

Alpha-Glucosylrutin: ein hochwirksames Flavonoid zum Schutz vor oxidativem Streß

Alpha-glucosylrutin, a highly effective flavonoid for protection against oxidative stress

Rainer Wolber¹, Franz Stäb¹, Heiner Max¹, Annegret Wehmeyer², Ina Hadshiew³, Horst Wenck¹, Frank Rippke¹, Klaus-Peter Wittern¹

(1) Beiersdorf AG, Hamburg

(2) Dinklage

(3) Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Venerologie, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

JDDG; 2004 · 2:580–587

Eingereicht: 14. 10. 2003 | Angenommen: 10. 5. 2004

Schlüsselwörter

- Alpha-Glucosylrutin (AGR)
- Flavonoide
- Antioxidantien
- Reaktive Sauerstoffspezies (ROS)
- Polymorphe Lichtdermatose (PLD)
- Hautalterung/Photoaging

Keywords

- alpha-glucosylrutin (AGR)
- flavonoids
- antioxidants
- reactive oxygen species (ROS)
- polymorphous light eruption (PLE)
- photoaging

Zusammenfassung

Das Bioflavonoid alpha-Glucosylrutin (AGR) findet aufgrund seiner starken antioxidativen Wirksamkeit und hohen epidermalen Bioverfügbarkeit zunehmend Verwendung im dermato-kosmetischen Bereich. Bioflavonoide sind sekundäre Pflanzenstoffe (Phytamine) mit einer gemeinsamen chemischen Grundstruktur und einem breit gefächerten Wirkungsspektrum, vor allem aber der Fähigkeit, reaktive Sauerstoffspezies (reactive oxygen species, ROS) zu neutralisieren. ROS beeinflussen und schädigen die Zelle sowohl durch direkte zytotoxische Effekte (Membrandestruktion durch Induktion radikalischer Kettenreaktionen, Mutationen nukleärer und mitochondrialer DNA etc.) als auch indirekt durch Modifikation intrazellulärer Signaltransduktionskaskaden, die entzündliche und proliferative Prozesse regulieren. Die ausgezeichnete antioxidative Wirksamkeit von AGR konnte durch verschiedene experimentelle *in-vitro*- und *in-vivo*-Untersuchungen bestätigt werden. Weiterführende klinische Studien belegen eindeutig die Wirksamkeit einer prophylaktischen Anwendung von AGR bei dermatologischen Krankheitsbildern wie der polymorphen Lichtdermatose (PLD), bei denen oxidativer Streß von pathogenetischer Relevanz ist. Auch in anderen dermato-kosmetischen Indikationsbereichen wie der vorzeitigen (lichtbedingten) Hautalterung scheint eine vorbeugende Behandlung mit AGR vielversprechend zu sein. In allen durchgeführten *in-vivo*-Untersuchungen zeigte sich zudem, daß AGR in den verwendeten Konzentrationen ein sehr gut hautverträglicher Wirkstoff für die medizinische Hautpflege ist.

Summary

The flavonoid alpha-glucosylrutin (AGR) is a potent antioxidant with a high epidermal bioavailability. This makes this substance particularly suitable for various dermato-cosmetic applications. Flavonoids are phytamines with a common chemical structure and a broad range of activities, the most prominent being their radical scavenging ability. Reactive oxygen species (ROS) damage cells by different mechanisms. Direct cytotoxic effects include destruction of the cell membrane by causing radical chain reactions or induction of mutagenic changes in the nuclear and mitochondrial DNA. Indirect changes involve modification of intracellular signal transduction pathways that regulate inflammatory or proliferative activities. The excellent antioxidant efficacy of AGR has been shown in various experimental studies, both *in vitro* and *in vivo*. Subsequent clinical studies have demonstrated that AGR is also effective in the prevention of dermatologic diseases in which oxidative stress is of pathogenetic relevance, e.g. in polymorphous light eruption (PLE). Other

promising dermato-cosmetic areas for AGR application are aging of the skin, especially photoaging. All *in vivo* evaluations indicate that AGR in the applied concentrations is a very well-tolerated ingredient for medical skin care preparations.

Einleitung

Alpha-Glucosylrutin (AGR) ist ein biotechnologisch modifizierter natürlicher Pflanzenstoff aus der Gruppe der Bioflavonoide. Flavonoide zeichnen sich durch ein sehr breites Wirkungsspektrum aus und haben u. a. hervorragende antioxidative Eigenschaften. Durch Glycosylierung von Rutin entsteht AGR, das im Vergleich zu Rutin epidermal erheblich besser bioverfügbar ist und somit einen für den dermatologisch-kosmetologischen Einsatz interessanten Wirkstoff darstellt. Ziel dieser Arbeit ist es, einen Überblick über die Eigenschaften und das Wirkungsspektrum von AGR zu geben. Hierbei wird insbesondere auch auf die Bedeutung oxidativen Stresses für die Pathogenese entzündlicher Hautreaktionen und Hautalterung eingegangen und es werden neue, potentielle topische Anwendungsmöglichkeiten von AGR diskutiert.

Oxidativer Stress und antioxidative Schutzsysteme der Haut

Als evolutionäre Anpassung des ursprünglich anaeroben Lebens an den steigenden, zytotoxischen Sauerstoffgehalt in der Atmosphäre entwickelten sich Redox-Systeme, die ein Überleben komplexer Organismen erst ermöglichten. Aerobes Leben beruht auf physiologisch balancierten Oxidations- und Reduktionsprozessen, wobei sich mit zunehmendem Alter des Organismus die Balance zugunsten der Oxidationsprozesse verschiebt. Nach der „free radical theory of aging“ ist oxidativer Streß eine der Hauptursachen physiologischer Alterungsprozesse und Auslöser für zahlreiche altersbedingte Erkrankungen [1, 2]. Im Rahmen der normalen Stoffwechselfvorgänge entstehen in jeder Körperzelle pro Tag ca. 10^{10} reaktive Sauerstoffverbindungen (reaktive Sauerstoffspezies, reactive oxygen species, ROS), d. h. Moleküle mit einer höheren chemischen Reaktivität als Sauerstoff. Unter oxidativen Streßbedingungen kann sich die Zahl an ROS pro Zelle und Tag noch deutlich erhöhen [3]. Zu den ROS zäh-

len sowohl freie Radikale, z. B. Hydroxylradikale oder Superoxidanionen, als auch nicht-radikalische Moleküle wie etwa Singulett-Sauerstoff und Wasserstoffperoxid. Auch reaktive Stickoxidverbindungen (reactive nitrogen species, RNS), wie z. B. NO, ONOO und NO₂ [4], zählen nach neueren Forschungsergebnissen hierzu. ROS entstehen u. a. durch endogene Stoffwechselprozesse, z. B. als „Abfallprodukte“ einer nicht mehr exakt funktionierenden Atmungskette während der oxidativen Phosphorylierung in den Mitochondrien, sowie im Rahmen von immunologischen Reaktionen, z. B. beim sogenannten „oxidative burst“ von Granulozyten und Monozyten [2]. Auch exogene Faktoren physikalischer und chemischer Natur (z. B. UV-Strahlung, Ultraschall, Benzoylperoxid) können die Bildung von ROS induzieren. Die Haut ist hier in besonderem Maße betroffen, da sie in unmittelbarem Kontakt zur Umwelt steht [5]. In der Haut existiert eine Vielzahl von Zielstrukturen, die durch oxidativen Streß beeinträchtigt werden können (Übersicht bei [6]). Zum Schutz vor den zytotoxischen Effekten dieser reaktiven Verbindungen existiert eine Vielzahl von spezifischen zelleigenen Schutzsystemen, die in unterschiedlichen Zellkompartimenten lokalisiert ist. Man unterscheidet nicht-enzymatische, kleinmolekulare Antioxidantien wie Vitamin E, Ubichinol und Carotinoide (lipophile Antioxidantien) sowie Vitamin C, Glutathion und Thio-redoxin (hydrophile Antioxidantien) von enzymatischen Antioxidanzschutzsystemen, z. B. Katalase, Superoxiddismutase und Glutathionperoxidase [5]. Diese wirken im Gewebe als koordiniertes Netzwerk, entsprechend ihrer chemischen Struktur, Position und ihrem relativen Redox-Potential [7]. Glutathionperoxidase und -reduktase reduzieren Wasserstoffperoxid und Lipidhydroperoxide, Katalase neutralisiert ebenfalls Wasserstoffperoxid und Superoxiddismutase schützt Zellen vor Superoxidanionen [7]. Durch kurze, wiederholte

UV-Exposition ist eine gewisse Induktion endogener Schutzsysteme möglich; dieses Phänomen wird klinisch als sogenannte „Lichtgewöhnung“ („light hardening“) beschrieben [8]. Hierbei wird z. B. Mangan-Superoxiddismutase, ein wichtiges antioxidatives Enzym in Mitochondrien, durch repetitive UVA-Bestrahlung induziert [9]. Die zelleigenen Schutzsysteme sind in epidermalen Zellen insgesamt besser ausgebildet als in dermalen Strukturen [10, 11]. Dieser Unterschied scheint bei Atopikern besonders ausgeprägt zu sein [12].

Oxidativer Streß kann zur Überforderung der hauteigenen endogenen Schutzsysteme führen und so auf unterschiedliche Weise Zellen schädigen [5, 13]. Photochemische Reaktionen können Modifikationen an Proteinen und Lipiden sowie Schäden der DNA (z. B. Oxidation von Nukleinsäuren) hervorrufen [7]. Durch radikalische Kettenreaktionen und Induktion autooxidativer Prozesse kann es zur Peroxidation von Membranlipiden mit Schädigung der Zellmembran oder auch chemischen und funktionellen Veränderungen von zellulären und interzellulären Strukturproteinen (u. a. Kollagenfasern) kommen. Auch Funktionsproteine (u. a. Enzyme) werden hierdurch beeinflusst. Biochemisch imponieren in chronisch oxidativ geschädigter Haut u. a. eine altersabhängige Zunahme des epidermalen Proteinkarboxylgehaltes, signifikant verminderte Mengen an dermalem Pro-Kollagen-1- und Kollagen-3-Pro-Peptiden sowie erhöhte Spiegel der Matrixmetalloproteinasen 1 und 2 [14]. Auf DNA-Ebene kann es durch ROS zu Schädigung nukleärer als auch mitochondrialer DNA kommen [1, 15]. Da die mitochondriale DNA über weniger effektive Reparatursysteme als die nukleäre DNA verfügt und zudem für die Enzyme der oxidativen Energiegewinnung kodiert, führt eine Störung in diesem Bereich auch zur Störung der Atmungskette und bedingt hierdurch eine vermehrte Akkumulation von ROS. Ein Circulus vitiosus entsteht [4, 14, 16].

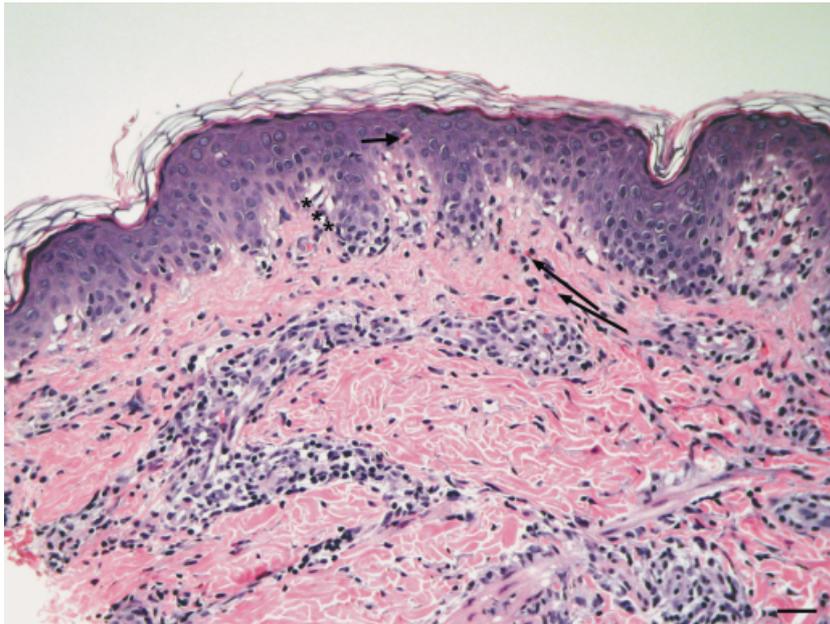


Abbildung 1: Polymorphe Lichtdermatose. Orthokeratotische Epidermis mit einzelnen apoptotischen Nuclei in der Epidermis (sunburn-cells). Ausgeprägtes dermales, perivaskulär imponierendes lymphozytäres Infiltrat. Geringfügige Extravasation von Erythrozyten. Mildes Ödem der oberen Dermis und beginnende vakuolige basale Degeneration.

Figure 1: Polymorphic light eruption. Orthokeratotic epidermis with single apoptotic nuclei in the epidermis (sunburn cells). Marked dermal, predominantly perivascular, lymphocytic infiltration. Minor extravasation of erythrocytes. Mild oedema of upper dermis and initial vacuolar basal degeneration.

Die genannten Prozesse sind wesentlich an Alterungsvorgängen beteiligt. Durch ROS-induzierte Schädigung der Strukturproteine, Enzyme und insbesondere der mitochondrialen DNA wird der Energiehaushalt insbesondere von Hautzellen gestört, Reparaturprozesse laufen verlangsamt oder gar nicht ab, was die Grundlage für die morphologischen Veränderungen der Hautalterung darstellt [14].

Darüber hinaus kommt es zur Beeinträchtigung der intrazellulären Signalübertragung [4]. Hierdurch können entzündliche Prozesse direkt mediiert (z. B. Arachidonsäure-Kaskade) oder über Induktion von spezifischen Genen, die für Entzündungsmediatoren (z. B. TNF α , IL-1, ICAM-1) kodieren, indirekt ausgelöst werden [2, 17]. Zudem gibt es Hinweise, daß spezifische Kinasen redox-sensitiv sind und durch Redoxprozesse in Hautzellen reguliert werden können [18]. Über derartige redox-sensitive Signaltransduktionswege werden entzündliche Prozesse gesteuert, die möglicherweise auch bei der Pathogenese entzündlicher Hauterkrankungen (z. B. bei der polymorphen Lichtdermatose, Abbildung 1) von Bedeutung sein

könnten. ROS spielen somit eine wichtige Rolle bei essentiellen zellulären Prozessen, wie Proliferation/Apoptose sowie Entzündungsreaktionen.

Nachweis von oxidativem Streß und antioxidativer Wirksamkeit topisch applizierter Wirkstoffe in der Haut

Um die Haut vor oxidativem Streß zu schützen, werden verschiedene Antioxidantien topisch angewendet. Hierbei kommen sowohl körpereigene (z. B. Vitamin C, Vitamin E, Carotinoide) sowie pflanzliche Antioxidantien (Isoflavone aus Soja, Polyphenole aus Tee etc.) als auch Selen- und Zinkverbindungen zum Einsatz [7, 15, 19, 20].

Der oxidative Status einer Zelle und auch die Wirkung von Antioxidantien lassen sich auf unterschiedliche Weisen objektivieren [17, 21]. Hierbei kommen sowohl *in-vitro*-Verfahren an Zellkulturen als auch *in-vivo*- und *ex-vivo*-Verfahren zur Anwendung.

Das *in-vitro*-Screening der antioxidativen Wirksamkeit potentieller Wirkstoffe erfolgt zunächst an Zellkulturen. Dabei werden vergleichsweise hohe physiologische Dosen chemischer (H₂O₂, Benzoylperoxid) oder physikalischer (UVA-

Strahlung) Stressoren eingesetzt, um stark wirksame von weniger effektiven Antioxidantien zu differenzieren. Zur Quantifizierung der entstandenen zellulären Schäden, wie z. B. DNA-Strangbrüchen, werden verschiedene Verfahren, wie z. B. das Comet Assay, eingesetzt [22]. Der Peroxidgehalt einer Zelle sowie der intrazelluläre Thiolgehalt, als Maß der Verfügbarkeit und Funktion der endogenen Schutzsysteme, werden durch spezielle Fluoreszenzindikatoren ermittelt, ebenso eine Zunahme der Tyrosinkinaseaktivität durch oxidativen Streß. Ferner erlaubt die Messung des Mitochondrienmembranpotentials (MMP) in Hautzellen den Nachweis von chemisch und/oder UV-induziertem oxidativem Streß *in-vitro* [17]. Diese Verfahren lassen sich auch *ex vivo* einsetzen. Hierbei wird nach topischer Anwendung des Wirkstoffes *in vivo* eine Saugblase auf dem behandelten Hautareal erzeugt und die aus dem Blasendach gewonnenen Hautzellen werden analysiert.

In-vivo-Wirkungsnachweise von Antioxidantien an der Haut sind in der Literatur bisher nur vereinzelt beschrieben und zumeist nur auf einen Einzelaspekt der antioxidativen Wirkung fokussiert. Die von *Sauer mann* et al. [23] entwickelte Methode zur Messung der Ultraschwachen Photonen-Emission (UPE) an der menschlichen Haut ist ein effektives nicht-invasives Verfahren, das eine quantitative Bestimmung des oxidativen Gesamtstatus der Haut ermöglicht. Die UPE-Messung erfaßt die Energie, die in Form von Lichtquanten bei prooxidativen chemischen Reaktionen in der Haut freigesetzt wird (Chemilumineszenz). Je höher die UPE, desto größer ist der oxidative Streß in der Haut [23].

Alpha-Glucosylrutin – ein hochwirksames Flavonoid zum Schutz der Haut

Der Begriff Flavonoide wurde erstmals 1952 von Geissman geprägt und bezeichnet die größte Gruppe sekundärer Pflanzenstoffe (Phytamine). Insgesamt wurden bisher mehr als 5000 verschiedene Flavonoide beschrieben. Die Flavonoide kommen nahezu ubiquitär im Pflanzenreich vor und bilden auch in der menschlichen Nahrung den mengenmäßig größten Anteil der Phytamine. Sie sind charakterisiert durch ihre intensive Färbung. Wie der Name Fla-

vonioide (flavus, lat. = gelb) andeutet, handelt es sich überwiegend um gelbliche Substanzen, andere Farbschattierungen kommen aber ebenso vor [24, 25]. Die Einführung der Flavonoide in die Arzneitherapie erfolgte 1936 durch Szent Györgyi, der die Stoffgruppe aufgrund ihrer ausgezeichneten antihämorrhagischen Wirksamkeit auch als „Vitamin P“ bezeichnete. Die sogenannten Antipermeabilitätsfaktoren führen zu einer Stabilisierung der Kapillarwände und daraus abgeleitet auch zu einer deutlichen Reduktion der Gefäßpermeabilität. Da jedoch keine Mangelerscheinungen beobachtet werden konnten und auch das Wirkungsspektrum der Substanzen weitaus größer war, wurde der Begriff später durch den Terminus Bioflavonoide ersetzt [26].

Entsprechend der großen Strukturvielfalt der Flavonoide sind ihre Funktionen vielfältig. In erster Linie handelt es sich um hochwirksame Antioxidantien; daher kommen sie auch überwiegend in den Licht- und Sauerstoff-exponierten oberirdischen Pflanzenteilen vor [24]. Außerdem sind Flavonoide – ähnlich wie Vitamine – als sogenannte Enzymmodulatoren Kofaktoren für eine Vielzahl von Enzymreaktionen besonders im Bereich des Arachidonsäurestoffwechsels [25]. Je nach Untergruppe sind darüber hinaus eine Vielzahl von spezifischen Wirkungen beschrieben, bei oraler Anwendung z. B. kardiotope, gefäßdilatorische und spasmolytische Effekte. Diese lassen sich häufig aus den antioxidativen und enzymmodulierenden Eigenschaften der Flavonoide ableiten, sind aber z. T. auch davon unabhängig. Pharmakologisch bedeutsame Flavonoidkombinationen werden z. B. aus *Crataegus* (Weißdorn) und *Gingko biloba* isoliert [27].

Rutin – der Ausgangsstoff für alpha-Glucosylrutin

Rutin ist das Glycosid des Flavonols Quercetin mit dem Diglycosid Rutinose (Quercetin-3-O-Rutinose). Das Diglycosid Rutinose besteht aus L-Rhamnose und D-Glucose (Abbildung 2).

Rutin ist Bestandteil zahlreicher Pflanzenarten und kommt in hohen Konzentrationen in den Blättern und Blüten des japanischen Pagodenbaums (*Sophora japonica*) vor, der auch die Hauptquelle für die technische Gewinnung von Rutin darstellt [28].

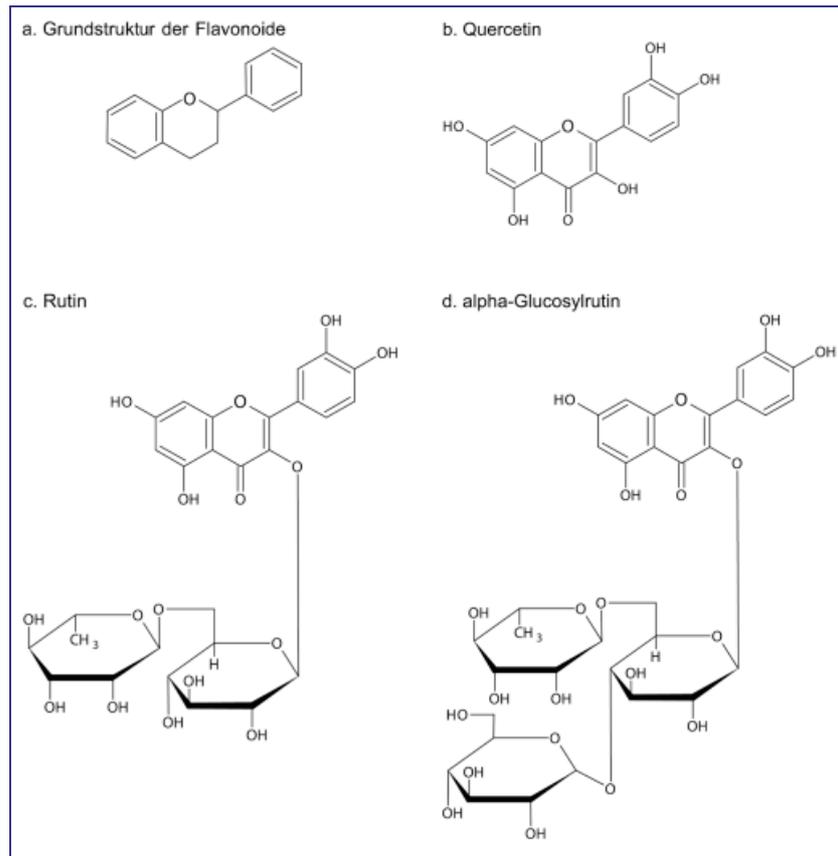


Abbildung 2: a) Grundstruktur der Flavonoide, b) Quercetin, c) Rutin, d) Alpha-Glucosylrutin.
Figure 2: a) Basic structure of flavonoids, b) quercetin, c) rutin, d) alpha-glucosylrutin.

Rutin ist ein geruch- und geschmackloses hellgelbes Pulver mit einer Molekularmasse von M_R 610,51. Es ist eine schwache Säure, die gut in Methanol und Ethanol löslich ist. In kaltem Wasser und lipophilen Lösungsmitteln läßt sich Rutin dagegen nur schwer lösen; dies bedingt die schlechte dermale und enterale Resorption nicht-derivatisierten Rutins [26]. *In-vitro*-Untersuchungen zeigen, daß Rutin in einem hydrophilen Milieu besser wirkt als in einer lipophilen Umgebung, wie es z. B. Zellmembranen sind. Die mäßige Penetration durch Zellmembranen resultiert einerseits aus der Molekülgröße, andererseits aus der schlechten Lipidlöslichkeit von Rutin [29].

Durch enzymatische Glucosylierung von Rutin in alpha-Position (alpha-Glucosylrutin = AGR) kann die Wasserlöslichkeit und damit die Bioverfügbarkeit in wäßrigem Milieu erheblich gesteigert werden. Entscheidend ist hierbei, daß die Glucosylierung spezifisch am Glucoserest der Rutinose stattfindet und nicht

an den für die antioxidative Wirkung relevanten phenolischen OH-Gruppen des Quercetinrests.

Auch durch Einarbeitung in eine geeignete Emulsionsmatrix kann die Freisetzung und Bioverfügbarkeit von Rutin signifikant verbessert werden [25]. Aufgrund seiner Reaktivität und der daraus resultierenden Instabilität muß AGR in Emulsionen jedoch durch geeignete Antioxidantien stabilisiert werden [10].

Biologische Wirkungen von alpha-Glucosylrutin

Rutin weist wesentlich ausgeprägtere antioxidative Effekte auf als z. B. Vitamin E oder andere Flavonoide [10, 25]. Neben einer effektiven antioxidativen Wirkung auf Membranlipide konnte für Rutin zudem ein Schutz vor einer UVB-induzierten DNA-Schädigung gezeigt werden [30].

AGR wirkt direkt als Radikalfänger und dabei relativ spezifisch auf Hydroxylradikale und Superoxidanionen sowie Peroxylradikale [29]. Indirekt werden durch

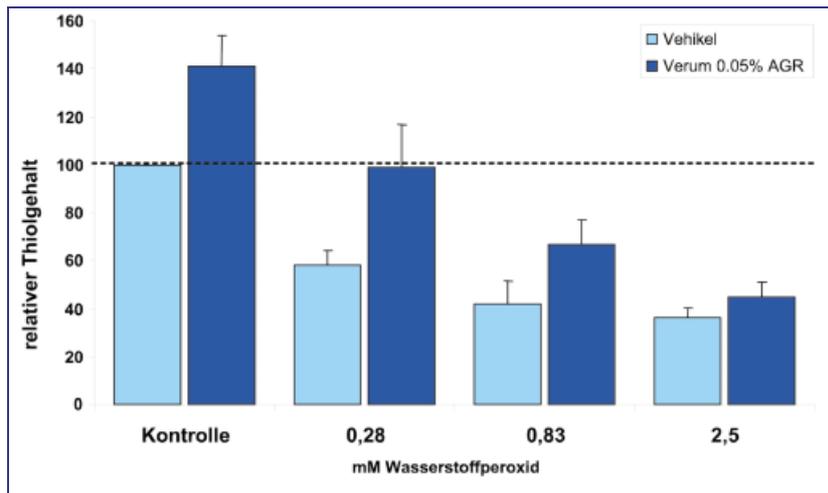


Abbildung 3: *Ex-vivo/in-vitro*-Nachweis der antioxidativen Wirksamkeit von AGR. Nach topischer Applikation von 0,05 % AGR zweimal täglich für eine Woche sind die intrazellulären Thiolspiegel (mBrB-Fluoreszenz) frisch präparierter Saugblasenepidermis als Indikator für den zellulären Antioxidationsstatus signifikant gegenüber Wasserstoffperoxid-induzierter Verminderung geschützt ($n = 5$) [3].

Figure 3: *Ex vivo/in vitro* proof of the antioxidative efficacy of AGR. The intracellular thiol levels of freshly prepared suction blister epidermis as an indicator of cellular oxidation status (mBrB fluorescence) are significantly protected against hydrogen peroxide-induced depletion after topical application of 0.05 % AGR twice daily for 1 week ($n = 5$) [3].

AGR die endogenen Antioxidantien wie z. B. Glutathion regeneriert, so daß die endogenen Schutzsysteme gestärkt werden [3]. Als starker Chelatbildner bewirkt AGR zusätzlich eine indirekte Oxidationshemmung, da durch freie Eisen-Ionen radikalbildende Reaktionen katalysiert werden („Fenton-Reaktion“) [29]. Wegen der hohen Wirksamkeit von AGR sind deutliche antioxidative Effekte auch schon in geringen Konzentrationen (0,05 bis 0,25 % im Endprodukt) nachweisbar [17].

***In-vitro*-Untersuchungen mit alpha-Glucosylrutin**

An primären epidermalen und dermalen Zellkulturen wurde die Effektivität von AGR *in vitro* getestet [3, 13, 17]. Im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen führte eine Vorbehandlung mit AGR zu einer signifikanten Erhöhung des zellulären Thiolgehaltes und dieser relative Unterschied blieb auch nach experimenteller Induktion von oxidativem Streß durch H_2O_2 oder UVA-Bestrahlung bestehen. Gleichzeitig kam es auch zu einer signifikanten Reduktion der entzündungsinduzierenden intrazellulären ERK1/2-Tyrosinkinaseaktivierung und damit des intrazellulären Phosphotyrosingehalts nach oxidativem Streß. Die konstitutive Expression der nichtaktivierten ERK1/2-Tyrosinkinase bleibt

durch Zugabe von AGR unbeeinflusst. Diese Ergebnisse zeigen, daß AGR in epidermalen und dermalen Primärkulturen die endogenen Schutzsysteme stärkt und gleichzeitig bei Vorliegen von oxidativem Streß die Aktivierung redoxsensitiver Signaltransduktionskaskaden hemmt.

Im Gegensatz zu dem ebenfalls getesteten Ubiquinon (Coenzym Q_{10}) blieb das Mitochondrienmembranpotential (MMP) durch Präinkubation mit AGR relativ unbeeinflusst [17]. Dies deutet auf ein unterschiedliches Verteilungsmuster der beiden Antioxidantien in den zellulären Kompartimenten hin und läßt zudem eine unterschiedliche Spezifität der beiden Radikalfänger vermuten.

***In-vivo*- bzw. *ex-vivo/in-vitro*-Untersuchungen mit alpha-Glucosylrutin**

Die Haut der volaren Unterarme gesunder Probanden wurde durch 7tägige Vorbehandlung mit AGR konditioniert. Anschließend erfolgte die Bestimmung des oxidativen Status durch Messung des Thiolgehaltes in den aus Saugblasen gewonnenen epidermalen und dermalen Zellen. Im Vergleich zum Placebo sowie zur unbehandelten Kontrolle wiesen die mit AGR vorbehandelten Zellen einen signifikant erhöhten Thiolgehalt auf; der relative Unterschied blieb auch nach Induktion von oxidativem Streß durch

H_2O_2 bestehen (Abbildung 3) [3, 13, 17, 31].

In einer *in-vivo*-Untersuchung mittels UPE-Methodik konnte die signifikante Reduktion prooxidativer Reaktionen in der Haut durch Vorbehandlung mit AGR nach UVA-induziertem oxidativem Streß bestätigt werden. Der Effekt wurde bereits durch sehr niedrige AGR-Konzentrationen erzielt ($\geq 0,1\%$) und war in dieser Versuchsanordnung dem von Vitamin E und Vitamin-E-Acetat bis zu 10fach und signifikant überlegen [17].

Klinische Aspekte einer Anwendung von alpha-Glucosylrutin

Alpha-Glucosylrutin bei Photodermatosen

Die polymorphe Lichtdermatose (PLD) ist mit einer Prävalenz von 10–20 % in den USA und Westeuropa die mit Abstand häufigste lichtinduzierte Dermatitis [32]. Die genaue Ätiologie der PLD ist immer noch ungeklärt. Pathogenetisch relevant ist wahrscheinlich eine durch UVA-Strahlung induzierte Bildung von ROS, die zu Zellschädigungen und Induktion von entzündlichen Reaktionen führt [2, 3]. Möglicherweise kommt es hierdurch zur Induktion des Transkriptionsfaktors AP-2 mit konsekutiver überschießender Expression des pro-inflammatorischen Adhäsionsmoleküls ICAM-1 [33].

Deutliche Hinweise für eine höhere Sensitivität gegenüber oxidativem Streß ergaben Untersuchungen des intrazellulären Peroxidstatus von Zellen aus Saugblasenepidermis (SBE)-Biopsieproben von PLD-Patienten im Vergleich zu Hautgesunden. Dabei zeigten epidermale Zellen von PLD-Patienten einen signifikant erhöhten Peroxid- und Phosphotyrosingehalt nach UVA-Photoprovokektion im Vergleich zu Kontrollpersonen mit gesunder Haut [3].

Chemilumineszenzmessungen (UPE) zeigten in ersten *in-vivo*-Untersuchungen nach UVA-Bestrahlung und einwöchiger Vorbehandlung mit AGR ebenfalls eine deutlich reduzierte prooxidative Reaktivität an den typischen PLD-Prädilektionsstellen im Vergleich zum Placebo [31].

In mehreren kontrollierten klinischen Studien mit AGR-haltigen Sonnenschutz-Formulierungen (Eucerin® Sonnenempfindliche Haut) konnte schließlich die prophylaktische Wirkung einer topischen AGR-Applikation auf die Ent-

stehung und den Schweregrad der PLD auch unter klinischen Bedingungen nachgewiesen werden. In einer Placebo-kontrollierten Untersuchung an 30 PLD-Patienten [34] wurde nach einer Vorbehandlung mit verschiedenen AGR-haltigen Emulsionen unter standardisierten Bedingungen eine Photoprovokation an den individuellen Prädisloktionsstellen durchgeführt. Die Ergebnisse belegen, daß sowohl Häufigkeit als auch Intensität der PLD-Symptomatik durch Vorbehandlung mit AGR signifikant reduziert werden können. Gleichzeitig waren auch deutlich höhere UVA-Dosen zur Auslösung der spezifischen Symptomatik erforderlich. Bereits niedrige Konzentrationen von 0,1 % AGR waren ausreichend, um eine effektive Hemmung der PLD-Entstehung zu erreichen. UV-Filter-Effekte als Ursache der prophylaktischen Wirkung von AGR konnten durch *in-vivo*-Absorptionsmessungen mittels diffuser Reflexionsspektrometrie im Vergleich zu einem klassischen UVA-Filter ausgeschlossen werden [34]. In einer weiteren klinischen Untersuchung an 20 PLD-Patienten konnten diese Ergebnisse verifiziert werden. Es zeigte sich dabei auch, daß eine präexpositionelle Konditionierung der Haut mit AGR über 3 bis 7 Tage den Schutzeffekt signifikant verbesserte [35] (Abbildung 4). Diese Wirksamkeit von AGR als Antioxidans ist insofern bemerkenswert, als daß andere Antioxidantien (Vitamin E, Vitamin C) selbst bei relativ hoch dosierter systemischer Gabe keinen Effekt auf die PLD zeigten [36].

Eine anschließende Anwendungsstudie unter Praxisbedingungen bestätigte den protektiven Effekt einer Vorbehandlung mit AGR auf die Entstehung der PLD [35]. Die zuverlässige Wirkung einer Vorbehandlung mit AGR konnte auch im Fall der sehr selten vorkommenden ausschließlich UVB-induzierten PLD beschrieben werden [37]. Die Effektivität der AGR-Prophylaxe änderte sich auch durch Einarbeitung in verschiedene Grundlagen nicht, tendenziell bot AGR in einer O/W-Emulsion jedoch bereits in niedrigeren Konzentrationen als in einem Hydrodispersionsgel einen Schutz vor der Entwicklung der PLD-Symptomatik [38]. Insbesondere in Kombination mit hochwirksamen UVA-Filtern läßt sich die Photoprovokation der PLD auch ohne mehrtägige

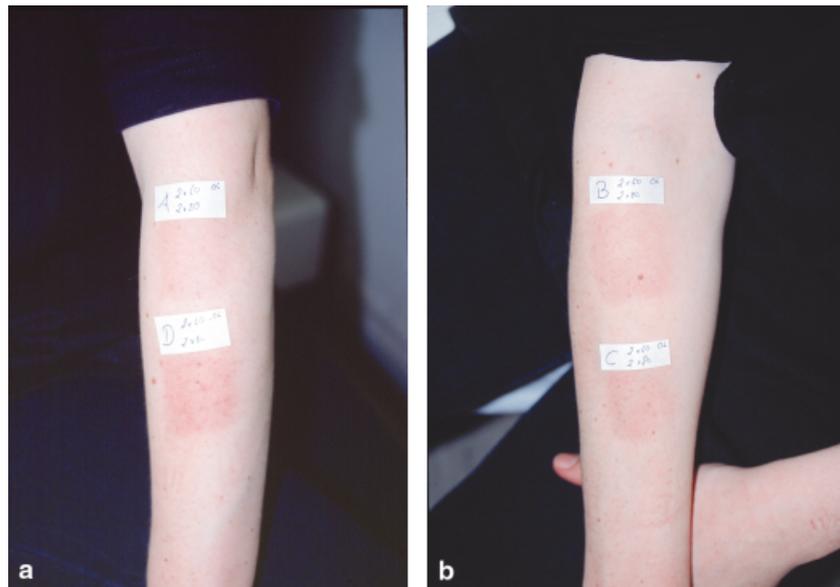


Abbildung 4: Hautreaktion eines Patienten mit polymorpher Lichtdermatose nach der 4. Photoprovokation mit 60–80 J/cm² [35] (Nachdruck mit freundlicher Genehmigung von Taylor & Francis, Stockholm). **A:** 7 Tage Vorbehandlung (0,25 % AGR) + Lichtschutz 30 Min. vor der Bestrahlung; **B:** 3 Tage Vorbehandlung (0,25 % AGR) + Lichtschutz 30 Min. vor der Bestrahlung; **C:** Keine Vorbehandlung, nur Lichtschutz 30 Min. vor der Bestrahlung; **D:** Keine Vorbehandlung, kein Lichtschutz (Kontrolle).

Figure 4: Skin reaction of a patient suffering from polymorphic light eruption after the fourth photoprovocation with 60–80 J/cm² [35] (reprinted with permission of Taylor & Francis, Stockholm). **(A)** Pre-treatment (0.25 % AGR) for 7 days plus sunscreen 30 min before photoprovocation; **(B)** pre-treatment (0.25 % AGR) for 3 days plus sunscreen 30 min before photoprovocation; **(C)** no pre-treatment, only sunscreen 30 min before photoprovocation; **(D)** no pre-treatment, no sunscreen (control).

Vorbehandlung praktisch vollständig und signifikant wirksamer als mit einem klassischen Lichtschutzmittel unterdrücken [39].

Die sogenannte Mallorca-Akne (*Acne aestivalis*) ist eine weitere, weitaus seltener Photodermatose, bei der es bei besonders disponierten Patienten durch Anwendung bestimmter oxidationsanfälliger Inhaltsstoffe kosmetischer Produkte in Gegenwart von UVA-Strahlung zu Akne-ähnlichen Symptomen kommt. Ätiologisch scheinen hier ebenfalls zytotoxische Effekte von ROS eine Rolle zu spielen und auch bei diesen Patienten konnte eine positive Wirkung durch Konditionierung mit AGR erzielt werden [35]. Diese positiven Effekte von AGR bei der polymorphen Lichtdermatose und der Mallorca-Akne konnten auch in einer groß angelegten Anwendungsbeobachtung an 577 Patienten unter Urlaubsbedingungen kürzlich bestätigt werden [40].

Alpha-Glucosylrutin und Hautalterung

Hautalterung ist ein komplexer Prozeß, der durch das Zusammenspiel von gene-

tischen Faktoren (intrinsic aging) und Umwelteinflüssen, vor allem UV-Strahlung (extrinsic aging oder photoaging), gekennzeichnet ist [16, 41]. Während die primär intrinsischen Hautalterungsprozesse vor allem durch Atrophie der Haut, Reduktion der metabolischen Aktivität sowie Verlust der dermalen Elastizität charakterisiert sind, imponieren beim Photoaging die verdickte und vergrößerte Hautoberflächenstruktur (solare Elastose), die unregelmäßige Pigmentierung sowie das Auftreten von Teleangiectasien. Auch prä-maligne und maligne Neoplasien der Haut werden vermehrt beobachtet.

Durch UV-Bestrahlung der Haut kommt es neben einer direkten Schädigung der DNA auch zu multiplen indirekten Schädigungen der Zellen durch oxidativen Streß. ROS führen darüber hinaus zu einer gesteigerten Aktivität von kollagenabbauenden Matrix-Metalloproteinasen und Induktion von Transkriptionsfaktoren (z. B. AP-1) [16]. Dadurch kommt es zu einer proteolytischen Degradation von Matrixproteinen, die durch AGR verhindert werden kann [42]. Auch chronische Entzün-

dungsprozesse, die durch ROS unterhalten werden, führen zu einer Zerstörung der dermalen Matrix [41].

ROS schädigen insbesondere auch Mitochondrien. Vermutlich spielt eine mitochondriale Dysfunktion durch mitochondriale DNA-Mutationen bei vielen degenerativen Erkrankungen wie auch beim physiologischen Alterungsprozeß eine wichtige Rolle [16]. Aufgrund dieser pathogenetischen Zusammenhänge wird eine prophylaktische Wirkung von Antioxidantien wie z. B. Vitamin E bei lichtinduzierter Hautalterung schon seit längerem postuliert. Diese konnte bisher allerdings nur *in vitro* nachgewiesen werden [43].

Die oben beschriebenen Ergebnisse unterstreichen die potentielle Bedeutung von AGR auch für die Prophylaxe des Photoaging, zumal AGR anhand der untersuchten *in-vitro*- und *in-vivo*-Parameter eine wesentlich höhere antioxidative Wirksamkeit aufweist als Vitamin E.

Hautverträglichkeit von AGR

In allen prä-klinischen und klinischen Untersuchungen [3, 17, 31, 34, 35, 37–40] zeigte sich AGR in den verwendeten Konzentrationen als sehr gut verträglicher, kosmetisch einsetzbarer Wirkstoff. Hautirritationen oder Sensibilisierungen durch AGR wurden nicht beobachtet. Als einziger unerwünschter Effekt wurde in seltenen Fällen eine leichte Gelbfärbung der Haut nach Anwendung von AGR beschrieben [35].

Ausblick

Aufgrund der hohen Wirksamkeit von AGR und den multiplen zellulären Schädigungsmustern von ROS sind weitere Indikationsgebiete für dieses potente Antioxidans denkbar. So fanden sich z. B. in ersten vergleichenden Untersuchungen an atopischer Haut versus gesunder Haut deutliche Unterschiede in der Resistenz gegen durch chemische Einflüsse oder UVA-Strahlung induzierten oxidativen Streß; dies galt nicht nur für erkrankte Hautareale sondern auch für symptomfreie Haut [12, 44]. Im Stratum corneum nicht-läsionaler Haut wurden zwar gesteigerte alpha-Tocopherol- und reduzierte Lipidperoxidspiegel gefunden [45], bei aktiver atopischer Dermatitis zeigten jedoch sowohl epidermale [46] als auch systemische [47] Marker des oxidativen Stresses einen Anstieg, der mit dem Schweregrad kor-

relierte. *In-vivo*-Messungen mittels UPE belegen, daß eine erhöhte epidermale Sensitivität gegen ROS durch Anwendung von AGR signifikant reduziert werden kann. Diese Verbesserung des oxidativen Status korreliert zudem mit einer Stabilisierung der epidermalen Barrierefunktion, wie begleitende Messungen des transepidermalen Wasserverlustes (TEWL) ergaben [44].

Zusammenfassend läßt sich feststellen, daß eine Vielzahl von experimentellen und klinischen Untersuchungen die starke antioxidative Wirksamkeit und ausgezeichnete Hautverträglichkeit des topisch applizierbaren Wirkstoffes AGR belegen. Neben der gesicherten prophylaktischen Wirkung bei lichtbedingten Hautreaktionen wie der PLD ergibt sich eine Reihe weiterer potentieller Anwendungsbereiche für diese Substanz in der Dermatologie. <<<

Korrespondenzanschrift

Dr. med. F. Rippke
Beiersdorf AG
Unnastraße 48
D-20245 Hamburg
Tel.: 040-49 09 33 22
Fax: 040-49 09 47 92
E-mail: Frank.Rippke@Beiersdorf.com

Literatur

- 1 Bieger WP. Oxidativer Stress und Alter. Eine aktuelle Übersicht. *Urologe* 2001; 41: 344–350.
- 2 Harmann D. Role of free radicals in aging and disease. *Ann NY Acad Sci* 1992; 673: 126–141.
- 3 Stäb F, Wolber R, Mundt C, Blatt T, Will K, Keyhani R, Rippke F, Max H, Schönrock U, Wenck H, Moll I, Hölzle E, Wittern K-P. Alpha-Glucosylrutin – an innovative antioxidant in skin protection. *SÖFW-Journal* 2001; 27: 2–8.
- 4 Boyd CS, Cadenas E. Nitric oxide and cell signaling pathways in mitochondrial-dependent apoptosis. *Biol Chem* 2002; 383: 411–423.
- 5 Scharffetter-Kochanek K, Schneider L. Antioxidantien – Bedeutung bei Karzinogenese und Hautalterung. In: Plewig G, Degitz K (Hrsg.): *Fortschritte der praktischen Dermatologie und Venerologie*. Berlin, Heidelberg, New York: Springer, 2001: 46–54.
- 6 Maccarone M., Catani M.V., Iraci S., Melino G., Agro A.F. A survey of reac-

tive oxygen species and their role in dermatology. *J Eur Acad Derm Venerol* 1997; 8: 185–202.

- 7 Pinnell SR. Cutaneous photodamage, oxidative stress, and topical antioxidant protection. *J Am Acad Dermatol* 2003; 49: 1203–1204.
- 8 Rucker BU, Haberle M, Koch HU, Bocionek P, Schriever KH, Hornstein OP. Ultraviolet light hardening in polymorphous light eruption – a controlled study comparing emission spectra. *Photodermatol Photoimmunol Photomed* 1991; 8: 73–78.
- 9 Poswig A, Wenk J, Brenneisen P, Wlaschek M, Hommel C, Quel G, Faisst K, Dissemond J, Briviba K, Krieg T, Scharffetter-Kochanek K. Adaptive antioxidant response of manganese-superoxide dismutase following repetitive UVA irradiation. *J Invest Dermatol* 1999; 112:13–18.
- 10 Stäb F, Lanzendörfer G, Schönrock U, Wenck H. Novel antioxidants: New strategies in product stabilization and skin protection. *SÖFW-Journal* 1998; 124: 604–613.
- 11 Rhie G, Shin MH, Seo JY, Choi WW, Cho KH, Kim KH, Park KC, Eun HC, Chung JH. Aging- and photoaging-dependent changes of enzymic and nonenzymic antioxidants in the epidermis and dermis of human skin in vivo. *J Invest Dermatol* 2001; 117: 1212–1217.
- 12 Mundt C, Blatt T, Wolber R, Gercken G, Fölster H, Schachtschabel D, Stäb F. Oxidative stress response in normal human skin versus noninvolved atopic dermatitic skin (abstr.). *J Invest Dermatol* 1999; 112: 572.
- 13 Wolber R, Keyhani R, Stäb F, Hoppe U, Schachtschabel O. Aktiver Zellschutz durch topische Applikation von Antioxidantien. In: Schütz R-M, Ries W, Tews, H-P (Hrsg.): *Altern in Gesundheit und Krankheit. Meldungen: BiblioMed-Medizinische Verlagsgesellschaft MWH*, 1997: 235–249.
- 14 Krutmann J. Vorzeitige Hautalterung durch ultraviolette Strahlung und andere Umweltnoxen. *Molekulare Grundlagen. Hautarzt* 2003; 9: 809–817.
- 15 Hadshiew I., Eller M.S., Gilchrist B.A. Skin aging and photoaging: the role of DNA damage and repair. *Am J Cont Derm* 2000; 11: 19–25.
- 16 Berneburg M, Plettenberg H, Krutmann J. Photoaging of human skin.

- Photodermatol Photoimmunol Photomed 2000; 16: 239–244.
- 17 Stäb F, Wolber R, Blatt T, Keyhani R, Sauer mann G. Topically applied antioxidants in skin protection. *Methods Enzymol* 2000; 319: 465–478.
 - 18 Mundt C, Blatt T, Mummert C, Fölster-Holst R, Gercken G, Wittern KP, Stäb F. Alpha-glucosylrutin – an antioxidative modulator of the UVA-induced ERK1/2 MAP kinase activation in normal and atopic skin (abstr.). *J Invest Dermatol* 2000; 114: 842.
 - 19 F'guyer S, Afaq F, Mukhtar H. Photochemoprevention of skin cancer by botanical agents. *Photodermatol Photoimmunol Photomed* 2003; 19: 56–72.
 - 20 Chiu A, Kimball AB. Topical vitamins, minerals and botanical ingredients as modulators of environmental and chronological skin damage. *Br J Dermatol* 2003; 149: 681–691.
 - 21 Schönrock U, Stäb F, Untiedt S, Wenck H, Lanzendörfer G, Rippke F, Hölzle E. Modern antioxidants. In: Hori W (Ed.). *Drug discovery approaches for developing cosmeceuticals*. Southborough: IBC Library Series, 1997: 5.2.1–5.2.17.
 - 22 Fairbairn DW, Olive PL, O'Neil KL. The comet assay: a comprehensive review. *Mutat Res* 1995; 339: 37–59.
 - 23 Sauer mann G, Mei WP, Hoppe U, Stäb F. Ultraweak photon emission of human skin in vivo: Influence of topically applied antioxidants on human skin. *Methods Enzymol* 1999; 300: 419–428.
 - 24 Metz G. Flavonoide. *Pharm Ztg* 2000; 145: 24–32.
 - 25 Brand-Garnys EE, van Dansik P, Brand HM. Flavonoids: Looking in the face of cosmeceuticals. *SÖFW-Journal* 2001; 27: 8–13.
 - 26 Falbe J, Regitz M. Rutin. In: Falbe J, Regitz M (Hrsg.): *Römpp Lexikon Chemie*. 10. Auflage. Stuttgart, New York: Thieme, 1999: 3885–3886.
 - 27 Spilkova J, Hubik J. Biologische Wirkungen von Flavonoiden. *Pharmazie in unserer Zeit* 1988; 17: 1–9.
 - 28 Tang W, Eisenbrand G. *Sophora japonica* L. In: Tang W, Eisenbrand G: *Chinese Drugs of Plant Origin*. Berlin, Heidelberg, New York: Springer, 1992: 945–955.
 - 29 Saija A, Scalese M, Lanza M, Marzullo D, Bonina F, Castelli F. Flavonoids as antioxidant agents: Importance of their interaction with biomembranes. *Free Rad Biol Med* 1995; 19: 481–486.
 - 30 Kootstra A. Protection from UV-B-induced DNA damage by flavonoids. *Plant Mol Biol* 1994; 26: 771–774.
 - 31 Stäb F, Wolber R, Keyhani R, Hadshiew I, Schönrock U, Rippke F, Bohnsack K, Wittern K-P, Hölzle E. Alpha-glucosylrutin – an innovative topical antioxidant for prophylaxis of photodamage and polymorphous light eruption (abstr.). *J Eur Acad Derm Venereol* 2000; 14 (Suppl.1): 235.
 - 32 Lehmann P. Polymorphe Lichtdermatose: Was hilft wirklich? In: Plewig G, Degitz K (Hrsg.). *Fortschritte der praktischen Dermatologie und Venerologie*. Berlin, Heidelberg, New York: Springer, 2001: 336–340.
 - 33 Grether-Beck S, Olaizola-Horn S, Schmitt H, Grewe M, Jahnke A, Johnson J, Briviba K, Sies H, Krutmann J. Activation of transcription factor AP-2 mediates UVA radiation and singlet oxygen-induced expression of the human intercellular adhesion molecule 1 gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 1–6.
 - 34 Hadshiew I, Stäb F, Untiedt S, Bohnsack K, Rippke F, Hölzle E. Effects of topically applied antioxidants in experimentally induced polymorphous light eruption. *Dermatology* 1997; 95: 362–368.
 - 35 Rippke F, Wendt G, Bohnsack K, Dörschner A, Stäb F, Hölzle E, Moll I. Results of photoprovocation and field studies on the efficacy of a novel topically applied antioxidant in polymorphous light eruption. *J Dermatol Treat* 2001; 12: 3–8.
 - 36 Eberlein-König B, Fesq H, Abeck D, Przybilla B, Placzek M, Ring J. Systemic vitamin C and vitamin E do not prevent photoprovocation test reactions in polymorphous light eruption. *Photodermatol Photoimmunol Photomed*. 2000;16: 50–52.
 - 37 Kowalzik L, Suckow M, Carl A, Waldmann T, Bohnsack K, Pönnighaus JM. UV-B-induzierte polymorphe Lichtdermatose: Protektion durch topische Antioxidantien. *Akt Dermatol* 1998; 24: 11–14.
 - 38 Bohnsack K, Wendt G, Hadshiew I, Dörschner A, Stäb F, Rippke F, Schölermann A, Hölzle E, Moll I. Polymorphe Lichtdermatose: Wie wirken topisch applizierte Antioxidantien? *Kosmet Med* 2000; 21: 90–93.
 - 39 Hadshiew I, Treder-Conrad C, Dörschner A, v. Bülow R, Klette E, Stäb F, Moll I, Rippke F. A new potent antioxidant and UVA-protective sunscreen formulation as prophylaxis against polymorphic light eruption. *Photodermatol Photoimmunol Photomed* (in press).
 - 40 Treder-Conrad C, Kloker B, Dörschner A, Stäb F, Rippke F. Wirksamkeit des antioxidativen Lichtschutzes bei polymorpher Lichtdermatose und Mal-lorca-Akne – Ergebnisse einer multizentrischen Anwendungsbeobachtung bei 577 Patienten. *Akt Dermatol* 2003; 29: 121–126.
 - 41 Gilchrist B. A review of skin ageing and its medical therapy. *Br J Dermatol* 1996; 135: 867–875.
 - 42 Hantke B, Lahmann C, Venzke K, Fischer T, Kocourek A, Windsor LJ, Bergemann J, Stäb F, Tschesche H. Influence of flavonoids and vitamins on the MMP- and TIMP-expression of human dermal fibroblasts after UVA irradiation. *Photochem Photobiol Sci* 2002; 1: 826–833.
 - 43 Miyachi Y. Photoaging from an oxidative standpoint. *J Dermatol Sci* 1995; 9: 79–86.
 - 44 Wolber R, Stäb F, Abeck D, Bleck O, Schreiner V, Untiedt S, Sauer mann G, Hoppe U. Antioxidant status and role of oxidative stress in atopic dermatitis (abstr.). *J Invest Dermatol* 1996; 106: 888.
 - 45 Antille C, Sorg O, Lübke J, Saurat J-H. Decreased oxidative state in non-lesional skin of atopic dermatitis. *Dermatology* 2002; 204: 69–71.
 - 46 Niwa Y, Sumi H, Kawahira K, Teras-hima T, Nakamura T, Akamatsu H. Protein oxidative damage in the stratum corneum: evidence for a link between environmental oxidants and the changing prevalence and nature of atopic dermatitis in Japan. *Br J Dermatol* 2003; 149: 248–254.
 - 47 Tsukahara H, Shibaba R, Ohshima Y, Todoroki Y, Sato S, Ohta N, Hiraoka M, Yoshida A, Nishima S, Mayumi M. Oxidative stress and altered antioxidant defense in children with acute exacerbation of atopic dermatitis. *Life Sci* 2003; 72: 2509–2516.