

### Zusammenfassung

Als Schutzmechanismus gegen schädliche Einflüsse von außen steht der Haut ein aus verschiedenen Komponenten zusammengesetztes antioxidatives Netzwerk zur Verfügung. Freie Radikale, die durch die Einwirkung von Umweltfaktoren – wie Luftschadstoffe, Ozon, UV-Strahlung und Chemikalien – entstehen, können über das antioxidative Netzwerk der gesunden Haut abgebaut und unschädlich gemacht werden. Aktuelle In-vivo-Studien beim Menschen belegen nun auch in junger Haut eine Abnahme der antioxidativ wirkenden Proteine sowie die Zunahme der Proteinoxidation unter wiederholter UV-Einwirkung. Damit liegt ein deutlicher Hinweis dafür vor, dass der UV-induzierte oxidative Stress für das so genannte Photoaging der Haut eine wichtige Rolle spielt. Ein von uns entwickelter Photooxidationstest ermöglicht den Nachweis photosensibilisierender bzw. protektiver Eigenschaften von Wirkstoffen. Für die Vitamine E und C konnte so die zentrale Bedeutung bei der Entgiftung freier Radikale nachgewiesen werden. Darüber hinaus zeigen neueste Studien, dass die positive Wirkung durch Vitamin C bei gleichzeitiger Applikation von Vitamin A (Retinol) noch verbessert wird.

### Abstract

To protect skin against environmental stress the human organism is equipped with a complex antioxidative network. This antioxidative network is able to eliminate free radicals generated from environmental factors like air pollutants, ozon, UV radiation or chemicals. There are evidences from recent in vivo studies that UV-induced stress is an important factor for photoaging of human skin. We developed a photooxidation test which is able to detect photosensitizing and, accordingly, protective effects of sunscreens as well as antioxidants. Vitamins C and E were shown to synergistically inhibit photooxidative stress in skin.

### Oxidativer Stress und antioxidatives Netzwerk in der Haut

Als äußere Barriere des Organismus ist die Haut verschiedensten Umweltfaktoren ausgesetzt, die für die Hautalterung relevant sind. Viele dieser Faktoren – so Luftschadstoffe, Ozon, natürliche und künstliche UV-Strahlung, Chemikalien oder Irritantien – entfalten ihren schädigenden Einfluss über die Bildung freier Radikale, die dann ihrerseits makromolekulare Strukturen in der

Haut wie DNA, Proteine und Lipide angreifen (Abb.1). Mit zunehmendem Alter steigt die Konzentration freier Radikale in der Haut ebenso wie in anderen Organsystemen des Körpers deutlich an; umgekehrt verringert sich die Menge der protektiv wirkenden Antioxidanzien. Eine derartige Auslenkung des natürlichen Redoxgleichgewichtes zugunsten oxidativer Bedingungen bezeichnet man als oxidativen Stress. Wird dieser in der Haut durch UV-Strahlung induziert, so wird er präziser als photooxi-

#### Institutsangaben

Klinik für Dermatologie und Allergologie, Friedrich Schiller Universität, Universität Jena

#### Korrespondenzadresse

Dr. J. Thiele · Klinik für Dermatologie und Allergologie · Friedrich Schiller Universität · Universität Jena · Erfurter Str. 35 · 07745 Jena · E-mail: thiele@derma.uni-jena.de

#### Bibliografie

Akt Dermatol 2002; 28: S3–S6 © Georg Thieme Verlag Stuttgart · New York · ISSN 0340-2541

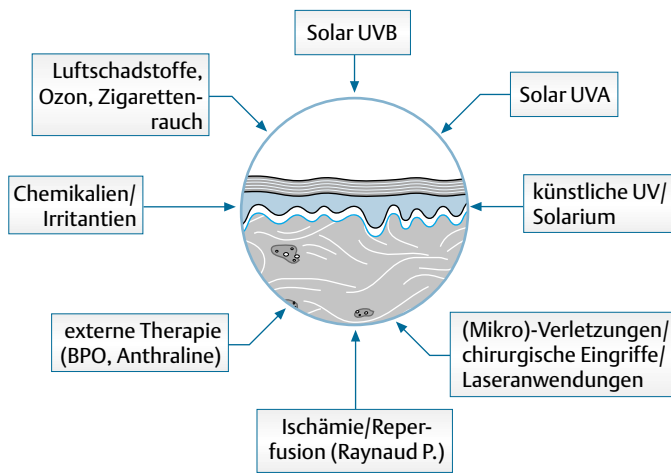


Abb. 1 Faktoren, die über die Bildung freier Radikale die Haut schädigen können.

dativer Stress spezifiziert. Oxidativer Stress kann nicht allein durch freie Radikale, d. h. Moleküle mit ungepaarten Elektronen wie das Superoxidanion oder das extrem reaktive Hydroxylradikal, ausgelöst werden. Auch die in der Haut in Gegenwart eines Photosensitizers durch UVA- oder UVB-Strahlung gebildeten Moleküle Singulett-Sauerstoff bzw. Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ) sind äußerst kurzlebig und werden daher mit den freien Radikalen als reaktive Sauerstoffspezies zusammengefasst.

In der gesunden Haut werden die unter UV-Strahlung entstandenen freien Radikale zum Großteil durch die antioxidativen Enzyme Katalase und Superoxiddismutase abgebaut und damit unschädlich gemacht. Reagieren nicht detoxifizierte Radikale mit mehrfach ungesättigten Fettsäuren in den Zellmembranen, so bilden sich Lipidperoxidradikale, die ihrerseits durch Vitamin E entgiftet werden können. Aus diesem Prozess geht das Vitamin selbst als Radikal hervor. Für seine Regeneration wird anschließend Vitamin C benötigt. Beide Vitamine werden daher auch als Ko-Antioxidanzien bezeichnet. Vitamin C wiederum interagiert mit weiteren antioxidativen Systemen, z. B. dem Glutathion-System, um erneut für antioxidative Reaktionen bereit zu sein. Damit steht in der Haut ein aus mehreren Komponenten zusammengesetztes antioxidatives Netzwerk zur Verfügung, mit dessen Hilfe freie Radikale auf unterschiedliche Weise entgiftet werden können (Abb. 2) [1].

### Die Rolle von oxidativem Stress und Photoaging

Aus In-vivo-Studien beim Menschen liegen mittlerweile Hinweise dafür vor, dass der UV-induzierte oxidative Stress für das so genannte Photoaging der Haut eine wichtige Rolle spielt. Sie bestätigen damit experimentelle Befunde, denen zufolge UVB-Strahlung und  $H_2O_2$  in Keratinozyten dosisabhängig zu einer Oxidation von Proteinen führen [2].

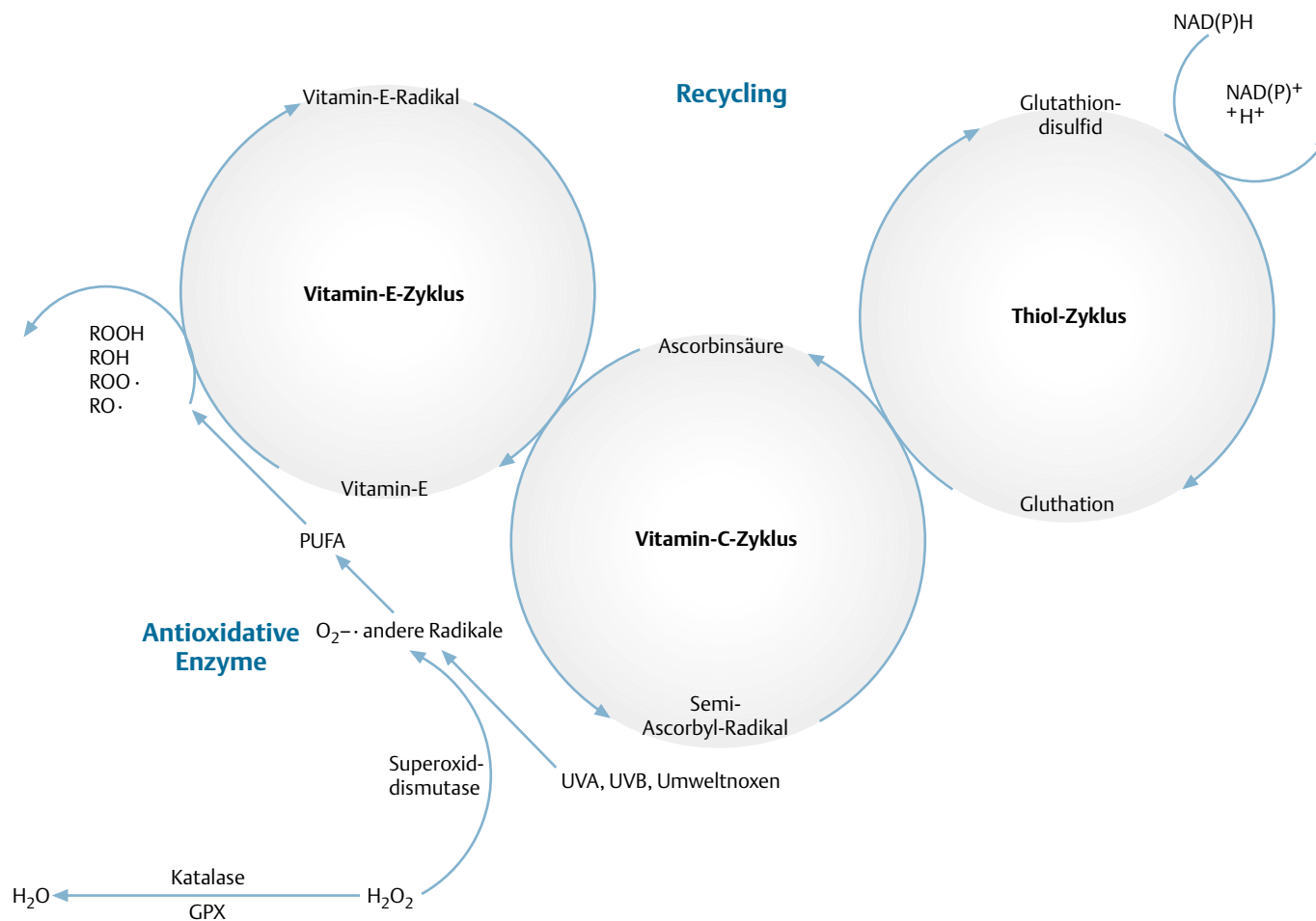


Abb. 2 Das antioxidative Netzwerk der Haut [1].

Unsere Arbeitsgruppe konnte in vergleichenden Untersuchungen an Biopsien von jungen Probanden (<30 Jahre) und über 60-jährigen Versuchspersonen eine ausgeprägte Abnahme antioxidativer Enzyme in der gealterten Haut, vor allem im Bereich der Hautbarriere und in der papillären Dermis, nachweisen [2]. Betroffen ist insbesondere die Katalase, die im Alter wesentlich schwächer exprimiert wird als bei den jungen Probanden. In Epidermis und Stratum corneum fallen die Unterschiede in den antioxidativen Enzymen zwischen junger und Altershaut dagegen nicht so deutlich aus (Abb. 3).

Der fehlende antioxidative Schutz führt in vivo zu vergleichbaren Veränderungen in der Haut, wie sie sich auch in vitro durch UV-Bestrahlung bzw. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Exposition induzieren lassen. So findet man bei den älteren Probanden in lichtexponierten Hautarealen mit deutlicher solarer Elastose eine dramatische Akkumulation photooxidierter Proteine gleichfalls vor allem in der Dermis. Weniger stark ausgeprägt ist die Proteinoxidation in der lichtgeschützten Haut, z.B. im Bereich des Unterleibs. Bei den jungen Probanden ist ein derartiges Photoaging dagegen auch in lichtexponierter Haut noch nicht festzustellen [2].

In einer weiteren Studie an gesunden jungen Probanden im Alter zwischen 20 und 35 Jahren konnten wir nachweisen, dass eine wiederholte UV-Einwirkung bereits nach einem relativ kurzen Zeitraum deutliche Proteinschäden auslöst. Die Versuchspersonen wurden im Glutealbereich mittels Solarsimulator mit UV-Licht in suberythemtologischer Dosis bestrahlt. Die initiale Strahlendosis betrug 0,5 MED (minimale Erythemdosis); sie wurde täglich um 10–45% gesteigert. Nach Beendigung des zehntägigen Protokolls, das mit den Bedingungen während eines Sommerurlaubs recht gut vergleichbar ist, ließ sich auf der bestrahlten Seite eine statistisch signifikante Abnahme des Katalase-Spiegels im Stratum corneum und parallel eine ebenfalls signifikante Zunahme der Proteinoxidation in Stratum corneum und Dermis im Vergleich zur lichtgeschützten Seite messen [2]. Diese Studie liefert damit einen überzeugenden Hinweis für die Bedeutung von oxidativem Stress beim Photoaging.

### Vitamin E als natürliches antioxidatives Schutzsystem der Haut

Dem hauteigenen Vitamin E kommt eine zentrale Rolle als antioxidativem Schutzmechanismus zu. Insbesondere in der Gesichtshaut ist  $\alpha$ -Tocopherol, das hauptsächlich im Organismus vorkommende Vitamin-E-Isomer, in einer hohen Konzentration vorhanden, die den  $\alpha$ -Tocopherol-Spiegel in der Haut des Oberarms um mehr als das Dreifache übersteigt [3]. Unseren Untersuchungen zufolge wird Vitamin E mit dem Sebum in großer Menge an die Hautoberfläche transportiert. Von hier kann es anschließend in das Stratum corneum repenetrieren. Dieser Sebum-vermittelte Vitamin-E-Transport wird – wie alle Talgdrüsenprozesse – hormonell gesteuert.

Die Hautbarriere ist damit physiologischerweise reich an  $\alpha$ -Tocopherol. Allerdings kann der natürliche Vitamin-E-Vorrat in den Hautoberflächenlipiden bereits durch UVA-Strahlung in sehr

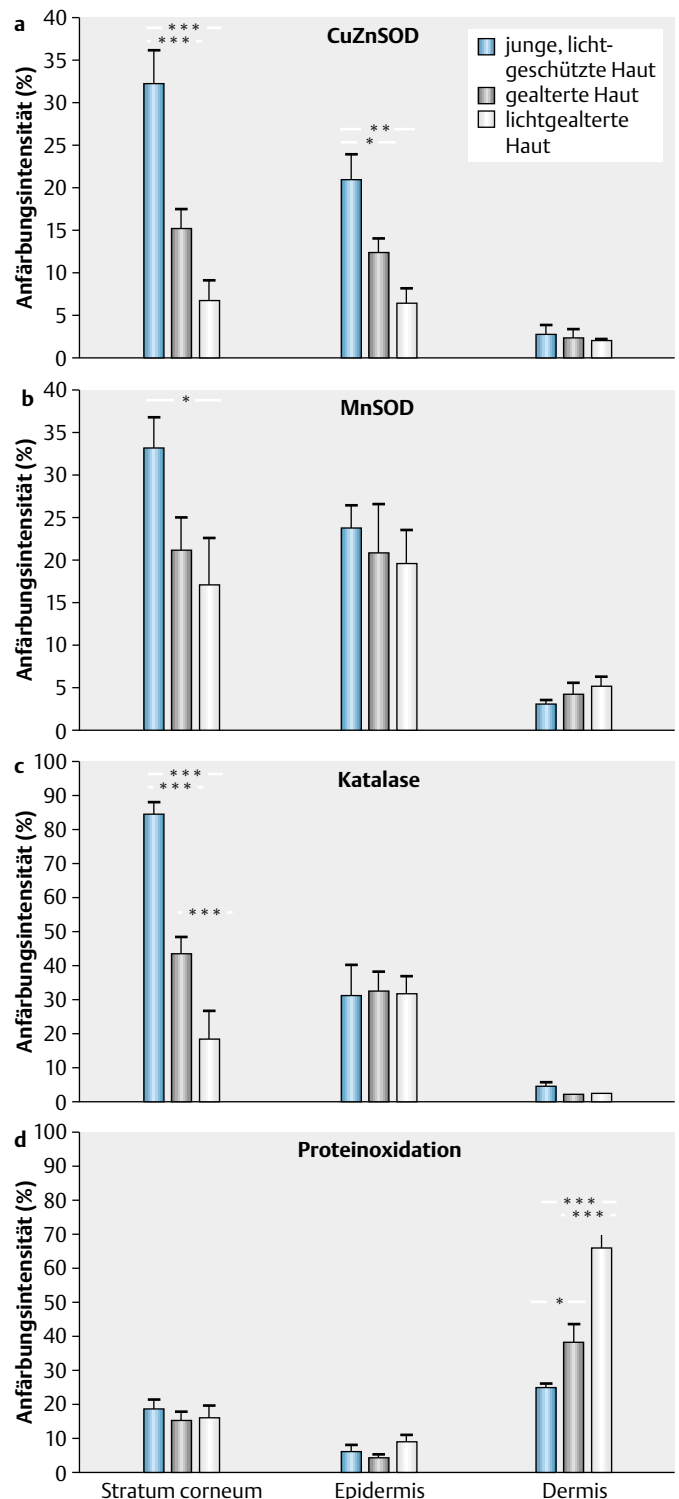


Abb. 3 Deutliche Abnahme in der Expression antioxidativer Enzyme und gleichzeitige Anhäufung oxidierter Proteine in der lichtgealterten menschlichen Haut [2].

niedriger Dosierung drastisch verringert werden. Schon bei UVA-Dosen zwischen 10 und 40 Joule/cm<sup>2</sup> ist in vivo ein steiler Abfall des Vitamin-E-Spiegels in den Oberflächenlipiden von initial 120 pmol/mg Sebum auf rund 10 pmol/mg Sebum messbar [4].

## Ermittlung von photooxidativem Stress

Steht Vitamin E aufgrund der UV-Strahlung nicht mehr in ausreichender Menge als Radikalfänger an der Hautoberfläche zur Verfügung, steigt der oxidative Stress an. Dies äußert sich in einer vermehrten Entstehung toxischer Lipidoxidationsprodukte, die mittels Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie (HPLC) nachgewiesen werden können. Als Markersubstanz für den oxidativen Stress konnten wir ein Photooxidationsprodukt identifizieren, das in lichtgeschützter Haut nur in sehr niedriger Menge vorhanden ist. Bereits bei einer Bestrahlung mit minimalen UVA-Dosierungen steigt die Konzentration dieser Substanz jedoch rasch und steil an [4]. Diese Substanz wurde von uns vorläufig als „unidentified sebum lipid photooxidation product“ (USLPP) bezeichnet.

In dem von unserer Arbeitsgruppe entwickelten und inzwischen patentierten Sebum-Photooxidationstest (SPT) kann dieses Oxidationsprodukt jetzt genutzt werden, um Wirkstoffe auf ihre photosensibilisierenden bzw. protektiven Eigenschaften hin zu untersuchen. Das einfache Testsystem besteht aus einer Träger-substanz (Sebutape®), auf die Hautoberflächenlipide aufgetragen werden. Nach Applikation der Testsubstanz wird das System mit UVA, UVB oder solarsimulierter UV-Strahlung in definierter Dosis bestrahlt und anschließend die Bildung von USLPP in der HPLC ermittelt. In ersten Untersuchungen konnte unsere Arbeitsgruppe zeigen, dass die Entstehung dieses Oxidationsproduktes durch Auftragen eines Lichtschutzfaktors fast vollständig verhindert werden kann. Die antioxidativ wirkenden Vitamine C und E inhibieren die Lipidoxidation einzeln nur partiell. Bei kombinierter Applikation wirken die beiden Ko-Antioxidanzien jedoch synergistisch und unterbinden die Bildung von USLPP unter UV-Strahlung ebenso effektiv wie ein Lichtschutzfaktor [5].

## Protektive Wirkmechanismen von Vitamin C in der Haut

Mittlerweile konnten in neueren Untersuchungen mehrere Mechanismen identifiziert werden, über die Vitamin C als Radikalfänger wirkt. Grundsätzlich spielt das Vitamin eine wichtige Rolle beim Erhalt des Kollagennetzwerkes in der Haut. In In-vitro-Systemen verhindert Vitamin C die Autoinaktivierung von Prolyl-Hydroxylase und Lysyl-Hydroxylase, zweier Schlüsselenzyme der Kollagen-Biosynthese, da es die Oxidation der Eisenatome im katalytischen Zentrum der Enzyme unterbindet [6]. In vivo ließen sich durch Applikation eines 5%-igen Vitamin-C-Präparates eine Verminderung des Hautfaltenreliefs und eine vermehrte Bildung elastischer Fasern erreichen.

Die positive Beeinflussung der Hautstruktur durch Vitamin C kann bei gleichzeitiger Applikation von Vitamin A (Retinol), das epitheliale Differenzierung und Zellproliferation moduliert bzw. stimuliert, noch verbessert werden. Beide Vitamine haben einen günstigen Effekt auf die Expression von Molekülen der extrazellulären Matrix und wirken so der Faltenbildung entgegen. Hierfür spricht eine dreimonatige Studie an 8 postmenopausalen Frauen, die zweimal täglich ein Kombinationspräparat mit Retinol und Vitamin C (Reti C™) auf die Innenseite eines Oberarms

auftrugen [7]. Als Kontrolle wurde auf dem kontralateralen Arm der Trägerstoff appliziert. Die topische Anwendung des Kombinationspräparates führte zu einer signifikant verringerten Expression der Keratin-mRNA, während Amino- und Carboxyprokollagen-Peptidasen, d. h. die posttranslationalen Reifungsenzyme von Prokollagenen, sowie die Metalloprotease 2 (MMP2) und der MMP-Inhibitor TIMP2 signifikant stärker exprimiert wurden. Auch der Spiegel von Fibrillin-1-mRNA wurde durch das Verumpräparat signifikant erhöht. Wie die Autoren ausführen, ist die positive Beeinflussung der biosynthetischen Aktivität von Fibroblasten mit vermehrter Enzymsynthese auf Vitamin C zurückzuführen. Dagegen wirkt Retinol günstig auf Keratinozyten, indem es deren Reifung verzögert und die Fibrillin-Synthese steigert. Diese doppelblinde Studie entkräftet überzeugend die Argumente von Kritikern der topischen Applikation, denen zufolge extern aufgetragene Substanzen nicht in tiefere Hautschichten penetrieren und somit wirkungslos seien. Eine derart differenzierte Modulation der Genexpression in Fibroblasten wie in der vorgestellten Untersuchung ist jedoch nur möglich, wenn Vitamin A und C bis in die Dermis gelangen.

## Weitere antioxidative Systeme

Bei Versagen der beschriebenen Radikalfänger und bereits erfolgter Oxidation von Makromolekülen werden weitere, mittlerweile identifizierte Schutzsysteme aktiv. Vorläufigen Resultaten unserer Arbeitsgruppe zufolge, ist von einer starken Induktion dieser Enzymsysteme durch UV-Strahlung auszugehen. Zukünftige Untersuchungen müssen zeigen, inwieweit dieses Enzymsystem zum Schutz gegen photooxidativen Stress genutzt und für Antiaging-Strategien eingesetzt werden kann.

## Literatur

- 1 Thiele JJ, Traber MG, Packer L. Depletion of human stratum corneum vitamin E: an early and sensitive in vivo marker of UV induced photooxidation. *J Invest Dermatol* 1998; 110: 756 – 761
- 2 Sander CS, Chang H, Salzman S, Muller CS, Ekanayake-Mudiyanselage S, Elsner P, Thiele JJ. Photoaging is associated with protein oxidation in human skin in vivo. *J Invest Dermatol* 2002; 118: 618 – 625
- 3 Weber SU, Thiele JJ, Cross CE, Packer L. Vitamin C, uric acid, and glutathione gradients in murine stratum corneum and their susceptibility to ozone exposure. *J Invest Dermatol* 1999; 113: 1128 – 1132
- 4 Ekanayake Mudiyanselage S, Elsner P, Thiele JJ. Wavelength dependent UV-induced depletion of vitamin E and generation of a highly sensitive lipid photooxidation product in human sebum (Poster auf der ADF, Berlin, 2002). *Archives of Dermatological Research* 2002; 294: 72A
- 5 Ekanayake Mudiyanselage S, Elsner P, Thiele JJ. UVA and UVB induce depletion of vitamin E and generation of a highly sensitive lipid photooxidation product in human sebum: Basis for a new phototoxicity test: SPT (Poster auf der SID, Los Angeles, 2002). *Journal of Investigative Dermatology* 2002; 119: 331A
- 6 Boyera N, Galey I, Beranrd BA. Effect of vitamin C and its derivatives on collagen syntheses and cross-linking by normal human fibroblasts. *Int J Cosmetic Science* 1998; 20: 151 – 158
- 7 Lapière C, Veyrat Hueber S, Nusegens BV et al. Modulation of epidermal and dermal genes expression by a retinol-vitamin C preparation topically applied on aged skin. 20th World Congress on Dermatology 2002