



MASTERARBEIT | MASTER'S THESIS

Titel | Title

UVA-induzierte ROS-Bildung in humanen Keratinozyten:
Methodenoptimierung und Effekte von Pflanzenextrakten

verfasst von | submitted by

Maximilian Finsterer BSc

angestrebter akademischer Grad | in partial fulfilment of the requirements for the degree of
Magister pharmaciae (Mag. pharm.)

Wien | Vienna, 2025

Studienkennzahl lt. Studienblatt | Degree
programme code as it appears on the
student record sheet:

UA 066 605

Studienrichtung lt. Studienblatt | Degree
programme as it appears on the student
record sheet:

Masterstudium Pharmazie

Betreut von | Supervisor:

Mag. Dr. Victoria Klang Privatdoz.

Danksagung

Ich bedanke mich herzlichst bei Frau Mag. Dr. Victoria Klang, PD, für die Möglichkeit meine Masterarbeit in ihrer Arbeitsgruppe absolvieren zu dürfen. In dieser Zeit konnte ich mir tagtäglich Wissen aneignen und fühlte mich durch ihre Organisation, ihr Engagement und ihre konstruktiven Anregungen bestens betreut. Die Zeit in ihrer Arbeitsgruppe war von kurzer Dauer aber dafür umso schöner. Sie wird mir noch lange in guter Erinnerung bleiben.

Zu großem Dank verpflichtet bin ich Frau Mag. Tanja Pfleger, die mich über die gesamte Masterarbeit hervorragend betreut hat und bei sämtlichen Fragen, auch außerhalb der Arbeitszeit, ein offenes Ohr für mich hatte. Ich fühle mich geehrt, an ihrem Projekt durch meine Mitarbeit und Datengenerierung mitwirken zu dürfen, wodurch ich wertvolle praktische Einblicke in die pharmazeutisch-technologische Forschung erlangen konnte. Auch bei Problemen im Arbeitsablauf war sie eine verlässliche Ansprechpartnerin und war jederzeit bereit mir mit ihrer fachkundigen Unterstützung auszuweichen. Danke, Tanja!

Ebenfalls bedanken möchte ich mich bei Univ.-Prof. Dr. Lea Ann Dailey und der gesamten Division of Pharmaceutical Technology and Biopharmaceutics, die mir durch Bereitstellung der notwendigen Infrastruktur diese Masterarbeit ermöglicht haben.

Abschließend danke ich noch meiner Mutter Angela und meinen Schwestern Melissa, Monika und Michaela für die mentale und heitere Stütze durch das ganze Studium hindurch. Jeglicher Anflug von Prüfungsstress hat sich durch Ihren guten Zuspruch oder einem gemeinsam verbrachten Tag alsbald verflüchtigt. Obwohl er diesen Moment nicht mehr miterleben kann, danke ich meinem 2022 verstorbenen Vater Roland von Herzen. Nicht nur für die umfangreiche finanzielle Unterstützung, sondern auch für die Bestärkung und Motivation ein Studium zu absolvieren.

Abstract

Panax Ginseng und im Speziellen Extrakte aus Blättern oder Wurzel werden in der Traditionellen Chinesischen Medizin seit Jahrhunderten aufgrund des antioxidativen Potenzials medizinisch verwendet. Neben dem Haupteinsatz als oral eingenommenes Adaptogen wird der Extrakt zunehmend in Dermatika eingesetzt. Evidenz in Bezug auf die tatsächliche Wirksamkeit ist jedoch rar; zudem wurden viele *in vitro*-Studien lediglich mit reinem Extrakt, nicht jedoch mit Formulierungen durchgeführt. Potenzielle Synergien oder Wirkungsveränderungen mit dermal verwendbaren kosmetischen Formulierungen sind noch nicht erforscht.

Daher war es das Ziel der vorliegenden Arbeit, das Potenzial von *Korean Red Ginseng* (KRG)-Extrakt als Radikalfänger konzentrationsabhängig als Reinstoff sowie in dermal verwendeten O/W-Nanoemulsionen (NEs) zu untersuchen. Das gewählte *in vitro*-Modell zur Untersuchung der Effektivität von KRG-Extrakt waren immortalisierte HaCaT-Zellen, welche nach Inkubation mit Untersuchungslösungen durch UVA-Strahlung oder Wasserstoffperoxid (H_2O_2) oxidativem Stress ausgesetzt wurden. Als Positivkontrolle dienten Ascorbinsäure sowie ein pflanzliches Antioxidans (*Hypericum Perforatum* (HYP)-Extrakt). Die Methode wurde vorab bzgl. Bestrahlungsintensität optimiert, sodass trotz Auslösung von oxidativem Stress eine Zellviabilität von 80% nicht unterschritten wurde. Der Effekt der verschiedenen Behandlungen auf die Zellviabilität wurde mittels 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium Bromid (MTT) Assays ermittelt, während antioxidative Effekte mittels 2',7' - Dichlorodihydrofluorescein Diacetat (DCF) Assay erfasst wurden.

Die Ergebnisse nach Bestrahlung zeigten, dass KRG- sowie HYP-Extrakt in Reinform zu keiner Senkung des ausgelösten oxidativen Stresses im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle führten. Eingebettet in NE führten beide Extrakte zu einer Reduktion von UVA-induziertem Stress, nicht jedoch zur Reduktion von H_2O_2 -induziertem Stress. Bezüglich Zellviabilität zeigten die weder Reinextrakte noch extrakthaltige NE negative Effekte im Zusammenhang mit UVA-Strahlung, sodass von einer guten Hautverträglichkeit ausgegangen werden kann.

Zusammengefasst zeigte sich, dass die *in vitro*-Radikalfänger-Kapazität der getesteten KRG- und HYP-Formulierungen im vorliegenden experimentellen Setup primär durch das Vorliegen der NEs bedingt war.

Abstract

Panax ginseng extracts from leaves or roots have been used in traditional Chinese medicine for centuries due to their antioxidant capacity. Korean red ginseng (KRG) root extract is primarily used as adaptogen taken via the oral route but is increasingly marketed in dermatological products. However, evidence of its effectiveness after local application on the skin is scarce. Moreover, most *in vitro* studies have been conducted with pure extract. Potential synergies or interactions with other additives within dermally applied vehicles have not been yet examined.

Therefore, the aim of this study was to investigate the potential of KRG extract as a radical scavenger in a concentration-dependent manner, both as a pure substance and in O/W nanoemulsions (NE) for dermal use. Immortalised HaCaT cells were chosen as *in vitro* model to investigate the effectiveness of KRG extract: cells were first incubated with either a test solution of KRG or positive control (ascorbic acid, Hypericum perforatum extract, HYP) and then subjected to oxidative stress by means of UVA radiation and/or hydrogen peroxide treatment. The treatments and irradiation intensity were optimised beforehand to maintain cell viability above 80% despite the induction of oxidative stress. Effect of treatments on cell viability was determined using 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide (MTT) assays, while antioxidant effects were determined using the 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCF) test.

The results after irradiation with 0.25 J/cm² showed that KRG and HYP extracts in their pure form did not lead to a reduction in oxidative stress compared to an untreated control. When embedded in NE, both extracts led to a significant reduction in UVA-induced oxidative stress, but no such effect was observed after treatment with hydrogen peroxide. Regarding cell viability, neither extracts nor extract-loaded NE had a negative impact on cell viability in context with UVA at 0.25 J/cm²; thus, good skin compatibility can be assumed.

In summary, it can be concluded that the *in vitro* radical scavenging capacity of the tested KRG and HYP formulations in this setup was primarily caused by the tested NE as vehicles, which should be subject to further investigations.

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung und Zielsetzung	1
2 Allgemeiner Teil	3
2.1 Die Haut – Aufbau und Funktionen	3
2.1.1 Epidermis	4
2.1.2 Dermis	8
2.1.3 Subcutis	10
2.2 UV-Strahlung	10
2.3 Oxidativer Stress	11
2.3.1 Reaktive Sauerstoffspezies (ROS)	13
2.4 Antioxidantien	22
2.4.1 Enzymatische Antioxidantien	23
2.4.2 Endogene nicht enzymatische Antioxidantien	24
2.4.3 Exogene Antioxidantien	26
2.5 Panax ginseng C.A. Meyer	33
2.5.1 Herkunft und Beschreibung	33
2.5.2 Weißer, Roter und Schwarzer Ginseng	35
2.5.3 Ginseng radix Ph.Eur.: Inhaltsstoffe	37
2.5.4 Biologische Effekte von Ginsengextrakt bei oraler Anwendung	41
2.5.5 Dermale Anwendung von Ginsengextrakt	42
2.6 Nanoemulsionen als Träger für Pflanzenextrakte	46
2.7 Angewendete Testmethoden	48
2.7.1 Prinzip des ROS-Assay	48
2.7.2 Prinzip des MTT-Assays	49
3 Materialien & Methoden	50

3.1 Reagenzien	50
3.2 Human adult low calcium high temperature (HaCaT) Keratinozyten als Zelllinie	50
3.3 Kultivierungsbedingungen	52
3.4 UVA-Bestrahlung	54
3.5 Versuchsdurchführung	55
3.5.1 Tag 1: Passagieren und Aussäen der Zellen	55
3.6 Reaktive Sauerstoff Spezies (ROS)-Assay	58
3.6.1 Tag 2: Probenvorbereitung	58
3.6.2 Durchführung des ROS-Assays	58
3.7 Durchführung des 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazoliumbromid (MTT) Assays	62
3.8 Methodenvalidierung mit Vitamin C	63
3.9 Nanoemulsionen	65
3.9.1 Herstellung der Nanoemulsionen	65
3.10 Statistische Analyse	66
4 Ergebnisse	68
4.1 Optimierung der UV-Bestrahlungsintensität	68
4.2 KRG-Extrakt: Antioxidative und zellviabilitätsbezogene Effekte	70
4.3 KRG-NEs: Antioxidative und zellviabilitätsbezogene Effekte	73
5 Diskussion	76
6 Conclusio	79
7 Literaturverzeichnis	80
8 Anhang	95

Abkürzungsverzeichnis

ATP	Adenosintriphosphat
ADP	Adenosindiphosphat
DCF	2', 7' – Dichlorofluorescein
DCFH ₂ -DA	2',7' - Dichlorodihydrofluorescein Diacetat
DEV	Droge-Extrakt-Verhältnis
DHA	Dehydroascorbat
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
ER	Endoplasmatisches Reticulum
FADH ₂	Flavin Adenin Dinukleotid
FAD	
FBS	fetal bovine serum
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HaCaT	Human adult low calcium high temperature Ceratinocytes
HPLC-ELSD	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie, gekoppelt mit einem Verdunstungslichtstreuendetektor
HYP	Hypericum perforatum
IR	Infrarot
KRG	Korean Red Ginseng
MBP	Metall bindende Proteine
MCI	Mild Cognitive Impairment
MMP	Matrix-Metalloproteinasen
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl- tetrazolium Bromid
NADPH	Nicotinamid Adenin Dinucleotid Phosphat
NADP ⁺	
NE, NEs	Nanoemulsion, Nanoemulsionen
O/W	Öl-in-Wasser
Ph.Eu	pharmacopoea europea, Europäisches Arzneibuch

ROS	reaktive Sauerstoffspezies
RPM	Rotations per Minute
SCI	Subjective Cognitive Impairment
SOD	Superoxid-Dismutase
UV	Ultraviolett
W/O	Wasser-in-Öl

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematischer Querschnitt durch die menschliche Haut [6]	4
Abbildung 2: Strukturübersicht der Epidermis [38]	5
Abbildung 3: Überblick des elektromagnetischen Spektrums [126]	10
Abbildung 4: Die mitochondriale Elektronentransportkette mit den Stellen der Produktion von $O_2^{\bullet}$ [19]	14
Abbildung 5: Lewis-Formel von $O_2^{\bullet}$ [18]	15
Abbildung 6: Hauptquellen der intrazellulären ROS-Produktion [24]	16
Abbildung 7: Intrazelluläre Radikalinduktoren und -fänger [20]	16
Abbildung 8: Signaltransduktionswege der UV induzierten Apoptose. UV-Strahlung schädigt nukleäre DNA, aktiviert Todes Rezeptoren (wie CD95) und induziert die Bildung von ROS [30]	17
Abbildung 9: ROS-Schäden auf biomolekularer Ebene [18]	20
Abbildung 10: Übersicht der Signalkaskaden nicht enzymatischer Antioxidantien [97]	25
Abbildung 11: Fenton-Reaktion [41]	25
Abbildung 12: Reaktion von Methionin mit der reaktiven Sauerstoffspezies H_2O_2	26
Abbildung 13: Strukturübersicht der Polyphenole [50]	28
Abbildung 14: Basisstruktur eines Flavonoids [49]	28
Abbildung 15: Redoxhaushalt und Strukturen des Vitamin C im Körper [44]	30
Abbildung 16: Spross mit Fruchtstand des Panax Ginseng C.A.Meyer [128]	35
Abbildung 17: Weiße Ginsengwurzel und die durch verschiedene Herstellungsmechaniken erreichten Unterarten, jeweils mit Angabe der enthaltenen Ginsenoside [129]	36
Abbildung 18: Strukturen von (20S) Protopanaxadiol und (20S) Protopanaxatriol, zugrunde liegt ein Triterpensaponin vom Dammaran-Typ [4]	38
Abbildung 19: Struktur von Ginsenosid Rg1	38
Abbildung 20: Struktur von Ginsenosid Rb1	38
Abbildung 21: HPLC-ELSD-Chromatogramme von Ginsenosiden in koreanischem weißem Ginseng (B), rotem Ginseng (C) und schwarzem Ginseng (D) [90]	40
Abbildung 22: Die Zielstrukturen der Komponenten von KRG in einem Keratinozyten [104]	45
Abbildung 23: Struktur eines Phosphatidylcholins. Die apolaren Seitenketten sind in diesem Fall Palmitinsäure und Ölsäure, welche an den Glycerinteil in der Mitte verestert sind.	47
Abbildung 24: Umwandlungsschritte von DCFH ₂ -DA in DCF durch den Metabolismus von Zellen	48
Abbildung 25: Umwandlung von MTT (gelb) durch NADH abhängige Reduktasen in Formazan (blau) [66]	49
Abbildung 26: HaCaT – Zellen unter dem Mikroskop (Passage 40, ® Mag. Tanja Pfleger)	51
Abbildung 27: UVA-Cube 400. Außenansicht (links), notwendige Utensilien zur Messung (rechts oben) sowie in der Aufwärmphase zum Einsatz kommende Sensor mit aufgelegtem Wellplattendeckel (rechts unten)	54
Abbildung 28: Laminar Flow-Werkbank zur Durchführung steriler Arbeiten in der Gefahrenstufe 1	55
Abbildung 29: Zellzähler und Zellviabilitätsanalysator	56
Abbildung 30: Ermittlung der gewünschten Zellzahl/mL sowie der notwendigen Zellsuspension nach Auszählung mit dem Vi-Cell® XR Cellcounter	57
Abbildung 31: Workflow des ROS-Assay	60
Abbildung 32: Pipettierschema ROS-Assay	61
Abbildung 33: Workflow des MTT-Assay	62
Abbildung 34: Pipettierschema Methodenvalidierung	64
Abbildung 35: Durchschnittliche ROS-Produktion in HaCaT-Keratinozyten unter Behandlung mit H_2O_2 bzw. mit einer bestimmten UVA-Bestrahlungsdichte. Die ROS-Produktion der behandelten Zellen sind als ein Vielfaches der ROS-Produktion in unexponierten Kontrollzellen dargestellt.	69
Abbildung 36: Durchschnittliche Zellviabilität der HaCaT-Keratinozyten unter Behandlung mit H_2O_2 bzw. mit einer bestimmten UVA-Bestrahlungsdichte. Die Zellviabilität in den behandelten Zellen ist als Prozentanteil der Zellviabilität der unbehandelten Kontrollzellen dargestellt.	69
Abbildung 37: KRG-Extrakt: ROS-Produktion in HaCaT-Keratinozyten unbehandelt (blau) sowie nach Behandlung mit H_2O_2 (orange) bzw. 0,25 J/cm ² UVA (gelb).	71
Abbildung 38: KRG-Extrakt: Zellviabilität in HaCaT-Keratinozyten unbehandelt (blau) sowie nach Behandlung mit H_2O_2 (orange) bzw. 0,25 J/cm ² UVA (gelb).	71

Abbildung 39: HYP-Extrakt: ROS-Produktion in HaCaT-Keratinocyten unbehandelt (blau) sowie nach Behandlung mit H_2O_2 (orange) bzw. $0,25\text{ J/cm}^2$ UVA (gelb).	72
Abbildung 40: HYP-Extrakt: Zellviabilität in HaCaT-Keratinocyten unbehandelt (blau) sowie nach Behandlung mit H_2O_2 (orange) bzw. $0,25\text{ J/cm}^2$ UVA (gelb).	72
Abbildung 41: NE_KRG: ROS-Produktion in HaCaT-Keratinocyten unbehandelt (blau) sowie nach Behandlung mit H_2O_2 (orange) bzw. $0,25\text{ J/cm}^2$ UVA (gelb).	73
Abbildung 42: NE_KRG: Zellviabilität in HaCaT-Keratinocyten unbehandelt (blau) sowie nach Behandlung mit H_2O_2 (orange) bzw. $0,25\text{ J/cm}^2$ UVA (gelb).	74
Abbildung 43: NE_HYP: ROS-Produktion in HaCaT-Keratinocyten unbehandelt (blau) sowie nach Behandlung mit H_2O_2 (orange) bzw. $0,25\text{ J/cm}^2$ UVA (gelb).	75
Abbildung 44: NE_HYP: Zellviabilität in HaCaT-Keratinocyten unbehandelt (blau) sowie nach Behandlung mit H_2O_2 (orange) bzw. $0,25\text{ J/cm}^2$ UVA (gelb).	75

1 Einleitung und Zielsetzung

Durch Umweltfaktoren bedingter oxidativer Stress bezeichnet ein Ungleichgewicht zwischen oxidativen und antioxidativen Prozessen auf zellulärer Ebene, der zugunsten der Oxidation verschoben ist. Es kommt zu einer Überlastung des körpereigenen antioxidativen Systems; Zellstrukturen wie Proteine, Lipide und DNA werden dadurch geschädigt. Es folgen Funktionsstörungen, Entzündungen und auf Dauer chronische Krankheitsbilder. So trägt permanenter oxidativer Stress zur Entstehung von Arteriosklerose, Diabetes oder Krebserkrankungen bei, spielt aber auch eine entscheidende Rolle bei vorzeitiger Hautalterung [14, 15].

Ein wichtiger Umweltfaktor in Bezug auf „Photoageing“, also vorzeitige lichtbedingte Hautalterung, ist die UV-Strahlung der Sonne. Diese ist ein potenter Induktor für oxidativen Stress in den Keratinozyten der Oberhaut und löst als wichtigster externer Faktor neben hohen Temperaturen, falscher Ernährung und Rauchen oxidative Entzündungsprozesse im Körper und der Haut im Besonderen aus [131, 132]. Durch Licht gealterte Haut besitzt einen eher faltigen und spröden Phänotypus; bei starker UV-Exposition wird sie dick, ledrig und verliert zusehends ihre Elastizität [34].

Um UV-bedingter Hautalterung entgegenzuwirken, werden Kosmetika mit mineralischen oder chemischen UV-Filtern verwendet, welche den UV-induzierten Ablauf oxidativer Prozesse in den Keratinozyten verlangsamen [56]. Als kosmetische Zusätze in Sonnenschutz- und Hautpflegeprodukten werden jedoch auch Antioxidantien verwendet. Ein Vertreter pflanzlicher Extrakte, der aus dem asiatischen Markt in den europäischen Raum eingeführt wurde, ist Korean Red Ginseng (KRG)-Extrakt. Dieses Vielkomponentengemisch weist laut Literatur in Reinform antioxidative Effekte *in vitro* und *in vivo* am Tier auf [134, 135]; jedoch gibt es wenige Studien, die sich mit der Einbettung von KRG in kosmetische Vehikel und deren Effekt auf oxidative Prozesse befassen.

Daher war es das Ziel der vorliegenden Arbeit, KRG-Extrakt in kosmetische O/W-Nanoemulsionen (NE) einzuarbeiten, da diese eine gute Hautverträglichkeit ausweisen [133], und den Einfluss der Formulierungen auf oxidative Prozesse und Zellviabilität *in vitro* zu messen. Zu diesem Zweck wurden die Formulierungen auf humane immortalisierte Keratinozyten (human adult low calcium high temperature, HaCaT-Keratinozyten) aufgetragen, welche nach Inkubation mit den Vehikeln unter

oxidativen Stress gesetzt werden. Ziel war es, eine potenzielle Senkung UVA-bedingten Hautalterung durch Messung antioxidativer Effekte von NE mit und ohne pflanzliche Antioxidantien zu messen.

Zunächst wurde eine Methodenvalidierung bezüglich der UVA-Bestrahlungstechnik an HaCaT-Zellen durchgeführt. Es wurde die optimale UVA-Bestrahlungsdosis ermittelt, bei der eine signifikante ROS-Bildung in HaCaT-Keratinocyten induziert wurde, jedoch gleichzeitig die Zellviabilität in keinem zu großem Ausmaß sank. Die verwendete Methodik wurde aus aktueller Literatur zur Untersuchung der Wirksamkeit chemischer UV-Filter gegen ROS-Bildung in Keratinocyten entnommen und adaptiert [56]. Hierbei wurde die Auslösung von oxidativem Stress durch UVA-Strahlung sowie Wasserstoffperoxid (H_2O_2) via Fluoreszenzfarbstoff gemessen. Die Zellviabilität der HaCaT-Keratinocyten wurde mittels MTT-Test ermittelt.

Nach Etablierung einer adäquaten UVA-Bestrahlungstechnik wurde KRG-Extrakt in Reinform sowie innerhalb der hergestellten NE auf seine Effektivität bezüglich der Reduktion des ausgelösten oxidativen Stresses untersucht. Als antioxidative Positivkontrolle diente Vitamin C, als pflanzliche Positivkontrolle diente Hypericum Perforatum (HYP)-Extrakt in Reinform sowie in NE.

2 Allgemeiner Teil

2.1 Die Haut – Aufbau und Funktionen

Mit annähernd 2 m² Oberfläche ist die Haut das größte Organ des Menschen. Von einer beispielhaft 70 kg schweren Person entfallen mindestens 5 kg auf die Haut [1].

Als Barriere zwischen Außen- und Innenwelt fallen der Haut vielfältige Aufgaben zu, welche einen wirksamen Schutz vor mechanischen, physikalischen und chemischen Reizen sowie gegen das Eindringen von Mikroorganismen sicherstellen. Die Haut ist damit auch ein Teil des körpereigenen Immunsystems. Ein prophylaktischer Schutz vor Infektionen wird neben der dicht gewachsenen Hornschicht der Epidermis durch einen Säureschutzmantel mit einem pH-Wert von 4,5 bis 6,2 erreicht. Sollte durch eine Verletzung der Zugang ins Körperinnere für Krankheitserreger geöffnet werden, so reagiert die Haut mit der Auslösung einer zunächst unspezifischen Immunantwort gegen den eingedrungenen Erreger. Im Bedarfsfall kann aber auch eine spezifische Immunantwort ausgelöst werden [3, 4, 5]. Die Vermittler sind Langerhans-Zellen. Sie können Antigene phagozytieren und den Vorläufern von Immunzellen in Lymphknoten präsentieren [1].

Weiters werden informative externe Reize über zahlreiche Nervenendigungen in der Dermis mit Ort und Stärke wahrgenommen und ermöglichen das Empfinden von Schmerz, Juckreiz und Temperaturschwankungen [3, 5].

Die verhornten Zellhüllen des Stratum corneum, der äußersten Schicht der Epidermis, sowie das von Talgdrüsen sezernierte Sebum, welches die Haut mit einem Fettfilm wasserdicht macht, fungieren als Schutz vor unkontrolliertem Wasserverlust [1]. Durch eine dynamische Durchblutung sowie das gezielte Verdunsten von Schweißflüssigkeit auf der Hautoberfläche ist eine adaptive Temperaturregulation möglich [3, 4]. Hierzu notwendig sind Schweißdrüsen, welche eine Kühlung durch Verdunstung von Flüssigkeit auf der Hautoberfläche erreichen. Die Gesamtheit der Schweißdrüsen produziert einen Liter Schweiß pro Stunde bei moderater Bewegung [1].

Auch im Stoffwechsel spielt die Haut eine wesentliche Rolle, etwa bei der von Sonnenstrahlung katalysierten Herstellung von Vitamin D sowie als größter Speicherort für Fettgewebe [1, 9].

Zum Schutz gegen Strahlennoxen kann die Haut neben der Absorption von Licht auch Lichtanteile reflektieren. In der Haut wird Melanin hergestellt, ein endogenes Pigment mit der Aufgabe des mechanischen und antioxidativen Schutzes vor UV- bedingten DNA-Schäden [6]. Die Haut kann die durch Strahlung entstandenen Schäden in der DNA auch zu einem gewissen Grad reparieren. In Phasen starker Strahlungsexposition kann die Haut bestimmte Ebenen der Epidermis vergrößern [5].

In den folgenden Unterkapiteln wird der Aufbau der Hautschichten (Abbildung 1) im Detail näher besprochen. Die Haut besteht aus drei grob eingeteilten Zonen: Der Epidermis, der Dermis und der Subcutis [1, 6].

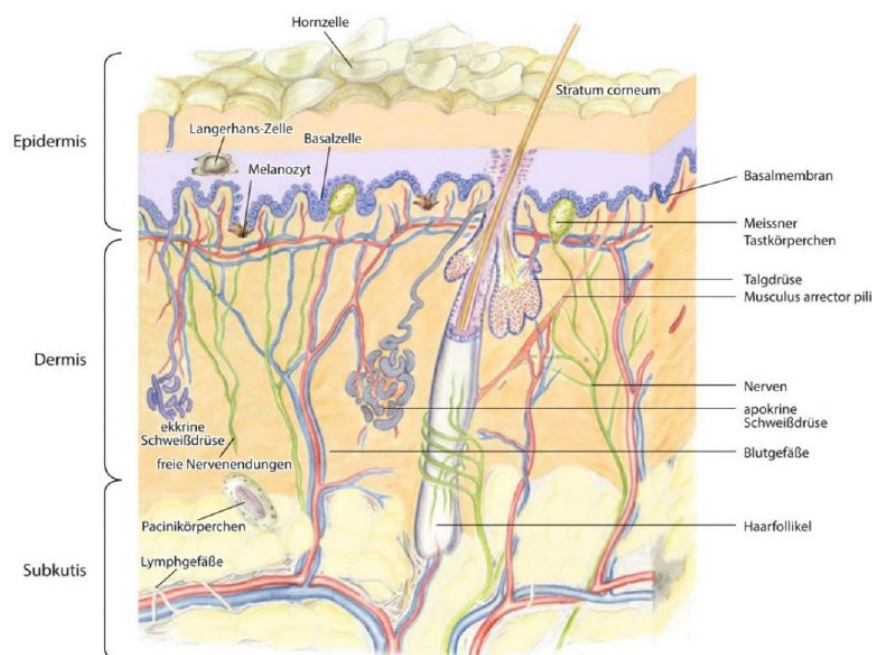


Abbildung 1: Schematischer Querschnitt durch die menschliche Haut, abgedruckt mit Genehmigung von Springer Nature [6]

2.1.1 Epidermis

Die Epidermis, auch Oberhaut genannt, stellt die äußerste Hautschicht dar und ist ein mehrschichtiges, nach außen zunehmend verhornendes Plattenepithel ohne Blutgefäße (Abbildung 2). Ihre Dicke reicht von 40 µm bis 1,6 mm. So ist die Epidermis an den Augenlidern am dünnsten, an den mechanisch am stärksten belasteten Zonen der Haut, wie den Handflächen und Fußsohlen, am stärksten ausgeprägt [1, 7]. Der überwiegend vorliegende Zelltyp mit einem Anteil von 95 % an der Gesamtzellzahl der Epidermis wird durch die Keratinozyten gestellt [1].

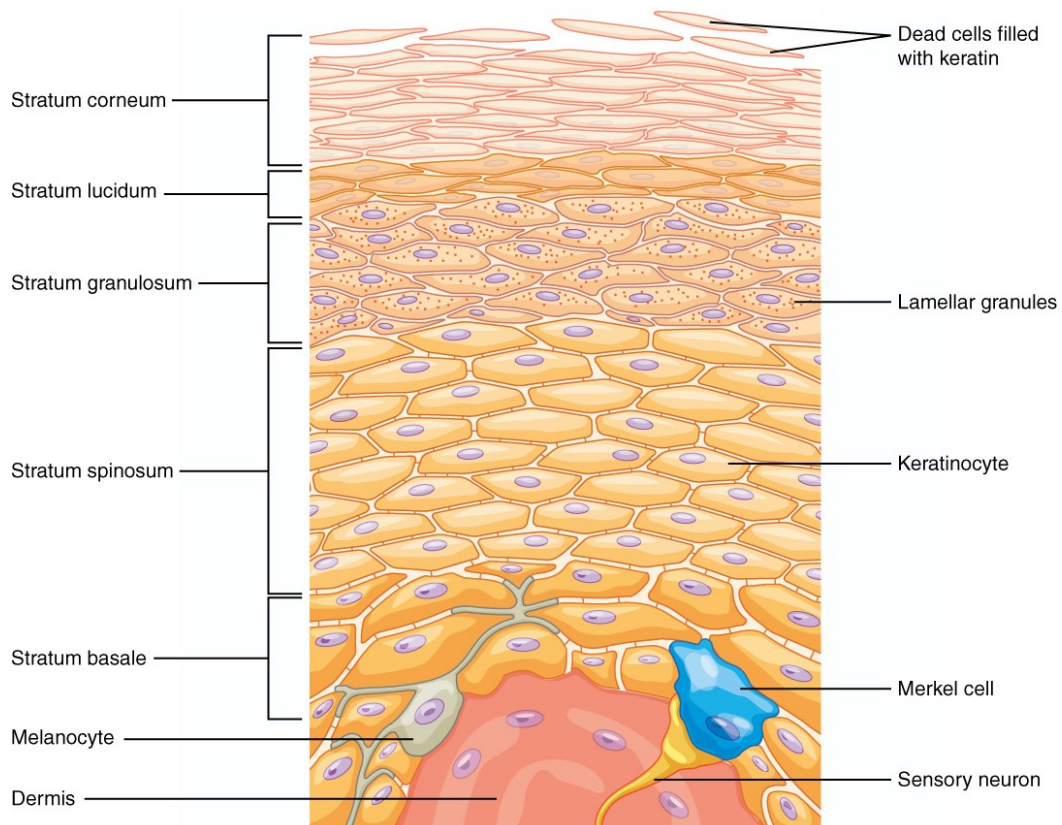


Abbildung 2: Strukturübersicht der Epidermis, abgedruckt unter CC BY 4.0 Open Access [38]

In ihrer rund vierwöchigen Lebensspanne durchwandern die Keratinozyten die gesamte Epidermis von innen nach außen und unterliegen dabei einem Differenzierungs- und Reifeprozess [1]. Keratinozyten entstehen aus adulten Stammzellen in der Basalzellschicht der Epidermis und werden mit zunehmender Differenzierung abgeflacht und verhornt. Sie produzieren fortlaufend Keratin, ein hydrophobes Protein, welches Filamente und damit das Zytoskelett der Keratinozyten ausbildet. In einem späteren Reifestadium produzieren die Keratinozyten in Keratohyalin granula ein weiteres Protein, Filaggrin. Nach seiner Freisetzung sorgt es für die Quervernetzung der Keratin-Filamente. Mit der steigenden Keratin- und Filaggrin-Konzentration in den Zellen folgt eine zunehmende Verhornung und gleichzeitige Abflachung der Keratinozyten. In diesem Prozess verlieren sie ihren Zellkern, das Cytoplasma und alle weiteren Zellorganellen [1, 2]. Nach Erreichen der Hornschicht der Epidermis werden die nun gänzlich verhornten Keratinozyten

sukzessive in die Umwelt abgeschilfert [7]. Die Epidermis ist daher ein vielzelliges und vielschichtiges Plattenepithel, welches sich permanent selbst erneuert [2, 4].

Anhand der Reifestadien der Keratinozyten teilt man die Epidermis in vier Schichten ein: Das Stratum corneum, auch Hornschicht genannt, ist die äußerste Zellebene der Epidermis und besteht aus abgeflachten, verhornten sowie zellkernlosen Keratinozyten [2]. Durch die Quervernetzung der Protein Vorstufen Involucrin und Loricrin sowie die Überbrückung der Keratin Filamente durch das Protein Filaggrin entsteht im Zuge der Verhornung eine stark wasserabweisende, verhärtete Schicht in der Plasmamembran der Keratinozyten. Zusätzlich sind eine Reihe von Lipiden, darunter Ceramide und Sterole zur Stabilisierung der Hornschicht involviert [1, 6].

Als äußerstes Barriere- und Speichersystem der Haut untersteht dem Stratum corneum der Schutz vor Fremdstoffen sowie die Prävention einer unverhältnismäßigen Wasserverdunstung. Ein pH-Wert von 5,5 ermöglicht bestimmten Mikroorganismen, wie Staphylokokken und Propionibakterien das Ansiedeln auf der Hautoberfläche [7]. Das schwach saure Milieu schafft eine unwirtliche Umgebung für andere, pathologisch relevante Bakterien und Pilze, wodurch deren Wachstum und Proliferation stark eingeschränkt wird [8]. An unbehaarten Stellen der Haut wie den Handinnenflächen und den Fußsohlen bildet das einzellreihige Stratum lucidum die innerste Zellschicht des Stratum corneum. Die Keratinozyten sind in dieser Zellebene dichter als in der darüber liegenden Hornschicht [5].

Das Stratum granulosum (Körnerzellschicht) ist mit zwei bis fünf Zelllagen deutlich dünner und besteht aus flachen Zellen mit kleinen Zellkernen. Der Name leitet sich ab von den in den dortigen Keratinozyten synthetisierten Keratohyalin granula [6]. Weiters werden hier durch die Keratinozyten Ceramide hergestellt. Ceramide gehören zu den epidermalen Lipiden und gewährleisten mit ihrer amphiphilen Struktur zusammen mit freien Fettsäuren und Cholesterol eine aufrechte Barriere- und Schutzfunktion der Hornschicht in Form von multilamellaren Komplexen [7, 10].

Darunter liegt das Stratum spinosum (Stachelzellschicht). Hier formieren sich lebende polygonale Keratinozyten zum größten Abschnitt der Epidermis mit vier bis acht Zellebenen. Die Schicht zeichnet sich durch ihre Vielzahl an Zellverbindungen aus, darunter Desmosomen, Adherens und Gap Junctions [6, 7]. Die Desmosomen als

Interzellulärbrücken erscheinen als stachelartige Fortsätze der Zellen und sorgen gemeinsam mit Tonofibrillen für eine Stabilisierung des Zellverbandes [5, 7].

Die innere Grenze der Epidermis wird durch das Stratum basale, zu deutsch Basalzellschicht, gebildet. An der Basalmembran haftet eine einzellreihige Schicht aus zylindrischen Stammzellen der Epidermis über Hemidesmosomen adhärent an. Das Stratum basale ist die einzige teilungsaktive Schicht der Keratinozyten, alle weiter äußerlich liegenden Epidermisschichten beinhalten teilungsinaktive Keratinozyten. Je weiter sie in der Epidermis nach außen vordringen, desto weiter ausdifferenziert sind sie und synthetisieren fortlaufend mehr Produkte. Dazu gehören Tonofibrillen, Keratinosomen und ab der Körnerschicht auch Keratohyalin granula. Diese Produkte verleihen der Epidermis zunehmend mehr Stabilität und Widerstand [5, 6].

Nach der Mitose in der Basalzellschicht brauchen die Keratinozyten 14 Tage, um durch die Epidermisschichten bis zum Stratum corneum durchzudringen. Dort angekommen wird eine Zeitspanne von weiteren 14 Tagen für den Prozess der Verhornung und Abschilferung als Hautschüppchen in die Umwelt benötigt. Der Lebenszyklus eines Keratinozyten bei einem Menschen ohne Hauterkrankungen dauert somit etwa 28 Tage [6].

Neben den anteilmäßig am meisten vorliegenden Keratinozyten gibt es noch weitere Zellarten mit anderen Funktionen in der Epidermis. Die Melanozyten sind dendritische Zellen im Stratum basale. Sie synthetisieren das Pigment Melanin, ausgehend von der Aminosäure Phenylalanin, die in Tyrosin umgewandelt wird. Das Enzym Tyrosinase wandelt Tyrosin weiter in L-DOPA und Dopachinon um, letztere ist eine metastabile Vorstufe zur weiteren Umwandlung in Eumelanin und Phäomelanin. Melanin wird in Melanosomen angereichert und diese können an bis zu 36 Keratinozyten übertragen werden, die dem Melanozyten benachbart sind. Neben der Art des hergestellten Melanins bestimmen auch die Größe der Melanosomen sowie das Ausmaß der Exposition von UV-Strahlung den Pigmenttyp der Haut. So schützt das schwarz-braun gefärbte Eumelanin die Keratinozyten sowohl mechanisch als absorbierender Schirm über den Zellkern als auch funktionell als Radikalfänger vor UV-Strahlung verursachten DNA-Schäden. Weitere Melanin-Arten sind das rot-gelb gefärbte Phäomelanin sowie das rot gefärbte Trichrome. Je nach Art der Zusammensetzung des Melaninpigments sowie das Ausmaß der Melaninproduktion stimulierenden UV-Exposition ergibt sich die Hautfarbe. Diese steht in einem direkten Verhältnis zur

Menge an produziertem Eumelanin sowie die der Haut extern zugeführter UV-Strahlung [1, 5, 6, 37].

Einen weiteren Zelltyp verkörpern die Langerhans-Zellen. Sie entstehen als dendritische Zellen aus Monozyten im Knochenmark, lagern sich im Stratum spinosum an und sind Bestandteil des Immunsystems [6]. Sie erkennen und phagozytieren, die sie erreichenden fremden Antigene, aktivieren Makrophagen in der Haut und bewegen sich in nahegelegene Lymphknoten. Dort präsentieren sie die Antigene auf ihrer Oberfläche den naiven T-Helferzellen, deren Reifung dadurch stimuliert wird. Es erfolgt zunächst eine primäre Immunantwort durch die Makrophagen Aktivierung, gefolgt von einer sekundären Immunantwort, welche durch die Antigenpräsentation in den Lymphknoten ausgelöst wird [1, 6, 7]. Die Langerhans-Zellen spielen eine kardinale Rolle bei Soforttyp- und zellvermittelten verzögerten Immunreaktionen, so auch bspw. bei der Sensibilisierung gegenüber Kontaktallergenen [5].

Einen dritten Zelltyp stellen die Merkel-Zellen dar. Sie halten sich in der Basalzellenschicht der Epidermis auf und zeigen ein verstärktes Vorkommen in Hautarealen mit hoher taktiler Empfindlichkeit, wie bspw. behaarte Hautstellen, Rektum und Labialepithel. Merkel-Zellen stehen oft in nächster Nähe zu freien Nervenendigungen, der Komplex aus beiden Komponenten wird auch als Merkel-Scheibe bezeichnet. Merkel-Scheiben sind Bestandteil des körperlichen Mechanorezeptoren-Systems für den Tastsinn, im Wesentlichen zur Empfindung sanfter Berührungen [1, 5].

2.1.2 Dermis

Die Dermis, auch Lederhaut genannt, ist die der Epidermis unterlagerte Hautschicht. Durch ihr fibroelastisches Bindegewebe verleiht sie der Haut als Ganzes Elastizität und Zugfestigkeit. An mechanisch stark beanspruchten Zonen des Körpers, wie den Handinnenflächen und den Fußsohlen ist sie mit einem ausführlicheren Profil ausgebildet.

Aufgrund des unterschiedlichen Musters, wie die Papillen der Dermis, die in die Epidermis hineinragen, besteht die Möglichkeit der Unterteilung in Felder- und Leistenhaut. Dabei lagern sich die Papillen entweder gruppenweise zusammen und bilden auf der Hautoberfläche ersichtliche Felder oder sie liegen kammartig vor und

lassen die Hautoberfläche als ein Abbild von Leisten erscheinen. Felderhaut besitzt Haare, Schweiß und Talgdrüsen während Leistenhaut nur Schweißdrüsen besitzt und typischerweise ein Vorkommen auf unbehaarten Körperstellen assoziiert wird [2].

Die Dermis besteht aus Fibroblasten, welche wiederum Fasern und eine amorphe Matrix herstellen. Die Kollagenfasern sind mit 70-75 % des Trockengewichts der Dermis die Hauptstrukturproteine und geben der Haut maßgeblich mechanische Stabilität. Weitere 3 % des Dermis-Trockengewichts entfallen auf die elastischen Fasern Elastin und Fibrillin. Diese treiben das Rückschnellen der Dermis nach mechanischer Beanspruchung voran. Ihre Anzahl im Bereich des Gesichts sowie des Nackens ist höher und nimmt allgemein ab dem 30. Lebensjahr kontinuierlich ab.

Die Zellen und Fasern der Dermis werden von einer amorphen Matrix umgeben. Darin enthalten sind Proteoglykane wie Hyaluronsäure, Heparin- und Chondroitinsulfat als Gerüstbildner. Diese binden Wasser und darin gelöste Biomoleküle und Transmitter an sich und formieren die Matrix als ein poröses Gel. In diesem sind wiederum die Faserproteine eingebettet [5, 6].

Die Lederhaut hat, abhängig von der betrachteten Hautstelle, eine Dicke von 500 µm - 5 mm [1]. Sie wird in zwei Schichten unterteilt: Das Stratum papillare (Papillarschicht) ist aus feinen, locker angeordneten Fibrillen und Fibroblasten zusammengesetzt und ragt mit dermalen Papillen in die Epidermis hinein [2, 5, 6]. Neben den in der Epidermis befindlichen Merkel-Zellen, die für das Empfinden von Berührung wesentlich sind, gibt es in den Dermispapillen der unbehaarten Leistenhaut Meissner-Tastkörperchen. Sie fungieren als Tast- und Druck-Mechanorezeptoren [2, 5].

Das Stratum reticulare (Geflechtsschicht), besteht aus dicht gelagerten Bündeln von Kollagen und Elastinfasern sowie Fibroblasten und grenzt an die Subcutis. Im Vergleich zum Stratum papillare weist es jedoch einen höheren Anteil an Fasern als Zellen auf [5]. Beide Schichten sind reich durchzogen von Blut- und Lymphgefäßen sowie peripheren Nervenfasern und beinhalten auch die Gänge von Talg- und Schweißdrüsen [2, 5]. Im Stratum reticulare liegen die Ursprünge von sämtlichen Haarfollikeln und Schweißdrüsen. Die Vater-Pacchini Körperchen sind eine weitere Art von Mechanorezeptoren. Sie liegen tief in der Dermis und sind zuständig für die Wahrnehmung von Beschleunigung und Vibration [5].

2.1.3 Subcutis

Die Subcutis, (Unterhaut) schließt ohne klare Grenze an die Dermis an und stellt grundsätzlich ein lockeres Bindegewebe dar. Darin ist das subkutane Fettgewebe, Panniculus adiposus, in Form von Lappchen eingebettet. Bei normalgewichtigen Patienten sind bis zu 80 % des gesamten Körperfetts im subkutanen Fettgewebe eingelagert. Es dient als Isolationsschicht, als dämpfende Schutzzone bei äußeren Traumata und zudem als Energiereserve für den Körper. Es nimmt auch eine endokrine Funktion wahr, da es das Sättigungshormon Leptin freisetzt. Leptin wirkt am Hypothalamus und reguliert Hunger sowie den Energiestoffwechsel [1, 7]. In der Subcutis liegt der Ursprung der Blut- und Lymphgefäßversorgung der übergeordneten Hautschichten. Die Gefäße verlaufen zunächst in das untere Stratum reticulare wo sie sich in einem ersten großen Gefäßnetz, genannt Plexus, zusammenschließen. Daraus gehen u.a. weiter aufsteigende Gefäße hervor, welche sich wiederum in einem zweiten Plexus in oberen Stratum reticulare bündeln. Dieses zweite Gefäßnetz versorgt die Papillen des Stratum papillare mit Kapillaren und stellt damit in weiterer Folge die Versorgung der Epidermis mit Nährstoffen durch Diffusion sicher [7].

2.2 UV-Strahlung

In der vorliegenden Arbeit wird UV-Strahlung als Induktor für intrazellulären oxidativen Stress genutzt. Als UV-Strahlung bezeichnet man den Teil des elektromagnetischen Spektrums im Wellenlängenbereich von 10 bis 380 nm (Abbildung 3).

Ultraviolettes Licht lässt sich anhand seiner Wellenlänge in drei weitere Subbereiche unterteilen, wobei bestimmte Wellenlängenbereiche einen dedizierten Buchstaben zugeordnet bekommen. So teilt man in UVA (315 - 380 nm), UVB (280 - 315 nm) und UVC (10 - 280 nm) Wellen. Die Sonne deckt

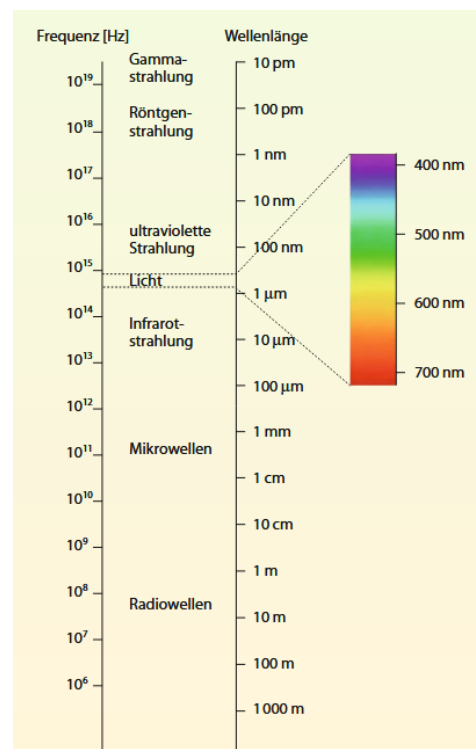


Abbildung 3: Überblick des elektromagnetischen Spektrums, abgedruckt mit Genehmigung von Springer Nature [126]

mit ihrer Emission den gesamten Bereich des ultravioletten Lichtes ab, jedoch erreicht aufgrund der abschirmenden Ozonschicht der Erde nur ein sehr kleiner Teil der UVB-Strahlung die Erdoberfläche. Mit einem Gesamtanteil von 99% des einfallenden UV-Lichtes ist der Rest UVA-Strahlung. UVC-Strahlung wird gänzlich durch die Ozonschicht zurückgehalten.

Trotz seiner verborgenen Natur birgt ultraviolettes Licht aufgrund seiner Energie, Risiken für die Gesundheit. UVA-Wellen tragen zur Hautalterung bei und werden in Verbindung mit der Entwicklung bestimmter Hautkrebsarten gebracht. UVB-Wellen sind maßgeblich an der Entstehung von Sonnenbränden beteiligt, worin wiederum die Ursache für das Auftreten von einer Vielzahl an Hautkrebsarten liegt [11].

2.3 Oxidativer Stress

Oxidierende und reduzierende Prozesse sind essenzielle Bestandteile für eine vitale Zellhomöostase der Eukaryoten. Redoxprozesse steuern den Elektronentransfer zwischen Molekülen, oft werden Elektronen auch auf Trägermolekülen, den Reduktionsäquivalenten, zwischengespeichert. Im Verlauf der folgenden Zellatmung werden die Elektronen wieder kollektiv freigesetzt, um ATP (Adenosintriphosphat) zu generieren.

Ein Oxidans ist ein Stoff, der eine Oxidation verursacht. Hauptvertreter sind ROS („Reaktive Sauerstoff Spezies“), die im Zuge des Metabolismus als Nebenprodukt entstehen. Hingegen vermag ein Antioxidans wie Vitamin C die Oxidation von Stoffen zu unterbinden. Der Begriff oxidativer Stress wurde 1985 von Helmut Sies in der Publikation: „*Oxidative stress: Damage to intact cells and organs*“ geprägt. Damals überwiegt der schon in der Titelüberschrift ersichtliche negative Konsens über die Eigenschaften des oxidativen Stresses im Körper [12]. In den Jahren 1991 und 2007 wurde diese ursprüngliche Definition umgewandelt und erweitert. So heißt es heute: Oxidativer Stress wird als ein Gleichgewicht zwischen pro- und antioxidativen Prozessen im Körper gesehen, welches zu Gunsten der pro-oxidativen Prozesse verschoben ist. Dieses Ungleichgewicht zugunsten der Oxidantien kann zu Störungen im Redox-Signalling und zu einer schleichenden Überlastung des antioxidativen Systems führen. Zellstrukturen wie Proteine, Lipide und DNA werden geschädigt. Es folgen Funktionsstörungen, Entzündungen und auf Dauer chronische Krankheitsbilder. So äußert sich permanenter oxidativer Stress bspw. in vorzeitiger Hautalterung, trägt

aber auch zur Entstehung von Arteriosklerose, Diabetes oder Krebserkrankungen bei [13, 14, 15].

Reaktive Sauerstoffspezies sind eine der Ursachen und Vermittler von oxidativem Stress. Sie entstehen hauptsächlich als Nebenprodukt des aeroben Metabolismus, insbesondere bei der Zellatmung der Mitochondrien. Es handelt sich dabei um eine Gruppe stark reaktiver Oxidantien, die auf biomolekularer Ebene stark mit den Komponenten lebender Organismen reagieren [14, 18, 20]. Bei oxidativem Stress übersteigt die ROS-Konzentration die Kapazität der antioxidativen Abwehr. Dies wird erreicht durch eine gesteigerte ROS-Produktion und / oder eine gesenkte antioxidative Aktivität, welche den oxidativen Vorgängen entgegensteuert [15]. Ohne Ausgleich resultieren aus permanentem oxidativem Stress oxidativer Schaden [18].

Davon abzugrenzen ist der physiologische oxidative Stress (Eustress). Denn in niedrigen Konzentrationen haben ROS eine positive, die Zellen zur metabolischen Arbeit anregende Wirkung. Wenn die ROS-Konzentration steigt, adaptieren sich die Zellen, zunächst durch Steigerung der Proliferationsrate, Aktivierung von Signalkaskaden und Erhöhung der Produktion von Schutzproteinen gegen oxidativen Stress. Steigt die ROS-Konzentration über diesen stimulierenden Level hinaus, können die Abwehrmechanismen nicht länger den vollen Schutz leisten und erste Schäden auf molekularer Ebene treten auf. Bei Fortsetzung der ROS-Belastung wird die Zelle zunächst teilungsinaktiv und kann, wenn der angerichtete Schaden irreparabel ist, im Rahmen der Apoptose bzw. Nekrose absterben [14, 22].

Eine unverzichtbare Rolle in der Redox-Regulierung, Signalübertragung und normalen Zellfunktion spielt H_2O_2 , dem eine grundlegende second messenger- Funktion ähnlich wie ATP und Ca^{2+} zugeschrieben wird. [18, 21]. So diffundiert es in Zellen und Gewebe, um dort die Proliferation anzuregen, Immunzellen zu rekrutieren oder die Zellform abzuwandeln [21]. Außerdem verstärkt es die Bildung von proinflammatorischen Zytokinen und die Aktivierung des Nuklear Faktor kB -Signalweges [20]. Durch die Aktivität der ROS entstehen weiters eine Reihe elektrophiler Sekundärprodukte. Zu diesen gehören u.a. α -, β -ungesättigte Fettsäuren sowie ω -6- und ω -3-ungesättigte Fettsäuren [15]. Wie bei anderen sekundären Botenstoffen müssen auch H_2O_2 vermittelte Signale nach einer Reaktion auf einen Reiz wieder desensibilisiert werden. Der Körper erreicht dies einerseits durch antioxidative Abwehrmechanismen,

andererseits durch negative Rückkopplungsschleifen, welche die Produktion sowie den Auf- und Abbau der Proteinkomplexe in der Mitochondrienmembran hemmen [22].

2.3.1 Reaktive Sauerstoffspezies (ROS)

Unter diesem Begriff fasst man im weiteren Sinne Sauerstoff beinhaltende chemische Substanzen mit einer großen Elektrophilie und hoher Reaktionsbereitschaft zusammen [15, 20]. Dabei wird das bei den ROS-Molekülen vorherrschende Elektronendefizit bzw. eine starke Polarisierung durch eine kovalente Bindung mit einem Elektronenpaar eines Nukleophils ausgeglichen. Moleküle aus der Gruppe der ROS sind entweder ein Radikal mit einem ungepaarten Elektron im äußersten Orbital oder sie sind kein Radikal, besitzen aber aufgrund ihrer Struktur dennoch die Fähigkeit anderen Biomolekülen wie Proteinen, Lipiden oder Nukleinsäuren Elektronen zu entziehen. Für Letzteres ist Wasserstoffperoxid als Beispiel zu nennen. Dort sind die beiden Elektronenpaare der Sauerstoffe positiv polarisiert und daher stark elektrophil [15].

Eine gemeinsame Eigenschaft von Radikalen ist das Auslösen einer Kettenreaktion. Sobald ein Radikal seinen Elektronenhaushalt ausgeglichen hat, entsteht bei seinem Elektronendonator wiederum ein Elektronenmangel und damit erneut ein reaktionsfreudiges Radikal. Das Durchbrechen dieser Kette nur mit an die Radikale bindende und sie neutralisierende Antioxidantien möglich oder wenn zwei Radikale miteinander reagieren [18, 20].

Entgegen ihrer einigermaßen eindeutigen Bezeichnung ist die Gruppe der ROS in ihrer Zusammenstellung breiter gefächert als scheint. So fasst man unter dem Begriff ROS typische Vertreter wie das Superoxid-Anion-Radikal ($O_2^{\cdot-}$), das Hydroxyl-Radikal ($\cdot OH$), Singulett-Sauerstoff (1O_2), Wasserstoffperoxid (H_2O_2) und Ozon (O_3), aber auch RNS (reaktive Stickstoffspezies) wie Stickstoffmonoxid (NO) und Peroxynitrit ($ONOO^-$) sowie hypochlorige Säure (HOCl), ein RCS (Reaktive Chlorspezies), zusammen [15, 16]. Mit einer steady-state-Konzentration von 1-10 nM ist H_2O_2 das am häufigsten auftretende ROS-Molekül in den Zellen des Körpers [23].

2.3.1.1 Intrinsische Ursachen für ROS

Als aerober Organismus bildet der Körper selbst über enzymatische und nichtenzymatische Reaktionen ROS. Der primäre Ursprung von ROS liegt in der Elektronentransportkette der Mitochondrien; aber auch Peroxisomen, das endoplasmatische Retikulum und Enzyme wie Xanthin-Oxidasen, NADPH (Nicotinamid Adenin Dinucleotid Phosphat)-abhängige Oxidasen, entkoppelte endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthasen sowie CYP-450 Enzyme sind in der Lage ROS wie das stark reaktive Superoxid-Radikal Anion ($O_2^{\cdot-}$) zu bilden [18, 20]. Peroxisomen erzeugen durch die β -Oxidation von Fettsäuren und ihrer Flavin-Oxidase Aktivität zwar ROS, sie beseitigen es jedoch parallel durch den durch die Katalase vermittelten Abbau von H_2O_2 . Das endoplasmatische Retikulum (ER) besitzt allgemein ein oxidatives Milieu, welches die Ausbildung von Disulfidbrücken und die Faltung naszierender Proteine begünstigt. Bei einer falschen Faltung des Proteins und Auslösung einer Entfaltung wird im ER Stress ausgelöst. Dieser bewirkt wiederum eine verstärkte Redox-Signalling-Aktivität und Akkumulation von ROS [20, 24, 25].

Um die intrinsische Entstehung von ROS besser nachzuvollziehen, werfen wir zunächst einen genaueren Blick auf die Elektronentransportkette (Abbildung 4): die mitochondriale Elektronentransport- bzw. Atmungskette ist ein Multi-Enzym Komplex, welcher in der inneren Mitochondrien-membran verankert ist.

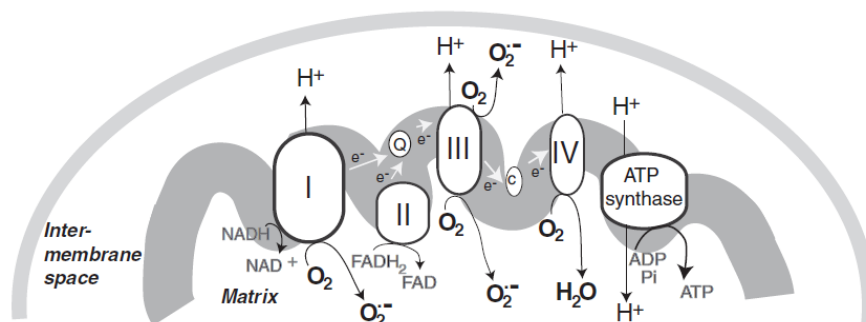


Abbildung 4: Die mitochondriale Elektronentransportkette mit den Stellen der Produktion von $O_2^{\cdot-}$, abgedruckt mit Genehmigung von Mary Ann Liebert, Inc.[19]

Bei der Zellatmung handelt es sich um eine fortlaufende Reduktionsreaktion, bei der die im Citratzyklus gebildeten Reduktionsäquivalente NADH und FADH₂ (Flavin Adenin Dinucleotid) je zwei Elektronen an den Komplexen I und II abgeben [19]. Diese Reaktion setzt Energie frei und läuft daher freiwillig ab [18]. Die gewonnenen

Elektronen werden weiter über Ubichinon-Carrier, Komplex III, Cytochrom C und schließlich Komplex IV geleitet. Von diesem werden sie auf Sauerstoff, dem Teil der Atmungskette mit dem höchsten Redoxpotential, transferiert. Dabei entsteht Wasser. An den transmembranären Komplexen I, III und IV wird parallel die freigewordene Energie genutzt, um die ebenfalls bei den Redoxreaktionen der Atmungskette freigesetzten Protonen von der Matrix in den Intermembranraum der Mitochondrien zu pumpen. Der entstandene Protonengradient stellt in weiterer Folge den Hauptantrieb für den transmembranären Komplex V, die ATP-Synthase, dar. Hier bewirkt der Rückfluss der Protonen in die Mitochondrienmatrix über Komplex V die Synthese von ATP aus ADP und anorganischem Phosphat [18, 19].

Konkret entstehen ROS jetzt an bis zu zwölf verschiedenen Stellen beim reversen Elektronentransfer in den Mitochondrien. Der größte Anteil wird bei der Aktivität von Komplex I und III freigesetzt [22]. Jedoch arbeitet das System der Zellatmung sehr effizient, denn nur etwa 2 % des in den Mitochondrien umgesetzten Sauerstoffs wird zum Superoxid-Radikal-Anion reduziert [19, 20].



Abbildung 5: Lewis-Formel von O₂^{•-}, abgedruckt unter CC BY 4.0 Open Access [18]

Wie in der Lewis-Formel in Abbildung 5 ersichtlich, enthält O₂ ursprünglich sieben Elektronen in seiner äußersten Valenzschale. Nach Aufnahme eines Elektrons komplettiert einer der beiden Sauerstoffe sein äußerstes Orbital durch Bildung eines Elektronenpaares, das zweite Orbital bleibt weiter unvollständig. Das Superoxid-Anion-Radikal hat daher eine Ladung von -1 [18]. O₂^{•-} ist hoch reaktiv und reagiert rasch weiter, um andere ROS-Spezies zu bilden. So ist eine Reaktion mit anderen Radikalen wie NO[•] möglich, um Peroxynitrit zu bilden, ein seinerseits wieder starkes RNS. Aber auch eine Protonierung des negativ geladenen O₂^{•-} ist möglich, damit das Hydroxyl-Radikal (•OH) entsteht. •OH ist u.a. ein Unterstützer von oxidativen Prozessen an Membranlipiden und Proteinen. Der Großteil des entstandenen O₂^{•-} reagiert jedoch spontan oder unter der Einwirkung der Superoxid-Dismutase weiter zu H₂O₂. Neben diesen nichtenzymatischen Quellen kann H₂O₂ im Körper auch aus der

Enzymaktivität von Xanthin oder NADPH abhängigen Oxidasen sowie der endothelialen Stickoxidsynthase oder metabolischen Enzymen aus der Familie der Cyclooxygenasen, Lipoxygenasen oder Cytochrom P450 Enzymen entstammen [19, 20]. Diese und weitere intrazelluläre Ursachen für einen erhöhten ROS-Spiegel sind in Abbildung 6 illustriert.

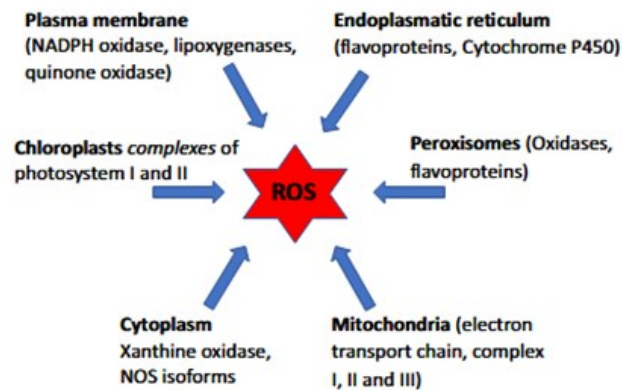


Abbildung 6: Hauptquellen der intrazellulären ROS-Produktion, abgedruckt unter CC BY 4.0 Open Access [24]

Die intrinsische Bildung von ROS schreitet schneller voran, wenn zur gleichen Zeit Induktoren im Körper vorliegen. So sind eine Unterversorgung der Mitochondrien mit Sauerstoff, falsches Falten der Proteine im ER, sowie die aktivierten Onkogene und der gesteigerte Metabolismus in Krebszellen für eine gesteigerte Produktion von ROS in kürzerer Zeit verantwortlich. Intrazelluläre Gegenspieler im Gleichgewicht eines optimalen oxidativen Zellstatus sind diverse Radikalfänger wie Glutathion, NADPH, diätetische Antioxidantien wie Vitamin C und E sowie die Aktivierung des NRF2 und von Tumor-Suppressor-Genen wie BRCA 1 (Breast Cancer gene 1) oder p53 (Abbildung 7) [20].

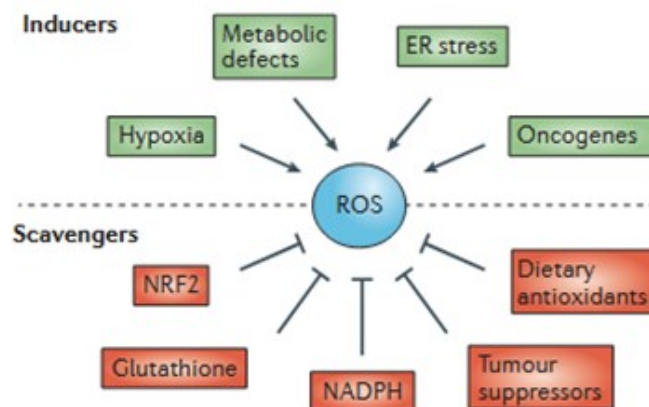


Abbildung 7: Intrazelluläre Radikalinduktoren und -fänger, abgedruckt mit Genehmigung von Springer Nature [20]

2.3.1.2 Extrinsische Ursachen für ROS

Neben der stetigen intrinsischen Entstehung können auch äußere Einflüsse die Generierung von ROS im Körper fördern. Prominente Vertreter sind energiereiche Strahlung wie ionisierende und UV-Strahlung. Weiters unterstützt der Konsum von Alkohol, Tabakprodukten, geräucherte Fleischwaren sowie die Einnahme bestimmter Arzneimittel und die vorhandene Luftschadstoff Konzentration die Formation von ROS [24, 27].

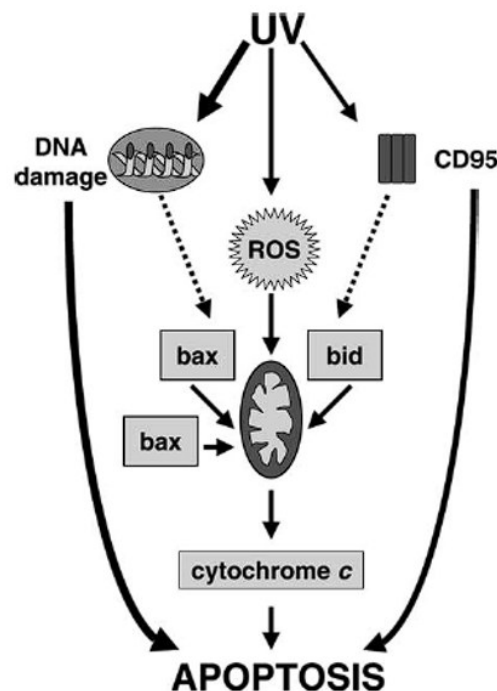


Abbildung 8: Signaltransduktionswege der UV induzierten Apoptose. UV-Strahlung schädigt nukleäre DNA, aktiviert Todes Rezeptoren (wie CD95) und induziert die Bildung von ROS, abgedruckt mit Genehmigung von Elsevier [30]

Von all diesen ist UV-Strahlung jener extrinsische Faktor, der unsere Haut am häufigsten belastet. Die Überexposition führt zur Entstehung von geschädigten Zellen in der Epidermis; flächig wird dieses Ereignis als Sonnenbrand bezeichnet. Die meist irreversibel geschädigten Zellen leiten die Apoptose ein, um das Risiko einer malignen Weiterentwicklung im Keim zu ersticken und damit das umliegende Gewebe zu schützen. Abbildung 8 zeigt die grundsätzlichen Targets der UV-Strahlung und jene Signalkaskaden, welche in Gang gesetzt werden, um die Apoptose der betroffenen Zelle zu erwirken [30, 31]. Damit UV-Strahlung eine Wirkung in der Zelle haben kann,

wird ein Chromophor benötigt, das die Strahlung absorbiert und in ein biochemisches Signal umwandelt. In den meisten Fällen wird dieses Chromophor durch die genomische DNA gestellt, aber auch eine Interaktion mit Todesrezeptoren ist möglich. Dies führt zu einem starken Stressanstieg der Zelle, aktiviert das Immunsystem und kann bei Beständigkeit die Apoptose der Zelle auslösen. UV-Strahlung kann die Apoptose der Zelle über drei Wege herbeiführen. Einerseits durch Aktivierung des extrinsischen Weges über den GD95/Fas-Todesrezeptor, weiters den hauptsächlich durch DNA-Schäden ausgelösten intrinsischen Weg durch die Freisetzung von Cytochrom C aus den Mitochondrien und schließlich durch die beschleunigte Bildung von ROS [30, 34].

2.3.1.3 Photoaging

Im Gegensatz zum chronologischen Altern versteht man unter Photoaging einen durch übermäßige UV-Exposition beschleunigten Alterungsprozess der Haut.

Beim chronologischen Altern sind Prozesse wie die Atrophie der Epidermisschichten, die Reduktion der Zahl der Fibroblasten sowie eine Verminderung der Komponenten der extrazellulären Matrix wesentlich. Zu letzterem gehört der erhöhte Abbau der Kollagenfasern durch Metalloproteinasen, die Reduktion von Elastin-Fasern sowie Glycosamino- und Proteoglykanen dazu. Gesammelt führen diese Vorgänge zum typisch klinischen Bild einer gealterten Haut mit Falten, Sprödigkeit und Verlust der Elastizität [34]. Auf molekularer Ebene betrachtet, verzeichnet man bei gealterter Haut allgemein geschädigte Mitochondrien, Deletionen von Basenpaaren in mitochondrialer DNA sowie hohe ROS-Konzentrationen und oxidativer Stress in Dermis und Epidermis [32].

Photoaging hingegen tritt nur auf sonnenexponierten Zonen der Haut wie Gesicht, Nacken, Dekolleté und Händen auf. Ihr Erscheinungsbild ist ebenfalls von tiefen Falten geprägt, jedoch erscheint die Haut dicker, ledriger und mit einer ungleichmäßigen Pigmentierung. Die auf der Erde eintreffende UV-Strahlung der Sonne setzt sich zu 5 % aus UVB und zu 95 % aus UVA-Strahlung zusammen. Die Wellenlänge der UV-Strahlung bestimmt die Eindringtiefe in die Haut, so reichen UVB-Wellen nur bis in die Epidermis, langwellige UVA-Wellen können jedoch weiter in die Dermis vordringen. Beide Arten verursachen grundsätzlich Schäden in der Haut. Allerdings agiert die energiereichere UVB-Strahlung schneller und intensiver als die UVA-Strahlung bei der

Interaktion mit molekularen Chromophoren in den Zellen. Besonders wichtige Targets der UV-Strahlung sind nukleäre und mitochondriale DNA sowie Proteine, die dadurch modifiziert und in ihrer Funktion eingeschränkt werden. Mit höherer Expression von Metalloproteinasen, Abbau von Kollagen, Elastin und Glykoprotein sowie die Fragmentierung des bestehenden Kollagens sind die sonstigen ausgelösten Prozesse jenen des normalen chronologischen Alterns ähnlich, laufen aber in einer höheren Geschwindigkeit ab [32, 33, 34].

Dauerhafte UV-Exposition steigert die Melaninproduktion, welche eigentlich bei einem normalen chronologischen Alterungsprozess pro Dekade um 10-20 % ihres Ursprungswerts gesenkt wird. Melanin, ein photoprotektives Pigment, schützt die Hautzellen vor UV-Strahlung durch Absorption dieser. Die dafür hochgefahrte Melanogenese ist selbst pro oxidativ und steigert intrinsische ROS-Level innerhalb der betroffenen Zellen, was wiederum bedeutet, dass jene anfällig für oxidativen Stress sind. Weiters kann bei fortlaufender UV-Exposition das hergestellte Melanin weiter oxidieren, wodurch nicht nur der Schutz vor UV-Strahlung, sondern parallel auch die ROS-Konzentration in den Zellen weiter ansteigt [32].

Ein nicht zu vernachlässigender Teil der Sonneneinstrahlung ist Infrarot-Licht. Mit etwa 54 % stellt es den Hauptteil an der gesamten auf der Erde einfallenden Solarenergie dar. Infrarot schließt Wellenlängen von 780 nm bis 1 mm ein [31]. Man geht davon aus, dass zumindest Anteile der Infrarot-Strahlung bis in das subkutane Fettgewebe vordringen [127]. Im Gegensatz zu ultraviolettem Licht kann Infrarot allein keine malignen Zellveränderungen bewirken, jedoch modifiziert es die Wirkung der UV-Strahlung im Körper. So wurde in Studien mit humanen epidermalen Melanozyten gezeigt, dass die gleichzeitige Bestrahlung der Zellen mit UV und IR zu einem signifikanten Rückgang der durch UV ausgelösten Apoptose führt. Weiters hemmt IR die durch UV ausgelöste Hochregulierung der Expression von CD95/Fas Rezeptoren und damit auch die Aktivierung von Caspase 8, einem Schlüsselenzym des extrinsischen Weges der Apoptose [31].

2.3.1.4 Schäden durch ROS

Die größten Mengen ROS werden in den Mitochondrien im Zuge der oxidativen Phosphorylierung von ADP und organischem Phosphat zu ATP gebildet. Die dabei genutzte Elektronentransportkette transferiert Elektronen entlang eines Redox-Potenzial Gefälles von einem Intermembrankomplex zum Nächsten und gibt schlussendlich die Elektronen an Sauerstoff als finalen Akzeptor ab. Ein kleiner Anteil Elektronen geht in diesem Transfer aus dem System der inneren Mitochondrienmembran verloren und reagiert mit O₂ zum Superoxid-Radikal-Anion. Die intrinsisch gebildeten ROS sowie extrinsische Faktoren, welche die Entstehung von ROS fördern, bringen das Gleichgewicht zwischen oxidativen und antioxidativen Prozessen zunehmend aus dem Lot. Die Zellen können sich jedoch eine gewisse Zeit an den erhöhten oxidativen Stress in Form von höherer Proliferation oder Steigerung ihrer antioxidativen Abwehrmechanismen anpassen [14, 18, 27].

Auf zellulärer Ebene bewirkt der gesteigerte oxidative Stress zunächst reversible, bei längerer Dauer irreversible Schädigungen der Makromoleküle (Abbildung 9), Membranen und Organellen der Zelle. Grundsätzlich wirkt anhaltender ROS destruktiv auf DNA bzw. RNA durch oxidative Veränderungen an Nukleotid-Basen. Weiters werden ungesättigte Fettsäuren oxidiert und Proteine können irreversibel oxidativ carbonyliert werden. Damit geht beiderseits ein Funktionsverlust einher [18, 28].

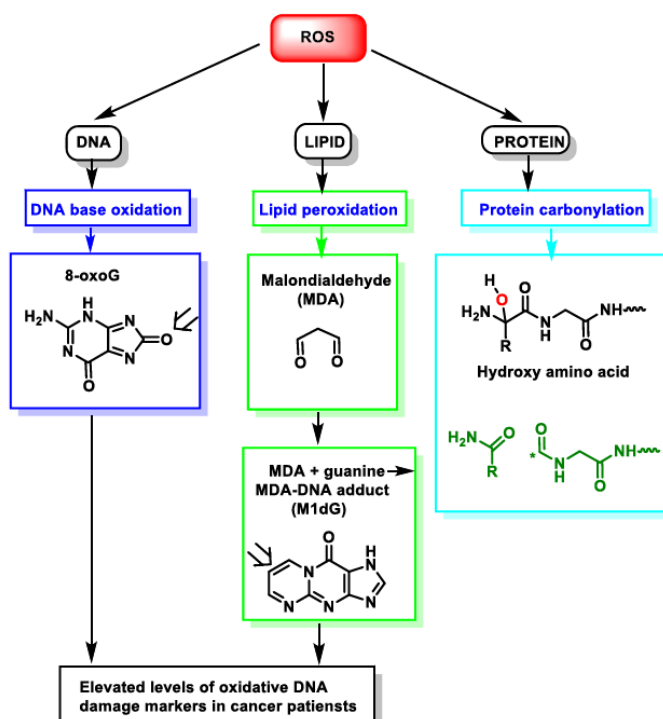


Abbildung 9: ROS-Schäden auf biomolekularer Ebene, abgedruckt unter CC BY 4.0 Open Access [18]

Die Signalübertragung wird zunehmend gestört und eine Reihe metabolischer Veränderungen treten auf. So kommt es durch die Beschädigung der Mitochondrien zu einer verringerten Leistung und damit niedrigeren ATP-Konzentrationen. Parallel ist die Glykolyse durch die Hemmung des Schlüsselenzyms Glycerol-3-phosphat-Dehydrogenase ebenfalls eingeschränkt. Weitere kaskadenartige Folgen des erhöhten oxidativen Stresses in der Zelle sind u.a. die Erhöhung der zytoplasmatischen Ca^{2+} Konzentration aufgrund deaktivierter Calciumpumpen. Eine Depolarisation der Zellmembran, welche durch eine Deaktivierung der essenziellen K^+ , Ca^{2+} und Na^+ Ionenkanäle bedingt ist, bewirkt eine gesteigerte Durchlässigkeit der Zellmembran und eine Verringerung des Glutathion-Spiegels in der Zelle. Parallel steigt die Konzentration von oxidiertem Glutathion in der Zelle, welche wiederum dafür sorgt, dass mehr ATP verbraucht wird, um es aktiv aus der Zelle zu pumpen [28].

Rund 70 % der trockenen Zellmasse wird durch Proteine gestellt. Zudem reagieren sie stark und schnell mit Oxidantien. Es ist daher nicht weiter verwunderlich, dass Proteine sehr empfindlich gegenüber oxidativem Stress sind und dadurch leicht modifiziert werden können. Die häufigste durch oxidativen Stress hervorgerufene Veränderung an Proteinstrukturen ist die Dehydrierung. Dabei wird ein Wasserstoffatom aus der Valenz mit einem Kohlenstoff, Stickstoff, Sauerstoff oder Schwefelatom gespalten. Zurück bleibt ein Radikal mit einem aus der ursprünglichen Bindung abgeleiteten Zentralatom. Diese Radikale reagieren gerne und rasch mit O_2 , da die O_2 -Konzentration in Relation zur Radikaldichte bei oxidativem Stress jedoch trotzdem gering ist, kommt es gehäuft auch zur Dimerisierung der Radikale. Dabei wurde beobachtet, dass reine Kohlenwasserstoffradikale schneller zu Dimeren führen als Heteroatomradikale, was aber auch aus dem Umstand hergeleitet werden kann, dass jene Radikale häufiger auftreten als andere [29].

Neben den Proteinen ist hauptsächlich die mitochondriale DNA von der schädlichen Einwirkung des oxidativen Stresses betroffen. So beobachtete man in Studien, dass die spontane Entfernung von bis zu 5000 Basenpaaren aus der mitochondrialen DNA bei sonnenexponierten Hautarealen zehnmal so häufig aufgetreten ist, wie in sonnengeschützten Bereichen der Haut [32]. Diese wird bspw. als direkte Modifikation in Form der Ausbildung von Dimeren aus Pyrimidinbasen zwischen den beiden DNA-Strängen durchgeführt. Ebenfalls möglich ist das Auslösen von oxidativem Stress,

welcher indirekt zu DNA-Schäden führt. So werden dadurch u.a. Guaninbasen zu 8-Oxo-7,8-Dihydroguanin-Derivaten oxidiert [33, 34].

Permanenter oxidativer Stress wird je nach Anpassungsfähigkeit der Zelle sowie Verfügbarkeit der entsprechenden Gegenmaßnahmen, wie z.B. Antioxidantien, früher oder später zu ihrer Seneszenz oder Apoptose führen. Zu den stärksten Induktoren für Apoptose gehören die durch UV-Strahlung hervorgerufenen Schäden in der DNA, welche die Hauptursache für die Aktivierung der Caspase 9, dem Schlüsselenzym des intrinsischen Weges der Apoptose, sind. UV-Strahlung kann die Apoptose neben diesem auch via extrinsischen Weg durch Hochregulierung der Expression von CD95/Fas Rezeptoren auslösen. Weiters kann sie eine Mehrproduktion von ROS bewirken, welche die bereits vorhandenen pro-oxidativen Belastungen und Schäden der Zelle weiter verschärft [31].

2.4 Antioxidantien

Unter einem Antioxidans versteht man eine Substanz, welche mit einem Oxidans reagiert, um dessen Reaktionsfähigkeit mit Zielstrukturen zu unterbinden. Wie bereits besprochen besitzen ROS in moderaten Konzentrationen unverzichtbare Aufgaben für die Homöostase, darunter die Signaltransduktion und die Abwehr von Krankheitserregern. Jedoch schützt sich der Körper vor übermäßiger und damit potenziell schädlicher Oxidantienaktivität mit einem ausgeklügelten antioxidativen System aus intern hergestellten und extern zugeführten Antioxidantien [35, 40]. Zu den Funktionen der Antioxidantien zählen u.a. die Hemmung der ROS-Produktion, das Abfangen freier Radikale, die Umwandlung von ROS in weniger schädliche Komponenten sowie die Unterbrechung von oxidativ bedingten Kettenreaktionen [39].

Man unterscheidet zwischen enzymatischen, nicht-enzymatischen und diätetisch zugeführten Antioxidantien [41]. Der Vollständigkeit halber sind synthetisch hergestellte Antioxidantien als Lebensmittelzusatzstoff zu erwähnen, deren primäre Aufgabe jedoch im Erhalt der Verzehrbarekeit von Nahrungsmitteln liegt, ohne deren Geschmack oder Nährwert negativ zu beeinflussen [35].

2.4.1 Enzymatische Antioxidantien

Antioxidative Enzyme bedienen sich eines mehrstufigen Prozesses, um aus schädlichen oxidativen Substraten zunächst H_2O_2 und schließlich H_2O herzustellen. Ihre Aktivität ist im physiologischen Zustand direkt proportional zur Konzentration der ROS im Körper. Eine Abweichung der Enzymkonzentrationen aus dem Normbereich kann erste Auskunft über Probleme im Gleichgewicht zwischen oxidativen und antioxidativen Prozessen geben. So fungieren niedrige Enzymkonzentrationen neben einer gleichzeitig erhöhten ROS-Konzentration im Körper als Biomarker für ein geschwächtes antioxidatives Abwehrsystem [35, 36]. Enzyme des antioxidativen Systems besitzen zudem Reparaturkapazitäten. Sie können den durch ROS angerichteten Schaden an DNA, Proteinen oder Zellmembranen bis zu einem gewissen Grad beseitigen und schützen gleichzeitig vor neuen Schäden durch die Reduktion von Peroxiden und Abstoppen von oxidativen Kettenreaktionen [41].

Zu den wichtigsten antioxidativen Enzymen des Körpers gehört die Glutathion-Peroxidase, die Katalase sowie die Superoxid-Dismutase. Die Glutathion-Peroxidase, vorwiegend in Mitochondrien und Cytoplasma ansässig, katalysiert die Reduktion von zellschädigenden Peroxiden wie H_2O_2 und Lipid Peroxiden in H_2O und Lipid-Alkohole. Parallel wird hierbei Glutathion zu Glutathion-Disulfid oxidiert. Um die Glutathion-Konzentration wieder zu erhöhen, wird eine ausreichende Aktivität der Glutathion-Reduktase benötigt. Diese ist wiederum auf das Reduktionsäquivalent NADPH angewiesen. Die Glutathion Reduktase oxidiert NADPH zu NADP^+ , gleichzeitig wird Glutathion-Disulfid zu Glutathion reduziert, um wieder für die Entgiftung von Peroxiden bereitzustehen. Die Glucose-6-phosphat Dehydrogenase ist ein weiteres unverzichtbares Enzym, da es das oxidierte NADP^+ als die reduzierte NADPH Form regeneriert [35, 39].

Der Superoxid-Dismutase (SOD) kommt eine direkte Rolle in der Prävention von oxidativ bedingten Zellschäden zu. Als eine der stärksten intrazellulären Antioxidantien ist sie imstande die hoch reaktiven Superoxid-Radikal Anionen zu disproportionieren. Es entstehen O_2 und H_2O_2 , letzteres wird weiter über die Glutathion-Peroxidase oder die Katalase zu H_2O reduziert [36, 40].

Für die reguläre Aktivität der antioxidativen Enzyme ist die ausreichende Präsenz von bestimmten Kofaktoren wie Selen, Kupfer, Magnesium und Zink, auch als antioxidative

Mineralien bezeichnet, unerlässlich [36]. Von der SOD existieren vier Isoformen, die man anhand ihrer Lokation und verwendeten Kofaktoren einteilt. So nutzt SOD1 im Zytosol Zink und Kupfer, SOD2 in den Mitochondrien Magnesium und SOD3 im Extrazellulärraum wiederum Zink und Kupfer als Kofaktoren für eine ordnungsgemäße Funktion [35, 39].

2.4.2 Endogene nicht enzymatische Antioxidantien

Neben den Enzymatischen bildet der Körper eine Reihe nicht enzymatischer Antioxidantien. Sie zeichnen sich durch ihre Fähigkeit aus, freie Radikale und Oxidantien, insbesondere ROS, zu inaktivieren. Ebenfalls können sie oxidativ getriebene Kettenreaktionen unterbrechen, nicht jedoch können sie direkt oxidative Schäden reparieren [36, 41]. Im Gegensatz zu Enzymen werden nicht enzymatische Antioxidantien bei Reaktion mit ROS verbraucht und müssen ersetzt werden. Dies kann durch ihre Neusynthese oder durch die Recyclingaktivität von Enzymen, wie schon bei Glutathion beschrieben, gelingen [40].

Typische Vertreter der nicht enzymatischen Antioxidantien finden sich als extra- und intrazelluläre Proteine ubiquitär im Körper (Abbildung 10). Neben small molecules wie Glutathion, Coenzym Q₁₀, Harnsäure, Bilirubin und Melatonin gibt es metallbindende Proteine (MBP) wie Albumin, Ceruloplasmin, Ferritin, Transferrin und Myoglobin. MBP sind die Hauptakteure der antioxidativen Kapazität im Blutplasma. Hervorzuheben ist ihre Eigenschaft, die stark redoxaktiven freien Eisen- und Kupfer-Ionen im Blut oder Gewebe zu binden und aus dem Gleichgewicht der Fenton-Reaktion (Abbildung 11) zu entfernen. Bei dieser Reaktion reagiert Fe^{2+} mit H_2O_2 zu Fe^{3+} und $\cdot\text{OH}$. Das Hydroxylradikal ist ein wesentlich stärkeres ROS als H_2O_2 , welches bei erhöhtem oxidativem Stress, gesenkter MBP-Konzentration aber auch im Rahmen einer Hämochromatose verstärkt hergestellt wird. Durch das vorzeitige Binden von Fe^{2+} an MBP wird der H_2O_2 Spiegel im Plasma bzw. im Gewebe und die Neusynthese starker ROS gesenkt [40, 41].

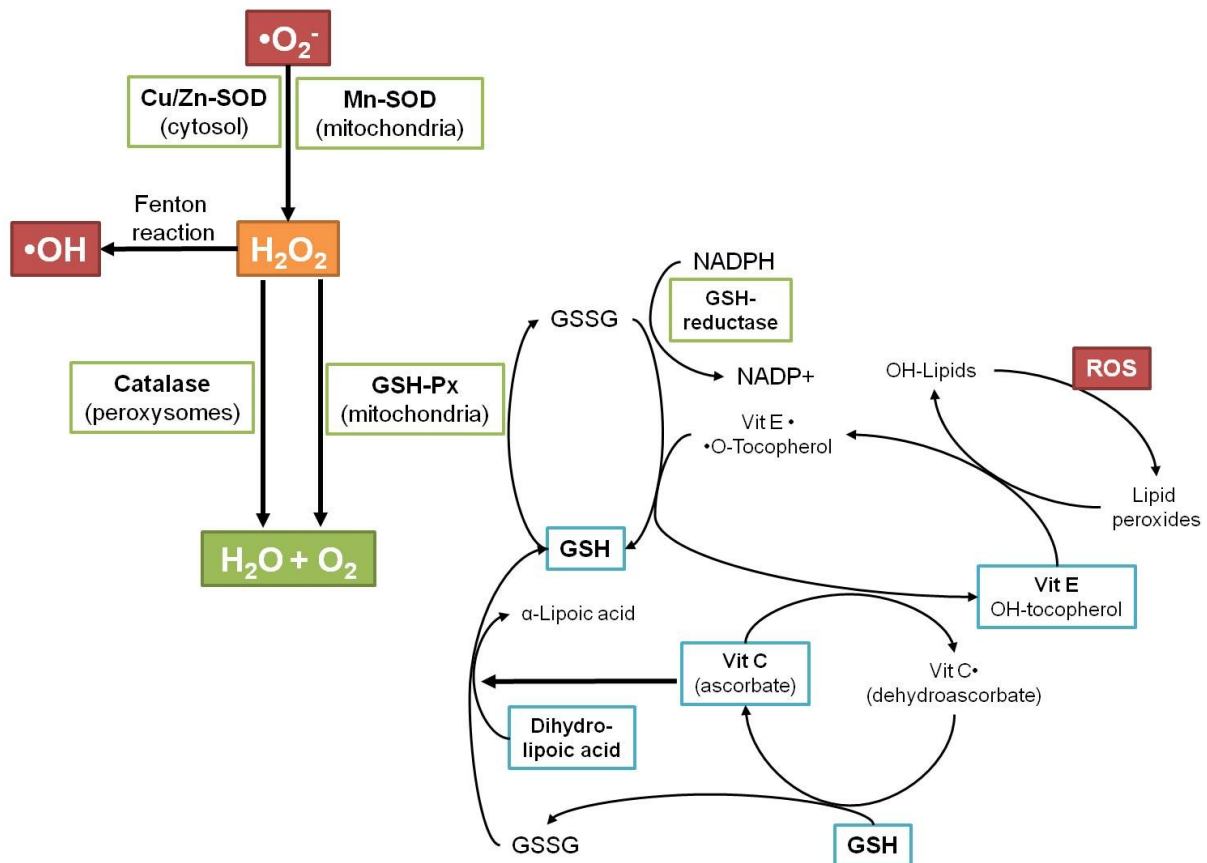


Abbildung 10: Übersicht der Signalkaskaden nicht enzymatischer Antioxidantien, abgedruckt unter CC BY 3.0 Open Access [97]

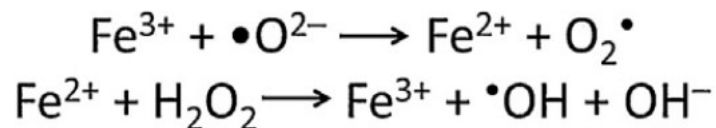


Abbildung 11: Fenton-Reaktion, abgedruckt mit Genehmigung von Elsevier [41]

Albumin hat neben seiner Aufgabe der Regulation des osmotischen Drucks zusätzlich aufgrund des hohen Anteiles an Aminosäuren mit Schwefel in der Struktur, die Eigenschaft eines Antioxidans. Methionin und Cystein agieren als Radikalfänger für zahlreiche ROS. Die auf der Proteinoberfläche exponierten -SCH₃ oder -SH Gruppen bieten einen direkten Angriffspunkt für ROS und schützen das gesamte Protein vor den schädlichen Einwirkungen. So oxidiert bspw. das Schwefelatom von Methionin unter Einwirkung von H₂O₂ zum Sulfoxid und H₂O₂ wird parallel zu H₂O reduziert. Um die ursprüngliche antioxidative Abwehr wiederherzustellen, ist eine Reduktion vom

Sulfoxid zur Thiolgruppe unter Verbrauch von NADPH, das zu NADP⁺ oxidiert wird, notwendig (Abbildung 12) [40, 41, 42].

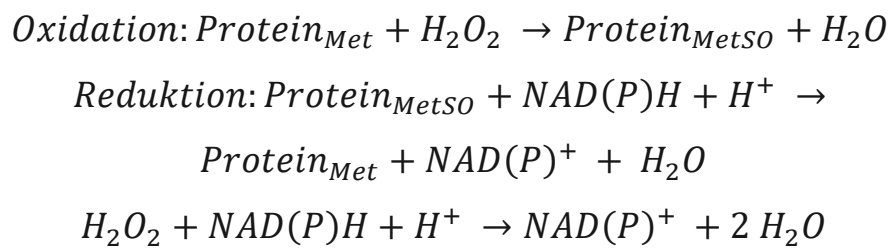


Abbildung 12: Reaktion von Methionin mit der reaktiven Sauerstoffspezies H₂O₂

Sowohl Ubiquinol (CoQ₁₀H₂) als auch das um ein Wasserstoff-Atom ärmere Ubisemiquinon (CoQ₁₀H), beides reduzierte Formen des Coenzym Q₁₀, führen antioxidative Arbeiten aus. Dazu wird die Übertragung von Wasserstoff auf freie Radikale genutzt, um deren Bindungen abzusättigen und dadurch ihren Beitrag zur ROS-Belastung zu senken.

Das bereits beschriebene Glutathion fungiert nicht nur als Reduktionsmittel bei der Glutathion Peroxidase, sondern besitzt auch selbst antioxidative Eigenschaften. Durch seine Tripeptid-Struktur aus Glycin, Cystein und Glutaminsäure ist es gut wasserlöslich und im Körper mit Konzentrationen von bis zu 10 mM sowohl in Zytoplasmen, in Zellkernen als auch in den Mitochondrien omnipräsent. Mit der Thiolgruppe im Cysteinteil ist es Glutathion, wie auch schon den MBP, möglich Radikale abzufangen und Metallionen, wie Fe³⁺, zu komplexieren [41].

2.4.3 Exogene Antioxidantien

Antioxidantien werden auch in der Natur und vor allem in Pflanzen gebildet. Als sekundäre Inhaltsstoffe werden sie verstärkt bei Stressbedingungen wie Klimaveränderungen oder Befall mit Krankheitserregern hergestellt. Durch den Verzehr von pflanzlichen Lebensmitteln gelangen diese Phytoantioxidantien in den menschlichen Körper, wo sie sowohl vor als auch nach ihrer Resorption ebenfalls antioxidative Wirkungen zeigen. Die Gruppe der Polyphenole ist mit ihrer Strukturvielfalt am häufigsten vertreten und wird zusammen mit anderen repräsentativen Beispielen in dieser Arbeit näher beleuchtet [47, 50].

2.4.3.1 Polyphenole

Polyphenole zählen zu den häufigsten Bestandteilen unserer Ernährung. Sie sind in einer Reihe von frischen und wenig verarbeiteten Lebensmitteln zu finden, darunter Beeren, Zitrusfrüchte, Spinat, Grünkohl, Hafer, Tee, Kaffee aber auch Rotwein. Den Polyphenolen wird ein breites Spektrum an Eigenschaften zugeschrieben, welche Auswirkungen auf diverse, insbesondere chronisch und inflammatorisch geprägte Krankheitsbilder haben können. So mildern Polyphenole nicht nur effektiv oxidativen Stress, sondern sind zudem imstande die Produktion pro-inflammatorischer Zytokine und deren Signaltransduktionswege zu hemmen, was bspw. die Progression von Atherosklerose, Übergewicht und Diabetes mellitus Typ 2 verlangsamt. Polyphenole modulieren zudem den Stoffwechsel der Adipozyten, regulieren die Lipidhomöostase durch Minimierung der LDL-Oxidation und Steigerung der HDL Cholesterin Synthese. Sie zeigen auch Ansätze gegen Karzinogenese, dies umfasst die potenzielle Modulation des Zellzyklus mit Induktion der Apoptose und Hemmung der Tumorangiogenese [50, 64]. Einige Humanstudien unterstützen diese zunächst *in vitro* beobachteten Hypothesen und besagen, dass Polyphenole das Mortalitätsrisiko senken sowie die Pathogenese von Diabetes, kardiovaskulären Erkrankungen und auch Krebserkrankungen verlangsamen [45, 47, 60, 61]. Diese Korrelationen sind jedoch nicht in allen bisher durchgeführten Studien mit phenolischen Komponenten aus Pflanzen nachweisbar bzw. oft nicht mit einem signifikanten Unterschied zu keiner Polyphenolbehandlung assoziiert [62, 63]. Ein Überangebot, insbesondere bei Einnahme konzentrierter Einzelsubstanzen hat das Potenzial zu gegenteiligen Effekten mit einer Erhöhung des oxidativen Stresslevels im Körper [14, 45, 47, 50].

Polyphenole sind eine sehr heterogene Strukturgruppe. Als zentrales Element teilen sich alle Vertreter dieser Gruppe mindestens einen aromatischen Ring, der mindestens eine Alkoholgruppe trägt, jedoch ist die sonstige Ausführung in die Peripherie sehr unterschiedlich [50]. Abbildung 13 zeigt einen Überblick über die Strukturvielfalt.

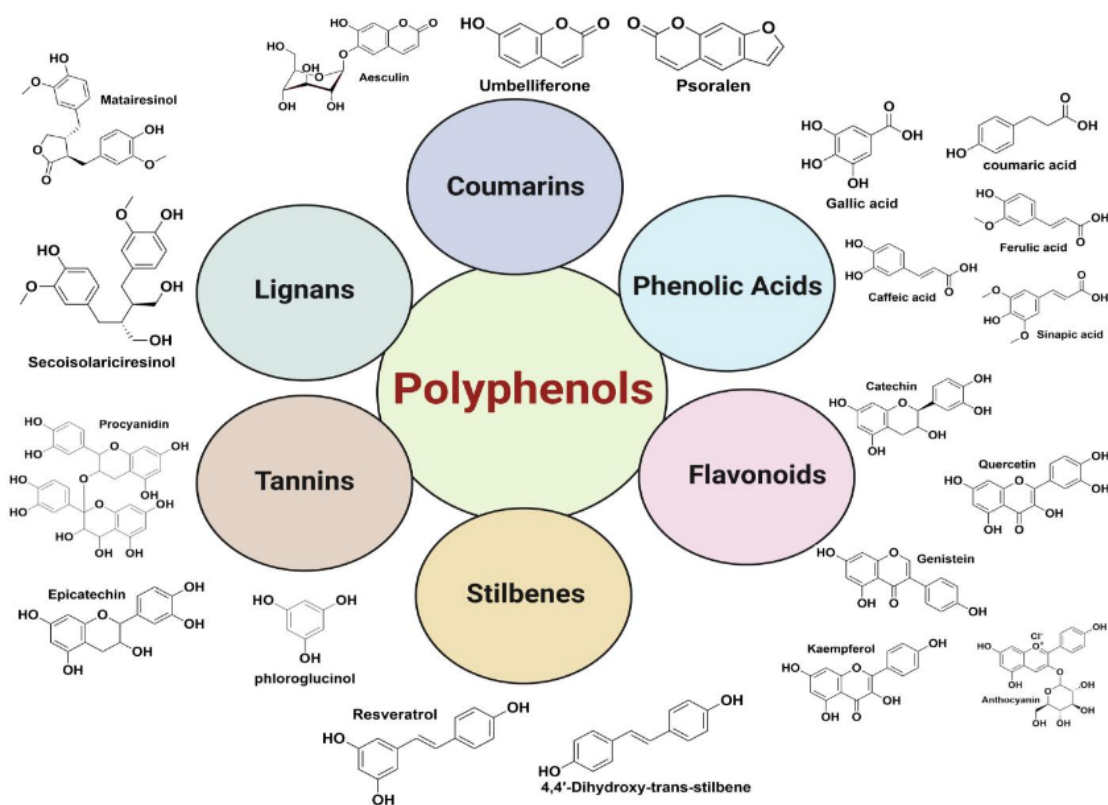


Abbildung 13: Strukturübersicht der Polyphenole, abgedruckt unter CC BY 4.0 Open Access [50]

2.4.3.2 Flavonoide

Eine ubiquitär in der Flora auftretende Polyphenolgruppe sind die Flavonoide. Laut Literatur gibt es 8000-10000 Flavonoide, wobei nur ein kleiner Bruchteil davon in den meisten Pflanzen in der bevorzugt glykosylierten Variante vertreten ist [49, 51, 52]. Das Flavonoid-Grundgerüst besteht aus 15 Kohlenstoffatomen, die in drei Ringen (A, B, C) in bestimmter Weise angeordnet sind (Abbildung 14).

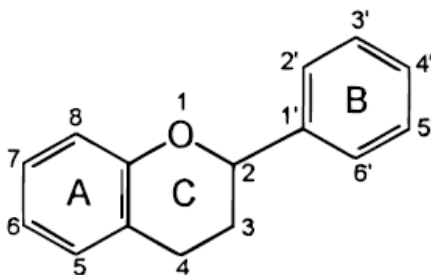


Abbildung 14: Basisstruktur eines Flavonoids, abgedruckt mit Genehmigung von American Chemical Society [49]

Zu ihren Aufgaben innerhalb der Pflanze gehören die Katalyse der Photosynthese, die Regulation an der Phosphorylierung beteiligter Eisenkanäle sowie das Binden und Abfangen freier Radikale, welche bei der photosynthetischen Elektronentransportkette oder in Stressbedingungen anfallen. Das Anlocken von Insekten zur Pollenbestäubung ist aufgrund ihrer strukturbedingten Färbung ebenfalls möglich [49].

2.4.3.3 Vitamin C

Vitamin C oder Ascorbinsäure ist eine gut wasserlösliche, thermolabile organische Verbindung mit der Summenformel $C_6H_8O_6$. Chemische Besonderheit hinsichtlich seiner Azidität erlangt die Struktur durch ihren fünfgliedrigen Laktonring, in dem ein Endiol eingebaut ist. Eine Alkoholgruppe ist mesomeriestabilisiert und strukturbedingt bei physiologischem pH-Wert so azid wie eine Carbonsäure und gibt daher leicht ihr Proton ab. Die Ascorbinsäure liegt in unserem Körper daher gehäuft als Ascorbat-Anion, ein Radikal, vor. Da es jedoch durch die Keto-Enol-Tautomerie stabilisiert ist, wird die negative Ladung über den ganzen Laktonring delokalisiert. Damit ist es im Vergleich zu anderen Radikalen im Körper deutlich weniger aggressiv und langlebiger. Folgende Reaktionsmechanismen sind in Abbildung 15 illustriert: in Gegenwart eines zweiten Ascorbat-Anion-Radikals oder eines stärkeren ROS, wie z.B. des Superoxid-Anion-Radikals, werden die Ascorbat-Anion-Radikale weiter zu Dehydroascorbinsäure (DHA) oxidiert. Radikale, die diese Reaktion eingehen, werden aus dem Gleichgewicht entfernt, für zuletzt genanntes Beispiel bedeutet dies, dass $O_2^{\cdot -}$ zu H_2O_2 reduziert wird. Über körpereigene Peroxidasen kann gebildetes H_2O_2 weiter zu H_2O reduziert werden [43,44]. Wenn das Ascorbat-Anion-Radikal nicht mit einem anderen Radikal reagiert, um selbst zu DHA oxidiert zu werden, ist eine Reduktion über die Ascorbat-Radikal Reduktase (ARR) möglich, die sowohl aus Ascorbat-Anion-Radikalen aber auch aus DHA wieder Ascorbinsäure / Ascorbat unter Verbrauch von NADPH generiert.

GSSG, NAD(P)⁺ → 2GSH, NAD(P)H



schlechterer Absorption anfälliger für einen Vitamin-Mangel. Ein Lebensstil, der von Rauchen oder Alkoholkonsum geprägt ist, erhöht das Level an oxidativem Stress im Körper und fordert die Gegenwehr der Antioxidantien zusätzlich [43].

Die von 1992 bis 2002 durchgeführte EPIC-Studie, bei der eine gesunde Kohorte aus rund 40.000 Menschen von 29 bis 69 Jahren teilnahm, kam zum Schluss, dass der tägliche Verzehr von mind. 250 g Gemüse und 300 g Früchten zu einer signifikanten Senkung der Sterblichkeit führt. Für Früchte und Wurzelgemüse bestand zudem eine Dosis-Wirkungsbeziehung. Als Begründung für diesen Schluss wird die gesamte antioxidative Kapazität der Studienernährung angesehen mit ihrem hohen Anteil an Antioxidantien wie Vitamin C, Vitamin A Carotinoide und Lycopin. Dennoch konnte keiner Einzelsubstanz die Senkung der Mortalität per se zugeordnet werden [48].

Eine Meta-Analyse untersuchte insgesamt 69 prospektive Studien zur Auswirkung der Antioxidantien Vitamin C, Vitamin E und Vitamin A-Carotinoiden auf Gesundheitsrisiken. Dabei wurde sowohl die in Lebensmitteln gebundene verzehrte Menge als auch die Blutkonzentrationen dieser Antioxidantien in StudienteilnehmerInnen ermittelt. Allgemein wurde festgestellt, dass ein hoher Obst- und Gemüsekonsum mit einem geringeren Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen, Krebserkrankungen und einer gesenkten Gesamtmortalität assoziiert ist. Jedoch ist hinsichtlich Dosis-Wirkungsbeziehung zu erwähnen, dass Antioxidantien die Risiken der Erkrankungen zwar senken, sehr niedrige und sehr hohe Mengen an Reinsubstanzen aber keinen wesentlichen Vorteil liefern. Die Empfehlung von höherer antioxidativer Einnahmegilt daher nicht für Arznei- und Nahrungsergänzungsmittel [45].

Vitamin C wirkt in sehr hohen Dosen pro-oxidativ und wird aktuell in Studien als intravenöse Zusatztherapie hinsichtlich gesteigerter Verträglichkeit von Chemotherapie bei Prostatakarzinom untersucht. Die Ergebnisse sind widersprüchlich: so kommt eine Phase II-Studie mit Docetaxel plus hochdosiertem intravenös appliziertem Vitamin C (1 g/kg zweimal wöchentlich) zu keinem signifikanten Vorteil im Vergleich zur reinen Chemotherapie [55]. Hingegen zeigt eine andere Phase II-Studie mit Gemcitabin und Paclitaxel plus hochdosiertes Vitamin C (75 g dreimal wöchentlich) eine Verbesserung des Überlebens bei gleichbleibender oder verbesserter Lebensqualität und Sicherheit der Chemotherapie [54].

2.4.3.4 *Hypericum perforatum* L.

In dieser Arbeit wurde *Hypericum perforatum*-Extrakt (Johanniskraut-Extrakt, HYP) als pflanzliche Referenz zur besseren Einschätzung des antioxidativen Potenzials von KRG-Extrakt eingesetzt. Echtes Johanniskraut ist heutzutage nur noch selten in Europa und im westasiatischen Bereich wildvorkommend. Der hohe Bedarf wird wie auch beim Ginseng durch angelegte Kulturen gedeckt, die sich bei HYP v.a. in Mittel- und Osteuropa befinden [26]. Die ausdauernde, mehrjährige Pflanze besitzt eine Wuchshöhe von 20-100 cm und länglich elliptische Blätter, dessen Ränder und Flächen mit durchscheinenden Öldrüsen und vereinzelt mit dunklen Hyperizinbehältern gesäumt ist. Zu seinen wesentlichen Inhaltsstoffen zählen Quercetinglykoside wie Hyperosid, Quercetin und Rutosid, weiters Naphtodianthrone wie Hyperizin und Pseudohyperizin und Phloroglucine, wozu Hyperforin und Adhyperforin zählen. Die Naphtodianthrone besitzen durch ihren mesomeriestabilisierten Aufbau eine intensive Färbung und sind charakteristische Farbgeber für die makroskopisch gut erkennbaren Hyperizinbehälter [78, 79].

Als Phytopharmakon ist HYP als mildes Antidepressivum zur Behandlung leichter bis mittelschwerer Depressionen im Einsatz. Für diese Wirkung wird eine Summe von noch nicht im Detail bekannten Einzelwirkungen, sprich der Gesamtextrakt, herangezogen. Ging man kurz nach der Entdeckung des antidepressiven Effekts vom Johanniskraut noch davon aus, dass die Hyperizine und ihre Hemmung der Monoaminoxidase hauptverantwortlich für die Wirkung sind, sieht man heute vorwiegend die Hemmung der Wiederaufnahme der Neurotransmitter Serotonin, Noradrenalin, Dopamin, GABA und L-Glutamat durch Hyperforin und andere Bestandteile. Aus einer Humanstudie mit 147 Patienten ging hervor, dass sich ein Hyperforin-Gehalt von 5 % positiv hinsichtlich der antidepressiven Wirkung im Vergleich zu einem Hyperforin-Gehalt von nur 0,5 % zeigt [78, 116].

In Tiermodellen wurde weiters eine wundheilungsfördernde sowie entzündungshemmende Wirkung für Johanniskraut nachgewiesen. Eine kürzlich durchgeführte Tierstudie zeigte, dass der in einem Hydrogel eingebettete Callus-Extrakt von HYP neben einem ausgeprägten antibakteriellen Effekt auch die Migration der Fibroblasten sowie die Reepithelialisierung fördert. Zusätzlich präsent ist eine antiphlogistische und antioxidative Wirkung, v.a. durch die enthaltenen Flavonoide [78, 117]. In einer *in vitro*-Studie konnte in humanem Vollblut die hemmende Wirkung

von Hyperforin auf die Prostaglandin - Synthese bzw. dessen Umwandlung aus Prostaglandin H₂ gezeigt werden. Hyperforin hatte allerdings weder einen Effekt auf die Aktivität der Enzymfamilie der Cyclooxygenasen noch auf andere Prostaglandine und Thromboxane [118].

In dieser Arbeit kam der getrocknete Extrakt von *Hypericum perforatum* L. zum Einsatz. Der freundlicherweise von Apomedica Pharmazeutische Produkte GmbH (Graz, Österreich) bereitgestellte Trockenextrakt (Ch. Nr.: 15044) wurde nach Ph. Eu. 11.0 mit 60 % (v/v) Ethanol und DEV (Droge-Extrakt Verhältnis) 3,5-6:1 hergestellt, wobei mindestens 0,1-0,3 % (w/w) Hypericine enthalten sind [136].

2.5 Panax ginseng C.A. Meyer

2.5.1 Herkunft und Beschreibung

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Extrakte der Pflanze *Panax ginseng* auf Zellen appliziert. Die mehrjährige Staudenpflanze wächst wild in den gebirgigen Wäldern Ostasiens, u.a. in der Mandschurei, Nordkorea und entlang der südlichen Ostküste Russlands, jedoch ist sie auch in diesen Ursprungsregionen sehr selten anzutreffen [4, 26, 72]. Handels- und Arzneiware stammt hauptsächlich aus in Südkorea und China angelegten Kulturen. Die Kultivierung erfordert viel Zeit und intensive Pflege, u.a. darf in der Erde seit mindestens zehn Jahren kein Ginseng gewachsen sein, da sonst Wurzelfäule entstehen kann. Weiters muss man die Pflanzen permanent künstlich beschatten und vor direkter Sonneneinstrahlung schützen, da wilder Ginseng auch nur im Halbschatten gedeiht. Nach einer langen Wuchszeit von vier bis sieben Jahren werden sie mit einer Länge zwischen 8-20 cm und einer Dicke von zwei cm geerntet. Dünne Enden, sog. „slender tails“, werden von der Wurzel abgetrennt, um die Ganzdroge mit weniger Verzweigungen zu erhalten. Die abgeschnittenen Teile werden separat vermarktet [4, 16, 26, 79].

Als eine der ältesten Heilpflanzen Asiens steht Ginseng schon seit 200 vor Christus in der TCM für Gesundheit und ein langes Leben. Bevor er in Kulturen angelegt wurde, war Ginseng aufgrund seiner langen Wuchsdauer und seltenen Fundorten wertvoller als Gold und seine Verwendung dem Adel vorbehalten. Im 17. Jahrhundert kam Ginseng durch die Seefahrt nach Europa, erlebte dort aber erst im 20. Jahrhundert eine breitere Bekanntheit [10, 16, 77, 78].

Der volle botanische Name des Ginsengs lautet „*Panax ginseng* C.A.Meyer“ und geht zurück auf den deutsch-russischen Botaniker und Pharmazeuten Carl Anton von Meyer, der *Panax ginseng* und drei weitere Arten 1842 in einer Publikation erstmals beschrieben und in Abbildungen gezeichnet hat [82]. Der Gattungsname *Panax* wird aus dem Griechischen hergeleitet und setzt sich aus den Wörtern „pan“ = alles und „axos“ = Heilmittel zusammen [83]. In Mandarin bezeichnet man die ganze Pflanze *Panax ginseng* als auch die arzneilich genutzte Wurzel Ginseng radix mit dem Wort Rénshēn (人參), das übersetzt Menschenkraut oder gegabelte Wurzel bedeutet [80, 81].

Panax ginseng (= Echter Ginseng, Koreanischer Ginseng) gehört zur Familie der Araliaceae und ist eine Staude die etwa 60-80 cm hoch wird. Sie besitzt einen kahlen runden Stängel mit drei bis vier Verzweigungen auf dessen Enden wiederum vier bis fünf handförmig angeordnete Blätter sitzen. In der Blütezeit von Juni bis Juli blühen ein bis drei Doldenblütenstände mit jeweils 15-30 zwittrigen Blüten. Nach Befruchtung entwickeln sich aus dem unterständigen Fruchtknoten scharlachrot glänzende Steinfrüchte mit je zwei Samen in Form von erbsengroßen Kugeln (siehe Abbildung 16) [4, 26, 79].

Der hauptsächlich verwendete Teil der Pflanze ist die Wurzel, *Ginseng radix*. Aufgrund ihres äußeren stark anthropomorphen Erscheinungsbildes bezeichnet man diese auch als „Menschenwurzel“. Der Glaube besagt, dass je älter die Pflanze und je stärker anthropomorph die Wurzel, umso wertvoller und wirksamer ist sie. Diese Similarität gekoppelt mit der Singularität machen Ginseng seit Jahrtausenden zum Sinnbild für Lebenskraft und Vitalität und seit jeher wird er als Adaptogen zur Unterstützung und Kräftigung des Körpers bei Müdigkeits- und Schwächegefühl sowie Leistungs- und Konzentrationsabfall eingesetzt [4, 10, 79].



Abbildung 16: Spross mit Fruchtstand des *Panax Ginseng* C.A.Meyer, abgedruckt mit Genehmigung von Springer Nature [128]

2.5.2 Weißer, Roter und Schwarzer Ginseng

Unter der Art *Panax ginseng* gibt es abgeleitete Unterarten, welche sich im Hinblick der Weiterverarbeitung der Wurzel in Morphologie und Inhaltstoffen stark unterscheiden. Abbildung 17 zeigt einen detaillierten Überblick über diese Unterarten, die sich im Kern nur in der Verarbeitungsart und ihrer enthaltenen Inhaltsstoffe voneinander unterscheiden. Beim weißen Ginseng wird die frisch geerntete und gewaschene Wurzel vom hellbraunen Kork befreit, mit SO₂ gebleicht und anschließend durch Sonneneinstrahlung bzw. bei 100-200 °C getrocknet. Durch die Schälung gehen sämtliche Anteile der in der Rinde befindlichen Inhaltsstoffe verloren. Roter Ginseng entsteht aus frisch geernteten, ungeschälten und gewaschenen Ginsengwurzeln, welche in Bambuskörben einer Dampfsterilisation bei 100-130 °C für zwei bis drei Stunden unterzogen und danach getrocknet werden. Die Trocknung erfolgt zunächst im Trockenschrank bei 50 °C, gefolgt von vier bis fünf Tagen Sontrocknung. Schlussendlich beträgt der Wassergehalt in der roten Ginsengwurzel noch 15 %. Im Prozess des Dämpfens und des Trocknens karamellisieren die in der Wurzel enthaltenen Zucker und geben eine kräftig rote Farbe. An der Wurzel anhaftende Mikroorganismen werden effektiv abgetötet, jedoch verändert sich die Komposition der Inhaltsstoffe [4, 10, 84, 89]. Schwarzer Ginseng wiederum erfährt nicht nur einen, sondern bis zu neun Zyklen der Bedampfung mit Wasserdampf bei 100 °C für je zwei bis drei Stunden. Die Trockenzeiten dazwischen variieren je nach Hersteller. Durch das mehrmalige Ausführen des Dämpfens fällt die auch beim roten Ginseng

ablaufende Maillard-Reaktion intensiver aus und das Inhaltsstoffspektrum verändert sich im Vergleich zum weißen und roten Ginseng [84,91]. Nach Ph.Eu. 11.0 sind nur der weiße und der rote Ginseng als getrocknete Wurzeln offizinell [9].

In dieser Arbeit kam der traditionelle rote koreanische Ginseng (KRG) als Trockenextrakt zum Einsatz. Der freundlicherweise von der KGV Korea Ginseng Vertriebs GmbH bereitgestellte Rote Ginsengwurzel Trockenextrakt (Ch. Nr.: 23008216 // 14.12.2023) wurde nach Ph. Eu. 11.0 mit 60 % (v/v) Ethanol und DEV 3 - 4:1 hergestellt, wobei mindestens 4 % (w/w) Ginsenoside enthalten sind [86, 87].

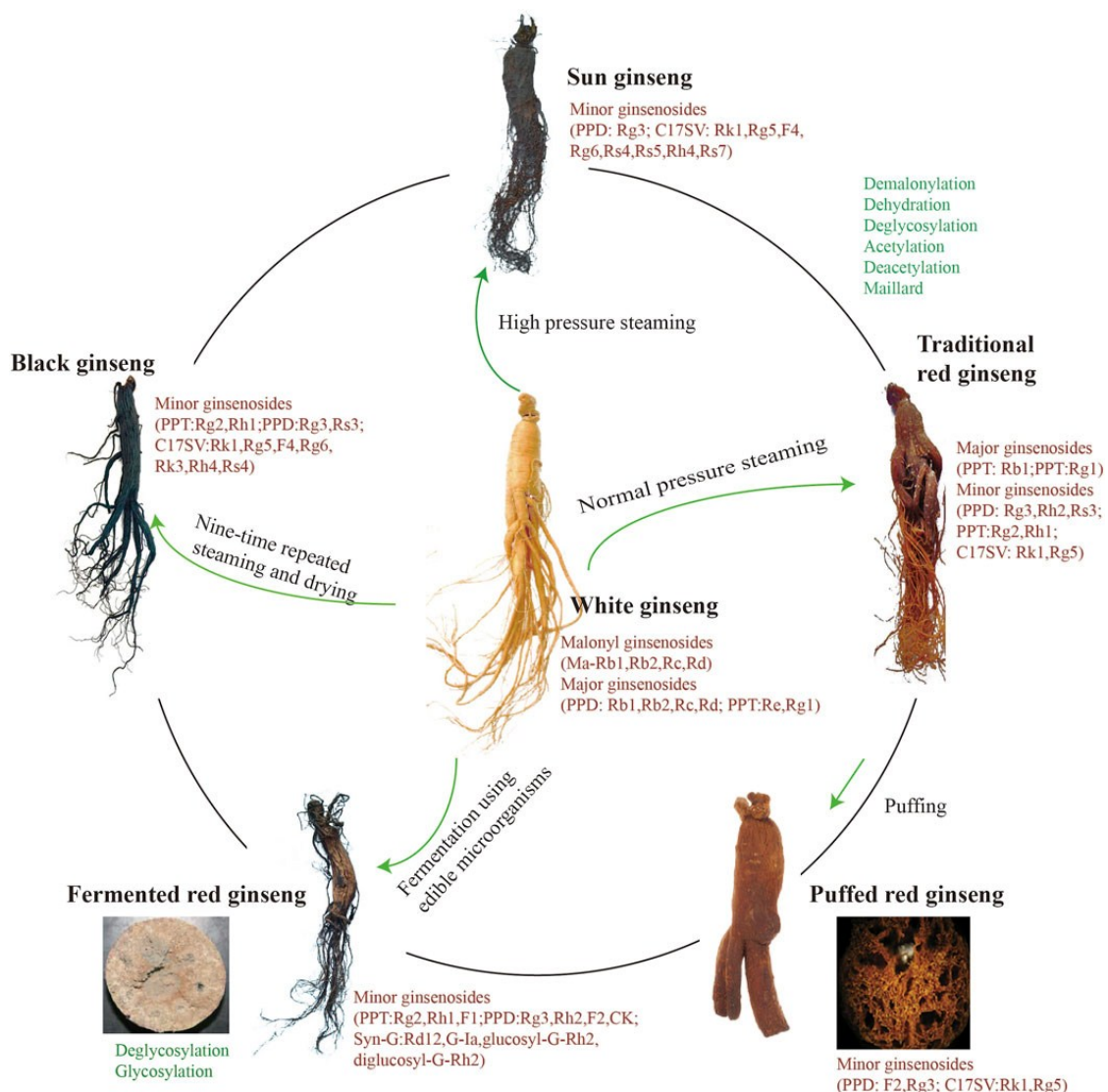


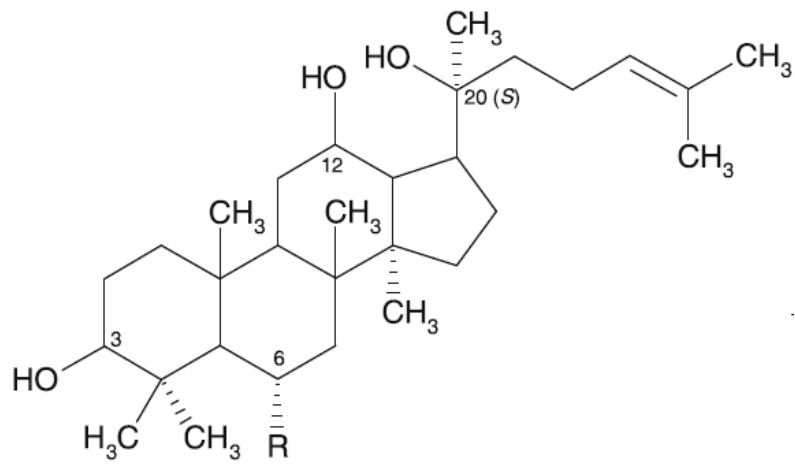
Abbildung 17: Weiße Ginsengwurzel und die durch verschiedene Herstellungsmechaniken erreichten Unterarten, jeweils mit Angabe der enthaltenen Ginsenoside, abgedruckt unter CC BY 4.0 Open Access [129]

2.5.3 Ginseng radix Ph.Eur.: Inhaltsstoffe

Als Speicherorgan der Pflanze ist die Ginsengwurzel reich an Inhaltsstoffen, allen voran die Ginsenoside als charakteristische Hauptvertreter. Dabei handelt es sich vorwiegend um Triterpensaponine vom tetrazyklischen Dammaran-Typ, die bisdesmosidisch verknüpft sind [4, 10]. Saponine sind eine Strukturklasse, bei denen die Vertreter immer einen apolaren Aglykonanteil und einen polaren Glykosidanteil besitzen. Das Aglykon wird durch ein Steroid- oder ein polyzyklisches Triterpengrundgerüst verkörpert, das Glykosid besteht aus einem oder mehreren Zuckerresten, die an einer oder mehreren Stellen am Aglykon gebunden sind. Man spricht von monodesmosidischen Saponinen bei einer gebundenen Zuckerkette und von bisdesmosidischen Saponinen, wenn zwei Zuckerketten vorliegen, die an unterschiedlichen Positionen des Aglykons gebunden sind. Aufgrund ihres amphiphilen Aufbaus weisen Saponine eine Oberflächenaktivität auf, die es ihnen ermöglicht Membranen zu schädigen und in Reaktion mit Wasser stabile Schäume zu bilden. Viele Saponine bilden mit Cholesterol Komplexe und sind zudem auch noch in hoher Verdünnung hämolytisch aktiv [4, 88].

Die wichtigsten Ableger der mit bis zu 4 % in der Ginsengwurzel vorkommenden Triterpensaponine sind das in Abbildung 18 dargestellte (20S) Protopanaxadiol und das (20S) Protopanaxatriol, wobei sich letzteres strukturell nur in der zusätzlichen Hydroxylgruppe am C-6 unterscheidet.

Die Bezeichnung der rund 50 bekannten Ginsenoside mit Buchstaben erfolgt anhand ihrer steigenden R_f-Werte bzw. sinkender Polarität bei der Auftrennung mittels Dünnschichtchromatographie. Untergestellte Zahlen unterscheiden dann weiter bei kleinen Abwandlungen im Glykosidmuster bei der gleichen Struktur [89, 130]. Zu den Protopanaxadiolen gehören u.a. Ginsenosid Ra1, Ra2, Rb1, Rb2, Rc und Rd, zu den Protopanaxatriolen zählen u.a. Ginsenosid Rg1, Rg2, Re, Rh und Rf. In Abbildung 19 und 20 sind Rg1 und Rb1 dargestellt, ausgehend vom selben Grundgerüst sind nur die Substitutionen mit Zuckerketten verschieden und Rg1 trägt als Protopanaxatriol eine dritte OH-Gruppe am C-6 [91].



Protopanaxadiol (R = H)
Protopanaxatriol (R = OH)

Abbildung 18: Strukturen von (20S) Protopanaxadiol und (20S) Protopanaxatriol, zugrunde liegt ein Triterpensaponin vom Dammaran-Typ, abgedruckt mit Genehmigung von Springer Nature [4]

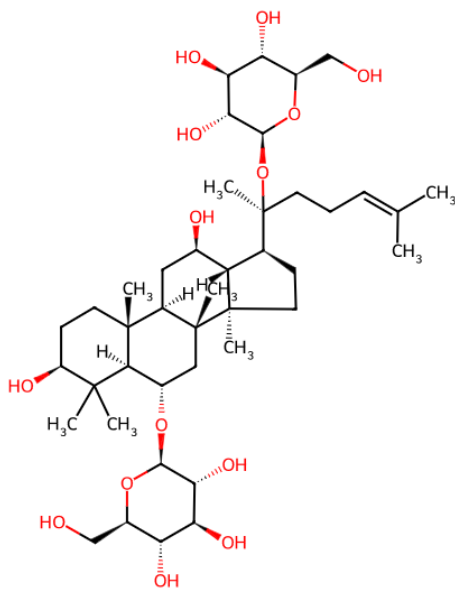


Abbildung 19: Struktur von Ginsenosid Rg1

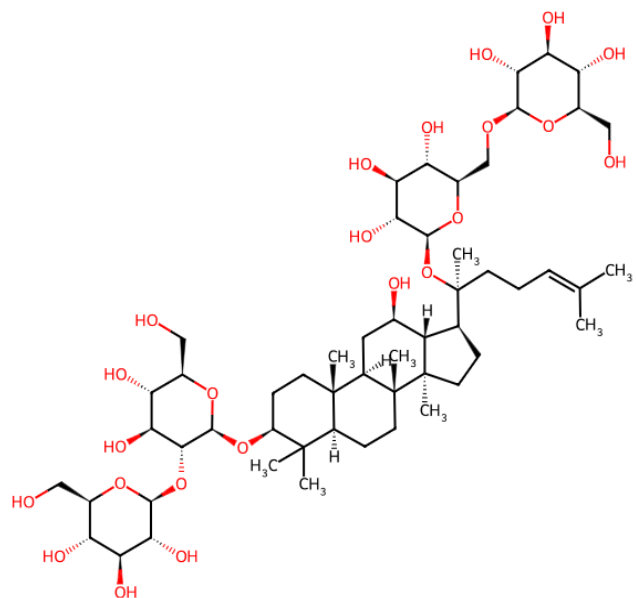


Abbildung 20: Struktur von Ginsenosid Rb1

Der Gehalt der Ginsenoside nimmt mit dem Alter der Wurzel zu und da sich Protopanaxadiole bevorzugt in der Rhizodermis anlagern, besitzen diese Ginsenoside höhere Konzentrationen in den bei der Verarbeitung entfernten dünnen Haarwurzeln als in der Hauptwurzel. Protopanaxatriole sind hingegen gleichmäßig auf das Wurzelwerk aufgeteilt [4, 26, 89]. Nach Ph.Eur.11.0 müssen in der Rohwurzel mindestens 0,4 % und nach zehnfacher Anreicherung im Trockenextrakt mindestens 4 % Ginsenoside, berechnet als Ginsenosid Rb1, enthalten sein [9, 86]. Durch die Hitzebehandlung zur Herstellung von schwarzem Ginseng werden die enthaltenen Ginsenoside im großen Stil in neue Formen umgewandelt. So sinkt mit der Dauer der Präsenz der erhöhten Temperatur die Konzentration an natürlichen Ginsenosiden wie Rg1, Re, Rf und sämtlichen malonierten Strukturen wie Rb1, Rb2 und Rc zusehends, während jene der neuen transformierten Ginsenoside wie Rg2, Rg6, Rh1 und Rs4 stetig steigt.

Eine HPLC-ELSD Auswertung (Abbildung 21) zeigt, dass sich die Ginsenosidspektren von weißem (B) und rotem (C) Ginseng sehr ähnlich sind. Zu beobachten ist ein leichter Anstieg der Ginsenosidarten beim roten Ginseng (12,13,16,17), der durch die Exposition gegenüber erhöhten Temperaturen und Druck bei der Dampfsterilisation bedingt ist. Bei anhaltender thermischer Belastung wie beim schwarzen Ginseng (D) geht die Konzentration der natürlichen Ginsenoside, die im weißen Ginseng (B) enthalten sind, wieder zurück, jedoch erhöht sich dennoch die Gesamtmenge an Ginsenosiden durch die vermehrte Bildung von transformierten Formen (8-19) [89, 90, 91].

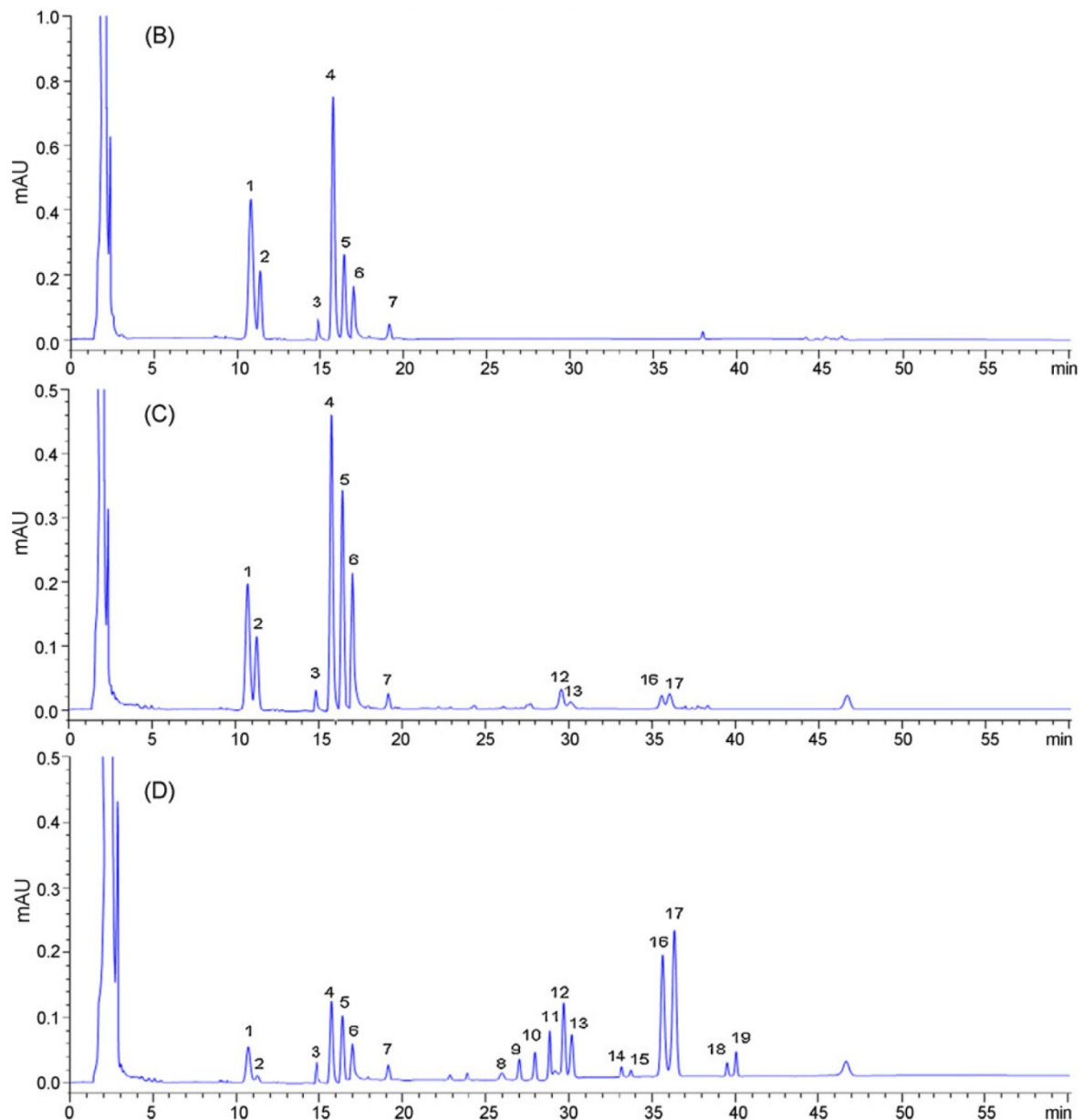


Abbildung 21: HPLC-ELSD-Chromatogramme von Ginsenosiden in koreanischem weißem Ginseng (B), rotem Ginseng (C) und schwarzem Ginseng (D) Peaks: 1, Rg1; 2, Re; 3, Rf; 4, Rb1; 5, Rc; 6, Rb2; 7, Rd; 8, Rg6; 9, F4; 10, Rk3; 11, Rh4; 12 und 13, 20(S)- und 20(R)-Rg3; 14 und 15, 20(S)- und 20(R)-Rs3; 16, Rk1; 17, Rg5; 18, Rs5; 19, Rs4. Die genaue Durchführung ist andernorts beschrieben, abgedruckt mit Genehmigung von Elsevier [90]

Neben den Ginsenosiden enthält Ginseng noch weitere charakteristische Inhaltsstoffe. Zu diesen gehören lipophile Polyacetylene (Kettenlänge C17) mit den Vertretern Panaxytriol, Panaxydol und Panaxynol sowie ätherisches Öl. Die Sesquiterpene Eremophilen, β -Elemen und weitere Terpenoide tragen zur typischen Duftnote der Wurzel bei, gehen aber bei der Dampfsterilisation größtenteils verloren [4, 10].

2.5.4 Biologische Effekte von Ginsengextrakt bei oraler Anwendung

Hinter der Zuschreibung des Allheilmittels aus Asien stecken einige in mehreren Studien belegte Wirkungen. Es folgt daher ein Überblick aus Meta-Analysen, wobei meist der Gesamtextrakt aus der Haupt- und Nebenwurzel zur Anwendung kommt.

Zunächst gibt es Evidenz bezüglich antioxidativer Effekte. So zeigt eine 2023 erstellte Meta-Analyse, dass die Einnahme von Ginseng über eine Woche hinweg die Biomarker des oxidativen Stresses positiv verändert. Ginseng reduzierte die Serum-Konzentration von Malondialdehyd, ein Marker für die Lipidperoxidation. Parallel stieg die gesamte antioxidative Kapazität, besonders Werte der SOD, Glutathion und Glutathion-Reduktase signifikant [96].

Ginseng kann weiters bei Krebserkrankungen die Lebensqualität verbessern sowie die Müdigkeit mildern. Aus einer Meta-Analyse von sieben randomisierten kontrollierten klinischen Studien geht hervor, dass Ginseng eine moderate Reduktion der Krebs bedingten Müdigkeit (Cancer Related Fatigue, CRF) bewirkt, weiters gibt es eine positive Auswirkung auf das körperliche wie emotionale Wohlbefinden [102]. Verschiedene zwischen 2010 und 2018 durchgeführte klinische Studien bestätigen die Wirkung von den zwei am häufigsten vorkommenden Ginsengarten (*Panax quinquefolius* & *Panax ginseng*) bezüglich der Milderung der Symptomatik von CRF [103].

Eine 2020 durchgeführte Meta-Analyse kommt zum vagen Schluss, dass die Einnahme von Ginseng einen unterstützenden Effekt bei saisonalen Infektionen des oberen Respirationstraktes haben kann, insbesondere als Zusatz bei einer parallel verabreichten Influenza-Impfung. Jedoch sind durch die kleinen Populationen bei den Studien keine Schlüsse mit Sicherheit möglich [99]. In Tier- und *in vitro*- Modellen konnte man bereits mehrfach eine Steigerung der Immunabwehr durch Ginseng feststellen. So verstärkt Ginseng die Lymphozyten Proliferation, die systemische wie schleimhautspezifischen Antikörperkonzentrationen und steigert die virale Clearance in der Lunge. Ginseng mildert weiters die Expression von proinflammatorischen Zytokinen und aktiviert parallel Phagozyten und natürliche Killerzellen [100]. In einer 2022 durchgeführten 24-wöchigen placebokontrollierten Studie wurde an 350 Probanden der Effekt von KRG auf die Konzentration der Antikörpertiter nach Verabreichung der zweiten bzw. dritten COVID-19 Impfdosis untersucht. Die

Bildungsrate der Antikörper in der KRG-Gruppe blieb 12 Wochen nach der zweiten Dosis höher als die der Kontrollgruppe, insbesondere ist dieser Effekt bei Personen über 50 Jahren zu beobachten [101].

Ginseng hat auch eine positive Wirkung auf die Verbesserung des Gedächtnisses, insbesondere im Bereich des visuellen und in manchen Studien auch im Bereich des verbalen Gedächtnisses. So konnte in einer täglichen Behandlung mit 450 mg Ginseng-Extrakt aus Ginsengsprossen über 12 Wochen gezeigt werden, dass Probanden (Alter 55-75 mit SCI) im Vergleich zu einer äquivalenten Placebogruppe signifikante Verbesserungen bei RCFT (Rey Complex Figure Test) und SVLT (Shiraz Verbal Learning Test) zeigen. Dabei handelt es sich um Testungen um das visuelle und verbale Gedächtnis unmittelbar nach Zeigen eines Bildes bzw. Aussprechen eines Wortes und nach 20-30 Minuten zu selbigem Bild / Wort zu testen [95].

Wichtig zu erwähnen ist, dass bei einer Behandlung mit Ginseng sonstige kognitive Verbesserungen wie Aufmerksamkeit, Exekutivfunktionen bzw. der Erhalt kognitiver Funktionen bei Morbus Alzheimer Patienten gegen Placebo gänzlich ausbleiben. Ebenso steigt die visuelle Gedächtnisleistung nur bei einer Alterskohorte über 60 Jahren signifikant an und dies auch nur dann, wenn eine entsprechend hohe Dosis verabreicht wird (450 mg/d) [93]. Andere Studien zeigen wiederum, dass die verbale Gedächtnisleistung nicht, wohl aber die visuelle Gedächtnisleistung bei der Einnahme von 3 g Ginseng täglich über 6 Monate signifikant verbessert wird [94].

Als wichtiges Fazit ist zu ziehen, dass Ginseng keine Therapie mit Arzneimitteln ersetzen kann und auch nicht bei schweren Krankheitsbildern die Ursache bekämpft, sondern vorwiegend Begleitsymptome lindert. So hilft bspw. Ginseng bei der Symptomatik von mild oder subjective cognitive impairment, kann aber nicht das Fortschreiten von Morbus Alzheimer verlangsamen. Ginseng wurde in den meisten klinischen Studien überwiegend gut vertragen und gilt als sicher in der Anwendung bei gesunden Patienten bei einer kurzfristigen Einnahme von bis zu 12 Wochen.

2.5.5 Dermale Anwendung von Ginsengextrakt

Ginsengextrakt findet sich ausgehend vom asiatischen Markt zunehmend auch in dermalen Pflegeprodukten. Der Hintergrund liegt auf der potenziellen Nutzung der

oben beschriebenen antioxidativen Effekte im Sinne der Gesundhaltung der Haut, beispielsweise zur Reduktion von lichtbedingter Hautalterung [104, 115].

Dieser vornehmlich durch UV-Strahlung verursachte Photoaging-Prozess tritt in Form von Verdickung der Haut, Verlust der Hautelastizität, vermehrter Faltenbildung und erhöhter Melaninsynthese in Erscheinung [33, 34]. Die im Ginseng enthaltenen Ginsenoside stellen eine Gegenwehr dar und besitzen eine antiinflammatorische, hautaufhellende und feuchtigkeitsspendende Wirkung [106, 107, 108].

Durch die UV-Strahlung induzierte ROS-Produktion werden Matrix-Metalloproteinasen hochreguliert. Dabei handelt es sich um eine Enzymgruppe, welche extrazelluläre Matrixproteine, u.a. Kollagen, aktiv abbaut. Ginsenoside steigern die Kollagen-Synthese und hemmen parallel die Expression dieser Matrix-Metalloproteinasen [104, 108]. In Studien an haarlosen Mäusen, die über fünf Wochen zwecks Faltenbildung mit UV-Strahlung bestrahlt wurden, konnte man einen besseren Erhalt der Hautelastizität mit geringerer Faltenbildung feststellen, wenn die Mäuse parallel mit einer täglichen Ginseng-Dosis gefüttert wurden bzw. Sonnencreme appliziert wurde. Ebenso verdickte die Haut im Vergleich zu einer nichtbehandelten Kontrollgruppe unter UV-Bestrahlung weniger stark [108]. In einer 24-wöchigen randomisierten kontrollierten klinischen Studie, bei der 3x täglich 250 mg eines roten Ginseng-Extraktes als Kapselformulierung peroral verabreicht wurde, konnte ein Rückgang der Tiefe von Augenfalten sowie eine Erhöhung der Elastizität und Feuchtigkeit der Haut festgestellt werden [107]. Das Enzym 11 β -Hydrosteroid-Dehydrogenase Typ 1 (11 β -HSD1) wandelt inaktives Cortison in aktives Cortisol um. Seine Expression wie seine Aktivität werden durch erhöhte Sonnenexposition begünstigt. Daher entsteht mehr Cortisol in der Haut, welches wiederum zu einem erhöhten Kollagen- und Elastinabbau führt. Ginsenoside führten zu einer Senkung der 11 β -HSD1 Expression und senkten damit die Cortisolkonzentrationen in der Haut, wodurch ein Anti-Aging-Effekt entsteht [106].

In Melanozyten bremsen Ginsenoside eine durch überhöhte Sonnenexposition ausgelöste Hyperpigmentation durch Hemmung des Transkriptionsfaktors MITF, der u.a. die Expression von Enzymen in Melanozyten reguliert, sowie durch Hemmung der Tyrosinase, dem ersten Schlüsselenzym in der Melaninsynthese. Des Weiteren wird die ebenfalls durch die Sonneneinstrahlung induzierte Proliferation der Melanozyten durch Ginsenoside gestoppt [104]. Durch diese Intervention bei der Synthese, dem

Transkriptionsfaktor und den Signaltransduktionswegen von Melanin besitzt Ginseng einen hautaufhellenden Effekt [105]. In haarlosen- UV-bestrahlten Mäusen, die täglich mit Sonnencreme behandelt oder mit Ginseng-Extrakt gefüttert wurden, konnte nach der dritten Behandlungswoche in beiden Gruppen ein Sinken der Melaninproduktion beobachtet werden. Ähnliche hautaufhellende Ergebnisse konnte in einer randomisierten kontrollierten klinischen Studie gezeigt werden, bei der eine Creme mit 3 % rotem Ginseng-Extrakt täglich für ein Monat topisch in der T- und U-Zone des Gesichts appliziert wurde. In der T-Zone gab es zwischen Versuchs- und Kontrollgruppe keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich des Hauttones, jedoch unterschieden sich die Wangen in der U-Zone, wobei die Versuchsgruppe einen hautaufhellenden Effekt verzeichnete. Es ist jedoch wichtig zu erwähnen, dass die Versuchsgruppe an der Baseline einen dunkleren Hautton hatte als die Kontrollgruppe [108].

Einzelnen Ginsenosiden wurde in Studien an HaCaT-Zellen und humanen Fibroblasten, bei denen oxidativer Stress mittels UV-Strahlung induziert wurde, eine antioxidative Wirkung nachgewiesen. Durch die vor der Bestrahlung erfolgte Inkubation mit verschiedenen Konzentrationen der Ginsenoside Rb3, Re oder Rd konnte die nachfolgend entstehende ROS-Konzentration in den Zellen im Vergleich zu einer unbehandelten Kontrollgruppe reduziert werden. Des Weiteren reduzieren diese Ginsenoside die Aktivität von Pro-Matrix Metalloproteinase-2 und 9, die ihrerseits durch den UV-induzierten oxidativen Stress angeregt wurden, mehr extrazelluläre Matrixproteine wie Kollagen abzubauen. Gleichzeitig steigern sie aber die antioxidative Kapazität durch Erhöhung der Glutathion- (GSH) und Superoxid-Dismutase (SOD) Spiegel, die hochreaktive Oxidantien im Körper umwandeln und den oxidativen Stress damit senken [110, 111, 112].

The diagram illustrates the signaling pathways in a keratinocyte, showing the effects of various factors and the potential targets of KRG and SG. The cell is depicted with its nucleus, cytoplasm, and cell membrane.

Extracellular Matrix and Receptors:

- Hyaluronan:** A blue chain-like structure on the cell surface.
- KRG, SG:** Red lightning bolts representing UV radiation or stress.
- Rh3:** A receptor on the cell surface.
- Rb3:** A receptor on the cell surface.

Signaling Pathways:

- TNF-α Pathway:** TNF-α (activated by KRG, SG) leads to Rg5: Rk1, which inhibits TNF-α. TNF-α also leads to MAPKs.
- MAPKs Pathway:** MAPKs lead to NF-κB, which activates iNOS and COX-2.
- ERK Pathway:** GM-CSF leads to ERK, which is inhibited by KRG. ERK also leads to P38/JNK.
- P38/JNK Pathway:** P38/JNK leads to c-Jun and c-fos, which are inhibited by SG.
- GADD45 Pathway:** GADD45 is inhibited by KRG and leads to ROS.
- ROS Pathway:** ROS leads to proMMP2 and proMMP9.
- p53 Pathway:** p53 is activated by ROS and leads to DNA repair, Apoptosis, and Oxidation.
- AP-1 Pathway:** AP-1 is activated by NF-κB and leads to IL-8, which causes Inflammation.
- SG Pathway:** SG leads to c-Jun and c-fos, which are inhibited by SG.
- Compounds K Pathway:** Compounds K lead to HAS-2, which causes Moisturization.

Downstream Effects:

- Inflammation:** Caused by iNOS, COX-2, and IL-8.
- Apoptosis:** Caused by c-Jun, c-fos, and p53.
- DNA repair:** Caused by p53.
- Oxidation:** Caused by proMMP2, proMMP9, and p53.
- Moisturization:** Caused by HAS-2.

Legend:

- Red arrows:** Inhibition.
- Black arrows:** Activation.

Keratinocyte: The overall cell structure shown.

2.6 Nanoemulsionen als Träger für Pflanzenextrakte

Bei einer Nanoemulsion handelt es sich um ein zweiphasiges flüssiges System, wobei eine Phase als feine nanoskalige Tröpfchen in einer kontinuierlichen zweiten Phase dispergiert ist. Die Tröpfchengröße der verteilten Phase zieht sich dabei über eine Spanne von 20 – 500 nm, die entstandene Emulsion wird daher als Nanoemulsion bezeichnet [120, 121]. Von den beiden nichtmischbaren Flüssigkeiten ist eine ölig, die andere wässriger Natur. Je nachdem welche Phase in der jeweils anderen verteilt ist, spricht man von Öl in Wasser (O/W) und Wasser in Öl (W/O) Systemen bzw. diversen weiteren Konstellationen bei multiplen Verteilungen (z.B. W/O/W) [121]. Typische O/W-NEs enthalten einen Formulierungsanteil von 5-20 % an Lipidtröpfchen.

NEs sind in einer fertigen Formulierung kinetisch metastabil, aber thermodynamisch instabil durch die molekularen Interaktionen an den Phasengrenzen und der treibenden Kraft zum Erreichen des energetisch günstigeren Zustandes der Phasentrennung. Die innere Phase wird daher stabilisiert durch Emulgatoren. Emulgatoren sind amphiphile Moleküle, die in ihrer Struktur sowohl lipophile als auch hydrophile Anteile besitzen, um als Vermittler zwischen den beiden Phasen zu agieren. Sie reduzieren die Oberflächenspannung der Nanoemulsion und stabilisieren damit die Dispersion der inneren Phase [122]. Ohne diese Stabilisierung ist der Erhalt des Herstellungszustandes der Nanoemulsion nur von kurzer Dauer, Phänomene wie Aggregation, Sedimentation oder Aufrahmung folgen dem Bestreben, den energetisch günstigen Zustand getrennter Phasen zu erreichen [123].

NEs bilden sich nicht spontan aus. Damit sie dennoch hergestellt werden können, ist eine externe Energiezufuhr z.B. in Form von mechanischen Scherkräften notwendig. Man bedient sich hierzu sog. high- oder low-energy emulsification methods [122]. Bei hochenergetischen Verfahren kommen Maschinen zum Einsatz, die unter Anwendung großer Mengen Energie starke Scherkräfte erzeugen. Diese wirken stark disruptiv auf das Öl/Wasser Gemisch und erzeugen aus groben, fein verteilten Tröpfchen mit hoher kinetischer Energie. Typische Verfahren dafür sind Hochdruckhomogenisation, Mikrofluidisierung und insbesondere im Labormaßstab auch Ultraschallbehandlung. Niedrigenergetische Verfahren zur Herstellung von NEs basieren auf der spontanen Bildung kleinster Tröpfchen in der kontinuierlichen Phase, wenn die Umgebungsbedingungen bzw. die Zusammensetzung des zu bearbeitenden Gemisches verändert wird. Durch verschiedene Phasenumkehr Techniken wird so die

innere Energie des Systems zugänglich gemacht und genutzt, um spontan NEs zu erzeugen. Diese Verfahren sind energieeffizienter und kostengünstiger, jedoch werden im großindustriellen Maßstab v.a. Öl in Wasser Emulsionen immer noch klassisch mit hochenergetischen Verfahren wie der Hochdruckhomogenisation erzeugt [119, 120, 121].

In dieser Arbeit diente LIPOID S75® als Emulgator für sämtliche NEs. Hinter dem Begriff steckt eine Sammlung verschiedener Phospholipide, wobei Phosphatidylcholin (PC) der wichtigste Bestandteil ist. PC ist ein zwitterionisches Molekül, welches bei pH = 7 keine Nettoladung besitzt und sich durch seine charakteristische amphiphile Struktur (Abbildung 23) ideal für pharmazeutische oder kosmetische Formulierungen eignet. Je nach vorhandenem apolaren Kohlenstoffkettenresten unterscheidet man zwischen differenten Phosphatidylcholinen, die auch als Lecithin bezeichnet werden. Im konkreten Fall von LIPOID S75® stammt Phosphatidylcholin aus Soja (S) und hat einen Massenanteil von $\geq 70\%$ am Gesamtprodukt [124].

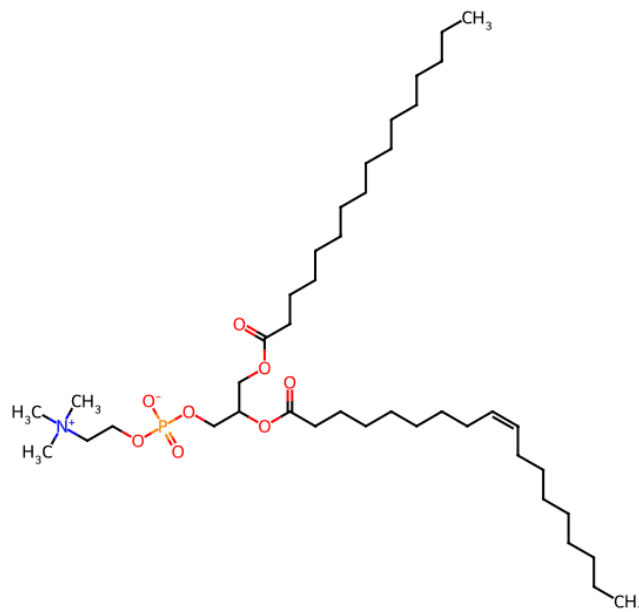


Abbildung 23: Struktur eines Phosphatidylcholins. Die apolaren Seitenketten sind in diesem Fall Palmitinsäure und Ölsäure, welche an den Glycerinteil in der Mitte verestert sind.

2.7 Angewendete Testmethoden

2.7.1 Prinzip des ROS-Assay

Zur Quantifizierung der intrazellulären ROS kam der Fluoreszenz-Farbstoff: DCFH₂-DA (2',7' - Dichlorodihydrofluorescein Diacetat) in einer Konzentration von 25 µM zum Einsatz. Dabei handelt es sich um die lipophile Vorstufe des Farbstoffes, der zunächst leicht die Zellmembran durchdringt und durch zytosolische Esterasen deacetyliert wird um die polare Zwischenform 2',7' - Dichlorodihydrofluorescein (DCFH₂) freizusetzen. DCFH₂ ist durch die hohe Polarität in den Zellen gefangen und wird in Anwesenheit von Oxidantien in seine fluoreszenzaktive oxidierte Form 2', 7' - Dichlorofluorescein (DCF, Abbildung 24) überführt [73, 74]. DCF ist stark fluoreszierend und wurde in diesem Versuch bei einer Anregungswellenlänge (λ_{ex}) von 485 nm und einer Emissionswellenlänge (λ_{em}) von 523 nm vermessen. [73, 113]. Eine höhere intrazelluläre ROS-Konzentration bewirkt eine stärkere Umwandlung von DCFH₂ in DCF und bildet damit direkt proportional anhand der Fluoreszenz-Intensität das Ausmaß des intrazellulären oxidativen Stresses ab [56].

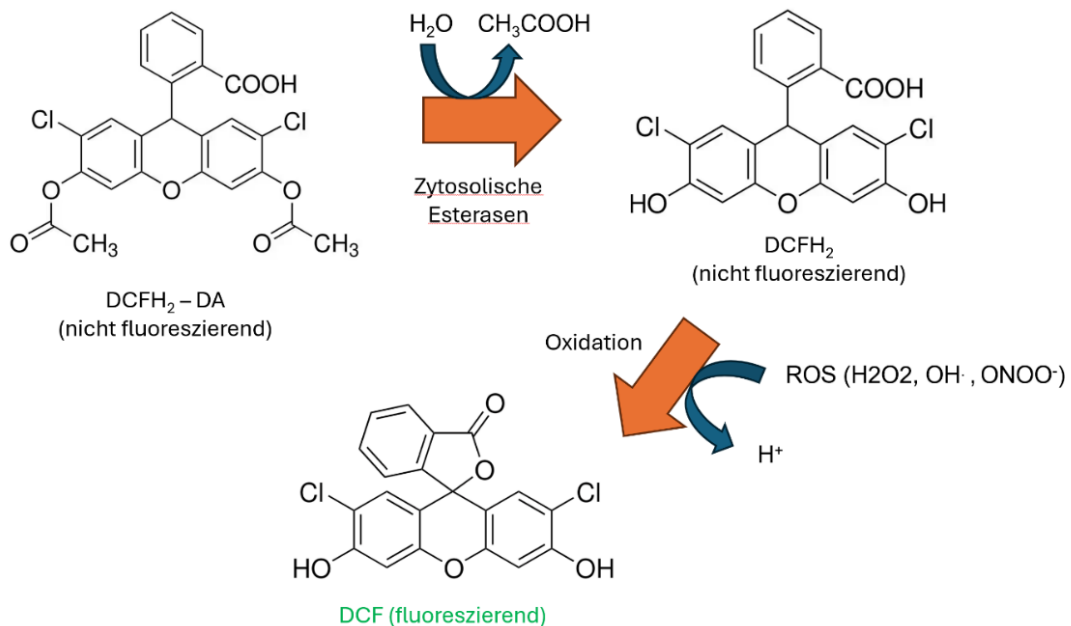


Abbildung 24: Umwandlungsschritte von DCFH₂-DA in DCF durch den Metabolismus von Zellen

2.7.2 Prinzip des MTT-Assays

Nachdem auf einer Platte der ROS-Assay durchgeführt worden war, folgte ein MTT-Assay. Dabei handelt es sich um einen Test zur Bestimmung der metabolischen Aktivität von Zellen, er findet daher breite Anwendung zur Überprüfung der Zellüberlebensrate nach Applikation von Substanzen. MTT-Tests nutzen die Präsenz aktiver Enzyme (NADH-abhängiger Dehydrogenasen) in vitalen Zellen, die imstande sind, Tetrazoliumsalze in charakteristische Chromophore umzusetzen. Bei der Inkubation dringt das schwach gelbe MTT in die Zelle ein und wird von den Mitochondrien und einem durch Stoffwechselaktivität bedingten reduzierenden Milieu im Zytosol in wasserunlösliche, tiefblau gefärbte Formazankristalle umgewandelt (Abbildung 25). Die Quantifizierung des Formazans erfolgt spektrophotometrisch, wobei die Intensität des entstandenen Farbstoffs in direkter Korrelation zur Zahl der metabolisch aktiven Zellen steht. Mittels Dimethylsulfoxid (DMSO) werden die Zellen lysiert, das Formazan dabei freigesetzt und wieder in Lösung gebracht [66, 67].

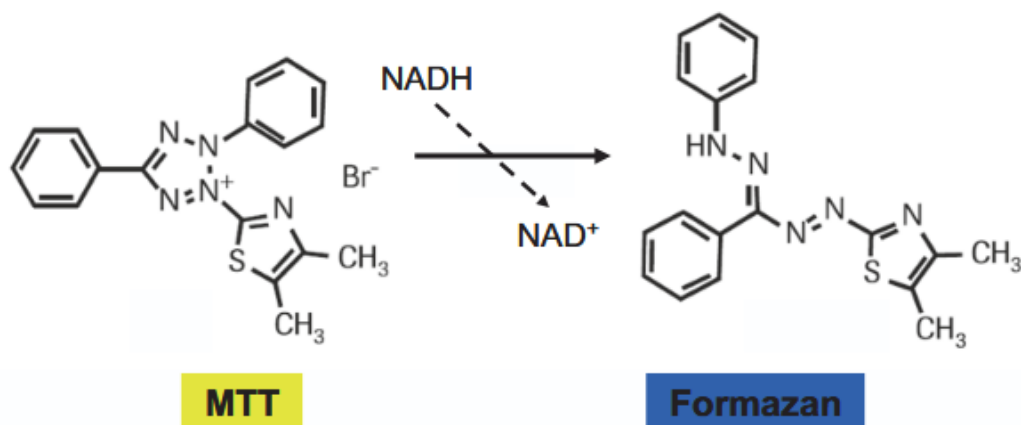


Abbildung 25: Umwandlung von MTT (gelb) durch NADH abhängige Reduktasen in Formazan (blau), abgedruckt mit Genehmigung von Springer Nature [66]

3 Materialien & Methoden

3.1 Reagenzien

In der nachfolgenden Tabelle 1 sind alle Materialien aufgelistet, die zur Vorbereitung sowie zur Durchführung der durchgeführten Assays benötigt wurden.

Tabelle 1: Reagenzienauflistung

Substanz	Hersteller / Vertrieb
Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)	Gibco (Waltham, USA)
Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) – farblos, ohne Phenolrot	Sigma-Aldrich / Merck (St. Louis, USA)
Gentamicinsulfat	Sigma-Aldrich / Merck (St. Louis, USA)
L-Glutamin	Sigma-Aldrich / Merck (St. Louis, USA)
Trypsin	Sigma-Aldrich / Merck (St. Louis, USA)
Fetales Kälberserum (FBS)	Gibco (Waltham, USA)
Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS) ohne Ca^{2+} / Mg^{2+} Zusatz	VWR (Radnor, USA)
DCFH ₂ -DA	Merck KGaA (Darmstadt, DE)
MTT	Millipore / Merck (Billerica, USA)
KRG-Extrakt	KGV Korea Ginseng Vertrieb (Lohmar, Deutschland)
HYP-Extrakt	Apomedica (Graz, Österreich)
Ascorbinsäure	Gatt-Koller (Absam, Österreich)
H ₂ O ₂	Gatt-Koller (Absam, Österreich)
DMSO	Sigma-Aldrich / Merck (St. Louis, USA)

3.2 Human adult low calcium high temperature (HaCaT)

Keratinocyten als Zelllinie

Zur Durchführung der ROS- und MTT-Assays wurden HaCaT-Keratinocyten verwendet (Abbildung 26), die von Cell Lines Service GmbH (CLS; Eppelheim Deutschland) gekauft wurden. Es handelt sich hierbei um die erste humane Zelllinie,

welche spontan via Änderung der Kulturmediumsbedingungen immortalisiert wurde. HaCaT-Zellen zeigen ein den humanen Keratinozyten *in vivo* ähnliches Verhalten im Hinblick auf Differenzierung und Keratinisierung, denen sogar die Fähigkeit eine intakte Epidermis nach einer Transplantation zu rekonstruieren erhalten bleibt. Der Name HaCaT richtet sich nach den ursprünglich notwendigen Mediums-Parametern, die für eine erstmalige Kultivierung unverzichtbar waren: eine niedrige Calciumkonzentration (0,2 M) und eine leicht erhöhte Temperatur (37 - 38,5 °C) [65].



Abbildung 26: HaCaT – Zellen unter dem Mikroskop
(Passage 40, © Mag. Tanja Pfleger)

HaCaT-Zellen sind heutzutage eine Standardzelllinie für *in vitro*-Versuche, da sie unter standardisierten Kulturbedingungen ein geeignetes *in vitro*-Modell darstellen, um Abläufe in echten humanen Keratinozyten darzustellen. So konnten HaCaT-Zellen, die mit einer Konfluenz von 80% und einer niedrigen extrazellulären Ca^{2+} -Konzentrationen kultiviert wurden, verwendet werden, um Entzündungs- und Reparaturreaktionen in Keratinozyten zu untersuchen. Der Vorteil der HaCaT-Keratinozyten gegenüber den sonst eingesetzten primären humanen Keratinozyten besteht v.a. in der Unabhängigkeit von der Spender-Varianz sowie der längeren Lebensdauer in der Zellkultur [69].

Auch in Bezug auf oxidativen Stress finden sich Daten mit HaCaT-Keratinocyten. In Studien, bei denen Feinstaub bestimmter Partikelgrößen eingesetzt wurde, um HaCaT-Keratinocyten unter oxidativen Stress zu setzen, konnte durch das vorhergehende Auftragen von Phenylpropanoid-hältigen Zubereitungen die antioxidative Kapazität gesteigert werden. Inhaltsstoffe von Propolis wie Kaffesäure konnten die durch den Feinstaub hochregulierten pro-oxidativen Prozesse wie ROS-Produktion, Lipid-Peroxidation und Glutathion-Oxidation signifikant senken [70, 114]. Mit der Testung auf intrazellulären oxidativen Stress (ROS-Assay) geht auch immer eine Überprüfung der Zellviabilität einher. So gestaltete sich auch der in dieser Arbeit durchgeführte Versuchsaufbau aus einem ROS-Assay, dem ein MTT-Assay folgte [56, 70].

Bei einer weiteren Studie wurde Fucoxanthin (2,5 – 40 μM), ein Carotinoid aus Braunalgen, auf HaCaT-Keratinocyten aufgebracht, welche im Anschluss mittels einer 1 mM H_2O_2 -Lösung unter oxidativen Stress gesetzt wurden. Nach Bestimmung des oxidativen Stresses mittels dem auch in dieser Arbeit verwendeten Fluoreszenzfarbstoffes DCFH₂-DA, dessen Fluoreszenzintensität direkt proportional zur ROS-Konzentration in der Zelle ist, wurde ebenfalls ein MTT-Test angeschlossen [125].

3.3 Kultivierungsbedingungen

Für die Kultivierung der HaCaT-Keratinocyten wurde Dulbecco Modified Eagles Medium (DMEM) der Firma Sigma-Aldrich / Merck verwendet. Es unterscheidet sich zum Basalmedium nach Eagle durch seine bis zu vierfach erhöhten Konzentrationen an zugesetzten Aminosäuren und Vitaminen. Weiters beinhaltet NaHCO_3 , welches zusammen mit CO_2 im Inkubator ein effektives Puffersystem ergibt. In Kombination mit einer 5-10 % CO_2 Atmosphäre können die freigesetzten HCO_3^- Ionen den physiologischen pH-Wert des Mediums selbst bei rasch proliferierenden Zellen mit erhöhter Stoffwechselproduktfreisetzung länger konstant halten. Der in unserem Fall ebenfalls zugesetzte Indikator-Farbstoff Phenolrot zeigt durch seine Entfärbung von Rot zu Gelb an, wenn das Medium zu sauer (pH-Wert < 6,4) geworden ist und ein Mediumswechsel vorgenommen werden muss [66, 67].

Der DMEM-Originalrezeptur wurden vor Durchführung der Zellkulturversuche weitere Zusätze hinzugefügt, die aufgrund ihrer geringen Stabilität meist nicht vom Hersteller direkt mitverarbeitet werden. (Tabelle 2). Das modifizierte DMEM wird im weiteren Verlauf der Arbeit als DMEM 10 % bezeichnet, wobei die 10% den Anteil des fetal bovine serum (FBS, fetales Kälberserum) am Gesamtvolumen ausmachen.

Tabelle 2: Zusammensetzung von DMEM 10% FBS

Bestandteil	Volumen
DMEM	1000 mL
FBS	100 mL
Gentamicin-Stammlösung (110 mg/mL H ₂ O)	2 mL
L-Glutamin-Stammlösung (29,23 mg/mL H ₂ O)	2 mL

L-Glutamin ist eine Aminosäure, die sich aufgrund ihres hohen Stickstoffanteils in der Zellkultur etabliert hat. Sie fungiert als Energiequelle und Präcursorlieferant für die Ribonukleotidsynthese und wird Kulturmedien daher in Konzentrationen von 2-4 mM beigemengt, um die rasche Proliferation und Wachstum von Zellen sicherzustellen [66, 67].

Zur Vorbeugung von Kontaminationen wird dem Medium Gentamicin zugesetzt. Es ist sowohl gegen grampositive als auch gramnegative Bakterien wirksam und in wässrigen Lösungen bis zu fünf Tage stabil. Im Gegensatz zu einer äquivalent wirksamen Kombination aus Penicillin G und Streptomycin, welche im wässrigen Milieu nur drei Tage stabil bleibt, um eine Besiedelung mit Bakterien zu verhindern [66].

Fetal Bovine Serum (FBS, fetales Kälberserum) ist eine von Rinderföten gewonnene Fraktion geronnenen Blutes, welche als Zusatz zu Kulturmedien eine Reihe von Aufgaben in der Zellkultur übernimmt. Als biologische Flüssigkeit reichert FBS das Kulturmedium mit Wachstums- und Adhäsionsfaktoren, Cytokinen, Hormonen, Bindungs- und Transportproteinen, Aminosäuren, Vitaminen, Spurenelementen, weitere Puffer- und Neutralisationssysteme sowie Fettsäuren und Lipide in Form von Lipoproteinen an. Dieser Umfang an wachstums- und proliferationsfördernden Bestandteilen macht es zu einer optimalen Nahrungsquelle für kultivierte Zellen. [66, 67, 68].

3.4 UVA-Bestrahlung

Im Zuge der Versuche wurden die HaCaT-Zellen künstlicher UVA-Strahlung als physikalischen Induktor für oxidativen Stress exponiert. Als Vergleich diente eine unbehandelte Kontrollgruppe sowie eine Gruppe, die mit H_2O_2 als chemischem Induktor für oxidativen Stress behandelt wurde. Zur Bestrahlung wurde ein Sonnenlichtsimulator (UVACube 400, Hoenle AG, Gilching, Deutschland) eingesetzt, wobei durch Verwendung des H1-Filters der Anteil an UVB-Strahlung gänzlich eliminiert wurde [92]. Abbildung 27 zeigt das Gerät und die notwendigen Utensilien zur Bedienung und Messung der Strahlenintensität. Mithilfe des Einsatzes von Edelstahlgittern bestimmter Maschenweiten konnte die Bestrahlungsstärke konstant gehalten werden. Deren Spannweite lag für die hier vorliegende Arbeit zwischen $1.3 - 1.6 \text{ mW/cm}^2$ bei einem angestrebten Erhaltungswert von 1.4 mW/cm^2 [92]. Die Bestrahlungsdosis wurde im Rahmen der Methodvalidierung zwischen $0,25 - 0,75 \text{ J/cm}^2$ variiert. Ziel war es die Bestrahlungsintensität so zu wählen, um Fluoreszenz in den Zellen zu detektieren, jedoch gleichzeitig eine Zellviabilität von mindestens 80% nach der Bestrahlung zu erhalten.



Abbildung 27: UVA-Cube 400. Außenansicht (links), notwendige Utensilien zur Messung (rechts oben) sowie in der Aufwärmphase zum Einsatz kommende Sensor mit aufgelegtem Wellplattendeckel (rechts unten)

3.5 Versuchsdurchführung

Der Versuchsaufbau gliederte sich in zwei Tage. Am ersten Tag wurden aus einer zu 70-80 % bewachsenen Zellkulturflasche 5×10^4 HaCaT-Zellen / 100 μL in je zwei 96- well-Platten (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) angesetzt. Die Zellen wurden für 24 Stunden im Brutschrank bei 37°C und 5 % CO_2 inkubiert. Nach der Ausbildung eines HaCaT-Monolayers über Nacht wurde am zweiten Tag zunächst mit einem ROS-Assay fortgefahren, dem ein an den gleichen Zellen durchgeführter MTT-Assay folgte.

3.5.1 Tag 1: Passagieren und Aussäen der Zellen

Vor Beginn des Versuchs wurden alle notwendigen Reagenzien auf etwa 37°C vorgewärmt. Dazu empfahl es sich circa 15 - 30 Minuten vor dem Start ein temperiertes Wasserbad zu nutzen. [66]

In der Laminar Flow-Werkbank (Abbildung 28) wurde das Zellmedium (DMEM 10%) aus der Kulturflasche abgesaugt. Zum Waschen des Kulturbodens wurden 10 mL phosphatgepufferte Salzlösung (PBS) in die Flasche abgelassen, diese ebenerdig abgelegt und der Zellrasen mittels sanfter kreisförmiger Bewegungen in Form einer Achterschleife gewaschen. Hierbei wurden tote Zellen, Zellprodukte und Serumreste entfernt, welche die Wirkung des nachfolgend aufgetragenen Enzyms Trypsin beeinträchtigen konnten [66, 67].



Abbildung 28: Laminar Flow-Werkbank zur Durchführung steriler Arbeiten in der Gefahrenstufe 1

Das PBS wurde abgesaugt und 3 mL Trypsin tropfenweise entlang des Flaschenbodens abgegeben. Dann wurde die Kulturflasche für 12 Minuten bei 37 °C und 5 % (v/v) CO₂ inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde mit Hilfe eines Mikroskops kontrolliert, ob sich die Zellen nach der Einwirkung der Protease Trypsin ausreichend abgelöst hatten. Durch Abklopfhiebe an den Flaschenflanken konnte dieser Prozess mechanisch unterstützt werden. Nach Wiedereinbringen der Zellkulturflasche in die Laminar Flow Werkbank wurden 6 mL DMEM 10 % entlang des Flaschenbodens abgelassen. Die Flasche wurde aufgestellt, damit sich die bereits von Adhärenzboden gelösten Zellen nicht direkt wieder absetzten. Die nun insgesamt 9 mL Zellsuspension (3 mL Trypsin + 6 mL DMEM 10%) wurden 5 Minuten mit einer 10 mL Pipette homogenisiert. Es folgte die Verfrachtung der Zellsuspension in ein 30 mL Zentrifugenröhrchen, welches mit dem entsprechenden Gegengewicht von 9 mL Aqua bidestillata, für 5 Minuten bei 140 g zentrifugiert wurde. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand vollständig abgesaugt, das Zellpellet in 10 mL frischem DMEM 10 % gelöst und erneut für etwa zwei Minuten homogenisiert. Aus dieser Zellsuspension wurde 1 mL Aliquot entnommen und in ein Zellzählröhrchen überführt.

Der Cell Counter (Abbildung 29: Vi-Cell® XR, Beckman Coulter, Inc., CA, USA) zählte mittels Durchflussszytometrie die Zellen im Zellzählröhrchen und bildete den Mittelwert aller gezählten sowie aller lebendigen Zellen aus 50 Aufnahmen und stellte diese Zahl mit der Einheit Zellen / mL dar. Für den Versuch wurden 50.000 Zellen/well (pro



Abbildung 29: Zellzähler und Zellviabilitätsanalysator

100 µL) bzw. 500.000 Zellen / mL benötigt. Abbildung 30 zeigt beispielhaft eine Berechnung der notwendigen Mischverhältnisse aus Zellsuspension und Verdünnungsmedium (DMEM 10 %). Die leere Zellkulturflasche wurde mit 10 mL PBS gespült und 10 mL frisches DMEM 10% hinzugegeben. Dazu wurden 3 mL Zellsuspension gegeben, diese mit einer sachten Achterschleifen-Kreisbewegung verteilt und die Kulturflasche im Anschluss in den Inkubator zurückgestellt.

Die nach berechneten Angaben frisch verdünnte Menge Zellsuspension wurde in zwei 96-well Platten zu je 100 µL / well ausgesät. Zu beachten ist, dass die beiden äußersten Spalten (1 & 12) anstelle der Zellsuspension mit der gleichen Menge DMEM 10 % als Leerwert befüllt wurden. Weiters blieben die beiden äußersten Zeilen sowie die Spalte Nummer 8 in jedem Versuch gänzlich frei. Effektiv wurden demnach statt 96 nur 66 wells befüllt. Davon 54 mit Zellsuspension sowie zwölf mit DMEM 10 %. Die beiden Platten wurden im Anschluss für 24 h im Inkubator bei 37 °C und 5% CO₂ inkubiert.

Zellzahl bei CellCounter: 1.630.000 cells/mL $1,63 \times 10^6$

Benötigtes Volumen an Zellsuspension berechnen:

in 9 Spalten mit je 6 wells sollen Zellen ausgesät werden, 2 Platten → 9 * 6 * 2 = 108 wells

→ 108 wells * 100 µl / 1000 = 10,8 ml Zellsuspension benötigt, aufrunden! → 12 ml

(z.B.: 6 Spalten mit 6 wells für 2 Platten = aufrundet 16 ml)

Gewünschte Zellzahl/ml berechnen:

wir wollen 5×10^4 Zellen/well, also in 100 µl → _____ * 10 = 500.000 Zellen/ml

(z.B.: 15.000 Zellen/well → 15.000 Zellen/200 µl → 75.000 Zellen/ml)

Mischungsverhältnis Zellsuspension:Medium berechnen:

500.000 12 1.630.000

Gewünschte Zellen/ml * benötigtes Volumen / tatsächliche Zellen/ml = 3,681 ml Zellsuspension

→ 3 ml + 681 µl Zellsuspension

Benötigtes Volumen Zellsuspension – verwendete ml Zellsuspension = 8,319 ml Medium

→ 8 ml + 319 µl Medium

Abbildung 30: Ermittlung der gewünschten Zellzahl/mL sowie der notwendigen Zellsuspension nach Auszählung mit dem Vi-Cell® XR Cellcounter

3.6 Reaktive Sauerstoff Spezies (ROS)-Assay

3.6.1 Tag 2: Probenvorbereitung

Die Testkonzentrationen für KRG-Extrakt wurden gemäß einer früheren Studie angepasst, in der serielle Konzentrationen von Ginsengblattextrakt (10–250 µg/ml) an UVA-induzierten HaCaT-Keratinocyten getestet wurden [137]. In der vorliegenden Studie wurden die Zellen mit steigenden Konzentrationen von KRG-Extrakt (25–250 µg/ml Endkonzentration) behandelt. Zuvor wurde der KRG-Extrakt in einer Konzentration von 40 % (v/v) Ethanol gelöst und für die Dauer einer Minute unter Verwendung eines Vortex-Schüttlers vermengt. Die in Ethanol gelösten Stammlösungen wurden in weiterer Folge in PBS-Puffer verdünnt und einer erneuten Schüttelung von einer Minute unterzogen. Im Rahmen der Untersuchung wurden Vehikelkontrollen mit einer Endkonzentration von 0,25 % (v/v) Ethanol 40 % (v/v) hinzugefügt. Als pflanzlichen Kontrolle wurde HYP-Extrakt ausgewählt und auf seine antioxidative Aktivität getestet (Endkonzentration 12,5 µg/ml). Vor der Behandlung der Zellen wurde der HYP-Extrakt in DMSO gelöst. Die in DMSO gelöste Stammlösung wurde in PBS-Puffer gegeben. Im Rahmen der Untersuchung wurde eine Vehikelkontrolle mit einer Endkonzentration von 0,125 % (v/v) DMSO durchgeführt.

Die NEs wurden in verschiedenen Verdünnungen an Zellen getestet, um die gleichen Konzentrationen wie beim reinen KRG-Extrakt zu erreichen. Die NEs wurden in PBS-Puffer verdünnt, um Verdünnungen von 1:100, 1:200 und 1:400 zu erhalten. Die Endkonzentrationen des KRG-Extrakts, die auf die Zellen aufgetragen wurden, lagen zwischen 25 und 100 µg/ml. Im Rahmen der pflanzlichen Kontrolle wurde NE_HYP in PBS-Puffer verdünnt, um eine Verdünnung von 1:200 zu erreichen, was einer Endkonzentration des HYP-Extrakts von 12,5 µg/ml entspricht. Für KRG- und HYP-Extrakt wurden Vehikelkontrollen in Form von extraktfreien Nanoemulsionen (NE_blank) hinzugefügt.

3.6.2 Durchführung des ROS-Assays

Die Durchführung des ROS-Assays zur Bewertung der UV-induzierten ROS-Bildung in HaCaT-Keratinocyten erfolgte auf Grundlage eines Protokolls von Hofer et al. [56] mit mehreren Modifikationen. Zur Validierung der angewandten Methode wurden Vorstudien mit Ascorbinsäure als starkem Antioxidans durchgeführt. Zur

Demonstration der Unterschiede zwischen der UV-Schutzkapazität des Antioxidans KRG-Extrakt und dessen alleinigen Radikalfängerpotenzial wurde als Positivkontrolle der ROS-Generator H_2O_2 verwendet. Vor der UV-Behandlung wurden die Zellen eine Stunde lang mit KRG-Extrakt (25-250 $\mu\text{g/mL}$) vorbehandelt, und unbehandelte Zellen (keine UV-Behandlung, mit Puffer behandelt) wurden als Kontrolle verwendet. Die Durchführung aller Behandlungen, Expositionen und Kontrollen erfolgte simultan unter Verwendung einer 96-Well-Platte ($n = 4$). Die Zellen wurden in 96-Well-Platten mit einer Dichte von 5×10^4 pro Well ausgesät. Nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden und Erreichen der Konfluenz wurden die Zellen zweimal mit vorgewärmtem Phosphatpuffer (PBS) gewaschen. Im Anschluss wurden die Zellen mit 50 μl pro Well 25 μM DCFH-DA in PBS zusammen mit 50 μl Probenlösung (KRG-Extrakt oder Puffer) inkubiert. Nach einer Inkubation von einer Stunde bei 37 °C unter einer 5% CO_2 -Atmosphäre im Dunkeln wurden die Zellen zweimal mit vorgewärmtem Phosphatpuffer (PBS) gewaschen und die 96-Well-Platte in drei Teile geteilt. Ein Teil der Proben wurde mit 100 mM H_2O_2 (200 μl , in PBS) als positive Kontrolle behandelt, ein weiterer Teil wurde mit einer Bestrahlungsdosis von 0,25 J/cm^2 bestrahlt, während sich die Zellen in 200 μl PBS befanden, und der dritte Teil blieb unbehandelt (mit Puffer, ohne H_2O_2 -Behandlung, ohne UV-Behandlung). Um die unbehandelten Zellen und jene, die mit H_2O_2 behandelt wurden, vor UVA-Bestrahlung zu schützen, wurden Alufolie und eine schwarze, UV-protective Kunststoffolie um die Platte gewickelt. Die Messung der Fluoreszenz von DCF erfolgte unmittelbar nach der Bestrahlung unter Verwendung eines Multiwell-Plattenlesegeräts (Exzitation 485 nm/Emission 538 nm; Tecan™ Infinite 200, Tecan Ltd., Maennedorf, Schweiz). Der Workflow des Experiments kann der Abbildung 31 entnommen werden. Die Einteilung der 96-well Platte und das Pipettierschema können in Abbildung 32 nachvollzogen werden.

Dem verwendeten PBS wurden zusätzlich Calcium- und Magnesiumsalze hinzugesetzt. Die beiden Kationen werden zur Förderung der Zelladhäsion an den well-Platten benötigt, die unter den häufigen Waschvorgängen in diesem ROS-Assay in Mitleidenschaft gezogen wurde [46, 59]. Tabelle 3 zeigt die Zusammensetzung des im weiteren Verlauf bezeichneten PBS+.

Tabelle 3: Zusammensetzung des Phosphatpuffers PBS+

CaCl ₂ 2H ₂ O	2,65 g
KCl	0,2 g
KH ₂ PO ₄	0,2 g
MgCl ₂ 6H ₂ O	0,1 g
NaCl	8,0 g
Na ₂ HPO ₄ 2H ₂ O	0,764 g
Aqua purificata	ad 1000 mL

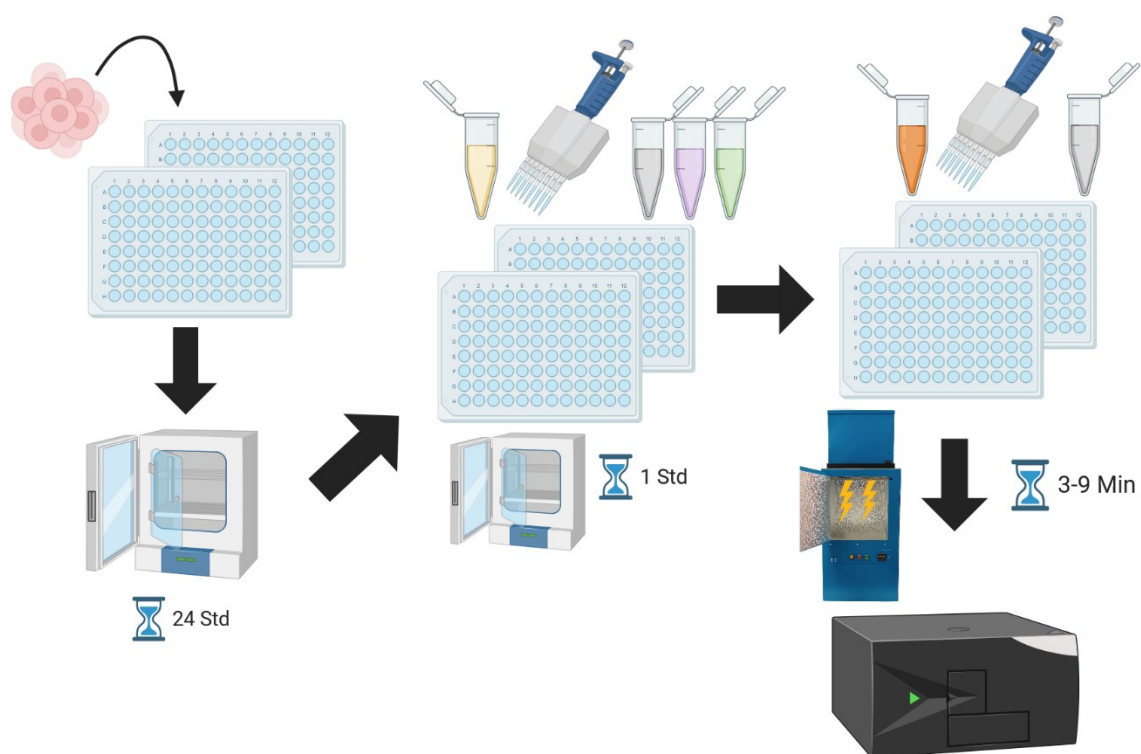


Abbildung 31: Workflow des ROS-Assay. Nach Ausbildung eines HaCaT-Monolayers für 24 Stunden wurden die wells zunächst mit 50 µL DCFH₂-DA (gelb) behandelt und dann je nach Spalte entweder mit 50 µL PBS+ (grau), 50 µL Vehikelkontrolle (lila) oder 50 µL KRG- / HYP-Formulierung für 1 Stunde inkubiert. Nach Waschen der wells, erfolgte je nach Bereich die Zugabe von 200 µL PBS+ (grau) oder 200 µL H₂O₂-Verdünnung (orange) sowie das Abdecken der Spalten 1-8 von allen Außenseiten mit Alu- und Schwarzfolie. Die Platte wurde mittig im UVA-Cube bestrahlt für eine gewisse Zeit und im Anschluss die Fluoreszenz des DCF-Farbstoffes im Tecan™ vermessen. Erstellt in <https://BioRender.com>

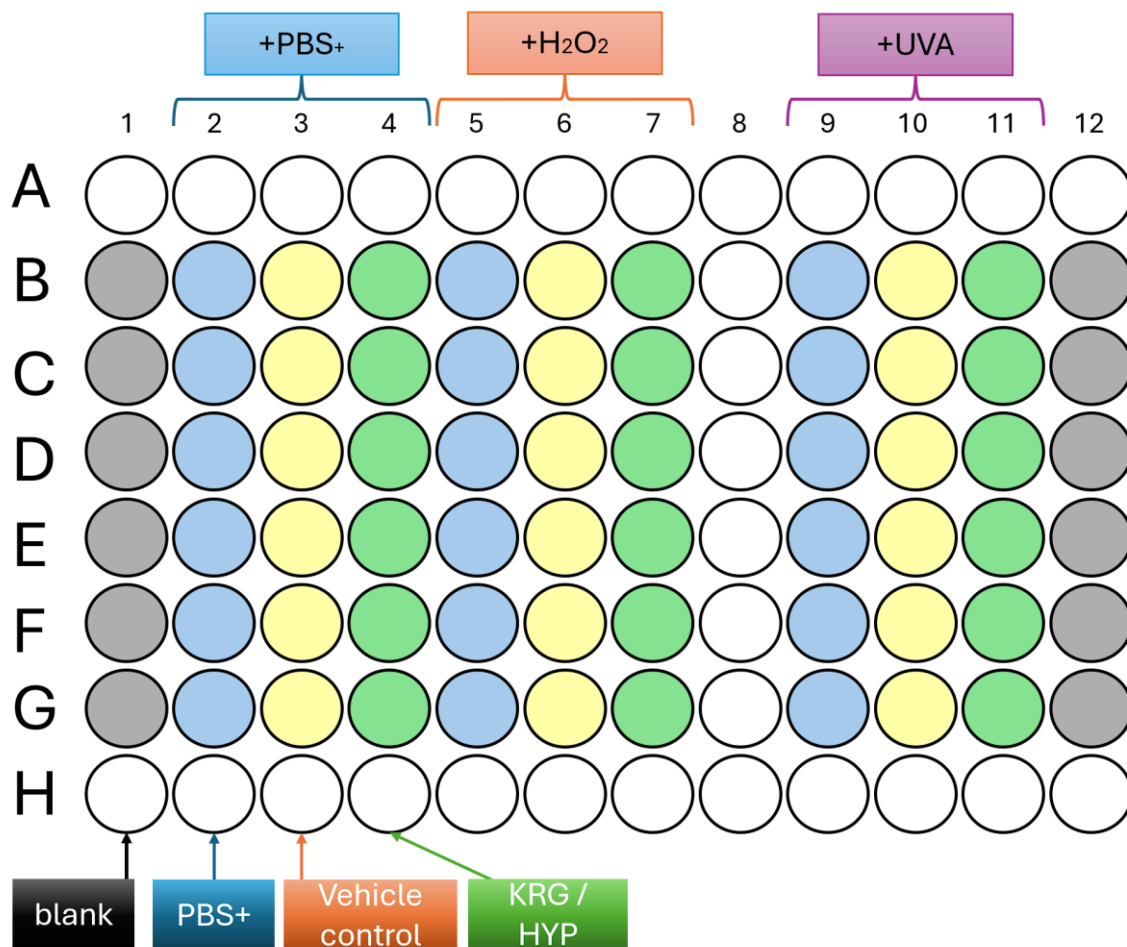


Abbildung 32: Pipettierschema mit den oben ersichtlichen drei Bereichen unbehandelt / untreated (blau), mit H_2O_2 behandelt / treated (orange) und mit UVA bestrahlt / UVA treated (violett). Jeder Bereich besteht aus drei Zellspalten, wobei die erste jeweils mit PBS+, die zweite mit der Vehikelkontrolle und die dritte mit der KRG bzw. HYP-Formulierung inkubiert wird. Spalte 1 und 12 sind zellfrei und dienen als blank.

3.6.3 UVA-Bestrahlung

Die UVA-Bestrahlung wurde mit einem Sonnensimulator (SOL500 + UVACube 400, Hoenle, Gilching, DE) mit H1-Filterglas durchgeführt, um UVB-Strahlung zu eliminieren. Vor jeder Verwendung wurde die UVA-Bestrahlungsstärke mit einem UVA-Messgerät (UV-Messgerät 3.0 mit UVA-Oberflächensensor, Hoenle, Gilching, DE) durch den Deckel einer 96-Well-Platte gemessen, um die Strahlungsintensität zu simulieren, die die Zellen erreicht. Gemäß dem Protokoll von Steiner et al. [92] wurde eine Kombination aus zwei Edelstahlgittern mit Maschenweiten von 30 und 120 (0,6 mm und 0,125 mm Öffnung) zwischen Lichtquelle und bestrahlten Zellen verwendet, um eine Bestrahlungsstärke von 1,6 – 1,7 mW/cm^2 zu erreichen. Der UVACube lief bei geöffneter Blende leer für mindestens 30 Minuten vor, um eine sichere Temperatur und Beständigkeit der Bestrahlungsintensität zu gewährleisten. Die Bestrahlungsdosis

wurde durch Variieren der Belichtungszeit unter Verwendung der folgenden Gleichung angepasst:

$$t [\text{min}] = \frac{\text{benötigte Strahlendosis } [\text{J}/\text{cm}^2] \times 1000}{\text{gemessene Strahlungsintensität } [\text{mW} / \text{cm}^2] \times 60}$$

Es wurden Vorstudien mit unterschiedlichen Expositionszeiten durchgeführt, um den Bereich der toxischen und nichttoxischen Bestrahlungsdosen für die verwendete Zelllinie zu ermitteln.

3.7 Durchführung des 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazoliumbromid (MTT) Assays

Ein klassischer MTT-Test folgte jedem ROS-Assay: die behandelten HaCaT-Zellen wurden auf die Viabilität hin untersucht (Abbildung 33).

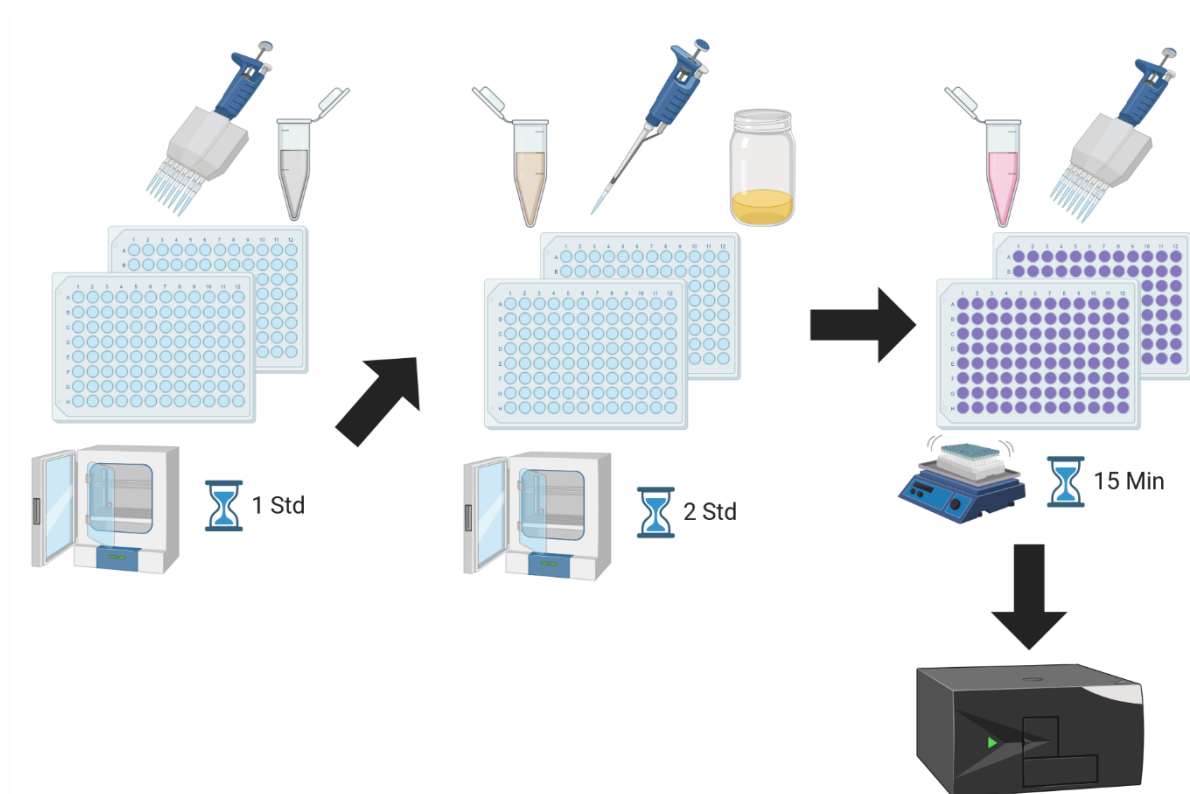


Abbildung 33: Workflow des MTT-Assay, der dem ROS-Assay folgte. Zunächst wurden die HaCaT-Zellen nach UVA-Bestrahlung gewaschen und dann eine Stunde mit 100 µL PBS+ (grau) im Inkubator belassen. Nach dieser Überbrückungszeit wurden die Zellen erneut gewaschen und dann 200 µL DMEM farblos, 5% FBS (braun) in jedes well vorgelegt. Dazu kamen je 20 µL MTT-Farbstoff (gelb). Nach 2 Stunden Inkubationszeit erfolgte die Absaugung und das Hinzugeben von 100 µL DMSO (rosa). Nach 15 Minuten am Kreisschüttler wurden die Absorption der Platten im Tecan™ vermessen. Erstellt in <https://BioRender.com>

In der einstündigen Wartezeit nach dem ROS-Assay wurde phenolrotfreies DMEM 5 % FBS im Wasserbad auf 37 °C erwärmt und 7,5 mg MTT-Farbstoff (Ch. Nr.: 4191745, Merck, Darmstadt, Deutschland) in 3 mL sterilem PBS+ vermischt und unter Beibehaltung des Lichtschutzes im Ultraschallbad gelöst. Das phenolrotfreie Medium ist notwendig, um keine Überlappung des Detektionssignals mit dem MTT-Farbstoff und seiner Umfärbung in das tiefblaue Formazansalz hervorzurufen.

Nach Ablauf der einstündigen Übergangsphase im Inkubator wurde das PBS+ aus den wells wieder entfernt, abermals mit 100 µL gewaschen und im Anschluss in alle behandelten wells 200 µL phenolrotfreies DMEM 5% pipettiert. Danach erfolgte die Zugabe von 20 µL MTT-Lösung in die wells. Die Platte wurde für zwei Stunden bei 37 °C und 5 % (v/v) CO₂ inkubiert. Nach dieser letzten Inkubation wurde der Überstand aus den wells abgesaugt und eine leicht violette Färbung der Zellen am Wellboden kam zum Vorschein. Diese Färbung wurde durch Zugabe von 100 µL DMSO intensiviert und die Platte zur gleichmäßigen Verteilung für 15 Minuten auf einem Kreisschüttler bei 100 Umdrehungen pro Minute belassen. Im Anschluss wurde die Absorption bei einer Wellenlänge von 540 nm im Tecan™ gemessen.

3.8 Methodenvalidierung mit Vitamin C

Vor den Versuchen mit KRG- und HYP-Extrakten bzw. NEs wurde eine Methodenvalidierung durchgeführt. Das Ziel dieser Validierung lag in der Optimierung der Bestrahlungsdosis. So sollte der induzierte oxidative Stress ausreichend sein, um eine Umwandlung des Fluoreszenzfarbstoffes zu bewirken, ohne dass die Zellviabilität unter 80 % fiel. Als Bestrahlungsintensitäten wurden 0,75, 0,5 und 0,25 J/cm² mit jeweils fünf biologischen Replikaten getestet. Ascorbinsäure diente als Positivkontrolle.

Die Unterschiede zum bisherigen Protokoll von Tag 2 lauten daher folgendermaßen: Eine 1 mM Lösung von Ascorbinsäure (Ch. Nr.: 23J00645 FA053230 // 24.04.2023 // GATT-KOLLER, Absam, Österreich) wurde zu 50 µL in die wells der jeweils rechten Spalte der drei Behandlungssegmente pipettiert. Die jeweils anderen beiden Spalten wurden nur mit PBS+ überschichtet (Abbildung 34).

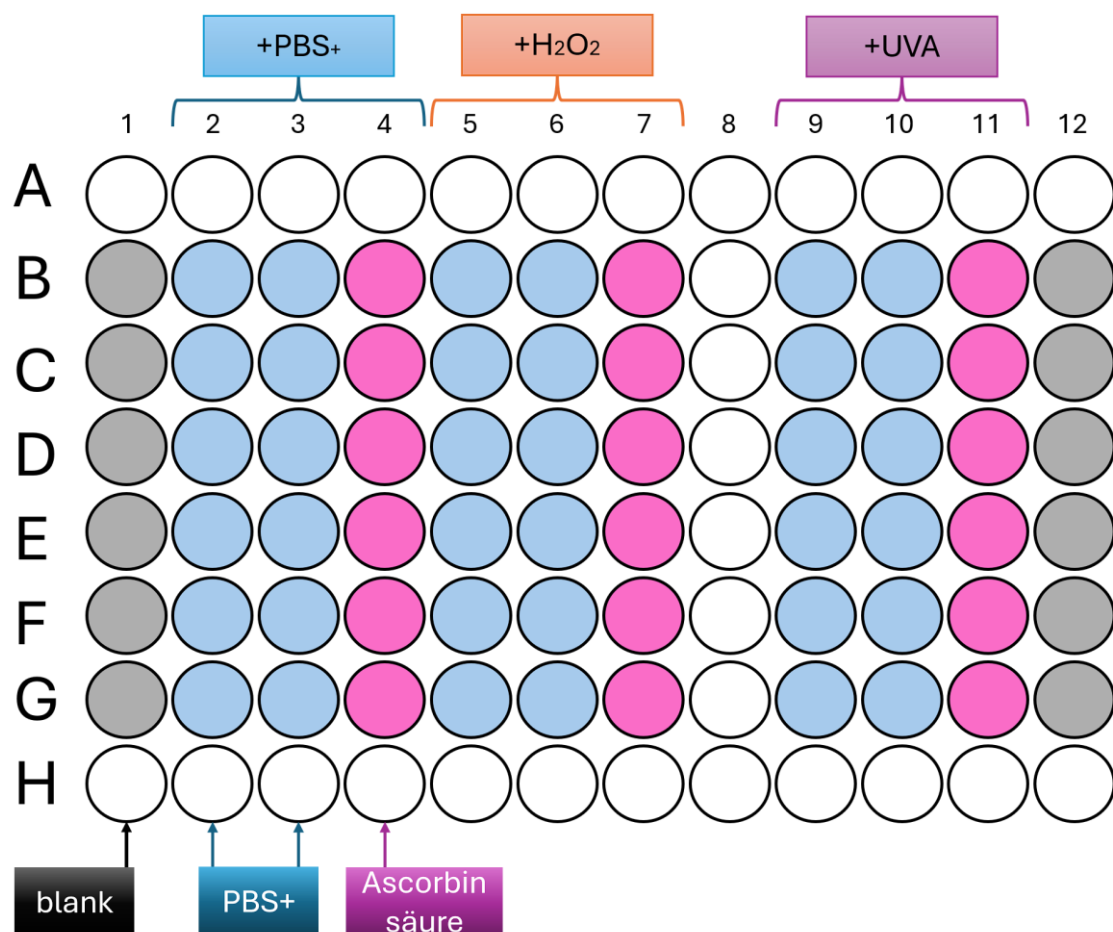


Abbildung 34: Pipettierschema mit den oben ersichtlichen drei Bereichen unbehandelt / untreated (blau), mit H_2O_2 behandelt / treated (orange) und mit UVA bestrahlt / UVA treated (violett). Jeder Bereich besteht aus drei Zellspalten, wobei die ersten beiden jeweils mit PBS+, die letzte mit der Ascorbinsäure Verdünnung, als Negativkontrolle für oxidativen Stress inkubiert wurde. Spalte 1 und 12 sind zellfrei und dienen als blank.

Nach der Inkubation und Behandlung mit PBS+ bzw. H_2O_2 nach dem gleichem Schema NC, TC und UC erfolgte die UVA-Bestrahlung im UVACube. Hier wurde in einem ersten Versuchsdurchlauf zunächst mit $0,75 \text{ J/cm}^2$, später mit $0,50 \text{ J/cm}^2$ und schließlich mit $0,25 \text{ J/cm}^2$ bestrahlt, wobei sich die Bestrahlungszeit nach der bereits beschriebenen Formel errechnete.

Die Ergebnisse hinsichtlich Fluoreszenz-Spektrophotometrie und anschließender Viabilitätsüberprüfung waren wesentlich für die Entscheidung, mit welcher Bestrahlungsintensität nachfolgende Versuche durchgeführt werden sollten. Fluoreszenz-Emissionswerte aus den Segmenten TC (H_2O_2 als Positivkontrolle für oxidativen Stress) und UC (UVA-Strahlung als Induktor für oxidativen Stress), sollten niedriger sein, wenn sie vor der Bestrahlung mit Vitamin C inkubiert wurden.

3.9 Nanoemulsionen

3.9.1 Herstellung der Nanoemulsionen

Die Öl in Wasser (O/W) Emulsionen wurden als Variante einer bereits von der Arbeitsgruppe beschriebenen Methode angefertigt [17, 115]. Für einen Zubereitungsansatz von 20 g stellte man zunächst Öl- und Wasserphase separat her und vereinigte diese im Laufe der Herstellung. Die Zusammensetzung der drei hergestellten NEs ist in Tabelle 4 angeführt.

Tabelle 4: Zusammensetzung der Nanoemulsionen

Bestandteil	blank	KRG	HYP
LIPOID S.75 [®]	0,5 g	0,5 g	0,5 g
Mittelkettige Triglyceride	4,0 g	4,0 g	4,0 g
Tween 80 [®]	0,5 g	0,5 g	0,5 g
KRG	/	0,4 g	/
HYP	/	/	0,1 g
Gereinigtes Wasser	15,0 g	14,6 g	14,9 g

Zuerst wurde LIPOID S.75[®] zu 0,5 g in ein Becherglas eingewogen. Ein zügiges Arbeiten erwies sich als vorteilhaft, da das Phospholipidgemisch bereits nach kurzer Zeit außerhalb des Gefrierschranks zu klumpen begann. Große Brocken wurden mechanisch mit einem Spatel vorab zerkleinert, da sonst ihre Auflösung in der Ölphase mehr Zeit in Anspruch genommen hätte. Danach wurden mittelkettige Triglyceride zu 4,0 g hinzupipettiert, ein Magnetrührstäbchen eingebracht und das Becherglas mit einem Parafilm bedeckt. Dieser verhindert den Substanzverlust durch Verdunstung während des Erhitzungsvorganges. Die Ölphase wurde danach für 45 Minuten bei 60°C und 600 rpm mithilfe eines Magnetrührers gerührt. Ein angebrachtes Thermometer tauchte dabei konstant unter die Oberfläche, um die Temperatur zu messen, die stabil gehalten wurde. In der Zwischenzeit wurden die für die Wasserphase erforderlichen Reagenzien eingewogen. Zu 0,5 g Tween 80[®] kamen je nach Nanoemulsion entsprechende Mengen KRG-Extrakt, HYP-Extrakt und

gereinigtes Wasser hinzu. Im Falle der blank Nanoemulsion wurde die Differenz zu insgesamt 20 g Nanoemulsion direkt mit gereinigtem Wasser aufgefüllt. Die Wasserphase wurde nach Einbringen des Magnetrührstäbchens und Anbringen eines Parafilms ebenfalls unter Temperaturkontrolle auf einen Magnetrührer (50 °C und 600 rpm) gestellt, nachdem die Ölphase bereits 30 Minuten gerührt hatte. Parallel wurde sichergestellt, dass sich das Lecithin in der Ölphase bereits vollständig dispergiert hat. Nach Ablauf von insgesamt 45 Minuten wurde die Wasserphase mit einer Pipette tropfenweise unter konstantem Rühren in die Ölphase eingebracht. Die dabei entstandene Emulsion wurde noch für weitere 15 Minuten bei 50 °C und 500 rpm temperaturkontrolliert gerührt.

Nach Entfernen des Magnetrührstäbchens wurden die NEs mit dem Ultra-Turrax (*Omni 5000*; Omni International, Kennesaw, GA, USA) für 2 min bei 2000 rpm vorhomogenisiert. Im darauffolgenden Schritt erfolgte die finale Homogenisierung mithilfe eines Hochdruckhomogenisators für sieben Minuten bei 700 bar. Dabei wurde jeweils nach zwei und fünf Minuten ein kleiner Teil der entstehenden Nanoemulsion in einem Becherglas zurück aufgefangen und durch kreisende Bewegungen auf einer flachen Ebene zusätzlich homogenisiert bevor der Anteil wieder dem Hochdruckhomogenisator (*Emulsiflex C3*; Avestin, Mannheim, Deutschland) zugeführt wurde. Schließlich wurde nach Ablauf der Zeit die frisch hergestellte Nanoemulsion in einer Schraubeprouvette aufgefangen, diese verschlossen und bis zu ihrer Verwendung im Kühlschrank (2-6 °C) aufbewahrt.

3.10 Statistische Analyse

Alle Messungen wurden als biologische Replikate zumindest in vierfacher (n=4), bei der Methodvalidierung in fünffacher Ausführung (n=5) durchgeführt. Für die statistische Auswertung sowie die grafische Darstellung der Ergebnisse wurde Microsoft Excel verwendet. Aus den Rohdaten wurde zunächst der Mittelwert und Standardabweichung der intrazellulären ROS und der Zellviabilität berechnet. Daraus wurden Säulendiagramme erstellt, die bei jedem Messpunkt den Mittelwert aus vier bzw. fünf Replikaten sowie jeweils die zugehörige Standardabweichung in Form eines Fehlerbalkens aufzeigen.

Da die Daten nicht normalverteilt waren und immer drei unabhängige Gruppen miteinander auf ihre signifikanten Unterschiede geprüft wurden, kam der Kruskal-Wallis Test mit post hoc Dunn's test zum Einsatz. Bei der UV-Strahlungsdosisoptimierung hatte der MTT-Zellviabilitätsassay normalverteilte Ergebnisse, aber keine vergleichbaren Varianzen. Es wurde daher bei diesem Abschnitt eine Welch correction und ein post hoc Games Howell-Test durchgeführt. Da die Ergebnisse des NE_HYP ROS-Assay normalverteilt waren und gleiche Varianzen besaßen, wurde für diesen Teil eine ANOVA mit post hoc Tukey-Test herangezogen.

Signifikanzen wurden mit $p < 0,05$ = statistisch signifikant (*), $p < 0,01$ = sehr signifikant (**) und $p < 0,001$ = hochsignifikant (***) angegeben. Die Signifikanzen zum Vergleich der H₂O₂ und UVA- Kohorte sind zu diesen Werten analog und werden mit ° statt * bezeichnet.

4 Ergebnisse

Der primäre Endpunkt nach Bestrahlung der Zellkulturplatten war die Messung der Gesamtheit des oxidativen Stresslevels in den UVA-behandelten HaCaT-Zellen im Vergleich zu einer unbehandelten und einer H₂O₂-behandelten Zellkontrolle. Der sekundäre Endpunkt bestand in der Eruiierung der Zellviabilität im Vergleich zu unbehandelten Kontrollzellen.

4.1 Optimierung der UV-Bestrahlungsintensität

Zu Beginn der vorliegenden Arbeit wurde nach einer geeigneten UVA-Bestrahlungsintensität gesucht. Sie sollte sowohl ausreichend hoch sein, um aussagekräftige Unterschiede bei der Fluoreszenz von DCF zwischen unbehandelten und mit H₂O₂ bzw. UVA-Strahlung behandelten Zellen zu liefern und gleichzeitig nicht höher als nötig sein, um nicht übermäßig viele Zellen aufgrund des ausgelösten oxidativen Stresses absterben zu lassen.

Abbildung 35 und 36 zeigen das mittlere Ausmaß der ROS-Produktion bzw. die mittlere Zellviabilität nach Exposition gegenüber unterschiedlichen UVA-Energiedichten im Vergleich zu einer gänzlich unbehandelten und einer unbestrahlten, H₂O₂-behandelten Kontrolle. Das Ausmaß der ROS-Bildung und die Zellüberlebensrate der Kontrolle (unbehandelt, unbestrahlt) nach Durchführung der Versuche wird als Referenzwert (1,0 bzw. = 100 %) gesetzt.

Eine UVA-Energiedichte von 0,5 und 0,75 J/cm² erzeugte rund zehnfache ROS-Bildung im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Zellen nach Bestrahlung mit 0,75 J/cm² (neun Minuten, 1,4 mW/cm²), zeigten eine geringe Überlebensrate. Auch nach Bestrahlung mit 0,5 J/cm² (sechs Minuten mit 1,4 mW/cm²) lag die Viabilität unter 80 %. Nach Bestrahlung mit 0,25 J/cm² trat deutlich geringere ROS-Produktion auf, die jener der Positivkontrolle H₂O₂ nahekam. Auch die Zellviabilität war vergleichbar mit jener der H₂O₂-behandelten Zellen; in beiden Fällen lag sie über 80 %. Für das Vorgehen bei weiteren Versuchen der Arbeit wurde demnach eine UVA-Bestrahlungsdosis von 0,25 J/cm² bzw. eine Bestrahlung von drei Minuten mit 1,4 mW/cm² gewählt.

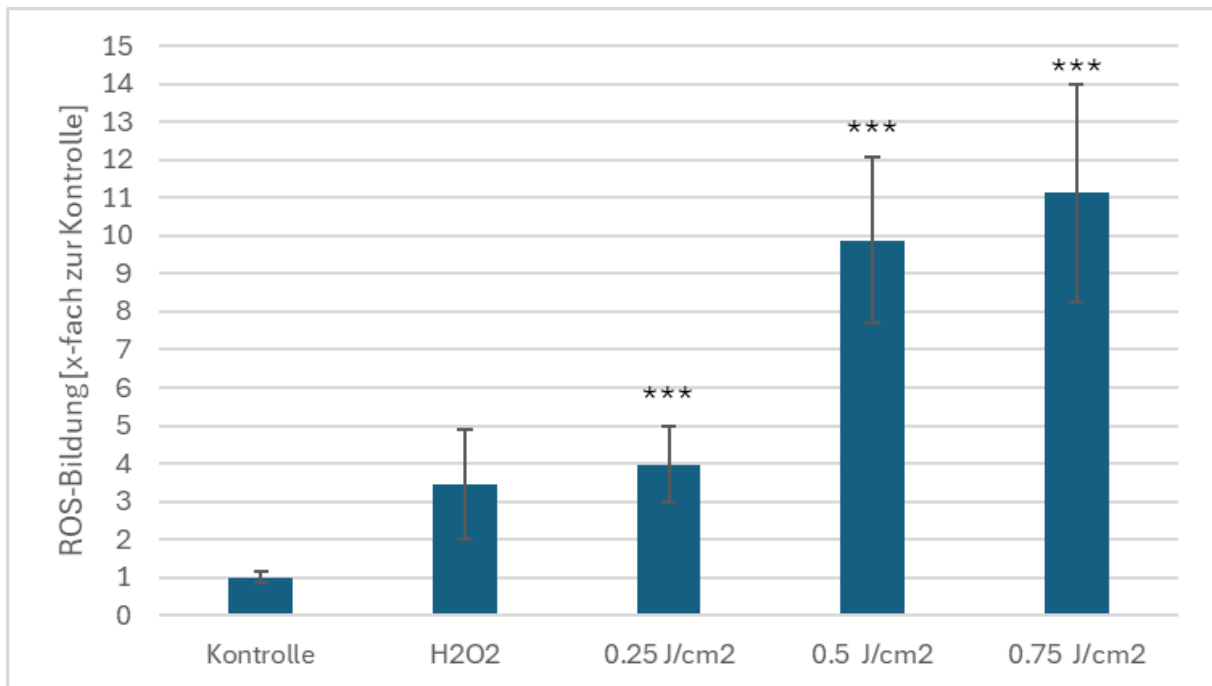


Abbildung 35: Durchschnittliche ROS-Produktion in HaCaT-Keratinocyten unter Behandlung mit H_2O_2 bzw. mit einer bestimmten UVA-Bestrahlungsdichte. Die ROS-Produktion der behandelten Zellen sind als ein Vielfaches der ROS-Produktion in unexponierten Kontrollzellen dargestellt. Die Werte entsprechen MW $\pm$ STABW von n=5 Versuchen. Die statistische Signifikanz vs. Kontrolle mit einem p-Wert < 0,001 ist durch *** gekennzeichnet.

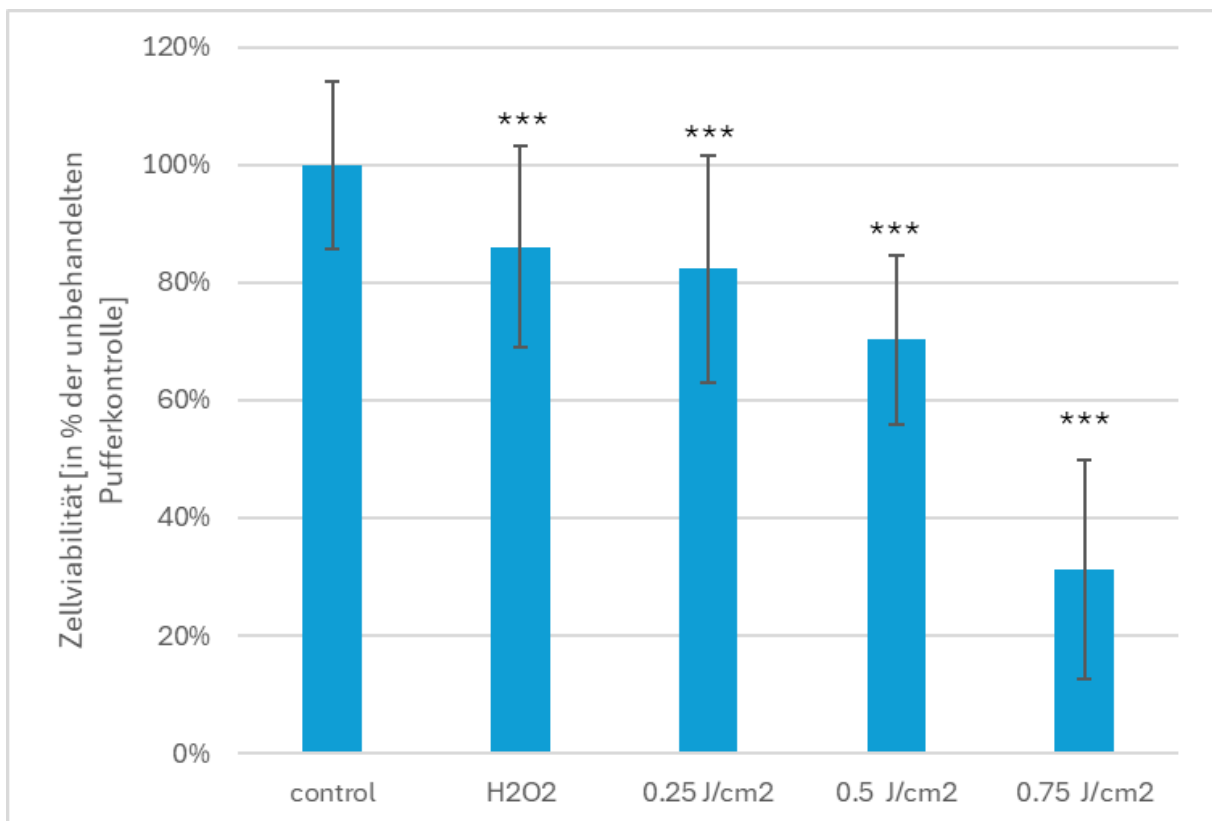


Abbildung 36: Durchschnittliche Zellviabilität der HaCaT-Keratinocyten unter Behandlung mit H_2O_2 bzw. mit einer bestimmten UVA-Bestrahlungsdichte. Die Zellviabilität in den behandelten Zellen ist als Prozentanteil der Zellviabilität der unbehandelten Kontrollzellen dargestellt. Die Werte entsprechen MW $\pm$ STABW von n=5 Versuchen. Die statistische Signifikanz vs. Kontrolle mit einem p-Wert < 0,001 ist durch *** gekennzeichnet.

4.2 KRG-Extrakt: Antioxidative und zellviabilitätsbezogene Effekte

Die Stärke der ROS-Bildung sowie die Zellviabilität nach Applikation von verschiedenen Konzentrationen von KRG sowie Behandlung mit H₂O₂ bzw. UVA-Bestrahlung ist in Abbildung 37 und 38 dargestellt. Zur Kontrolle dienten Zellen, die nur mit PBS-Puffer behandelt und nicht mit UVA bestrahlt wurden. Als Positiv-Kontrolle wurden H₂O₂-behandelte, nicht bestrahlte Zellen herangezogen. Eine Vehikelkontrolle wurde verwendet, um den Einfluss des KRG-Lösungsmittels (40% v/v) auf die ROS-Entstehung zu evaluieren.

HaCaT-Zellen, die mit H₂O₂ oder mit 0,25 J / cm² UVA-Strahlung behandelt wurden, zeigten allgemein höhere ROS-Bildungsraten als unbehandelte Kontrollzellen. Alle KRG-Konzentrationen (25-50 µg/mL) führten in den meisten Fällen zu einem signifikanten Anstieg der UV- und H₂O₂-induzierten ROS-Produktion im Vergleich zur unbehandelten Puffer-Kontrolle (+14-68%, Abbildung 37). Auch im Vergleich zur Vehikel-Kontrolle konnte festgestellt werden, dass KRG-Extrakt zu teilweise signifikanten UV- und H₂O₂-induzierten ROS-Bildungen führte. Tendenziell führten höhere KRG-Konzentrationen zu höherer ROS-Bildung bei allen drei Behandlungsvarianten mit Ausnahme der Gruppe KRG 250 µg/mL, wo starke Schwankungen die Interpretation erschwerten. Die Vehikelkontrolle (40% v/v) führte zu keinem signifikanten Anstieg der UV- und H₂O₂-induzierten ROS-Produktion im Vergleich zur unbehandelten Puffer-Kontrolle.

Bezüglich Zellviabilität zeigte die Behandlung der HaCaT-Zellen mit KRG keine signifikanten Auswirkungen: Die Werte lagen generell über 80 %, mit Ausnahme der oben genannten KRG 250 µg/mL-Gruppe. Behandlung der Zellen mit KRG 25 µg/mL unterlag hierbei den geringsten Schwankungen, erhielt die Zellviabilität vollständig aufrecht und führte zum kleinsten Anstieg des oxidativen Stresses, vergleichbar mit den Werten der Vehikelkontroll-Gruppe.

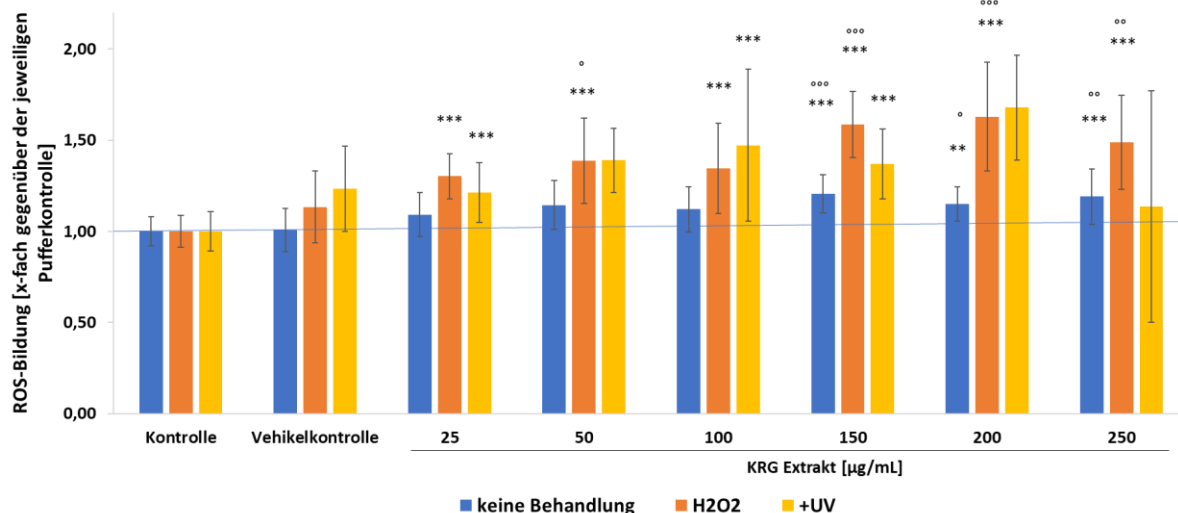


Abbildung 37: ROS-Produktion in HaCaT-Keratinocyten unbehandelt (blau) sowie nach Behandlung mit H₂O₂ (orange) bzw. 0,25 J/cm² UVA (gelb). Signifikante Änderungen durch 60-minütige Prä-Inkubation mit Puffer (Vehikellkontrolle, MW + STABW aus n=24 Versuchen) sowie KRG-Extrakt (25-250 µg/mL Puffer, je MW ± STABW von n=4 Versuchen) sind mit p<0.05 * (Vergleich zur unbehandelten Kontrolle) bzw. ° (Vergleich zur Vehikellkontrolle), p<0.01 ** bzw. °° sowie p<0.001 *** bzw. °°° gekennzeichnet.

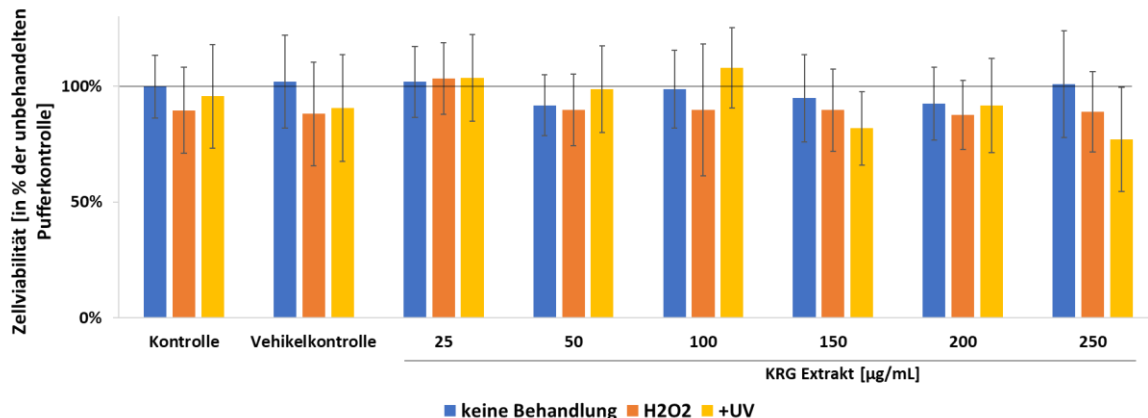


Abbildung 38: Zellviabilität in HaCaT-Keratinocyten unbehandelt (blau) sowie nach Behandlung mit H₂O₂ (orange) bzw. 0,25 J/cm² UVA (gelb). Daten sind als % Viabilität dargestellt, ±STABW, n ≥ 4 Versuchen. Statistische Unterschiede wurden mittels Kruskal Wallis Test + post-hoc Dunn's Test ermittelt.

Diese Versuche wurden mit HYP-Extrakt als pflanzliche Kontrolle analog durchgeführt. Jedoch wurde hier nur eine Konzentration von 12,5 µg/mL getestet.

Im Vergleich zu KRG-Extrakt zeigten die Ergebnisse von HYP-Extrakt (Abbildungen 39 und 40) ein ähnliches Bild bezüglich ROS-Produktion und Zellviabilität. Nach Inkubation wurde ein signifikanter Zuwachs in der ROS-Bildung bei H₂O₂- und UVA-behandelten Zellen im Vergleich zur unbehandelten Puffer-Kontrolle beobachtet. Auch

die Vehikelkontrolle (DMSO) führte zu einem signifikanten Anstieg der UV- und H₂O₂-induzierten ROS-Produktion im Vergleich zur unbehandelten Puffer-Kontrolle.

Bezüglich Zellviabilität zeigte die Behandlung der HaCaT-Zellen mit HYP-Extrakt keine signifikanten Auswirkungen.

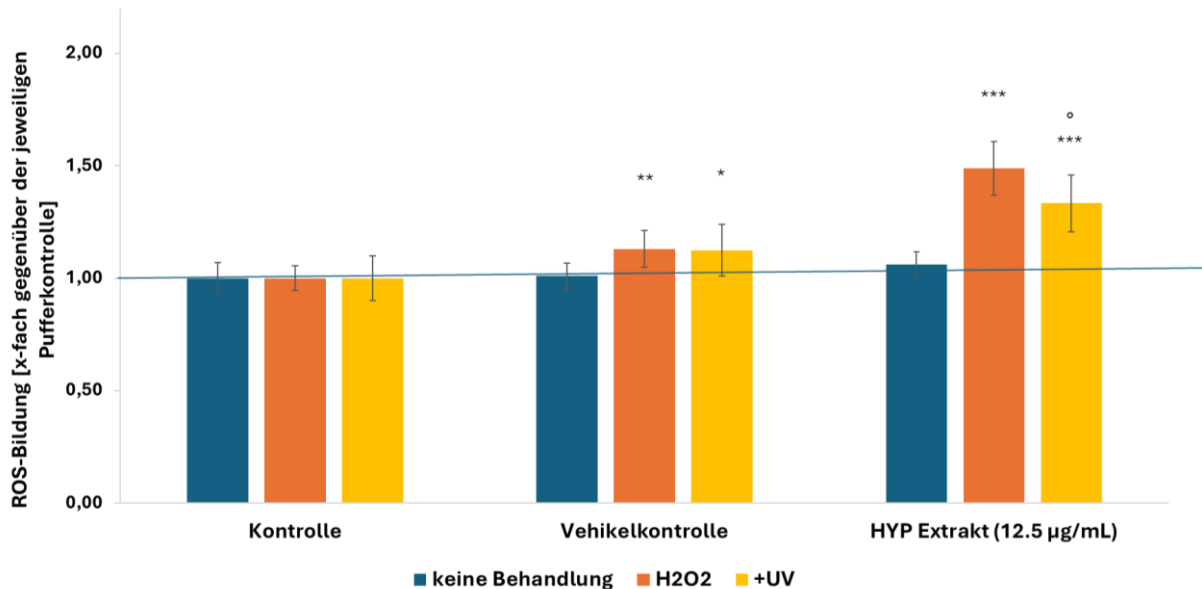


Abbildung 39: ROS-Produktion in HaCaT-Keratinocyten unbehandelt (blau) sowie nach Behandlung mit H₂O₂ (orange) bzw. 0,25 J/cm² UVA (gelb). Signifikante Änderungen durch 60-minütige Prä-Inkubation mit Puffer (Vehikelkontrolle, MW + STABW aus n=4 Versuchen) sowie HYP-Extrakt (12,5 µg/mL Puffer, je MW ± STABW von n=4 Versuchen) sind mit p<0.05 * (Vergleich zur unbehandelten Kontrolle) bzw. ° (Vergleich zur Vehikelkontrolle), p<0.01 ** bzw. °° sowie p<0.001 *** bzw. °°° gekennzeichnet.

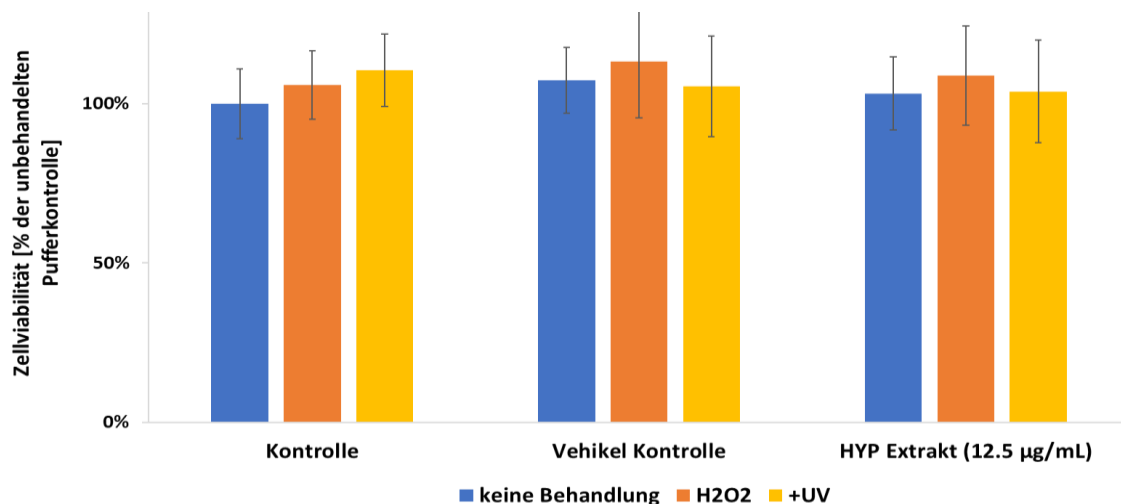


Abbildung 40: Zellviabilität in HaCaT-Keratinocyten unbehandelt (blau) sowie nach Behandlung mit H₂O₂ (orange) bzw. 0,25 J/cm² UVA (gelb). Daten sind als % Viabilität dargestellt, ±STABW, n ≥ 4 Versuchen. Statistische Unterschiede wurden mittels Kruskal Wallis Test + post-hoc Dunn's Test ermittelt.

4.3 KRG-NEs: Antioxidative und zellviabilitätsbezogene Effekte

Analog zu den oben beschriebenen Versuchen wurden auch extrakthaltige NE als wirkstoffbeladene Formulierungen bezüglich ihres Effekts auf ROS-Produktion und Zellviabilität getestet (Abbildung 41 und 42).

Im Vergleich zur Pufferkontrolle zeigte sich verringerte ROS-Bildung nach Inkubation mit NE, jedoch kein linearer Zusammenhang zum KRG-Gehalt. Im Fall von H₂O₂-behandelten Zellen waren nach Inkubation mit NE teils niedrigere, teils höhere ROS-Werte zu beobachten, im Fall von UVA-bestrahlten Zellen nahm die ROS-Bildung durch Inkubation mit NE in allen Fällen ab. Interessanterweise zeigte die mit der höchsten Konzentration an KRG beladene NE für alle Zellen - unbehandelt, H₂O₂-behandelt und UVA-bestrahlt – den stärksten ROS-senkenden Effekt. Die Zellviabilität blieb unabhängig der vorhergehenden Behandlung mit Werten um 100% zum Ausgangswert stabil (Abbildung 42).

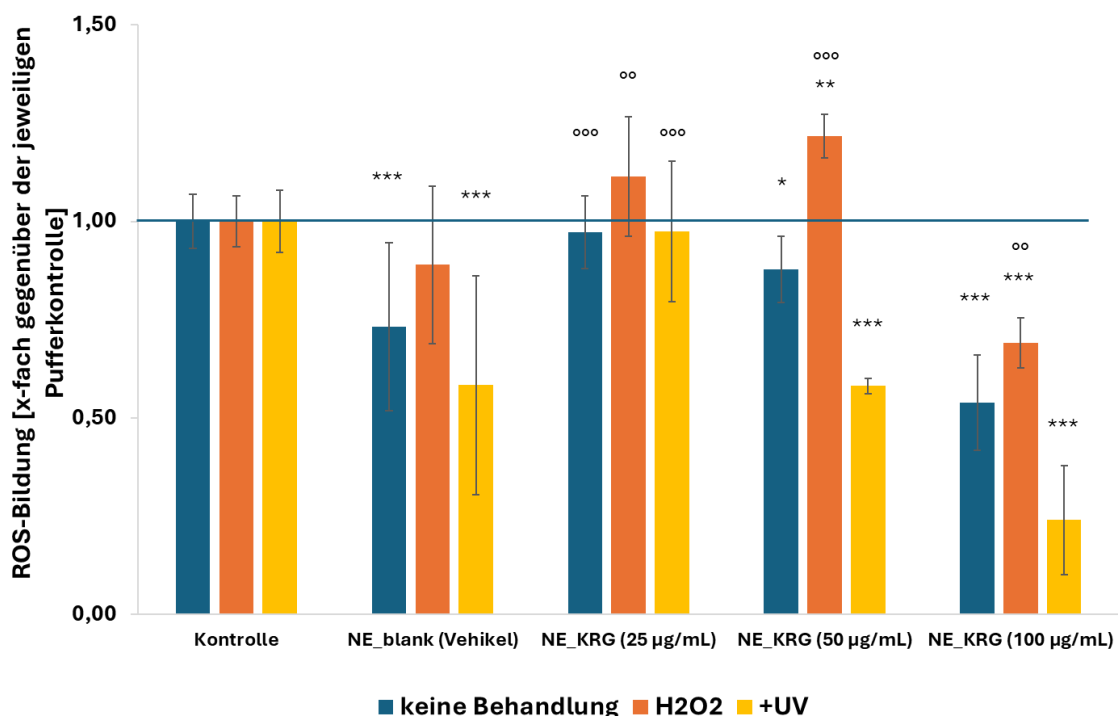


Abbildung 41: ROS-Produktion in HaCaT-Keratinozyten unbehandelt (blau) sowie nach Behandlung mit H₂O₂ (orange) bzw. 0,25 J/cm² UVA (gelb). Signifikante Änderungen durch 60-minütige Prä-Inkubation mit Puffer (Vehikelkontrolle, MW + STABW aus n=12 Versuchen) sowie NE_KRG (25-100 µg/mL Puffer, je MW ± STABW von n=4 Versuchen) sind mit p<0.05 * (Vergleich zur unbehandelten Kontrolle) bzw. ° (Vergleich zur Vehikelkontrolle), p<0.01 ** bzw. °° sowie p<0.001 *** bzw. °°° gekennzeichnet.

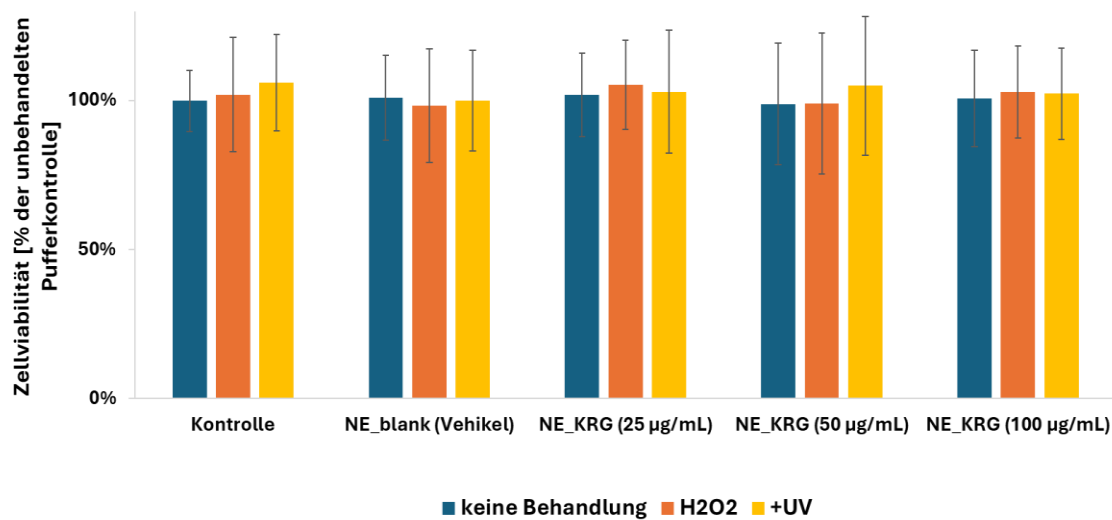


Abbildung 42: Zellviabilität in HaCaT-Keratinozyten unbehandelt (blau) sowie nach Behandlung mit H_2O_2 (orange) bzw. 0,25 J/cm² UVA (gelb). Daten sind als % Viabilität dargestellt, $\pm$ STABW, $n \geq 4$ Versuchen. Statistische Unterschiede wurden mittels Kruskal Wallis Test + post-hoc Dunn's Test ermittelt.

Als pflanzliche Kontrolle diente eine mit HYP-Extrakt beladene NE (HYP-NE), die auf anderen Platten anstelle der KRG-NE in einer Konzentration von 12,5 µg /mL auf die HaCaT-Zellen aufgebracht wurde (Abbildung 43 und 44).

Eine starke Reduktion des ROS-Spiegels war in NE_HYP (12,5 µg/mL)-behandelten und UVA-bestrahlten HaCaT-Keratinozyten ersichtlich, jedoch sank die ROS-Produktion auf vergleichbare Weise auch durch Behandlung mit NE_blank (Abbildung 43).

Mit Blick auf die Zellviabilität (Abbildung 44) lässt sich sagen, dass sowohl die Behandlung mit NE_blank als auch jene mit NE_HYP (12,5 µg/mL) nur zu einer moderaten Reduktion der Zellviabilität im Vergleich zur Kontrolle führte ($p > 0.05$). Einzig bei mit NE_HYP (12,5 µg/mL) behandelten und mit UVA gestressten Zellen ergab sich ein Viabilitätsverlust auf unter 80 %.

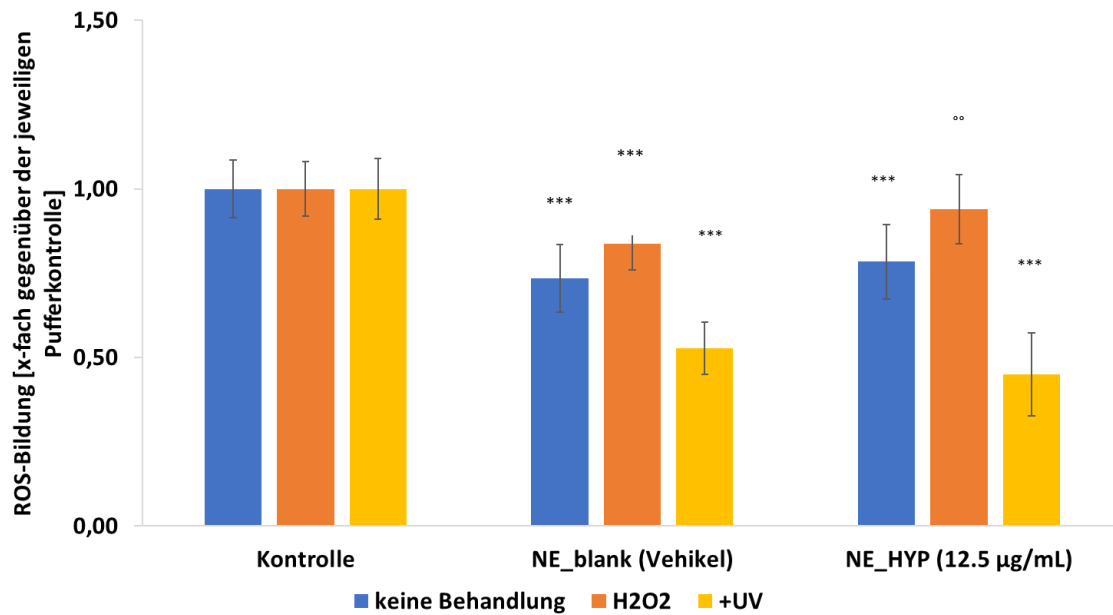


Abbildung 43: ROS-Produktion in HaCaT-Keratinocyten unbehandelt (blau) sowie nach Behandlung mit H₂O₂ (orange) bzw. 0,25 J/cm² UVA (gelb). Signifikante Änderungen durch 60-minütige Prä-Inkubation mit Puffer (Vehikelkontrolle, MW + STABW aus n=4 Versuchen) sowie NE_HYP (12,5 µg/mL Puffer, je MW ± STABW von n=4 Versuchen) sind mit p<0.05 * (Vergleich zur unbehandelten Kontrolle) bzw. ° (Vergleich zur Vehikelkontrolle), p<0.01 ** bzw. °° sowie p<0.001 *** bzw. °°° gekennzeichnet.

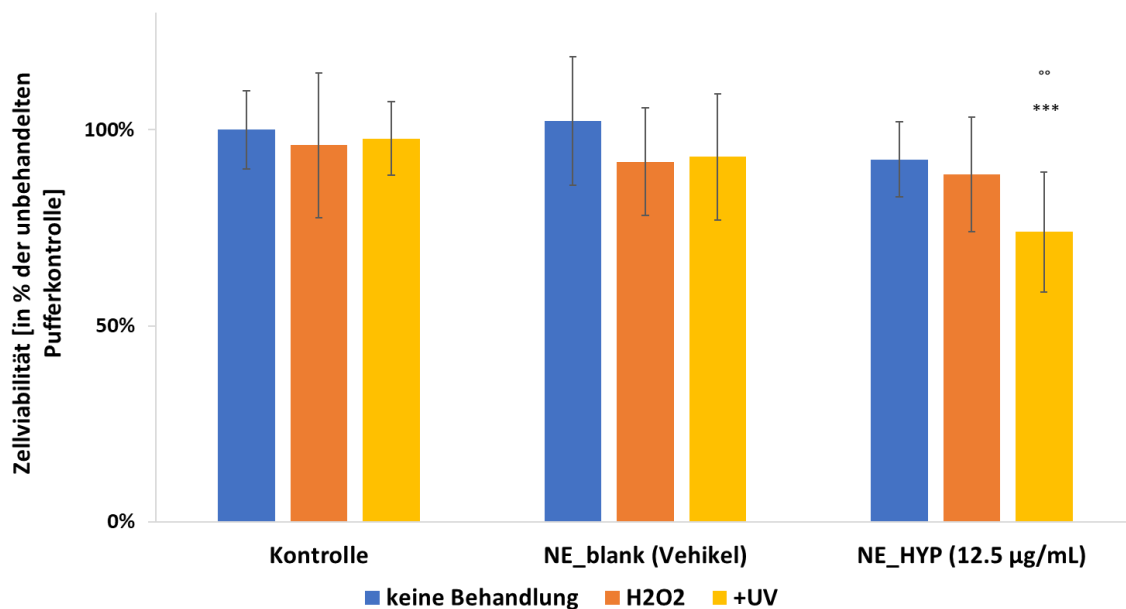


Abbildung 44: Zellviabilität in HaCaT-Keratinocyten unbehandelt (blau) sowie nach Behandlung mit H₂O₂ (orange) bzw. 0,25 J/cm² UVA (gelb). Signifikante Änderungen durch 60-minütige Prä-Inkubation mit Puffer (Vehikelkontrolle, MW + STABW aus n=4 Versuchen) sowie NE_HYP (12,5 µg/mL Puffer, je MW ± STABW von n=4 Versuchen) sind mit p<0.05 * (Vergleich zur unbehandelten Kontrolle) bzw. ° (Vergleich zur Vehikelkontrolle), p<0.01 ** bzw. °° sowie p<0.001 *** bzw. °°° gekennzeichnet.

5 Diskussion

Zunächst war es das Ziel dieser Arbeit, eine geeignete UVA-Bestrahlungsintensität zur Behandlung von HaCaT-Zellen zu ermitteln, um mittels Fluoreszenzfarbstoff DCF eine signifikante ROS-Bildung auszulösen. Jedoch sollte die Zellviabilität im Vergleich zu einer unbestrahlten Zellpopulation nicht unter 80 % sinken. Dieser Versuchsaufbau wurde anhand einer vorangegangenen Arbeit entwickelt, die sich mit dem Effekt von UV-Filtern zum Schutz von HaCaT-Keratinocyten und humanen Fibroblasten auseinandersetzte [56]. Die dort eingesetzten UVA-Strahlungsdosen für HaCaT-Zellen waren mit 4,91 bzw. 0,38 mJ/cm²/Sekunde und resultierenden Energiemengen von 73,65 mJ/cm² bzw. 5,7 mJ/cm² relativ hoch. In Vorversuchen der Arbeitsgruppe wurde mit diesen Energiemengen die Zellviabilität insbesondere in Kombination mit Faktoren zur Auslösung von ROS-Bildung wie H₂O₂ auf weit unter 80% herabgesetzt.

Da es das erste Ziel unserer Bestrahlungsstudien war, messbare ROS-Bildung unter Beibehalt einer Zellviabilität von über 80% auszulösen, wurde auf bisherigen Erkenntnissen aufgebaut (UVA-Bestrahlungsintensität unter 1 J/cm², H₂O₂-Zugabe 100 µM als Stressor). Zunächst wurde also die genaue Methodik mittels Ascorbinsäure, einem potenten Antioxidans, als Kontrolle optimiert.

Es wurden drei UVA-Bestrahlungsintensitäten getestet; hierbei erwies sich eine moderate Menge von 0,25 J/cm² als am besten geeignet. Höhere Intensitäten von 0,5 J/cm² und 0,75 J/cm² bewirkten zwar hohe ROS-Bildung und zeigten deutlich den antioxidativen Effekt von Ascorbinsäure, jedoch verursachten beide signifikantes Zellsterben.

Laut Literatur zeigten verschiedene Versuche bisher die antioxidative Wirkung von KRG-haltigen Formulierungen sowie anderen pflanzlichen und chemischen Komponenten [17, 56, 71, 76]. So ergab eine Studie an Ratten, dass KRG_NEs im Vergleich zum reinen KRG-Extrakt eine höhere Reduktion des durch BPA (Bisphenol A) ausgelösten oxidativen Stresses boten [71]. Vorangegangenen Arbeiten unserer Gruppe befassten sich mit Messung der Radikalfängerkapazität von KRG in Extraktform, in NEs sowie Hydrogelen mittels DPPH-Assay. KRG war hierbei sowohl als Extrakt (2 % w/w) als in Formulierungen als Radikalfänger wirksam, jedoch weniger effektiv als HYP-Extrakt (0,5 % w/w) oder Ascorbinsäure [17].

In der vorliegenden Arbeit hingegen bewirkte KRG als Extrakt (2 % w/w) in keiner Konzentration eine signifikante Senkung des ROS-Levels in HaCaT-Zellen nach Induktion von oxidativem Stress durch H₂O₂ oder UVA-Bestrahlung. KRG-Extrakt in NEs senkte den ROS-Spiegel, jedoch nur im Fall von durch UVA ausgelöster ROS-Bildung und nicht im Fall von H₂O₂-induziertem ROS-Anstieg. Die Vehikelkontrolle ohne KRG selbst führte hierbei ebenfalls zu einer Senkung der ROS-Bildung.

Eine mögliche Erklärung wäre eine potenzielle Abschattung der UVA-Strahlung durch die Testformulierungen trotz starker Verdünnung mit Phosphatpuffer. Das leicht trübe Erscheinungsbild fängt den physikalischen Stressor UVA-Strahlung hierbei stärker ab als den chemischen Induktor H₂O₂.

Interessanterweise finden sich in der Literatur Hinweise auf Vorteile dermalen Vehikel bzgl. zellschützender Effekte. Die Einbettung des UV-empfindlichen Wirkstoffs Resveratrol in Nano- und Mikroemulsionen kann zur Erhöhung seiner Stabilität gegenüber UVB beitragen und HaCaT-Zellen vor oxidativem Stress schützen [85]. Primärer Endpunkt dieser Studie war die mittels MTT-Test ermittelte Zellviabilität. Diese war in jener Zellpopulation, die vor der UVB-Bestrahlung mit der Reservatol-Mikroemulsion behandelt wurde, höher als jene der mit unbeladenen Mikroemulsionen behandelten Zellen. Der Unterschied zwischen Kontroll- und behandelten Zellen wurde aber erst ab einer Bestrahlungsenergie über 0,5 J/cm² tragend. Es wurde jedoch kein eigener Test zur direkten Ermittlung der ROS-Konzentration durchgeführt und die Zellen wurden erst 24 Stunden nach Bestrahlung dem MTT-Assay unterzogen.

Die intrazelluläre Aktivität von Resveratrol in NE wurde weiters in einer Studie mit humanen T24 Blasenkrebszellen *in vitro* getestet [98]. Auch dort wurde DCFH₂-DA als Farbstoff eingesetzt, um die intrazelluläre ROS-Produktion nachzuweisen. Nach Applikation von Resveratrol-NEs im Vergleich zu ebenfalls appliziertem Reinstoff ergab sich, dass sich im Mittel der oxidative Stress in jenen Zellen, die mit Resveratrol-NE behandelt wurden, doppelt so hoch war wie nach Behandlung mit unbeladenen NE oder reinem Resveratrol [98].

In einer anderen Studie mit HaCaT-Keratinocyten, welche mit unterschiedlichen Konzentrationen an Fucoxanthin (2,5 - 40 µM) als antioxidativem Carotinoid aus Braunalgen behandelt wurden, wurde ein antioxidativer Effekt nach Exposition gegenüber 1 mM H₂O₂ als Stressor nachgewiesen [125]. Ebenso wurde die Zytotoxizität

erfasst, welche erst bei der höchsten Fucoxanthin-Konzentration von 40 μM zu einem Abfall unter 80 % Zellviabilität führte. Im Vergleich zur vorliegenden Arbeit waren hier andere methodische Bedingungen vorhanden: es wurden nur 100.000 Zellen pro well ausgesät, die anschließende Wachstumsphase betrug 16 Stunden. Die Behandlung erfolgte mit Fucoxanthin sowie N-Acetyl-L-Cystein (NAC) als Positivkontrolle für nur 30 Minuten, es wurde hier 1 mM H_2O_2 hinzupipettiert und nach weiteren 30 Minuten Inkubation wurden 25 μM DCFH₂-DA als Farbstoff hinzugefügt [125]. Im Gegensatz dazu wurden die Zellen in der vorliegenden Arbeit mit DCFH₂-DA und Extrakt bzw. NEs gemeinsam inkubiert, anschließend rund zehn Minuten mit 100 μM H_2O_2 behandelt.

Interessanterweise wurde in der vorliegenden Arbeit ein fördernder Effekt auf ROS-Bildung durch 25 $\mu\text{g/mL}$ KRG sowie die Vehikelkontrolle (40% EtOH) beobachtet, hingegen ein ROS-senkender Effekt durch die NE-Vehikelkontrolle im Fall von UVA-Induktion. Eine Interaktion von DCFH₂-DA und NE während der gemeinsamen Inkubationszeit kann nicht ausgeschlossen werden, welche dazu führen könnte, dass weniger Farbstoff in die Zellen gelangt und DCF-Signal und damit korrelierende ROS-Menge abschwächt. Um diese Hypothese zu stützen, werden jedoch weitere Studien benötigt.

Eine Steigerung der Zellviabilität und antioxidative Aktivität zur Senkung der ROS-Spiegel wurde in einer anderen Studie mit 10-50 $\mu\text{g/mL}$ KRG-Extrakt gezeigt [109]; hierbei wurden strahlungsinduzierte Schäden in HaCaT-Zellen unter Verwendung ionisierender Strahlung ausgelöst, jedoch war der Effekt nicht linear – ebenso wie in der vorliegenden Arbeit. Die Ergebnisse decken sich bezüglich Größenordnung der Zellviabilität bis zu einer Konzentration von 100 $\mu\text{g/mL}$ KRG.

Inwieweit die Radikalfänger-Kapazität einer KRG- bzw. HYP-beladenen NE der Wirkung der reinen Extrakte überlegen ist, lässt sich anhand der vorliegenden Daten nicht abschließend beantworten. Bisherige Ergebnisse mittels DPPH-Assay weisen darauf hin, dass sich bezüglich der Radikalfänger-Kapazität von reinem KRG und KRG-beladenen Vehikeln keine wesentlichen Unterschiede ergeben [17]. Die vorliegenden Daten unterstützen diese Annahme.

6 Conclusio

Eine gute Biokompatibilität von KRG- und HYP-Formulierungen konnte im Rahmen dieser Arbeit für HaCaT-Keratinocyten bestätigt werden. Eine antioxidative Wirkung der beiden Extrakte in Lösung oder in NEs konnte mit dem vorliegenden experimentellen Setup nicht gezeigt werden. Im Gegenteil führten sowohl KRG als auch HYP in Lösung (40% EtOH oder DMSO) zu einer ROS-Zunahme bei Kontrollzellen und noch mehr im Fall von H₂O₂- bzw. UVA-behandelten Zellen. Bei Untersuchung von KRG und HYP in NEs war eine Tendenz zur ROS-Senkung sichtbar, die jedoch dem Effekt der reinen Vehikelkontrolle entsprach. Weitere Studien sollten sich mit einem konzentrationsabhängigen Effekt der beiden Pflanzenextrakte unter Verwendung anderer experimenteller Methoden befassen, um insbesondere die erhöhte intrazelluläre ROS-Bildung nach Extraktzusatz zu untersuchen.

7 Literaturverzeichnis

- [1] McGrath, JA., Uitto, J. Structure and Function of the Skin. In: Griffiths, C., Barker, J., Bleiker, T., Hussain, W., Simpson, R. Rook's Textbook of Dermatology. 10. Auflage. Hoboken: John Wiley & Sons, 2024. ISBN: 978-1-119-70921-3
- [2] Clauss W., Clauss, C. Humanbiologie kompakt. 2. Auflage. Heidelberg: Springer Spektrum Berlin Heidelberg, 2018. 211-214. ISBN: 978-3-662-55849-2
- [3] Rensing, L., Rippe, V. Altern. Heidelberg: Springer Spektrum Berlin Heidelberg, 2014. 54-69. ISBN: 978-3-642-37732-7
- [4] Sticher, O., Heilmann, J., Zündorf, I., Hänsel, R., Steinegger, E. Hänsel / Sticher Pharmakognosie Phytopharmazie. 9. Auflage. Heidelberg: Springer Heidelberg, 2009. 892-902. ISBN: 978-3-642-00963-1
- [5] Terhorst, D. BASICS Dermatologie. 4. Auflage. München: Elsevier Urban & Fischer, 2016. 4-5. ISBN: 978-3-437-42135-8
- [6] Hamm H. Grundlagen Anatomie und Physiologie der Haut. In: Goebeler M, Hamm H. Basiswissen Dermatologie. 2 Auflage. Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2024. 4-9. ISBN: 978-3-662-67328-7
- [7] Anatomische, physiologische und pathophysiologische Grundlagen der Haut. In: Geisslinger, G., Gudermann, T., Hinz, B., Menzel, S., Ruth, P. Mutschler Arzneimittelwirkungen, Pharmakologie – Klinische Pharmakologie - Toxikologie. 11 Auflage. Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, 2020. ISBN 978-3-8047-3663-4
- [8] Tan, I.J., Lio, P.A. From Discovery to Modern Understanding: The Acid Mantle in Dermatology: The acid mantle plays a significant role in the skin barrier, pH balance, and microbiome. Understanding its function has advanced holistic skincare and therapeutic potential in dermatology. *Journal of integrative dermatology*, 2025; 1(1). doi: 10.64550/joid.pemwha98.
- [9] Ph. Eur. 11.0, Grundwerk 2023. Monographie zu Ginsengwurzel, Nr. 1523. Stuttgart: Deutscher Apotheker Verlag, 2023. S. 2303-2305
- [10] Arzneibuch-Kommentar 77. Lieferung, 2025. Kommentar der Monographie zu Ginsengwurzel, Nr. 1523. Stuttgart: Deutscher Apotheker Verlag, 2025.

- [11] Shiell, R., McNab, I., Romerein, M. Pedrotti's Introduction to Optics. 4 Auflage. Cambridge: Cambridge University Press, 2024. 9-13 ISBN: 978-1-009-00843-3
- [12] Sies, H., Cadenas, E. Oxidative stress: damage to intact cells and organs. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 1985;311(1152):617-631. doi: 10.1098/rstb.1985.0168
- [13] Sies, H. Role of reactive oxygen species in biological processes. *Klin Wochenschr.* 1991;69(21-23):965-968. doi: 10.1007/BF01645140.
- [14] Barry, H., Gutteridge, J.M.C. Free Radicals in Biology and Medicine. 5. Auflage. Oxford: Oxford University Press, 2015. 153-283. ISBN: 978-0-191-80213-3
- [15] Li, R., Jia, Z., Trush, M.A. Defining ROS in Biology and Medicine. *React Oxyg Species (Apex).* 2016;1(1):9-21. doi:10.20455/ros.2016.803
- [16] He, M., Huang, X., Liu, S., Guo, C., Xie, Y., Meijer, A.H., Wang, M. The Difference between White and Red Ginseng: Variations in Ginsenosides and Immunomodulation. *Planta Med.* 2018;84(12-13):845-854. doi:10.1055/a-0641-6240
- [17] Pfleger, T., Ortmayr, K., Steiner, K., Zaher, R., Seiser, S., Elbe-Bürger, A., Heiss, E., Klang, V. Radical scavenging effect of skin delivery systems using Korean red ginseng extract and assessment of their biocompatibility with human primary dermal fibroblasts and HaCaT keratinocytes. *Int J Pharm.* 2025;674:125477. doi:10.1016/j.ijpharm.2025.125477
- [18] Juan, C.A., Pérez de la Lastra, J.M., Plou, F.J., Pérez-Lebeña, E. The Chemistry of Reactive Oxygen Species (ROS) Revisited: Outlining Their Role in Biological Macromolecules (DNA, Lipids and Proteins) and Induced Pathologies. *Int. J. Mol. Sci.* 2021; 22(9):4642. doi:10.3390/ijms22094642
- [19] Handy, D.E., Loscalzo, J. Redox regulation of mitochondrial function. *Antioxid Redox Signal.* 2012;16(11):1323-1367. doi:10.1089/ars.2011.4123
- [20] Gorrini, C., Harris, I.S., Mak, T.W. Modulation of oxidative stress as an anticancer strategy. *Nat Rev Drug Discov.* 2013;12(12):931-947. doi:10.1038/nrd4002
- [21] Sies, H. Hydrogen peroxide as a central redox signaling molecule in physiological oxidative stress: Oxidative eustress. *Redox Biol.* 2017;11:613-619. doi:10.1016/j.redox.2016.12.035

- [22] Mailloux, R.J. An Update on Mitochondrial Reactive Oxygen Species Production. *Antioxidants (Basel)*. 2020;9(6):472. doi:10.3390/antiox9060472
- [23] Magnani, F., Mattevi, A. Structure and mechanisms of ROS generation by NADPH oxidases. *Curr Opin Struct Biol*. 2019;59:91-97. doi:10.1016/j.sbi.2019.03.001
- [24] Jomova, K., Raptova, R., Alomar, S.Y., Alwasel, S.H., Nepovimova, E., Kuca, K., Valko, M. Reactive oxygen species, toxicity, oxidative stress, and antioxidants: chronic diseases and aging. *Arch Toxicol*. 2023;97(10):2499-2574. doi:10.1007/s00204-023-03562-9
- [25] Jomova, K., Alomar, S.Y., Alwasel, S.H., Nepovimova, E., Kuca, K., Valko, M. Several lines of antioxidant defense against oxidative stress: antioxidant enzymes, nanomaterials with multiple enzyme-mimicking activities, and low-molecular-weight antioxidants. *Arch Toxicol*. 2024;98(5):1323-1367. doi:10.1007/s00204-024-03696-4
- [26] Bauer, R., Volk, R.-B., Wichtl, M., Loew, D. Ginseng radix und Hyperici herba. In: Blaschek, W. Wichtl – Teedrogen und Phytopharmaka: ein Handbuch für die Praxis. 6. Auflage. Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, 2016. 294-297, 342-345
- [27] Caliri, A.W., Tommasi, S., Besaratinia, A. Relationships among smoking, oxidative stress, inflammation, macromolecular damage, and cancer. *Mutat Res Rev Mutat Res*. 2021;787:108365. doi:10.1016/j.mrrev.2021.108365
- [28] Davalli, P., Marverti, G., Lauriola, A., D'Arca, D. Targeting Oxidatively Induced DNA Damage Response in Cancer: Opportunities for Novel Cancer Therapies. *Oxid Med Cell Longev*. 2018;2018:2389523. doi:10.1155/2018/2389523
- [29] Hawkins, C.L., Davies, M.J. Detection, identification, and quantification of oxidative protein modifications. *J Biol Chem*. 2019;294(51):19683-19708. doi:10.1074/jbc.REV119.006217
- [30] Kulms, D., Schwarz, T. Independent contribution of three different pathways to ultraviolet-B-induced apoptosis. *Biochem Pharmacol*. 2002;64(5-6):837-841. doi:10.1016/s0006-2952(02)01146-2
- [31] Kimeswenger, S., Schwarz, A., Födinger, D., Müller, S., Pehamberger, H., Schwarz, T., Jantschitsch, C. Infrared A radiation promotes survival of human melanocytes carrying ultraviolet radiation-induced DNA damage. *Exp Dermatol*. 2016;25(6):447-452. doi:10.1111/exd.12968

- [32] Sreedhar, A., Aguilera-Aguirre, L., Singh, K.K. Mitochondria in skin health, aging, and disease. *Cell Death Dis.* 2020;11(6):444. doi:10.1038/s41419-020-2649-z
- [33] Berneburg, M., Plettenberg, H., Krutmann, J. Photoaging of human skin. *Photodermatol Photoimmunol Photomed.* 2000;16(6):239-244. doi:10.1034/j.1600-0781.2000.160601.x
- [34] Salminen, A., Kaarniranta, K., Kauppinen, A. Photoaging: UV radiation-induced inflammation and immunosuppression accelerate the aging process in the skin. *Inflamm Res.* 2022;71(7-8):817-831. doi:10.1007/s00011-022-01598-8
- [35] Gulcin, İ. Antioxidants: a comprehensive review. *Arch Toxicol.* 2025;99(5):1893-1997. doi:10.1007/s00204-025-03997-2
- [36] Janciauskiene, S. The Beneficial Effects of Antioxidants in Health And Diseases. *Chronic Obstr Pulm Dis.* 2020;7(3):182-202. doi:10.15326/jcopdf.7.3.2019.0152
- [37] Schlessinger, D.I., Rahimi, N., Schlessinger, J. Biochemistry, Melanin. In: *StatPearls*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing. Verfügbar auf: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/books/NBK459156/> (zugegriffen am 08.10.2025)
- [38] Betts, J.G., Young, K.A, Wise, J. A., Johnson, E., Poe, B., Kruse, D. H., Korol, O., Johnson, J.E., Womble, M., DeSaix, P. Anatomy and Physiology. Houston: OpenStax, 2022. Verfügbar auf: <https://openstax.org/details/books/anatomy-and-physiology-2e> (zugegriffen am 10.10.2025)
- [39] Losada-Barreiro, S., Sezgin-Bayindir, Z., Paiva-Martins, F., Bravo-Díaz, C. Biochemistry of Antioxidants: Mechanisms and Pharmaceutical Applications. *Biomedicines.* 2022;10(12):3051. doi:10.3390/biomedicines10123051
- [40] Halliwell, B. Understanding mechanisms of antioxidant action in health and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2024;25(1):13-33. doi:10.1038/s41580-023-00645-4
- [41] Mirończuk-Chodakowska, I., Witkowska, A.M., Zujko, M.E. Endogenous non-enzymatic antioxidants in the human body. *Adv Med Sci.* 2018;63(1):68-78. doi:10.1016/j.advms.2017.05.005
- [42] Levine, R.L., Mosoni, L., Berlett, B.S., Stadtman, E.R. Methionine residues as endogenous antioxidants in proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996;93(26):15036-15040. doi:10.1073/pnas.93.26.15036

- [43] Alberts, A., Moldoveanu, E.T., Niculescu, A.G., Grumezescu, A.M. Vitamin C: A Comprehensive Review of Its Role in Health, Disease Prevention, and Therapeutic Potential. *Molecules*. 2025;30(3):748. doi:10.3390/molecules30030748
- [44] Fujii, J., Osaki, T., Bo, T. Ascorbate Is a Primary Antioxidant in Mammals. *Molecules*. 2022;27(19):6187. doi:10.3390/molecules27196187
- [45] Aune, D., Keum, N., Giovannucci, E., Fadnes, L.T., Boffetta, P., Greenwood, D.C., Tonstad, S., Vatten, L.J., Riboli, E., Norat, T. Dietary intake and blood concentrations of antioxidants and the risk of cardiovascular disease, total cancer, and all-cause mortality: a systematic review and dose-response meta-analysis of prospective studies. *Am J Clin Nutr*. 2018;108(5):1069-1091. doi:10.1093/ajcn/nqy097
- [46] Takeichi, M., Okada, T.S. Roles of magnesium and calcium ions in cell-to-substrate adhesion. *Exp Cell Res*. 1972;74(1):51-60. doi: 10.1016/0014-4827(72)90480-6
- [47] Vázquez-Ruiz, Z., Toledo, E., Vitelli-Storelli, F., Bes-Rastrollo, M., Martínez-González, M.Á. Effect of dietary phenolic compounds intake on mortality in the „Seguimiento Universidad De Navarra“ (SUN) Mediterranean cohort. *Eur J Nutr*. 2025;64(2):70. doi:10.1007/s00394-025-03581-5
- [48] Agudo, A., Cabrera, L., Amiano, P., Ardanaz, E., Barricarte, A., Berenguer, T., Chirlaque, M.D., Dorronsoro, M., Jaksyn, P., Larrañaga, N., Martínez, C., Navarro, C., Quirós, J.R., Sánchez, M.J., Tormo, M.J., González, C.A. Fruit and vegetable intakes, dietary antioxidant nutrients, and total mortality in Spanish adults: findings from the Spanish cohort 84ft he European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC-Spain). *Am J Clin Nutr*. 2007;85(6):1634-1642. doi:10.1093/ajcn/85.6.1634
- [49] Pietta, P.G. Flavonoids as antioxidants. *J Nat Prod*. 2000;63(7):1035-1042. doi:10.1021/np9904509
- [50] Rudrapal, M., Rakshit, G., Singh, R.P., Garse, S., Khan, J., Chakraborty, S. Dietary Polyphenols: Review on Chemistry/Sources, Bioavailability/Metabolism, Antioxidant Effects, and Their Role in Disease Management. *Antioxidants (Basel)*. 2024;13(4):429. doi:10.3390/antiox13040429
- [51] Kozłowska, A., Szostak-Wegierek, D. Flavonoids—food sources and health benefits. *Rocz Panstw Zakl Hig*. 2014;65(2):79-85.

- [52] Hao, B., Yang, Z., Liu, H., Liu, Y., Wang, S. Advances in Flavonoid Research: Sources, Biological Activities, and Developmental Prospectives. *Curr Issues Mol Biol.* 2024;46(4):2884-2925. doi:10.3390/cimb46040181
- [53] Raftos, J.E., Whillier, S., Kuchel, P.W. Glutathione synthesis and turnover in the human erythrocyte: alignment of a model based on detailed enzyme kinetics with experimental data. *J Biol Chem.* 2010;285(31):23557-23567. doi:10.1074/jbc.M109.067017
- [54] Bodeker, K.L., Smith, B.J., Berg, D.J., Chandrasekharan, C., Sharif, S., Fei, N., Vollstedt, S., Brown, H., Chandler, M., Lorack, A., McMichael, S., Wulfekuhle, J., Wagner, B.A., Buettner, G.R., Allen, B.G., Caster, J.M., Dion, B., Kamgar, M., Buatti, J.M., Cullen, J.J. A randomized trial of pharmacological ascorbate, gemcitabine, and nab-paclitaxel for metastatic pancreatic cancer. *Redox Biol.* 2024;77:103375. doi:10.1016/j.redox.2024.103375
- [55] Paller, C.J., Zahurak, M.L., Mandl, A., Metri, N.A., Lalji, A., Heath, E., Kelly, W.K., Hoimes, C., Barata, P., Taksey, J., Garrison, D.A., Patra, K., Milne, G.L., Anders, N.M., Nauroth, J.M., Durham, J.N., Marshall, C.H., Markowski, M.C., Eisenberger, M.A., Antonarakis, E.S., Carducci, M.A., Denmeade, S.R., Levine, M. High-Dose Intravenous Vitamin C Combined with Docetaxel in Men with Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer: A Randomized Placebo-Controlled Phase II Trial. *Cancer Res Commun.* 2024;4(8):2174-2182. doi:10.1158/2767-9764.CRC-24-0225
- [56] Hofer, S., Stonig, M., Wally, V., Hartmann, A., Fuchs, D., Hermann, M., Paparella, M., Ganzera, M., Gostner, J.M. Contradictory effects of chemical filters in UV/ROS-stressed human keratinocyte and fibroblast cells. *ALTEX.* 2019;36(2):231-244. doi:10.14573/altex.1808201
- [57] Polidori, M.C., Mecocci, P., Levine, M., Frei, B. Short-term and long-term vitamin C supplementation in humans dose-dependently increases the resistance of plasma to ex vivo lipid peroxidation. *Arch Biochem Biophys.* 2004;423(1):109-115. doi:10.1016/j.abb.2003.12.019
- [58] Block, G., Jensen, C.D., Morrow, J.D., Holland, N., Norkus, E.P., Milne, G.L., Hudes, M., Dalvi, T.B., Crawford, P.B., Fung, E.B., Schumacher, L., Harmatz, P. The effect of vitamins C and E on biomarkers of oxidative stress depends on baseline level. *Free Radic Biol Med.* 2008;45(4):377-384. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2008.04.005.

- [59] Thermo Fisher Scientific. Balanced Salt Solutions [Internet]. 2025 Verfügbar unter: <https://www.thermofisher.com/at/en/home/life-science/cell-culture/mammalian-cell-culture/reagents/balanced-salt-solutions.html?icid=fl-bid-balancedsalts> (abgerufen am 13.10.2025)
- [60] Fagundes, M.A., Silva, A.R.C., Fernandes, G.A., Curado, M.P. Dietary Polyphenol Intake and Gastric Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Cancers (Basel)*. 2022;14(23):5878. doi:10.3390/cancers14235878
- [61] Kour, N., Bhagat, G., Singh, S., SBhatti, S., Arora, S., Singh, B., Bhatia, A. Polyphenols mediated attenuation of diabetes associated cardiovascular complications: A comprehensive review. *J Diabetes Metab Disord*. 2023;23(1):73-99. doi:10.1007/s40200-023-01326-x
- [62] Londoño, C., Cayssials, V., de Villasante, I., Crous-Bou, M., Scalbert, A., Weiderpass, E., Agudo, A., Tjønneland, A., Olsen, A., Overad, K., Katzke, V., Schulze, M., Palli, D., Krogh, V., Santucci de Magistris, M., Tumino, R., Ricceri, F., Gram, I.T., Rylander, C., Skeie, G., Sánchez, M.J., Amiano, P., Huerta, J.M., Barricarte, A., Sartor, H., Sonestedt, E., Esberg, A., Idahl, A., Mahamat-Saleh, Y., Laouali, N., Kvaskoff, M., Turzanski-Fornier, R., Zamora-Ros, R. Polyphenol Intake and Epithelial Ovarian Cancer Risk in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC) Study. *Antioxidants (Basel)*. 2021;10(8):1249. doi:10.3390/antiox10081249
- [63] Auclair, S., Chironi, G., Milenkovic, D., Hollmann, P.C., Renard, C.M., Ménégnien, J.L., Gariepy, J., Paul, J.L., Simon, A., Scalbert, A. The regular consumption of a polyphenol-rich apple does not influence endothelial function: a randomised double-blind trial in hypercholesterolemic adults. *Eur J Clin Nutr*. 2010;64(10):1158-1165. doi:10.1038/ejcn.2010.135
- [64] Duda-Chodak, A., Tarko, T. Possible Side Effects of Polyphenols and Their Interactions with Medicines. *Molecules*. 2023;28(6):2536. doi:10.3390/molecules28062536
- [65] Boukamp, P., Petrussevska, R.T., Breitkreutz, D., Hornung, J., Markham, A., Fusenig, N.E. Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line. *J Cell Biol*. 1988;106(3):761-771. doi:10.1083/jcb.106.3.761

- [66] Gstraunthaler, G., Lindl, T. Zell- und Gewebekultur: Allgemeine Grundlagen und spezielle Anwendungen, 8.Auflage. Heidelberg: Springer Spektrum Verlag, 2021. doi:10.1007/978-3-662-62606-1
- [67] Schmitz, S. Der Experimentator: Zellkultur, 4. Auflage. Heidelberg: Springer Spektrum Verlag, 2020. doi:10.1007/978-3-662-58951-9
- [68] van der Valk, J., Bieback, K., Buta, C., Cochrane, B., Dirks, W. G., Fu, J., Hickman, J.J., Hohensee, C., Kolar, R., Liebsch, M., Pistollato, F., Schulz, M., Thieme, D., Weber, T., Wiest, J., Winkler, S., Gstraunthaler, G. Fetal Bovine Serum (FBS): Past - Present - Future. *ALTEX*. 2018;35(1):99-118. doi:10.14573/altex.1705101
- [69] Colombo, I., Sangiovanni, E., Maggio, R., Mattozzi, C., Zava, S., Corbett, Y., Fumagalli, M., Carlino, C., Corsetto, P.A., Scaccabarozzi, D., Calvieri, S., Gismondi, A., Taramelli, D., Dell'Agli, M. HaCaT Cells as a Reliable In Vitro Differentiation Model to Dissect the Inflammatory/Repair Response of Human Keratinocytes. *Mediators Inflamm*. 2017;2017:7435621. doi:10.1155/2017/7435621
- [70] Bae, I.A., Ha, J.W., Choi, J.Y., Boo, Y.C. Antioxidant Effects of Korean Propolis in HaCaT Keratinocytes Exposed to Particulate Matter 10. *Antioxidants (Basel)*. 2022;11(4):781. doi:10.3390/antiox11040781
- [71] El-Shimi, B.I., Mohareb, R.M., Ahmed, H.H., Abohashem, R.S., Mahmoud, K.F., Hanna, D.H. Panax ginseng nanoemulsion for counteracting male infertility via modulating sex hormones and oxidative stress in a rat model. *Sci Rep*. 2024;14(1):29239. doi:10.1038/s41598-024-79388-x
- [72] Royal Botanic Gardens. POWO – Plants of the World Online. 2025. *Panax ginseng* C.A.Mey. Verfügbar auf: <https://powo.science.kew.org/> (zugegriffen am 15.09.2025)
- [73] Reiniers, M.J., van Golen, R.F., Bonnet, S., Broekgaarden, M., van Gulik, T.M., Egmond, M.R., Heger, M. Preparation and Practical Applications of 2',7'-Dichlorodihydrofluorescein in Redox Assays. *Anal Chem*. 2017;89(7):3853-3857. doi:10.1021/acs.analchem.7b00043
- [74] Carini, M., Aldini, G., Piccone, M., Facino, R.M. Fluorescent probes as markers of oxidative stress in keratinocyte cell lines following UVB exposure. *Farmaco*. 2000;55(8):526-534. doi:10.1016/s0014-827x(00)00037-9

- [75] Zielonka, J., Kalyanaraman, B. Small-molecule luminescent probes for the detection of cellular oxidizing and nitrating species. *Free Radic Biol Med.* 2018;128:3-22. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2018.03.032
- [76] Galani, E., Galatis, D., Tzoka, K., Papadimitriou, V., Sotiroudis, T.G., Bonos, A., Xenakis, A., Chatzidaki, M.D. Natural Antioxidant-Loaded Nanoemulsions for Sun Protection Enhancement. *Cosmetics.* 2023;10(4):102
doi:10.3390/cosmetics10040102
- [77] Achmüller, A. Echter Ginseng - HMPPA-Monographien. Österreichische Apothekerzeitung. Ausgabe 13, 2020. 50-53
- [78] Frohne, D., Classen, B., Heilpflanzenlexikon – Ein Leitfaden auf wissenschaftlicher Grundlage. 8.Auflage. Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, 2006. 273-277, 355-357. ISBN: 978-3-8047-2316-0
- [79] Schweins, S., Sonnenborn, U. Panax. In: Blaschek, W., Ebel, S., Hackenthal, E., Holzgrabe, U., Keller, K., Reichling, J., Schulz, V. Hagers Enzyklopädie der Arzneistoffe und Drogen. 6.Auflage. Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, 2007. 983-1010. ISBN: 978-3-8047-2384-9
- [80] Gledhill, D. The Names of Plants. 4. Auflage. Cambridge: Cambridge University Press, 2008. 178. ISBN: 978-0-5216-8553-5
- [81] Alexandra-Friederike von, T., Schmitz, O.J. Qualitätskontrolle in der TCM: Chinesische Heilpflanzen auf dem Prüfstand. Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2019. 91. ISBN: 978-3-662-59255-7
- [82] Gauger, G. (Hrsg.). Repertorium für Pharmacie und practische Chemie in Russland, oder Zusammenstellung des Wichtigsten und Wissenswerthesten aus den neuesten Entdeckungen im Gebiete der Pharmacie und Chemie, mit vorzüglicher Rücksicht auf das Russische Reich. Erster Jahrgang 1842. St. Petersburg, 1842. 524-528, 874-875. doi: 10.24355/dbbs.084-201703021440-0
- [83] Yun, T.K. Brief introduction of Panax ginseng C.A. Meyer. *J Korean Med Sci.* 2001;16:3-5. doi:10.3346/jkms.2001.16.S.S3
- [84] Huang, L., Li, H.J., Wu, Y.C. Processing technologies, phytochemistry, bioactivities and applications of black ginseng-a novel manufactured ginseng product: A

comprehensive review. *Food Chem.* 2023;407:134714.

doi:10.1016/j.foodchem.2022.134714

[85] Juškaitė, V., Ramanauskienė, K., Briedis, V. Testing of resveratrol microemulsion photostability and protective effect against UV induced oxidative stress. *Acta Pharm.* 2017;67(2):247-256. doi:10.1515/acph-2017-0018

[86] Ph. Eur. 11.0, Grundwerk 2023. Monographie zu Ginsengtrockenextrakt, Nr. 2356. Stuttgart: Deutscher Apotheker Verlag, 2023. S. 2301-2302

[87] Arzneibuch-Kommentar 77. Lieferung, 2025. Kommentar der Monographie zu Ginsengtrockenextrakt, Nr. 2356. Stuttgart: Deutscher Apotheker Verlag, 2025.

[88] Teuscher, E. Biogene Arzneimittel. 5.Auflage. Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, 1997. 149-161. ISBN: 3-8047-1482-X

[89] Lee, S.M., Bae, B.S., Park, H.W., Ahn, N.G., Cho, B.G., Cho, Y.L., Kwak, Y.S. Characterization of Korean Red Ginseng (*Panax ginseng* Meyer): History, preparation method, and chemical composition. *J Ginseng Res.* 2015;39(4):384-391. doi:10.1016/j.jgr.2015.04.009

[90] Sun B.S., Gu, L.J., Fang, Z.M., Wang, C.Y., Wang, Z., Lee, M.R., Li, Z., Li, J.J., Sung, C.K., Simultaneous quantification of 19 ginsenosides in black ginseng developed from *Panax ginseng* by HPLC-ELSD. *J Pharm Biomed Anal.* 2009;50(1):15-22. doi:10.1016/j.jpba.2009.03.025

[91] Sun, B.S., Pan, F.Y., Sung, C.K. Repetitious steaming-induced chemical transformations and global quality of black ginseng derived from *Panax ginseng* by HPLC-ESI-MS/MSⁿ based chemical profiling approach. *Biotechnol Bioproc.* 2011;16:956–965. doi:10.1007/s12257-011-0079-6

[92] Steiner, K., Schmolz, J.J., Hoang, F., Wolf, H., Seiser, S., Elbe-Bürger, A., Klang, V. Surfactants for stabilization of dermal emulsions and their skin compatibility under UVA irradiation: Diacyl phospholipids and polysorbate 80 result in high viability rates of primary human skin cells. *Int J Pharm.* 2024;653:123903. doi:10.1016/j.ijpharm.2024.123903

[93] Zeng, M., Zhang, K., Yang, J., Zhang, Y., You, P., Yan, L., Weng, Y. Effects of Ginseng on Cognitive Function: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Phytother Res.* 2024;38(12):6023-6034. doi:10.1002/ptr.8359

- [94] Park, K.C., Jin, H., Zheng, R., Kim, S., Lee, S.E., Kim, B.H., Yim, S.V. Cognition enhancing effect of panax ginseng in Korean volunteers with mild cognitive impairment: a randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial. *Transl Clin Pharmacol*. 2019;27(3):92-97. doi:10.12793/tcp.2019.27.3.92
- [95] Baek, H.I., Ha, K.C., Park, Y.K., Kim, T.Y., Park, S.J. Efficacy and Safety of *Panax ginseng* Sprout Extract in Subjective Memory Impairment: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Clinical Trial. *Nutrients*. 2024;16(12):1952. doi:10.3390/nu16121952
- [96] Ren, Q., Lin, J., Wang, H., Huang, M., Tan, X., Huang, W., Xu, Y. Effects of ginseng consumption on the biomarkers of oxidative stress: A systematic review and meta-analysis. *Phytother Res*. 2023;37(8):3262-3274. doi:10.1002/ptr.7893
- [97] Lazo-de-la-Vega-Monroy, M.L., Fernández-Mej, C. Oxidative Stress in Diabetes Mellitus and the Role Of Vitamins with Antioxidant Actions [Internet]. Oxidative Stress and Chronic Degenerative Diseases - A Role for Antioxidants. InTech; 2013. Verfügbar unter: <http://dx.doi.org/10.5772/51788> (abgerufen am 25.10.2025)
- [98] Rinaldi, F., Maurizi, L., Forte, J., Marazzato, M., Hanieh, P.N., Conte, A.L., Ammendolia, M.G., Marianecchi, C., Carafa, M., Longhi, C. Resveratrol-Loaded Nanoemulsions: In Vitro Activity on Human T24 Bladder Cancer Cells. *Nanomaterials (Basel)*. 2021;11(6):1569. doi:10.3390/nano11061569
- [99] Antonelli, M., Donelli, D., Firenzuoli, F. Ginseng integrative supplementation for seasonal acute upper respiratory infections: A systematic review and meta-analysis. *Complement Ther Med*. 2020;52:102457. doi:10.1016/j.ctim.2020.102457
- [100] Iqbal, H., Rhee, D.K. Ginseng alleviates microbial infections of the respiratory tract: a review. *J Ginseng Res*. 2020;44(2):194-204. doi:10.1016/j.jgr.2019.12.001
- [101] Yoon, J., Park, B., Kim, H., Choi, S., Jung, D. Korean Red Ginseng Potentially Improves Maintaining Antibodies after COVID-19 Vaccination: A 24-Week Longitudinal Study. *Nutrients*. 2023;15(7):1584. doi:10.3390/nu15071584
- [102] Luo, W.T., Huang, T.W. Effects of Ginseng on Cancer-Related Fatigue: A Systematic Review and Meta-analysis of Randomized Controlled Trials. *Cancer Nurs*. 2023;46(2):120-127. doi:10.1097/NCC.0000000000001068

- [103] Sadeghian, M., Rahmani, S., Zendehdel, M., Hosseini, S.A., Zare Javid, A. Ginseng and Cancer-Related Fatigue: A Systematic Review of Clinical Trials. *Nutr Cancer*. 2021;73(8):1270-1281. doi:10.1080/01635581.2020.1795691
- [104] You, L., Cho, J.Y. The regulatory role of Korean ginseng in skin cells. *J Ginseng Res*. 2021;45(3):363-370. doi:10.1016/j.jgr.2020.08.004
- [105] Meng, H., Liu, X.K., Li, J.R., Bao, T.Y., Yi, F. Bibliometric analysis of the effects of ginseng on skin. *J Cosmet Dermatol*. 2022;21(1):99-107. doi:10.1111/jocd.14450
- [106] Nam, J.J., Min, J.E., Son, M.H., Oh, J.H., Kang, S. Ultraviolet- and infrared-induced 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 activating skin photoaging is inhibited by red ginseng extract containing high concentration of ginsenoside Rg3(S). *Photodermatol Photoimmunol Photomed*. 2017;33(6):311-320. doi:10.1111/phpp.12337
- [107] Park, S.Y., Shin, Y.K., Kim, H.T., Kim, Y.M., Lee, D.G., Hwang, E., Cho, B.G., Yin, C.S, Kim, K.Y., Yi, T.H. A single-center, randomized, double-blind, placebo-controlled study on the efficacy and safety of "enzyme-treated red ginseng powder complex (BG11001)" for antiwrinkle and proelasticity in individuals with healthy skin. *J Ginseng Res*. 2016;40(3):260-268. doi:10.1016/j.jgr.2015.08.006
- [108] Saba, E., Kim, S.H., Lee, Y.Y., Park, C.K., Oh, J.W., Kim, T.H., Kim, H.K., Roh, S.S., Rhee, M.H. Korean Red Ginseng extract ameliorates melanogenesis in humans and induces antiphotaging effects in ultraviolet B-irradiated hairless mice. *J Ginseng Res*. 2020;44(3):496-505. doi:10.1016/j.jgr.2019.05.003
- [109] Chang, J.W., Park, K.H., Hwang, H.S., Shin, Y.S., Oh, Y.T., Kim, C.H. Protective effects of Korean red ginseng against radiation-induced apoptosis in human HaCaT keratinocytes. *J Radiat Res*. 2014;55(2):245-256. doi:10.1093/jrr/rrt109
- [110] Oh, S.J., Oh, Y., Ryu, I.W., Kim, K., Lim, C.J. Protective properties of ginsenoside Rb3 against UV-B radiation-induced oxidative stress in HaCaT keratinocytes. *Biosci Biotechnol Biochem*. 2016;80(1):95-103. doi:10.1080/09168451.2015.1075862
- [111] Shin, D., Moon, H.W., Oh, Y., Kim, K., Kim, D.D., Lim, C.J. Defensive Properties of Ginsenoside Re against UV-B-Induced Oxidative Stress through Up-Regulating Glutathione and Superoxide Dismutase in HaCaT Keratinocytes. *Iran J Pharm Res*. 2018;17(1):249-260.

- [112] Lee, Y., Lim, H.W., Yoon, J.Y., Lee, S., Ryu, I.W., Park, M., Chi, Y.M., Lim, C.J. Skin-Healing Properties of Ginsenoside Rd Against Ultraviolet-B-Induced Photooxidative Stress Through Up-Regulation of Antioxidant Components in HaCaT Keratinocytes. *Phcog Mag.* 2021;17(73):134–139. doi:10.4103/pm.pm_319_20
- [113] Chen, X., Zhong, Z., Xu, Z., Chen, L., Wang, Y. 2',7'-Dichlorodihydrofluorescein as a fluorescent probe for reactive oxygen species measurement: Forty years of application and controversy. *Free Radic Res.* 2010;44(6):587-604. doi:10.3109/10715761003709802
- [114] Herath, H.M.U.L., Piao, M.J., Kang, K.A., Fernando, P.D.S.M., Hyun, J.W. Rosmarinic Acid Protects Skin Keratinocytes from Particulate Matter 2.5-Induced Apoptosis. *Int J Med Sci.* 2024;21(4):681-689. Published 2024 Feb 4. doi:10.7150/ijms.90814
- [115] Klang, V., Schweiger, E.M., Strohmaier, S., Walter, V.I., Dekic, Z., Tahir, A. Dermal Delivery of Korean Red Ginseng Extract: Impact on Storage Stability of Different Carrier Systems and Evaluation of Rg1 and Rb1 Skin Permeation Ex Vivo. *Pharmaceutics.* 2022;15(1):56. doi:10.3390/pharmaceutics15010056
- [116] Laakmann, G., Schüle, C., Baghai, T., Kieser, M. St. John's wort in mild to moderate depression: the relevance of hyperforin for the clinical efficacy. *Pharmacopsychiatry.* 1998;31(Suppl 1):54-59. doi:10.1055/s-2007-979346
- [117] Zivari-Ghader, T., Hamishehkar, H., Shokouhi, B., Kosari-Nasab, M., Farahpour, M.R., Memar, M.Y., Davaran, S., Hanaee, J., Rashidi, M.R., Mehrali, M. Chitosan-Alginate Hydrogel Enriched with *Hypericum perforatum* Callus Extract for Improved Wound Healing and Scar Inhibition. *ACS Appl Mater Interfaces.* 2024;16(49):67344-67361. doi:10.1021/acsami.4c15091
- [118] Koeberle, A., Rossi, A., Bauer, J., Dehm, F., Verotta, L., Northoff, H., Sautebin, L., Werz, O. Hyperforin, an Anti-Inflammatory Constituent from St. John's Wort, Inhibits Microsomal Prostaglandin E(2) Synthase-1 and Suppresses Prostaglandin E(2) Formation in vivo. *Front Pharmacol.* 2011;2:7. doi:10.3389/fphar.2011.00007
- [119] Kumar, M., Bishnoi, R.S., Shukla, A.K., Jain, C.P. Techniques for Formulation of Nanoemulsion Drug Delivery System: A Review. *Prev Nutr Food Sci.* 2019;24(3):225-234. doi:10.3746/pnf.2019.24.3.225

- [120] Tayeb, H.H., Sainsbury, F. Nanoemulsions in drug delivery: formulation to medical application. *Nanomedicine (Lond)*. 2018;13(19):2507-2525. doi:10.2217/nnm-2018-0088
- [121] Mushtaq, A., Mohd Wani, S., Malik, A.R., Gull, A., Ramniwas, S., Nayik, G.A., Ercisli, S., Marc, R.A., Ullah, R., Bari, A. Recent insights into Nanoemulsions: Their preparation, properties and applications. *Food Chem X*. 2023;18:100684. doi:10.1016/j.fochx.2023.100684
- [122] Preeti, Sambhakar, S., Malik, R., Bhatia, S., Al Harrasi, A., Rani, C., Saharan, R., Kumar, S., Greeta, Sehrawat, R. Nanoemulsion: An Emerging Novel Technology for Improving the Bioavailability of Drugs. *Scientifica (Cairo)*. 2023;2023:6640103. doi:10.1155/2023/6640103
- [123] Iacob-Tudose, E.T., Mamaliga, I., Iosub, A.V. TES Nanoemulsions: A Review of Thermophysical Properties and Their Impact on System Design. *Nanomaterials (Basel)*. 2021;11(12):3415. doi:10.3390/nano11123415
- [124] Lipoid GmbH. *Unsaturated Phospholipids* [Internet]. 2022 Verfügbar unter: <https://lipoid.com/en/products/natural-phospholipids/unsaturated-phospholipids/> (abgerufen am 7.10.2025)
- [125] Zheng, J., Piao, M.J., Keum, Y.S., Kim, H.S., Hyun, J.W. Fucoxanthin Protects Cultured Human Keratinocytes against Oxidative Stress by Blocking Free Radicals and Inhibiting Apoptosis. *Biomol Ther (Seoul)*. 2013;21(4):270-276. doi:10.4062/biomolther.2013.030
- [126] Fritsche, O. Physik für Biologen und Mediziner. Heidelberg: Springer Spektrum Berlin Heidelberg, 2013. 87. ISBN: 978-3-642-34665-1
- [127] Häggqvist, I.M., Jernman, J., Snellman, E., Kärhä, P., Pasternack, R., Partonen, T., Karisola, P. Infrared-A (IR-A) modulates the p53 pathway and diurnal clock in human skin and subcutaneous adipose tissue in vivo. *J Photochem Photobiol B*. 2025 Aug;269:113199. doi: 10.1016/j.jphotobiol.2025.113199.
- [128] Reichling, J., Frater-Schröder, M., Saller, R., Fitz-Rathgen, J., Gachnian-Mirtscheva, R. Stress- und Ermüdungszustände, Tumoren und Allergien. In: Heilpflanzenkunde für die Veterinärpraxis. Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2016. ISBN: 978-3-662-48795-2, doi:10.1007/978-3-662-48795-2_19

- [129] Ye, X.W., Li, C.S., Zhang, H.X., Li, Q., Cheng, S.Q., Wen, J., Wang, X., Ren, H.M., Xia, L.J., Wang, X.X., Xu, X.F., Li, X.R. Saponins of ginseng products: a review of their transformation in processing. *Front Pharmacol.* 2023;14:1177819. doi: 10.3389/fphar.2023.1177819
- [130] Leung, K.W., Wong, A.S. Pharmacology of ginsenosides: a literature review. *Chin Med.* 2010;5:20. doi: 10.1186/1749-8546-5-20
- [131] Krutmann, J. The role of UVA rays in skin aging. *Eur J Dermatol.* 2001;11(2):170-171.
- [132] Ansary, T.M., Hossain, M.R., Kamiya, K., Komine, M., Ohtsuki, M. Inflammatory Molecules Associated with Ultraviolet Radiation-Mediated Skin Aging. *Int J Mol Sci.* 2021;22(8):3974. doi:10.3390/ijms22083974
- [133] Vater, C., Adamovic, A., Ruttensteiner, L., Steiner, K., Tajpara, P., Klang, V., Elbe-Bürger, A., Wirth, M., Valenta, C. Cytotoxicity of lecithin-based nanoemulsions on human skin cells and ex vivo skin permeation: Comparison to conventional surfactant types. *Int J Pharm.* 2019;566:383-390. doi:10.1016/j.ijpharm.2019.05.078
- [134] Hong, C.E., Lyu, S.Y. Anti-inflammatory and Anti-oxidative Effects of Korean Red Ginseng Extract in Human Keratinocytes. *Immune Netw.* 2011;11(1):42-49. doi:10.4110/in.2011.11.1.42
- [135] Park, S.K., Hyun, S.H., In, G., Park, C.K., Kwak, Y.S., Jang, Y.J., Kim, B., Kim, J.H., Han, C.K. The antioxidant activities of Korean Red Ginseng (*Panax ginseng*) and ginsenosides: A systemic review through *in vivo* and clinical trials. *J Ginseng Res.* 2021;45(1):41-47. doi:10.1016/j.jgr.2020.09.006
- [136] Ph. Eur. 11.0, Grundwerk 2023. Monographie zu Quantifizierter Johanniskrauttrockenextrakt, Nr. 1874. Stuttgart: Deutscher Apotheker Verlag, 2023. S. 2366-2368
- [137] Kim, M.R., Lee, H.S., Choi, H.S., Kim, S.Y., Park, Y., Suh, H.J. Protective effects of ginseng leaf extract using enzymatic extraction against oxidative damage of UVA-irradiated human keratinocytes. *Appl Biochem Biotechnol.* 2014;173(4):933-945. doi:10.1007/s12010-014-0886-2

1) Ergebnisse der oxidativen Stress-Tests bei KRG-Extrakt

Intrazelluläre ROS Level bei 0.25 J/cm ²									
	Kontrolle	Vehikel	KRG-Extrakt 25 µg/mL	50	100	150	200	250	
ohne Behandlung	1,00	1,01	1,09	1,14	1,12	1,21	1,15	1,19	
+H ₂ O ₂	1,00	1,13	1,30	1,39	1,35	1,59	1,63	1,49	
+UV	1,00	1,23	1,21	1,39	1,47	1,37	1,68	1,14	
STABW									
ohne Behandlung	0,08	0,12	0,12	0,13	0,13	0,10	0,09	0,15	
+H ₂ O ₂	0,09	0,20	0,12	0,23	0,25	0,18	0,30	0,26	
+UV	0,11	0,23	0,16	0,18	0,42	0,19	0,29	0,64	

2) Ergebnisse der oxidativen Stress-Tests bei HYP-Extrakt

MW intrazelluläre ROS Level bei 0.25 J/cm ²			
	Kontrolle	Vehikel	HYP-Extrakt (12.5 µg/mL)
ohne Behandlung	1,00	1,01	1,06
+H ₂ O ₂	1,00	1,13	1,49
+UV	1,00	1,12	1,33
STABW			
ohne Behandlung	0,07	0,06	0,06
+H ₂ O ₂	0,06	0,08	0,12
+UV	0,10	0,11	0,13

3) Ergebnisse der oxidativen Stress-Tests bei NE_KRG

MW Intrazelluläre ROS Level bei 0.25 J/cm ²					
	Kontrolle	NE_blank (Vehikel)	NE_KRG (25 µg/mL)	50 µg/mL	100 µg/mL
ohne Behandlung	1,00	0,73	0,97	0,88	0,54
+H ₂ O ₂	1,00	0,89	1,11	1,22	0,69
+UV	1,00	0,58	0,97	0,58	0,24
STABW					
ohne Behandlung	0,07	0,21	0,09	0,08	0,12
+H ₂ O ₂	0,07	0,20	0,15	0,06	0,06
+UV	0,08	0,28	0,18	0,02	0,14

4) Ergebnisse der oxidativen Stress-Tests bei NE_HYP

MW intrazelluläre ROS Level bei 0.25 J/cm ²				
	Kontrolle	NE_blank (Vehikel)	NE_HYP (12.5 µg/mL)	
ohne Behandlung	1,00	0,73	0,78	
+H ₂ O ₂	1,00	0,84	0,94	
+UV	1,00	0,53	0,45	
STABW				
ohne Behandlung	0,09	0,10	0,11	
+H ₂ O ₂	0,08	0,08	0,10	
+UV	0,09	0,08	0,12	

5) Ergebnisse der Zellviabilitäts-Tests bei KRG-Extrakt

MW Zellviabilität bei 0.25 J/cm ²								
	Kontrolle	Vehikel	KRG-Extrakt 25 µg/mL	50	100	150	200	250
ohne Behandlung	1,00	1,02	1,02	0,92	0,99	0,95	0,93	1,01
+H ₂ O ₂	0,90	0,88	1,03	0,90	0,90	0,90	0,88	0,89
+UV	0,96	0,91	1,04	0,99	1,08	0,82	0,92	0,77
STABW								
no treatment	0,14	0,20	0,15	0,13	0,17	0,19	0,16	0,23
+H ₂ O ₂	0,18	0,22	0,15	0,15	0,28	0,18	0,15	0,17
+UV	0,22	0,23	0,19	0,19	0,17	0,16	0,20	0,23

6) Ergebnisse der Zellviabilitäts-Tests bei HYP-Extrakt

MW Zellviabilität bei 0.25 J/cm ²			
	Kontrolle	Vehikel	HYP-Extrakt (12.5 µg/mL)
ohne Behandlung	1,00	1,07	1,03
+H ₂ O ₂	1,06	1,13	1,09
+UV	1,11	1,05	1,04
STABW			
ohne Behandlung	0,11	0,10	0,11
+H ₂ O ₂	0,11	0,18	0,16
+UV	0,11	0,16	0,16

7) Ergebnisse der Zellviabilitäts-Tests bei NE_KRG

MW Zellviabilität bei 0.25 J/cm ²					
	Kontrolle	Vehikel	NE_KRG (25 µg/mL)	50 µg/mL	100 µg/mL
ohne Behandlung	1,00	1,01	1,02	0,99	1,01
+H ₂ O ₂	1,02	0,98	1,05	0,99	1,03
+UV	1,06	1,00	1,03	1,05	1,02
STABW					
ohne Behandlung	0,10	0,14	0,14	0,20	0,16
+H ₂ O ₂	0,19	0,19	0,15	0,24	0,15
+UV	0,16	0,17	0,21	0,23	0,15

8) Ergebnisse der Zellviabilitäts-Tests bei NE_HYP

MW Zellviabilität bei 0.25 J/cm ²				
	Kontrolle	NE_blank (Vehikel)	NE_HYP (12.5 µg/mL)	
ohne Behandlung	1,00	1,02	0,92	
+H ₂ O ₂	0,96	0,92	0,89	
+UV	0,98	0,93	0,74	
STABW				
ohne Behandlung	0,10	0,16	0,10	
+H ₂ O ₂	0,18	0,14	0,15	
+UV	0,09	0,16	0,15	

9) Verdünnungsreihen:

Durch das Auftragen auf die Zellen ergibt sich eine weitere 1:1 Verdünnung mit PBS+, demnach sind bei allen genannten Verdünnungen doppelt so hohe Stammlösungen und EtOH auf insgesamt 10 mL bzw bei den NE 5 mL anzufertigen. Als Verdünnungsmittel wird immer PBS+ (Puffer) genutzt und mittels (v/v) EtOH 40% für KRG (im Folgenden mit EtOH abgekürzt) oder DMSO für HYP wird stets bei jeder Verdünnung ein konstanter Anteil des Extrakt Lösungsmittels erhalten.

1) KRG-Extrakt 25-250 µg/mL (Konzentration auf den Zellen)

Eine Stammlösung von KRG-Extrakt (10% in EtOH 40%) wird weiter verdünnt.

a) 1:400

- 250 µg/mL (sample solution 1), 10 mL
- => 25 µL Stammlösung + 9975 µL Puffer

b) 1:500

- 200 µg/mL (sample sol 2), 10 mL
- => 20 µL Stammlösung + 5 µL ETOH + 9975 µL Puffer

c) 1:666,67

- 150 µg/mL (sample sol 3), 10 mL
- => 15 µL Stammlösung + 10 µL EtOH + 9975 µL Puffer

d) 1:1000

- 100 µg/mL (sample sol 4), 10 mL
- => 10 µL Stammlösung + 15 µL EtOH + 9975 µL Puffer

e) 1:2000

- 50 µg/mL (sample sol 5), 10 mL
- => 5 µL Stammlösung + 20 µL EtOH + 9975 µL Puffer

=> Vehikel Kontrolle: 25 µL (v/v) EtOH 40% + 9975 µL Puffer

2) HYP-Extrakt 12,5 µg/mL

Eine Stammlösung von HYP-Extrakt (5% in DMSO) wird weiter verdünnt.

a) 1:200

- 12,5 µg/mL, 10 mL
- => 12,5 µL Stammlösung + 9987,5 µL Puffer

=> Vehikel Kontrolle: 12,5 µL DMSO + 9987,5 µL Puffer

3) NE KRG 25-100 µg/mL

a) 1:400

- 25 µg/mL, 5 mL
- => 12,5 µL NE + 4987,5 µL Puffer

b) 1:200

- 50 µg/mL, 5 mL
- => 25 µL NE + 4975 µL Puffer

c) 1:100

- 100 µg/mL, 5 mL
- => 50 µL NE + 4950 µL Puffer

4) NE HYP 12,5 µg/mL

- 12,5 µg/mL, 5 mL
- => 25 µL NE + 4975 µL Puffer