

**Untersuchungen zum zytotoxischen und zytoprotektiven Potential  
ausgewählter Radikalfänger an humanen Keratinozyten**

**Dissertation**

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

vorgelegt der

Mathematisch-Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät  
(mathematisch-naturwissenschaftlicher Bereich)  
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Frau Dipl.-Pharm. Anja Nickel  
geboren am 28.04.1974 in Suhl/Thüringen

Gutachter:

1. Prof. Dr. rer. nat. W. Wohlrab (Halle)
2. Prof. Dr. rer. nat. R. Neubert (Halle)
3. Prof. Dr. med. H. Meffert (Berlin)

Halle (Saale), den 21.11.2001

**urn:nbn:de:gbv:3-000002827**

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000002827>]

Meinen Eltern in Liebe und Dankbarkeit gewidmet

## INHALTSVERZEICHNIS

### Abkürzungs- und Symbolverzeichnis

<b>1 Einleitung und Zielsetzung der Arbeit</b>	<b>1</b>
<b>2 Theoretische Grundlagen</b>	<b>3</b>
2.1 Aufbau und Funktion der menschlichen Haut	3
2.2 UV-Strahlung und Wechselwirkungen mit biologischen Systemen	4
2.3 Freie Radikale, reaktive Sauerstoffspezies und Auswirkungen auf zelluläre Systeme	5
2.4 Reparatur- und antioxidative Verteidigungsmechanismen	5
2.5 Flavonoide	6
2.5.1 Vorkommen und biologische Eigenschaften	6
2.5.2 Strukturvoraussetzungen für die antioxidative Wirksamkeit	7
2.6 Melatonin	8
2.6.1 Biosynthese und physiologische Bedeutung	8
2.6.2 Antioxidative Eigenschaften	9
2.6.3 Bedeutung und Relevanz für die Dermatologie	10
<b>3 Material und Methoden</b>	<b>12</b>
3.1 Verwendete Chemikalien und Lösungen	12
3.2 Geräte und Hilfsmittel	14
3.3 Zellkultur	16
3.3.1 HaCaT-Keratinocyten	16
3.3.2 Normale humane epidermale Keratinocyten (NHEK)	17
3.3.2.1 Isolierung der normalen humanen epidermalen Keratinocyten (NHEK)	17
3.3.3 Kulturbedingungen, Subkultivierung und Passagierung der Keratinocyten	18
3.4 Herstellung der eingesetzten Wirkstofflösungen und durchgeführte Inkubationsschemen	19
3.5 Noxenexposition der Zellkultur	19
3.5.1 UV-A und UV-B Bestrahlung	19
3.5.2 Decylhydroperoxid	19
3.5.3 Wasserstoffperoxid	20
3.5.4 Ammoniumeisen-(II)-sulfat/8-Hydroxychinolin	20
3.6 Charakterisierung des Proliferationsverhaltens und der Zytotoxizität	20
3.6.1 Bestimmung der DNA-Syntheseleistung	20
3.6.2 Bestimmung der Lebendzellanzahl und Messung der Zellvitalität	21
3.6.2.1 LDH-Test	21
3.6.2.2 Zytotoxizitätstest (Vitalfärbung)	21
3.7 Bestimmung intrazellulärer Peroxide mittels Dihydrorhodamin 123 (DHR)	21
3.8 Flowzytometrische Bestimmung der Apoptose und des Zellzyklusphasenverteilungsmusters	22
3.8.1 Ablösen und Präparation des Probenmaterials	22

3.8.2	Untersuchungen des apoptotischen Zelltodes	22
3.8.2.1	Bestimmung der Translokalisierung von Phosphatidylserin	22
3.8.2.2	Bestimmung des Apoptose-spezifischen Mitochondrienmembranproteins Apo2.7	23
3.8.3	Untersuchung des Zellzyklusphasenverteilungsmusters	24
3.9	Bestimmung der UV-A induzierten Linolsäureperoxidation mittels Kapillarzonenelektrophorese	24
3.10	Aufnahme der Absorptionsspektren	25
3.11	Dünnschichtchromatographie	26
3.12	Bestimmung der Aufnahme von Melatonin in die HaCaT-Zellen	26
3.13	Untersuchungen der Penetration in Humanhaut ex vivo	26
3.13.1	Gewinnung und Präparation des biologischen Materials	26
3.13.2	Ermittlung der mittleren Epidermisbreiten	27
3.13.3	Herstellung der wirkstoffhaltigen Zubereitungen	27
3.13.3.1	Melatonin (1%-ig)	27
3.13.3.2	Flavonoidhaltige Vehikel	27
3.13.3.2.1	Rutin	27
3.13.3.2.2	Quercetin, Kämpferol und Isorhamnetin	28
3.13.4	Versuche mit radioaktiv markiertem <sup>3</sup> H-Melatonin	28
3.13.5	Versuche mit unmarkierten Substanzen	29
3.14	Statistische Auswertung der Versuchsergebnisse	29
<b>4</b>	<b>Ergebnisse und Diskussion</b>	<b>31</b>
4.1	Charakterisierung des Proliferationsverhaltens humaner Keratinozyten in vitro unter Antioxidantieneinfluß	31
4.1.1	Einfluß der Flavonoide	31
4.1.1.1	Einfluß von Quercetin	32
4.1.1.2	Einfluß von Kämpferol	36
4.1.1.3	Einfluß von Rutin	38
4.1.1.4	Diskussion	39
4.1.2	Einfluß der von Melatonin	42
4.1.3	Einfluß von N-Acetylserotonin	46
4.1.4	Diskussion	48
4.2	Charakterisierung des schädigenden Einflusses von Wasserstoffperoxid auf humane Keratinozyten	49
4.2.1	Diskussion	53
4.3	Untersuchungen des zytoprotektiven Potentials gegenüber schädigenden Noxen	54
4.3.1	Zytoprotektives Potential von Rutin im Keratinozytenmodell	54
4.3.1.1	Diskussion	58
4.3.2	Zytoprotektives Potential von Melatonin im Keratinozytenmodell	60
4.3.3	Zytoprotektives Potential von N-Acetylserotonin im Keratinozytenmodell	69
4.3.4	Diskussion	72

4.4	Bestimmung intrazellulärer Peroxide nach UV-A und UV-B Bestrahlung und unter Einfluß verschiedener Antioxidantien	74
4.4.1	Rutin	75
4.4.2	Kämpferol	76
4.4.3	Melatonin	77
4.4.4	N-Acetylserotonin	79
4.4.5	Diskussion	80
4.5	Untersuchungen zur Photostabilität der Indolderivate Melatonin und N-Acetylserotonin	81
4.5.1	Einfluß einer UV-Bestrahlung auf die Absorptionsspektren	81
4.5.2	Dünnschichtchromatographischer Nachweis der Photoabbauprodukte	82
4.5.3	Diskussion	83
4.6	Einfluß von Melatonin und N-Acetylserotonin auf die UV-A induzierte Linolsäureperoxidentstehung	84
4.6.1	Diskussion	87
4.7	Untersuchungen zur Penetration in humane Haut ex vivo	89
4.7.1	Penetration der Flavonoide	90
4.7.1.1	Flavonolaglyka	90
4.7.1.2	Rutin	92
4.7.2	Penetration von Melatonin	92
4.7.3	Diskussion	93
	<b>5 Diskussion</b>	<b>96</b>
	<b>6 Zusammenfassung</b>	<b>100</b>
	<b>Literaturverzeichnis</b>	
	<b>Abbildungs- und Tabellenverzeichnis</b>	

**ABKÜRZUNGS- UND SYMBOLVERZEICHNIS**

Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
BrdU	5-Brom-2'-desoxyuridin
D	Dermis
DAB	Deutsches Arzneibuch
DHP	Decylhydroperoxid
DHR	Dihydrorhodamin 123
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA (engl.)	Desoxyribonukleinsäure (dt.)
EDTA	Ethylendiamino-N,N,N',N'-tetraessigsäure
rEGF	recombinant epidermal growth factor
ELISA	enzyme linked immuno sorbent assay
EP	Epidermis
et al.	und Mitarbeiter/et alias
FKS	fetales Kälberserum
FLUOS	Fluoresceinisothiocyanat
HaCaT	Human Adult low Calcium high Temperature Keratinocytes
HBSS	Hank's Balanced Salts
IC <sub>50</sub>	Inhibition Concentration (50%)
Kap.	Kapitel
LDH	Lactatdehydrogenase
max.	maximal
MTP	Mikrotiterplatte
n	Anzahl der Werte pro Meßreihe
NHEK	normale humane epidermale Keratinozyten
p	Irrtumswahrscheinlichkeit (probability)
p.a.	pro analysi
PBS	phosphate buffered saline/Phosphat gepufferte Salzlösung
PE	Phycoerythrin
PI	Propidiumiodid
POPOP	1,4-bis-2-(5-Phenylloxazolyl)-benzen
PPO	2,5-Diphenylloxazol
RT	Raumtemperatur
SB	Stratum basale
SC	Stratum corneum
SD	Standardabweichung (standard deviation)
SFM	Serumfreies Medium
SG	Stratum granulosum
SS	Stratum spinosum
Tab.	Tabelle

## Abkürzungs- und Symbolverzeichnis

---

U/min	Umdrehungen pro Minute
UV-	ultraviolett
vgl.	vergleiche

Weitere Abkürzungen werden im Text bei ihrer ersten Verwendung erklärt.

## 1 Einleitung und Zielsetzung der Arbeit

Die menschliche Haut mit einer ca. 2 m<sup>2</sup> großen Kontaktfläche zum umgebenden Milieu unterliegt einer besonders starken Beeinflussung durch verschiedene externe schädigende Umwelttoxine. Dabei kommt der UV-Strahlung an den lichtexponierten Hautarealen eine besondere Bedeutung zu. Aufgrund veränderter Freizeitgewohnheiten, der ständig steigenden Inzidenz verschiedener Hautkreberkrankungen (Melanome, Basalzell- und Plattenepithelkarzinome) weltweit (Gallagher et al., 1995a und 1995b; Marks, 1995; Ringborg et al., 1997) und nicht zuletzt durch die zusätzliche Sensibilisierung der breiten Öffentlichkeit steigt das Interesse an einer Weiterentwicklung von UV-Protektiva.

Viele Arbeiten in der Vergangenheit beschäftigten sich mit der Untersuchung der zellschädigenden Mechanismen einer UV-Bestrahlung auf molekularer und zellbiologischer Ebene, in deren Folge es zu komplexen pathogenetischen Alterationen am Hautorgan kommen kann. Die Konsequenzen dieser akuten oder chronischen Schädigung des Hautgewebes sind vielfältiger Natur. Dazu gehören beispielsweise die Ausbildung und Manifestation verschiedener Photodermatosen (Gonzalez und Gonzalez, 1996), die vorzeitige Hautalterung ("photoaging") (Wenk et al., 2001) und die Photokarzinogenese und -mutagenese (Strickland, 1986; Drobetsky et al., 1995; Grossman und Leffell, 1997).

Es ist hinlänglich bekannt, daß eine UV-Exposition an der Generierung reaktiver Sauerstoffspezies und freier Radikale beteiligt ist (Black, 1987; Horio und Okamoto, 1987; Ogura et al., 1990 und 1991; Tyrrell, 1995). Deshalb wurde in den letzten beiden Jahrzehnten versucht, durch definierten systemischen bzw. topischen Einsatz verschiedener Antioxidantien und Radikalfänger alleine oder in Kombination mit UV-Lichtschutzsubstanzen einen adäquaten Schutz des lebensnotwendigen Hautorgans zu erreichen (Jurkiewicz et al., 1995; McVean und Liebler, 1997; Eberlein-König et al., 1998; Kowalick et al., 1998; Muizzuddin et al., 1998).

Gegenstand der wissenschaftlichen Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit war die Testung verschiedener Antioxidantien bzw. Radikalfänger hinsichtlich ihrer dermalen Einsatzfähigkeit für eine prophylaktische und therapeutische Anwendung. Besonderes Augenmerk lag dabei auf der Substanzklasse der Flavonoide. Aus dieser komplexen und vielfältigen Verbindungsklasse des pflanzlichen Sekundärstoffwechsels wurden Quercetin, Kämpferol und Rutin als häufig vorkommende Vertreter im Pflanzenreich und in entsprechend aufgearbeiteten Pflanzenextrakten ausgewählt. Daneben schien der Einsatz von Melatonin aufgrund des von Bangha et al., 1996 und 1997b beobachteten UV-Erythem vermindernden Effektes nach topischer Applikation und beschriebener Radikalfängereigenschaften (Tan et al., 1993; Pieri et al., 1994; Reiter 1995, 1996; Hardeland 1997), vielversprechend zu sein. Als weitere, dem Melatonin strukturell ähnliche und ebenfalls potente antioxidative Verbindung wurde N-Acetylserotonin eingesetzt.

Bevor neue Wirkstoffe und Wirkstoffkombinationen als Topika auf die menschliche Haut aufgebracht werden können, bedarf es der Klärung einer dadurch möglichen Schädigung. In der vorliegenden Arbeit lag ein Hauptschwerpunkt der Untersuchungen auf der Charakterisierung einer eventuellen zytotoxischen Potenz der angewandten Verbindungen. Es sollte die epidermale Verträglichkeit und Unbedenklichkeit geprüft und ein etwaiges Nebenwirkungspotential beurteilt werden.

Idealerweise dienen humane Keratinozyten als geeignetes *in vitro* Testsystem und epidermales Zellmodell, da sie mit ca. 90% die größte Zellpopulation in der Epidermis sind und somit Hauptzielzellen und Effektororgan für UV- und oxidativ bedingte Schäden darstellen.

Nach definierten Applikationszeiten sollte der Einfluß auf das Proliferationsverhalten humaner Keratinozyten bestimmt und ein Toxizitätsprofil erstellt werden. Neben diesen *in vitro* toxikologischen Fragestellungen richtete sich das Hauptinteresse der Untersuchungen auf die Abschätzung und Beurteilung des zytoprotektiven Potentials im epidermalen Zellsystem nach Anwendung unterschiedlicher physikalischer und chemischer Zellschädigungsmodelle (UV-Bestrahlung, Wasserstoffperoxid, Decylhydroperoxid, Ammoniumeisen-(II)-sulfat).

Wichtig für die Einschätzung möglicher Hautirritationen unter *in vivo* Bedingungen und für eine zukunftsorientierte und zielgerichtete Entwicklung topisch-präventiver Präparate ist das Penetrationsvermögen der einzelnen Substanzen durch das Stratum corneum bis in die lebenden Hautschichten der Epidermis und Dermis. Die Durchführung penetrationskinetischer Studien an Humanhaut *ex vivo* zur Ermittlung eines Konzentrations-Zeit-Profiles der extern applizierten Wirkstoffe war dabei für die Herstellung einer Korrelation und Übertragbarkeit zu den Zellkulturergebnissen erstrebenswert.

Ein Endziel der Bemühungen sollte darin bestehen, neue Ansatzpunkte für einen verbesserten und effektiven UV- bzw. biologischen Lichtschutz der menschlichen Haut aufzuzeigen, und damit zu einer Vermeidung oder zumindest einer Verminderung akuter und chronischer Lichtschäden (aktinischer Schäden) und zur möglichen Prävention von Melanomen und epithelialen Hauttumoren beizutragen.

Die hauptsächlichen Fragestellungen der vorliegenden Arbeit können wie folgt zusammengefaßt werden:

1. Welchen Einfluß üben verschiedene externe, schädigende Noxen (z. B. Wasserstoffperoxid) auf das Proliferationsverhalten humaner Keratinozyten aus?
2. Induzieren verschiedene extern applizierte, antioxidativ wirksame Substanzen Proliferationsveränderungen der humanen Keratinozyten *in vitro*?
3. Wie kann die epidermale Verträglichkeit bzw. die *in vitro* Toxizität dieser Substanzen bzw. deren oxidierte Formen bei einer dermalen Anwendung eingeschätzt werden?
4. Können zytoprotektive Wirkungen dieser Substanzen nach Anwendung verschiedener Zellschädigungsmodelle im epidermalen Zellsystem aufgezeigt werden?
5. Welches Penetrationsverhalten zeigen die einzelnen Verbindungen an Humanhaut *ex vivo* nach topischer Applikation eines O/W- bzw. W/O-Standardvehikels?
6. Inwieweit besteht eine Korrelation der Penetrationsergebnisse zu den Zellkulturergebnissen? Können ausreichend hohe Wirkspiegel in der lebenden Epidermis als Hauptwirkort erreicht werden?
7. Ist ein topischer Einsatz der untersuchten antioxidativ wirksamen Substanzen sinnvoll?

## 2 Theoretische Grundlagen

### 2.1 Aufbau und Funktion der menschlichen Haut

Die humane Haut gehört zu den wichtigsten und komplexesten Organen des menschlichen Organismus. Als lebensnotwendige Grenze zum umgebenden Milieu erfüllt sie multiple physiologische Aufgaben. Neben einer Kontakt- und Sinnesfunktion kommt den Schutz- und Barriereigenschaften eine besondere Bedeutung zu. Die Haut läßt sich grob in Epidermis (epithelial), Dermis (bindegewebig) und Subcutis (Fettgewebe) unterteilen (Abb. 1). In ihr sind verschiedene Anhangsgebilde, wie z. B. Haare, Nägel, Talg- und Schweißdrüsen eingebettet. Die durchschnittliche Hautdicke liegt, je nach regionalen und individuellen Gegebenheiten, zwischen 1,5 und 4 mm. Etwa 0,1 mm davon entfallen auf die Epidermis. Mit ca. 90% nehmen die Keratinozyten als biologisch aktive Zellen den quantitativ größten Teil der epidermalen Hautzellpopulation ein. Daneben kommen die im Stratum basale gelegenen neuroendokrinen Merkelzellen mit einem Anteil von weniger als 1% vor. Die Melanozyten, die unmittelbar der Basalmembran aufliegen, und die suprabasalen Langerhans-Zellen mit ihrer dendritischen Morphologie bilden mit den Keratinozyten eine symbiontische und funktionelle Einheit. Als mehrschichtiges, verhornendes und sich ständig erneuerndes Plattenepithel läßt sich die Epidermis durch den unterschiedlichen Differenzierungsgrad der Keratinozyten histologisch, morphologisch und biochemisch in vier verschiedene Schichten (Strata) gliedern: Stratum basale (SB), Stratum spinosum (SS), Stratum granulosum (SG) und Stratum corneum (SC). Die teilungsfähigen, lebenden Keratinozyten im Stratum basale wandeln sich während der Wanderung in Richtung Hautoberfläche zu toten, enddifferenzierten Korneozyten (Hornzellen) um und bilden die funktionstragende Permeabilitätsbarriere (Hornschicht). Die Zeitspanne zwischen der Mitose im SB und der Abschilferung des terminal differenzierten Keratinozyten beträgt etwa einen Monat. Diese ständige epidermale Gewebemöostase (Keratinozytenproliferation und -differenzierung) gewährleistet die vollständige Funktionsfähigkeit des Hautorgans (Fritsch, 1990).

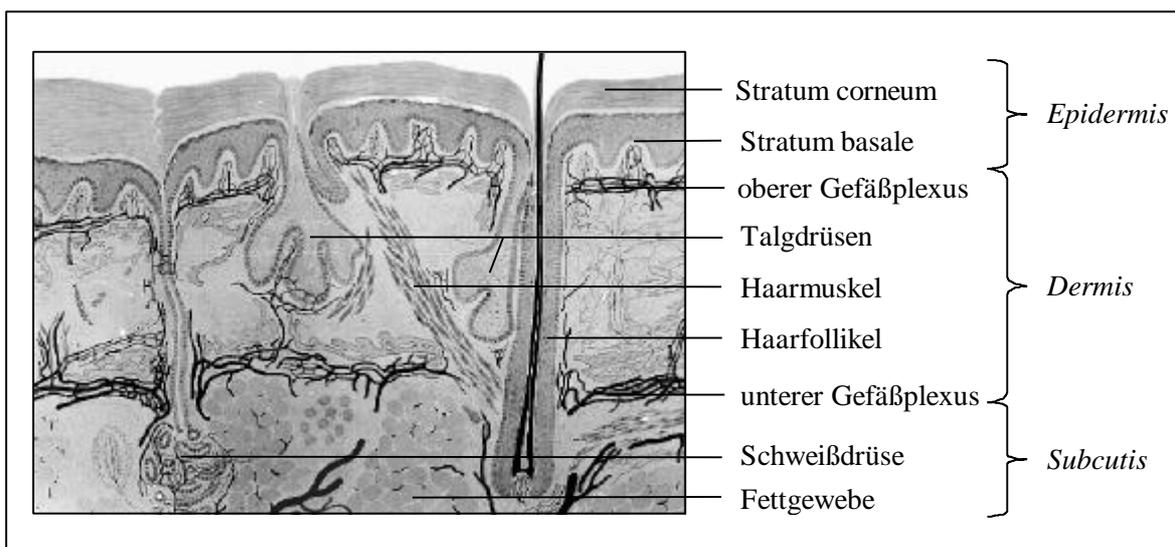


Abb. 1: Aufbau der menschlichen Haut (modifiziert nach Grüneberg)

## 2.2 UV-Strahlung und Wechselwirkungen mit biologischen Systemen

Aufgrund der großen Kontaktfläche zur Umwelt ist die Haut verschiedenen schädigenden Umweltfaktoren besonders intensiv ausgesetzt. Für das Hautorgan besitzt die elektromagnetische UV-Strahlung eine relevante Bedeutung. Das UV-Lichtspektrum kann in die Bereiche UV-C (100 nm - 280 nm), UV-B (280 nm - 320 nm) und UV-A (320 nm - 400 nm) eingeteilt werden. Während die UV-C Strahlung vom Sauerstoff in der Atmosphäre (bis 200 nm) und von der Ozonschicht in der Stratosphäre (bis 290 nm) vollständig absorbiert wird, erreicht die UV-A und ein Teil der UV-B Strahlung die Erdoberfläche (Heymann, 1994). Im Zuge der Zerstörung der Ozonschicht nimmt dabei der UV-B Anteil ständig zu (Kerr und McElroy, 1993). Auf die Haut auftreffendes UV-Licht wird größtenteils reflektiert, diffus gestreut bzw. im SC absorbiert (Kohen et al., 1995). Daneben kann ein erheblicher Teil in Abhängigkeit von der Wellenlänge in unterschiedliche Hautschichttiefen eindringen. Die kurzwellige, energiereiche UV-B Strahlung gelangt bis in die Epidermis und kann hier z. B. die lebenden, teilungsfähigen Keratinozyten des SB schädigen. Die UV-A Strahlung erreicht dermales und zum Teil subcutanes Gewebe (Frain-Bell, 1985). In der Epidermis werden ca. 90% der einfallenden UV-B und 60% der UV-A Strahlung absorbiert (Moll, 1999).

Die Absorption der Lichtenergie (Photonen) in der Haut erfolgt durch die unterschiedlichsten endogenen Chromophore (Nukleinsäuren, Lipide, Aminosäuren, Melanin, Urocaninsäure usw.). In der Folge können unterschiedliche angeregte Zustände des jeweiligen Chromophors entstehen und verschiedene photooxidative Reaktionen ausgelöst werden (Tedesco et al., 1997). Derartige photochemische Veränderungen äußern sich beispielsweise an der DNA mit der Bildung charakteristischer Photoprodukte nach UV-B Bestrahlung, wie z. B. Pyrimidindimerbildung (Fritsch, 1990; Young et al., 1998). Als weitere Folge dieser komplexen Wechselwirkungen mit unterschiedlichen zellulären Strukturen ist die Generierung freier Radikale und reaktiver Sauerstoffspezies bedeutsam (Black, 1987; Horio und Okamoto, 1987; Darr und Fridovich, 1994; Tyrrell, 1995). Die Konsequenzen derartiger Reaktionen nach UV-Exposition sind mannigfaltig. Als akute inflammatorische Antwort reagiert die Haut primär mit der Ausbildung eines UV-Erythems (Erythema solare) (Fritsch, 1990). Eine Lipidperoxidation kann ebenfalls nach UV-Bestrahlung erfolgen, wobei ein Mechanismus über freie Radikale als Mediatoren in diesem Prozeß beschrieben wurde (Ogura et al., 1990 und 1991).

Klinisch manifestieren sich chronische, aktinische Schäden schließlich in einer vorzeitigen Hautalterung ("photoaging") und in der Photokarzinogenese mit der möglichen Bildung verschiedener Präkanzerosen, wie z. B. aktinischer Keratosen und epithelialer Hauttumore (Fritsch, 1990; Darr und Fridovich, 1994).

Nach dem derzeitigen photobiologischen Wissensstand können die UV-A- und UV-B-vermittelten Schäden im zellulären System auf unterschiedliche Mechanismen zurückgeführt werden. Die hervorgerufenen Effekte durch die energiereiche UV-B Strahlung beruhen größtenteils auf einer direkten Schädigung zellulärer Strukturen (DNA, RNA, Proteine etc.) infolge einer UV-Absorption. Dagegen wurde das Schädigungspotential der UV-A Strahlung lange Zeit unterschätzt, obwohl diese ca. 95% der solaren UV-Strahlung ausmacht.

In der Vergangenheit wurde ein Mechanismus über endogene Photosensitizer (Porphyrine, Flavine etc.) in Anwesenheit von Sauerstoff beschrieben, bei dem es zur Generierung von reaktiven

Sauerstoffspezies ( $^1\text{O}_2$ ,  $^{\bullet}\text{O}_2^-$ ) kommt, und die DNA indirekt geschädigt werden kann (Kawanishi und Hiraku, 2001).

### 2.3 Freie Radikale, reaktive Sauerstoffspezies und Auswirkungen auf zelluläre Systeme

Ein freies Radikal kann definiert werden als ein Atom oder Molekül, welches ein oder mehrere ungepaarte Elektronen in einem äußeren Orbital enthält (Halliwell und Gutteridge, 1989). Die einzelnen Radikalspezies, die durch eine hohe Reaktivität mit extrem kurzen Halbwertszeiten (Tab. 1) gekennzeichnet sind, entstehen gewöhnlich während normaler physiologischer und metabolischer Prozesse im Zellstoffwechsel (Yu, 1994). Daneben wird eine vermehrte Radikalbildung durch verschiedene externe Faktoren, wie z. B. UV-Strahlung, initiiert (Black, 1987; Ogura et al., 1990 und 1991). In der Folge kann durch die reaktiven Sauerstoffintermediate ein breites Spektrum oxidativer Schäden an zellulären Strukturen, wie z. B. der DNA (Wiseman und Halliwell, 1996; Kvam und Tyrrell, 1997; Marnett, 2000) der Proteine, Kohlenhydrate und Lipide mit Veränderungen oder Verlust der biologischen Funktionsfähigkeit hergerufen werden (Sies, 1986).

Tab. 1: Halbwertszeiten (HWZ) ausgewählter reaktiver Sauerstoff- bzw. Radikalspezies bei 37°C im Vergleich zu molekularem Sauerstoff (Yu, 1994)

Radikalspezies	Formel	HWZ in s
Molekularer Sauerstoff	$\text{O}_2$	$> 10^2$
Singulett-Sauerstoff	$^1\text{O}_2$	$1 \times 10^{-6}$
Superoxidanionradikal	$^{\bullet}\text{O}_2^-$	$1 \times 10^{-6}$
Hydroxylradikal	$^{\bullet}\text{OH}$	$1 \times 10^{-9}$
Peroxyradikal	$\text{ROO}^{\bullet}$	$1 \times 10^{-2}$
Alkoxyradikal	$\text{RO}^{\bullet}$	$1 \times 10^{-6}$

### 2.4 Reparatur- und antioxidative Verteidigungsmechanismen

Die humane Haut, speziell die Hornschicht (SC), zeichnet sich durch eine hohe Widerstandsfähigkeit gegenüber physikalischen, z. B. aktinischen Einflüssen, und chemischen Noxen aus (Fritsch, 1990). Neben der rein physikalischen Barrierefunktion verfügt die humane Haut über verschiedene wichtige enzymatische, zelleigene Reparatursysteme (z. B. Endonukleasen), die oxidative bzw. UV-vermittelte Veränderungen an der DNA effektiv beseitigen können (Sies, 1986; Young et al., 1996; Bykov et al., 1999). Bei irreparablen Zellschädigungen kann ein Zelltodprogramm als molekularer Abwehrmechanismus induziert werden (Paus et al., 1995; Noll, 1997).

Weiterhin sind die einzelnen Zellen und Gewebe einer übermäßigen Schädigung durch reaktive Sauerstoffspezies (oxidativer Streß) nicht schutzlos ausgesetzt. Evolutionär bedingt haben sich gut organisierte, effiziente Verteidigungsmechanismen herausgebildet. Dazu gehören die unterschiedlich subzellulär lokalisierten antioxidativen Enzymsysteme Superoxiddismutase, Glutathionperoxidase und Katalase (Sies, 1986; Harris, 1992). Weiterhin können an dieser Stelle die nicht-enzymatischen

Antioxidantien  $\alpha$ -Tocopherol, Ascorbinsäure,  $\beta$ -Karotin u.a. angeführt werden (Yu, 1994). In Applegate und Frenk (1995) sowie Thiele et al. (2000) wird eine Zusammenfassung des komplexen antioxidativen Verteidigungssystems in der Haut gegeben.

Fuchs et al. (1989) und Shindo et al. (1993 und 1994) konnten in ihren Untersuchungen eine Abnahme verschiedener enzymatischer und nichtenzymatischer Antioxidantien in der Säugetierhaut nach UV-Bestrahlung nachweisen. Protektionen vor oxidativen Schäden wurden durch eine zusätzliche topische Applikation verschiedener Antioxidantien bzw. Radikalfänger im Tiermodell nach UV-Exposition gezeigt (Darr et al., 1992; Jurkiewicz et al., 1995; McVean und Liebler, 1997; Muizzuddin et al., 1998).

In der vorliegenden Arbeit sollten vordergründig antioxidativ wirksame Verbindungen aus der Substanzklasse der Flavonoide und die Indolderivate Melatonin und N-Acetylserotonin hinsichtlich ihrer protektiven Eigenschaften und der dermalen Einsatzfähigkeit untersucht werden.

## **2.5 Flavonoide**

### **2.5.1 Vorkommen und biologische Eigenschaften**

Aufgrund ihrer großen Präsenz und ubiquitären Verbreitung im Pflanzenreich stellen die Flavonoide eine intensiv erforschte Verbindungsklasse dar. Sie besitzen ein C-15-Kohlenstoffskelett als Grundstruktur und können in unterschiedliche Subklassen (Flavanone, Flavone, Flavonole, Isoflavone usw.) eingeteilt werden. Bis heute wurden mehr als 4000 Verbindungen isoliert und identifiziert. Die enorme Heterogenität und strukturelle Variationsbreite wird durch den unterschiedlichen Oxidations- und Substitutionsgrad des Ringsystems hervorgerufen. (Middleton und Kandaswami, 1993). Meistens tragen die Verbindungen dieser Stoffgruppe polyphenolischen Charakter und kommen hauptsächlich als Glykoside in den unterschiedlichsten Pflanzenteilen vor. Als bioaktive Verbindungen besitzen Flavonoide ein breites biologisches und pharmakologisches Wirkungsspektrum (Havsteen, 1983). In verschiedenen Tier- und Zellmodellen konnten antikarzinogene Eigenschaften nachgewiesen werden (Carroll et al., 1998; Deschner et al., 1991; Piantelli et al., 1995). Daneben wurden antiallergische und antiinflammatorische Wirkungen (del Carmen Recio et al., 1995; Middleton und Kandaswami, 1992) aber auch hepatoprotektive, endokrine und antivirale Eigenschaften (Middleton und Kandaswami, 1993) beschrieben. Ein Großteil dieser Wirkungen wird durch die Beeinflussung verschiedenster Enzymsysteme hervorgerufen (Hoult et al., 1994; Middleton und Kandaswami, 1993). Weiterhin sind in diesem Zusammenhang die antioxidativen Eigenschaften bedeutsam. Flavonoide können mit unterschiedlichen reaktiven Sauerstoffspezies interagieren, wie z. B. dem Superoxidradikal (Darmon et al., 1990; Robak und Gryglewski, 1988), dem Hydroxylradikal (Rekka und Kourounakis, 1991) oder dem Stickstoffmonoxidradikal (van Acker et al., 1995).

Ferner wurden in einer Arbeit von Facino et al., 1995 protektive Effekte gegenüber einem Radikalbedingten oxidativen Abbau von Kollagen gezeigt, und die mögliche topische Anwendung eines Extraktes verschiedener Echinacea Spezies in der Prävention photooxidativer Hautschäden diskutiert. In ihrer Funktion als Radikalfänger besitzen die Flavonoide ebenfalls günstige Wirkungen gegenüber einer Lipidperoxidation in Biomembranen (Terao et al., 1994; Ioku et al., 1995; Terao

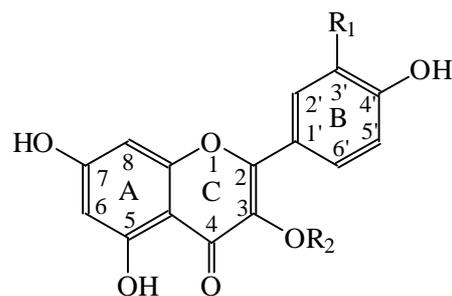
und Piskula, 1998), wobei ungesättigte Fettsäuren vor einem peroxidativ- oder Singulett-sauerstoff-initiiertem Abbau effektiv geschützt wurden (Elstner, 1990).

## 2.5.2 Strukturvoraussetzungen für die antioxidative Wirksamkeit

Die antioxidative Wirksamkeit der Flavonoide zeigt eine deutliche Abhängigkeit von der molekularen Struktur. Als ein wesentlicher Faktor ist dabei die Anzahl und die Lokalisation der Hydroxylgruppen am aromatischen Ringsystem anzusehen (Elstner 1990; Chen et al., 1996). Verschiedene Studien beschäftigten sich intensiv mit den notwendigen molekularen Voraussetzungen (Bors et al., 1990; Hu et al., 1995; van Acker et al., 1998; Rice-Evans und Miller, 1998).

Laut Bors et al., 1990 sind für eine effiziente Wirkung als Radikalfänger bzw. für ein hohes antioxidatives Potential drei wichtige Strukturen im Molekül verantwortlich. Dazu gehört beispielsweise die o-Dihydroxystruktur (Catechol) im Ring B, die eine höhere Stabilität des gebildeten Radikals bedingt und deutlich an der Elektronendelokalisation beteiligt ist. Weiterhin zählt zu den wichtigen Strukturmerkmalen die Doppelbindung zwischen C-2 und C-3 im Ring C, die in Konjugation zur 4-oxo-Gruppe treten kann. Dies ist ebenfalls für eine Elektronendelokalisation wichtig. Ein optimales Radikalfängerpotential wird daneben durch zusätzliche freie Hydroxylgruppen an C-3 und C-5 erreicht. Neben den aufgeführten strukturellen Voraussetzungen spielen auch noch die chelatisierenden Eigenschaften für Metallionen, wie z. B. Eisen, eine wesentliche Rolle in der Inhibierung Metallionen-katalysierter Radikalbildungsprozesse (Morel et al., 1994 und 1998).

Die in dieser Arbeit eingesetzten Flavonoide (Flavonole) besitzen zum Teil die angeführten wichtigen Strukturvoraussetzungen für eine antioxidative Wirksamkeit. Die chemischen Strukturformeln sind in der Abbildung 2 dargestellt.



	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>
Quercetin	- OH	- H
Kämpferol	- H	- H
Isorhamnetin	- OCH <sub>3</sub>	- H
Rutin	- OH	- D-Glucose-L-Rhamnose

Abb. 2: Chemische Strukturen der eingesetzten Flavonole

## 2.6 Melatonin

### 2.6.1 Biosynthese und physiologische Bedeutung

Bereits im Jahre 1958 wurde Melatonin als Hauptsekretionsprodukt der Epiphyse (Glandula pinealis = Zirbeldrüse) vom Dermatologen Aaron Lerner und seinen Mitarbeitern isoliert (Lerner et al., 1958). Der Name Melatonin leitet sich dabei aus dem Griechischen von melas (= dunkel) und tonein (= unterdrücken) ab und spiegelt die Fähigkeit dieser Substanz wieder, auf Amphibienhaut in sehr niedrigen Dosierungen aufhellend zu wirken (Liebmann et al., 1997). Die chemische Struktur dieser Verbindung (Abb. 3) wurde 1959 von der gleichen Arbeitsgruppe als N-Acetyl-5-methoxytryptamin charakterisiert und beschrieben (Lerner et al., 1959).

Nach der Wiederentdeckung von Melatonin als vielgepriesenes “Wundermittel” werden die verschiedensten Wirkungen und Bedeutungen der Epiphyse diskutiert und untersucht.

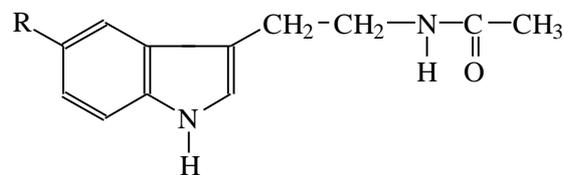


Abb. 3: Chemische Struktur von Melatonin (R = OCH<sub>3</sub>) und N-Acetylserotonin (R = OH)

Synthetisiert wird Melatonin hauptsächlich in den Pinealozyten der Epiphyse. Daneben sind noch andere Gewebe und Zellsysteme zur Melatoninbildung befähigt, wie z. B. die enterochromaffinen Zellen im Darm (Heuther et al., 1994) und die peripheren mononukleären Blutzellen (Finocchiaro et al., 1991). Ausgangspunkt der Melatonsynthese in den Pinealozyten ist die biogene Aminosäure L-Tryptophan. Über Serotonin (5-Hydroxytryptamin) als Zwischenstufe wird durch Vermittlung des Enzyms N-Acetyltransferase (NAT) die Substanz N-Acetylserotonin (N-Acetyl-5-hydroxytryptamin; Abb. 3) gebildet. Diese wird durch das zytosolische Enzym Hydroxyindol-O-Methyltransferase (HIOMT) zum lipophilen Indolderivat Melatonin umgewandelt (Kohen et al., 1995). Die nächtliche Sekretion des Neurohormons Melatonin durch die Zirbeldrüse in den Blutkreislauf unterliegt einer komplexen Steuerung und folgt einem Tagesrhythmus (zirkadianer Rhythmus), der durch die biologische Uhr in den suprachiasmatischen Kernen des Hypothalamus geregelt wird (Wirz-Justice, 1996). Die Produktion und apulsatile Sekretion wird dabei durch die Aktivität des Enzyms NAT gesteuert. In der Leber erfolgt die Metabolisierung zum Hauptmetaboliten 6-Hydroxymelatoninsulfat, der über den Harn ausgeschieden wird und als Parameter für das Ausmaß der Melatoninsekretion herangezogen werden kann (Langer et al., 1997).

Neben der Bildung der verschiedenen 6-Hydroxymelatoninkonjugate konnten Young et al., 1985 zeigen, daß Melatonin zu einem geringen Prozentsatz infolge einer Demethylierung in seine eigene Vorstufe, dem N-Acetylserotonin, umgewandelt wird.

Über die physiologische Bedeutung von Melatonin beim Menschen existieren die verschiedensten Thesen. So soll dieses Hormon beispielsweise die Sexualentwicklung steuern, anti-Tumoreffekte besitzen und an immunregulatorischen Prozessen beteiligt sein (Liebmann et al., 1997).

Gesichert ist neben diesen meist hypothetischen Annahmen, daß Melatonin in vorwiegend pharmakologischen bzw. supraphysiologischen Dosen eine sedierend-anxiolytische Wirkung besitzt (Zhdanova et al., 1995). Daneben geht man bis zum heutigen Zeitpunkt von einer guten Verträglichkeit nach exogener Melatoninzufuhr aus, da weder nennenswerte Nebenwirkungen oder toxische Schäden beschrieben wurden (Langer et al., 1997).

## 2.6.2 Antioxidative Eigenschaften

Neben der möglichen Regulation verschiedener neuroendokriner und physiologischer Prozesse, einer eventuellen Onkoprävention, einer Reduzierung Jet-lag bedingter Störungen und der viel diskutierten Auswirkung auf den Alterungsprozeß wurden in der Vergangenheit immer wieder die ausgezeichneten Radikalfängereigenschaften von Melatonin und die antioxidative Wirkung hervorgehoben. Verschiedene Übersichtsarbeiten behandeln ausführlich diesen Sachverhalt (Reiter 1995, 1996; Hardeland 1997; Reiter et al., 1997a; Reiter et al., 1997b).

Homologe des Melatonins zeigten im Mäusemodell (Blickenstaff et al., 1994) radioprotektive Eigenschaften. Daneben wird dem Melatonin die Fähigkeit zur Gastroprotektion infolge der Wirkung als Radikalfänger gegenüber reaktiven Sauerstoffspezies zugeschrieben (Konturek et al., 1997). Weiterhin soll die Expression antioxidativer Enzyme, wie z. B. der Superoxiddismutase (SOD), durch Einsatz von Melatonin gesteigert werden können (Antolin et al., 1996). Daneben wurde in der Literatur Melatonin als potenter Peroxylradikalfänger beschrieben, wobei die Effektivität über der von Vitamin E liegen soll (Pieri et al., 1994). Durch Untersuchungen von Tan et al., 1993 konnten unter Verwendung eines zellfreien in vitro Systems ausgeprägte Radikalfängereigenschaften gegenüber dem hochreaktiven Hydroxylradikal nachgewiesen werden. Neuere Arbeiten von Karbownik et al., 2000 belegen eine Protektion nukleärer DNA und von Lipiden in Lungen und der Milz von Ratten gegen einen oxidativen Schaden, der durch das Karzinogen  $\delta$ -Aminolävulinsäure hervorgerufen wurde. Ferner zeigen in vitro Daten, daß das Indolderivat Melatonin beispielsweise eine durch verschiedene Faktoren induzierte Lipidperoxidation in Zell- bzw. Gewebehomogenaten der Retina des Auges (Chen et al., 1995) und des Gehirns von Ratten (Melchiorri et al., 1996) wirksam inhibieren kann.

Aufgrund der hohen Lipophilie besitzt Melatonin die Fähigkeit, sich in die Lipidbilayer einzulagern bzw. leicht Zellmembranen und morphophysiologische Zellbarrieren zu durchdringen, und neben einer zytosolischen Verteilung auch intranukleär lokalisiert zu sein (Menendez-Pelaez und Reiter, 1993; Costa et al., 1995). Diese wichtige Substanzeigenschaft kommt der antioxidativen Wirksamkeit zugute. Für die antioxidative Wirkung wird die Indolstruktur des Moleküls verantwortlich gemacht. Der postulierte nicht-enzymatische Mechanismus der Radikalfängerwirkung ist in Abbildung 4 schematisch dargestellt.

Das Epiphysenhormon Melatonin kann mit verschiedenen Radikalspezies, z. B. dem Hydroxylradikal, unter Abgabe eines Elektrons reagieren. Dadurch erhält Melatonin selbst eine Radikalstruktur. Es wird ein Indolyl- bzw. Melatonylkationradikal gebildet, das sich durch eine geringere Reaktivität auszeichnet. Weiterhin besteht die Hypothese, daß dieses Kationradikal ein

Superoxidanionradikal katalytisch abfangen kann unter Bildung der nicht radikalischen Verbindung N<sup>1</sup>-Acetyl-N<sup>2</sup>-formyl-5-methoxykynuramin. Diese Substanz wird schließlich über den Urin ausgeschieden. Unbekannt ist bis heute, ob das gebildete Indolylkationradikal wieder zur Ausgangssubstanz Melatonin umgesetzt werden kann (Reiter, 1996; Reiter et al., 1997b).

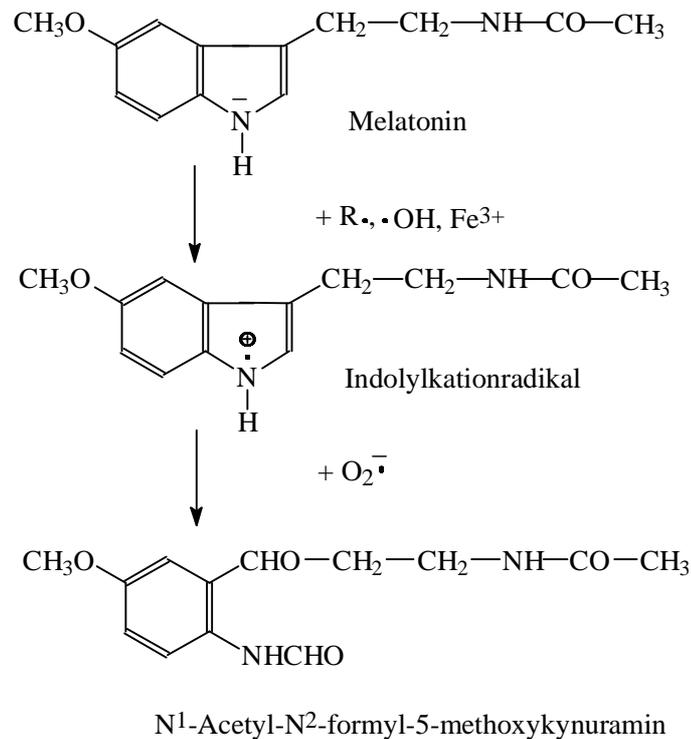


Abb. 4: Schematische Darstellung des postulierten Radikalfängermechanismus von Melatonin nach Reiter, 1996; Reiter et al., 1997b

### 2.6.3 Bedeutung und Relevanz für die Dermatologie

Die hochwirksame Verbindung Melatonin erweckte auch das dermatologische Interesse (Fischer et al., 1999). Neben einem möglichen Zusammenhang zwischen dem Serummelatoninspiegel und der Pathogenese verschiedener Systemerkrankungen, wie z. B. der koronaren Herzkrankheit (Brugger et al., 1995), scheint dieses neuroendokrine Hormon auch für die Hautphysiologie eine Rolle zu spielen. Die humane Haut kann bekanntermaßen funktionell durch verschiedene Hormone und Neuropeptide beeinflusst werden. Slominski et al., 1994 kommen zu dem Schluß, daß beispielsweise Säugetierhaut (Mausmodell) ein Zielorgan für die Melatoninbioregulation darstellt. Dabei konnten spezifische Bindungsstellen detektiert werden, die primär auf den epidermalen Keratinozyten und in der Haarwurzel des Haarfolikels lokalisiert sind.

Gaudet et al., 1993 wiesen zwei Isoenzyme der NAT in Hamsterhaut nach. Daneben demonstrierten Slominski et al., 1996 eine mögliche Biotransformation von <sup>3</sup>H-Serotonin durch kultivierte Hamsterhaut zu N-Acetylserotonin, Melatonin und 5-Methoxytryptamin. Aus diesen Unter-

suchungen an Hamsterhautkulturen wurde geschlossen, daß Säugetierhaut allgemein zu einer Acetylierung von Serotonin mit der Bildung von N-Acetylserotonin befähigt ist, und eine weitere Metabolisierung zum Melatonin und 5-Methoxytryptamin durch die Haut stattfindet. Weiterhin wird eine Wirkung auf die Melanogenese beschrieben, da die Tyrosinase als Schlüsselenzym dieses Prozesses durch Melatonin inhibiert werden kann. Ferner belegen verschiedene Arbeiten eine Bedeutung von Melatonin bei unterschiedlichen pathologischen Erkrankungszuständen des Hautorgans, wie z.B. bei der Psoriasis (Mozzanica et al., 1988) und beim atopischen Ekzem (Schwarz et al., 1988; Rupprecht et al., 1995). Daneben wurde die Effektivität und der Nutzen einer oralen Anwendung in der adjuvanten Therapie des metastasierenden malignen Melanoms untersucht (Gonzalez et al., 1991).

Inwieweit Melatonin für eine prophylaktische bzw. therapeutische Anwendung als topischer bzw. oraler Wirkstoff aufgrund dieser Befunde genutzt werden kann, ist noch nicht abzusehen. Wir richteten unser Hauptaugenmerk auf Melatonin, da in Arbeiten von Bangha et al., 1996 und 1997 und Dreher et al., 1998 eine UV-induzierte erythematöse Antwort der menschlichen Haut nach topischer Applikation und nachfolgender Bestrahlung supprimiert werden konnte. Als Mechanismus für diese beobachteten Schutzeffekte wurden vorwiegend die radikalfangenden Eigenschaften dieses Epiphysenhormons diskutiert.

### 3 Material und Methoden

#### 3.1 Verwendete Chemikalien und Lösungen

N-Acetylserotonin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf, Deutschland
Ammoniumeisen-(II)-sulfat	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Annexin-V-FLUOS	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland
Antibiotisch-antimykotischer Zusatz	Gibco Life Technologies GmbH, Eggenstein, Deutschland
Apo2.7-PE	Coulter-Immunotech-Diagnostics, Krefeld, Deutschland
n-Butanol	VEB Laborchemie Apolda, Deutschland
Calciumchlorid (CaCl <sub>2</sub> )	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Cell Proliferation ELISA, BrdU (colorimetric)	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland
Cytotoxicity Detection Kit (LDH)	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland
Decylhydroperoxid (C <sub>10</sub> H <sub>22</sub> O <sub>2</sub> )	synthetisiert am Institut für Pharmazeutische Chemie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
Dekon 90-Konzentrat	Zinsser Analytik GmbH, Frankfurt, Deutschland
Dihydrorhodamin 123	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
N,N-Dimethylformamid (DMF)	VEB Laborchemie Apolda, Deutschland
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck-Schuchardt, Hohenbrunn, Deutschland
Dinatriumhydrogenphosphat-2-hydrat	VEB Laborchemie Apolda, Deutschland
EDTA	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
Eosin gelblich	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen, Deutschland
Ethanol (absolut, zur Analyse)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Ethanol (ROTIPURAN <sup>®</sup> , p. a.)	Carl Roth GmbH + Co, Karlsruhe, Deutschland
Fetales Kälberserum (FKS)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen, Deutschland
Formaldehyd	VEB Laborchemie Apolda, Deutschland
Gentamycin	Gibco Life Technologies GmbH, Eggenstein, Deutschland
Dispase I	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland
Gentianaviolett (Kristallviolett)	Riedel-de Häen AG, Seelze, Deutschland
Glucose wasserfrei	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Hämalaun nach MAYER	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
HBSS (Hanks' Balanced Salts)	Gibco Life Technologies GmbH, Eggenstein, Deutschland
Hydrophile Salbe nach DAB 10	Klinikapothek der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

8-Hydroxychinolin p.a.	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Isorhamnetin (ROTICHRON HPLC)	Carl Roth GmbH + Co, Karlsruhe, Deutschland
Kämpferol (ROTICHRON HPLC)	Carl Roth GmbH + Co, Karlsruhe, Deutschland
Kaliumchlorid (KCl)	Serva Feinbiochemie, Heidelberg, Deutschland
Kaliumdihydrogenphosphat (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	VEB Laborchemie Apolda, Deutschland
Keratinocyte-SFM (inkl. rEGF und BPE)	Gibco Life Technologies GmbH, Eggenstein, Deutschland
Linolsäure	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen, Deutschland
Magnesiumchlorid (MgCl <sub>2</sub> )	VEB Laborchemie Apolda, Deutschland
Melatonin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf, Geschäftsbereich Fluka, Deisenhofen, Deutschland
[O-methyl- <sup>3</sup> H]-Melatonin (84 Ci/mmol)	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland
Methanol p.a.	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Methanol (HPLC rein)	Fisher Chemicals, Fisher Scientific UK Limited Loughborough, Leics., Großbritannien
Natriumborat	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Natriumchlorid (NaCl) reinst p.a.	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Natriumcitrat	VEB Laborchemie Apolda, Deutschland
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO <sub>3</sub> )	VEB Laborchemie Apolda, Deutschland
Natriumdihydrogenphosphat (NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Natriumhydroxid (NaOH)	Carl Roth GmbH + Co, Karlsruhe, Deutschland
Phenolrot	VEB Laborchemie Apolda, Deutschland
POPOP	Canberra-Packard GmbH, Dreieich, Deutschland
1,4-bis-2-(5-Phenyloxazolyl)-benzen	
PPO (2,5-Diphenyloxazol)	Canberra-Packard GmbH, Dreieich, Deutschland
Propidiumiodid	Calbiochem-Novabiochem GmbH, Bad Soden, Deutschland
Pufferlösungen zur pH-Meter-Eichung (pH 4, 7, 9)	Carl Roth GmbH + Co, Karlsruhe, Deutschland
Quercetin Dihydrat (ROTICHRON HPLC)	Carl Roth GmbH + Co, Karlsruhe, Deutschland
RNase (Ribonuclease)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen, Deutschland
Rutin Trihydrat (ROTICHRON HPLC)	Carl Roth GmbH + Co, Karlsruhe, Deutschland
Salzsäure (HCl)	VEB Laborchemie Apolda, Deutschland
Soluene <sup>®</sup> -350	Canberra-Packard GmbH, Dreieich, Deutschland
Tesafilm	Beiersdorf AG, Hamburg, Deutschland
Toluol zur Synthese	Merck-Schuchardt, Hohenbrunn, Deutschland
Triton <sup>®</sup> X-100	SERVA Feinbiochemie, Heidelberg, Deutschland
Trypsin/EDTA (0,05% / 0,02%)	Gibco Life Technologies GmbH, Eggenstein, Deutschland
Trypsininhibitor aus Sojabohnen	Gibco Life Technologies GmbH, Eggenstein, Deutschland

TWEEN® 20 (Polyethylensorbitanmonolaurat)	Serva Feinbiochemica, Heidelberg, Deutschland
Wasserstoffperoxid 30%	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Wollwachsalkoholsalbe nach DAB 10	Klinikapothek der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

### Lösungen:

PBS-Puffer (phosphate buffered saline)	8 g NaCl + 0,2 g KCl + 1,44 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> × 2 H <sub>2</sub> O + 0,2 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ad 1000 ml Aqua bidestillata; Einstellung mit 1N HCl oder 1N NaOH auf pH 7,4 bzw. 7,8
Puck-EDTA-Lösung	0,4 g KCl + 8,0 g NaCl + 0,35 g NaHCO <sub>3</sub> + 1,0 g D-Glucose + 5 mg Phenolrot + 0,255 g EDTA ad 1000 ml Aqua bidestillata
Tyrode-Eosin-Lösung	8 g NaCl + 0,2 g KCl + 0,2 g CaCl <sub>2</sub> + 0,1 g MgCl <sub>2</sub> + 0,05 g NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> + 1 g NaHCO <sub>3</sub> + 1 g Glucose ad 1000 ml Aqua bidestillata + 0,625 g Eosin Y
Szintillator	PPO 4,0 g POPOP 0,1 g ad 1000 ml Toluol und bis zur vollständigen Auflösung (2-3 h) kräftig schütteln

### 3.2 Geräte und Hilfsmittel

Absorptionsreader (MTP-Photometer)	Labsystems iEMS Reader MF, Helsinki, Finnland
Software zum Absorptionsreader	Sero Calc Vers. 4.0
Analysenwaage	Typ MC5-OCE, Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
Bildanalysesystem mit Durchlichtmikroskop	Cydok, Carl H. Hilgers, Königswinter, Deutschland
Biopsiestanzen	Zetopan, Reichert AG Wien, Österreich
Brutschrank	Stiefel Laboratorium GmbH, Offenbach, Deutschland
	Vitromat Mytron, Typ sbs-11, Heiligenstadt, Deutschland
	INCO 2 Memmert GmbH + Co. KG, Schwabach, Deutschland
Cell-Harvester und Vakuum-Controller	INOTECH, ICH-110, Wohlen, Schweiz
Dünnschichtchromatographieplatten (Kieselgel 60 F <sub>254</sub> )	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland

Durchflußzytometer (FACScan)	Becton Dickinson, San Jose, USA
Software zum Durchflußzytometer	PASCAL 3.22 (Systemsoftware) Lysis II Vers. 1.1 CellFit-Software Vers. 2.01.2
Eppendorf-Reaktionsgefäße	Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg, Deutschland
Eppendorf-Zentrifuge	EC 5402, Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg, Deutschland
Falcon-Tubes	Becton Dickinson, San Jose, USA
Flüssigkeitsszintillationszähler (WINSPECTRAL 1414 Liquid Scintillation Counter)	WALLAC-ADL-GmbH, Freiburg, Deutschland
Fluoreszenzreader (MTP-Reader)	Fluoroskan Ascent, Labsystems, Helsinki, Finnland
Software zum Fluoreszenzreader	Ascent Research Edition Vers. 1.2.1.
Franz-Diffusionszelle	Crown Glass Company, Sommerville, New Jersey, USA
mit Wasserbad	Thermostat B3-DC1, Haake, Karlsruhe, Deutschland
Fuchs-Rosenthal-Zählkammer	Faust GmbH, Halle, Deutschland
Füllspatel	VEB Dentalfabrik Treffurt, Deutschland
Gefriermikrotom	Mikrotom-Modell 1206, Frigomobil Reichert-Jung, Heidelberg-Nußloch, Deutschland
Gewebekulturflaschen und –schalen	Greiner GmbH, Frickenhausen, Deutschland
HaCaT-Keratinocyten	Deutsches Krebsforschungsinstitut Heidelberg, Deutschland
HPLC-MS-Anlage	Waters 600 E, Waters GmbH, Eschborn, Deutschland
HPLC-MS-Säule	Nucleosil 120, Macherey-Nagel, Düren, Deutschland
Kapillarelektrophoresesystem und Auswertesoftware	Dionex, Model CES-1, Dionex Corp., Sunnyvale, USA Borwin Version 1.21.60
Laminarbox	HS 12, Heraeus Instruments, Hanau, Deutschland
Magnetrührer	MLW Rührgerätewerk Medingen, Freital, Typ R3T Variomag <sup>®</sup> Elektronikrührer Poly 15, Laborbedarf K. J. Werner GmbH, Leipzig, Deutschland
Mikroliterspritze	VEB Werk für Technisches Glas, Ilmenau, Deutschland
Mikroskope	Telaval 3, Carl Zeiss Jena, Deutschland Olympus CK 2, Tokyo, Japan
96er Mikrotiterplatten (MTP)	Greiner Labortechnik GmbH, Frickenhausen, Deutschland
pH-Meter (Digital pH-Meter pH 525)	Wissenschaftlich-Technische Werkstätten GmbH, Weilheim, Deutschland
Pipetten	Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg, Deutschland
Präzisionswaagen	Typ 870-13, G. Kern & Sohn, Albstadt, Deutschland UMC 5, Sartorius AG Göttingen, Deutschland

Quarzkapillare (45 cm, i.d. 75 $\mu$ M)	Supelco Park, Bellefonte, USA
Quarzplatten (8 $\times$ 8 cm)	QVF Labortechnik GmbH, Ilmenau
Schüttelgeräte	Thys 2, MLW Labortechnik Ilmenau, Deutschland Heidolph unimax 2010, Deutschland
Sterilfilter	Sartorius Minisart steril, 600kPa max., 0,22 $\mu$ m
Szintillationsmeßgefäße	Pico Glass Vial, Pony Vial, Econo Glass Vial, Canberra-Packard GmbH, Dreieich, Deutschland
Ultraschallbad	Sonorex Super RK 102 H, Bandlin Elektronik, Berlin, Deutschland
UV-Bestrahlungskammer I	mit R-11-Sensoren UVA/UVB, mit UVAMAT zur UV-Dosissteuerung, vier UVA- und vier UVB-Röhren; Dr. Gröbel UV-Elektronik GmbH, Ettlingen, Deutschland
UVA-Röhren (Hauptemissionsbereich 320-480 nm, Peak 370 nm)	Philips TL-DK 30W/05, Philips Licht, Hamburg, Deutschland
UVB-Röhren (Hauptemissionsbereich 280-320 nm, Peak 309 nm)	Sankyo Denki UVB lamp F15 T8 15 W Sankyo Co, Tokio, Japan
UV-Bestrahlungskammer II	gefertigt am Fachbereich Pharmazie, MLU-Halle- Wittenberg, Halle/S., Deutschland
UVA-Röhren	Philips CLEO Performance R (305-420 nm), Veith Import-Export, Westerau, Deutschland
UVB-Röhren	UVB-Leuchtstofflampen TL (280-350 nm), Veith Import-Export, Westerau, Deutschland
UV-Sensoren	Kühnast Strahlungstechnik, Wächtersbach, Deutschland
UV-Vis-Spektrophotometer	UV mini 1240, Shimadzu Corp., Japan
Vortex genie 2	Scientific Industries, USA
Wasserbad	Thermostad B3-DC 1, Haake, Karlsruhe, Deutschland
Zellsieb	70 $\mu$ m, Becton Dickinson, NJ, USA
Zentrifuge mit Rotor für 96er MTP	MLW T54, Medizintechnik Leipzig, Deutschland
Zentrifugen	Biofuge Primo, Heraeus Instruments, Gera, Deutschland Hettich Mikroliter, Tuttlingen, Deutschland

### 3.3 Zellkultur

#### 3.3.1 HaCaT-Keratinocyten

Für den Hauptteil der Untersuchungen an der Zellkultur wurden HaCaT-Keratinocyten als epidermales in vitro-Keratinocytenmodell verwendet. Die Bezeichnung HaCaT steht dabei für "Human Adult Low Calcium High Temperature Keratinocytes". Es handelt sich hierbei um eine phänotypisch spontan transformierte epitheliale, aber nicht tumorigene, humane permanente Zelllinie, die von der Arbeitsgruppe Fusenig et al. am Deutschen Krebsforschungszentrum in Heidelberg aus

der Peripherie eines primären malignen Melanoms von der oberen Rückenhaut eines 62jährigen Patienten isoliert und etabliert wurde. Als vorteilhaft ist die hohe Immortalität (>140 Passagen), die hohe genetische Stabilität und die weitgehend erhaltene epidermale Differenzierungskapazität mit der Expression differenzierungsspezifischer Markerproteine (Involucrin, Filaggrin) zu bewerten, die die HaCaT-Zellen für Studien zum Proliferations- und Differenzierungsverhaltens und verschiedener Regulationsmechanismen prädestinieren (Boukamp et al., 1988).

### **3.3.2 Normale humane epidermale Keratinozyten (NHEK)**

Einzelne ausgewählte Zellversuche wurden mit normalen humanen epidermalen Keratinozyten (NHEK) durchgeführt. Die Verwendung größerer Zellansätze erfuhr durch die begrenzte Subkultivierbarkeit und Lebensfähigkeit gepaart mit einer vergleichsweise niedrigen Wachstumsrate und hohen Generationszeit eine Einschränkung. Trotz limitierter Lebensfähigkeit und Passagierfähigkeit einer solchen Kultur spiegelt sie dennoch in vivo Verhältnisse besser wieder und liefert zusammen mit den Ergebnissen der HaCaT-Kultur größere Vergleichs- und Interpretationsmöglichkeiten. Um spenderspezifische Unterschiede und interindividuelle Schwankungen möglichst gering zu halten, wurden die Keratinozyten aus juvenilem Gewebe gewonnen.

#### **3.3.2.1 Isolierung der normalen humanen epidermalen Keratinozyten (NHEK)**

Zur Anlegung einer Primärkultur wurde neonatales Vorhautgewebe verwendet. Etwa 5 cm<sup>2</sup> große Hautstücke lagen nach der Operation im Transportmedium (25 µg Gentamycin in 5 ml SFM) vor. Das subkutane Fettgewebe wurde mechanisch entfernt, die Haut in 5 × 5 mm große Stücke geschnitten und über Nacht bei 4°C im Kühlschrank in einer sterilen Dispaselösung (1 U/ml in PBS) belassen.

Vor der weiteren Präparation erfolgte eine spezielle Vorbehandlung der Kulturflaschen, um eine bessere Anheftung der Zellen am Kulturboden zu erreichen. Dazu wurden die Kulturgefäße mit 5 ml sterilem fetalem Kälberserum (FKS, 20%) in HBSS unter Schwenken bei Raumtemperatur beschichtet, die überschüssige Lösung abgegossen und nachfolgend einmal mit sterilem PBS (pH = 7,4) gespült, bevor die Kulturflaschen mit dem Kulturmedium im Brutschrank bei 37°C temperiert wurden. Die Hautstücke wurden aus der Dispaselösung genommen, die Epidermis vom dermalen Gewebe mit Hilfe einer Pinzette getrennt und die auf diese Weise gewonnenen Epidermisanteile in ein Gefäß mit 25 µg Gentamycin in 5 ml PBS überführt. Im Anschluß daran erfolgte die Inkubation der Epidermissegmente mit 5 ml 0,025% Trypsin/EDTA in PBS bei 37°C für maximal 4 min unter Schütteln. Daran schloß sich die Filtration der erhaltenen Zellsuspension durch ein Zellsieb mit einer Porengröße von 70 µm an. Zur Inaktivierung der Trypsinaktivität wurde ein Trypsininhibitor aus Sojabohnen (5 ml) zugesetzt, so daß eine Endkonzentration von 10 mg/ml erreicht wurde. Nach einer Zentrifugation (5 min) bei 1250 U/min wurde der Überstand verworfen, das Zellpellet vorsichtig mit Hilfe einer Eppendorf-Pipette resuspendiert und ca. 2 Millionen Zellen in eine vorbehandelte Kulturflasche gegeben (20 ml). Nach einem Tag Wachstum erfolgte die Entfernung von abgestorbenen, nicht angewachsenen Zellen durch einen Mediumwechsel und die unter 3.3.3 beschriebene Weiterkultivierung und Passagierung. Für die Zellversuche kamen nur gut wachsende fibroblasten- und melanozytenfreie Ansätze zur Anwendung.

### 3.3.3 Kulturbedingungen, Subkultivierung und Passagierung der Keratinozyten

Die Kultivierung der epidermalen Zellen erfolgte in einem speziellen serumfreien Keratinozytenmedium (SFM) mit 25 µg/ml Rinderhypophysenextrakt, 0,1 – 0,2 ng/ml humanen epidermalen rekombinanten Wachstumsfaktor (rEGF) als standardisierte Mediumzusätze und einem antibiotisch-antimykotischen Zusatz (0,25 µg/ml Amphotericin B, 100 IU/ml Penicillin G, 100 mg/ml Streptomycin).

Die Calciumionenkonzentration hatte mit 0,09 mM niedrigen Calcium-Status. In Abhängigkeit von der Calciumionenkonzentration im Kulturmedium kann eine Keratinozytenzellkultur zur Proliferation oder Differenzierung angeregt werden (Boyce und Ham, 1983). Hohe Calciumionenkonzentrationen im physiologischen Bereich (> 1,0 mM) führen dabei zu einer terminalen Differenzierung und Stratifizierung, wohingegen niedrige, in unseren Versuchen verwendete Konzentrationen (< 0,1 mM) die Bildung einer adhärenen Einzelschicht (Monolayer) proliferierender Keratinozyten begünstigen, und für Studien zur Untersuchung des Zellwachstums unter Substanzeinfluß besonders gut geeignet sind (Ponec et al., 1989; Ponec et al., 1990).

Zur Subkultivierung wurde das Kulturmedium nach etwa 7 Tagen entfernt und die adhärenen Keratinozyten mit PUCK/EDTA gespült. Danach erfolgte die Zugabe einer auf 37°C vorgewärmten 0,05%-igen Trypsin-EDTA-Lösung und eine Inkubation von ca. 10 min im Brutschrank unter gelegentlichem Schütteln. Um eine Beeinflussung der Keratinozytenlebensfähigkeit zu verhindern, wurden längere Einwirkzeiten vermieden (Lindl, 2000). Die erhaltene Zellsuspension wurde mit einer Eppendorf-Pipette abgezogen und in ein steriles Zentrifugenglas gegeben. Zur Inaktivierung der proteolytischen Trypsinaktivität wurde das Kulturgefäß mit 1 – 2 ml Medium gespült und mit der Zellsuspension verreinigt. Für die Zellanzahlbestimmung wurde das Volumen der Suspension ermittelt, 100 µl der Suspension zu 400 µl Thyrode-Eosinlösung (Vitalfärbung) gegeben (Verdünnung 1:5), durchmischt, in eine Fuchs-Rosenthal-Kammer gefüllt, die lebenden Keratinozyten in fünf Gruppenquadraten unter einem Lichtmikroskop ausgezählt, addiert und die Gesamtzellanzahl unter Einbeziehung des Kammerinhaltes ( $\times 1000$ ), des Verdünnungsfaktors und des vorher bestimmten Suspensionsvolumens berechnet.

Im Anschluß daran erfolgte die Zentrifugation der Zellsuspension bei 1500 U/min für 5 min mit anschließendem Abgießen des Überstandes. Die Zellsuspension wurde mit einer entsprechenden Menge an Kulturmedium ergänzt, um eine Konzentration von 1 Million Zellen in 1 ml zu erhalten. Entsprechend den experimentellen Erfordernissen schloß sich die Einsaat der Zellen in 96er MTP in einer Anfangszellichte von 5000 Zellen/200 µl in jedes well oder in Kulturschalen verschiedener Größe (0,3 Millionen Zellen/5 ml; 21 cm<sup>2</sup> bzw. 0,2 Millionen Zellen/2 ml; 8,7 cm<sup>2</sup>) an oder diente der weiteren Passagierung in Kulturflaschen (1 Million Zellen/20 ml).

Die Kultivierung erfolgte bei 36 - 37°C, einer Luftfeuchtigkeit von 90% und in 5%-iger CO<sub>2</sub>-Atmosphäre. HaCaT-Zellen der 24. - 50. Passage und NHEK der 2. Passage wurden für die durchgeführten Zellversuche genutzt.

### **3.4 Herstellung der eingesetzten Wirkstofflösungen und durchgeführte Inkubationsschemen**

Für alle verwendeten Wirkstoffe mußte ein geeignetes Lösungsmittel als Lösungsvermittler eingesetzt werden, wobei auf Verträglichkeit in der Zellkultur geachtet wurde. Stammlösungen von Melatonin sowie N-Acetylserotonin wurden mit absolutem Ethanol hergestellt und mit sterilem PBS bzw. einem Ethanol-PBS-Gemisch (2,2 Vol.-%) zur Bereitung einer entsprechenden Konzentrationsreihe verdünnt. Die Konzentration an Ethanol in der Zellkultur betrug 0,2 Vol.-%. Aufgrund der Oxidations- und Lichtempfindlichkeit wurde Melatonin unter Argon aufbewahrt und die hergestellten Gebrauchslösungen bis zu Versuchsbeginn lichtgeschützt gelagert.

Die verschiedenen Flavonoide (Quercetin, Kämpferol, Rutin) wurden in DMSO gelöst, mit PBS (pH = 7,8) bzw. mit DMSO-PBS (pH = 7,8; 1,1 Vol.-%) zur Herstellung einer Konzentrationsreihe verdünnt. Die Endkonzentration an DMSO lag im Kulturmedium bei 0,1 Vol.-%. Um eventuelle Instabilitäten der wäßrigen Lösungen und damit einen Wirkungsverlust auszuschließen, erfolgte vor jedem Versuch die Herstellung frischer Lösungen.

### **3.5 Noxenexposition der Zellkultur**

Die Schädigung der Keratinozyten erfolgte auf unterschiedliche Weise. Als physikalische Noxe wurde UV-A und UV-B Strahlung und als chemische Noxen Decylhydroperoxid, Wasserstoffperoxid und das System Ammoniumeisen-(II)-sulfat/8-Hydroxychinolin zur Erzeugung einer Fe<sup>2+</sup>-induzierten Toxizität verwendet. Der genaue Ablauf der jeweiligen Noxenexposition wird in den folgenden Ausführungen und den jeweiligen Ergebniskapiteln näher beschrieben.

#### **3.5.1 UV-A und UV-B Bestrahlung**

Vor jeder Bestrahlung wurde das Kulturmedium von den Zellen entfernt und durch steriles, auf 37°C temperiertes PBS (pH = 7,4) ersetzt, um eventuelle undefinierte, das Ergebnis überlagernde Reaktionen mit Mediumbestandteilen auszuschließen, wie z. B. UV-Absorptionen und Bildung radikalischer Reaktionsprodukte, und eine bessere Interpretation der Ergebnisse zu ermöglichen. Die Bestrahlung erfolgte in einer speziellen Bestrahlungskammer, die eine selektive Exposition mit UV-A oder UV-B Licht und gleichzeitig eine genaue Dosiserfassung ermöglichte.

Die unbestrahlten Kontrollen in den 96er MTP wurden während des Bestrahlungsvorganges durch eine Aluminiumfolie geschützt. Die unbestrahlten Kontrollen in den Kulturschälchen verblieben lichtgeschützt unter der Laminarbox. Nach jeder UV-Exposition erfolgte die Entfernung des PBS mit anschließender Zugabe von frischem, temperiertem SFM und eine entsprechende Weiterkultivierung (vgl. Ergebnisteil).

#### **3.5.2 Decylhydroperoxid**

Zur Herstellung entsprechend konzentrierter Decylhydroperoxidlösungen (DHP) wurde Ethanol als Lösungsvermittler verwendet und die erhaltene Stammlösung mit sterilem PBS (pH = 7,4) bzw.

einem Ethanol-PBS-Gemisch (5,5 Vol.-%) verdünnt. Nach einer 30minütigen Vorinkubation der HaCaT-Zellen mit Melatonin erfolgte die Zugabe der DHP-Lösungen (Mediumkonzentration 125  $\mu$ M und 250  $\mu$ M) für 30 min. Danach schloß sich ein Waschschrift mit PBS und ein Mediumwechsel an. Nach 24stündiger Weiterkultivierung wurde die DNA-Syntheserate und die Lebendzellanzahl bestimmt. Die Ethanolkonzentration in der Zellkultur lag bei 0,5 Vol.-%.

### 3.5.3 Wasserstoffperoxid

Die Herstellung der gewünschten Konzentration an Wasserstoffperoxid erfolgte durch Verdünnen mit sterilem PBS. Das Kulturmedium wurde nach Vorbehandlung mit dem jeweiligen Antioxidanz (vgl. Ergebnisteil) von den Keratinozyten entfernt und die Zellen mit sterilem, temperiertem PBS gewaschen. Danach schloß sich eine zeitabhängige Wasserstoffperoxidinkubation mit oder ohne gleichzeitiger Wirkstoffsupplementierung an. Nach dem Waschen der Keratinozyten mit PBS und der Zugabe von frischem SFM erfolgte die Weiterkultivierung für 24 h.

### 3.5.4 Ammoniumeisen-(II)-sulfat/8-Hydroxychinolin

Zur Untersuchung des Einflußverhaltens von  $\text{Fe}^{2+}$  auf das epidermale Zellsystem wurden Ammoniumeisen-(II)-sulfat und 8-Hydroxychinolin in sterilem SFM gelöst und vor der Zugabe zum Kulturmedium im Verhältnis 1:1 gemischt. Die Endkonzentration betrug jeweils 50  $\mu$ M. Der Zusatz von 8-Hydroxychinolin und die daraus resultierende Komplexbildung sollte eine leichtere Aufnahme in die Zellen bewirken.

## 3.6 Charakterisierung des Proliferationsverhaltens und der Zytotoxizität

Die Abschätzung der Keratinozytenverträglichkeit der eingesetzten Substanzen und die Beurteilung des zytoprotektiven Potentials gegen verschiedene exogene schädigende Faktoren geschah durch Bestimmung der DNA-Syntheseleistung und der Zellanzahl bzw. der vitalen Zellen nach sinnvollen Inkubations- und Weiterkultivierungszeiten.

### 3.6.1 Bestimmung der DNA-Syntheseleistung

Die Bestimmung der DNA-Syntheserate als Maß für das proliferative Potential der Zellpopulation nach Einfluß verschiedener exogener Noxen erfolgte durch Einbau und Nachweis des nichtradioaktiven Basenanalogen 5-Brom-2'-desoxyuridin (BrdU) anstelle von Thymidin während der Synthesephase des Zellzyklusses (Porstmann et al., 1985; Magaud et al., 1988). Dazu wurden die Keratinozyten in 96er MTP nach vorangegangener Behandlung bzw. Schädigung mit einer BrdU-Lösung (20  $\mu$ l/2ml SFM; 20  $\mu$ l/well) für 2 h im Brutschrank inkubiert. Nach diesem Labeln der Zellen mit BrdU und Entfernen des Kulturmediums erfolgte die Fixierung und Permeabilisierung durch Zugabe von 200  $\mu$ l FixDenat für 30 min bei RT. Nachfolgend schloß sich eine Inkubation (90 min) mit einem Peroxidase-markierten anti-BrdU-AK (6,5  $\mu$ l Antikörperlösung/1 ml Antikörperverdünnungslösung; 100  $\mu$ l/well) an. Vor der Zugabe der Substratlösung wurden die Zellen fünfmal mit einer Waschlösung laut dem Herstellerprotokoll zum Cell Proliferation ELISA, BrdU

(colorimetric) gewaschen, der Puffer sorgfältig entfernt und 100 µl der Substratlösung (3,3'-5,5'-Tetramethylbenzidin) zugegeben. In einer Enzym-Substrat-Reaktion erfolgte die Umsetzung des Substrates durch die Peroxidase zu einem blau gefärbten Reaktionsprodukt. Dieses wurde bei 370 nm gegen eine Referenzwellenlänge (492 nm) nach 14 min bei 25°C vermessen. Die unbehandelte Kontrolle diente als 100%-Wert.

### **3.6.2 Bestimmung der Lebendzellanzahl und Messung der Zellvitalität**

Bei den meisten durchgeführten Versuchen wurde parallel zur Bestimmung der DNA-Syntheserate als weiterer zweiter Parameter eine Bestimmung der Zellvitalität (Zytotoxizität) bzw. der Lebendzellanzahl durchgeführt.

#### **3.6.2.1 LDH-Test**

Es wurde die Lactatdehydrogenaseaktivität nach Lyse lebender intakter adhärenter Zellen als Maß für die Lebendzellanzahl bestimmt. Nach entsprechender Vorinkubationszeit erfolgte das Entfernen des Kulturmediums von den 96er MTP, die Lysierung der Zellmembran durch Zugabe einer 1%-igen (m/V) Triton<sup>®</sup>X-100-Lösung in SFM (200 µl/well) und eine zweistündige Inkubation im Brutschrank. An diesen Inkubationsschritt schloß sich eine Zentrifugation der 96er MTP bei 1700 U/min für 10 min an. Vom LDH-haltigen zellfreien Kulturüberstand wurden je 100 µl vorsichtig abgenommen und in eine neue 96er MTP überführt. Zur Bestimmung der LDH fand der Cytotoxicity Detection Kit (LDH) nach Angaben des Herstellers Anwendung. Zu 100 µl Kulturüberstand wurden 100 µl der frisch bereiteten Reagenslösung zugesetzt und die Absorption des gebildeten Reaktionsproduktes bei 492 nm nach 14 min (25°C) gegen eine Referenzwellenlänge von 620 nm vermessen.

#### **3.6.2.2 Zytotoxizitätstest (Vitalfärbung)**

Nachdem die Keratinozyten in 96er MTP in entsprechender Weise vorinkubiert oder geschädigt worden waren, erfolgte die Entfernung des Kulturmediums und die Fixierung bzw. Denaturierung der vitalen Zellen mit Methanol (200 µl/well) für 15 min bei RT. Danach wurden die Platten mehrmals mit Wasser gewaschen, bevor eine 0,1%-ige ethanolsche Gentianaviolettlösung (100 µl/well) zur Anfärbung der adhärenter Zellen (Proteinfärbung) zugegeben wurde, die dann für mindestens 15 min auf den Zellen verblieb. Nach drei weiteren Waschschritten mit Leitungswasser und der gründlichen Entfernung des Restwassers erfolgte die Zugabe einer 0,1 M Natriumcitratlösung in 50% Ethanol (100 µl/well) zum Lösen des Farbstoffes. Danach wurde die optische Dichte in einem Mikrotiterplattenphotometer bei einer Wellenlänge von 540 nm bestimmt (Flick und Gifford, 1984).

### **3.7 Bestimmung intrazellulärer Peroxide mittels Dihydrorhodamin 123 (DHR)**

Eine Stammlösung (5 mM) an Dihydrorhodamin 123 (DHR) wurde durch Auflösung in N,N-Dimethylformamid (DMF) erhalten und im Gefrierschrank lichtgeschützt gelagert. Vor jedem

Experiment erfolgte die Herstellung der DHR-Gebrauchslösung (55  $\mu\text{M}$ ) durch Verdünnen mit sterilem PBS (pH = 7,4).

Nach entsprechender Vorinkubation mit der zu untersuchenden Verbindung (Kap. 4.4) wurde 45 min vor der UV-Bestrahlung die DHR-Gebrauchslösung (20  $\mu\text{l}$ /well) zum Medium einer konfluenten Zellkultur in 96er MTP (5  $\mu\text{M}$  DHR-Mediumkonzentration) zugegeben, wobei die DMF-Konzentration in der Kultur 0,1 Vol.% betrug. Nachfolgend schloß sich ein zweimaliges Waschen der MTP-Platten mit sterilem PBS zur vollständigen Entfernung von zelloberflächlich gebundenem DHR an. Die nachfolgende UV-Exposition erfolgte entweder in PBS oder die Prüfsubstanz wurde erneut den Zellen zugegeben. Innerhalb von 15 min nach der jeweiligen Schädigung erfolgte die Vermessung des fluoreszierenden Reaktionsproduktes Rhodamin 123 in einem Fluoreszenzreader bei einer Excitationswellenlänge von 485 nm und einer Emissionswellenlänge von 538 nm. Die Durchführung dieses Testes geschah in Anlehnung an Peus et al., 1998 und 1999.

### **3.8 Flowzytometrische Bestimmung der Apoptose und des Zellzyklusphasenverteilungsmusters**

#### **3.8.1 Ablösen und Präparation des Probenmaterials**

Die Zellen in den vorbehandelten Kulturschalen wurden nach Entfernen des Mediums mit 1 – 2 ml PUCK/EDTA-Lösung gewaschen. Danach erfolgte der Zusatz von 1 ml einer 0,05%-igen Trypsin-EDTA-Lösung und eine Inkubation im Brutschrank für maximal 10 min. Zur Inaktivierung der Trypsinaktivität wurden 2 ml einer 2%-igen inaktivierten FKS/PBS-Lösung zugegeben, die Zellsuspension in Zentrifugenröhrchen gefüllt, die Kulturgefäße mit 4 ml PBS (pH = 7,4) gespült und die Zellen gezählt (3.3.3). Nachfolgend schloß sich eine 5minütige Zentrifugation bei 1500 U/min an. Nach dem Abgießen des Überstandes erfolgte die Einstellung einer Zellkonzentration von 1 Million Zellen in 1 ml PBS. Für die Bestimmung des Zellzyklusphasenverteilungsmusters oder der Apoptose wurden ca.  $0,5 \times 10^6$  Zellen in 0,5 ml PBS entnommen und der weiteren Präparation zugeführt.

#### **3.8.2 Untersuchung des apoptotischen Zelltodes**

Grundsätzlich kann ein Nachweis des programmierten Zelltodes (Apoptose) mit Hilfe verschiedener Meßparameter qualitativ und quantitativ in den verschiedenen Apoptosestadien erfolgen (Pepper et al., 1998). Für die vorliegenden Untersuchungen und Fragestellungen wurde zur Bestimmung früher Phasen der Apoptose die Translokalisierung von Phosphatidylserin an die Außenseite der Zytoplasmamembran und die Expression des Mitochondrienmembran-spezifischen Proteins Apo2.7 (Zhang et al., 1996) mittels Flowzytometrie detektiert.

##### **3.8.2.1 Bestimmung der Translokalisierung von Phosphatidylserin**

Als Marker für früh-apoptotische Prozesse wurde die Translokalisierung von Phosphatidylserin von der zytoplasmatischen zur extrazellulären Membranseite über die Bindung von FLUOS-markiertem

Annexin-V (Annexin-V-FLUOS-Kit) bestimmt (O'Brien et al., 1997). Nach jeweiliger Vorbehandlung und Exposition der Keratinozyten mit der entsprechenden exogenen Noxe wurden die Zellen geerntet ( $3.8.1$ ),  $0,5 \times 10^6$  Zellen/0,5 ml PBS in Falcon-Tubes gefüllt, 5 min bei 1300 U/min zentrifugiert und der Überstand dekantiert. Das Zellpellet wurde durch Zugabe von 100  $\mu$ l Markierungslösung (10  $\mu$ l Annexin-V-FLUOS Stammlösung, 10  $\mu$ l PI [50  $\mu$ g/ml], 500  $\mu$ l Inkubationspuffer) resuspendiert. Nach einer Inkubation (15 min) im Dunkeln erfolgte die Zugabe von 400  $\mu$ l Inkubationspuffer (10 mM Hepes, 140 mM NaCl, 5 mM CaCl<sub>2</sub>, mit NaOH auf pH = 7,4 eingestellt). Anschließend wurden die Proben der durchflußzytometrischen Messung zugeführt. Die simultane Zugabe des DNA-Farbstoffes PI diente dabei der Überprüfung der Membranintegrität. Da PI nur permeabilisierte Membranen nekrotischer oder spätapoptotischer Zellen passiert, konnte durch PI zwischen apoptotischen und spätapoptotisch/nekrotischen Zellen differenziert werden (Tab. 2). Als Ergebnis der flowzytometrischen Zweiparametermessung wurden charakteristische Dotplots erhalten, aus denen aufgrund der unterschiedlichen Fluoreszenzintensitäten der Einzelzellen eine prozentuale Zuordnung und Unterscheidung zwischen dem vitalen, apoptotischen oder spätapoptotisch/nekrotischen Anteil der Zellpopulation erfolgen konnte.

Tab.2: Differenzierung zwischen der vitalen, der apoptotischen und der spätapoptotisch/nekrotischen Zellpopulation durch Anfärbung mit Annexin-V-FLUOS und PI

	Annexin-V-FLUOS	PI
vitale Zellen	negativ	negativ
apoptotische Zellen	positiv	negativ
spätapoptotisch/nekrotische Zellen	positiv	positiv
Zellkerne	negativ	positiv

### 3.8.2.2 Bestimmung des Apoptose-spezifischen Mitochondrienmembranproteins

#### Apo2.7

Nach der Ablösung und Zentrifugation der behandelten Keratinozyten wurden  $0,5 \times 10^6$  Zellen in 0,5 ml PBS-B (PBS + 2% inaktiviertes FKS) aufgenommen, in Falcon-Tubes überführt, 5 min mit 1300 U/min zentrifugiert, der Überstand dekantiert und das Zellpellet aufgeklopft.

Um die Zellmembran für den Apo2.7-Antikörper durchlässig zu machen, erfolgte eine Permeabilisierung durch Inkubation mit 100  $\mu$ l PBS-T (PBS-B + 0,1% TWEEN<sup>®</sup>20) für 5 min bei Raumtemperatur. Danach wurde die Zellsuspension mit 1 ml PBS-B aufgefüllt, 5 min mit 1300 U/min zentrifugiert, der Überstand abgegossen und das Zellpellet aufgeklopft. Nachfolgend wurden 10  $\mu$ l des PE-markierten Apo2.7-Antikörpers zugegeben, für 30 min im Dunkeln auf den Zellen belassen und anschließend mit 2 ml PBS-B versetzt. Daran schloß sich eine Zentrifugation (5 min, 1300 U/min) an. Der Überstand wurde dekantiert und mit 0,5 ml PBS resuspendiert. Innerhalb von 1 h erfolgte die Vermessung der Proben am Flowzytometer, wobei die Proben bis zur Einzelmessung im Dunkeln aufbewahrt wurden. Als Ergebnis wurden charakteristische Histogramme

erhalten, aus denen die Apo2.7 positiven und die Apo2.7 negativen Zellen (Fluoreszenzmessung) nach Auswertung (Auswertesoftware) prozentual ersichtlich waren.

### 3.8.3 Untersuchung des Zellzyklusphasenverteilungsmusters

Die Anwendung der Flowzytometrie ermöglicht die Bestimmung des Zellzyklusphasenverteilungsmusters einer Zellpopulation aufgrund des DNA-Gehaltes der Einzelzellen und die Zuordnung zur  $G_0/G_1$ -, der S- oder der  $G_2/M$ -Phase. Mit diesem methodischen Ansatz kann eine Analyse verschiedener exogener Einflußfaktoren auf den Zellzyklus erfolgen.

Nach einer für die entsprechende Fragestellung gewählten Inkubationszeit und dem Ablösen der Keratinozyten (3.8.1) wurde unter Vortexen kaltes 80%-iges Ethanol (4,5 ml) zu den Zellen ( $0,5 \times 10^6$  in 0,5 ml PBS) hinzugefügt, über Nacht auf den Zellen belassen (Kühlschrank) und dann mit 1400 U/min für 4 min zentrifugiert. Danach schloß sich die Zugabe von 1 ml PBS + Tween<sup>®</sup>20 (0,5%) zum Zellpellet und eine Inkubation (15 min) an. Nach einer weiteren Zentrifugation (1400 U/min, 4 min) und dem Verwerfen des Überstandes erfolgte die Zugabe einer RNase-Lösung (350  $\mu$ l, 1 mg/ml in PBS) zur enzymatischen Verdauung zellulärer RNA. Im Anschluß daran wurde zur Anfärbung der Zellkerne eine Propidiumiodidlösung (400  $\mu$ l, 100  $\mu$ g/ml in PBS) zugefügt und für weitere 10 min bei 4°C im Dunkeln inkubiert. Dabei erfolgt eine Interkalation von PI in die DNA unter Ausbildung eines stöchiometrischen DNA-Propidiumiodid-Komplexes. Die Proben wurden der Messung am Flowzytometer zugeführt. Zellaggregate fanden keine Berücksichtigung. Die gemessenen Propidiumiodidfluoreszenzintensitäten der Einzelzellen gegen die Zellanzahl aufgetragen ergaben charakteristische DNA-Histogramme, in denen die prozentuale Zuordnung zur  $G_0/G_1$ -, S- und der  $G_2/M$ -Phase durch Anwendung der CellFit Software und durch Wahl eines geeigneten mathematischen Modelles getroffen werden konnte.

### 3.9 Bestimmung der UV-A induzierten Linolsäureperoxidation mittels Kapillaronenelektrophorese

Als instrumentell-analytische Trenntechnik zum Nachweis der UV-A induzierten Linolsäureperoxidation unter Einfluß von Melatonin und N-Acetylserotonin wurde die Kapillaronenelektrophorese (CZE) angewandt. Das Prinzip der elektrophoretischen Trennung beruht generell auf Mobilitätsdifferenzen geladener Teilchen in einem elektrischen Feld (Engelhardt et al., 1994).

Für die durchzuführenden Untersuchungen wurden jeweils 10 mM Stammlösungen von Melatonin und N-Acetylserotonin durch Lösen in absolutem Ethanol und anschließendem Verdünnen mit PBS (pH = 7,4) ohne NaCl (PB) frisch hergestellt. Der Ethanolgehalt in den Proben betrug 4 Vol.-%. Alle weiteren Konzentrationen (1 mM; 0,1 mM und 0,01 mM) wurden durch Verdünnen mit Ethanol/PB 4 Vol.-% erhalten. Die Herstellung einer 1,1 mM Linolsäurelösung erfolgte durch Lösen in PB und einer Homogenisierung für 5 min im Ultraschallbad zur Herstellung eines micellaren Systems. Nach jeder Entnahme schloß sich zur Verhinderung der Autoxidation von Linolsäure eine Begasung mit Argon an. Von der Linolsäurelösung wurden 9 ml und von der jeweiligen Melatonin- bzw. N-Acetylserotoninlösung 1 ml (Kontrollen 1 ml Ethanol/PBS 4 Vol.-%) in Planschliffgläser gefüllt. Bevor die Gefäße durch eine Quarzplatte abgedeckt einer dosisabhängigen UV-A Bestrahlung (7,5 und 15 J/cm<sup>2</sup>) bei RT zugeführt wurden, erfolgte die erste Probenentnahme (Leerwert: 0 J/cm<sup>2</sup>,

200 µl). Während des Bestrahlungsvorganges wurden die Proben permanent gerührt und nachfolgend direkt der kapillarzonenelektrophoretischen Trennung zugeführt. Die bei der UV-A induzierten Linolsäureperoxidation entstehende Hydroperoxyoctadecadiensäure (HPODE) konnte aufgrund eines konjugierten Doppelbindungssystems im Molekül UV-photometrisch bei 234 nm detektiert werden. Eine quantitative Auswertung erfolgte über die erhaltenen Peakflächen im Elektropherogramm. Als Positivkontrolle diente die UV-A abhängige Peroxidation der Linolsäure ohne Melatonin- bzw. N-Acetylserotoninsupplementierung. Diese wurde 100 % gesetzt und vergleichend dazu der dosisabhängige Einfluß beider Indolderivate betrachtet.

Aufgrund der hohen UV-Absorption von Melatonin und N-Acetylserotonin im UV-C Bereich konnten parallel zu den HPODE-Peaks die Melatonin und N-Acetylserotoninpeaks bei 234 nm detektiert und Aussagen zur Photostabilität dieser Substanzen getroffen werden.

Die einzelnen Untersuchungen wurden mit folgenden Wirkstoffkonzentrationen durchgeführt:

- Linolsäure 1 mM
- Melatonin 0,001 mM; 0,01 mM; 0,1 mM; 1 mM
- N-Acetylserotonin 0,001 mM; 0,01 mM; 0,1 mM; 1 mM

Trennbedingungen:

CE-Gerät:	Dionex, Model CES-1
Injektion:	hydrostatisch aus 20 cm Höhe 20 s lang
Temperatur:	konstant
Spannung:	25 kV
Kapillare:	aus amorphem Siliciumdioxid (Quarzkapillare) von Supelco
Innendurchmesser i.d.:	75 µm
Kapillarlänge:	45 cm
Länge bis zum Detektionsfenster:	40 cm
Grundelektrolytpuffer:	10 mM Natriumborat in Aqua bidest., pH 9
Detektion:	UV-Detektion bei 234 nm

### 3.10 Aufnahme der Absorptionsspektren

Melatonin und N-Acetylserotonin wurden in absolutem Ethanol gelöst und mit PBS (pH = 7,4) verdünnt. Der Ethanolgehalt lag bei 0,2 Vol.-%, um vergleichbare Bedingungen zu den Zellversuchen herzustellen. Die 1 und 0,1 mM Lösungen wurden in eine abdeckbare Quarzküvette gefüllt, das Absorptionsspektrum vor der Bestrahlung nach Durchführung einer Basiskorrektur gegen das Lösungsmittel PBS/Ethanol 0,2 Vol.-% aufgenommen, die Abdeckung auf den Quarzküvetten mit Tesafilm fixiert und die Küvetten in horizontaler Lage mit 100 J/cm<sup>2</sup> UV-B oder 12 J/cm<sup>2</sup> UV-A bestrahlt. Danach erfolgte erneut die Aufnahme eines Absorptionsspektrums im Bereich von 280 bis 800 nm.

### 3.11 Dünnschichtchromatographie

Zum qualitativen Nachweis und der Trennung der nach UV-A Bestrahlung entstandenen Photoprodukte wurden 1 bzw. 10 mM Lösungen von Melatonin bzw. N-Acetylserotonin in absolutem Methanol hergestellt, jeweils 4 ml in spezielle UV-durchlässige Quarzgefäße gefüllt, seitlich verschlossen und mit  $15 \text{ J/cm}^2$  UV-A unter ständigem Rühren bestrahlt. Im Anschluß daran erfolgte ein Konzentrieren der Lösungen und der Auftrag der unbestrahlten und bestrahlten Proben auf eine Kieselgelplatte F<sub>254</sub>, die dann in einer, mit Methanol/n-Butanol (60 + 40) gefüllten und gesättigten DC-Kammer entwickelt wurde. Die Auswertung erfolgte unter einer UV-Lampe bei 254 und 366 nm.

### 3.12 Bestimmung der Aufnahme von Melatonin in die HaCaT-Zellen

Am vierten Kultivierungstag der HaCaT-Zellen erfolgte die Zugabe des unmarkierten Melatonins zum Kulturmedium (Endkonzentrationen: 0,0001; 0,001; 0,01; 0,1 und 1 mM). Danach wurden 20  $\mu\text{l}$  der <sup>3</sup>H-Melatoninlösung (0,5  $\mu\text{Ci}$ ) zu jedem well (200  $\mu\text{l}$ ) zugegeben und die Platten für 2 bzw. 24 h im Brutschrank weiterkultiviert. Nach dieser Inkubationszeit wurde das Medium von jedem well abgenommen und in Szintillationsmeßgefäßen gesammelt. Danach schloß sich ein Waschschrift mit PBS (pH = 7,4; 200  $\mu\text{l}$ /well) an, wobei die Waschflüssigkeit mit dem jeweiligen Überstand im Meßgefäß vereinigt wurde. Zum Ablösen der adhärenen Zellen wurden je well 200  $\mu\text{l}$  0,5% Trypsin zugegeben, bei 37°C im Brutschrank für 10 min inkubiert, geschüttelt und der vollständige Ablösevorgang unter einem Lichtmikroskop kontrolliert. Danach erfolgten Absaugen, Spülen mit bidestilliertem Wasser und Sammeln der abgelösten Zellen auf einem Filterpapier mit Hilfe eines Zellharvesters und die nochmalige Kontrolle der vollständigen Entfernung der Zellen aus der MTP. Die Filterblättchen mit den abgelösten Zellen wurden im Anschluß in Szintillationsmeßgefäße gegeben, über Nacht getrocknet, nach 12 h mit 4 ml Szintillationsflüssigkeit (OptiPhase, HiSafe3) aufgefüllt und der Flüssigkeitsszintillationsmessung zugeführt. Die Quantifizierung der in die Zellen aufgenommenen Melatoninmenge erfolgte über eine externe Kalibrierreihe.

### 3.13 Untersuchungen der Penetration in Humanhaut ex vivo

#### 3.13.1 Gewinnung und Präparation des biologischen Materials

Bei dem für die Penetrationsstudien zur Verfügung stehenden Hautmaterial handelte es sich um Mammareduktionsplastiken von 23 bis 56 jährigen Probandinnen. Innerhalb eines möglichst kurzen Zeitraumes bis 4 h nach der Operation erfolgte die Aufarbeitung des biologischen Materials. Dazu wurde zuerst eine Säuberung mit isotonischer Kochsalzlösung vorgenommen und das subkutane Fettgewebe sorgfältig und vollständig entfernt. Danach schloß sich die Herstellung runder Hautstücke definierter Größe unter Zuhilfenahme eines Locheisens (d = 2 cm) an. Die so gewonnenen Hautpräparate wurden einzeln in Aluminiumfolie luftdicht eingepackt und nach Probandinnen getrennt bei -20°C im Gefrierschrank für maximal 6 Monate gelagert. Für eine bessere Vergleichbarkeit und Standardisierbarkeit der verschiedenen Penetrationen kam Haut weitgehend altersgleicher Probandinnen und möglichst gleicher Lagerungsdauer zur Anwendung.

### 3.13.2 Ermittlung der mittleren Epidermisbreiten

Von jedem erhaltenen Mammahautpräparat wurde die mittlere Epidermisbreite bestimmt und dokumentiert. Dazu erfolgte die Anfertigung histologischer Schnitte, indem ein kleines Hautstück vor der Einbettung in Paraffin mit 4%-igem Formaldehyd fixiert und in der aufsteigenden Alkoholreihe entwässert wurde. Danach schloß sich die Anfertigung von 5 µm dicken Gewebeschnitten mit Hilfe eines Mikrotoms an. Die so gewonnenen Schnitte wurden unmittelbar danach in heißem Wasser auf Objektträger aufgezogen und zur Glättung für 30 min im Trockenschrank bei 60°C belassen. Nach Entfernung des Paraffins wurde die Hämalaun-Eosin-Färbung (HE) (Hämalaun-Färbung nach MAYER) (Romeis, 1989) durchgeführt und die histologischen Hautschnitte nochmals entwässert und daran anschließend eingedeckt. Die HE-gefärbten Präparate wurden mit dem Morphometrie-Unterprogramm des Bildanalysesystems CYDOK untersucht. Es wurden fünfzehn automatisch berechnete Einzelwerte aus verschiedenen markierten Epidermisabschnitten zur Berechnung eines Mittelwertes mit Standardabweichung herangezogen.

### 3.13.3 Herstellung der wirkstoffhaltigen Zubereitungen

Für alle Penetrationsversuchskomplexe wurden die Wasserhaltige Hydrophile Salbe (Öl-in-Wasser-Emulsion, O/W) und die Wasserhaltige Wollwachsalkoholsalbe (Wasser-in-Öl-Emulsion, W/O) des Deutschen Arzneibuches als Standardvehikel verwendet.

#### 3.13.3.1 Melatonin (1%-ig)

Melatonin wurde in absolutem Ethanol (15 mg in 300 µl) in einem Eppendorff-Reaktionsgefäß unter Vortexen gelöst. In einen kleinen Glasmörser wurden 0,990 g der Wasserhaltigen Hydrophilen Salbe bzw. der Wasserhaltigen Wollwachsalkoholsalbe eingewogen und die ethanolische Melatoninlösung (10 mg in 200 µl) in kleinen Anteilen hinzugefügt, gründlich eingearbeitet und ca. 5 min gerührt. Die Zubereitungen wurden frisch hergestellt und bis zum Versuchsbeginn lichtgeschützt in einem Schliffgefäß im Kühlschrank dicht verschlossen aufbewahrt.

#### 3.13.3.2 Flavonoidhaltige Vehikel

Die flavonoidhaltigen Zubereitungen wurden einen Tag vor Penetrationsbeginn hergestellt und im Kühlschrank bis zur Durchführung des Versuches gelagert.

##### 3.13.3.2.1 Rutin

In einen kleinen Glasmörser wurde 10 mg Rutin eingewogen und mit einem kleinen Anteil der O/W- bzw. W/O-Emulsion verrieben. Danach erfolgte die anteilige Zugabe der restlichen Grundlage (ad 1 g) und eine gründliche Homogenisierung. Die Endkonzentration an Rutin in der Grundlage betrug 1%.

### 3.13.3.2.2 Quercetin, Kämpferol und Isorhamnetin

Die Inkorporierung der Wirksubstanzen erfolgte durch Einwiegen von jeweils 10 mg der verschiedenen Einzelsubstanzen und der Verreibung mit der anteilig zugegebenen Grundlage. Am Ende lagen alle drei Flavonole zu je 1% im Vehikel vor.

### 3.13.4 Versuche mit radioaktiv markiertem <sup>3</sup>H-Melatonin

Die Diffusionszellen nach FRANZ (Abb. 59) wurden etwa 30 min vor Versuchsbeginn mit dem Akzeptormedium (isotonische NaCl-Lösung, 20 ml) gefüllt und bei 32°C temperiert. Pro Versuch und Zeit kam ein Hautstück von drei verschiedenen Probandinnen zur Anwendung. Vor der Auftragung des wirkstoffhaltigen Vehikels erfolgte die Trocknung des jeweiligen Hautstückes vom anhaftenden Gefrierwasser mit einem Watteträger. Zu einer entsprechenden Menge der unmarkierten Zubereitung auf einem Stück Aluminiumfolie wurde unmittelbar vor der Applikation der in Ethanol gelöste Tracer <sup>3</sup>H-Melatonin (13,72 µCi; 14 µl) zugegeben. Dieser wurde homogen mit der unmarkierten Zubereitung (ca. 20 mg) vermischt, wobei auf eine Verdunstung des Lösungsmittels geachtet wurde. Danach erfolgte eine gleichmäßige Applikation der Emulsion mit einem Füllspatel auf der gesamten Epidermisfläche. Das Hautstück wurde so auf die Textilgaze gelegt, daß die dermale Seite in direkten Kontakt zur gerührten Akzeptorflüssigkeit treten konnte. Diese Anordnung wurde nachfolgend durch einen Glasring und eine Metallklammer für eine Versuchsdauer von 30 bzw. 300 min fixiert und zur Einhaltung konstanter Hydratationsbedingungen mit einem Glasdeckel abgedeckt (Kap. 4.7). Nach dem festgelegten Untersuchungszeitraum von 30 bzw. 300 min wurde das Hautstück von der Gaze genommen und der auf der Hautoberfläche zurückgebliebene überschüssige Vehikelrückstand mit Hilfe eines Watteträgers vorsichtig und ohne Druckanwendung entfernt. Zur weiteren Aufarbeitung des Hautmaterials erfolgte die vollständige Entfernung des Stratum corneums durch 20 Tesafilmabrisse unter leichter, gleichmäßiger Druckanwendung (definierte Kreisfläche:  $d = 1,6 \text{ cm}$ ;  $2,0106 \text{ cm}^2$ ). Es wurden  $10 \times 2$  Abrisse fraktioniert in Szintillationsmeßgefäßen gesammelt und der quantitativen Bestimmung zugeführt. Zur Erfassung der penetrierten Wirkstoffmenge in der lebenden Epidermis und Dermis wurden pro Hautstück drei Stanzbiopsien ( $d = 0,6$ ;  $0,2827 \text{ cm}^2$ ) entnommen. An einem Gefriermikrotom erfolgte die horizontale Zerlegung in separate Schichten festgelegter Schichtdicke. Pro Hautstanze wurden  $10 \times 20 \text{ µm}$  Epidermisschnitte und  $15 \times 80 \text{ µm}$  Dermischnitte angefertigt, einzeln gesammelt und analysiert. Zur besseren Reproduzierbarkeit gelangten auch die nicht aufgeschnittenen Stanzenreste, der Wattetupfer und 1 ml vom Akzeptormedium zur analytischen Bestimmung. Die Epidermis- und Dermischnitte, wie auch die Stanzenreste, wurden über Nacht zur vollständigen Zersetzung des Gewebes mit 100 µl bzw. 500 µl Soluene®-350 inkubiert und nachfolgend wie die Stratum corneum-Abrisse mit Methanol (SC-Abrisse 4 ml, Hautschnitte 1 ml, Stanzenreste 1 ml, Tupfer 1 ml, Akzeptor 6 ml) und Szintillatorflüssigkeit (SC-Abrisse 8 ml, Hautschnitte 2 ml, Stanzenreste 2 ml, Tupfer 2 ml, Akzeptor 12 ml) versetzt und nach mindestens 2 h Einwirkzeit unter Mitführung zweier Leerwerte im Flüssigkeitsszintillationszähler vermessen. Für die Quantifizierung der penetrierten Substanzmenge diente eine externe Kalibrierung.

### 3.13.5 Versuche mit unmarkierten Substanzen

Die Versuchsvorbereitungen und der Ablauf der penetrationskinetischen Studien zu den verschiedenen Flavonoiden gestaltete sich ähnlich den radioaktiven Penetrationsversuchen mit Melatonin. Auch hier wurde die entsprechende wirkstoffenthaltene Grundlage (10 mg) nach sorgfältiger Herstellung (vgl. 3.13.3.2) auf das Hautstück mit einem Füllspatel gleichmäßig aufgebracht und homogen verteilt. Nach 30 und 300 min wurde die Haut der Franz'schen Diffusionszelle entnommen und analog 3.13.4 aufgearbeitet. Hier erfolgte eine andere Fraktionierung der SC-Abrisse und der Epidermis- und Dermischnitte aufgrund der unempfindlicheren Analysenmethode im Vergleich zur radioaktiven Traceranalyse. Dabei wurden vom SC insgesamt 8 Fraktionen gesammelt, wobei die ersten 8 Abrisse gepaart und bei den folgenden jeweils 3 Abrisse gepoolt gesammelt wurden. Von jeder Stanzbiopsie der Epidermis wurden zwei  $4 \times 20 \mu\text{m}$  Schnitte und von der Dermis drei  $10 \times 40 \mu\text{m}$  Schnitte angefertigt. Dabei wurden die Schnitte der drei Stanzbiopsien eines Hautstückes einer Probe zugeordnet. Die Extraktion der Flavonoide aus den einzelnen SC-Abrissen erfolgte mit jeweils 2 ml Methanol und aus den Epidermis- und Dermisproben mit je 1 ml Methanol für 30 min, bevor sich eine Zentrifugation bei 12 000 U/min für 5 min anschloß. Für eine vollständige Reproduzierbarkeit der Versuche wurde der Gehalt der Wirksubstanz in der Formulierung, im Watteträger, in den unaufgeschnittenen Stanzresten und in der Akzeptorflüssigkeit (Aqua bidest. 20 ml, 1 ml abgenommen) bestimmt. Zur Erfassung und Quantifizierung der penetrierten Wirkstoffmengen der einzelnen Flavonoide in den verschiedenen definierten Hautschichten wurden die einzelnen Proben einer HPLC-MS Analytik zugeführt.

Gerät	Waters 600 E
Autosampler	Waters Wisp 712
Detektor (MS)	Finnigan-MAT SSQ 710C, SSQ 7000 Tamoquest, Quadrupol
Kapillarsäule	Nucleosil 120 3C18, $125 \times 2$ (RP 8)
Kapillartemperatur	230 °C
Injektionsvolumen	5 $\mu\text{l}$
Elutionsmittel	70 ml Methanol + 30 ml Aqua bidest. + 0,04% Eisessig
Flußrate	0,2 ml/min
Elektronenspray-Ionisierung	4,5 kV
Scan-Mode	SIM (Selected Ion Monitoring)
Collision induced dissociation	10 V
Kalibrierung	Interner Standard Dodecyl- $\beta$ -D-glucopyranosid (Konzentrationen: 0,01 - 10 $\mu\text{g/ml}$ )

### 3.14 Statistische Auswertung der Versuchsergebnisse

Die statistische Auswertung wurde mit der SigmaStat Software (Jandel Scientific GmbH, Erkrath, Deutschland) durchgeführt. Unterschiede wurden als statistisch signifikant bewertet, wenn die Irrtumswahrscheinlichkeit  $p \leq 0,05$  betrug (Weber, 1980).

Die Ergebnisse der einzelnen Untersuchungen und Versuchskomplexe sind als Mittelwerte mit der Standardabweichung angegeben. Die Prüfung auf signifikante Differenzen wurde bei Stichproben aus normalverteilten Grundgesamtheiten mit gleicher Varianz die Varianzanalyse (One Way Analysis of Variance) durchgeführt. Der parameterfreie Test (Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance on Ranks) kam im Falle von nicht normalverteilten Grundgesamtheiten zur Anwendung. Zur Untersuchung der signifikanten Differenzen wurde der Dunn's- bzw. der Dunnett's-Test herangezogen.

## **4 Ergebnisse und Diskussion**

### **4.1 Charakterisierung des Proliferationsverhaltens humaner Keratinozyten in vitro unter Antioxidantieneinfluß**

Vor einem topischen Einsatz potentieller antioxidativer Substanzen und der Entwicklung entsprechender galenischer Formulierungen muß die Frage der epidermalen Verträglichkeit geklärt werden. Um diese zu beantworten und ein zytotoxisches Potential ausschließen zu können, wurde der Einfluß verschiedener Antioxidantien auf das Proliferationsverhalten humaner Keratinozyten in vitro bestimmt. Als Testsysteme dienten HaCaT-Keratinozyten und normale humane epidermale Keratinozyten (NHEK) (vgl. Kap. 3.3).

Zur Charakterisierung des Wachstumsverhaltens erfolgte die Bestimmung der DNA-Syntheseleistung mittels BrdU-Einbau in die DNA während der S-Phase des Zellzyklus und nachfolgendem immunologischen Nachweis des eingebauten Basenanalogs BrdU mit Hilfe eines markierten monoklonalen Antikörpers.

Daneben wurde als weiterer Parameter die Lebendzellanzahl durch die Ermittlung der LDH-Aktivität lysierter Keratinozyten bzw. die vitale Zellpopulation durch Anfärbung mit Kristallviolett bestimmt und zur weiteren Interpretation der Ergebnisse herangezogen.

Weiterhin schloß sich in ausgewählten Versuchsansätzen eine Untersuchung der Apoptose und der prozentualen Zellzyklusphasenverteilung an. Die Inkubationszeiten der verschiedenen Wirkstoffe betragen 24 h, 48 h und 72 h. Dieses Inkubationsschema orientierte sich an früher durchgeführten Studien zur epidermalen Verträglichkeit topisch applizierter Substanzen (Brosin et al., 1997; Hofland et al., 1991; Ponc et al., 1990).

Die Zugabe der einzelnen Substanzlösungen zum Zellkulturmedium erfolgte am 3. bzw. 4. Tag (HaCaT) oder am 7. Tag (NHEK) nach der Zellaussaat bei einer 75-80%igen Konfluenz (subkonfluente Kultur).

Die Keratinozyten wurden aufgrund des noch ausgeprägten proliferierenden Potentials ohne Kontakthemmung (exponentielle Wachstumsphase) als in vitro Modell für Hautzellen der Basalzellschicht in der lebenden Epidermis angesehen.

#### **4.1.1 Einfluß der Flavonoide**

Aufgrund der vielfach beschriebenen antioxidativen Eigenschaften und der Wirkung als Radikalfänger (Kap. 2.5) wurden Flavonoide für die Untersuchungen verwendet.

Aus dieser komplexen Substanzklasse kamen neben der glykosidischen Verbindung Rutin die Flavonolaglyka Quercetin und Kämpferol zum Einsatz. Da im Pflanzenreich, in bestimmten Pflanzenextrakten und phytopharmazeutischen Zubereitungen die Flavonoide vorwiegend als Glykoside vorkommen, dienten die aglykosidischen Verbindungen vornehmlich als Modellsubstanzen und die ausgelösten Effekte sollten mit denen des Glykosids Rutin verglichen werden.

#### 4.1.1.1 Quercetin

Zur Bewertung des *in vitro* toxikologischen Verhaltens von Quercetin an kultivierten epidermalen Hautzellen (HaCaT) wurden diese mit definierten Quercetinkonzentrationen (1  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$  und 15  $\mu\text{M}$ ) versetzt. Nach 24 h, 48 h und 72 h Inkubationsdauer erfolgte die Bestimmung der DNA-Syntheserate und der Lebendzellanzahl als Maß für die Proliferation.

Im Vergleich zur unbehandelten Lösungsmittelkontrolle (0,1 Vol.-% DMSO im SFM) zeigte sich eine starke dosisabhängige Verringerung der BrdU-Einbaurrate auf 25% der Lösungsmittelkontrolle bei 10 und 15  $\mu\text{M}$  bereits nach 24 h (Abb. 5). Dieser deutliche Abfall der DNA-Syntheserate war irreversibel und blieb auch nach 48 h und 72 h Inkubationsdauer mit Quercetin im Zellkulturmedium bestehen.

Im Gegensatz dazu kam es bei der Konzentration von 1  $\mu\text{M}$  Quercetin nur nach 48 h zu einer Verringerung der DNA-Syntheseleistung. Dieser Abfall konnte nach 72 h nicht mehr detektiert werden. Die DNA-Syntheserate erreichte wieder das Niveau der Lösungsmittelkontrolle.

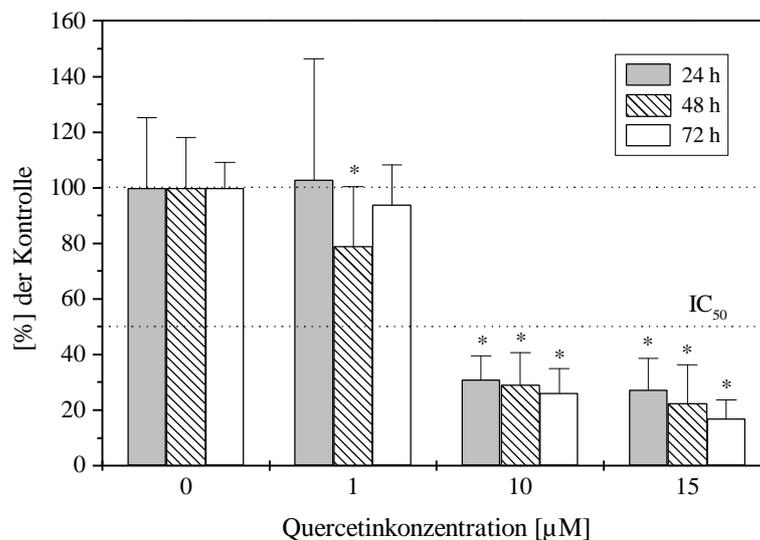


Abb. 5: Einfluß von Quercetin auf die DNA-Syntheserate humaner Keratinozyten (HaCaT) (Methode: BrdU-Einbau nach 24 h, 48 h und 72 h Inkubationszeit; \*  $p < 0,05$  im Vergleich zur unbehandelten LM-Kontrolle;  $n = 15-16$ )

Neben der Betrachtung der DNA-Syntheserate erfolgte die Bestimmung der Lebendzellanzahl über eine LDH-Aktivitätsbestimmung des Zelllysates nach dem obigen Zeitschema. Im Ergebnis dieser Untersuchungen zeigten sich ähnliche Effekte wie bei der Bestimmung der DNA-Syntheserate. Auch hier blieb die niedrigste eingesetzte Quercetinkonzentration von 1  $\mu\text{M}$  ohne Auswirkungen auf das Zellwachstum (Abb. 6).

Eine Einwirkung höherer Konzentrationen (5  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$  und 15  $\mu\text{M}$ ) auf die kultivierten Keratinozyten war mit einer dosisabhängigen Abnahme der Lebendzellanzahl verbunden. Diese Abnahme setzte sich auch nach 48 h und 72 h bei den höchsten Konzentrationen von 10  $\mu\text{M}$  und 15  $\mu\text{M}$  fort, wobei es keine Unterschiede im Ausmaß der Lebendzellanzahlabnahme zwischen den mit 10  $\mu\text{M}$  und 15  $\mu\text{M}$  behandelten Keratinozyten nach den einzelnen Zeitintervallen gab.

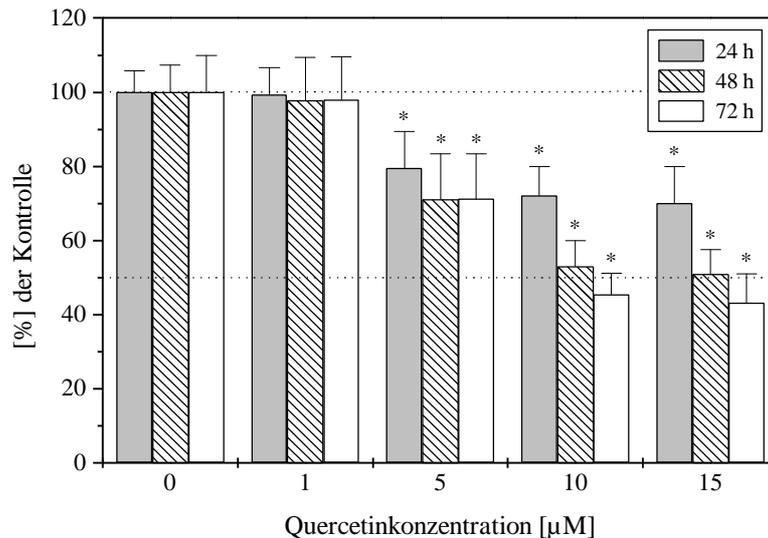


Abb. 6: Einfluß von Quercetin auf die Lebendzellanzahl humaner Keratinozyten (HaCaT) (Methode: LDH-Aktivitätsbestimmung im Zelllysate nach 24 h, 48 h und 72 h Inkubationszeit; \*  $p < 0,05$  im Vergleich zur unbehandelten LM-Kontrolle;  $n = 11-12$ )

Neben dem Verhalten der spontan transformierten HaCaT-Zelllinie interessierte auf Grund der besseren in vivo Relevanz das Verhalten normaler humaner epidermaler Keratinozyten (NHEK) auf einen exogenen Quercetinreiz. Dabei sollten die gefundenen Ergebnisse mit denen der HaCaT-Kultur verglichen werden. Es erfolgte das gleiche Zugabeschema wie bei den HaCaT-Zellversuchen. In Abbildung 7 ist der Effekt einer 24stündigen Quercetinexposition auf die DNA-Syntheserate der NHEK dargestellt.

Erwartungsgemäß übte Quercetin in Abhängigkeit von der eingesetzten Mediumkonzentration einen deutlichen Einfluß auf die Proliferation der epidermalen Hautzellen aus. Während die niedrigste verwendete Konzentration an Quercetin von 1  $\mu\text{M}$  ohne Auswirkungen auf die DNA-Syntheserate war, bewirkten die höheren Mediumkonzentrationen (5  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$  und 15  $\mu\text{M}$ ) eine ausgeprägte Abnahme der Proliferation. Das Ausmaß dieser deutlichen Hemmwirkung von Quercetin auf das zelluläre Wachstum der NHEK-Zellen war mit den gefundenen Ergebnissen an der HaCaT-Kultur vergleichbar.

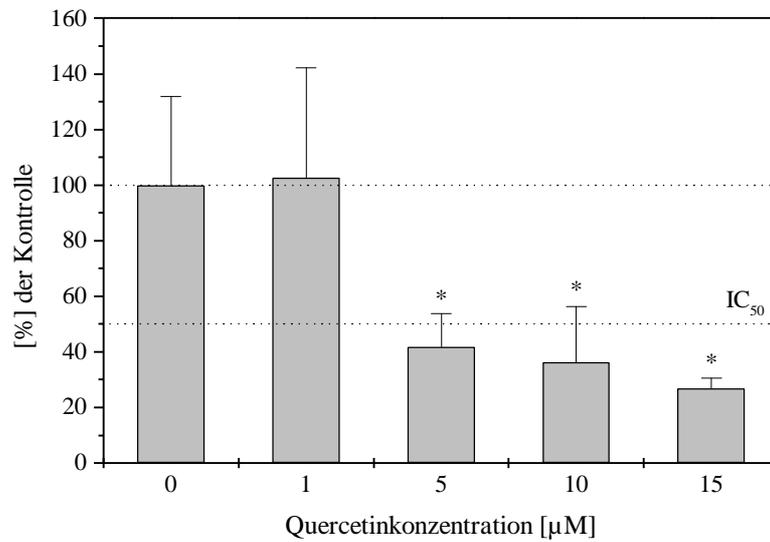


Abb. 7: Einfluß von Quercetin auf die DNA-Syntheserate der NHEK-Zellen (Methode: BrdU-Einbau nach 24 h Inkubationszeit; \*  $p < 0,05$  im Vergleich zur unbehandelten LM-Kontrolle;  $n = 23-24$ )

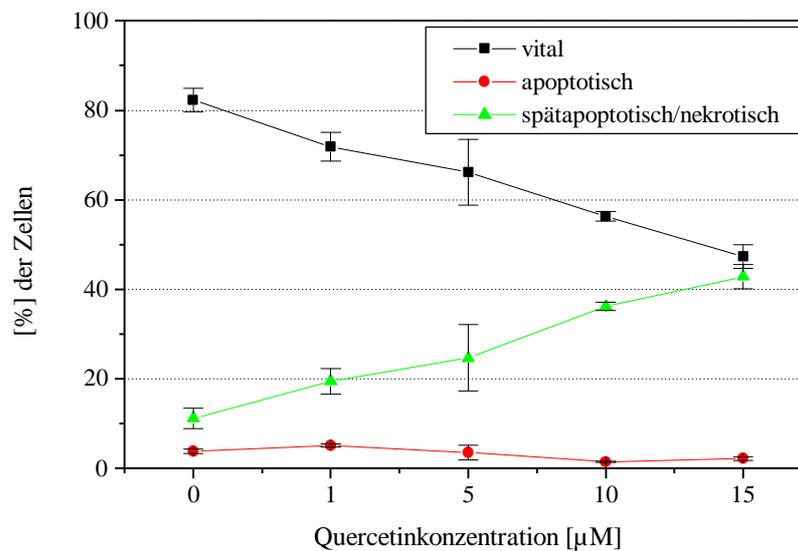


Abb. 8: Einfluß von Quercetin auf den apoptotischen bzw. spätapoptotisch/nekrotischen Zelltod der NHEK-Zellen 24 h nach Substanzapplikation (Methode: durchflußzytometrische Bestimmung von Annexin-V/PI);  $n = 3$

Für die Klärung der Art und der regulatorischen Mechanismen der Quercetin bedingten Zellschädigung von NHEK wurde der apoptotische bzw. spätapoptotisch/nekrotische Zelltod untersucht. Als Apoptosemarker (Frühphase) erfolgte die flowzytometrische Bestimmung der Translokalisierung von Phosphatidylserin von der inneren zur äußeren Zellmembranseite mittels Annexin-V und gleichzeitiger Überprüfung der Membranintegrität mit Hilfe von Propidiumiodid (PI) (Kap. 3.8.2.1). Nach Inkubation mit Quercetinkonzentrationen von 1  $\mu\text{M}$ , 5  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$  und 15  $\mu\text{M}$  zeigte sich nach 24 h eine dosisabhängige Abnahme der vitalen Zellpopulation und ein deutlicher Anstieg der PI-positiven und Annexin-V-positiven Zellen, d. h. eine Zunahme der spätapoptotisch/nekrotischen Zellfraktion (Abb. 8). Dagegen blieb der Anteil rein apoptotischer Zellen mit noch intakter Zellmembran unverändert über dem gesamten eingesetzten Konzentrationsbereich. Bei einer 15  $\mu\text{M}$  Quercetinkonzentration waren 50% der Keratinozyten spätapoptotisch bzw. nekrotisch.

Wertvolle Hinweise auf eine Regulation des Zellzyklusses kann die Zuordnung der Zellen zu den einzelnen Zellzyklusphasen geben. Diese Zuordnung erfolgt dabei aufgrund des unterschiedlichen DNA-Gehaltes in den einzelnen Zellzyklusphasen, der durch Anfärbung der DNA mit Propidiumiodid mittels Durchflußzytometrie bestimmt und quantifiziert werden kann.

Bei Betrachtung des prozentualen Zellzyklusphasenverteilungsmusters der NHEK nach einer Inkubationsdauer von 24 h mit den Quercetinkonzentrationen von 1  $\mu\text{M}$ , 5  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$  und 15  $\mu\text{M}$  konnten keine Veränderungen der prozentualen Verteilung und keine Arretierungen der Keratinozyten in einer Zellzyklusphase festgestellt werden (Tab. 3).

Tab. 3: Einfluß von Quercetin auf das prozentuale Zellzyklusphasenverteilungsmuster der NHEK nach 24stündiger Substanzapplikation (Mittelwerte  $\pm$  SD; n = 3).

Konzentration [ $\mu\text{M}$ ]	Zellzyklusphasenverteilung [%]		
	G <sub>0</sub> /G <sub>1</sub>	S	G <sub>2</sub> /M
Kontrolle	69,74 $\pm$ 1,64	24,02 $\pm$ 2,20	6,22 $\pm$ 0,71
1	72,10 $\pm$ 1,78	20,93 $\pm$ 2,06	6,97 $\pm$ 0,46
5	73,07 $\pm$ 2,60	20,91 $\pm$ 2,67	6,03 $\pm$ 0,96
10	70,23 $\pm$ 2,17	25,68 $\pm$ 4,74	4,09 $\pm$ 2,95
15	67,79 $\pm$ 4,83	26,00 $\pm$ 6,13	6,21 $\pm$ 1,41

Zusätzlich zum untersuchten Langzeiteinfluß (24 h, 48 h, 72 h) wurde ein Kurzzeiteinfluß (12 h) von Quercetin auf das Wachstumsverhalten humaner Keratinozyten bestimmt (Abb. 9). Hierzu erfolgte die Bestimmung der DNA-Syntheserate mittels BrdU-Einbau und die Bestimmung der Lebendzellanzahl mittels Vitalfärbung (Kristallvioletttest).

Im Ergebnis dieser Untersuchungen konnte eine signifikante dosisabhängige Abnahme der DNA-Syntheseleistung bei 5  $\mu\text{M}$  und 15  $\mu\text{M}$  Quercetin detektiert werden. Auch hier zeigte die geringste verwendete Quercetinkonzentration von 1  $\mu\text{M}$  keine Auswirkungen auf den BrdU-Einbau. Neben der DNA-Syntheserate nahm auch die Lebendzellanzahl mit steigender Quercetinkonzentration ab.

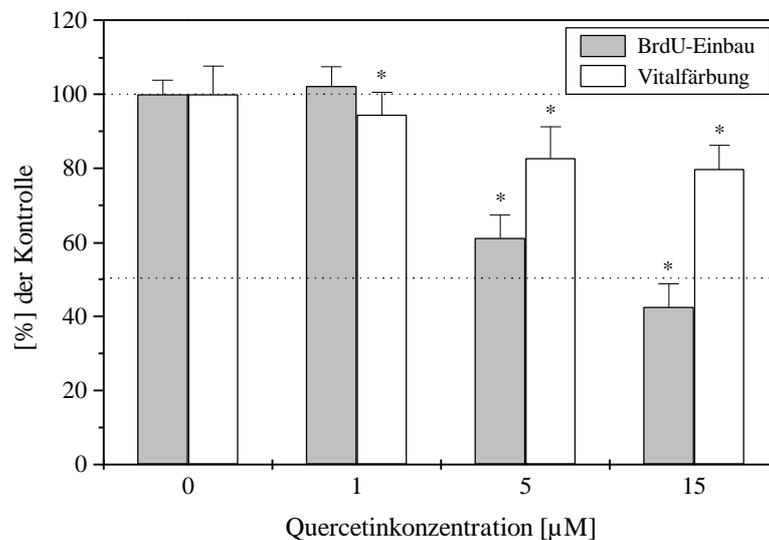


Abb. 9: Einfluß von Quercetin auf die DNA-Syntheserate (BrdU-Einbau) und die Lebendzellanzahl (Vitalfärbung) humaner Keratinozyten (HaCaT) nach 12 h Inkubationszeit; \*  $p < 0,05$  im Vergleich zur unbehandelten LM-Kontrolle;  $n = 24-36$

#### 4.1.1.2 Einfluß von Kämpferol

Als zweite, dem Quercetin strukturell verwandte und ebenfalls aglykosidische Verbindung besaß Kämpferol erwartungsgemäß auch wachstumshemmende Eigenschaften an den humanen Keratinozyten (HaCaT) nach 24 h und 48 h gemessen an der Lebendzellanzahl (Vitalfärbung) (Abb. 10).

Die HaCaT-Zellen zeigten bei 3  $\mu\text{M}$ , 6  $\mu\text{M}$  und 12  $\mu\text{M}$  eine signifikante Abnahme der Zellanzahl. Dagegen blieb eine Konzentration von 1  $\mu\text{M}$  ohne Einfluß auf die Lebendzellanzahl nach 24 h und 48 h.

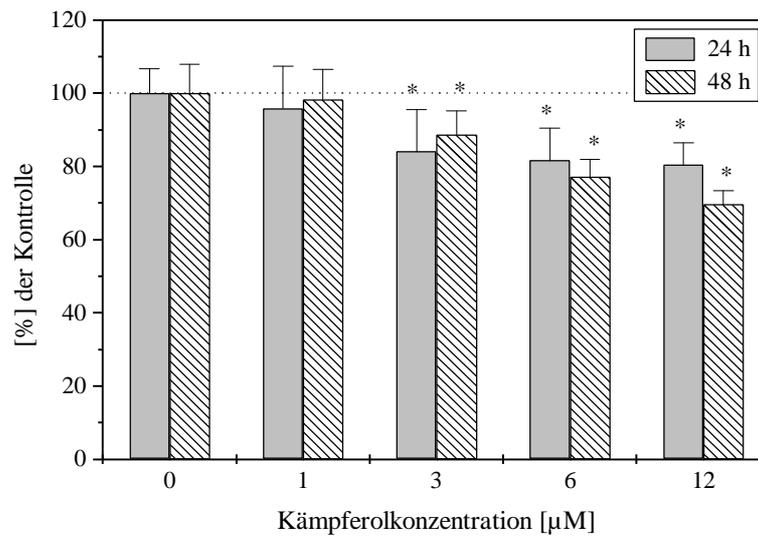


Abb. 10: Einfluß von Kämpferol auf die Lebendzellanzahl humaner Keratinozyten (HaCaT) (Methode: Kristallviolettffärbung/Vitalfärbung nach 24 h und 48 h Inkubationszeit; \*  $p < 0,05$  im Vergleich zur unbehandelten LM-Kontrolle;  $n = 32-36$ )

Bei Betrachtung des prozentualen Zellzyklusphasenverteilungsmusters nach 24 h und 48 h konnten nur nach 48 h geringfügige Veränderungen der einzelnen Zellfraktionen nachgewiesen werden (Tab. 4). Es kam nach einer 48stündigen Inkubationszeit zu einem tendenziellen Abfall des prozentualen Anteils der Zellen in der  $G_0/G_1$ -Phase und zu einem signifikanten Anstieg der S-Phasezellen bei 6  $\mu\text{M}$  und 12  $\mu\text{M}$  Kämpferol im Vergleich zur unbehandelten LM-Kontrolle. Die  $G_2/M$ -Phase blieb dagegen unbeeinflusst.

Tab. 4: Prozentuale Zellzyklusphasenverteilung humaner Keratinozyten (HaCaT) nach 24 h und 48 h Inkubationszeit (Mittelwerte  $\pm$  SD;  $n = 4$ ). \*  $p < 0,05$  im Vergleich zur unbehandelten LM-Kontrolle

Konzentration [ $\mu\text{M}$ ] und Inkubationszeit	Zellzyklusphasenverteilung [%]		
	$G_0/G_1$	S	$G_2/M$
0; 24 h	55,11 $\pm$ 0,94	36,86 $\pm$ 1,90	8,03 $\pm$ 1,04
1; 24 h	55,25 $\pm$ 2,59	38,05 $\pm$ 2,47	6,70 $\pm$ 0,38
6; 24 h	52,64 $\pm$ 1,66	40,16 $\pm$ 2,05	7,20 $\pm$ 0,60
12; 24 h	52,12 $\pm$ 0,81	37,95 $\pm$ 0,90	9,94 $\pm$ 0,54
0; 48 h	60,42 $\pm$ 1,43	28,95 $\pm$ 1,17	10,63 $\pm$ 0,43
1; 48 h	59,28 $\pm$ 0,78	31,57 $\pm$ 2,39	9,15 $\pm$ 1,63
6; 48 h	54,58 $\pm$ 2,33 *	36,20 $\pm$ 2,37 *	9,23 $\pm$ 1,48
12; 48 h	50,34 $\pm$ 1,80 *	36,65 $\pm$ 0,71 *	13,02 $\pm$ 1,16

### 4.1.1.3 Einfluß von Rutin

Infolge des besseren Löslichkeitsverhaltens von Rutin in wäßrigen Medien konnte der Einfluß von Rutin auf das Proliferationsverhalten humaner Keratinozyten in einem großen Konzentrationsbereich (1-200  $\mu\text{M}$ ) verfolgt werden. Rutin verblieb während der Expositionsdauer von 24 h, 48 h und 72 h direkt im Nährmedium.

In der Abbildung 11 ist der zeit- und dosisabhängige Einfluß von Rutin auf die DNA-Syntheserate und in der Abbildung 12 auf die Lebendzellanzahl dargestellt.

Eine Behandlung der Keratinozyten mit dem Glykosid (1-200  $\mu\text{M}$ ) zog keine Veränderungen des BrdU-Einbaus während des gesamten untersuchten Zeitintervalls hinweg nach sich. Ähnliche Auswirkungen zeigten sich bei der Lebendzellanzahlbestimmung. Während eine Exposition von 24 h und 48 h ebenfalls keine Veränderungen der Lebendzellanzahl bei den Konzentrationen von 1-50  $\mu\text{M}$  ergab, war ein schwacher Proliferationsschub nach 48 h bei 100  $\mu\text{M}$  Rutin und nach 72 h Inkubationsdauer bei 1-30  $\mu\text{M}$  Rutin erkennbar (Abb. 12).

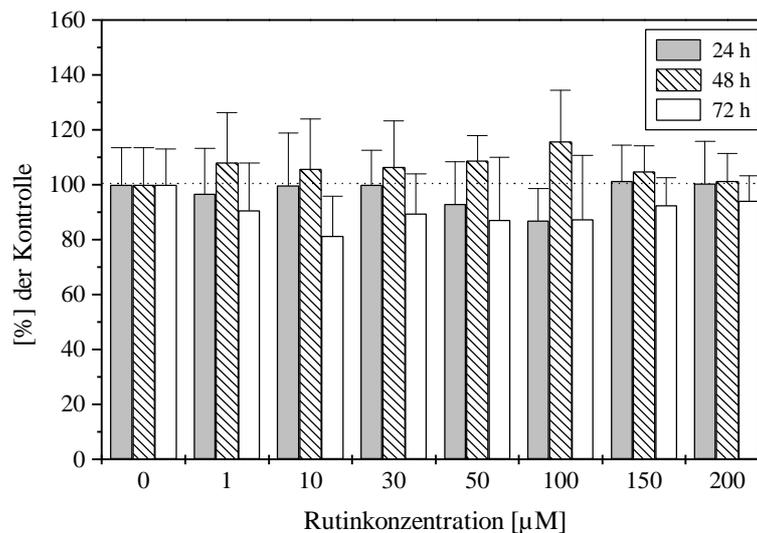


Abb. 11: Einfluß von Rutin auf die DNA-Syntheserate humaner Keratinozyten (HaCaT) (Methode: BrdU-Einbau nach 24 h, 48 h und 72 h Inkubationszeit; \*  $p < 0,05$  im Vergleich zur unbehandelten LM-Kontrolle; 24 h:  $n = 12-18$ ; 48 h:  $n = 12-24$ ; 72 h:  $n = 10-18$ )

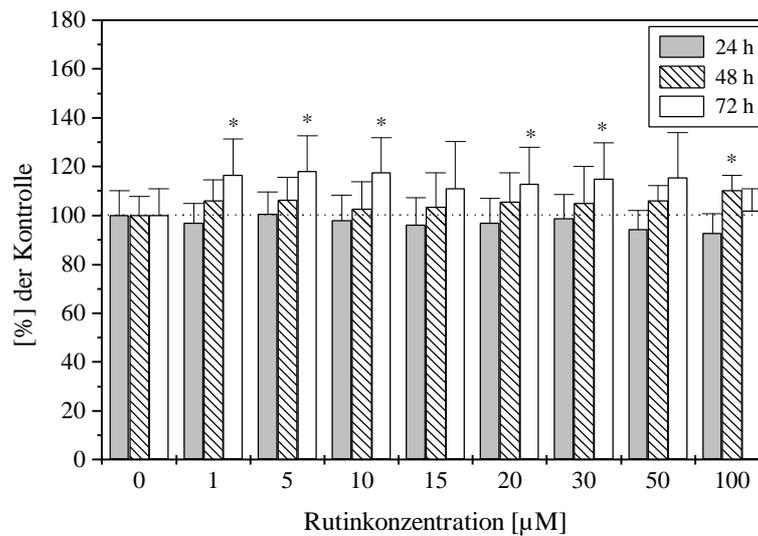


Abb. 12: Einfluß von Rutin auf die Lebendzellanzahl humaner Keratinozyten (HaCaT) (Methode: LDH-Aktivitätsbestimmung im Zelllysat nach 24 h, 48 h und 72 h Inkubationszeit; \*  $p < 0,05$  im Vergleich zur unbehandelten LM-Kontrolle; 24 h:  $n = 12-18$ ; 48 h:  $n = 12-18$ ; 72 h:  $n = 12-18$ )

#### 4.1.1.4 Diskussion

Ausschlaggebend für eine mögliche topische Applikation verschiedener Flavonoide ist deren epidermale Verträglichkeit und Unbedenklichkeit. Unsere Untersuchungen zeigten unterschiedliche Effekte und Toxizitätsprofile einer Flavonoidbehandlung auf die Proliferation kultivierter humaner Keratinozyten. Während das Glykosid Rutin über dem gesamten eingesetzten Konzentrationsbereich (bis 200 µM) keine Auswirkungen auf die DNA-Synthese hatte, reagierten die Keratinozyten insgesamt toxisch auf Quercetin und Kämpferol. Dies wurde an einer dosisabhängigen Wachstumshemmung sichtbar, die sich in einer starken Verringerung der DNA-Syntheserate (BrdU-Einbau) beziehungsweise einer Abnahme der Lebendzellanzahl nachweisen ließ. Diese konzentrationsabhängige Toxizität war unter unseren Versuchsbedingungen und Inkubationsschemen (24 h, 48 h, 72 h) nicht reversibel. Es erfolgte keine Adaptation der Keratinozyten an die externen Bedingungen, da die ausgelösten wachstumsbeeinflussenden Effekte nach 48 h beziehungsweise 72 h noch stark ausgeprägt waren.

Bereits niedrige Konzentrationen von Quercetin (10 µM und 15 µM) und Kämpferol (3 µM, 6 µM und 12 µM) reichten aus, um toxische Effekte an den kultivierten Keratinozyten auszulösen. Eine Anwendung höherer Konzentrationen der Aglykoside erfuhr durch die begrenzte Löslichkeit in wässrigen Medien eine Limitierung.

Nur der Einsatz von Quercetin- und Kämpferolendkonzentrationen von 1 µM verursachte keine Wachstumsinhibierung der HaCaT-Zellen, so daß hier von einem subtoxischen Konzentrationsbereich ausgegangen werden kann.

Neben der spontan transformierten, immortalisierten HaCaT-Zelllinie wurden für einige ausgewählte Versuchsansätze normale humane epidermale Keratinozyten (NHEK) aus juveniler Vorhaut verwendet, um die gefundenen Ergebnisse besser auf in vivo Verhältnisse extrapolieren zu

können. Bei Behandlung der NHEK mit Quercetin waren ebenfalls niedrige Mediumkonzentrationen (5-15  $\mu\text{M}$ ) ausreichend, um toxische Effekte, gemessen an der DNA-Syntheserate, nach 24 h Inkubationszeit auszulösen. Eine Konzentration von 1  $\mu\text{M}$  zeigte dabei keinen Einfluß auf die BrdU-Einbaurate. Die mit Quercetin erhaltenen Ergebnisse an der HaCaT-Kultur waren folglich mit den Resultaten an nativen Vorhautkeratinozyten vergleichbar. NHEK zeigten keine andere Reaktion auf einen exogenen Quercetinreiz. Diese Befunde liefern ein Indiz dafür, daß die spontan transformierte, immortalisierte HaCaT-Zelllinie im Hinblick auf die Regulation der Proliferation mit NHEK durchaus vergleichbar ist.

Die ermittelten Ergebnisse der starken dosisabhängigen Inhibierung der Zellproliferation stimmen mit verschiedenen Arbeiten aus der Literatur überein. Auch hier konnten Beeinflussungen des Wachstumsverhaltens an verschiedenen Zellsystemen, wie beispielsweise kultivierten Meerschweinchenkeratinozyten (Sauk et al., 1988) und zytotoxische Effekte an Raji-Lymphomzellen und HeLa-Zellen nach Einsatz pflanzlicher polyphenolischer Verbindungen nachgewiesen werden (Ramanathan et al., 1992). Die Studien von Ramanathan et al., 1992 belegen ebenfalls, daß die aglykosidischen Verbindungen der Flavonoide wesentlich ausgeprägtere wachstumshemmende Eigenschaften besitzen als die entsprechenden Glykoside. Diese Ergebnisse laufen mit unseren gefundenen Resultaten konform. Ferner ist die Doppelbindung zwischen C-2 und C-3, die die von uns verwendeten Flavonoide aufweisen (Abb. 2), wichtig für diese Wirkung.

Für den Erhalt aussagekräftigerer Ergebnisse und eine bessere Interpretation der regulatorischen Zusammenhänge erfolgte zusätzlich zur Bestimmung der DNA-Syntheserate und der Lebendzellanzahl eine Untersuchung der Apoptose und des Zellzyklusphasenverteilungsmusters. Es sollten dadurch Rückschlüsse auf die Art und den Mechanismus der Zellschädigung durch Quercetin und Kämpferol gezogen werden.

Eine Inkubation humaner Keratinozyten mit Kämpferol zeigte nur nach 48 h schwache Alterationen des Zellzyklusses, sichtbar an einer geringen Abnahme der Zellanzahl in der  $G_0/G_1$ -Phase und einem schwachen Anstieg der S-Phasezellen bei 6  $\mu\text{M}$  und 12  $\mu\text{M}$ . Die gefundenen wachstumshemmenden Effekte nach 24 h und 48 h sind daher eher auf ein insgesamt langsames Durchschreiten des Zellzyklusses zurückzuführen, wobei die Keratinozyten auf die Zellschädigung durch Kämpferol nach 48 h mit einer Zunahme der S-Phasezellen reagierten. Diese Zunahme resultiert vermutlich aus einer Reaktivierung der ruhenden Zellpopulation ( $G_0$ -Population). Diese Veränderungen nach 48 h sind in ihrem Ausmaß als gering einzustufen, und äußern sich aufgrund der unsensibleren Methode der Vitalfärbung nicht bei der Lebendzellanzahlbestimmung.

Während das Zellzyklusphasenverteilungsmuster humaner Keratinozyten durch eine 24stündige Behandlung mit Quercetin unbeeinflusst blieb, d. h. es zu keiner Arretierung der Zellen in einer Zellzyklusphase kam, zeigte sich eine starke Abnahme der vitalen Zellpopulation und eine dosisabhängige Zunahme der Annexin-V- und PI-positiven Zellen. Dagegen konnte ein Anstieg rein apoptotischer Zellen mit dieser Methode nicht detektiert werden. Die beobachtete zelluläre Antwort auf den externen Quercetinreiz ist demnach durch ein spätapoptotisch/nekrotisches Geschehen gekennzeichnet, bei dem es zu einer massiven Störung der Membranintegrität kommt. Aufgrund dieser Befunde kann auf eine direkte zytotoxische Schädigung der Keratinozyten durch Quercetin geschlossen werden.

Obwohl es Ansätze und Versuche *in vivo* gibt, Quercetin wegen seiner antioxidativen und anti-inflammatorischen Aktivitäten topisch einzusetzen, wie z.B. gegen Natriumlaurylsulfat-induzierte Hautirritationen (Katsarou et al., 2000), sollte davon auf Grund der starken Proliferationsbeeinflussung humaner Keratinozyten und des ausgeprägten zytotoxischen Potentials Abstand

genommen werden. Eine großflächige topische Applikation von Quercetin ist ebenfalls aus der nicht auszuschließenden lokalen Toxizität fraglich.

Kontrovers wird in der Literatur die mutagene Aktivität von Quercetin diskutiert (Bjeldanes and Chang, 1977). Solimani, 1996 konnte beispielsweise zeigen, daß das Flavonol Quercetin aufgrund seiner starken Hydrophobizität und Planarität in die DNA interkalieren kann. Diese Fähigkeit ist dabei durch die strukturellen Gegebenheiten beim Quercetin wesentlich höher ausgeprägt als beim Rutin. Die Affinität von Quercetin zur DNA wird aber im Vergleich zu anderen typischen DNA-Interkalatoren als sehr gering eingestuft und eine Mutagenität von Quercetin ist eher als unwahrscheinlich einzustufen.

Ebenso dürfte die hohe Lipophilie des Quercetins eine bessere Penetration durch Phospholipidmembranen im Gegensatz zum Glykosid Rutin bedingen. Die erhaltenen Effekte des Quercetins können infolgedessen durch eine stärkere Anreicherung in der Zelle und verschiedenen Zellkompartimenten mit der Beeinflussung unterschiedlichster Enzymsysteme oder durch direkte Effekte an den Zellmembranen erklärt werden.

Im Gegensatz zur hohen Zelltoxizität von Quercetin wurde dessen glykosidische Verbindung Rutin von den epidermalen Hautzellen über einen größeren Konzentrationsbereich sehr gut vertragen und für weitergehende Experimente, die einen topischen Einsatz zum Ziel haben, berücksichtigt. Der mittels Lebendzellanzahlbestimmung vorrangig nach 72 h ermittelte, schwache Proliferationschub, welcher ebenfalls durch Kim et al., 1997 an humanen Hautfibroblasten beschrieben wurde, kann für das weitere experimentelle Design vernachlässigt werden.

#### 4.1.2 Einfluß von Melatonin

Die eingesetzten Konzentrationen an Melatonin lagen im nano- bis millimolaren Bereich und orientierten sich an verschiedenen Zellkulturuntersuchungen aus der Literatur.

Eine Behandlung der humanen Keratinozyten (HaCaT) mit Melatonin für 24 h, 48 h und 72 h zeigte einen biphasischen Effekt auf die Proliferation (Abb. 13). Hohe Konzentrationen an Melatonin (1 mM) verursachten eine signifikante Verringerung der DNA-Syntheserate nach 48 h und 72 h im Vergleich zur LM-Kontrolle (EtOH/PBS 0,2 Vol.-%), nicht jedoch nach 24 h.

Dagegen zog der Einsatz niedriger Konzentrationen (1 nM - 10 µM) einen Anstieg der BrdU-Einbaurrate nach 24 h und somit eine gesteigerte Proliferation der Zellen nach sich.

Eine Inkubation für 48 h zeigte keine Steigerung der DNA-Syntheserate, wohingegen niedrige Konzentrationen von 1 nM und 10 nM eine signifikante Zunahme der BrdU-Einbaurrate nach 72 h um 20% zur Folge hatten. Vergleicht man die Ergebnisse der Lebendzellanzahlbestimmung mittels LDH (Abb. 14) mit denen des BrdU-Einbaus, so konnte lediglich nach 48 h und 72 h eine Abnahme der Zellanzahl bei 1 mM Melatonin beobachtet werden. Proliferationssteigerungen, d. h. ein Anstieg der Zellanzahl waren nicht sichtbar.

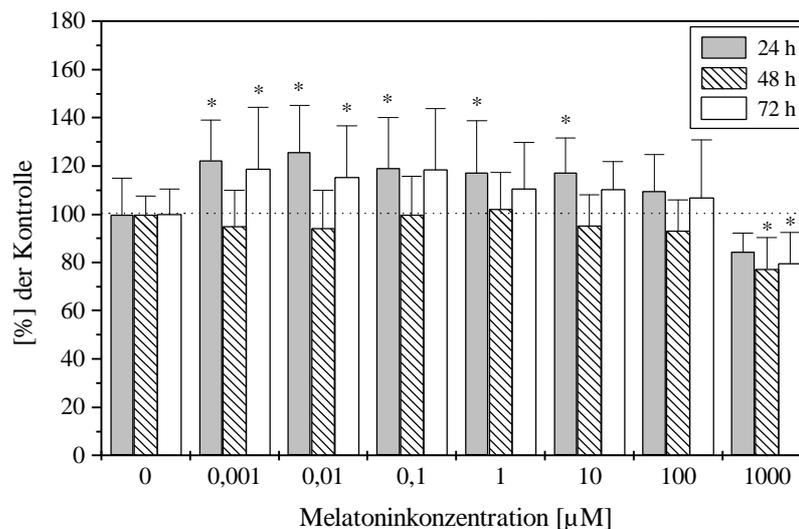


Abb. 13: Einfluß von Melatonin auf die DNA-Syntheserate humaner Keratinozyten (HaCaT) (Methode: BrdU-Einbau nach 24 h, 48 h und 72 h Inkubationszeit; \*  $p < 0,05$  im Vergleich zur unbehandelten LM-Kontrolle;  $n = 21-24$ )

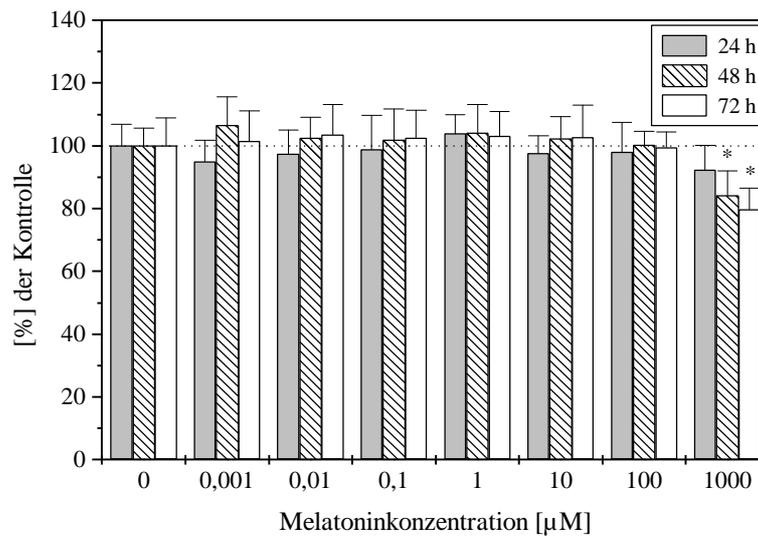


Abb. 14: Einfluß von Melatonin auf die Lebendzellanzahl humaner Keratinozyten (HaCaT) (Methode: LDH-Aktivitätsbestimmung im Zelllysate nach 24 h, 48 h und 72 h Inkubationszeit; \*  $p < 0,05$  im Vergleich zur unbehandelten LM-Kontrolle;  $n = 11-12$ )

Bei der Lebendzellanzahlbestimmung mittels Kristallvioletttest (Abb. 15) manifestierte sich die Abnahme nach Behandlung mit 1 mM Melatonin ebenfalls nach 48 h und 72 h Inkubationsdauer. Es konnte gezeigt werden, daß die Ergebnisse der beiden verwendeten Methoden zur Lebendzellanzahlbestimmung miteinander vergleichbar sind.

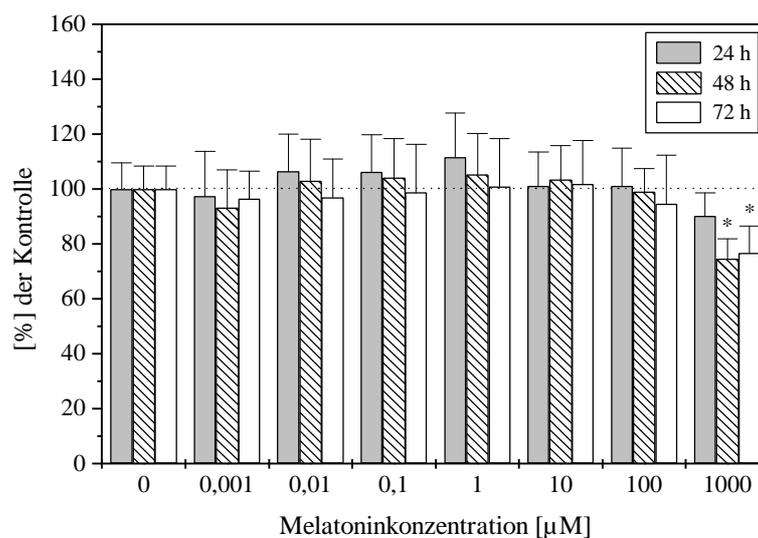


Abb. 15: Einfluß von Melatonin auf die Lebendzellanzahl humaner Keratinozyten (HaCaT) (Methode: Kristallvioletttest nach 24 h, 48 h und 72 h Inkubationszeit; \*  $p < 0,05$  im Vergleich zur unbehandelten LM-Kontrolle;  $n = 18$ )

Aufgrund der biphasischen Beeinflussung der DNA-Syntheserate nach 24 h, 48 h und 72 h war besonders für nachfolgende Versuche zum zytoprotektiven Potential die Auswirkung einer Kurzzeitinkubation interessant. Dazu wurden die HaCaT-Keratinocyten jeweils 0,5 h, 3 h oder 6 h mit Melatonin behandelt und danach das Melatonin supplementierte SFM durch frisches Medium ersetzt. Nach weiteren 24 h Kultivierungsdauer erfolgte die Bestimmung der DNA-Syntheserate durch einen BrdU-Einbau.

Die Ergebnisse sind in der Abbildung 16 dargestellt. Es konnten keine Veränderungen des Wachstumsverhaltens, d. h. vor allem keine Steigerungen des BrdU-Einbaus detektiert werden. Dieses Ergebnis ist für spätere Zytoprotektionsversuche hinsichtlich der Inkubations- und Zeitschemen besonders wichtig.

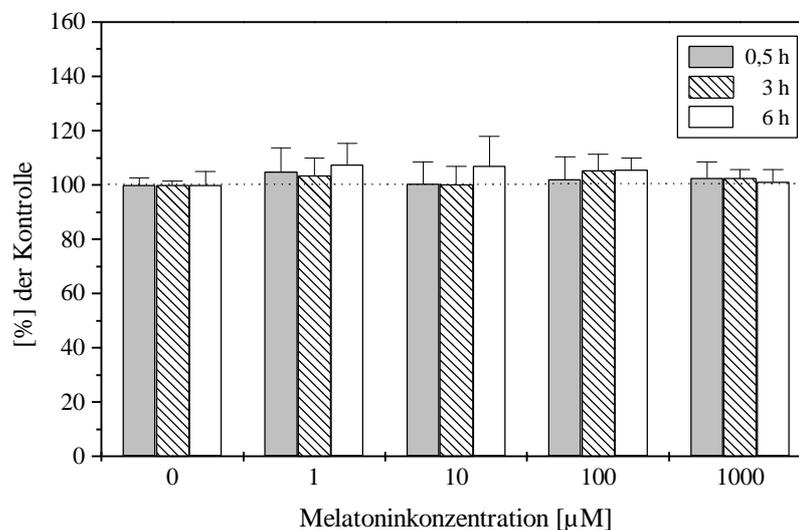


Abb. 16: Einfluß einer Kurzzeitinkubation (0,5 h, 3 h, 6 h) der HaCaT-Keratinocyten auf die DNA-Syntheserate nach 24 h (Methode: BrdU-Einbau); \*  $p < 0,05$  im Vergleich zur unbehandelten LM-Kontrolle;  $n = 12$

Die zusätzlich durchgeführte Bestimmung des prozentualen Zellzyklusphasenverteilungsmusters (Tab. 5) zeigte keine signifikanten, meßbaren Veränderungen in der Zuordnung der Zellen zu den einzelnen Zellzyklusphasen nach 6- und 24stündiger Melatonininkubation.

Tab. 5: Prozentuale Zellzyklusphasenverteilung humaner Keratinozyten (HaCaT) nach 24 h. Die Melatonininkubation betrug 6 h bzw. 24 h. (Mittelwert  $\pm$  SD; n = 3)

Konzentration [ $\mu$ M]	Inkubationszeit	Zellzyklusphasenverteilung [%]		
		G <sub>0</sub> /G <sub>1</sub>	S	G <sub>2</sub> /M
0	6 h	42,37 $\pm$ 0,87	44,00 $\pm$ 1,90	13,63 $\pm$ 1,20
0,1	6 h	40,51 $\pm$ 1,47	44,82 $\pm$ 1,88	14,67 $\pm$ 0,42
1	6 h	39,71 $\pm$ 1,81	45,73 $\pm$ 1,56	14,56 $\pm$ 1,80
10	6 h	40,38 $\pm$ 1,44	45,38 $\pm$ 1,22	14,24 $\pm$ 0,67
100	6 h	40,31 $\pm$ 0,92	45,87 $\pm$ 0,64	13,82 $\pm$ 0,53
1000	6 h	41,96 $\pm$ 1,36	44,54 $\pm$ 1,42	13,51 $\pm$ 1,44
0	24 h	52,60 $\pm$ 2,37	39,02 $\pm$ 1,30	8,38 $\pm$ 1,11
1	24 h	53,58 $\pm$ 0,80	38,81 $\pm$ 0,41	7,61 $\pm$ 1,17
10	24 h	51,23 $\pm$ 3,40	39,64 $\pm$ 3,25	9,13 $\pm$ 0,41
100	24 h	55,06 $\pm$ 2,03	36,13 $\pm$ 2,31	8,81 $\pm$ 0,58
1000	24 h	56,57 $\pm$ 1,63	35,80 $\pm$ 1,60	7,64 $\pm$ 1,12

Nach einer Behandlung der humanen Keratinozyten (HaCaT) mit verschiedenen Melatoninkonzentrationen über einen Zeitraum von 24 h zeigte sich keine signifikante Änderung hinsichtlich der Verteilung vitaler, apoptotischer bzw. spätapoptotisch/nekrotischer Zellen (Tab. 6).

Tab. 6: Einfluß von Melatonin auf den apoptotischen bzw. spätapoptotischen/nekrotischen Zelltod humaner Keratinozyten (HaCaT) nach 24 h Inkubationszeit.

(Methode: flowzytometrische Bestimmung von Annexin-V/PI) (Mittelwert  $\pm$  SD; n = 3)

Konzentration [ $\mu$ M]	vital [%]	apoptotisch [%]	spätapoptotisch/ nekrotisch [%]
0	89,35 $\pm$ 1,19	6,13 $\pm$ 1,61	4,16 $\pm$ 0,52
1	88,84 $\pm$ 1,24	5,58 $\pm$ 0,65	5,17 $\pm$ 1,74
10	87,37 $\pm$ 1,94	5,32 $\pm$ 0,21	6,88 $\pm$ 2,02
100	87,21 $\pm$ 0,71	7,41 $\pm$ 0,68	4,68 $\pm$ 0,11
1000	87,39 $\pm$ 2,16	5,68 $\pm$ 1,60	6,27 $\pm$ 0,60

Neben dem Verhalten der HaCaT-Zellen interessierte auch die Reaktion von NHEK auf eine Melatoninbehandlung. In Abbildung 17 ist dieser Einfluß von Melatonin dargestellt. Eine 24stündige Behandlung der Zellen mit 1 mM Melatonin zeigte eine Abnahme der DNA-Syntheserate um 20%.

Verglichen mit den HaCaT-Keratinozyten konnten aber keine Proliferationssteigerungen nach Supplementierung mit den niedrigen Mediumkonzentrationen an Melatonin (0,1  $\mu$ M und 10  $\mu$ M) festgestellt werden.

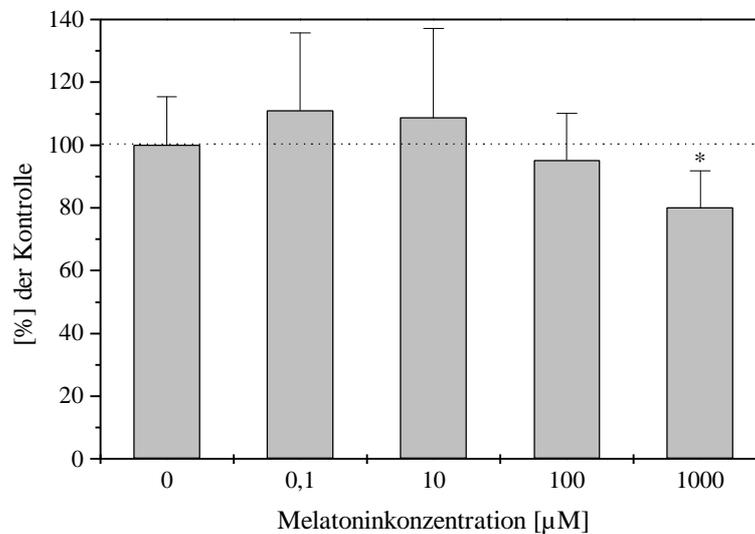


Abb. 17: Einfluß einer 24stündigen Melatoninbehandlung auf die DNA-Syntheserate (BrdU-Einbau) von NHEK, (\*  $p < 0,05$  im Vergleich zur unbehandelten LM-Kontrolle;  $n = 36$ )

#### 4.1.3 Einfluß von N-Acetylserotonin

In die vorliegende Arbeit wurde N-Acetylserotonin als direkter Precursor (Vorstufe) von Melatonin einbezogen (Kap. 2.6.1). Ein Einsatz von N-Acetylserotonin schien auch im Hinblick besserer und potenterer Radikalfängereigenschaften besonders interessant (Wölfler et al., 1999).

Die Abbildung 18 zeigt den Einfluß von N-Acetylserotonin auf den BrdU-Einbau humaner Keratinozyten (HaCaT). In der Abbildung 19 ist der Einfluß auf die Lebendzellanzahl dargestellt.

Eine 24stündige Behandlung der Zellen mit N-Acetylserotonin (1 nM bis 1 mM) verursachte nur bei der höchsten Konzentration eine schwache, signifikante Abnahme der DNA-Syntheserate. Nach 48 h und 72 h konnte dieser Effekt nicht mehr beobachtet werden. Daneben führte N-Acetylserotonin (1 mM) zu einer schwachen Abnahme der Lebendzellanzahl nach 24 h, 48 h und 72 h. Alle anderen verwendeten Konzentrationen blieben ohne Auswirkungen.

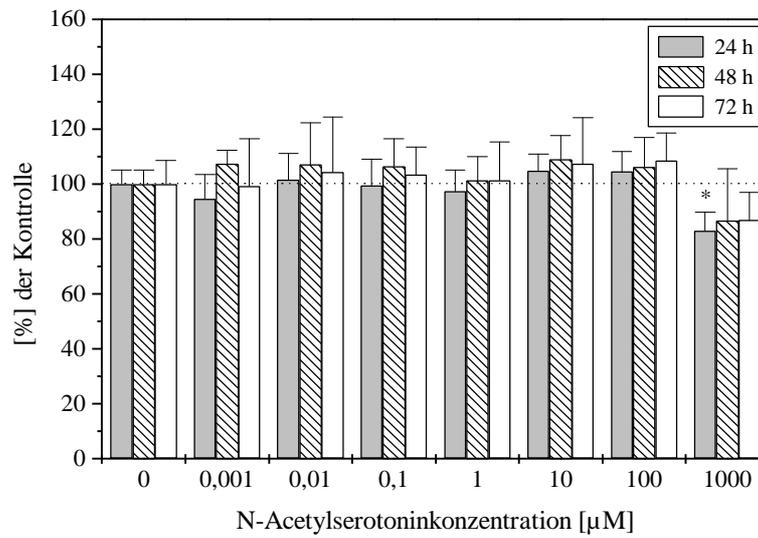


Abb. 18: Einfluß von N-Acetylserotonin auf die DNA-Syntheserate humaner Keratinozyten (HaCaT) (Methode: BrdU-Einbau; \*  $p < 0,05$  im Vergleich zur unbehandelten LM-Kontrolle;  $n = 12-18$ )

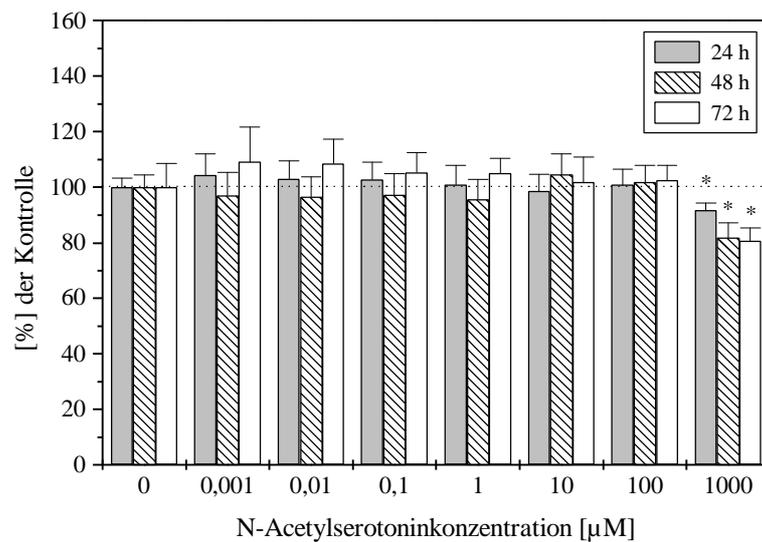


Abb. 19: Einfluß von N-Acetylserotonin auf die Lebendzellanzahl humaner Keratinozyten (HaCaT) (Methode: Kristallvioletttest; \*  $p < 0,05$  im Vergleich zur unbehandelten LM-Kontrolle;  $n = 12-18$ )

#### 4.1.4 Diskussion

Aus der Literatur ist bekannt, daß Melatonin selbst, beziehungsweise seine Vorstufen und Metabolite, dosisabhängige, antiproliferative Effekte in verschiedenen *in vitro* Zellsystemen verursachen (Hill und Blask, 1988; Shellard et al., 1989; Sze et al., 1993; Hu et al., 1997; Hu et al. 1998).

In unseren Versuchen an humanen Keratinozyten zeigten sich Hemmwirkungen des Wachstums nach Behandlung der Zellen mit 1 mM Melatonin oder N-Acetylserotonin. Dieser wachstumsinhibierende Effekt war jedoch nicht stark ausgeprägt. Man kann in diesem Fall von einer moderaten Zelltoxizität an epidermalen Hautzellen ausgehen. Finocchiaro et al., 1998 konnten durch Kultivierung von synchronisierten 3T3 Mausfibroblasten mit 1 mM Melatonin ein langsames Durchschreiten des Zellzyklusses nachweisen. Weiterhin schlossen sie aus ihren Untersuchungen auf eine direkte Interaktion von Melatonin mit nukleären und zytoskeletalen Strukturen, wodurch die verschiedensten Zellfunktionen wie z. B. die Zellzykluskontrolle und die genomische Stabilität beeinflusst werden können.

Während Konzentrationen an N-Acetylserotonin von 1 nM bis 100 µM ohne Einfluß auf das Wachstumsverhalten blieben, konnte nach Inkubation der Zellen mit Melatonin (1 nM bis 10 µM) eine geringe Proliferationssteigerung um 20% nach 24 h detektiert werden. Nach 48stündiger Behandlung erreichten die BrdU-Einbauraten wieder das Niveau der LM-Kontrolle. Dies dürfte auf eine Adaptation der Keratinozyten an die herrschenden Zellkulturbedingungen zurückzuführen sein. Ähnliche stimulierende Effekte von Melatonin (0,1–10 nM) auf die DNA-Synthese epidermaler und follikulärer Keratinozyten wurden von Slominski et al., 1994 unter Verwendung von Hautorgankulturen (Mäusehautmodell) beschrieben. Daneben konnte ebenfalls demonstriert werden, daß Säugetierhaut spezifische Bindungsstellen für Melatonin besitzt, die sich primär auf den epidermalen und follikulären Keratinozyten befinden. Weiterhin bestätigt der beobachtete Befund des biphasischen Verhaltens der HaCaT-Zellen auf einen externen Melatoninreiz die Ergebnisse von Carossino et al., 1996 an Hautfibroblastenzellkulturen. Hier wurden ebenfalls stimulierende Effekte von Melatonin auf die Zellproliferation (<sup>3</sup>H-Thymidineinbau) bei niedrigen Konzentrationen gezeigt, wobei die Zellviabilität unbeeinflusst blieb. Dagegen hatten höhere Konzentrationen eine Wachstumsinhibition zur Folge.

Die Durchführung einer Zellzyklusphasenanalyse nach 6- bzw. 24stündiger Melatoninbehandlung erbrachte, wie auch die Untersuchungen der Apoptose, keine Alterationen. Nach diesem Befund kann man nicht von einer direkten Zytotoxizität ausgehen.

Aufgrund unserer Ergebnisse können dem Melatonin insgesamt proliferationsmodulierende Eigenschaften zugesprochen werden. Trotz des beobachteten biphasischen Verhaltens der Hautzellen auf eine Behandlung mit Melatonin und der schwachen Abnahme der DNA-Syntheserate und der Lebendzellanzahl nach Inkubation mit N-Acetylserotonin kann die epidermale Verträglichkeit beider Indolamine als gut bewertet werden. Dies gilt insbesondere bei einer Kurzzeitinkubation (0,5 h, 3 h, 6 h) mit Melatonin und nachfolgender Weiterkultivierung (24 h), die ohne Einfluß auf das Wachstumsverhalten blieb und uns für das weitere Versuchdesign geeignet erschien.

## 4.2 Charakterisierung des schädigenden Einflusses von Wasserstoffperoxid auf humane Keratinozyten

Als einfaches Modell oxidativ bedingter Zellschädigungen humaner Keratinozyten diente die Behandlung mit Wasserstoffperoxid. In den vorliegenden Versuchen sollte das Ausmaß einer Schädigung und der Einfluß auf die epidermale Zellpopulation untersucht und charakterisiert werden.

Als sensibler Proliferationsmarker wurde die DNA-Syntheseleistung neben der Lebendzellanzahl bestimmt. Zur vollständigen Charakterisierung der Wirkung von Wasserstoffperoxid an humanen Keratinozyten erfolgte die Untersuchung des Zellzyklusphasenverteilungsmusters und des apoptotischen Zelltodes.

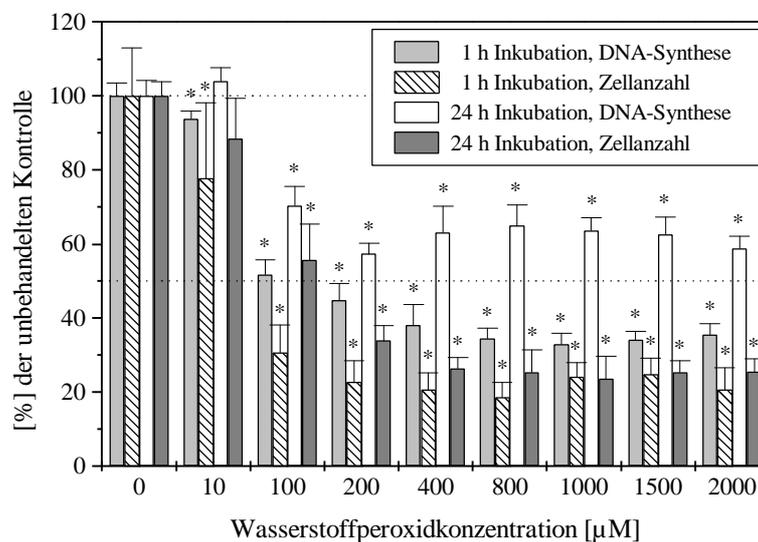


Abb. 20: Einfluß von Wasserstoffperoxid (Kurz- und Langzeiteinfluß) auf die DNA-Syntheserate (BrdU-Einbau) und die Lebendzellanzahl (Vitalfärbung) humaner Keratinozyten (HaCaT). \*  $p < 0,05$  im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle;  $n = 6$

In der Abbildung 20 ist ein zeit- und dosisabhängiger Einfluß von Wasserstoffperoxid auf den BrdU-Einbau und die Lebendzellanzahl der keratinozytären Zelllinie dargestellt. Hierzu wurde den HaCaT-Keratinozyten entweder  $H_2O_2$  direkt zum Kulturmedium zugegeben mit anschließender 24stündiger Weiterkultivierung oder das Kulturmedium von den Zellen entfernt, durch temperiertes steriles PBS ersetzt und  $H_2O_2$  in den unterschiedlichen Konzentrationen für 1 h zugeetzt. Danach erfolgte ein Waschschrift mit PBS und die Weiterkultivierung mit SFM für 24 h.

Nach dieser Kurz- (1 h) beziehungsweise Langzeitbehandlung (24 h) humaner Keratinozyten mit verschiedenen Konzentrationen an Wasserstoffperoxid (10-2000  $\mu\text{M}$ ) kam es zu einer dosisabhängigen Verminderung der DNA-Syntheserate und der Zellanzahl im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Während bereits Konzentrationen ab 100  $\mu\text{M}$  auf die Zellen in beiden Inkubationsschemen wachstumsinhibierend wirkten, zeigte sich eine schwache Abnahme der DNA-Synthese und der Zellanzahl bei 10  $\mu\text{M}$  nach einstündiger Inkubation in PBS. Eine Inkubation mit 10  $\mu\text{M}$  direkt im Kulturmedium für 24 h verursachte dagegen keine Veränderungen beider Proliferationsmarker.

Aus der Abbildung 20 ist weiterhin zu entnehmen, daß eine 24stündige Exposition der Zellen mit Wasserstoffperoxid direkt im SFM verglichen zur einstündigen Inkubation in PBS und Weiterkultivierung für 24 h eine geringere Toxizität gemessen an der Lebendzellanzahl bzw. der DNA-Syntheserate zeigte. Dieses Ergebnis dürfte zurückzuführen sein auf die zu erwartenden Wechselwirkungen von  $\text{H}_2\text{O}_2$  mit einzelnen Mediumbestandteilen und der daraus resultierenden Abschwächung der Wirkung gegenüber den Keratinozyten.

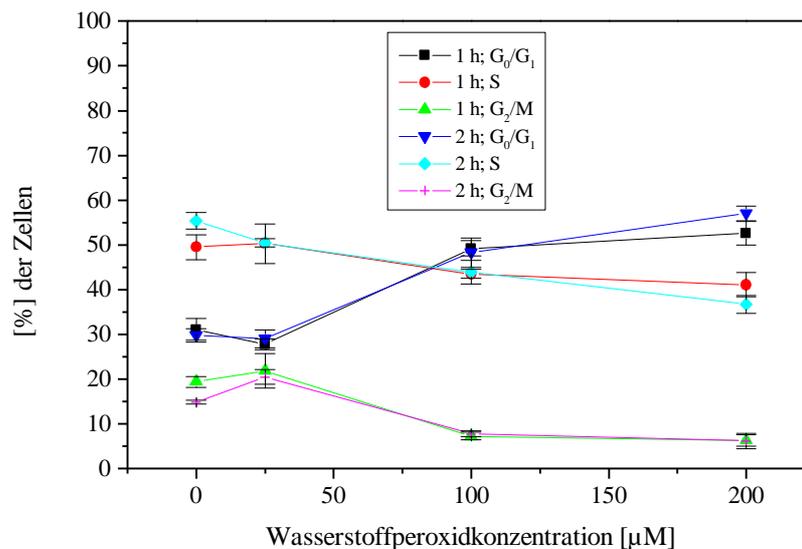


Abb. 21: Einfluß einer ein- bzw. zweistündigen Einwirkung von Wasserstoffperoxid auf das prozentuale Zellzyklusphasenverteilungsmuster humaner Keratinozyten (HaCaT) 24 h nach der Schädigung. n = 3

Zur Untersuchung der Wirkung von  $\text{H}_2\text{O}_2$  auf das Zellzyklusphasenverteilungsmuster humaner Keratinozyten (HaCaT) wurde als Expositionsdauer 1 h bzw. 2 h und ein Konzentrationsbereich bis  $200 \mu\text{M}$  gewählt. In der Abbildung 21 ist die prozentuale Verteilung der Keratinozyten auf die einzelnen Zyklusphasen 24 h nach erfolgter Schädigung dargestellt. Es können ausgeprägte Veränderungen im Zellzyklus humaner Keratinozyten (HaCaT) erkannt werden. Diese Änderungen manifestierten sich in einer starken Zunahme der  $\text{G}_0/\text{G}_1$ -Phasezellen und einer Abnahme der Zellen in der S- und  $\text{G}_2/\text{M}$ -Phase ab  $100 \mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ . Durch Anwendung von  $200 \mu\text{M}$  konnte noch eine leichte Verstärkung dieser Effekte beobachtet werden. Die niedrigste Konzentration von  $25 \mu\text{M}$  hatte dagegen keinen Einfluß. Zwischen einer ein- und zweistündigen Einwirkzeit gab es keine signifikanten Unterschiede, d. h. das Ausmaß der Veränderungen im Zellzyklus erfuhr durch eine verlängerte Exposition keine Verstärkung.

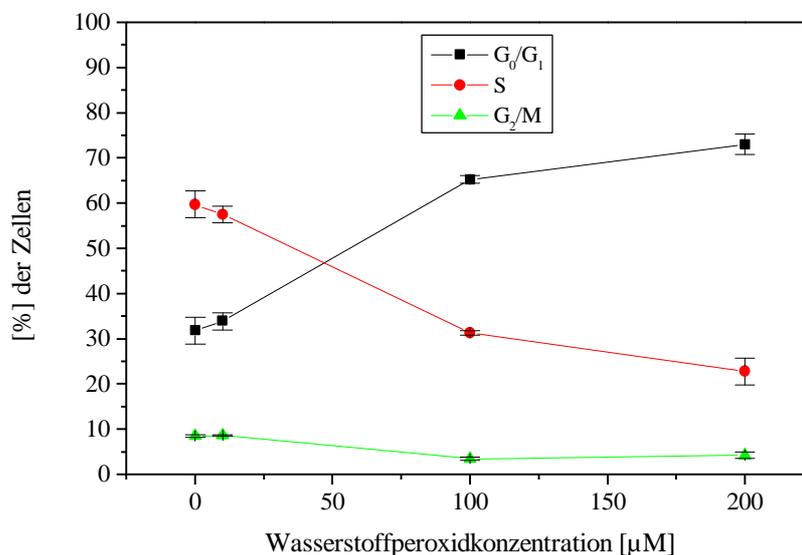


Abb. 22: Einfluß einer einstündigen Einwirkung von Wasserstoffperoxid auf das prozentuale Zellzyklusphasenverteilungsmuster humaner Keratinozyten (NHEK) 24 h nach der Schädigung.  $n = 3$

Orientierend an den vorangegangenen Versuchen mit HaCaT-Keratinozyten erfolgte die Festlegung des Studiendesigns bei Verwendung von NHEK. Da an der HaCaT-Kultur keine zusätzlichen Steigerungen der Effekte durch eine zweistündige Inkubation erreicht werden konnten, beschränkten sich die Versuche an NHEK auf eine Expositionsdauer von 1 h. Auch hier zeigten sich 24 h nach erfolgter Schädigung ebenfalls charakteristische Alterationen im Zellzyklus (Abb. 22). Während niedrige Konzentrationen von  $10 \mu\text{M}$  ohne Einfluß auf den Prozentsatz der Keratinozyten in den einzelnen Zellzyklusfraktionen blieben, kam es nach Behandlung mit  $100 \mu\text{M}$  für 1 h zu einem drastischen Anstieg der Zellen in der  $\text{G}_0/\text{G}_1$ -Phase und zu einem starken Abfall der S-Phasezellen. Nach Anwendung von  $200 \mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  konnten diese Effekte in geringem Ausmaß

verstärkt werden. Im Gegensatz zu den Versuchen an den HaCaT-Zellen blieb die G<sub>2</sub>/M-Phase bei den NHEK nahezu unbeeinflusst. Die ausgelösten Effekte auf die prozentuale Verteilung der Zellen auf die G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>- bzw. der S-Phase waren stärker ausgeprägt. Die NHEK reagierten auf einen einstündigen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Reiz im Vergleich zu den HaCaT-Zellen wesentlich sensibler.

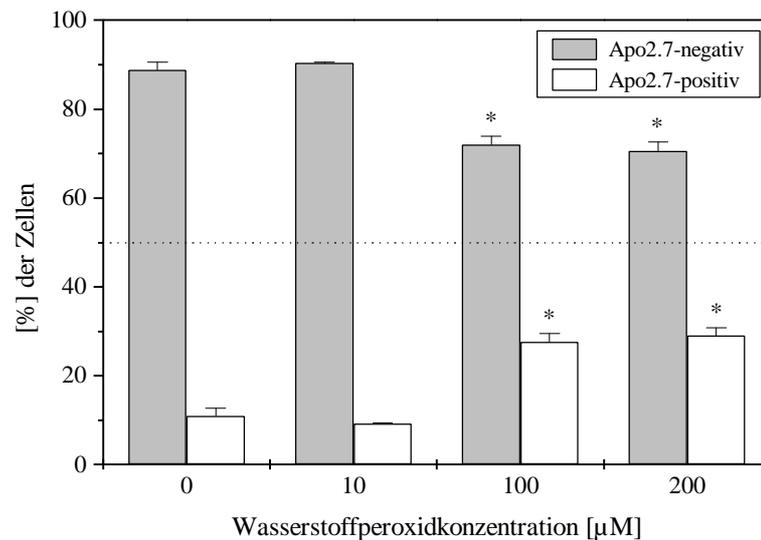


Abb. 23: Einfluß einer einstündigen Wasserstoffperoxideinwirkung auf den apoptotischen Zelltod humaner Keratinozyten (NHEK) 24 h nach der Zellschädigung (Methode: flowzytometrische Bestimmung von Apo2.7). \*  $p < 0,05$  im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle;  $n = 3$

Neben der Wirkung von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> auf das Zellzyklusphasenverteilungsmuster humaner Keratinozyten wurde zur Charakterisierung des Einflusses einer einstündigen Wasserstoffperoxideinwirkung in NHEK 24 h nach erfolgter Zellschädigung der mitochondriale Apoptosemarker Apo2.7 herangezogen. Das Ergebnis ist in Abbildung 23 aufgezeigt. Eine Behandlung der NHEK mit Wasserstoffperoxidkonzentrationen von 100 µM und 200 µM führte zu einem signifikanten Anstieg der Apo2.7-positiven Zellen und zu einer Abnahme der Apo2.7-negativen Zellen, wobei die nichtapoptotische Zellpopulation in ihrer Gesamtheit überwog. Das Ausmaß der Zunahme apoptotischer Zellen war bei 100 µM und 200 µM gleich ausgeprägt. Konzentrationen von 10 µM zeigten dagegen keine Veränderungen im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle.

### 4.2.1 Diskussion

In unseren Experimenten zum Einfluß von  $H_2O_2$  auf kultivierte humane epidermale Keratinozyten konnten neben einer deutlichen dosisabhängigen Abnahme der DNA-Syntheserate (BrdU-Einbau) und der Lebendzellanzahl (Vitalfärbung) starke Veränderungen im Zellzyklus festgestellt werden. Während niedrige Konzentrationen ( $10 \mu M$  bzw.  $25 \mu M$ ) von den humanen Hautzellen gut vertragen wurden, zeigten sich ab  $100 \mu M$  deutliche Auswirkungen auf die prozentuale Verteilung der Zellen in den einzelnen Zellzyklusphasen. Die Keratinozyten (HaCaT und NHEK) reagierten auf dieses externe Signal mit einer Akkumulation der Zellen in der  $G_0/G_1$ -Phase unter gleichzeitiger Abnahme der S-Phasezellen. Ein derartiger Arrest in  $G_0/G_1$  als Folge einer  $H_2O_2$ -Behandlung wurde ebenfalls von Bladier et al., 1997 an humanen Fibroblastenzellen beschrieben. Clopton und Saltman (1995) konnten an chinesischen Hamstereizellkulturen als Reaktion auf einen  $H_2O_2$ -induzierten oxidativen Stress neben einem Arrest in  $G_1$  einen weiteren in  $G_2/M$  nachweisen.

Daneben ist bekannt, daß Wasserstoffperoxid beispielsweise über die Fenton-Reaktion mit der daraus resultierenden Generierung von Hydroxylradikalen an der Schädigung der DNA beteiligt ist (Imlay et al., 1988). Die Zellen können auf derartige DNA-schädigende Einflüsse mit einer Blockierung des Zellzyklusses bzw. bei großen, irreparablen Schäden mit der Auslösung des programmierten Zelltodes (Apoptose) reagieren (Hartwell und Kastan, 1994).

Die Fähigkeit der Arretierung stellt dabei einen physiologischen Schutzmechanismus dar, der eine Replikation der Zellen mit geschädigtem Genom verhindern soll. Die Zelle erhält dadurch die Möglichkeit, aufgetretene Schäden durch verschiedene Reparaturmechanismen zu beseitigen und genetische Alterationen auszuschließen. Beteiligt an diesem Regulationsmechanismus im Zellzyklus sind bestimmte Kontrollpunkte, sogenannte „Checkpoints“, die sich am  $G_1/S$ -Übergang und am  $G_2/M$ -Übergang befinden. Diese komplexen Signaltransduktionssysteme bedingen wesentlich den korrekten Ablauf des Zellzyklusses und die genetische Stabilität einer Zelle. Eine Übersicht über die komplexen Mechanismen und das heutige Verständnis der Zellzykluskontrolle und -regulation wird von Funk und Kind (1997) gegeben.

Neben den beobachteten Veränderungen in der prozentualen Zellzyklusphasenverteilung konnte unter Verwendung von NHEK 24 h nach einstündiger Wasserstoffperoxidexposition ( $100 \mu M$  und  $200 \mu M$ ) durch Bestimmung des mitochondrialen Membranproteins Apo2.7 eine geringe Auslösung der Apoptose nachgewiesen werden. Dieser Prozess besitzt aber im Vergleich zur Zellzyklusregulation eher untergeordnete Bedeutung. Eine Konzentration von  $10 \mu M$  hatte sowohl auf apoptotische Prozesse als auch auf die Verteilung der einzelnen Zellzyklusphasen keinen Einfluß.

### 4.3 Untersuchungen des zytoprotektiven Potentials gegenüber schädigenden Noxen

Nachdem die Wirkung der ausgewählten definierten antioxidativen Einzelsubstanzen auf die Proliferation der humanen Keratinozyten charakterisiert und die epidermale Verträglichkeit eingeschätzt wurde, erfolgte die Untersuchung des zytoprotektiven Potentials im keratinozytären Zellsystem gegenüber verschiedenen externen schädigenden Reizen.

Die vorausgegangenen Untersuchungen zur epidermalen Verträglichkeit bildeten dabei die Grundlage für die Festlegung eines untoxischen Konzentrationsbereiches. Ein Schutzpotential der eingesetzten Substanzen (Rutin, Melatonin und N-Acetylserotonin) sollte anhand der Verminderung exogen hervorgerufener Proliferationsveränderungen (DNA-Synthese und Lebendzellanzahl) beurteilt werden. Experimentell erfolgte eine Schädigung der humanen Keratinozyten durch Anwendung verschiedener Zellschädigungsmodelle. Auf der einen Seite wurden die UV-A und UV-B Strahlung als physikalische und umweltrelevante Noxe und andererseits Wasserstoffperoxid, Decylhydroperoxid und Ammoniumeisen-(II)-sulfat als chemische Noxen verwendet (Kap. 3.5). Die eingesetzten UV-Strahlungsdosen und Konzentrationen an Decylhydroperoxid orientierten sich an Arbeiten von Göhring (1999).

#### 4.3.1 Zytoprotektives Potential von Rutin im Keratinozytenmodell

Aufgrund der guten Verträglichkeit an epidermalen Hautzellen über einen großen variablen Konzentrationsbereich (Kap. 4.1.1.3) wurde die Fähigkeit des Glykosides Rutin überprüft, eine Zytoprotektion humaner Keratinozyten herbeizuführen.

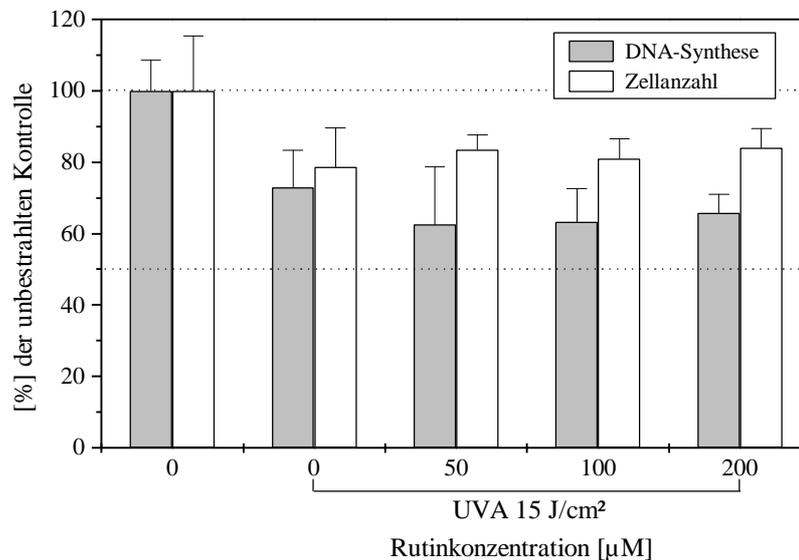


Abb. 24: Einfluß von Rutin auf die UV-A induzierte Verminderung der DNA-Syntheserate (Methode: BrdU-Einbau) und der Zellanzahl (Methode: Vitalitätstest) humaner Keratinozyten (HaCaT) 24 h nach der Schädigung. Die Zellen wurden 2 h mit Rutin vorinkubiert. Während der UV-A Bestrahlung erfolgte keine Rutinsupplementierung.

\*  $p < 0,05$  bestrahlte Zellen im Vergleich zur bestrahlten Kontrolle;  $n = 11-12$

Eine alleinige Behandlung der HaCaT-Zellen mit Rutin 2 h vor der UV-A Exposition mit der Dosis von 15 J/cm<sup>2</sup> wirkte sich nicht protektiv auf die Proliferationsverminderung gemessen an den Parametern DNA-Synthese und Lebenszellanzahl aus (Abb. 24).

Wurden dagegen die Keratinozyten auch während des Bestrahlungsvorganges mit Rutin supplementiert, zeigte sich ein deutlicher Einfluß auf die UV-A induzierte Verminderung der DNA-Syntheserate (Abb. 25). Bereits nach Einsatz einer Konzentration von 50 µM Rutin konnte eine Protektion der Proliferationsverminderung erzielt werden.

Eine Verwendung höherer Konzentrationen (100 µM und 200 µM) hatte keine zusätzliche Steigerung der Schutzeffekte zur Folge.

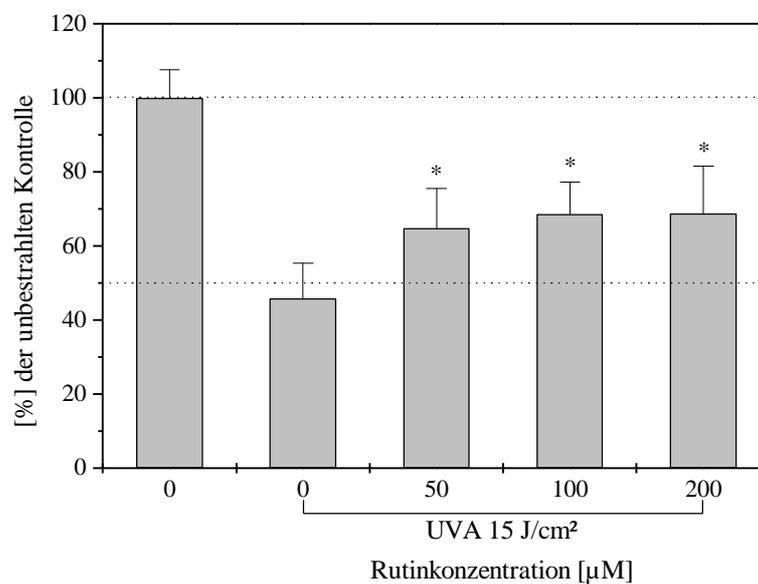


Abb. 25: Einfluß von Rutin auf die UV-A induzierte Verminderung der DNA-Syntheserate (BrdU-Einbau) humaner Keratinozyten (HaCaT) 24 h nach der Schädigung. Die Zellen wurden 2 h mit Rutin vorinkubiert. Während der UV-A Bestrahlung erfolgte eine Rutinsupplementierung. \*  $p < 0,05$  bestrahlte Zellen im Vergleich zur bestrahlten Kontrolle;  $n = 12-24$

Ein ähnliches Verhalten konnte nach UV-B Bestrahlung beobachtet werden (Abb. 26). Wenn Rutin neben einer Vorinkubationszeit von 2 h auch während der Bestrahlung mit 100 mJ/cm<sup>2</sup> UV-B auf den humanen Keratinozyten verblieb, konnten signifikante Zytoprotektionen erreicht werden. Rutinkonzentrationen von 50 µM, 100 µM und 200 µM zeigten eine Verminderung der UV-B bedingten Abnahme der DNA-Synthese. Der Abfall der Lebenszellanzahl wurde durch 100 µM und 200 µM signifikant verringert.

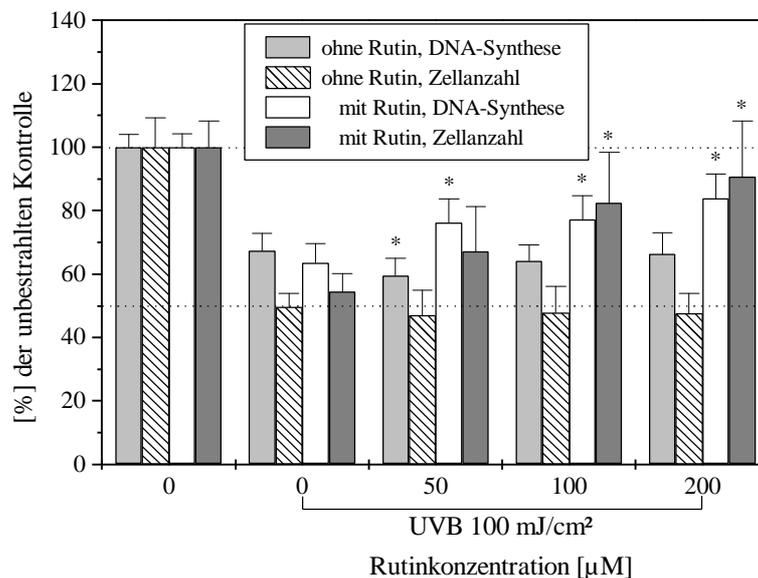


Abb. 26: Bestimmung der DNA-Syntheserate (BrdU-Einbau) und der Lebendzellanzahl (Vitalfärbung) humaner Keratinozyten (HaCaT) 24 h nach UV-B Bestrahlung (100 mJ/cm<sup>2</sup>). Die Zellen wurden 2 h mit Rutin vorinkubiert. Während der Bestrahlung erfolgte entweder eine oder keine gleichzeitige Rutinsupplementierung in PBS. \* p < 0,05 bestrahlte Zellen im Vergleich zur bestrahlten Kontrolle; n = 22-24

Neben der Untersuchung der Schutzeffekte gegenüber einer UV-A und UV-B Exposition erfolgte die Überprüfung der protektiven Kapazität von Rutin gegenüber einer schädigenden Wasserstoffperoxideinwirkung. Dazu wurden die humanen Keratinozyten (HaCaT) mit Rutin für 2 h vorinkubiert und während einer nachfolgenden H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Schädigung mit oder ohne Rutin versetzt. Die Ergebnisse dieses experimentellen Ansatzes sind in den Abbildungen 27 und 28 dargestellt.

Nach 24 h konnte weder durch eine alleinige Vorinkubation (Abb. 27) noch durch eine zusätzliche Behandlung der Keratinozyten mit Rutin (Abb. 28) während der Exposition mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0,2 mM; 1 h) eine Protektion anhand der Proliferationsparameter DNA-Synthese und Lebendzellanzahl nachgewiesen werden.

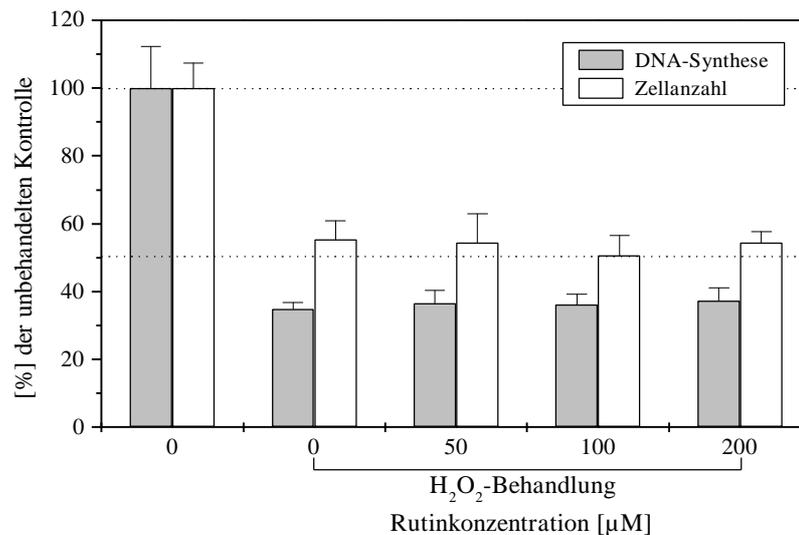


Abb. 27: Einfluß von Rutin auf die H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induzierte DNA-Syntheseverminderung (BrdU-Einbau) und Zellanzahlabnahme (Vitalfärbung) humaner Keratinozyten (HaCaT). Die Zellen wurden 2 h mit Rutin vorinkubiert, das Medium von den Zellen entfernt, für 1 h mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in PBS inkubiert (Endkonzentration: 0,2 mM) und nach erfolgtem Mediumwechsel für 24 h kultiviert. Während der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Schädigung erfolgte keine gleichzeitige Rutinsupplementierung. \* p < 0,05 behandelte Zellen im Vergleich zur behandelten Kontrolle; n = 11-12

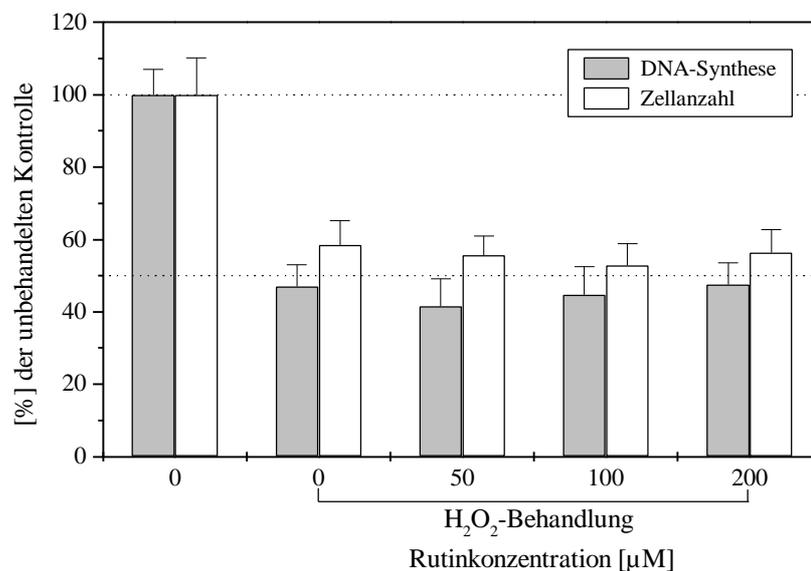


Abb. 28: Einfluß von Rutin auf die H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induzierte DNA-Syntheseverminderung (BrdU-Einbau) und Zellanzahlabnahme (Vitalfärbung) humaner Keratinozyten (HaCaT). Die Zellen wurden 2 h mit Rutin vorinkubiert, das Medium von den Zellen entfernt, für 1 h mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in PBS inkubiert (Endkonzentration: 0,2 mM) und nach erfolgtem Mediumwechsel 24 h kultiviert. Während der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Schädigung erfolgte eine gleichzeitige Rutinsupplementierung. \* p < 0,05 behandelte Zellen im Vergleich zur behandelten Kontrolle; DNA-Synthese: n = 23-24; Zellanzahl: n = 11-12

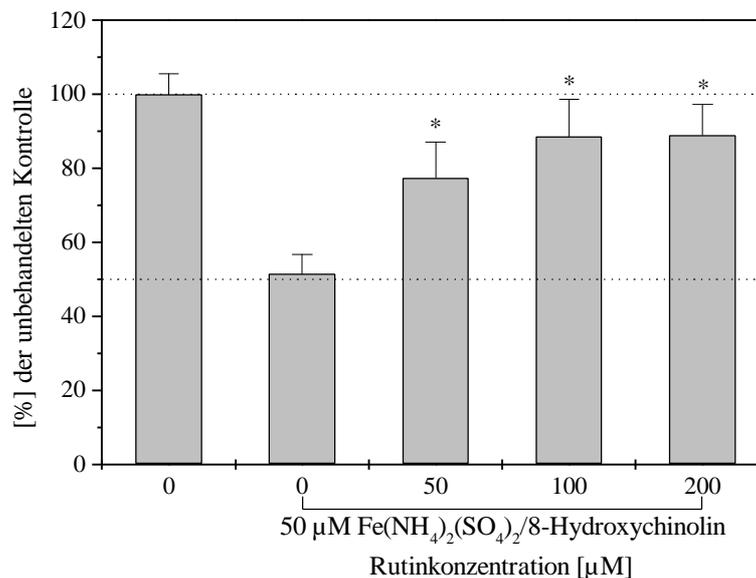


Abb. 29: Wirksamkeit von Rutin gegenüber einer  $\text{Fe}^{2+}$ -induzierten Zytotoxizität in humanen Keratinozyten (HaCaT). Die Zellen wurden 2 h vorinkubiert, anschließend mit einer äquimolaren Lösung von Ammoniumeisen-(II)-sulfat/8-Hydroxychinolin ( $50 \mu\text{M}$ ) versetzt und nach 24 h ein Vitalitätstest durchgeführt. \*  $p < 0,05$  behandelte Zellen im Vergleich zur behandelten Kontrolle;  $n = 44\text{-}48$

Als weitere schädigende Noxe wurde das System Ammoniumeisen-(II)-sulfat/8-Hydroxychinolin als Modell für eisenkatalysierte Radikalbildungsprozesse angewandt. Nach einer zweistündigen Vorinkubationszeit mit Rutin erfolgte die Exposition der humanen Hautzellen mit einer äquimolaren Lösung von Ammoniumeisen-(II)-sulfat und 8-Hydroxychinolin ( $50 \mu\text{M}$ ) zur Erzeugung einer  $\text{Fe}^{2+}$ -induzierten Zytotoxizität. Während des Schädigungsprozesses verblieb Rutin im Kulturmedium.

Die Abbildung 29 zeigt die Resultate des Vitalitätstestes nach 24 h. Die HaCaT-Keratinozyten reagierten auf diesen externen Reiz mit einer starken Abnahme der Zellanzahl um 50% im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Nach Einsatz von  $50 \mu\text{M}$  Rutin kam es zu einer signifikanten Verringerung dieser toxischen Wirkung. Nach Anwendung von  $100 \mu\text{M}$  konnte der Schutzeffekt noch gesteigert werden. Eine Erhöhung der Rutinkonzentration auf  $200 \mu\text{M}$  erbrachte keine weitere Steigerung des protektiven Effektes.

#### 4.3.1.1 Diskussion

Die durchgeführten Untersuchungen sollten klären, ob durch Einsatz von Rutin ein Schutz humaner Keratinozyten vor einer oxidativ bzw. UV-bedingten Zytotoxizität herbeigeführt werden kann. Es ist bekannt, daß die unterschiedlichen Flavonoide, wie z. B. Quercetin und Rutin in den oxidativen Stoffwechsel eingreifen können. Dabei zeichnen sich diese polyphenolischen Verbindungen durch

ihre direkten Radikalfängereigenschaften sowie durch eine direkte Hemmwirkung auf bestimmte Enzyme aus (Elstner, 1990; Merk et al., 1991).

Neben den wichtigen strukturellen Voraussetzungen für die antioxidativen Eigenschaften (Kap. 2.5.2) ist die Fähigkeit zur Interaktion mit Lipidmembranen und die Penetration durch diese von Bedeutung (Saija et al., 1995).

Die dargestellten Ergebnisse belegen UV-Protektionen an humanen Keratinozyten (HaCaT), wenn das Glykosid Rutin zusätzlich zur Vorinkubation (2 h) während der UV-B (100 mJ/cm<sup>2</sup>) bzw. der UV-A (15 J/cm<sup>2</sup>) Exposition auf den Zellen verbleibt. Kootstra, 1994 zeigte einen Schutzeffekt verschiedener isolierter Flavonoide (Naringenin, Rutin) und eines Flavonoidextraktes auf einen UV-B induzierten DNA Schaden. Die UV-protective Wirkung kam dabei, wie bei unseren Versuchen, durch die Fähigkeit der Flavonoide zur UV-Absorption zustande.

Nakayama et al., 1992 und 1993 wiesen protektive Effekte gegen eine Wasserstoffperoxid vermittelte Zytotoxizität an chinesischen Hamster V79 Zellen (Koloniebildungsassay) nach Inkubation mit verschiedenen Flavonoiden nach. Diese Schutzwirkung konnte an den humanen Keratinozyten nach erfolgter H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Schädigung und durch Einsatz von Rutin nicht bestätigt werden. Sowohl eine alleinige Vorinkubation der Zellen für 2 h als auch eine weitergehende Behandlung mit Rutin während der einstündigen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Behandlung hatte keinen schützenden Einfluß. Denkbar für diesen Effekt ist die zu geringe Aufnahme von Rutin in den Keratinozyten bzw. die fehlende Einlagerung in die Zellmembran aufgrund der geringeren Lipophilie und des großen gebundenen Zuckerrestes. Durch diesen wird zusätzlich eine für die antioxidative Wirkung wichtige Hydroxylgruppe besetzt (Kap. 2.5.2).

Im Gegensatz dazu zeigte eine Anwendung von Rutin ein ausgeprägtes Schutzpotential gegenüber einer Fe<sup>2+</sup>-induzierten Zytotoxizität an humanen Keratinozyten. Dieser Befund kann durch die Möglichkeit zur Chelatisierung von Metallionen aufgrund der polyphenolischen Struktur erklärt werden (Morel et al., 1994). Da Eisen an verschiedenen Radikalbildungsprozessen beteiligt ist, wie z. B. an der Generierung von Hydroxylradikalen über die Fenton-Reaktion, können durch diesen Mechanismus bedingte biologische Konsequenzen vermindert bzw. die Initiierung pathologischer Zustände infolge freier Radikale durch Einsatz von Rutin supprimiert werden. Untersuchungen von Kozlov et al., 1994 zeigten beispielsweise eine Verminderung der Lipidperoxidation in Rattenhirn-homogenaten durch Rutin infolge der Bildung von Fe<sup>2+</sup>-Chelator-komplexen. Afanas'ev et al., 1989 und 1995 befaßten sich in ihren Arbeiten ausführlich mit den chelatisierenden Eigenschaften, der Wirkung als Radikalfänger und dem Mechanismus der Inhibierung lipidperoxidativer Prozesse durch die Flavonoide Rutin und Quercetin. Sie fanden, daß beide Flavonoide effektive Inhibitoren in einem eisenabhängigen Lipidperoxidationssystem waren und durch ihre Fähigkeit zur Chelatisierung von Eisenionen mit der Formierung inerter Eisen-Flavonoid-Komplexe wirken. Die gebildeten Eisenkomplexe der Flavonoide behalten dabei ihre Radikalfängereigenschaften bei. Es konnte weiterhin nachgewiesen werden, daß der Mechanismus dieser Chelatisierung für die Schutzwirkung der Substanz Rutin bedeutender ist als für Quercetin. Insgesamt kommen Afanas'ev et al., 1989 zu dem Schluß, daß Rutin und Quercetin radikalbedingte Prozesse in drei Stadien vermindern können. Zum einen wird ein Einfluß auf die Formierung von Superoxidationradikalen und die Bildung von Lipidperoxyradikalen ausgeübt. Andererseits wird eine verminderte Generierung von Hydroxylradikalen in der Fenton Reaktion diskutiert. Weiterhin konnte nachgewiesen werden, daß der gebildete Eisen-Rutin-Komplex unter physiologischen pH-Werten stabil war und keine prooxidativen Eigenschaften zeigte. Das kalkulierte Eisen-Rutin-Verhältnis wurde bei pH 7.4 als 1:2 angegeben. Dieses Ergebnis korreliert mit unseren Resultaten, die aus der

Abbildung 29 entnommen werden können. Eine Steigerung der Rutinkonzentration von 100  $\mu\text{M}$  auf 200  $\mu\text{M}$  verursachte keinen zusätzlichen Schutz der humanen Keratinozyten. Im Gegensatz dazu konnte der protektive Effekt von 50  $\mu\text{M}$  Rutin auf eine  $\text{Fe}^{2+}$ -induzierte Zytotoxizität (50  $\mu\text{M}$   $\text{Fe}^{2+}$ ) durch Verwendung von 100  $\mu\text{M}$  Rutin gesteigert werden.

#### 4.3.2 Zytoprotektives Potential von Melatonin im Keratinozytenmodell

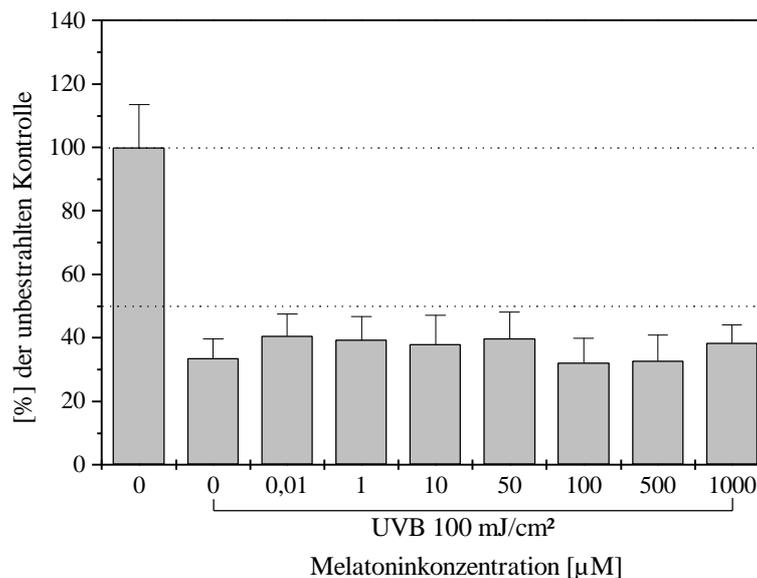


Abb. 30: Bestimmung der DNA-Syntheserate humaner Keratinozyten (HaCaT) 24 h nach UV-B Bestrahlung (100 mJ/cm<sup>2</sup>). Die Zellen wurden 2 h mit Melatonin vorinkubiert und während der UV-B Bestrahlung erfolgte keine gleichzeitige Melatonin-supplementierung. \*  $p < 0,05$  bestrahlte Zellen im Vergleich zur bestrahlten Kontrolle;  $n = 12$

Zur Prüfung der Wirksamkeit von Melatonin gegenüber einer UV-B vermittelten Proliferationsverminderung wurden die HaCaT-Keratinozyten in 96er MTP unterschiedlichen Inkubations-schemen unterworfen. Die Abbildung 30 zeigt die DNA-Syntheserate 24 h nach erfolgter UV-B Bestrahlung mit 100 mJ/cm<sup>2</sup>. Dabei wurden die Keratinozyten 2 h mit verschiedenen Melatoninkonzentrationen (0,01  $\mu\text{M}$  bis 1000  $\mu\text{M}$ ) vorinkubiert. Während des Bestrahlungsvorganges erfolgte keine Melatonin-supplementierung. In ihrer zellulären Antwort reagierten die bestrahlten Hautzellen (HaCaT) mit einer deutlichen Hemmung der DNA-Syntheserate (BrdU-Einbau). Eine Vorinkubation der Zellen erbrachte keine sichtbaren protektiven Effekte.

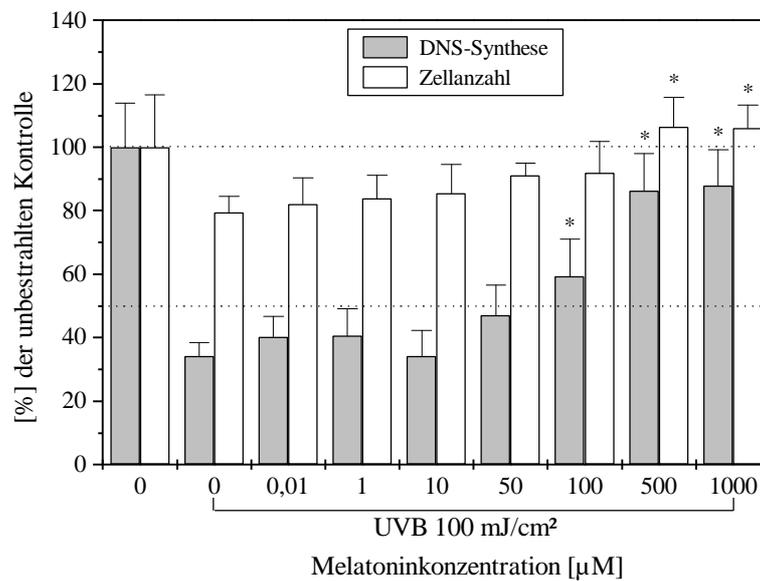


Abb. 31: Bestimmung der DNA-Syntheserate (BrdU-Einbau) und der Lebendzellanzahl (LDH-Aktivitätsbestimmung im Zelllysat) humaner Keratinozyten (HaCaT) 24 h nach UV-B Bestrahlung (100 mJ/cm<sup>2</sup>). Die Zellen wurden 2 h mit Melatonin vorinkubiert und während der UV-B Bestrahlung erfolgte eine gleichzeitige Melatoninsupplementierung in PBS. \*  $p < 0,05$  bestrahlte Zellen im Vergleich zur bestrahlten Kontrolle. (Zellanzahl:  $n = 6$ , DNA-Synthese:  $n = 17-18$ )

Im Kontrast dazu wurde nach zweistündiger Vorinkubation und gleichzeitiger Melatoninsupplementierung während der UV-B Bestrahlung eine eindeutige Zytoprotektion nach 24 h nachgewiesen (Abb. 31). Diese zeigte sich durch eine dosisabhängige Hemmbarkeit der UV-B vermittelten Proliferationsverminderung anhand der untersuchten Parameter DNA-Syntheserate (100  $\mu\text{M}$  bis 1000  $\mu\text{M}$ ) und Lebendzellanzahl (500  $\mu\text{M}$  und 1000  $\mu\text{M}$ ).

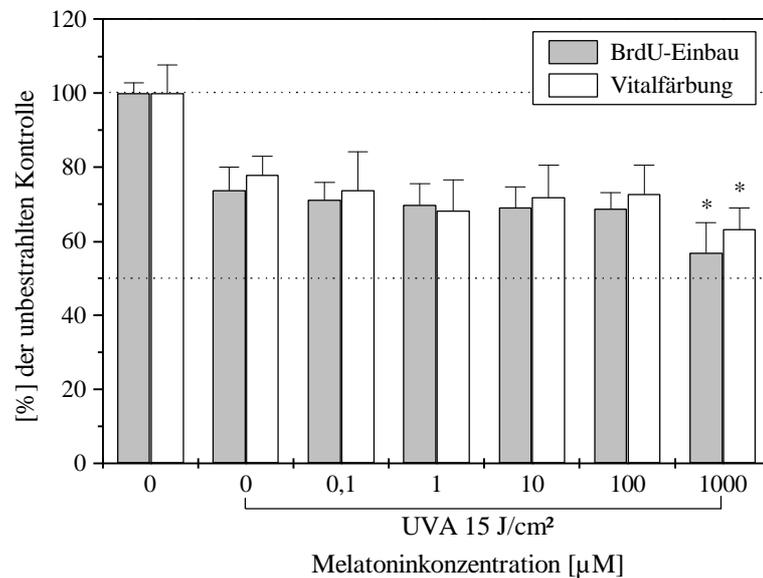


Abb. 32: DNA-Syntheserate und Lebendzellanzahl humaner Keratinozyten (HaCaT) 24 h nach UV-A Bestrahlung (15 J/cm<sup>2</sup>). Die Zellen wurden 2 h vorinkubiert und während der Bestrahlung erfolgte eine gleichzeitige Supplementierung mit Melatonin in PBS. \*  $p < 0,05$  bestrahlte Zellen im Vergleich zur bestrahlten Kontrolle;  $n = 18-36$

In einem nächsten Schritt sollte die Effektivität einer Zytoprotektion von Melatonin an der UV-A exponierten Keratinozytenzellkultur überprüft werden. In der Abbildung 32 sind die Ergebnisse zur Bestimmung der DNA-Syntheserate (BrdU-Einbau) und der Lebendzellanzahl (Vitalfärbung) dargestellt. Die HaCaT-Keratinozyten wurden für 2 h vorinkubiert. Während der Exposition mit UV-A (15 J/cm<sup>2</sup>) fand eine gleichzeitige Behandlung mit Melatonin statt. Nach Durchführung dieses Versuchsdesigns konnten keine Zytoprotektionen nachgewiesen werden. Interessanterweise kam es bei der Zellpopulation, die eine Behandlung mit der höchsten Melatoninkonzentration von 1 mM erfuhr, zu einer zusätzlichen signifikanten Abnahme der BrdU-Einbauwerten und der Lebendzellanzahl.

Zur Klärung dieser gesteigerten Toxizität und des Mechanismus der Zellschädigung nach UV-A Bestrahlung und simultaner Melatoninbehandlung schloß sich eine Untersuchung des apoptotischen bzw. nekrotischen Zelltodes an. Daneben erfolgte die Untersuchung des Zellzyklusses.

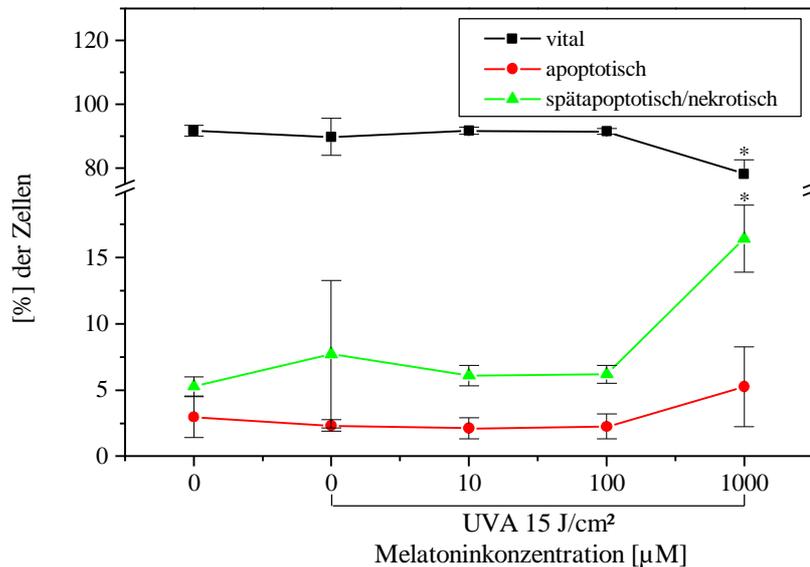


Abb. 33: Einfluß einer gleichzeitigen Melatoninsupplementierung während der UV-A Bestrahlung auf den apoptotischen bzw. spätapoptotischen/nekrotischen Zelltod humaner Keratinozyten (HaCaT) nach 24 h (Methode: flowzytometrische Bestimmung von Annexin-V/PI). Die Vorinkubation der Zellen betrug 2 h. \*  $p < 0,05$  bestrahlte Zellen im Vergleich zur bestrahlten Kontrolle;  $n = 4$

Die Abbildung 33 zeigt die Ergebnisse einer Bestimmung der Phosphatidylserintranslokation an die äußere Zytoplasmamembran mittels Annexin-V/PI am Durchflußzytometer. Es wurde das gleiche Inkubationsschema wie für Abbildung 32 verwendet.

Die höchste eingesetzte Konzentration an Melatonin von 1 mM verursachte einen deutlichen Anstieg Annexin-V- und PI-positiver Zellen. Eine signifikante Zunahme rein apoptotischer Zellen konnte nicht festgestellt werden. Alle anderen Konzentrationen, die auch keinen Einfluß auf die DNA-Syntheserate und die Lebendzellanzahl hatten, blieben auch hier ohne Auswirkungen. Ebenso konnte nach alleiniger UV-A Bestrahlung keine Phosphatidylserintranslokation nachgewiesen werden.

Weiterhin wurde das für frühapoptotische Prozesse charakteristische mitochondriale Membranprotein Apo2.7 nach gleichartiger Behandlung der humanen Hautzellen bestimmt. In der Abbildung 34 sind die Apo2.7-positiven bzw. -negativen Zellen in ihrer prozentualen Verteilung dargestellt. Auch hier konnte ein deutlicher Anstieg Apo2.7-positiver Keratinozyten, d. h. apoptotischer Zellen, bei 1 mM Melatonin und gleichzeitiger UV-A Bestrahlung nach 24 h detektiert werden.

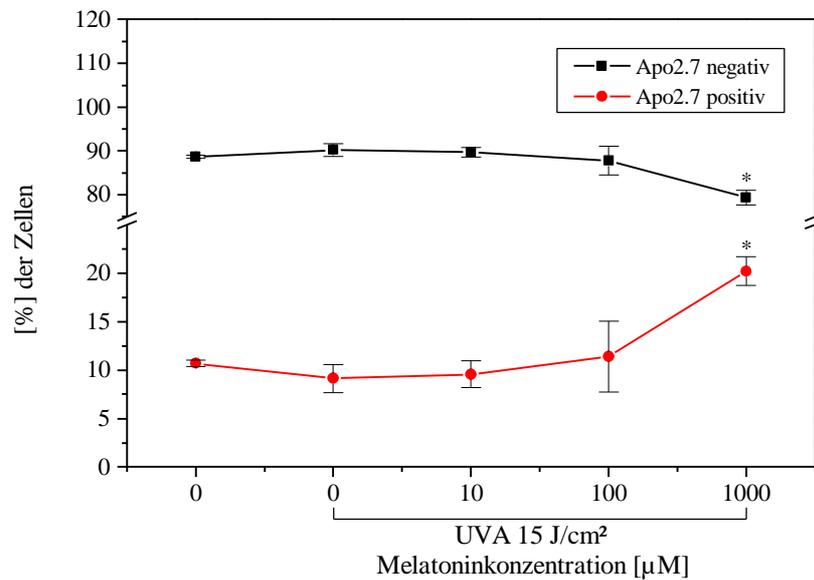


Abb. 34: Einfluß einer gleichzeitigen Melatoninsupplementierung während der UV-A Bestrahlung (15 J/cm<sup>2</sup>) auf den apoptotischen Zelltod humaner Keratinozyten (HaCaT) nach 24 h (Methode: flowzytometrische Bestimmung von Apo2.7). Die Vorinkubation der Zellen betrug 2 h. \* p < 0,05 bestrahlte Zellen im Vergleich zur bestrahlten Kontrolle; n = 4)

Tab. 7: Prozentuale Zellzyklusphasenverteilung humaner Keratinozyten (HaCaT) 24 h nach UV-A Bestrahlung (15 J/cm<sup>2</sup>) und gleichzeitiger Melatoninsupplementierung. Die Zellen wurden 2 h mit Melatonin vorinkubiert. (Mittelwert ± SD; n = 3), \* p < 0,05 bestrahlte Zellen im Vergleich zur bestrahlten Kontrolle

Konzentration [µM]	UV-A Bestrahlung [J/cm <sup>2</sup> ]	Zellzyklusphasenverteilung [%]		
		G <sub>0</sub> /G <sub>1</sub>	S	G <sub>2</sub> /M
0	0	37,21 ± 0,94	43,68 ± 1,37	19,12 ± 0,45
0	15	23,12 ± 1,48	64,16 ± 1,64	12,72 ± 0,61
10	15	23,92 ± 0,29	63,10 ± 0,90	12,99 ± 0,64
100	15	27,59 ± 1,83	60,42 ± 2,19	12,00 ± 0,41
1000	15	51,67 ± 0,27 *	37,01 ± 1,39 *	11,31 ± 1,18

Bei Betrachtung des Zellzyklusphasenverteilungsmusters humaner Keratinozyten (HaCaT) 24 h nach UV-A Exposition mit  $15 \text{ J/cm}^2$  und gleichzeitiger Melatoninbehandlung (Tab. 7) konnten zusätzlich zu den ausgelösten apoptotischen Vorgängen hauptsächlich Veränderungen in der Verteilung der  $G_0/G_1$ - und S-Phase festgestellt werden. Die Keratinozyten der bestrahlten Kontrolle reagierten mit einem schwachen Abfall der Zellen in der  $G_0/G_1$ -Phase und einem Anstieg der S-Phasezellen.

Dagegen kam es in der mit 1 mM Melatonin behandelten und bestrahlten HaCaT-Zellpopulation zu einem starken Anstieg an  $G_0/G_1$ - und einem Abfall der S-Phasezellen im Vergleich zur unbestrahlten und bestrahlten LM-Kontrolle. Im Gegenzug dazu zeigten sich in der Verteilung der Zellen auf die  $G_2/M$ -Phase keine ausgeprägten Effekte. Es konnte hier ein schwacher Abfall in allen UV-A bestrahlten Zellpopulationen detektiert werden.

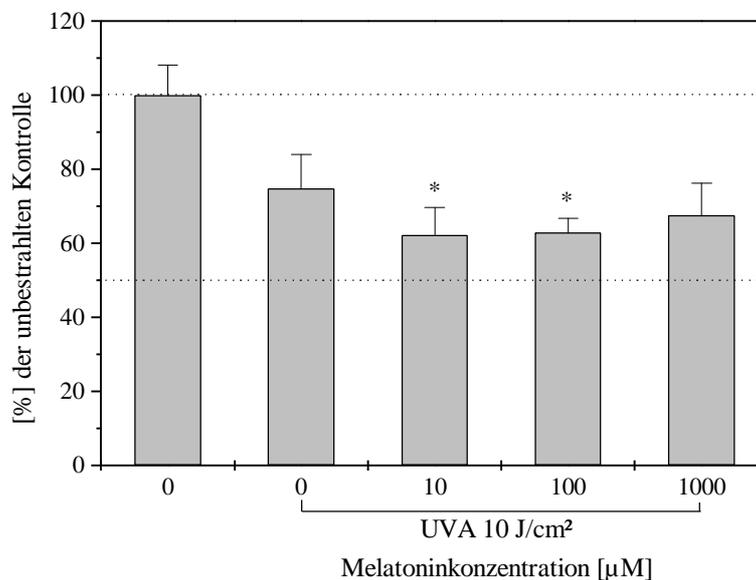


Abb. 35: DNA-Syntheserate humaner Keratinozyten (NHEK) 24 h nach UV-A Bestrahlung ( $10 \text{ J/cm}^2$ ). Die Zellen wurden 2 h vorinkubiert und während der Bestrahlung erfolgte eine gleichzeitige Supplementierung mit Melatonin in PBS. \*  $p < 0,05$  bestrahlte Zellen im Vergleich zur bestrahlten Kontrolle;  $n = 12$

Die Überprüfung des Einflusses einer UV-A Bestrahlung ( $10 \text{ J/cm}^2$ ) nach erfolgter zweistündiger Vorinkubation und gleichzeitiger Supplementierung mit Melatonin ( $10 \mu\text{M}$ ,  $100 \mu\text{M}$  und  $1000 \mu\text{M}$ ) auf die DNA-Syntheserate NHEK zeigte ein ähnliches Verhalten (Abb. 35). Wie bei den HaCaT-Zellen konnten keine Zytprotektionen nachgewiesen werden. Dagegen war eine Behandlung der NHEK mit Melatonin ( $10 \mu\text{M}$  und  $100 \mu\text{M}$ ) während der UV-A Exposition mit einer gesteigerten Toxizität, gemessen an einer zusätzlichen DNA-Syntheseverringerung nach 24 h, verbunden.

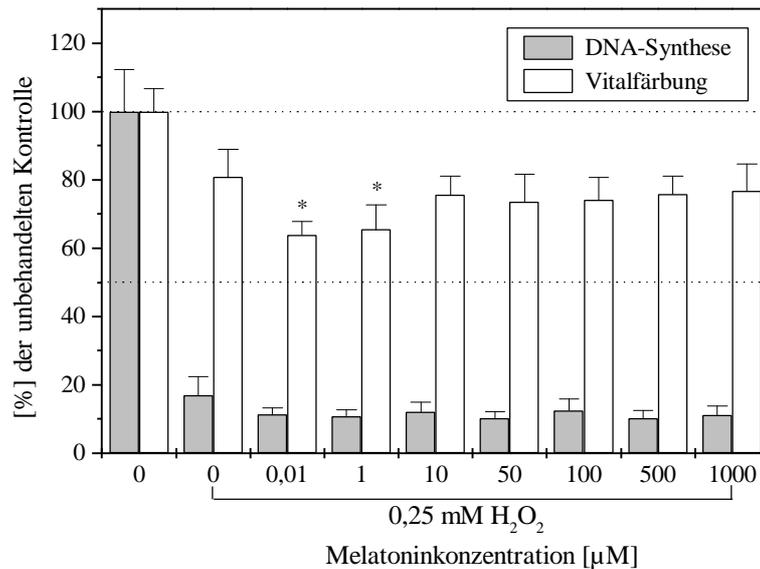


Abb. 36: Einfluß von Melatonin auf die  $\text{H}_2\text{O}_2$ -induzierte DNA-Syntheseverminderung und Zellanzahlabnahme humaner Keratinozyten (HaCaT). Die Zellen wurden 4 h mit Melatonin vorinkubiert und nach der Zugabe der  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Lösung in PBS erfolgte die Bestimmung der DNA-Syntheserate (Methode: BrdU-Einbau) und der Lebendzellanzahl (Vitalfärbung) nach 24 h. \*  $p < 0,05$  unbehandelte Zellen im Vergleich zur behandelten Kontrolle;  $n = 6$

Nachdem die Effektivität von Melatonin, humane Keratinozyten gegenüber UV-B und UV-A Strahlung zu schützen, überprüft wurde, kam als chemische, zellschädigende Noxe Wasserstoffperoxid zum Einsatz. Die Charakterisierung der Auswirkungen von Wasserstoffperoxid auf humane Keratinozyten erfolgte im Kapitel 4.2. Die Abbildung 36 zeigt den Einfluß von Melatonin auf die  $\text{H}_2\text{O}_2$ -vermittelte DNA-Syntheseverringung und Zellanzahlabnahme humaner Keratinozyten (HaCaT). Vor der Schädigung der epidermalen Hautzellen wurde 4 h mit Melatonin (0,01  $\mu\text{M}$  bis 1000  $\mu\text{M}$ ) vorinkubiert, die Zellen anschließend mit 0,25 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$  versetzt und nach 24 h die BrdU-Einbaurate und die Lebendzellanzahl bestimmt. Durch Einsatz von Melatonin konnte die starke Verringerung der DNA-Syntheserate durch keine der verwendeten Melatoninkonzentrationen vermindert werden. Auch der deutliche Abfall der Lebendzellanzahl konnte durch Anwendung des Epiphysenhormones nicht vermindert werden.

In einem anderen experimentellen Ansatz wurden die humanen Keratinozyten (HaCaT) nach vorheriger zweistündiger Inkubation mit Melatonin nur kurzzeitig für 30 min mit  $\text{H}_2\text{O}_2$  unterschiedlicher Konzentrationen (0,25 mM; 0,5 mM und 1 mM) versetzt. Nach einem Mediumwechsel und der Weiterkultivierung für 24 h erfolgte die Bestimmung der DNA-Syntheseleistung (Abb. 37). Keine der verwendeten Melatoninkonzentrationen (10  $\mu\text{M}$ , 100  $\mu\text{M}$  und 1000  $\mu\text{M}$ ) konnte die  $\text{H}_2\text{O}_2$  bedingte Verringerung der DNA-Synthese verhindern. Auffallend ist dagegen die noch zusätzlich gesteigerte Toxizität nach Anwendung von 1 mM Melatonin.

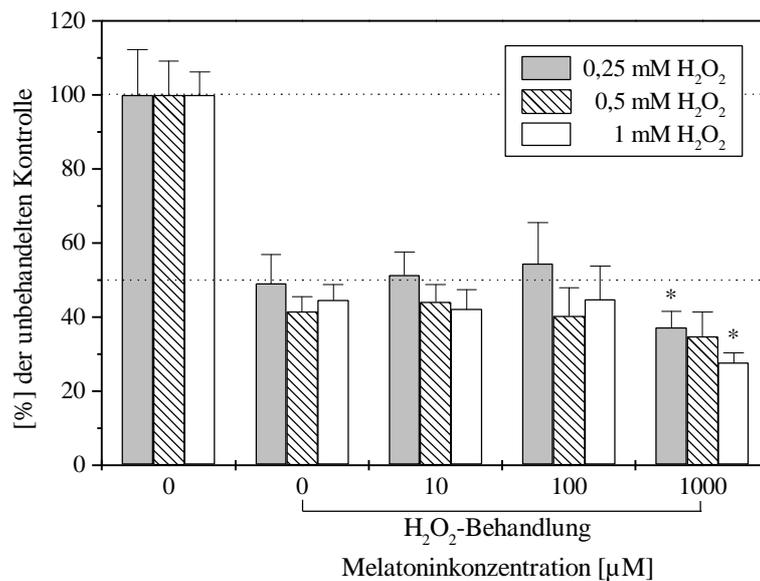


Abb. 37: Einfluß von Melatonin auf die H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induzierte DNA-Syntheseverminderung humaner Keratinozyten (HaCaT). Die Zellen wurden 2 h mit Melatonin vorinkubiert, für 30 min mit verschiedenen konzentrierten H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Lösungen (Endkonzentrationen: 0,25 mM; 0,5 mM; 1 mM) inkubiert und nach erfolgtem Mediumwechsel für weitere 24 h inkubiert. \* p < 0,05 behandelte Zellen im Vergleich zur behandelten Kontrolle; n = 12

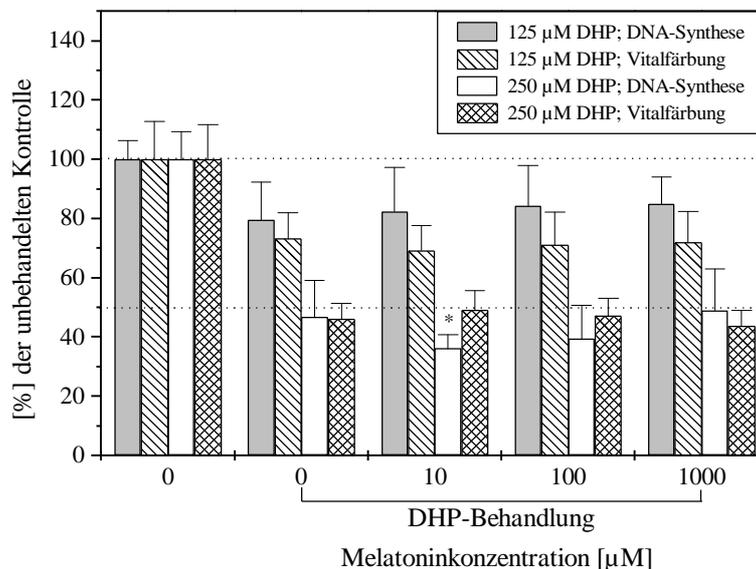


Abb. 38: Einfluß von Melatonin auf die DHP-induzierte DNA-Syntheseverminderung (BrdU-Einbau) und Zellanzahlabnahme (Vitalfärbung) humaner Keratinozyten (HaCaT). Die Zellen wurden 30 min mit Melatonin vorinkubiert, für 30 min mit DHP versetzt (125 µM, 250 µM), danach mit PBS gewaschen und nach Zugabe von frischem SFM 24 h weiterkultiviert. \* p < 0,05 behandelte Zellen im Vergleich zur behandelten Kontrolle. (BrdU-Einbau: n = 22-24; Vitalfärbung: n = 12)

Als weiterer zellschädigender Parameter neben Wasserstoffperoxid wurde die Modellsubstanz Decylhydroperoxid (DHP) in die Untersuchungen einbezogen. Hierbei handelt es sich um ein synthetisch hergestelltes, organisches Peroxid, dessen Auswirkungen auf die HaCaT-Zelllinie von Göhring (1999) anhand der DNA-Synthese, der Lebendzellanzahl, des apoptotischen und nekrotischen Zelltodes und der Zellzyklusphasenverteilung charakterisiert wurde.

Zur Überprüfung der Schutzwirkung von Melatonin gegen den DHP bedingten Abfall der DNA-Synthese und der Lebendzellanzahl wurden die HaCaT-Zellen 30 min mit Melatonin vorinkubiert und mit unterschiedlichen Konzentrationen an DHP (125  $\mu\text{M}$  und 250  $\mu\text{M}$ ) für 30 min versetzt. Es konnte ebenfalls keine Protektion durch Melatonin erzielt werden (Abb. 38).

Tab. 8: Aufnahme von Melatonin in humane Keratinozyten (HaCaT) (10000 Zellen pro well) nach einer Inkubationsdauer von 2 h. (Mittelwerte  $\pm$  SD)

Mediumkonzentration [mM]	Melotoninaufnahme [nM]	n
1	970 $\pm$ 181	11
0,1	93,9 $\pm$ 7,3	12
0,01	7,96 $\pm$ 0,9	12

Für die meisten durchgeführten Experimente wurde als Vorinkubationsschema 2 h gewählt. Um die zelluläre Aufnahme von Melatonin in die humanen Keratinozyten (HaCaT) zu bestimmen, erfolgte die Zugabe von Tritium-markiertem Melatonin zusätzlich zur unmarkierten Substanz in das Zellkulturmedium (Kap. 3.12). In Tabelle 8 sind die durch radioaktive Traceranalyse erhaltenen Resultate aufgeführt.

Als Mediumkonzentrationen an Melatonin wurden 0.01 mM, 0.1 mM und 1 mM verwendet. Im Ergebnis der Untersuchungen zeigte die zelluläre Aufnahme von Melatonin eindeutig eine Abhängigkeit von der Konzentration im Kulturmedium. Dieser Prozeß unterlag nahezu einer Proportionalität. Nach 2 h Inkubation der Zellen mit der höchsten Melatoninkonzentration von 1 mM wurden insgesamt von der Zellpopulation (10000 Zellen/well) 970  $\pm$  181 nM aufgenommen. Diese Methode diente dazu, die gesamte Aufnahme von Melatonin zu bestimmen. Eine Unterscheidung von zytosolisch und Zellmembran lokalisiertem Melatonin fand nicht statt.

### 4.3.3 Zytoprotektives Potential von N-Acetylserotonin im Keratinozytenmodell

Als weitere antioxidative Verbindung und Radikalfänger fand N-Acetylserotonin einen Einsatz. Diese Substanz stellt eine direkte biosynthetische Vorstufe von Melatonin dar (Kap. 2.6.1). Auch hier sollte das eventuelle Schutzpotential gegenüber der UV-induzierten Proliferationsveränderung humaner Keratinozyten untersucht werden. Für die nachfolgenden Untersuchungen wurden verschiedene Inkubationsschemen verfolgt. Eine alleinige Vorinkubation der Zellen (2 h) mit N-Acetylserotonin (10  $\mu$ M, 100  $\mu$ M und 1000  $\mu$ M) brachte keine Protektion vor der UV-B bedingten Abnahme der Lebenszellanzahl (Abb. 39).

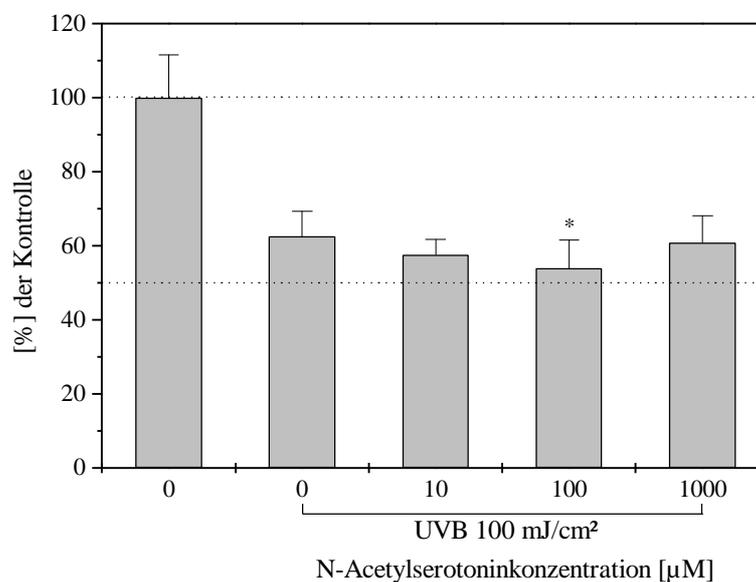


Abb. 39: Einfluß von N-Acetylserotonin auf die UV-B induzierte Verminderung der Vitalität (Lebenszellanzahl) humaner Keratinozyten (HaCaT) 24 h nach der Schädigung. Die Zellen wurden 2 h mit N-Acetylserotonin vorinkubiert und während der UV-B Bestrahlung erfolgte keine gleichzeitige Melatoninsupplementierung in PBS. \*  $p < 0,05$  bestrahlte Zellen im Vergleich zur bestrahlten Kontrolle;  $n = 23-24$

Erfolgte dagegen eine zusätzliche Inkubation während der UV-B Bestrahlung (100 mJ/cm<sup>2</sup>), konnte nach Anwendung von 1 mM N-Acetylserotonin ein deutlicher Anstieg der Lebenszellanzahl im Vergleich zur bestrahlten LM-Kontrolle erreicht werden (Abb. 40). Die niedrigen Konzentrationen von 10  $\mu$ M und 100  $\mu$ M blieben ohne Einfluß.

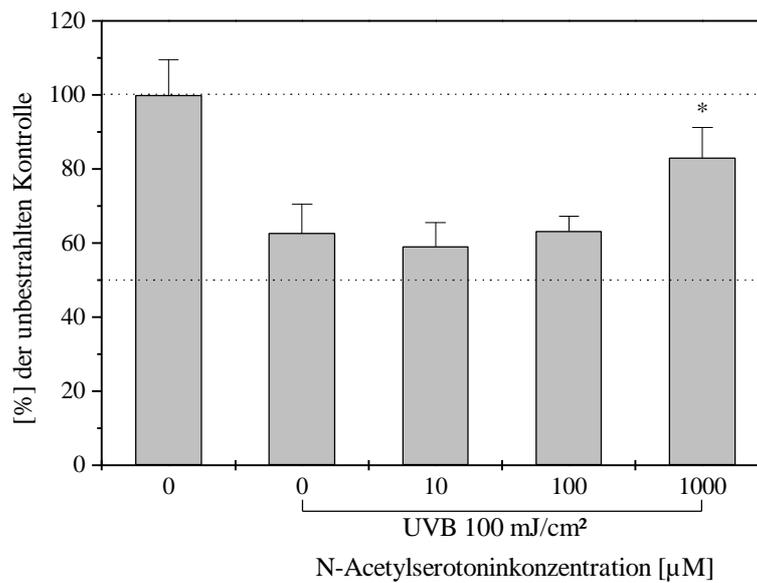


Abb. 40: Einfluß von N-Acetylserotonin auf die UV-B induzierte Verminderung der Vitalität (Lebendzellanzahl) humaner Keratinozyten (HaCaT) 24 h nach der Schädigung. Die Zellen wurden 2 h mit N-Acetylserotonin vorinkubiert und während der UV-B Bestrahlung erfolgte eine gleichzeitige Melatonin supplementierung in PBS. \*  $p < 0,05$  bestrahlte Zellen im Vergleich zur bestrahlten Kontrolle;  $n = 21-24$

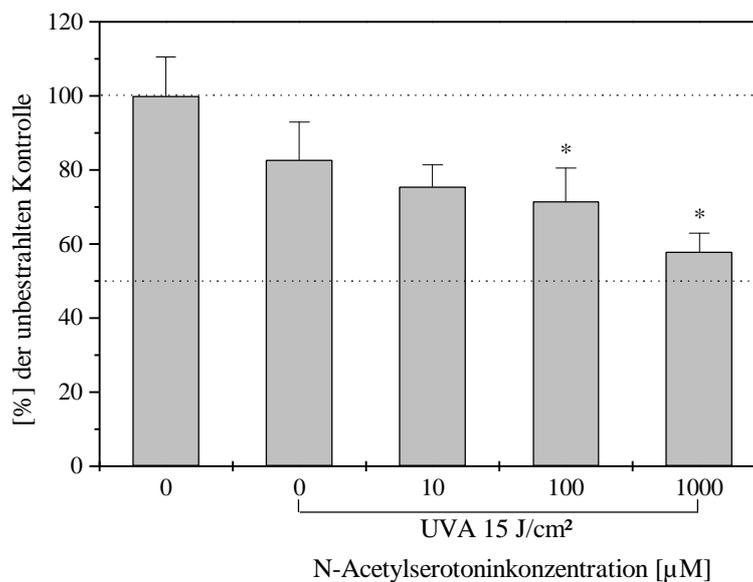


Abb. 41: Einfluß von N-Acetylserotonin auf die UV-A induzierte Verminderung der Vitalität (Lebendzellanzahl) humaner Keratinozyten (HaCaT) 24 h nach der Schädigung. Die Zellen wurden 2 h mit N-Acetylserotonin vorinkubiert und während der UV-A Bestrahlung erfolgte eine gleichzeitige Melatonin supplementierung in PBS. \*  $p < 0,05$  bestrahlte Zellen im Vergleich zur bestrahlten Kontrolle;  $n = 22-24$

Weiterhin wurde das protektive Potential von N-Acetylserotonin gegenüber einer UV-A Bestrahlung bestimmt. Die Proliferationsverminderung erfolgte mit einer UV-A Dosis von 15 J/cm<sup>2</sup>. Die Abbildung 41 zeigt die Resultate einer zweistündigen Vorinkubation und gleichzeitiger Supplementierung während der Bestrahlung.

Im Ergebnis dieses Inkubationsschemas konnten keine Protektionen nachgewiesen werden. Auffallend ist der stärkere Abfall der Lebendzellanzahl bei Behandlung mit 100 µM und 1000 µM N-Acetylserotonin.

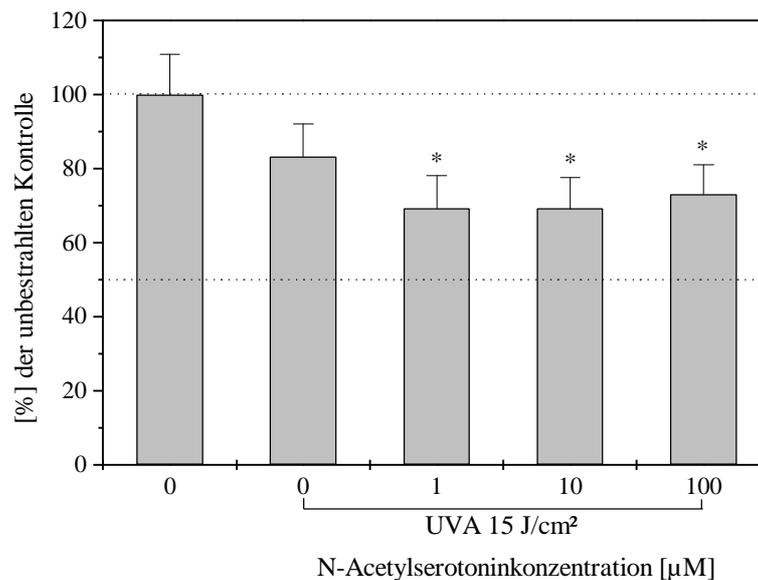


Abb. 42: Einfluß von N-Acetylserotonin auf die UV-A induzierte Verminderung der Vitalität (Lebendzellanzahl) humaner Keratinozyten (HaCaT) 24 h nach der Schädigung. Die Zellen wurden 2 h mit N-Acetylserotonin vorinkubiert und während und nach der UV-A Bestrahlung (24 h) erfolgte eine N-Acetylserotoninsupplementierung. \*  $p < 0,05$  bestrahlte Zellen im Vergleich zur bestrahlten Kontrolle;  $n = 21-24$

Zusätzlich zur zweistündigen Vorinkubationszeit und gleichzeitiger Supplementierung während der UV-A Bestrahlung erfolgte eine erneute N-Acetylserotoninzugabe für 24 h (Abb. 42). Dabei wurde ein Konzentrationsbereich (1 µM, 10 µM und 100 µM) verwendet, der keine toxischen Auswirkungen auf das Zellwachstum in vorhergehenden Experimenten bei einer Inkubationszeit von 24 h zeigte (Kap. 4.1.3). Im Gegensatz zu den Ergebnissen in Abbildung 41 verursachten auch Konzentrationen von 1 µM und 10 µM eine Abnahme der Zellanzahl, wobei sich die Effekte zwischen den einzelnen Konzentrationen nicht weiter unterschieden. Eine Zytoprotektion konnte auch durch erneute Zugabe nach dem Bestrahlungsvorgang und einer 24stündigen Weiterkultivierung nicht erreicht werden.

Tab. 9: Prozentuale Zellzyklusphasenverteilung humaner Keratinozyten (HaCaT) 24 h nach UV-A Bestrahlung (15 J/cm<sup>2</sup>) und gleichzeitiger N-Acetylserotoninsupplementierung. Die Zellen wurden mit N-Acetylserotonin 2 h vorinkubiert und in PBS nach erneuter Zugabe von N-Acetylserotonin mit UV-A bestrahlt. (Mittelwert  $\pm$  SD; \* p < 0,05 bestrahlte Zellen im Vergleich zur bestrahlten Kontrolle; n = 3-4)

Konzentration [ $\mu$ M]	UV-A Bestrahlung [J/cm <sup>2</sup> ]	Zellzyklusphasenverteilung [%]		
		G <sub>0</sub> /G <sub>1</sub>	S	G <sub>2</sub> /M
0	0	24,72 $\pm$ 1,41	59,66 $\pm$ 0,49	15,62 $\pm$ 1,50
0	15	33,30 $\pm$ 4,47	48,71 $\pm$ 4,12	17,99 $\pm$ 1,23
10	15	26,38 $\pm$ 6,00	52,75 $\pm$ 4,10	20,87 $\pm$ 1,90
100	15	34,44 $\pm$ 0,77	48,69 $\pm$ 0,84	16,88 $\pm$ 1,60
1000	15	48,71 $\pm$ 1,51 *	37,41 $\pm$ 0,98 *	13,89 $\pm$ 0,95

Ergänzend zu den vorhergehenden Versuchen wurde eine Untersuchung der prozentualen Zellzyklusphasenverteilung durchgeführt. In Tabelle 9 sind die Resultate nach zweistündiger Vorinkubationszeit und gleichzeitiger Behandlung der HaCaT-Keratinozyten mit N-Acetylserotonin während einer Bestrahlung mit 15 J/cm<sup>2</sup> UV-A nach 24 h darstellt.

Deutliche Effekte auf die Verteilung der einzelnen Zellzyklusphasen übte die höchste verwendete Konzentration von 1 mM und gleichzeitige UV-A Bestrahlung aus. Es konnte ein starker Anstieg in der G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>-Phase und eine ausgeprägte Abnahme der S-Phase im Vergleich zur unbestrahlten und bestrahlten Kontrolle festgestellt werden, während die G<sub>2</sub>/M-Phase nahezu unverändert blieb.

#### 4.3.4 Diskussion

Auf der ständigen Suche nach einsetzbaren UV-protectiven Substanzen, die für eine topische Applikation geeignet sind, wurde das Epiphysenhormon Melatonin hinsichtlich dieser Eigenschaft untersucht.

Bangha et al. (1996, 1997b) und Dreher et al. (1998) konnten die Schwere eines UV-induzierten Erythems nach dermalen Applikation Melatonin-haltiger Externa in vivo verringern. Dabei wurden verschiedene Dosen (0,05%; 0,1% und 0,5%) in einem Nanokolloidgel eingesetzt (Bangha et al., 1996) oder der Einfluß des Applikationszeitpunktes (Bangha et al., 1997b) untersucht. Die durchgeführten Studien an gesunden Probanden zeigten, daß durch die höchste eingesetzte Konzentration an Melatonin (0,5%) bzw. durch 15minütigen Auftrag der Melatonin enthaltenden Formulierung (0,5%ig) vor dem Bestrahlungsvorgang nach 8 h bzw. 24 h die Ausbildung eines UV-Erythems, welches visuell und mittels Chromametrie beurteilt wurde, signifikant verhindert werden konnte. Eine Applikation 1 min, 30 min oder 240 min nach der UV-Bestrahlung führte dagegen nicht zum Erfolg. Für die lokale antierythematöse Wirkung wurden die Radikalfängereigenschaften des Moleküls bzw. eine Beeinflussung des Arachidonsäuremetabolismus verantwortlich gemacht. Bangha et al., 1996 schlossen direkte UV absorbierende, reflektierende oder streuende Effekte von Melatonin aus.

Die vorliegenden Versuche an humanen Keratinozyten sollten sich mit der Untersuchung des zytoprotektiven Potentials von Melatonin nach Anwendung verschiedener oxidativer Zellschädigungsmodelle *in vitro* befassen und die Bewertung einer topischen Anwendbarkeit erleichtern. Neben dem Neurohormon Melatonin kam als Modellsubstanz N-Acetylserotonin mit ebenfalls beschriebenen antioxidativen Eigenschaften (Barsacchi et al., 1998; Goda et al., 1999; Reiter et al., 1999) zum Einsatz.

Entgegen aller Annahmen konnten durch alleinige Vorinkubation mit Melatonin bzw. N-Acetylserotonin (2 h) keine Protektionen vor einer UV-B induzierten Proliferationsverminderung nachgewiesen werden. Obwohl Arbeiten von Costa et al., 1995 zeigen konnten, daß Lipidmembranen aufgrund des relativ hohen Lipid-Verteilungskoeffizienten von Melatonin für diese Substanz leicht permeabel sind, reichte die von uns gefundene zelluläre Aufnahme durch die Keratinozyten nach 2 h Inkubationszeit anscheinend nicht aus, um eine für die antioxidative Wirkung effektive Konzentration im Zellsystem nach alleiniger Vorinkubation zu erreichen.

Anders sah es bei einer zusätzlichen Inkubation mit dem jeweiligen Indolamin während des Bestrahlungsvorganges mit UV-B aus. Die beobachteten dosisabhängigen Zytoprotektionen nach 24 h legten aber direkte UV-absorbierende Eigenschaften nahe, die auch durch Aufnahmen der UV-Absorptionsspektren von Melatonin und N-Acetylserotonin bestätigt werden konnten (Abb. 51 und 52). Die gefundenen dosisabhängigen Protektionen gegenüber einer UV-B Bestrahlung (100 mJ/cm<sup>2</sup>) stehen in einem direkten Zusammenhang mit den gefundenen UV-Filtereigenschaften (Nickel und Wohlrab, 2000). Es konnten starke Absorptionen im UV-B und nur äußerst schwache Absorptionen an der Grenze zwischen dem UV-B und UV-A Wellenlängenbereich beobachtet werden.

N-Acetylserotonin und Melatonin zeigten gleiche Effekte auf die Proliferationsverminderung humaner Keratinozyten nach einer UV-A Bestrahlung (15 J/cm<sup>2</sup>) und gleichzeitiger Supplementierung mit den Indolaminen. Anstelle der erwarteten photoprotektiven Wirkung der eingesetzten Indolderivate konnte eine gesteigerte Toxizität im Zellsystem bei Einsatz hoher Konzentrationen (1 mM) beobachtet werden. Es ist hier bei beiden Substanzen ein ähnlicher zellschädigender Mechanismus anzunehmen. Eine Protektion konnte weiterhin nicht durch eine zusätzliche Inkubation mit N-Acetylserotonin nach der UV-A Schädigung erreicht werden. Die Variation der Inkubationsbedingungen blieb im Ergebnis erfolglos und zeigte auch bei niedrigen Konzentrationen an N-Acetylserotonin (1 µM, 10 µM und 100 µM) eine im Vergleich zur UV-A bestrahlten Kontrolle zusätzliche Lebenszellanzahlverringering.

Neben den Untersuchungen zur DNA-Syntheserate und Lebendzellanzahl erfolgte eine Bestimmung des apoptotischen bzw. nekrotischen Zelltodes anhand der Parameter Phosphatidylserintranslokation an die äußere Zytoplasmamembran und die Bestimmung des für apoptotische Prozesse charakteristischen mitochondrialen Membranproteins Apo2.7, um zur Ermittlung des Schädigungsmechanismus und der gesteigerten toxischen Effekte (Zytotoxizität) beizutragen. Es konnte mit beiden Methoden die Auslösung eines apoptotischen (Apo2.7) bzw. spät-apoptotisch/nekrotischen Prozesses (Annexin V/PI) nach Behandlung der epithelialen Zellen mit 1 mM Melatonin und gleichzeitiger UV-A Bestrahlung (15 J/cm<sup>2</sup>) detektiert werden.

Daneben mündete die schädigende Einwirkung von Melatonin und N-Acetylserotonin während der UV-A Exposition in einen Zellzyklusblock in G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>. Die Fraktion der S-Phasezellen nahm hingegen im Vergleich zur bestrahlten Kontrolle ab. Während Arbeiten von Cagnoli et al., 1995 belegen, daß Melatonin beispielsweise Neuronen vor einer Singulett-Sauerstoff-induzierten Apoptose schützen kann, wurde in den vorliegenden Experimenten nach gleichzeitiger UV-A

Bestrahlung eine Zunahme der Apoptose bei hohen Konzentrationen gefunden. Ein Anstieg apoptotischer Zellen nach alleiniger UV-A Exposition konnte anhand der untersuchten Apoptoseparameter nicht detektiert werden. Eine Ursache könnte in der von Gniadecki et al., 2000 kürzlich nachgewiesenen Resistenz gegen eine UV-vermittelte Apoptose liegen.

Die von uns beobachtete Zelltodinduktion (Apoptose) und die gleichzeitige Arretierung der Keratinozyten in der G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>-Phase des Zellzyklusses ist als ein wichtiger zellinterner regulatorischer Kontrollmechanismus zu verstehen, durch den es zum Absterben von irreparabel geschädigten Zellen als Antwort auf den externen toxischen Reiz kommt.

Neben den Versuchen zur photoprotektiven Wirkung der Indolderivate konnte kein effektiver Schutz der Hautzellen vor einer oxidativ bedingten Zellschädigung durch Wasserstoffperoxid erreicht werden. Dagegen belegen Arbeiten von Hara et al., 1997 unter Verwendung eines in vivo Tiermodells die Wirkung von Melatonin auf die Aktivität des antioxidativen Enzymes Glutathionperoxidase, welches eine bedeutende Rolle im Metabolismus von Wasserstoffperoxid einnimmt.

Im Gegensatz zu Wasserstoffperoxid, das schnell abgebaut und durch Keratinozyten relativ gut toleriert werden kann, erfolgte der Einsatz eines organischen Hydroperoxides. Von solchen organischen Hydroperoxiden ist bekannt, dass sie viel langsamer abgebaut werden und auch Schlüsselenzyme des antioxidativen Verteidigungssystems der Zellen (Glutathion) inaktivieren (Vessey et al., 1992; Vessey und Lee, 1993). Mit DHP wurde eine solche Modellsubstanz für ein organisches Hydroperoxid in die Untersuchungen einbezogen, die den generierten Lipidhydroperoxiden nach erfolgter UV-Strahlung ähnlich ist und durch einen eisenkatalysierten Radikalbildungsprozess eine Proliferationsverminderung an humanen Keratinozyten initiiert (Göhring, 1999). Auch bei Anwendung von DHP als Schädigungsmodell erwies sich Melatonin als ineffektiv.

#### **4.4 Bestimmung intrazellulärer Peroxide nach UV-A und UV-B Bestrahlung und unter Einfluß verschiedener Antioxidantien**

Für den vorliegenden Versuchskomplex zur Bestimmung des intrazellulären Peroxidgehaltes humaner Keratinozyten (HaCaT) nach UV-Exposition und des Einflusses verschiedener Antioxidantien auf diesen Prozess wurde das leicht membrangängige Dihydrorhodamin 123 (DHR) verwendet. Das untoxische, nicht fluoreszierende DHR wird im Zuge des Anstieges intrazellulärer Peroxide irreversibel zum fluoreszierenden Oxidationsprodukt Rhodamin 123 umgesetzt (Royall und Ischiropoulos, 1993). Mit Hilfe des DHR-Testes sollte im folgenden die Wirksamkeit von Rutin, Kämpferol, Melatonin und N-Acetylserotonin gegen einen UV-bedingten Anstieg intrazellulärer oxidierender peroxidischer Verbindungen untersucht werden. Der experimentelle Ablauf wurde bereits im Kapitel 3.7 beschrieben.

Nach UV-B (100 mJ/cm<sup>2</sup>) bzw. UV-A (15 J/cm<sup>2</sup>) Exposition der HaCaT-Zellen konnte ein deutlicher Anstieg der Fluoreszenzintensität im Vergleich zur unbestrahlten Kontrolle gemessen werden, wobei das Ausmaß nach UV-A Bestrahlung ausgeprägter war.

#### 4.4.1 Rutin

Durch eine alleinige Vorinkubation der Zellen mit verschiedenen Rutinkonzentrationen (1  $\mu\text{M}$ , 50  $\mu\text{M}$ , 100  $\mu\text{M}$  und 200  $\mu\text{M}$ ) für 2 h bzw. 24 h konnte eine signifikante, konzentrationsabhängige Abnahme des intrazellulären Peroxidgehaltes nach UV-B Bestrahlung mit 100  $\text{mJ}/\text{cm}^2$  (Abb. 43) (50  $\mu\text{M}$ , 100  $\mu\text{M}$  und 200  $\mu\text{M}$  Rutin) und UV-A Bestrahlung mit 15  $\text{J}/\text{cm}^2$  (Abb. 44) (100  $\mu\text{M}$  und 200  $\mu\text{M}$  Rutin) erreicht werden. Zwischen der unterschiedlichen Vorinkubationsdauer von 2 h und 24 h gab es keine Unterschiede.

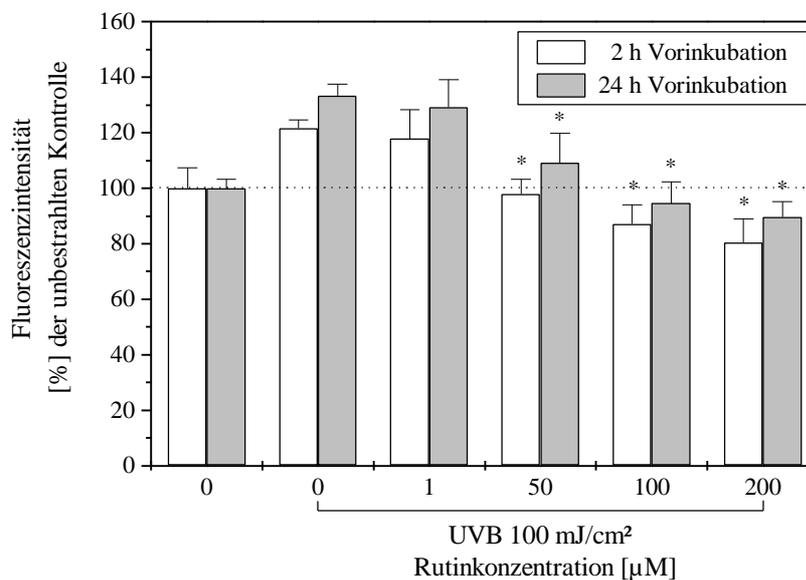


Abb. 43: Bestimmung des intrazellulären Peroxidgehaltes humaner Keratinozyten (HaCaT) nach UV-B Bestrahlung (100  $\text{mJ}/\text{cm}^2$ ) und Einfluß einer Rutinvorinkubation (2 h bzw. 24 h). \*  $p < 0,05$  bestrahlte Zellen im Vergleich zur bestrahlten Kontrolle;  $n = 12$

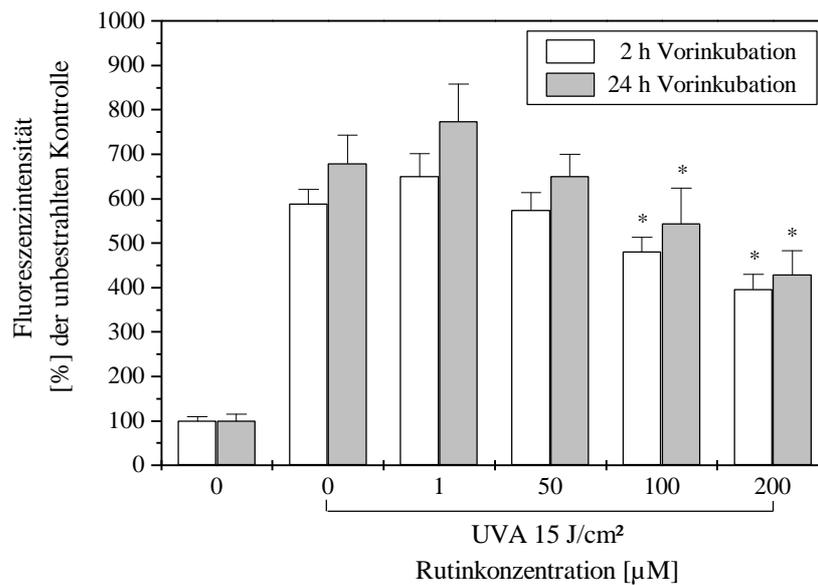


Abb. 44: Bestimmung des intrazellulären Peroxidgehaltes humaner Keratinozyten (HaCaT) nach UV-A Bestrahlung (15 J/cm<sup>2</sup>) und Einfluß einer Rutinvorinkubation (2 h bzw. 24 h). \* p < 0,05 bestrahlte Zellen im Vergleich zur bestrahlten Kontrolle; 2 h Vorinkubation: n = 12, 24 h Vorinkubation: n = 17-18

#### 4.4.2 Kämpferol

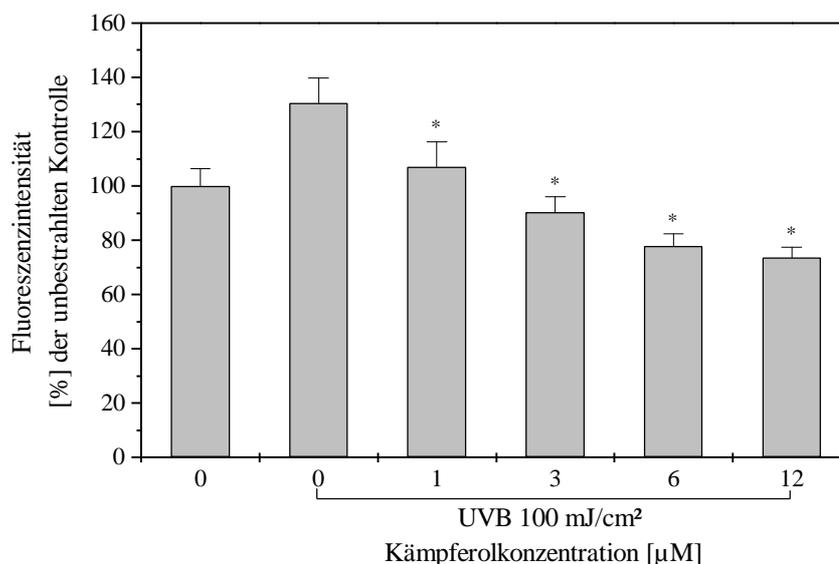


Abb. 45: Bestimmung des intrazellulären Peroxidgehaltes humaner Keratinozyten (HaCaT) nach UV-B Bestrahlung (100 mJ/cm<sup>2</sup>) und Einfluß einer Kämpferolvorinkubation (2 h). \* p < 0,05 bestrahlte Zellen im Vergleich zur bestrahlten Kontrolle; n = 12

Die Vorinkubation der HaCaT-Keratinocyten beschränkte sich bei Kämpferol auf 2 h, da in vorangegangenen Experimenten (Kap. 4.1.1.2) ein deutlicher wachstumshemmender Einfluß auf humane Keratinocyten nach 24 h nachgewiesen werden konnte.

Die Untersuchungen ergaben ebenfalls eine deutliche Abnahme an generierten intrazellulären Peroxiden in Abhängigkeit von der verwendeten Kämpferolkonzentration nach UV-B Bestrahlung (Abb. 45) (1  $\mu\text{M}$ , 3  $\mu\text{M}$ , 6  $\mu\text{M}$  und 12  $\mu\text{M}$ ) und UV-A Bestrahlung (Abb. 46) (3  $\mu\text{M}$ , 6  $\mu\text{M}$  und 12  $\mu\text{M}$ ).

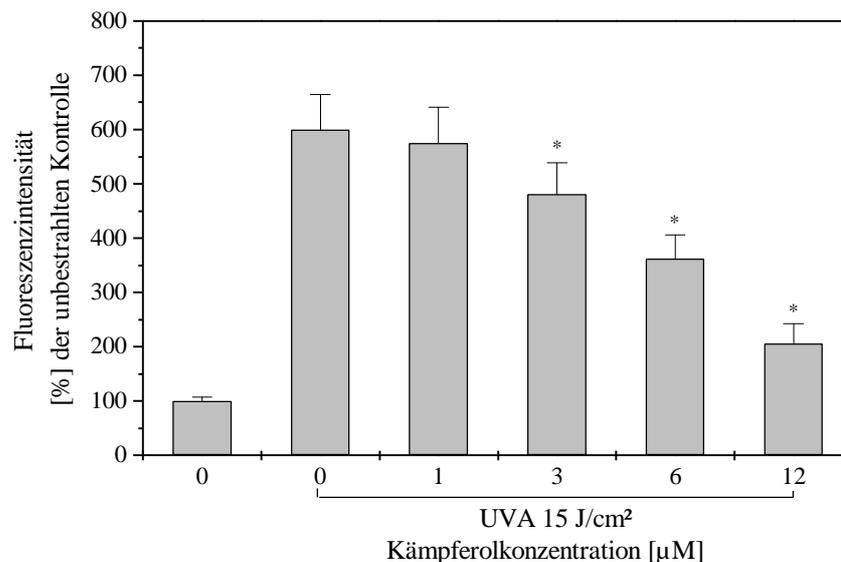


Abb. 46: Bestimmung des intrazellulären Peroxidgehaltes humaner Keratinocyten (HaCaT) nach UV-A Bestrahlung (15 J/cm<sup>2</sup>) und Einfluß einer Kämpferolvorinkubation (2 h). \*  $p < 0,05$  bestrahlte Zellen im Vergleich zur bestrahlten Kontrolle;  $n = 12$

#### 4.4.3 Melatonin

Bei den Untersuchungen mit Melatonin erfolgte neben einer Vorinkubation der humanen Keratinocyten von 2 h in Abhängigkeit von der Fragestellung eine zusätzliche Melatoninapplikation während des UV-A Bestrahlungsvorganges (Abb. 47). Eine alleinige Vorinkubation mit Melatonin zeigte bis auf die mit 1000  $\mu\text{M}$  vorbehandelten Zellen keine Unterschiede im intrazellulären Peroxidgehalt verglichen mit der UV-A (15 J/cm<sup>2</sup>) bestrahlten Kontrolle. Die mit 1000  $\mu\text{M}$  vorinkubierten Keratinocyten wiesen sogar eine Zunahme der Fluoreszenzintensität auf. Noch deutlichere Effekte wurden bei gleichzeitiger Melatoninsupplementierung und UV-A Exposition gefunden. Es kam zu einem starken und zusätzlichen Anstieg der Rhodaminfluoreszenz als Indiz für einen gesteigerten intrazellulären Peroxidgehalt.

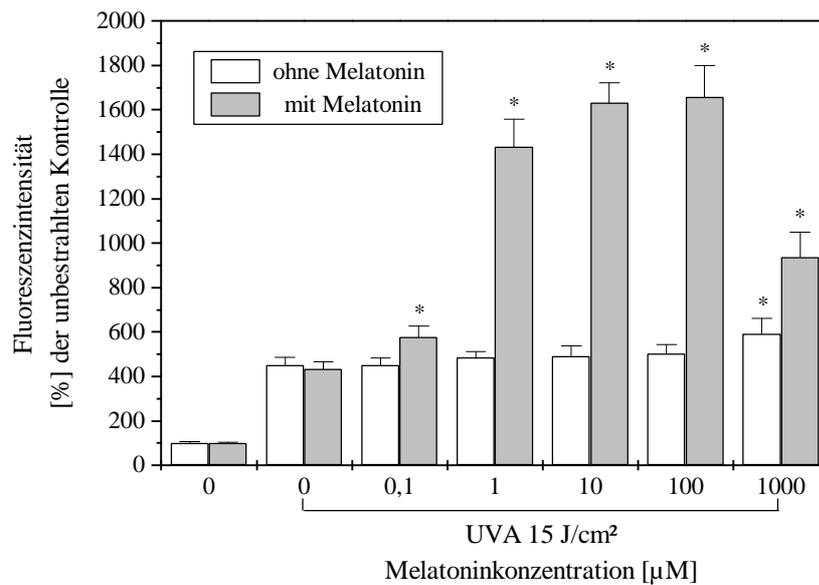


Abb. 47: Bestimmung des intrazellulären Peroxidgehaltes humaner Keratinozyten (HaCaT) nach UV-A Bestrahlung ( $15 \text{ J/cm}^2$ ) und Einfluß einer alleinigen Vorinkubation mit Melatonin (2 h) bzw. einer zusätzlichen Melatoninsupplementierung während der UV-A Exposition. \*  $p < 0,05$  bestrahlte Zellen im Vergleich zur bestrahlten Kontrolle;  $n = 17-18$

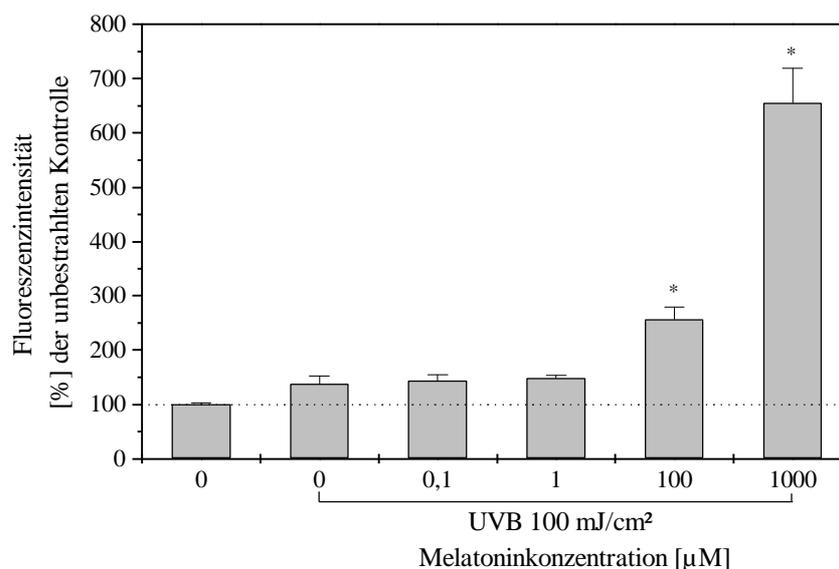


Abb. 48: Bestimmung des intrazellulären Peroxidgehaltes humaner Keratinozyten (HaCaT) nach UV-B Bestrahlung ( $100 \text{ mJ/cm}^2$ ) und Einfluß einer Melatoninvorinkubation (2 h). \*  $p < 0,05$  bestrahlte Zellen im Vergleich zur bestrahlten Kontrolle;  $n = 16-18$

Auch nach einer 2stündigen Vorinkubation der Zellen mit unterschiedlichen Melatoninkonzentrationen konnte ein starker Anstieg der Fluoreszenz nach UV-B Bestrahlung gemessen werden, der bei 100  $\mu\text{M}$  und 1000  $\mu\text{M}$  deutlich über dem Wert der bestrahlten Kontrolle lag (Abb. 48).

#### 4.4.4 N-Acetylserotonin

Im Ergebnis des Einsatzes von N-Acetylserotonin zeigten sich vom Melatonin abweichende Effekte. Nach N-Acetylserotoninvorinkubation (2 h; 100  $\mu\text{M}$  und 1000  $\mu\text{M}$ ) und UV-B-Bestrahlung (Abb. 49) konnte wie bei Rutin und Kämpferol eine Abnahme der Fluoreszenzintensitäten verzeichnet werden.

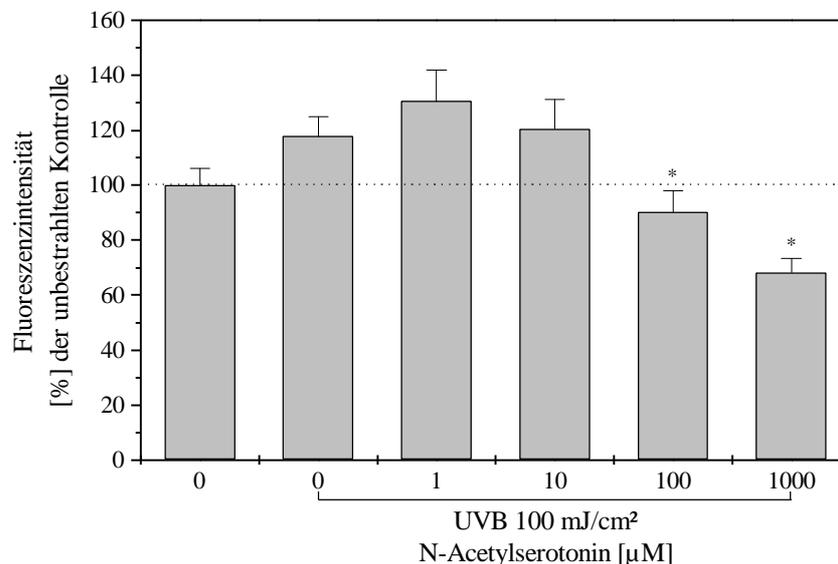


Abb. 49: Bestimmung des intrazellulären Peroxidgehaltes humaner Keratinozyten (HaCaT) nach UV-B Bestrahlung (100 mJ/cm<sup>2</sup>) und Einfluß einer N-Acetylserotoninvorinkubation (2 h). \*  $p < 0,05$  bestrahlte Zellen im Vergleich zur bestrahlten Kontrolle;  $n = 12$

Ähnliche Protektionen vor einem UV-bedingten Anstieg intrazellulärer peroxidischer Verbindungen waren auch nach UV-A Bestrahlung (15 J/cm<sup>2</sup>) sichtbar. In der Abbildung 50 sind die Resultate einer Vorinkubation mit N-Acetylserotonin (2 h) bzw. einer zusätzlichen Inkubation während der UV-A Exposition dargestellt. Eine alleinige Vorbehandlung der Zellen mit 100  $\mu\text{M}$  und 1000  $\mu\text{M}$  N-Acetylserotonin zeigte einen starken Rückgang des Peroxidgehaltes in den Keratinozyten. Die Effektivität konnte durch eine gleichzeitige Supplementierung und UV-A Bestrahlung gesteigert werden. Hierbei erwiesen sich auch Konzentrationen von 1  $\mu\text{M}$  und 10  $\mu\text{M}$  als stark wirksam.

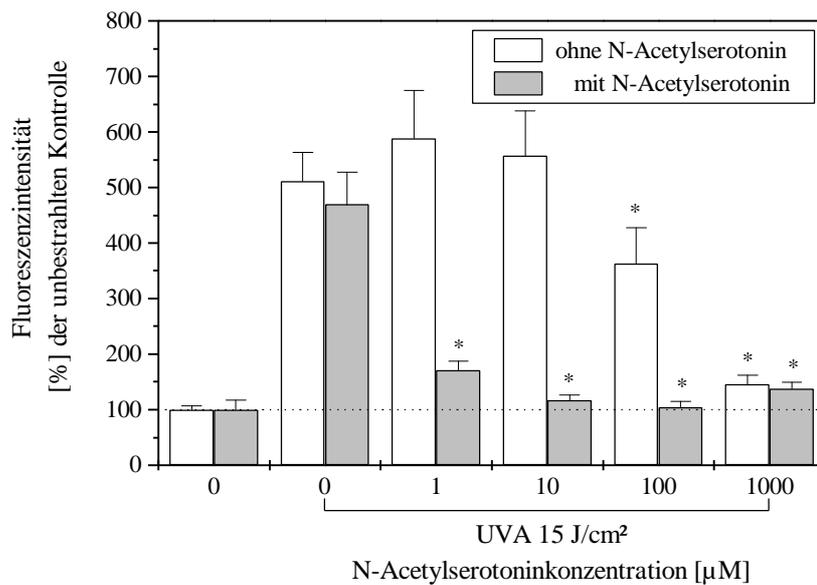


Abb. 50: Bestimmung des intrazellulären Peroxidgehaltes humaner Keratinozyten (HaCaT) nach UV-A Bestrahlung (15 J/cm<sup>2</sup>) und Einfluß einer alleinigen Vorinkubation mit N-Acetylserotonin (2 h) bzw. einer zusätzlichen N-Acetylserotoninsupplementierung während der UV-A Exposition. \* p < 0,05 bestrahlte Zellen im Vergleich zur bestrahlten Kontrolle; n = 11-12

#### 4.4.5 Diskussion

Grundsätzlich können verschiedene Methoden genutzt werden, um die intrazelluläre Generierung reaktiver Sauerstoffspezies bzw. peroxidischer und oxidierender Verbindungen zu messen. Neben dem Einsatz von 2', 7'-Dichlorofluorescein kann die Detektion intrazellulärer reaktiver Spezies unter Anwendung des DHR-Testes erfolgen. Hierbei handelt es sich um eine sensitive und etablierte Methode, die beispielsweise zur flowzytometrischen Messung der intrazellulären Produktion reaktiver Sauerstoffspezies in neutrophilen Granulozyten (Rothe et al., 1988) und Phagozyten (Rothe et al., 1991) herangezogen wird. Daneben wurde die Gebräuchlichkeit und der Vorteil dieses methodischen Ansatzes in der Bestimmung der intrazellulären Generierung von Peroxiden nach UV-Bestrahlung in epidermalen Keratinozyten von Sakurada et al., 1992 und in Arbeiten von Takano et al., 1995 beschrieben.

Aus den Ergebnissen der Untersuchungen läßt sich ableiten, daß besonders nach einer UV-A Bestrahlung humaner Keratinozyten (HaCaT) die Bildung reaktiver intrazellulärer Peroxide im Vordergrund steht. Die verwendeten Substanzen Rutin, Kämpferol und N-Acetylserotonin zeigten dosisabhängige Protektionen vor einem UV-bedingten Anstieg des Peroxidgehaltes.

Gegensätzliche Resultate lieferte der Einsatz von Melatonin. Es konnten keine Schutzeffekte nachgewiesen werden. Stattdessen verursachte Melatonin einen zusätzlichen Anstieg der Rhodaminfluoreszenz. Dies war besonders stark ausgeprägt bei gleichzeitiger Supplementierung während des UV-A Bestrahlungsvorganges. Die erhaltenen Ergebnisse legen daher die Vermutung nahe, daß Melatonin über gewisse prooxidative Eigenschaften unter den durchgeführten Versuchsbedingungen verfügt.

## 4.5 Untersuchungen zur Photostabilität der Indolderivate Melatonin und N-Acetylserotonin

### 4.5.1 Einfluß einer UV-Bestrahlung auf die Absorptionsspektren

Zur Klärung und Überprüfung der Photostabilität von N-Acetylserotonin und Melatonin wurden die Absorptionsspektren vor und nach UV-Exposition vergleichend betrachtet (Abb. 51 und 52). Bereits nach visueller Begutachtung einer bestrahlten (UV-A und UV-B) 1 mM N-Acetylserotoninlösung konnte eine schwache Farbveränderung (Violettäufhellung) wahrgenommen werden und gab erste Hinweise auf eine Photoinstabilität mit der Bildung von Photoabbauprodukten nach UV-Bestrahlung. Melatonin und N-Acetylserotonin zeigten starke UV Absorptionen im UV-B Bereich (280 – 320 nm). Dagegen konnten nur geringe Absorptionen an der Grenze zwischen dem UV-B und UV-A (320 – 400 nm) Wellenlängenbereich festgestellt werden. Eine Bestrahlung der N-Acetylserotonin- bzw. Melatoninlösung (je 0,1 mM in 0,2 Vol.-% Ethanol in PBS pH 7,4) mit UV-B (100 mJ/cm<sup>2</sup>) oder UV-A (12 J/cm<sup>2</sup>) löste eine bathochrome Verschiebung aus verbunden mit einer deutlichen Abnahme der Absorptionswerte im UV-B und einer gleichzeitigen Zunahme der Extinktionswerte im UV-A Wellenlängenbereich. Zusätzlich zu dieser bathochromen Verschiebung des Spektrums in den längerwelligen UV-A Spektralbereich konnte beim N-Acetylserotonin eine deutliche Zunahme der Extinktionen im sichtbaren Wellenlängenbereich (max. um 550 nm) beobachtet werden.

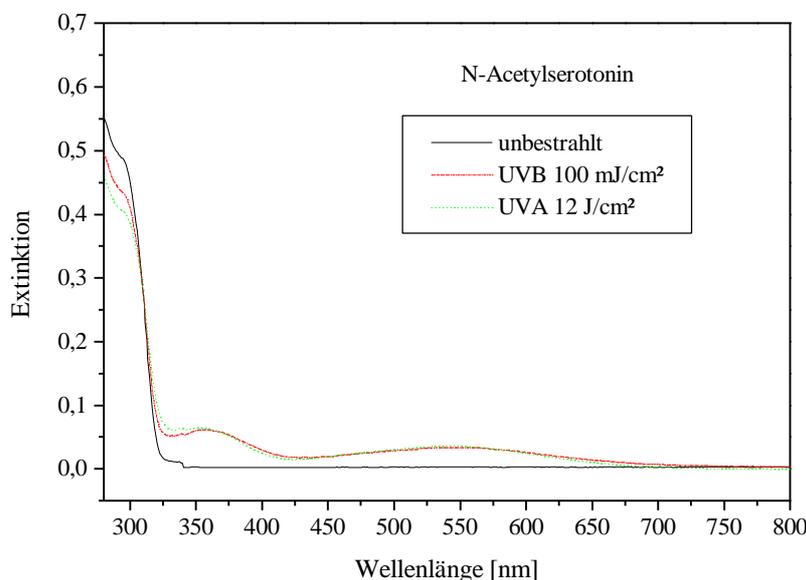


Abb. 51: Absorptionsspektren einer 0,1 mM wässrig-ethanolischen N-Acetylserotoninlösung (0,2 Vol.-% Ethanol in PBS pH 7,4). Die Spektren wurden im ultravioletten und sichtbaren Wellenlängenbereich vor und nach Bestrahlung mit UV-B (100 mJ/cm<sup>2</sup>) bzw. UV-A (12 J/cm<sup>2</sup>) aufgenommen.

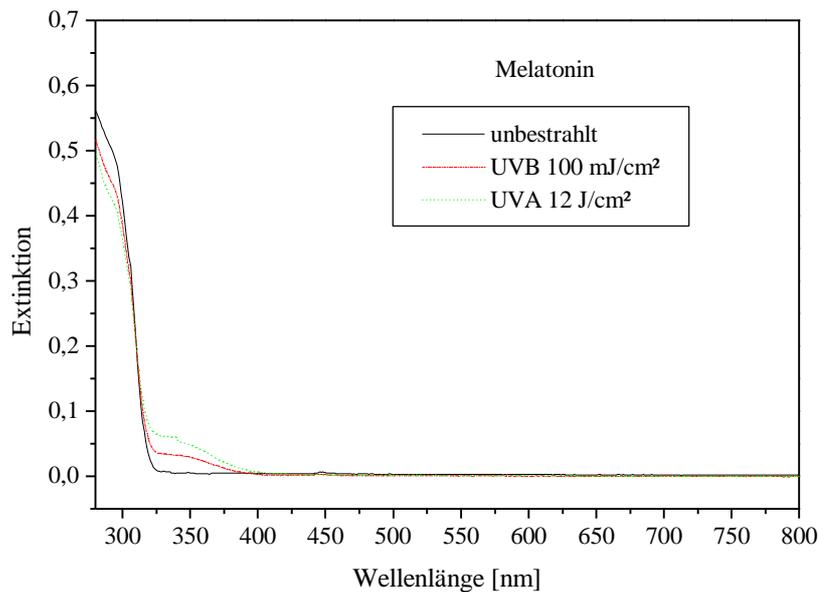


Abb. 52: Absorptionsspektren einer 0,1 mM wäßrig-ethanolischen Melatoninlösung (0,2 Vol.% Ethanol in PBS pH 7,4). Die Spektren wurden im ultravioletten und sichtbaren Wellenlängenbereich vor und nach Bestrahlung mit UV-B (100 mJ/cm<sup>2</sup>) bzw. UV-A (12 J/cm<sup>2</sup>) aufgenommen.

#### 4.5.2 Dünnschichtchromatographischer Nachweis der Photoabbauprodukte

Die Dünnschichtchromatographie wurde zum weiteren schnellen und qualitativen Nachweis der nach UV-A Bestrahlung (15 J/cm<sup>2</sup>) gebildeten Photoabbauprodukte herangezogen (vgl. Kap. 3.11). In der Abbildung 53 ist eine solche dünnschichtchromatographische Auftrennung der einzelnen Metaboliten aufgrund ihres unterschiedlichen Laufverhaltens in Methanol/n-Butanol (60 + 40) im Vergleich zur entsprechenden unbestrahlten Substanz dargestellt.

Nach UV-A Exposition der verschiedenen Indolderivate konnten deutlich erkennbar 2 Photoabbauprodukte von N-Acetylserotonin (Bahn 2) und die Bildung von 1 Photoabbauprodukt aus Melatonin (Bahn 4) detektiert werden. Bei Betrachtung der DC-Platte bei 366 nm zeigte das aus Melatonin entstandene Abbauprodukt eine blaue Fluoreszenz.



#### 4.6 Einfluß von Melatonin und N-Acetylserotonin auf die UVA-induzierte Linolsäureperoxidentstehung

Unter Verwendung eines zellfreien Testsystems wurde die Fähigkeit von Melatonin und N-Acetylserotonin bestimmt, eine dosisabhängige UV-A induzierte Lipidperoxidation zu inhibieren. Die Effektivität beider Substanzen in diesem Geschehen sollte dabei miteinander verglichen werden. Als Substrat für derartige peroxidative Prozesse erfolgte der Einsatz von Linolsäure. Diese zweifach ungesättigte Fettsäure kommt als freie Fettsäurekomponente im Stratum corneum vor bzw. als Bestandteil des Ceramid 1 (Schneider und Wohlrab, 1997) und findet sich zu einem geringen Anteil in der Lipidfraktion humaner Keratinozyten (Schürer et al., 1993).

Mit Hilfe der Kapillarzonenelektrophorese wurde ein nach der UV-A Bestrahlung entstandenes Linolsäureperoxid bei 234 nm anhand der konjugierten Doppelbindungen im Molekül detektiert und über die entsprechenden Elektropherogramme quantifiziert. In den Abbildungen 54, 55 und 56 sind beispielhaft derartige Elektropherogramme aufgezeigt. Mit dieser Methode wurde ebenfalls die Bildung eines Photoabbauproduktes von N-Acetylserotonin in Abhängigkeit von der UV-A Bestrahlungsdosis (7,5 und 15 J/cm<sup>2</sup>) nachgewiesen (Abb. 54). Das aus der bestrahlten 1 mM N-Acetylserotoninlösung entstandene Photoprodukt konnte im Elektropherogramm (Abb. 55) vor dem zu detektierenden Linolsäureperoxidpeak simultan bestimmt werden. Dagegen zeigte sich unter den verwendeten Nachweisbedingungen im aufgezeichneten Elektropherogramm einer UV-A bestrahlten Melatonin- und Linolsäurelösung neben einem Melatonin- und Linolsäureperoxidpeak kein entstandenes Photoabbauprodukt (Abb. 56).

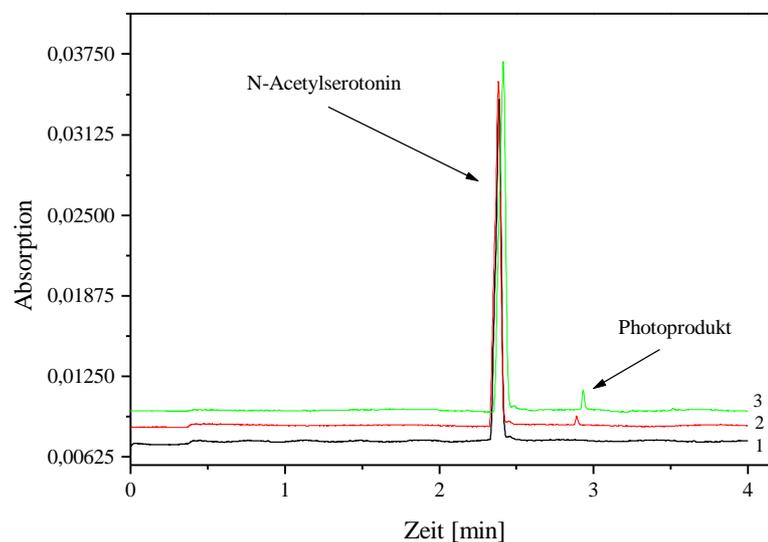


Abb. 54: Elektropherogramme einer 1 mM N-Acetylserotoninlösung nach unterschiedlichen UV-A Bestrahlungsdosen (1: 0 J/cm<sup>2</sup>; 2: 7,5 J/cm<sup>2</sup>; 3: 15 J/cm<sup>2</sup>). Grundelektrolytpuffer: 10 mM Natriumborat pH=9, Spannung: 25 kV, Quarzkapillare: i.d. = 45 cm, UV-Detektion (234 nm), hydrostatische Injektion, Temperatur: konstant

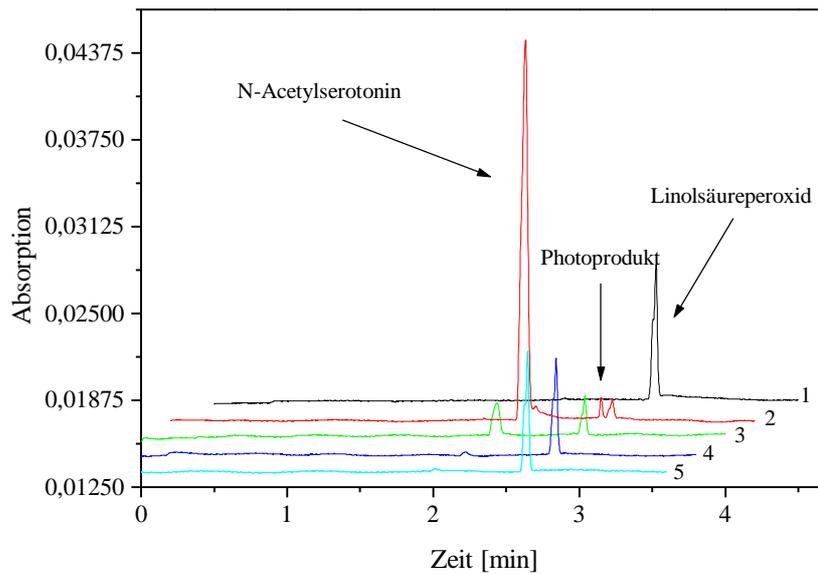


Abb. 55: Elektropherogramme UV-A ( $15 \text{ J/cm}^2$ ) bestrahlter Linolsäurelösung (1) bzw. Linolsäure mit verschiedenen Konzentrationen an N-Acetylserotonin (2: 1 mM; 3: 0,1 mM; 4: 0,01 mM; 5: 0,001 mM). Die Konzentration der Linolsäure betrug bei allen Versuchen 1 mM. Die einzelnen Elektropherogramme wurden für eine bessere Übersichtlichkeit gegeneinander verschoben.

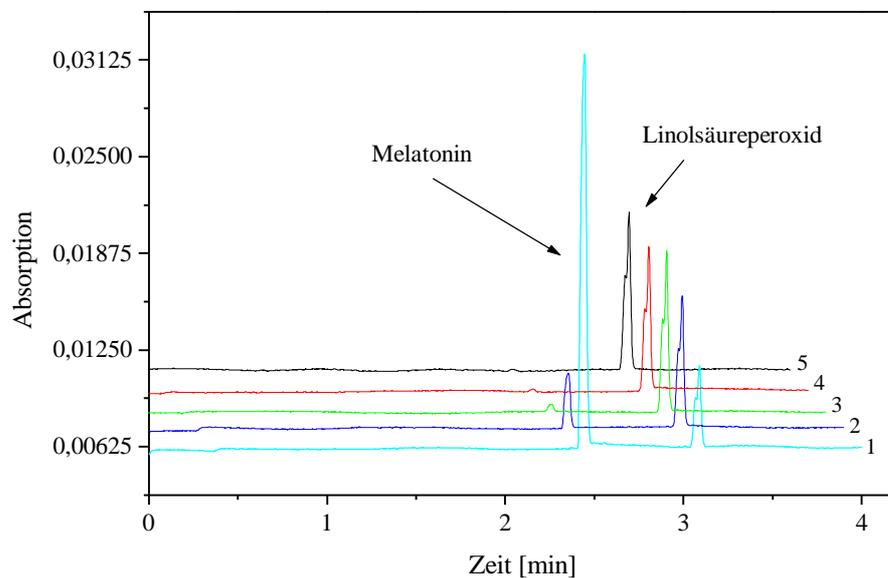


Abb. 56: Elektropherogramme UV-A ( $15 \text{ J/cm}^2$ ) bestrahlter Linolsäurelösung (5) bzw. Linolsäure mit verschiedenen Konzentrationen (1: 1 mM; 2: 0,1 mM; 3: 0,01 mM; 4: 0,001 mM) an Melatonin. Die Konzentration der Linolsäure betrug bei allen Versuchen 1 mM. Die einzelnen Elektropherogramme wurden für eine bessere Übersichtlichkeit gegeneinander verschoben.

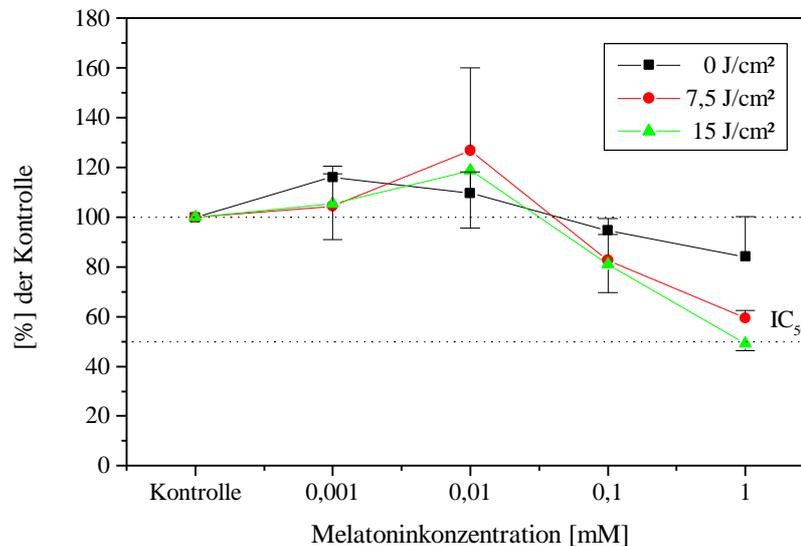


Abb. 57: Einfluß von Melatonin auf die UV-A (7,5 J/cm<sup>2</sup>; 15 J/cm<sup>2</sup>) induzierte Linolsäureperoxidentstehung. Als 100%-Kontrolle diente eine 1 mM Linolsäurelösung ohne Melatonin. (n = 3) Methode: Kapillarzonelektrophorese

Die Abbildungen 57 und 58 zeigen den Einfluß von verschiedenen Konzentrationen an Melatonin bzw. N-Acetylserotonin auf die UV-A induzierte Linolsäureperoxidation. Eine 1 mM Linolsäurelösung ohne das entsprechende Indolderivat diente als 100 %-Kontrolle. Im Ergebnis dieser Untersuchungen ließ sich eine wesentlich geringere Wirksamkeit von Melatonin gegenüber einer UV-A vermittelten Peroxidation der eingesetzten Linolsäure im Gegensatz zu N-Acetylserotonin demonstrieren.

N-Acetylserotonin zeigte eine um zwei Zehnerpotenzen höhere Effektivität als Melatonin (Abb. 58). Während bei Verwendung einer 1 mM N-Acetylserotoninlösung und gleichzeitiger UV-A Bestrahlung mit 15 J/cm<sup>2</sup> die Linolsäureperoxidation in diesem in vitro Modellsystem um 90% gesenkt werden konnte, lag die Hemmung dieses Prozesses nach Anwendung von 1 mM Melatonin nur bei 50%.

Im Unterschied zu Melatonin waren die verwendeten N-Acetylserotoninkonzentrationen von 10 µM und 100 µM wirksam. Zwischen den erhaltenen Resultaten bei Bestrahlung der einzelnen Proben mit 7,5 J/cm<sup>2</sup> und 15 J/cm<sup>2</sup> UV-A gab es im Ausmaß keine wesentlichen Unterschiede.

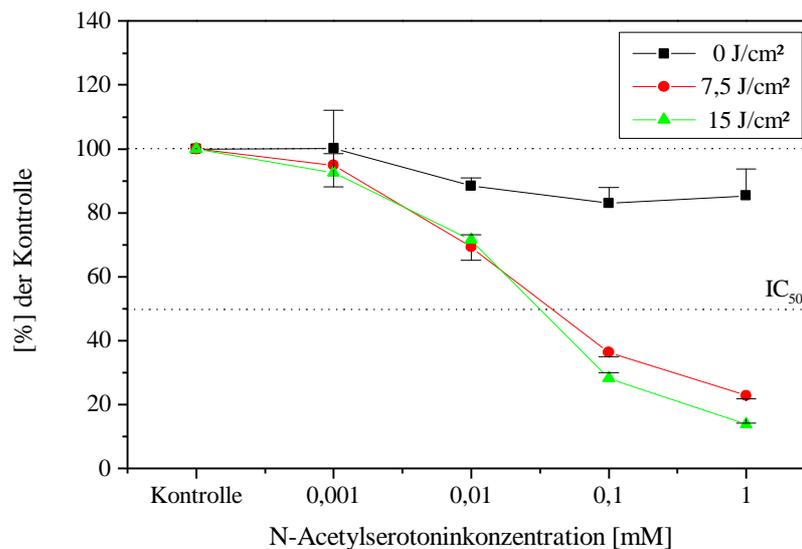


Abb. 58: Einfluß von N-Acetylserotonin auf die UV-A (7,5 J/cm<sup>2</sup>; 15 J/cm<sup>2</sup>) induzierte Linolsäureperoxidentstehung. Als 100 %-Kontrolle diente eine 1 mM Linolsäurelösung ohne Melatonin. (n = 3) Methode: Kapillarzonenelektrophorese

#### 4.6.1 Diskussion

Das primäre Ziel der durchgeführten Untersuchungen zur Möglichkeit der Inhibierung einer UV-A vermittelten Lipidperoxidation unter Einfluß von Melatonin und N-Acetylserotonin bestand in der Gegenüberstellung der Effektivität und des Schutzpotentials beider Indolderivate.

Bereits Arbeiten von Melchiorri et al., 1996 belegen die *in vitro* Wirksamkeit von Melatonin in der Verminderung einer Lipidperoxidation in Rattenhirnhomogenaten. Daneben zeigten Chen et al., 1995 ebenfalls eine inhibierende Wirkung von Melatonin auf eine Eisensulfat bedingte Lipidperoxidation von Gewebhomogenaten der Retina von Albinoratten *in vitro*. Als Index für die durch unterschiedliche Methoden ausgelösten peroxidativen Prozesse an den Membranlipiden wurden in beiden Arbeiten die Konzentrationen der gebildeten sekundären Produkte Malonaldehyd und 4-Hydroxyalkenal herangezogen. Auffallend ist dabei, daß ein ausreichender Schutz nur durch Einsatz von Melatoninkonzentrationen im millimolaren Bereich erreicht werden konnte.

Für unsere Untersuchungen nutzten wir kein komplexes Keratinozytenmodell, sondern verwendeten ein zellfreies Testsystem. Als physiologisch relevante Lipidkomponente diente die zweifach ungesättigte Linolsäure. Diese wurde mit und ohne Indolderivatsupplementierung verschiedenen UV-A Dosen (7,5 J/cm<sup>2</sup> und 15 J/cm<sup>2</sup>) ausgesetzt. Im weiteren Verlauf erfolgte die kapillarzonenelektrophoretische Quantifizierung der gebildeten Linolsäureperoxide. Im Ergebnis dieser Untersuchungen konnte nur eine geringe Wirksamkeit von Melatonin gegen eine UV-A bedingte Linolsäureperoxidation festgestellt werden. Eine stärkere Hemmung dieses Prozesses war durch Einsatz von 1 mM Melatonin zu erreichen.

Im Gegensatz dazu erwies sich N-Acetylserotonin, als direkte Vorstufe des Melatonins, als wesentlich effektiver in der Eigenschaft, eine peroxidische Veränderung der Linolsäure zu verringern. Neben einer N-Acetylserotoninkonzentration von 1 mM zeigten auch 100  $\mu$ M und 10  $\mu$ M eine detektierbare dosisabhängige Schutzwirkung.

Die schwache bathochrome Verschiebung der Absorptionsspektren in den längerwelligen Spektralbereich und die Bildung verschiedener Photoprodukte nach UV-Bestrahlung der 1 mM Lösungen dürfte keine große Relevanz für derartige ausgeprägte schützenden Effekte besitzen (Kap. 4.5).

Abuja et al., 1997 verweisen in ihren Ausführungen ebenfalls auf die nur schwachen erreichbaren Protektionen gegen eine oxidative Schädigung von menschlichem LDL nach Anwendung von Melatonin im Vergleich zu  $\alpha$ -Tocopherol. Die Konzentrationen an Melatonin, die für eine Inhibierung der Lipidperoxidation in diesen Untersuchungen benötigt wurden, lagen nicht im menschlichen Plasmakonzentrationsbereich. Deswegen konnte eine direkte physiologische Relevanz von Melatonin als wirksames Antioxidanz gegen eine Lipidperoxidation in diesem System nicht befürwortet werden. Daneben stellten Duell et al., 1998 ebenso fest, daß nur extreme, supraphysiologische Konzentrationen an Melatonin eine schwache antioxidative Wirksamkeit in der Inhibierung einer Metallionen-vermittelten Oxidation von LDL bedingen.

Im Gegensatz dazu übertraf der Einsatz von  $\alpha$ -Tocopherol, Ascorbinsäure und Tryptophan die Effektivität von Melatonin um ein Vielfaches. Untersuchungen von Wölfler et al., 1999 belegen außerdem, daß N-Acetylserotonin ein besseres extra- und intrazelluläres Antioxidanz im Vergleich zu Melatonin darstellt. Für diese Unterschiede zwischen den beiden strukturverwandten Indolderivaten wird das Vorhandensein einer freien, phenolischen OH-Gruppe im N-Acetylserotoninmolekül diskutiert (Abb. 3).

#### 4.7 Untersuchungen zur Penetration in humane Haut ex vivo

Als in vitro-Modellsystem zur Durchführung der einzelnen Penetrationsuntersuchungen und zur Ermittlung des dermalen Wirkstofftransportes der verschiedenen Substanzen wurde als Einkammersystem die Diffusionszelle nach FRANZ ausgewählt. Die Gebräuchlichkeit dieser Versuchsanordnung wird dabei durch korrelierende Ergebnisse zwischen in vitro-Befunden von Franz (1975) und in vivo-Daten von Feldmann et al. (1970) unterstützt. In Abb. 59 ist schematisch der Aufbau einer derartigen Diffusionszelle dargestellt. Sie besteht im Wesentlichen aus einer doppelwandigen, temperierbaren Glaskammer (32°C, Hautoberflächentemperatur) mit der darin enthaltenen, kontinuierlich gerührten Akzeptorflüssigkeit. Nach oben hin wird die FRANZ'sche Diffusionszelle durch eine Textilgaze begrenzt, auf der das vorbereitete Hautsheet (3,14 cm<sup>2</sup>) so angeordnet wird, daß die dermale Seite in Kontakt zum Akzeptormedium treten kann. Diese Anordnung wird durch einen Glasring und eine Metallklammer auf der Apparatur fixiert, und eine Glasbedeckung dient der Gewährleistung möglichst gleichbleibender Hydratationsbedingungen im gesamten Versuchszeitraum.

Das primäre Ziel der mit dieser Methode durchgeführten Untersuchungen bestand darin, das Penetrationsvermögen und -verhalten der verschiedenen potentiell antioxidativen Verbindungen in die humane Haut ex vivo nach definierter Applikationsdauer aus zwei einfachen dermatologischen Standardvehikeln zu charakterisieren. Es sollten penetrationskinetische Daten und Konzentrations-Zeit-Profile ermittelt und Aussagen zur Verteilung bzw. Anreicherung in den einzelnen Hautschichten getroffen werden, um eine Korrelation zu den Zellkulturergebnissen herstellen zu können.

Für alle Penetrationen kamen als halb feste Zubereitungen die Wasserhaltige Hydrophile Salbe DAB (Öl-in-Wasser-Emulsion) und die Wasserhaltige Wollwachsalkoholsalbe DAB (Wasser-in-Öl-Emulsion) als Wirkstoffträger zum Einsatz. Die Ermittlung der einzelnen Penetrationsdaten geschah unter Nutzung von exzidiertem Mammahaut. Der Vorteil des verwendeten Hautmaterials ist dabei in der besseren Reproduzierbarkeit und geringeren experimentell bedingten Variation aufgrund ähnlicher anatomischer und physiologischer Gegebenheiten zu suchen.

Als Hautschichttiefen wurden für das Stratum corneum 20 µm, die Epidermis 80 µm und für die Dermis 1280 µm angenommen. Die erhaltenen mittleren Epidermisbreiten, die für die einzelnen durchgeführten Penetrations-Versuchskomplexe verwendeten Mammahautpräparate, sind in der Tab. 10 dargestellt.

Tab. 10: Mittlere Epidermisbreiten der verwendeten Mammahautpräparate in µm (n=15; MW±SD)

Versuchskomplex	Epidermisbreite ± SD [µm]		
	Haut A	Haut B	Haut C
Flavonoidgemische	64,91 ± 6,41	79,86 ± 12,09	78,38 ± 26,68
Rutin	64,91 ± 6,41	79,86 ± 12,09	78,38 ± 26,68
<sup>3</sup> H-Melatonin	70,95 ± 27,59	69,68 ± 18,72	85,33 ± 48,36

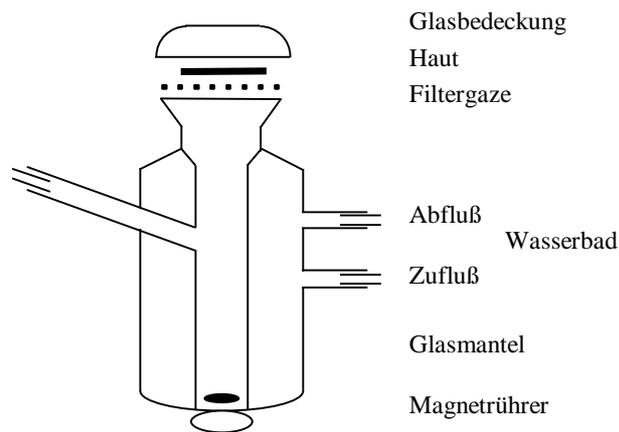


Abb. 59: Schematischer Aufbau der Diffusionszelle nach FRANZ (1975)

## 4.7.1 Penetration der Flavonoide

### 4.7.1.1 Flavonolglyka

Die penetrierten Wirkstoffmengen an Quercetin, Kämpferol und Isorhamnetin (je 1%-ig im Gemisch) aus einer W/O- bzw. O/W- Emulsion in die verschiedenen Hautschichten nach einer Applikationsdauer von 30 min und 300 min sind in den Abbildungen 60 und 61 ersichtlich.

Bei Verwendung beider Vehikelsysteme wurden im Stratum corneum sehr hohe Konzentrationen im millimolaren Bereich gefunden. In der lebenden Epidermis konnten ebenfalls hohe Wirkstoffmengen quantifiziert werden. Dabei zeigten sich insgesamt höhere Konzentrationswerte der einzelnen Flavonolglyka in der Epidermis nach Applikation des O/W-Standardvehikels (Abb. 61). Vergleicht man das Penetrationsverhalten der einzelnen aglykosidischen Verbindungen so fällt auf, daß sich eine größere Menge des lipophileren Isorhamnetins im Gegensatz zu Quercetin und Kämpferol nach Auftrag der W/O-Emulsion in der Epidermis nach 30 min nachweisen ließ (Abb. 60).

Dagegen konnten nach Applikation des O/W-Standardvehikels höhere epidermale Konzentrationen an Quercetin und Kämpferol im Vergleich zum Isorhamnetin nach 30 min und 300 min erreicht werden, während sich die gefundenen Konzentrationen der einzelnen Flavonole im Stratum corneum bis auf Kämpferol nach 300 min nicht signifikant voneinander unterschieden.

Insgesamt lagen die in der Epidermis erreichten Wirkstoffmengen über dem verwendeten Konzentrationsbereich im *in vitro* Zellkulturmodell. Im dermalen Gewebe waren die nachgewiesenen Konzentrationen bei Verwendung beider Vehikelsysteme sehr niedrig.

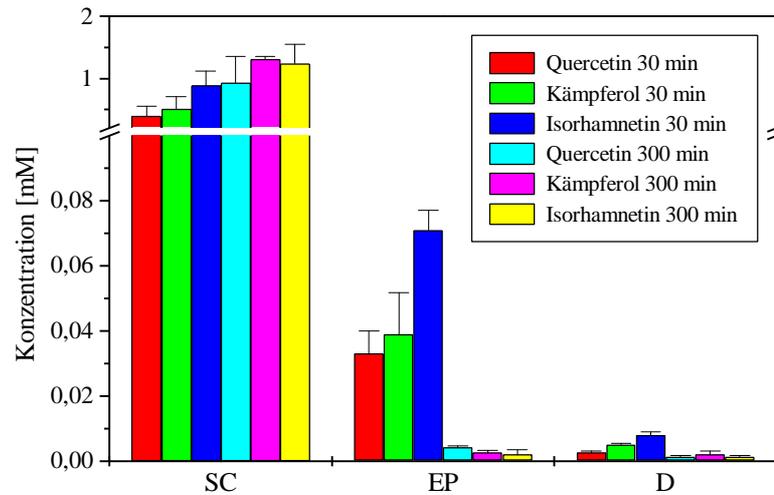


Abb. 60: Penetration der Flavonolglyka Quercetin, Kämpferol und Isorhamnetin (je 1%-ig im Gemisch) in die einzelnen Hautschichten (SC: n = 3; EP: n = 3; D: n = 3) aus der Wasserhaltigen Wollwachsalkoholsalbe (W/O) nach 30 und 300 min.

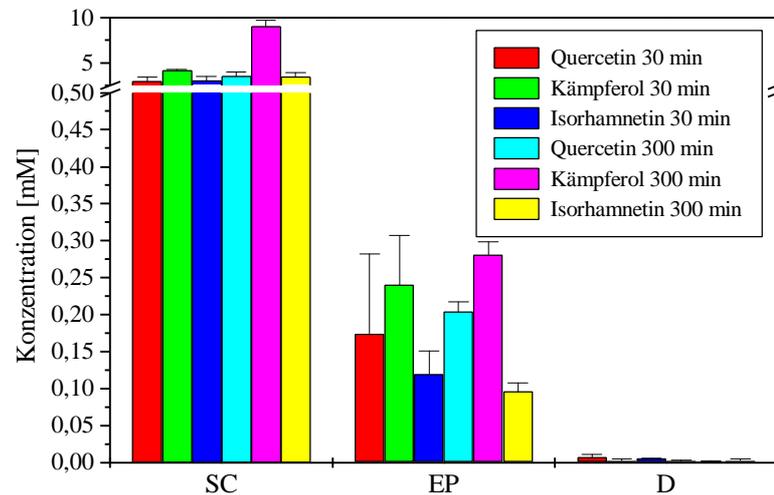


Abb. 61: Penetration der Flavonolglyka Quercetin, Kämpferol und Isorhamnetin (je 1%-ig im Gemisch) in die einzelnen Hautschichten (SC: n = 3; EP: n = 3; D: n = 3) aus der Wasserhaltigen Hydrophilen Salbe (O/W) nach 30 und 300 min.

#### 4.7.1.2 Rutin

Aus der Abbildung 62 lassen sich die verschiedenen Rutinkonzentrationen im Stratum corneum, in der Epidermis und in der Dermis nach topischer Applikation der O/W- und W/O-Standardvehikel entnehmen. Im Stratum corneum konnten erwartungsgemäß hohe Konzentrationen an Rutin bestimmt werden. Daneben wurden in der Epidermis der humanen Haut bei Verwendung beider Vehikelsysteme nach 30 min und 300 min Einwirkzeit Rutinmengen gefunden, die sich im mikromolaren Konzentrationsbereich der Zellkulturversuche bewegen. Eine Penetration von Rutin in die dermalen Schichten ließ sich nur in einem geringen Ausmaß nachweisen.

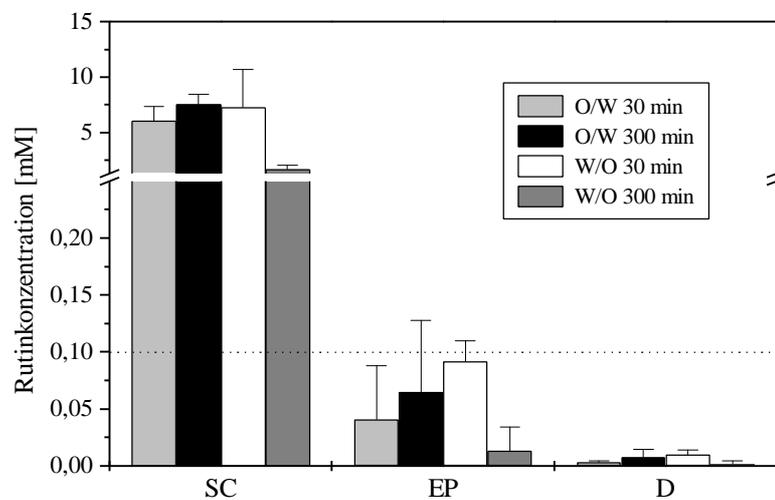


Abb. 62: Penetration von Rutin aus einer O/W- bzw. W/O-Standardemulsion in humane Haut ex vivo. (1%-ige Rutinkonzentration im Vehikel) (SC: n = 3; EP: n = 3; D: n = 3).

#### 4.7.2 Penetration von Melatonin

In der Abbildung 63 sind die penetrierten Wirkstoffkonzentrationen an Melatonin für beide Vehikelsysteme im Kurz- und Langzeitbereich (30 und 300 min) in den einzelnen Hautschichten zusammenfassend dargestellt. Bereits nach einer Applikationsdauer von 30 min zeigte sich eine sehr starke Anreicherung von Melatonin im Stratum corneum, die besonders ausgeprägt bei Verwendung des O/W-Standardvehikels war. Das Ausmaß der Wirkstoffpenetration in das Stratum corneum konnte durch eine längere Expositionsdauer nicht signifikant gesteigert werden. Neben den hohen Wirkstoffmengen im SC wurden auch in den epidermalen Schichten nach 30 min höhere Konzentrationen an Melatonin quantifiziert, wobei diese mit den an der Zellkultur getesteten Mediumkonzentrationen korrelierten. Hier zeigte sich ebenfalls eine stärkere Anreicherung des Wirkstoffes nach Applikation des O/W-Standardvehikels. Eine Erhöhung der Applikationsdauer auf 300 min zog nur eine schwache Erhöhung der epidermalen Konzentrationswerte nach sich. Im dermalen Gewebe konnten nur noch extrem niedrige Konzentrationswerte nachgewiesen werden.

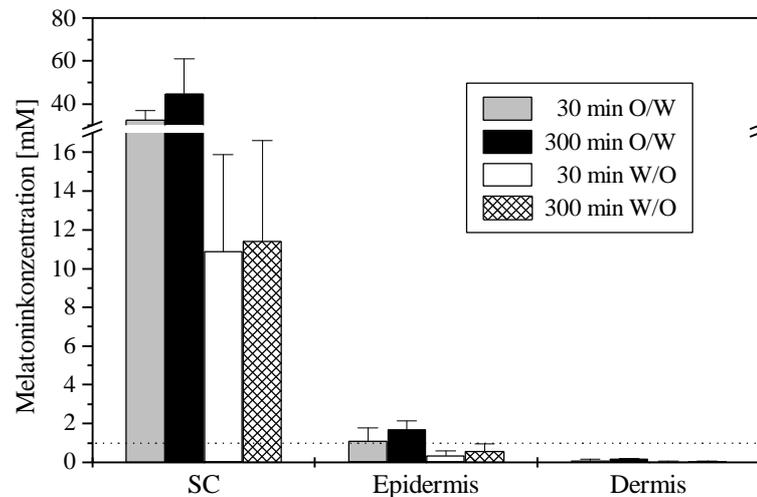


Abb. 63: Penetration von Melatonin aus einer O/W- bzw. W/O-Standardemulsion in humane Haut ex vivo. (1%-ige Melatoninkonzentration im Vehikel) (SC: n = 3; Epidermis: n = 9; Dermis: n = 9). Die gestrichelte Linie markiert die höchste eingesetzte Melatoninkonzentration in den in-vitro Zellversuchen.

#### 4.7.3 Diskussion

Zusätzlich zur Bewertung der in vitro Toxizität und zu den Untersuchungen des zytoprotektiven Potentials der verschiedenen, in dieser Arbeit verwendeten Antioxidantien am in vitro Keratinozytenmodell sollte das Penetrationsverhalten von Melatonin, Rutin und der Flavonolaglyka in die humane Haut ex vivo aus einem O/W- und einem W/O-Standardvehikel beurteilt werden.

Neben einer Adsorption an der Hautoberfläche schlossen bereits Merfort et al., 1994 aus dem Ergebnis einer durchgeführten in vivo Studie auf ein ausreichendes Penetrationsvermögen verschiedener Kamillenflavone (Apigenin, Luteolin und Apigenin 7-O- $\beta$ -glucosid) in die tieferen Hautschichten, was im Hinblick auf eine topische Anwendung als Antiphlogistika eine große Bedeutsamkeit erlangt.

In den vorliegenden Untersuchungen wurde die Penetration der Flavonolaglyka Quercetin, Kämpferol und Isorhamnetin im Gemisch (je 1%-ig) simultan bestimmt. Frühere Arbeiten zeigten dabei keine wachstumsinhibierenden Effekte einer Kombination der drei Flavonolaglyka (je 1  $\mu$ M und 2  $\mu$ M) an der HaCaT-Zelllinie (Nickel, 1997). Nach einer lokalen Applikation (30 min und 300 min) lagen aber die gefundenen Konzentrationen in der Epidermis über dem verträglichen Konzentrationsbereich der Zellkultur. Aus diesem Grund trugen die Versuche zur topischen Anwendung und dem Penetrationsverhalten der drei aglykosidischen Verbindungen nur Modellcharakter.

In den Versuchen zur Penetration von Rutin in die humane Haut aus der O/W- und W/O-Emulsion konnten ausreichende penetrierte Wirkstoffmengen in der Epidermis nach 30 min und 300 min Auftragsdauer ermittelt werden, die sich im verwendeten Konzentrationsbereich an der Zellkultur bewegten. Hier zeigte Rutin in den in vitro Zellversuchen eine hohe Keratinozytenverträglichkeit.

Zur topischen Applikation und zum Penetrationsverhalten von Melatonin an der humanen Haut existieren bisher nur wenige Arbeiten, die sich mit diesem Sachverhalt beschäftigt haben. Die größten Bemühungen und Ansatzpunkte der Vergangenheit lagen in der Entwicklung Transdermaler Therapeutischer Systeme (TTS), um eine gezielte Beeinflussung der systemischen Melatoninspiegel über eine transdermale Aufnahme zu erreichen (Bènès et al., 1997; Konsil et al., 1995; Lee et al., 1994; Kandimalla et al., 1999). Bei diesen Untersuchungen zur topischen Anwendung wurde nicht die Verteilung in den einzelnen Hautschichten betrachtet, sondern der Anstieg der Serummelatoninspiegel gesunder Probanden gemessen oder die Konzentration des Hauptmetaboliten 6-Sulfatoxymelatonin im Urin quantifiziert (Lee et al., 1994; Bangha et al., 1997a). Im Ergebnis dieser Untersuchungen konnte gezeigt werden, daß Melatonin aus einem Propylenglykol-haltigen TTS (40 %) bzw. einer 70 %-igen ethanolischen Lösung leicht durch die Haut in den Blutkreislauf aufgenommen wird (Permeation und Resorption). Dabei kommt dem Stratum corneum eine gewisse Depotfunktion für Melatonin zu. Aus diesem wird Melatonin kontinuierlich in die systemische Zirkulation abgegeben. Diese These wird auch durch Arbeiten von Bènès et al., 1997 unterstrichen.

Für den topisch-präventiven Einsatz verschiedener Antioxidantien, wie z. B. Melatonin und Rutin, ist aber nicht die systemische Aufnahme von Bedeutung, sondern die Verfügbarkeit des Wirkstoffes am Ort der Schädigung durch verschiedene exogene und endogene Noxen. Durch eine Anreicherung der antioxidativ wirksamen Substanz in ausreichend hohen Konzentrationen im Stratum corneum und vor allem in den lebenden Epidermisschichten sollen UV und oxidativ bedingte Schäden an den inter- und intrazellulären strukturgebenden Lipiden des Stratum corneums und den verschiedenen Zellpopulationen und -strukturen des epidermalen Gewebes verhindert bzw. verringert werden.

Nach kutaner Melatoninapplikation zeigte sich ebenfalls ein ausreichendes Penetrationsverhalten in die humane Haut ex vivo schon nach 30 min Verweildauer, wobei die Penetration aus der O/W-Emulsion begünstigt war. Dabei kam es zu einer erwartungsgemäß starken Akkumulation von Melatonin im Stratum corneum, die durch die lipophilen Eigenschaften des Moleküls bedingt wurde. Da nach 300 min Auftragsdauer keine wesentliche Erhöhung der gefundenen Konzentration im Stratum corneum erreicht werden konnte, ist in diesem Fall von einer Sättigung bereits nach 30 min auszugehen. Bekannterweise fungieren die oberen Lagen der Hornschicht (Stratum corneum disjunctum) als wirksames Reservoir für lokal applizierte Arzneimittel, wohingegen in den tieferen Lagen (Stratum corneum conjunctum) die Barrierefunktion überwiegt (Zesch et al., 1973). Aus dem Stratum corneum kann der entsprechende Arzneistoff zeitabhängig in tieferliegende Hautschichten diffundieren und prolongiert freigesetzt werden. In den lebenden Epidermisschichten kann aufgrund einer hohen Stoffwechselaktivität die applizierte Substanz einer Biotransformation durch abbauende Enzyme unterliegen (Metabolisierung). Lee et al., 1994 gehen aber davon aus, daß Melatonin in der menschlichen Haut weder metabolisch umgewandelt noch zerstört wird.

Ein ausreichend hoher Anteil der aufgetragenen Melatonindosis erreichte die lebende Epidermis, so daß der gefundene Konzentrationsbereich mit den eingesetzten Konzentrationen in den Zellkultur-experimenten durchaus verglichen werden kann. Eine Optimierung der galenischen Formulierung

zur Modulation der Penetration mittels Zusatz von Enhancern war in diesem und im Fall von Rutin nicht nötig.

Insgesamt läßt sich sagen, daß eine starke Akkumulation von Melatonin im SC bereits nach 30 min erwünscht ist, da diese Substanz - wie auch Rutin - zusätzlich über UV-B Lichtfilterwirkungen verfügt. Das Eindringen der UV-B Strahlung in tiefergelegene Schichten kann infolge dieser UV-B Absorption verhindert und ein zusätzlicher Schutz erreicht werden. Eine systemische Aufnahme ist für diesen Wirkungsmechanismus aber nicht essentiell und sogar unerwünscht.

Grundsätzlich sollte bei einer topischen Anwendung von UV-Protektiva und Lichtschutzsubstanzen nur eine lokal begrenzte Anreicherung und Wirkung auf der Hautoberfläche und in den oberen Epidermisschichten (SC) angestrebt werden. Eine Permeation, d. h. ein Durchdringen der Haut mit einer anschließenden systemischen Aufnahme (Resorption) ist als nicht sinnvoll anzusehen. Da Sonnenschutzmittel in der Regel großflächig aufgetragen werden, muß auch bei niedrigen Penetrationsraten mit einer höheren Belastung des Organismus gerechnet werden.

## 5 Diskussion

Das Hauptziel der Untersuchungen dieser Arbeit lag in der Testung verschiedener antioxidativ wirksamer Substanzen hinsichtlich ihrer *in vitro* Verträglichkeit und der Fähigkeit zur Zytoprotektion im keratinozytären Zellmodell. In diesem Zusammenhang soll abschließend die Möglichkeit eines topisch-präventiven Einsatzes der verwendeten Verbindungen diskutiert und bewertet werden.

Die wichtigste Voraussetzung für die unbedenkliche kutane Applikation ist das Fehlen eines zellschädigenden Potentials. Eine Zellschädigung wurde als Verminderung der DNA-Syntheseleistung bzw. der Lebendzellanzahl im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle ausgedrückt. Weiterhin erfolgte eine Betrachtung der Beeinflussung der Zellzyklusphasenverteilung und des apoptotischen bzw. nekrotischen Zelltodes. Die genutzte Keratinozytenzellkultur erwies sich für die Untersuchungen als sinnvolles Modell. Versuche an humanen Keratinozyten erlauben Aussagen und Rückschlüsse auf die epidermale Verträglichkeit und Wirksamkeit verschiedener Wirkstoffe, da sie die Hauptzellpopulation in der Epidermis ausmachen. Ebenso besitzen sie als Zielzellen für UV-bedingte Schädigungen eine große Relevanz. Der ausgewählte Einsatz von NHEK sollte die *in vivo* Situation noch besser reflektieren.

Die eingesetzten Substanzen zeigten ein unterschiedliches Verhalten an humanen Keratinozyten. Im Falle der Flavonoide zeichnete sich Rutin im Gegensatz zu den Aglykosiden Quercetin und Kämpferol durch eine hohe Keratinozytenverträglichkeit aus. Obwohl Quercetin die wichtigen Strukturvoraussetzungen für optimale Radikalfängereigenschaften besitzt (Kap. 2.5.2), wurde im verwendeten *in vitro* System eine starke zytotoxische Reaktion an den Hautzellen ausgelöst. Somit kam Quercetin für weitergehende Versuche an den Keratinozyten nicht in Frage. Dagegen sprechen die vorliegenden Befunde zum Melatonin und N-Acetylserotonin für eine gute epidermale Verträglichkeit (Kap. 4.1.2 und 4.1.3).

Nach erfolgter Beurteilung der *in vitro* Toxizität, sollte die Frage vordergründig bearbeitet werden, ob ein ausreichender Schutz humaner Keratinozyten vor oxidativ bedingten Schäden durch Einsatz von Rutin, Melatonin und N-Acetylserotonin erreicht werden kann. Die Schädigung der Keratinozyten erfolgte durch unterschiedliche chemische und physikalische Noxen (Kap. 3.5).

Zur Verhinderung bzw. Verminderung UV-vermittelter zellulärer Schäden des Hautorgans (Kurz- und Langzeitwirkung) existieren verschiedene Versuchsansätze. Intensiv erforscht wird beispielsweise die Möglichkeit der topischen, liposomalen Applikation von DNA-Reparatur-enzymen (z. B. T4 Endonuklease V), um UV-medierte DNA-Schäden (Pyrimidindimerbildung) zu beheben (Yarosh, 1997). Weiterhin sind die Bemühungen auf einen Einsatz unterschiedlicher Antioxidantien und Radikalfänger zur Prävention sauerstoffabhängiger Krankheitsbilder und der Verringerung einer kutanen Manifestation aktinischer Schäden ausgerichtet. Während bei systemischer Anwendung von Vitamin C bzw. Vitamin E keine photoprotektiven Effekte beobachtet werden konnten (Werninghaus et al., 1994; Eberlein-König et al., 2000), scheint in diesem Zusammenhang eine topische Anwendung ein vielversprechendes Konzept zu sein (Roshchupkin et al., 1979; Hadshiew et al., 1997; Lopez-Torres et al., 1998; Pelle et al., 1999).

Ein Einsatz der natürlich vorkommenden Verbindung Rutin zeigte photoprotektive Effekte, die vornehmlich auf den UV absorbierenden Eigenschaften beruhen (Kap. 4.3.1). Daneben konnte eine UV-bedingte Generierung intrazellulärer Peroxide durch eine Vorbehandlung mit dem Glykosid verringert werden (Kap. 4.4.1). Weiterhin wurden humane Keratinozyten vor einer Fe<sup>2+</sup>-induzierten Zytotoxizität effektiv geschützt (Kap. 4.3.1).

Aufgrund dieser Befunde, der ausgezeichneten Keratinozytenverträglichkeit (Kap. 4.1.1.3) und des befriedigenden Penetrationsverhaltens (Kap. 4.7.1.2) ist Rutin als phenolisches Antioxidanz für eine topisch-präventive Applikation durchaus geeignet.

Im Gegensatz zu Rutin muß die topische Anwendbarkeit von Melatonin kritischer bewertet werden. Bis auf eine gleichzeitige Supplementierung der Zellen mit Melatonin während einer UV-B Exposition konnte weder nach alleiniger Vorbehandlung (2 h) noch bei gleichzeitiger Applikation und UV-A Bestrahlung eine Zytoprotektion erreicht werden. Die beobachteten dosisabhängig photoprotektiven Effekte nach UV-B Bestrahlung können durch die starken UV absorbierenden Eigenschaften erklärt werden und stehen bei den beobachteten Effekten im Vordergrund (Kap. 4.3.2).

Soll eine Substanz, die gewisse UV-Filtereigenschaften besitzt, topisch eingesetzt werden, muß sie über eine ausreichende Photostabilität während des Bestrahlungsvorganges verfügen. Dies ist nach den vorliegenden Untersuchungen beim Melatonin und N-Acetylserotonin nicht gegeben (Kap. 4.5). Es wurde sowohl eine bathochrome Verschiebung des Absorptionsspektrums als auch die Entstehung verschiedener Photoabbauprodukte nachgewiesen. Derartige Photoinstabilitäten können beispielsweise in einer topischen Formulierung zu Abbauprodukten führen, deren Toxizitätsprofil und Penetrationsverhalten unbekannt ist. Dies kann im ungünstigen Fall allergische Reaktionen mit entsprechenden Hauteffloreszenzen hervorrufen.

Neben einer Uneffektivität von Melatonin bei gleichzeitiger UV-A Bestrahlung zeichnete sich eine zusätzlich gesteigerte Zytotoxizität bei hohen Konzentrationen ab. Dies zeigte sich an den Parametern DNA-Syntheserate und Lebendzellanzahl. Bei der höchsten Konzentration (1 mM) und gleichzeitiger UV-A Exposition konnte weiterhin die Auslösung apoptotischer Prozesse (Annexin-V/PI, Apo2.7) nachgewiesen werden. Zusätzlich kam es ebenfalls zu Alterationen im Zellzyklus (Kap. 4.3.2), die mit einer Arretierung der Keratinozyten in der G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>-Phase und einer Abnahme der Zellen in der Synthesephase einhergingen. In ihrer Gesamtheit deuten die Ergebnisse auf eine Phototoxizität im *in vitro* Zellmodell hin. Einige wenige Hinweise auf ein toxisches Potential *in vivo* nach UV-Bestrahlung liegen vor.

In ihren Untersuchungen konnten Kim et al., 1999 in einem histopathologischen Test eine schwache Degeneration der Keratinozyten (Meerschweinchen) in der Epidermis und eine Vasodilatation in der Dermis nach UV-A Bestrahlung zeigen. Sie beschrieben ebenfalls eine UV-A bedingte Veränderung der molekularen Struktur von Melatonin (Photolyse) mit der Bildung unidentifizierter Photoprodukte bei UV-A Bestrahlungsdosen, die mit unserem experimentellem Design übereinstimmten (15 J/cm<sup>2</sup>).

Eine Erklärungsmöglichkeit der gesteigerten Toxizität von Melatonin bei gleichzeitiger UV-Exposition kann aus der chemische Struktur des Moleküls beantwortet werden. Die beiden Indolderivate Melatonin und N-Acetylserotonin leiten sich von Tryptophan ab. Diese biogene, aromatische Aminosäure ist ein relevantes endogenes Chromophor in der Haut. Bei Absorption von Lichtquanten wird ein energiereicher, angeregter Zustand erreicht. In der Folge kann die Generierung eines Tryptophanradikalkations stattfinden und photochemische bzw. -oxidative Reaktionen ausgelöst werden (Kohen, 1995; Tedesco et al., 1997). Babu et al., 1992 beschrieben die Produktion von Singulett-Sauerstoff und von Superoxidanionradikalen aus UV-B bestrahltem Tryptophan. Sie räumten ein, daß diese reaktiven Sauerstoff-Formen mit Membran-, Zytoplasma- und DNA-schädigenden Effekten einhergehen können.

Die Datenlage bezüglich des antioxidativen Potentials von Melatonin ist widersprüchlich. Während vielfach die effektiven Radikalfängereigenschaften und ein starkes antioxidatives Potential

beschrieben wurden (Tan et al., 1993; Pieri et al., 1994; Daniels et al., 1996), konnten in unserem in vitro Modell entgegen aller Erwartungen keine Zytoprotektionen nachgewiesen werden. Der weiterhin beobachtete Anstieg der Rhodaminfluoreszenz (Kap. 4.4.3) nach UV-A Exposition weist dabei auf ein zusätzliches oxidierendes Potential von Melatonin bzw. seiner Photoabbauprodukte hin.

Durch eine Inkubation der Zellen mit N-Acetylserotonin (2 h) konnte dagegen eine starke Verminderung der intrazellulär generierten oxidierenden Verbindungen eindrucksvoll demonstriert werden.

Barsacchi et al., 1998 zeigten ebenfalls abweichend von den allgemeinen Erwartungen einen prooxidativen Effekt von Melatonin mit Cumenhydrodroperoxid und Wasserstoffperoxid anhand eines zusätzlichen dosisabhängigen Vitamin E Verbrauchs. Dagegen entfaltete N-Acetylserotonin starke antioxidative Effekte in diesem System. Aus ESR Studien unter Verwendung eines Galvinoxylradikals (H-Abstraktor) leiteten sie ab, daß N-Acetylserotonin als klassisches Antioxidans durch H-Abgabe wirkt. Dagegen wird der prooxidative Effekt des Melatonins auf Interaktionen des gebildeten Radikalkations mit Vitamin E zurückgeführt. Beide Moleküle differieren in der Auswirkung auf e-Transportprozesse. Beim N-Acetylserotonin ist eine H-Abstraktion aufgrund der chemischen Struktur, d. h. einer OH- und NH-Gruppe in einer konjugierten Position, begünstigt. Ein starkes antioxidatives Potential von N-Acetylserotonin im Gegensatz zu Melatonin, welches keine Effekte zeigte, wird ebenfalls in jüngsten Untersuchungen von Wölfler et al., 1999 beschrieben.

In einem Lipidperoxidationsmodell konnten Abuja et al., 1997 nach Einsatz von Melatonin ein geringeres Schutzpotential im Verleich zu  $\alpha$ -Tocopherol zeigen. Untersuchungen zur Beeinflussung der LDL Oxidation durch Melatonin demonstrierten nur eine schwache Wirksamkeit bei Anwendung von supraphysiologischen Konzentrationen (Duell et al., 1998). Weiterhin wurden ebenfalls nur limitierte direkte antioxidative Wirkungen des Melatonins von Marshall et al., 1996 beschrieben. Studien von Antunes et al., 1999 bewiesen, daß Melatonin nicht zu einem Kettenabbruch führt, sondern bestenfalls als schwacher Verzögerer (Retarder) einer Lipidperoxidation dienen kann. Dies wurde darauf zurückgeführt, daß Melatonin-abgeleitete Radikale nicht ausreichend stabilisiert sind und deshalb die Formierung derartiger Radikale eine Kettenreaktion nicht unterbricht.

In den DHR-Versuchen konnte eindeutig ein Schutzpotential von Rutin, Kämpferol und N-Acetylserotonin nachgewiesen werden. Dagegen zeigten sich keine Zytoprotektionen in den verschiedensten Schädigungsmodellen. Tyrrell (1995) wies bereits darauf hin, daß die Zugabe antioxidativ wirksamer Vitamine den Schutz von Zellkulturen gegen UV-B oder UV-A Strahlung nicht erhöht. Das ist vor dem Hintergrund der Komplexizität radikalbedingter zellulärer Effekte nicht verwunderlich. Freie Radikale besitzen eine extrem kurze HWZ (Tab. 1) und hohe Reaktivität. Deshalb wirken sie nur auf kurze Distanzen und reagieren mit allen umliegenden Zellstrukturen. Ein vollständiger Schutz ist deswegen nicht zu erwarten. Wenn ein Radikalfänger seine Wirksamkeit entfalten soll, muß er am Ort des Geschehens in ausreichender Konzentration vorhanden sein. Das setzt eine ausreichende Vorinkubationszeit und Dosis voraus. Deshalb erschien es wenig sinnvoll erst unmittelbar und alleinig nach der induzierten Schädigung durch UV ein Antioxidanz zuzusetzen.

Die Ergebnisse unserer Untersuchungen belegen eindeutig eine phototoxische Wirkung von Melatonin bei gleichzeitiger UV-A Exposition. Ein angestrebter topischer Einsatz dieser Verbindung (Bangha et al., 1996 und 1997a/b; Dreher et al., 1998 und 1999) muß aufgrund der

vorliegenden Daten kontrovers diskutiert werden, ebenso wie das postulierte starke antioxidative Potential in der Haut (Fischer und Elsner, 2001). Lokale sensibilisierende Effekte, besonders bei einer gestörten Barrierefunktion der Epidermis, können nicht mit vollständiger Sicherheit ausgeschlossen werden. Über Langzeiteffekte in vivo lassen sich nur spekulative Aussagen treffen. Daneben dokumentieren unsere Untersuchungen eindrucksvoll die Möglichkeit einer kutanen Rutinapplikation gegen UV-vermittelten oxidativen Streß.

## 6 Zusammenfassung

Die Untersuchungen verschiedener Antioxidantien hinsichtlich ihres Einflusses auf die Proliferation humaner Keratinozyten und des zytoprotektiven bzw. antioxidativen Potentials in verschiedenen Testsystemen ergaben ein unterschiedliches Wirkprofil und -verhalten.

Von den verwendeten Flavonoiden zeigte nur Rutin eine hohe Keratinozytenverträglichkeit. Dagegen verursachten Quercetin und Kämpferol eine starke Wachstumsinhibierung bei relativ niedrigen Konzentrationen. Melatonin und N-Acetylserotonin zeigten nur in der höchsten eingesetzten Konzentration (1 mM) eine Proliferationsabnahme.

Die Charakterisierung des schädigenden Einflusses von Wasserstoffperoxid ergab neben einer dosisabhängigen Abnahme der DNA-Syntheserate und der Lebendzellanzahl starke Veränderungen im Zellzyklus (HaCaT und NHEK). Es konnte eine Akkumulation der Zellen in der G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>-Phase (G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>-Arrest) beobachtet werden. Daneben wurde die Auslösung apoptotischer Prozesse (Apo2.7) nach einstündiger Wasserstoffperoxidexposition (100 µM, 200 µM) nach 24 h gezeigt.

Zur Überprüfung des zytoprotektiven Potentials dienten unterschiedliche Schädigungsmodelle (UV-Bestrahlung, Wasserstoffperoxid, DHP und Ammoniumeisen-(II)-sulfat). Gegen eine UV-induzierte Zytotoxizität war der Einsatz von Rutin, Melatonin und N-Acetylserotonin nur bei gleichzeitiger Anwendung während des Bestrahlungsvorganges effektiv. Diese Effekte können vordergründig durch die UV-Filtereigenschaften des Moleküls erklärt werden. Eine Anwendung von Melatonin bzw. N-Acetylserotonin zeigte nach simultaner UV-A Bestrahlung eine zusätzlich gesteigerte Toxizität. Weiterhin konnte in diesem Fall ein Anstieg apoptotischer bzw. spätapoptotisch/nekrotischer Zellen und ein Zellzyklusarrest in G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> nachgewiesen werden.

Eine Untersuchung der Photostabilität von Melatonin und N-Acetylserotonin ergab eine bathochrome Verschiebung des Absorptionsspektrums. Nach dünnenschichtchromatographischer Auftrennung konnten 2 Photoabbauprodukte des N-Acetylserotonins und 1 Abbauprodukt von Melatonin detektiert werden.

In der Verhinderung des UV-medierten Anstieges intrazellulärer Peroxide zeigten sich Rutin, Kämpferol und N-Acetylserotonin dosisabhängig als sehr wirksam. Dagegen verursachte ein Einsatz von Melatonin einen zusätzlichen Anstieg der Rhodaminfluoreszenz. Aus diesen Ergebnissen kann auf prooxidative Eigenschaften des Melatonins geschlossen werden.

Die Gegenüberstellung des Schutzpotentials von Melatonin und N-Acetylserotonin gegenüber einer UV-A vermittelten Lipidperoxidation in vitro zeigte nur eine sehr geringe Wirksamkeit von Melatonin im Gegensatz zu seiner biochemischen Vorstufe.

Untersuchungen zum Penetrationsverhalten aus zwei dermatologischen Standardvehikeln vom Typ W/O und O/W sollten eine Verbindung zu den Zellkulturergebnissen herstellen. Alle verwendeten Substanzen zeigten ein gutes Penetrationsverhalten an exzidiierter Humanhaut nach 30 und 300 min. Die gefundenen Konzentrationen liegen dabei im Konzentrationsbereich der Zellkulturversuche.

Abschließend kann gesagt werden, daß ein topischer Einsatz von Melatonin aufgrund der Photoinstabilität und der Phototoxizität fragwürdig erscheint. Eine Anwendung von Rutin zeigte dagegen photoprotektive Effekte (UV-Absorption). Es konnte weiterhin eine UV-bedingte Generierung von intrazellulären Peroxiden nach Vorbehandlung und eine Fe<sup>2+</sup>-induzierte Zytotoxizität verringert werden. Aufgrund dieser Befunde scheint ein topischer Einsatz - im Gegensatz zu Melatonin - sinnvoll zu sein.

## LITERATURVERZEICHNIS

1. Abuja PM, Liebmann P, Hayn M, Schauenstein K, Esterbauer H: Antioxidant role of melatonin in lipid peroxidation of human LDL. *FEBS Lett* (1997) 413: 289-293
2. van Acker SA, Tromp MN, Haenen GR, van der Vijgh WJ, Bast A: Flavonoids as scavengers of nitric oxide radical. *Biochem Biophys Res Commun* (1995) 214(3): 755-759
3. van Acker SA, van der Vijgh WJF, Bast A: Structural aspects of antioxidant activity of flavonoids.: In: Rice-Evans CA, Packer L (eds.) *Flavonoids in Health and Disease*. Marcel Dekker New York, Basel, Hong Kong (1998): 221-251
4. Afanas'ev IB, Dorozhko AI, Brodskii AV, Kostyuk VA, Potapovitch AI: Chelating and free radical scavenging mechanisms of inhibitory action of rutin and quercetin in lipid peroxidation. *Biochem Pharmacol* (1989) 38(11): 1763-1769
5. Afanas'ev IB, Ostrachovitch EA, Abramova NE, Korkina LG: Different antioxidant activities of bioflavonoid rutin in normal and iron-overloading rats. *Biochem Pharmacol* (1995) 50(5): 627-635
6. Antolín I, Rodríguez C, Sàinz RM, Mayo JC, Uría H, Kotler ML, Rodríguez-Colunga MJ, Tolivia D, Menéndez-Pelàez A: Neurohormone melatonin prevents cell damage: effect on gene expression for antioxidant enzymes. *FASEB J* (1996) 10: 882-890
7. Antunes F, Barclay LRC, Ingold KU, King M, Norris JQ, Scaiano JC, Xi F: On the antioxidant activity of melatonin. *Free Radic Biol Med* (1999) 26(1/2): 117-128
8. Applegate LA, Frenk E: Cellular defense mechanisms of the skin against oxidant stress and in particular UVA radiation. *Eur J Dermatol* (1995) 5: 97-103
9. Babu V, Joshi PC: Tryptophan as an endogenous photosensitizer to elicit harmful effects of ultraviolet B. *Indian J Biochem Biophys* (1992) 29(3): 296-298
10. Bangha E, Elsner P, Kistler GS: Suppression of UV-induced erythema by topical treatment with melatonin (N-acetyl-5-methoxytryptamine). A dose response study. *Arch Dermatol Res* (1996) 288: 522-526
11. Bangha E, Lauth D, Kistler GS, Elsner P: Daytime serum levels of melatonin after topical application onto the human skin. *Skin Pharmacol* (1997a) 10: 298-302
12. Bangha E, Elsner P, Kistler GS: Suppression of UV-induced erythema by topical treatment with melatonin (N-acetyl-5-methoxytryptamine) - Influence of the application time point. *Dermatology* (1997b) 195: 248-252
13. Barsacchi R, Kusmic C, Damiani E, Carloni P, Greci L, Donato L: Vitamin E consumption induced by oxidative stress in red blood cells is enhanced by melatonin and reduced by N-acetylserotonin. *Free Radic Biol Med* (1998) 24(7/8): 1187-1192
14. Bènès L, Claustrat B, Horrière F, Geoffriau M, Konsil J, Parrott KA, DeGrande G, McQuinn RL, Ayres JW: Transmucosal, oral controlled-release, and transdermal drug administration in human subjects: a crossover study with melatonin. *J Pharm Sci* (1997) 86(10): 1115-1119

15. Bjeldanes LF, Chang GW: Mutagenic activity of quercetin and related compounds. *Science* (1977) 197: 577-578
16. Black HS: Potential involvement of free radical reactions in ultraviolet light-mediated cutaneous damage. *Photochem Photobiol* (1987) 46(2): 213-221
17. Bladier C, Wolvetang EJ, Hutchinson P, de Haan JB, Kola I: Response of a primary human fibroblast cell line to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: senescence-like growth arrest or apoptosis. *Cell Growth Differ* (1997) 8(5): 589-598
18. Blickenstaff RT, Brandstadter SM, Reddy S, Witt R: Potential radioprotective agents. 1. Homologs of melatonin. *J Pharm Sci* (1994) 83(2): 216-218
19. Bors W, Heller W, Michel C, Saran M: Flavonoids as antioxidants: determination of radical-scavenging efficiencies. *Methods Enzymol* (1990) 186: 343-355
20. Boukamp P, Petrussevska RT, Breitkreutz D, Hornung J, Markham A, Fusenig NE: Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line. *J Cell Biol* (1988) 106: 761-771
21. Boyce ST, Ham RG: Calcium-regulated differentiation of normal human epidermal keratinocytes in chemically defined clonal culture and serum-free serial culture. *J Invest Dermatol* (1983) 81: 33s-40s
22. Brosin A, Wolf V, Mattheus A, Heise H: Use of XTT-assay to assess the cytotoxicity of different surfactants and metal salts in human keratinocytes. *Acta Derm Venereol* (1997) 77: 26-28
23. Brugger P, Marktl W, Herold M: Impaired nocturnal secretion of melatonin in coronary heart disease. *Lancet* (1995) 345(8962): 1408
24. Bykov VJ, Sheehan JM, Hemminki K, Young AR: In situ repair of cyclobutane pyrimidine dimers and 6-4 photoproducts in human skin exposed to solar simulating radiation. *J Invest Dermatol* (1999) 112: 326-331
25. Cagnoli CM, Atabay C, Kharlamova E, Manev H: Melatonin protects neurons from singlet oxygen-induced apoptosis. *J Pineal Res* (1995) 18: 222-226
26. Carossino AM, Lombardi A, Matucci-Cerinic M, Pignone A, Cagnoni M: Effect of melatonin on normal and sclerodermic skin fibroblast proliferation. *Clin Exp Rheumatol* (1996) 14: 493-498
27. Carroll KK, Guthrie N, So FV, Chambers AF: Anticancer properties of flavonoids, with emphasis on citrus flavonoids. In: Rice-Evans CA, Packer L (eds.) *Flavonoids in Health and Disease*. Marcel Dekker New York, Basel, Hong Kong (1998): 437-446
28. Chen L-D, Melchiorri D, Sewerynek E, Reiter RJ: Retinal lipid peroxidation in vitro is inhibited by melatonin. *Neurosci Res Commun* (1995) 17(3): 151-158
29. Chen ZY, Chan PT, Ho KY, Fung KP, Wang J: Antioxidant activity of natural flavonoids is governed by number and location of their aromatic hydroxyl groups. *Chem Phys Lipids* (1996) 79: 157-163

30. Clopton DA, Saltman P: Low-level oxidative stress causes cell-cycle specific arrest in cultured cells. *Biochem Biophys Res Commun* (1995) 210(1): 189-196
31. Costa EJX, Lopes RH, Lamy-Freund MT: Permeability of pure lipid bilayers to melatonin. *J Pineal Res* (1995) 19: 123-126
32. Daniels WM, van Rensburg SJ, van Zyl JM, van der Walt BJ, Taljaard JJ: Free radical scavenging effects of melatonin and serotonin: possible mechanism. *Neuroreport* (1996) 7(10): 1593-1596
33. Darmon N, Fernandez Y, Canbon-Gros C, Mitjavila S: Quantification of the scavenger capacity of different flavonoids with regard to the superoxide ion. *Food Addit Contam* (1990) 7(1): S60-63
34. Darr D, Combs S, Dunston S, Manning T, Pinnell S: Topical vitamin C protects porcine skin from ultraviolet radiation-induced damage. *Br J Dermatol* (1992) 127: 247-253
35. Darr D, Fridovich I: Free radicals in cutaneous biology. *J Invest Dermatol* (1994) 102: 671-675
36. Deschner EE, Ruperto J, Wong G, Newmark HL: Quercetin and rutin as inhibitors of azoxymethanol-induced colonic neoplasia. *Carcinogenesis* (1991) 12(7): 1193-1196
37. Dreher F, Gabard B, Schwindt DA, Maibach HI: Topical melatonin in combination with vitamins E and C protects skin from ultraviolet-induced erythema: a human study in vivo. *Br J Dermatol* (1998) 139: 332-339
38. Dreher F, Denig N, Gabard B, Schwindt DA, Maibach HI: Effect of topical antioxidants on UV-induced erythema formation when administered after exposure. *Dermatology* (1999) 198: 52-55
39. Drobetsky EA, Turcotte J, Chateaufneuf A: A role for ultraviolet A in solar mutagenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* (1995) 92: 2350-2354
40. Duell PB, Wheaton DL, Shultz A, Nguyen H: Inhibition of LDL oxidation by melatonin requires supraphysiologic concentrations. *Clin Chem* (1998) 44(9): 1931-1936
41. Eberlein-König B, Placzek M, Przybilla B: Protective effect against sunburn of combined systemic ascorbic acid (vitamin C) and d- $\alpha$ -tocopherol (vitamin E). *J Am Acad Dermatol* (1998) 38: 45-48
42. 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
43. Elstner EF (Hrsg.): *Der Sauerstoff: Biochemie, Biologie, Medizin*. BI-Wissenschaftsverlag Mannheim, Wien, Zürich (1990)
44. Engelhardt H, Beck W, Schmitt T (Hrsg.): *Kapillarelektrophorese - Methoden und Möglichkeiten*. Friedr. Vieweg & Sohn Verlagsgesellschaft mbH, Braunschweig, Wiesbaden (1994)

45. Facino RM, Carini M, Aldini G, Saibene L, Pietta P, Mauri P: Echinacoside and caffeoyl conjugates protect collagen from free radical-induced degradation: a potential use of Echinacea extracts in the prevention of skin photodamage. *Planta Med* (1995) 61: 510-514
46. Feldmann RJ, Maibach HI: Absorption of some organic compounds through the skin in man. *J Invest Dermatol* (1970) 54: 399-404
47. Finocchiaro LM, Nahmod VE, Launay JM: Melatonin biosynthesis and metabolism in peripheral blood mononuclear leucocytes. *Biochem J* (1991) 280: 727-731
48. Finocchiaro LM, Glikin GC: Intracellular melatonin distribution in cultured cell lines. *J Pineal Res* (1998) 24: 22-34
49. Fischer T, Wigger-Alberti W, Elsner P: Melatonin in der Dermatologie - Experimentelle und klinische Aspekte. *Hautarzt* (1999) 50: 5-11
50. Fischer TW, Elsner P: The antioxidative potential of melatonin in the skin.: In: Thiele J, Elsner P (eds.): *Oxidants and antioxidants in cutaneous biology. Current Problems in Dermatology*, vol. 29; Karger Basel, Freiburg, Paris, London, New York, New Delhi, Bangkok, Singapore, Tokyo, Sydney (2001): 165-174
51. Flick DA, Gifford GE: Comparison of in vitro cell cytotoxic assays for tumor necrosis factor. *J Immunol Methods* (1984) 68: 167-175
52. Fraun-Bell W: *Cutaneous photobiology*. Oxford University Press Oxford, New York, Tokyo (1985)
53. Franz TJ: Percutaneous absorption. On the relevance of in vitro data. *J Invest Dermatol* (1975) 64: 190-195
54. Fritsch P: *Aufbau und Funktion der normalen Haut*. In: *Dermatologie*. 3. Auflage. Springer Verlag. Berlin, Heidelberg, New York, London, Paris, Tokyo, Hong Kong, Barcelona (1990): 3-32
55. Fuchs J, Huflejt ME, Rothfuss LM, Wilson DS, Carcamo G, Packer L: Impairment of enzymic and nonenzymic antioxidants in skin by UVB irradiation. *J Invest Dermatol* (1989) 93: 769-773
56. Funk JO, Kind P: Zellzykluskontrolle, genetische Instabilität und Krebs. *Hautarzt* (1997) 48: 157-165
57. Gallagher RP, Hill GB, Bajdik CD, Fincham S, Coldman AJ, McLean DI, Threlfall WJ: Sunlight exposure, pigmentary factors, and risk of nonmelanocytic skin cancer - I. Basal cell carcinoma. *Arch Dermatol* (1995a) 131: 157-163
58. Gallagher RP, Hill GB, Bajdik CD, Coldman AJ, Fincham S, McLean DI, Threlfall WJ: Sunlight exposure, pigmentation factors, and risk of nonmelanocytic skin cancer - II. Squamous cell carcinoma. *Arch Dermatol* (1995b) 131: 164-169
59. Gaudet SJ, Slominski A, Etmnan M, Pruski D, Paus R, Namboodiri MAA: Identification and characterization of two isozymic forms of arylamine N-acetyltransferase in syrian hamster skin. *J Invest Dermatol* (1993) 101: 660-665

60. Gniadecki R, Hansen M, Wulf HC: Resistance of senescent keratinocytes to UV-induced apoptosis. *Cell Mol Biol Noisy le grand.* (2000) 46(1): 121-127
61. Göhring J: Untersuchungen zur Proliferationsbeeinflussung von HaCaT-Keratinocyten durch UV-Licht und zur Möglichkeit einer UV-Protektion mit bestimmten Flavonoiden. Dissertation (1999) Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg (Pharmazie)
62. Goda K, Hamane Y, Kishimoto R, Ogishi Y: Radical scavenging properties of tryptophan metabolites. Estimation of their radical reactivity. *Adv Exp Med Biol* (1999) 467: 397-402
63. Gonzalez E, Gonzalez S: Drug photosensitivity, idiopathic photodermatoses, and sunscreens. *J Am Acad Dermatol* (1996) 35(6): 871-885
64. Gonzalez R, Sanchez A, Ferguson JA, Balmer C, Daniel C, Cohn A, Robinson WA: Melatonin therapy of advanced human malignant melanoma. *Melanoma Research* (1991) 1: 237-243
65. Grossman D, Leffell DJ: The molecular basis of nonmelanoma skin cancer. New understanding. *Arch Dermatol* (1997) 133: 1263-1270
66. Hadshiew I, Stäb F, Untiedt S, Bohnsack K, Rippke F, Hölzle E: Effects of topically applied antioxidants in experimentally provoked polymorphous light eruption. *Dermatology* (1997) 195: 362-368
67. Halliwell B, Gutteridge JMC: Free radicals in biology and medicine. 2. Auflage, Oxford: Clarendon Press (1989)
68. Hara M, Iigo M, Ohtani-Kaneko R, Nakamura N, Suzuki T, Reiter RJ, Hirata K: Administration of melatonin and related indoles prevents exercise-induced cellular oxidative changes in rats. *Biol Signals* (1997) 6: 90-100
69. Hardeland R: Melatonin: multiple functions in signaling and protection. In: Altmeyer P, Hoffmann K, Stücker M (Eds.) *Skin Cancer and UV Radiation*, Springer Verlag Berlin, Heidelberg (1997): 186-198
70. Harris ED: Regulation of antioxidant enzymes. *FASEB J* (1992) 6: 2675-2683
71. Hartwell LH, Kastan MB: Cell cycle control and cancer. *Science* (1994) 266: 1821-1828
72. Havsteen B: Flavonoids, a class of natural products of high pharmacological potency. *Biochem Pharmacol* (1983) 32(7): 1141-1148
73. Heuther G: Melatonin synthesis in the gastrointestinal tract and the impact of nutritional factors on circulating melatonin. *Ann NY Acad Sci* (1994) 719: 146-158
74. Heymann E: Haut, Haar und Kosmetik. Eine chemische Wechselwirkung. S. Hirzel Verlag Stuttgart (1994)
75. Hill SM, Blask DE: Effects of the pineal hormone melatonin on the proliferation and morphological characteristics of human breast cancer cells (MCF-7) in culture. *Cancer Res* (1988) 48(21): 6121-6126

76. Hofland HEJ, Bouwstra JA, Ponc M, Boddè HE, Spies F, Coos Verhoef J, Junginger HE: Interactions of non-ionic surfactant vesicles with cultured keratinocytes and human skin in vitro: A survey of toxicological aspects and ultrastructural changes in stratum corneum. *J Contr Rel* (1991) 6: 155-168
77. Horio T, Okamoto H: Oxygen intermediates are involved in ultraviolet radiation-induced damage of langerhans cells. *J Invest Dermatol* (1987) 88: 699-702
78. Hoult JRS, Moroney MA, Payá M: Actions of flavonoids and coumarins on lipoxygenase and cyclooxygenase. *Methods Enzymol* (1994) 234: 443-454
79. Hu DN, Roberts JE: Melatonin inhibits growth of cultured human uveal melanoma cells. *Melanoma Res* (1997) 7(1): 27-31
80. Hu DN, McCormick SA, Roberts JE: Effects of melatonin, its precursors and derivatives on the growth of cultured uveal melanoma cells. *Melanoma Res* (1998) 8: 205-210
81. Hu JP, Calomme M, Lasure A, de Bruyne T, Pieters L, Vlietinck A, vanden Berghe DA: Structure-activity relationship of flavonoids with superoxide scavenging activity. *Biol Trace Elem Res* (1995) 47: 327-331
82. Imlay JA, Chin SM, Linn S: Toxic DNA damage by hydrogen peroxide through the fenton reaction in vivo and in vitro. *Science* (1988) 240: 640-642
83. Ioku K, Tsushida T, Takei Y, Nakatani N, Terao J: Antioxidative activity of quercetin and quercetin monoglucosides in solution and phospholipid bilayers. *Biochim Biophys Acta* (1995) 1234: 99-104
84. Jurkiewicz BA, Bissett DL, Buettner GR: Effect of topically applied tocopherol on ultraviolet radiation-mediated free radical damage in skin. *J Invest Dermatol* (1995) 104: 484-488
85. Kandimalla K, Kanikkannan N, Andega S, Singh M: Effect of fatty acids on the permeation of melatonin across rat and pig skin in-vitro and on the transepidermal water loss in rats in-vivo. *J Pharm Pharmacol* (1999) 51: 783-790
86. Karbownik M, Tan DX, Reiter R: Melatonin reduces the oxidation of nuclear DNA and membrane lipids induced by the carcinogen  $\delta$ -Aminolevulinic acid. *Int J Cancer* (2000) 88: 7-11
87. Katsarou A, Davoy E, Xenos K, Armenaka M, Theoharides TC: Effect of an antioxidant (quercetin) on sodium lauryl sulfate-induced skin irritation. *Contact Dermatitis* (2000) 42: 85-89
88. Kawanishi S, Hiraku Y: Sequence-specific DNA damage induced by UVA radiation in the presence of endogenous and exogenous photosensitizers. In: Thiele J, Elsner P (eds.) *Oxidants and antioxidants in cutaneous biology – Current problems in dermatology*. Karger, Basel (2001) 29: 74-82
89. Kerr JB, McElroy CT: Evidence for large upward trends of ultraviolet-B radiation linked to ozone depletion. *Science* (1993) 262: 1032-1034
90. Kim SJ, Lim MH, Chun IK, Won YH: Effects of flavonoids of *Ginkgo biloba* on proliferation of human skin fibroblast. *Skin Pharmacol* (1997) 10: 200-205

91. Kim YO, Chung HJ, Chung ST, Kim JH, Park JH, Kil KS, Cho DH: Phototoxicity of melatonin. *Arch Pharm Res* (1999) 22(2): 143-150
92. Kohen E, Hirschberg J, Santus R (eds.): *Photobiology*. Academic Press, Inc. San Diego, London (1995)
93. Konsil J, Parrott KA, Ayres JW: Development of a transdermal delivery device for melatonin in vitro study. *Drug Develop Industr Pharm* (1995) 21(12): 1377-1387
94. Konturek PCh, Konturek SJ, Brzozowski T, Dembinski A, Zembala M, Mytar B, Hahn EG: Gastroprotective activity of melatonin and its precursor, L-tryptophan, against stress-induced and ischaemia-induced lesions is mediated by scavenge of oxygen radicals. *Scand J Gastroenterol* (1997) 32: 433-438
95. Kootstra A: Protection from UV-B-induced DNA damage by flavonoids. *Plant Mol Biol* (1994) 26: 771-774
96. Kowalzik L, Suckow M, Carl A, Waldmann, Bohnsack K, Pönnighaus JM: UV-B-induzierte polymorphe Lichtdermatose: Protektion durch topische Antioxidantien. *Akt Dermatol* (1998) 24: 11-14
97. Kozlov AB, Ostrachovitch EA, Afanas'ev IB: Mechanism of inhibitory effects of chelating drugs on lipid peroxidation in rat brain homogenates. *Biochem Pharmacol* (1994) 47(5): 795-799
98. Kvam E, Tyrrell RM: Induction of oxidative DNA base damage in human skin cells by UV and near visible radiation. *Carcinogenesis* (1997) 18(12): 2379-2384
99. Langer M, Hartmann J, Turkof H, Waldhauser F: Melatonin beim Menschen - ein Überblick. *Wien Klin Wochenschr* (1997) 109(18): 707-713
100. Lee B-J, Parrott KA, Ayres JW, Sack RL: Preliminary evaluation of transdermal delivery of melatonin in human subjects. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol* (1994) 85(3): 337-346
101. Lerner AB, Case JD, Takahashi Y, Lee TH, Mori W: Isolation of melatonin, the pineal gland factor that lightens melanocytes. *J Am Chem Soc* (1958) 80: 2587
102. Lerner AB, Case JD, Heinzelmann RV: Structure of melatonin. *J Am Chem Soc* (1959) 81: 6084-6085
103. Liebmann PM, Wölfler A, Felsner P, Hofer D, Schauenstein K: Melatonin and the immune system. *Int Arch Allergy Immunol* (1997) 112: 203-211
104. Lindl T: *Zell- und Gewebekultur: Einführung in die Grundlagen sowie ausgewählte Methoden und Anwendungen*. 4. Auflage (2000) Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Berlin, Heidelberg
105. Lopez-Torres M, Thiele JJ, Shindo Y, Han D, Packer L: Topical application of  $\alpha$ -tocopherol modulates the antioxidant network and diminishes ultraviolet-induced oxidative damage in murine skin. *Br J Dermatol* (1998) 138: 207-215
106. Magaud JP, Sargent I, Mason DY: Detection of human white cell proliferative responses by immunoenzymatic measurement of bromodeoxyuridine uptake. *J Immunol Methods* (1988) 106: 95-100

107. Marks R: An overview of skin cancers. Incidence and causation. *Cancer* (1995) 75(2 Suppl): 607-612
108. Marnett LJ: Oxyradicals and DNA damage. *Carcinogenesis* (2000) 21(3): 361-370
109. Marshall K-A, Reiter RJ, Poeggeler B, Aruoma OI, Halliwell B: Evaluation of the antioxidant activity of melatonin in vitro. *Free Radic Biol Med* (1996) 21(3): 307-315
110. McVean M, Liebler DC: Inhibition of UVB induced DNA photodamage in mouse epidermis by topically applied  $\alpha$ -tocopherol. *Carcinogenesis* (1997) 18(8): 1617-1622
111. Melchiorri D, Reiter RJ, Chen LD, Sewerynek E, Nisticò G: Melatonin affords protection against kainate-induced lipid peroxidation in brain. *Eur J Pharmacol* (1996) 305: 239-242
112. Menendez-Pelaez A, Reiter RJ: Distribution of melatonin in mammalian tissues: The relative importance of nuclear versus cytosolic localization. *J Pineal Res* (1993) 15: 59-69
113. Merfort I, Heilmann J, Hagedorn-Leweke U, Lippold BC: In vivo skin penetration studies of camomile flavones. *Pharmazie* (1994) 49(7): 509-511
114. Merk H, Jugert F, Bonnekoh B, Mahrle G: Induction and inhibition of NAD(P)H: quinone reductase in murine and human skin. *Skin Pharmacol* (1991) 4: 183-190
115. Middleton E, Kandaswami C: Effects of flavonoids on immune and inflammatory cell functions. *Biochem Pharmacol* (1992) 43(6): 1167-1179
116. Middleton E, Kandaswami C: The impact of plant flavonoids on mammalian biology: implications for immunity, inflammation and cancer. In: Harborne JB (ed.): *The flavonoids: advances in research since 1986*. Chapman & Hall, London (1993): 619-652
117. Moll I: Fotoinduzierte epidermale Veränderungen und ihre therapeutischen Optionen. *Akt Dermatol* (1999) 25: 174-177
118. Morel I, Lescoat G, Cillard P, Cillard J: Role of flavonoids and iron chelation in antioxidant action. *Methods Enzymol* (1994) 234: 437-443
119. Morel I, Cillard P, Cillard J: Flavonoid-metal interactions in biological systems. In: Rice-Evans CA, Packer L (eds.) *Flavonoids in Health and Disease*. Marcel Dekker New York, Basel, Hong Kong (1998): 163-177
120. Mozzanica N, Tadini G, Radaelli A, Negri M, Pigatto P, Morelli M, Frigerio U, Finzi A, Esposti G, Rossi D, Frascini F: Plasma melatonin levels in psoriasis. *Acta Derm Venereol (Stockh)* (1988) 68: 312-316
121. Muizzuddin N, Shakoori AR, Marenus KD: Effect of topical application of antioxidants and free radical scavengers on protection of hairless mouse skin exposed to chronic doses of ultraviolet B. *Skin Res Technol* (1998) 4: 200-204
122. Nakayama T, Niimi T, Osawa T, Kawakishi S: The protective role of polyphenols in cytotoxicity of hydrogen peroxide. *Mutat Res* (1992) 281(2): 77-80
123. Nakayama T, Yamada M, Osawa T, Kawakishi S: Suppression of active oxygen-induced cytotoxicity by flavonoids. *Biochem Pharmacol* (1993) 45(1): 265-267

124. Nickel A: Der Einfluß ausgewählter Flavonoide auf das Proliferationsverhalten humaner Keratinozyten (HaCaT). Diplomarbeit (1997) Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg (Pharmazie)
125. Nickel A, Wohlrab W: Melatonin protects human keratinocytes from UVB irradiation by light absorption. *Arch Dermatol Res* (2000) 292: 366-368
126. Noll M: Apoptose: Mord und Selbstmord im menschlichen Organismus. *PZ* (1997) 142(23): 11-17
127. O'Brien IEW, Reutelingsperger CPM, Holdaway KM: Annexin-V and TUNEL use in monitoring the progression of apoptosis in plants. *Cytometry* (1997) 29: 28-33
128. Ogura R, Nishi J, Sugiyama M, Haramaki N, Kotegawa M: Lipid radical formation of the epidermis exposed to ultraviolet light (ESR study). *Photomed Photobiol* (1990) 12: 179-184
129. Ogura R, Sugiyama M, Nishi J, Haramaki N: Mechanism of lipid radical formation following exposure of epidermal homogenate to ultraviolet light. *J Invest Dermatol* (1991) 97: 1044-1047
130. Paus R, Menrad A, Czarnetzki BM: Nekrobiologie der Haut: Apoptose. *Hautarzt* (1995) 46: 285-303
131. Pelle E, Muizzuddin N, Mammone T, Marenus K, Maes D: Protection against endogenous and UV-B induced oxidative damage in stratum corneum lipids by an antioxidant-containing cosmetic formulation. *Photodermatol Photoimmunol Photomed* (1999) 15: 115-119
132. Pepper C, Thomas A, Tucker H, Hoy T, Bentley P: Flow cytometric assessment of three different methods for the measurement of in vitro apoptosis. *Leuk Res* (1998) 22: 439-444
133. Peus D, Vasa RA, Meves A, Pott M, Beyerle A, Squillace K, Pittelkow MR: H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> is an important mediator of UVB-induced EGF-receptor phosphorylation in cultured keratinocytes. *J Invest Dermatol* (1998) 110: 966-971
134. Peus D, Vasa RA, Beyerle A, Meves A, Krautmacher C, Pittelkow MR: UVB activates ERK1/2 and p38 signaling pathways via reactive oxygen species in cultured keratinocytes. *J Invest Dermatol* (1999) 112: 751-756
135. Piantelli M, Maggiano N, Ricci R, Larocca LM, Capelli A, Scambia G, Isola G, Natali PG, Ranelletti FO: Tamoxifen and quercetin interact with type II estrogen binding sites and inhibit the growth of human melanoma cells. *J Invest Dermatol* (1995) 105: 248-253
136. Pieri C, Marra M, Moroni F, Recchioni R, Marcheselli F: Melatonin: a peroxy radical scavenger more effective than vitamin E. *Life Sci* (1994) 55(15): 271-276
137. Ponc M, Haverkort M, Soei YL, Kempenaar J, Brussee J, Boddè HE: Toxicity screening of n-alkylazacycloheptan-2-one derivatives in cultured human skin cells: Structure-toxicity relationships. *J Pharm Sci* (1989) 78: 738-741
138. Ponc M, Haverkort M, Soei YL, Kempenaar J, Boddè HE: Use of human keratinocyte and fibroblast cultures for toxicity studies of topically applied compounds. *J Pharm Sci* (1990) 79: 312-316

139. Porstmann T, Ternynck T, Avrameas S: Quantitation of 5-Bromo-2-deoxyuridine incorporation into DNA: an enzyme immunoassay for the assessment of the lymphoid cell proliferative response. *J Immunol Methods* (1985) 82: 169-179
140. Ramanathan R, Tan CH, Das NP: Cytotoxic effect of plant polyphenols and fat-soluble vitamins on malignant human cultured cells. *Cancer Lett* (1992) 62: 217-224
141. del Carmen Recio M, Giner RM, Manez S, Talens A, Cubells L, Gueho J, Julien HR, Hostettmann K, Rios JL: Anti-inflammatory activity of flavonol glycosides from *Erythrospermum monticolum* depending on single or repeated local TPA administration. *Planta Med* (1995) 61: 502-504
142. Reiter RJ: Oxidative processes and antioxidative defense mechanisms in the aging brain. *FASEB J* (1995) 9: 526-533
143. Reiter RJ: Functional aspects of the pineal hormone melatonin in combating cell and tissue damage induced by free radicals. *Eur J Endocrinol* (1996) 134: 412-420
144. Reiter RJ, Carneiro RC, Oh C-S: Melatonin in relation to cellular antioxidative defense mechanisms. *Horm Metab Res* (1997a) 29: 363-372
145. Reiter R, Tang L, Garcia JJ, Munoz-Hoyos A: Pharmacological actions of melatonin in oxygen radical pathophysiology. *Life Sci* (1997b) 60(25): 2255-2271
146. Reiter RJ, Tan DX, Cabrera J, D'Arpa D: Melatonin and tryptophan derivatives as free radical scavengers and antioxidants. *Adv Exp Med Biol* (1999) 467: 379-387
147. Rekka E, Kourounakis PN: Effect of hydroxyethyl rutosides and related compounds on lipid peroxidation and free radical scavenging activity. Some structural aspects. *J Pharm Pharmacol* (1991) 43(7): 486-491
148. Rice-Evans CA, Miller NJ: Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and isoflavonoids. In: Rice-Evans CA, Packer L (eds.) *Flavonoids in Health and Disease*. Marcel Dekker New York, Basel, Hong Kong (1998): 199-219
149. Ringborg U, Breitbart EW, Meulemans CCE, deWolf CJM: Skin cancer prevention. In: Altmeyer P, Hoffmann K, Stücker M (Eds.) *Skin Cancer and UV Radiation*. Springer-Verlag Berlin, Heidelberg (1997): 795-819
150. Robak J, Gryglewski RJ: Flavonoids are scavengers of superoxide anions. *Biochem Pharmacol* (1988) 37(5): 837-841
151. Romeis B In: Böck P (Hrsg.) *Mikroskopische Technik*. Urban & Schwarzenberg München, Wien, Baltimore (1989): 243-244
152. Roshchupkin DI, Pistsov MY, Potapenko AY: Inhibition of ultraviolet light-induced erythema by antioxidants. *Arch Dermatol Res* (1979) 266: 91-94
153. Rothe G, Oser A, Valet G: Dihydrorhodamine 123: a new flow cytometric indicator for respiratory burst activity in neutrophil granulocytes. *Naturwissenschaften* (1988) 75: 354-355

154. Rothe G, Emmendörffer A, Oser A, Roesler J, Valet G: Flow cytometric measurement of respiratory burst activity of phagocytes using dihydrorhodamine 123. *J Immunol Methods* (1991) 138: 133-135
155. Royall JA, Ischiropoulos H: Evaluation of 2', 7'-dichlorofluorescein and dihydrorhodamine 123 as fluorescent probes for intracellular H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in cultured endothelial cells. *Arch Biochem Biophys* (1993) 302(2): 348-355
156. Rupprecht M, Berg P, Koch HU, Hornstein OP: Twenty-four hour melatonin concentrations in patients with active atopic eczema and after recovery. *Eur J Dermatol* (1995) 5: 80-83
157. Saija A, Scalese M, Lanza M, Marzullo D, Bonina F, Castelli F: Flavonoids as antioxidant agents: importance of their interaction with biomembranes. *Free Radic Biol Med* (1995) 19(4): 481-486
158. Sakurada H, Koizumi H, Ohkawara A, Ueda T, Kamo N: Use of dihydrorhodamine 123 for detecting intracellular generation of peroxides upon UV irradiation in epidermal keratinocytes. *Arch Dermatol Res* (1992) 284: 114-116
159. Sauk JJ, Norris K: Tobacco components induce alterations in keratinocyte lipid membrane fluidity and inhibit cell proliferation in culture. *J Oral Pathol* (1988) 17: 30-33
160. Schneider I-M, Wohlrab W: Fettsäuren und Epidermis. *Hautarzt* (1997) 48: 303-310
161. Schürer N, Köhne A, Schliep V, Barlag K, Goerz G: Lipid composition and synthesis of HaCaT cells, an immortalized human keratinocyte line, in comparison with normal human adult keratinocytes. *Exp Dermatol* (1993) 2: 179-185
162. Schwarz W, Birau N, Hornstein OP, Heubeck B, Schönberger A, Meyer C, Gottschalk J: Alterations of melatonin secretion in atopic eczema. *Acta Derm Venereol (Stockh)* (1988) 68: 224-229
163. Shellard SA, Whelan RD, Hill BT: Growth inhibitory and cytotoxic effects of melatonin and its metabolites on human tumour cell lines in vitro. *Br J Cancer* (1989): 60(3): 288-290
164. Shindo Y, Witt E, Packer L: Antioxidant defense mechanisms in murine epidermis and dermis and their responses to ultraviolet light. *J Invest Dermatol* (1993) 100: 260-265
165. Shindo Y, Witt E, Han D, Packer L: Dose-response effects of acute ultraviolet irradiation on antioxidants and molecular markers of oxidation in murine epidermis and dermis. *J Invest Dermatol* (1994) 102: 470-475
166. Sies H: Biochemie des oxidativen Stress. *Angew Chem* (1986) 98: 1061-1075
167. Slominski A, Chassalevris N, Mazurkiewicz J, Maurer M, Paus R: Murine skin as a target for melatonin bioregulation. *Exp Dermatol* (1994) 3: 45-50
168. Slominski A, Baker J, Rosano TG, Guisti LW, Ermak G, Grande M, Gaudet SJ: Metabolism of serotonin to N-acetylserotonin, melatonin, and 5-methoxytryptamine in hamster skin culture. *J Biol Chem* (1996) 271(21): 12281-12286
169. Solimani R: Quercetin and DNA in solution: analysis of the dynamics of their interaction with a linear dichroism study. *Int J Biol Macromol* (1996) 18: 287-295

170. Strickland PT: Photocarcinogenesis by near-ultraviolet (UVA) radiation in senear mice. *J Invest Dermatol* (1986) 87: 272-275
171. Sze SF, Ng TB, Liu WK: Antiproliferative effect of pineal indoles on cultured tumor cell lines. *J Pineal Res* (1993) 14(1): 27-33
172. Takano JI, Koizumi H, Ohkawara A, Kamo N, Ueda T: Ultraviolet action spectra for peroxide generation in human and pig epidermal keratinocytes loaded with dihydrorhodamine 123. *Arch Dermatol Res* (1995) 287: 321-325
173. Tan D-X, Chen L-D, Poeggeler B, Manchester LC, Reiter RJ: Melatonin: a potent, endogenous hydroxyl radical scavenger. *Endocr J* (1993) 1: 57-60
174. Tarras-Wahlberg N, Stenhagen G, Larkö O, Rosen A, Wennberg A-M, Wennerström O (1999): Changes in ultraviolet absorption of sunscreens after ultraviolet irradiation. *J Invest Dermatol* 113: 547-553
175. Tedesco AC, Martinez L, Gonzalez S: Photochemistry and photobiology of actinic erythema: defensive and reparative cutaneous mechanisms. *Braz J Med Biol Res* (1997) 30(5): 561-575
176. Terao J, Piskula M, Yao Q: Protective effect of epicatechin, epicatechin gallate and quercetin on lipid peroxidation in phospholipid bilayers. *Arch Biochem Biophys* (1994) 308: 278-284
177. Terao J, Piskula MK: Flavonoids as inhibitors of lipid peroxidation in membranes. In: Rice-Evans CA, Packer L (eds.) *Flavonoids in Health and Disease*. Marcel Dekker New York, Basel, Hong Kong (1998): 277-293
178. Thiele JJ, Dreher F, Packer L: Antioxidant defense systems in skin. In: Elsner P, Maibach HI (eds.) *Cosmeceuticals – Drugs vs. Cosmetics*. Marcel Dekker New York, Basel (2000): 145-187
179. Tyrrell RM: Ultraviolet radiation and free radical damage to skin. *Biochem Soc Symp* (1995) 61: 47-53
180. Vessey DA, Lee K-H, Blacker KL: Characterisation of the oxidative stress initiated in cultured human keratinocytes by treatment with peroxides. *J Invest Dermatol* (1992) 99: 859-863
181. Vessey DA, Lee K-H: Inactivation of enzymes of the glutathione antioxidant system by treatment of cultured human keratinocytes with peroxides. *J Invest Dermatol* (1993) 100: 829-833
182. Weber E: *Grundriß der biologischen Statistik. Anwendungen der mathematischen Statistik in Forschung, Lehre und Praxis*. Gustav Fischer Verlag Jena (1980)
183. Wenk J, Brenneisen P, Meewes C, Wlaschek M, Peters T, Blaudschun R, Ma W, Kuhr L, Schneider L, Scharffetter-Kochanek: UV-induced oxidative stress and photoaging. In: Thiele J, Elsner P (eds.) *Oxidants and antioxidants in cutaneous biology – Current problems in dermatology*. Karger, Basel (2001) 29: 83-94

184. Werninghaus K, Meydani M, Bhawan J, Margolis R, Blumberg JB, Gilchrest BA: Evaluation of the photoprotective effect of oral vitamin E supplementation. *Arch Dermatol* (1994) 130: 1257-1261
185. Wirz-Justice A: Melatonin: ein neues Wundermittel? *Schweizerische Rundschau für Medizin (Praxis)* (1996) 85(42): 1332-1336
186. Wiseman H, Halliwell B: Damage to DNA by reactive oxygen and nitrogen species: role in inflammatory disease and progression to cancer. *Biochem J* (1996) 313: 17-29
187. Wölfler A, Abuja PM, Schauenstein K, Liebmann PM: N-acetylserotonin is a better extra- and intracellular antioxidant than melatonin. *FEBS Lett* (1999) 449: 206-210
188. Yarosh DB: Toward enzyme therapy: topically applied DNA repair enzymes. *Dermatologic Therapy* (1997) 4: 118-122
189. Young AR, Chadwick CA, Harrison GI, Hawk JLM, Nikaido O, Potten CS: The in situ repair kinetics of epidermal thymine dimers and 6-4 photoproducts in human skin types I and II. *J Invest Dermatol* (1996) 106: 1307-1313
190. Young AR, Chadwick CA, Harrison GI, Nikaido O, Ramsden J, Potten CS: The similarity of action spectra for thymine dimers in human epidermis and erythema suggests that DNA is the chromophore for erythema. *J Invest Dermatol* (1998) 111: 982-988
191. Young IM, Leone RM, Francis P, Stovell P, Silman RE: Melatonin is metabolized to N-Acetyl Serotonin and 6-Hydroxymelatonin in man. *J Clin Endocrinol Metab* (1985) 60: 114-119
192. Yu BP: Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Physiol Rev* (1994) 74(1): 139-162
193. Zesch A, Schaefer H, Hoffmann W: Barriere- und Reservoirfunktion der einzelnen Hornschichtlagen der menschlichen Haut für lokal aufgetragene Arzneimittel. *Arch Derm Forsch* (1973) 246: 103-107
194. Zhang C, Ao Z, Seth A, Schlossman SF: A mitochondrial membrane protein defined by a novel monoclonal antibody is preferentially detected in apoptotic cells. *J Immunol* (1996) 157: 3980-3987
195. Zhdanova IV, Wurtman RJ, Lynch HJ, Ives JR, Dollins AB, Morabito C, Matheson JK, Schomer DL: Sleep-inducing effects of low doses of melatonin ingested in the evening. *Clin Pharmacol Ther* (1995) 57(5): 552-558

**ABBILDUNGS- UND TABELLENVERZEICHNIS**Abbildungen:

	Seite
Abb. 1: Aufbau der menschlichen Haut (modifiziert nach Grüneberg)	3
Abb. 2: Chemische Strukturen der eingesetzten Flavonole	7
Abb. 3: Chemische Struktur von Melatonin (R = OCH <sub>3</sub> ) und N-Acetylserotonin (R = OH)	8
Abb. 4: Schematische Darstellung des postulierten Radikalfängermechanismus von Melatonin nach Reiter, 1996; Reiter et al., 1997b	10
Abb. 5: Einfluß von Quercetin auf die DNA-Syntheserate humaner Keratinozyten (HaCaT) (Methode: BrdU-Einbau nach 24 h, 48 h und 72 h Inkubationszeit; * p < 0,05 im Vergleich zur unbehandelten LM-Kontrolle; n = 15-16)	32
Abb. 6: Einfluß von Quercetin auf die Lebendzellanzahl humaner Keratinozyten (HaCaT) (Methode: LDH-Aktivitätsbestimmung im Zelllysats nach 24 h, 48 h und 72 h Inkubationszeit; * p < 0,05 im Vergleich zur unbehandelten LM-Kontrolle; n = 11-12)	33
Abb. 7: Einfluß von Quercetin auf die DNA-Syntheserate der NHEK-Zellen (Methode: BrdU-Einbau nach 24 h Inkubationszeit; * p < 0,05 im Vergleich zur unbehandelten LM-Kontrolle; n = 23-24)	34
Abb. 8: Einfluß von Quercetin auf den apoptotischen bzw. spätapoptotisch/nekrotischen Zelltod der NHEK-Zellen 24 h nach Substanzapplikation (Methode: durchflußzytometrische Bestimmung von Annexin-V/PI; n = 3)	34
Abb. 9: Einfluß von Quercetin auf die DNA-Syntheserate (BrdU-Einbau) und die Lebendzellanzahl (Vitalfärbung) humaner Keratinozyten (HaCaT) nach 12 h Inkubationszeit; * p < 0,05 im Vergleich zur unbehandelten LM-Kontrolle; n = 24-36	36
Abb. 10: Einfluß von Kämpferol auf die Lebendzellanzahl humaner Keratinozyten (HaCaT) (Methode: Kristallviolett/Färbung/Vitalfärbung nach 24 h und 48 h Inkubationszeit; * p < 0,05 im Vergleich zur unbehandelten LM-Kontrolle; n = 32-36)	37
Abb. 11: Einfluß von Rutin auf die DNA-Syntheserate humaner Keratinozyten (HaCaT) (Methode: BrdU-Einbau nach 24 h, 48 h und 72 h Inkubationszeit; * p < 0,05 im Vergleich zur unbehandelten LM-Kontrolle; 24 h: n = 12-18; 48 h: n = 12-24; 72 h: n = 10-18)	38
Abb. 12: Einfluß von Rutin auf die Lebendzellanzahl humaner Keratinozyten (HaCaT) (Methode: LDH-Aktivitätsbestimmung im Zelllysats nach 24 h, 48 h und 72 h Inkubationszeit; * p < 0,05 im Vergleich zur unbehandelten LM-Kontrolle; 24 h: n = 12-18; 48 h: n = 12-18; 72 h: n = 12-18)	39
Abb. 13: Einfluß von Melatonin auf die DNA-Syntheserate humaner Keratinozyten (HaCaT) (Methode: BrdU-Einbau nach 24 h, 48 h und 72 h Inkubationszeit; * p < 0,05 im Vergleich zur unbehandelten LM-Kontrolle; n = 21-24)	42

Abb. 14:	Einfluß von Melatonin auf die Lebendzellanzahl humaner Keratinozyten (HaCaT) (Methode: LDH-Aktivitätsbestimmung im Zelllysate nach 24 h, 48 h und 72 h Inkubationszeit; * $p < 0,05$ im Vergleich zur unbehandelten LM-Kontrolle; $n = 11-12$ )	43
Abb. 15:	Einfluß von Melatonin auf die Lebendzellanzahl humaner Keratinozyten (HaCaT) (Methode: Kristallvioletttest nach 24 h, 48 h und 72 h Inkubationszeit; * $p < 0,05$ im Vergleich zur unbehandelten LM-Kontrolle; $n = 18$ )	43
Abb. 16:	Einfluß einer Kurzzeitinkubation (0,5 h, 3 h, 6 h) der HaCaT-Keratinozyten auf die DNA-Syntheserate nach 24 h (Methode: BrdU-Einbau); * $p < 0,05$ im Vergleich zur unbehandelten LM-Kontrolle; $n = 12$	44
Abb. 17:	Einfluß einer 24stündigen Melatoninbehandlung auf die DNA-Syntheserate (BrdU-Einbau) NHEK, (* $p < 0,05$ im Vergleich zur unbehandelten LM-Kontrolle; $n = 36$ )	46
Abb. 18:	Einfluß von N-Acetylserotonin auf die DNA-Syntheserate humaner Keratinozyten (HaCaT) (Methode: BrdU-Einbau; * $p < 0,05$ im Vergleich zur unbehandelten LM-Kontrolle; $n = 12-18$ )	47
Abb. 19:	Einfluß von N-Acetylserotonin auf die Lebendzellanzahl humaner Keratinozyten (HaCaT) (Methode: Kristallvioletttest; * $p < 0,05$ im Vergleich zur unbehandelten LM-Kontrolle; $n = 12-18$ )	47
Abb. 20:	Einfluß von Wasserstoffperoxid (Kurz- und Langzeiteinfluß) auf die DNA-Syntheserate (BrdU-Einbau) und die Lebendzellanzahl (Vitalfärbung) humaner Keratinozyten (HaCaT). * $p < 0,05$ im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle; $n = 6$	49
Abb. 21:	Einfluß einer ein- bzw. zweistündigen Einwirkung von Wasserstoffperoxid auf das prozentuale Zellzyklusphasenverteilungsmuster humaner Keratinozyten (HaCaT) 24 h nach der Schädigung. $n = 3$	50
Abb. 22:	Einfluß einer einstündigen Einwirkung von Wasserstoffperoxid auf das prozentuale Zellzyklusphasenverteilungsmuster humaner Keratinozyten (NHEK) 24 h nach der Schädigung. $n = 3$	51
Abb. 23:	Einfluß einer einstündigen Wasserstoffperoxideinwirkung auf den apoptotischen Zelltod humaner Keratinozyten (NHEK) 24 h nach der Zellschädigung (Methode: flowzytometrische Bestimmung von Apo2.7). * $p < 0,05$ im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle; $n = 3$	52
Abb. 24:	Einfluß von Rutin auf die UV-A induzierte Verminderung der DNA-Syntheserate (Methode: BrdU-Einbau) und der Zellanzahl (Methode: Vitalitätstest) humaner Keratinozyten (HaCaT) 24 h nach der Schädigung. Die Zellen wurden 2 h mit Rutin vorinkubiert. Während der UV-A Bestrahlung erfolgte keine Rutinsupplementierung. * $p < 0,05$ bestrahlte Zellen im Vergleich zur bestrahlten Kontrolle; $n = 11-12$	54
Abb. 25:	Einfluß von Rutin auf die UV-A induzierte Verminderung der DNA-Syntheserate (BrdU-Einbau) humaner Keratinozyten (HaCaT) 24 h nach der Schädigung. Die Zellen wurden 2 h mit Rutin vorinkubiert. Während der UV-A Bestrahlung erfolgte eine Rutinsupplementierung. $p < 0,05$ bestrahlte Zellen im Vergleich zur bestrahlten Kontrolle; $n = 12-24$	55

Abb. 26:	Bestimmung der DNA-Syntheserate (BrdU-Einbau) und der Lebendzellanzahl (Vitalfärbung) humaner Keratinozyten (HaCaT) 24 h nach UV-B Bestrahlung (100 mJ/cm <sup>2</sup> ). Die Zellen wurden 2 h mit Rutin vorinkubiert. Während der Bestrahlung erfolgte entweder eine oder keine gleichzeitige Rutinsupplementierung in PBS. * p < 0,05 bestrahlte Zellen im Vergleich zur bestrahlten Kontrolle; n = 22-24	56
Abb. 27:	Einfluß von Rutin auf die H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -induzierte DNA-Syntheseverminderung (BrdU-Einbau) und Zellanzahlabnahme (Vitalfärbung) humaner Keratinozyten (HaCaT). Die Zellen wurden 2 h mit Rutin vorinkubiert, das Medium von den Zellen entfernt, für 1 h mit H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> in PBS inkubiert (Endkonzentration: 0,2 mM) und nach erfolgtem Mediumwechsel für 24 h kultiviert. Während der H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -Schädigung erfolgte keine gleichzeitige Rutinsupplementierung. * p < 0,05 behandelte Zellen im Vergleich zur behandelten Kontrolle; n = 11-12	57
Abb. 28:	Einfluß von Rutin auf die H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -induzierte DNA-Syntheseverminderung (BrdU-Einbau) und Zellanzahlabnahme (Vitalfärbung) humaner Keratinozyten (HaCaT). Die Zellen wurden 2 h mit Rutin vorinkubiert, das Medium von den Zellen entfernt, für 1 h mit H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> in PBS inkubiert (Endkonzentration: 0,2 mM) und nach erfolgtem Mediumwechsel 24 h kultiviert. Während der H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -Schädigung erfolgte eine gleichzeitige Rutinsupplementierung. p < 0,05 behandelte Zellen im Vergleich zur behandelten Kontrolle; DNA-Synthese: n = 23-24; Zellanzahl: n = 11-12	57
Abb. 29:	Wirksamkeit von Rutin gegenüber einer Fe <sup>2+</sup> -induzierten Zytotoxizität in humanen Keratinozyten (HaCaT). Die Zellen wurden 2 h vorinkubiert, anschließend mit einer äquimolaren Lösung von Ammoniumeisen-(II)-sulfat/8-Hydroxychinolin (50 µM) versetzt und nach 24 h ein Vitalitätstest durchgeführt. * p < 0,05 behandelte Zellen im Vergleich zur behandelten Kontrolle; n = 44-48	58
Abb. 30:	Bestimmung der DNA-Syntheserate humaner Keratinozyten (HaCaT) 24 h nach UV-B Bestrahlung (100 mJ/cm <sup>2</sup> ). Die Zellen wurden 2 h mit Melatonin vorinkubiert und während der UV-B Bestrahlung erfolgte keine gleichzeitige Melatoninsupplementierung. * p < 0,05 bestrahlte Zellen im Vergleich zur bestrahlten Kontrolle; n = 12	60
Abb. 31:	Bestimmung der DNA-Syntheserate (BrdU-Einbau) und der Lebendzellanzahl (LDH-Aktivitätsbestimmung im Zelllysate) humaner Keratinozyten (HaCaT) 24 h nach UV-B Bestrahlung (100 mJ/cm <sup>2</sup> ). Die Zellen wurden 2 h mit Melatonin vorinkubiert und während der UV-B Bestrahlung erfolgte eine gleichzeitige Melatoninsupplementierung in PBS. * p < 0,05 bestrahlte Zellen im Vergleich zur bestrahlten Kontrolle. (Zellanzahl: n = 6, DNA-Synthese: n = 17-18)	61
Abb. 32:	DNA-Syntheserate und Lebendzellanzahl humaner Keratinozyten (HaCaT) 24 h nach UV-A Bestrahlung (15 J/cm <sup>2</sup> ). Die Zellen wurden 2 h vorinkubiert und während der Bestrahlung erfolgte eine gleichzeitige Supplementierung mit Melatonin in PBS. * p < 0,05 bestrahlte Zellen im Vergleich zur bestrahlten Kontrolle; n = 18-36	62

- Abb. 33: Einfluß einer gleichzeitigen Melatoninsupplementierung während der UV-A Bestrahlung auf den apoptotischen bzw. spätapoptotischen/nekrotischen Zelltod humaner Keratinozyten (HaCaT) nach 24 h (Methode: flowzytometrische Bestimmung von Annexin-V/PI). Die Vorinkubation der Zellen betrug 2 h. \*  $p < 0,05$  bestrahlte Zellen im Vergleich zur bestrahlten Kontrolle;  $n = 4$  63
- Abb. 34: Einfluß einer gleichzeitigen Melatoninsupplementierung während der UV-A Bestrahlung ( $15 \text{ J/cm}^2$ ) auf den apoptotischen Zelltod humaner Keratinozyten (HaCaT) nach 24 h (Methode: flowzytometrische Bestimmung von Apo2.7). Die Vorinkubation der Zellen betrug 2 h. \*  $p < 0,05$  bestrahlte Zellen im Vergleich zur bestrahlten Kontrolle;  $n = 4$  64
- Abb. 35: DNA-Syntheserate humaner Keratinozyten (NHEK) 24 h nach UV-A Bestrahlung ( $10 \text{ J/cm}^2$ ). Die Zellen wurden 2 h vorinkubiert und während der Bestrahlung erfolgte eine gleichzeitige Supplementierung mit Melatonin in PBS. \*  $p < 0,05$  bestrahlte Zellen im Vergleich zur bestrahlten Kontrolle;  $n = 12$  65
- Abb. 36: Einfluß von Melatonin auf die  $\text{H}_2\text{O}_2$ -induzierte DNA-Syntheseverminderung und Zellanzahlabnahme humaner Keratinozyten (HaCaT). Die Zellen wurden 4 h mit Melatonin vorinkubiert und nach der Zugabe der  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Lösung in PBS erfolgte die Bestimmung der DNA-Syntheserate (Methode: BrdU-Einbau) und der Lebendzellanzahl (Vitalfärbung) nach 24 h. \*  $p < 0,05$  unbehandelte Zellen im Vergleich zur behandelten Kontrolle;  $n = 6$  66
- Abb. 37: Einfluß von Melatonin auf die  $\text{H}_2\text{O}_2$ -induzierte DNA-Syntheseverminderung humaner Keratinozyten (HaCaT). Die Zellen wurden 2 h mit Melatonin vorinkubiert, für 30 min mit verschiedenen konzentrierten  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Lösungen (Endkonzentrationen: 0,25 mM; 0,5 mM; 1 mM) inkubiert und nach erfolgreichem Mediumwechsel für weitere 24 h inkubiert. \*  $p < 0,05$  behandelte Zellen im Vergleich zur behandelten Kontrolle;  $n = 12$  67
- Abb. 38: Einfluß von Melatonin auf die DHP-induzierte DNA-Syntheseverminderung (BrdU-Einbau) und Zellanzahlabnahme (Vitalfärbung) humaner Keratinozyten (HaCaT). Die Zellen wurden 30 min mit Melatonin vorinkubiert, für 30 min mit DHP versetzt ( $125 \mu\text{M}$ ,  $250 \mu\text{M}$ ), danach mit PBS gewaschen und nach Zugabe von frischem SFM 24 h weiterkultiviert. \*  $p < 0,05$  behandelte Zellen im Vergleich zur behandelten Kontrolle. (BrdU-Einbau:  $n = 22-24$ ; Vitalfärbung:  $n = 12$ ) 67
- Abb. 39: Einfluß von N-Acetylserotonin auf die UV-B induzierte Verminderung der Vitalität (Lebendzellanzahl) humaner Keratinozyten (HaCaT) 24 h nach der Schädigung. Die Zellen wurden 2 h mit N-Acetylserotonin vorinkubiert und während der UV-B Bestrahlung erfolgte keine gleichzeitige Melatoninsupplementierung in PBS. \*  $p < 0,05$  bestrahlte Zellen im Vergleich zur bestrahlten Kontrolle;  $n = 23-24$  69

Abb. 40:	Einfluß von N-Acetylserotonin auf die UV-B induzierte Verminderung der Vitalität (Lebendzellanzahl) humaner Keratinozyten (HaCaT) 24 h nach der Schädigung. Die Zellen wurden 2 h mit N-Acetylserotonin vorinkubiert und während der UV-B Bestrahlung erfolgte eine gleichzeitige Melatoninsupplementierung in PBS. * $p < 0,05$ bestrahlte Zellen im Vergleich zur bestrahlten Kontrolle; n = 21-24	70
Abb. 41:	Einfluß von N-Acetylserotonin auf die UV-A induzierte Verminderung der Vitalität (Lebendzellanzahl) humaner Keratinozyten (HaCaT) 24 h nach der Schädigung. Die Zellen wurden 2 h mit N-Acetylserotonin vorinkubiert und während der UV-A Bestrahlung erfolgte eine gleichzeitige Melatoninsupplementierung in PBS. * $p < 0,05$ bestrahlte Zellen im Vergleich zur bestrahlten Kontrolle; n = 22-24	70
Abb. 42:	Einfluß von N-Acetylserotonin auf die UV-A induzierte Verminderung der Vitalität (Lebendzellanzahl) humaner Keratinozyten (HaCaT) 24 h nach der Schädigung. Die Zellen wurden 2 h mit N-Acetylserotonin vorinkubiert und während und nach der UV-A Bestrahlung (24 h) erfolgte eine N-Acetylserotoninsupplementierung. * $p < 0,05$ bestrahlte Zellen im Vergleich zur bestrahlten Kontrolle; n = 21-24	71
Abb. 43:	Bestimmung des intrazellulären Peroxidgehaltes humaner Keratinozyten (HaCaT) nach UV-B Bestrahlung (100 mJ/cm <sup>2</sup> ) und Einfluß einer Rutinvorinkubation (2 h bzw. 24 h). * $p < 0,05$ bestrahlte Zellen im Vergleich zur bestrahlten Kontrolle; n = 12	75
Abb. 44:	Bestimmung des intrazellulären Peroxidgehaltes humaner Keratinozyten (HaCaT) nach UV-A Bestrahlung (15 J/cm <sup>2</sup> ) und Einfluß einer Rutinvorinkubation (2 h bzw. 24 h). * $p < 0,05$ bestrahlte Zellen im Vergleich zur bestrahlten Kontrolle; 2 h Vorinkubation: n = 12, 24 h Vorinkubation: n = 17-18	76
Abb. 45:	Bestimmung des intrazellulären Peroxidgehaltes humaner Keratinozyten (HaCaT) nach UV-B Bestrahlung (100 mJ/cm <sup>2</sup> ) und Einfluß einer Kämpferolvorinkubation (2 h). * $p < 0,05$ bestrahlte Zellen im Vergleich zur bestrahlten Kontrolle; n = 12	76
Abb. 46:	Bestimmung des intrazellulären Peroxidgehaltes humaner Keratinozyten (HaCaT) nach UV-A Bestrahlung (15 J/cm <sup>2</sup> ) und Einfluß einer Kämpferolvorinkubation (2 h). * $p < 0,05$ bestrahlte Zellen im Vergleich zur bestrahlten Kontrolle; n = 12	77
Abb. 47:	Bestimmung des intrazellulären Peroxidgehaltes humaner Keratinozyten (HaCaT) nach UV-A Bestrahlung (15 J/cm <sup>2</sup> ) und Einfluß einer alleinigen Vorinkubation mit Melatonin (2 h) bzw. einer zusätzlichen Melatoninsupplementierung während der UV-A Exposition. * $p < 0,05$ bestrahlte Zellen im Vergleich zur bestrahlten Kontrolle; n = 17-18	78
Abb. 48:	Bestimmung des intrazellulären Peroxidgehaltes humaner Keratinozyten (HaCaT) nach UV-B Bestrahlung (100 mJ/cm <sup>2</sup> ) und Einfluß einer Melatoninvorinkubation (2 h). * $p < 0,05$ bestrahlte Zellen im Vergleich zur bestrahlten Kontrolle; n = 16-18	78

Abb. 49:	Bestimmung des intrazellulären Peroxidgehaltes humaner Keratinozyten (HaCaT) nach UV-B Bestrahlung (100 mJ/cm <sup>2</sup> ) und Einfluß einer N-Acetylserotoninvorinkubation (2 h). * p < 0,05 bestrahlte Zellen im Vergleich zur bestrahlten Kontrolle; n = 12	79
Abb. 50:	Bestimmung des intrazellulären Peroxidgehaltes humaner Keratinozyten (HaCaT) nach UV-A Bestrahlung (15 J/cm <sup>2</sup> ) und Einfluß einer alleinigen Vorinkubation mit N-Acetylserotonin (2 h) bzw. einer zusätzlichen N-Acetylserotinsupplementierung während der UV-A Exposition. * p < 0,05 bestrahlte Zellen im Vergleich zur bestrahlten Kontrolle; n = 11-12	80
Abb. 51:	Absorptionsspektren einer 0,1 mM wäßrig-ethanolischen N-Acetylserotoninlösung (0,2 Vol.% Ethanol in PBS pH 7,4). Die Spektren wurden im ultravioletten und sichtbaren Wellenlängenbereich vor und nach Bestrahlung mit UV-B (100 mJ/cm <sup>2</sup> ) bzw. UV-A (12 J/cm <sup>2</sup> ) aufgenommen.	81
Abb. 52:	Absorptionsspektren einer 0,1 mM wäßrig-ethanolischen Melatoninlösung (0,2 Vol.% Ethanol in PBS pH 7,4). Die Spektren wurden im ultravioletten und sichtbaren Wellenlängenbereich vor und nach Bestrahlung mit UV-B (100 mJ/cm <sup>2</sup> ) bzw. UV-A (12 J/cm <sup>2</sup> ) aufgenommen.	82
Abb. 53:	Dünnschichtchromatographische Trennung der aus Melatonin und N-Acetylserotonin entstandenen Photoabbauprodukte nach UV-A Bestrahlung (15 J/cm <sup>2</sup> ). 1 = N-Acetylserotonin unbestrahlt, 2 = N-Acetylserotonin bestrahlt (15 J/cm <sup>2</sup> ), 3 = Melatonin unbestrahlt, 4 = Melatonin bestrahlt (15 J/cm <sup>2</sup> )	83
Abb. 54:	Elektropherogramme einer 1 mM N-Acetylserotoninlösung nach unterschiedlichen UV-A Bestrahlungsdosen (1: 0 J/cm <sup>2</sup> ; 2: 7,5 J/cm <sup>2</sup> ; 3: 15 J/cm <sup>2</sup> ). Grundelektrolytpuffer: 10 mM Natriumborat pH = 9, Spannung: 25 kV, Quarzkapillare: i.d. = 45 cm, UV-Detektion (234 nm), hydrostatische Injektion, Temperatur: konstant	84
Abb. 55:	Elektropherogramme UV-A (15 J/cm <sup>2</sup> ) bestrahlter Linolsäurelösung (1) bzw. Linolsäure mit verschiedenen Konzentrationen an N-Acetylserotonin (2: 1 mM; 3: 0,1 mM; 4: 0,01 mM; 5: 0,001 mM). Die Konzentration der Linolsäure betrug bei allen Versuchen 1 mM. Die einzelnen Elektropherogramme wurden für eine bessere Übersichtlichkeit gegeneinander verschoben.	85
Abb. 56:	Elektropherogramme UV-A (15 J/cm <sup>2</sup> ) bestrahlter Linolsäurelösung (5) bzw. Linolsäure mit verschiedenen Konzentrationen an Melatonin (1: 1 mM; 2: 0,1 mM; 3: 0,01 mM; 4: 0,001 mM). Die Konzentration der Linolsäure betrug bei allen Versuchen 1 mM. Die einzelnen Elektropherogramme wurden für eine bessere Übersichtlichkeit gegeneinander verschoben.	85
Abb. 57:	Einfluß von Melatonin auf die UV-A induzierte Linolsäureperoxidentstehung. Als 100%-Kontrolle diente eine 1 mM Linolsäurelösung ohne Melatonin. (n = 3) Methode: Kapillarzonenelektrophorese	86
Abb. 58:	Einfluß von N-Acetylserotonin auf die UV-A induzierte Linolsäureperoxidentstehung. Als 100 %-Kontrolle diente eine 1 mM Linolsäurelösung ohne Melatonin. (n = 3) Methode: Kapillarzonenelektrophorese	87
Abb. 59:	Schematischer Aufbau der Diffusionszelle nach FRANZ (1975)	90

Abb. 60:	Penetration der Flavonolaglyka Quercetin, Kämpferol und Isorhamnetin (je 1%-ig im Gemisch) in die einzelnen Hautschichten (SC: n = 3; EP: n = 3; D: n = 3) aus der Wasserhaltigen Wollwachsalkoholsalbe (W/O) nach 30 und 300 min.	91
Abb. 61:	Penetration der Flavonolaglyka Quercetin, Kämpferol und Isorhamnetin (je 1%-ig im Gemisch) in die einzelnen Hautschichten (SC: n = 3; EP: n = 3; D: n = 3) aus der Wasserhaltigen Hydrophilen Salbe (O/W) nach 30 und 300 min.	91
Abb. 62:	Penetration von Rutin aus einer O/W- bzw. W/O-Standardemulsion in humane Haut ex vivo. (1%-ige Rutinkonzentration im Vehikel) (SC: n = 3; EP: n = 3; D: n = 3).	92
Abb. 63:	Penetration von Melatonin aus einer O/W- bzw. W/O-Standardemulsion in humane Haut ex vivo. (1%-ige Melatoninkonzentration im Vehikel) (SC: n = 3; Epidermis: n = 9; Dermis: n = 9). Die gestrichelte Linie markiert die höchste eingesetzte Melatoninkonzentration in den in-vitro Zellversuchen.	93

Tabellen:

Tab. 1:	Halbwertszeiten (HWZ) ausgewählter reaktiver Sauerstoff- bzw. Radikalspezies bei 37°C im Vergleich zu molekularem Sauerstoff (Yu, 1994)	5
Tab. 2:	Differenzierung zwischen der vitalen, der apoptotischen und der spätapoptotisch/nekrotischen Zellpopulation durch Anfärbung mit Annexin-V-FLUOS und PI	23
Tab. 3:	Einfluß von Quercetin auf das prozentuale Zellzyklusphasenverteilungsmuster der NHEK nach 24stündiger Substanzapplikation (Mittelwerte $\pm$ SD; n = 3).	35
Tab. 4:	Prozentuale Zellzyklusphasenverteilung humaner Keratinozyten (HaCaT) nach 24 h und 48 h Inkubationszeit (Mittelwerte $\pm$ SD; n = 4). * p < 0,05 im Vergleich zur unbehandelten LM-Kontrolle	37
Tab. 5:	Prozentuale Zellzyklusphasenverteilung humaner Keratinozyten (HaCaT) nach 24 h. Die Melatonininkubation betrug 6 h bzw. 24 h. (Mittelwert $\pm$ SD; n = 3)	45
Tab. 6:	Einfluß von Melatonin auf den apoptotischen bzw. spätapoptotischen/nekrotischen Zelltod humaner Keratinozyten (HaCaT) nach 24 h Inkubationszeit. (Methode: flowzytometrische Bestimmung von Annexin-V/PI) (Mittelwert $\pm$ SD; n = 3)	45
Tab. 7:	Prozentuale Zellzyklusphasenverteilung humaner Keratinozyten (HaCaT) 24 h nach UV-A Bestrahlung (15 J/cm <sup>2</sup> ) und gleichzeitiger Melatonin-supplementierung. Die Zellen wurden 2 h mit Melatonin vorinkubiert. (Mittelwert $\pm$ SD; n = 3), * p < 0,05 bestrahlte Zellen im Vergleich zur bestrahlten Kontrolle	64
Tab. 8:	Aufnahme von Melatonin in humane Keratinozyten (HaCaT) (10000 Zellen pro well) nach einer Inkubationsdauer von 2 h. (Mittelwerte $\pm$ SD)	68
Tab. 9:	Prozentuale Zellzyklusphasenverteilung humaner Keratinozyten (HaCaT) 24 h nach UV-A Bestrahlung (15 J/cm <sup>2</sup> ) und gleichzeitiger N-Acetylserotonin-supplementierung. Die Zellen wurden mit N-Acetylserotonin 2 h vorinkubiert und in PBS nach erneuter Zugabe von N-Acetylserotonin mit UV-A bestrahlt. (Mittelwert $\pm$ SD; * p < 0,05 bestrahlte Zellen im Vergleich zur bestrahlten Kontrolle; n = 3-4)	72
Tab. 10:	Mittlere Epidermisbreiten der verwendeten Mammahautpräparate in $\mu$ m (n = 15; MW $\pm$ SD)	89

Die vorliegende Dissertationsarbeit entstand in der Arbeitsgruppe “Experimentelle Dermatologie” der Universitätsklinik und Poliklinik für Dermatologie und Venerologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. rer. nat. habil. Wolfgang Wohlrab.

Mein besonderer Dank gilt an dieser Stelle Herrn Prof. Dr. rer. nat. habil. Wolfgang Wohlrab für die Überlassung des interessanten Themas, für die intensive Betreuung und inspirierende Diskussionsbereitschaft.

Bei Herrn Prof. Dr. rer. nat. habil. Reinhard Neubert vom Institut für Pharmazeutische Technologie und Biopharmazie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg bedanke ich mich für das große Interesse am positiven Verlauf der Untersuchungen.

Weiterhin sei Herrn Priv.-Doz. Dr. rer. nat. Hans-Hermann Rüttinger und Frau Dipl.-Pharm. Antje Radschuweit vom Institut für Pharmazeutische Chemie am Fachbereich Pharmazie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg für die hilfreiche Zusammenarbeit und Unterstützung bei der Durchführung der kapillarzonenelektrophoretischen Untersuchungen herzlichst gedankt.

Besonders herzlich möchte ich mich bei Frau Karin Hölsken, Frau Ursula Schramm und Frau Helga Schmidt für die umfangreiche und liebevolle Unterstützung bei der experimentellen Durchführung der Untersuchungen an humaner Haut ex vivo und an humanen Keratinozyten in vitro sowie für die angenehme und freundliche Arbeitsatmosphäre bedanken.

Bei Herrn Dr. rer. nat. Dirk Fröde und Herrn Dipl.-Phys. Thomas Klapperstück aus der Arbeitsgruppe “Experimentelle Dermatologie” bedanke ich mich für die Einarbeitung in die Flowzytometrie, für die große Unterstützung bei der Durchführung flowzytometrischer Untersuchungen und für kritische Anregungen und Diskussionen.

Frau Manuela Woigk und Herrn Dr. rer. nat. Raik Wolf vom Institut für Pharmazeutische Technologie und Biopharmazie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg danke ich für die Durchführung der HPLC-MS-Messungen.

Frau Dipl.-Biol. Ramona Körting, Herrn Dipl.-Pharm. Tino Galgon und Herrn Dr. rer. nat. Christoph Huschka danke ich für zahlreiche Diskussionen und das Korrekturlesen der Arbeit.

Einen herzlichen Dank richte ich an alle ungenannten Mitarbeiterinnen und Mitarbeiter der Arbeitsgruppe “Experimentelle Dermatologie” der Universitätsklinik und Poliklinik für Dermatologie und Venerologie, die durch ihre fachliche Hilfe und durch ihr freundschaftliches Engagement zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Diese Arbeit wurde im Rahmen des Graduiertenkollegs “Transport von Wirkstoffen in biologischen Systemen” von der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) unterstützt.

## Lebenslauf

### Persönliche Daten

Name Anja Nickel  
Anschritt Waldhornstraße 4  
76131 Karlsruhe  
geboren am 28.04.1974 in Suhl  
Familienstand ledig

### Schulbildung

1980 - 1990 Polytechnische Oberschule in Hinternah  
1990 - 1992 Staatliches Hennebergisches Gymnasium  
„Georg Ernst“ in Schleusingen

### Berufsausbildung

Okt. 1992 - Sept. 1996 Studium der Pharmazie an der Martin-Luther-  
Universität Halle-Wittenberg  
Okt. 1996 - März 1997 Diplomandin an der Universitätsklinik für  
Dermatologie und Venerologie in Halle/S.  
Thema: „Der Einfluß ausgewählter Flavonoide auf das  
Proliferationsverhalten humaner Keratinozyten  
(HaCaT)“  
April 1997 - Sept. 1997 Pharmaziepraktikantin in der Mohren-Apotheke in  
Suhl  
Nov. 1997 Approbation als Apothekerin  
Nov. 1997 - März 2001 Doktorandin an der Universitätsklinik und Poliklinik  
für Dermatologie und Venerologie in Halle /S.  
Stipendiatin im DFG geförderten Graduiertenkolleg  
„Transport von Wirkstoffen in biologischen Systemen“  
seit April 2001 medizinische Fachreferentin in der Abteilung  
„Zulassung und Wissenschaft Ausland“ der Firma Dr.  
Willmar Schwabe Arzneimittel in Karlsruhe-Durlach

### Sprachkenntnisse:

Englisch, Russisch, Spanisch

## **Erklärung**

Hiermit versichere ich, daß ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfaßt, keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.  
Die Dissertation wurde bisher an keiner anderen Universität oder Hochschule vorgelegt.

Anja Nickel

Halle (Saale), den