

Aus der Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie,
Bereich Hautphysiologie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

„Kinetik der Carotinoidkonzentration hausgemachter vs.
kommerzieller Smoothies *in vitro* und ihr Einfluss auf den
kutanen Antioxidantienstatus *in vivo* bei täglicher Einnahme
über einen Zeitraum von 8 Wochen“

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Bena Jung

aus Berlin

Datum der Promotion: 05.03.2021

Vorwort

Teile der vorliegenden Arbeit wurden nach einem Peer-Review-Verfahren am 25.06.2020 publiziert in:

Bena Jung, Maxim E. Darwin, Sora Jung, Stephanie Albrecht, Sabine Schanzer, Martina C. Meinke, Gisela Thiede, Juergen Lademann, Kinetics of the carotenoid concentration degradation of smoothies and their influence on the antioxidant status of the human skin in vivo during 8 weeks of daily consumption, Nutrition Research, Volume 81, 2020, Pages 38-46.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	5
1. ABSTRACT	
1.1. Deutscher Abstract.....	6
1.2. Englischer Abstract	7
2. EINLEITUNG	
2.1. Oxidativer Stress - Grundlagen.....	9
2.1.1. RONS und freie Radikale.....	10
2.2. Antioxidantien – Bedeutung und Beispiele	12
2.2.1 Enzymatische und nicht-enzymatische Inaktivierung von RONS.....	13
2.3. Carotinoide.....	15
2.3.1. Grundlagen.....	15
2.3.2. Lutein und Zeaxanthin.....	16
2.3.3. Lycopin.....	17
2.3.4. Beta-Carotin.....	18
2.4. Haut.....	19
2.4.1. Grundlagen – Funktion und Anatomie der Haut.....	19
2.4.2. Sonnenlicht-induzierte Hautschädigungen.....	21
2.4.3. Schutzmechanismen der Haut.....	22
2.4.4. Antioxidatives Potential (AOP) der Haut.....	22
2.4.5. Resorption der Carotinoide.....	24
2.4.6. Messmethoden.....	26
2.5. Fragestellung	26
3. MATERIAL UND METHODEN	
3.1 <i>In vitro</i> Studie.....	28
3.1.1. Studiendesign der <i>in vitro</i> Studie.....	28
3.1.2. Material der <i>in vitro</i> Messungen.....	29
3.1.3. Resonanz-Raman-Spektroskopie (RRS)	31
3.1.3.1. Theoretische Grundlagen und Raman-Effekt.....	31

3.1.3.2. Versuchsaufbau der RRS-Messungen <i>in vitro</i>	33
3.2. <i>In vivo</i> Studie.....	36
3.2.1. Probanden.....	36
3.2.2. Studiendesign der <i>in vivo</i> Studie.....	36
3.2.3. Fragebögen.....	38
3.2.4. Reflexionsspektroskopie.....	38
3.2.5. Pilotstudie mit Zusatz von Rapsöl.....	40
3.3. Statistik und Datenanalyse.....	41
4. ERGEBNISSE	
4.1. Ergebnisse der <i>in vitro</i> Studie.....	42
4.2. Ergebnisse der <i>in vivo</i> Studie.....	44
4.3. Ergebnisse Fragebögen.....	47
5 DISKUSSION	
5.1. Ergebnisse der <i>in vitro</i> Studie.....	49
5.2. Ergebnisse der <i>in vivo</i> Studie.....	51
5.3. Einschränkungen.....	56
5.4. Schlussfolgerungen	57
5.5. Interessenkonflikt.....	58
6. LITERATURVERZEICHNIS	59
7. Anhang.....	68
8. EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG	69
9. ANTEILSERKLÄRUNG	70
10. LEBENSLAUF	71
11. DANKSAGUNG	72

Abkürzungsverzeichnis

AOP; Antioxidatives Potenzial

a.u.; arbitrary units (unskalierte Einheiten)

BCMO1; β -Carotin-15,15'-Monooxygenase

b.E. ; unskalierte Einheiten

GGSG; Glutathiondisulfid

GSH; reduziertes Glutathion,

GSSG: oxidiertes Glutathion

h; hour (Stunde)

hrs; hours (Stunden)

HPLC; high performance liquid chromatography
(Hochleistungsflüssigkeitschromatographie)

IR - Strahlung; infrarote Strahlung

IQR; interquartile Range

IU; international units (internationale Einheiten)

KAT; Katalase

min.; minutes (Minuten)

SEM; standard error of the mean (Standardfehler)

SH – Gruppen; Sulfhydrylgruppen

RNS; reactive nitrogen species (reaktive Stickstoffspezies)

ROS; reactive oxygen species (reaktive Sauerstoffspezies)

RONs; reactive oxygen and nitrogen species

RPF; Radikalschutzfaktor

RRS; Raman–Resonanz-Spektroskopie

SOD; Superoxiddismutase

UV- Strahlung; ultraviolette Strahlung

1. Abstract

1.1 Abstract (deutsch):

Hintergrund: Antioxidantien spielen eine essentielle Rolle bei der Neutralisierung freier Radikale und können vom menschlichen Körper nicht bedarfsdeckend synthetisiert, sondern müssen mit der Nahrung zugeführt werden. Kutane Carotinoide können als Surrogatparameter für den Antioxidantienstatus eines Menschen dienen, der durch verschiedene Faktoren beeinflusst werden kann, u. a. Stress und Toxine, aber auch durch die Menge an zugeführten Antioxidantien. Ziel dieser Dissertation ist, die Kinetik der Carotinoidkonzentration hausgemachter und kommerzieller grüner Smoothies *in vitro* zu untersuchen, sowie deren Einfluss auf das antioxidative Potential der Haut *in vivo* bei täglicher Einnahme über einen Zeitraum von 8 Wochen zu bestimmen. Dabei soll untersucht werden ob hierbei Unterschiede zwischen frisch zubereiteten und einem industriell hergestellten, kommerziellen Smoothie messbar sind.

Material und Methoden: Zwei frische hausgemachte grüne Smoothies sowie ein kommerzieller grüner Smoothie, bestehend aus verschiedenen Früchten und Gemüse, wurden mittels Resonanz-Raman-Spektroskopie bezüglich ihres Carotinoidgehalts über einen Zeitraum von 24 Stunden *in vitro* verglichen. In separaten Experimenten wurde die kutane Carotinoidkonzentration von insgesamt 20 Probanden *in vivo* bestimmt, die täglich 250 ml des frisch zubereiteten oder des kommerziellen Smoothies über einen Zeitraum von 8 Wochen verzehrten. Die kutane Carotinoidkonzentration wurde *in vivo* mittels Reflexionsspektroskopie an 6 Zeitpunkten gemessen.

Ergebnis: Die *in vitro* Messungen zeigten zum Ausgangszeitpunkt unmittelbar nach Zubereitung des frischen bzw. Öffnen des kommerziellen Smoothies bei den frischen, hausgemachten Smoothies deutlich höhere Carotinoidkonzentrationen ($7.6 \pm 0.8 \cdot 10^{-4}$ [b. E.] für Smoothie A bzw. $10.4 \pm 0.6 \cdot 10^{-4}$ [b. E.] für Smoothie B) verglichen mit dem kommerziellen Produkt ($5.8 \pm 0.2 \cdot 10^{-4}$ [b. E.]). Während die hausgemachten Smoothies einen initialen Abfall der Carotinoidkonzentration zeigen, die nach ca. 200 Minuten einen stabilen Zustand erreicht, bleibt der kommerzielle Smoothie über den Beobachtungszeitraum von 24 Stunden relativ unverändert. In der *in vivo* Studie zeigte sich bei den Probanden nach 8 Wochen täglicher Einnahme eines frisch zubereiteten Smoothies ein tendenzieller Anstieg der kutanen Carotinoidwerte von $4.5 \pm 0.1 \cdot 10^{-4}$ [b.E.]

auf $4.8 \pm 0.3 \cdot 10^{-4}$ [b.E.] (Mittelwert \pm Standardabweichung). Bei den Probanden, die täglich den kommerziellen Smoothie verzehrten, wurde ein leichter Anstieg der kutanen Carotinoidkonzentration von $4.3 \pm 0.2 \cdot 10^{-4}$ [b.E.] auf $4.7 \pm 0.2 \cdot 10^{-4}$ [b.E.] nachgewiesen.

Schlussfolgerung: Die tägliche Einnahme eines Smoothies, bestehend aus Obst und Gemüse, verbessert den antioxidativen Status der Haut. Frische, hausgemachte Smoothies zeigen eine höhere Carotinoidkonzentration verglichen mit gleichartig aufgebauten, kommerziellen Produkten. Sie müssen jedoch unmittelbar nach Zubereitung verzehrt werden, um diese optimal bioverfügbar zu machen. Hausgemachte Smoothies stellen zum Zeitpunkt des Verzehrs instabile Systeme dar. Kommerzielle Produkte sind deutlich stabiler, bezogen auf die Carotinoidkonzentration. Die verglichenen Produkte zeigen vergleichbare Erhöhungen der Hautcarotinoide *in vivo*.

1.2 Abstract (english):

Background: Antioxidants play an essential role in the neutralization of free radicals. Since most of them cannot be synthesized by the human body, they have to be absorbed from food. Cutaneous carotenoids can serve as a marker substance for the antioxidant status of the human skin which shows constant alterations depending on nutrition, stress and other lifestyle factors. The objective of this dissertation was to assess the kinetics of the carotenoid concentration of a homemade and a commercial green smoothie over time, and examine their influence on the carotenoid concentration of the human skin. We hypothesized that the daily consumption of fresh homemade smoothies with higher carotenoid concentrations would enhance the cutaneous carotenoid concentration of healthy volunteers faster than the daily consumption of a commercial smoothie.

Materials and methods: The carotenoid concentration of two homemade green smoothies and a commercial green smoothie, all containing fruits and vegetables, was assessed *in vitro* during 24 hours by resonance Raman spectroscopy at distinct timepoints. In a separate experiment changes of the cutaneous carotenoid concentration in 20 healthy volunteers under daily intake of either a homemade or a commercial green smoothie (250ml smoothie/day) over 8 weeks were investigated *in vivo* using reflectance spectroscopy.

Results: The *in vitro* measurements of the two homemade smoothies showed notably higher carotenoid concentrations of $7.6 \pm 0.8 \cdot 10^{-4}$ [a.u.] (smoothie A) and $10.4 \pm 0.6 \cdot 10^{-4}$ [a.u.] (smoothie B) compared to the commercial smoothie with a baseline carotenoid concentration of $5.8 \pm 0.2 \cdot 10^{-4}$ [a.u.]. While the homemade smoothies reached a steady state after ~200 minutes, the carotenoid concentration of the commercial smoothie was relatively stable. 8 weeks after daily consumption of the freshly homemade smoothies, volunteers showed a tendential increase of cutaneous carotenoids from $4.5 \pm 0.1 \cdot 10^{-4}$ [a.u.] to $4.8 \pm 0.3 \cdot 10^{-4}$ [a.u.] (mean value \pm standard deviation). The volunteers consuming the commercial smoothie showed a slight increase of cutaneous carotenoids from $4.3 \pm 0.2 \cdot 10^{-4}$ [a.u.] to $4.7 \pm 0.2 \cdot 10^{-4}$ [a.u.] after 8 weeks.

Conclusion: The cutaneous carotenoid concentration depends on different lifestyle factors. The consumption of smoothies made out of fruits and vegetables can increase the antioxidant status of the human skin. Homemade smoothies can exhibit a higher carotenoid concentration compared to similarly composed commercial smoothies. They need to be consumed immediately following preparation to enhance the bioavailability of the carotenoids. Freshly made smoothies represent instable systems at the time of preparation. Commercially available smoothie products are rather stable regarding their carotenoid concentration. The different smoothie products examined in these investigations lead to comparable increases of the cutaneous carotenoid concentrations *in vivo*.

2. Einleitung

2.1. Oxidativer Stress - Grundlagen

Unter optimalen physiologischen Bedingungen besteht in aeroben Organismen ein Fließgleichgewicht zwischen antioxidativen Schutzmechanismen und Oxidationsprozessen, die durch freie Radikale und RONS (Reactive oxygen and nitrogen species) verursacht werden können, dieser Zustand wird auch als „Redox-Homöostase“ bezeichnet. Kommt es jedoch zu einem Ungleichgewicht zugunsten der oxidativen Prozesse gegenüber den antioxidativen Schutzmechanismen eines Organismus, kann oxidativer Stress entstehen [1]. Oxidativer Stress kann zur Schädigung von Biomolekülen wie z.B. Membranlipiden, Proteinen und Heteroglykanen sowie bis zum Zelltod führen; des Weiteren kann oxidativer Stress zu Strangbrüchen und Basenmodifikation der DNA mit nachfolgenden Mutationen und Tumorinitiation beitragen [2].

Die zugrundeliegenden Auslöser, die zu einer vermehrten Generierung von freien Radikalen und RONS sowie oxidativem Stress führen können sind vielfältig: Umwelteinflüsse wie z.B. durch die Sonne durch Strahlung im ultravioletten (UV) und infraroten (IR) Bereich [3], Luftverschmutzung (z.B. Ozon, Stickoxide) [4], ionisierende Strahlung [5], toxische Schwermetalle [6], die Metabolisation einer Vielzahl von Noxen und Medikamenten, insbesondere Chemotherapeutika [7], Alkoholabusus und Rauchen [8, 9]. Eine vermehrte Bildung von RONS bzw. oxidativem Stress wird bei einer Vielzahl von akuten, chronischen oder degenerativen Erkrankungen [2, 10] beobachtet sowie auch bei inflammatorischen Prozessen, Perfusionsdefiziten, Hypoxie und Trauma [11-14]. In zahlreichen Studien wird auch beschrieben, dass bestimmte Lebensgewohnheiten einen Einfluss auf die Entstehung von oxidativem Stress haben wie Ernährung, psychischer und physischer Stress, insbesondere exzessive physische bzw. sportliche Belastungen trotz der erwiesenermaßen positiven Effekte der Ausübung von Sport vor allem in Hinblick auf metabolische und kardiovaskuläre Erkrankungen [15-18].

Oxidativer Stress wird in Verbindung mit der begünstigten Entstehung von bösartigen Neubildungen, kardiovaskulären und anderen chronischen oder degenerativen Erkrankungen sowie auch in Zusammenhang mit einer Beschleunigung von Alterungsprozessen gebracht [10, 19-21]. Mit der Nahrung aufgenommene Antioxidantien können oxidativem Stress entgegenwirken. In zahlreichen Studien wurde

eine antioxidantienreiche Ernährung mit einer niedrigeren Prävalenz von kardiovaskulären Erkrankungen und Infarktgeschehen sowie einigen Krebserkrankungen gebracht [22-24].

2.1.1. RONS und freie Radikale

Als freie Radikale werden Atome und Moleküle bezeichnet, die ein oder mehrere ungepaarte Elektronen aufweisen und in der Lage sind unabhängig zu existieren [25]. Das Vorhandensein ungepaarter Elektronen in den Orbitalen von Atomen bzw. Molekülen führt zu einer hohen chemischen Reaktivität in dem Bestreben einen stabileren chemischen Zustand zu erreichen.

In allen aeroben Mechanismen werden bei vielen physiologischen und pathophysiologischen Prozessen im menschlichen Organismus reaktive Sauerstoffverbindungen (ROS, reactive oxygen species) oder Stickstoffverbindungen (RNS, reactive nitrogen species) generiert. ROS und RNS werden in Abhängigkeit ihres zentralen Atoms bezeichnet und auch unter dem Begriff RONS (reactive oxygen and nitrogen species) zusammengefasst werden. Unter diese Überbegriffe (ROS, RNS, RONS) fallen jedoch nicht nur freie Radikale, die sich vom Sauerstoff bzw. Stickstoff ableiten, sondern auch Nicht-Radikale, die z. T. leicht in Radikale überführt werden können (siehe Tabelle 1); mit anderen Worten sind alle Sauerstoffradikale ROS, aber nicht alle ROS Sauerstoffradikale [26]. Es gibt verschiedene Möglichkeiten der Radikalentstehung, u.a. die Aufnahme eines Elektrons durch ein Nichtradikal mit folgender Entstehung eines Radikal-Anions, der Verlust eines Elektrons von einem Nichtradikal unter Entstehung eines Radikal-Anions sowie die homolytische Aufspaltung kovalenter Bindungen mit Entstehung ungeladener Radikale [27].

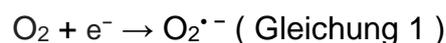
Reaktive Sauerstoffspezies ROS

Radikale	Nicht-Radikale
Superoxid, $O_2^{\bullet -}$	Wasserstoffperoxid, H_2O_2
Hydroxylradikal, OH^\bullet	Ozon, O_3
Hydroperoxylradikal, HO_2^\bullet	hypochlorige Säure, $HOCl^c$
Peroxyradikal, RO_2^\bullet	Singulett Sauerstoff, $O_2^1\Delta g$ (auch singlet O_2 oder 1O_2)

Tabelle 1: Beispiele radikalischer und nicht-radikalischer ROS

Aerob lebende Organismen nutzen atmosphärischen, molekularen Sauerstoff zur Energiegewinnung bei dem wie bei anderen sauerstoffabhängigen Reaktionen reaktive Sauerstoffspezies als Produkt oder Nebenprodukt entstehen können. Im menschlichen Organismus findet vor allem in der mitochondrialen Atmungskette zur Energiegewinnung eine Generierung von ROS statt [28]. Hierbei wird ein Großteil des vom Organismus aufgenommenen Sauerstoffs unter Bildung von Wasser reduziert durch mehrere Ein-Elektronen-Reduktionsschritte. Jedoch entstehen auch unvollständig reduzierte hochreaktive Sauerstoffspezies wie z.B. das Superoxidanionradikal ($O_2^{\bullet -}$), das Wasserstoffperoxid (H_2O_2) und das hochreaktive Hydroxylradikal (OH^\bullet), siehe Gleichung 1-4 [1].

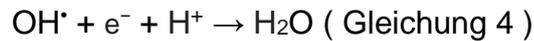
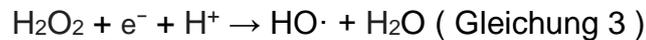
Ein-Elektronen-Reduktion mit Entstehung eines Superradikaloxidanions:



Protonierung des Superoxidanionradikals mit Entstehung von Wasserstoffperoxid:



Aus Wasserstoffperoxid entweder Entstehung des hochreaktiven Hydroxylradikals oder Wasser durch Reduktion mit zwei Elektronen:



Die vielfältigen Funktionen von RONS sind aufgrund ihrer Komplexität immer noch nicht hinreichend geklärt und weiterhin Gegenstand vieler Forschungsvorhaben. RONS werden eine Dualität aus für aerobe Organismen physiologisch unersätzlich wichtigen, aber auch potentiell schädigenden Funktionen zu geschrieben [29]. Sie erfüllen in physiologischen Mengen wichtige Signal- und Mediatorfunktionen für die Zellproliferation und -kommunikation, der Apoptose, bei Entzündungsprozessen und der Immunabwehr indem sie u.a. zur Beseitigung von Mikroorganismen wie z.B. Viren und Bakterien beitragen [2, 30, 31].

2.2. Antioxidantien – Bedeutung und Beispiele

Antioxidative Schutzmechanismen spielen eine essentielle bei der Neutralisation von ROS, die bei übermäßiger Entstehung zu oxidativem Stress führen können. Der menschliche Organismus verfügt zum einem über endogen produzierte und körpereigene antioxidativ wirksame Substanzen bzw. Schutzmechanismen, zum anderen ist er aber auch auf exogene Faktoren angewiesen, die mit der Nahrung zugeführt werden müssen. Viele der für den Menschen wichtigen antioxidativ wirkenden Substanzen und Komponenten, die für den Ablauf antioxidativer Schutzmechanismen essentiell sind, können vom menschlichen Organismus nicht bedarfsdeckend synthetisiert, sondern müssen mit der Nahrung aufgenommen werden. Einteilungen können anhand ihrer Wirkmechanismen erfolgen, indem man sie zu Radikalfängern (z.B. Tocopherole), die im Organismus ablaufende Oxidationskaskaden unterbrechen oder zu den Reduktionsmitteln (z.B. Ascorbinsäure) zählt, die präventiv eher oxidiert werden als das zu schützende Substrat.

Aufgrund der Vielfältigkeit und Komplexität der antioxidativ wirksamen Schutzmechanismen zählen zu den Antioxidantien unterschiedlichste Substanzen, beispielsweise Vitamine (Vitamin A, C, D, E) [32], Carotinoide, Peptide (z.B. Glutathion, Transferrin, Haptoglobin), antioxidativ wirksame Enzyme, eine Reihe von für die enzymatische Aktivität z.T. essentielle Spurenelemente (z. B. Selen, Kupfer, Zink) und Coenzyme (z.B. Coenzym Q10), Hormone (z.B. Melatonin [33]), Flavonoide, Polyphenole, Phytoöstrogene, Sulfide und viele weitere.

2.2.1 Enzymatische und nicht-enzymatische Inaktivierung von RONS

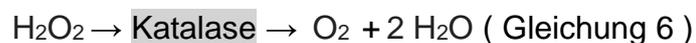
Die Inaktivierung von entstandenen ROS kann über enzymatische und nicht-enzymatische Mechanismen erfolgen. Nicht-enzymatisch wirken Antioxidantien wie z.B. Vitamin A (Retinol), Vitamin C (Ascorbat) und das Vitamin E (α -Tocopherol) [34] oder die große Gruppe der Carotinoide.

Die enzymatische Entgiftung von ROS geschieht durch antioxidativ wirksame Enzyme, insbesondere der Superoxiddismutase (SOD), Katalase (KAT) und Glutathionperoxidase [29] (siehe Gleichung 5 – 7 [35]).

Die Superoxiddismutase katalysiert die Dismutation von Superoxidanionen:



Die Katalase entgiftet Wassrestoffperoxid H_2O_2 durch die Spaltung in Sauerstoff und Wasser:



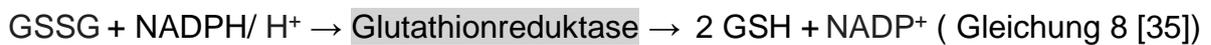
Die Glutathionperoxidase benutzt Wassrestoffperoxid H_2O_2 um Glutathion (GSH) in einer reversiblen Reaktion unter Bildung von Wasser zu Glutathion-Disulfid (GSSG) zu oxidieren:



Eines der wichtigsten antioxidativ wirkenden Peptide, weil fast ubiquitär in den menschlichen Zellen vorkommend ist das Glutathion - ein Tripeptid bestehend aus den

drei Aminosäuren Glutamat, Cystein und Glycin [36]. Glutathion kommt insbesondere in Erythrozyten in hoher Konzentration vor, in denen es funktionell wichtige Sulfhydrylgruppen (SH – Gruppen) vor Oxidation schützt sowie Peroxide entgiftet, deren Generierung aufgrund der hier herrschenden hohen Sauerstoffkonzentration leicht erfolgen kann [37, 38]. Des Weiteren hat es die Fähigkeit, Methämoglobin, welches nicht mehr mit Sauerstoff beladen werden kann zu der funktionsfähigen Form des Hämoglobins zu reduzieren [39].

Das oxidierte GSSG kann wiederum durch die Glutathionreduktase katalysiert unter Oxidation des Coenzym NADPH (Nicotinsäureamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat) zum reduzierten Glutathion regeneriert werden:



Aufgrund dieses Recyclingprozesses kann das Verhältnis zwischen GSH und GSSG bzw. Verschiebungen dieses Verhältnisses als Marker für oxidativen Stress dienen [40].

Es gibt im menschlichen Organismus zahlreiche weitere endogene, antioxidativ wirkende funktionelle Proteine und Peptide wie z.B. das Transferrin, Albumin, Coeruloplasmin und Haptoglobin [41].

Für die Funktionstüchtigkeit der Enzyme sind z.T. bestimmte, mit der Nahrung zugeführte Spurenelemente essentiell, beispielsweise ist die Aktivität der Glutathionperoxidase von Selen abhängig [42]. Des Weiteren enthält die im Zytosol lokalisierte Superoxiddismutase Kupfer (Cu) und Zink (Zn) in ihrem katalytischen Zentrum, die mitochondriale Superoxiddismutase Mangan (Mn). So werden die Superoxiddismutasen auch in Abhängigkeit von ihrem zentralen Metallanteil unterteilt in Kupfer- / Zink-SOD (Cu- / Zn-SOD), Mangan-SOD (Mn-SOD) oder Eisen-SOD (Fe-SOD) [43, 44]. Aufgrund der hier an einigen Beispielen gezeigten essentiellen Funktionen in den enzymatischen Prozessen zur Inaktivierung von ROS werden Spurenelemente und Coenzyme zu den antioxidativ wirksamen Substanzen gezählt.

Des Weiteren zählen zu den exogenen Antioxidantien, die mit der Nahrung aufgenommen werden, beispielsweise die Vitamine C und E, Flavonoide und Carotinoide. Alimentäre Antioxidantien können aus natürlichen Quellen extrahiert oder auch synthetisch hergestellt werden. Natürliche Antioxidantien kommen in

verschiedensten Nahrungsmitteln vor, wie z.B. Pflanzenextrakten, Kakao, grünem Tee sowie insbesondere in Obst und Gemüse [45, 46]. Hierbei ist es wichtig, dass das Obst und Gemüse möglichst roh und unverarbeitet sowie so frisch wie möglich sein sollte zum Zeitpunkt des Verzehrs, um einen möglichst hohen Antioxidantiengehalt zu erreichen [47]. Neben dem bei Kontakt zu Luft entstehenden und über die Zeit fortschreitenden Oxidationsprozess können thermische Prozesse wie Erwärmung oder Kochen zu einem Verlust von Antioxidantien und anderer bioaktiver Substanzen führen [48].

2.3. Carotinoide

2.3.1. Grundlagen

Als Carotinoide werden eine große Gruppe lipophiler Farbstoffe (Lipochrome) bezeichnet, die sich bei der Absorption von kurzwelligem Licht von farblos über gelblich, orange bis rot darstellen. Carotinoide können von photosynthetisch aktiven Organismen sowie in einigen nicht-photosynthetisch aktiven Bakterien und Pilzen synthetisiert werden. Menschen und Tiere sind nicht zur *de novo* Carotinoid-Synthese fähig, sondern müssen diese mit der Nahrung aufnehmen [49]. Es sind mehr als 750 verschiedene Carotinoid-Strukturen aus der Natur bekannt und charakterisiert, davon kommen je nach Literaturangaben ca. 30 – 40 in der Nahrung des Menschen vor [50, 51].

Carotinoide können aufgrund ihrer Polarität, die bei ihrer Auftrennung in der Chromatographie sichtbar gemacht werden kann, in die zwei Hauptgruppen Carotine und Xanthophylle aufgeteilt werden. Die Carotine sind ausschließlich aus Kohlenstoff- und Wasserstoffatomen aufgebaut und die Xanthophylle sind sauerstoffhaltige Derivate von Carotinen. Dabei ist der Sauerstoffgehalt der Xanthophylle maßgeblich für ihre höhere Polarität gegenüber den Carotinen. Zu den polaren Carotinoiden gehören z.B. die Xanthophylle Astaxanthin, Lutein und Zeaxanthin zu den nicht-polaren Carotinoiden gehören z.B. die Carotine Alpha-Carotin, Beta-Carotin und Lycopin [51].

Die gemeinsame chemische Grundstruktur der Carotinoide ist das Tetraterpen, aufgebaut aus acht Isopreneinheiten und enthalten somit 40 Kohlenstoffatome. Der Aufbau der Kohlenstoffatome ist kettenartig angeordnet mit variablen Einzel- oder Doppelbindungen spezifisch für das Carotinoid [51, 52].

Zu den für den Menschen bedeutsamen Carotinoiden zählen u.a. Beta-Carotin ($C_{40}H_{56}$), Lycopin ($C_{40}H_{56}$) und Lutein ($C_{40}H_{56}O_2$), siehe Abbildungen 1 - 3. Neben ihren antioxidativen Eigenschaften können sie auch weitere für den menschlichen Organismus wichtige Wirkungen entfalten [53].

2.3.2. Lutein und Zeaxanthin

Die Carotinoide Lutein und Zeaxanthin, die in der menschlichen Retina akkumulieren, können protektiv wirken gegenüber Erkrankungen des Auges, z.B. der altersabhängigen Maculadegeneration, die eine der häufigsten Ursachen für Erblindungen ist, indem sie schädigendes photooxidatives blaues Licht absorbieren können [54-56]. Lutein kommt z.B. als gelber Farbstoff im Eidotter, aber auch in dunklem Blattgemüse wie z.B. Spinat vor [57].

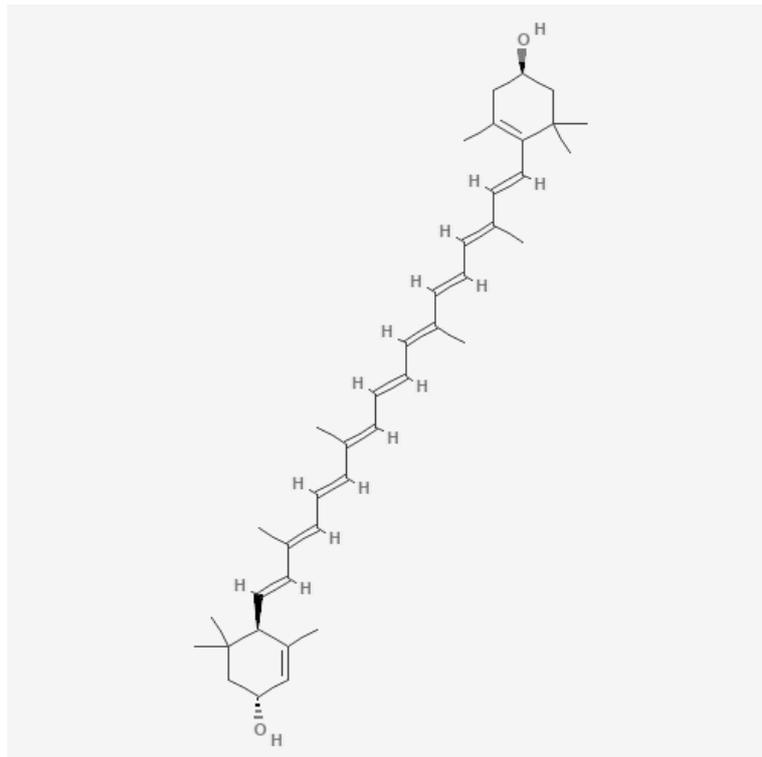


Abbildung 1: Chemische Struktur von Lutein [58]

2.3.3. Lycopin

Lycopin gilt als das Carotinoid mit dem höchsten antioxidativen Potential [59, 60], daneben wurden auch positive prebiotische Effekt auf die Darmflora beschrieben bei einer kontinuierlichen Einnahme lycopinreicher Lebensmittel [61]. Die Lycopin-Konzentration zeigt große Schwankungen im Blut und in verschiedenen Geweben. In einer Auswertung einer großen, nationalen Datenerhebung in den USA wurde beschrieben, dass die Plasma- oder Serumkonzentrationen im Bereich von ≤ 60 ng / ml bis ≥ 600 ng / ml liegen können. Hierbei wurden auch Abhängigkeiten der Lycopin-Konzentration im Blut beschrieben zum Alter, sozioökonomischem Status, Ernährungsgewohnheiten und Rauchverhalten der untersuchten Probanden [60]. Niedrige Lycopinkonzentrationen im Blut können erklärt werden durch eine verminderte Aufnahme mit der Ernährung, einer verminderten Absorption, z.B. bei Patienten, die an einem metabolischen Syndrom leiden sowie der daraus resultierenden verminderten Bioverfügbarkeit oder durch einen vermehrten Abbau durch RONS-assoziierte Erkrankungen [61, 62]. Lycopin kommt beispielsweise in hohen Konzentrationen in Tomaten [63] und Wassermelonen [64] vor, was sich auch in der roten Farbe widerspiegelt.

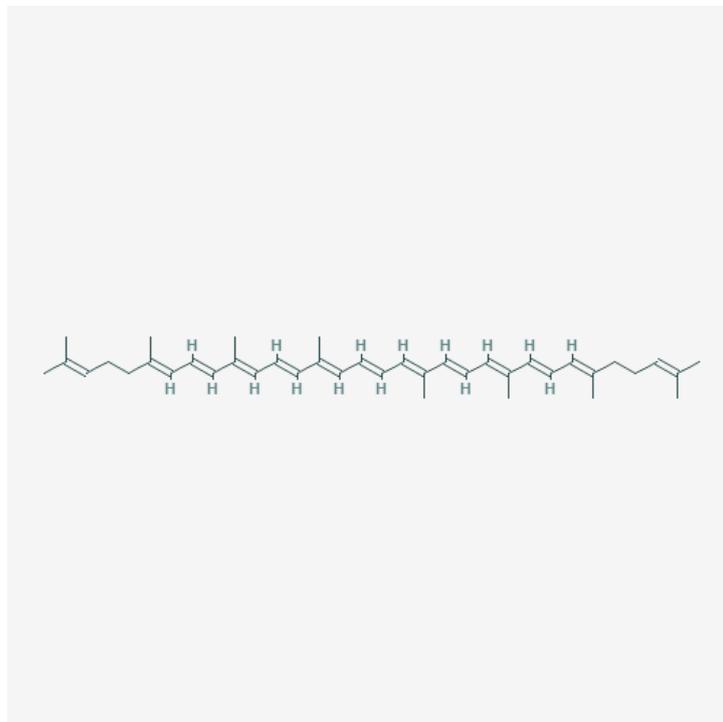


Abbildung 2: Chemische Struktur von Lycopin [65]

2.3.4. Beta-Carotin

Ein weiteres Beispiel ist Beta-Carotin, das in vielen Obst- und Gemüsesorten, beispielsweise in Karotten, Süßkartoffeln [49] und Grünkohl [66] vorkommt. Beta-Carotin spielt eine zentrale Rolle in der Vitamin-A-Synthese, es wird auch als Provitamin A bezeichnet, da es die wichtigste Vorstufe des Vitamin A ist. Beta-Carotin kommt reichlich in unserer Ernährung vor und wird nach Absorption im Darm in den Enterozyten der intestinalen Mucosa durch die Beta-Carotin-15,15'-Monoxygenase (BCMO1) zu Vitamin A konvertiert. Im Tierversuch konnte *in vivo* in einer Studie von Barua et al. gezeigt werden, dass ca. 95% der Retinoide aus Beta-Carotin auf diesem Weg entstehen [67]. Beta-Carotin zeigt einen Absorptionspeak bei ~450 nm im sichtbaren Spektrum, der für seine orange-rötliche Farbe verantwortlich ist [68]. Aus den Carotinen entsteht durch oxidative Spaltung das Retinal, dieses kann zu Retinol bzw. Retinoat umgewandelt werden [69]. Retinal und seine durch von ihm ausgehenden Retinoate beeinflussen viele physiologische Vorgänge wie z.B. beim Sehvorgang, als essentieller Bestandteil des Rhodopsins [70], beim Zellwachstum, der Embryogenese und Fertilität [71]. Gleichzeitig können sowohl ein ausgeprägter Mangel als auch ein Überschuss an Vitamin A sich toxisch auf den menschlichen Organismus und insbesondere seine Entwicklung ausbilden [72].

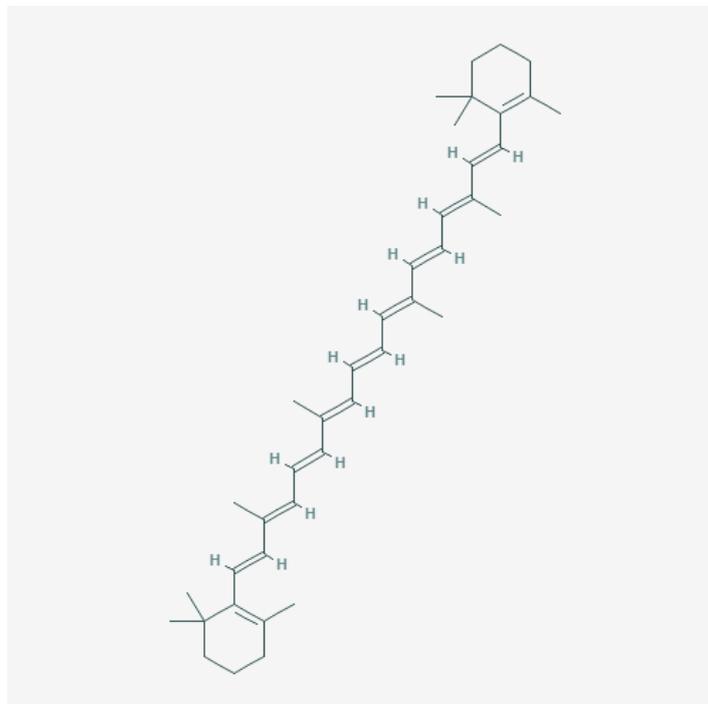


Abbildung 3: Chemische Struktur Beta-Carotin [73]

Aufgrund der vielen durch exogene Antioxidantien hervorgerufenen positiven Wirkungen auf den menschlichen Organismus gibt es zahlreiche potentielle Anwendungsgebiete in der Pharma-, Lebensmittel- und Kosmetikindustrie. Des Weiteren wurden bereits in einer Vielzahl von Interventionsstudien durch eine zusätzliche Supplementierung mit alimentären Antioxidantien über einen begrenzten Zeitraum messbare Effekte bei Probanden beschrieben. Gleichzeitig wird die hochdosierte Supplementierung von einzelnen Antioxidantien bei Patienten sowie auch an gesunden Probanden kritisch bewertet.

2.4. Haut

2.4.1. Grundlagen – Funktion und Anatomie der Haut

Die Haut ist das grösste Organ des menschlichen Körpers, gibt diesem seine äußere Erscheinung und bildet die wichtigste Schutzbarriere gegen externe, potentiell schädigende Einwirkungen physikalischer, chemischer oder mikrobiologischer Natur. Die Haut spielt eine entscheidende Rolle im Immun-, Nerven- und endokrinen System des Organismus, die miteinander interagieren. Die Haut ist maßgeblich beteiligt an der Thermoregulation, Regulierung des Flüssigkeitshaushaltes und metabolischen Prozessen, insbesondere am Vitamin-D-Stoffwechsel [74].

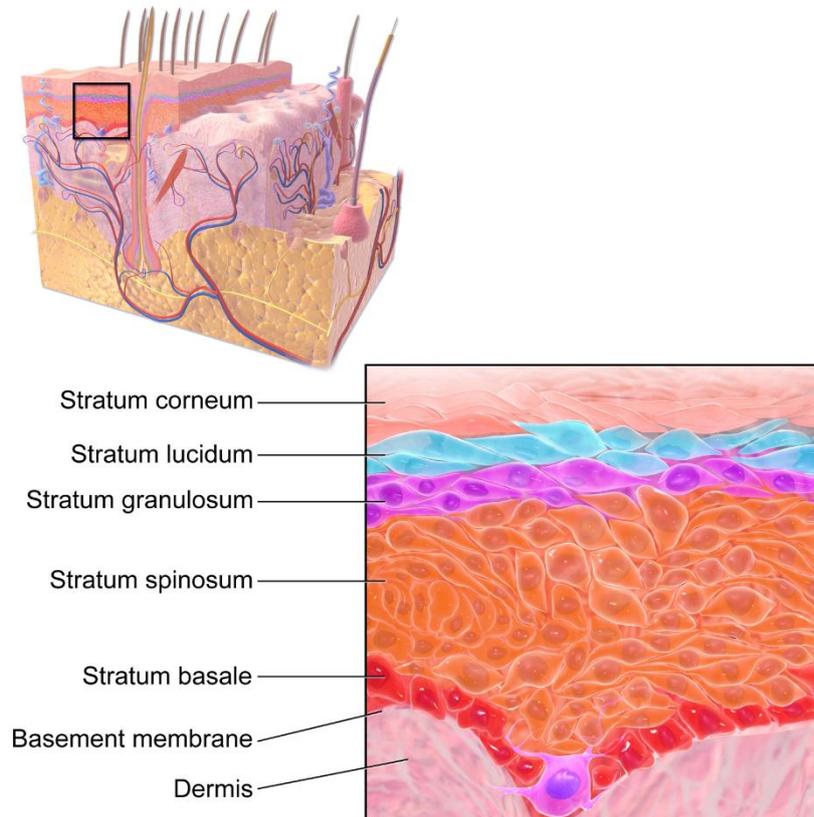


Abbildung 4: Aufbau der Haut und Epidermis (aus [75])

Die Haut ist aus mehreren Schichten (siehe Abbildung 4) und verschiedenen Zellen aufgebaut, die unterschiedlichen Funktionen dienen. Über dem subkutanen Fettgewebe, das vorwiegend aus Lipozyten aufgebaut ist sowie Drüsen und Blutgefäße enthält, liegt die Dermis (Korium), die sich wiederum aufteilen lässt in ein Stratum papillare, das mit der Epidermis verzahnt ist und das tiefer gelegene Stratum reticulare, das dem subkutanen Fettgewebe aufliegt. Die Dermis ist überwiegend aus Fibrozyten aufgebaut, enthält aber auch Mastzellen und Lymphozyten, Mechanorezeptoren, Schweißdrüsen und Haarfollikel sowie interstitielle Kollagenfasern, die der Haut ihre Elastizität und Zugfestigkeit verleihen. Die äußerste Schicht der Haut bildet die Epidermis, ihre Dicke schwankt zwischen 0,04 mm (z.B. Augenlider) und 1,5 mm (Handinnenflächen und Fußsohlen) [76]. Die Epidermis ist wiederum aus fünf Schichten aufgebaut von denen die äußerste das Stratum corneum ist mit einer Dicke von 0,02 - 0,5 mm. Das Stratum corneum besteht vornehmlich aus Corneozyten, abgeflachten und abgestorbenen keratinhaltigen Zellen, und bilden eine mechanische Barrierschicht. Die übrige

Epidermis besteht zu überwiegendem Teil aus Keratinozyten (ca. 90 %), einen geringen Anteil machen auch Melanozyten, Langerhans- und Merkel-Zellen aus [76, 77].

2.4.2. Sonnenlicht-induzierte Hautschädigungen

Die Haut ist häufig und direkt potentiell schädigenden, pathogenen und oxidativen Einflüssen ausgesetzt. Sonnenlicht-Exposition ist für den Menschen für wichtige Stoffwechselforgänge wie der Vitamin-D-Synthese unabdingbar. Andererseits kann Sonnenlicht auch inflammatorische, photooxidative sowie abnorme phototoxische und -allergische Reaktionen wie z.B. Lichtdermatosen auslösen [78].

Eine exzessive oder kumulativ andauernde Sonnenlichtexposition bzw. –absorption der Haut führt zur Generierung von ROS und photooxidativem Stress. Abhängig von der Dosis kann dies akute reversible Schäden zur Folge haben wie ein Erythem (Sonnenbrand) sowie zum Teil irreversible Schäden wie vorzeitige lichtbedingte Hautalterung (auch als „Photoageing“ bezeichnet). UV-Exposition wirkt lokal und systemisch immunsuppressiv wobei durch diese Effekte die Entstehung von Hauttumoren getriggert werden kann [79].

Eine Studie von Albrecht et al. [80] konnte zeigen, dass nicht nur die auf der Erdoberfläche auftreffende UV-Strahlung mit UVA 320 – 400 nm und UVB 280 - 320 nm, sondern auch der sichtbare (VIS; visible) und der nahinfrarote (NIR) Bereich des Sonnenlichtspektrums die Produktion freier Radikaler induzieren. Dabei ist das Ausmaß der Radikalproduktion sowie der Hautschädigung abhängig von der Wellenlänge und unterscheidet sich für die verschiedenen Hauttypen der Fitzpatrick-Klassifikation [81] zum Teil erheblich.

2.4.3. Schutzmechanismen der Haut

Die Haut ist nicht schutzlos der potentiell schädigenden Wirkungen des Sonnenlichtspektrums ausgesetzt, sondern besitzt eine Vielzahl komplexer photoprotektiver Mechanismen. Zu diesen gehören eine Verdickung der Epidermis, die UV-Strahlung reflektiert und streut, DNA-Reparaturmechanismen, Apoptose und Hautpigmentation durch induzierte Melaninproduktion [79]. Des Weiteren verfügt die menschliche Haut über vielfältige enzymatische und nicht-enzymatische Antioxidantien deren Verteilung bezogen auf die Hautschichten unterschiedlich ist. In einer Studie von Shindo et al. [82] konnte anhand von Hautbiopsien gesunder Probanden gezeigt werden, dass die Konzentration aller gemessenen enzymatischen und nicht-enzymatischen Antioxidantien in der Epidermis, die als äußerste Hautschicht die initiale Barrierefunktion erfüllt, höher war als in der darunterliegenden Dermis. Insbesondere die Katalase-Aktivität war in der Epidermis deutlich höher als in der Dermis.

Eine Vielzahl von Studien konnte eine Assoziation zwischen der systemischen Wirkung von oral eingenommenen Antioxidantien und photoprotektiven Effekten belegen. So zeigten Groten et al. [83] in einer doppel-blinden, Placebo-kontrollierten Cross-over-Studie, dass die Einnahme eines Lycopin-reichen Nahrungsergänzungsmittel aus Tomaten über 12 Wochen UV-induzierte photooxidative Schäden in gesunden Probanden gegenüber einem Placebo zu reduzieren vermag. Neben einer signifikanten Erhöhung der Plasmakonzentration von Carotinoiden konnte auch eine Reduktion proinflammatorischer Zytokine (TNF- α und IL-6) gezeigt werden.

2.4.4. Antioxidatives Potential (AOP) der Haut

Als antioxidatives Potential der Haut wird deren Fähigkeit und Kapazität bezeichnet oxidativen Stress durch ROS und andere freie Radikale zu neutralisieren. In dieser Arbeit haben wir als Parameter dazu die Carotinoidkonzentration in der Haut herangezogen. Dem liegen die folgenden Überlegungen zugrunde.

Alle antioxidativ wirksamen Substanzen interagieren und zeigen synergistische Effekte indem sie sich gegenseitig vor dem Angriff der unterschiedlichen Typen freier Radikaler

schützen [84]. Gelingt es eine der effektivsten und in hoher Konzentration vorhandenen Antioxidantien zu detektieren, sind Rückschlüsse auf das gesamte AOP möglich. Carotinoide stellen solch eine Markersubstanz dar [85, 86]. Zu den Carotinoiden mit der höchsten Konzentration in der Haut gehören Lycopin, Alpha-Carotin, Beta-Carotin, Phytoen und Phytofluon, wobei die Carotine einen Gesamtanteil von 60 – 70% [87] repräsentieren. Das Carotinoidbasierende AOP ist gleichzeitig eine den Antioxidantienstatus des gesamten Organismus charakterisierende Größe. Meinke et al. wiesen nach, dass die Konzentration der Hautcarotinoide mit der Carotinoidkonzentration im Blut korreliert [88].

In zahlreichen Studien wurde gezeigt, dass sich oxidative sowie antioxidative Effekte auf den Organismus durch bestimmte Ernährungs- und Lebensweisen in der kutanen Carotinoidkonzentration messbar widerspiegeln [89, 90]. Das stützt die Festlegung die kutane Carotinoidkonzentration als Surrogatparameter zu nutzen um den antioxidativen Status eines Menschen zu quantifizieren, wobei unter bestimmten Bedingungen Rückschlüsse auf dessen Lebensweise möglich werden [17, 91].

Die Antioxidantienkonzentration bestimmt wesentlich die Alterungsprozesse unseres Körpers, insbesondere auch der Hautalterung mit. So konnte in einer Studie an 40- bis 50-Jährigen, welche ihren Lebensstil über ein Jahrzehnt kaum verändert hatten, festgestellt werden, dass Personen mit einer hohen Hautkonzentration von Antioxidantien eine deutlich geringere Hautalterung aufweisen als Personen mit niedrigen Werten [92].

Die topische Applikation von Antioxidantien auf der Haut erlaubt die gezielte Anreicherung von Antioxidantien in der Haut. Nach regelmäßiger Anwendung ist diese signifikant erhöht messbar [93, 94]. Abgesehen von milden Unverträglichkeits- oder allergischen Reaktionen traten keine negativen Effekte bei den in der Vergangenheit durchgeführten Studien auf. Bei dermalen Entzündungsprozessen oder auch nach Bestrahlungen oder Chemotherapie kommt es zu oxidativem Stress in der Haut [95, 96]. Eine Studie von Jung et al. zeigte, dass die tägliche Applikation einer hoch konzentrierten antioxidantienhaltigen Creme mit einem Radical Protection Factor (RPF) von über 5000 die Symptome und Inzidenz eines Hand- und Fußsyndroms unter Chemotherapiepatienten verringern konnte [97].

Erschwert wird die dermale Anreicherung von hoch konzentrierten Antioxidantien bei lokaler Applikation auf die Haut durch deren Luftsauerstoff bedingte Oxidation verbunden mit schnellem Effektivitätsverlust [98].

2.4.5. Resorption der Carotinoide

Die Löslichkeit der Antioxidantien spielt auch eine entscheidende Rolle im Hinblick auf ihre Absorptionswege und Effektivität bzw. Bioverfügbarkeit. So gibt es hydrophile Antioxidantien, wie z.B. Vitamin C und Glutathion, und hydrophobe bzw. lipophile Antioxidantien, wie z.B. Tocopherole und Carotinoide. Die lipophilen, mit der Nahrung aufgenommenen Carotinoide werden hauptsächlich im Dünndarm resorbiert, sie werden hier in aus Lipiden und Gallensalzen gebildeten Mizellen eingelagert, die klein genug sind um zwischen die Mikrovilli der Darmepithelien einzudringen und den für die Absorption wichtigen engen Kontakt zur Lipidschicht der Zellmembran der Enterozyten herzustellen in der sie sich lösen [99]. Anschliessend werden die Carotinoide mit anderen resorbierten Nahrungslipiden in Chylomikronen inkorporiert und über Lymphgefäße abtransportiert, in die Blutbahn sezerniert und erscheinen dort sowie in einigen Geweben. Dabei hat das menschliche Intestinum nur eine begrenzte Kapazität intaktes Beta-Carotin in das Lymphsystem zu absorbieren [100]. Im Blut werden Carotinoide gebunden an Lipoproteine transportiert, vor allem VLDL (very low density lipoproteins), LDL (low density lipoproteins) und HDL (high density lipoproteins). Die im Blut zirkulierenden Carotinoide gelangen dann über Schweißdrüsen und das Sebum aus der Cutis auf die Hautoberfläche und diffundieren anschließend retrograd in das Stratum corneum, die oberste Schicht der Epidermis, welche somit als ein Reservoir dienen kann [101].

Rock et al. [102] haben in einer Studie an gesunden männlichen Probanden, die über 13 Wochen eine Carotinoid-arme Ernährung in kontrollierter Umgebung zu sich nahmen, mittels HPLC-Methode (Hochleistungsflüssigkeitschromatographie) die Plasma-Carotinoidkonzentrationen gemessen. Hier zeigte sich ein nicht-linearer Konzentrationsabfall mit besonders rapidem Abfall an Tag 2-3 und Tag 14-15, was die Vermutung zulässt, dass es mindestens zwei Pooling-Systeme im menschlichen Körper gibt wovon einer eine schnellere Umsatzrate besitzt. Die durchschnittliche Halbwertszeit

der gemessenen Carotinoide gibt die Arbeitsgruppe wie folgt an: für Beta-Carotin weniger als 12 Tage, für Lycopin zwischen 12-13 Tagen und für Zeaxanthin / Lutein zwischen 33-61 Tagen.

Die lipophilen Carotinoide zeigen auch eine unterschiedliche Verteilung auf die Hautschichten bzw. anatomischen Regionen. Eine Studie von Darvin et al. [85] konnte zeigen, dass sich der Großteil im oberen Anteil des Stratum corneum befindet. Insbesondere konnten hier hohe Konzentrationen im Stratum corneum der Stirn sowie der Handinnenflächen gemessen werden im Vergleich zum Unterarm. Dies wurde der an diesen Arealen besonders hohen Dichte an Schweiß- und Talgdrüsen zugeschrieben. Diese Ergebnisse unterstützen auch die Vermutung, dass Antioxidantien wie z.B. Carotinoide über eccrine Schweiß- und Talgdrüsen an die Hautoberfläche sezerniert werden, da auch im Schweiß antioxidative Carotinoide bereits nachgewiesen werden konnten [103].

Gestützt werden diese Beobachtungen auch bei der als Aurantiasis cutis (Synonyme: Karotinoase, Hyperkarotinämie, Xanthochromie) bekannten, nutritiv oder stoffwechselbedingten, sonst harmlosen Gelbfärbung der Haut [104]. Klinisch fällt vor allem eine Gelbfärbung der Haut und der Nägel mit Verstärkung an Handflächen und Fußsohlen auf. Weitere betroffene Lokalisationen sind das Gesicht und die Achseln. Die Skleren sowie die Schleimhäute sind von der Gelbfärbung nicht betroffen, was sie differentialdiagnostisch vom Ikterus abgrenzt. Histologisch findet sich eine Gelbfärbung der gesamten Epidermis, insbesondere der Hornschicht [104]. Die Aurantiasis cutis ist vor allem auf den exzessiven Verzehr Carotin-reicher Nahrungsmittel oder Nahrungsergänzungsmittel zurückzuführen, die zu erhöhten Carotin-Spiegeln im Blut und -ablagerungen in der Haut führen. Insbesondere können auch Kinder davon betroffen sein. Teilweise ist die Aurantiasis cutis auch assoziiert mit metabolischen Störungen wie Diabetes mellitus, Hypothyreose, Nephrosesyndrom, Anorexia nervosa oder tritt in der Schwangerschaft auf [105].

2.4.6. Messmethoden

In der Literatur werden unterschiedlichste Messverfahren beschrieben, um die Konzentration von Antioxidantien *in vivo* qualitativ und quantitativ zu messen. Etablierte Verfahren sind chromatographische Messmethoden wie die lange als Goldstandard geltende HPLC (high performance liquid chromatography bzw. Hochleistungsflüssigkeitschromatographie, früher auch als high pressure liquid chromatography bzw. Hochdruckflüssigkeitschromatographie bezeichnet). Bei der HPLC werden in Lösung befindliche Stoffe aufgrund ihrer Polarität chromatographisch aufgetrennt und detektiert. Nachteil der HPLC wie auch vieler anderer Methoden ist die invasive Materialgewinnung der zu messenden Proben durch Hautbiopsien oder Blutentnahmen [106, 107]. Die Sensitivität des Messverfahrens kann auch vermindert werden, wenn es bei der Probenentnahme durch Kontakt zu Luft oder notwendigen Reagenzien zum Verlust von Antioxidantien kommt. Das erhaltene Messresultat wird dann von dem eigentlichen Status *in vivo* abweichen. Darüber hinaus sind eine Vielzahl von Biomarkern und Tracern identifiziert worden, die Hinweise auf den antioxidativen Status eines Organismus geben [108, 109]. So führt die Elektronenspinresonanzspektroskopische Bestimmung des Radikalschutzfaktors (RPF) zu einem Wert, der angibt wieviel freie Radikale durch 1 mg Haut neutralisiert werden können [110].

Als non-invasive Messmethoden zur Quantifizierung von Antioxidantien in der Haut haben sich optische Verfahren wie z.B. die Raman-Resonanz-Spektroskopie und Reflexionsspektroskopie etabliert, diese Messungen sind zudem günstig bezogen auf den Zeit- und Kostenaufwand [111].

2.5. Fragestellung

Eine Vielzahl von Faktoren führt in Organismen zur Generierung von überschüssigen ROS und anderen freien Radikalen. Ein Überschuss freier Radikale bedeutet oxidativer Stress, der als Grund für beschleunigte Alterungsprozesse bis hin zur Tumorinitialisierung angesehen wird. Dem menschlichen Organismus steht ein vielschichtiges Schutzsystem zur Verhinderung dieser schädigenden Effekte zur Verfügung. Eine Schlüsselrolle nehmen dabei Antioxidantien ein. Wichtige Antioxidantien, wie z.B. Vitamin C oder Carotinoide, müssen mit der Nahrung

aufgenommen werden, da der menschliche Organismus diese selbst nicht de novo synthetisieren kann. Für die Effektivität alimentärer Antioxidantien ist die Menge, die Kombination der unterschiedlichen antioxidativen Substanzen und deren Bioverfügbarkeit entscheidend. In der Literatur wird die Gabe einzelner hochdosierter Antioxidantien als Nahrungsergänzungsmittel trotz nachgewiesener positiver Effekte sehr kritisch bewertet [112, 113]. Nach Neuhouser et al. hat sich die Kombination mehrerer antioxidativ wirksamer Komponenten in niedrigeren Konzentrationen wie beim Verzehr von antioxidantienreichem Gemüse und Obst, der hochdosierten Einzelapplikation als überlegen erwiesen [114].

Die Wirkung alimentärer Antioxidantien im Organismus, die sich auch in der Antioxidantienkonzentration in der Haut widerspiegelt, wurde in zahlreichen (Interventions-)Studien mit Hilfe einer Vielzahl verschiedener Biomarker nachgewiesen. Die Arbeitsgruppe Prof. Lademann der Charité Universitätsmedizin Berlin hat für hautphysiologische Untersuchungen neben der Raman-Resonanz-Spektroskopie eine neue non-invasive reflektionsspektroskopische Methode etabliert [115]. Mit dieser Methode ist die kutane Carotinoidkonzentration *in vivo* zuverlässig bestimmbar. Es konnte gezeigt werden, dass das antioxidative Potential der Haut ein zuverlässiger Indikator für den gesamten antioxidativen Status des Organismus darstellt, der Rückschlüsse auf die Lebens- und Ernährungsgewohnheiten eines Menschen zulässt [17, 116].

Ziel der Dissertation war es die Kinetik der Carotinoidkonzentration von zwei aus frischen Zutaten hausgemachten grünen Smoothies *in vitro* mit der eines kommerziell erhältlichen grünen Smoothies vergleichend zu untersuchen. Es ist bekannt, dass Emulsionssysteme, wie frisch hergestellte Smoothies sie darstellen, semistabil sind. Der Prozess zur Ausbildung der stabilen Emulsion erfordert Zeit. Die durch den mechanischen Zerkleinerungsprozess aus den Komponenten erhaltenen hochaktiven Antioxidantien sind grossen Mengen Sauerstoff ausgesetzt. Ein rapider Abfall der Carotinoidkonzentration ist daher zu erwarten. Die Konsequenzen aus dem kinetischen Verhalten für die Anwendung der selbstgemachten Smoothies sollen aufgezeigt werden.

In einer parallel zu diesen Untersuchungen laufenden Studie mit 20 Probanden sollte folgende Hypothese verifiziert werden: Die hausgemachten grünen Smoothies haben eine höhere initiale aktive Carotinoidkonzentration *in vitro* als das kommerzielle Produkt.

Bei täglicher Einnahme von 250 ml pro Tag sollten daher die hausgemachten Smoothies zu einem schnelleren Anstieg der kutanen Carotinoidkonzentration bei gesunden Probanden führen als bei Verzehr des kommerziellen Produktes.

3. Material und Methoden

3.1. *In vitro* Studie

3.1.1. Studiendesign der *in vitro* Studie

Die *in vitro* Studien wurden durchgeführt um die Quantität und Kinetik der Carotinoidkonzentration der frisch zubereiteten grünen Smoothies gegenüber dem kommerziellen grünen Smoothie mittels Resonanz-Raman-Spektroskopie (RRS) zu bestimmen. Zwei verschiedene hausgemachte grüne Smoothies (Smoothie A und B, s. Tabelle 1) sowie ein kommerzieller grüner Smoothie wurden über einen Zeitraum von 24 Stunden untersucht. Die Zeitpunkte der RRS-Messungen der frisch zubereiteten sowie des kommerziellen Smoothies waren:

t0 = unmittelbar nach Zubereitung der frischen Smoothies bzw. Öffnen des kommerziellen Smoothies,

t1 = 10 Minuten nach Zubereitung bzw. Öffnen,

t2 = 30 Minuten nach Zubereitung bzw. Öffnen,

t3 = 1 Stunde nach Zubereitung bzw. Öffnen,

t4 = 2 Stunden nach Zubereitung bzw. Öffnen,

t5 = 6 Stunden nach Zubereitung bzw. Öffnen,

t6 = 12 Stunden nach Zubereitung bzw. Öffnen,

t7 = 24 Stunden nach Zubereitung bzw. Öffnen.

Während einer 24 Stunden dauernden Messung wurden die Smoothies jeweils zu den Messzeitpunkten t_0 bis t_7 untersucht. Um eventuelle saisonale Unterschiede im Antioxidantiengehalt der frischen Früchte- und Gemüsesorten auszugleichen, wurden Messungen im Winter ($n=1$) sowie im Frühling ($n=6$) durchgeführt. Insgesamt wurden $n=7$ Messungen pro Messzeitpunkt durchgeführt und deren Mittelwerte aus den verschiedenen Messungen gebildet.

3.1.2. Material der *in vitro* Messungen

Die Zusammensetzung der zwei hausgemachten Smoothies A und B sowie des kommerziellen Smoothies sind in Tabelle 2 dargestellt. Die hausgemachten Smoothies wurden aus frischen Komponenten hergestellt, indem sie in einem handelsüblichen Mixer für die Dauer von 2 Minuten zerkleinert wurden bis sich eine homogene Flüssigkeit ergab. Unmittelbar nach Zubereitung wurden die zu untersuchenden Proben entnommen, in Küvetten gefüllt und die RRS-Messungen durchgeführt. Entsprechend wurde das kommerzielle Smoothie-Produkt vor Öffnen des versiegelten Verschlusses geschüttelt, um eine repräsentative, vergleichbar homogene Probe zu erhalten. Anschließend erfolgte der gleiche Ablauf wie für die RRS-Messungen der hausgemachten Smoothies beschrieben.

Zusammensetzung Smoothie A, 250 mL:

- ein halber Apfel (mit Schale, 90g)
- eine halbe Banane (ohne Schale, 60g)
- ein Esslöffel frischer Zitronensaft (15 mL)
- 100 mL stilles Wasser
- 20 g Kopfsalat / Lollo bionda

Zutaten Smoothie B, 250 mL:

- eine Kiwi (ohne Schale, 70g)
- eine halbe Banane (ohne Schale, 60g)
- 100 mL stilles Wasser
- 30 g Baby-Spinat

Zutaten kommerzieller Smoothie „Innocent green smoothie“, 250 mL:

- 49% Apfelsaft,
- 29% Birnenpüree,
- Pfirsichpüree,
- 6% Zucchini-püree
- Orangensaft,
- 1.6% Spinatpüree
- 1.6% Grünkohlpüree
- Zitronensaft
- 0.4% Saflor- und Spirulina-Extrakt,
- 0.02%. Baobab-Frucht-Extrakt

Tabelle 2: Zusammensetzung der grünen Smoothies A und B sowie des kommerziellen grünen Smoothies [117, 118]

Die Nährwertangaben der drei grünen Smoothies sind in Tabelle 3 aufgeführt, sie wurden berechnet anhand der gewichts- bzw. volumenadaptierten durchschnittlichen Nährwerte der jeweiligen frischen Zutaten aus der USDA Nutrient Database [119]. Die Zutaten- sowie Nährwertangaben des kommerziellen Smoothies wurden vom Hersteller übernommen sowie mit Daten einer unabhängigen Quelle abgeglichen [117, 118].

	Smoothie A (250 ml) ^a	Smoothie B (250 ml) ^a	Kommerzieller Smoothie (250 ml) ^b
Energie [kcal / kJ]	106.5 / 444.9	103 / 439.3	123,7 / 517,5
Proteine [g]	1.2	2.3	1.5
Fett [g]	0.4	0.7	3
Kohlenhydrate [g]	27.7	25.1	26
davon Zucker [g]	17.2	13.7	26
Ballaststoffe [g]	4.1	4.4	2.2
Natrium [mg]	11.25	30.4	0

^a Nährwertangaben von Smoothie A und B berechnet auf Grundlage der USDA Nutrient Database [119] ^b Angaben des Herstellers und einer unabhängigen Quelle [117, 118]

Tabelle 3: Nährwertangaben der untersuchten Smoothies

3.1.3. Resonanz-Raman-Spektroskopie (RRS)

3.1.3.1. Theoretische Grundlagen und Raman-Effekt

Die hier verwendeten Messmethoden der Resonanz-Raman-Spektroskopie beruhen auf dem physikalischen Prinzip des Raman-Effekts, benannt nach dem indischen Physiker Sir Chandrasekhara Venkata Raman, der diesen 1928 das erste Mal experimentell nachweisen konnte und im Zuge dessen für seine Arbeit 1930 den Nobelpreis erhielt.

Sir Raman hatte sich schon seit den frühen 1920er Jahren mit der Streuung von Licht beschäftigt. Er konnte zeigen, dass die blaue Farbe des Meeres nicht nur durch die Reflektionen des Himmels zustande kommt, wie ursprünglich von dem Mathematiker und Physiker Lord Rayleigh vermutet, sondern auch durch die Streustrahlung der Meerwassermoleküle selbst [120]. Die theoretischen Grundlagen dieses Phänomens waren schon 1923 durch die Physiker Adolf Smekal [121] sowie 1925 durch Hendrik Kramers und Werner Heisenberg [122] gelegt worden [120].

Sir Raman konnte beweisen, dass bei der Bestrahlung von Molekülen mit monochromatischem Licht Streustrahlung mit derselben Frequenz wie der Lichtquelle auftritt sowie daneben auch Streustrahlung mit einer verschobenen, d.h. einer anderen Frequenz als der der Lichtquelle [123]. Bei diesem nach ihm benannten Raman-Effekt entstehenden Spektrallinien, die gegenüber der Frequenz der Lichtquelle verschoben sind, diese werden auch als Raman-Linien bezeichnet. Die Frequenzunterschiede zum eingestrahlt Licht entsprechen den für das Material charakteristischen Eigenschaften bzw. Energien. Somit lassen sich aus dem emittierten Spektrum Rückschlüsse auf die Substanzen ziehen. Die Raman-Frequenzverschiebungen sind also spezifisch für das streuende Molekül, sodass Rückschlüsse zu dessen Quantität gezogen werden können. Dem Raman-Effekt zugrunde liegt eine Wechselwirkung zwischen dem eingestrahlt monochromatischen Licht und den von ihm bestrahlten Molekülen, d.h. eine Wechselwirkung zwischen den Photonen des Lichts mit einer bestimmten Energie und Frequenz und der bestrahlten Materie. Das eingestrahlt Licht wird dabei inelastisch und elastisch gestreut. Bezogen auf das eingestrahlt Licht überwiegt der Anteil der elastischen Streuung deutlich gegenüber der inelastischen Streuung.

Bei der elastischen Streuung verändert sich der Energiezustand des Moleküls nicht, auch die Frequenz der Streustrahlung bzw. der Photonen verändert sich nicht zur Frequenz der Lichtquelle, diese Streustrahlung wird auch als Rayleigh-Streuung bezeichnet.

Der Raman-Effekt bzw. Raman-Streuung umfasst sämtliche inelastische Streuung bei der es zu einer Übertragung von Schwingungsenergie zwischen den Photonen und dem Molekül kommt. Dabei kann das gestreute Photon entweder Schwingungsenergie von der Materie aufnehmen (Anti-Stokes-Streuung) oder es kann Schwingungsenergie an die Materie abgeben (Stokes-Streuung).

Bei der Stokes-Streuung besitzt die Materie nach dem Aufeinandertreffen mit den Photonen höhere Schwingungsenergie, das Streulicht ist dabei energieärmer geworden

und weist damit eine niedrigere Frequenz auf als die Lichtquelle; die emittierten Spektrallinien werden auch als Stokes-Linien bezeichnet.

Bei der Anti-Stokes-Raman-Streuung kommt es umgekehrt zu einer Übertragung von Schwingungsenergie von der Materie auf das gestreute Photon, welches nun eine höhere Energie und höhere Frequenz aufweist, die beobachtbaren Spektrallinien werden als Anti-Stokes-Linien bezeichnet. Dieser Fall ist nur möglich, wenn sich das Molekül vor der Wechselwirkung auf einem höheren Energieniveau befindet.

3.1.3.2. Versuchsaufbau der RRS-Messungen *in vitro*

Der hier verwendete RRS-Aufbau wurde durch unsere Arbeitsgruppe bereits in verschiedenen Experimenten detailliert beschrieben und publiziert [111, 124] als non-invasive, schnelle optische Methode zur qualitativen sowie quantitativen Bestimmung von antioxidativen Substanzen *in vivo* und *in vitro*. Insbesondere konnte die RRS auch als Verfahren zur Bestimmung der antioxidativen Carotinoide in Nahrungsmitteln etabliert werden [125]. Der hier verwendete RRS-Aufbau ist in den Abbildungen 5 a und 5 b dargestellt.

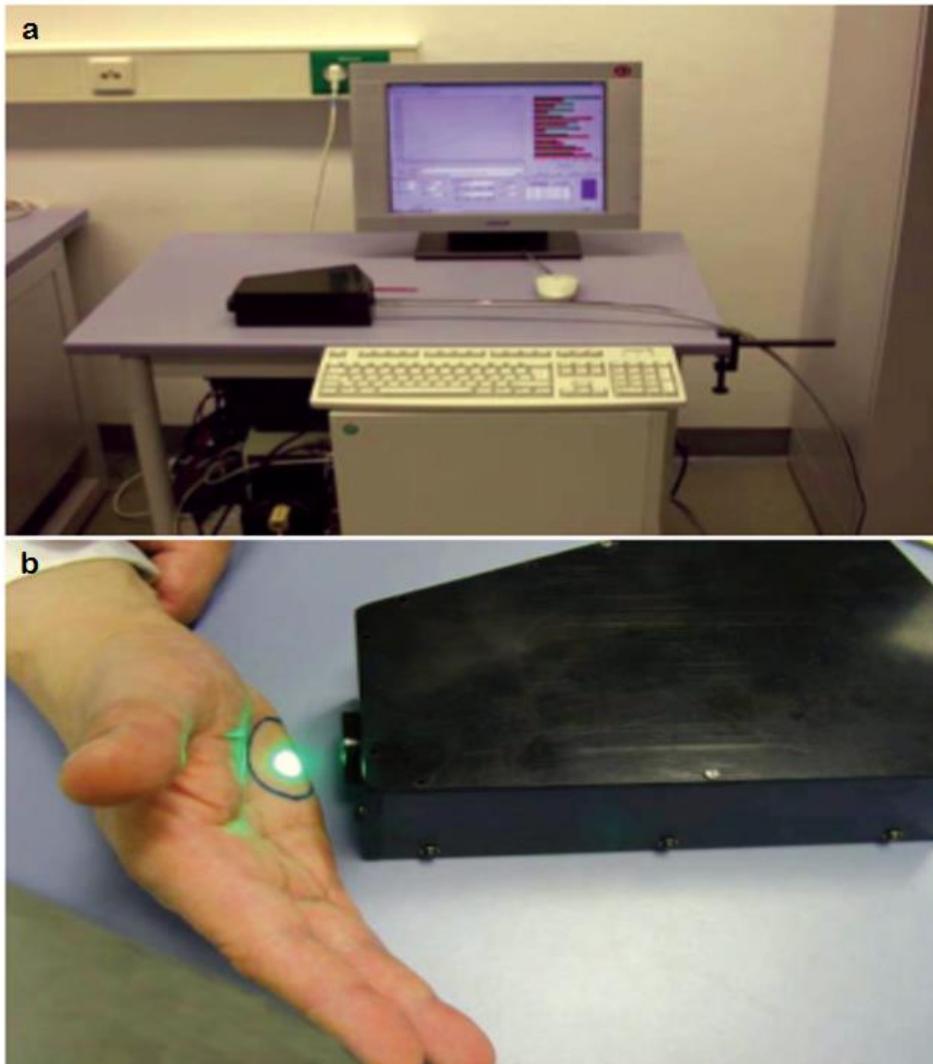


Abbildung 5.a und 5.b : Fotos (aus [125]) des Aufbaus für die RRS-Messungen *in vitro*

Es wurde in der hier vorliegenden Studie für die Exzitation der Raman-Spektren der Carotinoide in den Smoothies ein Argon-Laser mit einer Wellenlänge von 488 nm sowie einer Intensität von 33 W/cm^2 verwendet [126]. Hierbei wird der Argonlaser gefiltert und fokussiert auf die Probe gerichtet. Die Raman-Linien der Probe werden durch eine Linse gesammelt und über optische Faserkabel zu einem Spektrographen geleitet. Dieser ist wiederum mit einer CCD-Kamera (engl. charge-coupled device) verbunden, die das Spektrum aufnimmt bzw. die Strahlung detektiert, in ein elektronisches Signal umwandelt und an einen Computer zur Auswertung weiterleitet. Die Messungen wurden jeweils dreimal wiederholt, die drei Messergebnisse gemittelt und in unskalierten Einheiten (b.E., engl. Arbitrary units = a.u.) wiedergegeben [85].

Die verschiedenen Carotinoide Alpha-, Beta-, Gamma-, Sigma-Carotin, Lutein, Zeaxanthin, Lycopin und ihre Isomere besitzen ähnliche Absorptionsspektren im blauen Bereich des sichtbaren Lichtspektrums, z.B. bei 488 nm (siehe Abbildung 6). Aus diesem Grund induziert das eingestrahlte Licht bei ihnen auch ein ähnliches Raman-Signal in diesem Spektralbereich. Im grünen Bereich des optischen Spektrums zeigt lediglich Lycopin hohe Absorptionswerte verglichen mit den anderen genannten Carotinoiden. Das Absorptionsverhalten wird durch die chemische Struktur der Moleküle bzw. die Anzahl der konjugierten Kohlenstoff-Doppelbindungen C=C bestimmt wovon die Carotine, Lutein und Zeaxanthin jeweils neun und nur Lycopin 11 besitzt, siehe hierzu auch Abbildungen 1-3 [127].

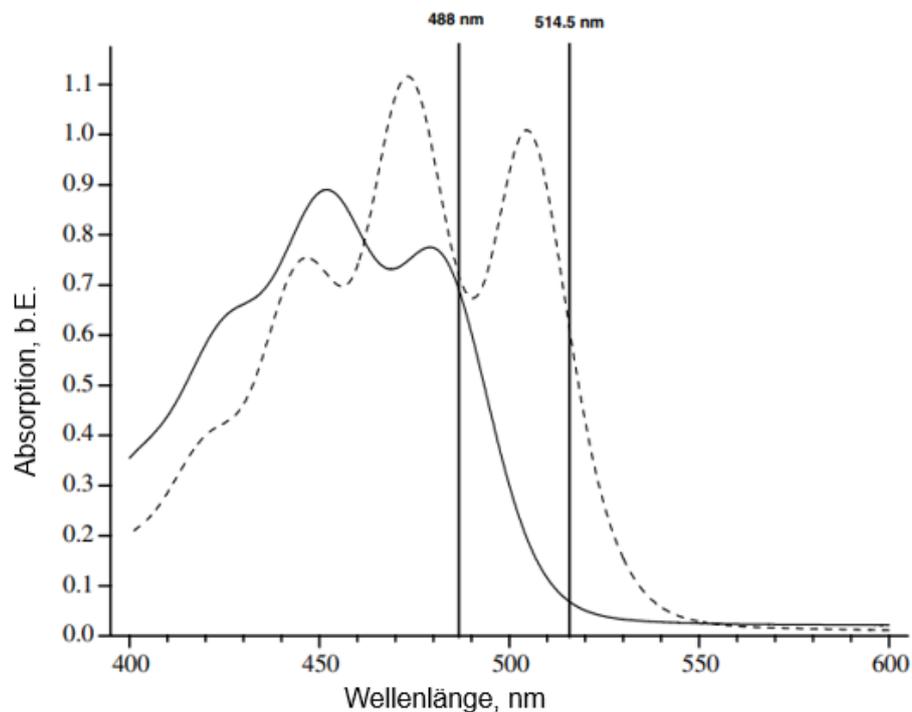


Abbildung 6 : Absorptionsspektrum von Beta-Carotin (durchgehende Linie) und Lycopin (gepunktete Linie) in Ethanol (Abbildung modifiziert aus [115]).

Es wurden von allen hier untersuchten Smoothies Proben von je 1ml in 10mm-Glassküvetten abgefüllt, die vor jeder Messung gevortext und dann zur quantitativen Messung der Carotinoide mittels RRS herangezogen wurden. Die Aufbewahrung der untersuchten Smoothies fand zwischen den Messzeitpunkten bei einer Temperatur von

4° C in identischen Küvetten statt, die mit Aluminiumfolie versiegelt wurden, um Lichtexposition, Oxidation und Verdunstung möglichst gering zu halten.

3.2. *In vivo* Studie

3.2.1. Probanden

Im Rekrutierungszeitraum vom 18.11.2016 bis 23.01.2017 wurde ein Screening durchgeführt, an dem insgesamt 57 gesunde Freiwillige teilnahmen. Von diesen wurden 20 Probanden im Alter zwischen 26 und 58 Jahren (Mittelwert 38 ± 2 Jahre) ausgewählt mit Haut-Typ II oder III gemäß Fitzpatrick-Klassifikation [81], die die Einschlusskriterien erfüllten (s. Abbildung 7). Unter den 20 Probanden waren 12 Männer und 8 Frauen. Keine der Frauen war zum Zeitraum der Studiendurchführung schwanger. Einschlusskriterien waren ein gesunder Allgemeinzustand, insbesondere keine bekannten Hauterkrankungen sowie einem Antioxidantien-Status von $\leq 5 \cdot 10^{-4}$ [b.E.] gemessen mit dem Biozoom-Scanner [128]. Gemessen wurde am rechten oder linken Handballen. Der letzte Teilnehmer schloss die Studie am 20.03.2017 ab. Die Freiwilligen wurden rekrutiert auf dem Campus der Charité Universitätsmedizin Berlin Mitte sowie einem weiteren akademischen Lehrkrankenhaus der Charité (DRK Kliniken Berlin Westend).

Die Studie wurde durch die Ethik-Kommission der Charité-Universitätsmedizin Berlin genehmigt und wurde gemäß den Prinzipien der Erklärung von Helsinki (1996) und den Good Clinical Practice Guidelines [129, 130] durchgeführt. Alle Teilnehmer wurden vor Durchführung der Studie ausführlich über Ablauf und Ziel der Studie informiert und gaben anschließend mündlich und schriftlich ihr Einverständnis.

3.2.2. Studiendesign der *in vivo* Studie

Über ein Screening an 57 gesunden Freiwilligen wurden 20 Probanden identifiziert, die den o.g. Einschlusskriterien entsprachen. Mit diesen wurde eine explorative, randomisierte Studie durchgeführt (s. Abbildung 7).

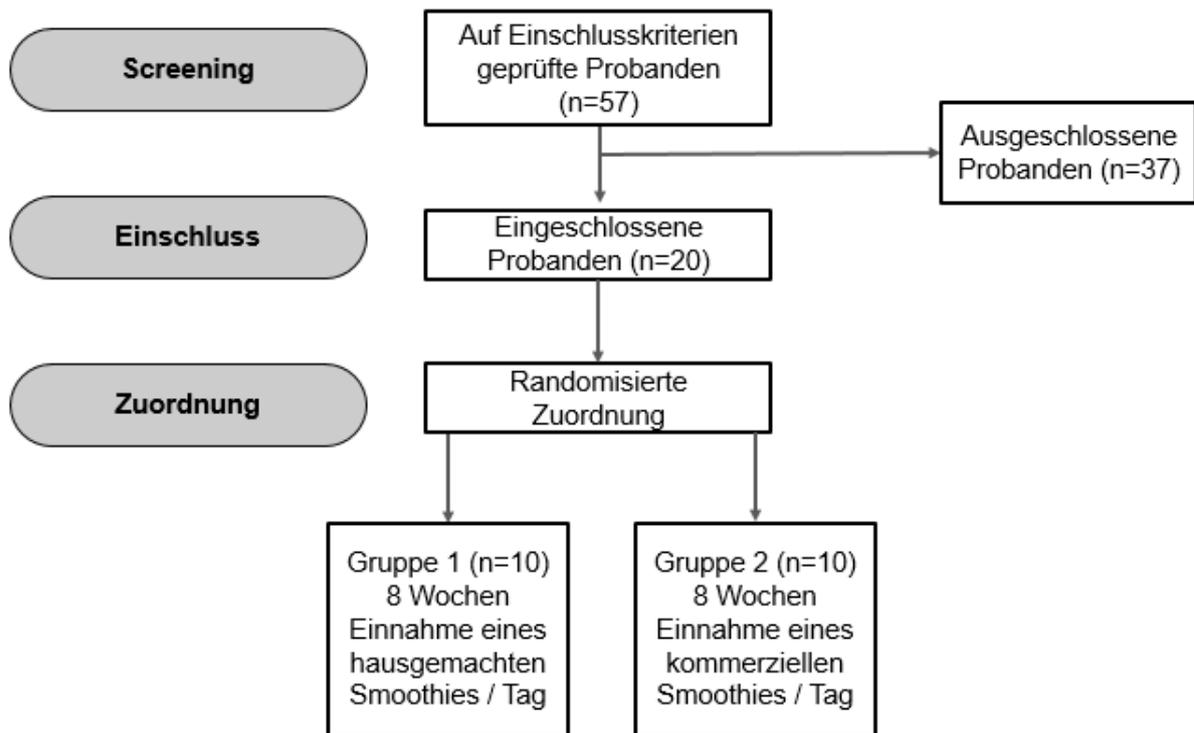


Abbildung 7: Flussdiagramm des Studienablaufs

Die 20 Probanden wurden randomisiert entweder Gruppe 1 oder Gruppe 2 zugeteilt, so dass jede Gruppe aus jeweils 10 Probanden bestand. Dabei waren 5 Frauen in Gruppe 1 sowie 3 Frauen in Gruppe 2.

Gruppe 1 wurde instruiert über einen Zeitraum von 8 Wochen zusätzlich zu ihrer normalen, gewohnten Nahrung täglich zur gleichen Zeit 250 ml eines frisch zubereiteten hausgemachten Smoothies jeweils alternierend Smoothie A oder B zu trinken. Die Zusammensetzung ist in Tabelle 1 aufgeführt. Die Probanden wurden angewiesen, die in Tabelle 1 genannten Komponenten für die Smoothies A bzw. B in vorbezeichneten Mengen in einem handelsüblichen Mixer, den sie entweder selbst besaßen oder sich für den Studienzeitraum in unserem Institut ausleihen konnten, über einen Zeitraum von 2 Minuten zu einer homogenen Flüssigkeit zu zerkleinern. Davon sollten dann unmittelbar nach Herstellung 250 ml verzehrt werden. Überschüssige Reste sollten verworfen werden.

Gruppe 2 (n=10) wurde angehalten ebenfalls zusätzlich zu ihrer normalen Nahrung über einen Zeitraum von 8 Wochen täglich 250 ml eines kommerziellen Smoothie-Produkts (Innocent® Green Smoothie, innocent Alps GmbH, Salzburg, Austria) vor Verfall des auf dem Produkt angegebenen Mindesthaltbarkeitsdatums und unmittelbar nach dem Öffnen komplett zu verzehren.

Messungen der kutanen Carotinoidkonzentration wurden bei Beginn (t=0) sowie 1, 2, 4, 6 und 8 Wochen nach Beginn der Smoothie-Einnahme mit dem Biozoom® Scanner (s. 3.2.4.) durchgeführt.

3.2.3. Fragebögen

Zu jedem Messzeitpunkt erhielten die Probanden jeweils einen Anamnesebogen mit Fragen bezüglich ihres allgemeinen Gesundheitszustandes (Krankheit ja / nein), Stress (weniger als gewöhnlich / unverändert / mehr als gewöhnlich), Sonnenexposition (ja / nein), Nikotin- (ja / nein) und Alkoholkonsum (nie / > 1 x pro Monat / > 1 x pro Woche / ≥ 4 x pro Woche). Eventuelle Veränderungen bestehender oder das Auftreten weiterer Einflussfaktoren auf das antioxidative Potenzial der Probanden sollte damit berücksichtigt werden. Dieser Arbeit ist beispielhaft ein solcher Fragebogen im Anhang beigefügt.

3.2.4. Reflexionsspektroskopie

Die Messungen *in vivo* zur Quantifizierung der kutanen Carotinoidkonzentrationen wurden unter Verwendung des Biozoom® Scanners (Biozoom services GmbH, Kassel, Deutschland, Abb. 8) durchgeführt. Hierbei handelt es sich um ein mobiles Mess-system basierend auf der Reflexionsspektroskopie, das bereits in zahlreichen Publikationen als zuverlässiges Verfahren akzeptiert wurde [128]. Es erlaubt die genaue, schnelle, weniger als eine Minute dauernde, nicht-invasive quantitative Bestimmung der kutanen Carotinoidkonzentration.

Lichtquelle ist eine LED (light emitting diode), die ein Spektrum zwischen 440 nm - 490 nm emittiert, das dem Absorptionsmaximum der kutanen Carotinoide entspricht. Das von

der Haut reflektierte Licht wird auf eine Linse projiziert, die das Signal an ein Spektrometer weiterleitet, das an einen Computer oder Laptop angeschlossen ist. Das Reflexionsspektrum des in die Haut emittierten Lichtes wird quantitativ analysiert und daraus die Konzentration der Carotinoide in der Haut berechnet.

Messungen werden in einer Ordinal-Skala von 1-12 angegeben [b.E., *engl.* a.u.]. Eine Konzentration von 1.2 nmol-g⁻¹ Haut entspricht einem Wert von 12 [128]. Das diffus reflektierende Substrat sind hierbei die unterhalb der Oberfläche gelegenen Schichten des Stratum corneums. Hier werden die Carotinoide in einer Tiefe von 150-200µm untersucht. Das Stratum corneum ist palmar und plantar besonders dick ausgeprägt, weswegen sich diese Lokalisationen gut für die Messungen eignen. In der hier vorliegenden Arbeit wurden die Messungen am Handballen der Patienten durchgeführt. Für jeden Zeitpunkt wurden die Messungen dreimal wiederholt und der Mittelwert berechnet. Der Handballen wurde ausgewählt, da er in der Regel nicht pigmentiert ist, aufgrund seiner für die Messungen vorteilhaften Dicke des Stratum coreums eine hohe Konzentration an kutanen Antioxidantien aufweist und im Gegensatz zu den Plantae unkomplizierter für die Messungen herangezogen werden kann. Aus diesen Gründen hat er sich als optimale Lokalisation für dieses Messverfahren *in vivo* in zahlreichen Studien etabliert [91]. Damit ist eine gute Vergleichbarkeit zu den vorangegangenen Studienresultaten gegeben. Von grundlegender Bedeutung für die vorliegende Arbeit ist dabei, dass die Kinetik der gemessenen Carotinoide im Handballen mit der Kinetik der Carotinoidkonzentration im Blutserum korreliert. Somit können die gemessenen Werte als repräsentativer Surrogatparameter für den antioxidativen Status des gesamten menschlichen Organismus herangezogen werden [88].

Dieses non-invasive Messverfahren ist in der Handhabung so schnell und sicher, dass keine schädigende Wirkung oder Komplikationen wie z.B. bei invasiven Probenentnahmen möglich ist. Daher kann es ohne Bedenken auch zur Erfassung des antioxidativen Potenzials bei Schwangeren und Neugeborenen eingesetzt werden [131].



Abbildung 8: Biozoom®-Scanner zur Bestimmung der kutanen Carotinoid-Konzentration.

3.2.5. Pilotstudie mit Zusatz von Rapsöl

Bei der ursprünglichen Planung sollte in einer dritten Gruppe der Effekt einer zusätzlichen Gabe von Rapsöl zu den frisch zubereiteten Smoothies getestet werden. Der Einschluss dieses dritten Studienarms wurde jedoch nach einem Pilotversuch an fünf gesunden Freiwilligen unserer Arbeitsgruppe verworfen. Die Messungen wurden nach einer Woche abgebrochen, da die Teilnehmer des Pilotversuchs nach Einnahme des mit Rapsöl versetzten hausgemachten grünen Smoothies über als sehr störend empfundene gastrointestinale Probleme berichteten wie einer schlechteren Verdauung bis hin zu abdominalen Schmerzen und leichten Krämpfen oder Durchfall. Ziel der Untersuchung war eine verbesserte Aufnahme der lipophilen Antioxidantien bzw. Carotinoide im Gastrointestinaltrakt zu erreichen. Es ist bekannt, dass Nahrungslipide die Synthese von Gallensalzen des Pankreas bzw. des biliären Systems stimulieren, die zur Fettverdauung und Mizellbildung benötigt werden. Das heißt, dass mit steigendem Fettanteil der Nahrung auch der Anteil der in den Mizellen inkorporierten Carotinoide und damit deren Bioverfügbarkeit steigt [132]. Bei der Weiterführung unseres Denkansatzes sollte daher

neben den rein pharmakologischen Aspekten, insbesondere die physiologische Verträglichkeit eingesetzter Öle berücksichtigt werden.

3.3. Statistik und Datenanalyse

Die statistischen Analysen der Messergebnisse wurden mithilfe von SPSS (Software SPSS Statistics Version 25 IBM, USA) durchgeführt. Die Signifikanzen der Carotinoid - Konzentrationsmessungen *in vitro* und *in vivo* wurden mittels GEE (=Generalized Estimating Equations)-Tests sowie unter Anwendung des Mann-Whitney U-Tests für nicht-verbundene Stichprobe berechnet. P-Werte ≤ 0.05 (p^*), ≤ 0.01 (p^{**}), ≤ 0.001 (p^{***}) wurden als signifikant betrachtet [133]. Die Datenakquise, statistische Auswertung und Diagrammerstellung erfolgte unter der Anwendung von Microsoft Office Excel und PowerPoint 2013 [133].

4. Ergebnisse

4.1. Ergebnisse der *in vitro* Studie

Die Mittelwerte der *in vitro* mittels RRS über einen Zeitraum von 24 Stunden gemessenen durchschnittlichen Carotinoidkonzentrationen der hausgemachten Smoothies sowie des kommerziellen Smoothies sind in Abbildung 9 dargestellt. Hierbei wurden für die hausgemachten Smoothies A und B, unmittelbar nach Zubereitung aus frischen Komponenten, sowie dem kommerziellen Smoothie, direkt nach erstmaligem Öffnen des versiegelten Produktes, unterschiedliche Kinetiken der Carotinoidkonzentrationsabnahme bzw. Stabilität beobachtet für die Zeitpunkte t 0 bis t 7 (t 0 = unmittelbar nach Zubereitung bzw. Öffnen; t 1 = 10 min. / t 2 = 30 min. / t 3 = 60 min. / t 4 = 2 hrs. / t 5 = 6 hrs. / t 6 = 12 hrs. / t 7 = 24 hrs. nach Zubereitung bzw. Öffnen).

Initial zeigten die aus frischen Komponenten hausgemachten Smoothies A und B unmittelbar nach Zubereitung deutlich höhere Werte mit $7.6 \pm 0.3 \cdot 10^{-4}$ [b. E.] bzw. von $10.4 \pm 0.2 \cdot 10^{-4}$ [b. E.] gegenüber dem kommerziellen Smoothie unmittelbar nach Öffnen des versiegelten Produkts mit $5.8 \pm 0.2 \cdot 10^{-4}$ [b. E.] (Abb. 9).

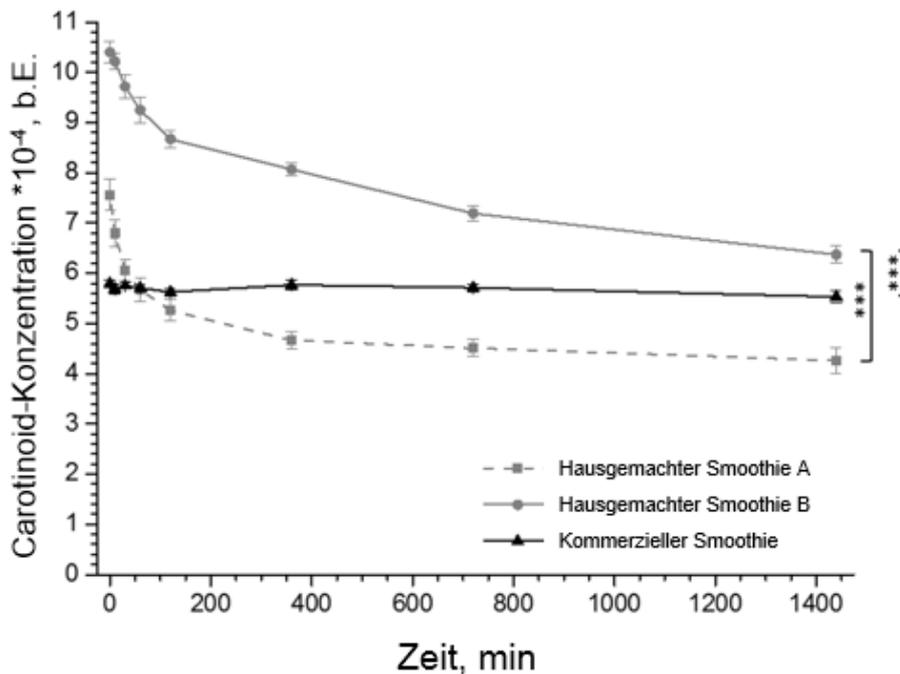
Smoothie A zeigt *in vitro* zum Zeitpunkt t 0 unmittelbar nach Zubereitung eine durchschnittliche Carotinoidkonzentration von $7.6 \pm 0.3 \cdot 10^{-4}$ [b. E.], im Verlauf zeigt sich hier eine mono-exponentielle Abnahme auf $4.3 \pm 0.3 \cdot 10^{-4}$ [b. E.] nach 24 Stunden (Mittelwert aus n=7 Messungen und Standardabweichung). Der stärkste Abfall der Carotinoidkonzentration wurde für Smoothie A in den ersten 30 Minuten nach Zubereitung verzeichnet (siehe Abb. 9).

Smoothie B zeigt vom Zeitpunkt t 0 unmittelbar nach Zubereitung über einen Zeitraum von 24 Stunden einen Abfall der durchschnittlichen Carotinoidkonzentration von $10.4 \pm 0.2 \cdot 10^{-4}$ [b. E.] auf $6.4 \pm 0.2 \cdot 10^{-4}$ [b. E.]. Im Vergleich zu Smoothie A fällt bei Smoothie B in den ersten 30 Minuten der Abfall der durchschnittlichen Carotinoidkonzentration weniger ausgeprägt aus, was auf eine höhere Stabilität der Antioxidantien hinweist.

Der kommerzielle Smoothie zeigt unmittelbar nach Öffnen des versiegelten Produkts eine im Vergleich zu den beiden hausgemachten Smoothies A und B deutlich niedrigere durchschnittliche Carotinoid-Ausgangskonzentration von $5.8 \pm 0.1 \cdot 10^{-4}$ [b. E.]. Im Verlauf

von 24 Stunden zeigt der kommerzielle Smoothie einen vergleichsweise schwachen Abfall der Carotinoidkonzentration auf $5.5 \pm 0.1 \cdot 10^{-4}$ [b.E.].

Abbildung 9: Stabilität der Carotinoide in Smoothies



Die Abbildung 9 zeigt die über 24 Stunden *in vitro* gemessenen Carotinoidkonzentrationen in [b.E.] des kommerziellen Smoothies (schwarze durchgehende Linie), des hausgemachten Smoothies A (graue gestrichelte Linie) sowie des hausgemachten Smoothies B (graue durchgehende Linie). Die Werte sind Mittelwerte (aus $n = 7$) mit Fehlerbalken (Standard error of the mean, SEM). Es wurde eine Kurvenanpassung (curve fitting) durchgeführt zur besseren Visualisierung der Daten (Abbildung modifiziert aus: [133]).

Die aus frischen Komponenten zubereiteten Smoothies A und B zeigen initial deutlich höhere Carotinoid-Ausgangskonzentrationen mit einer höheren Abbaugeschwindigkeit verglichen mit dem kommerziellen Smoothie-Produkt, bei dem über den gesamten Zeitraum von 24 Stunden relativ stabile Werte beobachtet werden konnten.

Die Abbaugeschwindigkeit der Carotinoidkonzentration von Smoothie B unterscheidet sich signifikant ($p < 0.001$) von der der anderen zwei untersuchten Smoothies, dem hausgemachten Smoothie A und dem kommerziellen Smoothie. Smoothie A zeigt eine mono-exponentielle Abnahme der Carotinoidkonzentration, was sich nicht signifikant unterscheidet zu der Carotinoidkonzentration vom kommerziellen Smoothie-Produkt, wohingegen Smoothie B eine multi-exponentielle Abnahme der Carotinoidkonzentration zeigt (siehe Abb. 9).

4.2. Ergebnisse der *in vivo* Studie

Der Mittelwert der kutanen Carotinoidkonzentration der Probanden in Gruppe 1 betrug vor Durchführung der Studie $4.5 \pm 0.1 \cdot 10^{-4}$ [b.E.] mit individuell unterschiedlichen Veränderungen im Verlauf (siehe Abbildung 10). Nach täglicher Einnahme von 250 ml eines hausgemachten grünen Smoothies über insgesamt 8 Wochen, wobei täglich alternierend Smoothie A und Smoothie B verzehrt wurden, betrug die durchschnittliche Carotinoidkonzentration $4.8 \pm 0.3 \cdot 10^{-4}$ [b. E.], was insignifikant höher ist als der Ausgangswert ($p > 0.05$).

Die mittlere Carotinoidkonzentration der Probanden der Gruppe 2, die über 8 Wochen den kommerziellen grünen Smoothie einnahmen, zeigten einen Anstieg von $4.3 \pm 0.2 \cdot 10^{-4}$ [b.E.] auf $4.7 \pm 0.2 \cdot 10^{-4}$ [b.E.] (siehe Abbildung 11).

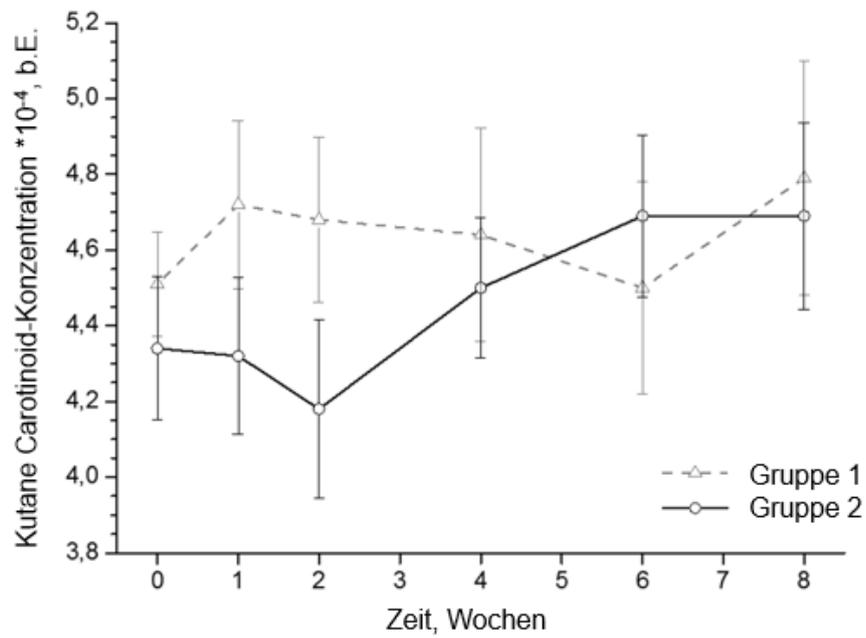


Abbildung 10: Verlauf der *in vivo* Mittelwerte der kutanen Carotinoidkonzentration der Gruppe 1 hausgemachter grüner Smoothies A und B, Gruppe 2 kommerzieller grüner Smoothie. Die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung.

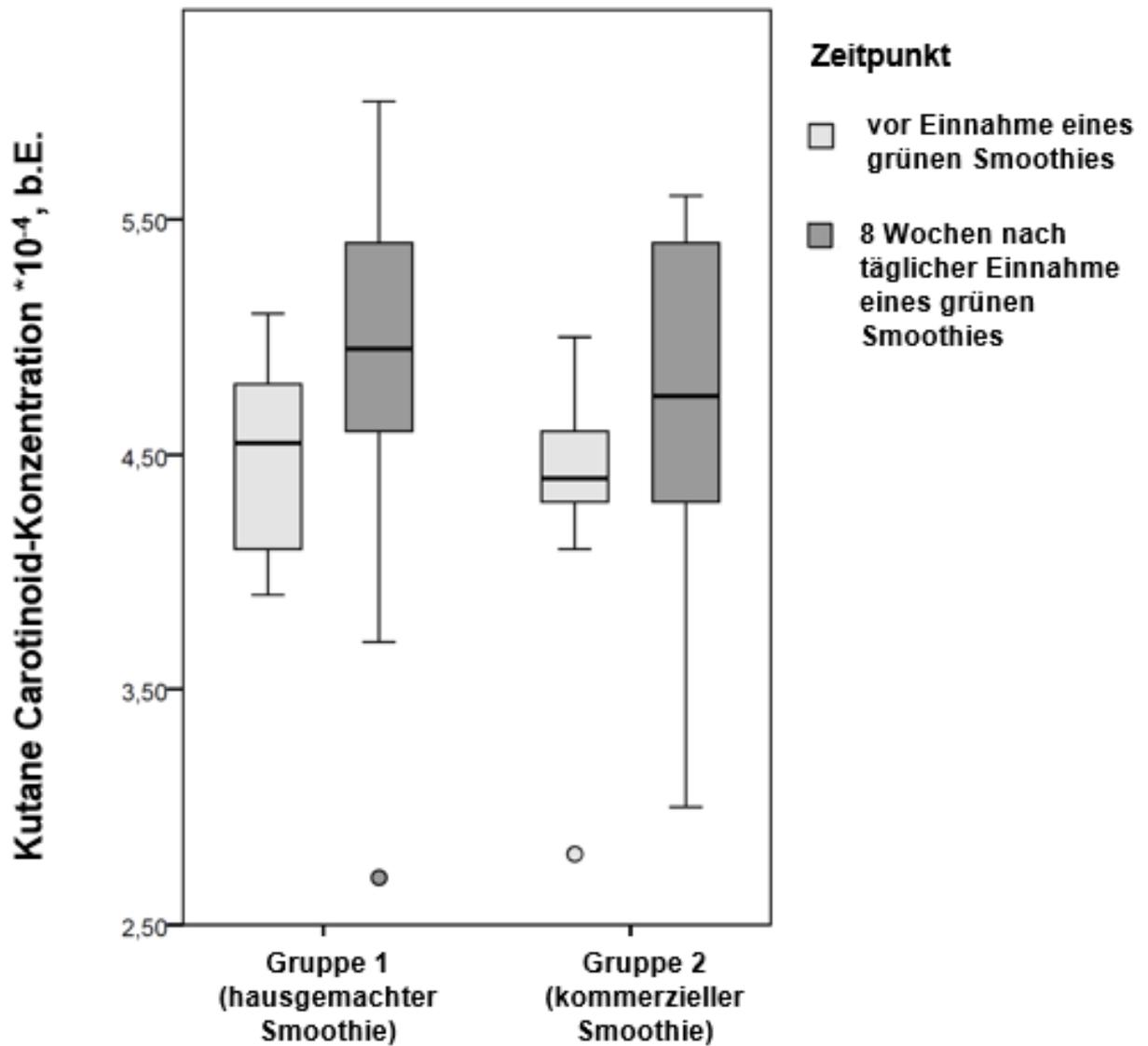


Abbildung 11: Boxplot der kutanen Carotinoidkonzentration in [b.E.] der Gruppe 1 (n=10) und Gruppe 2 (n=10). Obere und untere Whisker zeigen Minimal- bzw. Maximalwerte innerhalb des 1,5-fachen Interquartilabstands an. Ausreißer außerhalb des 1,5-fachen Interquartilabstands sind mit Punkten gekennzeichnet.

Die Probanden der beiden Gruppen 1 und 2 zeigten nur eine tendenzielle Erhöhung der kutanen Carotinoidkonzentration nach täglicher Einnahme eines grünen Smoothies über einen Zeitraum von 8 Wochen (s. Tabelle 5.a und 5.b). In beiden Gruppen konnte ein vergleichbarer, aber statistisch insignifikanter Anstieg der kutanen Carotinoidkonzentration beobachtet werden.

Die in dieser Arbeit zu prüfende Hypothese lautete, dass die hausgemachten Smoothies aus frischen Komponenten *in vitro* über höhere initiale Carotinoidkonzentrationen verfügen und somit bei täglicher Einnahme unmittelbar nach Zubereitung über einen längeren Zeitraum die kutane Carotinoidkonzentration *in vivo* schneller erhöhen würden als kommerzielle Produkte. Diese Hypothese konnte nicht bestätigt werden.

Obwohl die aus frischen Zutaten hausgemachten Smoothies *in vitro* eine relativ hohe initiale Carotinoidkonzentration gegenüber dem kommerziellen Produkt zeigten, konnte während des Beobachtungszeitraums *in vivo* ein statistisch nur insignifikanter Anstieg der kutanen Carotinoidkonzentration der Probanden nachgewiesen werden.

4.3. Ergebnisse Fragebögen

Es konnten keine signifikanten Korrelationen zwischen der kutanen Carotinoidkonzentration der Probanden sowie den von ihnen in den Fragebögen gemachten Angaben bezüglich möglicher Einflussfaktoren festgestellt werden. Die von den Probanden bezüglich ihres gesundheitlichen Allgemeinzustandes, subjektiven Stressempfindens, ihrer Sonnenexposition sowie ihres Alkohol- oder Nikotinkonsums gegebenen Antworten sind in absoluten und relativen Zahlen (in Prozent) in Tabelle 6 dargestellt. Der Nikotinkonsum aller Probanden blieb während des gesamten Studienzeitraumes unverändert, n = 9 der gesunden Probanden rauchten regelmäßig. Die Teilnehmer, die die Frage nach „Krankheit“ zu einem Zeitpunkt mit „Ja“ beantwortet hatten, berichteten auf Nachfragen lediglich über milde Erkältungssymptomaten wie z.B. Husten oder Halsschmerzen. Es kam während des Studienzeitraums bei keinem der Probanden zu einer schwerwiegenden Erkrankung. Da der Durchführungszeitraum der *in vivo* Untersuchungen im Winter stattfand wurde bezüglich der Sonnenexposition durchweg relativ unverändertes Verhalten angegeben. Der

Alkoholkonsum variierte bei den Probanden während des Studienzeitraums interindividuell sowie im Verlauf, zeigte jedoch keine statistisch signifikanten Korrelationen zu den gemessenen Carotinoidkonzentrationen.

		t0	t1	t2	t3	t4	t5
Krankheit	ja	4 (20%)	1 (5%)	3 (15%)	4 (20%)	7 (35%)	5 (25%)
	nein	16 (80%)	19 (95%)	17 (85%)	16 (80%)	13 (65%)	15 (75%)
Stress-Level	weniger Stress als sonst	5 (25%)	0 (0%)	2 (10%)	1 (5%)	6 (30%)	3 (15%)
	unverändert	11 (55%)	15 (75%)	13 (65%)	14 (70%)	12 (60%)	11 (55%)
	mehr Stress als sonst	4 (20%)	5 (25%)	5 (25%)	5 (25%)	2 (10%)	6 (30%)
Alkoholkonsum	Selten / nie	4 (20%)	4 (20%)	7 (35%)	4 (20%)	5 (25%)	5 (25%)
	>1x / Monat	6 (30%)	5 (25%)	4 (20%)	6 (30%)	5 (25%)	6 (30%)
	>1/ Woche	4 (20%)	8 (40%)	7 (35%)	8 (40%)	6 (30%)	7 (35%)
	≥ 4x / Woche	6 (30%)	3 (15%)	2 (10%)	2 (10%)	4 (20%)	2 (10%)
Vermehrte Sonnenexposition	ja	1 (5%)	2 (10%)	1 (5%)	0 (0%)	0 (0%)	3 (15%)
	nein	19 (95%)	18 (90%)	19 (95%)	20 (100%)	20 (100%)	17 (85%)

Tabelle 4 : Daten aus den Fragebögen zu ausgewählten Einflussfaktoren bei t 0 – t 5 in absoluten Zahlen und Prozentangaben.

5. Diskussion

5.1. Ergebnisse der *in vitro* Studie

Die aus frischen Komponenten hausgemachten Smoothies A und B zeigten *in vitro* initial signifikant höhere Carotinoidkonzentrationen im Vergleich zum kommerziellen Produkt. Bei den hausgemachten Smoothies konnte jedoch ein rapider mono-exponentieller Abfall von ca. 50 % der Carotinoide über einen Zeitraum von 24 Stunden *in vitro* beobachtet werden. Demgegenüber zeigte der hier untersuchte kommerzielle grüne Smoothie, dem zusätzlich das antioxidativ wirksame Vitamin C für eine verbesserte Haltbarkeit beigelegt wurde [134], über einen Zeitraum von 24 Stunden stabilere Werte bezüglich seiner Antioxidantienkonzentration.

Zum Messzeitpunkt t_1 ($t_1 = 10$ min nach Zubereitung) zeigt der hausgemachte Smoothie A einen Abfall der Carotinoidkonzentration um 11.1 %. Der hausgemachte Smoothie B zeigt 10 min nach Zubereitung einen Abfall der Carotinoidkonzentration um 1.7 %. Der kommerzielle Smoothie zeigt 10 min nach Öffnen des versiegelten Produktes einen Abfall der Carotinoidkonzentration um 2 %. Die Carotinoidkonzentration ist unmittelbar nach Zubereitung bzw. Öffnen des Smoothies am höchsten, so dass dies auch der optimale Zeitpunkt für den Verzehr ist.

Die Resultate zeigten, dass insbesondere bei den frischen, hausgemachten Smoothies ein rapider Abfall der Antioxidantienkonzentration beginnt und deswegen auch hier eine Einnahme idealerweise unmittelbar nach Zubereitung erfolgen sollte. Eine längere Lagerung, wie zum Beispiel eine Zubereitung am Morgen mit geplantem Verzehr am Nachmittag führt zu einem starken Konzentrationsabfall bzw. Verlust der Antioxidantien.

Die in der vorliegenden Dissertation untersuchten hausgemachten grünen Smoothies sowie der kommerzielle grüne Smoothie wurden ausgewählt aufgrund ihrer relativ hohen Carotinoidkonzentrationen sowie der breiten Verfügbarkeit an unserem Standort in Berlin. Das kommerzielle Produkt sowie die Zutaten für die Zubereitung der hausgemachten Smoothies sollten für die Probanden leicht erhältlich sein, um einen reibungslosen Studienablauf und deren Compliance zu gewährleisten. Die Komponenten der frisch

zubereiteten Smoothies sollten unabhängig von den Jahreszeiten in Deutschland leicht erhältlichen Zutaten bestehen. Da das kommerzielle Smoothie-Produkt über eine große Anzahl an Zutaten besteht, wurden die Probanden der Gruppe 1 instruiert, täglich alternierend jeweils einen der zwei unterschiedlichen hausgemachten Smoothies einzunehmen, um die Anzahl der Zutaten anzugleichen und mit der Geschmacksvariation die Compliance zu erhöhen. Die Trinkmenge in beiden Gruppen wurde auf je 250 ml Smoothie pro Tag angepasst, da das kommerzielle Produkt in einer Flaschengröße von 250 ml weit verbreitet ist und die Einnahme dieser Menge zusätzlich zur regulären Ernährung ethisch zumutbar ist.

In zukünftigen Studien sollte ein direkter Vergleich von hausgemachten mit kommerziellen Smoothie-Produkten angestrebt werden, die eine ähnlichere Zusammensetzung der Zutaten sowie vergleichbarere Ausgangswerte der Antioxidantienkonzentrationen aufweisen. Des Weiteren könnte die Erstellung eines genaueren Profils der in den Smoothies enthaltenen Carotinoide zusätzliche Anhaltspunkte für die antioxidative Wirksamkeit liefern.

Die aus frischen Komponenten hausgemachten Smoothies zeigen zwar initial höhere Carotinoidkonzentrationen verglichen mit dem kommerziellen Produkt, jedoch einen unmittelbar nach Zubereitung einsetzenden konstanten Zerfall der Carotinoide über einen Zeitraum von 24 Stunden, wohingegen das kommerzielle Produkt mit dem zugesetzten Vitamin C als natürliches Konservierungsmittel konstantere Carotinoidkonzentrationen über denselben Zeitraum aufwies. Der kommerzielle Smoothie zeigte insbesondere zu den ersten Messzeitpunkten deutlich niedrigere Carotinoidkonzentrationen verglichen mit den hausgemachten Smoothies, aber eine höhere Stabilität im längeren Verlauf. Nach etwa 24 Stunden zeigten die aus frischen Komponenten hausgemachten Smoothies sowie der kommerzielle Smoothie ähnliche Carotinoidkonzentrationen.

Bezüglich des *in vitro* gemessenen Stabilitätsverlaufs der Carotinoidkonzentration müssen weitere Einflussfaktoren einbezogen werden, z.B. dass zum Zeitpunkt $t=0$ am Ende des Rührprozesses der Smoothie als eine in Ausbildung zu befindliche Emulsion mit einem hohen Anteil an Sauerstoff zu betrachten ist. Die Stabilisierung solcher Systeme kann sich innerhalb von einigen Minuten bis zu mehreren Stunden vollziehen. Der in Abb. 9 dargestellte Carotinoidkonzentrationsverlauf könnte somit auch einen Übergang zur Stabilität nach der frischen Zubereitung entsprechen. Eine hieraus

resultierende Überlegung wäre, ob eine Stabilisierung der Emulsion, d.h. ein „ruhen“ der frisch zubereiteten Smoothies vorteilhaft sein könnte, um eine bessere Wirkung zu erzielen.

Hinsichtlich ihres Nährwertgehaltes weisen die hausgemachten Smoothies verglichen zum kommerziellen Smoothie insbesondere höhere Anteile an Ballaststoffen auf denen ebenfalls positive Effekte auf die Verdauung und andere metabolische Prozesse zugeschrieben werden wie z.B. der Vorbeugung von Typ2-Diabetes, kardiovaskulären Erkrankungen und Kolonkarzinomen [135]. Des Weiteren weisen die untersuchten Smoothies A und B auch einen deutlich niedrigeren Zuckergehalt verglichen mit dem kommerziellen Smoothie auf dessen Kohlenhydrate ausschließlich als aus Zucker bestehend angegeben werden. Mit einer ähnlichen Gesamtmenge an Kohlenhydraten weisen die getesteten Smoothies A und B ungefähr die Hälfte an Zuckern auf (siehe Tabelle 3).

5.2. Ergebnisse der *in vivo* Studie

Wir sind in dieser Arbeit von der Hypothese ausgegangen, dass die hausgemachten Smoothies aus frischen Komponenten über höhere initiale Carotinoidkonzentrationen verfügen und somit bei täglicher Einnahme unmittelbar nach Zubereitung über einen längeren Zeitraum das antioxidative Potenzial der Haut *in vivo* schneller erhöhen würden als kommerzielle Produkte. Diese Hypothese konnte nicht bestätigt werden. Sowohl in der Gruppe, die täglich einen hausgemachten grünen Smoothie einnahm als auch in der Gruppe, die einen kommerziellen Smoothie täglich verzehrte, konnte ein tendenzieller, aber statistisch nicht signifikanter Anstieg des antioxidativen Potenzials der Haut über den Studienzeitraum von 8 Wochen beobachtet werden. Dieser statistisch nicht signifikante Anstieg der kutanen Carotinoidkonzentration in beiden Gruppen ist möglicherweise auch nicht signifikant aufgrund der kleinen Probandenzahl und sollte daher in einem größeren Probandenkollektiv vertieft untersucht werden.

Insgesamt gibt es große interindividuelle Unterschiede im antioxidativen Status, die auch von zahlreichen anderen Studien in der Vergangenheit beschrieben worden sind [89], in dieser Untersuchung repräsentiert durch die kutanen Carotinoidwerte.

Beispielsweise werden genetische Faktoren bzw. Varianten diskutiert, die einen Einfluss auf die Metabolisation und somit Effektivität und Konzentration antioxidativ wirksamer Substanzen in einem Individuum haben könnten, insbesondere bezüglich der Carotinoid-Metabolisation [136]. Es sind Varianten von Einzelnukleotidpolymorphismen (SNP = single nucleotid polymorphism) beschrieben worden, die Einfluss haben auf die katalytische Aktivität von wichtigen Enzymen, die im Vitamin-A-Stoffwechsel gebraucht werden. Somit können bestimmte vererbte SNP's eine individuelle Effektivität von pflanzenbasierten alimentären Carotinoiden auf den Menschen determinieren. So werden in einer Literaturanalyse von Lietz et al. verschiedene Studien zitiert, die Assoziationen bestimmter genetischer Variatianten mit einem Low-responder-Phänotyp beschreiben, die zu einer hohen interindividuellen Variabilität sowohl der Beta-Carotin-Absorption als auch deren Konversion zu Retinal führen, wobei der Anteil von low-Respondern bis zu 45 % betragen kann [137, 138]. Solche genetischen Faktoren können also die Wirksamkeit von alimentären Antioxidantien in einem Individuum determinieren und entziehen sich dem eigenen Einflussbereich. In der hier vorliegenden Studie ist der Anteil an Low-Respondern unbekannt, da diesbezüglich keine Typisierungen erfolgt ist.

Neben den individuell unterschiedlichen Prädispositionen, Carotinoide zu metabolisieren, können auch verschiedene Verarbeitungsprozesse von frischem Obst und Gemüse für die hausgemachten Smoothies sowie für kommerzielle Smoothie-Produkte die biologische Verfügbarkeit von Carotinoiden beeinflussen [139].

Viele unserer Grundnahrungsmittel enthalten bereits Antioxidantien und Carotinoide (z.B. Brot, Kartoffeln und andere Gemüse, Milch- und Fleischprodukte). Auch verarbeitete Produkte, wie z.B. auf Tomaten basierende Saucen oder Ketchup enthalten relativ viele Antioxidantien. Getränke wie Tee, insbesondere grüner Tee, Kaffee und natürlich Säfte haben ein relativ hohes antioxidatives Potenzial. Die Probanden nahmen die in dieser Studie getesteten Smoothies zusätzlich zu ihrer regulären Ernährung ein. 250 ml eines grünen Smoothies könnten in Proportion zu der insgesamt täglich aufgenommenen Nahrung einen geringen Anteil an zusätzlichen Antioxidantien einbringen. Das ist ein weiterer Aspekt bei der Erklärung für unsere Ergebnisse mit dem nur mäßigen Anstieg der kutanen Carotinoidkonzentration.

Auch erschwert die komplexe Zusammensetzung unserer Lebensmittel zu bewerten, welche Nährstoffe einzeln oder in welcher Kombination für verschiedene Wirksamkeiten

maßgeblich sind. Beispielsweise konnte in einer Studie von Darvin et al. [140] gezeigt werden, dass der Konsum von Alkohol, in diesem Fall Wodka, zu einer signifikanten Erniedrigung der kutanen Carotinoidkonzentration verbunden mit einer Erniedrigung der minimalen Erythemdosis führt, wobei eine reduzierte MED assoziiert ist mit einem erhöhten UV-bedingten Sonnenbrandrisiko. Die MED ist definiert als UV-Dosis bei der gerade noch eine sichtbare Rötung der menschlichen Haut initiiert wird. Dieselbe Studie zeigte jedoch auch, dass eine kombinierte Gabe von Wodka und einem Carotinoidreichen Orangensaft einem Abfall der kutanen Carotinoidkonzentration sowie einer reduzierten MED entgegenwirken kann.

Alkoholabusus ist erwiesenermaßen mit der Entstehung von oxidativem Stress assoziiert, was bereits in zahlreichen Studien beschrieben wurde, da Alkohol über vielfältige Mechanismen vermehrt RONS generiert, insbesondere in der Leber wo er metabolisiert wird [141]. Es gibt jedoch auch Anhaltspunkte dafür, dass die Sorte und konsumierte Menge des Alkohols entscheidend dafür sind ob bzw. in welchem Ausmaß oxidativer Stress induziert wird. Vor allem Rotwein werden bei moderatem Konsum kardioprotektive und z.T. auch photoprotektive Effekte zugeschrieben [142, 143]. Diese positiven Effekte werden vor allem den im Rotwein enthaltenen Polyphenolen zugeschrieben deren antioxidative Wirksamkeit *in vivo* am Menschen sowie im Tierversuch gezeigt werden konnte [142, 144].

Die in dieser Studie untersuchten Smoothies wurden ausgewählt, da sie aus multiplen Komponenten mit antioxidativ wirksamen Substanzen bestehen. Vorangegangene Studien haben synergistische Effekte von Antioxidantien beschrieben und belegt, dass die kombinierte Gabe von mehreren antioxidativ wirksamen Komponenten gegenüber der Verabreichung einzelner antioxidativer Komponenten vorteilhafter und sicherer ist [145, 146].

Auch spielt die verabreichte Antioxidantienkonzentration und ihre Zusammensetzung eine Rolle. Eine Analyse verschiedener Studien über die Effektivität von topisch applizierten Substanzen beim Menschen [86] kommt zu dem Schluss, dass die systemische Gabe synthetischer oder extrahierter Antioxidantien sich am effizienten und positivsten auf den Körper auswirkt, wenn mehrere Antioxidantien in niedrigeren, physiologischen Konzentrationen appliziert werden. Sie ist der Gabe einzelner Antioxidantien in einer sehr hohen Konzentration deutlich überlegen, in welcher

Antioxidantien selbst zur Generierung von Radikalen beitragen anstatt sie zu neutralisieren.

Die meisten Antioxidantien kann der menschliche Organismus nicht selbst bilden. Sie müssen mit einer gesunden Ernährung aufgenommen werden, v.a. reich an Obst und Gemüse, da diese einen hohen Antioxidantien-Gehalt aufweisen. Verschiedene Studien haben gezeigt, dass Nahrungsmittel und Getränke mit einem hohen Antioxidantiengehalt oxidativen Stress reduzieren [147, 148] und somit protektiv gegenüber ROS-assoziierten Krankheiten fungieren können. Folglich spielt eine ausgewogene und gesunde Ernährung eine Schlüsselrolle in unserem täglichen Leben. Die tägliche Einnahme von Carotinoiden über die Nahrung oder als Nahrungsergänzungsmittel kann diverse Effekte haben bis hin zur Veränderungen der Hautfarbe durch eine erhöhte Carotinoidzufuhr [149].

Tan et al. [150] beschrieben in einer randomisierten kontrollierten Interventionsstudie *in vivo* über eine Farbänderung der Haut bei gesunden Probanden, die über einen Zeitraum von 6 Wochen einen Carotinoid-reichen Smoothie einnahmen im Gegensatz zur Kontrollgruppe, denen Mineralwasser verabreicht wurde. Hier war nachweislich der Carotinoid-reiche Smoothie der Transportvektor für die in der Haut akkumulierten Carotinoide, die die Farbveränderungen hervorriefen. Es kann angenommen werden, dass es sich bei der Ablagerung von durch die Nahrung aufgenommenen Antioxidantien in der Haut um einen relativ langsamen Prozess handelt, so dass zukünftige Studien auf diesem Gebiet auf einen längeren Beobachtungszeitraum ausgelegt sein sollten.

Über die orale Aufnahme hoch konzentrierter Antioxidantien kann über die Blutversorgung eine Anreicherung von Antioxidantien in der Haut erzielt werden, wobei der klinische Nutzen hieraus von Autoren kontrovers und teils negativ bewertet wird. Vorgegangene Studien haben widersprüchliche Resultate bezüglich der Gabe von hochdosierten Antioxidantien kombiniert oder einzeln als Nahrungsergänzungsmittel beschrieben. Die Einnahme hochdosierter antioxidantienhaltiger Nahrungsergänzungsmittel führte trotz vieler erwiesener positiver Wirkmechanismen von Antioxidantien wider Erwarten teilweise zu negativen bzw. adversen Effekten, insbesondere bei Patienten, die bereits erhöhten oxidativen Stressfaktoren ausgesetzt waren wie z.B. Rauchern und Asbestexponierten. Beispielsweise konnte in der viel zitierten CARET-Studie („The Beta-Carotene and Retinol Efficacy Trial“) gezeigt werden,

dass eine kombinierte Gabe von 30 mg Beta-Carotin und 25,000 IU Retinylpalmitat (Vitamin A) täglich über einen durchschnittlichen Zeitraum von vier Jahren bei Probanden mit bekanntem Nikotinabusus und Asbestexposition u.a. die Inzidenz von kardiovaskulären Erkrankungen, Lungenkrebs sowie das Mortalitätsrisiko durch Lungenkrebs erhöht. Aufgrunddessen wurden diese Pilotstudien 21 Monate früher als ursprünglich geplant abgebrochen [151-153]. Auch die Autoren der sehr umfassenden ATBC-Studie (Alpha-Tocopherol, Beta Carotene Cancer Prevention Study Group) beschrieben positive sowie negative schädigende Einflüsse der hochdosierten Gabe von antioxidativen Nahrungsergänzungsmitteln in einer randomisierten, doppelblinden, Placebo-kontrollierten Studie in der insgesamt 29.133 männliche Raucher in Finnland über 5-8 Jahre untersucht wurden. Die Probanden wurden täglich supplementiert mit entweder nur Alpha-Tocopherol (50 mg pro Tag), nur Beta-Carotin (20 mg pro Tag), Alpha-Tocopherol und Beta-Carotin kombiniert oder einem Placebo. Insbesondere die Einnahme von Beta-Carotin war mit einer höheren Mortalität durch ischämische Herzkrankheiten oder Lungenkrebs assoziiert. Auf Grundlage dieser Daten wird dementsprechend von der Supplementation antioxidativer Substanzen in höheren Dosierungen abgeraten bis es neue Erkenntnisse bezüglich ihrer Sicherheit und Wirksamkeit gibt. Daher sollten Nahrungsergänzungsmittel hochdosiert an Antioxidantien nicht unbedenklich, sondern an individuelle Bedürfnisse angepasst verabreicht werden [154].

Als mögliche Ursache der toxischen bzw. pro-oxidativen Effekte durch eigentlich antioxidativ wirksame Carotinoide werden u.a Carotinoidmetabolite diskutiert [155]. Nach der Entfaltung der antioxidativen Wirkung von Carotinoiden entstehen viele Abbauprodukte der Carotinoide, die selbst wieder oxidativ und hochreaktiv sein können. Je mehr antioxidative Aktionen ausgeführt werden, desto mehr entstehen Abbauprodukte, die unter bestimmten Umständen wiederum pro-oxidativ und damit potentiell schädigend auf den Organismus einwirken können wie es z.B. bei einer hochdosierten Supplementation mit Carotinoiden bei Menschen mit sowieso erhöhtem oxidativem Stress-Status der Fall sein kann.

Wissenschaftlicher Konsens besteht jedoch bezüglich der positiven Effekte einer oralen Aufnahme natürlicher Antioxidantien in physiologischen Konzentrationen durch eine

ausgewogene Ernährung reich an Obst und Gemüse im Allgemeinen und auch bei therapiebedürftigen Erkrankungen.

5.3. Einschränkungen

In der hier vorliegenden Dissertation konnte aufgrund der uns zugänglichen, relativ kleinen Anzahl an Probanden sowie des limitierten Beobachtungszeitraumes nur eine begrenzte Zahl von gesicherten Resultaten erhalten werden. Dagegen zeigen die nachgewiesenen Tendenzen und Ergebnisse die Kompliziertheit auf wissenschaftlich begründete Zusammenhänge auf diesem Feld zu finden und zu beweisen.

Limitierend für die Auswertungen sind auch die Subjektivität sowie die Vergleichbarkeit der Angaben der Probanden in den Fragebögen. Insbesondere die Evaluation des persönlichen Stresslevels ist schwer objektivierbar und interindividuell sehr verschieden. Stress kann auch intraindividuell unterschiedlich bewertet bzw. wahrgenommen werden. Stress kann einerseits als negativ oder auch als positiver Eustress empfunden werden [156]. Eustress kann entstehen, wenn eine Tätigkeit zwar physisch oder psychisch fordernd ist, jedoch als positiv eingestuft wird, weil sie zum Beispiel als motivierend oder erfüllend wahrgenommen wird. Zudem sind Tätigkeiten, die weder eine Unter- noch Überforderung darstellen und als sinnvoll oder als subjektiven Gewinn darbringend gesehen werden, eher mit Eustress assoziiert.

Des Weiteren hat eine Studie von Yu et al. [91] Biofeedback-Mechanismen bei jungen Probanden beschrieben, die bei regelmäßig aufeinanderfolgenden Messungen der kutanen Carotinoidkonzentration abhängig vom tendenziell positiv oder negativ wahrgenommenen Messergebnis eine Motivation verspürt haben Lebens- oder Ernährungsgewohnheiten zu ändern, um positiven Einfluss auf ihren Gesundheitszustand zu nehmen. Die Biofeedback-Mechanismen und das Wissen um die Möglichkeit der Einflussnahme auf den Gesundheitszustand wurde von Yu et al. als positiv und als mögliche präventive Maßnahme bewertet, da junge gesunde Probanden (n=50 Schüler/innen zwischen 17 und 20 Jahren) untersucht wurden, die auf Grundlage der Messungen zum Teil bewusst oder unterbewusst veränderte Verhaltensmuster hin zu einer gesundheitsfördernden Lebensweise gezeigt haben.

Eben diese Biofeedback-Mechanismen können aber auch einen Einfluss auf die Lebensgewohnheiten der in den Experimenten dieser Dissertation untersuchten Probanden und somit auf ihre Messergebnisse und hier beschriebenen Resultate gehabt haben. Die Probanden haben insgesamt ein Interesse an einem gesundheitsorientierten Thema gezeigt, so dass bei ihnen davon ausgegangen werden muss, dass sie auch generell eher auf eine gesunde Lebensweise mit einer ausgewogenen Ernährung achten, die bereits reich an Antioxidantien ist und sich somit auch keine signifikante Veränderung des antioxidativen Potentials der Haut durch die zusätzliche Gabe von 250 ml eines Smoothies auslösen liess.

Aus diesem Grund sind komplexere Untersuchungen über einen längeren Zeitraum mit einer größeren Anzahl an Probanden notwendig, um den Einfluss von der täglichen Einnahme eines grünen Smoothies sowie Änderungen der Lebensweise auf den Antioxidantienstatus einzustufen. Obwohl Änderungen im antioxidativen Potential beobachtet werden konnten, abhängig vom Alkoholkonsum und anderen Lifestyle-Faktoren, ist es dennoch fraglich, ob diese Veränderungen einen langfristigen Effekt auf die Gesundheit haben.

5.4. Schlussfolgerungen

Eine orale Aufnahme von Antioxidantien aus verschiedenen unverarbeiteten Obst- und Gemüsesorten in Form eines Smoothies erscheint sinnvoll und funktionell zugleich. Es sind keine negativen oder unerwünschten Effekte auf die Gesundheit zu erwarten oder während der Untersuchungen aufgetreten. Funktionelle Nahrungsmittel wie Smoothies werden immer populärer, um neben der Nahrungsaufnahme zur Energiegewinnung auch die Nährstoffvielfalt zu erhöhen und damit Abwehrkräfte, Vitalität und eine Verbesserung des Alterungsprozesses des Organismus zu erzielen [157].

Carotinoide können aus Pflanzen extrahiert oder synthetisch hergestellt werden. Aufgrund der vielen positiven physiologischen Eigenschaften durch Antioxidantien finden sich immer mehr Bestrebungen in der Lebensmittel-, Kosmetik- und Pharmaindustrie solche auf antioxidativen Wirkmechanismen beruhenden Produkte als Nahrungsergänzungsmittel, Nutrazeutika oder funktionelle Lebensmittel („functional food“) zur Vorbeugung oder Abmilderung von Krankheits- und Alterserscheinungen

anzubieten [157-160]. Dabei finden speziell Carotine aufgrund ihrer chemischen Eigenschaften auch seit langem Verwendung in der Industrie als Lebensmittelfarbstoff [161, 162].

Die Einnahme von gesundheitsfördernden Nahrungsmitteln wie Smoothies oder Nahrungsergänzungsmitteln kann keinen ungesunden Lebenswandel ausgleichen. Ein guter physischer und psychischer Status wird durch eine gesunde ausgewogene Ernährung, die Vermeidung von Noxen wie Nikotin und Alkohol sowie Vermeidung von Stress erreicht. Letzteres ist schwierig, da es häufig auf externen Faktoren beruht und sich der eigenen Beeinflussbarkeit entzieht [163].

Smoothies sind eine neue Variante und nährstoffreiche Ergänzung der Nahrungsmittelpalette. Die offensichtlich schnelle, ohne mechanisches Kauen erreichte Verfügbarkeit einer Vielzahl von Antioxidantien bis hin zu sekundären Pflanzenstoffen hat in kurzer Zeit zu deren großer Verbreitung geführt. Die hausgemachten Smoothies aus frischen Zutaten sollten idealerweise unmittelbar nach Zubereitung konsumiert werden, da hier die aktive Konzentration der Antioxidantien am höchsten ist. Gleichzeitig konnte gezeigt werden, dass kommerzielle Produkte, jedoch teilweise verbunden mit einem hohen Zuckergehalt, ebenfalls zu einem tendenziellen, statistisch nicht signifikanten Antistieg des antioxidativen Potentials der Haut führen. Weitere sorgfältig designte Untersuchungen mit exakt dafür entwickelten Kompositionen der flüssigen Nahrungsmittelkomponenten, einer großen Anzahl von Probanden über einen längeren Studienzeitraum von mindestens drei bis vier Monaten sind nötig, um die gefundenen Tendenzen statistisch zu bestätigen.

5.5. Interessenkonflikt

Es besteht kein Interessenkonflikt.

6. Literaturverzeichnis

- [1] Sies H. Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Experimental physiology*. 1997;82:291-5.
- [2] Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The international journal of biochemistry & cell biology*. 2007;39:44-84.
- [3] Darvin ME, Haag S, Meinke M, Zastrow L, Sterry W, Lademann J. Radical production by infrared A irradiation in human tissue. *Skin pharmacology and physiology*. 2010;23:40-6.
- [4] Fuks KB, Woodby B, Valacchi G. Skin damage by tropospheric ozone. *Der Hautarzt; Zeitschrift für Dermatologie, Venerologie, und verwandte Gebiete*. 2019.
- [5] Wei J, Wang B, Wang H, Meng L, Zhao Q, Li X, Xin Y, Jiang X. Radiation-Induced Normal Tissue Damage: Oxidative Stress and Epigenetic Mechanisms. *Oxidative medicine and cellular longevity*. 2019;2019:3010342.
- [6] Kim JJ, Kim YS, Kumar V. Heavy metal toxicity: An update of chelating therapeutic strategies. *Journal of trace elements in medicine and biology : organ of the Society for Minerals and Trace Elements (GMS)*. 2019;54:226-31.
- [7] Weijl NI, Hopman GD, Wipkink-Bakker A, Lentjes EG, Berger HM, Cleton FJ, Osanto S. Cisplatin combination chemotherapy induces a fall in plasma antioxidants of cancer patients. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology*. 1998;9:1331-7.
- [8] Li S, Tan HY, Wang N, Zhang ZJ, Lao L, Wong CW, Feng Y. The Role of Oxidative Stress and Antioxidants in Liver Diseases. *International journal of molecular sciences*. 2015;16:26087-124.
- [9] Burke A, Fitzgerald GA. Oxidative stress and smoking-induced vascular injury. *Progress in cardiovascular diseases*. 2003;46:79-90.
- [10] Liguori I, Russo G, Curcio F, Bulli G, Aran L, Della-Morte D, Gargiulo G, Testa G, Cacciatore F, Bonaduce D, Abete P. Oxidative stress, aging, and diseases. *Clinical interventions in aging*. 2018;13:757-72.
- [11] Servia L, Serrano JCE, Pamplona R, Badia M, Montserrat N, Portero-Otin M, Trujillano J. Location-dependent effects of trauma on oxidative stress in humans. *PloS one*. 2018;13:e0205519.
- [12] McGarry T, Biniiecka M, Veale DJ, Fearon U. Hypoxia, oxidative stress and inflammation. *Free radical biology & medicine*. 2018;125:15-24.
- [13] Martin A, Faes C, Debevec T, Rytz C, Millet G, Pialoux V. Preterm birth and oxidative stress: Effects of acute physical exercise and hypoxia physiological responses. *Redox biology*. 2018;17:315-22.
- [14] Li P, Stetler RA, Leak RK, Shi Y, Li Y, Yu W, Bennett MVL, Chen J. Oxidative stress and DNA damage after cerebral ischemia: Potential therapeutic targets to repair the genome and improve stroke recovery. *Neuropharmacology*. 2018;134:208-17.
- [15] Knez WL, Coombes JS, Jenkins DG. Ultra-endurance exercise and oxidative damage : implications for cardiovascular health. *Sports medicine (Auckland, NZ)*. 2006;36:429-41.
- [16] Vierck HB, Darvin ME, Lademann J, Reissauer A, Baack A, Sterry W, Patzelt A. The influence of endurance exercise on the antioxidative status of human skin. *European journal of applied physiology*. 2012;112:3361-7.
- [17] Lademann J, Köcher W, Yu R, Meinke MC, Na Lee B, Jung S, Sterry W, Darvin ME. Cutaneous carotenoids: the mirror of lifestyle? *Skin pharmacology and physiology*. 2014;27:201.
- [18] Niess A, Fehrenbach E, Northoff H, Dickhuth H. Freie Radikale und oxidativer Stress bei körperlicher Belastung und Trainingsanpassung-Eine aktuelle Übersicht. *Deutsche Zeitschrift für Sportmedizin*. 2002;53:345-53.
- [19] Lademann J, Schanzer S, Meinke M, Sterry W, Darvin ME. Interaction between carotenoids and free radicals in human skin. *Skin pharmacology and physiology*. 2011;24:238-44.
- [20] Finkel T, Holbrook NJ. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature*. 2000;408:239-47.
- [21] Klaunig JE, Kamendulis LM, Hocevar BA. Oxidative stress and oxidative damage in carcinogenesis. *Toxicologic pathology*. 2010;38:96-109.
- [22] Kim MJ, Kim H. Anticancer Effect of Lycopene in Gastric Carcinogenesis. *Journal of cancer prevention*. 2015;20:92-6.

- [23] Friedman M, Levin CE, Lee SU, Kim HJ, Lee IS, Byun JO, Kozukue N. Tomatine-containing green tomato extracts inhibit growth of human breast, colon, liver, and stomach cancer cells. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2009;57:5727-33.
- [24] Kardinaal AFM, van't Veer P, Kok F, Ringstad J, Gómez-Aracena J, Mazaev VP, Kohlmeier L, Martin BC, Aro A, Huttunen JK, Kark JD, Delgado-Rodriguez M, Riemersma RA, Martin-Moreno JM, Kok FJ, Huttunen JK, Kohlmeier L, Martin-Moreno JM, van 't Veer P. Antioxidants in adipose tissue and risk of myocardial infarction: the EURAMIC study. *The Lancet*. 1993;342:1379-84.
- [25] Halliwell B, Gutteridge JM. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *The Biochemical journal*. 1984;219:1-14.
- [26] Halliwell B, Whiteman M. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? *British journal of pharmacology*. 2004;142:231-55.
- [27] Halliwell B. Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant Physiol*. 2006;141:312-22.
- [28] Bertero E, Maack C. Calcium Signaling and Reactive Oxygen Species in Mitochondria. *Circulation research*. 2018;122:1460-78.
- [29] Zuo L, Zhou T, Pannell BK, Ziegler AC, Best TM. Biological and physiological role of reactive oxygen species--the good, the bad and the ugly. *Acta physiologica (Oxford, England)*. 2015;214:329-48.
- [30] Schieber M, Chandel NS. ROS function in redox signaling and oxidative stress. *Current biology : CB*. 2014;24:R453-62.
- [31] Halliwell B. Phagocyte-derived reactive species: salvation or suicide? *Trends in biochemical sciences*. 2006;31:509-15.
- [32] Godala M, Materek-Kuśmierkiewicz I, Moczulski D, Rutkowski M, Szatko F, Gaszyńska E, Tokarski S, Kowalski J. The risk of plasma vitamin A, C, E and D deficiency in patients with metabolic syndrome: A case-control study. *Advances in clinical and experimental medicine : official organ Wroclaw Medical University*. 2017;26:581-6.
- [33] Fischer TW, Slominski A, Zmijewski MA, Reiter RJ, Paus R. Melatonin as a major skin protectant: from free radical scavenging to DNA damage repair. *Experimental dermatology*. 2008;17:713-30.
- [34] Godala MM, Materek-Kuśmierkiewicz I, Moczulski D, Rutkowski M, Szatko F, Gaszyńska E, Tokarski S, Kowalski J. Lower Plasma Levels of Antioxidant Vitamins in Patients with Metabolic Syndrome: A Case Control Study. *Advances in clinical and experimental medicine : official organ Wroclaw Medical University*. 2016;25:689-700.
- [35] Löffler G. *Basiswissen Biochemie*, 5. Auflage, 1998, p. 293-295.
- [36] Owen JB, Butterfield DA. Measurement of oxidized/reduced glutathione ratio. *Methods in molecular biology (Clifton, NJ)*. 2010;648:269-77.
- [37] Snyder LM, Fortier NL, Trainor J, Jacobs J, Leb L, Lubin B, Chiu D, Shohet S, Mohandas N. Effect of hydrogen peroxide exposure on normal human erythrocyte deformability, morphology, surface characteristics, and spectrin-hemoglobin cross-linking. *The Journal of clinical investigation*. 1985;76:1971-7.
- [38] Snyder LM, Fortier NL, Leb L, McKenney J, Trainor J, Sheerin H, Mohandas N. The role of membrane protein sulfhydryl groups in hydrogen peroxide-mediated membrane damage in human erythrocytes. *Biochimica et biophysica acta*. 1988;937:229-40.
- [39] Stratton LP, Rudolph AS, Knoll WK, Jr., Bayne S, Farmer MC. The reduction of methemoglobin levels by antioxidants. *Hemoglobin*. 1988;12:353-68.
- [40] Zitka O, Skalickova S, Gumulec J, Masarik M, Adam V, Hubalek J, Trnkova L, Kruseova J, Eckschlager T, Kizek R. Redox status expressed as GSH:GSSG ratio as a marker for oxidative stress in paediatric tumour patients. *Oncology letters*. 2012;4:1247-53.
- [41] Sitar ME, Aydin S, Cakatay U. Human serum albumin and its relation with oxidative stress. *Clinical laboratory*. 2013;59:945-52.
- [42] Oliveira-Silva JA, Yamamoto JUP, Oliveira RB, Monteiro VCL, Frangipani BJ, Kyosen SO, Martins AM, D'Almeida V. Oxidative stress assessment by glutathione peroxidase activity and glutathione levels in response to selenium supplementation in patients with Mucopolysaccharidosis I, II and VI. *Genetics and molecular biology*. 2019;42:1-8.

- [43] Crapo JD, Oury T, Rabouille C, Slot JW, Chang LY. Copper,zinc superoxide dismutase is primarily a cytosolic protein in human cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1992;89:10405-9.
- [44] Vance CK, Miller AF. Spectroscopic comparisons of the pH dependencies of Fe-substituted (Mn)superoxide dismutase and Fe-superoxide dismutase. *Biochemistry*. 1998;37:5518-27.
- [45] Halvorsen BL, Holte K, Myhrstad MC, Barikmo I, Hvattum E, Remberg SF, Wold AB, Haffner K, Baugerød H, Andersen LF, Moskaug Ø, Jacobs DR, Jr., Blomhoff R. A systematic screening of total antioxidants in dietary plants. *The Journal of nutrition*. 2002;132:461-71.
- [46] Megow I, Darvin ME, Meinke MC, Lademann J. A Randomized Controlled Trial of Green Tea Beverages on the in vivo Radical Scavenging Activity in Human Skin. *Skin pharmacology and physiology*. 2017;30:225-33.
- [47] Arora B, Sethi S, Joshi A, Sagar VR, Sharma RR. Antioxidant degradation kinetics in apples. *Journal of food science and technology*. 2018;55:1306-13.
- [48] Eyarkai Nambi V, Gupta RK, Kumar S, Sharma PC. Degradation kinetics of bioactive components, antioxidant activity, colour and textural properties of selected vegetables during blanching. *Journal of food science and technology*. 2016;53:3073-82.
- [49] Nisar N, Li L, Lu S, Khin NC, Pogson BJ. Carotenoid metabolism in plants. *Molecular plant*. 2015;8:68-82.
- [50] Obana A, Gohto Y, Gellermann W, Ermakov IV, Sasano H, Seto T, Bernstein PS. Skin Carotenoid Index in a large Japanese population sample. *Scientific reports*. 2019;9:9318.
- [51] Cho KS, Shin M, Kim S, Lee SB. Recent Advances in Studies on the Therapeutic Potential of Dietary Carotenoids in Neurodegenerative Diseases. *Oxidative medicine and cellular longevity*. 2018;2018:4120458.
- [52] Britton G. Structure and properties of carotenoids in relation to function. *The FASEB Journal*. 1995;9:1551-8.
- [53] Krinsky NI, Johnson EJ. Carotenoid actions and their relation to health and disease. *Molecular aspects of medicine*. 2005;26:459-516.
- [54] Barker FM, 2nd, Snodderly DM, Johnson EJ, Schalch W, Koepcke W, Gerss J, Neuringer M. Nutritional manipulation of primate retinas, V: effects of lutein, zeaxanthin, and n-3 fatty acids on retinal sensitivity to blue-light-induced damage. *Investigative ophthalmology & visual science*. 2011;52:3934-42.
- [55] Eisenhauer B, Natoli S, Liew G, Flood VM. Lutein and Zeaxanthin-Food Sources, Bioavailability and Dietary Variety in Age-Related Macular Degeneration Protection. *Nutrients*. 2017;9.
- [56] Bernstein PS, Li B, Vachali PP, Gorusupudi A, Shyam R, Henriksen BS, Nolan JM. Lutein, zeaxanthin, and meso-zeaxanthin: The basic and clinical science underlying carotenoid-based nutritional interventions against ocular disease. *Progress in retinal and eye research*. 2016;50:34-66.
- [57] Burns-Whitmore BL, Haddad EH, Sabaté J, Jaceldo-Siegl K, Tanzman J, Rajaram S. Effect of n-3 fatty acid enriched eggs and organic eggs on serum lutein in free-living lacto-ovo vegetarians. *European journal of clinical nutrition*. 2010;64:1332-7.
- [58] National Center for Biotechnology Information. PubChem Database. Lutein, CID=5281243, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Lutein> [accessed 17 June 2020].
- [59] Costa-Rodrigues J, Pinho O, Monteiro PRR. Can lycopene be considered an effective protection against cardiovascular disease? *Food chemistry*. 2018;245:1148-53.
- [60] Ganji V, Kafai MR. Population determinants of serum lycopene concentrations in the United States: data from the Third National Health and Nutrition Examination Survey, 1988-1994. *The Journal of nutrition*. 2005;135:567-72.
- [61] Wiese M, Bashmakov Y, Chalyk N, Nielsen DS, Krych Ł, Kot W, Klochov V, Pristensky D, Bandaletova T, Chernyshova M, Kyle N, Petyaev I. Prebiotic Effect of Lycopene and Dark Chocolate on Gut Microbiome with Systemic Changes in Liver Metabolism, Skeletal Muscles and Skin in Moderately Obese Persons. *BioMed research international*. 2019;2019:4625279.
- [62] Ford ES, Mokdad AH, Giles WH, Brown DW. The metabolic syndrome and antioxidant concentrations: findings from the Third National Health and Nutrition Examination Survey. *Diabetes*. 2003;52:2346-52.

- [63] Shi J, Le Maguer M. Lycopene in tomatoes: chemical and physical properties affected by food processing. *Critical reviews in biotechnology*. 2000;20:293-334.
- [64] Tamburini E, Costa S, Rugiero I, Pedrini P, Marchetti MG. Quantification of Lycopene, β -Carotene, and Total Soluble Solids in Intact Red-Flesh Watermelon (*Citrullus lanatus*) Using On-Line Near-Infrared Spectroscopy. *Sensors (Basel, Switzerland)*. 2017;17.
- [65] National Center for Biotechnology Information. PubChem Database. Lycopene, CID=446925, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Lycopene> [accessed 17 June 2020].
- [66] Novotny JA, Kurilich AC, Britz SJ, Clevidence BA. Plasma appearance of labeled beta-carotene, lutein, and retinol in humans after consumption of isotopically labeled kale. *Journal of lipid research*. 2005;46:1896-903.
- [67] Barua AB, Olson JA. β -Carotene Is Converted Primarily to Retinoids in Rats In Vivo. *The Journal of nutrition*. 2000;130:1996-2001.
- [68] Grune T, Lietz G, Palou A, Ross AC, Stahl W, Tang G, Thurnham D, Yin SA, Biesalski HK. Beta-carotene is an important vitamin A source for humans. *The Journal of nutrition*. 2010;140:2268s-85s.
- [69] Biesalski HK, Chichili GR, Frank J, von Lintig J, Nohr D. Conversion of beta-carotene to retinal pigment. *Vitamins and hormones*. 2007;75:117-30.
- [70] Miyazono S, Isayama T, Delori FC, Makino CL. Vitamin A activates rhodopsin and sensitizes it to ultraviolet light. *Visual neuroscience*. 2011;28:485-97.
- [71] Childs AJ, Cowan G, Kinnell HL, Anderson RA, Saunders PT. Retinoic Acid signalling and the control of meiotic entry in the human fetal gonad. *PloS one*. 2011;6:e20249.
- [72] Parr CL, Magnus MC, Karlstad Ø, Holvik K, Lund-Blix NA, Haugen M, Page CM, Nafstad P, Ueland PM, London SJ, Håberg SE, Nystad W. Vitamin A and D intake in pregnancy, infant supplementation, and asthma development: the Norwegian Mother and Child Cohort. *The American journal of clinical nutrition*. 2018;107:789-98.
- [73] National Center for Biotechnology Information. PubChem Database. beta-Carotene, CID=5280489, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/beta-Carotene> [accessed 17 June 2020].
- [74] Chuong CM, Nickoloff BJ, Elias PM, Goldsmith LA, Macher E, Maderson PA, Sundberg JP, Tagami H, Plonka PM, Thestrup-Pederson K, Bernard BA, Schröder JM, Dotto P, Chang CM, Williams ML, Feingold KR, King LE, Kligman AM, Rees JL, Christophers E. What is the 'true' function of skin? *Experimental dermatology*. 2002;11:159-87.
- [75] Blausen.com staff (2014). "Medical gallery of Blausen Medical 2014". *WikiJournal of Medicine* 1 (2). DOI:10.15347/wjm/2014.010. ISSN 2002-4436 [accessed 20 June 2020].
- [76] Altmeyer P. Epidermis. *Altmeyers Enzyklopädie*. <https://www.enzyklopaedie-dermatologie.de/dermatologie/epidermis-1181>. Version mit letzter Aktualisierung am: 24.10.2017. [accessed 27 June 2020].
- [77] Altmeyer P. Stratum corneum. *Altmeyers Enzyklopädie*. <https://www.enzyklopaedie-dermatologie.de/dermatologie/stratum-corneum-3803>. Version mit letzter Aktualisierung am: 24.10.2017. [accessed 27 June 2020].
- [78] Lehmann P, Schwarz T. Photodermatoses: diagnosis and treatment. *Deutsches Arzteblatt international*. 2011;108:135-41.
- [79] Brenner M, Hearing VJ. The protective role of melanin against UV damage in human skin. *Photochemistry and photobiology*. 2008;84:539-49.
- [80] Albrecht S, Jung S, Müller R, Lademann J, Zuberbier T, Zastrow L, Reble C, Beckers I, Meinke MC. Skin type differences in solar-simulated radiation-induced oxidative stress. *The British journal of dermatology*. 2019;180:597-603.
- [81] Fitzpatrick TB. The validity and practicality of sun-reactive skin types i through vi. *Archives of Dermatology*. 1988;124:869-71.
- [82] Shindo Y, Witt E, Han D, Epstein W, Packer L. Enzymic and non-enzymic antioxidants in epidermis and dermis of human skin. *The Journal of investigative dermatology*. 1994;102:122-4.
- [83] Groten K, Marini A, Grether-Beck S, Jaenicke T, Ibbotson SH, Moseley H, Ferguson J, Krutmann J. Tomato Phytonutrients Balance UV Response: Results from a Double-Blind, Randomized, Placebo-Controlled Study. *Skin pharmacology and physiology*. 2019;32:101-8.

- [84] Jacob RA. The integrated antioxidant system. *Nutrition Research*. 1995;15:755-66.
- [85] Darvin ME, Fluhr JW, Caspers P, van der Pool A, Richter H, Patzelt A, Sterry W, Lademann J. In vivo distribution of carotenoids in different anatomical locations of human skin: comparative assessment with two different Raman spectroscopy methods. *Experimental dermatology*. 2009;18:1060-3.
- [86] Darvin M, Zastrow L, Sterry W, Lademann J. Effect of supplemented and topically applied antioxidant substances on human tissue. *Skin pharmacology and physiology*. 2006;19:238-47.
- [87] Ermakov IV, Ermakova MR, Gellermann W, Lademann J. Noninvasive selective detection of lycopene and beta-carotene in human skin using Raman spectroscopy. *J Biomed Opt*. 2004;9:332-8.
- [88] Meinke MC, Darvin ME, Vollert H, Lademann J. Bioavailability of natural carotenoids in human skin compared to blood. *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics : official journal of Arbeitsgemeinschaft fur Pharmazeutische Verfahrenstechnik eV*. 2010;76:269-74.
- [89] Darvin ME, Patzelt A, Knorr F, Blume-Peytavi U, Sterry W, Lademann J. One-year study on the variation of carotenoid antioxidant substances in living human skin: influence of dietary supplementation and stress factors. *J Biomed Opt*. 2008;13:044028.
- [90] Mayne ST, Cartmel B, Scarmo S, Lin H, Leffell DJ, Welch E, Ermakov I, Bhosale P, Bernstein PS, Gellermann W. Noninvasive assessment of dermal carotenoids as a biomarker of fruit and vegetable intake. *The American journal of clinical nutrition*. 2010;92:794-800.
- [91] Yu R-X, Köcher W, Darvin ME, Büttner M, Jung S, Lee BN, Klotter C, Hurrelmann K, Meinke MC, Lademann J. Spectroscopic biofeedback on cutaneous carotenoids as part of a prevention program could be effective to raise health awareness in adolescents. *Journal of Biophotonics*. 2014;7:926-37.
- [92] Darvin M, Patzelt A, Gehse S, Schanzer S, Benderoth C, Sterry W, Lademann J. Cutaneous concentration of lycopene correlates significantly with the roughness of the skin. *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics : official journal of Arbeitsgemeinschaft fur Pharmazeutische Verfahrenstechnik eV*. 2008;69:943-7.
- [93] Lademann J, Vergou T, Darvin ME, Patzelt A, Meinke MC, Voit C, Papakostas D, Zastrow L, Sterry W, Doucet O. Influence of Topical, Systemic and Combined Application of Antioxidants on the Barrier Properties of the Human Skin. *Skin pharmacology and physiology*. 2016;29:41-6.
- [94] Darvin ME, Fluhr JW, Schanzer S, Richter H, Patzelt A, Meinke MC, Zastrow L, Golz K, Doucet O, Sterry W, Lademann J. Dermal carotenoid level and kinetics after topical and systemic administration of antioxidants: enrichment strategies in a controlled in vivo study. *Journal of dermatological science*. 2011;64:53-8.
- [95] Jung S, Darvin ME, Schleusener J, Thiede G, Lademann J, Braune M, Maiwald M, Sumpf B, Tränkle G, Kutzer D, Elban F, Fuss H. In vivo detection of changes in cutaneous carotenoids after chemotherapy using shifted excitation resonance Raman difference and fluorescence spectroscopy. *Skin research and technology : official journal of International Society for Bioengineering and the Skin (ISBS) [and] International Society for Digital Imaging of Skin (ISDIS) [and] International Society for Skin Imaging (ISSI)*. 2020;26:301-7.
- [96] Lee BN, Jung S, Darvin ME, Eucker J, Kühnhardt D, Sehouli J, Chekerov R, Patzelt A, Fuss H, Yu RX, Lademann J. Influence of Chemotherapy on the Antioxidant Status of Human Skin. *Anticancer research*. 2016;36:4089-93.
- [97] Jung S, Sehouli J, Chekerov R, Kluschke F, Patzelt A, Fuss H, Knorr F, Lademann J. Prevention of palmo-plantar erythrodysesthesia in patients treated with pegylated liposomal doxorubicin (Caelyx®). *Supportive care in cancer : official journal of the Multinational Association of Supportive Care in Cancer*. 2017;25:3545-9.
- [98] Darvin ME, Sterry W, Lademann J. Resonance Raman spectroscopy as an effective tool for the determination of antioxidative stability of cosmetic formulations. *J Biophotonics*. 2010;3:82-8.
- [99] Golenhofen K. *Basislehrbuch Physiologie - Lehrbuch, Kompendium, Fragen und Antworten*. 2004;3:344.
- [100] Goodman DS, Blomstrand R, Werner B, Huang HS, Shiratori T. The intestinal absorption and metabolism of vitamin A and beta-carotene in man. *The Journal of clinical investigation*. 1966;45:1615-23.

- [101] Fluhr JW, Caspers P, van der Pol JA, Richter H, Sterry W, Lademann J, Darvin ME. Kinetics of carotenoid distribution in human skin in vivo after exogenous stress: disinfectant and wIRA-induced carotenoid depletion recovers from outside to inside. *J Biomed Opt.* 2011;16:035002.
- [102] Rock CL, Swendseid ME, Jacob RA, McKee RW. Plasma carotenoid levels in human subjects fed a low carotenoid diet. *The Journal of nutrition.* 1992;122:96-100.
- [103] E. DM. Kinetic of carotenoids in human skin. Doctoral Thesis. Berlin: Charité Universitätsmedizin, 2007. .
- [104] Altmeyer P. Aurantiasis cutis. *Altmeyers Enzyklopädie.* <https://www.enzyklopaedie-dermatologie.de/dermatologie/aurantiasis-cutis-570>. Version mit letzter Aktualisierung am: 22.08.2019. [accessed 21 June 2020].
- [105] Edigin E, Asemota IR, Olisa E, Nwaichi C. Carotenemia: A Case Report. *Cureus.* 2019;11:e5218.
- [106] Scarmo S, Cartmel B, Lin H, Leffell DJ, Welch E, Bhosale P, Bernstein PS, Mayne ST. Significant correlations of dermal total carotenoids and dermal lycopene with their respective plasma levels in healthy adults. *Archives of biochemistry and biophysics.* 2010;504:34-9.
- [107] Ermakov IV, Ermakova M, Sharifzadeh M, Gorusupudi A, Farnsworth K, Bernstein PS, Stookey J, Evans J, Arana T, Tao-Lew L, Isman C, Clayton A, Obana A, Whigham L, Redelfs AH, Jahns L, Gellermann W. Optical assessment of skin carotenoid status as a biomarker of vegetable and fruit intake. *Archives of biochemistry and biophysics.* 2018;646:46-54.
- [108] Frijhoff J, Winyard PG, Zarkovic N, Davies SS, Stocker R, Cheng D, Knight AR, Taylor EL, Oettrich J, Ruskovska T, Gasparovic AC, Cuadrado A, Weber D, Poulsen HE, Grune T, Schmidt HH, Ghezzi P. Clinical Relevance of Biomarkers of Oxidative Stress. *Antioxidants & redox signaling.* 2015;23:1144-70.
- [109] Sheftel J, Loechl C, Mokhtar N, Tanumihardjo SA. Use of Stable Isotopes to Evaluate Bioefficacy of Provitamin A Carotenoids, Vitamin A Status, and Bioavailability of Iron and Zinc. *Advances in nutrition (Bethesda, Md).* 2018;9:625-36.
- [110] Lauer AC, Groth N, Haag SF, Darvin ME, Lademann J, Meinke MC. Radical scavenging capacity in human skin before and after vitamin C uptake: an in vivo feasibility study using electron paramagnetic resonance spectroscopy. *The Journal of investigative dermatology.* 2013;133:1102-4.
- [111] Darvin ME, Gersonde I, Meinke M, Sterry W, Lademann J. Non-invasive in vivo determination of the carotenoids beta-carotene and lycopene concentrations in the human skin using the Raman spectroscopic method. *Journal of Physics D: Applied Physics.* 2005;38:2696-700.
- [112] Siems W, Wiswedel I, Salerno C, Crifò C, Augustin W, Schild L, Langhans C-D, Sommerburg O. β -Carotene breakdown products may impair mitochondrial functions — potential side effects of high-dose β -carotene supplementation. *The Journal of Nutritional Biochemistry.* 2005;16:385-97.
- [113] Kim T-J, Byun J-S, Kwon HS, Kim D-Y. Cellular toxicity driven by high-dose vitamin C on normal and cancer stem cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 2018;497:347-53.
- [114] Neuhouser ML, Patterson RE, Thornquist MD, Omenn GS, King IB, Goodman GE. Fruits and vegetables are associated with lower lung cancer risk only in the placebo arm of the beta-carotene and retinol efficacy trial (CARET). *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology.* 2003;12:350-8.
- [115] Darvin ME, Meinke MC, Sterry W, Lademann J. Optical methods for noninvasive determination of carotenoids in human and animal skin. *J Biomed Opt.* 2013;18:61230.
- [116] Darvin M, Magnussen B, Lademann J, Dr. Koecher W. Multiple spatially resolved reflection spectroscopy for in vivo determination of carotenoids in human skin and blood. *Laser Physics Letters.* 2016;13:095601.
- [117] Open Food Facts. <https://de.openfoodfacts.org/produkt/5038862238137/green-smoothie-innocent> [accessed 18April 2020]
- [118] Innocent drinks. <https://www.innocentdrinks.de/fruchtiges/smoothie/green-smoothie> [accessed 18April 2020]
- [119] U.S. Department of Agriculture, Agricultural Research Service. FoodData Central, 2019. fdc.nal.usda.gov. [accessed 18April 2020].

- [120] Clark RJH. Rayleigh, Ramsay, Rutherford and Raman – their connections with, and contributions to, the discovery of the Raman effect. *Analyst*. 2013;138:729-34.
- [121] Smekal A. Zur Quantentheorie der Dispersion. *Naturwissenschaften*. 1923;11:873-5.
- [122] Kramers HA, Heisenberg W. Über die Streuung von Strahlung durch Atome. *Zeitschrift für Physik*. 1925;31:681-708.
- [123] Raman CV, Krishnan KS. A New Type of Secondary Radiation. *Nature*. 1928;121:501-2.
- [124] Darvin ME, Gersonde I, Albrecht H, Meinke M, Sterry W, Lademann J. Non-invasive in vivo detection of the carotenoid antioxidant substance lycopene in the human skin using the resonance Raman spectroscopy. *Laser Physics Letters*. 2006;3:460-3.
- [125] Darvin ME, Gersonde I, Albrecht H, Sterry W, Lademann J. Resonance Raman spectroscopy for the detection of carotenoids in foodstuffs. Influence of the nutrition on the antioxidative potential of the skin. *Laser Physics Letters*. 2007;4:452-6.
- [126] Darvin ME, Gersonde I, Albrecht H, Gonchukov SA, Sterry W, Lademann J. Determination of beta carotene and lycopene concentrations in human skin using resonance Raman spectroscopy. *Laser Physics*. 2005;15:295-9.
- [127] Rodriguez-Amaya DB. *A Guide to Carotenoid Analysis in Foods*, ILSI Press, Washington (2001).
- [128] Darvin ME, Sandhagen C, Koecher W, Sterry W, Lademann J, Meinke MC. Comparison of two methods for noninvasive determination of carotenoids in human and animal skin: Raman spectroscopy versus reflection spectroscopy. *J Biophotonics*. 2012;5:550-8.
- [129] World Medical Association Declaration of Helsinki: ethical principles for medical research involving human subjects. *Jama*. 2013;310:2191-4.
- [130] ICH Harmonised Tripartite Guideline: Guideline for Good Clinical Practice. *Journal of postgraduate medicine*. 2001;47:199-203.
- [131] Maeter H. Das kutan messbare antioxidative Potenzial von Schwangeren und Neugeborenen. Doctoral Thesis. Universitätsfrauenklinik und Poliklinik am Klinikum Südstadt Rostock, 2012.
- [132] Reboul E. Absorption of vitamin A and carotenoids by the enterocyte: focus on transport proteins. *Nutrients*. 2013;5:3563-81.
- [133] Jung B, Darvin ME, Jung S, Albrecht S, Schanzer S, Meinke MC, Thiede G, Lademann J. Kinetics of the carotenoid concentration degradation of smoothies and their influence on the antioxidant status of the human skin in vivo during 8 wks daily consumption. *Nutrition Research*. 2020.
- [134] Franco R, Navarro G, Martínez-Pinilla E. Antioxidants versus Food Antioxidant Additives and Food Preservatives. *Antioxidants (Basel, Switzerland)*. 2019;8.
- [135] Kaczmarczyk MM, Miller MJ, Freund GG. The health benefits of dietary fiber: beyond the usual suspects of type 2 diabetes mellitus, cardiovascular disease and colon cancer. *Metabolism*. 2012;61:1058-66.
- [136] Borel P. Genetic variations involved in interindividual variability in carotenoid status. *Molecular nutrition & food research*. 2012;56:228-40.
- [137] Lietz G, Oxley A, Leung W, Hesketh J. Single nucleotide polymorphisms upstream from the β -carotene 15,15'-monooxygenase gene influence provitamin A conversion efficiency in female volunteers. *The Journal of nutrition*. 2012;142:161s-5s.
- [138] Hickenbottom SJ, Follett JR, Lin Y, Dueker SR, Burri BJ, Neidlinger TR, Clifford AJ. Variability in conversion of beta-carotene to vitamin A in men as measured by using a double-tracer study design. *The American journal of clinical nutrition*. 2002;75:900-7.
- [139] van Het Hof KH, West CE, Weststrate JA, Hautvast JG. Dietary factors that affect the bioavailability of carotenoids. *The Journal of nutrition*. 2000;130:503-6.
- [140] Darvin ME, Sterry W, Lademann J, Patzelt A. Alcohol consumption decreases the protection efficiency of the antioxidant network and increases the risk of sunburn in human skin. *Skin pharmacology and physiology*. 2013;26:45-51.
- [141] Wu D, Cederbaum AI. Alcohol, oxidative stress, and free radical damage. *Alcohol research & health : the journal of the National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism*. 2003;27:277-84.
- [142] Sato M, Ray PS, Maulik G, Maulik N, Engelman RM, Bertelli AA, Bertelli A, Das DK. Myocardial protection with red wine extract. *Journal of cardiovascular pharmacology*. 2000;35:263-8.

- [143] Moehrle M, Dietrich H, Patz CD, Häfner HM. Sun protection by red wine? *Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft = Journal of the German Society of Dermatology : JDDG*. 2009;7:29-32, 29-33.
- [144] Tsang C, Higgins S, Duthie GG, Duthie SJ, Howie M, Mullen W, Lean ME, Crozier A. The influence of moderate red wine consumption on antioxidant status and indices of oxidative stress associated with CHD in healthy volunteers. *The British journal of nutrition*. 2005;93:233-40.
- [145] Ming Z, Fan YJ, Yang X, Lutt WW. Synergistic protection by S-adenosylmethionine with vitamins C and E on liver injury induced by thioacetamide in rats. *Free radical biology & medicine*. 2006;40:617-24.
- [146] Wang HH, Chowdhury KK, Lutt WW. A synergistic, balanced antioxidant cocktail, protects aging rats from insulin resistance and absence of meal-induced insulin sensitization (AMIS) syndrome. *Molecules (Basel, Switzerland)*. 2015;20:669-82.
- [147] Kiokias S, Gordon MH. Dietary supplementation with a natural carotenoid mixture decreases oxidative stress. *European journal of clinical nutrition*. 2003;57:1135-40.
- [148] Slavin JL, Lloyd B. Health benefits of fruits and vegetables. *Advances in nutrition (Bethesda, Md)*. 2012;3:506-16.
- [149] Pezdirc K, Hutchesson MJ, Williams RL, Rollo ME, Burrows TL, Wood LG, Oldmeadow C, Collins CE. Consuming High-Carotenoid Fruit and Vegetables Influences Skin Yellowness and Plasma Carotenoids in Young Women: A Single-Blind Randomized Crossover Trial. *Journal of the Academy of Nutrition and Dietetics*. 2016;116:1257-65.
- [150] Tan KW, Graf BA, Mitra SR, Stephen ID. Daily Consumption of a Fruit and Vegetable Smoothie Alters Facial Skin Color. *PLoS one*. 2015;10:e0133445.
- [151] Omenn GS, Goodman GE, Thornquist MD, Balmes J, Cullen MR, Glass A, Keogh JP, Meyskens FL, Valanis B, Williams JH, Barnhart S, Hammar S. Effects of a combination of beta carotene and vitamin A on lung cancer and cardiovascular disease. *The New England journal of medicine*. 1996;334:1150-5.
- [152] Omenn GS, Goodman GE, Thornquist MD, Rosenstock L, Barnhart S, Gyls-Colwell I, Metch B, Lund B. The Carotene and Retinol Efficacy Trial (CARET) to prevent lung cancer in high-risk populations: pilot study with asbestos-exposed workers. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*. 1993;2:381-7.
- [153] Goodman GE, Omenn GS, Thornquist MD, Lund B, Metch B, Gyls-Colwell I. The Carotene and Retinol Efficacy Trial (CARET) to prevent lung cancer in high-risk populations: pilot study with cigarette smokers. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*. 1993;2:389-96.
- [154] Harvie M. Nutritional supplements and cancer: potential benefits and proven harms. *American Society of Clinical Oncology educational book American Society of Clinical Oncology Annual Meeting*. 2014:e478-86.
- [155] Shin J, Song MH, Oh JW, Keum YS, Saini RK. Pro-Oxidant Actions of Carotenoids in Triggering Apoptosis of Cancer Cells: A Review of Emerging Evidence. *Antioxidants (Basel, Switzerland)*. 2020;9.
- [156] Parker KN, Ragsdale JM. Effects of Distress and Eustress on Changes in Fatigue from Waking to Working. *Applied psychology Health and well-being*. 2015;7:293-315.
- [157] Santos-Buelga C, González-Paramás AM, Oludemi T, Ayuda-Durán B, González-Manzano S. Plant phenolics as functional food ingredients. *Advances in food and nutrition research*. 2019;90:183-257.
- [158] Boots AW, Haenen GR, Bast A. Health effects of quercetin: from antioxidant to nutraceutical. *European journal of pharmacology*. 2008;585:325-37.
- [159] Serafini M, Peluso I. Functional Foods for Health: The Interrelated Antioxidant and Anti-Inflammatory Role of Fruits, Vegetables, Herbs, Spices and Cocoa in Humans. *Current pharmaceutical design*. 2016;22:6701-15.
- [160] Wilson DW, Nash P, Buttar HS, Griffiths K, Singh R, De Meester F, Horiuchi R, Takahashi T. The Role of Food Antioxidants, Benefits of Functional Foods, and Influence of Feeding Habits on the Health of the Older Person: An Overview. *Antioxidants (Basel, Switzerland)*. 2017;6.
- [161] Sigurdson GT, Tang P, Giusti MM. Natural Colorants: Food Colorants from Natural Sources. *Annual review of food science and technology*. 2017;8:261-80.

[162] Wrolstad RE, Culver CA. Alternatives to those artificial FD&C food colorants. *Annual review of food science and technology*. 2012;3:59-77.

[163] Cohen S, Gianaros PJ, Manuck SB. A Stage Model of Stress and Disease. *Perspectives on psychological science : a journal of the Association for Psychological Science*. 2016;11:456-63.

7. Anhang

Fragebogen zur Ernährungs- und Lebensgewohnheiten

Bitte beantworten Sie den folgenden Fragebogen wahrheitsgemäß. Die Auswertung der Daten erfolgt ausschließlich im Rahmen der Studie. Keine der von Ihnen gemachten Angaben wird in Bezug zu Ihrem Namen veröffentlicht. Wenn Sie meinen, zu einer Frage gibt es keine passende Antwortmöglichkeit, nehmen Sie die Antwort, die am ehesten zutrifft.

Probandennummer: _____ Visite: _____

1. Alter: _____ Jahre

Geschlecht: männlich weiblich ?

2. Waren Sie in der letzten Woche krank oder sind Sie noch akut erkrankt, (z.B. Erkältung, Grippe etc.)? Ja Nein

3. Hatten Sie heute oder in den letzten Tagen mehr oder weniger Stress (beruflich oder privat) als sonst?

1. Mein Stressniveau hat sich nicht verändert
2. Ja, ich habe mehr Stress
3. Ja, ich habe weniger Stress

4. Waren Sie in den letzten zwei Tagen im Sonnenstudie oder haben sich gesonnt bzw. waren Sie viel in der Sonne (z.B. beim Sport)?

1. Ja
2. Nein

5. Wie häufig konsumieren Sie alkoholische Getränke?

Selten/ nie	>1 Mal pro Monat	>1Mal/ Woche	≥ 4 Mal pro Woche
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

a. Sind Sie derzeit aktiver Raucher?

6. ja nein

a. Wenn ja, wieviele Zigaretten rauchen Sie pro Tag im Schnitt?

<input type="checkbox"/> < 10 Zig/ Tag	<input type="checkbox"/> >10 Zig/ Tag
--	---------------------------------------

8. Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Bena Jung, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Kinetik der Carotinoidkonzentration hausgemachter vs. kommerzieller Smoothies *in vitro* und ihr Einfluss auf den kutanen Antioxidantienstatus *in vivo* bei täglicher Einnahme über einen Zeitraum von 8 Wochen“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren/innen beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) werden von mir verantwortet.

Ich versichere ferner, dass ich die in Zusammenarbeit mit anderen Personen generierten Daten, Datenauswertungen und Schlussfolgerungen korrekt gekennzeichnet und meinen eigenen Beitrag sowie die Beiträge anderer Personen korrekt kenntlich gemacht habe (siehe Anteilserklärung). Texte oder Textteile, die gemeinsam mit anderen erstellt oder verwendet wurden, habe ich korrekt kenntlich gemacht.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Erstbetreuer/in, angegeben sind. Für sämtliche im Rahmen der Dissertation entstandenen Publikationen wurden die Richtlinien des ICMJE (International Committee of Medical Journal Editors; www.icmje.org) zur Autorenschaft eingehalten. Ich erkläre ferner, dass ich mich zur Einhaltung der Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis verpflichte.

Weiterhin versichere ich, dass ich diese Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits an einer anderen Fakultät eingereicht habe.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§§156, 161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

9. Anteilserklärung an erfolgter Publikation

Bena Jung hatte Anteil an der folgenden Publikation:

Bena Jung, Maxim E. Darwin, Sora Jung, Stephanie Albrecht, Sabine Schanzer, Martina C. Meinke, Gisela Thiede, Juergen Lademann, Kinetics of the carotenoid concentration degradation of smoothies and their influence on the antioxidant status of the human skin in vivo during 8 weeks of daily consumption, Nutrition Research, Volume 81, 2020, Pages 38-46.

Beitrag von Bena Jung im Einzelnen:

Miterstellung des Ethikantrages, Planung und Durchführung der Experimente vor Studienbeginn. Organisation und Durchführung der Messungen der *in vitro* sowie der *in vivo* Studien. Erhebung, Unterstützung bei der statistischen Auswertung und Interpretation der gewonnenen Daten. Aus den von mir erhobenen Daten und statistischen Auswertung sind die Tabellen 1, 2 und 3 (Table 1-3) sowie die Diagramme 1-4 (Fig. 1-4) der Publikation entstanden. Erstellen der Tabellen und Abbildungen der Publikation. Verfassen und Revision der wissenschaftlichen Publikation.

Unterschrift, Datum und Stempel des erstbetreuenden Hochschullehrers

Unterschrift der Doktorandin

10. Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

11. Danksagung

Mein ganz besonderer Dank gilt Prof. Dr. Dr.-Ing. Lademann für seine geduldige Betreuung und Unterstützung meiner Doktorarbeit. Des Weiteren möchte ich mich bei allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Dr.-Ing. Lademann bedanken, dass sie mich so freundlich in ihr Team aufgenommen haben, insbesondere den an meiner wissenschaftlichen Publikation beteiligten Co-Autoren von denen ich viel gelernt habe. Insbesondere herzlichen Dank an Dr. Dr. Maxim Darwin und Dr. med. Sora Jung für ihr Wissen und ihre Unterstützung bei der Erstellung der Publikation sowie bei Dr. rer. nat. Stephanie Albrecht für Ihre Hilfe bei der statistischen Auswertung der Ergebnisse. Ich bedanke mich ganz herzlich bei Sabine Schanzer für die Unterstützung bei der Durchführung der Experimente, bei Giesela Thiede und Ellen Eby für das Korrigieren der zahlreichen Manuskripte in Deutsch und Englisch sowie bei Frau Domke für die freundliche Organisation vieler Termine und Details. Vielen herzlichen Dank an alle Probanden der Studie. Vielen lieben Dank an Frederic Jaeckel für den technischen Support, zahlreiche Reparaturen und Beheben von Software-Problemen. Vielen Dank auch an Priv.-Doz. Dr. med. Bernd Frericks, der mir die Möglichkeit gab neben meiner Assistenzarztausbildung am DRK-Westend auch die Promotion und Experimente durchzuführen.

Meiner ganzen Familie und Freunden nah und fern möchte ich danken, insbesondere meinen Eltern und meiner Schwester für ihre liebevolle und bedingungslose Unterstützung in allen Lebenslagen sowie allen Dawirs, allen voran Stefan und Kilian.