

Modulation des oxidativen Stresstatus und dessen Auswirkungen auf Zellen und Haut

1. Forschungsziel

Ziel des Projektes ist der Vergleich verschiedener *in vitro* Methoden mit *in vivo* Methoden, die die Wirksamkeit von Antioxidantien anhand der Substanzen Vitamin E, Vitamin C, Carcinin und Liponsäure belegen. Dazu sollen zwei verschiedene Schädigungsmodelle UVA und Ozon eingesetzt werden. Auf der Basis dieser Untersuchungsergebnisse ist es möglich, eine Wirksamkeitsabschätzung der einzelnen Antioxidantien definiert durchzuführen.

Die Aufklärung der wissenschaftlichen Zusammenhänge zwischen Wirkung und Rezepturaufbau erlaubt es vor allem kleinen und mittleren Unternehmen (KMU's) konkrete Empfehlungen zur zeit- und kostensparenden Entwicklung von wirkungsvollen Anti-Aging-Hautpflege Mitteln transformierbar auf andere hier nicht geprüfte kosmetische Systeme zu geben.

2. Lösungsweg

Die Messung der induzierten Chemilumineszenz gilt als sehr empfindliches, nicht invasives *in vivo* Verfahren zur Wirksamkeitsprüfung an Probanden. Es wird untersucht, inwiefern durch die topische Applikation von Antioxidantien der oxidative Stress der Haut nach Einsatz der Stressnoxen UVA und Ozon vermindert wird.

Bei den *in vitro* Untersuchungen werden neben Zellkulturen (humane Keratinocyten und Fibroblasten) humane Hautmodelle (Epidermis- und Vollhautmodelle) eingesetzt. Die lebenden Zellen und Hautmodelle werden nach Zusatz verschiedener Antioxidantien den Stressnoxen UVA und Ozon ausgesetzt. Als Messparameter dienen die Zellvitalität, die Zellproliferation mit ihren Endpunkten Lactatdehydrogenase (LDH)- Interleukin 1 α (IL-1 α)- und Prostaglandin E2-Expression (PGE-2), die Proteinoxidation, die Gesamtperoxidbestimmung sowie die spontane Chemolumineszenz der Zellen.

Folgende Antioxidantien werden in diesem Forschungsvorhaben eingesetzt: Vitamin E und Vitamin E-Acetat, Vitamin C, Carcinin und Liponsäure.

3. Forschungsergebnisse

Die Ergebnisse zeigen, dass die Quantifizierung der stressinduzierten Chemilumineszenz eine geeignete Methode ist, die Effektivität von Antioxidantien *in vivo* nachzuweisen. Die Schädigungsmodelle UVA und Ozon eignen sich beide zur Überprüfung der Aktivität kosmetischer Wirkstoffe mittels Chemilumineszenz-Untersuchungen. Durch die UVA-Bestrahlung als auch durch die Ozonbegasung wird bei Probanden ein vergleichbarer oxidativer Stress gesetzt. Allerdings ist der Nachweis der antioxidativen Wirksamkeit der verschiedenen Wirksubstanzen vor allem abhängig von der Art des Schädigungsmodells (s. Tab. 1).

Tab. 1: Güte der Nachweisbarkeit der antioxidativen Wirksamkeit der getesteten Wirksubstanzen mit den Schädigungsmodellen UVA und Ozon. ++ = sehr gute Nachweisbarkeit, + = gute Nachweisbarkeit, -- schlechte Nachweisbarkeit

Wirksubstanz \ Schädigungsmodell	Vitamin E	Vitamin C	Carcinin	Liponsäure
UVA	--	++	--	++
Ozon	+	--	+	+

Während die antioxidative Wirksamkeit der Substanzen Vitamin E und Carcinin nur mit dem Schädigungsmodell Ozon nachgewiesen werden können, lässt sich die antioxidative Wirksamkeit von Vitamin C nur mit dem Schädigungsmodell UVA dokumentieren. Einzig der Wirkstoff Liponsäure zeigt in beiden Schädigungsmodellen UVA und Ozon antioxidative Wirksamkeit, allerdings wesentlich ausgeprägter im Schädigungsmodell UVA (Abb. 1).

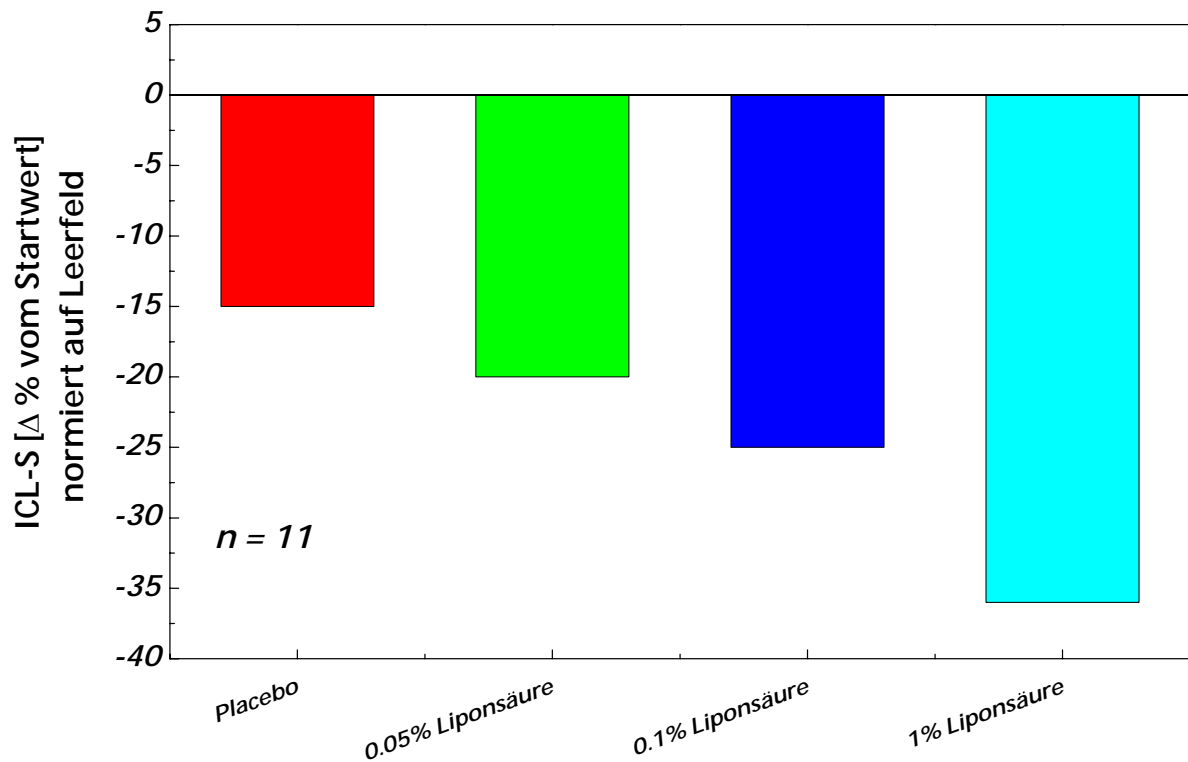


Abb.1: Relative Änderung des UVA-induzierten ICL-S Integrals zwischen Start- und Endwert bezogen auf den Startwert und normiert auf Leerfeld nach 14tägiger täglicher Applikation liponsäurehaltiger Cremes.

Zellkulturen und dreidimensionale Hautmodelle eignen sich beide zur Überprüfung der in vitro Aktivität kosmetischer Wirkstoffe. Dabei zeigen Fibroblasten ein vergleichbares Reaktionsverhalten auf oxidativen Stress wie Keratinocyten. Während die Testung von lipophilen Agenzien im Zellkultursystem durch die mangelnde Löslichkeit im wässrigen Nährmedium begrenzt ist, können bei der Testung mit Hautmodellen auch lipophile Substanzen und Fertigformulierungen in praxisnahen Konzentrationen geprüft werden.

Durch die UV-Bestrahlung als auch durch Ozonexposition kann in den verwendeten Zellkulturen und Hautmodellen ein vergleichbarer oxidativer Stress gesetzt werden, sodass neue Wirkstoffsysteme optimal auf ihre Eignung in Bezug auf die alltäglichen umweltbedingten Stressnoxen überprüft werden können. Die getesteten Substanzen Vitamin E und C, Liponsäure sowie Carcinin zeigen eine Schutzwirkung gegen beide oxidative Noxen, wenn auch zum Teil in geringfügig unterschiedlicher Ausprägung. Der optimale Nachweis einer antioxidativen Aktivität variiert für die eingesetzten Wirkstoffe in Abhängigkeit von der gewählten

in vitro Methode, dem Schädigungsmodell und den ausgewählten Endpunkten. Dabei gibt eine Kombination geeigneter Endpunkte aufschlussreiche Hinweise auf die antioxidative Wirksamkeit einer Prüfsubstanz.

Als optimale Endpunkte für die Nachweisbarkeit von AO haben sich die Endpunkte LDH-, IL-1 α - sowie PGE-2-Expression herausgestellt (Abb. 2). Weniger gut lässt sich die antioxidative Wirksamkeit mit den Endpunkten Gesamtperoxidgehalt und Carbonylproteinbildung bestimmen.

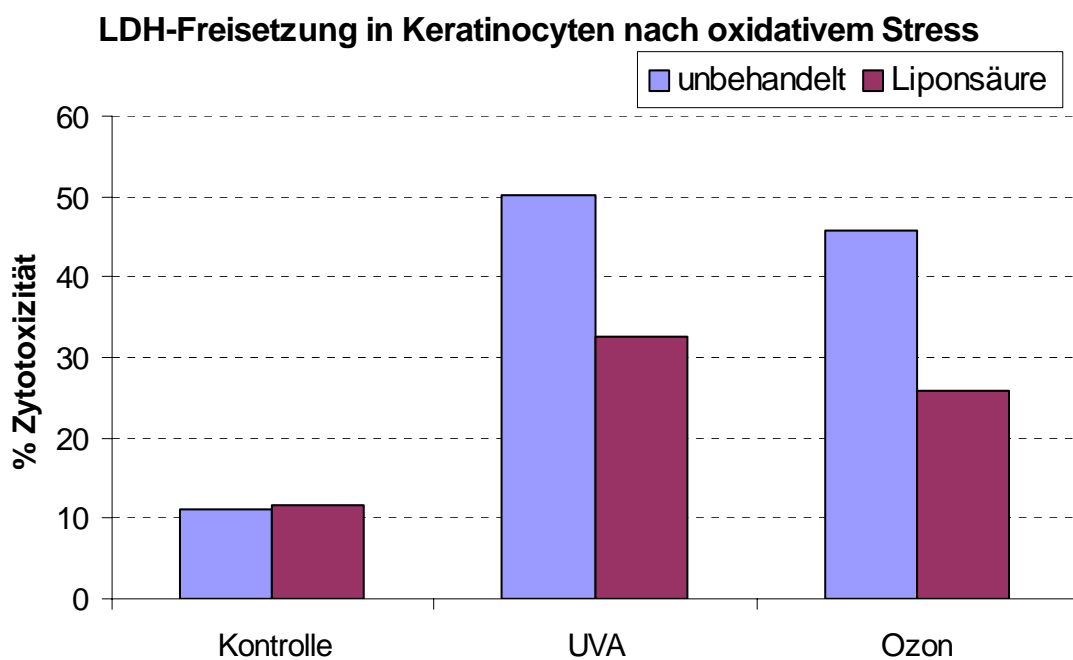


Abb. 2: Einfluss von Liponsäure (0,05 %) auf die LDH-Freisetzung von Keratinocyten nach oxidativem Stress (UVA-Bestrahlung von 5 J/cm² bzw. Ozonexposition von 8 ppm).

4. Übertragbarkeit der in vitro-Ergebnisse auf die in vivo Daten

Es lässt sich aus den durchgeführten Versuchsreihen erkennen, dass die eingesetzten AO in ihren jeweils eingesetzten Konzentrationen eine ähnliche Wirkkapazität in den einzelnen Testsystemen aufwiesen, wobei eine Schutzwirkung an den isolierten Zellkulturen bzw. dreidimensionalen Hautäquivalenten eher erfasst werden konnte als in den Probandenstudien. Dies lässt sich damit begründen, dass die *in vitro* Testsysteme eine wesentlich geringere biologische Variabilität aufweisen als humane Probanden, die in Hinsicht auf ihre Lebensumstände (Genetik, Gesundheit, Ernährung, umweltbedingter Stress etc.) nur bedingt normiert

werden können. Ferner weist naturgewachsene, lebendige Haut eine stärkere Barrierschicht auf als die verwendeten Zell- und Hautkulturen. Des Weiteren sollte berücksichtigt werden, dass die *in vitro* Testsysteme ebenfalls auf ihre Enzymaktivität und Freisetzung biochemischer Botenstoffe normiert und optimiert worden sind, so dass hier eine bestmögliche biologische Antwort auf den gesetzten oxidativen Stress erhalten wird.

Dies ist aufgrund der unterschiedlichen gesundheitlichen Kondition der Probanden – allein bedingt durch eine altersbedingte Variabilität in den Enzymaktivitäten – in den Humanstudien nicht gegeben, so dass es hier ggf. zu individuellen Dosisanpassungen kommen müsste, um für das Einzelindividuum eine bestmögliche antioxidative Wirksamkeit zu erreichen.

Die vorgestellten *in vitro* Methoden stellen daher eine zeitsparende Möglichkeit dar, neue Wirkstoffe und Modellformulierungen auf ihr antioxidatives Potential zu screenen, das heißt eine Vorauswahl zu treffen, bevor zeitaufwendigere Probandenstudien folgen, um die *in vitro* Testergebnisse abzusichern und die Einsatzkonzentrationen für den *in vivo* Einsatz zu optimieren.

5. Anmerkungen

Dieses Projekt (FV-Nr. 14020 N) wurde aus Haushaltsmitteln des Bundesministeriums für Wirtschaft und Arbeit (BMWA) über die Arbeitsgemeinschaft industrieller Forschungsvereinigungen „Otto von Guericke“ e. V. (AIF) gefördert.



Forschungsstelle: Wissenschaftliches Institute der FKI e.V.
 Max-Planck-Str. 6
 37603 Holzminden

Auf Wunsch wird der Abschlussbericht versandt. Bitte wenden Sie sich hierzu an die Geschäftsstelle der FKI.