

Einfluss von UVB-Strahlung auf die Expression von Entzündungsfaktoren im Linsenepithel

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Hohen Medizinischen Fakultät

der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität

Bonn

Eva-Katharina Willimsky

aus Stuttgart

2024

Angefertigt mit der Genehmigung

der Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachterin: PD Dr. med. Linda Maren Meyer PhD
2. Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. Sven Wehner

Tag der mündlichen Prüfung: 22.03.2024

Aus der Augenklinik der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

Direktor: Prof. Dr. med. Frank G. Holz

Für Martin und meine Eltern

Inhaltsverzeichnis

Einleitung und Problemstellung	10
1 Einführung in die theoretischen Grundlagen.....	13
1.1 Anatomie des Auges und seine Bedeutung für das Immunprivileg.....	13
1.1.1 Anatomie des Auges	13
1.1.2 Anatomie der Linse	14
1.1.3 Ermöglichung des Immunprivilegs durch anatomische Besonderheiten des Auges	16
1.1.4 Regulierung des Immunprivilegs durch Entzündungsfaktoren	17
1.2 Entzündungsfaktoren.....	19
1.2.1 Das Neuropeptid Substanz P und sein Rezeptor NK1R	20
1.2.2 Bedeutung von Substanz P für Entzündungsprozesse im Auge	22
1.2.3 Das Chemokin MCP-1	25
1.2.4 Bedeutung von MCP-1 für Entzündungsprozesse im Auge	26
1.3 Die Katarakt.....	28
1.3.1 Klinik und Symptome	28
1.3.2 Lokalisation	29
1.3.3 Ursachen und Risikofaktoren	30
1.4 Ultraviolette Strahlung	30
1.4.1 Bedeutung von UV-Strahlung für die Gesundheit	31
1.4.2 Wirkfaktoren der UV-Strahlung	31
1.5 UVB-induzierte Katarakt	34
1.5.1 Epidemiologische Nachweise für UVB als kataraktogener Faktor	34
1.5.2 Experimentelle Nachweise für UVB als kataraktogener Faktor.....	34
1.5.3 Pathophysiologie der UVB-bedingten Kataraktogenese durch Photooxidation	36
1.5.4 Katarakt Schwellendosis für die UVB-Bestrahlung der Linse der C57BL/6-Maus	38
1.5.5 Kataraktogenese durch Wechselwirkungen zwischen UVB-bedingter Photooxidation und inflammatorischen Prozessen	39
2 Material und Methoden.....	41
2.1 Auflistung des Materials.....	41
2.1.1 Verwendete Geräte	41
2.1.2 Chemikalien und Arzneistoffe	41
2.1.3 ELISA-Kits.....	42

2.1.3.1	MCP-1 ELISA-Kit von R D Systems	42
2.1.3.2	NK1R ELISA-Kit von Cusabio	42
2.2	Beschreibung wichtiger Geräte und der Versuchstiere	43
2.2.1	Das Bestrahlungsgerät Bio-Spectra	43
2.2.2	Das Durchlicht-Dunkelfeld-Mikroskop Leica M60	44
2.2.3	Versuchstiere	45
2.3	Methoden	45
2.3.1	Versuchsaufbau	45
2.3.2	Anästhesie und Voruntersuchung	46
2.3.3	Bestrahlungsvorgang	47
2.3.4	Gewebebegewinnung für den ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay)	48
2.3.5	Darstellung und Quantifizierung der Linsen-Morphologie	48
2.3.6	ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent) zum Nachweis von MCP-1 und NK1R	49
2.3.6.1	Das Wirkprinzip	49
2.3.6.2	Die Vorbereitung	51
2.3.6.3	Arbeitsschritte des MCP-1 ELISAs	52
2.3.6.4	Arbeitsschritte des NK1R ELISAs	53
2.3.6.5	Auswertung der ELISA-Tests	54
2.3.7	Statistische Auswertung	55
3	Ergebnisse	57
3.1	Ergebnis des Vorversuchs zur Ermittlung der Bestrahlungsdosis	57
3.2	Ergebnisse des Versuchs	58
3.2.1	Linsenmorphologie	58
3.2.1.1	Linsenmorphologie der Kontrollgruppe	58
3.2.1.2	Linsenmorphologie drei Tage und sieben Tage nach Bestrahlung	59
3.2.1.3	Vergleich der Linsenmorphologie nach Bestrahlung mit der dreifachen und fünffachen UVB-Schwellendosis	60
3.2.2	Quantifizierung der Linsentrübung als optische Dichte	61
3.2.3	Ergebnisse der ELISA-Tests	64
3.2.3.1	MCP-1-Konzentrationen im Linsenepithel der C57BL/6-Maus nach UVB-Exposition	64
3.2.3.2	NK1R-Konzentration im Linsenepithel der C57BL/6-Maus nach UVB-Exposition	65
4	Diskussion	68
4.1	Methodischer Ansatz	68

4.1.1	Versuchstiere	68
4.1.2	Anästhesierung	69
4.1.3	Untersuchungszeitraum	69
4.1.4	Bestrahlungsvorgang	70
4.1.5	ELISA (Enzym-linked Immunosorbent Assay) als Protein-Nachweisverfahren	71
4.1.6	Dunkelfeldmikroskopie und Lichtstreuungsmessung	72
4.2	UVB-bedingte Linsentrübung	72
4.3	Entzündungsregulierung durch UVB-abhängige Zytokinsynthese im Linsenepithel	74
4.3.1	Die inflammatorische Wirkung UVB-bedingter MCP-1-Erhöhung im Linsenepithel des bestrahlten Auges	74
4.3.2	Die inflammatorische Wirkung UVB-bedingter NK1R-Erhöhung im Linsenepithel des bestrahlten Auges	78
4.3.3	Beeinflussung der Apoptose von Linsenepithelzellen durch Substanz P und MCP-1	81
4.3.4	Einfluss der Apoptose von Linsenepithelzellen auf die Synthese von Substanz P und MCP-1	82
4.4	Die Regeneration des Linsenepithels und ihre mögliche Beeinflussung durch Substanz P und MCP-1	84
4.5	Entzündung und Katarakt	85
4.5.1	Der Einfluss von UVB Strahlung auf die NK1R und MCP-1-Synthese im nicht bestrahlten kontralateralen Auge	85
4.5.2	Belege für eine Zytokin-regulierte inflammatorische Komponente bei der Kataraktogenese	88
4.5.3	Mögliche Pathomechanismen der inflammatorischen Kataraktogenese und ihr Zusammenhang mit Substanz P und MCP-1	90
4.5.4	Ansatzpunkte einer möglichen Katarakt-Prävention und Katarakt-Therapie	93
4.5.4.1	Mögliche Katarakt-Prävention oder -Therapie durch NK1R-Antagonisierung	94
4.5.4.2	Mögliche Katarakt-Prävention oder -Therapie durch MCP-1-Antagonisierung	95
4.6	Abschließende Bewertung und Ausblick	97
5	Zusammenfassung	100
6	Abbildungsverzeichnis	102
7	Tabellenverzeichnis	104

8	Literaturverzeichnis.....	105
9	Danksagung	122
10	Publikationen	123

Abkürzungsverzeichnis

ACAID	<i>Vorderkammer-assoziierte abweichende Immunantwort</i>
APC	<i>Antigen-präsentierenden Zellen</i>
ARVO	<i>Association for Research in Vision and Ophthalmology</i>
CCL3	<i>C-C Motif Chemokine Ligand 3</i>
CCR2-Rezeptor	<i>C-C chemokine receptor type 2</i>
CXCL2	<i>C-X-C Motif Chemokine Ligand 2</i>
DNA	<i>Deoxyribonucleic Acid</i>
ELISA	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>
ERK1/2	<i>Extracellular-signal Regulated Kinases 1/2</i>
FELASA	<i>Federation of European Laboratory Animal Science Associations</i>
G-Protein	<i>Gruppe intrazellulärer Proteine mit der Fähigkeit die guaninbasierten Nukleotide GDP und GTP zu binden</i>
HRP	<i>Horseradish Peroxidase</i>
IFN- γ	<i>Interferon- γ</i>
IL	<i>Interleukin</i>
MBAA	<i>Multiplex Bead Array Assay</i>
MCP-1	<i>Monocyte chemotactic Protein 1</i>
MTD	<i>maximal tolerierbare Dosis</i>
Na-K-Pumpe	<i>Natrium-Kalium-Pumpe</i>
NK1R	<i>Neurokinin-1 Receptor</i>
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
ROS	<i>reaktive Sauerstoffspezies</i>
TGF- β	<i>Transforming growth factor- β</i>
TMB	<i>3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin</i>
TNF- α	<i>Tumornekrosefaktor- α</i>
USA	<i>United States of America</i>
UV	<i>Ultraviolette Strahlung</i>
UVA	<i>Ultraviolettstrahlung des Sonnenlichts im Wellenlängenbereich von 315 bis 380 nm</i>
UVB	<i>Ultraviolettstrahlung des Sonnenlichts im Wellenlängenbereich 280 – 315nm</i>
UVC	<i>Ultraviolettstrahlung des Sonnenlichts im Wellenlängenbereich von 100 bis 280nm</i>
Vakuum- UV	<i>Vakuumltraviolette Strahlung</i>
VIP	<i>Vasoactive intestinal peptide</i>
WHO	<i>World Health Organisation</i>
α -MSH	<i>α-Melanocyte-stimulating hormone</i>

Einleitung und Problemstellung

Die Katarakt ist eine Augenerkrankung, die durch die Trübung der Augenlinse zu einer Verschlechterung der Sehleistung führt. Nach der aktuellsten Analyse der WHO waren im Jahr 2010 weltweit 20 Millionen Menschen aufgrund einer Katarakt erblindet, was einem Anteil von 51 % an den gesamten Erblindungsfällen entspricht (World Health Organization, 2010). Bedingt durch weltweites Bevölkerungswachstum und den demographischen Wandel in westlichen Ländern steigt die Kataraktprävalenz kontinuierlich an. Es gibt bis dato weder erfolgreiche Präventivmaßnahmen noch erfolgreiche konservative Behandlungsmöglichkeiten. Die einzige Therapieoption ist die chirurgische Entfernung der getrübbten Linse und die Implantation einer Kunstlinse.

In Entwicklungsländern besteht aufgrund der hohen Kosten und der fehlenden ärztlichen Versorgung meist ein erschwerter Zugang zur chirurgischen Katarakttherapie. Die Kataraktprävalenz ist hier sehr hoch, häufig erblinden bereits junge Erwachsene und Kinder. Die sozialen und ökonomischen Folgen sind somit verheerend für den Einzelnen wie auch für die Gesellschaft.

In den Industrienationen ist die Katarakt überwiegend eine Erkrankung des Alters und die Katarakt-Operation, mit einer für Deutschland geschätzten Zahl von 900.000 Operationen pro Jahr, der am häufigsten durchgeführte elektive chirurgische Eingriff (Hirneiß *et al.*, 2014; Walter *et al.*, 2020). Die jährlichen Kosten für Katarakt-Operationen in Deutschland sind mit über 600 Millionen Euro erheblich (Hirneiß *et al.*, 2014). Für die Betroffenen ist dieser Eingriff zudem mit dem Risiko möglicher peri- oder postoperativer Komplikationen verbunden. Nach Hochrechnungen von Congdon (2001) könnte eine Herauszögerung der Kataraktentstehung um 10 Jahre die Anzahl an Katarakt-Operationen auf 50 Prozent senken.

Daher ist es sinnvoll und notwendig neue Erkenntnisse über die Entstehungs- und Pathomechanismen der Katarakt zu gewinnen und diese in konservative, kostengünstigere und für mehr Menschen zugängliche präventive Therapien umzusetzen.

Neben der natürlichen Alterung der Linse, genetischen Faktoren und Grunderkrankungen wie Diabetes mellitus stellt UVB-Strahlung die wichtigste modifizierbare Ursache für die

Kataraktentstehung dar (Hockwin *et al.*, 1999; Ivanov *et al.*, 2018; Roberts, 2011). Die Ursache ist eine Schädigung der hoch organisierten Mikrostruktur der Linse durch absorbierte Strahlung, insbesondere im Bereich der UVB-Wellenlängen. Dadurch entsteht eine Trübung der Linse, die als „Katarakt“ definiert ist. Die UVB-bedingte Kataraktogenese wird zunehmen, da die rapide globale Erwärmung und das dadurch mitbedingte Voranschreiten des Ozonabbaus zu einem Anstieg der UVB-Strahlung auf der Erde führt (Ohneiser *et al.*, 2021; von der Gathen *et al.*, 2021).

Zur Erhaltung der Linsenfunktion und -struktur ist das Epithel als einziges stoffwechselaktives Gewebe der Linse zentral wichtig (Dahm *et al.*, 2011). Hier zeigen sich pathologische Veränderungen bereits vor Ausbildung der sichtbaren Linsentrübung (Uga *et al.*, 1988). Deshalb sollte das Linsenepithel bei der Erforschung der molekularen Kataraktogenese-Mechanismen besondere Beachtung finden. Im Fokus der Kataraktforschung auf molekularer Ebene standen bisher vor allem die Oxidation der Linsenproteine durch reaktive Sauerstoffspezies (ROS) als bedeutendster Pathomechanismus der Proteinaggregation und resultierender Kataraktogenese (Davies und Truscott, 2001; Moreau und King, 2012a; Pau *et al.*, 1990; Truscott, 2005).

Allerdings treten Katarakte auch im Rahmen von Zytokin-assoziierten und systemisch entzündlichen Erkrankungen auf. Die hierbei zugrundeliegenden Pathomechanismen sind nicht bekannt, wurden jedoch bisher unabhängig von der Pathogenese der senilen Katarakt gesehen (Chen *et al.*, 2014). Es gibt jedoch mehrere Hinweise auf einen Zusammenhang zwischen systemisch erhöhten Entzündungsfaktoren und der Entstehung einer senilen beziehungsweise UVB-bedingten Katarakt (Klein *et al.*, 2006; Meyer *et al.*, 2013). Zudem gelang auch auf lokaler Ebene der Nachweis, dass das Epithel kataraktogener Linsen in der Lage ist, verschiedene Entzündungsfaktoren zu exprimieren (Nishi *et al.*, 1995).

Die Entzündungsfaktoren MCP-1 (Monocyte chemoattractant Protein-1) und Substanz P sind entscheidende Initiatoren und Regulatoren von Entzündungsprozessen im Auge. Mehrere frühere Studien geben Hinweise darauf, dass diese Zytokine insbesondere bei der UVB-bedingten Kataraktogenese von Bedeutung sind. Für Substanz P konnte in einer früheren Studie gezeigt werden, dass seine Expression in okulären Geweben durch UVB-

Strahlung getriggert wird (Gross *et al.*, 2018). Zudem wurde festgestellt, dass die Katarakt beim Menschen und im Tiermodell mit einem vermehrten Vorkommen des Entzündungsfaktors MCP-1 im Kammerwasser assoziiert ist (Gao *et al.*, 2016; Kawai *et al.*, 2012; Kokubun *et al.*, 2017).

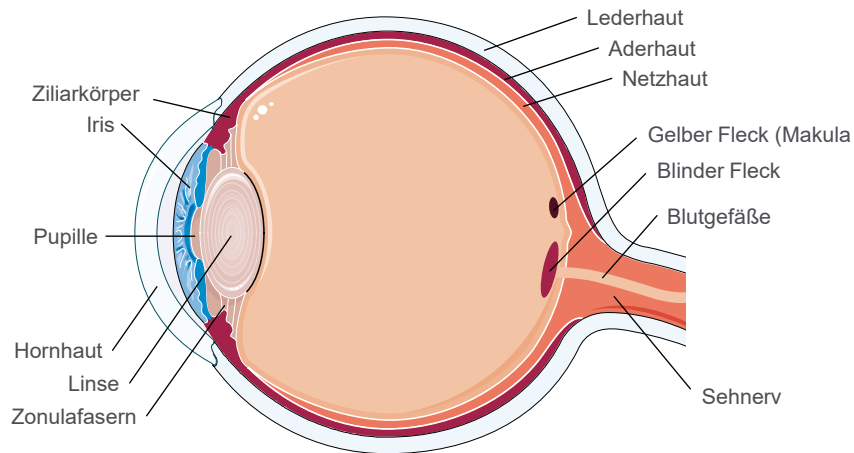
Nach jahrzehntelangen Forschungsbemühungen zur Entstehung der senilen Katarakt konnten zwar zahlreiche Risikofaktoren ermittelt werden, jedoch keine präventive Therapie daraus entwickelt werden. Daher ist es notwendig und dringlich, den bestehenden Hinweisen auf einen Entzündungsprozess als involvierten Pathomechanismus der Katarakt nachzugehen. Dies könnte einen Fortschritt bei der Umsetzung der gewonnenen Forschungsergebnisse in prophylaktische Maßnahmen und konservative Therapieansätze bewirken.

In der vorliegenden Arbeit wird deshalb die Rolle von entzündungsvermittelnden Zytokinen und Neuropeptiden bei der durch UVB-Strahlen induzierten Kataraktogenese *in-vivo* untersucht. Im Fokus stehen dabei MCP-1 und Substanz P mit ihrem Rezeptor NK1R (Neurokinin-1 Rezeptor). Es wird die mögliche Beteiligung dieser Entzündungsfaktoren an der UVB-bedingten Kataraktogenese und die Regulierung eines möglichen begleitenden Entzündungsprozesses durch diese *in vivo* am Mausmodell (C57BL/6-Mäuse, Charles River) analysiert. Mittels ELISA-Test überprüft werden soll die Hypothese, dass eine einseitige UVB-Exposition im bestrahlten Auge zur Erhöhung der MCP-1- und NK1R-Level im Linsenepithel führt. Es wird dabei auch die Annahme überprüft, dass höhere UVB-Dosen zu höheren Zytokinspiegeln im Linsenepithel führen. Auch eine mögliche UVB-bedingte Erhöhung der Zytokinlevel im contralateralen Auge soll untersucht werden. Die Morphologie der UVB-bedingten Linsentrübungen wird mittels Dunkelfeldmikroskopie dargestellt und Computer-gestützt quantifiziert; hier wird die Hypothese einer Dosis-abhängigen Verstärkung der Linsentrübung evaluiert.

1 Einführung in die theoretischen Grundlagen

1.1 Anatomie des Auges und seine Bedeutung für das Immunprivileg

1.1.1 Anatomie des Auges



*Abbildung 1: Anatomischer Überblick des Auges
Quelle: Eigene Abbildung*

Der menschliche Augapfel (Bulbus oculi) ist ein kugelförmiger Körper mit einem Gewicht von 7,5g (Schmidt *et al.*, 2010). Er liegt in der Augenhöhle (Orbita) umgeben von schützenden knöchernen Strukturen. Die Bulbuswand besteht aus drei Schichten: Die elastische und stabilisierende Hülle des Bulbus wird durch die Lederhaut und die Cornea gebildet. Die mittlere Augenhaut, die aufgrund ihres Gefäßreichtums als Gefäßhaut oder Uvea bezeichnet wird, setzt sich aus der Regenbogenhaut (Iris), Ziliarkörper (Corpus Ziliare) und Aderhaut (Choroidea) zusammen. Die Iris bildet die Pupille und dient dabei als verstellbare Blende. Der Ziliarkörper produziert das Kammerwasser, das zur Ernährung von Cornea (Hornhaut) und Linse dient. Die Netzhaut (Retina) als innere, den Bulbus auskleidende Augenhaut wird von der Choroidea mit Blut versorgt (Aumüller, 2007).

Im Inneren des Auges unterscheidet man drei Kammern. Die vordere Kammer liegt zwischen Cornea-Rückfläche und Iris und beinhaltet das Kammerwasser sowie im Randbereich das Trabekelwerk. Durch dieses fließt das Kammerwasser ab nach Passage von der hinteren in die vordere Kammer. Die hintere Kammer erstreckt sich von der Iris zur

Vorderfläche des Glaskörpers. Die hintere Augenkammer beinhaltet den größten Teil der Linse, die in einer Ausbuchtung des Glaskörpers, der Fossa hyaloidea, liegt. In ihrer Position wird die Linse durch die sogenannten Zonulafasern gehalten, ein Ring aus fibrösen Fasern, der um den Äquator der Linse verläuft und diese mit dem 0,5mm entfernten Ziliarkörper verbindet (Lang, 2000). Der dritte Raum des Auges ist der Glaskörperraum, er erstreckt sich über zwei Drittel des Augeninneren. Die gelartige Konsistenz des Glaskörpers setzt sich aus Hyaluronsäure, Kollagenfasern und Wasser zusammen (Quantock *et al.*, 2015).

1.1.2 Anatomie der Linse

Zum Verständnis dieser Arbeit ist es hilfreich, einen Einblick in die Anatomie und die Physiologie der Linse zu geben.

Im äquatorialen Durchmesser misst die Linse eines Erwachsenen 8,8- 12,25mm (Lang, 2000). Im Gegensatz zum Augapfel, der seine endgültige Größe zum Ende der Pubertät hin erreicht, wächst die Linse durch den Erhalt der Linsenfasern ein Leben lang. Ihr Gewicht erhöht sich von 65mg bei der Geburt auf bis zu 260mg im Alter von 90 Jahren (Pescosolido *et al.*, 2016).

Die Linse ist ein Organ ektodermalen Ursprungs. Sie hat keinen Kontakt zu Mesenchymalzellen und ist durch ihre kollagene Kapsel abgegrenzt von den umgebenden Strukturen. Da die Linse frei von Nerven und Gefäßen ist, erhält sie Nährstoffe und Mineralien ausschließlich durch den Transport aus dem Kammerwasser. Zusammen mit Cornea, Kammerwasser und Glaskörper gehört die Linse zu den einzigen klaren Strukturen des Körpers. Diese bilden den dioptrischen Apparat, dessen Funktion es ist, das durch die Pupille eintretende Licht so zu bündeln, dass ein scharfes Bild auf der Netzhaut entsteht (Hejtmancik und Shiels, 2015).

Im Inneren gliedert sich die Linse in die Rinde und den Kern, die beide aus Linsenfasern bestehen (Abbildung 2). Das einzige stoffwechselaktive Gewebe der Linse ist das Linsenepithel. Es verläuft vom vorderen Linsenpol bis zum Äquator und besteht aus einer Reihe kubischer Zellen mit einer Größe von 10 bis 20µm (Frederikse *et al.*, 2012).

Das anteriore Linsenepithel bildet die Wachstumszone (Zona germinativa), in der es lebenslang zur Zellteilung kommt (Abbildung 2). Im Rahmen der Elongation wandern die Tochterzellen in Richtung des Äquators und differenzieren sich dort zu proteinreichen sekundären Linsenfasern, die bis zu 10mm lang sein können (Perng *et al.*, 2007; Ray, 2015).

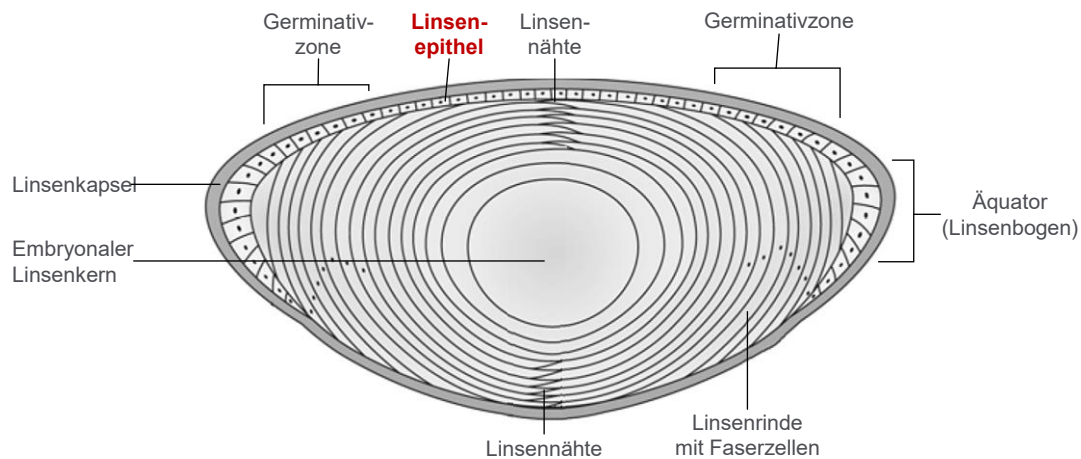


Abbildung 2: Frontalschnitt der Linse
 Quelle: In Anlehnung an Graw (2003)

Im Rahmen der Elongation verlieren die Fasern ihren Kern, nach und nach alle Organellen sowie ihr Zytoplasma (Naumann, 1980). Sie bestehen nun aus sehr stabilen, dicht gepackten, wasserlöslichen Linsenfasern, den Kristallinen (Flaugh *et al.*, 2005; Hejtmancik *et al.*, 2015). Die neu gebildeten länglichen Linsenfasern lagern sich zwiebel-schalenartig an die ältere Zellschicht an, das heißt von der Oberfläche in Richtung Zentrum. Es gehen bei diesem Prozess keine Linsenfasern verloren, sondern es kommt im Laufe des Lebens zu einer Verdichtung des Linsengewebes, bis hin zur Kernsklerosierung im Alter. So entsteht zentral der harte und dichte Linsenkern, in dessen Zentrum sich mitunter die ältesten Proteine unseres Körpers befinden und außen die weniger dichte Linsenrinde mit jüngeren Linsenfasern und -proteinen (Lang, 2000; Naumann, 1980). Sowohl die Kernsklerosierung als auch Schädigungen der Linsenfasern und des Linsenepithels können zur Trübung der Linse führen (siehe Kapitel 2.3).

1.1.3 Ermöglichung des Immunprivilegs durch anatomische Besonderheiten des Auges

Das Auge ist ein Organ mit vielen besonderen und teils einzigartigen Eigenschaften. Dazu zählt die im Körper sonst kaum vorkommende optische Transparenz von Cornea, Linse und Glaskörper, wodurch die Passage des Lichtes zur Retina hin ermöglicht wird. Zudem ist die Retina Teil des zentralen Nervensystems und zeichnet sich durch eine stark eingeschränkte Regenerationsfähigkeit aus. Diese Eigenschaften stellen das Immunsystem vor eine Herausforderung, da schädliche Keime abgewehrt werden müssen, jedoch der Schutz der optischen Transparenz und der Netzhaut gewahrt sein muss, um die Sehfunktion zu erhalten. Inflammatorische Immunantworten müssen folglich ohne Gewebeerstörung und ohne Vernarbung ablaufen, um okuläre Begleitschäden zu verhindern. Als Anpassung an diese Anforderungen ist das Auge bedingt durch zwei anatomische Besonderheiten vom Blut- und Lymphsystem isoliert (Grisanti, 1998).

Zum einen verhindert die Blut-Augen-Schranke das Einwandern von Plasmaproteinen und Immunzellen und reguliert den Stofftransport über Transporter. Die Blut-Augen-Schranke besteht aus:

- Blut-Retina-Schranke mit Tight Junctions im Pigmentepithel und ungefenstertem Epithel in den retinalen Gefäßen.
- Blut-Kammerwasser-Schranke mit Tight Junctions im nicht-pigmentierten Ziliarepithel und ungefensterter Epithelauskleidung in den Irisgefäßen.

Zum anderen besitzt das Auge keine abfließenden Lymphbahnen und somit fehlt der Kontakt zu Lymphknoten, in denen eine unmittelbare Immunantwort initiiert wird. Stattdessen verlassen Antigene das Auge über das Trabekelwerk und den Schlemmschen Kanal. Sie gelangen so direkt in das venöse Blut und zur Milz als erstes Lymphorgan (Campbell und Humphries, 2012).

Die genannten anatomischen Besonderheiten führen zur immunologischen Isolierung des Auges und zur Ausbildung immunprivilegierter Räume, in denen die Immunantwort abgeschwächt abläuft, so dass Antigene trotz ihrer Histo-Inkompatibilität länger im Gewebe überleben. Die immunprivilegierten Räume sind die Kammerwasser gefüllte

Vorderkammer, der Glaskörper und der Subretinalraum zwischen der Nervenzellschicht und dem Pigmentepithel der Retina.

Das Immunprivileg in den isolierten Bereichen des Auges entsteht nicht nur passiv durch anatomische Barrieren, sondern es findet ein durch Entzündungsfaktoren gesteuerter Regulationsmechanismus lokal im Auge und auf systemischer Ebene statt (Grisanti, 1998).

1.1.4 Regulierung des Immunprivilegs durch Entzündungsfaktoren

Im Rahmen der ersten Untersuchungen zum Immunprivileg des Auges wurde die Toleranzausbildung in der Vorderkammer bei Antigenkontakt untersucht, woraufhin das Phänomen des Immunprivilegs von da an als Vorderkammer-assoziierte abweichenden Immunantwort (ACAID) bezeichnet wurde (Streilein, 1996).

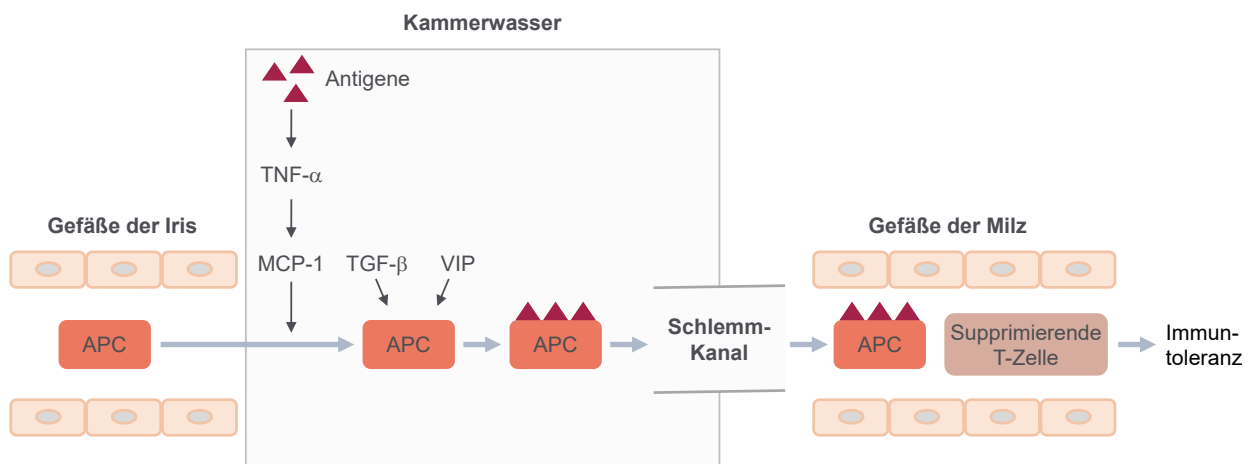


Abbildung 3: Induktion des Immunprivilegs durch Entzündungsfaktoren
 Bei Antigenkontakt erhöht der Entzündungsfaktor TNF- α die Synthese von MCP-1, das daraufhin Antigen-präsentierende Monozyten ins Kammerwasser rekrutiert. Dort wirken die immunsuppressiven Entzündungsfaktoren TGF- β und VIP auf die Antigen-präsentierenden Zellen ein, die über den Schlemm-Kanal zur Milz gelangen und dort an der Induktion von immunsupprimierenden T-Lymphozyten beteiligt sind. TNF- α : Tumornekrosefaktor- α , MCP-1: Monocyte chemoattractant Protein-1, APC: Antigen-presenting Cell, TGF- β : Transforming Growth Factor- β , VIP: Vasoactive Intestinal Peptide
 Quelle: Eigene Abbildung in Anlehnung an Cone und Pais (2009)

Unterscheiden lassen sich die Immunsuppression auf lokaler okulärer Ebene und die Ausbildung einer Immuntoleranz auf systemischer Ebene im gesamten Körper. In beiden Fällen erfolgt die Regulierung der Immunsuppression durch Entzündungsfaktoren (siehe Abbildung 3).

Lokal wird die Immunreaktion des Auges durch im Kammerwasser enthaltene immunsuppressive Entzündungsfaktoren wie TGF- β (Transforming growth factor- β), VIP (Vasoactive intestinal peptide) und α -MSH (α -Melanocyte-stimulating hormone) gesteuert, deren Synthese durch Antigene verstärkt wird. Diese Entzündungsfaktoren werden aus den umliegenden Augengeweben sezerniert. Bei Antigenkontakt induzieren sie in einer Kaskade die verstärkte Synthese von Chemokinen, die daraufhin Antigen präsentierende mononukleäre Lymphozyten und Monozyten ins Kammerwasser rekrutieren. Da die Rekrutierung antigenpräsentierender Zellen in die Vorderkammer vom CCR2-Rezeptor abhängig ist, wird davon ausgegangen, dass der Ligand für diesen Rezeptor - der Entzündungsfaktor MCP-1 - hierbei eine zentrale Rolle spielt (Cone und Pais, 2009).

Die im Kammerwasser enthaltenen Entzündungsfaktoren wirken auf die rekrutierten Antigenpräsentierenden Zellen ein und sorgen lokal für die Inhibierung sensibilisierter Lymphozyten sowie die Deletion aktivierter Lymphozyten (Ishida *et al.*, 2003; Stein-Streilein und Streilein, 2002; Taylor, 1996).

Auch die systemische Immuntoleranz wird durch das Einwirken der Entzündungsfaktoren des Kammerwassers auf die ins Auge rekrutierten Antigenpräsentierenden Immunzellen ermöglicht. Die Antigenpräsentierenden Zellen werden dabei spezifisch in ihrer Funktion verändert. Daraufhin bewirken sie nach Auswanderung in die Milz, die Induktion und Proliferation von antigenspezifischen immunsupprimierenden T-Lymphozyten, die die Synthese antikörperbildender B-Lymphozyten unterdrücken und auf diese Weise eine systemische Immunantwort hervorrufen (Streilein und Niederkorn, 2007; Taylor, 2016).

Das Immunprivileg besteht nicht absolut und kann aufgehoben werden, indem trigeminale Fasern auf einen Reiz hin den proinflammatorischen Entzündungsfaktor Substanz P ausschütten. Substanz P antagonisiert die immunsuppressive Wirkung oben erwähnter Faktoren und ist so in der Lage, die Blut-Kammerwasser-Schranke zu stören und das

Immunprivileg gänzlich aufzuheben (Bill *et al.*, 1979; Seiger *et al.*, 1985). Die Immunprivileg aufhebende Wirkung von Substanz P kann durch Blockade seines Rezeptors antagonisiert werden und so das Immunprivileg wieder hergestellt werden (Ferguson *et al.*, 1995; Lucas *et al.*, 2012; Paunicka *et al.*, 2015).

Substanz P und MCP-1 sind folglich entscheidend daran beteiligt, entweder eine Immuntoleranz im Körper auszulösen, oder im Gegenteil, das Privileg aufzuheben und eine Immunantwort im Auge stattfinden zu lassen. Auch dann, wenn es zu dieser Immunreaktion kommt, sind beide Entzündungsfaktoren an der Regulierung beteiligt. Daher stehen diese Entzündungsfaktoren im Fokus dieser Arbeit.

Die Entdeckung der abweichenden Immunantwort des Auges und im besonderen Maße auch die Erkenntnis ihrer Aufhebbarkeit, haben das Verständnis okulärer Entzündungsprozesse verändert (Grisanti, 1998). Dieses Wissen sollte auch bei der Erforschung einer entzündlichen Komponente bei der Kataraktogenese Beachtung finden.

Im Folgenden werden Substanz P, dessen Rezeptor NK1R sowie MCP-1 vorgestellt und in das weite Feld der Entzündungsfaktoren eingeordnet sowie ihre herausragende Rolle für die Regulierung von Entzündungsprozessen im Auge und für die Fragestellung dieser Arbeit erörtert.

1.2 Entzündungsfaktoren

Zu den Entzündungsfaktoren zählen Zytokine und ihre Unterformen wie Chemokine, Wachstumsfaktoren und Tumornekrosefaktoren. Zusätzlich können auch Neuropeptide Entzündungen modulieren und damit auch als Entzündungsfaktoren agieren. Die Aufgabe der Entzündungsfaktoren ist die Rekrutierung von Blutzellen in das Gewebe sowie die Modulierung und Stimulierung anderer Immunzellen. Im Auge werden Entzündungsfaktoren sowohl unter physiologischen als auch verstärkt unter pathologischen Bedingungen von Retina, Hornhaut, Iris und Ziliarkörper gebildet. Die Fähigkeit des Linsenepithels zur Synthese von Entzündungsfaktoren wurde durch Kultivierung von Linsenepithelzellen gezeigt (Kawai *et al.*, 2012; Nishi *et al.*, 1992; Nishi *et al.*, 1996).

Auch das Kammerwasser beinhaltet Entzündungsfaktoren, die aus den umliegenden Augengeweben sezerniert werden, so dass sich laut Grisanti (1998) das „okuläre Milieu“ im Kammerwasser wiederfindet. Abweichende Zusammensetzungen der Entzündungsfaktoren im Kammerwasser konnten im Rahmen verschiedener okulärer Erkrankungen beobachtet werden, wie beispielsweise in Bezug auf das Glaukom (Chua *et al.*, 2012), die altersbedingte Makuladegeneration (Jonas *et al.*, 2010), Uveitiden (Ongkosuwito *et al.*, 1998) und Retinopathien (Funatsu *et al.*, 2005). Auch für die Kataraktogenese konnten bereits erste bedeutende Erkenntnisse, in Hinsicht einer entzündlichen Komponente gewonnen werden. Dies trifft sowohl auf die Zusammensetzung lokaler Entzündungsfaktoren als auch auf den Anstieg systemischer Entzündungsfaktoren zu. Die bisherigen Studienergebnisse werden unter dem Punkt 2.6.5 vorgestellt. Diese Arbeit geht der Rolle von Entzündungsfaktoren insbesondere für die UVB-induzierte Kataraktogenese nach.

1.2.1 Das Neuropeptid Substanz P und sein Rezeptor NK1R

Substanz P ist ein Neuropeptid aus 11 Aminosäuren, das zur Familie der Tachykinine gehört. Es ist das erste im Auge entdeckte Neuropeptid. Seinen Namen erhielt es aufgrund der puderigen Konsistenz nach Extraktion aus Pferdehirn und -Dünndarm. (Euler und Gaddum, 1931). Es wird in vielen Geweben des Körpers und von unterschiedlichen Zellarten gebildet. Sein Vorkommen im Körper ist weit verbreitet und umfasst das Nervensystem, das kardiovaskuläre System, Magen, Darm, Drüsengewebe und den Respirationsstrakt. Die Synthese findet in Epithelzellen, in Immunzellen wie Makrophagen, Eosinophilen, Lymphozyten und dendritischen Zellen sowie Nervenzellen statt (Mashaghi *et al.*, 2016; O'Connor *et al.*, 2004).

Der erste wichtige Wirkungsbereich von Substanz P ist die Entzündungsregulierung. Als Entzündungsmediator bewirkt es die Dilatation und Durchlässigkeit von Blutgefäßen und rekrutiert Immunzellen. Diese regt Substanz P zur Synthese von Chemokinen (wie zum Beispiel MCP-1), proinflammatorischen Zytokinen und auch zur Bildung von entzündungsfördernden Substanzen wie Arachnoidonsäurederivaten, Sauerstoffradikalen und Histamin an (Hartung und Toyka, 1983; Murris-Espin *et al.*, 1995). Das zweite wichtige Wirkspektrum des Neuropeptids Substanz P ist die neuronale Übertragung. Es fungiert

als Transmitter im zentralen Nervensystem, wobei seine schmerzverstärkende Wirkung bisher am ausführlichsten analysiert wurde.

Seine Wirkung vermittelt Substanz P überwiegend über den Neurokinin-1 Rezeptor (NK1R), für den es eine sehr hohe Affinität aufweist. Dieser Rezeptor gehört zur Familie der G-Protein gekoppelten Rhodopsinrezeptoren mit sieben hydrophoben transmembranären Bereichen, die durch extra- und intrazelluläre schleifenförmige Proteinketten verbunden sind (Nakanishi, 1991).

Das an den Rezeptor gekoppelte G-Protein vermittelt die Wirkung von Substanz P über eine intrazelluläre Signalkaskade. Diese mündet in die Aktivierung der Signalkaskaden ERK1/2 (extrazelluläre Signal-bezogene Kinasen1/2), die in den Zellkern wandern, um dort die Synthese von Transkriptionsfaktoren zu initiieren, die die Fähigkeit besitzen, die Expression von Zytokinen zu steigern oder zu senken (Mashaghi *et al.*, 2016).

Wenn Substanz P an NK1R bindet, wird der gesamte Komplex in die Zelle aufgenommen. Nach vermittelter Substanz P-Wirkung wird der Rezeptor wiederverwertet. Durch Änderung der Geschwindigkeit, mit der dieser Prozess abläuft, kann die Wirkstärke von Substanz P auf die Zelle reguliert werden. Einfluss kann zum einen über verschiedene zytosolische Proteine und Enzyme, aber auch über andere Entzündungsfaktoren ausgeübt werden. So trägt TGF- β zu einer Drosselung der Internalisierungsgeschwindigkeit bei, wohingegen proinflammatorische Zytokine die Rezeptorverfügbarkeit erhöhen (Roosterman *et al.*, 2004; Suvas, 2017).

Die Halbwertszeit von Substanz P wird durch den chemischen und enzymatischen Abbau sowie durch die beschriebene Zellbindung und Zellinternalisierung bestimmt. Im Gewebe ist sie kurz und liegt im Bereich von Sekunden bis wenigen Minuten, im Plasma handelt es sich dagegen um eine Halbwertszeit von Stunden (Corbally *et al.*, 1990; Erdos und Skidgel, 1989; Skidgel *et al.*, 1984). Aufgrund der geringen Halbwertszeit von Substanz P gibt der experimentelle Nachweis des NK-1-Rezeptors ein präziseres Abbild der Substanz P-Aktivität. Die Übertragbarkeit der Erkenntnisse zur Physiologie des NK-1-Rezeptors der Maus auf den menschlichen NK-1-Rezeptor ist durch die hohe Homologie von NK1R

zwischen verschiedenen Spezies wie Mensch, Maus und Ratte begünstigt (Gerard *et al.*, 1993; Gerard *et al.*, 1991).

1.2.2 Bedeutung von Substanz P für Entzündungsprozesse im Auge

Substanz P ist im großen Ausmaß an der Induktion okulärer Entzündungen beteiligt. Zum einen ermöglicht es den Ablauf von Entzündungsprozessen durch Aufhebung des Immprivilegs (siehe Kapitel 2.2.1.) und zum anderen verstärkt und reguliert es Entzündungen im Auge durch Rekrutierung von Entzündungszellen und die Induktion der Zytokinsynthese. Proinflammatorisch wirkt Substanz P im Auge zudem durch seine Verstärkung der Gefäßproliferation und -permeabilität.

In vielen okulären Geweben konnte Substanz P durch Tiermodelle und Zellkulturen bisher nachgewiesen werden. Es kommt sowohl in Nervenfasern als auch in den Epithel- und Parenchymzellen okulärer Gewebe vor. So wurde an Ratten, Mäusen und Hasen gezeigt, dass Substanz P von trigeminalen Fasern produziert wird, die zu Iris, Cornea und Trabekelwerk ziehen (Jones und Marfurt, 1998; Keen *et al.*, 1982; Miller *et al.*, 1981; Stone *et al.*, 1987; Tervo *et al.*, 1981). Des Weiteren konnte Substanz P und auch sein NK-1-Rezeptor in cornealen Epithelzellen, Stroma-Keratozyten, Iris und Ziliarkörper, in bipolaren und amakrinen Zellen der Retina sowie 2018 erstmalig im Linsenepithel nachgewiesen werden (Brecha *et al.*, 1989; Casini *et al.*, 2002; Catalani *et al.*, 2006; Gross *et al.*, 2018; Watanabe *et al.*, 2002).

Die Auslöser für die Substanz P Freisetzung und die Hochregulierung des NK-1-Rezeptors sind mannigfaltig. Der folgende Überblick fasst die wichtigsten Erkenntnisse zur Aktivierung und Wirkung von Substanz P für die jeweiligen okulären Gewebe zusammen (siehe auch Abbildung 4).

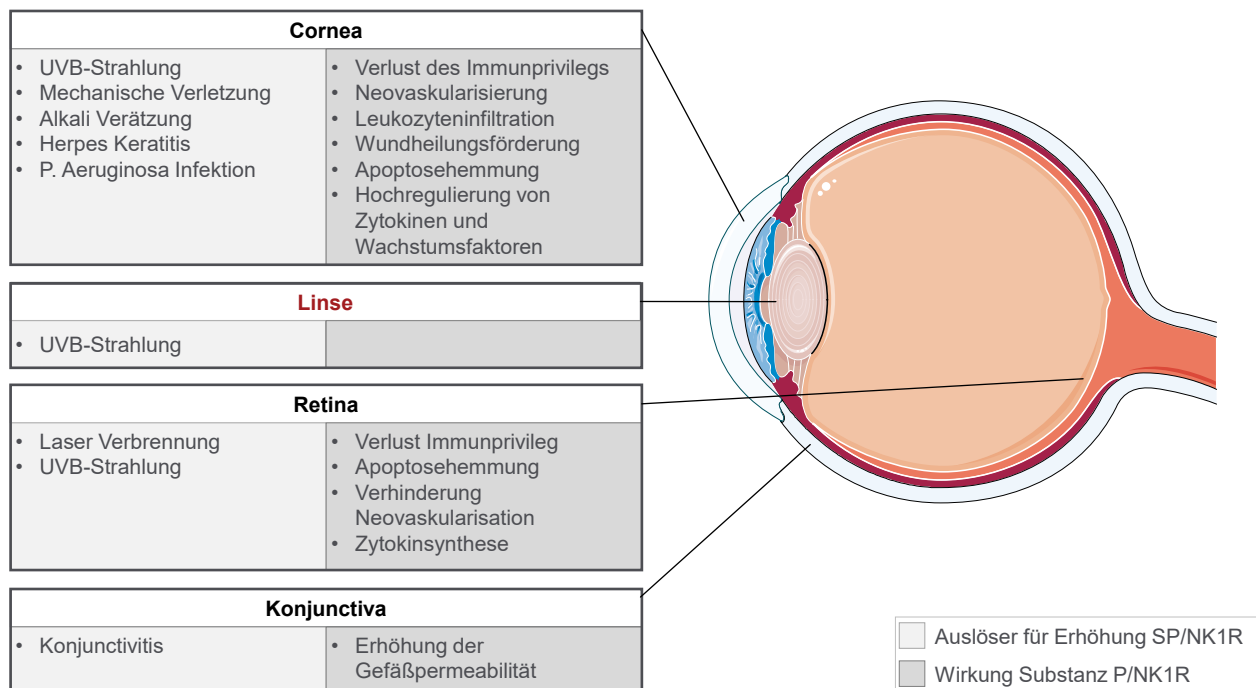


Abbildung 4: Die Wirkung von Substanz P am Neurokinin-1 Rezeptor im okulären Gewebe. SP: Substanz P, NK1R: Neurokinin-1 Rezeptor
 Quelle: Eigene Abbildung

Für die Cornea konnte eine Substanz P-Exprimierung nach mechanischer Verletzung sowie im Rahmen einer Herpes-Infektion nachgewiesen werden (Bignami *et al.*, 2014; Twardy *et al.*, 2011). Dabei wurde im Rahmen der Herpes-induzierten Keratitis bei der Maus eine Korrelation zwischen dem Schweregrad der Schädigung und der messbaren Substanz P-Menge im Hornhaut-Epithel beobachtet, was die Rolle von Substanz P als proinflammatorischem Entzündungsfaktor unterstreicht (Twardy *et al.*, 2011).

In der Tränenflüssigkeit des Menschen ist Substanz P physiologisch enthalten, seine Bedeutung ist dabei noch nicht erforscht (Varnell *et al.*, 1997). Im Rahmen der allergischen Konjunktivitis konnte ein Anstieg der Substanz P-Konzentration im Tränensekret nachgewiesen werden sowie eine Substanz P-abhängige Erhöhung der Gefäßpermeabilität in der Konjunktiva (Fujishima *et al.*, 1997; Yamaji *et al.*, 1997). Es ist folglich davon auszugehen, dass Substanz P seine proinflammatorische Wirkung auch im Rahmen von Autoimmunprozessen ausübt.

Für die Retina ist die Bedeutung von Substanz P als zentrales proinflammatorisches Zytokin besonders groß, da das retinale Gewebe neuronalen Ursprungs und damit eingeschränkt regenerationsfähig ist. Substanz P ist hier in der Lage ab einem gewissen Grad der Gewebeschädigung das Immunprivileg - das heißt die Unterdrückung einer Immunantwort - aufzuheben und eine Entzündung zu initiieren, die im neuronalen Gewebe zur Vernarbung führen kann. So wurde dies nach Argon-Laserbehandlung der Maus-Retina nachgewiesen (Lucas *et al.*, 2012).

Für die Linse konnte Gross (2018) erstmalig das Vorkommen des NK-1-Rezeptors im Linsenepithel der Maus durch Immunostaining nachweisen (siehe Abbildung 5).

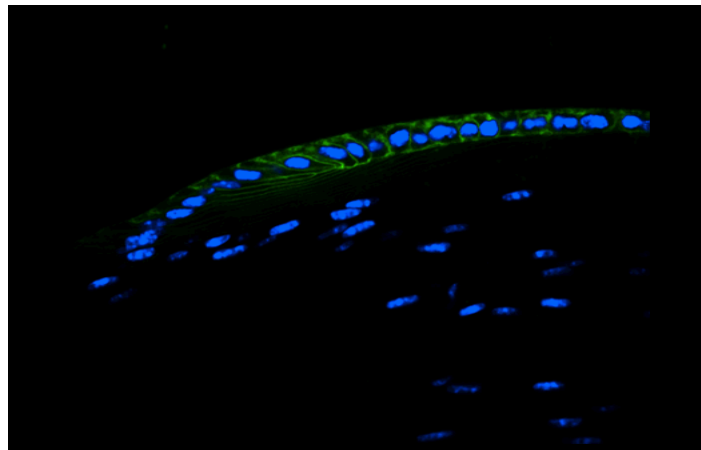


Abbildung 5: Fluoreszierender Neurokinin-1-Rezeptor im anterioren Linsenepithel und Linsenbogen
Quelle: Gross, 2018

Gezeigt wurde dabei zum einen das physiologische Vorkommen von NK1R im nativen Linsenpräparat und zum anderen die Induktion des NK-1-Rezeptors durch UVB-Bestrahlung der Linse. Es ist davon auszugehen, dass die von Gross festgestellte UVB-induzierte Synthese des NK-1-Rezeptors im Linsenepithel ebenfalls mit dem Anstieg seines Liganden, Substanz P, korreliert.

1.2.3 Das Chemokin MCP-1

Das aus 76 Aminosäuren aufgebaute MCP-1 (nach neu eingeführter Nomenklatur CCL2, Ligand für den Chemokinrezeptor 2) gehört zu den chemotaktisch wirksamen Zytokinen, den Chemokinen.

Es ist eines der am frühesten entdeckten und besten erforschten Chemokine. Zunächst *in vitro* (Leonard und Yoshimura, 1990) und später *in vivo* (Boring *et al.*, 1997) konnte gezeigt werden, dass MCP-1 das potenteste Chemokin zur Anlockung und Aktivierung von Monozyten ist. Die Monozyten wandern aus dem Blut in das verletzte oder entzündete Gewebe ein und differenzieren dort zu Makrophagen. Diese eliminieren Erreger MCP-1-induziert durch Phagozytose und durch die Bildung von Stickoxiden und reaktiven Sauerstoffspezies.

Synthetisiert wird MCP-1 von Immun- und Gewebezellen, überwiegend von aktivierten Monozyten, Makrophagen, Endothel- und Epithelzellen (Furie und Randolph, 1995). Die Synthese und Sekretion von MCP-1 wird durch Wachstumsfaktoren, andere Zytokine (IL-1, IL-4, TNF- α , IFN- γ), Lipopolysaccharide, Lipoproteine und oxidativen Stress induziert (Chakravarty *et al.*, 1998). *In vitro* wurde bei Stimulierung von humanen Mastzellen mit Substanz P eine vermehrte MCP-1-Expriemierung beobachtet (Castellani *et al.*, 2009). Derselbe Effekt konnte ebenfalls *in vitro* für humane Makrophagen beobachtet werden (s. Abbildung 6) (Spitsin *et al.*, 2017).

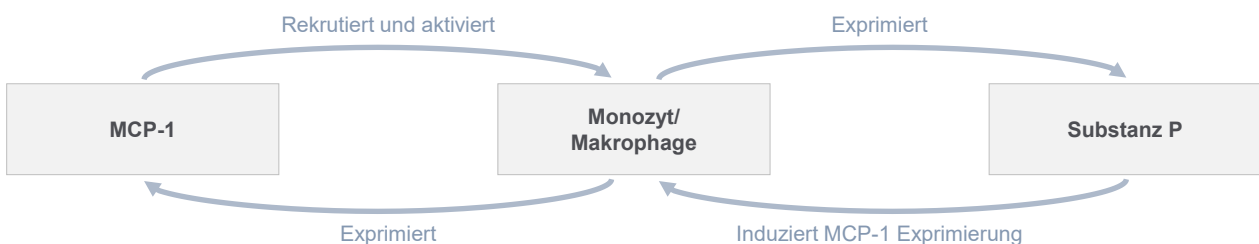


Abbildung 6: Wechselwirkungen zwischen Substanz P und MCP-1
 MCP-1: Monocyte chemoattractant Protein-1
 Quelle: Eigene Abbildung

MCP-1 wirkt im Gegensatz zu anderen Chemokinen nur an einem Rezeptor, dem G-Protein gekoppelten Rezeptor CCR2, der hauptsächlich auf Monozyten expriemiert wird

(Deshmane *et al.*, 2009; Lu *et al.*, 1998; Palframan *et al.*, 2001). Die Bindung von MCP-1 an seinen Rezeptor triggert intrazelluläre Signalkaskaden, die die Adenylatzyklase hemmen und Kalzium mobilisieren und so die Transmigration der Rezeptor-tragenden Zelle zum Ort der Chemokine auslösen (Vaddi *et al.*, 1997).

MCP-1 spielt in verschiedenen Organsystemen des Körpers eine Rolle und wurde bereits als möglicher Therapie-Ansatzpunkt bei verschiedenen Krankheiten wie beispielsweise der Multiplen Sklerose (Sorensen *et al.*, 2004), Asthma (Gonzalo *et al.*, 1998), koronarer Herzerkrankung, Artherosklerose (Kusano *et al.*, 2004), Rheumatoider Arthritis und inflammatorischen Hauterkrankungen erforscht (Hayashidani *et al.*, 2003).

1.2.4 Bedeutung von MCP-1 für Entzündungsprozesse im Auge

Im Auge wird MCP-1 durch das Endothel der Cornea, durch das Pigmentepithel der Retina sowie durch das vaskuläre Endothel in den uvealen Organabschnitten Iris und Ziliarkörper produziert. Die Synthese ist dabei abhängig von anderen Zytokinen. Für das retinale Pigmentepithel (Hollborn *et al.*, 2000) und das corneale Endothel (Yamagami *et al.*, 2003) konnte experimentell gezeigt werden, dass Stimulierung mit proinflammatorischen Zytokinen wie TNF- α die MCP-1-Synthese verstärkt. Für das Linsenepithel wurde in der Zellkultur ein signifikanter Anstieg der MCP-1 Synthese durch Stimulierung mit TGF- β nachgewiesen (Kawai *et al.*, 2012).

MCP-1 wirkt im Auge über die Rekrutierung von Immunzellen, insbesondere Monozyten aus dem Blut ins Gewebe. Die eingewanderten Monozyten können, abhängig vom umgebenden Zytokinmilieu, an Entzündungsprozessen beteiligt sein oder auch antiinflammatorisch wirken, indem sie die Ausbildung der Immuntoleranz gegenüber okulären Antigenen (Immunprivileg) fördern, wie in Abschnitt 2.2.1 beschrieben (Cone und Pais, 2009).

Die bisher bekannten Auslöser für die Synthese sowie die wichtigsten Funktionen von MCP-1 im Auge werden im Folgenden zusammengefasst (siehe auch Abbildung 7).

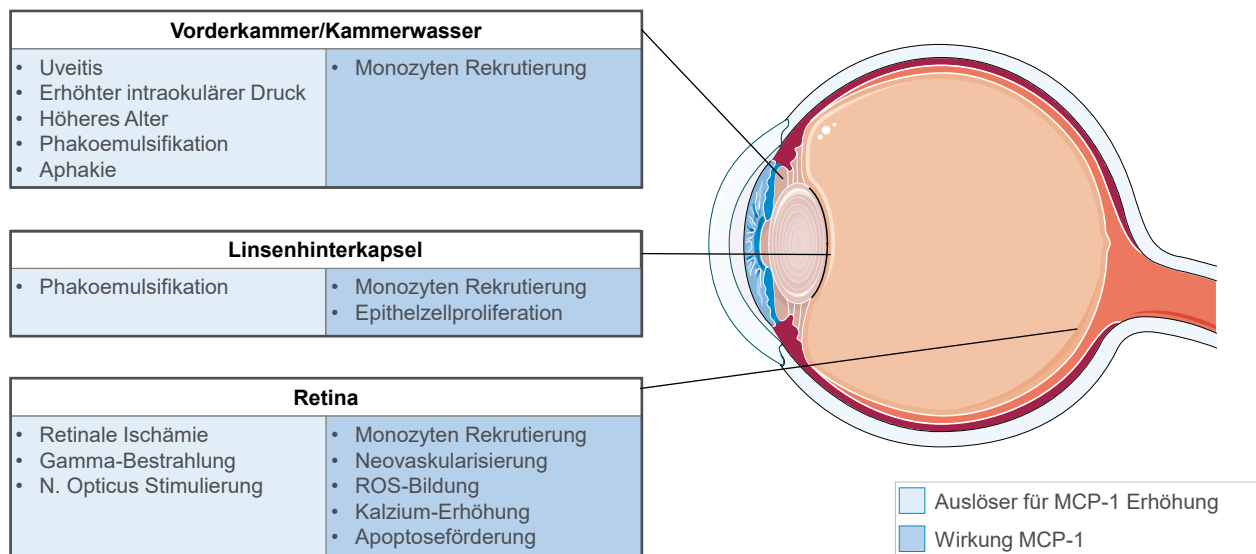


Abbildung 7: Die Wirkung von MCP-1 im okulären Gewebe
 MCP-1: Monocyte chemoattractant Protein-1
 Quelle: Eigene Abbildung

MCP-1 wird im Rahmen zahlreicher okulärer Pathologien und Eingriffe verstärkt exprimiert. Erhöhte MCP-1 Werte im Kammerwasser sind mit verschiedenen Formen des Glaukoms assoziiert, da ein erhöhter intraokulärer Druck zu erhöhten MCP-1-Werten im Kammerwasser führt (Kawai *et al.*, 2012; Kokubun *et al.*, 2017). Auch der Schweregrad von Autoimmun-Uveitiden sowie der ischämischen Retinopathie korreliert mit der Höhe der MCP-1-Werte im Kammerwasser und der Menge an MCP-1-abhängig rekrutierten Monozyten (Crane *et al.*, 2001).

Die Fähigkeit des Linsenepithels zur MCP-1-Synthese konnte nach Katarakt-Operation (Phakoemulsifikation) in Linsenepithelzellen nachgewiesen werden, die im Kapselsack verblieben waren (Kawai *et al.*, 2012; Zhu *et al.*, 2015). Die Ausprägung der post-operativen Hinterkapseltrübung durch Linsenepithelzell-Proliferation korreliert dabei mit der Höhe der MCP-1-Synthese sowie der resultierenden Monozyten-Einwanderung (Lois *et al.*, 2003). Durch MCP-1-aktivierte Monozyten führen zur erhöhten Synthese von Sauerstoffradikalen (Yang *et al.*, 2011). Sauerstoffradikale stellen durch ihre Fähigkeit der Proteinoxidation den größten bekannten Faktor bei der Entstehung von Katarakten dar (siehe Kapitel 2.6.3). Passend dazu kann eine MCP-1-Erhöhung im Kammerwasser von

Patienten mit seniler Katarakt nachgewiesen werden (Gao *et al.*, 2016; Kawai *et al.*, 2012; Kokubun *et al.*, 2017).

1.3 Die Katarakt

Die Katarakt umfasst alle Linsentrübungen, unabhängig ihrer Lokalisation und unabhängig des zugrundeliegenden Pathomechanismus. Die Folge der Linsentrübung ist die Abnahme der Sehleistung bis hin zur Erblindung. Der Begriff Katarakt stammt aus dem Griechischen (Kataraktes = herabstürzen) und wird im medizinischen Sprachgebrauch in weiblicher latinisierter Form benutzt. Das im Deutschen gebräuchliche Synonym grauer Star geht auf die gräuliche Verfärbung der Linse im fortgeschrittenen Stadium zurück (Axenfeld, 1992).

Zur Linsentrübung und damit verbundenen störenden Lichtstreuung kommt es durch Schädigung von Linsenfasern. Die geschädigten Linsenfasern lagern sich zusammen, es kommt zur Ausfällung sowie zur Bildung hochmolekularer Proteinkomplexe (Moreau und King, 2012b; Pirie, 1968). Zum einen führen die Proteinaggregate selbst zur Linsentrübung und zum anderen verstärken sie die Linsentrübung durch Schädigung weiterer Zellstrukturen und Störung des Zellmetabolismus (Graw und Loster, 2003; Hejtmancik und Kantorow, 2004). Die Ursachen der Schädigung von Linsenfasern sind vielfältig, der bedeutendste Umweltfaktor ist die UVB-Strahlung. Kapitel 2.6.3 stellt die Pathophysiologie der UVB-induzierten Linsenzellschädigung ausführlich dar.

1.3.1 Klinik und Symptome

Klinisch zeigt sich die Katarakt als Trübung und Verfärbung der Augenlinse mit dadurch reduzierter Sehschärfe. Im fortgeschrittenen Stadium ist sie mit bloßem Auge zu sehen. Bei der Untersuchung mit der Spaltlampe sind Lokalisation und Schweregrad der Linsentrübung zu erkennen. Je nach Stadium kann die Katarakt Farben von hellgelb bis dunkelbraun annehmen (Pirie, 1968). Mit zunehmender Abdunkelung und Trübung der Linse wird der rote Fundusreflex bei der Spaltlampenuntersuchung abgeschattet, bis er im fortgeschrittenen Stadium nicht mehr vorhanden ist (Axenfeld, 1992).

Die Zerstörung der Linsenstruktur im Rahmen der Kataraktogenese führt in den betroffenen Bereichen zur Veränderung des refraktiven Index, so dass einfallendes Licht diffus gebrochen wird, was zur vermehrten Lichtstreuung auf der Retina führt (Abbildung 8).

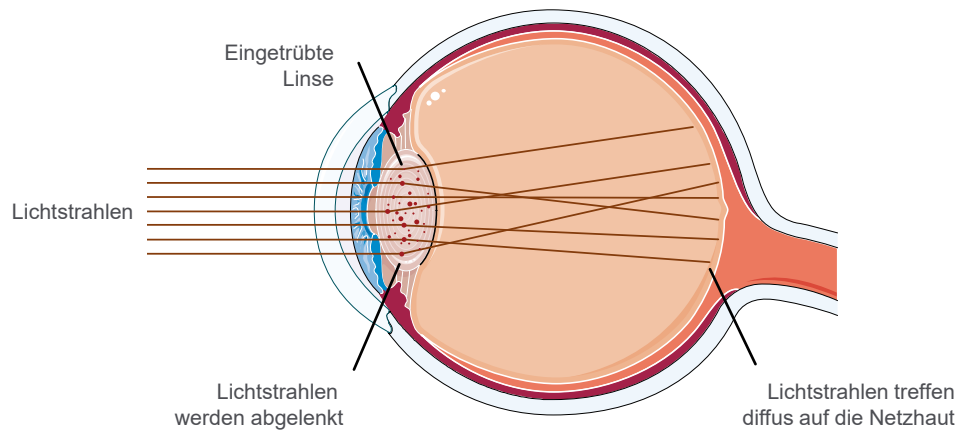


Abbildung 8: *Diffuse Lichtstreuung durch Linsentrübungen*
Quelle: In Anlehnung an Truscott (2005)

Daraus resultiert eine erhöhte Blendungsempfindlichkeit bei Sonnenstrahlung oder Scheinwerferlicht. Typisch ist zudem das Entstehen von Lichteffekten (Halos) um Lichtquellen. Je nach Ausmaß und Lage der Linsentrübung kommt es zu einer entsprechenden Abnahme der Sehfähigkeit, teilweise begleitet durch eine zunehmende Myopisierung. Die Abnahme des Visus fällt zunächst vor allem beim Lesen und in dunklerer Umgebung auf. Das Bild wird unscharf, Farben werden getrübt wahrgenommen, Kontraste und Konturen verblassen und auch Doppelbilder können auftreten (Campbell, 1999).

1.3.2 Lokalisation

Durch unterschiedliche Pathomechanismen treten Trübungen in verschiedenen Bereichen der Linse auf. Im Rahmen der Cataracta nuclearis kommt es mit zunehmendem Alter zur Gelb- und später Braunfärbung des Linsenkerns. Die Cataracta corticalis entsteht durch mechanisches Zerreißen von Linsenfasern zwischen der Linsenrinde und dem sklerotisierten Kern. Sie ist die häufigste Ausprägung einer Katarakt und entspricht dem typischen grauen Altersstar (Axenfeld, 1992; Naumann, 1980). Bei der Cataracta subcapsularis anterior ist die Trübung im Bereich der vorderen Linsenkapsel lokalisiert und geht mit einer Schädigung des vorderen Linsenepithels einher (Kanski, 2008). Bei

den meisten Patienten kommt es zu einer Kombination aus den verschiedenen Trübungslokalisationen.

1.3.3 Ursachen und Risikofaktoren

Für die Kataraktentwicklung sind viele Ursachen und Risikofaktoren bekannt, die zusammenwirkend und in gegenseitiger Verstärkung zur Trübung führen.

Dazu zählen ein hohes Alter, die Einnahme bestimmter Medikamente wie zum Beispiel Glucocorticoide sowie Allgemeinerkrankungen wie Diabetes mellitus und die arterielle Hypertonie. Insbesondere entzündliche Erkrankungen gehen mit einer Dysbalance der Expression von Entzündungsfaktoren einher und sind mit einer erhöhten Kataraktprävalenz assoziiert. Dazu zählen sowohl entzündliche Systemerkrankungen (z.B. Morbus Behcet), als auch entzündliche Hauterkrankungen (z.B. atopische Dermatitis, Vitiligo) und entzündliche Augenerkrankungen (z.B. Uveitis, Retinitis, intraokuläre Infektionen) (Arnarsson *et al.*, 2002; Leske *et al.*, 1998; McCarty *et al.*, 1999; Truscott, 2005; West *et al.*, 1998).

Der größte modifizierbare Risikofaktor der Umwelt für die Kataraktentstehung ist die UVB-Strahlung (Hockwin *et al.*, 1999; Ivanov *et al.*, 2018; Roberts, 2011). Vom Linsengewebe absorbierte Strahlung schädigt, insbesondere im Bereich der UVB-Wellenlängen, die hoch organisierte Mikrostruktur der Linse und führt so zur Trübung. Bekannt und gut erforscht ist, dass die lebenslange Einwirkung von UVB-Strahlung den oxidativen Stress in der Linse erhöht und so zur Kataraktbildung führt (Hockwin *et al.*, 1999).

1.4 Ultraviolette Strahlung

Ultraviolette Strahlung ist für den Menschen nicht sichtbare elektromagnetische Strahlung, wie Abbildung 9 zeigt, im Bereich zwischen 1 und 400nm. Unterteilt wird die UV-Strahlung in UVA (315-380 nm) UVB (280-315 nm) UVC (100-280 nm) und Vakuum-UV (1-100nm). UV-Strahlung ist im Sonnenlicht und in artifiziellem Licht enthalten. Durch Ozon in der Stratosphäre und Troposphäre wird der gesamte UVC- sowie ein Teil der UVB-Strahlung des Sonnenlichtes absorbiert, so dass im Sonnenlicht, das die Erde

erreicht, neben sichtbarem Licht (52%) und Infrarot-Strahlung (42%) auch UVA (5,6%) und der geringe ungefilterte UVB-Anteil (0,5%) enthalten sind (Brix *et al.*, 2012).

1.4.1 Bedeutung von UV-Strahlung für die Gesundheit

UV-Strahlung ist von Bedeutung für die menschliche Gesundheit. Wir benötigen sie für die körpereigene Synthese von Vitamin D, das maßgeblich an der Regulierung des Kalzium-Stoffwechsels beteiligt ist. Daneben wird UV-Strahlung in der Therapie verschiedener Hauterkrankungen wie Psoriasis und dem atopischen Ekzem eingesetzt sowie als Lichttherapie zur Stimmungsstabilisierung bei Depressionen und bipolaren Störungen (Bae *et al.*, 2017; Williams und Grindlay, 2008) (Sit *et al.*, 2017).

Die UV-Exposition schädigt jedoch Haut und Augen und kann auf systemischer Ebene immunsuppressiv wirken. Die Folge der UV-Exposition sind Sonnenbrände (McKenzie *et al.*, 1999), vorzeitige Hautalterung (Yaar und Gilchrest, 1998), Hautkrebs (Liu-Smith und Ziogas, 2017; Mohania *et al.*, 2017) und Augenerkrankungen wie Pterygium, Keratopathien und die Katarakt (Chandler, 2011; Taylor, 1989; Taylor *et al.*, 1988).

Das Auge kann sowohl chronisch im Laufe des Lebens als auch durch intensive akute Strahlung geschädigt werden. Akute Schädigungen entstehen beispielsweise durch Blendung mit einer artifiziellen Lichtquelle (Klein *et al.*, 2009; Sliney, 1997, 2005).

1.4.2 Wirkfaktoren der UV-Strahlung

Die Wirkung der UV-Strahlung auf menschliches Körpergewebe im Allgemeinen und auf die Linse im Speziellen hängt entscheidend davon ab, wie stark die Strahlung auf dem Weg bis zur Erdoberfläche abgeschwächt wird, und in welchem Winkel, in welchem Wellenlängenbereich und in welcher Dosis die Strahlung auf das Gewebe einwirkt.

In der unteren Stratosphäre, etwa 10km-16km oberhalb der Erdoberfläche, liegt die schützende Ozonschicht. Diese Schicht, die zum größten Teil aus Nitrogen (N₂) und Sauerstoff (O₂) besteht, absorbiert Strahlung mit Wellenlängen unter 300nm, so dass sie die Erdoberfläche nicht erreichen (Bachem, 1956). Reaktive Gase, wie das anthropogene Fluorchlorkohlenwasserstoff (FCKW) und CO₂, führen zunehmend zu einem Abbau der

Ozonschicht, was zu einem Gesamtanstieg der UVB-Strahlungsdosis auf der Erdoberfläche führt (Farmer *et al.*, 1987). Im Durchschnitt ließ sich allein zwischen 1980 und 2010 eine weltweite Ozonabnahme in der Stratosphäre von 4% feststellen (Aucamp *et al.*, 2011). Die fortschreitende Klimaerwärmung verstärkt diese Entwicklung (Solomon *et al.*, 2016; von der Gathen *et al.*, 2021). Durch die Reduktion der Ozonschicht erhöht sich die Inzidenz von Sonnenbrand, Hautkrebs und Katarakten. In einer Hochrechnung aus dem Jahr 1998 wurden für je ein Prozent Ozonabnahme weltweit 100.000 bis 150.000 weitere Kataraktfälle geschätzt (Longstreth *et al.*, 1998). In einer aktuelleren Berechnung für die USA wird bei einer Abnahme der Ozonschicht um 5-20 % bis zum Jahr 2050 mit zusätzlichen 167.000- 830.000 kortikalen Katarakten jährlich allein in den USA gerechnet (West *et al.*, 2005).

UVB-Wirkung ist abhängig vom Einstrahlungswinkel. Deshalb ist die Strahlungsintensität von der Höhenlage, dem Breitengrad sowie Tages- und Jahreszeiten abhängig. Eine Studie aus dem Jahr 1994 zeigte für die USA eine Zunahme an Katarakt-Operationen um 3 % pro Breitengrad südlicher Richtung (Javitt und Taylor, 1994).

Die Spiegelung von UV-Strahlung an der Erdoberfläche (zum Beispiel durch Schnee oder Wasser) erhöht die Strahlungsintensität und ändert den Einfallwinkel der Strahlung. Auch durch die reflektierende Wirkung von Staubpartikeln und Wolken kann UV-Strahlung abgelenkt werden, so dass sie parallel zur Erdoberfläche verläuft und den Menschen seitlich trifft. Das Auge ist durch seine Lage in der Augenhöhle nach oben hin geschützt. Strahlung, die seitlich oder von unten auf das Auge trifft, kann die Linse jedoch ungehindert erreichen (Sliney, 1986). Auch die Lichtbündelung und Reflexion innerhalb des Auges spielt hierbei eine Rolle. Coroneo *et al.* stellten die Bündelung des Lichtes an der temporalen Seite der Cornea hin zur unteren nasalen Seite des Limbus und der Linse fest (Coroneo *et al.*, 1991; Maloof *et al.*, 1994). Passend dazu treten in diesem Bereich der Linse UVB-bedingte Trübungen signifikant häufiger auf (Sasaki *et al.*, 2003; Schein *et al.*, 1994).

Je kürzer die Wellenlänge der UV-Strahlung ist, desto größer ist die enthaltene Energie und damit das Schädigungspotenzial für biologisches Gewebe. Eine größere Wellenlänge wie zum Beispiel UVA-Strahlung kann auch gewebeschädigend wirken, der Einfluss auf

die DNA ist aber wesentlich geringer als der von UVB-Strahlung, obwohl der Anteil an UVA im Sonnenlicht ein Vielfaches ist (Taylor *et al.*, 1988).

Gemäß des ersten Gesetzes der Fotochemie von Grotthus-Draper kommt es nur dann zu schädigenden photochemischen Reaktionen, wenn die einwirkende elektromagnetische Strahlung vom Gewebe absorbiert wird (Groot *et al.*, 2013).

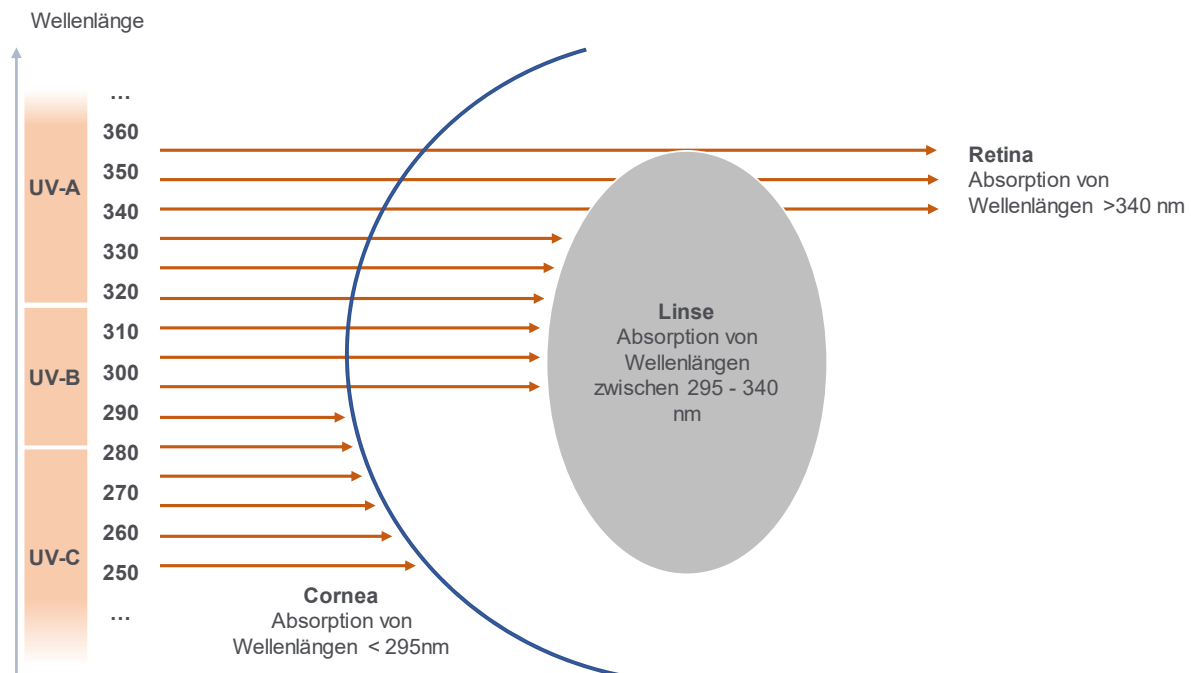


Abbildung 9: Absorption ultravioletter Strahlung von den Geweben des Auges
Quelle: Eigene Abbildung

Die verschiedenen okulären Gewebe haben je spezifische Grenzwerte für die Strahlungsabsorption (siehe Abbildung 9). Die Cornea absorbiert Strahlung mit einer Wellenlänge bis zu 295 nm, alle Wellenlängen darüber treten durch sie hindurch. Die Linse ist durchlässig für alle Wellenlängen über 340 nm. Die dazwischenliegenden Wellenlängen zwischen 295 nm und 340 nm werden von der Linse absorbiert und schädigen diese (Roberts, 2011).

1.5 UVB-induzierte Katarakt

1.5.1 Epidemiologische Nachweise für UVB als kataraktogener Faktor

Eine große Anzahl epidemiologischer Studien hat einen kausalen Zusammenhang zwischen UVB-Strahlung und der Entwicklung einer senilen Katarakt nachgewiesen. Die Ergebnisse stimmen darin überein, dass die lebenslange Exposition gegenüber UV-Strahlung die Ausbildung einer Katarakt begünstigt. Dabei wurde ein Zusammenhang der lebenslangen Sonnenexposition mit kortikalen Katarakten (Storey *et al.*, 2013), nukleären Katarakten, insbesondere bei Exposition als junger Erwachsener (Hayashi *et al.*, 2003; Neale *et al.*, 2003) und gemischten Katarakttypen gefunden (Yu *et al.*, 2016).

Die Kataraktraten sind abhängig von der durchschnittlichen UV-Strahlungsintensität eines Ortes (Zhu *et al.* 2015.), von der Höhenlage (Yu *et al.*, 2016), der individuell verbrachten Zeit im Freien und der Nutzung von schützenden Maßnahmen wie Sonnenbrillen (Neale *et al.*, 2003).

Die Schwierigkeiten epidemiologischer Studien ergeben sich aus den vielfältigen möglichen Ursachen für die Entwicklung einer Katarakt und aus den methodischen Grenzen bei der Ermittlung der genauen UV-Dosis, der ein Individuum im Laufe des Lebens ausgesetzt war (Neale *et al.*, 2003). Daher werden Tiermodelle benötigt, zur Untersuchung des Einflusses von UVB-Strahlung auf die Kataraktogenese sowie zur Analyse, welche Rolle Entzündungsfaktoren in diesem Prozess spielen.

1.5.2 Experimentelle Nachweise für UVB als kataraktogener Faktor

Das einheitliche Resultat der epidemiologischen Forschung wird in experimentellen Studien bestätigt. Eine große Anzahl experimenteller Studien hat einen kausalen Zusammenhang zwischen UVB-Strahlung und der Entwicklung einer senilen Katarakt bestätigt. Bereits 1891 entdeckte Widmark die kataraktogene Wirkung von UV-Strahlung sowie die Fähigkeit der Linse UV-Strahlung zu resorbieren und damit abzuschwächen (Widmark, 1891). 1901 dokumentierte er erstmalig unter kontrollierten Laborbedingungen am Hasenauge, wie UV-Strahlung das Linsenepithel schädigt und Linsenfasern zum Aufquellen bringt (Widmark, 1901). Bis heute folgten weitere experimentelle Studien an Hasen,

Eichhörnchen und Mäusen, die übereinkommend zum Ergebnis gelangen, dass UV-Strahlung zur Trübung der Linse führt (Hightower und McCready, 1993; Hockwin *et al.*, 1999; Meyer *et al.*, 2008; Meyer *et al.*, 2014; Pitts *et al.*, 1977; Soderberg, 1989).

Die Ultrastruktur von UVB-geschädigten Linsenepithelzellen wurde in einer früheren Studie im Rasterelektronenmikroskop dargestellt (Meyer *et al.*, 2014). Nach Bestrahlung von C57BL/6-Mäusen mit der doppelten UVB-Schwellendosis, zeigten sich angeschwollene und zerrissene Faserzellen im vorderen Rindenbereich und nukleare Chromatinkondensationen und Apoptosekörperchen im vorderen Linsenepithel (Abbildung 10).

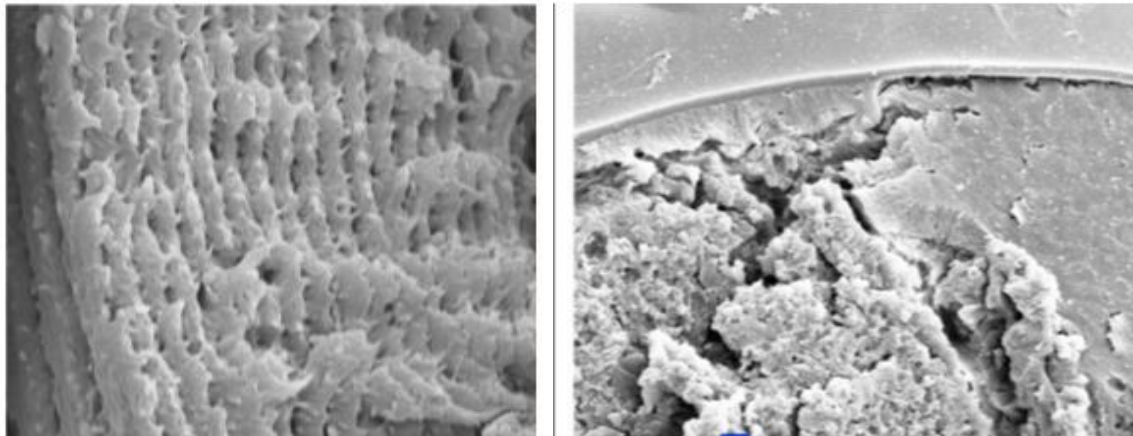


Abbildung 10: *Struktur UVB-geschädigter Linsenepithel- und Linsenfasern im Raster-Elektronenmikroskop*
 a): *Membranschäden an Linsenfasern* b): *Die Linse von anterior mit geschädigten Linsenepithelzellen unter der Kapsel*
 UVB: *Ultraviolettstrahlung im Wellenlängenbereich 280 – 315nm*
 Quelle: *Meyer et al. (2014)*

Beobachtet wurde neben der Zellschädigung auch der Verlust von Epithelzellen entlang der gesamten anterioren Linsenfläche. Epithelzellverluste durch UVB-Strahlung können im Auge der C57BL/6-Maus und des Hasen jedoch innerhalb einer Woche durch Zellproliferation behoben werden (Meyer *et al.*, 2014; Yamada *et al.*, 2001). Dabei stellten Meyer *et al.* (2014) fest, dass die Wachstumsrichtung des proliferierenden Epithels retrograd zur sonstigen Richtung vom Äquator hin zu den Linsennähten stattfindet.

Die Mechanismen, über die UVB-Strahlung zur Schädigung des Epithels führt, wurden bisher hauptsächlich auf Photooxidationsprozesse zurückgeführt. In den letzten Jahren

wurden neben der Forschung zur Photooxidation zunehmend Erkenntnisse gewonnen, die auf eine inflammatorische Komponente der UVB-induzierten Kataraktogenese hindeuten. In den nächsten zwei Abschnitten wird ein Überblick zum aktuellen Wissensstand beider Schädigungswege gegeben.

1.5.3 Pathophysiologie der UVB-bedingten Kataraktogenese durch Photooxidation

Wie in Kapitel 2.4.4 beschrieben, führt die Schädigung von Linsenfasernproteinen zur Ausfällung, Aggregation und Komplexbildung der Proteine. In der Folge kommt es zur Linsentrübung und Kataraktbildung (Moreau und King, 2012b; Pirie, 1968). Dabei ist der wichtigste Pathomechanismus kataraktogener Proteinmodifikation die Oxidation von Aminosäureresten der Linsenfasernproteine durch Sauerstoffradikale.

Die lebenslange Exposition gegenüber UV-Strahlung als größter kataraktogener Faktor der Umwelt führt zur Entstehung von Sauerstoffradikalen, auch reaktive Sauerstoffspezies (ROS) genannt (siehe Abbildung 11).

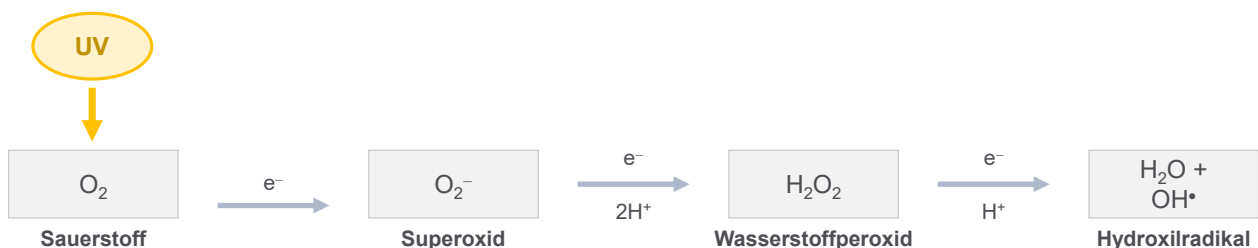


Abbildung 11: Entstehung von reaktiven Sauerstoffspezies durch Aufnahme von Elektronen

Quelle: In Anlehnung an Possel (2018)

ROS entstehen durch Elektronenaufnahme von Sauerstoff. Es entstehen Hydroxylradikale und Superoxidradikale mit jeweils einem ungepaarten Elektron sowie Wasserstoffperoxid (H₂O₂) mit zwei ungepaarten Elektronen (Varma *et al.*, 2011).

ROS oxidieren die Sulfhydrylgruppen (R-SH) der Aminosäure Cystein, die als einzige Aminosäure eine randständige Schwefelgruppe aufweist. Daraufhin wird aus zwei Sulfhydrylgruppen eine kovalente Disulfidbindung (SS), die stärkste vorhandene Bindungsform zwischen Aminosäuren (Abbildung 12).

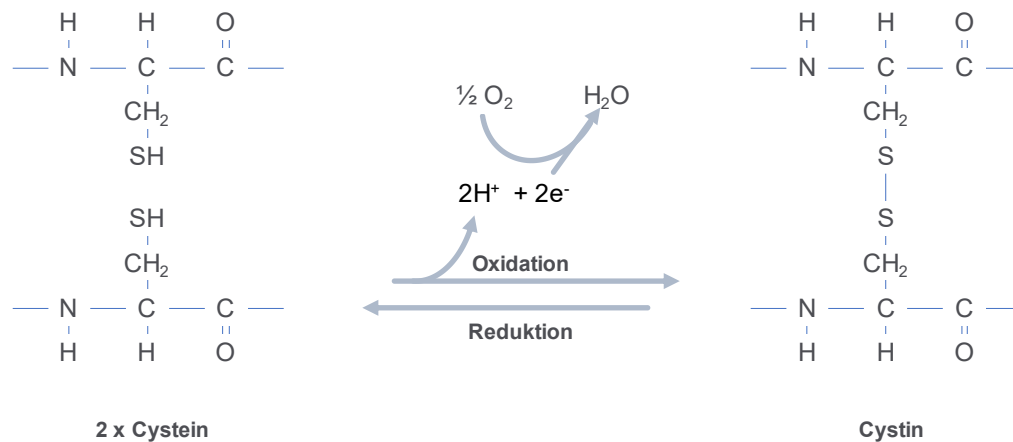


Abbildung 12: Bildung einer Disulfidbindung
 Durch ROS-abhängige Oxidation kommt es zur Ausbildung einer kovalenten Bindung der Schwefel-Atome zweier Cysteine (Disulfidbindung). ROS: Reactive Oxygen Species
 Quelle: Rhiner (2018)

Die Photooxidation wirkt sich auf die Energiegewinnung, den Stofftransport und die Zell-DNA aus (Chen *et al.*, 1989; Lofgren und Soderberg, 2001; Reddy und Bhat, 1998).

Die Oxidierung von Membran-Transportproteinen, wie der Na-K-Pumpe, resultiert in einer Elektrolytverschiebung und in der Erhöhung des osmotischen Drucks. Folge ist das Aufquellen der Linse im Rindenbereich mit Ausbildung von Flüssigkeitsräumen zwischen den Fasern (Naumann, 1980; Padgaonkar *et al.*, 1989; Padgaonkar *et al.*, 1999; Soderberg, 1989; Torriglia und Zigman, 1988). An Nukleinbasen der DNA in Linsenfaser- und Epithelzellen bewirken UVB-induzierte ROS Mutationen, Strangbrüche und Exzisionen in der DNA der Linsenepithel- und Faserzellen, die zur Störung der DNA-Konformation und damit auch zu fehlerhafter Replikation im Linsenepithel führen (Mesa und Bassnett, 2013; Padgaonkar *et al.*, 1989; Sorte *et al.*, 2011).

1.5.4 Katarakt Schwellendosis für die UVB-Bestrahlung der Linse der C57BL/6-Maus

In bisherige Forschungsarbeiten zur kataraktogenen Wirkung von UVB-Strahlung wurde ein Wellenlängenbereich von 312 nm für die Bestrahlung der C57BL/6-Maus gewählt. Dies entspricht kürzeren und damit energiereicheren Wellenlängen im Bereich der von der Linse absorbierten Strahlung (295nm-340nm).

Die UVB-Schwellendosis für die Kataraktentstehung bei der C57BL/6-Maus ist definiert als diejenige Dosis an UVB-Strahlung, die noch maximal toleriert werden kann, ohne dass es zur Ausbildung einer Katarakt kommt. Die Festlegung dieses Schwellenwertes ermöglicht die quantitative Vergleichbarkeit zwischen verschiedenen *in-vivo* UVB-Bestrahlungsversuchen im 300nm Bereich an der C57BL/6-Maus (Meyer *et al.*, 2008; Soderberg *et al.*, 2002). Aus diesem Grund dient der Schwellenwert als Referenzwert in dieser Arbeit.

Die Definition des Schwellenwertes als maximal tolerierbare Dosis MTD geht zurück auf ein Konzept von Söderberg *et al* (2002), das auf Untersuchungen zum Dosis-Wirkungs-Verhältnis kontinuierlicher UVB-Bestrahlung beruht (Soderberg *et al.*, 2002).

Die MTD für die Bestrahlung der C57BL/6-Maus im 300nm-Bereich beträgt 2,87kJ/m², gerundet auf 2,9 kJ/m². Ermittelt wurde dieser Schwellenwert in einer Dosis-Wirkungs-Untersuchung von Meyer *et al.* (2008). Dabei wurden C57BL/6-Mäuse mit Dosen von 0, 2, 4 und 8 kJ/m² bestrahlt und die resultierende Lichtstreuung der getrübten Linsen gemessen. Dann wurde, wie in der unten abgebildeten Formel gezeigt, der Mittelwert-Unterschied der gemessenen Lichtstreuung zwischen bestrahltem und nicht-bestrahltem Auge berechnet (Meyer *et al.*, 2008). Die maximal tolerierbare UVB-Strahlungsdosis wurde anschließend aus der Standardabweichung des Mittelwertunterschieds und dem Regressionskoeffizienten berechnet.

$$MTD_{23;16} = \sqrt{\frac{S_{y/x}}{k}} = 2,87 \text{ kJ/m}^2$$

$S_{y/x}$ = Standardabweichung, k = Regressionskoeffizient

1.5.5 Kataraktogenese durch Wechselwirkungen zwischen UVB-bedingter Photooxidation und inflammatorischen Prozessen

Die Einwirkung von UVB-Strahlung auf Gewebe kann durch Beeinflussung der Expression von Genen zu Veränderungen der Zytokinexpression führen. Nachgewiesen ist dies für die UVB-bedingte Freisetzung zahlreicher Entzündungsfaktoren in der Haut (Heck *et al.*, 2004) und für die Cornea (Chen *et al.*, 2016).

Entzündliche Erkrankungen wie Morbus Behcet und das Vogt-Koyanagi-Harada-Syndrom beruhen auf einer Imbalance der Zytokinexpression. In der Literatur herrscht Einigkeit darüber, dass diese Zytokinabweichungen auch zur Linsentrübung führen und die genannten Erkrankungen weisen eine erhöhte Kataraktprävalenz auf (Brunsting *et al.*, 1957; Chen *et al.*, 2014; Han *et al.*, 2017; Silverberg und Kantor, 2017). Die Pathogenese der inflammatorischen Katarakt ist jedoch im Hinblick auf Zusammensetzung und Funktion der Zytokine noch unbekannt.

Laut Chen 2014 fallen sowohl bei der inflammatorischen Katarakt im Rahmen von Morbus Behcet oder des Vogt-Koyanagi-Harada-Syndroms als auch bei der senilen Katarakt im Kammerwasser erhöhte Werte für die gleichen Zytokine (IFN- γ und Interleukin-6) auf, wobei die Erhöhung bei der inflammatorischen Katarakt noch stärker ausgeprägt ist. Auch unabhängig von zugrundeliegenden entzündlichen Systemerkrankungen wurde die Uveitis-assoziierte Katarakt mit veränderten Interleukinspiegeln in Verbindung gebracht. So beobachtete Stambuk 1994 signifikante Erhöhungen des Interleukin-4 Spiegels im Kammerwasser von Patienten mit Uveitis-induzierter Katarakt. Diese Beobachtung bestätigte sich sogar in Fällen, bei denen die Uveitis schon mehrere Jahre zurück lag (Stambuk, 1994). Als Ursprung der anhaltenden Zytokinsynthese kommt auch das Linsenepithel in Betracht. Durch den Nachweis der Zytokinexpression in verbleibenden Epithelzellen des Kapselsacks nach Phakoemulsifikation zeigten mehrere Studien, dass das Linsenepithel in der Lage ist, Entzündungsfaktoren zu synthetisieren (Kawai *et al.*, 2012; Nishi *et al.*, 1992; Nishi *et al.*, 1996).

Nicht nur lokale, sondern auch systemische Zytokin-Veränderungen werden im Zusammenhang mit der Katarakt gesehen. So konnte gezeigt werden, dass systemisch erhöhte Entzündungsmarker das Risiko für die Ausprägung einer Katarakt in sonst gesunden

Probanden erhöhen (Schaumberg *et al.*, 1999). Zudem wurde demonstriert, dass hohe systemische Level an Interleukin-6 die Entwicklung einer senilen nuklearen Katarakt begünstigen (Klein *et al.*, 2006). Umgekehrt konnte im *in-vivo* Experiment an der C57BL/6-Maus gezeigt werden, dass UVB-Bestrahlung des Auges mit resultierender Linsentrübung zu einem systemischen Anstieg von Interleukin-1 β und Interleukin-6 führt (Meyer *et al.*, 2013). Zusammenfassend weisen die dargestellten Studienergebnisse auf eine Rolle inflammatorischer Zytokine bei der Entstehung einer Katarakt hin, insbesondere auch bei der UVB-bedingten Kataraktogenese.

Zentrale Zytokine bei der Regulation entzündlicher Prozesse im Auge sind MCP-1 sowie Substanz P (und sein Rezeptor NK1-R), die im Fokus dieser Arbeit stehen. Beide Zytokine wirken proinflammatorisch durch Rekrutierung von Entzündungszellen und Anregung dieser Zellen zur Synthese von Sauerstoffradikalen und Zytokinen (Bignami *et al.*, 2014; Murriss-Espin *et al.*, 1995; Vaddi *et al.*, 1997; Yang *et al.*, 2011). Des Weiteren stellt Substanz P das entscheidende Zytokin zur Aufhebung des okulären Immunprivilegs dar und nimmt damit eine Schlüsselrolle bei der Initiierung von Entzündungsprozessen im sonst immunsupprimierten Auge ein (Lucas *et al.*, 2012; Paunicka *et al.*, 2015). Bisherige Arbeiten geben Hinweise auf erhöhte MCP-1-Spiegel im Kammerwasser von Kataraktpatienten sowie auf eine UVB-abhängige Expressierung von NK1-R im okulären Gewebe (Gao *et al.*, 2016; Gross *et al.*, 2018; Kawai *et al.*, 2012; Kokubun *et al.*, 2017).

Trotz dieser Hinweise ist die Rolle von MCP-1 und Substanz P bei der UVB-bedingten Kataraktogenese bisher nicht erforscht. Der aktuelle Wissensstand zu Katarakt-Pathomechanismen zeigt hingegen, dass die UVB-bedingte Proteinoxidation Gegenstand zahlreicher und ausführlicher Forschungsarbeiten war. Den Hinweisen einer möglichen entzündlichen Komponente der UVB-abhängigen Kataraktogenese wurde jedoch nur vereinzelt nachgegangen.

Diese Arbeit soll einen Beitrag leisten diese Lücke zu schließen. Es soll untersucht werden, ob UVB-Strahlung das Linsenepithel zur Expressierung der Zytokine MCP-1 und Substanz P anregt, um so der Rolle von Entzündungsfaktoren bei der UVB-induzierten Kataraktogenese nachzugehen.

2 Material und Methoden

2.1 Auflistung des Materials

2.1.1 Verwendete Geräte

Tabelle 1: Verwendete Geräte

Produktname/ -beschreibung	Hersteller
Spaltlampe	Coherent Medical Group, Santa Clara, USA
Bestrahlungsgerät Bio-Spectra	Vilber Lourmat, Marne- La Vallee, Frankreich
Pipettierhilfen Research Plus	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Vortex-Schüttler RS VA 10	Phoenix Instrument GmbH, Garbsen, Deutschland
Laborautoklav DE-23	Systec GmbH, Berlin, Deutschland
Zentrifuge 5424R	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Gefrierschrank	Thermo Electron Corporation, Waltham, USA
Mikroskop Leica M60	Leica, Microsystems, Wetzlar, Deutschland
Mikroskopkamera IC80 HD	Leica Camera AG, Wetzlar, Deutschland
Pinzette	Geuder, Heidelberg, Deutschland
Mikroskopische Schere	Fine Science Tools GmbH, Heidelberg, Deutschland
Thermomatte Lucky Reptile	Import Export Peter Hoch GmbH, Waldkirch, Deutschland
Waage	ADE GmbH, Hamburg, Deutschland
ELISA reader, Synergy H1 Microplate Reader	Biotek, Vermont, USA
Sterile Werkbank	Jackson Immuno Research, West Grove, USA

2.1.2 Chemikalien und Arzneistoffe

Tabelle 2: Chemikalien und Arzneistoffe

Produkt	Hersteller
Isofluran VET	Eickemeyer GmbH, Tuttlingen, Deutschland
Kohlenstoffdioxid	Linde AG, München, Deutschland
Sauerstoff	Linde AG, München, Deutschland
PBS-Puffer	Pan Biotech, Aidenbach, Deutschland

Protease Inhibitor	Pan Biotech, Aidenbach, Deutschland
Xylarium 20mg Xylazin	Alvetra GmbH, Neumünster, Deutschland
Ketaminhydrochlorid	Wirtschaftsgenossenschaft deutscher Tierärzte eG, Garbsen, Deutschland

2.1.3 ELISA-Kits

2.1.3.1 MCP-1 ELISA-Kit von R D Systems

Tabelle 3: MCP-1 ELISA-Kit

Material	Beschreibung
Maus MCP-1-Mikroplatte	96 Well Polystyren Platte. Beschichtet mit einem polyklonalen spezifischen MCP-1 Antikörper
Maus MCP-1-Standard	Rekombinantes Maus MCP-1 in Protein Pufferbasis, gefriergetrocknet
Maus MCP-1-Kontrolle	Rekombinantes Maus MCP-1 in Protein Pufferbasis, gefriergetrocknet
Maus MCP-1-Detektionsantikörper	Polyklonaler spezifischer MCP-1 Antikörper konjugiert mit Meerrettich Peroxidase (HRP für Horseradish Peroxidase)
Assay-Verdünnung RD1W	Proteinpuffer mit Konservierungsmittel
Kalibrator-Verdünnung RD5-3	Proteinpuffer mit Konservierungsmittel
Waschpuffer-Konzentrat	25-fach konzentrierte gepufferte Tenside mit Konservierungsmittel
Farbreagenz A	Stabilisiertes Hydrogenperoxid
Farbreagenz B	Stabilisiertes Tetramethylbenzidin (TMB)
Stop-Solution	Verdünnte Salzsäure

2.1.3.2 NK1R ELISA-Kit von Cusabio

Tabelle 4: NK1R ELISA-Kit

Material	Beschreibung
Mikroplatte	96 Well Polystyren Platte. Beschichtet mit einem polyklonalen spezifischen NK1R Antikörper
NK1R-Standard	Polyklonaler spezifischer NK1R Antikörper

Maus NK1R-Detektionsantikörper	Biotin konjugierter NK1R- Antikörper
Detektionsenzym	Avidin (Glykoprotein) konjugiert mit Meerrettich Peroxidase (HRP für Horseradish Peroxidase)
Antikörper-Verdünnung	BSA- Proteinpuffer unterschiedlicher Verdünnung
HRP-Verdünnung	
Sample Dilettant	
Waschpuffer	25-fach konzentrierte gepufferte Tenside mit Konservierungsmittel
Farbreagenz	Tetramethylbenzidin (TMB)- Substrat
Stop-Solution	Schwefelsäure 2mol/L

2.2 Beschreibung wichtiger Geräte und der Versuchstiere

2.2.1 Das Bestrahlungsgerät Bio-Spectra

Für die Bestrahlung der C57BL/6-Mäuse wurde in dieser Arbeit das Bio-Spectra-Gerät der Firma Vilber Lourmat genutzt, welches speziell für den experimentellen Einsatz entwickelt wurde (Abbildung 13).



Abbildung 13: Bio-Spectra-Gerät der Firma Vilber Lourmat
Quelle: Handout Bio-Spectra

Es besteht aus einem Epoxid-beschichteten Aluminiumgehäuse mit neun 40-Watt-Röhren, davon fünf für den UVA-Wellenlängen-Bereich und vier für den UVB-Wellenlängen-Bereich. Auf einer Fläche von 90cm x 80cm entsteht so ein gleichmäßiger Bestrahlungsbereich mit dem größten Strahlungsanteil im Wellenlängenbereich von 312nm. Die Vilber Lourmat UVB-Röhren emittieren primär Strahlung mit einer Wellenlänge von 312nm, die Spektralkurve reicht jedoch von 280nm bis 320nm, so dass im sehr geringen Maß auch UVA-Strahlung emittiert wird (Abbildung 14).

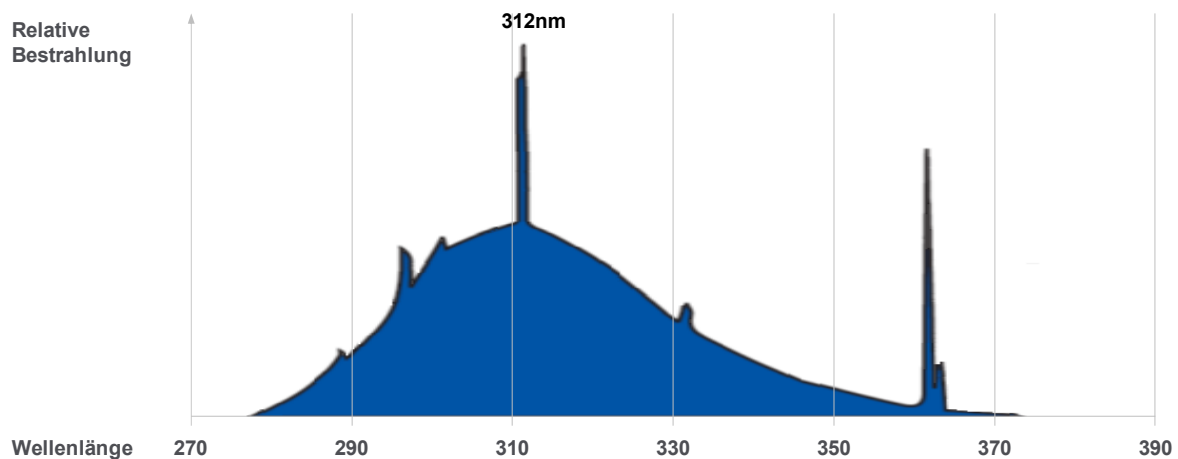


Abbildung 14: *Spektralkurve der UVB-Röhren des Bio-Spectra-Geräts*
UVB: Ultraviolettstrahlung im Wellenlängenbereich 280 – 315nm
Quelle: Eigene Abbildung in Anlehnung an Handout Bio-Spectra

Die Bestrahlung wird über einen integrierten Mikroprozessor-gesteuerten UV-Sensor reguliert, der die Bestrahlung bei Erreichen der Ziel-Intensität beendet. Dadurch wird sichergestellt, dass die abgegebene Bestrahlungsdosis über die Bestrahlungszyklen hinweg identisch bleibt. Durch die Kühlungsfunktion des Geräts wird die Temperatur im Bestrahlungsbereich unter 30 Grad Celsius gehalten.

2.2.2 Das Durchlicht-Dunkelfeld-Mikroskop Leica M60

Das Durchlicht-Dunkelfeld-Mikroskop stellt insbesondere für transparente Objekte eine geeignete Mikroskopier-Methode dar. Das Licht trifft dabei von der Rückseite auf das zu mikroskopierende Präparat, so dass das Objekt selbst hell auf dunklem Hintergrund

erscheint. So können auch durchsichtige Präparate wie die Linse mit einer hohen Auflösung und einem starken Kontrast dargestellt werden.

2.2.3 Versuchstiere

Im Rahmen dieser Arbeit wurden C57BL/6-Mäuse verwendet (Charles River GmbH Deutschland). Die Mauskoorte setzte sich sowohl aus weiblichen (n=31) als auch männlichen Tieren (n=32) zusammen, das Gewicht der weiblichen Mäuse betrug 17-20g, das Gewicht der männlichen 21-25g.

Alle im Rahmen dieser Dissertation durchgeführten Experimente wurden durch das zuständige Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz (LANUV) Nordrhein-Westfalen genehmigt. Beteiligte Personen nahmen alle an einer versuchstierkundlichen Schulung der Federation of European Laboratory Animal Science Associations (FELASA) teil. Umgang und Haltung der Tiere erfolgte gemäß der Richtlinien der „Association for Research in Vision and Ophthalmology statement for the Use of Animals in Ophthalmic and Vision Research (ARVO)“.

Die Mäuse wurden in geeigneten Käfigen (Tecniplast Deutschland GmbH Hohenpeißenberg, Deutschland) in regulierbaren Klimaschränken (Scantainer von Scanbur Technology Karlslunde, Dänemark) gehalten. Licht-Zeitschaltuhren stellten einen regelmäßigen Tages- und Nachtrhythmus nach.

2.3 Methoden

2.3.1 Versuchsaufbau

63 Mäuse (C57BL/6, Charles River) wurden unterteilt in drei Gruppen von jeweils 21 Mäusen. Eine der Gruppen diente als Kontrolle und wurde nicht bestrahlt, die anderen beiden Gruppen wurden mit der fünffachen UVB-Schwellendosis (maximal tolerierbare Dosis, MTD) von $14,5 \text{ kJ/m}^2$ unilateral bestrahlt. Die beiden bestrahlten Gruppen unterschieden sich in Bezug auf die Latenzzeit zwischen Bestrahlung und Untersuchung, die bei der einen Gruppe drei Tage und bei der anderen Gruppe sieben Tage betrug. Nach dem entsprechenden Zeitraum wurden die Mäuse geopfert, die Linsen mikrochirurgisch entfernt

und im Dunkelfeld-Mikroskop visualisiert und fotografiert. Quantifiziert wurde die Linsen-trübung durch Messung der Lichtstreuung mit spezifischer Software. Der Versuchsaufbau wird in Abbildung 15 dargestellt.



Abbildung 15: Das Prinzip des Versuchsaufbaus

MTD: Maximal tolerierbare Dosis, NK1R: Neurokinin-1 Rezeptor, MCP-1: Monocyte chemoattractant Protein-1

Quelle: Eigene Abbildung

Aus immunohistochemischen Versuchen an der C57BL/6-Maus von Gross et al (2018) ist bekannt, dass der NK-1-Rezeptor erst ab einer Dosis oberhalb der dreifachen UVB-Schwellendosis im okulären Gewebe exprimiert wird. Als Bestrahlungsdosis für diese Arbeit wurde in Vorversuchen ein Wert ermittelt, der hoch genug ist, um messbare Proteinkonzentrationen im ELISA-Versuch zu produzieren, der jedoch gleichzeitig aus Tierschutzgründen so niedrig wie möglich sein sollte. Diese Anforderungen erfüllte eine einmalige Bestrahlung mit der fünffachen UVB-Schwellendosis (14,5kJ/m²).

2.3.2 Anästhesie und Voruntersuchung

Die UVB-Bestrahlung der Mäuse fand in Allgemeinnarkose statt. Eingeleitet wurde diese durch die Inhalation eines Isofluran-Sauerstoff-Gemisches (Sauerstoff: Conoxia GO₂X, Linde AG, Pullach, Deutschland; Isofluran: Forene®, 100% [V/V], AbbVie Deutschland GmbH & Co. KG, Ludwigshafen, Deutschland, Verdampfer: Isofluran VET, Eickemeyer, Tuttlingen, Deutschland).

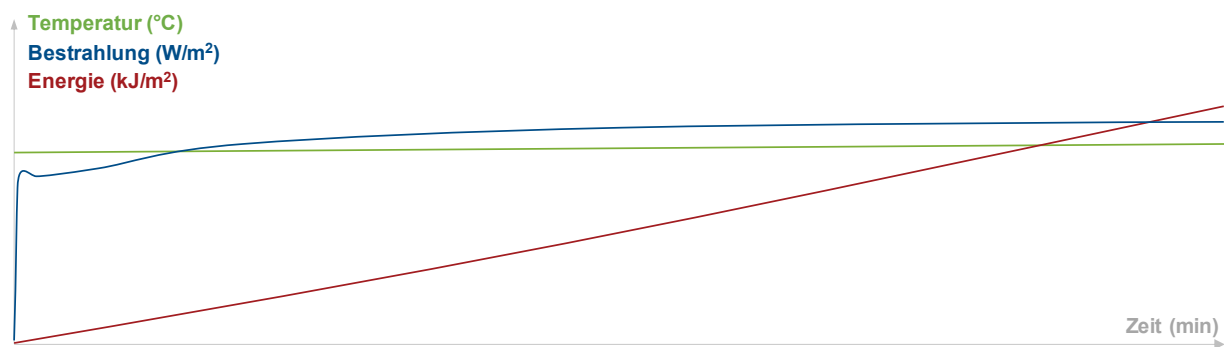
Die Dosis des Injektionsnarkotikums wurde dabei individuell an das Gewicht der Maus angepasst. Verwendet wurde ein Gemisch aus Ketamin (60 mg/kg Körpergewicht) und Xylazin (5 mg/kg Körpergewicht), das intraperitoneal injiziert wurde (Ketamin 10%, WDT, Garbsen, Deutschland; Xylazin Xylarium 20mg, Alvetra GmbH, Neumünster Deutschland). Zum Ausschluss vorbestehender kongenitaler Katarakte erfolgte die Applikation

eines Mydriatikums (0,5% Tropicamid Pharma Stulln, Stulln, Deutschland) und die Untersuchung der anästhesierten Mäuse unter der Spaltlampe (Coherent Medical Group). Bei der Voruntersuchung wurden keine vorbestehenden Katarakte festgestellt.

Um Austrocknung der Cornea während der Untersuchung sowie während des Bestrahlungsvorgangs und der Aufwachphase zu verhindern, wurde auf beide Augen eine physiologische Kochsalzlösung getropft. Zusätzlich wurde vor der Bestrahlung einseitig auf das nicht zu bestrahlende Auge und nach der Bestrahlung beidseits Bepanthen Wund- und Heilsalbe aufgetragen (5% Dexpanthenol, Bayer AG, Leverkusen). Während der gesamten Anästhesierung wurden die Mäuse auf Wärmematten (Lucky Reptile Thermo Mat) gelagert, um ein Auskühlen zu verhindern. Das Aufwachen erfolgte spontan und ohne Antagonisierung der Narkose.

2.3.3 Bestrahlungsvorgang

Ein Auge der Versuchsmäuse wurde im 300nm-Bereich einseitig bestrahlt, das andere Auge wurde dabei abgedeckt.



UVB (312)	
Bestrahlungsziel (kJ/m²)	14,50
Bestrahlungsergebnis (kJ/m²)	14,50
Maximale Bestrahlungsintensität (W/m²)	48,11
Zeit (min:sec)	5:21
Maximale Temperatur (°C)	24,1
Minimale Temperatur (°C)	23,1

Abbildung 16: Bestrahlungsübersicht des Bio-Spectra-Systems

Quelle: Eigene Abbildung in Anlehnung an den Originalausdruck, ins Deutsche übersetzt

Während der Bestrahlung wurden kontinuierlich die abgelaufene Zeit, die erreichte UV-Intensität sowie die Temperatur angezeigt, am Ende des Bestrahlungsvorgangs wird eine Übersicht über die genannten Daten ausgegeben (siehe Abbildung 16). Dabei ist eine konstante Temperatur (grün) über den gesamten Bestrahlungsvorgang zu sehen sowie eine UV-Intensität (blau), die nach anfänglichem Hochfahren ihr Maximum von 4,8 mW/cm² erreicht und zu einer konstanten Zunahme der abgegebenen Energie (rot) führt. Nach etwa 5 Minuten ist die maximale UVB-Gesamtdosis von 14,5kJ/m² erreicht.

2.3.4 Gewebebegewinnung für den ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay)

Drei beziehungsweise sieben Tage nach Bestrahlung wurden die Mäuse mit 100% CO₂ (Linde AG Pullach, Deutschland) euthanasiert und die Bulbi anschließend enukleiert. Zur Lösung des Auges und des Sehnervs aus der Orbita wurde mit einer Pinzette hinter dem Bulbus Zug ausgeübt. Die Augen wurden sofort in 0,9% NaCl gelegt und unter dem Leica M60-Mikroskop die Linse mikrochirurgisch entfernt, indem durch einen feinen Schnitt entlang des Limbus der vordere Augenabschnitt mit Cornea und Iris abgetrennt und anschließend Choroidea und Retina von der Linse abpräpariert wurden.

Nach Aufnahme der Dunkelfeld-Fotografien wurde in einem letzten Schritt das Linsenepithel von der Linse abpräpariert und in Eppendorfgefäßen mit einer Pufferlösung aus PBS-Puffer und Proteinase Inhibitor im Verhältnis 10:1 gelöst. Dabei wurde jeweils das Gewebe von 7 Mäusen in einem Gefäß gepoolt, um Zytokinkonzentrationen oberhalb der Nachweisgrenze sicherzustellen. Die Proben wurden durchgehend mit Eis gekühlt und schließlich manuell homogenisiert und bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und bei -80 Grad eingefroren.

2.3.5 Darstellung und Quantifizierung der Linsen-Morphologie

Die Linsenmorphologie wurde im Durchlicht-Dunkelfeld-Mikroskop dargestellt. Dabei wurden Fotos der Linsen mit der Leica-IC80-HD-Mikroskopkamera in 2,5-facher Vergrößerung gemacht.

Durch Messung der integrierten optischen Dichte der Linsen-Fotografien mit der Software ImageJ (National Institutes of Health Bethesda, MD) wurde die Linsentrübung als

Gradmesser für die Kataraktogenese objektivierbar quantifiziert. In 17 Fällen kam es zu präparationsbedingten Artefakten und daher zum Ausschluss der Linsenphotographien aus der Messung der optischen Dichte.

Bei der Messung wurde nach einem standardisierten Protokoll vorgegangen. Alle Bilder wurden in 16-bit-Formate konvertiert und im schwarz-weißen Modus mit dunklem Hintergrund dargestellt. Über die Spezifizierungsoption wurde eine runde Messfläche mit einem Durchmesser von 740 Pixeln für alle Linsenfotos festgelegt. Diese Messfläche deckt den gesamten Linsendurchmesser ab, jedoch unter Ausschluss des Linsenrandes, da es im Randbereich teilweise zu Artefakten kam. Die Messung wurde pro Linse drei Mal durchgeführt und anschließend der Mittelwert bestimmt. Um die gewählte Linsenfläche getrennt vom Hintergrund messen zu können, wurde ein minimaler Pixel-Schwellenwert von 50 sowie ein maximaler Pixel-Schwellenwert von 120 festgelegt und spezifisch für jedes Linsenbild die Pixelintensität des Hintergrundes gemessen und subtrahiert.

2.3.6 ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent) zum Nachweis von MCP-1 und NK1R

Die Synthese des Linsenepithels von NK1R und MCP-1 wurde mittels Sandwich-ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) untersucht. Den Namen Sandwich-ELISA erhielt dieses enzymatische Immunadsorptionsverfahren, da zum selektiven Nachweis des Antigens zwei Antikörper an dieses binden. Das in der vorliegenden Arbeit genutzte ELISA-Kit zur Detektion des Zytokins MCP-1 ist von R D Systems Minneapolis USA hergestellt, das ELISA-Kit für NK1R ist vom Hersteller Cusabio, Wuhan, China bezogen worden. Beide ELISAs wurden streng nach Angaben der Hersteller durchgeführt. Das Wirkprinzip, die Vorbereitung und die Auswertung beider Assays waren dabei identisch und werden im Folgenden beschrieben. Die verwendeten Materialien und die genauen Arbeitsschritte der ELISAs unterscheiden sich und werden separat an anderer Stelle beschrieben.

2.3.6.1 Das Wirkprinzip

Das Wirkprinzip des Sandwich-ELISA ist in Abbildung 17 dargestellt. Zunächst wird das Antigen (NK1R beziehungsweise MCP-1) über einen spezifischen Antikörper an eine Mikrotiterplatte gebunden und akkumuliert. Anschließend erfolgt die Bindung eines an das

Enzym HRP (Horseradish Peroxidase) gekoppelten Antikörpers, der durch Umsetzung des Chromogens TMB (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin) einen Farbumschlag zur Sichtbarmachung des Antigens bewirkt. Die Intensität des Farbumschlags entspricht der Konzentration des Antigens. Gemessen wird er als optische Dichte über die Absorption von Licht einer spezifischen Wellenlänge.

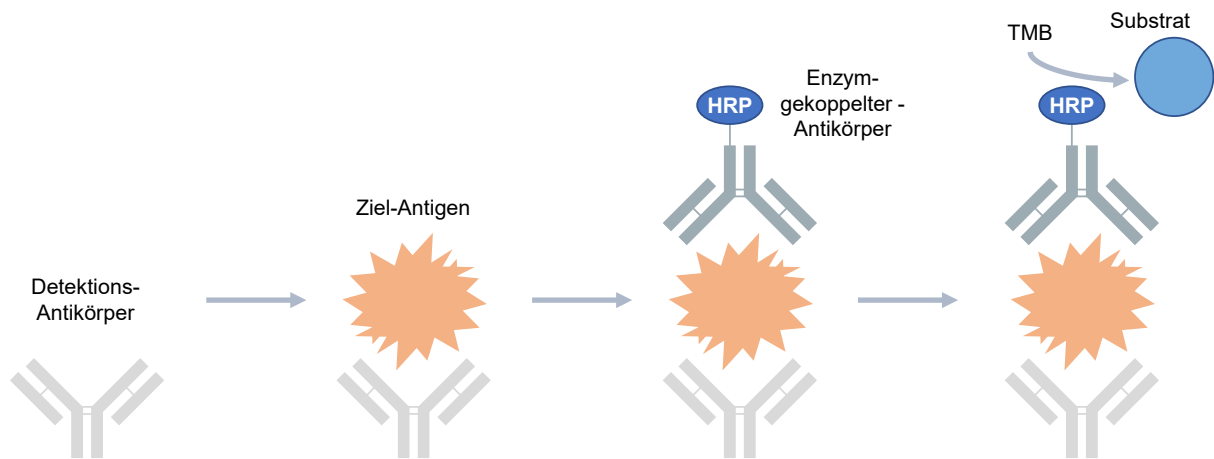


Abbildung 17: Wirkprinzip des Sandwich-ELISAs
 HRP: Horseradish Peroxidase, TMB: Tetramethylbenzidin
 Quelle: Eigene Abbildung

Zur Quantifizierung der Ergebnisse wird eine Standardreihe aus festgelegten Antigenkonzentrationen von 500 pg/ml, 250 pg/ml, 125 pg/ml, 62,5 pg/ml, 31,25 pg/ml, 15,6 pg/ml und 0 pg/ml auf die Platte aufgetragen und gemessen. Anhand der daraus ermittelten Standardkurve kann eine Eichgerade generiert werden, mit der sich die Proben vergleichen und quantifizieren lassen. Sowohl die Probenwerte als auch die Standardreihe werden doppelt aufgetragen und auch doppelt gemessen, die Ergebnisse werden jeweils gemittelt.

Beide Assays werden auf eine 96-Well-Polystyren-Platte aufgetragen, die bereits beschichtet vorlag mit einem polyklonalen Antikörper spezifisch für Maus MCP-1 beziehungsweise NK1R. Die Bindung erfolgt dabei über Wechselwirkung eines Kohlenhydratrests der konstanten Einheit des Antikörpers mit hydrophilen Gruppen des Polystyrens.

Die Nachweisgrenze des MCP-1 ELISA-Kits liegt bei 2,00 pg/ml, die des NK1R ELISA-Kits liegt bei 1,95 pg/ml.

Zwei Werte dienen als Kenngrößen der Assay-Qualität. Zum einen die Intraassay-Variabilität als Maß für die Schwankung bei mehrmaligem Messen einer Probe auf derselben Mikrotiterplatte (NK1R-ELISA: unter 8%, MCP-1 ELISA: unter 5,3 %). Zum anderen die Interassay-Variabilität, die für die Schwankung der Ergebnisse bei Messung einer Probe auf verschiedenen Mikrotiterplatten steht (NK1R ELISA: unter 10%, MCP-1 ELISA: unter 7,3%). Beide Werte werden als Variationskoeffizient (Standardabweichung/Mittelwert) angegeben.

2.3.6.2 Die Vorbereitung

Die Vorbereitungsschritte beider ELISAs umfassen das Herausnahme aller Detergenzien aus Kühlschrank und Gefrierfach zum Aufwärmen auf Raumtemperatur, die Herstellung des Waschpuffers durch Verdünnung von 20ml Waschpufferkonzentrat mit 480ml destilliertem Wasser, die Herstellung von Gewebelysat-Verdünnungen mit PBS im Verhältnis 1:6 für den NK1R-ELISA und im Verhältnis 1:4 für den MCP-1- ELISA im Eppendorfgefäß unter einem sterilen Luftabzug, sowie die Herstellung einer Standardlösung. Zur Herstellung der Standardreihe wird die Standardsubstanz mit der definierten Konzentration von 1000pg/ml von MCP-1 bzw. NK1R verdünnt (siehe Abbildung 18).

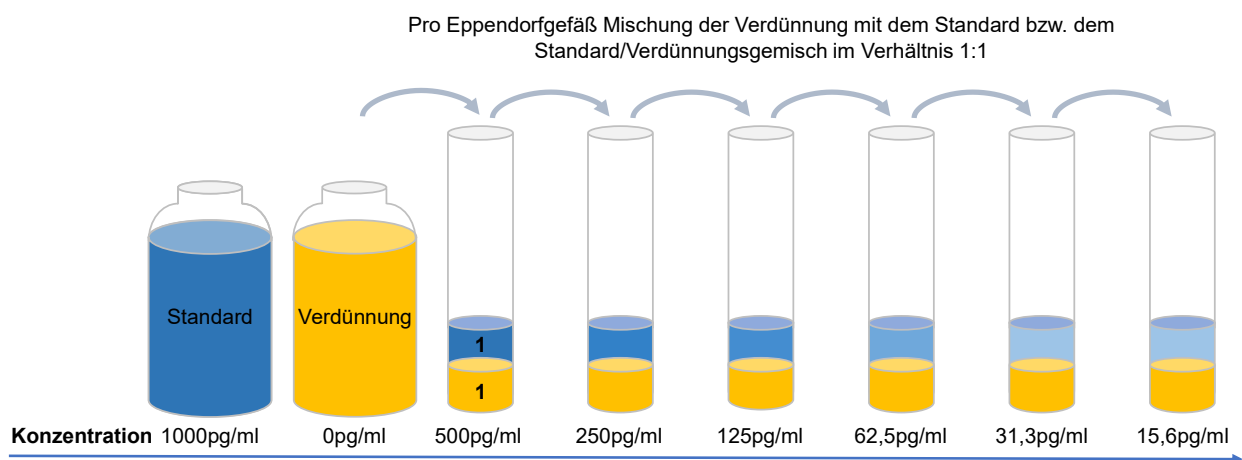


Abbildung 18: Herstellung der Standardreihe

Quelle: Eigene Abbildung in Anlehnung an Cusabio Instructions

Beim MCP-1 ELISA werden in 6 Eppendorfgefäße jeweils 200µl Verdünnung pipettiert. Im nächsten Schritt wird durch Zugabe von 200µl Standardlösung mit einer MCP-1 Konzentration von 1000pg/ml in das erste Eppendorfgefäß eine neue Mischung mit dann um 50% reduzierter Standard-Konzentration 500pg/ml hergestellt. Von dieser Mischung werden wiederum 200µl in das zweite Eppendorf-Gefäß pipettiert und somit die Konzentration erneut um 50% auf 250pg/ml reduziert. Dieser Vorgang wird wiederholt bis das sechste Gefäß erreicht ist; im Ergebnis befindet sich dort eine Standard-Verdünnungs-Mischung mit einer MCP-1 Konzentration von 15,6pg/ml. Beim NKR-1 ELISA wird grundsätzlich analog vorgegangen, es werden jedoch gemäß Hersteller-Angaben in jedem Schritt 250µl Standard mit 250µl Standard-Verdünnungs-Gemisch ergänzt.

2.3.6.3 Arbeitsschritte des MCP-1 ELISAs

- 1) Pipettieren von 50µl Assay-Verdünnung RD1W in jedes Well.
- 2) Doppeltes Auftragen von 50µl des jeweiligen Standards.
- 3) Doppeltes Auftragen von 50µl der Proben und der Kontrolle.
- 4) Vorsichtiges Beklopfen der Platte für eine Minute zur Durchmischung.
- 5) Abdecken der Platte mit der mitgelieferten Folie.
- 6) Inkubation bei Raumtemperatur für 2 Stunden, um eine Antigen-Bindung an die Antikörper der Platte zu gewährleisten.
- 7) Aspiration der überstehenden Flüssigkeit in jedem Well.
- 8) Zugeben von 400µl Waschpuffer pro Well mit einer Spritzflasche und anschließende Entfernung, fünfmalige Wiederholung des Waschvorgangs.
- 9) Entfernung der Überreste des Waschpuffers nach dem letzten Waschgang, durch Umdrehen und auf Papiertücher Klopfen der Platte.
- 10) Pipettieren von 100µl des polyklonalen Maus-Antikörpers mit konjugierter Meerrettich-Peroxidase in jedes Well.
- 11) Abdecken der Platte mit einer frischen Folie.
- 12) Inkubation für 2 Stunden.

- 13) Wiederholung des Waschvorgang wie in Schritt 8) beschrieben.
- 14) Herstellung von 100µl Substrat Lösung aus 50µl stabilisiertem Hydrogenperoxid und 50µl 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine (TMB). Pipettieren der Mischung in jedes Well.
- 15) Einwickeln der Platte in Alufolie, um sie vor Lichteinwirkung zu schützen. (Die TMB-Wirkung kann auch durch Licht ausgelöst werden).
- 16) Inkubation bei Raumtemperatur für 30 Minuten.
- 17) Pipettieren von 100µl Stop-Solution aus Salzsäure in jedes Well.
- 18) Vorsichtiges Beklopfen der Platte zur Mischung.
- 19) Bestimmung der optischen Dichte jedes Wells mit einem Mikroplattenlesegerät bei 540nm, innerhalb von 30 Minuten.

2.3.6.4 Arbeitsschritte des NK1R ELISAs

- 1) Verdünnung von 10µl des Biotin-Antikörper-Konjugats mit 990µl Verdünnung.
- 2) Verdünnung von 10µl HRP-Avidin-Konjugat mit 990µl Verdünnung.
- 3) Jeweils zweifaches Auftragen von 100µl des Standards oder der Probe.
- 4) Aufbringen der Schutzfolie auf die Platte.
- 5) Inkubation bei 37 Grad für 2 Stunden.
- 6) Pipettieren von 100µl des Biotin-Antikörper-Konjugats in jedes Well, ohne vorherigen Waschvorgang.
- 7) Aufbringen einer frischen Schutzfolie und Inkubation bei 37 Grad für eine Stunde.
- 8) Aspiration der überstehenden Flüssigkeit in jedem Well.
- 9) Hinzugabe von 200µl Waschpuffer pro Well mit einer Spritzflasche, nach 2 Minuten Entfernung des Waschpuffers durch Kippen der Platte, dreifache Durchführung des Waschvorgangs.
- 10) Entfernung der Überreste des Waschpuffers nach dem letzten Waschgang, durch Umdrehen und auf Papiertücher klopfen der Platte.

- 11) Hinzufügen von 100µl HRP-Avidin-Konjugat in jedes Well.
- 12) Aufbringen einer frischen Schutzfolie und Inkubation bei 37 Grad für eine Stunde.
- 13) Fünffache Wiederholung des Waschvorgang wie in Schritt 9) beschrieben.
- 14) Hinzufügen von 90µl TMB-Substrat in jedes Well.
- 15) Einwickeln der Platte in Alufolie zum Schutz vor Lichteinwirkung. (Die TMB-Wirkung kann auch durch Licht ausgelöst werden).
- 16) Inkubation bei 37 Grad für 30 Minuten.
- 17) Pipettieren von 50µl Stop-Solution aus Salzsäure in jedes Well.
- 18) Vorsichtiges Beklopfen der Platte zur Mischung.
- 19) Bestimmung der optischen Dichte jedes Wells mit einem Mikroplattenlesegerät bei 540nm innerhalb von 5 Minuten.

2.3.6.5 Auswertung der ELISA-Tests

Durch das doppelte Auftragen der Standard-Konzentrationen wurden pro Konzentration zwei Werte für die optische Dichte im Mikroplattenlesegerät generiert. Es wurden jeweils Mittelwerte aus den beiden Werten für jede Standard-Konzentration gebildet. Aus den berechneten Mittelwerten wurde eine Kurve erstellt und aus deren Steigung und ihrem Schnittpunkt mit der Y-Achse ihre Polynomfunktion 1. Grades ermittelt nach dem Schema

$$Y = m \times x + n.$$

Hierbei entspricht m der Steigung und n dem Schnittpunkt mit der Y-Achse, beide Werte waren gegeben. Die Funktionsgleichung wurde nach x aufgelöst, so dass sie lautet

$$x = (y - n) / m.$$

Für y wurden die jeweiligen Ergebnisse aus der Plattenmessung der optischen Dichte eingesetzt und so das Ergebnis des ELISA-Tests berechnet. Dieses Ergebnis musste anschließend mit dem Verdünnungsfaktor multipliziert werden, der im Fall beider durchgeführten ELISA 2 betrug.

2.3.7 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der Tests erfolgte unter Zuhilfenahme der Programme Excel und SPSS 23 (Statistical Package for the Social Sciences 23).

In der bildanalytischen Auswertung der Dunkelfeld-Fotografien sowie in den immunologischen Nachweisverfahren der Zytokine im Linsenepithel wurden jeweils die Mittelwerte zwischen drei Gruppen sowie innerhalb dieser Gruppen miteinander verglichen. Die Gruppen setzten sich zusammen aus der

- Kontrollgruppe mit 21 unbestrahlten Mäusen,
- Drei-Tages-Latenzzeit-Gruppe mit 21 Mäusen, die einseitig bestrahlt wurden und nach einer Latenzzeit von drei Tagen untersucht wurden,
- Sieben-Tages-Latenzzeit-Gruppe mit 21 Mäusen, die einseitig bestrahlt wurden und nach einer Latenzzeit von sieben Tagen untersucht wurden.

In der Kontrollgruppe liegen die Daten für beide unbestrahlten Augen vor, für die Mäuse der Drei- und Sieben-Tages-Gruppen liegen pro Maus die Daten zu einem exponierten und einem nicht exponierten Auge vor.

Statistisch verglichen wurden die Mittelwerte der exponierten Augen sowohl mit der Kontrollgruppe als auch mit den nicht exponierten Augen der eigenen Gruppe. Zudem wurde der Mittelwertsunterschied zwischen exponiertem und nicht exponiertem Auge für die Drei- und Sieben-Tages-Latenzzeit-Gruppe im Konfidenzintervall angegeben.

Die Messergebnisse für die optische Dichte der Linsenfotos wurden durch den Shapiro-Wilk-Test auf Normalverteilung geprüft und diese bestätigt, so dass eine einseitige ANOVA (F-Test) mit Posthoc-Test (LSD für least significant difference) durchgeführt wurde, um die optische Dichte des bestrahlten Auges mit dem unbestrahlten Auge zu vergleichen.

Die Zytokin-Level im bestrahlten Auge im Vergleich zum unbestrahlten Auge jeweils innerhalb einer Gruppe (Kontrollgruppe/ Drei-Tage-Latenzzeit/ Sieben-Tage-Latenzzeit) wurden durch einen T-Test für gepaarte Stichproben statistisch verglichen. Der

statistische Vergleich der Zytokinlevel zwischen den Gruppen (Kontrollgruppe/ Drei-Tage-Latenzzeit/ Sieben-Tage-Latenzzeit) wurde durch einen zweiseitigen T-Test bei zwei Stichproben gleicher Varianz vorgenommen. Die ermittelten p-Werte gelten als signifikant, wenn $p \leq 0,05$. Das Konfidenzintervall wurde auf 0,95 gesetzt.

3 Ergebnisse

3.1 Ergebnis des Vorversuchs zur Ermittlung der Bestrahlungsdosis

Durch die Ergebnisse des Vorversuchs konnten sowohl die Bestrahlungsdosis als auch die in dieser Arbeit zu untersuchenden Peptide spezifiziert werden. Im Vorversuch wurde zunächst eine Bestrahlungsdosis von $8,7 \text{ kJ/m}^2$ verwendet, da diese Dosis bereits in einer früheren Studie die NK-1-Rezeptor Expression im okulären Gewebe auf messbare Werte erhöht hatte.

Die Bestrahlung von je 20 Mäusen mit der dreifachen UVB-Schwellendosis und immunologischer Untersuchung im ELISA nach drei Tagen ergab für NK1R und MCP-1 absolute Werte (vor Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors) knapp im sensitiven Bereich der ELISA-Kits. Substanz P dagegen lag deutlich unterhalb der Nachweisgrenze.

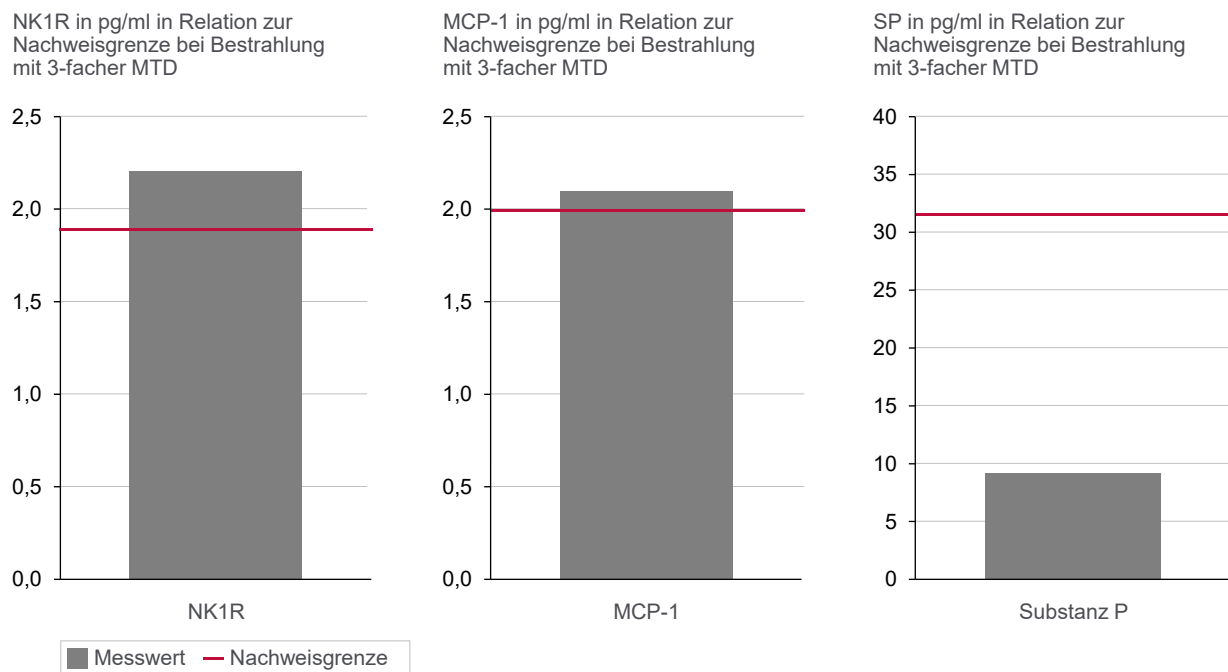


Abbildung 19: Vorversuch zur Untersuchung der NK1R-, MCP-1- und Substanz P-Expression im Linsenepithel im ELISA-Test drei Tage nach Bestrahlung mit der dreifachen MTD. Darstellung der absoluten Werte (vor Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors) bei einer Messung mit $n=20$ (Proben gepoolt); NK1R: Neurokinin-1 Rezeptor, MCP-1: Monocyte chemoattractant Protein-1, MTD: Maximal tolerierbare Dosis

Die oben dargestellten Ergebnisse des Vorversuchs zeigen, dass NK1R und MCP-1 im Linsenepithel exprimiert werden und durch das ELISA-Nachweisverfahren detektiert werden können. Es wird von einer Korrelation des NK-1-Rezeptors und seines Substrates Substanz P ausgegangen. Es gelang jedoch nicht, das Neuropeptid Substanz P nachzuweisen, was auf seine geringe Halbwertszeit zurückgeführt werden kann. Das Resultat des Vorversuchs legt nahe, dass für den Versuch eine höhere UVB-Dosis als die dreifache MTD von $8,7 \text{ kJ/m}^2$ gewählt werden sollte, um eine deutlich über die Nachweisgrenze erhöhte Zytokin-Synthese im Linsenepithel zu begünstigen. Deshalb wurde im Versuch eine fünffache Schwellendosis von $14,5 \text{ kJ/m}^2$ verwendet.

3.2 Ergebnisse des Versuchs

3.2.1 Linsenmorphologie

Auf den im Durchlicht-Dunkelfeld-Mikroskop erzeugten Fotografien der präparierten, in Pufferlösung vorliegenden Linsen, zeigten sich unterschiedliche Morphologien für die unbestrahlte Kontrollgruppe und die mit fünffacher Schwellendosis bestrahlten Mausgruppen nach drei und sieben Tagen.

3.2.1.1 Linsenmorphologie der Kontrollgruppe

Die unbestrahlten Kontrolllinsen zeigen sich klar ohne Trübungszeichen (Abbildung 20).

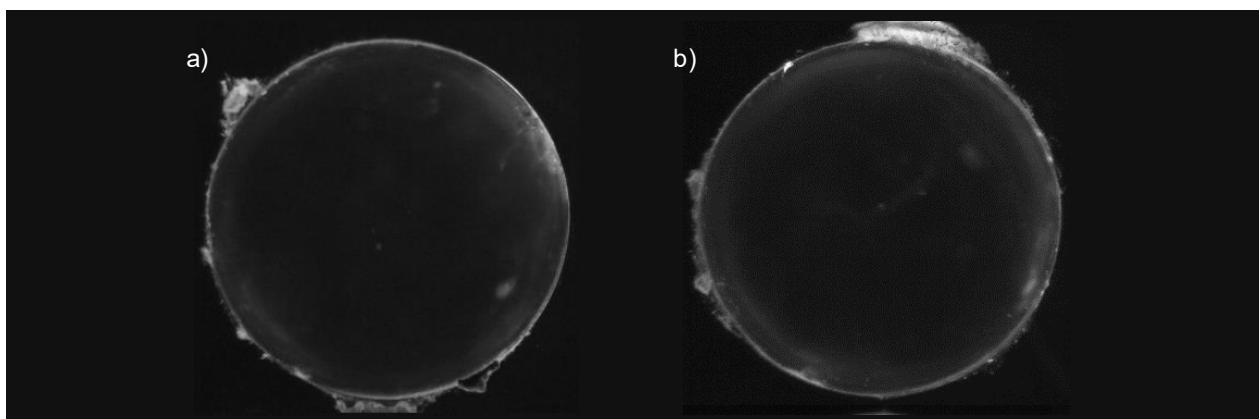


Abbildung 20: Linsenmorphologie der unbestrahlten Kontrollgruppe. Klare Linsen a) und b) einer Maus aus der unbestrahlten Kontrollgruppe

3.2.1.2 Linsenmorphologie drei Tage und sieben Tage nach Bestrahlung

Im exponierten Auge bildete sich anterior eine subkapsuläre Katarakt mit Schädigung des Epithels. Nach einer Latenzzeit von drei Tagen präsentierte sich diese in Gestalt von großflächigen, obskuren Granula (Abbildung 21).

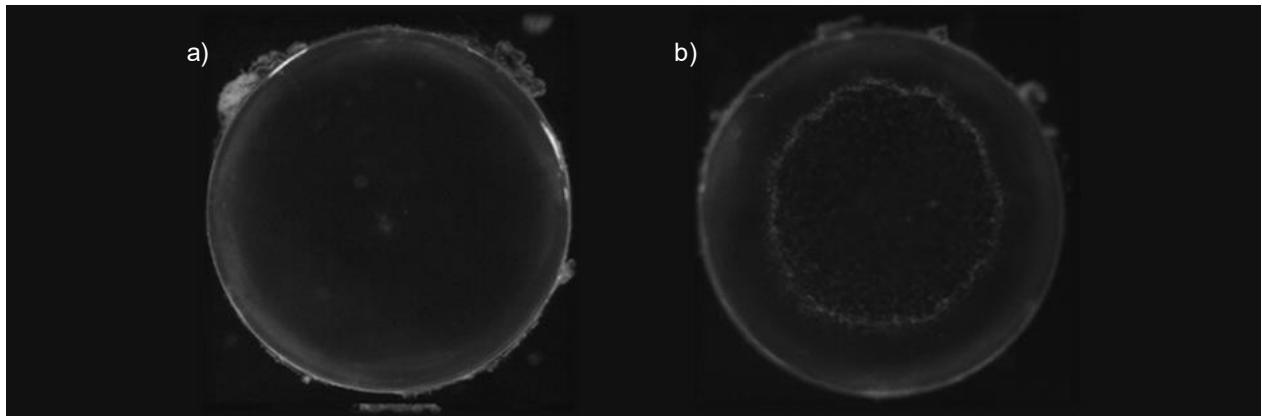


Abbildung 21: Linsenmorphologie drei Tage nach UVB-Bestrahlung mit fünffacher maximal tolerierbarer Dosis, a) nicht exponierte klare Linse, b) exponierte Linse mit subkapsulärer Katarakt

Nach sieben Tagen ist eine Verkleinerung des getrübbten Bereichs in Richtung des Linsen-zentrums zu beobachten (Abbildung 22).

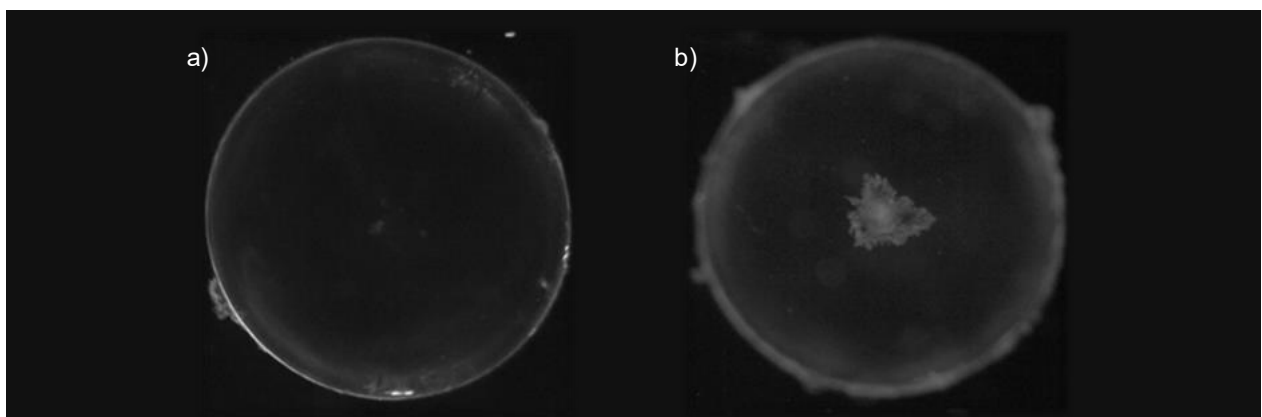


Abbildung 22: Linsenmorphologie sieben Tage nach UVB-Bestrahlung mit fünffacher maximal tolerierbarer Dosis, a) nicht exponierte klare Linse, b) exponierte Linse mit subkapsulärer Katarakt

3.2.1.3 Vergleich der Linsenmorphologie nach Bestrahlung mit der dreifachen und fünffachen UVB-Schwellendosis

Beim Vergleich der Linsenmorphologie des Versuchs (fünffache UVB-Schwellendosis) mit der des Vorversuchs (dreifache UVB-Schwellendosis) waren drei Tage nach Bestrahlung deutlich unterschiedliche Trends zu beobachten. Bei fünffacher Bestrahlungsdosis zeigte sich der Epithelschaden wie oben beschrieben homogen körnig und großflächig mit schmalem epitheliale Randsaum. Bei dreifacher Bestrahlungsdosis war die Regeneration bereits weiter vorangeschritten, sichtbar an einem insgesamt verkleinerten getrübten Areal und einem breiteren hellen epithelialen Randwall, der sich in klarer Abgrenzung zum dunklen Granula-freien Zentrum darstellte. Linsen, die fünffacher UVB-Schwellendosis ausgesetzt waren, zeigten auch nach sieben Tagen ein inhomogeneres Trübungsbild als die schwächer bestrahlten Linsen (Abbildung 23).

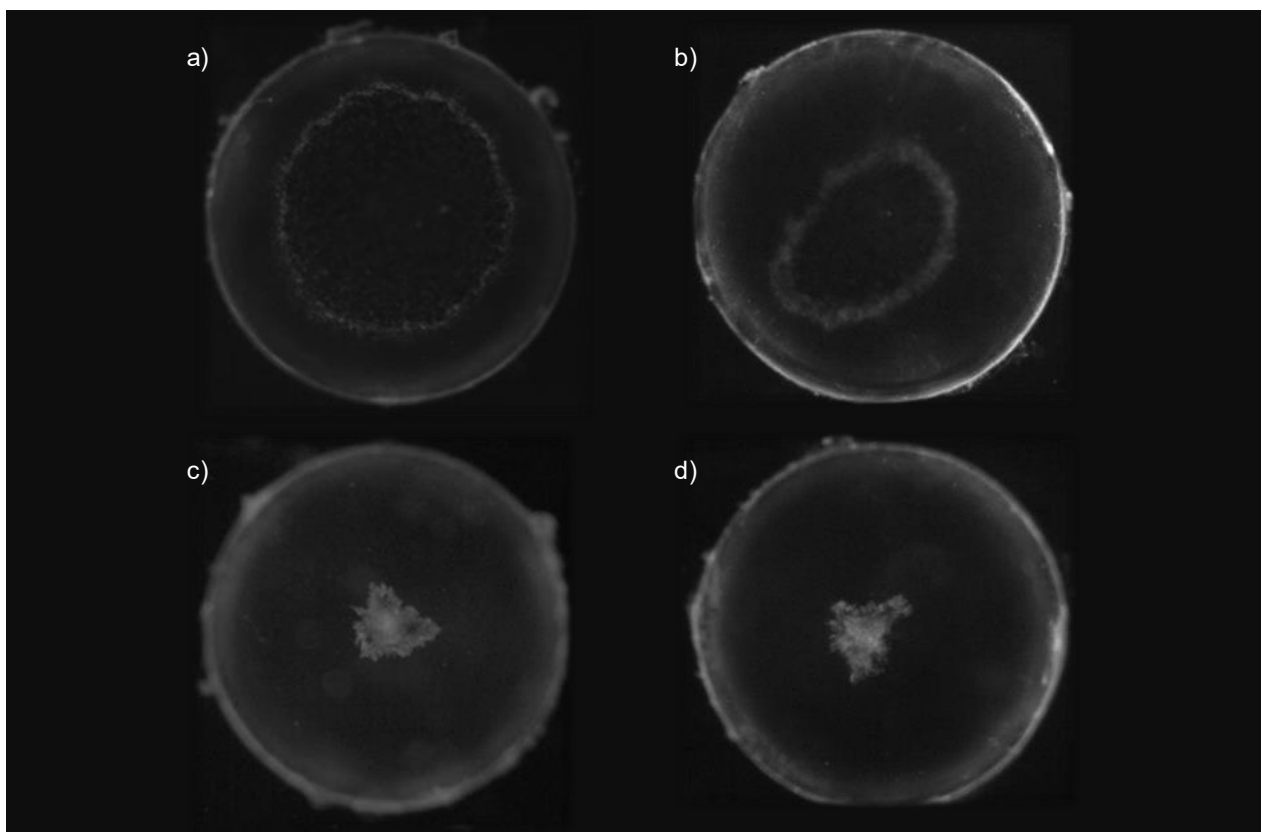


Abbildung 23: Vergleich der Linsenmorphologie nach Bestrahlung mit drei- und fünffacher UVB-Schwellendosis. Drei Tage nach Bestrahlung: a) mit fünffacher maximal tolerierbarer Dosis (MTD) bestrahlte Linse und b) mit

dreifacher MTD bestrahlte Linse; sieben Tage nach Bestrahlung: c) mit fünffacher MTD bestrahlte Linse, d) mit dreifacher MTD bestrahlte Linse

3.2.2 Quantifizierung der Linsentrübung als optische Dichte

Die Quantifizierung der Linsentrübung nach einseitiger Bestrahlung mit der fünffachen Schwellendosis bestätigt die Auswertungsergebnisse der Dunkelfeld-Fotografien, da die Werte der optischen Dichte der sichtbaren Linsenmorphologie entsprechen. Für die exponierten Linsen ist sowohl drei Tage als auch sieben Tage nach Bestrahlung ein deutlicher Anstieg der gemessenen Pixelintensität zu beobachten. Passend zur großflächigen Ausprägung der subkapsulären Katarakt nach drei Tagen, ist zu diesem Zeitpunkt auch die Pixelintensität besonders hoch. Ebenfalls entsprechen sich die Verkleinerung der Linsentrübung und die Rückläufigkeit der Pixelintensität nach sieben Tagen. Kontrolllinsen und nicht exponierte Linsen, die mikroskopisch beide klar erscheinen, weisen auch für die optische Dichte niedrige Werte auf. Zwischen den jeweils rechten und linken nicht bestrahlten Augen der Kontrollgruppe ergibt sich ein geringfügiger Unterschied aufgrund der Streuung zwischen den Messwerten (Abbildung 24).

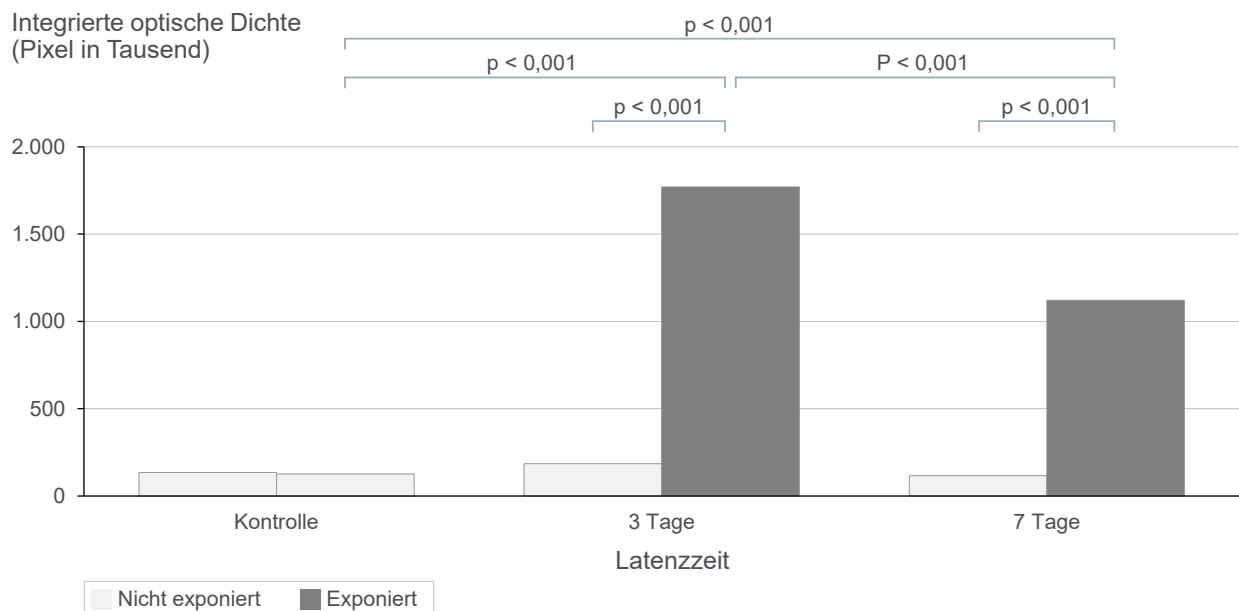


Abbildung 24: Quantifizierung und Vergleich der Linsentrübung anhand der Pixelintensität durch Messung der integrierten optischen Dichte. Vergleich der optischen Dichte der Linsen für die unbestrahlte Kontrollgruppe und

die bestrahlten Gruppen mit Latenzzeit von drei Tagen und sieben Tagen, Angabe der optischen Dichte als Mittelwerte. Höchst signifikanter Unterschied ($p < 0,001$) für den Vergleich des nicht exponierten Auges mit dem exponierten Auge sowohl nach drei Tagen als auch nach sieben Tagen. Höchst signifikanter Unterschied ($p < 0,001$) für den Vergleich der exponierten Augen nach drei und sieben Tagen mit den nicht exponierten Augen der Kontrollgruppe. $n=20$ und $n=17$ für die Kontrollgruppe, $n=20$ drei Tage exponiert, $n=19$ drei Tage nicht exponiert, $n=15$ sieben Tage exponiert sowie $n=18$ sieben Tage nicht exponiert. Einseitige ANOVA (F-Test) mit Posthoc Test (LSD für least significant difference)

Die statistische Auswertung ergab einen höchst signifikanten Unterschied für den Vergleich des nicht exponierten Auges (< 200.000 Pixel) mit dem exponierten Auge sowohl nach drei Tagen (1,77 Millionen Pixel) als auch nach sieben Tagen (1,12 Millionen Pixel) sowie einen höchst signifikanten Unterschied der exponierten Augen nach drei und sieben Tagen mit den nicht exponierten Augen der Kontrollgruppe. Auch der Rückgang der Linsentrübung vom dritten zum siebten Tag nach Bestrahlung ist signifikant.

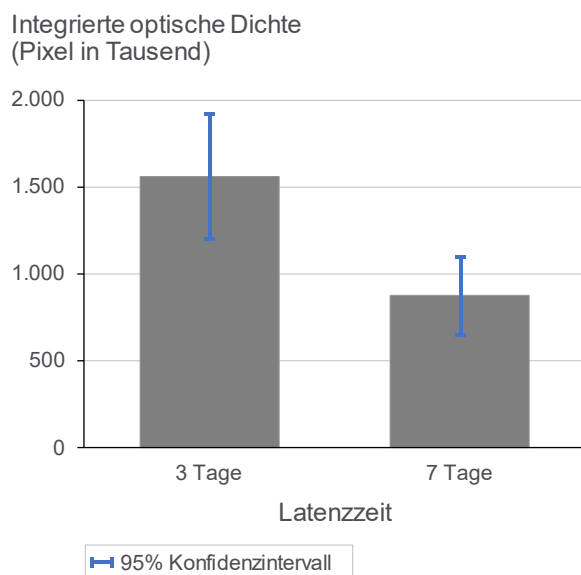


Abbildung 25: Mittelwertunterschied der optischen Dichte und dessen 95% Konfidenzintervall zwischen exponiertem Auge und nicht exponiertem Auge drei und sieben Tage nach Bestrahlung. $n=20$ drei Tage exponiert, $n=19$ drei Tage nicht exponiert, $n=15$ sieben Tage exponiert sowie $n=18$ sieben Tage nicht exponiert; MCP-1: Monocyte chemoattractant Protein-1

Abbildung 25 zeigt einen deutlich größeren Mittelwertsunterschied der Pixelintensität zwischen bestrahltem und nicht bestrahltem Auge nach drei Tagen (1,56 Millionen) als nach

sieben Tagen (878,78 Tausend). Das 95% Konfidenzintervall integriert nicht die Null und gibt keinen Überschneidungsbereich zwischen den Konfidenzintervallen. Dies spricht für einen signifikanten Unterschied.

Ein Vergleich der optischen Dichte der Linsentrübung nach drei Tagen zwischen den dreifach bestrahlten Mäusen des Vorversuchs und den fünffach bestrahlten Linsen des Versuchs, ist mit der angewandten Quantifizierungsmethode nicht sinnvoll. Nach dreifacher Bestrahlungsdosis befindet sich das Linsenepithel nach drei Tagen, wie oben zu sehen, bereits im fortgeschrittenen Regenerationsstadium und bildet einen breiten Epithelwall, mit einer höheren optischen Dichte als die nicht regenerierte Linsentrübung.

3.2.3 Ergebnisse der ELISA-Tests

3.2.3.1 MCP-1-Konzentrationen im Linsenepithel der C57BL/6-Maus nach UVB-Exposition

Durch die Analyse der Linsenepithel-Lysate im ELISA gelang es MCP-1 im Linsenepithel der Maus nachzuweisen. Die MCP-1-Werte der nicht bestrahlten Augen (9,58 pg/ml) blieben auf dem Niveau der Werte unbestrahlter Kontrollmäuse (Abbildung 26). Es wurde ein UVB-induzierter Anstieg der MCP-1-Werte im Vergleich zur Kontrolle und im Vergleich zum nicht bestrahlten Auge nach einer Latenzzeit von drei Tagen (9,71 pg/ml) und sieben Tagen (9,70 pg/ml) festgestellt. Die Unterschiede der MCP-1-Konzentrationen der bestrahlten Augen der Latenzzeit-Gruppen von drei und sieben Tagen waren allerdings nicht signifikant.

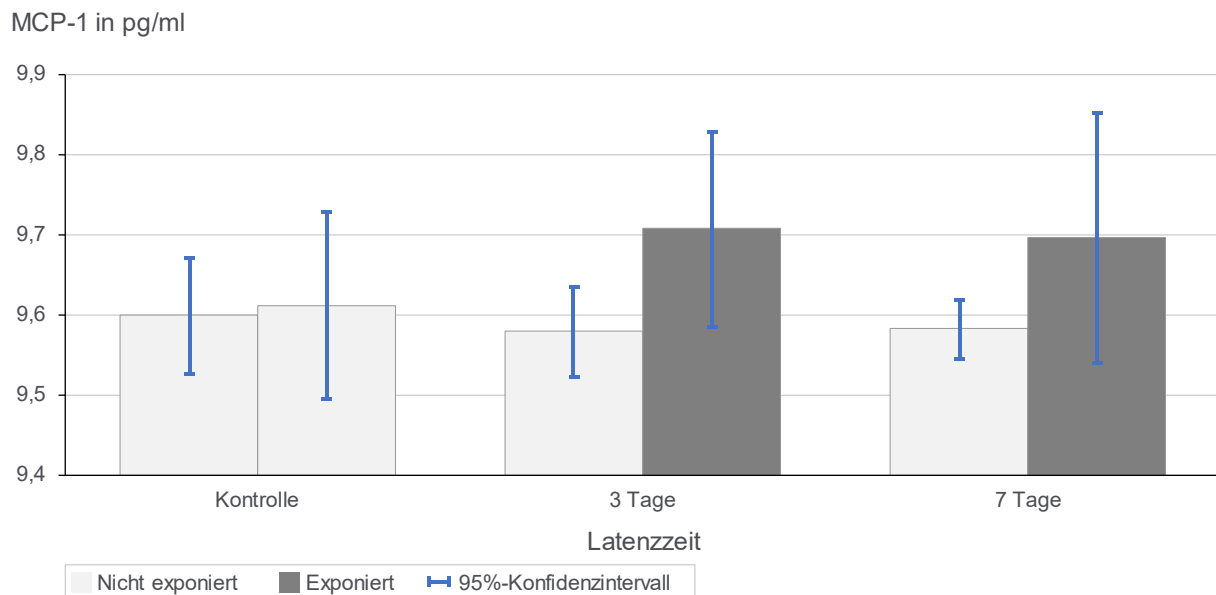


Abbildung 26: MCP-1-Level im Linsenepithel der Kontrollgruppe und der Latenzzeitgruppen von drei Tagen und sieben Tagen mit 95% Konfidenzintervall. Angabe von Mittelwerten bei je drei Messungen mit $n=7$ pro Gruppe. Kein signifikanter Unterschied der MCP-1-Konzentrationen der Kontrollgruppe im Vergleich zu den Latenzzeit-Gruppen von drei und sieben Tagen (zweiseitiger T-Test bei zwei Stichproben gleicher Varianz). Kein signifikanter Unterschied der MCP-1-Konzentrationen innerhalb der Gruppen zwischen exponiertem und nicht-exponiertem Auge (T-Test für gepaarte Stichproben). MCP-1: Monocyte chemoattractant Protein-1

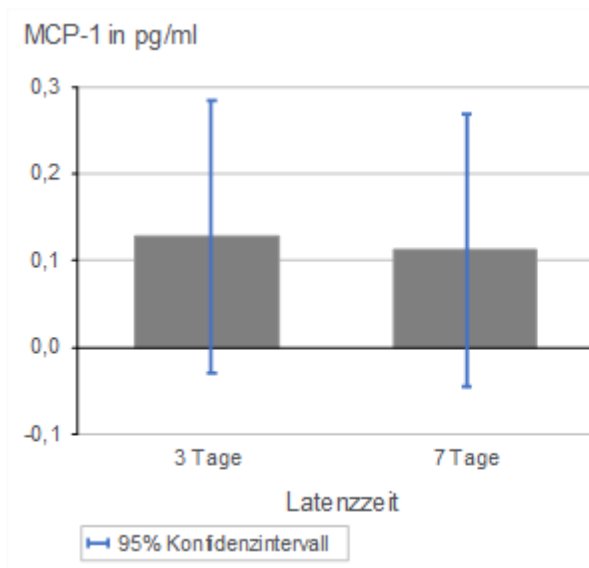


Abbildung 27: MCP-1 Mittelwertunterschied und dessen 95% Konfidenzintervall zwischen exponiertem und nicht exponiertem Auge drei und sieben Tage nach Bestrahlung; je Untergruppe (Drei-Tages-Latenzzeitgruppe exponiert und nicht exponiert, Sieben-Tages-Latenzzeitgruppe exponiert und nicht exponiert) 3 Messungen mit $n=7$; MCP-1: Monocyte chemoattractant Protein-1

Für den Vergleich der MCP-1 Konzentration im bestrahlten und nicht bestrahlten Auge drei und sieben Tage nach Bestrahlung zeigen sich ähnlich große Mittelwertsunterschiede mit fast deckungsgleichen Verteilungsmustern des Konfidenzintervalls.

3.2.3.2 NK1R-Konzentration im Linsenepithel der C57BL/6-Maus nach UVB-Exposition

Die Ermittlung der NK1R-Konzentrationen im Linsenepithel durch Untersuchung der NK1R-Lysate im ELISA ergab einen Anstieg von NK1R im UVB-exponierten Auge im Vergleich zum nicht exponierten Auge sowohl nach drei als auch nach sieben Tagen Latenzzeit. Ein signifikanter Unterschied wurde für NK1R im Linsenepithel nach drei Tagen zwischen dem exponierten Auge (13,8 pg/ml) und dem nicht exponierten Auge (13,41 pg/ml) gefunden (Abbildung 28).

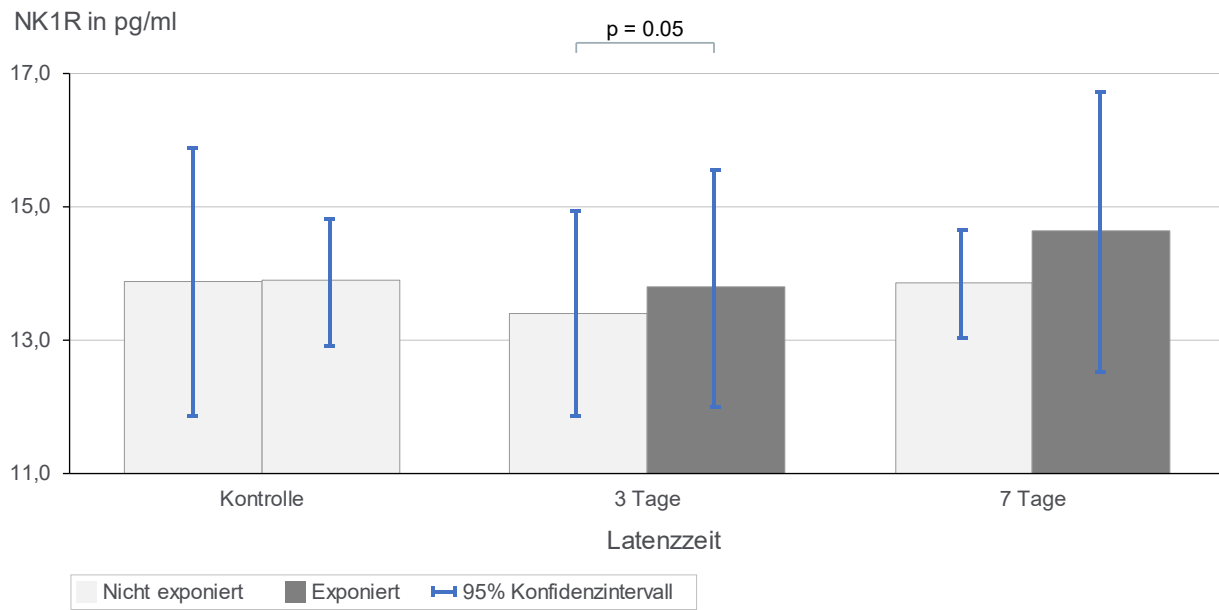


Abbildung 28: NK1R-Werte im Linsenepithel der Kontrolle, drei und sieben Tage nach Bestrahlung mit 95% Konfidenzintervall, Angabe von Mittelwerten bei je drei Messungen mit $n=7$, signifikant erhöhte NK1R-Level ($p=0,05$) im exponierten Auge gegenüber dem nicht exponierten Auge nach drei Tagen (T-Test für gepaarte Stichproben); NK1R: Neurokinin-1 Receptor

Die NK1R-Expressierung nach drei Tagen nimmt insgesamt ab und regeneriert sich wieder bis zum siebten Tag nach Bestrahlung. Insgesamt ist die NK1R-Expressierung im Linsenepithel drei Tage nach Bestrahlung weniger ausgeprägt als nach sieben Tagen, was sich auch in einem geringeren Mittelwertsunterschied zwischen exponiertem und nicht exponiertem Auge niederschlägt (Abbildung 29).

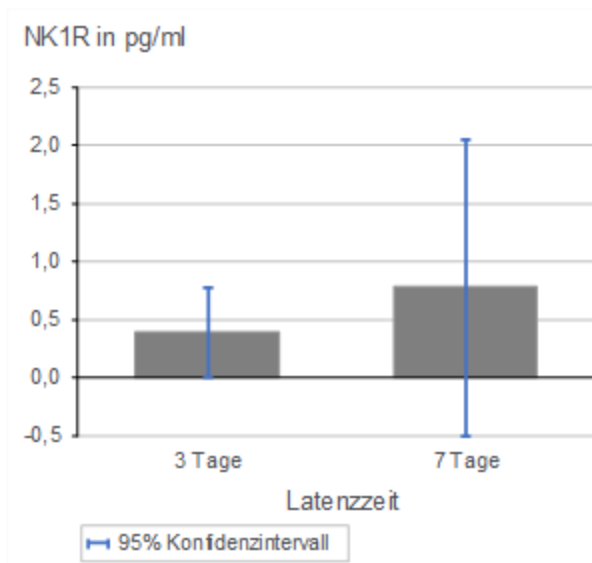


Abbildung 29: NK1R-Mittelwertunterschied und dessen 95% Konfidenzintervall zwischen exponiertem und nicht exponiertem Auge drei und sieben Tage nach Bestrahlung; je Untergruppe (Drei-Tages-Latenzzeitgruppe exponiert und nicht exponiert, Sieben-Tages-Latenzzeitgruppe exponiert und nicht exponiert) 3 Messungen mit $n=7$; NK1R: Neurokinin-1 Receptor

4 Diskussion

4.1 Methodischer Ansatz

4.1.1 Versuchstiere

In der Maus kann in-vivo die Interaktion verschiedener Gewebe untersucht werden, wohingegen mit der Zellkultur nur bestimmte Zellarten isoliert voneinander betrachtet werden können. Bei der Erforschung, der in dieser Arbeit im Fokus stehenden Zytokine ist es von großer Bedeutung, die Zytokinsynthese der Linsenepithelzellen innerhalb des okulären Milieus zu untersuchen, da insbesondere das an die Linse angrenzende Kammerwasser einen regulierenden Einfluss auf die Zytokinsynthese okulärer Gewebe hat.

Morphologisch ähneln sich Maus und Menschenauge in weiten Teilen, dennoch bestehen anatomische Unterschiede. So weist die Maus eine dünnere Cornea (Dillon *et al.*, 1999), einen prozentual höheren Anteil an γ -Kristallinen an den Linsenfasernproteinen (Wistow und Piatigorsky, 1987) sowie eine geringer ausgeprägte Fähigkeit zur Akkomodation auf (Hockwin *et al.*, 2002). Das Auge des Meerschweinchens ähnelt dem Menschenauge im Hinblick auf das Vorhandensein von UV-Filtern und die Beteiligung von Vitamin C am oxidativen Schutzsystem besonders (Truscott, 2005). Allerdings bietet die Maus den großen Vorteil, dass ihr Genom neben dem des Menschen am besten untersucht ist und eine weitgehende Übereinstimmung zwischen den beiden Genomen gezeigt wurde (Graw und Loster, 2003). Außerdem sind sowohl die phänotypische Erscheinung als auch die genetische Manifestation von Krankheiten vergleichbar zwischen Maus und Mensch (Smith *et al.*, 1997).

Aus den genannten Gründen eignet sich das Mausmodell besonders gut, um Erkenntnisse zur UVB-induzierten Katarakt zu gewinnen und diese auf die menschliche Kataraktogenese sowie die mögliche Katarakt-Prävention und -Therapie zu übertragen.

Das Alter der Mäuse von sechs Wochen wurde in Anlehnung an bereits veröffentlichte Studien zur UVB-induzierten Kataraktogenese gewählt, in denen gezeigt wurde, dass die Sensibilität gegenüber UVB-Strahlung bei Mäusen mit steigendem Alter abnimmt (Dong *et al.*, 2003) und die Effektivität der Reparaturmechanismen bei vier Wochen alten

Mäusen ausgeprägter ist als bei 16 Wochen alten Mäusen (Zhang *et al.*, 2012). Aus diesem Grund sind sechs Wochen alte C57BL/6-Mäuse ein gutes Modell zur Untersuchung UVB-bedingter Linsenepithelschädigungen.

4.1.2 Anästhesierung

Die Kombination aus dem analgetisch und relaxierend wirkendem Xylazin und narkotisch wirksamem Ketamin zur Anästhesierung der Maus und anderer Spezies wird seit den 1970er-Jahren eingesetzt und ist damit vielfach bewährt (Lofgren und Soderberg, 2001; Merriam *et al.*, 2000; Meyer *et al.*, 2008).

Calderone *et al.* (1986) kritisierten, dass Xylazin/Ketamin bei topischer Applikation bei der Ratte aufgrund von Austrocknung der Cornea selbst kataraktogen wirkt. Jedoch wurde das Analgetikum in dieser Arbeit nicht topisch, sondern intraperitoneal appliziert und die Cornea mit Gel benetzt. Zhang *et al.* (2007) sprachen sich für die Nutzung von Barbituraten wie Pentobarbital zur Analgesie von Versuchstieren bei Studien zur UVB-induzierten Katarakt aus, da das Ergebnis ihrer Studie Anzeichen für einen Xylazin/Ketamin bedingten Exophtalmus bei der Ratte beinhaltete. Dies würde zur höheren Exposition des Auges gegenüber UVB-Strahlung führen. Beachtet werden muss dabei die von Zhang angewandte, im Vergleich zu dieser Arbeit, erhöhte Dosis des Analgetikums (80mg/kg Ketamin 10mg/kg Xylazin im Vergleich zu 60mg/kg Ketamin und 5mg/kg Xylazin) sowie die Pentobarbital kennzeichnende, geringe therapeutische Breite mit erhöhter Mortalität bei Versuchstieren.

In dieser Arbeit wurden sowohl bestrahlte Tiere als auch die Kontrollgruppe anästhesiert und es konnte in der Spaltlampenuntersuchung weder ein Exophtalmus noch eine kataraktogene Veränderung bei der Kontrollgruppe festgestellt werden.

4.1.3 Untersuchungszeitraum

Die Untersuchung der Linsen erfolgte entweder drei oder sieben Tage nach Bestrahlung. Damit unterscheidet sich diese Arbeit von vielen bisher durchgeführten Forschungsarbeiten, die nur einen Untersuchungszeitpunkt beinhalten und so lediglich eine Momentaufnahme darstellen, jedoch keinen Verlauf beobachten (Lofgren, 2017). Durch Arbeiten von

Meyer *et al.* (2005) ist belegt, dass es mindestens einen Zeitraum von 48 Stunden in Anspruch nimmt, bis die Reaktion des Linsenepithels auf die UVB-Exposition durch eine deutliche Linsentrübung sichtbar wird. Ebenso konnte in früheren Arbeiten gezeigt werden, dass die Regeneration des Epithels im Zeitraum einer Woche stattfindet (Meyer *et al.*, 2005; Yamada *et al.*, 2001). Studien zur MCP-1 und NK1R Synthese des retinalen Pigmentepithels sprechen dafür, dass diese ebenfalls innerhalb einer Woche nach Stimulierung stattfindet (Benhar *et al.*, 2016; Lucas *et al.*, 2012).

Die These dieser Arbeit ist, dass ein Zusammenhang zwischen Kataraktbildung und okulärer Inflammation nach UVB-Exposition besteht. Aus diesem Grund wurde passend dazu nach drei und sieben Tagen die Synthese von Entzündungsfaktoren durch das Linsenepithel als Antwort auf die Bestrahlung im ELISA untersucht.

4.1.4 Bestrahlungsvorgang

Durch Benutzung des Bio-Spectra-Bestrahlungsgeräts von Vilber Lourmat wurde sichergestellt, dass die Bestrahlungsbedingungen in dieser Arbeit vergleichbar zu früheren Arbeiten waren (Meyer *et al.*, 2013; Soderberg *et al.*, 2002). Aufgrund der in Abbildung 22 abgebildeten UVB-Spektralkurve des Bio-Spectra-Geräts, das im geringen Maß auch UVA-Strahlung enthält, kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass die Resultate dieser Arbeit partiell auch durch UVA-Strahlung induziert wurden.

In früheren Studien konnte immunhistochemisch gezeigt werden, dass eine dreifache UVB-Schwellendosis bei der C57BL/6-Maus zu einer gesteigerten Expressierung des NK-1-Rezeptors in verschiedenen okulären Geweben, darunter auch im Linsenepithel, führt. Für MCP-1 lagen keine Anhaltspunkte für die benötigte Bestrahlungsdosis vor. Aufgrund des durchgeführten Vorversuches konnte gezeigt werden, dass für die zuverlässige Messung der untersuchten Zytokine im ELISA eine Bestrahlungsdosis oberhalb der dreifachen Schwellendosis ($9,4\text{kJ/m}^2$) benötigt wird. Aus Tierschutzgründen wurde mit der fünffachen Schwellendosis ($14,5\text{kJ/m}^2$) die geringste Dosis zur Gewährleistung eines messbaren biologischen Effekts gewählt.

4.1.5 ELISA (Enzym-linked Immunosorbent Assay) als Protein-Nachweisverfahren

Es stehen verschiedene mögliche und bewährte Protein-Nachweisverfahren zur Verfügung, die bereits in früheren Studien zum Screening einer Vielzahl möglicherweise relevanter Zytokine im Zusammenhang mit der Katarakt angewandt wurden. Die genannten Studien ermöglichten Erkenntnisse, auf denen in dieser Arbeit mit der Quantifizierung von MCP-1 und NK1R mittels ELISA aufgebaut wird.

Multiplex-Tests mittels Filtermikroplatten, sogenannte MBAA (Multiplex Bead Array Assay) können mehrere (üblicherweise bis zu 30) Zytokine parallel quantifizieren. Sie eignen sich insbesondere zum Screening mehrerer Zytokine, wenn noch wenig Kenntnisse vorliegen, welche Zytokine für die Fragestellung von besonderer Relevanz sind. Der Nachteil dieser Methodik liegt in höheren Kosten im Vergleich zum ELISA (Elshal und McCoy, 2006). Mittels MBAA wurde in früheren Studien das Kammerwasser von Patienten mit seniler Katarakt auf verschiedene Zytokine hin untersucht. MCP-1 kann im Kammerwasser von Patienten mit seniler Katarakt nachgewiesen werden und es wurde mehrfach in voneinander unabhängigen Studien eine positive Korrelation zwischen dem MCP-1-Niveau im Kammerwasser und dem Alter gezeigt (Gao *et al.*, 2016; Kokubun *et al.*, 2017).

Die Immunhistochemie kann ebenfalls als Screening-Verfahren zum Nachweis eines bestimmten Proteins eingesetzt werden. So gelang in einer früheren Studie der Nachweis UVB-abhängiger Synthese des NK-1-Rezeptors im Linsenepithel der C57BL/6-Maus (Gross *et al.*, 2018). Die UVB-bedingte MCP-1-Synthese im Linsenepithel *in-vivo* wurde bisher noch nicht untersucht. Es wurden jedoch mittels Immunhistochemie erhöhte MCP-1-Werte im Kammerwasser nach Phakoemulsifikation am Menschen sowie am Hasen nachgewiesen (Kawai *et al.*, 2012). Aufbauend auf diesen früheren immunhistochemischen Versuchen zum Nachweis von NK1R und MCP-1 wurde in dieser Arbeit die Quantifizierung mittels ELISA durchgeführt. Die Vorteile des ELISA-Tests gegenüber der Immunfluoreszenz sind zudem eine höhere Objektivität und bessere Standardisierung.

Im Gegensatz zum Verfahren des Westernblots war der ELISA-Test geeigneter, da er die höhere Sensibilität aufweist und die Möglichkeit des Western-Blots, das ganze Protein-Spektrum nachzuweisen, für die Fragestellung dieser Arbeit nicht benötigt wurde. Einziger

Vorteil des Westernblots gegenüber dem ELISA wäre die Messung des Gesamt-Protein-gehaltes in den einzelnen Proben gewesen.

Der ELISA-Test ist eine bewährte Methode und war für diese Arbeit das optimale Verfahren, zum Nachweis der UVB-induzierten Synthese von MCP-1 und NK1R aufgrund der hohen Sensitivität (1,95 pg/ml für NK1R beziehungsweise 2,00 pg/ml für MCP-1) sowie der zuverlässigen Durchführbarkeit und schnellen photometrischen Auswertung.

4.1.6 Dunkelfeldmikroskopie und Lichtstreuungsmessung

Zur Optimierung der Messgenauigkeit der Pixelintensität der Linsentrübung wurden zum einen die technische Durchführung für alle Bilder standardisiert und zum anderen wurden potenzielle Artefakte durch Abzug des Pixelmesswertes für den Bildhintergrund herausgerechnet. Außerdem wurde auch die zu messende Fläche durch die Verwendung einer Mess-Schablone für alle Bilder vereinheitlicht. Durch die genannten Vorkehrungen konnten potenzielle Schwierigkeiten der angewandten Messtechnik auf ein minimales Maß reduziert werden.

4.2 UVB-bedingte Linsentrübung

Die einseitige UVB-Bestrahlung der C57BL/6-Mäuse mit der fünffachen Schwellendosis (14,5kJ/m²) führte im bestrahlten Auge zur Ausprägung einer anterioren subkapsulären Katarakt. Auf Bildern der Linse im Dunkelfeld-Mikroskop war erkennbar, dass sich die Linsentrübung in Gestalt von Granula nach drei Tagen über den größten Teil der Linsenvorderfläche zog und nach sieben Tagen eine Regeneration des Epithels mit Wiederherstellung der Linsentransparenz im äußeren Bereich stattgefunden hatte. Die Trübung beschränkte sich nach sieben Tagen nur noch auf das Linsenzentrum. In Übereinstimmung damit zeigte die Quantifizierung der Linsentrübung durch Ermittlung der integrierten optischen Dichte der mikroskopischen Linsenbilder nach drei Tagen eine starke Erhöhung im bestrahlten Auge, die nach sieben Tagen wieder rückläufig war. Der beobachtete Ablauf der Linsentrübung und -regeneration stimmt überein mit den Ergebnissen früherer Studien (Meyer *et al.*, 2005; Meyer *et al.*, 2014). In diesen erfolgte die Bestrahlung der C57BL/6-Mäuse mit geringeren Strahlendosen von 5kJ/m² sowie 6,4kJ/m² als doppelte

Schwellendosis. Im Gegensatz dazu wurde in dieser Arbeit eine der fünffachen Schwellendosis ($14,5\text{kJ/m}^2$) entsprechende Bestrahlungsdosis gewählt, um messbare Zytokinpiegel zu gewährleisten. Im Vergleich der Linsenphotografien wird ersichtlich, dass mit steigender Strahlungsintensität der beobachtete Regenerationsprozess langsamer und später abläuft. In den Studien von Meyer (2005) und Meyer (2014) fand die dunkelfeldmikroskopische Untersuchung der bestrahlten Linsen auch zu früheren Zeitpunkten, am ersten und zweiten Tag nach Bestrahlung statt. So konnte hier auch die Entwicklung der ersten Trübungsanzeichen in Form von disseminierter Granula im Bereich des Linsenäquator einen Tag nach Bestrahlung sowie deren Formierung zum Anulus am zweiten Tag nach Bestrahlung dargestellt werden (Meyer *et al.*, 2014).

Während in dieser Arbeit sieben Tage nach UVB-Exposition ein deutlicher und signifikanter Unterschied der Lichtstreuung zwischen exponiertem und nicht exponiertem Auge zu beobachten ist, konnte Meyer (2014) keine erhöhte Lichtstreuung nach acht Tagen feststellen. Dies unterstreicht die Feststellung, dass die Lichtstreuungsintensität von der UVB-Strahlungsdosis abhängt und mit steigender UVB-Dosis zunimmt (Meyer *et al.*, 2008).

Galichanin *et al.* (2010) beobachteten bei Bestrahlung der Ratte mit 8kJ/m^2 ebenfalls eine ipsilaterale subkapsuläre Linsentrübung, die sie durch Messung der Lichtstreuung quantifizierten. Interessanterweise unterschied sich hierbei der zeitliche Verlauf der Trübungsentwicklung, da die gemessene Lichtstreuung bis 14 Tage nach Bestrahlung zunahm und danach erst sichtbaren Reparaturprozessen unterlag. Dieser Unterschied könnte auf genetische Unterschiede zwischen den Spezies Maus und Ratte zurückzuführen sein.

Michael *et al.* (2000) untersuchten Langzeiteffekte nach Bestrahlung von Ratten mit 5kJ/m^2 im 300nm-Bereich. 56 Tage nach UVB-Exposition konnten geschädigte Linsenfasern im tieferen Bereich der Rinde bei gleichzeitig intaktem Epithel elektronenmikroskopisch dargestellt werden. Die Autoren stellen die These auf, dass Signale des regenerierenden Epithels die Linsenfasern erreichen oder sich Störungen im Wasser- und Ionenstoffwechsels auf diese auswirken. Auffällig war zudem, dass ausschließlich Fasern im Differenzierungsstadium Schädigungen aufwiesen. Die Erkenntnisse von Michael und Vrensen zeigen, dass UVB-Strahlung trotz beobachteter Reparatur des

Epithels kataraktogene Folgen im Linsengewebe verursacht, die auch in tieferen Schichten liegen können.

Die Schädigung des Linsenepithels führt bekannterweise zur Störung von Energiegewinnung, Proteinsynthese und Stofftransport des Epithels (Friedrich *et al.*, 2012; Moffat *et al.*, 1999; Pierscione *et al.*, 2015). Wie im Einführungsteil ausführlich erläutert, kann sich die UVB-bedingte Schädigung des einzigen stoffwechselaktiven Gewebes der Linse so auch auf die Struktur und Funktion des gesamten darunterliegenden Linsengewebes im nuklearen und kortikalen Bereich auswirken. Im Einklang mit dieser Erkenntnis beobachteten Meyer *et al.* (2008) in einigen Fällen auch nukleare und kortikale Trübungen, wohingegen in dieser Arbeit ausschließlich subkapsuläre Katarakte bei allen bestrahlten Mäusen zu finden waren.

4.3 Entzündungsregulierung durch UVB-abhängige Zytokinsynthese im Linsenepithel

In dieser Arbeit wurde eine UVB-induzierte Erhöhung der untersuchten Zytokine im Linsenepithel des bestrahlten Auges im Vergleich zum unbestrahlten Auge nachgewiesen, sowohl bei den 21 Mäusen in der Latenzzeitgruppe von drei Tagen, als auch bei den 21 Mäusen der Latenzzeitgruppe von sieben Tagen.

4.3.1 Die inflammatorische Wirkung UVB-bedingter MCP-1-Erhöhung im Linsenepithel des bestrahlten Auges

In dieser Arbeit konnte ein Trend hin zu erhöhter MCP-1-Synthese im Linsenepithel des bestrahlten Auges im Vergleich zum kontralateralen Auge und zur Kontrollgruppe festgestellt werden. Diese Erhöhung der MCP-1-Werte bestand sowohl nach drei als auch nach sieben Tagen, war jedoch nicht signifikant. Die MCP-1 Level im nicht bestrahlten Auge glichen in der Latenzzeit-Gruppe von drei Tagen als auch in der Latenzzeit-Gruppe von sieben Tagen den MCP-1-Werten der nicht exponierten Kontrollgruppe.

Die Mittelwertsunterschiede zwischen bestrahltem und nicht bestrahltem Auge zeigten sich ähnlich groß. Die Spanne beider Konfidenzintervalle war in Relation zur Größe des Mittelwertsunterschiedes recht groß, was durch die geringe Mausanzahl und folglich geringe Zahl an Datenpunkten erklärt werden kann. Die Anzahl der Datenpunkte wurde

zudem limitiert durch die Detektionsschwelle der ELISA-Tests, die ein Pooling des okulären Gewebes mehrerer Mäuse erforderte.

Den Nachweis, dass das Linsenepithel zur MCP-1-Synthese fähig ist, erbrachten bereits Kawai *et al.* (2012) am Hasen durch PCR-Analyse verbliebener Linsenepithelzellen, nach erfolgter Phakoemulsifikation (Kawai *et al.*, 2012). Zum Einfluss von UVB-Strahlung auf die MCP-1-Synthese des Linsenepithels oder anderer okulärer Gewebe liegen bisher noch keine Studien vor. Jedoch kann ein Beleg für den indirekten Einfluss von UVB auf die MCP-1-Synthese in Epithel- und Immunzellen des Auges in der Verknüpfung von Studienergebnissen gesehen werden, die zum einen die durch Substanz P induzierte Synthese von MCP-1 nachwiesen und zum anderen zeigten, dass Substanz P in okulären Geweben UVB-abhängig hochreguliert werden kann (Castellani *et al.*, 2009; Gross *et al.*, 2018; Spitsin *et al.*, 2017).

Wir stellten die MCP-1-Synthese des Linsenepithels nach UVB-Exposition über die Zeitspanne einer Woche dar und fanden Hinweise darauf, dass die UVB-induzierte MCP-1-Syntheserate nach drei und sieben Tagen anhaltend erhöht ist, wenn auch wie oben diskutiert nicht signifikant war.

Es stellt sich die Frage, wie sich eine mögliche UVB-bedingte MCP-1-Synthese des Linsenepithels auf das Epithel und seine Umgebung auswirkt. Basierend auf der Gegenüberstellung des Ergebnisses dieser Arbeit mit bisherigen Forschungsergebnissen, stellen wir vier Hypothesen auf.

Hypothese 1: Durch chemotaktische Rekrutierung von Monozyten ins Linsenepithel und die Fähigkeiten der Monozyten zur Induktion von ROS und Nitritoxiden erhöht MCP-1 den oxidativen Stress und verstärkt so die kataraktogen wirkende Oxidation von Linsenfaser- und Linsenepithelzellen.

In seiner proinflammatorischen Funktion übt MCP-1 eine starke chemotaktische Wirkung auf Monozyten aus (Lee *et al.*, 2012). Zu der inflammatorischen Wirkung rekrutierter Monozyten ist bekannt, dass sie neben ihrer Phagozytose-Funktion auch die Fähigkeit der Zytokinsynthese und der ROS Induktion besitzen und dabei selbst verstärkend wirken können (Benhar *et al.*, 2016). Yang *et al.* (2011) verdeutlichten dies am Beispiel des

retinalen Pigmentepithels. Am humanen Retina-Pigmentepithelium beschrieben sie, dass MCP-1 Monozyten aktiviert und diese daraufhin in den Epithelzellen die Level an Sauerstoffradikalen erhöhten.

Bekannterweise stellt die Oxidation von Proteinen des Linsenepithels und der Linsenfasern durch Sauerstoffradikale den bedeutendsten Pathomechanismus der Kataraktogenese dar. Folglich ist davon auszugehen, dass MCP-1 an der Pathogenese der UVB-bedingten Kataraktogenese beteiligt ist. Gestützt wird diese These von Studienergebnissen, die erhöhte MCP-1-Level im Kammerwasser von Katarakt-Patienten nachwiesen (Zhu *et al.*, 2016; Zhu *et al.*, 2015).

Hypothese 2: Es bestehen Wechselwirkungen zwischen der MCP-1-Synthese des Linsenepithels und dem Zytokinmilieu des Kammerwassers.

Das Zytokinmilieu des Kammerwassers wird durch die Sekretion von Zytokinen aus den umliegenden Geweben bestimmt (Stein-Streilein und Streilein, 2002; Taylor, 1996). So führen Pathologien verschiedener Gewebe des Auges zur MCP-1-Erhöhung im Kammerwasser, dazu zählen beispielweise Entzündungen der mittleren Augenhaut (Uveitis) und das Glaukom (Crane *et al.*, 2001; Kokubun *et al.*, 2017; Yoshida *et al.*, 2007). Es ist davon auszugehen, dass auch bei Inflammation des Linsenepithels synthetisiertes MCP-1 in das Kammerwasser abgegeben wird und über das Kammerwasser andere okuläre Gewebe erreicht. Zudem scheint es wahrscheinlich, dass sich MCP-1 aus dem Kammerwasser durch Bindung an Rezeptoren des Linsenepithels auf den Stoffwechsel und die Inflammation des Linsenepithels auswirkt. Eine UVB-bedingte Zytokinerhöhung parallel in Linsenepithel, Kammerwasser und angrenzenden Geweben konnte bisher lediglich für NK1R nachgewiesen werden (Gross *et al.*, 2018).

Auffällig ist, dass auch im Zuge der ischämischen Retinopathie mit steigender Entzündung der Retina die MCP-1-Spiegel im Kammerwasser ansteigen, obwohl kein direkter Kontakt zwischen Retina und Kammerwasser besteht (Yoshida *et al.*, 2003). Diese Beobachtungen legen die These nahe, dass Zytokine in der Lage sind MCP-1 vermittelte Entzündungsreaktionen in andere okuläre Gewebe zu vermitteln, die nicht unmittelbar benachbart oder über das Kammerwasser verbunden sind. Folglich sind auch für UVB-

bedingte Entzündungsprozesse des Linsenepithels Wechselwirkungen mit nicht unmittelbar angrenzenden Geweben des Auges denkbar.

Hypothese 3: MCP-1 kann in Abhängigkeit des umgebenden Zytokinmilieus sowohl eine pro- als auch eine antiinflammatorische Funktion ausüben.

Studien zur pro-inflammatorischen Funktion von MCP-1 stehen Studien gegenüber, die für eine immunsuppressive, protektive Wirkung der MCP-1-abhängig rekrutierten Monozyten im okulären Gewebe sprechen. Wie lässt sich dieser vermeintliche Widerspruch erklären?

Die Erklärung liegt in der Vielseitigkeit und Anpassungsfähigkeit der von MCP-1 rekrutierten Monozyten. Sie können ihren Phänotyp und ihre Funktion flexibel an die inflammatorischen Verhältnisse ihrer Umgebung anpassen. Eine inflammatorische Umgebung regt Monozyten an, sich zur M1-Makrophage zu differenzieren, die pro-inflammatorische Zytokine sowie Sauerstoffradikale und Nitritoxide produziert (Fernandez-Velasco *et al.*, 2014; Mosser, 2003; Mosser und Edwards, 2008). Antiinflammatorische Umgebungen induzieren die Differenzierung zur regulatorischen M2-Makrophagen, die zwar ebenfalls viel Nitritoxide produzieren können, jedoch durch die Synthese antiinflammatorischer Zytokine und ihre Fähigkeit zur Antigenpräsentation gekennzeichnet sind (Edwards *et al.*, 2006; Kauppinen *et al.*, 2016). Ob ein Zytokinmilieu pro- oder antiinflammatorisch ist, hängt von der Intaktheit des Immunprivilegs ab (Benhar *et al.*, 2016; London *et al.*, 2011).

Der antiinflammatorische Einfluss von MCP-1 wurde im Rahmen mehrerer Studien im Zusammenhang mit Entzündungsprozessen der Retina nachgewiesen (Ambati *et al.*, 2003; Benhar *et al.*, 2016; Luhmann *et al.*, 2009; Tuo *et al.*, 2007). So demonstrierten Benhar *et al.* (2016) die protektive Wirkung MCP-1-abhängiger Monozyten, indem sie die Monozyten in den Subretinalraum nach Glutamat-bedingter Verletzung der Retina injizierten und anschließend eine signifikant höhere Überlebensrate der retinalen Ganglionzellen feststellten. Seine antientzündliche Wirkung entfaltet MCP-1, indem es ins Auge rekrutierte Monozyten zur Synthese des antiinflammatorischen Interleukin-10 anregt, sowie durch eine Abschwächung der Radikalsynthese (Chen *et al.*, 2011). In der Zusammenschau

kann MCP-1 den oxidativen Stress im Linsenepithel damit nicht nur erhöhen, sondern in Abhängigkeit seiner Umgebung die Radikalsynthese eindämmen.

Hypothese 4: MCP-1 ist maßgeblich daran beteiligt die Zytokinzusammensetzung des Linsenepithels zu prägen.

MCP-1 und die durch dieses Zytokin rekrutierten Monozyten können bei Ausbildung eines antigenpräsentierenden Makrophagentyps sogar selbst entscheidend daran beteiligt sein, das Immunprivileg und ein immunsuppressives Zytokinmilieu aufrecht zu erhalten. Cone und Pais (2009) belegten, dass eine durch Ovalbumin-Antigen induzierte moderate okuläre Entzündung zu einem Anstieg an MCP-1 im Kammerwasser führt und einhergeht mit der Einwanderung von F4/80+-Monozyten über die Gefäße der Iris. 48 Stunden nach Injektion konnte dann ein Rückgang infiltrierender Zellen in der Iris und ein Anstieg dieser in Thymus und Milz der Tiere festgestellt werden. Die Autoren schlussfolgern, dass die MCP-1-abhängig eingewanderten Monozyten in Thymus und Milz die okulären Antigene präsentieren und die Ausbildung des Immunprivilegs induzieren.

Ähnlich wie für das retinale Zellüberleben im Rahmen der altersabhängigen Makuladegeneration beobachtet, könnten MCP-1 und eingewanderte Monozyten durch antiinflammatorische Wirkungen zum Schutz des Linsenepithels beitragen, solange ein intaktes Zytokinmilieu im Auge herrscht. Welche Funktion Monozyten im Rahmen der UVB-bedingten Kataraktogenese ausüben, sollte Gegenstand weiterer Forschungsbemühungen sein. Für ein umfassendes Verständnis wäre es dabei von besonderem Interesse, den Einfluss des Zytokinmilieus zu untersuchen und denjenigen Schwellenwert proinflammatorischer Zytokine zu ermitteln, ab welchem sich Monozyten zum proinflammatorischen Typ differenzieren.

4.3.2 Die inflammatorische Wirkung UVB-bedingter NK1R-Erhöhung im Linsenepithel des bestrahlten Auges

Auffälligstes Ergebnis dieser Arbeit ist die erhöhte Substanz P-Rezeptor-Expression im bestrahlten Auge nach drei Tagen, die sich im Vergleich zum nicht bestrahlten Auge als statistisch signifikant erwies ($p=0,05$). Bei den unbestrahlten Kontrollmäusen hingegen unterschieden sich die NK1R-Level im Linsenepithel des exponierten und nicht

exponierten Auges kaum voneinander. Der Vergleich der Zytokinlevel des Vorversuchs mit dem des Versuchs offenbart, dass die Zytokinsynthese von der UVB-Dosis abhängt. Während bei dreifacher UVB-Bestrahlung die Zytokinwerte nur knapp über der Nachweisgrenze lagen, lagen sie bei fünffacher Bestrahlung deutlich darüber.

Das Zytokin Substanz P ist durch Bindung an dessen NK-1-Rezeptor ein zentrales Molekül zur Induktion und Regulierung okulärer Entzündungsprozesse. Substanz P ist bedingt durch seine kurze Halbwertszeit, die im Gewebe nur einige Sekunden bis Minuten beträgt, schwer zu detektieren (Skidgel *et al.*, 1984). Aus diesem Grund wurden NK-1-Rezeptor Level als Quantifizierungsmaß für die Substanz P-Exprimierung im ELISA-Test gemessen. Der Nachweis UVB-abhängiger NK1R-Expression im Linsenepithel kann als Beleg für die dortige Substanz P-Synthese gesehen werden (Lucas *et al.*, 2012). Wie in Keratozyten und Epithelzellen der Cornea, den Epithel- und amakrinen Zellen der Retina sowie dem Epithel von Choroidea und Iris gezeigt wurde, findet die Synthese dieser Moleküle parallel statt (Bignami *et al.*, 2016; Denis *et al.*, 1991; Kieselbach *et al.*, 1990; Sloniecka *et al.*, 2015).

Die UVB-abhängige Induktion des NK-1-Rezeptors in okulären Geweben der Maus wurde 2018 erstmalig immunohistochemisch nachgewiesen (Gross *et al.*, 2018). Erstmalig wurde mit dieser Studie gezeigt, dass eine UVB-Dosis über der dreifachen Schwellendosis *in-vivo*, drei und sieben Tage nach Bestrahlung, zu einer erhöhten NK1R-Exprimierung im Linsenepithel führt. Das Vorkommen des NK-1-Rezeptors nach Bestrahlung mit der dreifachen UVB-Schwellendosis war deutlich ausgeprägter als nach Bestrahlung mit der einfachen UVB-Schwellendosis. Somit wurde auch hier eine Abhängigkeit der NK1R-Synthese des Linsenepithels von der UVB-Bestrahlungsdosis gefunden. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit dem Resultat dieser Arbeit, wobei sich die geringere Bestrahlungsdosis sowie die Methode der Immunfluoreszenz von dieser Arbeit unterscheiden.

Chui *et al.* (2007) stellten in einer weiteren Studie die UVB-abhängige Synthese von NK1R im okulären Gewebe fest, indem sie die NK1R-Synthese in menschlichen Epithelzellen der UVB-induzierten Bindehaut-Wucherung des Pterygiums nachwiesen. Gross (2018) zeigte darüber hinaus, dass UVB-Strahlung die NK1R-Synthese auch in Zellen der umliegenden Strukturen des Auges wie Iris, Ziliarkörper, Cornea und Retina hochreguliert. Im

Einklang mit den oben diskutierten Ergebnissen zur MCP-1-Induktion in nicht benachbarten Geweben zeigte auch Gross, dass UVB-Strahlung die Zytokinsynthese auch in retinalen Zellen der inneren plexiformen Retina-Schicht steigert, obwohl die UVB-Strahlung die Retina selbst nicht erreicht, da sie von den davorliegenden Geweben vollständig absorbiert wird. Als mögliche Erklärung schlussfolgert auch Gross, eine Zytokin-vermittelte Übertragung inflammatorischer Signale.

Besonders relevant sind dabei die NK1R-Erhöhen in Geweben, die über das Kammerwasser mit dem Linsenepithel verbunden sind, wozu Iris, Ziliarkörper und corneales Endothel zählen. Die Autorin stellt fest, dass durch Zytokinabgabe an das Kammerwasser molekulare Interaktionen zwischen den Geweben möglich sind. Hieraus ergibt sich, zusätzlich zur Beeinflussung über die direkte UVB-Einstrahlung, die Möglichkeit eines weiteren indirekten Weges, auf dem UVB-Strahlung Einfluss auf die Zytokinsynthese des Linsenepithels nimmt. Wie bereits für MCP-1 diskutiert, ist es auch für Substanz P denkbar, dass sich das Zytokin vom Kammerwasser aus an Rezeptoren des Linsenepithels bindet und so auf den Stoffwechsel und die Inflammation des Linsenepithels auswirkt. Des Weiteren könnte vom Linsenepithel synthetisierte und freigesetzte Substanz P auch über das Kammerwasser mit angrenzenden Epithelien mit NK1R-Expression interagieren.

Schlussfolgernd sollte das in dieser Arbeit erbrachte Ergebnis einer UVB-induzierten NK1R-Hochregulierung im Linsenepithel drei Tage nach Bestrahlung nicht isoliert betrachtet werden, sondern die bisherigen Erkenntnisse zur proinflammatorischen Funktion von Substanz P in okulären Geweben beachtet werden. Dabei finden sich neben Hinweisen auf die durch Substanz P- bedingte Hochregulierung proinflammatorischer Zytokine wie Interleukin-6,-12 und -23 auch Belege für die Senkung antiinflammatorischer Zytokine wie Interleukin-10 und VIP (Foldenauer *et al.*, 2013; Mashaghi *et al.*, 2016; McClellan *et al.*, 2008; Xu *et al.*, 2011). Darüber hinaus ist bekannt, dass Substanz P durch die beschriebene Einflussnahme auf die Zytokinsynthese umliegender Zellen eine Schlüsselrolle in der Rekrutierung von Immunzellen einnimmt (Mashaghi *et al.*, 2016).

Im Auge wurden die proinflammatorischen Mechanismen von Substanz P insbesondere für entzündliche Erkrankungen der Cornea untersucht. Dabei wurde eine Korrelation zwischen dem Schweregrad der Entzündungsreaktion mit der Höhe der Substanz P-Level

sowie der proinflammatorischen Zyto- und Chemokine IFN- γ , Interleukin 6, CCL3 und CXCL2 im cornealen Gewebe nachgewiesen (Twardy *et al.*, 2011). Des Weiteren wurde eine verstärkte Einwanderung von Leukozyten sowie Neovaskularisation in der Cornea im Rahmen erhöhter Substanz P-Expression des Cornea Epithels der C57BL/6-Maus gezeigt. Dabei führte das topische Auftragen eines NK1R-Antagonisten innerhalb von vier Tagen zu einem Rückgang der Leukozyten Infiltration und Neovaskularisation (Bignami *et al.*, 2014).

Anhand dieser Beispiele wird deutlich, dass Substanz P bei Bindung an den NK-1-Rezeptor proinflammatorisch auf die Gewebe des Auges wirkt. Die vorgestellten Studienergebnisse sprechen dafür, dass die UVB-induzierte NK1R-Synthese des Linsenepithels sich bei Bindung von Substanz P auf die weitere Zytokinexpression des Linsenepithels auswirkt und folglich eine erhöhte Einwanderung von Immunzellen bewirkt. Dabei könnte es, wie Sloniecka *et al.* (2015) bereits für Keratozyten des Auges vermuteten, auch zur autokrinen Verstärkung durch die eigene Substanz P-Synthese des Linsenepithels kommen.

4.3.3 Beeinflussung der Apoptose von Linsenepithelzellen durch Substanz P und MCP-1

Die mikroskopisch sichtbare Schädigung des Linsenepithels geht mit einer erhöhten Apoptoserate einher. Mittels Elektronenmikroskopie nach *in-vivo* Bestrahlung der Maus wurde bereits gezeigt, dass die UVB-bedingte Linsenepithelschädigung mit dem Verlust von Epithelzellen entlang der gesamten anterioren Linsenfläche einhergeht (Meyer *et al.*, 2014). Mehrere an der Ratte gewonnene Hinweise finden sich zudem, dass geschädigtes Linsenepithel verstärkt Apoptose-induzierende Faktoren wie P53 und Caspase 3 synthetisiert (Ji *et al.*, 2015; Michael *et al.*, 1998; Talebizadeh *et al.*, 2014). Passend dazu fand Fagerholm (1981) im humanen Linsenepithel von Linsen mit seniler Katarakt eine erniedrigte Epithelzellichte.

Entzündungsfaktoren wie MCP-1 und NK1R sind in der Lage, Apoptoseprozesse zu beeinflussen, so dass die Zytokinsynthese des Linsenepithels sich in autokriner Weise auch auf das Zellüberleben dieser Zelle auswirken könnte.

Die Literatur legt jedoch nahe, dass die beobachteten Apoptoseprozesse von Substanz P eher antagonisiert als unterstützt werden. Der beschriebene anti-apoptotische Effekt von

Substanz P ist bereits für zahlreiche Gewebe des Körpers beschrieben (Backman und Danielson, 2013; DeFea *et al.*, 2000; Janelins *et al.*, 2009; Lallemand *et al.*, 2003; Pieri *et al.*, 2010). Am Auge sind Apoptoseprozesse und ihr Zusammenhang mit Substanz P vor allem für die Retina und die Cornea erforscht.

In retinalen Epithelzellen *in-vivo* und in retinalen Epithelzellen der Zellkultur wurde eine verringerte Apoptoserate durch Substanz P-Bindung an den NK-1-Rezeptor beobachtet (Baek *et al.*, 2016; Hong *et al.*, 2015). In Anbetracht der eingeschränkten Regenerationsfähigkeit retinaler Zellen kann die Verhinderung der Apoptose durch Substanz P hier als protektiv angesehen werden. Insbesondere für Erreger verursachte Entzündungen des Auges wie die Herpes-induzierte Keratitis und die *Pseudomonas aeruginosa* bedingte Inflammation des cornealen Epithels wurden Hinweise auf eine Pathologie-verstärkenden Wirkung durch den anti-apoptotischen Einfluss durch Substanz P gefunden, da ein früher stattfindender Apoptoseprozess zur effizienteren Eliminierung von Erregern führt und Substanz P durch seine anti-apoptotische Funktion die Eliminierung von Bakterien oder Viren verzögert (Yang *et al.*, 2016; Zhou *et al.*, 2008). Für die UVB-bedingte Inflammation des Linsenepithels ist bei später stattfindender Apoptose ebenfalls von einer länger anhaltenden Inflammation und damit verstärkter Schädigung des Gewebes auszugehen.

Die Bedeutung von MCP-1 und durch MCP-1 rekrutierte Monozyten für Apoptoseprozesse bleibt offen, da wie in Punkt 5.3.1 erläutert, je nach Zytokin-Milieu, konträre Funktionen ausgeführt werden können. Auch im Zusammenhang mit Apoptoseprozessen ist dies der Fall. So belegte Yang eine proapoptotische Funktion, indem er eine erhöhte Apoptoserate im retinalen Pigmentepithel durch MCP-1 aktivierte Monozyten nachwies. Im Widerspruch zu Yangs Studie steht das Ergebnis von London *et al.* (2011), das einen positiven Effekt von Monozyten auf das Zellüberleben von retinalen Epithelzellen zeigt.

4.3.4 Einfluss der Apoptose von Linsenepithelzellen auf die Synthese von Substanz P und MCP-1

Der Zelluntergang und die Zellschädigung führt ab einem gewissen Maß zur Reduktion der Zytokinsynthese in Epithelzellen.

Entsprechend war für die Synthese des Substanz P-Rezeptors in dieser Arbeit nach einer Latenzzeit von drei Tagen eine Auffälligkeit im ipsi- und kontralateralen, nicht bestrahlten Auge zu beobachten. Bei signifikantem Unterschied zwischen bestrahltem und nicht bestrahltem Auge lag beidseits eine, im Vergleich zur Latenzzeitgruppe von sieben Tagen, abgeschwächte NK1R-Synthese vor.

Das Ergebnis einer verringerten Zytokinsynthese nach UVB-Bestrahlung steht im Einklang mit den Ergebnissen von Hightower *et al.* (1994). In dieser Studie wurden die Epithelien von Hasenlinsen *in-vitro* UVB-Strahlung ausgesetzt. Durch Messung der Histi-din-C14-Level wurde eine 60-prozentige Reduktion der Proteinsynthese festgestellt. Die Verringerung der NK1R-Synthese kann mit der Schädigung von Linsenepithelzellen, wie sie nach drei Tagen mikroskopisch sichtbar war, erklärt werden, da ab einem gewissen Schädigungsgrad die Fähigkeit zur Proteinsynthese eingeschränkt wird. Auch die Verringerung der Zellzahl durch Apoptose führt zu einer erniedrigten Gesamt-Syntheserate. Konform mit diesem Erklärungsansatz erholt sich die NK1R-Synthese parallel zur morphologischen Linsenregeneration nach sieben Tagen.

Das Phänomen einer ebenfalls verringerten NK1R-Synthese im kontralateralen Auge kann möglicherweise in einer Mitreaktion des unbestrahlten Auges begründet sein, wenn- gleich hierfür keine morphologischen Korrelate gefunden wurden. Die Möglichkeit einer Mitreaktion des kontralateralen Auges wird unter Punkt 7.4.1 erörtert.

Für MCP-1 waren erhöhte Werte im bestrahlten Auge und unveränderte Werte für das unbestrahlte Auge zu beobachten. Das Niveau der Gesamt-Proteinsynthese war folglich nicht erniedrigt. Dies kann damit begründet werden, dass die durch MCP-1 rekrutierten Monozyten ebenfalls MCP-1 herstellen und sogar die Hauptsyntheseorte für MCP-1 sind. So wird möglicherweise eine verringerte MCP-1-Synthese im Linsenepithel durch die MCP-1 Synthese in eingewanderten Monozyten kompensiert.

4.4 Die Regeneration des Linsenepithels und ihre mögliche Beeinflussung durch Substanz P und MCP-1

Beim Vergleich der mikroskopischen Linsenbilder drei und sieben Tage nach UVB-Bestrahlung wird sichtbar, dass sich das geschädigte Epithel von außen in Richtung Zentrum erneuert. Dabei bildet sich zunächst ein äußerer Wall, der anschließend durch intaktes einreihiges Epithel ersetzt wird, so dass die Linse in diesem Bereich ihre Transparenz zurückerlangt.

Meyer *et al.* (2014) visualisierten in elektronenmikroskopischen Aufnahmen den Regenerationsprozess UVB-geschädigten Linsenepithels. In Übereinstimmung mit den Bildern dieser Arbeit zeigt sich dabei, dass die Epithelreparatur von außen in Richtung Zentrum der Linse stattfindet und zunächst mit der Ausbildung eines mehrreihigen Epithels verläuft. Die Bilder des Elektronenmikroskops machen zudem sichtbar, dass die Epithel-Proliferation, vom Äquator ausgehend, in retrograder Richtung zur sonstigen Richtung der Epitheldifferenzierung stattfindet. Meyer *et al.* (2014) und Yamada *et al.* (2001) berichten, dem Ergebnis dieser Arbeit entsprechend, dass die Reparatur von Epithelschäden durch Epithelzellproliferation nach UVB-Bestrahlung im 300nm Bereich bei Maus und Hase eine Woche beansprucht.

In dieser Arbeit wurde die Linsenmorphologie nach Bestrahlung mit fünffacher Schwellendosis mit der dreifachen Dosis im Vorversuch verglichen. Dabei offenbarte sich eine Dosisabhängigkeit der Reparaturmechanismen. Bei Linsen mit geringerer Bestrahlung ist die Reparatur nach drei Tagen bereits weiter vorangeschritten, was an der Verkleinerung der getrübten Fläche und der Verlagerung des äußeren Epithelwalls in Richtung Zentrum zu sehen ist. Auffällig ist zudem, dass der äußere Epithelwall sich bei geringerer Bestrahlung mehrreihig und dadurch wesentlich breiter darstellt. Diese Mehrreihigkeit gilt ebenfalls als Zeichen für den gerade ablaufenden Prozess der Gewebe-Regenerierung.

Während es für MCP-1 und MCP-1 abhängig eingewanderte Monozyten neben ihrer flexiblen pro- oder antiinflammatorischen Funktion keine Hinweise für eine Beteiligung an Regenerationsprozessen gibt, ist eine regenerative Wirkung von Substanz P durch zahlreiche Studien belegt. Es wurde eine verstärkende Wirkung auf Wund- und

Epithelheilungsprozesse durch Induktion einer vermehrten Synthese von Wachstumsfaktoren (Foldenauer *et al.*, 2012) sowie Förderung der Migration retinaler und cornealer Epithelzellen *in-vitro* und *in-vivo* am Tiermodell belegt (Nakamura *et al.*, 1999; Nishida *et al.*, 1996; Sloniecka *et al.*, 2016; Tran *et al.*, 2000). Bestätigt wurden diese Ergebnisse durch weitere Studien am Tiermodell, in denen durch topische Applikation von Substanz P eine signifikante Verbesserung der Wundheilung des Cornea-Epithels sowie Reduktion stromaler Cornea-Trübungen erreicht wurde (Brown *et al.*, 1997; Nakamura *et al.*, 2003; Nakamura *et al.*, 1997; Yang *et al.*, 2014). Auch speziell für Linsenepithelzellen konnte durch Inkubation mit Substanz P ein positiver Effekt auf Zellwachstum und -proliferation festgestellt werden (Reid *et al.*, 1993).

Als Schlussfolgerung kann ein Zusammenhang hergestellt werden zwischen der in dieser Arbeit beobachteten epithelialen Regeneration nach UVB-Schädigung und dem nachgewiesenen Anstieg des Substanz P-Rezeptors NK1R. Die vorgestellte Literatur unterstützt die These, dass Substanz P nicht nur die UVB-bedingte Entzündungsreaktion im Linsenepithel fördert, sondern auch die Regeneration des Linsenepithels und die Wiederherstellung der Linsentransparenz unterstützt durch Regulierung der Zellmigration und -proliferation. Bisher ist nicht bekannt über welche Regulationsmechanismen die jeweilige Funktionsausprägung von Substanz P gesteuert wird. Es ist denkbar, dass Substanz P beide Funktionsausprägungen in zeitlicher Abfolge aufweist und so am Entzündungsprozess wie auch an der darauffolgenden Regeneration des Gewebes beteiligt ist.

4.5 Entzündung und Katarakt

4.5.1 Der Einfluss von UVB Strahlung auf die NK1R und MCP-1-Synthese im nicht bestrahlten kontralateralen Auge

Die NK1R- und MCP-1-Synthese des Linsenepithels wurde in dieser Arbeit, ebenso wie die Trübung der Linse, ausschließlich im bestrahlten Auge beobachtet. In Übereinstimmung damit war auch die Linsentrübung, quantifiziert als IOD, auf das bestrahlte Auge beschränkt und betraf nicht die kontralaterale Seite.

Es besteht jedoch die Möglichkeit, dass sich die UVB-Bestrahlung eines Auges auf das kontralaterale nicht bestrahlte Auge auswirkt und hier ebenfalls eine Linsentrübung

hervorrufen, wie frühere Arbeiten von Meyer *et al.* (2013) und Meyer *et al.* (2008) zeigten. Diese Mit-Reaktion war gekennzeichnet durch beidseitige inflammatorische Zeichen wie posteriore Synechien und Neovaskularisationen, die bei Mäusen mit einseitiger Katarakt Ausprägung nicht zu beobachten waren. In der Zusammenschau wird die Frage aufgeworfen, wie die beobachteten Entzündungszeichen im Zusammenhang mit der Linsentrübung stehen und über welche Wege die Übertragung auf das kontralaterale Auge stattgefunden hat.

Zentrales Molekül bei der Übertragung von Entzündungsreaktionen vom mit UVB oder anderen Mitteln gereizten Auge zum kontralateralen unbehandelten Auge scheint Substanz P zu sein. So fanden Lucas *et al.* (2012) diesen Effekt nach einseitiger Laser-Verbrennung der Retina und Paunicka *et al.* (2015) nach einseitiger Verletzung cornealer Nervenfasern. In beiden Studien wurde übereinstimmend festgestellt, dass die Übertragung der Entzündungsreaktion an den Verlust der Immuntoleranz gegenüber okulären Antigenen gebunden ist. Auch Ferguson *et al.* (1995) belegten konform zu diesen Ergebnissen, dass die neurogen stimulierte Freisetzung von Substanz P in das Kammerwasser zur Aufhebung des Immunprivilegs führt.

Sowohl in den Untersuchungen von Lucas als auch in denen von Paunicka konnte das Immunprivileg aufrechterhalten werden, indem der NK-1-Rezeptor durch Injektion eines Antagonisten ausgeschaltet wurde oder indem Substanz P Knock-out Mäuse verwendet wurden. Als Konsequenz wurde hier kein kontralateraler Effekt beobachtet (Lucas *et al.*, 2012; Paunicka *et al.*, 2015).

Es lässt sich schlussfolgern, dass die Übertragung von Entzündungsprozessen vom einen zum anderen Auge mit dem Substanz P-bedingten Verlust des Immunprivilegs assoziiert ist. Somit ist die Möglichkeit gegeben, dass auch die Übertragung der Linsentrübung auf das kontralaterale Auge nur bei Aufhebung des Immunprivilegs durch Substanz P stattfinden kann. Bestätigt wird diese These durch eine Studie von Gross (2020) am Mausmodell. Durch Antagonisierung des NK-1-Rezeptors im exponierten Auge wurde die NK1R Expression sowohl im UVB-exponierten als auch nicht exponierten Auge signifikant gesenkt.

Auch für MCP-1 fanden Zhu *et al.* (2015) einen Hinweis auf die bilaterale Synthese nach einseitiger Reizung. Sie zeigten, dass MCP-1 nach Katarakt-Operation im Kammerwasser des kontralateralen, nicht-operierten Auges signifikant erhöht ist. Da, wie in der Einführung beschrieben, Substanz P auch die Synthese von MCP-1 induziert, könnte auch diese Beobachtung durch Substanz P begründet sein. MCP-1 unterscheidet sich in seiner ursprünglichen Wirkung auf das okuläre Immunprivileg grundlegend von Substanz P. Während Substanz P als pro-inflammatorischer Gegenspieler wirkt, ist MCP-1, wie oben erläutert, selbst an der Aufrechterhaltung des Immunprivilegs beteiligt. Da den oben genannten Studien zufolge, die Übertragung von Entzündungsprozessen von einem zum anderen Auge an die Aufhebung des Immunprivilegs gekoppelt ist, scheint MCP-1 folglich keine Funktion als Überträgermolekül auszuüben.

Es bleibt die Frage, unter welchen Umständen UVB-bedingte kontralaterale Entzündungs- und Trübungsreaktionen ausgelöst werden. Naheliegender scheint das Kriterium der UVB-Bestrahlungsdosis und die Frage, ob diese die Substanz P-Freisetzung ins Kammerwasser für eine Aufhebung des Immunprivilegs ausreichend stimuliert. In den Versuchen von Meyer *et al.* (2013) und Meyer *et al.* (2008) wurde eine maximale Bestrahlungsintensität der 4-fachen UVB-Schwellendosis gewählt und damit eine geringere als in dieser Arbeit.

Des Weiteren ist davon auszugehen, dass neben der exogenen Bestrahlung auch Maus-eigene Abwehr- und Kompensationsmechanismen den Übertragungseffekt beeinflussen und individuelle Unterschiede in der Effizienz dieser Mechanismen bestehen. Dies legen die Ergebnisse von Meyers Versuchen nahe, laut denen nicht alle bestrahlten Mäuse kontralaterale Trübungen und Entzündungszeichen entwickelten, jedoch der Anteil mit steigender Bestrahlungsdosis zunahm.

Die zumeist bilaterale Ausprägung der Katarakt verdeutlicht den Stellenwert neuer Forschungsarbeiten zur Möglichkeit einer zytokinvermittelten Übertragung der Katarakt vom einen zum anderen Auge. Wünschenswert sind an dieser Stelle weitere Arbeiten zur Klärung des Zusammenhangs zwischen der UVB-induzierten Kataraktogenese und Entzündungszeichen im kontralateralen unbestrahlten Auge, insbesondere unter Berücksichtigung von Substanz P als möglicher Auslöser und Regulator der Entzündungsprozesse. Wie die oben vorgestellten Studien zeigen, sollte bei der Erforschung

dieser Inhalte zukünftig der Substanz P Signalweg im Detail untersucht werden als möglicher Ansatzpunkt für eine Katarakt-Prävention und -Therapie (Gross *et al.*, 2020). Es wäre weiterhin eine logische Fortführung dieser Arbeit, zu analysieren, ob die entzündungsbegleitende Übertragung der Katarakt zum kontralateralen Auge mit einer veränderten Synthese weiterer Zytokine des Substanz P-Signalweges im Linsenepithel zusammenhängt.

4.5.2 Belege für eine Zytokin-regulierte inflammatorische Komponente bei der Kataraktogenese

Frühere Studien stützen unsere These einer Zytokin-regulierten inflammatorischen Komponente bei der Kataraktogenese. Liu *et al.* (1994) und Mansfield *et al.* (2004) untersuchten die Wirkung verschiedener Entzündungsfaktoren auf Linsenepithelzellen und identifizierten dabei TGF- β als wichtiges Molekül. Es konnte anhand von kultivierten Gewebeexplantaten zunächst für die Ratte und später auch an Linsenepithelzellen von Maus, Hase und Mensch mikroskopisch gezeigt werden, dass dieser Wachstumsfaktor kataraktogene Veränderungen in Linsenepithelzellen hervorrufen kann, die denen der subkapsulären Katarakt ähneln (West-Mays *et al.*, 2010).

Hinweise darauf, dass die UVB-induzierte Kataraktogenese in Zusammenhang mit Zytokinveränderungen steht, wurden bereits von Meyer *et al.* (2013) gefunden. Im Serum von Mäusen mit UVB-induzierter Linsentrübung wurden signifikant erhöhte Interleukin-1 β Werte ermittelt sowie ein ähnlicher Trend für Interleukin-6. Übereinstimmend damit zeigten Klein *et al.* (2006) durch Untersuchung menschlicher Seren, dass die Höhe von Interleukin-6 mit der Prävalenz der nuklearen Katarakt assoziiert war. Es ist zu vermuten, dass es auch im Linsenepithel zur Erhöhung der Interleukin-6 Synthese in Assoziation mit der UVB-induzierten Katarakt kommt. Dafür spricht, dass die hier nachgewiesene Substanz P in der Lage ist, die Interleukin-6-Synthese in Zellen zu induzieren (Mashaghi *et al.*, 2016). Nishi (1996) erbrachte zudem den Nachweis für die Fähigkeit der Linsenepithelzellen, Interleukin-1 β und Interleukin-6 zu exprimieren.

Weitere Argumente für einen inflammatorischen Einfluss der Katarakt-Pathogenese liefern Erkrankungen, die mit Zytokinveränderungen im Auge einhergehen und zur Katarakt führen. Dazu gehören die Erkrankungen Morbus Behcet und Vogt-Koyanagi-Harada

(VKH), die mit einer Erhöhung zahlreicher Zytokine im Auge assoziiert sind und Katarakte verursachen (Sugita *et al.*, 2012). Auffälligerweise spielt auch hier Interleukin-6 eine bedeutende Rolle als signifikanter Marker für die Entzündungsausprägung in den kataraktogenen Augen (Chen *et al.*, 2014).

Auch kongenitale Katarakte gehen oftmals mit okulären Entzündungsreaktionen einher. Nachgewiesen wurden dabei zudem erhöhte Spiegel von Interleukin-6, Interleukin-1 β und MCP-1 im Kammerwasser der Neugeborenen mit kongenitaler Katarakt im Vergleich zum Kammerwasser von Patienten mit seniler Katarakt (Sauer *et al.*, 2016). Ein Zusammenhang des stark proinflammatorischen Augenmilieus mit der Ausprägung der kongenitalen Katarakt wird angenommen (Sauer *et al.*, 2016). Offen bleibt, ob die Zytokinwerte im Kammerwasser bei seniler Katarakt im Vergleich zum Kammerwasser gesunder Augen ebenfalls erhöht sind, wenngleich weniger ausgeprägt als bei der kongenitalen Katarakt. Die Ergebnisse dieser Arbeit unterstützen diese These sowie die Relevanz, dies zukünftig zu überprüfen. Auch die Tatsache, dass dieselben Zytokine in den hier genannten Studien wiederholt von Bedeutung sind, unterstreicht die Notwendigkeit, dies im Rahmen zukünftiger Forschungsarbeiten zur Zytokin-Beteiligung zu untersuchen.

Ergänzend zu den genannten Studien zum Zusammenhang eines proinflammatorischen Zytokinmilieus und der Kataraktogenese, konnte auch eine gesteigerte Immunzellinfiltration bei UVB-induzierten Linsentrübungen beobachtet werden. Dabei wurde die Infiltration von F4/80-Monozyten/Makrophagen und polymorphonuklearen Leukozyten (PMN) in der Vorderkammer nachgewiesen, wobei bei steigender UVB-Bestrahlungsdosis (einfache bis vierfache UVB-Schwellendosis) ein ebenfalls steigender Anteil an Mäusen mit Immunzell-Infiltration zu beobachten war (Meyer *et al.*, 2013). Die Fähigkeit von Substanz P und MCP-1 Leukozyten zu rekrutieren sowie unser Nachweis der UVB-induzierten und Katarakt begleitenden Hochregulierung von Substanz P und MCP-1 legen nahe, dass die beobachtete Immunzell-Infiltration auch auf diese Zytokine zurückzuführen sein könnte.

Im Gegensatz dazu konnten Wang *et al.* (2015) bei Untersuchung des Kammerwassers und der gesamten Linsen von Patienten mit seniler nuklearer Katarakt keinen Anstieg an Leukozyten bei steigender Härte des Linsenkerns (als Maß für die Katarakt Ausprägung) feststellen. Wangs Forschungsgruppe sowie Chen *et al.* (2014) sehen keinen

Zusammenhang zwischen den Entstehungsmechanismen inflammatorisch bedingter Katarakte und oxidationsbedingter, seniler Katarakte. Allerdings vertreten sie diese These ohne die Unabhängigkeit der beiden Pathomechanismen voneinander zu überprüfen und zu belegen. Die Auffassung eines getrennten Pathomechanismus von inflammatorischer und oxidationsbedingter, seniler Katarakt ist nicht mehr haltbar. Dafür spricht die oben erläuterte Literatur, die inflammatorische Reaktionen im Rahmen UVB-induzierter Katarakte belegt, da gleichzeitig bekannt ist, dass die senile Katarakt maßgeblich durch UVB-Strahlung hervorgerufen wird.

Des Weiteren spricht die Analyse möglicher Katarakt-Pathomechanismen, wie sie im folgenden Abschnitt vorgenommen wird, deutlich dafür, dass Entzündungs- und Oxidationsprozesse in gegenseitiger Wechselwirkung ablaufen und folglich Zusammenhänge zwischen den unterschiedlichen Entstehungsmechanismen der Katarakt bestehen (Hamacher *et al.*, 2017).

4.5.3 Mögliche Pathomechanismen der inflammatorischen Kataraktogenese und ihr Zusammenhang mit Substanz P und MCP-1

Die UVB-induzierte Schädigung des Linsenepithels führt zur Ausbildung einer subkapsulären Katarakt, wie sie mikroskopisch in dieser Arbeit dargestellt und beschrieben wurde. UVB-Strahlung ist in der Lage, Einfluss zu nehmen auf die Genexpression in okulären Zellen. Auch im Linsenepithel wird die Expression und folglich die Synthese von Substanz P und möglicherweise auch von MCP-1 hochreguliert. Wie oben beschrieben, gibt es Hinweise auf einen Zusammenhang zwischen Substanz P-bedingter Aufhebung des Immunprivilegs und der Übertragung einer Linsentrübung zum kontralateralen Auge. Erkenntnisse zum Immunprivileg und ACAID-Phänomen zeigen jedoch auch, dass Zytokine und Immunzellen ebenfalls unter Gültigkeit des Immunprivilegs aktiv sind, so dass ihre Beeinflussung der Kataraktogenese auch ohne prominente Entzündungsreaktion im Auge zu vermuten ist.

An dieser Stelle sollen mögliche Pathomechanismen der inflammatorisch bedingten Kataraktogenese aufgezeigt werden. Es ist noch nicht ausreichend erforscht, über welche Mechanismen Zytokine Einfluss auf Linsenepithelzellen nehmen, denkbar ist jedoch

durch die Beeinflussung der Barrierefunktion, des oxidativen Gleichgewichts und der Genexpression des Linsenepithels.

Für Epithelien anderer Organe ist bereits belegt, dass Zytokine wie TGF- β , Interleukin 4, Interleukin 13 und TNF- α in der Lage sind, die Permeabilität von Epithelien zu erhöhen und epithelverbindende Tight Junctions durchlässiger zu machen (Hamacher *et al.*, 2017). In Bezug auf die Linse könnte dieser Zytokineinfluss Transportprozesse und damit die Flüssigkeits- und Nährstoff- Homöostase der Linsenepithelzellen stören.

Die Literatur legt nahe, dass inflammatorische Zytokine hauptsächlich über Verstärkung und Wechselwirkung mit den bekannten Katarakt-Pathomechanismen der verstärkten Oxidation und veränderten Genexpression wirken. So ist für die Pathogenese verschiedener kardiovaskulärer und onkologischer Erkrankungen bekannt, dass Inflammation und oxidativer Stress sich gegenseitig beeinflussen (Aukrust *et al.*, 1998; Reuter *et al.*, 2010; Yang *et al.*, 2017). Dabei bilden sie einen Teufelskreis der gegenseitigen Verstärkung, da Immunzellen in der Lage sind, die Synthese von Sauerstoffradikalen in umliegenden Zellen zu erhöhen und erhöhte ROS-Werte die Genexpression für Zytokine steigern können. Die verstärkte Zytokin-Bildung regt dann in der Folge die Einwanderung weiterer Immunzellen an (Lozhkin *et al.*, 2017). Insbesondere auch für die artherosklerotische Wirkung von MCP-1 und durch MCP-1 angelockte Monozyten/Makrophagen ist diese Wechselwirkung mit Sauerstoffradikalen (ROS) bekannt (Cochain und Zernecke, 2017; Satriano *et al.*, 1993). Die beschriebenen Interaktionen zwischen MCP-1 und ROS sind ein möglicher Erklärungsansatz dafür, dass mit zunehmendem Alter beide Werte parallel im Kammerwasser ansteigen (Gao *et al.*, 2016; Huang *et al.*, 2014; Kawai *et al.*, 2012; Kokubun *et al.*, 2017). Wie in der theoretischen Einführung erläutert, führen ROS durch Oxidation von Proteinen zur Ausbildung von Aggregaten, die zur Linsentrübung führen können. Bei Anlagerung dieser Aggregate an die Membran der Linsenepithelzelle, tragen ROS zusätzlich zur Kataraktogenese bei durch Störung des Stofftransports und der Energiegewinnung sowie durch verstärkte Pigmentbildung (Davies und Truscott, 2001; Truscott, 2005). In der Konsequenz führt die anzunehmende entzündungsbedingte Verstärkung der ROS-Synthese auch zur Verstärkung dieser Katarakt-Mechanismen.

Substanz P ist durch eine sehr starke proinflammatorische Wirkung und die Fähigkeit, das Immunprivileg aufzuheben, gekennzeichnet. So könnte durch UVB-Strahlung freigesetzte Substanz P indirekt über die Induktion von Zytokinen und Chemokinen wie MCP-1 auf die ROS-Synthese und das Einwandern von Immunzellen wirken.

Des Weiteren ist Substanz P in der Lage, die Genexpression von Epithelzellen zu beeinflussen (Heck *et al.*, 2004). Die Beeinflussung der Genexpression des Linsenepithels durch Zytokine wurde bisher nicht untersucht. Niwa (1994) stellte jedoch fest, dass die mit atopischer Dermatitis assoziierte inflammatorische Kataraktogenese mit einer geringeren Induzierbarkeit der Superoxiddismutase einhergeht. Bekannt ist, dass die Expression von Schutzenzymen eine große Rolle für das oxidative Gleichgewicht und damit für die Kataraktogenese spielt. Die Bedeutung von Genen für Enzyme der DNA-Reparatur in UV-geschädigten Linsenzellen wurde sehr gut belegt durch Analyse des Genoms von Kataraktpatienten und durch Experimente an Knockout-Mäusen. Treten in diesen Genabschnitten Mutationen auf, besteht ein erhöhtes Kataraktrisiko, da sich der kataraktogene Einfluss von UV-Strahlung ungehindert auswirkt (Hamada und Fujimichi, 2015).

Ein Zusammenspiel verschiedener kataraktogen wirkender Beeinflussungen der Genexpression in Linsenepithelzellen ist denkbar, wie das Zusammenspiel zwischen altersbedingten Degenerationsprozessen, oxidativem Stress und Entzündungsfaktoren. Mit steigendem Alter lässt die Synthese von Gluthation und antioxidativen Enzymen nach und auch oxidativer Stress wirkt sich auf die Expression von über 1000 Genen, darunter auch solche für die oxidative Abwehr, aus (Hejtmancik und Kantorow, 2004). Zukünftig wären weitere aufschlussreiche Forschungsarbeiten zum Einfluss von Zytokinen auf die Genexpression des Linsenepithels wünschenswert, um ihrer Bedeutung für die Kataraktogenese nachzugehen und die hier aufgestellten Thesen zu möglichen Pathomechanismen zu überprüfen und gegebenenfalls zu untermauern.

4.5.4 Ansatzpunkte einer möglichen Katarakt-Prävention und Katarakt-Therapie

Die Erforschung der Rolle von Zytokinen und Entzündungsprozessen bei der Kataraktogenese eröffnet die Möglichkeit neue Präventions- und Therapieansätze zu entwickeln. Die Erkenntnisse dieser Arbeit sollen hierbei einen Beitrag leisten. Es wurde bereits auf verschiedenen Wegen versucht, eine Katarakt-Therapie oder -Präventionsmaßnahme durch Stärkung der körpereigenen Oxidations-Abwehr zu etablieren. In zahlreichen klinischen Studien zur oralen Katarakt-Prävention mit Antioxidantien wurden widersprüchliche Ergebnisse erzielt (Chong und Wong, 2008; Chylack *et al.*, 2002; Kottler *et al.*, 2003; McCusker *et al.*, 2016; Schalch und Chylack, 2003). Es konnten positive Effekte für die Einnahme von Vitamin C, Vitamin E, Zink und β -Karotin festgestellt werden bezüglich der Auftretenshäufigkeit sowie des Voranschreitens der Kataraktausprägung (Christen *et al.*, 2014; Chylack *et al.*, 2002). Eine Effektivität wurde hierbei insbesondere bei früher Einnahme im Krankheitsverlauf, bei höherer Dosierung, bei längerer Einnahme über mindestens drei Jahre sowie bei Einnahme von Personen, die besonders großem oxidativem Stress ausgesetzt sind, wie zum Beispiel Rauchern, nachgewiesen (Chylack *et al.*, 2002; Fernandez und Afshari, 2008; Kottler *et al.*, 2003). Diese Ergebnisse früherer Studien zeigen, dass für Personen, die erhöhtem photooxidativem Stress durch UVB-Bestrahlung ausgesetzt sind, die langfristige orale Einnahme antioxidativer Vitamine gesondert geprüft werden sollte.

Trotz der teilweise positiven Ergebnisse konnte bisher keine konservative Therapie etabliert werden und der chirurgische Linsenaustausch bleibt nach wie vor die einzige Therapie-Option für die Kataraktbehandlung. Ein wesentliches Problem bei der Erforschung antioxidativer Präventions- und Therapiestrategien war bisher, dass die Effektivität der Therapie erst ab einer Dosis gegeben war, bei der ebenso vermehrt paradoxe Nebenwirkungen auftraten (Kottler *et al.*, 2003).

Die bereits gewonnenen Erkenntnisse zu einer multifaktoriellen Genese der Kataraktentstehung, die auch von dieser Arbeit gestützt werden, sprechen dafür, dass auch bei der Prävention und Therapie der Katarakt an mehreren Punkten parallel angesetzt werden sollte. Die Ergebnisse dieser Arbeit zur Rolle von Substanz P und MCP-1 im Rahmen der Kataraktogenese legen eine Ergänzung oder den Ersatz antioxidativer Strategien durch

antiinflammatorische Ansatzpunkte nahe. Eine Kombination beider Ansatzpunkte wäre eine denkbare Strategie, um das antikataraktogene Potenzial von Antioxidantien zu nutzen bei geringerer, nebenwirkungsfreier Dosierung der antioxidativen Vitamine.

Um den potenziellen Weg einer Blockade der Substanz P- oder MCP-1-Funktion zu erforschen, eignen sich zum einen Knock-Out Mäuse und zum anderen die Rezeptor-Blockade durch verschiedene im Tiermodell bereits erfolgreich erprobte Antagonisten.

4.5.4.1 Mögliche Katarakt-Prävention oder -Therapie durch NK1R-Antagonisierung

Das Ausschalten der Substanz P Funktion führt am Linsenepithel zu einer schnelleren Apoptose der Linsenepithelzellen und damit zu einem verkürzten und abgeschwächten Entzündungsprozess (Yang *et al.*, 2016; Zhou *et al.*, 2008). Zudem wird durch die Blockade des NK-1-Rezeptors der immunologische Crosstalk zwischen den Augen verhindert, so dass eine Übertragung oder gegenseitige Verstärkung einer veränderten Zytokinsynthese im okulären Gewebe entgegengewirkt werden kann (Gross *et al.*, 2020). Dagegen abgewogen werden muss der potenziell nachteilige Effekt einer Substanz P-Antagonisierung durch Verlust der Substanz P-Wirkung auf die Zellmigration und -proliferation, die zur Regeneration des Linsenepithels beiträgt.

Substanz P Knock-out Mäuse wurden bereits erfolgreich bei der Erforschung des okulären Immunprivilegs eingesetzt (Lucas *et al.*, 2012). Darüber hinaus wurde im Zusammenhang mit verschiedenen okulären Pathologien bisher der Einsatz von NK1R-Antagonisten bevorzugt. Auch für die Kataraktogenese und Zytokinexpression im Linsenepithel wurde die Substanz P-Wirkung bereits durch Antagonisten, jedoch noch nicht durch Gen-Knock-out erforscht.

Bei Verabreichung des Substanz P-Antagonisten Fosaprepitant konnte für das Linsenepithel nach UVB-Bestrahlung am Mausmodell eine signifikant reduzierte Expression von NK1R im UVB-exponierten und mit Fosaprepitant behandelten Auge im Vergleich zur unbehandelten UVB-bestrahlten Kontrollgruppe nachgewiesen werden (Gross *et al.*, 2020). Ebenso zeigte sich auch hier, dass durch den Substanz P-Rezeptor-Antagonisten die inflammatorische Mitreaktion des kontralateralen unbestrahlten Auges, wie sie in der

Literatur mehrfach beschrieben wurde, verhindert wird. Bemerkenswerterweise konnte an der CL57BL6 Maus für das Linseneptel nach UVB-Bestrahlung keine verminderte NK1R-Expression durch einen weiteren Substanz P-Antagonisten, Spantide I gezeigt werden, sondern im Gegenteil, eine paradoxe Hochregulierung (Gross *et al.*, 2020). Folglich scheint Spantide für die weitere Erforschung der NK1R-Antagonisierung zur Katarakt-Prävention oder Therapie nicht geeignet, obwohl für die Cornea und Retina eine verminderte Inflammation durch Spantide I und II beobachtet wurde (Hazlett *et al.*, 2007; Lucas *et al.*, 2012; Paunicka *et al.*, 2015; Twardy *et al.*, 2011).

Ein weiterer Faktor, der gegen die Verwendung von Spantide I oder II spricht, ist der bisher rein experimentelle Einsatz und die fehlende Erprobung in klinischen Studien.

Lanepitant ist ein weiterer Arzneistoff zur Blockade des NK-1-Rezeptors, der im Tiermodell bereits erfolgreich zur Therapie cornealer Neovaskularisierung angewandt wurde. In klinischen Studien am Menschen zeigte Lanepitant jedoch keine signifikante Wirkung (Bignami *et al.*, 2014).

Im Gegensatz zu Spantide und Lanepitant ist der Arzneistoff Aprepitant bzw. sein Prodrug Fosaprepitant klinisch erprobt und zugelassen zur Vorbeugung von Übelkeit und Erbrechen bei Chemotherapie sowie als Schmerzmittel (Tattersall *et al.*, 2000). Auch eine antiinflammatorische Wirkung von Fosaprepitant wurde in verschiedenen Studien bestätigt (Berger *et al.*, 2014; Bignami *et al.*, 2017). Es ist zudem nebenwirkungsarm und gut verträglich (Muñoz *et al.*, 2010). Durch die klinische Erprobung, die gute Verträglichkeit und die gute antiinflammatorische Wirkung ist Fosaprepitant geeignet für eine zukünftige Erprobung im Zusammenhang mit der Prävention oder Therapie der Katarakt.

4.5.4.2 Mögliche Katarakt-Prävention oder -Therapie durch MCP-1-Antagonisierung

Die Auswirkung einer MCP-1- oder MCP-1-Rezeptor-Blockade ist aufgrund der verschiedenen Funktionen von MCP-1 in Abhängigkeit vom umgebenden Zytokinmilieu schwer vorherzusehen.

Während zur Erforschung verschiedener Augenerkrankungen Substanz P-Rezeptor-Antagonisten gebräuchlich sind, wurden für MCP-1 bisher keine Studien zur Rezeptor-Blockade durch Antagonisten am Auge durchgeführt.

Jedoch wurden hier vermehrt Knock-Out Mäuse eingesetzt und auch eine weitere, dritte Möglichkeit der Intervention am MCP-1-Signalweg sowohl *in vitro* als auch *in vivo* erforscht. Dabei handelt es sich um die Dimerisierung von MCP-1 mit einer verabreichten genetisch veränderten MCP-1-Mutation (7ND) zur Abschwächung der chemotaktischen MCP-1-Wirkung (Kitamoto und Egashira, 2003; Zhang und Rollins, 1995).

Knock-Out Mäuse wurden bereits sowohl für MCP-1 selbst als auch für seinen Rezeptor CCR2 eingesetzt (Kurihara and others 1997). Für Erkrankungen des Auges wurden Experimente an der Knock-out Maus bisher bezüglich der altersbedingten Makuladegeneration und ischämischen Retinopathie durchgeführt (Ambati *et al.*, 2003; Davies *et al.*, 2006). Hierbei zeigte sich das Ausschalten des Gens für MCP-1 jedoch als Verstärker für die genannten Pathologien. Im Gegensatz dazu konnte die MCP-1-Rezeptor Blockade an der Knock-Out Maus für andere Erkrankungen wie der multiplen Sklerose jedoch auch zu positiven Effekten führen (Sorensen *et al.*, 2004).

Dieses Ergebnis unterstreicht die zahlreichen und konträren Funktionen des Entzündungsfaktors MCP-1, einschließlich seiner Bedeutung bei der Aufrechterhaltung und Wiederherstellung gesunden Augengewebes. Eine mögliche Therapie oder Prävention durch Reduktion der MCP-1-Wirkung wird hierdurch erschwert und zeigt, dass dieser Ansatz nur mit Vorsicht angewandt werden sollte. Essenzielles Kriterium, das den Einsatz einer MCP-1-Antagonisierung erst sinnvoll erscheinen lässt, ist ein detailliertes Wissen über die Einflussfaktoren auf die Funktionsausprägung von MCP-1. Bei der zukünftigen Erforschung einer möglichen Prävention oder Therapie der Katarakt sollten folglich auch mit MCP-1 zusammenspielende Entzündungsfaktoren identifiziert werden. Insbesondere TNF- α sollte dabei untersucht werden, da es bekannt ist als wichtiger Regulator von MCP-1 im Rahmen des Erhalts des Immunprivilegs des Auges (Cone und Pais, 2009).

Da die MCP-1-Synthese auch durch Substanz P initiiert wird, bleibt abzuwarten, ob in weiteren Forschungsarbeiten eine Blockade der Substanz P-Funktion bereits in

ausreichendem Umfang die MCP-1-Funktion einschränkt ohne die mögliche positive Funktionsausprägung von MCP-1 zu verhindern.

4.6 Abschließende Bewertung und Ausblick

In der Vergangenheit wurden die Entstehungsmechanismen der senilen Katarakt erforscht und der Fokus dabei besonders auf die ursächlichen Oxidationsprozesse sowie die körpereigenen antioxidativen Abwehrmechanismen gelegt. Trotz des inzwischen erlangten umfassenden Verständnisses dieser Mechanismen gelang es nicht, daraus eine konservative Katarakttherapie oder Präventionsmaßnahmen zu entwickeln.

Aufgrund der systemisch und lokal bestehenden Immuntoleranz gegenüber okulären Antigenen, bestand lange Zeit die Auffassung des Auges als Immunzell-freier und Immunreaktions-freier Raum. Entsprechend wurden auch die Pathomechanismen der Kataraktogenese unabhängig von immunologischen Prozessen erforscht. Mit der Etablierung des Konzepts des Immunprivilegs, später auch als ACAID Phänomen bezeichnet, entwickelte sich ein neues Verständnis immunologischer Verhältnisse im Auge. Im Mittelpunkt des neuen Konzepts standen Entzündungsfaktoren und Immunzellen im Auge, die die physiologische Immuntoleranz durch aktive Immunsuppression herstellen. Damit einhergehend wurde die Aufhebbarkeit der Immuntoleranz durch Veränderung in der Zusammensetzung dieser Entzündungsfaktoren entdeckt.

Das neu gewonnene Wissen erweiterte gängige Sichtweisen zu okulären Erkrankungen, zum Beispiel der altersbedingten Makuladegeneration (AMD). Im allgemein gültigen Konzept der Kataraktogenese blieben die Erkenntnisse zur weitreichenden Bedeutung von Entzündungsfaktoren bis heute jedoch unberücksichtigt, obwohl die inflammatorische Katarakt-Pathogenese im Rahmen entzündlicher Grunderkrankungen als wissenschaftlich gesichert gilt und sich die Hinweise eines inflammatorischen Einflusses auf die UVB-induzierte Kataraktogenese häufen. Es scheint überfällig, dass, nach langanhaltender Fokussierung auf Oxidationsprozesse und oxidative Abwehrmechanismen, der Blick geweitet wird für mögliche inflammatorische Einflussfaktoren auf diese Mechanismen. Das Verständnis kataraktogener Pathomechanismen sollte unter Berücksichtigung des

aktuellen immunologischen Wissens überprüft werden und dabei der Zusammenhang mit Entzündungsfaktoren untersucht werden.

Eine wichtige Erweiterung erfuhr die Kataraktforschung in den letzten Jahren. Zunehmend wurde die Bedeutung des Linsenepithels als Ursprungsort der Kataraktentwicklung herausgestellt. Die Ergebnisse dieser Arbeit sowie weitere Studien, die einen Zusammenhang zwischen lokalen und systemischen Entzündungsprozessen und der UVB-induzierten Kataraktogenese nahelegen, unterstreichen die Notwendigkeit, das Linsenepithel bezüglich seiner inflammatorischen Funktion zu untersuchen.

In dieser Arbeit konnte die UVB-abhängige Synthese von MCP-1 und NK1R im Linsenepithel *in-vivo* mittels ELISA nachgewiesen werden. Die NK1R-Synthese war nach drei Tagen im bestrahlten Auge im Vergleich zum nicht bestrahlten Auge signifikant erhöht. Dieses Ergebnis zeigt die Notwendigkeit auf, auch die Synthese des Linsenepithels von Entzündungsfaktoren in groß angelegten Immunassays zum Beispiel mit Hilfe von Multiplex-Tests wie dem MBAA (multiplex bead array assay) zu untersuchen. Dabei wäre aufgrund der vermuteten Molekül-Interaktionen auch die Zytokinlevel im Kammerwasser und angrenzenden okulären Geweben von Interesse. Eine wünschenswerte Erweiterung zur Fragestellung dieser Studie ist die Untersuchung langfristiger UVB-bedingter Zytokineffekte, da die Kataraktogenese ein chronischer Prozess ist und entsprechende Hinweise vorliegen, dass die Stimulation des Linsenepithels zu langfristigen Zytokinveränderungen führen kann. Der Vergleich pathologischer Linsen mit den Linsen gesunder Augen wurde in bisherigen Studien leider oft nicht durchgeführt, ist für zukünftige Studien jedoch unbedingt zu empfehlen, da sonst oft ungewiss bleibt, ob sich ein ermitteltes Resultat vom physiologischen Zustand unterscheidet. Neben der Syntheserate sollten zukünftig auch die Wirkmechanismen von Zytokinen untersucht werden unter Berücksichtigung zytokinmodulierender Moleküle und Zytokin-Interaktionen. Neben der Oxidations- und Entzündungsfördernden Funktion ist dabei auch ihre Fähigkeit zur Unterstützung von Schutzmechanismen und Regenerationsprozessen zu berücksichtigen. Ein vorstellbares Modell zur Untersuchung dieser Fragestellungen ist das Ausschalten bestimmter Zytokin-Gene an Substanz P und MCP-1 Knock-out Mäusen sowie die Anwendung von Antikörpern gegen Substanz P und MCP-1.

Die in dieser Arbeit verwendeten Methoden zur Katarakt-Quantifizierung sowie der Einsatz des Vilber Lourmat Bestrahlungsgerätes haben sich in dieser Arbeit bewährt und sind für weitere Forschungsarbeiten zur UVB-Strahlung an der C57BL/6-Maus zu empfehlen. Der Bezug zur UVB-Schwellenwert-Dosis schafft dabei Vergleichbarkeit zwischen den Ergebnissen zukünftiger und bisheriger Studien.

Diese Arbeit eröffnet neue Ansatzpunkte für eine mögliche Katarakttherapie oder -prävention. Sie liefert Argumente, die bisher erfolglosen Versuche zur Stärkung oxidativer Schutzmechanismen zu ergänzen oder zu ersetzen durch Therapieansätze zur Schwächung proinflammatorischer und damit prooxidativer Zytokine. Die Antagonisierung der Zytokine könnte dabei über die Blockade ihrer Rezeptoren oder die Schwächung ihrer Freisetzung stattfinden. Die Blockade des NK-1-Rezeptors und damit die Hemmung seiner proinflammatorischen Funktion wurde im Mausmodell bezüglich der UVB-induzierten Kataraktogenese erfolgreich angewandt. Die Übertragbarkeit auf Therapieansätze bleibt in klinischen Studien zu erforschen. Die Antagonisierung des CCR2 Rezeptors wurde bereits in klinischen Studien zu verschiedenen Erkrankungen getestet. Dabei wurde deutlich, dass die Vielseitigkeit der MCP-1 Wirkung, wie sie in dieser Arbeit beschrieben wurde, eine große Herausforderung darstellt. Die möglichen positiven Effekte einer MCP-1-Antagonisierung in Bezug auf die Abschwächung der inflammatorischen Komponente bei der Katarakt-Pathogenese muss den möglichen Risiken aufgrund der Gesundheitserhaltenden Immunregulierung durch MCP-1 gegenübergestellt werden. Eine sorgfältige Abwägung ist hierbei erforderlich (Deshmane *et al.*, 2009; Kalinowska und Losy, 2008).

5 Zusammenfassung

Weltweit gilt die Katarakt als häufigste Erblindungsursache und in den westlichen Ländern ist die Katarakt-Operation der am häufigsten durchgeführte operative Eingriff. Die weitreichenden Folgen auf gesellschaftlicher und ökonomischer Ebene sowie für den Betroffenen, führten dazu, dass in den letzten Jahren zahlreiche Forschungsarbeiten zur Ergründung der Pathomechanismen dieser Erkrankung durchgeführt wurden. Ein umfassendes Verständnis für die Prozesse der Proteinoxidation und -Aggregation sowie für die große Bedeutung des Linsenepithels wurden erlangt, jedoch konnte daraus bis heute keine erfolgreiche Katarakt-Therapie oder -Prävention entwickelt werden.

In der Konsequenz müssen auch mögliche Pathomechanismen der Kataraktogenese, die über die bisher bekannten hinausgehen, untersucht werden. Zahlreiche Hinweise deuten auf eine Beteiligung von Entzündungsfaktoren an der Kataraktogenese. Hier setzt die vorliegende Arbeit an, die den Einfluss des größten Umweltfaktors, der UVB-Strahlung, auf eine mögliche inflammatorische Katarakt-Pathogenese nachgeht.

Im *in-vivo* Experiment an der Maus wurde dabei erstmalig die Wirkung einseitiger okulärer UVB-Bestrahlung im 300nm-Bereich ($14,5 \text{ kJ/ m}^2$) auf die Synthese von Entzündungsfaktoren im Linsenepithel untersucht. Alle bestrahlten Mäuse entwickelten eine Katarakt im entsprechenden Auge. Die Erstellung mikroskopischer Fotoaufnahmen zeigte dabei eine großflächige Trübung des anterioren Linsenepithels drei Tage nach Bestrahlung, die sich bis nach sieben Tagen durch Regenerationsprozesse deutlich verkleinerte. Das Ergebnis der computergestützten Quantifizierung der Linsentrübungen zeigte, entsprechend dem morphologischen Bild, eine stark erhöhte Pixelintensität im bestrahlten Auge nach drei Tagen, die ebenfalls bis nach sieben Tagen rückläufig war.

Mittels ELISA-Tests wurde das Linsenepithel der bestrahlten Mäuse sowie der Kontrolle auf die Expression des Chemokins MCP-1 sowie des Substanz P-Rezeptors NK1R hin untersucht. Die MCP-1-Synthese war sowohl nach drei als auch nach sieben Tagen im bestrahlten Auge leicht erhöht, es konnte dabei jedoch keine Signifikanz festgestellt werden. Für die NK1R-Synthese wurde ein signifikanter Unterschied zwischen bestrahltem und nicht bestrahltem Auge nach drei Tagen festgestellt.

Das Ergebnis einer UVB-bedingt erhöhten Expression von Entzündungsfaktoren und ihrem Rezeptor im Linsenepithel stellt eine mögliche Beteiligung inflammatorischer Zytokine an der Kataraktogenese in den Raum. Zukünftig sollte untersucht werden, ob antiinflammatorische Ansätze oder Ansätze zur Verstärkung der regenerativen Funktion von Zytokinen der Katarakt-Entwicklung entgegenwirken. Diese Arbeit liefert wichtige Hinweise darauf, dass die Zytokine MCP-1 und Substanz P bei der Entwicklung einer möglichen Katarakttherapie und -prophylaxe Beachtung finden sollten.

6 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Anatomischer Überblick des Auges.....	13
Abbildung 2:	Frontalschnitt der Linse	15
Abbildung 3:	Induktion des Immunprivilegs durch Entzündungsfaktoren.	17
Abbildung 4:	Die Wirkung von Substanz P am Neurokinin-1 Rezeptor im okulären Gewebe	23
Abbildung 5:	Fluoreszierender Neurokinin-1-Rezeptor im anterioren Linsenepithel und Linsenbogen	24
Abbildung 6:	Wechselwirkungen zwischen Substanz P und MCP 1.....	25
Abbildung 7:	Die Wirkung von Monocyte chemoattractant Protein-1 im okulären Gewebe	27
Abbildung 8:	Diffuse Lichtstreuung durch Linsentrübungen	29
Abbildung 9:	Absorption ultravioletter Strahlung von den Geweben des Auges.....	33
Abbildung 10:	Struktur UVB-geschädigter Linsenepithel- und Linsenfaserzellen im Raster-Elektronenmikroskop	35
Abbildung 11:	Entstehung von reaktiven Sauerstoffspezies durch Aufnahme von Elektronen	36
Abbildung 12:	Bildung einer Disulfitbindung	37
Abbildung 13:	Bio-Spectra-Gerät der Firma Vilber Lourmat	43
Abbildung 14:	Spektralkurve der UVB-Röhren des Bio-Spectra-Geräts.....	44
Abbildung 15:	Das Prinzip des Versuchsaufbaus.....	46
Abbildung 16:	Bestrahlungsübersicht des Bio-Spectra-Systems.....	47
Abbildung 17:	Wirkprinzip des Sandwich-ELISAs	50
Abbildung 18:	Herstellung der Standardreihe	51
Abbildung 19:	Vorversuch zur Untersuchung der NK1R, MCP-1 und Substanz P-Expression im Linsenepithel im ELISA-Test drei Tage nach Bestrahlung mit der dreifachen MTD	57
Abbildung 20:	Linsenmorphologie der unbestrahlten Kontrollgruppe	58
Abbildung 21:	Linsenmorphologie drei Tage nach UVB-Bestrahlung mit fünffacher MTD.....	59
Abbildung 22:	Linsenmorphologie sieben Tage nach UVB-Bestrahlung mit fünffacher MTD.....	59
Abbildung 23:	Vergleich der Linsenmorphologie nach Bestrahlung mit drei- und fünffacher UVB-Schwellendosis	60
Abbildung 24:	Quantifizierung und Vergleich der Linsentrübung anhand der Pixelintensität durch Messung der integrierten optischen Dichte	61

Abbildung 25: Mittelwertunterschied der optischen Dichte und dessen 95% Konfidenz-intervall zwischen exponiertem Auge und nicht exponiertem Auge drei und sieben Tage nach Bestrahlung	62
Abbildung 26: MCP-1-Level im Linsenepithel der Kontrollgruppe und der Latenzzeit- gruppen von drei Tagen und sieben Tagen	64
Abbildung 27: MCP-1-Mittelwertunterschied und dessen 95% Konfidenzintervall zwischen exponiertem und nicht exponiertem Auge drei und sieben Tage nach Bestrahlung	65
Abbildung 28: NK1R-Level im Linsenepithel der Kontrollgruppe und der Latenzzeitgruppen von drei Tagen und sieben Tagen.....	66
Abbildung 29: NK1R-Mittelwertunterschied und desssen 95% Konfidenzintervall zwischen exponiertem und nicht exponiertem Auge drei und sieben Tage nach Bestrahlung	67

7 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Verwendete Geräte	41
Tabelle 2:	Chemikalien und Arzneistoffe	41
Tabelle 3:	MCP-1 ELISA-Kit.....	42
Tabelle 4:	NK1R ELISA-Kit	42

8 Literaturverzeichnis

- Ambati, J, Anand, A, Fernandez, S, Sakurai, E, Lynn, BC, Kuziel, WA, Rollins, BJ, Ambati, BK. (2003). An animal model of age-related macular degeneration in senescent Ccl-2- or Ccr-2-deficient mice. *Nat Med*, 9(11), 1390-1397.
- Arnarsson, A, Jonasson, F, Sasaki, H, Ono, M, Jonsson, V, Kojima, M, Katoh, N, Sasaki, K. (2002). Risk factors for nuclear lens opacification: the Reykjavik Eye Study. *Dev Ophthalmol*, 35, 12-20.
- Aucamp, PJ, Bjorn, LO, Lucas, R. (2011). Questions and answers about the environmental effects of ozone depletion and its interactions with climate change: 2010 assessment. *Photochem Photobiol Sci*, 10(2), 301-316.
- Aukrust, P, Ueland, T, Muller, F, Andreassen, AK, Nordoy, I, Aas, H, Kjekshus, J, Simonsen, S, Froland, SS, Gullestad, L. (1998). Elevated circulating levels of C-C chemokines in patients with congestive heart failure. *Circulation*, 97(12), 1136-1143.
- Aumüller, G. (2007). *Anatomie*. Stuttgart: Thieme.
- Axenfeld, T, Pau, H. (1992). *Lehrbuch der Augenheilkunde* (Vol. 13. Aufl.). Stuttgart, Jena, New York: Gustav Fischer.
- Bachem, A. (1956). Ophthalmic ultraviolet action spectra. *Am J Ophthalmol*, 41(6), 969-975.
- Backman, LJ, Danielson, P. (2013). Akt-mediated anti-apoptotic effects of substance P in Anti-Fas-induced apoptosis of human tenocytes. *J Cell Mol Med*, 17(6), 723-733.
- Bae, JM, Jung, HM, Hong, BY, Lee, JH, Choi, WJ, Lee, JH, Kim, GM. (2017). Phototherapy for Vitiligo: A Systematic Review and Meta-analysis. *JAMA Dermatol*, 153(7), 666-674.
- Baek, SM, Yu, SY, Son, Y, Hong, HS. (2016). Substance P promotes the recovery of oxidative stress-damaged retinal pigmented epithelial cells by modulating Akt/GSK-3beta signaling. *Mol Vis*, 22, 1015-1023.
- Benhar, I, Reemst, K, Kalchenko, V, Schwartz, M. (2016). The retinal pigment epithelium as a gateway for monocyte trafficking into the eye. *Embo j*, 35(11), 1219-1235.
- Berger, M, Neth, O, Ilmer, M, Garnier, A, Salinas-Martín, MV, de Agustín Asencio, JC, von Schweinitz, D, Kappler, R, Muñoz, M. (2014). Hepatoblastoma cells express truncated neurokinin-1 receptor and can be growth inhibited by aprepitant in vitro and in vivo. *J Hepatol*, 60(5), 985-994.
- Bignami, F, Giacomini, C, Lorusso, A, Aramini, A, Rama, P, Ferrari, G. (2014). NK1 receptor antagonists as a new treatment for corneal neovascularization. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 55(10), 6783-6794.
- Bignami, F, Lorusso, A, Rama, P, Ferrari, G. (2017). Growth inhibition of formed corneal neovascularization following Fosaprepitant treatment. *Acta Ophthalmol*, 95(7), e641-e648.
- Bignami, F, Rama, P, Ferrari, G. (2016). Substance P and its Inhibition in Ocular Inflammation. *Curr Drug Targets*, 17(11), 1265-1274.
- Bill, A, Stjernschantz, J, Mandahl, A, Brodin, E, Nilsson, G. (1979). Substance P: release on trigeminal nerve stimulation, effects in the eye. *Acta Physiol Scand*, 106(3), 371-373.
- Boring, L, Gosling, J, Chensue, SW, Kunkel, SL, Farese, RV, Jr., Broxmeyer, HE, Charo, IF. (1997). Impaired monocyte migration and reduced type 1 (Th1)

- cytokine responses in C-C chemokine receptor 2 knockout mice. *J Clin Invest*, 100(10), 2552-2561.
- Brecha, NC, Sternini, C, Anderson, K, Krause, JE. (1989). Expression and cellular localization of substance P/neurokinin A and neurokinin B mRNAs in the rat retina. *Vis Neurosci*, 3(6), 527-535.
- Brix, J, Brose, M, Fartasch, M, Ott, G, Reichrath, J, Reidenbach, H, Horak, W, Jossen, H, Emmerich, K, Knuschke, P. (2012). Leitfaden Sonnenstrahlung, abgerufen unter https://www.fs-ev.org/fileadmin/user_upload/04_Arbeitsgruppen/08_Nichtionisierende_Strahlung/02_Dokument_e/Leitfaeden/Leitfaden-Sonnenstrahlung_AKNIR-29112012.pdf, 15.11.2017.
- Brown, SM, Lamberts, DW, Reid, TW, Nishida, T, Murphy, CJ. (1997). Neurotrophic and anhidrotic keratopathy treated with substance P and insulinlike growth factor 1. *Arch Ophthalmol*, 115(7), 926-927.
- Brunsting, LA, Reed, WB, Bair, HL. (1957). Additional report on the occurrence of cataracts with atopic dermatitis. *AMA Arch Derm*, 76(6), 779.
- Calderone, L, Grimes, P, Shalev, M. (1986). Acute reversible cataract induced by xylazine and by ketamine-xylazine anesthesia in rats and mice. *Exp Eye Res*, 42(4), 331-337.
- Campbell, C. (1999). Observations on the optical effects of a cataract. *J Cataract Refract Surg*, 25(7), 995-1003.
- Campbell, M, Humphries, P. (2012). The blood-retina barrier: tight junctions and barrier modulation. *Adv Exp Med Biol*, 763, 70-84.
- Casini, G, Sabatini, A, Catalani, E, Willems, D, Bosco, L, Brecha, NC. (2002). Expression of the neurokinin 1 receptor in the rabbit retina. *Neuroscience*, 115(4), 1309-1321.
- Castellani, ML, Vecchiet, J, Salini, V, Conti, P, Theoharides, TC, Caraffa, A, Antinolfi, P, Tete, S, Ciampoli, C, Cuccurullo, C, Cerulli, G, Felaco, M, Boscolo, P. (2009). Stimulation of CCL2 (MCP-1) and CCL2 mRNA by substance P in LAD2 human mast cells. *Transl Res*, 154(1), 27-33.
- Catalani, E, Dal Monte, M, Gangitano, C, Lucattelli, M, Fineschi, S, Bosco, L, Bagnoli, P, Casini, G. (2006). Expression of substance P, neurokinin 1 receptors (NK1) and neurokinin 3 receptors in the developing mouse retina and in the retina of NK1 knockout mice. *Neuroscience*, 138(2), 487-499.
- Chakravarty, L, Rogers, L, Quach, T, Breckenridge, S, Kolattukudy, PE. (1998). Lysine 58 and histidine 66 at the C-terminal alpha-helix of monocyte chemoattractant protein-1 are essential for glycosaminoglycan binding. *J Biol Chem*, 273(45), 29641-29647.
- Chandler, H. (2011). Ultraviolet absorption by contact lenses and the significance on the ocular anterior segment. *Eye Contact Lens*, 37(4), 259-266.
- Chen, EP, Soderberg, PG, MacKerell, AD, Jr., Lindstrom, B, Tengroth, BM. (1989). Inactivation of lactate dehydrogenase by UV radiation in the 300 nm wavelength region. *Radiat Environ Biophys*, 28(3), 185-191.
- Chen, M, Forrester, JV, Xu, H. (2011). Dysregulation in retinal para-inflammation and age-related retinal degeneration in CCL2 or CCR2 deficient mice. *PLoS One*, 6(8), e22818.
- Chen, SJ, Lee, CJ, Lin, TB, Liu, HJ, Huang, SY, Chen, JZ, Tseng, KW. (2016). Inhibition of Ultraviolet B-Induced Expression of the Proinflammatory Cytokines TNF-alpha

- and VEGF in the Cornea by Fucoxanthin Treatment in a Rat Model. *Mar Drugs*, 14(1), 13.
- Chen, W, Lin, H, Zhong, X, Liu, Z, Geng, Y, Xie, C, Chen, W. (2014). Discrepant expression of cytokines in inflammation- and age-related cataract patients. *PLoS One*, 9(10), e109647.
- Chong, EW, Wong, TY. (2008). Multivitamin supplements and cataract prevention. *Ophthalmology*, 115(4), 597-598.
- Christen, WG, Glynn, RJ, Manson, JE, MacFadyen, J, Bubes, V, Schwartz, M, Buring, JE, Sesso, HD, Gaziano, JM. (2014). Effects of multivitamin supplement on cataract and age-related macular degeneration in a randomized trial of male physicians. *Ophthalmology*, 121(2), 525-534.
- Chua, J, Vania, M, Cheung, CM, Ang, M, Chee, SP, Yang, H, Li, J, Wong, TT. (2012). Expression profile of inflammatory cytokines in aqueous from glaucomatous eyes. *Mol Vis*, 18, 431-438.
- Chui, J, Di Girolamo, N, Coroneo, MT, Wakefield, D. (2007). The role of substance P in the pathogenesis of pterygia. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 48(10), 4482-4489.
- Chylack, LT, Jr., Brown, NP, Bron, A, Hurst, M, Kopcke, W, Thien, U, Schalch, W. (2002). The Roche European American Cataract Trial (REACT): a randomized clinical trial to investigate the efficacy of an oral antioxidant micronutrient mixture to slow progression of age-related cataract. *Ophthalmic Epidemiol*, 9(1), 49-80.
- Cochain, C, Zernecke, A. (2017). Macrophages in vascular inflammation and atherosclerosis. *Pflugers Arch*, 469(3-4), 485-499.
- Cone, RE, Pais, R. (2009). Anterior Chamber-Associated Immune Deviation (ACAID): An Acute Response to Ocular Insult Protects from Future Immune-Mediated Damage? *Ophthalmol Eye Dis*, 1, 33-40.
- Congdon, NG. (2001). Prevention strategies for age related cataract: present limitations and future possibilities. *Br J Ophthalmol*, 85(5), 516-520.
- Corbally, N, Powell, D, Tipton, KF. (1990). The binding of endogenous and exogenous substance-P in human plasma. *Biochem Pharmacol*, 39(7), 1161-1166.
- Coroneo, MT, Muller-Stolzenburg, NW, Ho, A. (1991). Peripheral light focusing by the anterior eye and the ophthalmohelioses. *Ophthalmic Surg*, 22(12), 705-711.
- Crane, IJ, McKillop-Smith, S, Wallace, CA, Lamont, GR, Forrester, JV. (2001). Expression of the chemokines MIP-1 α , MCP-1, and RANTES in experimental autoimmune uveitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 42(7), 1547-1552.
- Dahm, R, van Marle, J, Quinlan, RA, Prescott, AR, Vrensen, GF. (2011). Homeostasis in the vertebrate lens: mechanisms of solute exchange. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 366(1568), 1265-1277.
- Davies, MH, Eubanks, JP, Powers, MR. (2006). Microglia and macrophages are increased in response to ischemia-induced retinopathy in the mouse retina. *Mol Vis*, 12, 467-477.
- Davies, MJ, Truscott, RJW. (2001). Photo-oxidation of proteins and its role in cataractogenesis. *Journal of Photochemistry and Photobiology B-Biology*, 63(1-3), 114-125.
- DeFea, KA, Vaughn, ZD, O'Bryan, EM, Nishijima, D, Déry, O, Bunnett, NW. (2000). The proliferative and antiapoptotic effects of substance P are facilitated by formation of a beta-arrestin-dependent scaffolding complex. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97(20), 11086-11091.

- Denis, P, Fardin, V, Nordmann, JP, Elena, PP, Laroche, L, Saraux, H, Rostene, W. (1991). Localization and characterization of substance P binding sites in rat and rabbit eyes. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 32(6), 1894-1902.
- Deshmane, SL, Kremlev, S, Amini, S, Sawaya, BE. (2009). Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1): an overview. *J Interferon Cytokine Res*, 29(6), 313-326.
- Dillon, J, Zheng, L, Merriam, JC, Gaillard, ER. (1999). The optical properties of the anterior segment of the eye: implications for cortical cataract. *Exp Eye Res*, 68(6), 785-795.
- Dong, X, Ayala, M, Lofgren, S, Soderberg, PG. (2003). Ultraviolet radiation-induced cataract: age and maximum acceptable dose. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 44(3), 1150-1154.
- Edwards, JP, Zhang, X, Frauwirth, KA, Mosser, DM. (2006). Biochemical and functional characterization of three activated macrophage populations. *J Leukoc Biol*, 80(6), 1298-1307.
- Elshal, MF, McCoy, JP. (2006). Multiplex bead array assays: performance evaluation and comparison of sensitivity to ELISA. *Methods*, 38(4), 317-323.
- Erdos, EG, Skidgel, RA. (1989). Neutral endopeptidase 24.11 (enkephalinase) and related regulators of peptide hormones. *Faseb j*, 3(2), 145-151.
- Euler, V, Gaddum, JH. (1931). An unidentified depressor substance in certain tissue extracts. *J Physiol*, 72(1), 74-87.
- Fagerholm, PP. (1981). Human lens epithelium in normal and cataractous lenses. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 21(3), 408-414.
- Farmer, CB, Toon, GC, Schaper, PW, Blavier, JF, Lowes, LL. (1987). Stratospheric trace gases in the spring 1986 Antarctic atmosphere. *Nature*, 329, 126.
- Ferguson, TA, Fletcher, S, Herndon, J, Griffith, TS. (1995). Neuropeptides modulate immune deviation induced via the anterior chamber of the eye. *J Immunol*, 155(4), 1746-1756.
- Fernandez-Velasco, M, Gonzalez-Ramos, S, Bosca, L. (2014). Involvement of monocytes/macrophages as key factors in the development and progression of cardiovascular diseases. *Biochem J*, 458(2), 187-193.
- Fernandez, MM, Afshari, NA. (2008). Nutrition and the prevention of cataracts. *Curr Opin Ophthalmol*, 19(1), 66-70.
- Flaugh, SL, Kosinski-Collins, MS, King, J. (2005). Interdomain side-chain interactions in human gammaD crystallin influencing folding and stability. *Protein Sci*, 14(8), 2030-2043.
- Foldenauer, ME, McClellan, SA, Barrett, RP, Zhang, Y, Hazlett, LD. (2012). Substance P affects growth factors in *Pseudomonas aeruginosa*-infected mouse cornea. *Cornea*, 31(10), 1176-1188.
- Foldenauer, ME, McClellan, SA, Berger, EA, Hazlett, LD. (2013). Mammalian target of rapamycin regulates IL-10 and resistance to *Pseudomonas aeruginosa* corneal infection. *J Immunol*, 190(11), 5649-5658.
- Frederikse, PH, Kasinathan, C, Kleiman, NJ. (2012). Parallels between neuron and lens fiber cell structure and molecular regulatory networks. *Dev Biol*, 368(2), 255-260.
- Friedrich, MG, Lam, J, Truscott, RJ. (2012). Degradation of an old human protein: age-dependent cleavage of gammaS-crystallin generates a peptide that binds to cell membranes. *J Biol Chem*, 287(46), 39012-39020.

- Fujishima, H, Takeyama, M, Takeuchi, T, Saito, I, Tsubota, K. (1997). Elevated levels of substance P in tears of patients with allergic conjunctivitis and vernal keratoconjunctivitis. *Clin Exp Allergy*, 27(4), 372-378.
- Funatsu, H, Yamashita, H, Noma, H, Mimura, T, Nakamura, S, Sakata, K, Hori, S. (2005). Aqueous humor levels of cytokines are related to vitreous levels and progression of diabetic retinopathy in diabetic patients. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*, 243(1), 3-8.
- Furie, MB, Randolph, GJ. (1995). Chemokines and tissue injury. *Am J Pathol*, 146(6), 1287-1301.
- Galichanin, K, Lofgren, S, Bergmanson, J, Soderberg, P. (2010). Evolution of damage in the lens after in vivo close to threshold exposure to UV-B radiation: cytomorphological study of apoptosis. *Exp Eye Res*, 91(3), 369-377.
- Gao, X, Huang, W, Zhang, X, Du, S, Wang, J, Wang, W, Zhou, M, Chen, S, Li, X, Jonas, JB. (2016). Chemokine (C-C motif) ligand 2 and chemokine (C-C motif) ligand 7 in angle-closure glaucoma. *Acta Ophthalmol*, 94(3), e220-224.
- Gerard, NP, Bao, L, Xiao-Ping, H, Gerard, C. (1993). Molecular aspects of the tachykinin receptors. *Regul Pept*, 43(1-2), 21-35.
- Gerard, NP, Garraway, LA, Eddy, RL, Jr., Shows, TB, Iijima, H, Paquet, JL, Gerard, C. (1991). Human substance P receptor (NK-1): organization of the gene, chromosome localization, and functional expression of cDNA clones. *Biochemistry*, 30(44), 10640-10646.
- Gonzalo, JA, Lloyd, CM, Wen, D, Albar, JP, Wells, TN, Proudfoot, A, Martinez, AC, Dorf, M, Bjerke, T, Coyle, AJ, Gutierrez-Ramos, JC. (1998). The coordinated action of CC chemokines in the lung orchestrates allergic inflammation and airway hyperresponsiveness. *J Exp Med*, 188(1), 157-167.
- Graw, J, Loster, J. (2003). Developmental genetics in ophthalmology. *Ophthalmic Genet*, 24(1), 1-33.
- Grisanti, S. (1998). [Immune privilege of the eye]. *Ophthalmologe*, 95(2), 124-135.
- Groot, W, Ladenburg, R, Noddack, W, Penning, FM, Pringsheim, P, Geiger, H, Scheel, K. (2013). *Quantenhafte Ausstrahlung*: Springer Berlin Heidelberg.
- Gross, J, Wegener, AR, Kronschl ger, M, Holz, FG, Schönfeld, CL, Meyer, LM. (2018). Ultraviolet radiation exposure triggers neurokinin-1 receptor upregulation in ocular tissues in vivo. *Exp Eye Res*, 174, 70-79.
- Gross, J, Wegener, AR, Kronschl ger, M, Schönfeld, CL, Holz, FG, Meyer, LM. (2020). UVR-B-induced NK-1 Expression in Ocular Tissues is blocked by Substance P Receptor Antagonist Fosaprepitant in the Exposed as well as Unexposed Partner Eye. *Ocul Immunol Inflamm*, 1-13.
- Hamacher, J, Hadizamani, Y, Borgmann, M, Mohaupt, M, Mannel, DN, Moehrlen, U, Lucas, R, Stammberger, U. (2017). Cytokine-Ion Channel Interactions in Pulmonary Inflammation. *Front Immunol*, 8, 1644.
- Hamada, N, Fujimichi, Y. (2015). Role of carcinogenesis related mechanisms in cataractogenesis and its implications for ionizing radiation cataractogenesis. *Cancer Lett*, 368(2), 262-274.
- Han, H, Roan, F, Ziegler, SF. (2017). The atopic march: current insights into skin barrier dysfunction and epithelial cell-derived cytokines. *Immunol Rev*, 278(1), 116-130.
- Hartung, HP, Toyka, KV. (1983). Activation of macrophages by substance P: induction of oxidative burst and thromboxane release. *Eur J Pharmacol*, 89(3-4), 301-305.

- Hayashi, LC, Hayashi, S, Yamaoka, K, Tamiya, N, Chikuda, M, Yano, E. (2003). Ultraviolet B exposure and type of lens opacity in ophthalmic patients in Japan. *Sci Total Environ*, 302(1-3), 53-62.
- Hayashidani, S, Tsutsui, H, Shiomi, T, Ikeuchi, M, Matsusaka, H, Suematsu, N, Wen, J, Egashira, K, Takeshita, A. (2003). Anti-monocyte chemoattractant protein-1 gene therapy attenuates left ventricular remodeling and failure after experimental myocardial infarction. *Circulation*, 108(17), 2134-2140.
- Hazlett, LD, McClellan, SA, Barrett, RP, Liu, J, Zhang, Y, Lighvani, S. (2007). Spantide I Decreases Type I Cytokines, Enhances IL-10, and Reduces Corneal Perforation in Susceptible Mice after *Pseudomonas aeruginosa* Infection. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 48(2), 797-807.
- Heck, DE, Gerecke, DR, Vetrano, AM, Laskin, JD. (2004). Solar ultraviolet radiation as a trigger of cell signal transduction. *Toxicol Appl Pharmacol*, 195(3), 288-297.
- Hejtmancik, JF, Kantorow, M. (2004). Molecular genetics of age-related cataract. *Exp Eye Res*, 79(1), 3-9.
- Hejtmancik, JF, Riazuddin, SA, McGreal, R, Liu, W, Cvekl, A, Shiels, A. (2015). Lens Biology and Biochemistry. *Prog Mol Biol Transl Sci*, 134, 169-201.
- Hejtmancik, JF, Shiels, A. (2015). Overview of the Lens. *Prog Mol Biol Transl Sci*, 134, 119-127.
- Hightower, K, McCready, J. (1993). Comparative effect of UVA and UVB on cultured rabbit lens. *Photochem Photobiol*, 58(6), 827-830.
- Hightower, KR, McCready, JP, Borchman, D. (1994). Membrane damage in UV-irradiated lenses. *Photochem Photobiol*, 59(4), 485-490.
- Hirneiß, C, Kampik, A, Neubauer, AS. (2014). Volkswirtschaftliche Kosten von Augenerkrankungen. *Der Ophthalmologe*, 111(5), 420-427.
- Hockwin, O, Kojima, M, Muller-Breitenkamp, U, Wegener, A. (2002). Lens and cataract research of the 20th century: a review of results, errors and misunderstandings. *Dev Ophthalmol*, 35, 1-11.
- Hockwin, O, Kojima, M, Sakamoto, Y, Wegener, A, Shui, YB, Sasaki, K. (1999). UV damage to the eye lens: further results from animal model studies: a review. *J Epidemiol*, 9(6 Suppl), S39-47.
- Hollborn, M, Enzmann, V, Barth, W, Wiedemann, P, Kohen, L. (2000). Changes in the mRNA expression of cytokines and chemokines by stimulated RPE cells in vitro. *Curr Eye Res*, 20(6), 488-495.
- Hong, HS, Kim, S, Nam, S, Um, J, Kim, YH, Son, Y. (2015). Effect of substance P on recovery from laser-induced retinal degeneration. *Wound Repair Regen*, 23(2), 268-277.
- Huang, W, Chen, S, Gao, X, Yang, M, Zhang, J, Li, X, Wang, W, Zhou, M, Zhang, X, Zhang, X. (2014). Inflammation-related cytokines of aqueous humor in acute primary angle-closure eyes. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 55(2), 1088-1094.
- Ishida, K, Panjwani, N, Cao, Z, Streilein, JW. (2003). Participation of pigment epithelium in ocular immune privilege. 3. Epithelia cultured from iris, ciliary body, and retina suppress T-cell activation by partially non-overlapping mechanisms. *Ocul Immunol Inflamm*, 11(2), 91-105.
- Ivanov, IV, Mappes, T, Schaupp, P, Lappe, C, Wahl, S. (2018). Ultraviolet radiation oxidative stress affects eye health. *J Biophotonics*, 11(7), e201700377.

- Janelsins, BM, Mathers, AR, Tkacheva, OA, Erdos, G, Shufesky, WJ, Morelli, AE, Larregina, AT. (2009). Proinflammatory tachykinins that signal through the neurokinin 1 receptor promote survival of dendritic cells and potent cellular immunity. *Blood*, 113(13), 3017-3026.
- Javitt, JC, Taylor, HR. (1994). Cataract and latitude. *Doc Ophthalmol*, 88(3-4), 307-325.
- Ji, Y, Cai, L, Zheng, T, Ye, H, Rong, X, Rao, J, Lu, Y. (2015). The mechanism of UVB irradiation induced-apoptosis in cataract. *Mol Cell Biochem*, 401(1-2), 87-95.
- Jonas, JB, Tao, Y, Neumaier, M, Findeisen, P. (2010). Monocyte chemoattractant Protein-1, intercellular adhesion molecule 1, and vascular cell adhesion molecule 1 in exudative age-related macular degeneration. *Arch Ophthalmol*, 128(10), 1281-1286.
- Jones, MA, Marfurt, CF. (1998). Peptidergic innervation of the rat cornea. *Exp Eye Res*, 66(4), 421-435.
- Kalinowska, A, Losy, J. (2008). Investigational C-C chemokine receptor 2 antagonists for the treatment of autoimmune diseases. *Expert Opin Investig Drugs*, 17(9), 1267-1279.
- Kanski, J. (2008). *Klinische Ophthalmologie Lehrbuch und Atlas* (Vol. 6. Aufl.). München: Elsevier.
- Kauppinen, A, Paterno, JJ, Blasiak, J, Salminen, A, Kaarniranta, K. (2016). Inflammation and its role in age-related macular degeneration. *Cell Mol Life Sci*, 73(9), 1765-1786.
- Kawai, M, Inoue, T, Inatani, M, Tsuboi, N, Shobayashi, K, Matsukawa, A, Yoshida, A, Tanihara, H. (2012). Elevated levels of monocyte chemoattractant protein-1 in the aqueous humor after phacoemulsification. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 53(13), 7951-7960.
- Keen, P, Tullo, AB, Blyth, WA, Hill, TJ. (1982). Substance P in the mouse cornea: effects of chemical and surgical denervation. *Neurosci Lett*, 29(3), 231-235.
- Kieselbach, GF, Ragaut, R, Knaus, HG, König, P, Wiedermann, CJ. (1990). Autoradiographic analysis of binding sites for ¹²⁵I-Bolton-Hunter-substance P in the human eye. *Peptides*, 11(4), 655-659.
- Kitamoto, S, Egashira, K. (2003). Anti-monocyte chemoattractant protein-1 gene therapy for cardiovascular diseases. *Expert Rev Cardiovasc Ther*, 1(3), 393-400.
- Klein, BE, Klein, R, Lee, KE, Knudtson, MD, Tsai, MY. (2006). Markers of inflammation, vascular endothelial dysfunction, and age-related cataract. *Am J Ophthalmol*, 141(1), 116-122.
- Klein, RS, Werth, VP, Dowdy, JC, Sayre, RM. (2009). Analysis of compact fluorescent lights for use by patients with photosensitive conditions. *Photochem Photobiol*, 85(4), 1004-1010.
- Kokubun, T, Tsuda, S, Kunikata, H, Yasuda, M, Himori, N, Kunimatsu-Sanuki, S, Maruyama, K, Nakazawa, T. (2017). Characteristic Profiles of Inflammatory Cytokines in the Aqueous Humor of Glaucomatous Eyes. *Ocul Immunol Inflamm*, 1-12.
- Kottler, UB, Dick, HB, Augustin, AJ. (2003). [Is a cataract avoidable? Current status with special emphasis on the pathophysiology of oxidative lens damage, nutritional factors, and the ARED study]. *Ophthalmologe*, 100(3), 190-196.
- Kusano, KF, Nakamura, K, Kusano, H, Nishii, N, Banba, K, Ikeda, T, Hashimoto, K, Yamamoto, M, Fujio, H, Miura, A, Ohta, K, Morita, H, Saito, H, Emori, T,

- Nakamura, Y, Kusano, I, Ohe, T. (2004). Significance of the level of monocyte chemoattractant protein-1 in human atherosclerosis. *Circ J*, 68(7), 671-676.
- Lallemend, F, Lefebvre, PP, Hans, G, Rigo, JM, Van de Water, TR, Moonen, G, Malgrange, B. (2003). Substance P protects spiral ganglion neurons from apoptosis via PKC-Ca²⁺-MAPK/ERK pathways. *J Neurochem*, 87(2), 508-521.
- Lang, GK. (2000). *Augenheilkunde*.
- Lee, NY, Park, HY, Park, CK, Ahn, MD. (2012). Analysis of systemic endothelin-1, matrix metalloproteinase-9, macrophage chemoattractant protein-1, and high-sensitivity C-reactive protein in normal-tension glaucoma. *Curr Eye Res*, 37(12), 1121-1126.
- Leonard, EJ, Yoshimura, T. (1990). Human monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1). *Immunol Today*, 11(3), 97-101.
- Leske, MC, Chylack, LT, Jr., He, Q, Wu, SY, Schoenfeld, E, Friend, J, Wolfe, J. (1998). Risk factors for nuclear opalescence in a longitudinal study. LSC Group. Longitudinal Study of Cataract. *Am J Epidemiol*, 147(1), 36-41.
- Liu-Smith, F, Ziogas, A. (2017). An age-dependent interaction between sex and geographical UV index in melanoma risk. *J Am Acad Dermatol*.
- Liu, J, Hales, AM, Chamberlain, CG, McAvoy, JW. (1994). Induction of cataract-like changes in rat lens epithelial explants by transforming growth factor beta. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 35(2), 388-401.
- Lofgren, S. (2017). Solar ultraviolet radiation cataract. *Exp Eye Res*, 156, 112-116.
- Lofgren, S, Soderberg, PG. (2001). Lens lactate dehydrogenase inactivation after UV-B irradiation: an in vivo measure of UVR-B penetration. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 42(8), 1833-1836.
- Lois, N, Dawson, R, McKinnon, AD, Forrester, JV. (2003). A new model of posterior capsule opacification in rodents. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 44(8), 3450-3457.
- London, A, Itskovich, E, Benhar, I, Kalchenko, V, Mack, M, Jung, S, Schwartz, M. (2011). Neuroprotection and progenitor cell renewal in the injured adult murine retina requires healing monocyte-derived macrophages. *J Exp Med*, 208(1), 23-39.
- Longstreth, J, de Gruijl, FR, Kripke, ML, Abseck, S, Arnold, F, Slaper, HI, Velders, G, Takizawa, Y, van der Leun, JC. (1998). Health risks. *J Photochem Photobiol B*, 46(1-3), 20-39.
- Lozhkin, A, Vendrov, AE, Pan, H, Wickline, SA, Madamanchi, NR, Runge, MS. (2017). NADPH oxidase 4 regulates vascular inflammation in aging and atherosclerosis. *J Mol Cell Cardiol*, 102, 10-21.
- Lu, B, Rutledge, BJ, Gu, L, Fiorillo, J, Lukacs, NW, Kunkel, SL, North, R, Gerard, C, Rollins, BJ. (1998). Abnormalities in monocyte recruitment and cytokine expression in Monocyte chemoattractant Protein-1-deficient mice. *J Exp Med*, 187(4), 601-608.
- Lucas, K, Karamichos, D, Mathew, R, Zieske, JD, Stein-Streilein, J. (2012). Retinal laser burn-induced neuropathy leads to substance P-dependent loss of ocular immune privilege. *J Immunol*, 189(3), 1237-1242.
- Luhmann, UF, Robbie, S, Munro, PM, Barker, SE, Duran, Y, Luong, V, Fitzke, FW, Bainbridge, JW, Ali, RR, MacLaren, RE. (2009). The drusenlike phenotype in aging Ccl2-knockout mice is caused by an accelerated accumulation of swollen

- autofluorescent subretinal macrophages. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 50(12), 5934-5943.
- Maloof, AJ, Ho, A, Coroneo, MT. (1994). Influence of corneal shape on limbal light focusing. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 35(5), 2592-2598.
- Mansfield, KJ, Cerra, A, Chamberlain, CG. (2004). FGF-2 counteracts loss of TGFbeta affected cells from rat lens explants: implications for PCO (after cataract). *Mol Vis*, 10, 521-532.
- Mashaghi, A, Marmalidou, A, Tehrani, M, Grace, PM, Pothoulakis, C, Dana, R. (2016). Neuropeptide substance P and the immune response. *Cell Mol Life Sci*, 73(22), 4249-4264.
- McCarty, CA, Mukesh, BN, Fu, CL, Taylor, HR. (1999). The epidemiology of cataract in Australia. *Am J Ophthalmol*, 128(4), 446-465.
- McClellan, SA, Zhang, Y, Barrett, RP, Hazlett, LD. (2008). Substance P promotes susceptibility to *Pseudomonas aeruginosa* keratitis in resistant mice: anti-inflammatory mediators downregulated. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 49(4), 1502-1511.
- McCusker, MM, Durrani, K, Payette, MJ, Suchecki, J. (2016). An eye on nutrition: The role of vitamins, essential fatty acids, and antioxidants in age-related macular degeneration, dry eye syndrome, and cataract. *Clin Dermatol*, 34(2), 276-285.
- McKenzie, R, Connor, B, Bodeker, G. (1999). Increased summertime UV radiation in New Zealand in response to ozone loss. *Science*, 285(5434), 1709-1711.
- Merriam, JC, Lofgren, S, Michael, R, Soderberg, P, Dillon, J, Zheng, L, Ayala, M. (2000). An action spectrum for UV-B radiation and the rat lens. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 41(9), 2642-2647.
- Mesa, R, Bassnett, S. (2013). UV-B-induced DNA damage and repair in the mouse lens. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 54(10), 6789-6797.
- Meyer, LM, Dong, X, Wegener, A, Soderberg, P. (2008). Dose dependent cataractogenesis and Maximum Tolerable Dose (MTD(2.3:16)) for UVR 300 nm-induced cataract in C57BL/6J mice. *Exp Eye Res*, 86(2), 282-289.
- Meyer, LM, Lofgren, S, Holz, FG, Wegener, A, Soderberg, P. (2013). Bilateral cataract induced by unilateral UVR-B exposure -- evidence for an inflammatory response. *Acta Ophthalmol*, 91(3), 236-242.
- Meyer, LM, Soderberg, P, Dong, X, Wegener, A. (2005). UVR-B induced cataract development in C57 mice. *Exp Eye Res*, 81(4), 389-394.
- Meyer, LM, Wegener, AR, Holz, FG, Kronschlager, M, Bergmanson, JP, Soderberg, PG. (2014). Ultrastructure of UVR-B-induced cataract and repair visualized with electron microscopy. *Acta Ophthalmol*, 92(7), 635-643.
- Michael, R, Vrensen, GF, van Marle, J, Gan, L, Soderberg, PG. (1998). Apoptosis in the rat lens after in vivo threshold dose ultraviolet irradiation. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 39(13), 2681-2687.
- Michael, R, Vrensen, GF, van Marle, J, Lofgren, S, Soderberg, PG. (2000). Repair in the rat lens after threshold ultraviolet radiation injury. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 41(1), 204-212.
- Miller, A, Costa, M, Furness, JB, Chubb, IW. (1981). Substance P immunoreactive sensory nerves supply the rat iris and cornea. *Neurosci Lett*, 23(3), 243-249.

- Moffat, BA, Landman, KA, Truscott, RJ, Sweeney, MH, Pope, JM. (1999). Age-related changes in the kinetics of water transport in normal human lenses. *Exp Eye Res*, 69(6), 663-669.
- Mohania, D, Chandel, S, Kumar, P, Verma, V, Digvijay, K, Tripathi, D, Choudhury, K, Mitten, SK, Shah, D. (2017). Ultraviolet Radiations: Skin Defense-Damage Mechanism. *Adv Exp Med Biol*, 996, 71-87.
- Moreau, KL, King, JA. (2012a). Protein misfolding and aggregation in cataract disease and prospects for prevention. *Trends Mol Med*, 18(5), 273-282.
- Moreau, KL, King, JA. (2012b). Protein misfolding and aggregation in cataract disease and prospects for prevention. *Trends Mol Med*, 18(5), 273-282.
- Mosser, DM. (2003). The many faces of macrophage activation. *J Leukoc Biol*, 73(2), 209-212.
- Mosser, DM, Edwards, JP. (2008). Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat Rev Immunol*, 8(12), 958-969.
- Muñoz, M, Rosso, M, Coveñas, R. (2010). A new frontier in the treatment of cancer: NK-1 receptor antagonists. *Curr Med Chem*, 17(6), 504-516.
- Morris-Espin, M, Pinelli, E, Pipy, B, Leophonte, P, Didier, A. (1995). Substance P and alveolar macrophages: effects on oxidative metabolism and eicosanoid production. *Allergy*, 50(4), 334-339.
- Nakamura, M, Chikama, T, Nishida, T. (1999). Synergistic effect with Phe-Gly-Leu-Met-NH₂ of the C-terminal of substance P and insulin-like growth factor-1 on epithelial wound healing of rabbit cornea. *Br J Pharmacol*, 127(2), 489-497.
- Nakamura, M, Kawahara, M, Morishige, N, Chikama, T, Nakata, K, Nishida, T. (2003). Promotion of corneal epithelial wound healing in diabetic rats by the combination of a substance P-derived peptide (FGLM-NH₂) and insulin-like growth factor-1. *Diabetologia*, 46(6), 839-842.
- Nakamura, M, Ofuji, K, Chikama, T, Nishida, T. (1997). Combined effects of substance P and insulin-like growth factor-1 on corneal epithelial wound closure of rabbit in vivo. *Curr Eye Res*, 16(3), 275-278.
- Nakanishi, S. (1991). Mammalian tachykinin receptors. *Annu Rev Neurosci*, 14, 123-136.
- Naumann, G. (1980). *Pathologie des Auges I* (Vol. 2. Aufl.). Berlin: Springer.
- Neale, RE, Purdie, JL, Hirst, LW, Green, AC. (2003). Sun exposure as a risk factor for nuclear cataract. *Epidemiology*, 14(6), 707-712.
- Nishi, O, Nishi, K, Imanishi, M. (1992). Synthesis of interleukin-1 and prostaglandin E₂ by lens epithelial cells of human cataracts. *Br J Ophthalmol*, 76(6), 338-341.
- Nishi, O, Nishi, K, Imanishi, M, Tada, Y, Shirasawa, E. (1995). Effect of the cytokines on the prostaglandin E₂ synthesis by lens epithelial cells of human cataracts. *Br J Ophthalmol*, 79(10), 934-938.
- Nishi, O, Nishi, K, Ohmoto, Y. (1996). Synthesis of interleukin-1, interleukin-6, and basic fibroblast growth factor by human cataract lens epithelial cells. *J Cataract Refract Surg*, 22 Suppl 1, 852-858.
- Nishida, T, Nakamura, M, Ofuji, K, Reid, TW, Mannis, MJ, Murphy, CJ. (1996). Synergistic effects of substance P with insulin-like growth factor-1 on epithelial migration of the cornea. *J Cell Physiol*, 169(1), 159-166.

- Niwa, Y. (1994). Abnormalities in serum lipids and leukocyte superoxide dismutase and associated cataract formation in patients with atopic dermatitis. *Arch Dermatol*, 130(11), 1387-1392.
- O'Connor, TM, O'Connell, J, O'Brien, DI, Goode, T, Bredin, CP, Shanahan, F. (2004). The role of substance P in inflammatory disease. *J Cell Physiol*, 201(2), 167-180.
- Ohneiser, K, Ansmann, A, Chudnovsky, A, Engelmann, R, Ritter, C, Veselovskii, I, Baars, H, Gebauer, H, Griesche, H, Radenz, M, Hofer, J, Althausen, D, Dahlke, S, Maturilli, M. (2021). The unexpected smoke layer in the High Arctic winter stratosphere during MOSAiC 2019–2020. *Atmos. Chem. Phys.*, 21(20), 15783-15808.
- Ongkosuwito, JV, Feron, EJ, van Doornik, CE, Van der Lelij, A, Hoyng, CB, La Heij, EC, Kijlstra, A. (1998). Analysis of immunoregulatory cytokines in ocular fluid samples from patients with uveitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 39(13), 2659-2665.
- Padgaonkar, V, Giblin, FJ, Reddy, VN. (1989). Disulfide cross-linking of urea-insoluble proteins in rabbit lenses treated with hyperbaric oxygen. *Exp Eye Res*, 49(5), 887-899.
- Padgaonkar, VA, Lin, LR, Leverenz, VR, Rinke, A, Reddy, VN, Giblin, FJ. (1999). Hyperbaric oxygen in vivo accelerates the loss of cytoskeletal proteins and MIP26 in guinea pig lens nucleus. *Exp Eye Res*, 68(4), 493-504.
- Palframan, RT, Jung, S, Cheng, G, Weninger, W, Luo, Y, Dorf, M, Littman, DR, Rollins, BJ, Zweerink, H, Rot, A, von Andrian, UH. (2001). Inflammatory chemokine transport and presentation in HEV: a remote control mechanism for monocyte recruitment to lymph nodes in inflamed tissues. *J Exp Med*, 194(9), 1361-1373.
- Pau, H, Graf, P, Sies, H. (1990). Glutathione levels in human lens: regional distribution in different forms of cataract. *Exp Eye Res*, 50(1), 17-20.
- Paunicka, KJ, Mellon, J, Robertson, D, Petroll, M, Brown, JR, Niederkorn, JY. (2015). Severing corneal nerves in one eye induces sympathetic loss of immune privilege and promotes rejection of future corneal allografts placed in either eye. *Am J Transplant*, 15(6), 1490-1501.
- Perng, MD, Zhang, Q, Quinlan, RA. (2007). Insights into the beaded filament of the eye lens. *Exp Cell Res*, 313(10), 2180-2188.
- Pescosolido, N, Barbato, A, Giannotti, R, Komaiha, C, Lenarduzzi, F. (2016). Age-related changes in the kinetics of human lenses: prevention of the cataract. *Int J Ophthalmol*, 9(10), 1506-1517.
- Pieri, M, Amadoro, G, Carunchio, I, Ciotti, MT, Quaresima, S, Florenzano, F, Calissano, P, Possenti, R, Zona, C, Severini, C. (2010). SP protects cerebellar granule cells against beta-amyloid-induced apoptosis by down-regulation and reduced activity of Kv4 potassium channels. *Neuropharmacology*, 58(1), 268-276.
- Pierscionek, B, Bahrami, M, Hoshino, M, Uesugi, K, Regini, J, Yagi, N. (2015). The eye lens: age-related trends and individual variations in refractive index and shape parameters. *Oncotarget*, 6(31), 30532-30544.
- Pirie, A. (1968). Color and solubility of the proteins of human cataracts. *Invest Ophthalmol*, 7(6), 634-650.
- Pitts, DG, Cullen, AP, Hacker, PD. (1977). Ocular effects of ultraviolet radiation from 295 to 365 nm. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 16(10), 932-939.

- Quantock, AJ, Winkler, M, Parfitt, GJ, Young, RD, Brown, DJ, Boote, C, Jester, JV. (2015). From nano to macro: studying the hierarchical structure of the corneal extracellular matrix. *Exp Eye Res*, 133, 81-99.
- Ray, NJ. (2015). Biophysical chemistry of the ageing eye lens. *Biophys Rev*, 7(4), 353-368.
- Reddy, GB, Bhat, KS. (1998). UVB irradiation alters the activities and kinetic properties of the enzymes of energy metabolism in rat lens during aging. *J Photochem Photobiol B*, 42(1), 40-46.
- Reid, TW, Murphy, CJ, Iwahashi, CK, Foster, BA, Mannis, MJ. (1993). Stimulation of epithelial cell growth by the neuropeptide substance P. *J Cell Biochem*, 52(4), 476-485.
- Reuter, S, Gupta, SC, Chaturvedi, MM, Aggarwal, BB. (2010). Oxidative stress, inflammation, and cancer: how are they linked? *Free Radic Biol Med*, 49(11), 1603-1616.
- Roberts, JE. (2011). Ultraviolet radiation as a risk factor for cataract and macular degeneration. *Eye Contact Lens*, 37(4), 246-249.
- Roosterman, D, Cottrell, GS, Schmidlin, F, Steinhoff, M, Bunnett, NW. (2004). Recycling and resensitization of the neurokinin 1 receptor. Influence of agonist concentration and Rab GTPases. *J Biol Chem*, 279(29), 30670-30679.
- Sasaki, H, Kawakami, Y, Ono, M, Jonasson, F, Shui, YB, Cheng, HM, Robman, L, McCarty, C, Chew, SJ, Sasaki, K. (2003). Localization of cortical cataract in subjects of diverse races and latitude. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 44(10), 4210-4214.
- Satriano, JA, Shuldiner, M, Hora, K, Xing, Y, Shan, Z, Schlondorff, D. (1993). Oxygen radicals as second messengers for expression of the monocyte chemoattractant protein, JE/MCP-1, and the monocyte colony-stimulating factor, CSF-1, in response to tumor necrosis factor- α and immunoglobulin G. Evidence for involvement of reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH)-dependent oxidase. *J Clin Invest*, 92(3), 1564-1571.
- Sauer, A, Bourcier, T, Gaucher, D, Candolfi, E, Speeg-Schatz, C. (2016). Intraocular cytokines imbalance in congenital cataract and its impact on posterior capsule opacification. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*, 254(5), 1013-1018.
- Schalch, W, Chylack, LT. (2003). [Antioxidant micronutrients and cataract. Review and comparison of the AREDS and REACT cataract studies]. *Ophthalmologe*, 100(3), 181-189.
- Schaumburg, DA, Ridker, PM, Glynn, RJ, Christen, WG, Dana, MR, Hennekens, CH. (1999). High levels of plasma C-reactive protein and future risk of age-related cataract. *Ann Epidemiol*, 9(3), 166-171.
- Schein, OD, West, S, Munoz, B, Vitale, S, Maguire, M, Taylor, HR, Bressler, NM. (1994). Cortical lenticular opacification: distribution and location in a longitudinal study. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 35(2), 363-366.
- Schmidt, RF, Lang, F, Heckmann, M. (2010). *Physiologie des Menschen: Mit Pathophysiologie*: Springer Berlin Heidelberg.
- Seiger, A, Selin, UB, Kessler, J, Black, I, Ayer-LeLievre, C. (1985). Substance P-containing sensory nerves in the rat iris. Normal distribution, ontogeny and innervation of intraocular iris grafts. *Neuroscience*, 15(2), 519-528.

- Silverberg, JI, Kantor, R. (2017). The Role of Interleukins 4 and/or 13 in the Pathophysiology and Treatment of Atopic Dermatitis. *Dermatol Clin*, 35(3), 327-334.
- Sit, DK, McGowan, J, Wiltrout, C, Diler, RS, Dills, JJ, Luther, J, Yang, A, Ciolino, JD, Seltman, H, Wisniewski, SR, Terman, M, Wisner, KL. (2017). Adjunctive Bright Light Therapy for Bipolar Depression: A Randomized Double-Blind Placebo-Controlled Trial. *Am J Psychiatry*, appiajp201716101200.
- Skidgel, RA, Engelbrecht, S, Johnson, AR, Erdos, EG. (1984). Hydrolysis of substance p and neurotensin by converting enzyme and neutral endopeptidase. *Peptides*, 5(4), 769-776.
- Sliney, DH. (1986). Physical factors in cataractogenesis: ambient ultraviolet radiation and temperature. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 27(5), 781-790.
- Sliney, DH. (1997). Optical radiation safety of medical light sources. *Phys Med Biol*, 42(5), 981-996.
- Sliney, DH. (2005). Exposure geometry and spectral environment determine photobiological effects on the human eye. *Photochem Photobiol*, 81(3), 483-489.
- Sloniecka, M, Le Roux, S, Boman, P, Bystrom, B, Zhou, Q, Danielson, P. (2015). Expression Profiles of Neuropeptides, Neurotransmitters, and Their Receptors in Human Keratocytes In Vitro and In Situ. *PLoS One*, 10(7), e0134157.
- Sloniecka, M, Le Roux, S, Zhou, Q, Danielson, P. (2016). Substance P Enhances Keratocyte Migration and Neutrophil Recruitment through Interleukin-8. *Mol Pharmacol*, 89(2), 215-225.
- Smith, RS, Sundberg, JP, Linder, CC. (1997). Mouse mutations as models for studying cataracts. *Pathobiology*, 65(3), 146-154.
- Soderberg, PG. (1989). Mass alteration in the lens after exposure to radiation in the 300 nm wavelength region. *Acta Ophthalmol (Copenh)*, 67(6), 633-644.
- Soderberg, PG, Lofgren, S, Ayala, M, Dong, X, Kakar, M, Mody, V. (2002). Toxicity of ultraviolet radiation exposure to the lens expressed by maximum tolerable dose. *Dev Ophthalmol*, 35, 70-75.
- Solomon, S, Ivy, DJ, Kinnison, D, Mills, MJ, Neely, RR, 3rd, Schmidt, A. (2016). Emergence of healing in the Antarctic ozone layer. *Science*, 353(6296), 269-274.
- Sorensen, TL, Ransohoff, RM, Strieter, RM, Sellebjerg, F. (2004). Chemokine CCL2 and chemokine receptor CCR2 in early active multiple sclerosis. *Eur J Neurol*, 11(7), 445-449.
- Sorte, K, Sune, P, Bhake, A, Shivkumar, VB, Gangane, N, Basak, A. (2011). Quantitative assessment of DNA damage directly in lens epithelial cells from senile cataract patients. *Mol Vis*, 17, 1-6.
- Spitsin, S, Meshki, J, Winters, A, Tuluc, F, Benton, TD, Douglas, SD. (2017). Substance P-mediated chemokine production promotes monocyte migration. *J Leukoc Biol*, 101(4), 967-973.
- Stambuk, N. (1994). TGF-beta-induced cataract-like changes in lens epithelia. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 35(11), 3787-3788.
- Stein-Streilein, J, Streilein, JW. (2002). Anterior chamber associated immune deviation (ACAID): regulation, biological relevance, and implications for therapy. *Int Rev Immunol*, 21(2-3), 123-152.
- Stone, RA, Kuwayama, Y, Laties, AM. (1987). Regulatory peptides in the eye. *Experientia*, 43(7), 791-800.

- Storey, P, Munoz, B, Friedman, D, West, S. (2013). Racial differences in lens opacity incidence and progression: the Salisbury Eye Evaluation (SEE) study. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 54(4), 3010-3018.
- Streilein, JW. (1996). Peripheral tolerance induction: lessons from immune privileged sites and tissues. *Transplant Proc*, 28(4), 2066-2070.
- Streilein, JW, Niederkorn, JY. (2007). Induction of anterior chamber-associated immune deviation requires an intact, functional spleen. 1981. *Ocul Immunol Inflamm*, 15(3), 187-194.
- Sugita, S, Kawazoe, Y, Imai, A, Yamada, Y, Horie, S, Mochizuki, M. (2012). Inhibition of Th17 differentiation by anti-TNF-alpha therapy in uveitis patients with Behcet's disease. *Arthritis Res Ther*, 14(3), R99.
- Suvas, S. (2017). Role of Substance P Neuropeptide in Inflammation, Wound Healing, and Tissue Homeostasis. *J Immunol*, 199(5), 1543-1552.
- Talebizadeh, N, Yu, Z, Kronschlager, M, Soderberg, P. (2014). Modelling the time evolution of active caspase-3 protein in the rat lens after in vivo exposure to ultraviolet radiation-B. *PLoS One*, 9(9), e106926.
- Tattersall, FD, Rycroft, W, Cumberbatch, M, Mason, G, Tye, S, Williamson, DJ, Hale, JJ, Mills, SG, Finke, PE, MacCoss, M, Sadowski, S, Ber, E, Cascieri, M, Hill, RG, MacIntyre, DE, Hargreaves, RJ. (2000). The novel NK1 receptor antagonist MK-0869 (L-754,030) and its water soluble phosphoryl prodrug, L-758,298, inhibit acute and delayed cisplatin-induced emesis in ferrets. *Neuropharmacology*, 39(4), 652-663.
- Taylor, AW. (1996). Neuroimmunomodulation in immune privilege: role of neuropeptides in ocular immunosuppression. *Neuroimmunomodulation*, 3(4), 195-204.
- Taylor, AW. (2016). Ocular Immune Privilege and Transplantation. *Front Immunol*, 7, 37.
- Taylor, HR. (1989). The biological effects of UV-B on the eye. *Photochem Photobiol*, 50(4), 489-492.
- Taylor, HR, West, SK, Rosenthal, FS, Munoz, B, Newland, HS, Abbey, H, Emmett, EA. (1988). Effect of ultraviolet radiation on cataract formation. *N Engl J Med*, 319(22), 1429-1433.
- Tervo, K, Tervo, T, Eranko, L, Eranko, O, Cuello, AC. (1981). Immunoreactivity for substance P in the Gasserian ganglion, ophthalmic nerve and anterior segment of the rabbit eye. *Histochem J*, 13(3), 435-443.
- Torriglia, A, Zigman, S. (1988). The effect of near-UV light on Na-K-ATPase of the rat lens. *Curr Eye Res*, 7(6), 539-548.
- Tran, MT, Lausch, RN, Oakes, JE. (2000). Substance P differentially stimulates IL-8 synthesis in human corneal epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 41(12), 3871-3877.
- Truscott, RJW. (2005). Age-related nuclear cataract - oxidation is the key. *Exp Eye Res*, 80(5), 709-725.
- Tuo, J, Bojanowski, CM, Zhou, M, Shen, D, Ross, RJ, Rosenberg, KI, Cameron, DJ, Yin, C, Kowalak, JA, Zhuang, Z, Zhang, K, Chan, CC. (2007). Murine ccl2/cx3cr1 deficiency results in retinal lesions mimicking human age-related macular degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 48(8), 3827-3836.
- Twardy, BS, Channappanavar, R, Suvas, S. (2011). Substance P in the corneal stroma regulates the severity of herpetic stromal keratitis lesions. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 52(12), 8604-8613.

- Uga, S, Tsuchiya, K, Ishikawa, S. (1988). Histopathological study of Emory mouse cataract. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*, 226(1), 15-21.
- Vaddi, K, Keller, M, Newton, M. (1997). *The Chemokine Factsbook: Ligands and Receptors*: Elsevier Science.
- Varma, SD, Kovtun, S, Hegde, KR. (2011). Role of ultraviolet irradiation and oxidative stress in cataract formation-medical prevention by nutritional antioxidants and metabolic agonists. *Eye Contact Lens*, 37(4), 233-245.
- Varnell, RJ, Freeman, JY, Maitchouk, D, Beuerman, RW, Gebhardt, BM. (1997). Detection of substance P in human tears by laser desorption mass spectrometry and immunoassay. *Curr Eye Res*, 16(9), 960-963.
- von der Gathen, P, Kivi, R, Wohltmann, I, Salawitch, RJ, Rex, M. (2021). Climate change favours large seasonal loss of Arctic ozone. *Nature Communications*, 12(1), 3886.
- Walter, K, Kauffman, L, Hess, J. (2020). Rate of pseudophakic cystoid macular edema using intraoperative and topical nonsteroidal antiinflammatory drugs alone without steroids. *J Cataract Refract Surg*, 46(3), 350-354.
- Wang, X, Sun, J, Dang, GF, Gao, Y, Duan, L, Wu, XY. (2015). Antioxidant content and cytological examination of aqueous fluid from patients with age-related cataracts at different stages. *Genet Mol Res*, 14(2), 6251-6255.
- Watanabe, M, Nakayasu, K, Iwatsu, M, Kanai, A. (2002). Endogenous substance P in corneal epithelial cells and keratocytes. *Jpn J Ophthalmol*, 46(6), 616-620.
- West-Mays, JA, Pino, G, Lovicu, FJ. (2010). Development and use of the lens epithelial explant system to study lens differentiation and cataractogenesis. *Prog Retin Eye Res*, 29(2), 135-143.
- West, SK, Duncan, DD, Munoz, B, Rubin, GS, Fried, LP, Bandeen-Roche, K, Schein, OD. (1998). Sunlight exposure and risk of lens opacities in a population-based study: the Salisbury Eye Evaluation project. *Jama*, 280(8), 714-718.
- West, SK, Longstreth, JD, Munoz, BE, Pitcher, HM, Duncan, DD. (2005). Model of risk of cortical cataract in the US population with exposure to increased ultraviolet radiation due to stratospheric ozone depletion. *Am J Epidemiol*, 162(11), 1080-1088.
- Widmark, J. (1891). *Über die Durchlässigkeit der Augenmedien für ultraviolette Strahlen*. Stockholm: Beiträge zur Ophthalmologie.
- Widmark, J. (1901). *Über den Einfluss des Lichtes auf die Linse*. In: Widmark J, ed. *Mitteilung aus der Augenlinik des carolinischen Medico-Chirurgischen Instituts in Stockholm*. Jena: Gustav Fischer Verlag.
- Williams, HC, Grindlay, DJ. (2008). What's new in atopic eczema? An analysis of the clinical significance of systematic reviews on atopic eczema published in 2006 and 2007. *Clin Exp Dermatol*, 33(6), 685-688.
- Wistow, G, Piatigorsky, J. (1987). Recruitment of enzymes as lens structural proteins. *Science*, 236(4808), 1554-1556.
- World Health Organization. (2010). Action plan for the prevention of avoidable blindness and visual impairment, 2009-2013.
- Xu, Q, Fitzsimmons, B, Steinauer, J, O'Neill, A, Newton, AC, Hua, XY, Yaksh, TL. (2011). Spinal phosphoinositide 3-kinase-Akt-mammalian target of rapamycin signaling cascades in inflammation-induced hyperalgesia. *J Neurosci*, 31(6), 2113-2124.

- Yaar, M, Gilchrist, BA. (1998). Aging versus photoaging: postulated mechanisms and effectors. *J Invest Dermatol Symp Proc*, 3(1), 47-51.
- Yamada, Y, Kojima, M, Vrensen, GF, Takahashi, N, Sasaki, K. (2001). [Acute ultraviolet B induced lens epithelial cell photo-damage and its repair process]. *Nippon Ganka Gakkai Zasshi*, 105(2), 102-110.
- Yamagami, H, Yamagami, S, Inoki, T, Amano, S, Miyata, K. (2003). The effects of proinflammatory cytokines on cytokine-chemokine gene expression profiles in the human corneal endothelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 44(2), 514-520.
- Yamaji, M, Takada, M, Fujiwara, R, Ohishi, H, Izushi, K, Sugimoto, Y, Kamei, C. (1997). Role of substance P in experimental allergic conjunctivitis in guinea pigs. *Methods Find Exp Clin Pharmacol*, 19(9), 637-643.
- Yang, D., E, S. G., Chen, X, Field, MG, Petty, HR, Elner, VM. (2011). MCP-1-activated monocytes induce apoptosis in human retinal pigment epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 52(8), 6026-6034.
- Yang, L, Di, G, Qi, X, Qu, M, Wang, Y, Duan, H, Danielson, P, Xie, L, Zhou, Q. (2014). Substance P promotes diabetic corneal epithelial wound healing through molecular mechanisms mediated via the neurokinin-1 receptor. *Diabetes*, 63(12), 4262-4274.
- Yang, L, Sui, W, Li, Y, Qi, X, Wang, Y, Zhou, Q, Gao, H. (2016). Substance P Inhibits Hyperosmotic Stress-Induced Apoptosis in Corneal Epithelial Cells through the Mechanism of Akt Activation and Reactive Oxygen Species Scavenging via the Neurokinin-1 Receptor. *PLoS One*, 11(2), e0149865-e0149865.
- Yang, X, Li, Y, Li, Y, Ren, X, Zhang, X, Hu, D, Gao, Y, Xing, Y, Shang, H. (2017). Oxidative Stress-Mediated Atherosclerosis: Mechanisms and Therapies. *Front Physiol*, 8, 600.
- Yoshida, S, Yoshida, A, Ishibashi, T, Elner, SG, Elner, VM. (2003). Role of MCP-1 and MIP-1 α in retinal neovascularization during postischemic inflammation in a mouse model of retinal neovascularization. *J Leukoc Biol*, 73(1), 137-144.
- Yoshida, Y, Yamagishi, S, Matsui, T, Nakamura, K, Imaizumi, T, Yoshimura, K, Yamakawa, R. (2007). Positive correlation between pigment epithelium-derived factor and monocyte chemoattractant protein-1 levels in the aqueous humour of patients with uveitis. *Br J Ophthalmol*, 91(6), 737-738.
- Yu, JM, Yang, DQ, Wang, H, Xu, J, Gao, Q, Hu, LW, Wang, F, Wang, Y, Yan, QC, Zhang, JS, Liu, Y. (2016). Prevalence and risk factors of lens opacities in rural populations living at two different altitudes in China. *Int J Ophthalmol*, 9(4), 610-616.
- Zhang, F, Lofgren, S, Soderberg, PG. (2007). Interaction of anaesthetic drugs and UV-B irradiation in the anterior segment of the rat eye. *Acta Ophthalmol Scand*, 85(7), 745-752.
- Zhang, J, Yan, H, Lofgren, S, Tian, X, Lou, MF. (2012). Ultraviolet radiation-induced cataract in mice: the effect of age and the potential biochemical mechanism. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 53(11), 7276-7285.
- Zhang, Y, Rollins, BJ. (1995). A dominant negative inhibitor indicates that Monocyte chemoattractant Protein-1 functions as a dimer. *Mol Cell Biol*, 15(9), 4851-4855.
- Zhou, Z, Barrett, RP, McClellan, SA, Zhang, Y, Szliter, EA, van Rooijen, N, Hazlett, LD. (2008). Substance P delays apoptosis, enhancing keratitis after *Pseudomonas aeruginosa* infection. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 49(10), 4458-4467.

- Zhu, X, Zhang, K, He, W, Yang, J, Sun, X, Jiang, C, Dai, J, Lu, Y. (2016). Proinflammatory status in the aqueous humor of high myopic cataract eyes. *Exp Eye Res*, 142, 13-18.
- Zhu, XJ, Wolff, D, Zhang, KK, He, WW, Sun, XH, Lu, Y, Zhou, P. (2015). Molecular Inflammation in the Contralateral Eye After Cataract Surgery in the First Eye. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 56(9), 5566-5573.

9 Danksagung

Prof. F. Holz danke ich herzlich für die Möglichkeit diese Doktorarbeit an der Universitäts-Augenklinik Bonn anfertigen zu können.

Mein besonderer Dank gilt meiner Doktormutter und Betreuerin Frau PD Dr. LM Meyer PhD für die hervorragende Betreuung bei der Durchführung und Ausarbeitung dieser Dissertation und für die Unterstützung bei der Vorstellung unseres Projekts auf dem Kongress der DOG.

Ich danke Dr. rer. nat. C. Brandstetter, Dr. rer. nat. J. Meyer und C. Strack für das Weitergeben Ihrer Erfahrung und Ihre Hilfsbereitschaft bei der täglichen Arbeit im Labor. Besonderer Dank geht an Dr. rer. nat. J. Marx für die gute Einarbeitung und stete Unterstützung.

Ein besonderer Dank von ganzem Herzen an meine Eltern für die bedingungslose Unterstützung meiner Ausbildung und meines Promotionsvorhabens.

Aus tiefem Herzen danke ich meinem Ehemann Martin Ziegler, der mich immer bestärkt und mir den Rücken freihält.

10 Publikationen

Teile dieser Dissertation sind bereits publiziert in:

Gross J, Willimsky E, Wegener AR., Kronschräger M, Schönfeld CL, Holz FG, et al.:
Ultraviolet Radiation Exposure of One Eye Stimulates Sympathizing Expression of Neurokinin-1
Receptor but not Monocyte Chemoattractant Protein-1 in the Partner Eye. *Ophthalmic Research*;
63(1):59-71: Epub 2019 Aug 13. DOI: 10.1159/000501320

Willimsky E, Munzig A, Mayer K, Biskup S, Abicht A et al.:
Next generation sequencing in pediatric epilepsy using customized panels: size matters. *Neuropediatrics*. *Neuropediatrics*. 2021 Apr;52(2):92-97. Epub 2020 Oct 21. DOI: 10.1055/s-0040-1712488

Gerstl L, Willimsky E, Rémi C, Noachtar S, Borggräfe I, Tacke M (2019):
A systematic review of seizure freedom rates in patients with benign epilepsy of childhood with
centrotemporal spikes (BECTS) receiving antiepileptic drugs. *Clin Neuropharmacol*. 2021 Mar-
Apr 01;44(2):39-46. DOI: 10.1097/WNF.0000000000000435

Willimsky E, Munzig A, Mayer K, Biskup S, Abicht A et al.:
Next generation sequencing bei pädiatrischen Epilepsien: Einfluss der Panel Größe auf die Er-
gebnisse. Poster, vorgestellt auf der Tagung der Gesellschaft für Neuropädiatrie, 03/2019

Willimsky E, Gross J, Wegener A, Kronschräger M, Schönfeld CL, Meyer LM:
UVR-B induced cataract is linked to an increased expression of inflammatory cytokines in the
lens epithelium in vivo: Poster, vorgestellt auf dem Kongress der DOG, 09/2017
Ausgezeichnet mit dem DOG Posterpreis