

5. DISKUSSION

5.1. Wirkung verschiedener Tocopherol-Derivate auf die NF- κ B-/I- κ B-Aktivierung in kultivierten HaCaT-Keratinocyten nach UVA-Bestrahlung

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine Stunde nach UVA-Bestrahlung der HaCaT-Keratinocyten ein statistisch signifikanter Anstieg der NF- κ B-Bindungsaktivität auftritt. Die Supplementation der HaCaT-Keratinocyten mit α -Tocopherol, Trolox, α -Tocopherol-Acetat und α -Tocopherol-Succinat erbrachte keine signifikante Beeinflussung der NF- κ B-Bindungsaktivität nach UVA-Bestrahlung.

Durch die Western Blots konnten keine signifikanten Änderungen der I- κ B α -Proteinkonzentrationen in HaCaT-Keratinocyten, weder nach der UVA-Bestrahlung mit 1 J/cm², noch beim Vergleich unterschiedlicher Tocopherol-Derivate (α -Tocopherol, Trolox, α -Tocopherol-Acetat bzw. α -Tocopherol-Succinat) nachgewiesen werden.

Diese Ergebnisse lassen sich eventuell damit erklären, dass ein relativ begrenzter Zeitraum für die Dissoziation des I- κ B-/NF- κ B-Komplexes und den I- κ B-Abbau existiert. Die Gesamtproteine für den I- κ B α -Western-Blot wurden eine Stunde nach der Bestrahlung aus den Zellen extrahiert, was einen zu langen Zeitraum von der Bestrahlung bis zur Gesamtproteinextraktion darstellen könnte.

Durch eine UVA-Bestrahlung kann in unterschiedlichen Zelllinien die Bildung von reaktiven Sauerstoffverbindungen (reactive oxygen species = ROS) forciert werden. In der Literatur können viele Hinweise gefunden werden, dass reaktive Sauerstoffverbindungen eine zentrale Rolle bei der NF- κ B-Aktivierung spielen. Schreck et al. kamen zu dem Ergebnis, dass viele NF- κ B-Aktivatoren, wie z. B. TNF- α , IL-1 und Lipopolysaccharide, durch einen gemeinsamen Mechanismus wirken könnten, der die Synthese von ROS beinhaltet. ROS können direkt oder indirekt die Trennung der Untereinheit I- κ B vom NF- κ B und damit eine NF- κ B-Aktivierung vermitteln (Schreck et al. 1991). Auch Israel et al. wiesen darauf hin, dass oxidativer Stress eine zentrale Rolle bei der NF- κ B-Aktivierung spielt (Israel et al. 1992).

Um das NF- κ B-Protein zu aktivieren, d. h. eine Dissoziation von I- κ B und NF- κ B zu bewirken, ist der I- κ B-Abbau notwendig, welcher durch die Phosphorylierung durch

Proteinkinasen möglich wird. Antioxidantien wie z. B. Pyrrolidin Dithiocarbamat und Acetylcystein können die Aktivierung mancher dieser Proteinkinasen blockieren, welches ein weiterer Hinweis dafür ist, dass ROS eine vermittelnde Rolle bei der NF-κB-Regulation spielen (Schreck et al. 1991).

Ausgehend von der Annahme, dass ROS eine zentrale Rolle bei der NF-κB-Aktivierung einnehmen, kann man annehmen, dass antioxidative Vitamine wie z. B. *α-Tocopherol*, einen Einfluss auf das Ausmaß der NF-κB-Aktivierung ausüben. Tatsächlich konnte Tocopherol nachweislich eine ROS-Anreicherung in Keratinozyten hemmen (Petersen et al. 2000; Peus et al. 2001).

Die Voraussetzungen für eine NF-κB-Aktivierung scheinen von Zelllinie zu Zelllinie individuellen Gegebenheiten zu unterliegen. Unterschiedliche Zelllinien reagieren z. B. unterschiedlich sensibel auf UV-Licht. Eine NF-κB-Aktivierung konnte in A-431 Zellen durch eine Dosis von 15 mJ/cm² erreicht werden, wohingegen 50 mJ/cm² notwendig waren, um eine NF-κB-Aktivierung in HaCaT-Keratinozyten und in der Mäuse-Keratinozyten-Zelllinie Balb/MK zu bewirken (Tobin et al. 1996). Vile et al. berichteten über eine minimale UVB-Dosis von 750 mJ/cm², um NF-κB in humanen Hautfibroblasten zu aktivieren (Vile et al. 1995).

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass eine UVA-Bestrahlung (1 J/cm²) der HaCaT-Keratinozyten die NF-κB-Bindungsaktivität signifikant erhöht, ohne dass eine Tocopherol-Supplementation (*α-Tocopherol* (10⁻⁴ M) und *Trolox* (10⁻⁴ M)) bzw. eine Supplementation mit den Tocopherol-Derivaten *α-Tocopherol-Acetat* (10⁻⁴ M) und *α-Tocopherol-Succinat* (10⁻⁵ M) einen Einfluss auf diese Aktivierung hatte.

In der Literatur finden sich unterschiedliche Ergebnisse über die Beeinflussung der NF-κB-Bindungsaktivität und die Beeinflussung von Zellschäden durch Tocopherol.

Suzuki und Packer berichteten, dass *α-Tocopherol*-Derivate die NF-κB-Aktivierung in humanen Jurkat T Zellen hemmen können (Suzuki und Packer 1993 a). In THP-1 humanen monozytischen Leukämiezellen reduzierte *α-Tocopherol-Succinat* die NF-κB-Bindungsaktivität (Nakamura et al. 1998). In NCTC 2544 Keratinozyten ergab sich keine signifikante

Beeinflussung der UV-induzierten NF- κ B-Bindungsaktivität durch α -*Tocopherol* (Djavaheri-Mergny et al. 1999).

Abweichungen der Ergebnisse in der vorliegenden Arbeit im Vergleich zur existierenden Literatur können auf die unterschiedlichen Tocopherol-Konzentrationen in unterschiedlichen Zelllinien zurückgeführt werden. Es ist sehr wahrscheinlich, dass die Wirkung der α -Tocopherol-Derivate konzentrationsabhängig ist, was auch Nakamura et al. mit ihren Versuchen zeigten (Nakamura et al. 1998). Sie fanden heraus, dass eine NF- κ B-Aktivierung in THP-1 humanen monozytischen Leukämiezellen, welche durch LPS-Zugabe forciert wurde, durch α -*Tocopherol-Succinat* konzentrationsabhängig gehemmt werden kann. Am stärksten wurde die NF- κ B-Aktivierung durch 50 μ M α -*Tocopherol-Succinat* gehemmt. Alpha-*Tocopherol-Succinat* in einer Konzentration von 20 μ M hemmte die NF- κ B-Aktivität weniger stark, und 10 μ M α -*Tocopherol-Succinat* zeigten den geringsten Grad an hemmender Wirkung. In diesen Versuchen wurde die NF- κ B-Aktivität durch Supplementation der THP-1 humanen monozytischen Leukämiezellen mit α -*Tocopherol* nicht beeinflusst.

Suzuki und Packer wiesen eine konzentrationsabhängige Inhibition der NF- κ B-Aktivierung in humanen Jurkat T Zellen durch α -*Tocopherol-Succinat* und α -*Tocopherol-Acetat* nach. Eine deutliche Hemmung der NF- κ B-Aktivierung wurde in diesen Versuchen durch 10 μ M α -*Tocopherol-Succinat* erreicht; vollständig wurde die NF- κ B-Aktivität durch 1 mM α -*Tocopherol-Succinat* gehemmt (Suzuki und Packer 1993 a).

Neuere Untersuchungen von Rijnkels et al. zeigten, dass steigende topische Dosen von α -*Tocopherol* bzw. *L-Ascorbinsäure* den UVB-induzierten Zelltod und die Apoptose in ex vivo Schweinehaut zunehmend hemmten (Rijnkels et al. 2003).

Woods et al. belegten, dass α -*Tocopherol* in einer Konzentration von 10^{-4} M DNA-Schäden in HaCaT-Keratinocyten verhindern konnte (Woods et al. 2004).

In der vorliegenden Arbeit wurde anhand der Proliferations- und Zytotoxizitätsversuche für α -*Tocopherol*, *Trolox* und α -*Tocopherol-Acetat* eine Konzentration von 10^{-4} M und für α -*Tocopherol-Succinat* eine Konzentration von 10^{-5} M gewählt.

Ein weiterer wichtiger Faktor, der die Wirkungsweise der Tocopherol-Derivate verändern könnte, ist die Inkubationszeit vor der Bestrahlung. Peus et al. untersuchten diesen Sachverhalt. Die beobachtete EGFR-Phosphorylierung nach UVB-Bestrahlung bei unterschiedlichen Präinkubationszeiten mit *Trolox* (drei bis 24 Stunden) wurde durch diese nur minimal verändert. Dagegen zeigte die ERK 1/2-Aktivierung einen progressiven Abfall

bei verlängerter Präinkubation mit *Trolox*. Die Hemmung der p38-Aktivierung zeigte einen invers korrelierten Effekt. Eine vollständige Blockade der p38-Aktivierung trat innerhalb der ersten Stunde der Präinkubationszeit mit *Trolox* auf und ließ mehr und mehr nach, je länger die Vorbehandlungszeit anstieg. Je länger die Keratinozyten vor der Bestrahlung mit *Trolox* supplementiert waren (bis max. 24 Stunden), desto geringer war die Rate der abgestorbenen Zellen (Peus et al. 2001).

Es ist interessant zu wissen, ob Wirkungsunterschiede der Tocopherol-Derivate existieren, um diese optimal zu nutzen. In der Literatur findet sich bisher keine Studie, die umfassend die Wirkung verschiedener Tocopherol-Derivate bzw. die Wirkung des wasserlöslichen *Trolox* mit der α -Tocopherol-Wirkung in Keratinozyten vergleicht.

Einzelne Vergleiche ergaben, dass α -Tocopherol in vivo eine signifikante Hemmung der Thymin Dimer Bildung in C3H-Mäusehaut bewirkt, welche durch α -Tocopherol-Acetat nicht nachzuweisen war (McVean und Liebler 1999). Eine Präinkubation von 308-Zellen mit α -Tocopherol vor einer Bestrahlung mit UVB-Licht verringerte die Thymin Dimer Bildung in diesen Zellen signifikant. Durch α -Tocopherol-Acetat konnte dieser Effekt nicht erreicht werden (McVean und Liebler 1999).

Einige Autoren konnten für *Trolox* einen höheren protektiven Effekt gegenüber UV-induzierter Zelltoxizität im Vergleich zu α -Tocopherol feststellen (Cerutti 1985; Peus et al. 2001; Satoh et al. 1997).

Packer et al. fanden bei einem Vergleich heraus, dass α -Tocopherol-Acetat die NF- κ B-Aktivität in humanen Jurkat T Zellen in einem weitaus größeren Maße hemmte, als vergleichbare Konzentrationen von α -Tocopherol (Packer und Suzuki 1993). Außerdem belegten sie, dass α -Tocopherol-Succinat die NF- κ B-Aktivität in humanen Jurkat T Zellen vollständig hemmte, was bei vergleichbaren Konzentrationen von α -Tocopherol und α -Tocopherol-Acetat nicht zu beobachten war (Suzuki und Packer 1993).

In Versuchen von Nakamura et al. konnte α -Tocopherol-Succinat in THP-1-Zellen eine NF- κ B-Aktivierung bzw. eine Translokation des NF- κ B-Proteins in den Kern hemmen. Dahingegen zeigte sich keine signifikante Hemmung der NF- κ B-Aktivierung bei vergleichbarer Supplementation der Zellen mit α -Tocopherol (Nakamura et al. 1998).

In der vorliegenden Arbeit konnte die Supplementation der HaCaT-Keratinozyten mit α -Tocopherol, *Trolox*, α -Tocopherol-Acetat und α -Tocopherol-Succinat keine signifikante

Beeinflussung der NF- κ B-Bindungsaktivität bewirken. Es ergaben sich jedoch unterschiedlich ausgeprägte Wirkungen der Tocopherol-Derivate bei der kombinierten Anwendung von *Tocopherol* und *Ascorbinsäure*, sowie unterschiedliche Einflüsse der Tocopherol-Derivate auf die Lipidperoxidation in HaCaT-Keratinocyten nach der UVA-Bestrahlung.

5.2. Einfluss von Tocopherol in Kombination mit Ascorbinsäure auf die NF- κ B-Bindungsaktivität in kultivierten HaCaT-Keratinocyten

In dieser Arbeit konnte ein synergistischer Effekt von *Tocopherol* und *Ascorbinsäure* auf die NF- κ B-Bindungsaktivität gezeigt werden. Eine alleinige Supplementation der HaCaT-Keratinocyten mit *Ascorbinsäure* oder α -*Tocopherol* in einer Konzentration von 10^{-4} M konnte weder einen signifikanten Anstieg, noch eine signifikante Hemmung der NF- κ B-Bindungsaktivität nach einer UVA-Bestrahlung mit 1 J/cm^2 ausüben. Bei einer Kombination von *Ascorbinsäure* (10^{-4} M) und α -*Tocopherol-Succinat* (10^{-5} M) vor der Bestrahlung konnte jedoch eine signifikante ($p < 0,005$) Hemmung der UVA-induzierten NF- κ B-Bindungsaktivität beobachtet werden.

Bei der Kombination von *Ascorbinsäure* und *Trolox*, sowie bei einer kombinierten Supplementation mit *Ascorbinsäure* und α -*Tocopherol-Acetat* konnte ebenfalls eine signifikante ($p < 0,05$) Hemmung der NF- κ B-Bindungsaktivität im Vergleich zur bestrahlten nicht-supplementierten Probe gezeigt werden.

In der Literatur wird beschrieben, dass sowohl *Ascorbinsäure*, als auch α -*Tocopherol* die NF- κ B-Bindungsaktivität hemmen können. So zeigten Bowie et al., dass *Ascorbinsäure* die NF- κ B-Bindungsaktivität in der Endothelzelllinie ECV 304 und in primären HUVEC hemmte (Bowie und O'Neill 2000). *Tocopherol* konnte in humanen Jurkat T Zellen eine NF- κ B-Aktivierung hemmen (Packer und Suzuki 1993; Suzuki und Packer 1993; Suzuki und Packer 1993 a).

Beide Substanzen sind antioxidativ wirksam und können auf diese Weise die Bildung von ROS in verschiedenen Zellsystemen hemmen. Durch eine Kombination von *Ascorbinsäure* und α -*Tocopherol* kommt es zu einer erneuten Bereitstellung von α -*Tocopherol* durch die

Regeneration des α -*Tocopherol*-Radikals (Doba et al. 1985; Packer et al. 1979). Auf diese Weise kommt es zu einem synergistischen Effekt dieser beiden Substanzen.

Die Zusammenhänge einer kombinierten Wirkung von α -*Tocopherol* und *Ascorbinsäure* wurden eruiert. Donnelly et al. untersuchten die Auswirkungen einer Kombinationsbehandlung mit α -*Tocopherol* und *Ascorbinsäure* auf Sperma und konnten vermehrte DNA-Schäden nach dieser Behandlung nachweisen. Die DNA-Schäden waren durch eine H₂O₂-Behandlung hervorgerufen worden und wurden durch eine Kombinationsbehandlung mit α -*Tocopherol* und *Ascorbinsäure* intensiviert. Die H₂O₂-induzierte ROS-Produktion wurde durch diese Kombinationsbehandlung allerdings signifikant reduziert (Donnelly et al. 1999).

Im Tiermodell existieren Hinweise, dass durch eine Kombinationsbehandlung mit α -*Tocopherol* und *Ascorbinsäure* eine Photoprotektion erreicht werden kann. Darr et al. untersuchten die Beeinflussung der Bildung von „Sonnenbrandzellen“ durch eine Kombinationsbehandlung mit α -*Tocopherol* und *Ascorbinsäure*. Eine Sonnencreme wurde mit 10 %iger Konzentration von *Ascorbinsäure* und α -*Tocopherol* für 15 bis 20 Minuten auf Schweinehaut aufgetragen und anschließend mit UVB-Licht bestrahlt. So konnte eine statistisch signifikant geringere Bildung von „Sonnenbrandzellen“ durch diese Behandlung nachgewiesen werden (Darr et al. 1996). Auch Dreher et al. konnten einen deutlich ausgeprägteren photoprotektiven Effekt durch eine Kombinationsbehandlung mit α -*Tocopherol* und *Ascorbinsäure* – verglichen mit der Einzelgabe – nachweisen. Sie applizierten 30 Minuten vor einer UV-Bestrahlung 2 % α -*Tocopherol* und 5 % *Ascorbinsäure* auf humane Haut (Dreher et al. 1998).

Darüber hinaus weiß man aus Probandenstudien, dass eine Kombinationsbehandlung mit α -*Tocopherol* und *Ascorbinsäure* die humane Haut vor UV-induzierten Schäden schützen kann. Eberlein-König et al. stellten einen Schutz der Haut durch oral applizierte Vitamine (*Ascorbinsäure* in Kombination mit *Tocopherol*) nach Bestrahlung mit UVA- bzw. UVB-Licht fest. Acht Tage lang wurden *Ascorbinsäure* in einer Dosierung von 2000 mg/d und *Tocopherol* in einer Dosierung von 1000 IU/d gegeben. Die MED erhöhte sich nach der achttägigen Vitamingabe bei der Probandengruppe, die Vitamine bekam. Es konnte somit gezeigt werden, dass eine kombinierte orale Behandlung mit *Ascorbinsäure* und *Tocopherol* die Sonnenbrandreaktion abschwächen kann (Eberlein-König et al. 1998). Auch Fuchs et al. konnten darlegen, dass diätetisch hohe Dosen von α -*Tocopherol* (2 g pro Tag über 50 Tage lang) kombiniert mit *Ascorbinsäure* (3 g pro Tag über 50 Tage lang) die Sonnenbrandreaktion

von gesunden Probanden statistisch signifikant, jedoch nur geringgradig reduzieren (Fuchs und Kern 1998).

Bei genauerer Betrachtung der verschiedenen Tocopherol-Derivate ergaben sich in der vorliegenden Arbeit interessante Ergebnisse. Es zeigte sich, dass eine Kombination von *Ascorbinsäure* und *α-Tocopherol-Succinat* die NF-κB-Bindungsaktivität in HaCaT-Keratinocyten nach einer UVA-Bestrahlung am effektivsten hemmte. Eine Kombination von *Trolox* und *Ascorbinsäure* hemmte die NF-κB-Bindungsaktivität ebenfalls signifikant, der hemmende Effekt war jedoch weniger ausgeprägt. Die Kombination von *Ascorbinsäure* und *α-Tocopherol-Acetat* ergab eine signifikante Hemmung der NF-κB-Bindungsaktivität, die im Vergleich zur bestrahlten Kontrolle die geringste Ausprägung der genannten Kombinationen aufwies. Die Kombination von *Ascorbinsäure* und *α-Tocopherol* bewirkte eine statistisch nicht signifikante leichte Hemmung der NF-κB-Bindungsaktivität.

Anhand dieser Ergebnisse wird deutlich, dass Wirkungsunterschiede der einzelnen *Tocopherol*-Derivate in Kombination mit *Ascorbinsäure* existieren.

In den bisher durchgeführten Probandenstudien wurde die kombinierte Anwendung von *Ascorbinsäure* und *α-Tocopherol* untersucht (Darr et al. 1996; Eberlein-König et al. 1998; Fuchs und Kern 1998). Zieht man die Ergebnisse dieser Arbeit in Betracht, dann sollten Probandenstudien durchgeführt werden, die einer kombinierten Anwendung von *Ascorbinsäure* und *α-Tocopherol-Succinat* bzw. einer Kombination von *Ascorbinsäure* und *α-Tocopherol-Acetat* den Vorzug geben. Dieser Arbeit zufolge zeigt die Substanz *Trolox* in Kombination mit *Ascorbinsäure* deutlichere photoprotektive Effekte in Keratinocyten als die Kombination von *Ascorbinsäure* und *α-Tocopherol*.

Die alleinige Anwendung von *Ascorbinsäure* bzw. *α-Tocopherol* oder eines seiner Derivate ist der kombinierten Gabe unterlegen.

5.3. Einfluss verschiedener Tocopherol-Derivate auf die Lipidperoxidation in HaCaT-Keratinocyten nach UVA-Bestrahlung

In dieser Arbeit konnte ein Anstieg der extrazellulären thiobarbitursäurereaktiven Substanzen (TBARS) in HaCaT-Keratinocyten um das 2,6-fache nach der UVA-Bestrahlung gemessen werden. Nach einer Supplementation von α -Tocopherol, Trolox, α -Tocopherol-Acetat bzw. α -Tocopherol-Succinat konnte eine Verminderung der TBARS im Vergleich zur bestrahlten Kontrolle festgestellt werden, die bei α -Tocopherol und Trolox stärker ausgeprägt war.

Vergleichend wurden in der vorliegenden Arbeit α -Tocopherol, Trolox, α -Tocopherol-Acetat und α -Tocopherol-Succinat untersucht, wobei sich zeigte, dass die gemessenen extrazellulären TBARS durch Trolox am stärksten gehemmt wurden. Diese Hemmung war im Vergleich zur bestrahlten Kontrolle statistisch signifikant. Die statistisch signifikante Hemmung der TBARS nach UVA-Bestrahlung durch α -Tocopherol war etwas geringer ausgeprägt. Die TBARS-Konzentrationen lagen durch diese Inkubationen der HaCaT-Keratinocyten mit Trolox bzw. α -Tocopherol nach der Bestrahlung im Bereich der unbestrahlten Kontrolle. Die Behandlung der HaCaT-Keratinocyten mit α -Tocopherol-Acetat und α -Tocopherol-Succinat ergab eine Verminderung der TBARS, die nicht statistisch signifikant war.

Die Lipide der Membran können durch Peroxid-Radikale geschädigt werden, was strukturelle und funktionelle Membranveränderungen nach sich zieht, und schließlich zu Membranschäden führen kann (Black 1987; Girotti 1985; Pryor 1978). Es ist bekannt, dass Tocopherol Zellmembranen vor der Lipidperoxidation schützt (Bommannan et al. 1990; Burton 1986; Chow 1991; Christen et al. 1997). Dieser Schutz konnte in unterschiedlichen Zelllinien, wie z. B. in NCTC 2544 humanen Keratinocyten (Djavaheri-Mergny et al. 1999), Epidermiszellen (Clement-Lacroix et al. 1996) und HL-60-Zellen (Barroso et al. 1997) gezeigt werden.

Die UV-Dosis, die nötig ist, um eine Verminderung der α -Tocopherol-Konzentration in murinem Stratum corneum zu bewirken, ist geringer, als die UV-Dosis, die die Lipidperoxidation messbar steigert. So konnten Thiele et al. zeigen, dass eine suberythematöse UV-Dosis ausreicht, um die α -Tocopherol-Konzentration in murinem Stratum corneum signifikant zu verringern, wohingegen sich das Nachweisprodukt der

Lipidperoxidation Malondialdehyd erst nach unphysiologisch hohen Dosen vermehrte (Thiele et al. 2001). In dieser Arbeit wurden die HaCaT-Keratinocyten mit 10 J/cm^2 UVA-Licht bestrahlt, da bekannt war, dass diese Dosis die TBARS in HaCaT-Keratinocyten erhöht (Tebbe et al. 1997).

Aus der Literatur ist bekannt, dass durch eine *Tocopherol*-Supplementation von NCTC 2544 humanen Keratinocyten vor der UVA-Bestrahlung die TBARS-Bildung gehemmt werden kann (Djavaheri-Mergny et al. 1999).

Es gibt nur wenige Studien am Tiermodell, die zeigen, dass eine topische Applikation von α -*Tocopherol* die Lipidperoxidation der Zellmembran verhindern kann. Rijnkels et al. fanden heraus, dass eine einmalige topisch applizierte Dosis von α -*Tocopherol* bzw. *L-Ascorbinsäure* auf ex vivo Schweinehaut die Lipidperoxidation, welche durch UVB-Licht ausgelöst worden war, reduzieren konnte (Rijnkels et al. 2003). Umfassende Studien über Wirkungsunterschiede verschiedener α -*Tocopherol*-Derivate in Keratinocyten fehlen bislang. In dieser Arbeit konnte die Lipidperoxidation in HaCaT-Keratinocyten am wirksamsten durch *Trolox* verhindert werden. Eine Behandlung der Zellen mit α -*Tocopherol* zeigte ebenfalls eine signifikante Hemmung der TBARS. Die Supplementation der HaCaT-Keratinocyten mit α -*Tocopherol*-Acetat bzw. α -*Tocopherol*-Succinat ergab eine Verminderung der TBARS, die jedoch nicht statistisch signifikant war.