

Eine neue Strategie zur holistischen Hautverjüngung

Julia Baumann, Franziska Wandrey, Fred Züllic

Abstract

Ein revolutionäres Anti-Aging-Konzept, Senolytika, hat Einzug in die medizinische Welt gehalten. Senolytika haben in ersten Versuchen bemerkenswerte Ergebnisse gezeigt und können eine Verjüngung verschiedener Gewebe bewirken, indem sie gezielt seneszente Zellen eliminieren, ohne gesunde Zellen zu schädigen. Dieses Konzept wurde nun für die Kosmetikindustrie angepasst, indem seneszente Fibroblasten in gealterter und lichtgealterter Haut gezielt eliminiert werden. Um die Hautverjüngung optimal zu vervollständigen, müssen die eliminierten Fibroblasten jedoch durch neue Zellen ersetzt werden – dies kann durch die Aktivierung der dermalen Stammzellen erreicht werden. Diese revolutionäre Idee wurde mit dem innovativen Wirkstoffkonzept SenoCellTec™ umgesetzt.

Einführung

Die Bildung und Anhäufung seneszenter Zellen ist eines der entscheidenden Merkmale der Alterung [1]. Seneszente Zellen werden auch als "Zombiezellen" bezeichnet: sie teilen sich nicht mehr, sind aber auch noch lange nicht tot. Als solche scheiden seneszente Zellen weiterhin Signalmoleküle aus, die Entzündungen fördern und umliegende Zellen weiter beeinträchtigen, so dass diese ebenfalls seneszent werden. Interessanterweise legt eine jüngste Veröffentlichung von *Franco et al.* [2] nahe, dass seneszente Zellen in der Haut sogar zur allgemeinen Alterung des Körpers beitragen können. Diese Theorie unterstreicht, wie wichtig es ist, senolytische Inhaltsstoffe in Kosmetika einzubauen.

Der seneszenzassoziierte sekretorische Phänotyp (SASP), der durch die Sekretion von Molekülen wie entzündlichen Zytokinen und Proteasen gekennzeichnet ist, führt zu hohen Konzentrationen der typischen Alterungsmarker in der Haut. In jüngeren Geweben werden seneszente Zellen normalerweise vom Immunsystem beseitigt. In gealterter Haut mit eingeschränkter Immunfunktion ist diese Beseitigung jedoch beeinträchtigt, und die seneszenten Zellen reichern sich an. Das neue Konzept "Senolytika" hilft, Gewebe wie die Haut von solchen seneszenten Zellen zu befreien. Bei diesem Ansatz ist es wichtig, dass die senolytische Substanz spezifisch nur die seneszenten Zellen eliminiert, ohne die gesunden, sich teilenden Zellen zu schädigen. Obwohl Senolytika ein brandneues Thema der Biowissenschaften sind – der Begriff Senolytika wurde erst 2015 geprägt [3] – wurden bereits mehr als 700 wissenschaftliche Artikel veröffentlicht, in denen die senolytische Aktivität zahlreicher Substanzen untersucht wurde. In unserer Forschungs Kooperation zwischen Mibelle Biochemistry und Helvecos haben wir einen Extrakt aus Alpenrosenblättern (*Rhododendron Ferrugineum*) entdeckt, der senolytische Aktivitäten aufweist. Auf der Grundlage der

Analyse von Verbindungen in diesem Extrakt konnten wir Moleküle identifizieren, die möglicherweise für diese Aktivität verantwortlich sind.

Ein weiteres Kennzeichen der Hautalterung ist der Abbau von Stammzellen [1]. Daher ist die Stimulierung und Auffüllung der Stammzellen eine weitere wirksame Strategie zur Bekämpfung der Hautalterung. Wir haben bereits gezeigt, dass die in pflanzlichen Stammzellen gefundenen Verbindungen die Vitalität der Hautstammzellen fördern [4]. Um die senolytische Wirkung des Alpenrosen-Extrakts bei der Hautverjüngung zu ergänzen, haben wir daher die Wirkung eines Apfelmastzellenextrakts (*Malus Domestica*) untersucht, der die dermalen Vorläuferzellen zur Regeneration der Dermis und der extrazellulären Matrix anregt. In einem weiteren Experiment untersuchten wir die durch diesen Apfelmastzellenextrakt induzierten dermal-epidermalen Interaktionen. Mit einem Extrakt aus Traubenstammzellen (*Vitis Vinifera*) konnte ein Schutz der epidermalen Vorläuferzellen erreicht werden. Somit bildet die Anwendung dieser pflanzlichen Stammzellenextrakte zusammen mit den senolytischen Verbindungen das leistungsstarke SenoCellTec™-Konzept für eine tiefgreifende Verjüngung der Haut.

Materialien und Methoden

Senolytischer Assay

Um das senolytische Potenzial des Alpenrosen-Extrakts zu bestimmen, wurden normale menschliche Hautfibroblasten zwei Stunden lang mit 500 µM H₂O₂ behandelt, um eine durch oxidativen Stress ausgelöste vorzeitige Seneszenz zu induzieren. Nach dreitägiger Kultur in normalen Medien (damit sich der seneszente Phänotyp in einer Subpopulation der Zellen vollständig etablieren konnte) wurde die Mischkultur aus seneszenten und nicht seneszenten Zellen 48 Stunden lang

entweder mit 1% Alpenrosen-Extrakt oder Navitoclax, einem bekannten senolytischen Medikament, behandelt oder als Kontrolle unbehandelt gelassen. Nach der Fixierung mit 2% Formaldehyd und 0,2% Glutaraldehyd wurden die Zellkerne mit DAPI angefärbt, um die relative Gesamtzellzahl zu bestimmen. Ein Test zur Bestimmung der Seneszenz-assoziierten β -Galaktosidase (β -gal) Aktivität wurde wie von *Zhao et al.* beschrieben durchgeführt und insgesamt 400 Zellen gezählt [5]. Die Wirksamkeit der Behandlung wurde durch Berechnung des Prozentsatzes der β -gal-positiven (seneszenten) Zellen im Vergleich zur Gesamtzahl der Zellen bestimmt.

Chemische Profilerstellung des Alpenrosenblattextrakts mittels CAMEL

Potenziell senolytische Moleküle im Alpenrosenblattextrakt wurden durch chemische Profilerstellung (CAMEL-Analyse, durchgeführt von NatExplore SAS) identifiziert [6]. Die Extrakte wurden 5 Stunden lang im Vakuum (bei 50°C, 5 mbar) eingedampft, bevor sie durch Zentrifugalpartitionschromatographie (CPC, Gerät TCPE300®) fraktioniert wurden. Die erhaltenen Fraktionen wurden dann mittels Kohlenstoff-13-Kernspinresonanz (13C NMR, Instrument Bruker Avance AVIII-600) analysiert und die im Extrakt enthaltenen Metaboliten identifiziert. Zur weiteren Bestätigung der chemischen Strukturen der identifizierten Metaboliten wurden die Extrakte auch mittels Flüssigchromatographie-Massenspektrometrie (LC-MS) analysiert.

Aktivierung der dermalen Sox2-positiven Vorläuferzellen

Um die Wirkung der Extrakte auf die Stammzellenaktivität zu bestimmen, wurde ein Sphärenbildungstest durchgeführt. Primäre dermale Papillenzellen wurden aus der Dermis behaarter Haut isoliert, die aus der Schönheitschirurgie stammte. Nach der dritten Passage wurden die Zellen mit 0,1% Apfelstammzellenextrakt behandelt, und ab der siebten Passage wurde ein Sphärenbildungstest durchgeführt. Nach 24 Stunden wurden repräsentative primäre Sphären entnommen und die Aktivierung der dermalen Vorläuferzellen durch Immunfärbung für den Stammzellmarker Sox2 bewertet. Die Anzahl der gebildeten sekundären und tertiären Sphären wurde nach drei bzw. sechs Wochen Kultivierung bestimmt.

Dermale – epidermale Kommunikation in einem Vollhautmodell

Die Wirkung eines Apfelstammzellenextrakts auf die Entwicklung einer reichhaltigen dermalen Matrix wurde anhand eines Vollhautmodells untersucht. Primäre humane dermale Fibroblasten wurden in Gegenwart von 0,1% des Stammzellenextrakts in Submersionskultur gezüchtet. Nach 14 Tagen wurden primäre humane epidermale Keratinozyten-Vorläuferzellen auf dem Fibroblastenmodell ausgesät und drei Tage lang gezüchtet, bevor sie an die Luft-Flüssigkeits-Grenzfläche gehoben wurden, gefolgt von einer weiteren 12-tägigen Kultur. Anschließend wurden die Hautmodelle geschnitten und die dermale und epidermale Organisation durch histologische Analyse (Hämatoxylin- und Eosin-Färbung) sichtbar gemacht.

Schutz der epidermalen Stammzellen durch Traubenstammzellenextrakt

Um die schützende Wirkung des Traubenstammzellenextrakts gegen UV-Bestrahlung zu bewerten, wurde die Koloniebildungseffizienz (CFE) mit Hilfe eines Kolonieassays bestimmt. Primäre menschliche Keratinozyten-Vorläuferzellen wurden mit 0,625% des Extrakts inkubiert, bevor sie 10 Minuten lang bei 450 kJ/m² UV-Licht ausgesetzt wurden (Gerät Suntest CPS+). Die Anzahl der gebildeten Kolonien (Parameter für aktive Progenitorzellen) wurde berechnet und mit unbestrahlten und unbehandelten Kontrollen verglichen.

Klinische Studie: Auswirkungen von Alpenrosenblattextrakt auf Hautrötungen

Um die senolytische Wirkung des Alpenrosenblattextrakts *in vivo* zu testen, wurde eine randomisierte, Placebo kontrollierte klinische Studie durchgeführt. An der Studie nahmen 44 weibliche Freiwillige im Alter von 40 bis 65 Jahren teil, die einen matten Teint und gerötete Wangen aufwiesen. Nach 14-tägigem Auftragen einer Creme mit 2% Alpenrosen-Extrakt oder einer Placebo-Creme zweimal täglich auf das ganze Gesicht wurden die Veränderungen der Hautrötung mit einem tragbaren Spektralphotometer (CM-700d, Konica Minolta) gemessen.

Klinische Studie: Auswirkungen des Apfelstammzellenextrakts auf die Hautstraffung

Die Wirkung des Apfelstammzellenextrakts auf die Hautstraffung wurde *in vivo* in einer randomisierten, Placebo kontrollierten klinischen Studie mit 21 Freiwilligen (Alter 35 bis 56 Jahre, Studie mit halbseitigem Gesicht) untersucht. Die Probanden trugen zweimal täglich eine Creme mit 2% Apfelstammzellenextrakt oder eine Placebo-Creme auf die jeweilige Gesichtshälfte auf. Nach 28 Tagen wurde die Straffung der Haut mit einem Indentometer® (IDM 800, Courage+Khazaka) gemessen.

Resultate and Diskussion

Ein neuer senolytischer Wirkstoff aus Schweizer Alpenrosenblättern

Entscheidend für einen senolytischen Wirkstoff ist seine Fähigkeit, seneszente Zellen zu eliminieren, ohne gesunde, nicht seneszente Zellen zu beeinträchtigen. In unserem senolytischen Assay konnten wir eine Fibroblastenkultur mit 28% seneszenten Zellen erzeugen. Die Behandlung mit dem Alpenrosenblattextrakt konnte die Anzahl dieser Zellen deutlich auf etwa 10% reduzieren, während die gesunden Fibroblasten größtenteils überhaupt nicht betroffen waren (**Abbildung 1**). Dieser Effekt ist vergleichbar mit der Behandlung mit dem bekannten senolytischen Medikament Navitoclax, das den Anteil der seneszenten Zellen auf 12% reduziert. Wir konnten also eine sehr selektive senolytische Aktivität dieses Extrakts nachweisen.

Mit unserer analytischen Untersuchung wollten wir das phytochemische Profil des Alpenrosenblattextrakts ermitteln. In

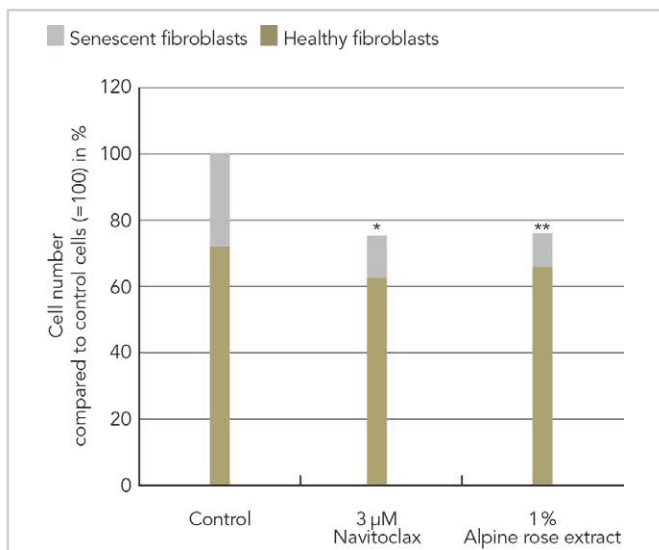


Abb. 1 Der mit 1% getestete Alpenrosenblattextrakts reduzierte die Zahl der seneszenten Fibroblasten signifikant von 28,1% auf 10,1%, während die gesunden Zellen unbeeinflusst blieben. Die Wirkung ist vergleichbar mit der Behandlung mit dem bekannten senolytischen Medikament Navitoclax.

der Tat konnten wir zahlreiche interessante Moleküle identifizieren (6). Insbesondere fanden wir Taxifolin und Farrerol in dem Extrakt (**Abbildung 2**). Diese Moleküle sind strukturell dem Fisetin sehr ähnlich (**Abbildung 2**), einer bekannten und starken senolytischen Verbindung [7]. Das natürliche Flavonoid Taxifolin bewirkt einen Stillstand des Zellzyklus durch Aktivierung des Wnt/beta-Catenin-Signalwegs. Dies führt zu einer Rückbildung von Tumoren und bietet eine allgemeine senolytische Aktivität [8]. Auch Farrerol weist senolytische Funktionen auf, indem es die Expression von Bcl-2 reduziert [9]. Hochreguliertes Bcl-2 ist ein anti-apoptotischer Faktor, der die Fähigkeit seneszenter Zellen, im Gewebe zu verbleiben, bestimmt, so dass die Hemmung von Bcl-2 eine senolytische Wirkungsweise darstellt [10]. Das kombinierte Vorhandensein

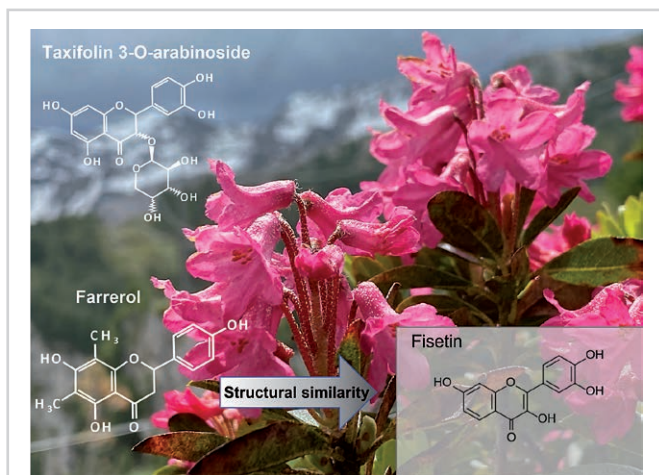


Abb. 2 Chemisches Profil und Identifizierung von senolytischen Molekülen. Das chemische Profil, erstellt durch CAMEL-Analyse, identifizierte Farrerol und Taxifolin im Alpenrosenblattextrakt. Diese Moleküle weisen eine große strukturelle Ähnlichkeit mit Fisetin auf, einem bekannten senolytischen Wirkstoff.

von Taxifolin und Farrerol erklärt somit die senolytische Aktivität des Extrakts aus den Blättern der Schweizer Alpenrose und macht ihn zu einem neuartigen Senolytikum aus natürlichen Quellen.

Holistische Verjüngungstherapie: Aktivierung der dermalen Vorläuferzellen

Die Aktivierung der dermalen Vorläuferzellen durch pflanzliche Stammzellextrakte kann den Ersatz der eliminierten seneszenten Fibroblasten nach einer senolytischen Behandlung unterstützen. Unter dieser Prämisse untersuchten wir die berühmten Apfelstammzellen, die nachweislich zur Vitalisierung von epidermalen Stammzellen beitragen [11], auf ihre Wirkung auf die Aktivierung der dermalen Stammzellen. Wir fanden heraus, dass der Apfelstammzellenextrakt in der Lage war, Sox2 (Stammzellmarker) positive dermale Vorläuferzellen in einem Sphärenbildungstest zu aktivieren. Außerdem konnte die Bildung von sekundären und tertiären Sphären (die auf eine stammzellähnliche Aktivität hinweisen) im Vergleich zu den Kontrollen um 38% bzw. 24% gesteigert werden (Daten nicht gezeigt).

Die Behandlung der Hautzellen mit dem Apfelstammzellenextrakt wirkte sich auch auf die Bildung der epidermalen Strukturen und der darunter liegenden dermalen Matrix in einem Vollhautmodell aus. Histologische Schnitte von Hautmodellen zeigten, dass die Behandlung zu einer verbesserten säulenförmigen Morphologie der basalen Keratinozytenschicht führte, mit einer reichlich vorhandenen darunter liegenden extrazellulären Matrix der Haut (**Abbildung 3a**). Außerdem führte die Behandlung mit Apfelstammzellenextrakt zu einer Zunahme der Hautdicke um 27% (**Abbildung 3b**).

Epidermale Vorläuferzellen sind wichtige Zellen in der Basalschicht der Epidermis. Sie leiten alle drei Wochen die vollständige Regeneration der Epidermis ein und sind daher in der oberen Hautschicht zu finden. Diese Lokalisierung macht sie jedoch auch sehr empfindlich gegenüber UV-Strahlung. In unseren Studien fanden wir heraus, dass ein Traubenstammzellenextrakt in der Lage war, die Vitalität der epidermalen Vorläuferzellen aufrechtzuerhalten und ihre koloniebildende Wirksamkeit trotz UV-Bestrahlung weiter zu stimulieren (**Abbildung 4**). Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Stammzellenextrakte nicht nur aktivierende, sondern auch schützende Wirkungen auf Hautvorläuferzellen haben.

Klinisch nachgewiesene Wirksamkeit der natürlichen Pflanzenextrakte

Um die *in vitro* beobachteten Ergebnisse zu verifizieren, haben wir zwei Placebo kontrollierte klinische Studien durchgeführt, um die Auswirkungen unserer Wirkstoffe auf die senolytische Aktivität und die Stimulation von Hautstammzellen zu untersuchen. Seneszente Fibroblasten sind durch den Seneszenz-assoziierten sekretorischen Phänotyp (SASP) gekennzeichnet, der zu einer chronischen Hautentzündung führt. In unserer Studie zeigten Probanden, die den Alpenrosenblattextrakt in einer Creme anwendeten, eine statistisch signifikante Verringerung der Hautrötung (ein Indikator für eine

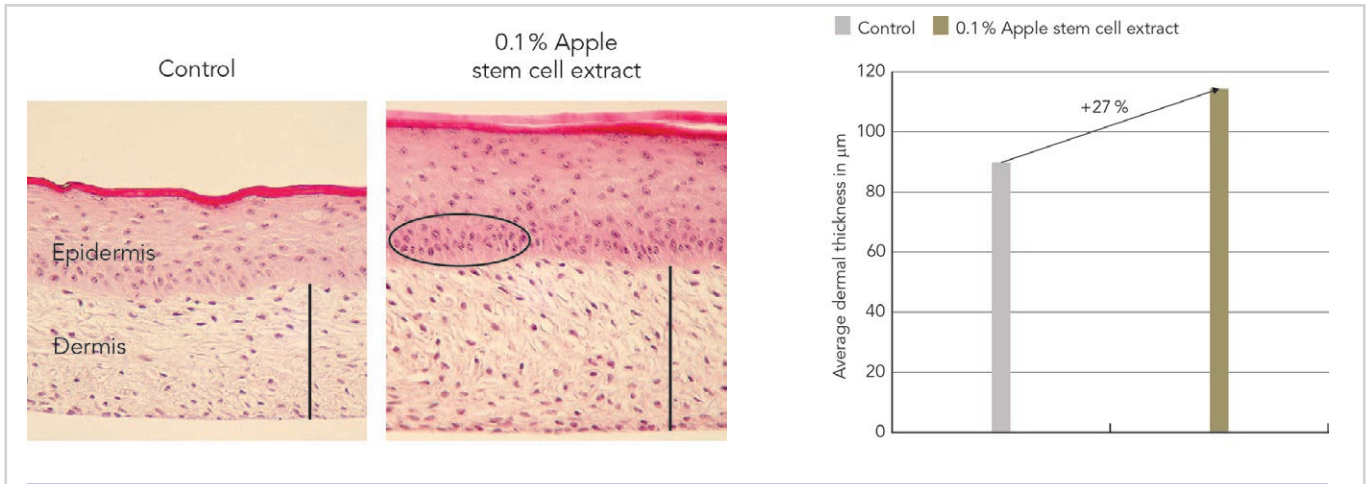


Abb. 3 Verbesserte Haut-Epidermis-Organisation mit Apfelstammzellenextrakt. (a) Histologische Schnitte des Vollhautmodells, die mittels H&E-Färbung analysiert wurden, zeigen eine verbesserte Epidermisbildung mit einer reichhaltigen darunter liegenden dermalen extrazellulären Matrix, wenn die Zellen mit Apfelstammzellenextrakt behandelt wurden. (b) Die Behandlung mit Apfelstammzellenextrakt führte zu einer weiteren Zunahme der Hautdicke um 27% im Vergleich zu den Kontrollen.

Hautentzündung) um 8,4% nach nur 14 Tagen Behandlung (**Abbildung 5**). Die Vorteile des Apfelstammzellenextrakts für die Aktivierung der dermalen Vorläuferzellen wurden in einer anderen klinischen Studie untersucht. Die Behandlung mit dem Extrakt führte zu einer statistisch signifikanten Verbesserung der Hautfestigkeit nach 28 Tagen im Vergleich zu Placebo (Daten nicht gezeigt).

Zusammengenommen unterstreichen die klinischen Studien sowohl die starke senolytische Wirkung des Alpenrosenblattextrakts als auch die stimulierende Wirkung der Stammzellenextrakte auf die Aktivierung und Vitalisierung der Hautstammzellen. In Kombination fördern diese Wirkstoffe eine verbesserte Hautstruktur und eine insgesamt lebendige und verjüngte Haut.

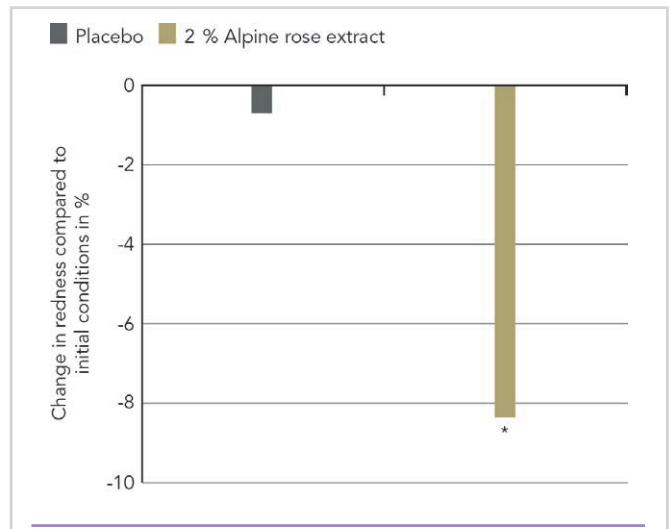


Abb. 5 Klinische Verbesserung von Hautrötungen mit Alpenrosen-Extrakt. Die Anwendung einer Creme mit 2% Alpenrosenblattextrakt führte nach 14 Tagen zu einer signifikanten Verringerung der Hautrötung, sowohl im Vergleich zu Placebo als auch zu den Ausgangsbedingungen.

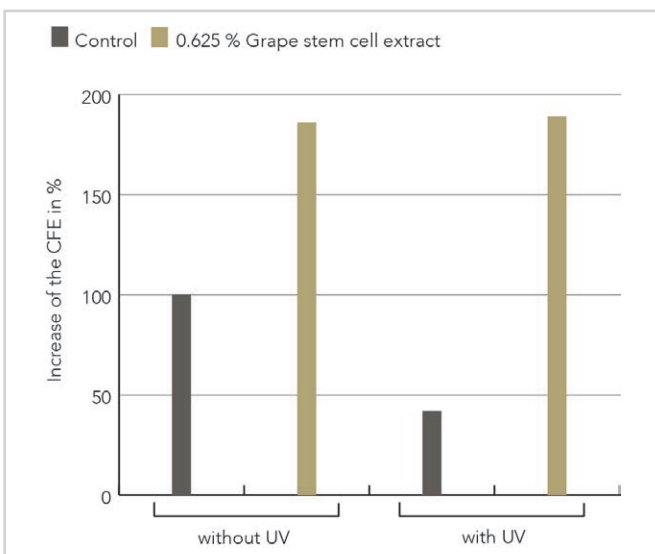


Abb. 4 Schützende Wirkung von Traubenstammzellenextrakt gegen UV-Bestrahlung. Die Behandlung mit 0,625% Traubenstammzellenextrakt war in der Lage, die Vitalität der epidermalen Vorläuferzellen aufrechtzuerhalten und ihre koloniebildende Wirksamkeit zu stimulieren, trotz UV-Bestrahlung (450kJ/m², 10 min).

Schlussfolgerung

Senolytika, ein neues Anti-Aging-Konzept, hat in den letzten Jahren viel Aufmerksamkeit erregt. Die gezielte Beseitigung seneszenten Fibroblasten in der Haut, ohne gesunde Zellen zu schädigen, ist auch für die Kosmetik eine sehr attraktive Strategie. In unseren Studien haben wir gezeigt, dass ein Extrakt aus Alpenrosenblättern eine ausgezeichnete senolytische Aktivität aufweist, die mit etablierten senolytischen Medikamenten vergleichbar ist. Um diese Anti-Aging-Strategie weiterzuentwickeln, haben wir SenoCellTec™ entwickelt, ein Wirkstoffkonzept, das auf der Idee basiert, senescente Zellen aus der Haut zu entfernen und dann wiederum die Hautstammzellen zu vitalisieren und zu schützen, um den Verjüngungsprozess zu fördern. Durch die Kombination des senolytischen Alpenrosen-Extraktes mit den aktivieren-

den und vitalisierenden Stammzellen-Extrakten bietet dieses "leeren and auffüllen"-Konzept ein neues und revolutionäres Konzept zur ganzheitlichen Hautverjüngung mit vielversprechenden Behandlungsmöglichkeiten in naher Zukunft.

Referenzen:

- [1] Lopez-Otin C, Blasco MA, Partridge L, Serrano M, Kroemer G., The hallmarks of aging. Cell. 2013;153(6):1194-217.
- [2] Franco AC, Aveleira C, Cavadas C., Skin senescence: mechanisms and impact on whole-body aging. Trends Mol Med. 2022;28(2):97-109.
- [3] Zhu Y, Tchkonja T, Pirtskhalava T, Gower AC, Ding H, Giorgadze N, et al., The Achilles' heel of senescent cells: from transcriptome to senolytic drugs. Aging Cell. 2015;14(4):644-58.
- [4] Schmid D, Züllig F., Use of Plant Cell Cultures for a Sustainable Production of Innovative Ingredients. SOFW. 2012.
- [5] Zhao J, Fuhrmann-Stroissnigg H, Gurkar AU, Flores RR, Dorronsoro A, Stolz DB, et al., Quantitative Analysis of Cellular Senescence in Culture and *In Vivo*. Curr Protoc Cytom. 2017;79:9 51 1-9 25.
- [6] Hubert J, Kotland A, Henes B, Poigny S, Wandrey F., Deciphering the Phytochemical Profile of an Alpine Rose (*Rhododendron ferrugineum* L.) Leaf Extract for a Better Understanding of Its Senolytic and Skin-Rejuvenation Effects. Cosmetics. 2022;9(2).
- [7] Yousefzadeh MJ, Zhu Y, McGowan SJ, Angelini L, Fuhrmann-Stroissnigg H, Xu M, et al., Fisetin is a senotherapeutic that extends health and lifespan. EBioMedicine. 2018;36:18-28.
- [8] Razak S, Afsar T, Ullah A, Almajwal A, Alkholief M, Alshamsan A, et al., Taxifolin, a natural flavonoid interacts with cell cycle regulators causes cell cycle arrest and causes tumor regression by activating Wnt/ beta -catenin signaling pathway. BMC Cancer. 2018;18(1):1043.

- [9] Liu E, Liang T, Wang X, Ban S, Han L, Li Q., Apoptosis induced by farrerol in human gastric cancer SGC-7901 cells through the mitochondrial-mediated pathway. European Journal of Cancer Prevention. 2015;24(5):365-72.
- [10] Yosef R, Pilpel N, Tokarsky-Amiel R, Biran A, Ovadya Y, Cohen S, et al., Directed elimination of senescent cells by inhibition of BCL-W and BCL-XL. Nat Commun 7: 11190. 2016.
- [11] Schmid D, Züllig F., Stimulating Epidermal Regeneration with Plant-derived Stem Cells. Cosmetics and toiletries. 2010;125.

Autoren

Dr. Julia Baumann, Dr. Franziska Wandrey*, Dr. Fred Züllig
Mibelle AG | Bolimattstrasse 1 | 5033 Buchs | Switzerland
*Artemis Research Project Leader

Korrespondenzautor:

Dr. Fred Züllig | Founder & Business Development Director
Mibelle AG | Bolimattstrasse 1 | 5033 Buchs | Switzerland

Supported by Helvecos AG | Trogenerstrasse 23 | 9055 Bühler | Switzerland

EverCare
Innovate · Enable · Protect

SUN Protection

Fine Chemicals and More...



Zano® & Xperse®

the Ultrafine Zinc Oxide solution for best balance of UVA and UVB protection for globally accepted SUN CARE formulations

- Safety and Naturality
- Formulation Esthetics
- Photostability in UVA & UVB
- Sustainability Support by the Positive Reef Initiative