary lycopene and lutein did not influence plasma vitamin E and C concentrations. There is indication that a combined administration of the carotenoids could elevate TEBK as well as LEBK.

In the second part of the feeding study the effects were detectable although to a much lesser extent. Possibly part I of the trial left some effects despite the long washout period of eleven weeks between the two parts of the trial.

In conclusion, due to the carotenoids lycopene and lutein positive effects on the antioxidant status could be found in dogs. For this reason supplementation of dog food with lycopene and lutein could be of interest for the health of the animals.

8. Literaturverzeichnis

ADLER, K. B., W. J. HOLDEN-STAUFFER, J. E. REPINE (1990)
Oxygen Metabolites Stimulate Release of High-Molecular-Weight Glycoconjugates by Cell and Organ Cultures of Rodent Respiratory Epithelium via an Arachidonic Acid-dependent Mechanism
Journal of Clinical Investigation 85, 75 – 85

AHLSWEDE, L., H. KONERMANN (1980)
Erfahrungen mit der oralen und parenteralen Applikation von β -Carotin beim Pferd
Der praktische Tierarzt 61, 47 – 52

ALEXANDER, M., H. NEWMARK, R. G. MILLER (1985)
Oral beta-carotene can increase the number of OKT4⁺ cells in human blood
Immunology Letters 9, 221 – 224

AMES, B. N., M. K. SHIGENAGA, T. M. HAGEN (1993)
Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging
Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 90, 7915 – 7922

ARÉCHIGA, C. F., C. R. STAPLES, L. R. MCDOWELL, P. J. HANSEN (1998a)
Effects of Timed Insemination and Supplemental β -Carotene on Reproduction and Milk Yield of Dairy Cows Under Heat Stress
Journal of Dairy Science 81, 390 – 402

ARÉCHIGA, C. F., S. VÁZQUEZ-FLORES, O. ORTÍZ, J. HERNÁNDEZ-CERÓN, A. PORRAS, L. R. MCDOWELL, P. J. HANSEN (1998b)
Effect of Injection of β -Carotene or Vitamin E and Selenium on Fertility of Lactating Dairy Cows
Theriogenology 50, 65 – 76

ASTORG, P., S. GRADELET, R. BERGÈS, M. SUSCHETET (1997)
Dietary Lycopene Decreases the Initiation of Liver Preneoplastic Foci by Diethylnitrosamine in the Rat
Nutrition and Cancer 29, 60 – 68

AUST, O, N. ALE-AGHA, L. ZHANG, H. WOLLERSEN, H. SIES, W. STAHL (2003)
Lycopene oxidation product enhances gap junctional communication
Food and Chemical Toxicology 41, 1399 – 1407

BALDACHANDRAN, B., A. V. RAO (2002)
Time-dependent uptake and antiperoxidative potential of lycopene in multilamellar liposomes
Food Research International 36, 611 – 616

BASKIN, C. R., K. W. HINCHCLIFF, R. A. DISILVESTRO, G. A. REINHART, M. G. HAYEK, B. P. CHEW, J. R. BURR, R. A. SWENSON (2000)
Effects of dietary antioxidant supplementation on oxidative damage and resistance to oxidative damage during prolonged exercise in sled dogs
American Journal of Veterinary Research 61, 886 – 891

BENDICH, A. (1992)
Safety Issues Regarding the Use of Vitamin Supplements
Annals of the New York Academy of Sciences 669, 300 – 310

BENDICH, A., S. S. SHAPIRO (1986)
Effect of β -carotene and Canthaxanthin on the Immune Responses of the Rat
Journal of Nutrition 116, 2254 – 2262

BENDICH, A. (2004)
From 1989 to 2001: What Have We Learned About the "Biological Actions of Beta-Carotene" ?
Journal of Nutrition 134, 225S – 230S

VAN DEN BERG, H. (1999)
Carotenoid Interactions
Nutrition Reviews 57, 1 – 10

BERNSTEIN, P. S., F. KHACHIK, L. S. CARVALHO, G. J. MUIR, D.-Y. ZHAO, N. B. KATZ (2001)
Identification and Quantification of Carotenoids and their Metabolites in the Tissue of the Human Eye
Experimental Eye Research 72, 215 – 223

BERTRAM, J. S. (1999)
Carotenoids and Gene Regulation
Nutrition Reviews 57, 182 – 191

BIERER, T. L., N. R. MERCHEN, J. W. ERDMANN JR. (1995)
Comparative Absorption and Transport of Five Common Carotenoids in Preruminant Calves
Journal of Nutrition 125, 1569 – 1577

BLAKELY, S. R., L. SLAUGHTER, J. ATKINS, E. V. KNIGHT (1988)
Effects of β -Carotene and Retinyl Palmitate on Corn Oil-Induced Superoxide Dismutase and Catalase in Rats
Journal of Nutrition 118, 152 – 158

BLOCK, G., B. PATTERSON, A. SUBAR (1992)
Fruit, Vegetables, and Cancer Prevention: A Review of the Epidemiological Evidence
Nutrition and Cancer 18, 1 – 29

- BLOT, W. J., J.-Y. LI, P. R. TAYLOR, W. GUO, S. DAWSAY, G.-Q. WANG, C. S. YANG, S.-F. ZHENG, M. GAIL, G.-Y. LI, Y. YU, B.-Q. LIU, J. TANGREA, Y.-H. SUN, F. LIU, J. F. FRAUMENI JR., Y.-H. ZHANG, B. LI (1993)
Nutrition Intervention Trials in Linxian, China: Supplementation With Specific Vitamin/Mineral Combinations, Cancer Incidence, and Disease-Specific Mortality in the General Population
Journal of the National Cancer Institute 85, 1483 – 1492
- BOILEAU, A. C., N. R. MERCHEN, K. WASSON, C. A. ATKINSON, J. W. ERDMAN JR. (1999)
Cis-Lycopene Is More Bioavailable Than *Trans*-Lycopene In Vitro and In Vivo in Lymph-Cannulated Ferrets
Journal of Nutrition, 129, 1176 – 1181
- BOILEAU, T. W.-M., S. K. CLINTON, J. W. ERDMAN JR. (2000)
Tissue Lycopene Concentrations and Isomer Patterns Are Affected by Androgen Status and Dietary Lycopene Concentration in Male F344 Rats
Journal of Nutrition, 130:6, 1613 – 1618
- BOILEAU, T. W.-M., A. C. BOILEAU, J. W. ERDMAN JR. (2002)
Bioavailability of *all-trans* and *cis*-Isomers of Lycopene
Experimental Biology and Medicine 227, 914 – 919
- BOREL, P., P. GROLIER, M. ARMAND, A. PARTIER, H. LAFONT, D. LAIRON, V. AZAIS-BRAESCO (1996)
Carotenoids in biological emulsions: solubility, surface-to-core distribution, and release from lipid droplets
Journal of Lipid Research 37, 250 – 261
- BROWN, E. D., S. R. BLAKELY, U. BABU, E. GRUNDEL, G. V. MITCHELL (1997)
Vegetable Concentrates Interact with Canthaxanthin to Affect Carotenoid Bioavailability and Superoxide Dismutase Activity but not Immune Response in Rats
Nutrition Research, 17:6, 989 – 998
- BRUBACHER, G. B., H. WEISER (1985)
The vitamin A activity of β -carotene
International Journal for Vitamin and Nutrition Research 55, 5 – 15
- BRUCE, W. R., M. C. ARCHER, D. E. CORPET, A. MEDLINE, S. MINKIN, D. STAMP, Y. YIN, X.-M. ZHANG (1993)
Diet, aberrant crypt foci and colorectal cancer
Mutation Research 290, 111 – 118
- BRÜGGEMANN, J., K.-H. NIESAR (1957)
Über die Beziehung der Vitamine A und E und des β -Carotins zum weiblichen Sexualzyklus des Rindes und Schweines unter besonderer Berücksichtigung der Zyklussterilität
Vitamine und Hormone 7, 10 – 25

- BUB, A., B. WATZL, L. ABRAHAMSE, H. DELINCÉE, S. ADAM, J. WEVER, H. MÜLLER, G. RECHKEMMER (2000)
Moderate Intervention with Carotenoid-Rich Vegetable Products Reduces Lipid Peroxidation in Men
Journal of Nutrition 130, 2200 – 2206
- BURRI, B. J. (1997)
Beta - Carotene and Human Health: A Review of Current Research
Nutrition Research, 17, 547-580
- BURTON, G. W., K. U. INGOLD (1984)
 β -Carotene: An Unusual Type of Lipid Antioxidant
Science 224, 569 – 573
- CASTENMILLER, J.J.M. AND C.E. WEST (1998)
Bioavailability and bioconversion of carotenoids
Annual Review of Nutrition 18, 19 – 38
- CERVENY, C., B. CHEW, N. CHA, T. WONG, J. PARK, B. WENG, M. HAYEK, G. REINHART (1998)
Lutein uptake by blood and leukocytes in the dog
The FASEB Journal 12, 857
- CHEN, Y, R. ZHENG, Z. JIA, Y. JU (1990)
Flavonoids as superoxide scavengers and antioxidants
Free Radical Biology & Medicine 9, 19 – 21
- CHEW, B. P., D. M. HOLPUCH, J. V. O`FALLON (1984)
Vitamin A and β -Carotene in Bovine and Porcine Plasma, Liver, Corpora Lutea, and Follicular Fluid
Journal of Dairy Science 67, 1316 – 1322
- CHEW, B. P., L. A. JOHNSTON (1985)
Effects of supplemental vitamin A and β -carotene on mastitis in dairy cows
Journal of Dairy Science 68 (Suppl. 1), 191
- CHEW, B. P., T. S. WONG, J. J. MICHAL, F. E. STANDAERT, L. R. HEIMAN (1991a)
Kinetic Characteristics of β -Carotene Uptake After an Injection of β -Carotene in Pigs
Journal of Animal Science 69, 4883 – 4891
- CHEW, B. P., T. S. WONG, J. J. MICHAL, F. E. STANDAERT, L. R. HEIMAN (1991b)
Subcellular Distribution of β -Carotene, Retinol, and α -Tocopherol in Porcine Lymphocytes After a Single Injection of β -Carotene
Journal of Animal Science 69, 4892 – 4897
- CHEW, B. P. (1993)
Effects of Supplemental β -Carotene and Vitamin A on Reproduction in Swine
Journal of Animal Science 71, 247 – 252

- CHEW, B. P., T. S. WONG, J. J. MICHAL (1993)
Uptake of Orally Administered β -Carotene by Blood Plasma, Leukocytes, and Lipoproteins in Calves
Journal of Animal Science 71, 730 – 739
- CHEW, B. P., M. W. WONG, T. S. WONG (1996)
Effects of Lutein from Marigold Extract on Immunity and Growth of Mammary Tumors in Mice
Anticancer Research 16, 3689 – 3694
- CHEW, B. P., J. S. PARK, M. W. WONG, T. S. WONG (1999)
A Comparison of the Anticancer Activities of Dietary β -Carotene, Canthaxanthin and Astaxanthin in Mice *in Vivo*
Anticancer Research 19, 1849 – 1854
- CHEW, B. P., J. S. PARK, T. S. WONG, H. W. KIM, B. B. C. WENG, K. M. BYRNE, M. G. HAYEK, G. A. REINHART (2000a)
Dietary β -Carotene Stimulates Cell-Mediated and Humoral Immune Response in Dogs
Journal of Nutrition 130, 1910 - 1913
- CHEW, B. P., J. S. PARK, B. C. WENG, T. S. WONG, M. G. HAYEK, G. A. REINHART (2000b)
Dietary β -Carotene Absorption by Blood Plasma and Leukocytes in Domestic Cats
Journal of Nutrition 130, 2322 - 2325
- CHEW, B. P., J. S. PARK, B. C. WENG, T. S. WONG, M. G. HAYEK, G. A. REINHART (2000c)
Dietary β -Carotene Is Taken up by Blood Plasma and Leukocytes in Dogs
Journal of Nutrition 130, 1788 – 1791
- CLARK, R. M., L. L. YAO, L. SHE, H. C. FURR (1998)
A Comparison of Lycopene and Canthaxanthin Absorption: Using the Rat to Study the Absorption of Non-Provitamin A Carotenoids
Lipids, 33, 159 - 163
- CLINTON, S. K., C. EMENHISER, S. J. SCHWARTZ, D. G. BOSTWICK, A. W. WILLIAMS, B. J. MOORE, J. W. ERDMAN JR. (1996)
cis-trans Lycopene Isomers, Carotenoids, and Retinol in the Human Prostate
Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention 5, 823 – 833
- CONN, P. F., W. SCHALCH, T. G. TRUSCOTT (1991)
The singlet oxygen and carotenoid interaction
Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology 11, 41 – 47
- COOKE, B. C., N. COMDEN (1980)
A Study of the Relationship Between Beta-Carotene and Fertility Problems in Dairy Cows
Animal Production 26, 356 – 357

- COONEY, R. V., A. A. FRANKE, P. J. HARWOOD, V. HATCH-PIGOTT, L. J. CUSTER, L. J. MORDAN (1993)
 γ -Tocopherol detoxification of nitrogen dioxide: Superiority to α -tocopherol
Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 90, 1771 – 1775
- CONN, P. F., W. SCHALCH, T. G. TRUSCOTT (1991)
The singlet oxygen and carotenoid interactions
Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology 11, 41 – 47
- CORREA, P., E. T. H. FONTHAM, J. C. BRAVO, L. E. BRAVO, B. RUIZ, G. ZARAMA, J. L. REALPE, G. T. MALCOM, D. LI, W. D. JOHNSON, R. MERA (2000)
Chemoprevention of Gastric Dysplasia: Randomized Trial of Antioxidant Supplements and Anti-*Helicobacter pylori* Therapy
Journal of the National Cancer Institute 92, 1881 – 1888
- CORRIDAN, B.M., M. O'DONOGHUE, D. A. HUGHES, P. A. MORRISSEY (2001)
Low-dose supplementation with lycopene or β -carotene does not enhance cell-mediated immunity in healthy free-living elderly humans
European Journal Clinical Nutrition 55, 627 – 635
- DAHLQUIST, S. P., B. P. CHEW (1985)
Effects of supplemental vitamin A and β -carotene on mastitis in dairy cows during the early dry period
Journal of Dairy Science 68 (Suppl. 1), 191 – 192
- DANIEL, L. R., B. P. CHEW, T. S. TANAKA, L. W. TJOELKER (1991a)
 β -Carotene and Vitamin A Effects on Bovine Phagocyte Function In Vitro During the Peripartum Period
Journal of Dairy Science 74, 124 – 131
- DANIEL, L. R., B. P. CHEW, T. S. TANAKA, L. W. TJOELKER (1991b)
In Vitro Effects of β -Carotene and Vitamin A on Peripartum Bovine Peripheral Blood Mononuclear Cell Proliferation
Journal of Dairy Science 74, 911 – 915
- DAVALIA, J. L., A. M. CAMPBELL, R. J. SAPSFORD, C. RUSZNAK, D. QUINT, P. GODARD, J. BOUSQUET, R. J. DAVIES (1993)
Effect of Nitrogen Dioxide on Synthesis of Inflammatory Cytokines Expressed by Human Bronchial Epithelial Cells *In Vitro*
American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology 9, 271 – 278
- DAVIES, K. J. A., A. T. QUINTANILHA, G. A. BROOKS, L. PACKER (1982)
Free radicals and tissue damage produced by exercise
Biochemical and Biophysical Research Communications 107, 1198 – 1205
- DENNERY, P. A., A. F. MCDONAGH, D. R. SPITZ, P. A. RODGERS, D. K. STEVENSON (1995)
Hyperbilirubinemia results in reduced oxidative injury in neonatal Gunn rats exposed to hyperoxia
Free Radical Biology & Medicine 19, 395 – 414

- DI MASCIO, P., S. KAISER, H. SIES (1989)
Lycopene as the Most Efficient Biological Carotenoid Singlet Oxygen Quencher
Archives of Biochemistry and Biophysics 274, 532 – 538
- DJURIC, Z., V. E. UHLEY, L. NAEGELI, S. LABABIDI, S. MACHA, L. K. HEILBRUN (2003)
Plasma Carotenoids, Tocopherols, and Antioxidant Capacity in a 12-Week Intervention Study to Reduce Fat and/or Energy Intakes
Nutrition 19, 244 – 249
- DORGAN, J. F., A. SOWELL, C. A. SWANSON, N. POTISCHMAN, R. MILLER, N. SCHUSSLER, H. E. STEPHENSON JR. (1998)
Relationship of serum carotenoids, retinol, α -tocopherol, and selenium with breast cancer risk: results from a prospective study in Columbia, Missouri (United States)
Cancer Causes and Control 9, 89 – 97
- DUGAS, T. R., D. W. MOREL, E. H. HARRISON (1998)
Impact of LDL carotenoid and α -tocopherol content on LDL oxidation by endothelial cells in culture
Journal of Lipid Research 39, 999 – 1007
- DUGAS, T. R., D. W. MOREL, E. H. HARRISON (1999)
Dietary supplementation with β -carotene, but not with lycopene, inhibits endothelial cell-mediated oxidation of low-density lipoprotein
Free Radical Biology & Medicine 26, 1238 – 1244
- DWYER, J. H., M. NAVAB, K. M. DWYER, K. HASSAN, P. SUN, A. SHIRCORE, S. HAMA-LEVY, G. HOUGH, X. WANG, T. DRAKE, C. N. BAIREY MERZ, A. M. FOGELMAN (2001)
Oxygenated Carotenoid Lutein and Progression of Early Atherosclerosis, The Los Angeles Atherosclerosis Study
Circulation 103, 2922 – 2927
- DWYER, J. H., M. J. PAUL-LABRADOR, J. FAN, A. M. SHIRCORE, C. N. BAIREY MERZ, K. M. DWYER (2004)
Progression of Carotid Intima-Media Thickness and Plasma Antioxidants: The Los Angeles Atherosclerosis Study
Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology 24, 313 – 319
- EDGE, R., D. J. MCGARVEY, T. G. TRUSCOTT (1997)
The carotenoids as anti-oxidants- a review
Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology 41, 189 – 200
- VAN EENWYK, J., F. G. DAVIS, P. E. BOWEN (1991)
Dietary and serum carotenoids and cervical intraepithelial neoplasia
International Journal of Cancer 48, 34 – 38
- EITZER, P., H. J. RAPP (1985)
Zur oralen Anwendung von synthetischem β -Carotin bei Zuchtstuten
Der praktische Tierarzt 66, 123 - 128

- ELSAYED, N. M. (2001)
Antioxidant Mobilization in Response to Oxidative Stress: A Dynamic Environmental-Nutritional Interaction
Nutrition 17, 828 – 834
- ERDMAN, J. W. JR., T. L. BIERER, E. T. GUGGER (1993)
Absorption and Transport of Carotenoids
Annals of the New York Academy of Sciences 691, 76 – 85
- EVANS, P. J., R. EVANS, I. Z. KOVAR, A. F. HOLTON, B. HALLIWELL (1992)
Bleomycin-detectable iron in the plasma of premature and full-term neonates
FEBS Letters 303, 210 – 212
- EVANS, R. W., B. J. SHATEN, B. W. DAY, L. H. KULLER (1998)
Prospective Association between Lipid Soluble Antioxidants and Coronary Heart Disease in Men – The Multiple Risk Factor Intervention Trial
American Journal of Epidemiology 147, 180 – 186
- EVERETT, S. A., M. F. DENNIS, K. B. PATEL, S. MADDIX, S. C. KUNDU, R. L. WILLSON (1996)
Scavenging of Nitrogen Dioxide, Thiyl and Sulfonyl Free Radicals by the Nutritional antioxidant β -Carotene
Journal of Biological Chemistry 271, 3988 – 3994
- FARMILO, A., F. WILKINSON (1973)
On the mechanism of quenching of singlet oxygen in solution
Photochemistry and Photobiology 18, 447 – 450
- FELDMAN, C., R. ANDERSON, K. KANTHAKUMAR, A. VARGAS, P. J. COLE, R. WILSON (1994)
Oxidant-mediated ciliary dysfunction in human respiratory epithelium
Free Radical Biology & Medicine 17, 1 – 10
- FOOTE, C. S., R. W. DENNY (1968)
Chemistry of Singlet Oxygen. VII. Quenching by β -Carotene
Journal of the American Chemical Society 90, 6233 – 6235
- FREI, B., M. C. KIM, B. N. AMES (1990)
Ubiquinol-10 is an effective lipid-soluble antioxidant at physiological concentrations
Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 87, 4879 – 4883
- FULLER, C. J., H. FAULKNER, A. BENDICH, R. S. PARKER, D. A. ROE (1992)
Effect of β -carotene supplementation on photosuppression of delayed-type hypersensitivity in normal young men
American Journal of Clinical Nutrition 56, 684 – 690
- GIOVANNUCCI, E., A. ASCHERIO, E. B. RIMM, M. J. STAMPFER, G. A. COLDITZ, W. C. WILLETT (1995)
Intake of Carotenoids and Retinol in Relation to Risk of Prostate Cancer
Journal of the National Cancer Institute 87, 1767 – 1776

- GIOVANNUCCI, E., E. B. RIMM, Y. LIU, M. J. STAMPFER, W. C. WILLETT (2002)
A Prospective Study of Tomato Products, Lycopene, and Prostate Cancer Risk
Journal of the National Cancer Institute 94, 391 – 398
- GOODMAN, D. S., R. BLOMSTRAND, B. WERNER, H. S. HUANG, T. SHIRATORI (1966)
The Intestinal Absorption and Metabolism of Vitamin A and β -Carotene in Man
Journal of Clinical Investigation 45, 1615 – 1623
- GOODMAN, G. E., S. SCHAFFER, G. S. OMENN, C. CHEN, I. KING (2003)
The Association between Lung and Prostate Cancer Risk, and Serum Micronutrients: Results and Lessons Learned from β -Carotene and Retinol Efficacy Trial
Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention 12, 518 – 526
- GRADELET, S., P. ASTORG, J. LECLERC, J. CHEVALIER, M.-F. VERNEVAUT, M.-H. SIESS (1996)
Effects of canthaxanthin, astaxanthin, lycopene and lutein on liver xenobiotic-metabolizing enzymes in the rat
Xenobiotica 26, 49 – 63
- GRADELET, S., A.-M. LE BON, R. BERGÈS, M. SUSCHETET, P. ASTORG (1998)
Dietary carotenoids inhibit aflatoxin B₁-induced liver preneoplastic foci and DNA damage in the rat: Role of the modulation of aflatoxin B₁ metabolism
Carcinogenesis 19, 403 – 411
- GREEN, H. N., E. MELLANBY (1930)
Carotene and Vitamin A: The Anti-Infective Action of Carotene
British Journal of Experimental Pathology 11, 81 – 89
- GRIEVINK, L., F. G. DE WAART, E. G. SCHOUTEN, F. J. KOK (2000)
Serum Carotenoids, α -Tocopherol, and Lung Function among Dutch Elderly
American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine 161, 790 – 795
- GRONOWSKA-SENGER, A., G. WOLF (1970)
Effect of Dietary Proteins on the Enzyme from Rat and Human Intestine Which Converts β -Carotene to Retinal
Journal of Nutrition 100, 300 – 308
- GÜRBAY, A., B. GONTHIER, D. DAVELOOSE, A. FAVIER, F. HINCAL (2001)
Microsomal metabolism of ciprofloxacin generates free radicals
Free Radical Biology & Medicine 30, 1118 – 1121
- HALLIWELL, B. (1996)
Oxidative stress, nutrition and health
Free Radical Research 25, 57 – 74
- HAMILTON, M. L., H. VAN REMMEN, J. A. DRAKE, H. YANG, Z. M. GUO, K. KEWITT, C. A. WALTER, A. RICHARDSON (2001)
Does oxidative damage to DNA increase with age?
Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 98, 10469 – 10474

- HANDELMANN, G. J. (2001)
The evolving Role of Carotenoids in Human Biochemistry
Nutrition 17, 818 - 822
- HAQ, A.-U., C. A. BAILEY, A. CHINNAH (1996)
Effect of β -Carotene, Canthaxanthin, Lutein, and Vitamin E on Neonatal Immunity of Chicks When Supplemented in the Broiler Breeder Diets
Poultry Science 75:9, 1092 - 1097
- HARMAN, D. (1956)
Aging. A theory based on free radical and radiation chemistry
Journal of Gerontology 11, 298 – 300
- HELLWEG, P. (2005)
Dietätische Beeinflussung des Immunsystems bei Hunden
Diss. med. vet., Wien
- HELZLSOUER, K. J., G. W. COMSTOCK, J. S. MORRIS (1989)
Selenium, Lycopene, α -Tocopherol, β -Carotene, Retinol, and Subsequent Bladder Cancer
Cancer Research 49, 6144 – 6148
- HENDRY, G. A. F., J. D. HOUGHTON, S. B. BROWN (1987)
The degradation of chlorophyll – a biological enigma
The New Phytologist 107, 255 – 302
- HERRAIZ, L. A., W. C. HSIEH, R. S. PARKER, R. S. PARKER, J. E. SWANSON, A. BENDICH, D. A. ROE (1998)
Effect of UV Exposure and β -Carotene Supplementation on Delayed-Type Hypersensitivity Response in Healthy Older Men
Journal of the American College of Nutrition 17, 617 – 624
- HIRSCHBERG, G. (2001)
Carotenoid biosynthesis in flowering plants
Current Opinion in Plant Biology 4, 210 – 218
- HOLDON, J. M., A. L. ELDRIDGE, G. R. BEECHER, I. M. BUZZARD, S. BHAGWAT, C. S. DAVIS, L. W. DOUGLASS, S. GEBHARDT, D. HAYTOWITZ, S. SCHAKEL (1999)
Carotenoid Content of U. S. Foods: An Update of the Database
Journal of Food Composition and Analysis 12, 169 – 196
- HU, G., P. A. CASSANO (2000)
Antioxidant Nutrients and Pulmonary Function: The Third National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES III)
American Journal of Epidemiology 151, 975 – 981
- HUANG, H. S., D. S. GOODMAN (1965)
Vitamin A and Carotenoids. I: Intestinal absorption and metabolism of ^{14}C -labeled vitamin A alcohol and β -carotene in the rat
The Journal of Biological Chemistry 240, 2839 – 2844

- HUGHES, D. A., A. J. A. WRIGHT, P. M. FINGLAS, A. C. J. PEERLESS, A. L. BAILEY, S. B. ASTLEY, A. C. PINDER, S. SOUTHON (1997)
The effect of β -carotene supplementation on the immune function function of blood monocytes from healthy male nonsmokers
Journal of Laboratory and Clinical Medicine 129, 309 – 317
- ISHII, T., T. MATSUSE, S. TERAMOTO, H. MATSUI, M. MIYAO, T. HOSOI, H. TAKAHASHI, Y. FUKUCHI, Y. OUCHI (1999)
Glutathione S-transferase P1 (GSTP1) polymorphism in patients with chronic obstructive pulmonary disease
Thorax 54, 693 – 696
- JAIN, C. K., S. AGARWAL, A. V. RAO (1999)
The Effect of Dietary Lycopene on Bioavailability, Tissue Distribution, In Vivo Antioxidant Properties and Colonic Preneoplasia in Rats
Nutrition Research, 19, 1383 – 1391
- JAYARAJAN, P., V. REDDY, M. MOHANRAM (1980)
Effect of dietary fat on absorption of β -carotene from green leafy vegetables in children
Indian Journal of Medical Research 71, 53 – 56
- JENKINS, R. R. (1988)
Free Radical Chemistry. Relationship to Exercise
Sports Medicine 5; 156 – 170
- JEWELL, C., N. M. O'BRIEN (1999)
Effect of dietary supplementation with carotenoids on xenobiotic metabolizing enzymes in the liver, lung, kidney and small intestine of the rat
British Journal of Nutrition 81, 235 – 242
- JYONOUCHI, H., S. SUN, M. MIZOKAMI, M. D. GROSS (1996)
Effects of Various Carotenoids on Cloned, Effector-Stage T-Helper Cell Activity
Nutrition and Cancer, 26:3, 313 – 324
- JYONOUCHI, H., S. SUN, Y. TOMITA, M. D. GROSS (1995)
Astaxanthin, a Carotenoid without Vitamin A Activity, Augments Antibody Responses in Cultures Including T-helper Cell Clones and Suboptimal Doses of Antigen
Journal of Nutrition 125:10, 2483 - 2492
- JYONOUCHI, H., L. ZHANG, M. GROSS, Y. TOMITA (1994)
Immunomodulating Actions of Carotenoids: Enhancement of *In Vivo* and *In Vitro* Antibody Production to T-Dependent Antigens
Nutrition and Cancer 21, 47 – 58
- KAGAN, V. E., E. A. SERBINOVA, G. M. KOYNOVA, S. A. KITANOVA, V. A. TYURIN, T. S. STOYTCHEV, P. J. QUINN, L. PACKER (1990)
Antioxidant action of ubiquinol homologues with different isoprenoid chain length in biomembranes
Free Radical Biology & Medicine 9, 117 – 126

- KIM, H. (1995)
Carotenoids Protect Cultured Rat Hepatocytes from Injury Caused by Carbon Tetrachloride
International Journal of Biochemistry and Cell Biology 27, 1303 – 1309
- KIM, H. W., B. P. CHEW, T. S. WONG, J. S. PARK, B. B. C. WENG, K. M. BYRNE, M. G. HAYEK, G. A. REINHART (2000a)
Dietary lutein stimulates immune response in the canine
Veterinary Immunology and Immunopathology, 74, 315 – 327
- KIM, H. W., B. P. CHEW, T. S. WONG, J. S. PARK, B. B. C. WENG, K. M. BYRNE, M. G. HAYEK, G. A. REINHART (2000b)
Modulation of humoral and cell-mediated immune responses by dietary lutein in cats
Veterinary Immunology and Immunopathology 73, 331 – 341
- KLIPSTEIN-GROBUSCH, K., J. M. GELEIJNSE, J. H. DEN BREEIJEN, H. BOEING, A. HOFMAN, D. E. GROBBEE, J. C. M. WITTEMAN (1999)
Dietary antioxidants and risk for myocardial infarction in the elderly: the Rotterdam Study
American Journal of Clinical Nutrition 69, 261 – 266
- KOHLMEIER, L., M. KOHLMEIER (1995)
Adipose Tissue as a Medium for Epidemiologic Exposure Assessment
Environmental Health Perspectives 103 (Suppl. 3), 99 – 106
- KOHLMEIER, L., J. D. KARK, E. GOMEZ-GRACIA, B. C. MARTIN, S. E. STECK, A. F. M. KARDINAAL, J. RINGSTAD, M. THAMM, V. MASAIEV, R. RIEMERSMA, J. M. MARTIN-MORENO, J. K. HUTTUNEN, F. J. KOK (1997)
Lycopene and Myocardial Infarction Risk in the EURAMIC Study
American Journal of Epidemiology 146, 618 – 626
- KOOY, N. W., J. A. ROYALL, Y. Z. YE, D. R. KELLY, J. S. BECKMAN (1995)
Evidence for *In Vivo* Peroxynitrite Production in Human Acute Lung Injury
American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine 151, 1250 – 1254
- KOPPENOL, W. H., J. J. MORENO, W. A. PRYOR, H. ISCHIROPOULOS, J. S. BECKMAN (1992)
Peroxynitrite, a Cloaked Oxidant Formed by Nitric Oxide and Superoxide
Chemical Research in Toxicology 5, 834 – 842
- KORYTKO, P. J., K. A. RODVOLD, J. A. CROWELL, M. STACEWICZ-SAPUNTZAKIS, V. DIWADKAR-NAVSARIWALA, P. E. BOWEN, W. SCHALCH, B. S. LEVINE (2003)
Pharmacokinetics and Tissue Distribution of Orally Administered Lycopene in Male Dogs
Journal of Nutrition 133, 2788 – 2792
- KRAFT, W., U. M. DÜRR (1997)
Klinische Labordiagnostik in der Tiermedizin
4. Auflage, Schattauer Verlag, Stuttgart

- KRINSKY, N. I., M. M. MATHEWS-ROTH, S. WELANKIWAR, P. K. SEHGAL, N. C. G. LAUSEN, M. RUSSETT (1990)
The Metabolism of [¹⁴C]β-Carotene and the Presence of Other Carotenoids in Rats and Monkeys
Journal of Nutrition 120, 81 – 87
- KRINSKY, N. I. (2002)
Possible Biologic Mechanisms for a Protective Role of Xanthophylls
Journal of Nutrition 132, 540S – 542S
- LEAL, M., E. GONZÁLEZ DE MEJÍA, F. RUÍZ, A. SHIMADA (1998)
Effects of Carotenoids on Cytotoxicity of T-2 Toxin on Chicken Hepatocytes *In Vitro*
Toxicology in Vitro 12, 133 – 139
- LEE, I.-M., N. R. COOK, J. E. MANSON, J. E. BURING, C. H. HENNEKENS (1999)
β-Carotene Supplementation and Incidence of Cancer and Cardiovascular Disease: The Women's Health Study
Journal of the National Cancer Institute 91, 2102 – 2106
- LEE, C. M, A. C. BOILEAU, T. W. M. BOILEAU, A. W. WILLIAMS, K. S. SWANSON, K. A. HEINTZ, J. W. ERDMAN JR. (1999)
Review of Animal Models in Carotenoid Research
Journal of Nutrition 129, 2271 – 2277
- LEE, S. H., D. B. MIN (1990)
Effects, Quenching Mechanisms, and Kinetics of Carotenoids in Chlorophyll-Sensitized Photooxidation of Soybean Oil
Journal of Agricultural and Food Chemistry 38, 1630 – 1634
- LIEBLER, D. C. (1993)
Antioxidant Reactions of Carotenoids
Annals of the New York Academy of Sciences 691, 20 – 31
- LINDEMAN, J. H., E. HOUDKAMP, E. G. LENTJES, B. J. POORTHUIS, H. M. BERGER (1992)
Limited protection against iron-induced lipid peroxidation by cord blood plasma
Free Radical Research Communications 16, 285 – 294
- LIVNY, O., I. KAPLAN, R. REIFEN, S. POLAK-CHARCON, Z. MADAR, B. SCHWARTZ (2002)
Lycopene Inhibits Proliferation and Enhances Gap-Junction Communication of KB-1 Human Oral Tumor Cells
Journal of Nutrition 132, 3754 – 3759
- LOEWENSTEIN, W. R. (1979)
Junctional intercellular communication and the control of growth
Biochimica et Biophysica Acta 560, 1 – 65

- LOTTHAMMER, K.-H., L. AHLWEDE, H. MEYER (1976)
Untersuchungen über eine spezifische, Vitamin-A-unabhängige Wirkung des β -Carotins auf die Fertilität des Rindes. 2. Mitteilung: Weitere klinische Befunde und Befruchtungsergebnisse (Versuch III)
Deutsche tierärztliche Wochenschrift 83, 353 – 358
- LOWE, G. M., K. VLISMAS, A. J. YOUNG (2003)
Carotenoids as prooxidants?
Molecular Aspects of Medicine 24, 363 – 369
- MACNEE, W., I. RAHMAN (1999)
Oxidants and Antioxidants as Therapeutic Targets in Chronic Obstructive Pulmonary Disease
American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine 160, S58 – S65
- MCGRAW, K. J., M. D. BEEBEE, G. E. HILL, R. S. PARKER (2003)
Lutein-based plumage coloration in songbirds is a consequence of selective pigment incorporation into feathers
Comparative Biochemistry and Physiology Part B 135, 689 – 696
- MÄNNISTÖ, S., S. A. SMITH-WARNER, D. SPIEGELMAN, D. ALBANES, K. ANDERSON, P. A. VAN DEN BRANDT, J. R. CERHAN, G. COLDITZ, D. FRESKANICH, J. L. FREUDENHEIM, E. GIOVANNUCCI, R. A. GOLDBOHM, S. GRAHAM, A. B. MILLER, T. E. ROHAN, J. VIRTAMO, W. C. WILLETT, D. J. HUNTER (2004)
Dietary Carotenoids and Risk of Lung Cancer in a Pooled Analysis of Seven Cohort Studies
Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention 13, 40 – 48
- MAISELS, M. J. (1988)
Neonatal jaundice
Seminars in Liver Disease 8, 148 – 162
- MARTIN, H.-D., C. JÄGER, C. RUCK, M. SCHMIDT (1999)
Anti- and Prooxidant Properties of Carotenoids
Journal für Praktische Chemie 342, 302 – 308
- MATTHEWS-ROTH, M. M., S. WELANKIWAR, P. K. SEHGAL, N. C. G. LAUSEN, M. RUSSETT, N. I. KRINKSY (1990)
Distribution of [^{14}C]Canthaxanthin and [^{14}C]Lycopene in Rats and Monkeys
Journal of Nutrition 120, 1205 – 1213
- MATILE, P. (2000)
Biochemistry of Indian summer: physiology of autumnal leaf coloration
Experimental Gerontology 35, 145 – 158

MAYNE, S. T., B. CARTMEL, M. BAUM, G. SHOR-POSNER, B. G. FALLON, K. BRISKIN, J. BEAN, T. ZHENG, D. COOPER, C. FRIEDMAN, W. J. GOODWIN JR. (2001)

Randomized Trial of Supplemental β -Carotene to Prevent Second Head and Neck Cancer

Cancer Research 61, 1457 – 1463

MAYNE, S. T. (2003)

Antioxidant Nutrients and Chronic Disease: Use of Biomarkers of Exposure and Oxidative Stress Status in Epidemiologic Research

Journal of Nutrition 133, 933S – 940S

MEYER, H., L. AHLWEDE, K. H. LOTTHAMMER (1975)

Untersuchungen über eine spezifische, Vitamin-A-unabhängige Wirkung des β -Carotins auf die Fertilität des Rindes. 1. Mitteilung: Versuchsanstellung, Körperentwicklung und Eierstocksfunktion

Deutsche tierärztliche Wochenschrift 82, 444 – 449

MILLER, N. J., C. RICE-EVANS, M. J. DAVIES, V. GOPINATHAN, A. MILNER (1993)

A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates

Clinical Science, 84, 407 – 412

MILLER, N. J., J. SAMPSON, L. P. CANDEIAS, P. M. BRAMLEY, C. A. RICE-EVANS (1996)

Antioxidant activities of carotenes and xanthophylls

FEBS Letters 384, 240 – 242

MOORE, A. C., E. T. GUGGER, J. W. ERDMAN JR. (1996)

Brush Border Membrane Vesicles from Rats and Gerbils Can Be Utilized to Evaluate the Intestinal Uptake of All-*trans* and 9-*cis* β -carotene

Journal of Nutrition 126, 2904 – 2912

MURATA, T., H. TAMAI, T. MORINOBU, M. MANAGO, H. TAKENAKA, K. HAYASHI, M. MINO (1994)

Effect of long-term administration of β -carotene on lymphocyte subsets in humans

American Journal of Clinical Nutrition 60, 597 – 602

MURTAUGH, M. A., K.-N. MA, J. BENSON, K. CURTIN, B. CAAN, M. L. SLATTERY (2003)

Antioxidants, Carotenoids, and Risk of Rectal Cancer

American Journal of Epidemiology 159, 32 – 41

NAVAB, M., J. A. BERLINER, A. D. WATSON, S. Y. HAMA, M. C. TERRITO, A. J. LUSIS, D. M. SHIH, B. J. VAN LENTEN, J. S. FRANK, L. L. DEMER, P. A. EDWARDS, A. M. FOGELMAN (1996)

The Yin and Yang of Oxidation in the Development of the Fatty Streak

Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology 16, 831 – 842

- NEUMAN, I., H. NAHUM, A. BEN-AMOTZ (2000)
Reduction of exercise-induced asthma oxidative stress by lycopene, a natural antioxidant
Allergy 55, 1184 – 1189
- NOVOTNY, J. A., S. R. DUEKER, L. A. ZECH, A. J. CLIFFORD (1995)
Compartmental analysis of the dynamics of β -carotene metabolism in an adult volunteer
Journal of Lipid Research 36, 1825 – 1838
- NOWAK, D., M. KASIELSKI, A. ANTCZAK, T. PIETRAS, P. BIALASIEWICZ (1999)
Increased content of thiobarbituric acid-reactive substances and hydrogen peroxide in the expired breath condensate of patients with stable chronic obstructive pulmonary disease: no significant effect of cigarette smoking
Respiratory Medicine 93, 389 – 396
- OKAI, Y., K. HIGASHI-OKAI (1996)
Possible immunomodulating activities of carotenoids in *in vitro* cell culture experiments
International Journal of Immunopharmacology 18, 753 – 758
- OLIVER, C. N., B.-W. AHN, E. J. MOERMAN, S. GOLDSTEIN, E. R. STADTMAN (1987)
Age-related Changes in Oxidized Proteins
The Journal of Biological Chemistry 262, 5488 – 5491
- OMENN, G. S., G. E. GOODMAN, M. D. THORNQUIST, J. BALMES, M. R. CULLEN, A. GLASS, J. P. KEOGH, F. L. MEYSKENS, B. VALANIS, J. H. WILLIAMS JR., S. BARNHART, S. HAMMAR (1996)
Effects of a Combination of Beta Carotene and Vitamin A on Lung Cancer and Cardiovascular Disease
The New England Journal of Medicine 334, 1150 – 1155
- PALOZZA, P., G. CALVIELLO, S. SERINI, P. MOSCATO, G. M. BARTOLI (1998)
Supplementation with Canthaxanthin Affects Plasma and Tissue Distribution of α - and γ -Tocopherols in Mice
Journal of Nutrition 128, 1989 – 1994
- PALOZZA, P., S. SERINI, N. MAGGIANO, M. ANGELINI, A. BONINSEGNA, F. DI NICUOLO, F. O. RANELLETTI, G. CALVIELLO (2002)
Induction of cell cycle arrest and apoptosis in human colon adenocarcinoma cell lines by β -carotene through down-regulation of cyclin A and Bcl-2 family proteins
Carcinogenesis 23, 11 – 18
- PAREDI, P., S. A. KHARITONOV, D. LEAK, S. WARD, D. CRAMER, P. J. BARNES (2000)
Exhaled Ethane, a Marker of Lipid Peroxidation, Is Elevated in Chronic Obstructive Pulmonary Disease
American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine 162, 369 – 373

- PARK, J. S., B. P. CHEW, T. S. WONG (1998)
Dietary Lutein from Marigold Extract Inhibits Mammary Tumor Development in BALB/c Mice
Journal of Nutrition 128, 1650 – 1656
- PARK, J. S., B. P. CHEW, T. S. WONG (1998)
Dietary Lutein Absorption from Marigold Extract is Rapid in BALB/c Mice
Journal of Nutrition 128, 1802 – 1806
- PEARL, R. (1928)
The Rate of Living
University of London Press, London, U. K.
- PELTIER, M. M., M. R. PELTIER, D. C. SHARP, E. A. OTT (1997)
Effect of β -carotene administration on reproductive function of horse and pony mares
Theriogenology 48, 893 - 906
- POLLACK, J., J. M. CAMPBELL, S. M. POTTER, J. W. ERDMAN JR. (1994)
Mongolian Gerbils (*Meriones unguiculatus*) Absorb β -Carotene Intact from a Test Meal
Journal of Nutrition 124, 869 – 873
- VAN POPPEL, G., R. A. GOLDBOHM (1995)
Epidemiologic evidence for β -carotene and cancer prevention
American Journal of Clinical Nutrition 62 (Suppl.), 1393S – 1402S
- PRATICÒ, D., S. BASILI, M. VIERI, C. CORDOVA, F. VIOLI, G. A. FITZGERALD (1998)
Chronic Obstructive Pulmonary Disease Is Associated with an Increase in Urinary Levels of Isoprostane $F_{2\alpha}$ -III, an Index of Oxidant Stress
American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine 158, 1709 – 1714
- PRYOR, W. A., K. STONE (1993)
Oxidants in Cigarette Smoke: Radicals, Hydrogen Peroxide, Peroxynitrate, and Peroxynitrite
Annals of the New York Academy of Sciences 686, 12 – 28
- RAHMAN, I., A. A. VAN SCHADEWIJK, A. J. CROWTHER, P. S., HIEMSTRA, J. STOLK, W. MACNEE, W. I. DE BOER (2002)
4-Hydroxy-2-Nonenal, a Specific Lipid Peroxidation product, Is Elevated in Lungs of Patients with Chronic Obstructive Pulmonary Disease
American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine 166, 490 – 495
- RAILA, J., F. J. SCHWEIGERT (2002)
Physiologische Besonderheiten im Vitamin-A-Stoffwechsel von Karnivoren
Tierärztliche Praxis 30 (K), 1 – 7
- RAO, A. V., S. AGARWAL (1999)
Role of Lycopene as Antioxidant Carotenoid in the Prevention of Chronic Diseases: A Review
Nutrition Research, 19: 2, 305 - 323

RAO, A. V., H. SHEN (2002)

Effect of low dose lycopene intake on lycopene bioavailability and oxidative stress
Nutrition Research 22, 1125 – 1131

RAUSCHER, R., R. EDENHARDER, K. L. PLATT (1998)

In vitro antimutagenic and in vivo anticlastogenic effects of carotenoids and solvent extracts from fruits and vegetables rich in carotenoids
Mutation Research 413, 129 – 142

RIBAYA-MERCADO, J. D., S. C. HOLMGREN, J. G. FOX, R. M. RUSSELL (1989)

Dietary β -Carotene Absorption and Metabolism in Ferrets and Rats
Journal of Nutrition 119, 665 – 668

RIBOLI, E., T. NORAT (2003)

Epidemiological evidence of the protective effect of fruit and vegetables on cancer risk

American Journal of Clinical Nutrition 78 (Suppl.), 559S – 569S

ROELS, O. A., M. TROUT, R. DUJAQUIER (1958)

Carotene balances on boys in Ruanda where vitamin A deficiency is prevalent
Journal of Nutrition 65, 115 – 127

ROMANCHIK, J. E., D. W. MOREL, E. H. HARRISON (1995)

Distributions of Carotenoids and α -Tocopherol among Lipoproteins Do Not Change When Human Plasma Is Incubated In Vitro
Journal of Nutrition 125, 2610 – 2617

RUSZNAK, C., P. R. MILLS, J. L. DEVALIA, R. J. SAPSFORD, R. J. DAVIES, S. LOZEWICZ (2000)

Effect of Cigarette Smoke on the Permeability and IL-1 β and sICAM-1 Release from Cultured Human Bronchial Epithelial Cells of Never-Smokers, Smokers, and Patients with Chronic Obstructive Pulmonary Disease
American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology 23, 530 – 536

SANDMAN, G. (2001)

Carotenoid Biosynthesis and Biotechnological Application
Archives of Biochemistry and Biophysics 385, 4 – 12

SANTOS, M. S., L. S. LEKA, J. D. RIBAYA-MERCADO, R. M. RUSSELL, M. MEYDANI, C. H. HENNEKENS, J. M. GAZIANO, S. M. MEYDANI (1997)

Short- and long-term beta-carotene supplementation do not influence T cell-mediated immunity in healthy elderly persons

American Journal of Clinical Nutrition 66, 917 – 924

SCHAMS, D., B. HOFFMANN, K.-H. LOTTHAMMER, L. AHLWEDE (1977)

Untersuchungen über eine spezifische, Vitamin-A-unabhängige Wirkung des β -Carotins auf die Fertilität des Rindes. 4. Mitteilung: Auswirkungen auf hormonale Parameter während des Zyklus

Deutsche tierärztliche Wochenschrift 84, 307 – 310

- SCHOEFS, B. (2002)
Chlorophyll and carotenoid analysis in food products. Properties of the pigments and methods of analysis
Trends in Food Science & Technology 13, 361 - 371
- SCHÜEP, W., J. P. VUILLEUMIER, D. GYSEL, D. HESS (1984)
Determination of ascorbic acid in body fluids, tissues and feedstuffs
In: Proceedings of workshop on ascorbic acid in domestic animals
I. Wegger, F. J. Tagwerker, J. Moustgaard (Eds.)
The Royal Danish Agricultural Society, Copenhagen, 50 – 55
- SCHÜNEMANN, H. J., B. J. B. GRANT, J. L. FREUDENHEIM, P. MUTI, R. W. BROWNE, J. A. DRAKE, R. A. KLOCKE, M. TREVISAN (2001)
The Relation of Serum Levels of Antioxidant Vitamins C and E, Retinol and Carotenoids with Pulmonary Function in the General Population
American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine 163, 1246 – 1255
- SCHULTZ, G., G. HORSTMANN, C. ANWANDTER, E. GRUNERT (1974)
 β -Carotin- und Progesterongehalt der Corpora lutea des Rindes nach Weide- und Stallfütterung
Zeitschrift für Tierphysiologie, Tierernährung und Futtermittelkunde 33, 214
- SCHWARTZ, J., D. SUDA, G. LIGHT (1986)
Beta carotene is associated with the regression of hamster buccal pouch carcinoma and the induction of tumor necrosis factor in macrophages
Biochemical and Biophysical Research Communications 136, 1130 – 1135
- SCHWARTZ, J., G. SHKLAR (1988)
Regression of Experimental Oral Carcinomas by Local Injection of β -Carotene and Canthaxanthin
Nutrition and Cancer 11, 35 – 40
- SESTILI, P., A. GUIDARELLI, M. DACHÀ, O. CANTONI (1998)
Quercetin prevents DNA single strand breakage and cytotoxicity caused by *tert*-butylhydroperoxide: Free radical scavenging versus iron chelating mechanism
Free Radical Biology & Medicine 25, 196 – 200
- SHARONI, Y., R. AGBARIA, H. AMIR, A. BEN-DOR, I. BOBILEV, N. DOUBI, Y. GIAT, K. HIRSH, G. IZUMCHENKO, M. KHANIN, E. KIRILOV, R. KRIMER, A. NAHUM, M. STEINER, Y. WALFISCH, S. WALFISCH, G. ZANGO, M. DANILENKO, J. LEVY (2003)
Modulation of transcriptional activity by antioxidant carotenoids
Molecular Aspects of Medicine 24, 371 – 384
- SHI, M., B. XU, X. WANG, K. AOYAMA, S. A. MICHIE, T. TAKEUCHI (2004)
Oxidative damages in chronic inflammation of a mouse autoimmune disease model
Immunology Letters 95, 233 – 236

SIEFERMANN-HARMS, D. (1985)
Carotenoids in photosynthesis. I. Location in photosynthetic membranes and light-harvesting function
Biochimica et Biophysica Acta 811, 325 – 355

SIES, H. (1985)
Oxidative stress: Introductory Remarks
In: Oxidative Stress (Ed.: H. Sies)
Academic Press, London, U. K., 1 – 8

SIES, H. (1991)
Oxidative Stress: From basic research to clinical application
American Journal of Medicine 91, 31S – 39S

SIES, H., W. STAHL, A. R. SUNDQUIST (1992)
Antioxidant Functions of Vitamins. Vitamins E and C, Beta-Carotene, and Other Carotenoids
Annals of the New York Academy of Sciences 669, 7 – 20

SIES, H., W. STAHL (1995)
Vitamins E and C, β -carotene, and other carotenoids as antioxidants
American Journal of Clinical Nutrition 62, 1315S – 1321S

SKLAN, D., T. YOSEFOV, A. FRIEDMAN (1989)
The Effects of Vitamin A, β -carotene and Canthaxanthin on Vitamin A Metabolism and Immune Responses in the Chick
International Journal for Vitamin and Nutrition Research 59, 245 - 250

SLATTERY, M. L., J. BENSON, K. CURTIN, K.-N. MA, D. SCHAEFFER, J. D. POTTER (2003)
Carotenoids and colon cancer
American Journal of Clinical Nutrition 71, 575 – 582

SMITH, C. A. D., D. J. HARRISON (1997)
Association between polymorphism in gene for microsomal epoxide hydrolase and susceptibility to emphysema
The Lancet 350, 630 – 633

SMITH, M. A., P. L. RICHEY HARRIS, L. M. SAYRE, J. S. BECKMAN, G. PERRY (1997)
Widespread Peroxynitrite-Mediated Damage in Alzheimer`s Disease
Journal of Neuroscience 17, 2653 – 2657

SOUZA, J. M., R. RADJ (1998)
Glyceraldehyd-3-Phosphate Dehydrogenase Inactivation by Peroxynitrite
Archives of Biochemistry and Biophysics 360, 187 – 194

STAHL, W., W. SCHWARZ, A. R. SUNDQUIST, H. SIES (1992)
Cis-trans Isomers of Lycopene and β -Carotene in Human Serum and Tissues
Archives of Biochemistry and Biophysics 294, 173 – 177

- STAHL, W., H. SIES (1992)
Uptake of Lycopene and Its Geometrical Isomers Is Greater from Heat-Processed than from Unprocessed Tomato Juice in Humans
Journal of Nutrition 122, 2161 – 2166
- STAHL, W., W. SCHWARZ, H. SIES (1993)
Human Serum Concentrations of all-*trans* β - and α -Carotene but Not 9-*cis* β -Carotene Increase upon Ingestion of a Natural Isomer Mixture Obtained from *Dunaliella salina* (Betatene)
Journal of Nutrition 123, 847 – 851
- STAHL, W., W. SCHWARZ, J. VON LAAR, H. SIES (1995)
All-*trans* β -Carotene Preferentially Accumulates in Human Chylomicrons and Very Low Density Lipoproteins Compared with the 9-*cis* Geometrical Isomer
Journal of Nutrition 125, 2128 – 2133
- STAHL, W., A. JUNGHANS, B. DE BOER, E. S. DRIOMINA, K. BRIVIBA, H. SIES (1998)
Carotenoid mixtures protect multilamellar liposomes against oxidative damage: synergistic effect of lycopene and lutein
FEBS Letters 427, 305 – 308
- STAHL, W. (2004)
Sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe: 6.4 Lycopin
Praxishandbuch Funcional Food, 16. Akt.-Lfg, 1-24
- STOHRER, M., B. HAMMER, R. HAMMER, M. STANGASSINGER (2001)
Vitamin E supplementation in racedog nutrition
In: Vitamine und Zusatzstoffe in der Ernährung von Mensch und Tier. 8. Symposium 26./27. September 2001, Jena/Thüringen (Hrsg.: R. Schubert), Informations- und Datenzentrum der FAL, Braunschweig, 155 – 160
- SZASZ, G., W. GRUBER, E. BERNT (1976)
Creatine kinase in serum: 1. Determination of optimum reaction conditions
Clinical Chemistry 22, 650 – 656
- TALVERA, F., B. P. CHEW (1987)
In vitro interaction of lipoproteins with retinol, retinoic acid and β -carotene on progesterone secretion by bovine luteal cells
Journal of Dairy Science 70 (Suppl. 1), 225
- TALVERA, F., B. P. CHEW (1988)
Comparative role of retinol, retinoic acid and β -carotene on progesterone secretion by pig corpus luteum *in vitro*
Journal of Reproduction and Fertility 82, 611 – 615
- THE ALPHA-TOCOPHEROL, BETA CAROTENE PREVENTION STUDY GROUP (1994)
The Effect of Vitamin E and Beta Carotene on the Incidence of Lung Cancer and Other Cancers in Male Smokers
The New England Journal of Medicine 330, 1029 – 1035

- TRABER, M. G., S. R. DIAMOND, J. C. LANE, R. I. BRODY, H. J. KAYDEN (1994)
 β -Carotene Transport in Human Lipoproteins. Comparisons with α -Tocopherol
Lipids 29, 665 – 669
- TRICHOPOULOU, A., T. COSTACOU, C. BAMIA, D. TROCHOPOULOS (2003)
Adherence to a Mediterranean Diet and Survival in a Greek Population
The New England Journal of Medicine 348, 2599 – 2608
- TROSKO, J. E., C. C. CHANG (2001)
Mechanism of up-regulated gap junctional intercellular communication during
chemoprevention and chemotherapy of cancer
Mutation Research 480 – 481, 219 – 229
- VERSHININ, A. (1999)
Biological functions of carotenoids-diversity and evolution
BioFactors 10, 99 - 104
- VAN VLIET, T., M. F. VAN VLISSINGEN, F. VAN SCHAİK, H. VAN DEN BERG
(1996a)
 β -Carotene Absorption and Cleavage in Rats is Affected by the Vitamin A
Concentration of the Diet
Journal of Nutrition 126, 499 – 508
- VAN VLIET, T., F. VAN SCHAİK, W. H. SCHREURS, H. VAN DEN BERG (1996b)
In Vitro Measurement of β -Carotene Cleavage Activity: Methodological
Considerations and the Effect of Other Carotenoids on β -Carotene Cleavage
International Journal for Vitamin and Nutrition Research 66, 77 – 85
- VUILLEUMIER, J. P., H. E. KELLER, D. GYSEL, F. HUNZIKER (1983)
Clinical chemical methods for the routine assessment of the vitamin status in human
populations. Part I: The fat soluble vitamins A, E and β -carotene
International Journal for Vitamin and Nutrition Research 53, 265 – 272
- WANG, X.-D., G.-W. TANG, J. G. FOX, N. I. KRINSKY, R. M. RUSSELL (1991)
Enzymatic Conversion of β -Carotene into β -Apo-carotenals and Retinoids by Human,
Monkey, Ferret, and Rat Tissues
Archives of Biochemistry and Biophysics 285, 8 – 16
- WANG, X.-D., N. I. KRINSKY, G. TANG, R. M. RUSSELL (1992)
Retinoic Acid Can Be Produced from Excentric Cleavage of β -Carotene in Human
Intestinal Mucosa
Archives of Biochemistry and Biophysics 293, 298 – 304
- WANG, X.-D., R. M. RUSSELL, R. P. MARINI, G. TANG, G. G. DOLNIKOWSKI, J.
G. FOX, N. I. KRINSKY (1993)
Intestinal perfusion of β -carotene in the ferret raises retinoic acid level in portal blood
Biochimica et Biophysica Acta 1167, 159 – 164

- WOLF, A., C.-F. TRENDELENBURG, C. DIEZ-FERNANDEZ, P. PRIETO, S. HOUY, W. E. TROMMER, A. CORDIER (1997)
Cyclosporine A-induced Oxidative Stress in Rat Hepatocytes
The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics 280, 1328 – 1334
- WOODALL, A. A., G. BRITTON, M. J. JACKSON (1996)
Dietary supplementation with carotenoids: effect on α -tocopherol levels and susceptibility of tissues to oxidative stress
British Journal of Nutrition 76:2, 307 - 317
- WYSS, A., G. WIRTZ, W.-D. WOGGON, R. BRUGGER, M. WYSS, A. FRIEDLEIN, H. BACHMANN, W. HUNZIKER (2000)
Cloning and Expression of β , β -Carotene 15, 15`-Dioxygenase
Biochemical and Biophysical Research Communications 271, 334 – 335
- YAPING Z., Q. SUPING, Y. WENLI, X. ZHENG, S. HONG, Y. SIDE, W. DAPU (2001)
Antioxidant activity of lycopene extracted from tomato paste towards trichloromethyl peroxy radical $\text{CCl}_3\text{O}_2\bullet$
Food Chemistry 77, 209 – 212
- YEH, S.-L., M.-L. HU (2000)
Antioxidant and pro-oxidant effects of lycopene in comparison with β -carotene on oxidant-induced damage in Hs68 cells
Journal of Nutritional Biochemistry 11, 548 – 554
- YEH, S.-L., M.-L. HU (2001)
Induction of Oxidative DNA Damage in Human Foreskin Fibroblast Hs68 Cells by Oxidized β -Carotene and Lycopene
Free Radical Research 35, 203 – 213
- YOUNG, F. M., W. B. LUDERER, R. J. RODGERS (1995)
The antioxidant β -carotene prevents covalent cross-linking between cholesterol side-chain cleavage cytochrome P450 and its electron donor, adrenodoxin, in bovine luteal cells
Molecular and Cellular Endocrinology 109, 113 – 118
- YUAN, J.-M., D. O. STRAM, K. ARAKAWA, H.-P. LEE, M. C. YU (2003)
Dietary Cryptoxanthin and Reduced Risk of Lung Cancer: The Singapore Chinese Health Study
Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention 12, 890 – 898
- ZHANG, L.-X., R. V. COONEY, J. S. BERTRAM (1991)
Carotenoids enhance gap junctional communication and inhibit lipid peroxidation in C3H/10T1/2 cells: relationship to their cancer chemopreventive action
Carcinogenesis 12, 2109 – 2114
- ZHANG, L.-X., R. V. COONEY, J. S. BERTRAM (1992)
Carotenoids Up-Regulate *Connexin43* Gene Expression Independent of Their Provitamin A or Antioxidant Properties
Cancer Research 52, 5707 – 5712

9. Danksagung

Zuerst möchte ich meinem Doktorvater, Herrn Prof. Walter A. Rambeck, herzlich für die Überlassung des interessanten Themas und die großartige Betreuung bedanken. Ich fand bei ihm stets ein freundliches Wort und immer ein offenes Ohr für jegliche Probleme oder Wünsche.

Besonders danke auch ich Herrn Dr. Ulrich Wehr für die umfassende und immer geduldige und kompetente Betreuung und die vielen wertvollen Ratschläge. Auch für die unermüdlichen Antworten auf meine unzähligen Fragen möchte ich mich ganz herzlich bedanken.

Den Mitarbeitern der Außenstelle Oberwiesefeld danke ich ebenso vielmals. Ein besonderes Dankeschön gebührt an dieser Stelle Frau Elisabeth Stadler, die mir bei der Kapselherstellung und vielen weiteren Fragen („Jugend forscht“) mit ihrem großen Erfahrungsschatz eine enorme Hilfe war.

Auch dem Laborpersonal, insbesondere Herrn Werner Hesselbach, Frau Elke Kleiner und Frau Antje Wetzel, möchte ich sehr herzlich danken. Sie alle standen mir bei meiner Laborarbeit stets mit Rat und Tat zur Seite.

Für die zuverlässige Bestimmung der Enzyme danke ich den Mitarbeiterinnen des Labors der I. Medizinischen Tierklinik. Auch für die Benutzung des Gerätes Cell Dyn[®] zur Bestimmung des Blutbildes möchte ich mich bei der I. Medizinischen Tierklinik bedanken.

Für die Hilfe bei der statistischen Auswertung danke ich Herrn Prof. Dr. K. Osterkorn und Herrn J. Stanglmeier.

Der Firma DSM Nutritional Products AG möchte ich für die Zusammenarbeit in diesem Projekt danken.

Auch die Familie Kotyza verdient für ihre tatkräftige Unterstützung bei der Durchführung der Studie und ihre hingebungsvolle Pflege der Hunde ein großes Dankeschön.

Außerdem gilt allen Doktoranden, die mich bei der Blutentnahme so hilfsbereit unterstützt haben, aufrichtiger Dank, vor allem Tini und Susi, auf die ich mich mehrfach verlassen konnte und mit denen ich so manchen Tag im Hundestall verbrachte – egal ob bei Sommerhitze oder Schneetreiben, gell Tini?

Ein großes Dankeschön geht auch an alle Wienfahrer: Tini, Achim, Stephan, Thomas, Johanna und Guido – ihr wart für mich wirklich eine sehr große Erleichterung!

Von ganzem Herzen danke schließlich ich meinen Eltern, die mir Studium und Promotion ermöglicht und mich während meiner gesamten Studien- und Doktorandenzeit immer unterstützt und großes Vertrauen in mich gesetzt haben. Ohne euch hätte ich alles nicht so erfolgreich bewältigt!

Auch allen anderen, die mich bei und während meiner Arbeit unterstützt haben, möchte ich sehr herzlich danken, besonders natürlich meinem Mann Christoph, der all meine guten und schlechten Launen, alle Hochs und Tiefs und alle fachlichen Ausführungen immer verständnisvoll ertragen hat.

Der H. Wilhelm Schaumann Stiftung möchte ich mich für die finanzielle Unterstützung aufrichtig danken.

10. Lebenslauf

Name:	Nicole Nitschke, geb. Seiler	
Geburtsdatum:	1. September 1975 in München	
Eltern:	Michael Frank Christian Seiler Felicitas Seiler, geb. Hag	
Geschwister:	Christian Frank Michael Seiler	
Ausbildung:	1982 – 1986	Grundschule Raiffeisenschule in Unterschleißheim
	1986 – 1995	Carl-Orff-Gymnasium in Unterschleißheim
	30. Juni 1995	Allgemeine Hochschulreife
	1995 – 1996	Studium der Biologie an der Ludwig- Maximilians-Universität München
	1996 – 2002	Studium der Tiermedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität München
	16. August 2002	3. Teil der Tierärztlichen Prüfung
Approbation:	21. Januar 2003	
Beginn der Promotion:	September 2002	Institut für Physiologie, Physiologische Chemie und Tierernährung der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians- Universität München