

sofw Journal

Home & Personal Care Ingredients & Formulations

powered by **SOFW**

Home Care

EU-harmonisierte Produktmeldung,
Pflichten und Fristen

04

2020

deutsch

Dekorative Kosmetik

Soft-Focus: weichzeichnende Ingredients
für hohe Ansprüche

Stabilisierung

Kombination von Milchsäure und 1,2-Hexandiol –
eine neue Option zur Stabilisierung
von Rinse-off-Formulierungen

Haut & Haarpflege

Der Golgi-Apparat – Detox Superheld

Umweltfreundliche Extraktion mit einem neuen Lösungsmittel
für leistungsstarke biomimetische Hautwirkstoffe

Ethylmacadamiat als pflanzliche Alternative zu Silikon
in Haarkonditioniermitteln

Der Golgi-Apparat – Detox Superheld

E. Besic Gyenge, S. Hettwer, B. Suter, S. Breitenbach, B. Obermayer

Abstract

Unser zelleigenes Reinigungssystem ist einer der raffiniertesten Mechanismen unseres Körpers. Langlebige Hautzellen wie Fibroblasten und die Keratinozyten der Basalzellschicht halten sich und ihre Umgebung jeden Tag durch Autophagie sauber. Dieser intrazelluläre Selbstverdauprozess ist nicht nur wichtig zur Reinigung der Zellen, sondern auch zur Aufrechterhaltung der Homöostase und physiologischen Zellfunktion.

Leider lässt die Effizienz dieses zellulären Abfallentsorgungssystems mit der Zeit nach. Zellen verlieren ihre funktionelle Identität, was zur Zellseneszenz führt. Daher tragen sicher auslösbare Autophagie und die Aufrechterhaltung ordentlicher Autophagieprozesse dazu bei, den Beeinträchtigungen, die sich mit dem Alter mehren, entgegenzuwirken und Keratinozyten und Fibroblasten jung zu halten.

REFORCYL®-AION wirkt auf die drei Hauptkomponenten, die am Reinigungsprozess gesunder Zellen beteiligt sind: den Golgi-Apparat, das Autophagie-Markerprotein LC3 und die Fitness der Mitochondrien. Es unterstützt Zellen bei der Reaktivierung des Autophagieprozesses und liefert ihnen die notwendigen Nährstoffe. Dabei ist die gesamte Lieferkette CO₂-neutral. Somit stellt es ein gesamtheitliches Konzept dar, das sowohl haut- als auch umweltfreundlich ist.

Einleitung

Der Golgi-Apparat – Koordinator der Autophagie und zelleigene Poststelle

Der Golgi-Apparat (**Abb. 1**) ist ein aus membranbegrenzten Zisternen bestehendes, hochdynamisches Zellorganell mit vielfältigen Aufgaben. Es ist im Zentrum der vesikulären Kommunikationswege positioniert, nämlich zwischen Zellkern und -membran [1]. Unter normalen Bedingungen kann seine Funktion mit der einer Poststelle verglichen werden: Er leitet Pakete und Nachrichten von einem Ort zu einem anderen. Außerdem spielt er eine zentrale Rolle bei der Autophagie. Diese ist für die ordnungsgemäße Beseitigung nicht mehr funktionsfähiger Zellorganellen und Makromoleküle im Zellinneren notwendig und hängt von zuverlässigen und dynamischen Membranquellen wie dem Golgi-Apparat ab [2]. Die erstaunliche Funktionsvielfalt des Golgi-Apparats und seine Koordination unterschiedlichster Vesikel belegen seine unglaubliche Bedeutung in einer ganzen Reihe zellulärer Prozesse inklusive das Zellüberleben.

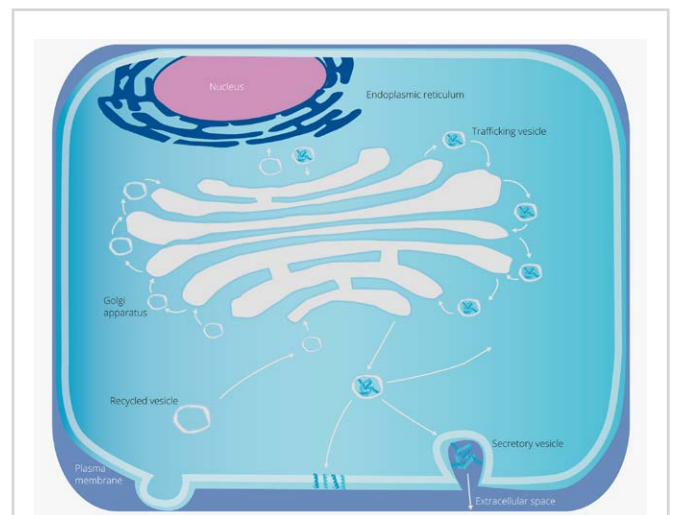


Abb. 1 Der Golgi-Apparat als stark durchorganisierte zelluläre Poststelle. Proteine müssen den Golgi-Apparat passieren, um modifiziert und für den Transport an die unterschiedlichen Stellen innerhalb der Zelle verpackt zu werden.

HAVE WE GOT NEWS FOR YOU. www.sofw.com

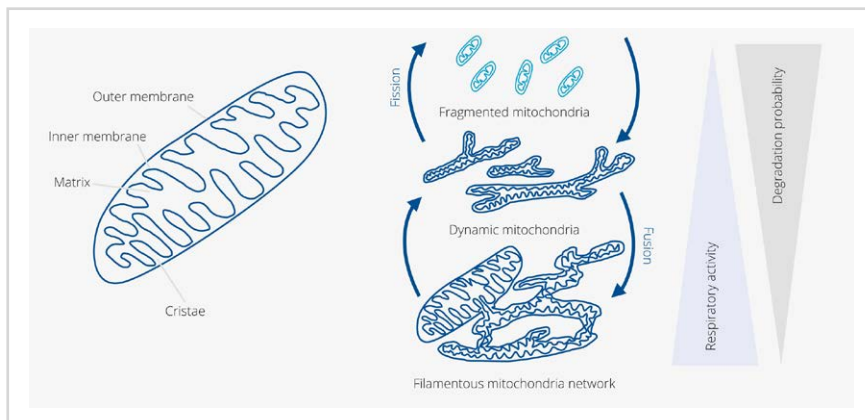


Abb. 2 Die dynamische mitochondriale Struktur. Das Standarddiagramm eines Mitochondriums in Lehrbüchern stellt nicht die tatsächliche Situation in der Zelle dar. In ihrem physiologischen (gesunden) Zustand weisen Mitochondrien eine dynamische, filamentöse Morphologie auf.

Die Mitochondrien – Kraftwerke für Zellen und Autophagieprozesse

Mitochondrien sind dynamische Zellorganellen, die von einem Doppelmembransystem mit einem dazwischenliegenden Intermembranraum umgeben sind (**Abb. 2**). Sie sind in fast allen eukaryotischen Zellen zu finden und dienen vor allem dem Zweck, über die Zellatmung, Energie für Zellfunktionen und -prozesse zu erzeugen. Wie im mittleren Schema in **Abb. 2** gezeigt, können sich Mitochondrien in Reaktion auf Umwelteinflüsse umstrukturieren. Außerdem sind Mitochondrien in der Lage, zu einem Netz zu fusionieren, das das gesamte Zellvolumen einnehmen kann, und so die ATP-Produktion zu steigern. Autophagie bestimmt die Gesundheit und die Konzentration der Mitochondrien und ist notwendig, um ein physiologisches (gesundes) mitochondriales Netz aufrechtzuerhalten [3]. Diese Organellen sind an jeder Phase der Autophagie, u. a. als irreversible Membranquelle bei der Bildung von Autophagosomen und am autophagischen Fluss, beteiligt. Die Steuerung erfolgt über Energieniveaus [4]. Die Bewahrung der vollen Funktionsfähigkeit der Mitochondrien ist wichtig für das Überleben und die Langlebigkeit der Zellen.

Autophagie – die Upcyclingprogramm der Zellen

Die Ansammlung von Abfallprodukten in den Zellen nimmt mit zunehmendem Alter signifikant zu, während die Aktivität der Zellen und die Autophagieprozesse zurückgehen. Dies führt zu einer Beeinträchtigung der Zellen und damit verbunden zu einer Verschlechterung der Haut. Das Auslösen der Autophagie wäre somit eine ideale Technik gegen Hautalterung.

Die Bildung von Autophagosomen, den wichtigsten an der Autophagie beteiligten Organellen (**Abb. 3**), geht mit der Reorganisation der Membranen des Golgi-Apparats, der Mitochondrien, des endoplasmatischen Retikulums (ER) und der Plasmamembran einher [5, 6]. Während der Autophagie kommt es zur reversiblen Auflösung fast des gesamten Golgi-Apparats zugunsten der Bildung von Autophagosomen. Nur wenige Überreste bleiben erhalten, die für den Wiederaufbau des Golgi-Apparats wichtig sind. Im Wesentlichen,

die *de novo* gebildeten Doppelmembranstrukturen (Phagophoren) umgeben die Abfallprodukte verschliessen sie (Autophagosomen) und verschmelzen anschließend mit Lysosomen zu Autolysosomen. Im nächsten Schritt wird ihr Inhalt von Enzymen abgebaut. Die molekularen Mechanismen zur Bildung von Autophagosomen sind äußerst komplex. Die letzte Phase, nämlich die Spaltung des Membranproteins LC3A, ist von besonderem Interesse. Dieses Membranprotein ist nämlich für die korrekte Verschmelzung mit den Lysosomen verantwortlich. Das Vorhandensein von LC3A kennzeichnet die Autophagie und dient als einer der biochemischen Autophagiemarker.

chemischer Autophagiemarker.

REFORCYL®-AION (INCI: Propanediol, Water, Cucurbita Pepo (Pumpkin) Seed Extract, Citric Acid) enthält einen Extrakt aus den Samen spezieller, in der Steiermark, Österreich, angebaute Kürbisse. Seine Bestandteile Aminosäuren, Saccharide und Spermidin/Spermin sind in der Lage die Autophagie auszulösen. Ausserdem REFORCYL®-AION versorgt optimal die Zellen mit wichtigen Nährstoffen und beeinflussen somit die Zellen und die Haut von innen. Bei der Herstellung und Verarbeitung von REFORCYL®-AION wird der Ansatz der Kreislaufwirtschaft befolgt. Die entstehende CO₂-Emissionen werden durch Investitionen in zwei Klimaschutzprojekte ausgeglichen. Das Ergebnis ist ein beispielhafter Herstellungsweg von der Kultivierung bis zum fertigen Produkt.

Materialien und Methoden

Veränderungen der LC3A-Genexpression: Normale menschliche epidermale Keratinozyten (NHEK) wurden unter Standardbedingungen kultiviert. Am nächsten Tag wurde das

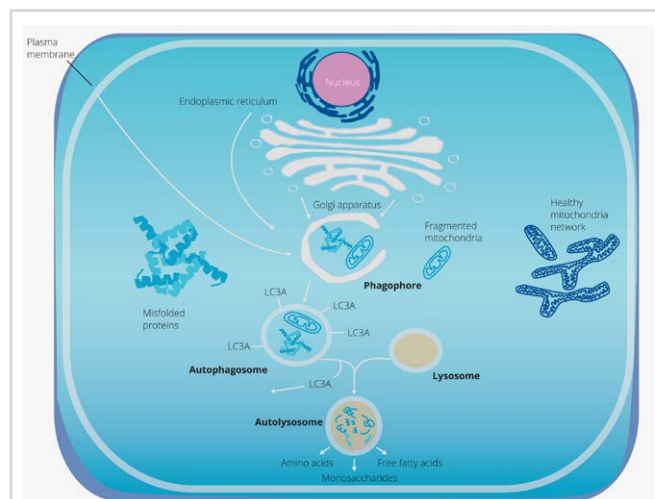


Abb. 3 Makroautophagie in Säugerzellen. Schematische Darstellung der wichtigsten Form der Autophagie.

Medium gegen frisches mit Serum (normale Bedingungen) oder ohne Serum (Nahrungsmangel) mit einem Gehalt an REFORCYL®-AION von 0 % oder 1 % ausgetauscht und für 24 Stunden kultiviert. Anschließend wurde aus allen Proben RNA extrahiert und eine quantitative RT-PCR durchgeführt, um den LC3-Transkriptionsgrad zu bestimmen.

Außerdem wurde mithilfe eines MTT-Tests die Lebensfähigkeit der Zellen bestimmt. Dazu wurden Zellen 24 Stunden lang mit unterschiedlichen Konzentrationen von REFORCYL®-AION im Bereich von 0 % bis 1 % behandelt. Anschließend wurde die MTT-Lösung 3 Stunden lang inkubiert und die Absorption bei 550 nm gemessen.

Statistische Analyse: one-way ANOVA.

Auslösen von Autophagie in gesunden Zellen und Stärkung von Mitochondrien unter Stressbedingungen: NHEK

wurden 24 Stunden lang auf einem Deckglas kultiviert. Danach wurde das Medium gegen frisches Medium mit Serum (Kontrolle) oder ohne Serum (Nahrungsmangel) mit einem Gehalt an REFORCYL®-AION von 0 % oder 1 % ausgetauscht und 24 Stunden lang kultiviert. Nach Abschluss der Inkubation wurden Proben 45 Minuten lang mit MitoTracker™ Deep Red FM (Mitochondrien) und über Nacht mit dem Antikörper Anti-Giantin (Golgi-Apparat) immunhistochemisch gefärbt. Zellkerne wurden mit DAPI gefärbt.

Allgemeine Verbesserung des Hautzustandes: Die *in-vivo*-Untersuchung wurde im Einklang mit der Deklaration von Helsinki des Weltärztebundes (WMA) durchgeführt. Es wurde eine doppelblinde, placebo-kontrollierte, randomisierte Studie an 55 freiwilligen Probanden (Frauen und Männern, zahlenmäßig gleich verteilt) durchgeführt. Über 56 Tage wurde zweimal täglich eine Emulsion mit einem Gehalt an REFORCYL®-AION von 0 % oder 3 % auf die Haut aufgetragen. Zur Bestimmung des subjektiven Eindrucks der Wirksamkeit wurde eine 5-Punkte-Bewertungsskala verwendet (5: stimme stark zu; 4: stimme zu; 3: weder – noch; 2: stimme nicht zu; 1: stimme überhaupt nicht zu). Diejenigen Probanden, die als Antwort die Option 5 oder 4 auswählten, galten als zufrieden mit den Behandlungsergebnissen.

Die statistische Analyse erfolgte mittels eines unabhängigen t-Tests.

Ergebnisse

Hochregulierung der LC3A-Genexpression

Das Vorhandensein von 1 % REFORCYL®-AION über 24 Stunden unter normalen Bedingungen erhöhte die Expression des Gens MAP1LC3A signifikant um 43 % (Abb. 4, links – normale Bedingungen) gegenüber der unbehandelten Kontrolle, was bedeutet, dass REFORCYL®-AION dazu in der Lage war, Autophagie auszulösen.

In den NHEK, die zuvor Nahrungsmangelbedingungen, einem natürlichen Auslöser von Autophagie, ausgesetzt waren, be-

stätigte der Anstieg der Expression des Gens MAP1LC3A um 54 % das Einsetzen der Autophagie (Abb. 4, rechts – Nahrungsmangel). Der signifikant höhere Anstieg der Expression des Gens MAP1LC3A in Zellen, die gleichzeitig Nahrungsmangelbedingungen und einer Behandlung mit 1 % REFORCYL®-AION ausgesetzt wurden, um 26 Prozentpunkte (insgesamt 80 %; Abb. 4, rechts) unterstrich die Wirksamkeit von REFORCYL®-AION bei der Auslösung von Autophagie. Da Autophagie und der Zelltod eng miteinander verknüpft sind, wurde auch die Lebensfähigkeit der Zellen getestet. Die Ergebnisse zeigten, dass REFORCYL®-AION bei Konzentrationen bis zu 1 % während 24 Stunden der Exposition in NHEK keine Apoptose auslöste, sondern die Zellen am Leben hielt (Daten nicht gezeigt).

Morphologische Manifestationen der Autophagie in gesunden Zellen

Unter normalen Bedingungen weisen Zellen einen auffälligen Golgi-Apparat in unmittelbarer Nähe des Zellkerns auf (Abb. 5, links oben, grün gefärbt). Bei Aussetzung gegenüber 1 % REFORCYL®-AION trat eine ausgeprägte Abnahme der Färbung des Golgi-Apparats auf, was die durch erhöhtes LC3 angezeigte voranschreitende Autophagie und zunehmende Bildung von Autophagosomen bestätigte (Abb. 5, rechts oben).

Dies war auch bei Proben zu beobachten, die Nahrungsmangel oder gleichzeitig Nahrungsmangel und 1 % REFORCYL®-AION ausgesetzt waren, wie in den unteren Aufnahmen der Abb. 5 zu sehen ist. Es ist bemerkenswert, dass die Überreste des Golgi-Apparats in der Kontrolle unter Nahrungsmangel im gesamten Zytoplasma verteilt waren, ähnlich dem Verteilungsmuster beim Zelltod [15], während in den mit REFORCYL®-AION behandelten Proben die Überreste an der Position in der Nähe des Zellkerns blieben, was auf einen hochgradig organisierten Auflösungsprozess hinweist, wie er in lebenden, gesunden Zellen zu beobachten ist.

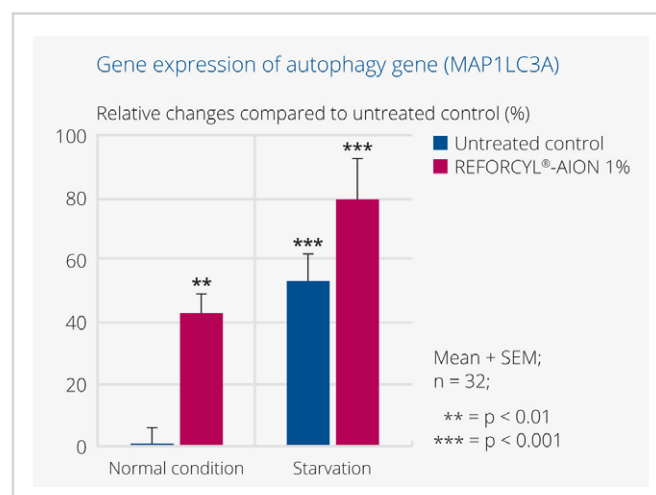


Abb. 4 REFORCYL®-AION führt zu Autophagie in einem geeigneten Maß für Zellerhaltung. Die Expression des Gens MAP1LC3A war sowohl unter normalen als auch unter Mangelbedingungen erhöht.

Das gut verteilte mitochondriale tubuläre Netzwerk unter normalen Bedingungen ist in **Abb. 5** (links oben) in Magenta dargestellt. Nach der Behandlung mit 1% REFORCYL®-AION ging die Mitochondrienfärbung im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle leicht zurück (**Abb. 5**, rechts oben). Obwohl für das bloße Auge nicht sichtbar, wird dies durch Quantifizierung der Fluoreszenzintensität (**Abb. 7**) deutlich. Interessanterweise ähnelte die Morphologie der Mitochondrien derjenigen unbehandelter Zellen (Kontrolle). Dank ihrer gesunden Verteilung über das gesamte Zytoplasma waren Autophagosomen deutlich als schwarze „Löcher“ in der Mitochondrienfärbung zu erkennen (**Abb. 5**, rechts oben, vergrößerter Ausschnitt). Nahrungsmangel ausgesetzte Zellen wiesen eine undefinierte, milchige Mitochondrienfärbung auf. Dies lässt auf eine extensive Teilung der Organellen schließen, was im Allgemeinen zu einem verstärkten Abbau von Mitochondrien und einer geringen Energieerzeugung führt. Proben, die gleichzeitig Nahrungsmangel und REFORCYL®-AION ausgesetzt waren (**Abb. 5**, rechts unten), wiesen eine energiereiche, vernetzte Architektur auf. Eine solche Morphologie ist nur bei gesunden Mitochondrien möglich. Eine filamentöse Mitochondrienarchitektur spielt eine wesentliche Rolle bei der Vorbeugung des vollständigen Abbaus, stellt zugleich ausreichend Energie für den Autophagieprozess bereit und kann Nährstoffdefizite ausgleichen. Auch hier war eine Vakuolisierung (Autophagosomen, schwarze „Löcher“) deutlich zu erkennen (**Abb. 5**, rechts unten, vergrößerter Ausschnitt). Prinzipiell sollte Autophagie zu einer Verkleinerung des mitochondrialen Netzes führen, wie aus einem Vergleich der Proben unter normalen Bedingungen mit den Proben unter Nahrungsmangelbedingungen ersichtlich ist.

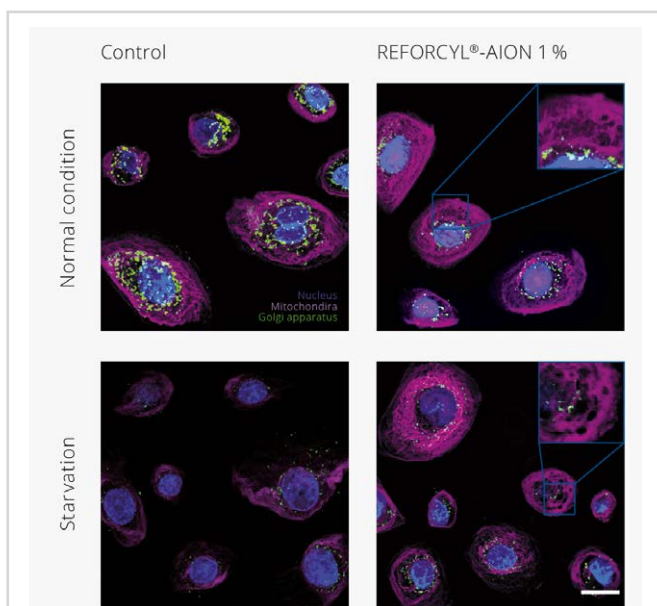
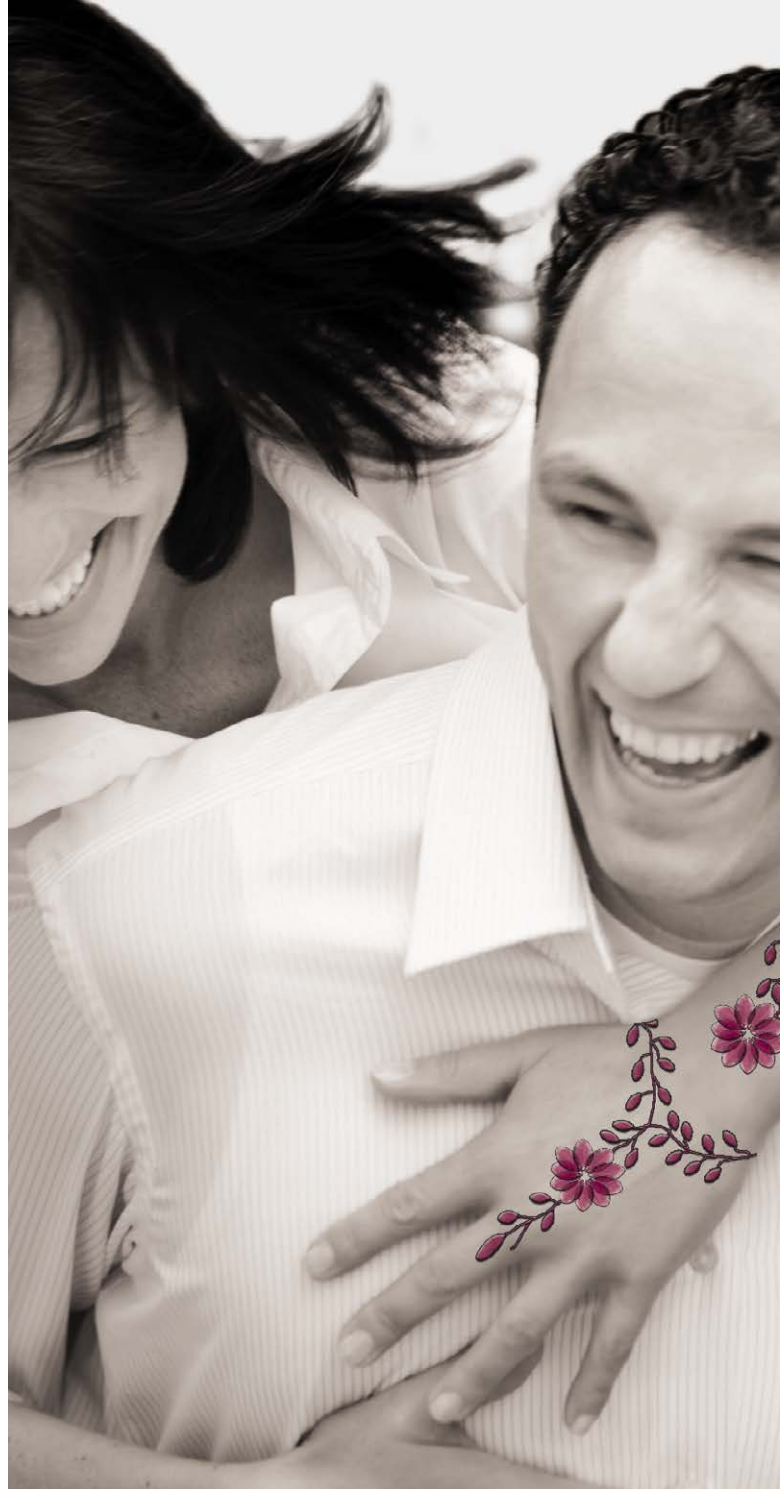


Abb. 5 REFORCYL®-AION ist in der Lage, durch Auflösung des Golgi-Apparats Autophagie hervorzurufen und gleichzeitig bewahrt es die Aktivität und Integrität der Mitochondrien. Immunfluoreszenzaufnahmen zeigen den Golgi-Apparat (grün), die Mitochondrien (Magenta) und den Zellkern (blau) in NHEK. Maßstab: 20 µm.



REFORCYL®-AION

Garb'Ageing Clean-Up

NEW

- Activates autophagy
- Maintains mitochondrial fitness
- Detoxifies and repairs aged skin

SWISS EXPERTISE 



RAHN

Your partner for excellence

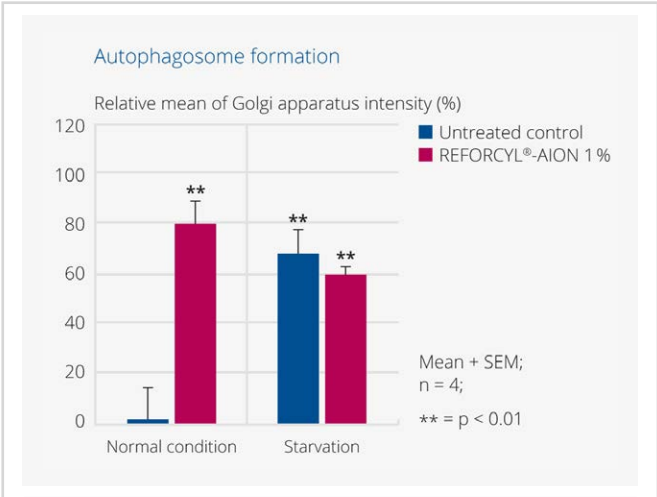


Abb. 6 Quantifizierung der Immunfluoreszenzintensität des Golgi-Apparats. Behandlung mit 1 % REFORCYL®-AION unter normalen Bedingungen resultierte in einer Zunahme der Bildung von Autophagosomen um 80 %.

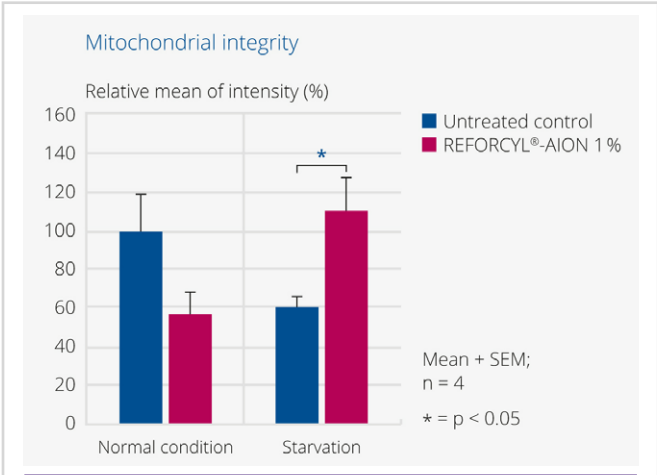


Abb. 7 Quantifizierung der Aktivität von Mitochondrien. Die Aktivität von Mitochondrien zeigt ihren Gesundheitszustand an. Inkubation mit 1 % REFORCYL®-AION in Kombination mit Nahrungsmangel führte zu einer Zunahme der Mitochondrienaktivität um 51 Prozentpunkte gegenüber der Kontrolle unter Mangelbedingungen.

Dies war in Gegenwart von REFORCYL®-AION jedoch nicht der Fall. Die einzige Erklärung ist, dass, obwohl Autophagie eindeutig ausgelöst wurde, REFORCYL®-AION dazu beitrug, dass die Mitochondrien einen gesunden Zustand mit hohem Energieniveau beibehielten.

Die Ergebnisse der Quantifizierung der Immunfluoreszenzintensität des Golgi-Apparats sind in **Abb. 6** dargestellt. Hier wurde die unbehandelte Kontrolle auf 0 % festgesetzt, d.h. keine Bildung von Autophagosomen. In Zellen, die 1 % REFORCYL®-AION ausgesetzt waren, kam es zu einer um bis zu 80 % erhöhten Bildung von Autophagosomen, während Nahrungsmangelbedingungen allein zu einer Zunahme um 68 % und Mangelbedingungen zusammen mit 1 % REFORCYL®-AION zu einer Zunahme um knapp 60 % führten. Das Experiment bestätigt, dass es unter allen Bedingungen zu einer maximalen Auslösung von Autophagie kam.

Stärkung der Mitochondrien unter Stressbedingungen

Die Ergebnisse der Quantifizierung der Immunfluoreszenzintensität der Mitochondrien sind in **Abb. 7** dargestellt. Die Kontrollprobe wurde als 100 % festgesetzt. Bei REFORCYL®-AION ausgesetzten Zellen wurde eine Abnahme um 43 % festgestellt. Quantifizierung der Immunfluoreszenz ergab einen Rückgang der Mitochondrienaktivität ähnlich dem in den Proben ausgesetzt der Nahrungsmangel (40%). Dies weist deutlich auf einen laufenden Autophagieprozess hin, in dem beschädigte und beeinträchtigte Mitochondrien von Autophagosomen umschlossen und abgebaut wurden. Quantifizierung der Immunfluoreszenz nach Nahrungsmangel und gleichzeitiger Behandlung mit 1 % REFORCYL®-AION ergab eine bessere Aktivität als in den Kontrollproben. Im Vergleich zu den Proben ausgesetzt der Nahrungsmangel war die Aktivität der Mitochondrien

signifikant um 51 Prozentpunkte erhöht. Dieses Phänomen einer intensiven ATP-Produktion durch ein Netzwerk von Mitochondrien ist während der Zellteilung zu beobachten, bevor Zellen in die energiezehrende Phase der DNA-Replikation eintreten. Das bedeutet, dass REFORCYL®-AION in der Lage ist, die notwendigen Nährstoffe zu liefern und die Mitochondrien unter Stressbedingungen, z.B. aufgrund von Nahrungsmangel, zu stärken, sodass ausreichend Energie für die Autophagie und den Überlebensprozess bereitgestellt wird.

Allgemeine Verbesserung des Erscheinungsbildes der Haut

Eine Befragung der 55 Probanden, Frauen und Männer, hinsichtlich ihrer persönlichen Wahrnehmung der Wirkung auf unterschiedliche Hautbedingungen ergab für die meisten der untersuchten Parameter einen signifikanten Unterschied zwischen Placeboemulsion und Emulsion mit 3 % REFORCYL®-AION nach 56 Tagen der Anwendung (**Abb. 8**).



Abb. 8 Subjektive Beurteilung verschiedener Hautparameter. Die Ergebnisse zeigten signifikante Unterschiede zwischen der Behandlung mit Placebo und Verum.

Es ist bemerkenswert, dass die Behandlung mit dem Verum mit signifikanten Verbesserungen nahezu aller abgefragten Parameter in Zusammenhang stand. Mindestens 80 % der Probanden, die die REFORCYL®-AION-Emulsion anwendeten, waren mit den Behandlungsergebnissen zufrieden. Es ist hervorzuheben, dass 100 % der Anwender des Verums ihre Haut als besser ernährt beschrieben. Rund 90 % der Probanden bewerteten Feuchtigkeitsversorgung, Glätte, Straffheit und Sebumregulierung ihrer Haut positiv, während 86 % allgemein mit den Ergebnissen hinsichtlich Ebenmäßigkeit der Haut, Hautrötung, Porenverringern und Hautverjüngung zufrieden waren.

Fazit und Diskussion

In Anbetracht der Ergebnisse insgesamt kann geschlossen werden, dass REFORCYL®-AION in der Lage ist, unter normalen Bedingungen Autophagie unter Beteiligung von 80 % der Zisternen des Golgi-Apparats auszulösen und den Abbau beeinträchtigter Mitochondrien herbeizuführen. Interessanterweise wird bei Auslösung der Autophagie aufgrund eines Nahrungsmangels eine Notreserve schnell verfügbarer Aminosäuren, Proteine und Kohlenhydrate freigesetzt, die die

Fusion der Mitochondrien zu einem energiereichen Netz bewirken, das zur Verteidigung gegen Apoptose dient und zugleich genug Energie für einen effektiven Autophagieprozess bereitstellt.

REFORCYL®-AION vereint modernste Erkenntnisse der Molekularbiologie mit den Grundsätzen der CO₂-Neutralität und bietet ein ganzheitliches Aufwertungskonzept, das sowohl der Haut als auch unserer Umwelt nutzt.

Referenzen

- [1] Farquhar, M.G. and G.E. Palade, The Golgi apparatus (complex)-(1954-1981)-from artifact to center stage. J Cell Biol, 1981. 91(3 Pt 2): p. 77s-103s.
- [2] Geng, J. and D.J. Klionsky, The Golgi as a potential membrane source for autophagy. Autophagy, 2010. 6(7): p. 950-1.
- [3] Youle, R.J. and A.M. van der Bliek, Mitochondrial fission, fusion, and stress. Science, 2012. 337(6098): p. 1062-5.
- [4] Rambold, A.S. and J. Lippincott-Schwartz, Mechanisms of mitochondria and autophagy crosstalk. Cell Cycle, 2011. 10(23): p. 4032-8.
- [5] Mizushima, N. and M. Komatsu, Autophagy: renovation of cells and tissues. Cell, 2011. 147(4): p. 728-41.
- [6] Wang, J., et al., Autophagosome formation: Where the secretory and autophagy pathways meet. Autophagy, 2017. 13(5): p. 973-974.

Kontakt

Emina Besic Gyenge
Stefan Hettwer
Brigit Suter
Sandra Breitenbach
Barbara Obermayer
RAHN AG

Dörflistrasse 120
8050 Zurich | Switzerland

proDERM

Your partner for trustworthy clinical studies.

25 YEARS proDERM

+10,000 STUDIES CONDUCTED

+50,000 PRODUCTS TESTED

+225,000 SUBJECTS ENROLLED

Research to rely on.