

**In-vitro-Untersuchung zur Schutzwirkung natürlicher und synthetischer
Huminsäuren gegenüber UVB-Strahlenschäden
an humanen Linsenepithelzellen**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Hohen Medizinischen Fakultät
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität
Bonn

Susanne Elisabeth John
aus Bonn - Bad Godesberg

2010

Angefertigt mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Priv.-Doz. Dr. rer. nat. A. Wegener
2. Gutachter: Prof. Dr. med. R. Bauer

Tag der Mündlichen Prüfung: 27.08.2010

Aus der Augenklinik der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

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

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	7
1. Einleitung	9
1.1 Die Linse des menschlichen Auges	9
1.2 Ultraviolette Strahlung	10
1.3 Wirkung der ultravioletten Strahlung	11
1.4 Schädigungen durch ultraviolette Strahlen am Auge und Entstehung der Katarakt.....	12
1.5 Apoptose vs. Nekrose	14
1.6 Mitochondrien unter UV-Bestrahlung	18
1.7 Huminstoffe, Vorkommen und Eigenschaften.....	20
1.8 Aufgabenstellung.....	22
2. Materialien und Methoden	23
2.1 Medien, Arbeitsmaterial, Geräte.....	23
2.1.1. Medien	23
2.1.2 Chemikalien und Lösungen.....	24
2.1.3 Arbeitsmaterialien	24
2.1.4 Geräte.....	25
2.2 Testsubstanzen.....	26
2.2.1 Paraaminobenzoessäure (PABA) - Referenzsubstanz.....	26
2.2.2 Hydrokaffeesäure-Oxidationsprodukt – synthetische Huminsäure	27
2.2.3 Huminsäure Aldrich – natürliche Huminsäure.....	27
2.2.4 Herstellung der Huminsäurelösungen für die Versuche	28
2.2.5 Herstellung der PABA-Lösung für die Versuche.....	29
2.3 Zellen.....	30
2.3.1 Verwendete Zelllinie.....	30
2.3.2 Standardkulturbedingungen.....	30

2.3.3 Zellzüchtung	31
2.3.4 Zellen einfrieren	31
2.3.5 Zellen auftauen.....	32
2.3.6 Zellzahlbestimmung:	32
2.4 Testmethoden	32
2.4.1 Neutralrottest.....	32
2.4.2 Bestimmung der Zytotoxizität der HS und von PABA	35
2.4.3 Bestimmung der Bestrahlungsdosis	36
2.4.4 Bestimmung der UVB-Strahlenwirkung in Gegenwart von HS und PABA	37
2.4.5 Mitochondrienfärbung mit dem Fluoreszenzfarbstoff MitoTracker®	38
2.4.6 Fototechnik.....	39
2.4.6.1 Bilder unter Phasenkontrastmikroskop	39
2.4.6.2 Bilder unter Fluoreszenzmikroskop	40
2.5 Statistische Auswertung und Berechnung	40
2.5.1 Berechnung der Substanzkonzentration bei halbmaximaler zytotoxischer Wirkung (CC_{50})	40
2.5.2 Berechnung der UV-B-protektiven Wirkung der Testsubstanzen	41
2.5.3 Berechnung der Substanzkonzentration bei halbmaximaler UV-B-protektiver Wirkung.....	42
2.5.4 Statistische Auswertung	42
2.6 Ablauf der Testung – Fließschema.....	44
3. Ergebnisse	45
3.1 Ermittlung der Bestrahlungsdosis.....	45
3.1.1 Bestimmung der Zytotoxizität von UVB-Strahlung mittels Neutralrottest	45
3.1.2 Morphologische Veränderungen an humanen Linsenepithelzellen unter UVB-Bestrahlung.....	47
3.2 Zytotoxizität und UVB-protektive Wirkung der Testsubstanzen.....	48
3.2.1 HS Aldrich (natürliche Huminsäure)	49
3.2.1.1 Bestimmung der Zytotoxizität von HS Aldrich	49
3.2.1.2 Bestimmung der UV-B-protektiven Wirkung von HS Aldrich	52

3.2.2 Hydrokaffeesäure-Oxidationsprodukt (synthetische Huminsäure)	53
3.2.2.1 Bestimmung der Zytotoxizität von HYKOP	54
3.2.2.2 Bestimmung der UVB-protectiven Wirkung von HYKOP	56
3.2.3 Paraaminobenzoessäure (PABA) – Referenzsubstanz	58
3.2.3.1 Bestimmung der Zytotoxizität von PABA	58
3.2.3.2 Bestimmung der UVB-protectiven Wirkung von PABA	61
3.2.4 Linseneithelzellen in serumfreiem Medium	63
3.3 Mitochondrienmorphologie und Verteilung in humanen Linseneithelzellen	64
3.3.1 Mitochondrien in der humanen Linseneithelzelle	64
3.3.2 Mitochondrien in serumfreiem Medium	66
3.3.3 UVB-Strahleneinfluss auf humane Linseneithelzellen	68
3.4. Untersuchung der Mitochondrien in humanen Linseneithelzellen bei Testsubstanz-Exposition ..	70
3.4.1 Huminsäure Aldrich	70
3.4.2 Hydrokaffeesäure-Oxidationsprodukt	72
3.4.3 Paraaminobenzoessäure	74
3.5 Untersuchung der Schutzwirkung der Prüfsubstanzen vor UVB-Strahlenschäden anhand der Mitochondrienmorphologie	75
3.5.1 HS Aldrich	75
3.5.2 Hydrokaffeesäure-Oxidationsprodukt	77
3.5.3 Paraaminobenzoessäure – PABA	79
3.6 Tabellarische Zusammenfassung der Ergebnisse	81
4. Diskussion	82
4.1 Protektion vor UV-Strahlung	82
4.1.1 Antioxidantien	83
4.1.2 Kaffeesäure	84
4.1.3 Huminsäuren	84
4.2 Methodendiskussion	85

4.2.1 Auswahl der Testverfahren.....	85
4.2.1.1 Neutralrottest.....	85
4.2.1.2 MitoTracker® Red	88
4.2.2 Auswahl der Zelllinie.....	92
4.2.3 Bestimmung der optimalen UVB-Bestrahlungszeit.....	93
4.2.4 Auswahl der UVB-Wellenlänge	95
4.3 Mitochondrien von Linsenepithelzellen nach UVB-Bestrahlung.....	96
4.4 Eigentoxizität und UVB-protective Wirksamkeit der HS	97
4.4.1 Natürliche Huminsäure: Aldrich	98
4.4.2 Synthetische HS: Hydrokaffeesäure-Oxidationsprodukt.....	102
4.4.3 Referenzsubstanz: PABA.....	105
4.5 Huminsäuren als UV-Schutz für das Auge.....	108
4.5.1 Fotosensibilisierung.....	108
4.5.2 Toxikologie, fototoxische und fotoallergische Reaktionen von UV-Filtern	109
4.5.3 Rezepturvorschlag für huminsäurehaltige Augentropfen mit UV-Schutz	111
5. Zusammenfassung.....	112
6. Anhang: Wertetabellen	114
9. Literaturverzeichnis	124
10. Danksagung	134

Abkürzungsverzeichnis

AIF	Apoptosis inducing factor
Apaf-1	Apoptosis activating factor 1
Bcl-2	B-cell lymphoma 2
CC ₅₀	Substanzkonzentration bei halbmaximaler Zellschädigung
COS-7	Fibroblasten-Zelllinie aus grünen Meerkatzen (<i>Cercopithecus aethiops</i>)
CT	Zytotoxizität
CMXRos	Chloromethy-X-rosamine
DD	Death Domain
DNA	Deoxyribonucleic acid
FBS	Fetales bovines Serum
HeLa	etablierte Epithelzelllinie aus einem Zervixkarzinom (Patientin: Henrietta Lacks)
HIV	Human immunodeficiency virus
hLEC	Human Lens epithelial cell(s)
HS	Huminsäure/Huminsäuren
HSV	Herpes simplex Virus
HYKOP	Hydrokaffeesäure-Oxidationsprodukt
KOP	Kaffeesäure-Oxidationsprodukt
LEC	Lens epithelial cell(s)
MEM	Minimal essential medium
MG	Molekulargewicht
MMP	Mitochondriales Membranpotenzial
MTT-Test	Zytotoxizitätstest 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
NR	Neutralrot
NRU	Neutral Red Uptake Cytotoxicity Assay
O.D.	Optische Dichte
σ	Standardabweichung
σ_n	Fehler des Mittelwertes
PABA	Paraaminobenzoessäure
PARP	Poly-ADP-Ribose-Polymerase
Pen/Strep	Penicillin/Streptomycin
PFA	Paraformaldehyd

Phako	Phasenkontrastmikroskop
PMP	Plasmamembranpotenzial
PUVA	Psoralen Ultraviolett A
RNA	Ribonucleic Acid
ROS	Reactive oxygen species
TNF-Rezeptor	Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptor
UV	Ultraviolette Strahlung
UVA	UV im Bereich 315-380 nm
UVB	UV im Bereich 280-315 nm
UVB-PC ₅₀	Halbmaximale UVB-protective Substanzkonzentration
UVB-PW	UVB-protective Wirkung
UVC	UV im Bereich 100-280 nm
UVI	Ultraviolett-Index
\bar{x}	Mittelwert
ZK	Zellkontrolle
ZS	Zellschaden/Zellschädigung

1. Einleitung

1.1 Die Linse des menschlichen Auges

Die Linse der Wirbeltiere ist in ihrem Aufbau und ihrer Versorgung ein einzigartiges Organ (Sachsenweger et al., 2003). Sie besitzt weder Blutgefäße noch Nerven und hat nur ein einschichtiges Linsenepithel unter der festen, elastischen vorderen Linsenkapsel (Abb.1). Während die Epithelzellen in der zentralen Region nur wenig mitotische Aktivität zeigen, teilen sie sich vermehrt in Richtung der äquatorialen Region (der germinativen Zone), wo sie sich letzten Endes in Linsenfasern ausdifferenzieren (Papaconstantinou, 1967; Piatigorsky, 1981). Diese einzelne Schicht an Linsenepithelzellen ist essentiell, um den metabolischen Haushalt aufrecht zu erhalten und die Transparenz der Zelle zu gewährleisten. Die regelmäßige räumliche Anordnung der Proteinmoleküle in den Faserzellen ist die morphologische und physikalische Grundlage für ihre Transparenz. Mit einem Proteingehalt von 35 % ist sie das eiweißreichste Organ des gesamten Körpers. Die Ernährung erfolgt durch Diffusion des Kammerwassers durch die Linsenkapsel, z.T. auch durch aktiven Transport (Kationenpumpen). Unter normalen Bedingungen haben diese Linsenepithelzellen eine relativ lange Lebenszeit, die aber durch äußere Einflüsse, wie etwa ultraviolette Strahlung drastisch verkürzt werden kann (Sachsenweger et al., 2003).

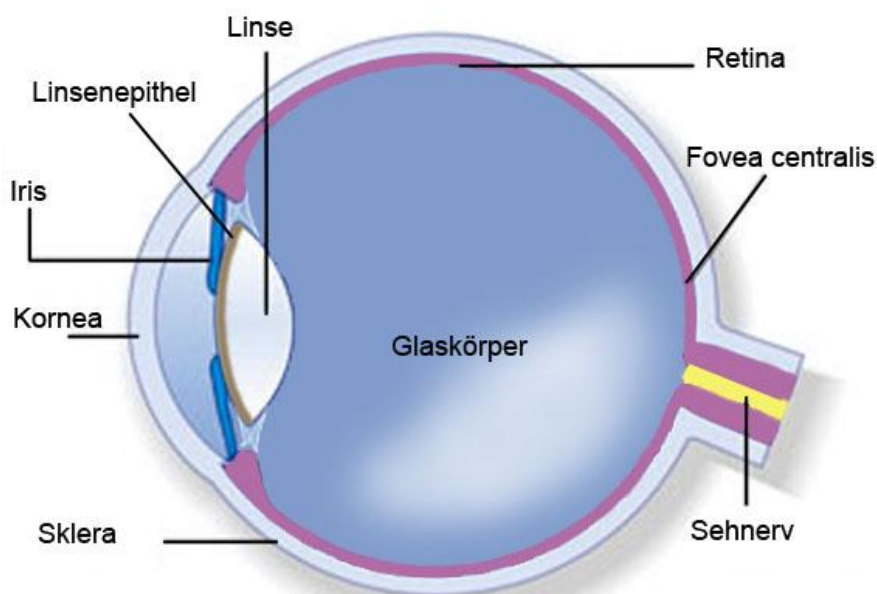


Abb. 1: Schematische Darstellung des anatomischen Aufbaus des Auges (eigene Darstellung)

1.2 Ultraviolette Strahlung

UV-Strahlung ist elektromagnetische Strahlung im Wellenlängenbereich von 1-380 nm und somit nur ein Teil des Gesamtspektrums des Sonnenlichtes (Abb. 2). Das Sonnenlicht setzt sich zusammen aus dem ultravioletten, dem sichtbaren und dem infraroten Strahlenbereich. Der Wellenlängenbereich von UV-Strahlung liegt zwischen den kürzerwelligen Röntgenstrahlen und dem sichtbaren Licht. Das sichtbare Licht ist nur ein kleiner Teil des gesamten elektromagnetischen Spektrums im Wellenlängenbereich zwischen 380 und 750 nm. Die UV-Strahlung kann noch weiter unterteilt werden in UV-A (Wellenlänge 380-315 nm), UV-B (Wellenlänge 315-280 nm), UV-C (Wellenlänge von 280-100 nm), ferne- und Vakuum UV-Strahlung (100-1 nm) (CIE, 1999).

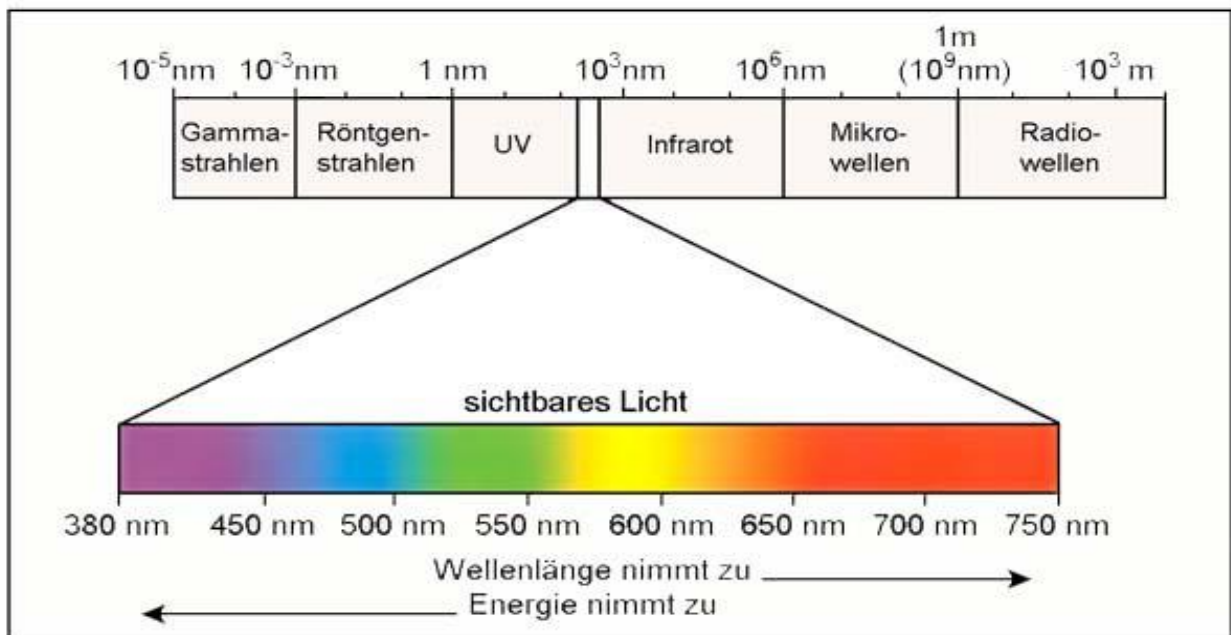


Abb. 2: Übersicht des elektromagnetischen Spektrums mit sichtbarem Spektrum im Detail. Oben im Bild: schematische Darstellung der Strahlungsbereiche, geordnet nach zunehmender Wellenlänge (modifiziert aus: Bickel-Sandkötter, 2009)

Aufgrund der Absorption in der Atmosphäre, insbesondere durch die Ozonschicht, dringt neben dem längerwelligen sichtbaren Licht vor allem UV-A- und teilweise UV-B-Strahlung oberhalb von 295 nm bis zur Erdoberfläche vor. UV-C wird komplett absorbiert und kann nicht auf der Erdoberfläche gemessen werden. Die Sonnenstrahlung, die bis zur Erdoberfläche vordringt, besteht zu 13 % aus UV-Strahlung (295-380 nm), zu 44 % aus sichtbarem Licht (380-750 nm) und zu 43 % aus infraroter Strahlung (780-1060 nm) (Pitts, 1993; Zigman, 1985). Bestimmte Gase, insbesondere FCKW, CO_2 und Methan führen

allerdings in zunehmendem Maße zu einer Abnahme der Ozonschicht, wodurch die UV-B-Exposition der Erdoberfläche zunimmt (Zigman, 1985). Die Menge der UV-Strahlung, die die Erdoberfläche erreicht, ist außerdem abhängig vom Sonnenstand und deren Erhebungswinkel (Sliney, 1986). Somit variiert die UV-Dosis, welche direkt auf die Erdoberfläche einfällt und als UV-Index (UVI) bezeichnet wird, mit der Tageszeit, Jahreszeit, Höhe über dem Meeresspiegel und anderen umweltbedingten Faktoren, wie Wolken, Landschaft, Bodenreflexionen und Luftverschmutzung.

1.3 Wirkung der ultravioletten Strahlung

Der kleinste Anteil der Sonnenstrahlung, der bei Organismen auf der Erde ankommt, sind die ultravioletten Strahlen (CIE, 1989). Dennoch haben die ultravioletten Strahlen aufgrund ihrer höheren Photonenenergie den größten biologischen Einfluss, verglichen mit der von sichtbarem und infrarotem Licht (Christiaens et al., 2005).

UV-Strahlung beeinflusst die menschliche Gesundheit und kann potentiell Säugetierzellen schädigen (Longstreth, 1998). Sie verursacht kurzfristig Sonnenbrände (Daniels et al., 1968) und Hautbräunung (Bargoil und Erdman, 1993). Am Auge zeigen sich akute UV-Strahlenschäden in Form von Bindehautentzündungen. Langfristig können UV-Strahlen zu vorzeitiger Hautalterung (Yaar & Gilchrest, 1998) und Hautkrebs führen (Darr und Fridovich, 1994; Elwood und Jopson, 1997; Urbach, 1991), wobei UVB-Strahlung als Hauptursache des Non-Melanomkarzinoms betrachtet wird (Setlow, 1974). Daneben sind DNA-Schäden (Jones et al., 1987), genetische Mutationen (Wikonkai und Brash, 1999), Immunsuppression (Vink et al., 1996) und Augenkrankheiten, wie Katarakt und Pterygium (Hayashi et al., 1998; Sliney, 1994;) beschrieben. In erster Linie sind die UV-Strahlen mit kurzer Wellenlänge, d.h. UV-B-Strahlung, für diese schädigenden Einflüsse verantwortlich. Auch für die Augenlinse konnte die UV-B-Strahlung als die schädlichste ausgemacht werden (Bachem, 1956; Merriam et al., 2000; Pitts et al., 1977).

Elektromagnetische Strahlung mit größerer Wellenlänge, wie z.B. UV-A, kann ebenfalls Säugetierzellen schädigen, allerdings ist ihr Einfluss auf die DNA relativ gering und dies obwohl ihr Anteil an der Sonnenstrahlung tausendfach höher liegt als der von UV-B (Godar et al., 2001; Sliney, 2002).

Schon eine geringe Zunahme der ultravioletten Strahlung kann die menschliche Gesundheit und die Biosphäre ernsthaft beeinflussen (McKenzie, 1999). Eine Abnahme der UV-B-Absorption durch die Ozonschicht kann zu einem Anstieg von Hautkrebs und vielleicht sogar zu immunologischen Problemen bei Menschen sowie bei Land- und Wasserlebewesen führen (Brown, 1999). Zudem ergaben Schätzungen, dass ein weiterer Schaden an der Ozonschicht von nur einem Prozent zu 100.000 bis 150.000 weiteren Kataraktfällen pro Jahr weltweit führen wird (Longstreth, 1998).

Neben der potentiell schädlichen Wirkung der UV-Strahlung ist sie aber auch eine der wichtigsten Quellen für natürliche Energie und spielt eine zentrale Rolle in einer Vielzahl von biologischen Prozessen.

Pflanzen brauchen Sonnenlicht, um zu wachsen und Kohlenhydrate und Sauerstoff herzustellen. Der Mensch benötigt UV-Strahlung für die Herstellung von Vitamin D in Hautzellen. Vitamin-D-Metaboliten fördern die Absorption von Calcium im Verdauungstrakt und sind somit unverzichtbar für das Wachstum eines stabilen Knochengestüts.

Außerdem wird UV-Strahlung in diversen diagnostischen und therapeutischen Bereichen eingesetzt. Mehr als 30 Krankheitsbilder können mit einer Kombination aus UV-A und Psoralen (PUVA-Therapie) behandelt werden. Darunter finden sich am häufigsten die Psoriasis und das Hautekzem. In der Neonatologie wird UV-A zur Fototherapie der Neugeborenen-Gelbsucht und Hyperbilirubinämie angewandt.

1.4 Schädigungen durch ultraviolette Strahlen am Auge und Entstehung der Katarakt

Schon gegen Ende des 19. Jahrhunderts entdeckte Widmark den kataraktogenen Effekt von UV-Strahlung und die abschwächenden Eigenschaften der Linse auf die optische Strahlung (Widmark, 1891). 1901 beschrieb er Schädigungen am Epithel von Hasenlinsen, geschwollene Linsenfasern, aber keine Schädigung am Linsenäquator, nach kontrollierter UV-Strahlenexposition (Widmark, 1901).

Das Auge ist dauerhafter UV-Strahlung ausgesetzt. Wobei die Hornhaut (Kornea) des Auges für alle Wellenlängen oberhalb von 290 nm durchlässig ist, während die Linse nur Wellenlängen von über 340 nm passieren lässt. Daraus ergibt sich, dass die Linse nahezu alle Energie zwischen 290 und 340 nm absorbiert. Gemäß dem ersten Gesetz der Fotochemie von Grotthus-Draper, kann nur absorbierte

Strahlenenergie schädigende Einflüsse auf ein Gewebe und dessen Zellen ausüben. Somit ist es am Auge das Linsenepithel das am stärksten von UVB-induzierten Strahlenschäden gefährdet wird.

Neben der Sonnenstrahlung gibt es noch weitere Quellen von UV-Strahlung, wie z.B. Lichtbogenschweißlampen, Laser und einige andere medizinische und zahntechnische Gerätschaften (WHO, 1994). Trotzdem ist die Sonne die größte und bedeutendste Quelle für UV-B-Strahlung und somit in erster Linie für Menschen, die im Freien arbeiten, von gesundheitlicher Bedeutung. Daher zählen Bauern und Landarbeiter zu den meist exponierten Gruppen. Epidemiologische Studien ergaben, dass Freiluftarbeiter eher zu Katarakt neigen als solche, die die meiste Zeit in geschlossenen Räumen arbeiten (Burton et al. 1997; Delcourt et al., 2000; Italian-American Cataract study Group, 1991; Leske et al., 1991). In einzelnen Fallstudien konnten zusätzliche Beweise für einen Zusammenhang zwischen UV-Strahlung und Kataraktformation beim Menschen erbracht werden (Lerman, 1980; Müller-Breitenkamp et al., 1997). Darüber hinaus wurde in zahlreichen Tierexperimenten mit Ratten, Mäusen, Kaninchen und Eichhörnchen Kataraktformation durch UV-B-Strahlung nachgewiesen (Ayala, 2000; Meyer et al., 2005; Michael, 2000; Söderberg, 1988; Wegener 1994;), wobei ein dosisabhängiger Zusammenhang zwischen UV-Strahlung und anschließender Eintrübung der Linse besteht. Die meisten Katarakte entwickeln sich aus einer zunehmenden Eintrübung der Linse.

Normalerweise durchlaufen Linsenepithelzellen die Mitose bis sie schließlich im Laufe ihres Lebens zu Linsenfaserzellen ausdifferenzieren (Harding et al., 1971). Man geht davon aus, dass DNA-Schäden in Linsenepithelzellen zu fehlerhafter Linsenfaserzellenbildung führen, wodurch die Kataraktbildung initiiert wird (Worgul et al., 1989).

Auf mikroskopischer Ebene lassen sich UV-Schäden an der Linse durch Schwellung und Auseinanderreißen von Linsenepithelzellen und kortikalen Linsenfaserzellen erkennen (Breadsell et al. 1994; Söderberg, 1988). Desweiteren finden sich geschwollene Mitochondrien, subkapsuläre Vakuolen, Chromatinkondensationen und Kernfragmentierungen in den Linsenepithelzellen (Söderberg, 1988).

UV-Strahlung kann die Linsenepithelzelle über mehrere Mechanismen schädigen: Protein-Quervernetzungen (cross-linking), DNA-Schädigungen, Inaktivierung oder Veränderung von Enzymen und Schädigungen der Membranen.

Auf molekularer Ebene wurde UVB-Schaden mit der Bildung von *reactive oxygen species* (ROS) in Verbindung gebracht (Heck et al., 2003). Zu den gebildeten ROS zählen freie Sauerstoffradikale,

Hydrogenperoxide, Superoxid-Ionen und Hydroxyl-Radikale (Hedge und Varama, 2004). Die Linse selbst besitzt darüber hinaus Enzyme, mit denen sie auch endogene ROS produzieren kann.

Damit das Redoxsystem der Linse im Gleichgewicht bleibt und somit die Lichtdurchlässigkeit der Linse gewährleistet bleibt, hat die Linse ein ausgefeiltes Abwehrsystem gegen oxidativen Stress. Zum einen gibt es ein nicht-enzymatisches Abwehrsystem, hierzu zählen z.B. Glutathione, Vitamin C, Vitamin E und Karotenoide.

An Albinoratten konnte gezeigt werden, dass Vitamin E vor Katarakt schützen kann bei UV-B-Exposition mit einer Wellenlänge von 300 nm (Ayala & Söderberg, 2004). Man nimmt an, dass der protektive Effekt von Vitamin E auf dessen antioxidative Eigenschaften zurückzuführen ist. Zu den enzymatischen Abwehrmechanismen zählen die Glutathion-Peroxidase, Katalase und die Glutathion-abhängige Thioltransferase (Lou, 2003). Wenn diese Abwehrmechanismen nicht ausreichend, oder defekt sind, können ROS akkumulieren und Sulfhydryl-abhängige Enzymsysteme inaktivieren. Proteine aggregieren durch Bildung von Protein-Protein-Disulfidbrücken. Farbveränderungen der Linse werden durch Bildung von Chromophoren verursacht. Membranstrukturen werden zerstört durch Lipidperoxidation (Chylack, 2004). Hauptquelle für ROS in der Linse ist ultraviolette Strahlung, da die Linse auf Grund ihrer anatomischen Lage (Abb.1) einer ständigen UV-Exposition ausgesetzt ist (Lou, 2003).

1.5 Apoptose vs. Nekrose

Zellen können grundsätzlich durch zwei verschiedene Mechanismen absterben, die als Nekrose (*nekr-*: abgestorben, tot; *-osis*: Krankheit, krankhafter Zustand) und Apoptose (*apo-*: ab-, weg-; *-ptosis*: Fall) bezeichnet werden (Majno und Joris, 1995).

Während die Nekrose eine passive Reaktion der Zelle auf eine Schädigung darstellt, ist die Apoptose ein von der Zelle aktiv gesteuerter Prozess. Die beiden Vorgänge werden deshalb auch als „*accidental cell death*“ beziehungsweise programmierter Zelltod (*programmed cell death*) beschrieben. Beide Arten des Zelltodes unterscheiden sich hinsichtlich der molekularen und morphologischen Veränderungen der betroffenen Zellen (Abb. 3).

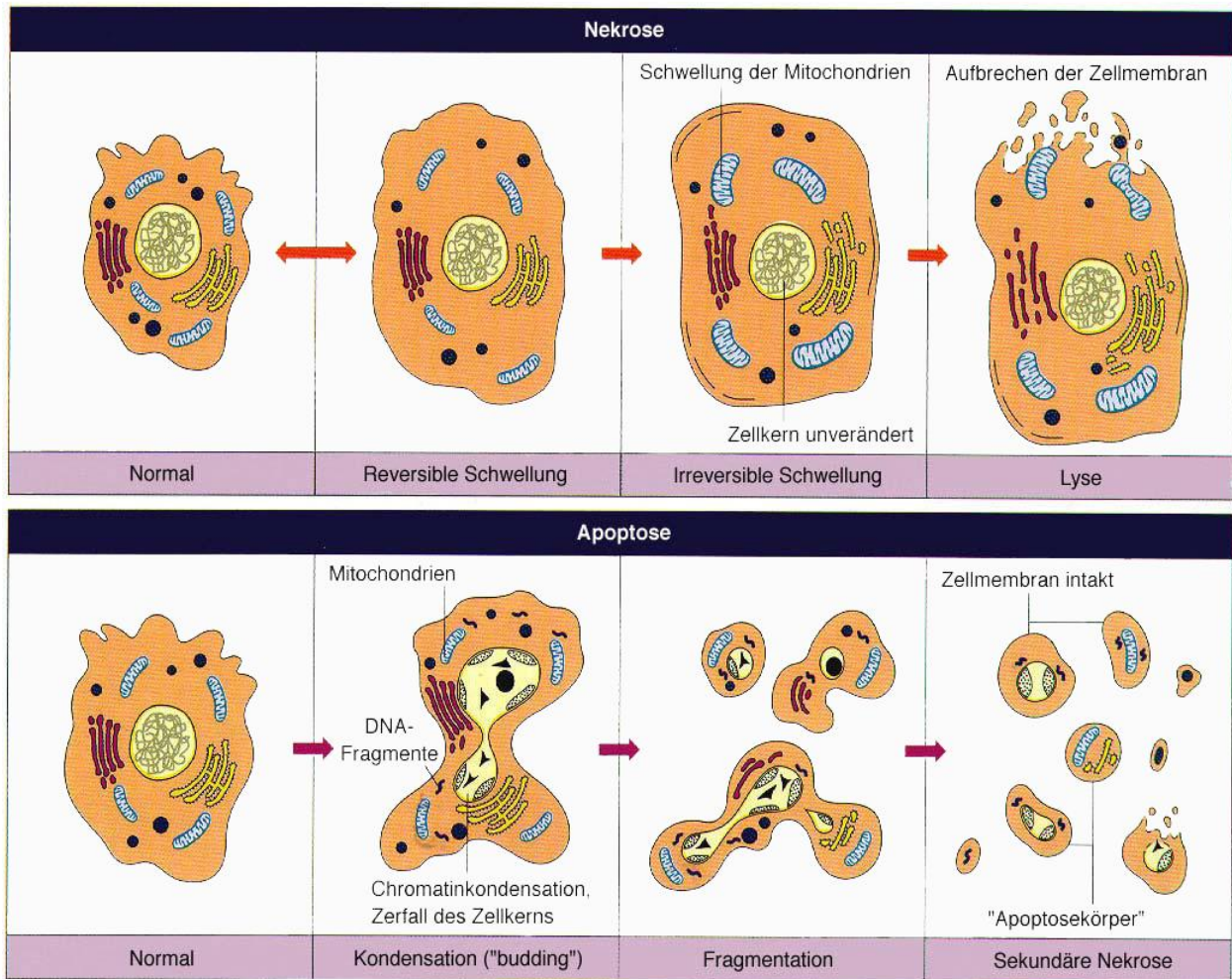


Abb. 3: Zellmorphologische Veränderungen bei Apoptose und Nekrose (modifiziert aus: Wyllie, 2005)

Die Nekrose wird durch physikalisch-chemische Einflüsse wie Verletzung, Verbrennung, Verätzung, Ischämie und toxische Substanzen induziert (Majno und Joris, 1995). Diese verursachen einen Ausfall der membranständigen Ionenpumpen, der zum osmotischen Anschwellen des Zellkerns, der Mitochondrien und der Zelle als Ganzem führt. Im weiteren Verlauf wird der Zellkern aufgelöst ("Karyolyse") und die DNA degradiert. Schließlich geht die Integrität der Zellmembran verloren und es kommt zur Lyse der Zelle. Dabei werden Arachidonsäurederivate und andere zelluläre Bestandteile freigesetzt, die eine lokale Entzündungsreaktion hervorrufen.

Die Apoptose dagegen ist ein physiologischer Vorgang, der unter anderem im Rahmen der Embryonalentwicklung, der Geweberegeneration, der Beendigung einer Immunantwort und der Beseitigung genetisch geschädigter Zellen auftritt (Majno und Joris, 1995). Mikroskopisch lässt sich im

Gegensatz zur Nekrose eine Schrumpfung und Verdichtung der Zelle und des Zellkerns mit einer Kondensation des Chromatins beobachten ("Pyknose"). Die DNA wird von speziellen DNasen internukleosomal gespalten und der Zellkern zerfällt schließlich ("Karyorrhexis"). Die Zelle bricht die Kontakte zu ihren Nachbarzellen ab und löst sich aus dem Zellverband heraus. Es kommt zu Ausstülpungen der Zellmembran ("Zeiose" oder "*budding*") und zur Abschnürung von Vesikeln, den sogenannten Apoptosekörpern. Die Apoptosekörper sowie der verbliebene Zellrest werden aufgrund spezifischer Membranveränderungen wie der Exposition von Phosphatidylserin rasch von Makrophagen erkannt und phagozytiert. Im Gegensatz zur Nekrose bleibt im gesamten Verlauf der Apoptose die Zellmembran intakt, so dass eine Entzündung durch freigesetzte Zellbestandteile verhindert wird.

Zu beachten ist jedoch, dass eine strenge Trennung des Zelltodes in Apoptose und Nekrose nicht immer möglich ist. So haben Untersuchungen an Myozyten und an humanen Promyelozytenleukämie-Zellen einen dosisabhängigen Zusammenhang zwischen Nekrose und Apoptose ergeben. Niedrige Dosierungen des zelltodauslösenden Agens führten zu Apoptose, während hohe Dosierungen Nekrose einleiteten (Burniston et al., 2005; Zaucke et al., 1998).

Die Apoptoseinduktion benötigt zytosolische Enzyme, die Kaspasen. Kaspasen sind Cysteinproteasen (d.h. Proteasen mit Cystein in ihrem aktiven Zentrum). Bislang konnten 13 verschiedene Kaspasen beim Menschen klassifiziert werden. Die Kaspasen bewirken den Tod der Zelle, indem sie unter anderem die Zerstörung von Zytoskelettkomponenten wie Lamin A, die Spaltung von DNA-Reparaturenzymen wie PARP, sowie die Aktivierung der für die DNA-Fragmentierung verantwortlichen Endonukleasen bewirken. Die Kaspaseaktivierung und die darauffolgende Apoptose kann auf zwei Wegen eingeleitet werden, zum einen durch mitochondriale Membranveränderungen und zum anderen durch Todesrezeptoren (Fas-Rezeptor oder TNF-Rezeptoren) in der Plasmamembran (Abb. 4).

DNA-Schädigung durch Bestrahlung, Chemotherapeutika und Glucocorticoide können Apoptose über den mitochondrialen Weg einleiten. Der mitochondriale Weg, auch intrinsischer Apoptoseweg genannt, ist meist hervorgerufen durch Stress oder ein Fehlen von Überlebensstimuli („*death by neglect*“). Darauf folgt ein rascher Anstieg der Membranpermeabilität in den Mitochondrien. In der Folge strömen zahlreiche Proteine, darunter Cytochrome C in das Zytoplasma (Desagher und Martinou, 2000). Der Mechanismus, der zur Steigerung der Mitochondrienmembranpermeabilität führt, ist bislang noch unbekannt und Gegenstand gegenwärtiger Forschung.

Zytochrom C fungiert als Kofaktor von Apoptosis activating factor-1 (Apaf-1), gemeinsam aktivieren sie die Caspase-9, welche wiederum die Apoptose einleitet (Abb. 4). Daneben gibt es auch noch einige

andere Proteine, die von den Mitochondrien freigesetzt werden und zu einer direkten Inaktivierung der anti-apoptotischen Bcl-Protein-Familie führen.

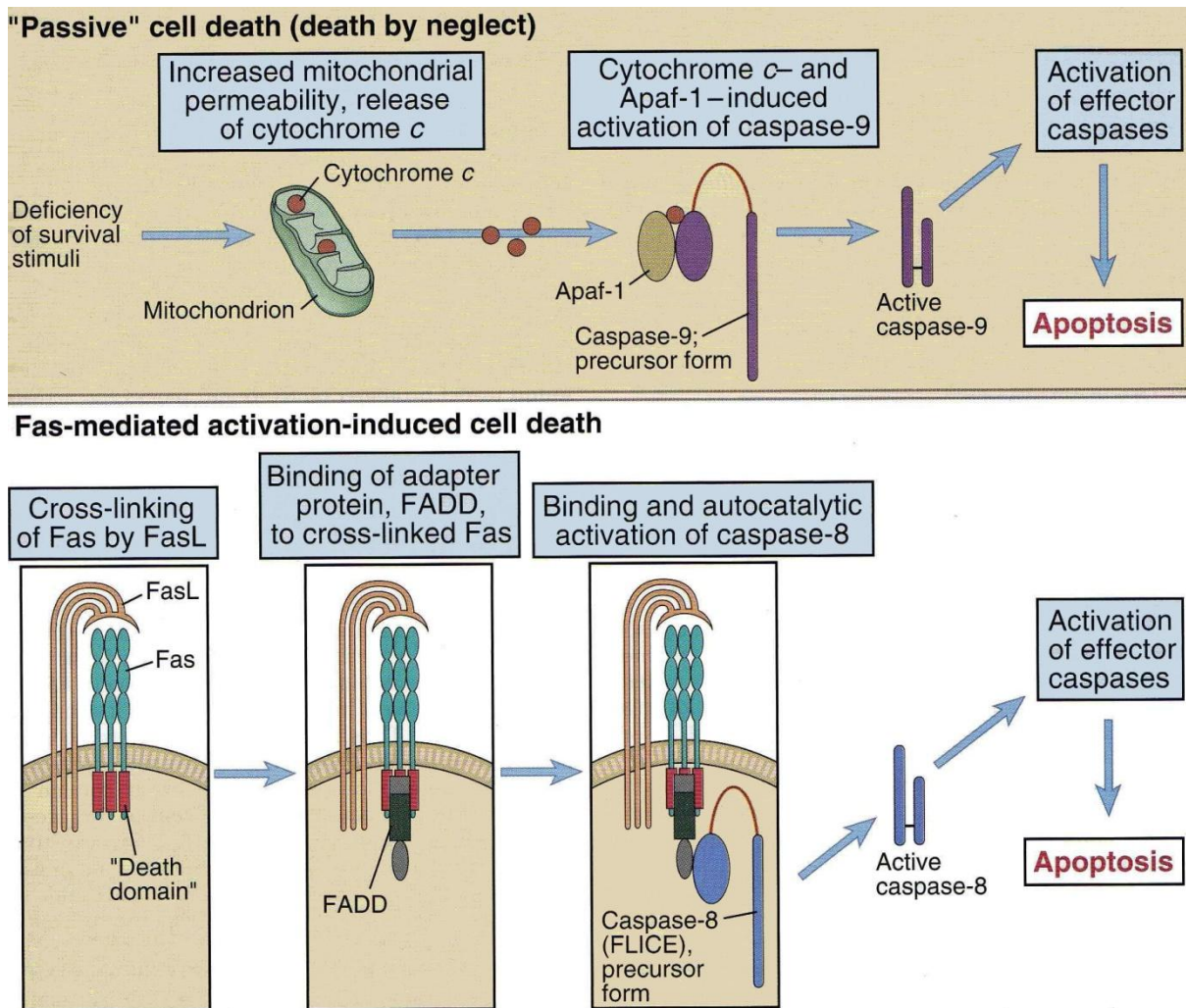


Abb.4: Schematische Darstellung der biochemischen Mechanismen bei Apoptose. Die obere Bildhälfte zeigt den Ablauf der Apoptose bei fehlenden Überlebensstimuli unter Ausschüttung von Zytocrom C. In der unteren Bildhälfte wird der Zelltod über membranständige FAS-Rezeptoren eingeleitet (aus: Abbas und Lichtman, 2005)

Der aktiv induzierte Zelltod durch Todesrezeptoren (extrinsischer oder rezeptorvermittelter Apoptoseweg) wird über membranständige Rezeptoren moduliert. Die meisten Todesrezeptoren gehören der TNF-Rezeptorenfamilie an, deren gemeinsames Merkmal die intrazelluläre Todesdomäne (*death domain*, DD) ist, die für die Signaltransduktion von Bedeutung ist. Im Gegensatz zum mitochondrialen Apoptoseweg wird anstelle der Caspase-9, Caspase-8 aktiviert, die dann ebenfalls die Apoptose einleiten kann (Abbas und Lichtman, 2005).

Experimente an Linseneithelzellen konnten zeigen, dass Apoptose ein initialer Faktor in der Entstehung von nonkongenitalen Katarakten ist (Li et al., 1995; Li et al., 1996; Michael R. et al., 1998). Physiologischer Weise kommt Apoptose in LEC während der embryonalen Linsenentwicklung vor, Ihre genaue Rolle in der Linse des Erwachsenen ist noch nicht vollständig verstanden (Wride, 1996). Die Fehlregulation von Apoptose in LEC ist allerdings assoziiert mit Eintrübungen der Rattenlinse und kann sowohl durch oxidativen Stress, als auch durch UVB-Strahlung hervorgerufen werden (Li et al., 1995; Li et al., 1996; Spector, 1995; Wride, 1996;).

24 h nach Schwellendosis-Exposition mit UVB-Strahlung wurde ein Apoptose-Maximum im Linseneithel von Ratten nachgewiesen (Michael et al., 1998). Die toten Zellen werden aus dem Epithel durch Phagozyten abgeräumt. Es erscheint sehr wahrscheinlich, dass die Zellen nach UV-Exposition einen Reparaturprozess durchlaufen und dass die Zellen, die nicht mehr zu reparieren sind, dem programmierten Zelltod zum Opfer fallen. Somit hilft Apoptose fehlerhafte Zellen zu entfernen. Würden diese Zellen weiterhin im Zellverband verbleiben, so könnten sie das Wachstum der Linse und deren Lichtdurchlässigkeit beeinträchtigen.

1.6 Mitochondrien unter UV-Bestrahlung

Das Mitochondrium, auch bekannt als das „Kraftwerk der Zelle“, produziert Energie durch oxidative Phosphorylierung und Lipidoxidation (Frey und Mannella, 2000). Daneben ist das Mitochondrium noch für viele weitere metabolische Prozesse verantwortlich, wie z.B. Harnstoffproduktion, Steroid-Biogenese, intrazelluläre Ca^{2+} Homöostase und vieles mehr. Allerdings sind viele dieser Funktionen in ihrem Ablauf und vor allem Ihrer Regulation noch wenig verstanden und untersucht (Wallace et al., 1998). Seit der Weiterentwicklung von geeigneten Farbstoffen für die Mitochondrienfärbung konnten mittels der Fluoreszenzmikroskopie einige neue Erkenntnisse über Mitochondrien in Linsen erbracht werden. So hatten die ersten elektronenmikroskopischen Analysen in den späten 60er Jahren postuliert, dass Linsenfaserzellen keinerlei Mitochondrien enthielten. Dies konnte mittels Fluoreszenzmikroskopie widerlegt werden (Bantseev & Sivak, 2005).

Mitochondrien sind nicht die statischen Organellen, wie man sie aus vielen Lehrbüchern kennt. Im Gegenteil, sie unterliegen ständigen Veränderungen betreffend ihrer Form und ihrer biologischen

Anordnung. Abhängig von ihrer Funktion und dem jeweiligen Zellzyklus kann man sie als sphärische, länglich-fadenförmige oder tubuläre, gar verzweigt Strukturen vorfinden. Die länglich-tubuläre Form wird durch Interaktion mit dem Zytoskelett hervorgerufen (Boldogh & Pon, 2007). Daneben kann die Form auch durch Fusion und Teilung der Mitochondrien bestimmt werden. Die sphärische Form ist die energetisch günstigste Form, sie hat die geringste Oberflächenspannung aufgrund des günstigen Verhältnisses zwischen Oberfläche und Volumen.

Mit Hilfe von Videomikroskopie konnten dynamische Bewegungen der Mitochondrien innerhalb der Zelle dokumentiert werden. Entsprechend der Endosymbiontentheorie sind Mitochondrien früher einmal Prokaryonten gewesen, die von eukaryontischen Zellen aufgenommen wurden und seither in einem symbiotischen Verhältnis zusammen arbeiten und leben. Dennoch besitzen die Mitochondrien selbst weder Flagellen, Zilien, noch jedwede andere Organellen, die für Bakterienbewegungen typisch wären (Boldogh & Pon, 2007). Somit ist für die Bewegung der Mitochondrien eine Interaktion mit dem Zytoskelett der Zelle unabdingbar, sie bewegen sich mit Hilfe von Mikrotubuli (Boldogh & Pon, 2007). Die Mitochondrienbewegung kann durch äußere Stimuli wie z.B. UV-B-Bestrahlung beeinflusst und sogar gestoppt werden. Außerdem konnten Fragmentierung und Schwellung der Mitochondrien in UVB-bestrahlten LEC nachgewiesen werden (Bantseev und Youn, 2006).

Neuere Studien zeigen, dass, anders als bislang angenommen, die Mitochondrien sich nicht nur während der Nekrose verändern, sondern auch bei Apoptose zahlreiche morphologische Veränderungen vorkommen. Zu den häufigsten Veränderungen zählen Reduktion der Größe und Verdichtung der Matrix, häufig auch „*mitochondriale Pyknose*“ genannt. Zudem ist die Verteilung der Mitochondrien durch Apoptose stark beeinflusst. In der intakten Zelle finden sich Mitochondrien über das gesamte Zytoplasma verteilt, während bei apoptotischen Zellen die Mitochondrien perinukleär gehäuft vorkommen (Desagher und Martinou 2000). Häufig wird auch Fragmentierung und Schwellung der Mitochondrien beschrieben (Gao et al., 2001).

1.7 Huminstoffe, Vorkommen und Eigenschaften

Huminsäuren sind eine Gruppe von höhermolekularen Polymeren, die hauptsächlich aus der Zersetzung von organischem Pflanzenmaterial entstehen. Sie stellen den größten Anteil in der Gruppe der Huminstoffe dar. Die Huminstoffe können weiterhin unterteilt werden in Humine und Fulvinsäuren. Humine sind unlösliche Stoffe, während Fulvinsäuren sowohl im sauren, als auch im basischen pH-Bereich löslich sind. Huminsäuren selbst sind nur im basischen pH-Bereich löslich. Huminsäuren kommen in größerem Maße in Torf, Erde und Oberflächenwasser vor. Sie bestehen aus einer Mischung von nahe verwandten komplexen aromatischen Polymeren. Die genaue Zusammensetzung der Huminsäuren variiert mit der geographischen Herkunft der Präparate. Chemische und Infrarotspektroskopische Analysen konnten zeigen, dass die Huminsäuren aromatische Ringe, phenolische Hydroxyle, Ketoncarbonyle, Chinoncarbonyl-, Carboxyl- und Alkyl-Gruppen enthalten (Stevenson, 1985). Davon spielen die sauerstoffhaltigen Carboxyl-, Hydroxyl- und Carbonylgruppen für die biologische Wirkung die wichtigste Rolle. Sie können Bestandteile der phenolischen Grundkörper der Huminsäuren sein oder an Seitenketten gebunden vorkommen (Choudry, 1984).

Natürliche Huminsäuren aus Humus, Torf, Schlamm und Kohle finden Anwendung als pharmakologische Präparate für diverse medizinische Indikationen. Vor allem in der Veterinärmedizin haben Huminsäuren heutzutage ein breites Anwendungsspektrum. Bereits in den 60er Jahren wurden die ersten huminsäurehaltigen Tierarzneimittel entwickelt. Beispielsweise wurde Torfmull aufgrund seiner viruziden Wirkung zur Bekämpfung der Maul- und Klauenseuche eingesetzt (Schultz, 1965).

Aufgrund ihrer lokalen anti-inflammatorischen Wirkung, können Huminsäuren erfolgreich als entzündungshemmende Mittel verwendet werden. Dies konnte im Tierexperiment am Eiweißödem der Rattenpfote nachgewiesen werden (Klöcking et al., 1968). Der antibakterielle Effekt von Huminsäure aus Kohle, von Fulvinsäuren und Humus-Extrakten wurde untersucht. Auch antivirale Wirkung, unter anderem gegen das HI-Virus und HSV, konnten für Oxihumate und synthetische Huminsäureanaloga nachgewiesen werden (Klöcking et al., 2002; Schneider et al., 1996; van Rensburg et al., 2002). Darüber hinaus konnte an HIV-infizierten Patienten eine Immunsystem-stimulierende Wirkung von HS gezeigt werden (Jooné et al., 2003).

Auf Kollagen haben Huminsäuren einen stabilisierenden Effekt (Riede et al. 1992). Die In-vitro-Inkubation mit Huminsäuren konnte den Zerreißungspunkt der Schwanzsehne von Ratten um 75 % erhöhen. Es

wird angenommen, dass dies mit einer Interaktion der Huminsäuren mit den Wasserstoffbrücken- und kovalenten Bindungen der Kollagenfasern zusammenhängt.

Daneben konnte in einer neueren Studie ein antitumoraler Effekt von Humusextrakten auf transplantablen Lymphozyten-Leukämie-Zellen (L1210-Zellen) in Mäusen gezeigt werden (Kodama, 2007).

Wie fast alle Arzneimittel haben Huminstoffe allerdings nicht nur positive Wirkungen auf die Gesundheit von Menschen und Tieren. Zum einen konnte ein kausaler Zusammenhang zu Strumen festgestellt werden (Cooley et al., 1985), zum anderen soll die Blackfoot Disease, eine endemische, perivaskuläre Krankheit, die überwiegend an der Südwestküste von Taiwan vorkommt, durch huminsäurehaltiges Brunnenwasser verursacht werden (Yang et al., 2002). Die Symptome dieser Krankheit ähneln der von Arteriosklerose. Ihren Namen erhielt die Krankheit allerdings durch den Befall von peripheren Gefäßen, vorwiegend an den Beinen und Füßen. Die Minderdurchblutung führt zu gangränöser Schwarzfärbung eben dieser Gliedmaßen, die in der Folge häufig zu Amputationen führen. Allerdings werden für diese Krankheit die sogenannten „fluoreszierenden Huminsäuren“ verantwortlich gemacht. Bislang ist ungeklärt, in welcher Beziehung diese Huminsäuren zu den bei uns vorkommenden natürlichen Huminsäuren stehen.

An humanen Endothelzellen und humanen promyelozytischen Leukämie HL-60-Zellen können Huminsäuren Apoptose einleiten. Beide Zellarten zeigten die typischen morphologischen Veränderungen wie Chromatinkondensation, intranukleäre DNA Fragmentierung und Zelltod (Hseu et al., 2002; Yang et al., 2004;).

1.8 Aufgabenstellung

In vorausgegangenen Studien konnte gezeigt werden, dass natürliche Huminsäuren (HS) und einige synthetische HS-ähnliche Polymere (u.a. Hydrokaffeesäure-Oxidationsprodukt, HYKOP) eine protektive Wirkung gegenüber UV-B-bedingten Strahlenschäden an U937 Zellen, einer humanen promonozytären Zelllinie, entfalten (Hübner, 2004; Kühn, 2005).

Die günstigen Ergebnisse hinsichtlich der fotoprotektiven Wirkung sowie der geringen Eigentoxizität der HS auf U937-Zellen, regten dazu an, die Untersuchung an humanen Linsenepithelzellen durchzuführen. Schwerpunkt der Untersuchung sollte die mögliche Anwendung von HS als UV-B-protective Substanz am Auge sein.

Zu diesem Zweck werden eine natürliche Huminsäure (HS Aldrich) und eine synthetische Huminsäure, das Hydrokaffeesäure-Oxidationsprodukt (HYKOP), getestet. HYKOP hatte sich als besonders günstig in seinen Eigenschaften als fotoprotektive Substanz erwiesen (Kühn, 2005). Als Referenzsubstanz für die UV-B-protective Wirkung wird Paraaminobenzoessäure (PABA) verwendet.

Gleichzeitig ist für diese Arbeit die Mitochondrienfunktion, -morphologie und -verteilung innerhalb der humanen Linsenepithelzellen von Bedeutung. Zum einen soll der Effekt der UVB-Bestrahlung und zum anderen der Einfluss der HS auf die Zelle und ihre Mitochondrien beurteilt werden.

Weiterhin beschäftigt sich diese Arbeit mit der Regenerationsfähigkeit des Linsenepithels nach einem erlittenen UV-B-Strahlenschaden. Zu diesem Zweck musste zunächst eine Bestrahlungszeit ermittelt werden, die einen deutlichen Schaden verursacht ohne dabei alle Zellen zu töten.

Die Zellvitalität wurde mittels des Neutralrottests bestimmt. Dieser Test wurde zur Bestimmung der UV-B-protectiven Wirkung und der Zytotoxizität von UV-B-Bestrahlung sowie der Zytotoxizität der HS selbst verwendet.

Der Einfluss von UV-B-Bestrahlung und der HS auf die Mitochondrien von humanen Linsenepithelzellen (hLEC) wurde durch Anfärbung der Mitochondrien mittels MitoTracker® und anschließender Beobachtung mit einem Fluoreszenzmikroskop ermittelt und auf Fotos festgehalten.

2. Materialien und Methoden

2.1 Medien, Arbeitsmaterial, Geräte

2.1.1. Medien

Minimal Essential Medium Eagle (MEM), rot, mit Indikator, mit L-Glutamin PAA Laboratories GmbH, 35091 Cölbe
Art-Nr.: E15-825

Minimal Essential Medium Eagle (MEM), ohne Indikator, ohne L-Glutamin Invitrogen Ltd, Paisley PA4 9RF, UK
Art-Nr.: 51200-046

Fetales bovines Serum (FBS), getestet auf Mycoplasmen PAA Laboratories GmbH, 35091 Cölbe
Kat-Nr.: A15-104
Chargenr.: A10406-1111/R2181

Penicillin/Streptomycin (100x) PAA Laboratories GmbH, 35091 Cölbe
Art-Nr.: P11-010

Wachstumsmedium:

Als Standardmedium wurde das MEM (mit Indikator und L-Glutamin) mit 10 % FBS und 1 % Penicillin/Streptomycin angesetzt.

Versuchsmedium:

Für die Versuche wurde MEM ohne Indikator, ohne L-Glutamin, ohne FBS und ohne Penicillin/Streptomycin verwendet.

2.1.2 Chemikalien und Lösungen

- 10 M Natriumhydroxid-Lösung (NaOH) (AppliChem GmbH, Darmstadt)
- Aqua dest. (Delta Select GmbH, Dreieich)
- Calciumchlorid (CaCl₂) (AppliChem GmbH, Darmstadt) Art.-Nr.: A4689
- DMSO Dimethyl sulfoxide minimum 99,5 % GC (Sigma, USA)
- Dulbecco PBS without Ca & Mg (PAA, Cölbe)
- Essigsäure, Eisessig 100 % (Merck, Darmstadt)
- Ethanol 70 % (Merck, Darmstadt)
- Ethanol, absolut zur Analyse (Merck, Darmstadt)
- Formaldehyd (37 %) säurefrei (Merck, Darmstadt)
- Freka-NOL® Alkoholisches Sprüh-Desinfizienz (Fresenius Kabi AG, Bad Homburg)
- MitoTracker®Red CMXRos, MW 531,52 g/mol (Invitrogen™ Molecular Probes™, Paisley PA4 9RF, UK)
- Neutralrot C₁₅H₁₇ClN₄ (Merck, Darmstadt)
- Trypsin-EDTA (1x) L11-004 (PAA, Cölbe)

2.1.3 Arbeitsmaterialien

- 6-, 12-, 24- und 96-Well-Zellkulturplatten mit Deckel (Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen)
- Auslaufpipetten, wattiert, steril 5 , 10 und 25 ml (Corning Incorporated, New York)
- Cryo-Röhrchen, 2 ml mit grünem Schraubverschluss (Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen)
- Deckgläser für Mikroskopie (Menzel-Gläser, Germany)
- Eppendorf Reaktionsgefäße 0,5 und 1,5 ml (Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen)
- Indikatorstäbchen pH-Fix 4,5-10,0 (Macherey Nagel, Düren)
- Laborglasflaschen 100 , 500 und 1000 ml (Ilmabor, Technische Glaswerke Ilmenau GmbH, Ilmenau)
- Microlance Kanüle 0,9x40 mm (Beckton-Dickinson, New Jersey)
- Mörser aus Melamin (Hersteller unbekannt)
- Objektträger 76x26 mm (Engelbrecht Medizin- und Labortechnik GmbH, Edermünde)
- Pasteurpipetten aus Glas (Brand GmbH, Wertheim)

- Pipettenspitzen 10 , 100 und 1000 µl (Eppendorf GmbH, Hamburg)
- Polypropylen-Röhrchen, 50 ml mit blauem Verschluss (Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen)
- Schräghalszellkulturflaschen, 250 ml, 75cm² Wachstumsfläche mit roter Filterkappe (Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen)
- Spritzen 2 , 5 und 10 ml (Beckton-Dickinson, New Jersey)
- Sterilfilter 0,2 µm FP 30/0,2 (Whatman GmbH, Dassel)
- Wägebapier MN 226 (Macherey Nagel, Düren)
- Zellkulturschalen, steril, 35x10 mm (Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen)
- Zentrifugenröhrchen aus polypropylen, 15 ml mit konischem Boden (Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen)

2.1.4 Geräte

- Absaugpumpe (Greifenberg Antriebstechnik GmbH, Marktredwitz)
- Accu-Jet (Brand GmbH, Wertheim)
- Analysenwaage Mettler AE 160 (Mettler GmbH, Gießen)
- Begasungsbrutschrank HeraCell 150 (Thermo Electron Corporation, Waltham, USA)
- Eppendorf Pipettierhilfe (Eppendorf GmbH, Hamburg)
- Filter N3 Extinktion Filter 546/12 (Leica, Wetzlar)
- Fluoreszenzkamera Leica DFC340-FX (Leica, Wetzlar)
- Fluoreszenzmikroskop Leica DMRXE (Leica, Wetzlar)
- Julabo SW Schüttler (Heinz Eich GmbH, Bonn)
- Kamera Olympus E-330 (Olympus, Japan)
- LabDancer (IKA-Werke GmbH, Staufen)
- Leuchtstoffröhre TL 20W/12RS (Philips GmbH, Hamburg)
- Multifuge 1 S-R Heraeus (Kendro GmbH, Osterode)
- MultiSkan EX (Thermo Electron Corporation, Waltham, USA)
- Neubauerzählkammer (Brand, Wertheim)
- Objektiv 63x HCX APO LUV-I Wasserimmersion (Leica, Wetzlar)
- Objektive 4x, 10x, 20x, 40x (Olympus, Japan)
- Phasenkontrastmikroskop Olympus CKX41 (Olympus, Japan)

- Reinraumwerkbank Antair ZKB (Bio-Flow, Meckenheim)
- Software Leica Application Suite Version 2.7.0 R1 (Leica, Wetzlar)
- Stoppuhr (Oregon Scientific, Neu-Isenburg)
- UVB-Lampe, Teilkörper UV-Lampe (Waldmann GmbH, Villingen-Schwenningen)
- UV-Meter Dr. Höhnle UV A+B (Dr. Höhnle GmbH, Martinsried)
- UV-Schutzbrille (Laser Vision GmbH, Arnsberg)
- Varioklav Dampfsterilisator (H+P Labortechnik GmbH, Hackermoos)
- Vortex Genie 2 (Scientific Industries, USA)
- Wasserbad (Memmert GmbH, Schwabach)

2.2 Testsubstanzen

2.2.1 Paraaminobenzoensäure (PABA) - Referenzsubstanz

Paraaminobenzoensäure (4-Aminobenzoensäure, PABA) war eines der ersten UV-B-protectiven Sonnenschutzmittel. Heute findet es nur noch selten Anwendung, da es die Kleidung färbt und bei einigen Patienten zu allergischen Hautreaktionen führen kann. Darüber hinaus hat die Substanz eine geringe Fotostabilität und wird daher heute durch neuere Substanzen wie Cinnamate oder Kampferderivate ersetzt. Für die vorliegende Arbeit wurde sie eingesetzt, da sie in dem verwendeten Versuchsmedium gut löslich ist und keine Eigenfärbung besitzt. Zudem hat PABA durch seinen aromatischen Ring eine gewisse strukturelle Ähnlichkeit mit HYKOP (Abb.5 und Abb. 6).

PABA [4-Aminobenzoensäure]

$C_7H_7NO_2$ MG 137,1 g/mol

Merck Darmstadt

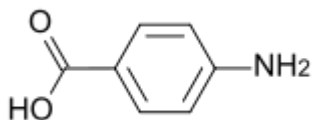


Abb.5: Paraaminobenzoensäure (4-Aminobenzoensäure, PABA)

2.2.2 Hydrokaffeesäure-Oxidationsprodukt – synthetische Huminsäure

Diese synthetische HS wurde vom Institut für Antivirale Chemotherapie der Friedrich-Schiller-Universität Jena zur Verfügung gestellt. Als Ausgangsmonomer diente Hydrokaffeesäure (Abb. 6). Da HS ein sehr komplexes Stoffsystem darstellen, deren Strukturen erst teilweise bekannt sind, ist es notwendig für die Erforschung der pharmakologischen Wirkung, HS zu synthetisieren, die pharmakologische Wirkung besitzen und von einem definierten Ausgangsmonomer als „Startmonomer“ abzuleiten sind. Dieser Weg wurde von Helbig und Klöcking (1983) erstmals beschrieben.

Mittels Ausschlusschromatographie wurde die Molekülmasse für HYKOP mit 6000 Da bestimmt (Helbig & Klöcking, 1983).

Hydrokaffeesäure-Oxidationsprodukt (HYKOP, MG 6000 Da), Charge-Nr. 441

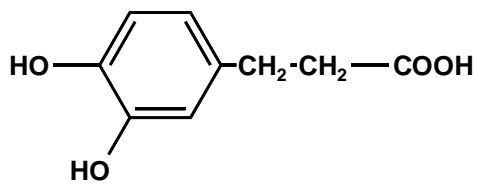


Abb. 6: Hydrokaffeesäure

2.2.3 Huminsäure Aldrich – natürliche Huminsäure

Diese Huminsäure ist kommerziell bei der Sigma Aldrich Chemie GmbH erhältlich. Es handelt sich um eine natürliche HS aus Braunkohlevorkommen. Im Vergleich zu den synthetischen HS hat sie mit 3000 kDa eine relative große Molekülmasse (Remmler et al., 1995). Außerdem hat HS-Aldrich eine geringere Acidität als HYKOP (Schewe et al., 1991). Acidität ist ein Maß für die Fähigkeit einer Substanz, Protonen abzugeben. Es wird angenommen, dass durch Wechselwirkungen mit basischen Aminosäuren viraler Glykoproteine die HS antivirale Aktivität entfalten. Dies würde bedeuten, dass HYKOP auf Grund seiner höheren Acidität auch eine stärkere antivirale Wirkung besitzt als die Aldrich-HS (Pörschmann et al., 2003).

HS Aldrich

Kat.-Nr.: H16752, Lot: 31620-099

Sigma Aldrich Chemie GmbH, München

Herstellerangaben:

Herkunft: Zersetzungsprodukt von organischem Material, größtenteils Pflanzen. Das Produkt stammt aus Braunkohlevorkommen und wurde in entionisiertem Wasser gewaschen.

MG: 2000 – 500000 Da. Die HS Aldrich enthält Polysaccharide, Proteine, Phenole und chelatierte Metallionen.

(Summenformel unbekannt)

2.2.4 Herstellung der Huminsäurelösungen für die Versuche

Für die Versuche wurden die Huminsäuren in Versuchsmedium (MEM, ohne Indikator, ohne FBS und ohne Pen/Strep) gelöst und anschließend die entsprechenden Verdünnungen hergestellt. Dabei wurde wie folgt vorgegangen:

Für die Herstellung einer 1 mg/ml enthaltenden HS-Stammlösung wurden zunächst 10 mg der jeweiligen HS abgewogen und in einem Mörser fein zerrieben. Da sich HS im basischen Milieu besser lösen, wurden 500 µl 0,05 M NaOH hinzugegeben und verrührt, bis sich die HS vollständig gelöst hatte. Anschließend wurde mit dem MEM-Versuchsmedium auf 10 ml aufgefüllt und in Zentrifugenröhrchen für 10 min bei 5000 U/min abzentrifugiert. Der so gewonnene dunkelbraune Überstand wurde zur Gewährleistung der Keimfreiheit durch einen Sterilfilter mit einer Porengröße von 0,2 µm geschickt. Im Sinne einer geometrischen Verdünnungsreihe wurden die fünf verschiedenen Untersuchungskonzentrationen hergestellt.

Mittels eines pH-Indikator-Teststreifens (pH-Fix 4,5-10,0) wurden die pH-Werte der einzelnen Verdünnungen gemessen. Die so gemessenen pH-Werte der verschiedenen Prüfsubstanzkonzentrationen entsprachen dabei jeweils dem pH-Wert des verwendeten Mediums. Somit konnten negative Einflüsse auf die hLEC durch pH-Wert-Verschiebungen weitestgehend ausgeschlossen werden.

Es ergaben sich folgende Charakteristika für die verwendeten drei Testlösungen:

Prüfsubstanz	Konzentration [µg/ml]	Charakteristika der Prüfsubstanz
MEM (ohne Indikator, ohne FBS, ohne Pen/Strep)	-	Farblos ; pH: 7,0–8,0
PABA	10 – 500	Farblos ; pH: 7,0–8,0
HS Aldrich/ Hydrokaffeesäure Oxidationsprodukt	10	Ganz schwach gelblich; pH: 7,0–8,0
	20	Schwach gelblich; pH: 7,0–8,0
	60	Gelblich; pH: 7,0–8,0
	120	Gold-gelb; pH: 7,0–8,0
	250	Gold-braun; pH: 7,0–8,0
	500	Braun; pH: 7,0–8,0
	1000	Tiefbraun, fast schwarz; pH: 7,0–8,0

Tab. 1: pH-Wert und Farbe der verwendeten Prüfsubstanzen und des Mediums, aufgelistet nach Konzentrationsstufen

2.2.5 Herstellung der PABA-Lösung für die Versuche

Da PABA ausgezeichnet löslich ist in dem verwendeten MEM–Versuchsmedium, konnte auf die Zugabe von NaOH verzichtet werden. Es wurden 10 mg PABA abgewogen und mit 10 ml MEM verdünnt, anschließend auf einem Schüttler für circa eine Minute stehen gelassen. Die so gewonnene Lösung war völlig farblos. Auch hier wurde ein Sterilfilter (Porengröße 0,2 µm) zur Sicherstellung der Sterilität verwendet. Die geometrischen Verdünnungen wurden in den gleichen Abstufungen wie bei den HS-Lösungen hergestellt. Zusätzlich wurde noch eine Konzentration von 500 µg/ml untersucht.

2.3 Zellen

2.3.1 Verwendete Zelllinie

Für die Bestimmung der Zytotoxizität und der UV-B-protectiven Wirkung der HS werden humane Linsenepithelzellen verwendet (hLEC). Bei diesen Zellen handelt es sich um eine adulte Linsenepithelzelllinie, die von einem Epithel-Kapsel-Präparat einer 61-jährigen Frau isoliert wurde. Bei dieser Zelllinie kam es zu einer Spontantransformation, wodurch die Kontakthemmung der Epithelzellen aufgehoben wurde. Nach längerer Kulturzeit entwickelt sich aus dem Monolayer ein mehrschichtiger Zellbelag, der sich durch überlappende Zellkerne unter dem Phasenkontrastmikroskop erkennen lässt (Iwig et al., 2001 a).

Die Zellen wurden vom Institut für Physiologische Chemie der Medizinischen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg (Direktor: Prof. Dr. Dr. Thomas Braun) übernommen.

2.3.2 Standardkulturbedingungen

Bei den verwendeten Zellen handelt es sich um adhärent wachsende humane Linsenepithelzellen, die zur Anzucht in dem Fertigmedium MEM mit Earl's Salts, L-Glutamin und Phenolrot Indikator (PAA) mit 10 % hitzeinaktiviertem, fetalem bovinem Serum (FBS) kultiviert wurden. Als Behälter wurden Schräghalsflaschen (250 ml, 75 cm²) verwendet, die mit einem Filter in der Verschlusskappe ausgestattet sind. Dieser optimiert den Gasaustausch und dient zugleich bei geschlossenem Schraubverschluss als Schutz vor Kontamination.

In einer 5 % CO₂-enthaltenden humiden Atmosphäre wurden die Zellen bei 37 °C im Begasungsschrank kultiviert.

2.3.3 Zellzüchtung

Nach circa einer Woche haben die Zellen eine solche Dichte erreicht, dass sie passagiert werden müssen. Um einen möglichst geregelten Versuchsablauf zu gewährleisten, wurde einmal pro Woche eine neue Passage angesetzt.

Dazu wurde zunächst das alte Medium sorgfältig abgesaugt. Danach wurde die Zellkultur mit 10 ml, auf 37 °C vorgewärmtem PBS ohne Ca^{2+} gewaschen und erneut abgesaugt. Mit weiteren 10 ml PBS ohne Ca^{2+} wurde die Kulturflasche für 10 min unter der Werkbank stehen gelassen und danach erneut vorsichtig abgesaugt und mit 1 ml vorgewärmtem Trypsin für 5 min unter Standardkulturbedingungen in den Begasungsschrank gestellt. Nach Ablauf der Zeit sollte bereits mit bloßem Auge die Ablösung des Zellrasens vom Boden der Kulturflasche sichtbar werden. Durch Zugabe von 9 ml frischem 10 % FBS enthaltendem MEM wird die Trypsin-Reaktion gestoppt. Nach gründlichem Durchmischen mit der Pipettierhilfe kann unter dem Phasenkontrastmikroskop die Zellsuspension beobachtet werden. Im Idealfall sieht man einzelne runde Zellen, die im Medium frei flottieren.

Je 1 ml dieser Zellsuspension wurde mit 9 ml FBS haltigem MEM zum Ansatz einer neuen Passage in eine neue Zellkulturflasche umgesetzt (Verdünnung 1:10). Drei Tage nach Aussaat der Zellen wurde ein Mediumwechsel mit MEM unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Dazu wurde zunächst das alte Medium unter der sterilen Werkbank abgesaugt und durch 10 ml frisches, zuvor auf 37 °C vorgewärmtes Medium ersetzt.

2.3.4 Zellen einfrieren

Die Zellen werden wie oben beschrieben trypsiniert und anschließend für 5 min bei 500 U/min zentrifugiert. Der Überstand wird abgesaugt und das Sediment mit 5 % DMSO und serumhaltigem Medium auf 1,5 ml aufgefüllt und anschließend in Cryo-Röhrchen abgefüllt. Die Zellen können so für 6 Monate bei -80 °C gelagert werden.

2.3.5 Zellen auftauen

Die eingefrorenen Cryo-Röhrchen werden langsam bei 37 °C im Wasserbad aufgetaut und dann der Inhalt in Zentrifugenröhrchen pipettiert. Bei max. 1000 U/min wird 5 min zentrifugiert. Nach Absaugen des Überstandes, das zurückbleibende Pellet mit 10 ml serumhaltigem MEM gut durchmischen. Hiernach erneut zentrifugieren und die obigen Schritte wiederholen. Zum Schluss den gesamten Inhalt des Zentrifugenröhrchens in eine Kulturflasche geben und wie gewohnt inkubieren.

2.3.6 Zellzahlbestimmung:

Um die Zellen in der Neubauerzählkammer einer Zellzahlbestimmung unterziehen zu können, müssen die adhärent wachsenden Linsenepithelzellen zunächst passagiert werden. Nach gründlichem Säubern der Neubauerzählkammer mit 70%igem Alkohol wird ein Deckgläschen angehaucht, so dass es bei Kontakt mit der Zählkammer zu deutlich sichtbaren Newton'schen Ringen kommt. Zur Zellzahlbestimmung werden 100 µl der Zellsuspension benötigt.

Ausgezählt werden nur die gleichmäßig abgerundeten Zellen mit einem einheitlich morphologischen Bild, um so die Zellzahl der noch vitalen Zellen zu bestimmen.

Pro ml sollten etwa $0,75-0,9 \cdot 10^6$ humane Linsenepithelzellen enthalten sein, um zu starke Schwankungen der optischen Dichte in den einzelnen Versuchen zu vermeiden.

2.4 Testmethoden

2.4.1 Neutralrottest

Prinzip:

Die Zellvitalität wurde mit dem Neutralrottest gemessen. Der Neutralrottest (2-Methyl-3-amino-7-dimethylaminophenanzin), auch NRU (Neutral Red Uptake Cytotoxicity Assay) ist ein Test, der auf der Fähigkeit lebender Zellen basiert, den Farbstoff Neutralrot aufzunehmen und zu binden. Neutralrot ist

ein schwach basischer, supravitaler Farbstoff (Abb. 7), der Zellmembranen via nicht-ionischer Diffusion passieren kann und vorzugsweise in intrazellulären Lysosomen akkumuliert (Borenfreund und Puerner, 1985; Nemes et al., 1979). Die Anreicherung von Neutralrot resultiert aus einer Protonierung des Farbstoffes im sauren Milieu der Lysosomen und einer Bindung an anionische Moleküle der lysosomalen Matrix. Veränderungen an der Zelloberfläche oder der sensiblen Lysosomenmembran führen zum Untergang der Lysosomen und zu anderen irreversiblen Veränderungen der Zellen. Der Farbstoff kann also nur von solchen Zellen festgehalten werden, deren Membranintegrität erhalten bleibt, d.h. von gesunden und apoptotischen Zellen (nur in der frühen Phase). Veränderungen an der Zellmembran, hervorgerufen durch toxische Substanzen und Einflüsse, wie z.B. UV-Bestrahlung, führen zu einer verminderten Aufnahme und Bindung von Neutralrot, was letztendlich ermöglicht, durch fotometrische Bestimmung der optischen Dichte zwischen lebenden, beschädigten und toten Zellen zu unterscheiden.

Die Zytotoxizität wird als konzentrationsabhängige Verminderung der Neutralrot-Aufnahme nach Exposition mit dem toxischen Agens gegenüber einer Kontrolle erfasst (Borenfreund und Puerner, 1985; Riddell et al., 1986).

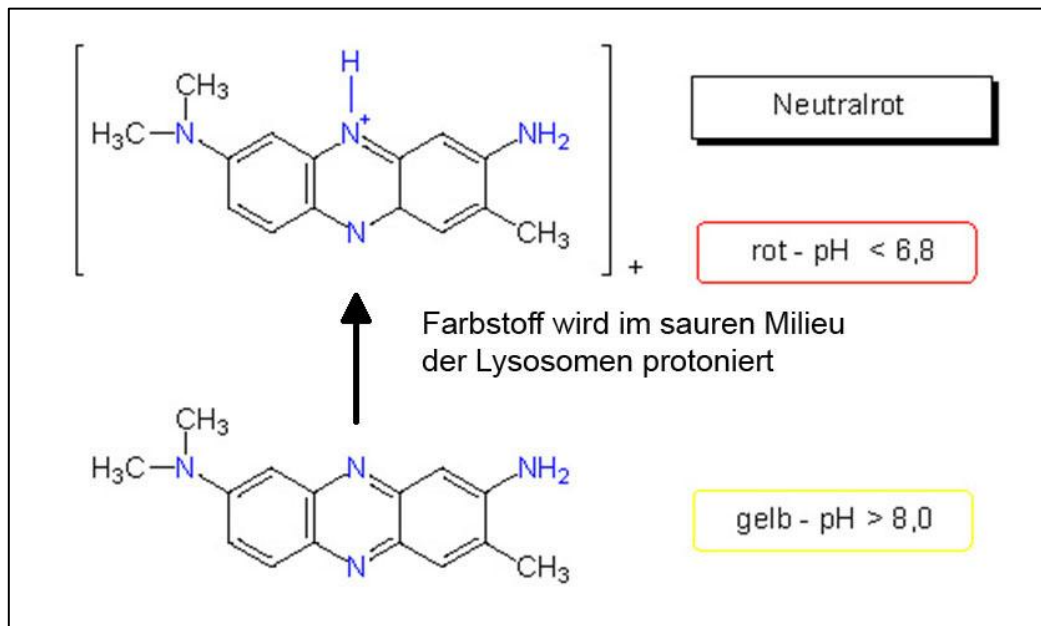


Abb.7: Schematische Darstellung der Neutralrotreaktion (eigene Darstellung)

Reagenzien:

- Neutralrothaltiges Medium: Die 5%ige Neutralrot-Stammlösung von Merck, Darmstadt wird mit Medium (MEM mit Indikator, 10 % FBS und 1 % Pen/Strep) 1:100 verdünnt und auf 37 °C im Wasserbad vorgewärmt. (Vor Gebrauch muss die Lösung gut geschüttelt werden, um eine gleichmäßige Verteilung des Farbstoffes zu erreichen)
- Wasch/Fixier-Lösung: 0,5 % Formaldehyd, 1 % CaCl₂
- Auflösungspuffer: 50 % Ethanol, 1 % Essigsäure

Durchführung:

Die Bestimmung der Neutralrot-Aufnahme erfolgte in Anlehnung an das Versuchsprotokoll von Borenfreund und Puerner (1984) mit geringen Modifikationen.

Zunächst wurde das Medium aus allen Kavitäten der 24-Well-Platten gründlich abgesaugt, um eventuelle Schwankungen der optischen Dichte durch das rote Medium zu verhindern.

Danach wurde in jede Kavität 1 ml des 1:100 verdünnten neutralrothaltigen Mediums pipettiert und für 3 Stunden unter Standardkulturbedingungen im Begasungsschrank inkubiert.

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Zellen nach Absaugen des Neutralrot-Mediums mit 1 ml Wasch/Fixierlösung eine Minute lang gespült, danach erneut abgesaugt und mit 1 ml Auflösungspuffer pro Kavität beschickt. Für weitere 20 Minuten wurden die auflösungspufferhaltigen 24-Well-Platten bei Raumtemperatur auf einen Schüttler gestellt, um eine maximale Auswaschung des Farbstoffes zu erreichen. Nach Übertragung der rötlichen Lösung in 96-Well-Mikrotiterplatten konnte die optische Dichte (O.D.) bei 540 nm mit einem Multiskan® Plattenlesegerät bestimmt werden. Als Blank-Werte, dienten zwei Kavitäten der Kontrolle, die für 3 h statt mit Neutralrot mit MEM inkubiert wurden. Anschließend erfuhren sie die gleiche Behandlung wie die anderen Zellen mit Wasch-/Fixierlösung sowie mit dem Auflösungspuffer. Der dabei ermittelte Wert wurde automatisch von der Ascent Multiskan® Software von den anderen Probenwerten subtrahiert.

Anmerkung:

Die HLEZ sind extrem empfindlich gegenüber Austrocknungserscheinungen, daher empfiehlt es sich reihenweise beim Absaugen vorzugehen und die Neutralrotlösung dann sofort zuzugeben.

2.4.2 Bestimmung der Zytotoxizität der HS und von PABA

Um die Zytotoxizität zu bestimmen, wurden die humanen Linseneithelzellen zunächst für zwei Tage auf 24-Well-Platten in MEM mit 10 % FBS kultiviert. In jede Kavität kamen je 20 µl Zellsuspension (das entspricht ca. 17.000 Zellen/Kavität) und 500 µl MEM. Nach Erreichen einer etwa 80%igen Konfluenz des Zellrasens, wurde das Wachstumsmedium unter der sterilen Werkbank abgesaugt. Anschließend wurden die HS und die PABA in 5 Konzentrationen, in geometrischer Reihe aufsteigend, in die einzelnen Kavitäten gegeben. Hierzu wurden je 250 µl der HS-Lösung bzw. der PABA-Lösung pro Kavität hinzupipettiert. Die Lösungen bestanden aus farblosem MEM ohne FBS mit HS bzw. PABA. Für jede Konzentrationsstufe wurden 4 Kavitäten vorbereitet. Zusätzlich wurden 4 Kavitäten für die Kontrolle mit farblosem MEM beschickt (Abb.8).

Im Anschluss wurde für 24, 48 und 72 Stunden bei 37 °C und CO₂- Atmosphäre (5 %) im Brutschrank inkubiert. Ausgewertet wurde mit dem NRU-Test (2.4.1).

A1-D1:

A2- D6:

Kontrolle:

zunehmende Konzentrationen der Testsubstanzen:

250 µl MEM/Kavität

250 µl MEM mit HS bzw. PABA/Kavität

	1	2	3	4	5	6
A						
B						
C						
D						

Abb.8: Beschickungsschema der Mikrotiterplatte für die Zytotoxizitätstest mit den drei Prüfsubstanzen (HS Aldrich, HYKOP und PABA)

2.4.3 Bestimmung der Bestrahlungsdosis

In dieser Arbeit sollte zum einen der Effekt der UV-B-Bestrahlung und zum anderen die Regenerationsfähigkeit nach UV-B-Strahlenschaden an humanen Linsenepithelzellen untersucht werden. Daher war es wichtig, eine Bestrahlungsdosis zu finden, bei der ein ausreichend großer Schaden verursacht, aber nicht alle Zellen abgetötet werden.

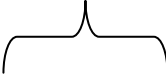
Für jeden Versuch wurden 8 Kavitäten einer 24-Well-Platte mit ca. 17.000 Zellen beschickt und mit 500 µl MEM (mit FBS und Pen/Strep) für 48 h bei Standardkulturbedingungen kultiviert (Abb.9). Die Zellen erreichen nach dieser Zeit eine etwa 80%ige Konfluenz. Das Wachstumsmedium wurde abgesaugt und durch 250 µl farbloses MEM (ohne FBS und Pen/Strep) ersetzt. Die Bestrahlung erfolgte ohne Deckel unter einer Teilkörper-UV-Therapielampe der Firma Waldmann in einem Abstand von 25,5 cm zwischen Tisch und UVB- Leuchtstoffröhre. Die Strahlungsdosis ändert sich mit der Bestrahlungsdauer und ergab für 10 s = 2,96 mJ/cm²; 20 s = 5,92 mJ/cm² und 40 s = 11,84 mJ/cm².

Unmittelbar nach der Bestrahlung wurden die Zellen wieder in 500 µl MEM mit FBS umgesetzt. So erhielten die Zellen genügend Nährstoffe und somit die Möglichkeit, nach dem verursachten Strahlenschaden zu regenerieren.

Als Kontrolle dienten je zwei 24-Well-Platten mit 8 zellbestückten Kavitäten, diese wurden ebenfalls für die Dauer des Bestrahlungsversuches in farbloses MEM umgesetzt, allerdings ohne selbst einer Bestrahlung zu unterlaufen. Alle Versuche wurden mindestens in drei unabhängigen Wiederholungen durchgeführt.

Ausgewertet wurde nach 24, 48 und 72 h mittels NRU-Test.

grau unterlegte Kavitäten enthalten 250 µl farbloses Medium



	1	2	3	4	5	6
A						
B						
C						
D						

Abb. 9: Beschickungsschema für die Bestimmung der Bestrahlungszeit

2.4.4 Bestimmung der UVB-Strahlenwirkung in Gegenwart von HS und PABA

Bei der Aussaat der Zellen auf den 24-Well-Platten wurde genauso verfahren wie für die Zytotoxizitätsbestimmung der HS, mit dem Unterschied, dass nur die mittleren 4x4 Kavitäten verwendet wurden. Durch die quadratische Anordnung sollte ein möglichst homogenes Bestrahlungsfeld erzeugt werden. Nach zweitägiger Inkubation unter Standardbedingungen wurde das Wachstumsmedium sorgfältig abgesaugt und anschließend durch 250 µl HS-Lösung ersetzt.

Auch hier wurde in geometrischer Reihenfolge aufsteigend die HS-Lösung in je vier Kavitäten der 24-Well-Platte pipettiert (Abb. 8). Ausgewählt wurden hier drei Konzentrationen, die sich in Vorversuchen als wirksam erwiesen hatten (hier nicht dargestellt). In die Kavitäten A2-D2 wurden 250 µl farbloses MEM gegeben und als Schadenskontrolle mit bestrahlt. Als Negativ-Kontrolle diente eine weitere 24-Well-Platte, die wie die Mikrotiterplatten für die Bestimmung der Strahlendosis beschickt wurde (Abb. 9). Umgehend nach der Bestrahlung wurden die HS- und PABA-Lösungen abgesaugt und wieder durch 10 % FBS haltiges MEM ersetzt, um einen möglichst physiologischen Erholungseffekt simulieren zu können. Alle Versuche wurden mindestens dreimal wiederholt.

Ausgewertet wurde auch hier nach 24, 48 und 72 Stunden mit dem NRU-Test.

2.4.5 Mitochondrienfärbung mit dem Fluoreszenzfarbstoff MitoTracker®

Prinzip:

Mitochondrienfunktion, mitochondriales Membranpotenzial (MMP), sowie Mitochondrienmorphologie können in lebenden Zellen mittels lipophiler, fluoreszierender, kationischer Farbstoffe beurteilt werden. Diese Farbstoffe werden in den Mitochondrien auf Grund des negativen MMP angereichert und zeigen einen proportionalen Zusammenhang zwischen der Fluoreszenzemission und dem MMP. Insbesondere Chloromethyl-X-rosamine (CMXRos) bzw. MitoTracker® Red haben sich in verschiedenen Zellen als höchst sensitiv für die Detektion von Apoptose erwiesen (Macho et al., 1996; Poot und Pierce, 1999).

MitoTracker® ist ein mitochondrienspezifischer Farbstoff mit einem schwachen thiol-reaktiven Chloromethyl-Rest, der wahrscheinlich für die Retention des Farbstoffes im Mitochondrium verantwortlich ist. Die Bindung des Farbstoffes an die Mitochondrienmembran bleibt auch nach Fixierung der Zellen und nach Zusammenbruch des MMP bestehen. Der verwendete MitoTracker® Red ist ein Derivat von X-rosamine. Der Farbstoff überwindet via passive Diffusion die Membran von aktiven Mitochondrien und akkumuliert dort entsprechend des MMP. Die Fluoreszenzemission ist demnach zum einen abhängig vom MMP und zum anderen von der Masse und der Dichte der Mitochondrien in der Zelle.

Darüber hinaus konnten Pendergrass et al. (2004) anhand von NADH Spiegel Messungen in Mitochondrien von lymphoblastoiden Zellen zeigen, dass MitoTracker® selbst nicht toxisch ist. Der Farbstoff eignet sich somit für die Beobachtung von morphologischen Veränderungen, auch über einen längeren Zeitraum.

Durchführung:

Der Farbstoff MitoTracker® Red wird von der Firma Invitrogen™ als Pulver geliefert. Daraus wurde eine 1 mM Stammlösung mit DMSO hergestellt und jeweils 10 µL bei <20 °C unter Lichtausschluss in Eppendorfcaps eingefroren.

Als Gebrauchslösung wurde eine 300 nM Lösung mit serumhaltigem Medium vor jedem Versuch frisch angesetzt und auf 37 °C im Wasserbad vorgewärmt.

Für die Beobachtung der Mitochondrien unter dem Fluoreszenzmikroskop wurden die hLEC zunächst auf Petrischalen (35 mm²) ausgesät und für zwei Tage kultiviert. Jede Petrischale wurde mit einem Deckgläschen versehen und dann mit 100 µl Zellsuspension (das entspricht ca. 85.000 Zellen/Petrischale) und 2 ml MEM (mit FBS und Pen/Strep) beschickt. Vor der Färbung wurden die einzelnen Schälchen auf ausreichende Konfluenz überprüft. Nur solche, die eine etwa 70%ige Konfluenz erreicht hatten, wurden für die Versuche verwendet. Die Wachstumsdichte der Zellen wurde für die Fluoreszenzbilder etwas niedriger gewählt als für den NRU-Test, um Überstrahlungseffekte zu vermeiden.

Das Wachstumsmedium wurde anschließend sorgfältig unter der Werkbank abgesaugt und durch 2 ml der MitoTracker®-Lösung ersetzt. Inkubiert wurde für 10 min unter Standardbedingungen. Danach wurden die Zellen mit Medium gewaschen und je nach Versuch entweder in farbloses Medium für die Bestrahlung oder in HS-Lösung umgesetzt. Analog den Bestrahlungsversuchen, die mit NRU ausgewertet wurden, sind auch hier die Zellen unmittelbar nach der Bestrahlung in serumhaltiges Medium gegeben worden.

Die Zellen wurden nach 1, 3, 6, 12 und 24 h unter dem Fluoreszenzmikroskop beobachtet und fotografiert. Jeder Versuch wurde mindestens dreimal wiederholt.

2.4.6 Fototechnik

2.4.6.1 Bilder unter Phasenkontrastmikroskop

Vor jedem Versuch wurden die 24-Well-Platten auf einheitliches Zellwachstum untersucht. Dazu wurden die Platten auf den Objektisch des Phasenkontrastmikroskops (Olympus CKX41) gespannt und mit 4x-, 10x-, 20x- und 40x- Objektiven betrachtet. Repräsentative Kavitäten wurden mit einer Olympus E-330 Digitalkamera, die auf dem Phasenkontrastmikroskop fest installiert war, fotografiert. Diese Bilder dienten als Zellkontrolle. Auf gleiche Weise wurde mit den 24-Well-Platten verfahren, die eine Behandlung mit den Testsubstanzen und/oder UVB-Bestrahlung erhalten hatten.

2.4.6.2 Bilder unter Fluoreszenzmikroskop

Für die Bilder unter dem Fluoreszenzmikroskop (Leica DMRXE) wurden die Zellen in 35x10 mm Zellkulturschalen, die je ein Deckgläschen enthielten, kultiviert. Vor jedem Versuch wurden die Zellen wie unter (2.4.5.) beschrieben mit MitoTracker® angefärbt. Zu jedem Untersuchungszeitpunkt (d.h. nach 1, 3, 6, 12 und 24 h) wurde je eine Zellkulturschale mit Hilfe eines 63x-Wasserimmersionsobjektives, unter Verwendung eines Extinktionsfilters (Filter N3 546/12), betrachtet. Der Filter lässt Licht im roten Farbspektrum durch, wodurch die Emission des angewendeten Fluoreszenzfarbstoffes hervorgehoben wird. Die Bilder wurden mit einer fest installierten Fluoreszenzkamera (Leica DFC340-FX) aufgenommen und anschließend mit der dazugehörigen Software (Leica Application Suite Version 2.7.0 R1) bearbeitet und gespeichert. Mit zunehmendem Versuchsverlauf mussten die Belichtungszeiten nachreguliert werden.

2.5 Statistische Auswertung und Berechnung

2.5.1 Berechnung der Substanzkonzentration bei halbmaximaler zytotoxischer Wirkung (CC₅₀)

Die Zytotoxizität (CT) berechnet sich wie folgt:

$$CT = \left(\frac{\bar{x}_i - \bar{x}_0}{\bar{x}_0} \right) * 100\%$$

\bar{x}_0 = Mittelwert der O.D. aus der Zellkontrolle

\bar{x}_i = Mittelwert der O.D. der mit HS inkubierten Zellen

Die so ermittelte Zytotoxizität wird in einem Diagramm mit dem Programm Excel (Version 2007, Microsoft) über der Konzentration aufgetragen. Zur Ermittlung der halbmaximalen Zytotoxizität (CC₅₀) wird eine Regressionsgerade ermittelt. Dazu errechnete das Programm eine logarithmische Regressionsfunktion, die den mathematischen Zusammenhang zwischen der Konzentration und der ermittelten CT darstellt. Da die Funktion logarithmisch ist, erhält man in der Geradengleichung statt der Konzentration x die logarithmische Konzentration ln x.

Der y-Achsenabschnitt $y = 50\%$ wird mit der Geradengleichung: $y = n(\ln x) + b$ berechnet. Aus drei voneinander unabhängigen Versuchen erhält man drei $\ln x$ -Werte, aus denen dann der Mittelwert, die Standardabweichung, sowie der mittlere Fehler gebildet werden. Nach Entlogarithmierung erhält man den CC_{50} -Wert und das dazugehörige Konfidenzintervall. Bei der so errechneten HS-Konzentration erwartet man also aufgrund der durchgeführten Versuche, dass 50 % der Zellen absterben. Da in der vorliegenden Arbeit mit nur 3 unabhängigen Wiederholungen gearbeitet wurde, sind diese CC_{50} -Werte natürlich nur als Näherungswerte zu betrachten, die zwar statistischen Schwankungen unterliegen, jedoch zeigte sich, dass der Informationsgewinn durch weitere Wiederholungen so gering gewesen wäre, dass er in keinem Verhältnis zum damit verbundenen Mehraufwand gestanden hätte.

2.5.2 Berechnung der UV-B-protektiven Wirkung der Testsubstanzen

Für die Bestimmung der UV-B-protektiven Wirkung von Huminsäuren und PABA auf den Bestrahlungsdefekt der Linsenepithelzellen wurde folgende Formel angewandt:

$$\text{UVB-PW} = \left(\frac{\bar{x}_i - \bar{x}_0}{x_0 - \bar{x}_0} \right) * 100\%$$

\bar{x}_i = aus vier Einzelmessungen arithmetisch gemittelter Messwert bestrahlter, HS-behandelter Zellen

\bar{x}_0 = aus vier Einzelmessungen arithmetisch gemittelter Messwert der bestrahlten Zellkontrolle

x_0 = aus acht Einzelmessungen arithmetisch gemittelter Messwert der unbestrahlten Zellkontrolle

Analog der Berechnung der CC_{50} , wird auch hier die UVB-protektive Wirkung in Prozent gegen die Konzentration in einem Diagramm aufgetragen.

2.5.3 Berechnung der Substanzkonzentration bei halbmaximaler UV-B-protektiver Wirkung (UVB-PC₅₀)

Hiermit soll diejenige HS-Konzentration ermittelt werden, bei der 50 % der Zellen vor UVB-Strahlenschäden geschützt werden. Hier wurde genau wie unter (2.5.1) verfahren. Auch hier wird mittels einer logarithmischen Regressionsfunktion eine Regressionsgerade bestimmt. Für die Berechnung wurden die drei errechneten Werte der UVB-PW für jede Konzentration verwendet, daraus der Mittelwert, die Standardabweichung und der Fehler des Mittelwertes errechnet. Durch Entlogarithmierung der ln x-Werte erhält man das Konfidenzintervall der UVB-PC₅₀. Wie bereits unter 2.5.1 für die Berechnung der halbmaximalen zytotoxischen Wirkung (CC₅₀) erwähnt, wurden nur 3 Wiederholungen der Versuche durchgeführt, daher sind auch die ermittelten UVB-PC₅₀-Werte als Schätzungen des wahren Wertes zu betrachten, jedoch reicht dies für eine rein deskriptive Analyse aus.

2.5.4 Statistische Auswertung

Jeder Versuch wurde in mindestens drei voneinander unabhängigen Wiederholungen und mit mindestens vier parallelen Ansätzen durchgeführt. Genau genommen ist die Anzahl der Wiederholung mit n=3 für vertiefte statistische Auswertungen zu gering. Ein empirisch bestimmter Mittelwert stellt immer nur eine Schätzung des im Allgemeinen unbekanntes Erwartungswertes dar. Erhöht man den Stichprobenumfang, so wird die Standardabweichung des Mittelwertes umgekehrt proportional zu \sqrt{n} kleiner, die Güte der Schätzung wird also erhöht. Daher könnte theoretisch die statistische Messungsunsicherheit durch Erhöhung der Messungsanzahl beliebig klein gemacht werden. In dieser Arbeit war die Wiederholungsgröße n=3 ausreichend, da lediglich eine deskriptive Analyse des Verhaltens der verwendeten Testsubstanzen erfolgen sollte. Zudem sind die rechnerisch ermittelten Werte aus den Zytotoxizitätstests keine alleinstehenden Ergebnisse, da diese mit den morphologischen Bildern unter Phasenkontrast- und Fluoreszenzmikroskop verglichen wurden.

Für jede Konzentration und jede Versuchsgruppe wurden jeweils der Mittelwert, die Standardabweichung und der Fehler auf den Mittelwert bestimmt, wobei es sich hierbei um unabhängige, (normal-)verteilte Zufallsvariablen handelt, deren Fehler nach dem zentralen Grenzwertsatz als Gauß-verteilt angenommen werden können.

Mittelwert:

$$\bar{x} = \frac{\sum_{i=1}^n x_i}{n}$$

\bar{x} = Mittelwert der Zytotoxizität

x_i = Einzelwerte der Zytotoxizität

n = Anzahl der Versuche

Standardabweichung:

Die Standardabweichung ist ein Maß für die Streubreite einer Zufallsvariablen um ihren Erwartungswert $E(x)$.

$$\sigma = \sqrt{\frac{n}{n-1} \frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n}} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n-1}}$$

σ = Standardabweichung der Zytotoxizität

x_i = Einzelwerte der Zytotoxizität

\bar{x} = Mittelwert der Zytotoxizität

Standardfehler:

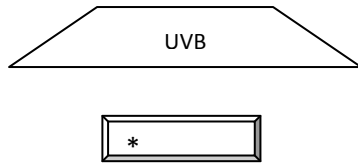
Der Standardfehler oder Stichprobenfehler ist ein Streuungsmaß für eine Stichprobenverteilung und gibt die Streuung des errechneten Mittelwertes vom wahren Mittelwert, dem Erwartungswert der Verteilung an.

$$\sigma_n = \frac{\sigma}{\sqrt{n}}$$

In den folgenden graphischen Darstellungen sind die Mittelwerte und deren Standardfehler eingezeichnet.

2.6 Ablauf der Testung – Fließschema

1. Ermittlung der Bestrahlungsdosis mit UVB:



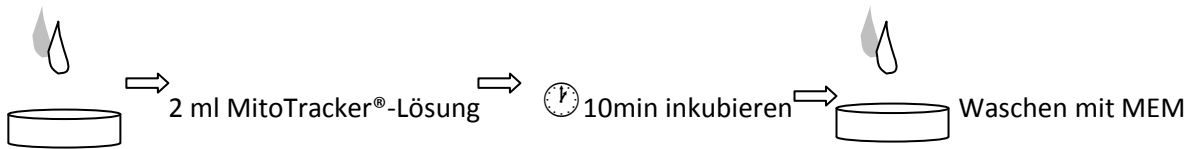
hLEC in MEM ohne Zusatz

3. Bestrahlung in Anwesenheit der Testsubstanzen:

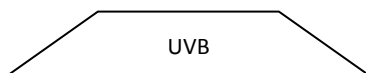


*) Auswertung jeweils mit Neutralrottest und Beurteilung unter Phasenkontrastmikroskop nach 24, 48 und 72 Stunden

4. Anfärben der hLEC mit MitoTracker®

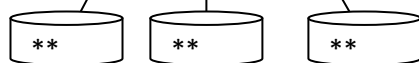


5. Bestrahlung der angefärbten hLEC



hLEC in MEM ohne Zusatz

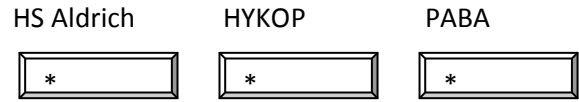
7. Bestrahlung in Anwesenheit der Testsubstanzen



HS Aldrich HYKOP PABA

**) Bilder wurden mit der Fluoreszenzkamera nach 1, 3, 6, 12 und 24 Stunden aufgenommen

2. Zytotoxizitätstest:



in den Konzentrationsstufen 10, 20, 60, 120 und 250 µg/ml (für PABA zusätzlich 500 µg/ml)

6. Beurteilung der angefärbten Mitochondrien in Anwesenheit der Testsubstanzen



3. Ergebnisse

3.1 Ermittlung der Bestrahlungsdosis

3.1.1 Bestimmung der Zytotoxizität von UVB-Strahlung mittels Neutralrottest

Für die nachfolgenden Versuche musste eine Bestrahlungsdosis ermittelt werden, die einen ausreichenden UV-B-Strahlenschaden an den hLEC verursacht, ohne dabei alle Zellen abzutöten. Die Zellen wurden wie unter (2.4.3) beschrieben für 10, 20 und 40 s ohne Deckel in einem Abstand von 25,5 cm mit UV-B bestrahlt und anschließend 24, 48 und 72 h lang unter Standardbedingungen inkubiert. Die Abb. 10 stellt den zeitlichen Zusammenhang zwischen der Bestrahlungs- und Postexpositionszeit sowie der Zytotoxizität dar.

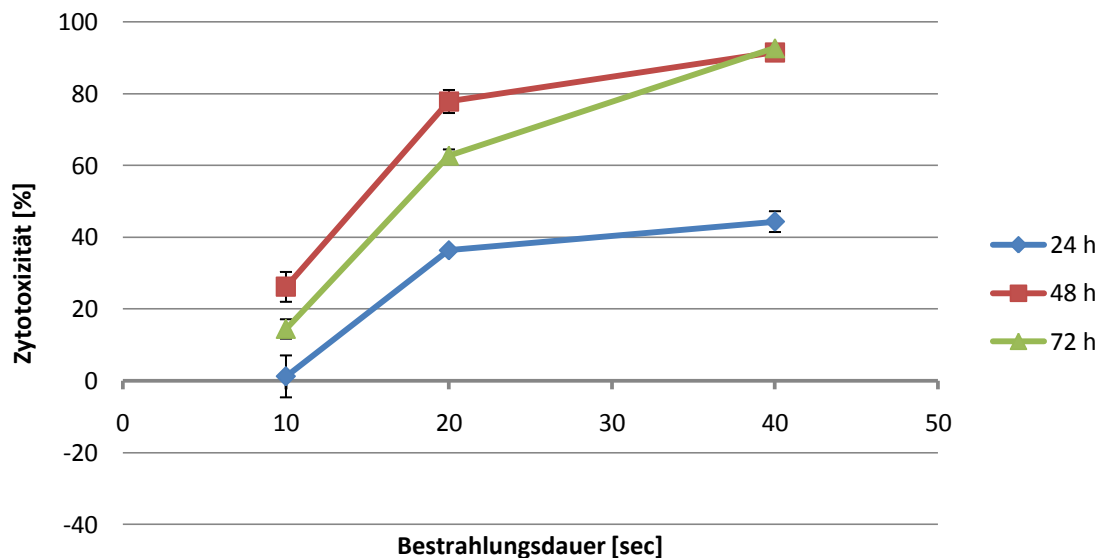


Abb. 10: Ausmaß der Zytotoxizität nach UV-B-Bestrahlung der hLEC in Abhängigkeit von der Bestrahlungsdauer und der Postexpositionszeit. Getestet wurden Bestrahlungszeiten von 10, 20 und 40 s. Ausgewertet wurde mit NRU nach 24, 48 und 72 h ($\bar{x} \pm \sigma_n$; $n_{24h}=6$; $n_{48h}=6$; $n_{72h}=6$)

Nach 24 h hat eine Bestrahlungsdauer von 10 s UV-B-Strahlungen keinen eindeutig messbaren schädigenden Einfluss auf die hLEC. Dieser wird sehr viel deutlicher bei einer Bestrahlungsdauer von 20 s und erreicht hier eine rechnerische Zytotoxizität von 36,3 %, durch eine weitere Steigerung der Bestrahlungszeit auf 40 s kann dieser zytotoxische Strahlungseffekt auf 44,4 % gesteigert werden.

Bei einem Postexpositionsintervall von 48 h findet sich der steilste Anstieg zwischen der 10-s- und der 20-s-Bestrahlungszeit. Während nach 10 s Bestrahlung nur 26,2 % der Zellen absterben, sind es nach 20 s bereits 77,81 %, dies entspricht einer Verdreifung des Zellschadens. Die 40-s-Bestrahlung zeigt einen Zelluntergang von 91,5 % (Tab. 7).

Die Betrachtung des 72-h-Postexpositionsintervalls zeigt insgesamt einen ähnlichen Verlauf wie der nach 48 h, allerdings findet sich hier ein Erholungseffekt der Zellen bei den 10- und 20-s-Bestrahlungen, da hier nicht alle Zellen abgetötet wurden, können sich die überlebenden Zellen regenerieren und wieder vermehren. Dies scheint nach einer Bestrahlungsdauer von 40 s nicht mehr möglich zu sein, weshalb man hier eine Zytotoxizität von 92,7 % vorfindet (Tab. 7).

Zu beachten ist hier, dass die Zellen unmittelbar nach der Bestrahlung in serumfreiem, farblosem MEM wieder in serumhaltiges MEM Wachstumsmedium umgesetzt wurden. Nur so ist es den Zellen möglich sich von dem erlittenen Zellschaden zu erholen.

Das Wachstum der hLEC wird in Abb. 11 als absoluter Wert der O.D. dargestellt.

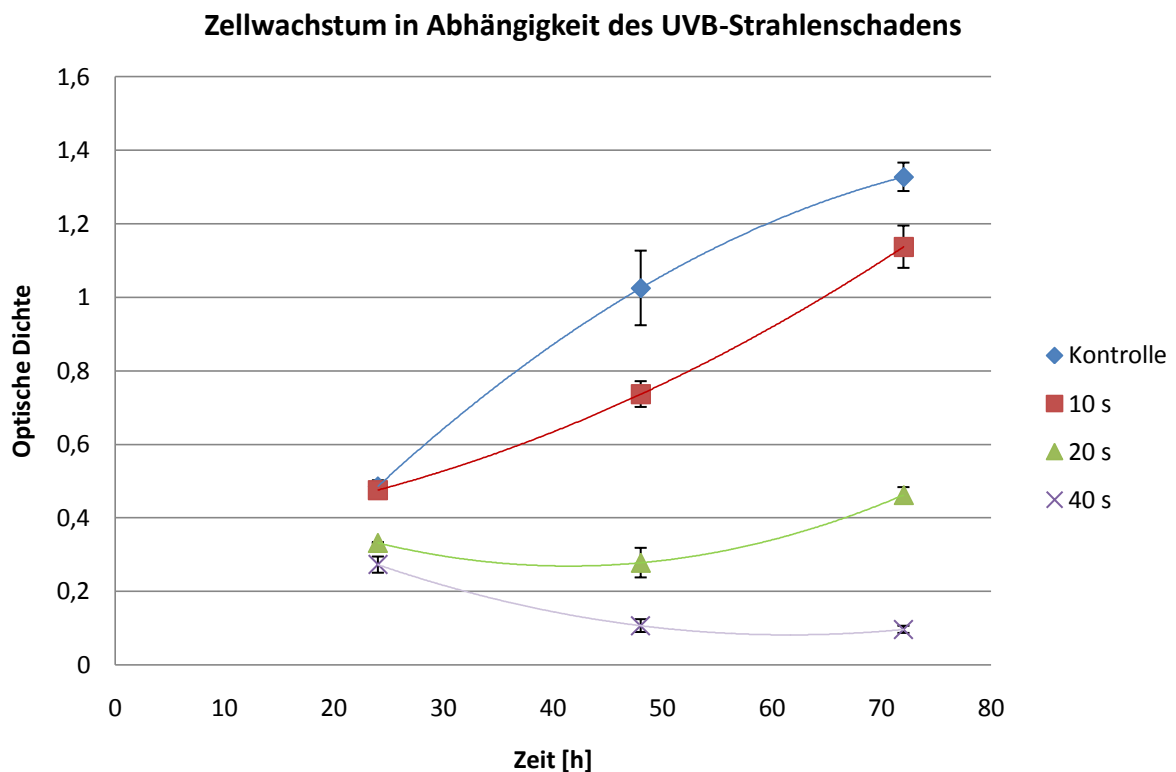


Abb. 11: Darstellung des Zellwachstums als absolute Werte der optischen Dichte gegen den Postexpositionsintervall (24, 48 und 72 h) in Abhängigkeit von der Bestrahlungsdauer (10, 20 und 40 s) ($\bar{x} \pm \sigma_n$; $n_{24h}=6$; $n_{48h}=6$; $n_{72h}=6$)

In dieser Darstellung wird der Erholungseffekt v.a. bei der 20-s-Bestrahlung deutlich. Der Zellschaden hat hier sein Maximum nach 48 h bereits durchlaufen und die Zellzahl nimmt wieder stetig zu. Die Bestrahlung mit 10 s UV-B-Strahlen hat scheinbar lediglich eine Verlangsamung des Zellwachstums zur Folge. Nach 72 h findet eine deutliche Annäherung der Wachstumskurven von Kontrolle und 10-s-Bestrahlung statt. Das Zellwachstum in der Kontrolle wird durch das limitierte Platzangebot in der 24-Well-Platte gedrosselt. Auch in dieser Darstellung ist ersichtlich, dass die 40-s-Bestrahlung keinen Erholungseffekt mehr zeigt. Alle Zellen haben einen irreversiblen Schaden erlitten.

3.1.2 Morphologische Veränderungen an humanen Linsenepithelzellen unter UVB-Bestrahlung

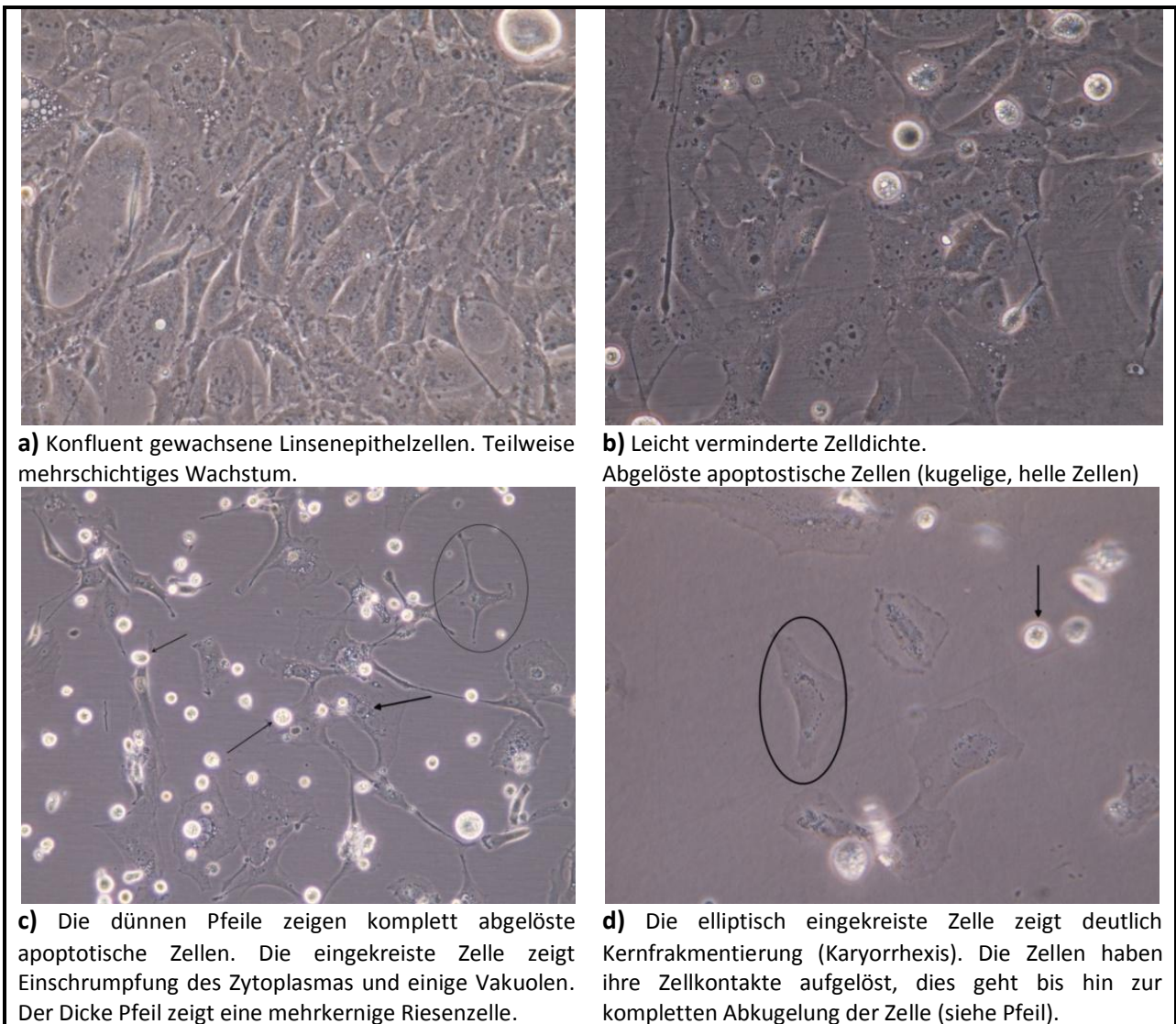


Abb.12: Morphologische Veränderungen von hLEC 48 h nach UVB-Bestrahlung (a= Zellkontrolle. Phako: 120x , b= 10 s bestrahlt. Phako: 240x, c= 20 s bestrahlt. Phako: 120x, d= 40 s bestrahlt. Phako: 240x)

Unbehandelte Zellen	Apoptotische Zellen	Nekrotische Zellen
<ul style="list-style-type: none"> • Große, flache Epithelzellen • Zellkern deutlich vom Zytoplasma abgrenzbar • Nucleoli als kontrastreiche schwarze Punkte im Kern sichtbar • Mehrschichtiges, dichtes Zellwachstum • Glatte und deutlich abgrenzbare Membranränder • Rund um den Kern als gräuliche Granula sichtbare Zellorganellen • Nicht konfluente Zellen, bilden teilweise Filo- und Lamellopodien aus 	<p><u>Obligate Merkmale:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • Auflösung der Zellkontakte, die Zellmembran erscheint unregelmäßig und ausgefranst • Zellschrumpfung und Verdichtung der Zelle • Zellen bekommen spindelförmiges Aussehen • Einzelne komplett abgekugelte Zellen schwimmen frei im Medium <p><u>Häufige Merkmale:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • Der Kern ist nicht mehr klar vom Zytoplasma abgrenzbar • Chromatinkondensation und Kernfragmentierung (Karyorhexis) • Kernperiphere Chromatinverklumpungen <p><u>Fakultative Merkmale:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • Vakuolenbildung im Zytoplasma (v.a. bei Kontakt mit HS) • Abschnürung von membranumschlossenen Kernfragmenten, den „apoptotic bodies“ 	<p><u>Nur vereinzelt Vorkommen in den hier durchgeführten Versuchen:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • Zelle erscheint geschwollen • Zellorganellen flottieren frei im Medium • Membran ist rupturiert • Zelle sieht aus wie „explodiert“

Tab. 2: Morphologische Unterschiede zwischen unbehandelten, apoptotischen und nekrotischen hLEC-Zellen

3.2 Zytotoxizität und UVB-protective Wirkung der Testsubstanzen

Bevor eine Aussage über die vermeintliche UVB-protective Wirkung der hier untersuchten HS und von PABA gemacht werden kann, muss deren zytotoxische Wirkung auf die humanen Linsenepithelzellen getestet werden.

3.2.1 HS Aldrich (natürliche Huminsäure)

Diese HS wurden in 5 Konzentrationsstufen zwischen 10 und 250 µg/ml auf Ihre Zytotoxizität getestet. Ihre UVB-protective Wirkung wurde in den Konzentrationsstufen 60, 120 und 250 µg/ml getestet. Diese drei Konzentrationen hatten sich in Vorversuchen (hier nicht gezeigt) als protektiv wirksam gegen UVB-Strahlung erwiesen. Für die Zytotoxizitätstestung wurden Expositionszeiten von 24, 48 und 72 h ausgewählt.

3.2.1.1 Bestimmung der Zytotoxizität von HS Aldrich

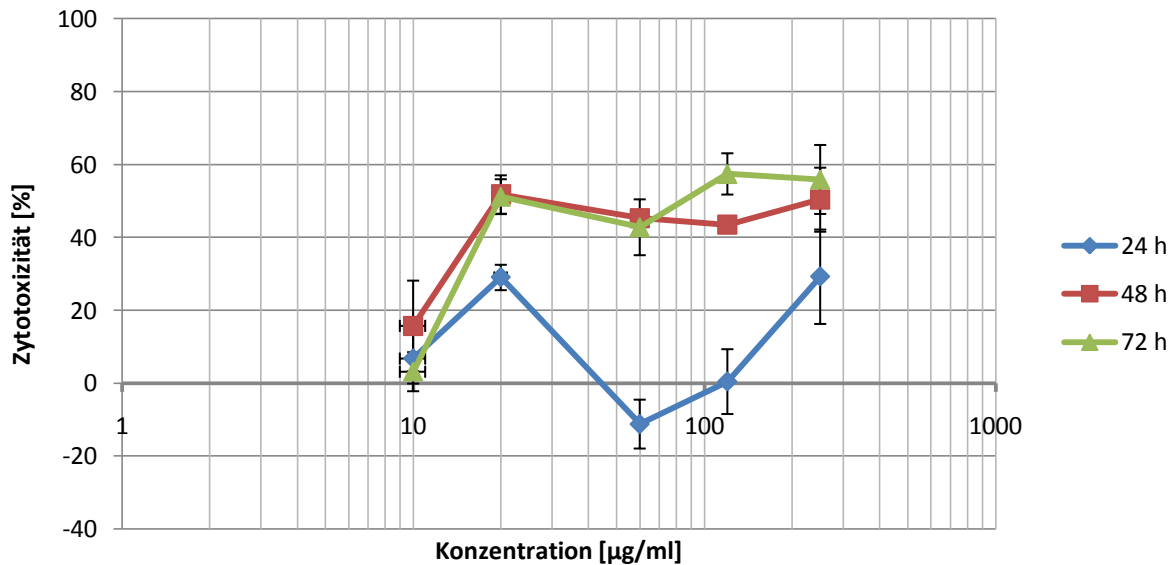


Abb. 13: Zytotoxizität (CT) von HS Aldrich auf hLEC. Getestet wurde HS Aldrich in den Konzentrationen 10, 20, 60, 120 und 250 µg/ml für je 24, 48 und 72 h. Ausgewertet wurde mit dem Neutralrottest ($\bar{x} \pm \sigma_n$; $n_{24h}=3$; $n_{48h}=3$; $n_{72h}=3$)

Nach einer Expositionszeit von 24 h steigt die Toxizität, gemessen mit dem Neutralrottest, nicht über 30 %. Bei einer HS-Konzentration von 60 µg/ml ergibt die Auswertung mit dem NRU-Test eine negative Zytotoxizität. Mit steigender Konzentration steigt dann auch wieder die Zytotoxizität der HS auf hLEC.

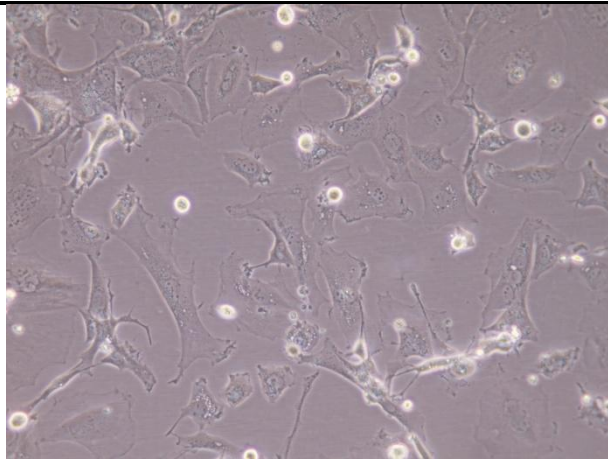
Bei den längeren Expositionszeiten fehlt der scheinbar wachstumsfördernde Effekt der HS, hier steigt die Zytotoxizität zunächst stark an und erreicht zwischen 20 und 250 µg/ml ein Plateau.

Die beiden Expositionszeiten 48 und 72 h ähneln sich sehr in ihrem Kurvenverlauf. Bereits eine geringe Konzentrationserhöhung der HS-Lösung von 10 auf 20 µg/ml zeigt einen drastischen Anstieg der zytotoxischen Wirkung auf über 50 %. Dieser steigt aber bei weiterer Konzentrationssteigerung nicht mehr wesentlich weiter an.

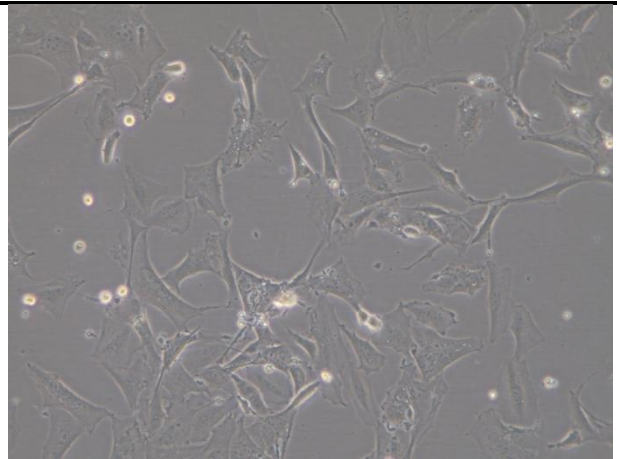
Diese Ergebnisse mit dem Neutralrottest stehen in deutlicher Diskrepanz mit den morphologisch sichtbaren Veränderungen unter dem Phasenkontrastmikroskop (Abb. 14). Während der Neutralrottest nach 24 h Exposition mit der HS Aldrich nur geringe Zytotoxizität misst, können unter dem Phasenkontrastmikroskop schon deutliche Veränderungen an den Linsenepithelzellen gesehen werden. Der Zellverband löst sich auf und die Zellen werden spindelförmig, viele Zellen bilden Vakuolen in ihrem Zytoplasma.

Die mit HS Aldrich behandelten Zellen zeigen bereits nach 24h fast alle der in (Tab. 2) genannten morphologischen Merkmale der Zellapoptose. Mit steigender Konzentration und Verlängerung der Expositionszeit kann der Zelltod beschleunigt bzw. noch verstärkt werden.

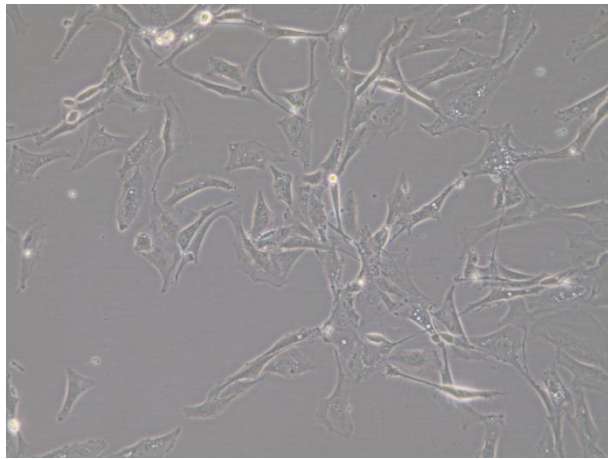
Die ermittelte CC_{50} der HS Aldrich liegt nach 24-stündiger Exposition bei > 250 µg/ml, nach 48-stündiger Exposition bei 141 µg/ml (92,2-216 µg/ml) und nach 72-stündiger Exposition bei 107 µg/ml (57,5–200 µg/ml) (Tab. 3).



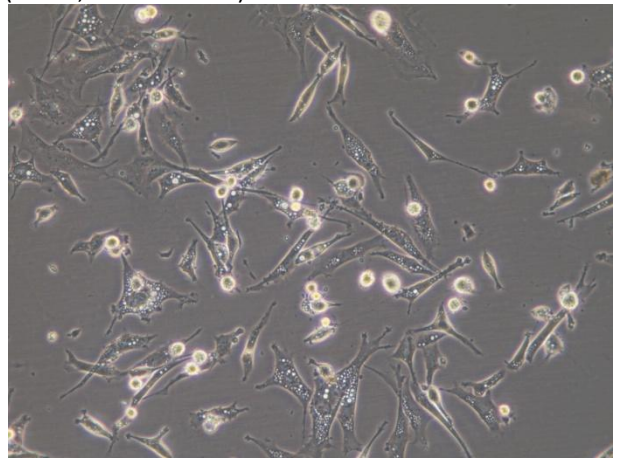
a) Zellkontrolle in serumfreiem MEM



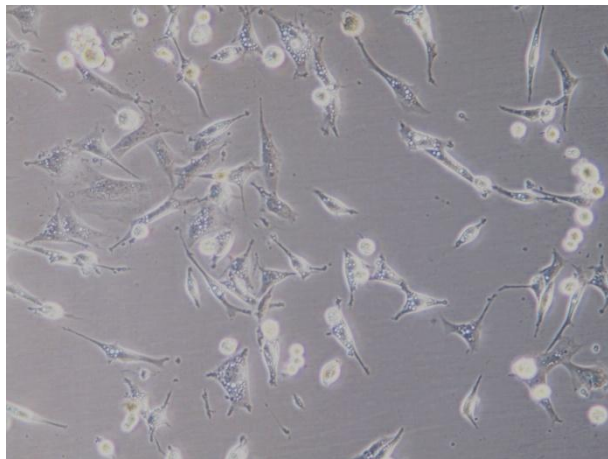
b) Die Zellen lösen sich aus dem Zellverband, einzelne frei flottierende apoptotische Zellen sind sichtbar (weiße, runde Punkte)



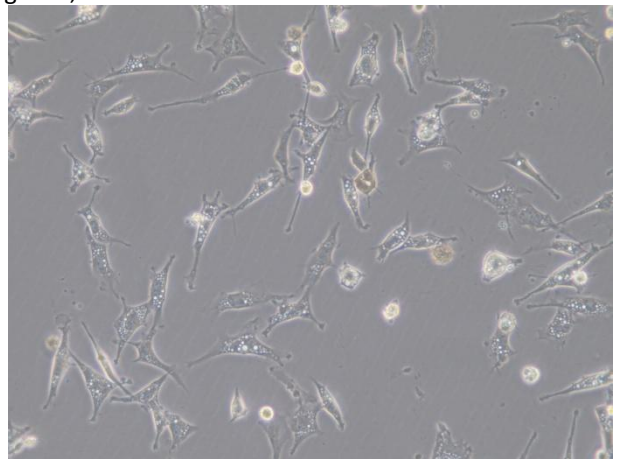
c) Die Zellen bekommen ein spindelförmiges Aussehen.



d) Zellen erscheinen spindelförmig und neigen zu Vakuolenbildung. Die Zellen sind aus dem Verband gelöst, Anzahl noch nicht deutlich reduziert.



e) Die Zellen sind deutlich geschrumpft, das Zytoplasma mit Vakuolen durchsetzt.



f) Zellzahl vermindert

Abb. 14: 24-h-Inkubation mit HS Aldrich bei 120facher Vergrößerung (a=Kontrolle in MEM ohne Serum, b= 10 µg/ml, c= 20 µg/ml, d= 60 µg/ml, e= 120 µg/ml, f= 250 µg/ml)

3.2.1.2 Bestimmung der UV-B-protektiven Wirkung von HS Aldrich

Für die Bestimmung der UV-B-protektiven Wirkung der HS Aldrich wurden die Konzentrationen 60, 120 und 250 µg/ml ausgewählt. In diesen drei Konzentrationen konnten in Vorversuchen deutlich protektive Effekte erzielt werden. Desweiteren war die Beschränkung auf drei Konzentrationen notwendig, um zusammen mit der Schadenskontrolle ein quadratisches Bestrahlungsfeld auf der 24-Well-Platte zu erhalten (2.4.4).

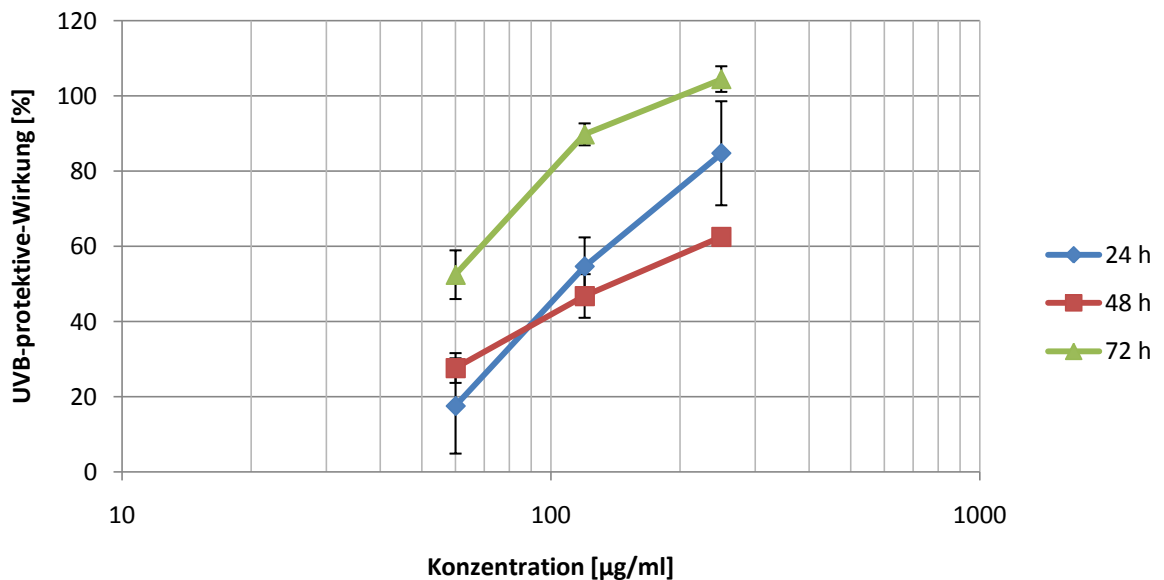


Abb. 15: UV-B-protektive Wirkung (UV-B-PW) von HS Aldrich auf hLEC. Getestet wurden HS-Konzentrationen von 60, 120 und 250 µg/ml. Ausgewertet wurde mit NRU nach 24, 48 und 72 h ($\bar{x} \pm \sigma_n$; $n_{24h}=3$; $n_{48h}=3$; $n_{72h}=3$)

Die Zellen waren den HS nur zum Bestrahlungszeitpunkt ausgesetzt und wurden anschließend umgehend in frisches serumhaltiges MEM umgesetzt. So sollten die zytotoxischen Einflüsse der HS minimiert werden. Bei allen drei Postexpositionsintervallen ist ein konzentrationsabhängiger Anstieg der UVB-PW sichtbar. Nach 72 h liegt sie bei einer Konzentration von 250 µg/ml sogar über 100 %. Ein Wert über 100 % ergibt sich rechnerisch, wenn sich die mit HS behandelten Zellen im Vergleich zu den Zellen der unbestrahlten Kontrolle stärker vermehrt haben. Nach 48 h ist der Zellschaden von unbehandelten hLEC maximal (Abb. 10) Hier in (Abb. 15) wird deutlich, dass die UVB-PW nach 48 h geringer ist als für die beiden anderen Postexpositionsintervalle.

Morphologisch finden sich vor allem bei niedrigen HS Konzentrationen die für UVB-Strahlenschäden typischen apoptotischen Zellen. Mit längerem Postexpositionsintervall schwimmen vermehrt abgelöste Zellen frei im Medium, während sich darunter eine neue, dicht wachsende hLEC-Schicht gebildet hat. Auffällig ist das vermehrte Auftreten von mehrkernigen Riesenzellen (Abb. 16), in einem ansonsten dicht wachsenden Epithel. Die Kerne mit ihren Nucleoli sind deutlich vom Zytoplasma abgrenzbar.

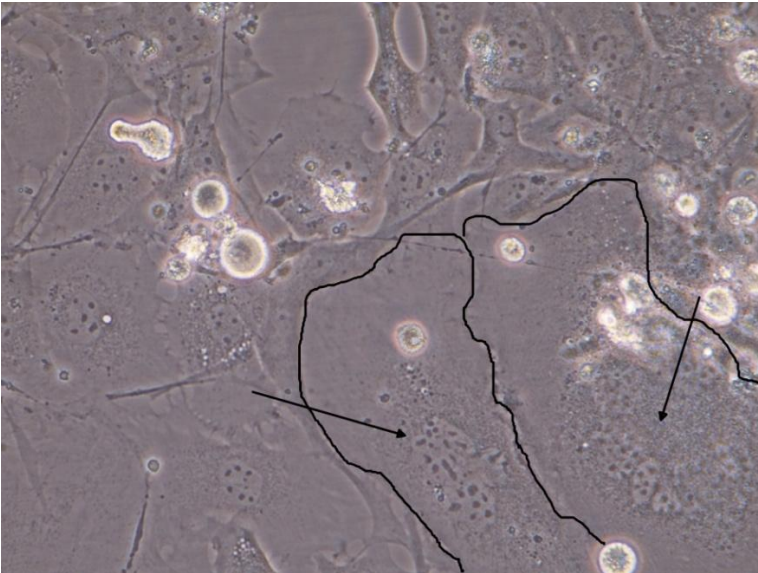


Abb. 16: 120 µg/ml HS Aldrich 20 s lang mit UVB bestrahlt. Nach 72h-Postexpositionsintervall (300x Vergrößerung)
Pfeile zeigen mehrkernige Riesenzellen, die schwarzen Linien zeigen die Zellgrenzen an.

Die ermittelte UV-B-PC₅₀ von HS Aldrich liegt 24 h nach Exposition bei 112,68 µg/ml (90,8–140µg/ml), nach 48 h bei 143 µg/ml (122–168 µg/ml) und nach 72h bei 48,1 µg/ml (40,2–57,6 µg/ml) (Tab. 3).

3.2.2 Hydrokaffeesäure-Oxidationsprodukt (synthetische Huminsäure)

HS können auch auf dem synthetischen Weg hergestellt werden. Im Gegensatz zu den natürlichen HS geht man hier von einer monomeren Ausgangsverbindung aus und polymerisiert nach einer speziellen Vorschrift (Helbig und Klöcking, 1983). Für die Herstellung von HYKOP ist Hydrokaffeesäure das Ausgangsmonomer (Abb. 6).

HYKOP hatte sich als besonders untoxisch und als wirksamer UV-Schutz an U937-Zellen erwiesen (Kühn, 2005).

3.2.2.1 Bestimmung der Zytotoxizität von HYKOP

Zunächst wurde analog zu HS Aldrich die Zytotoxizität von HYKOP an hLEC mit einem Expositionsintervall von 24, 48 und 72 h getestet. Für die Zytotoxizität und den späteren Bestrahlungsversuch wurden die gleichen Konzentrationen ausgewählt wie für HS Aldrich.

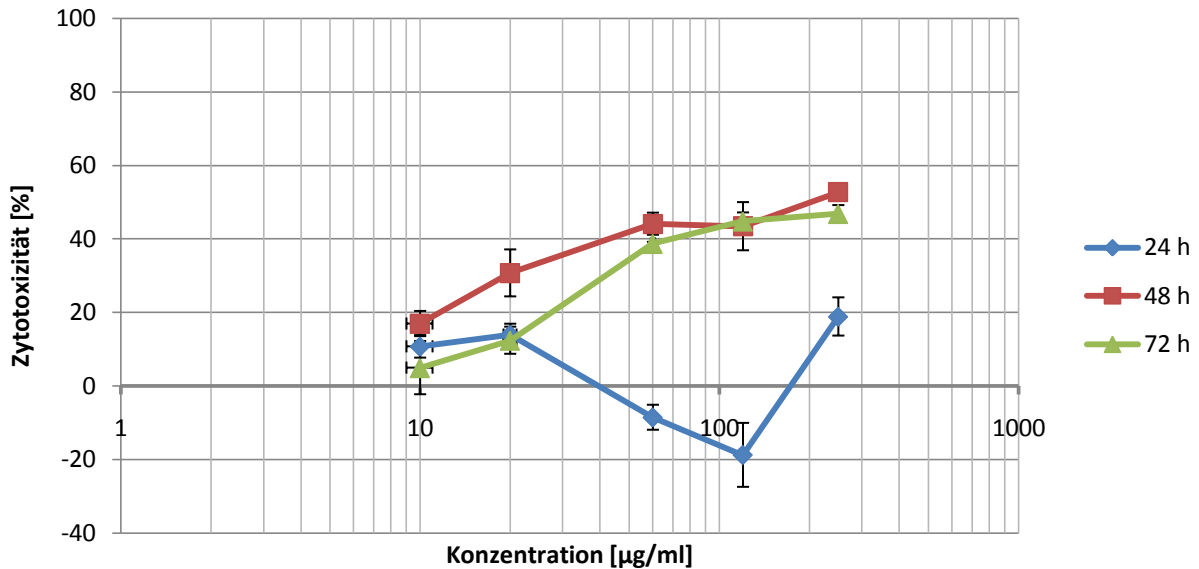


Abb. 17: Zytotoxizität (CT) von HS HYKOP auf hLEC. Ausgewertet mit NRU nach 24, 48 und 72 h Expositionszeit. Getestete HYKOP-Konzentrationen: 10, 20, 60, 120 und 250 µg/ml ($\bar{x} \pm \sigma_n$; $n_{24h}=3$; $n_{48h}=3$; $n_{72h}=3$)

Auffällig ist der scheinbar wachstumsfördernde Effekt dieser HS im Konzentrationsbereich von 60–120 µg/ml. Erst ab 250 µg/ml schlägt die Wirkung wieder in eine zytotoxische um. Schon an U937-Zellen konnte dieser wachstumsfördernde Effekt im Konzentrationsbereich von 62,5–500 µg/ml gezeigt werden (Kühn, 2005). Allerdings muss dieses Ergebnis, wie schon bei HS Aldrich, gemeinsam mit den morphologischen Veränderungen der Zellen unter dem Phasenkontrastmikroskop betrachtet werden. Hier zeigt sich wieder ein ähnliches Bild wie schon zuvor bei HS Aldrich (Abb. 18).

Auch hier verlaufen die beiden Kurven der 48- und 72-h- Expositionszeit ähnlich, der Anstieg der Kurven ist insgesamt etwas flacher für die HS HYKOP als für die HS Aldrich.

Rechnerisch ergeben sich CC_{50} Werte nach 24 h von > 250 µg/ml, nach 48 h liegt er bei 166 µg/ml (124–223 µg/ml) und nach 72 h ergibt sich ein Wert von 209 µg/ml (192–229 µg/ml) (Tab. 3).

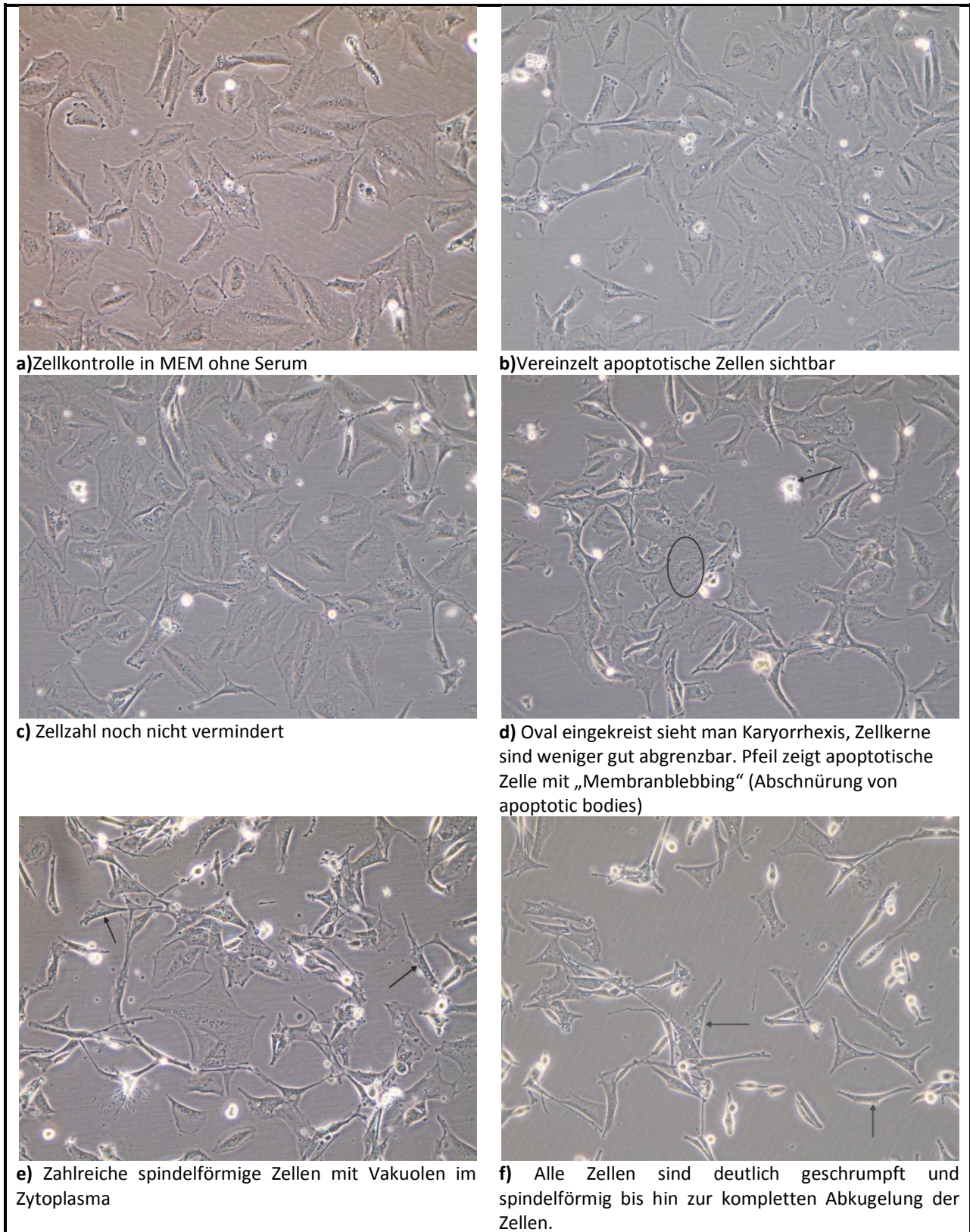


Abb. 18: 24h Inkubation mit HS HYKOP bei 120facher Vergrößerung (a=Kontrolle in MEM ohne Serum, b=10 µg/ml, c=20 µg/ml, d=60 µg/ml, e=120 µg/ml, f=250 µg/ml)

3.2.2.2 Bestimmung der UVB-protaktiven Wirkung von HYKOP

Getestet wurden auch hier die Konzentrationen 60, 120, 250 µg/ml, zusätzlich wurde eine Schadenskontrolle mit serumfreiem Medium mit bestrahlt (Abb. 19).

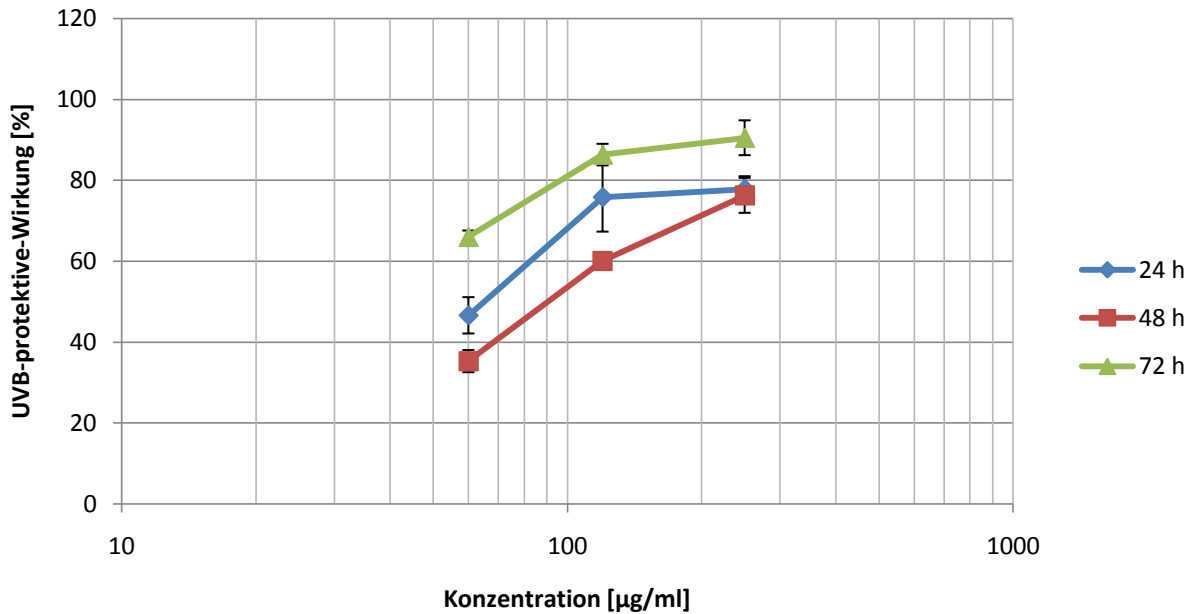


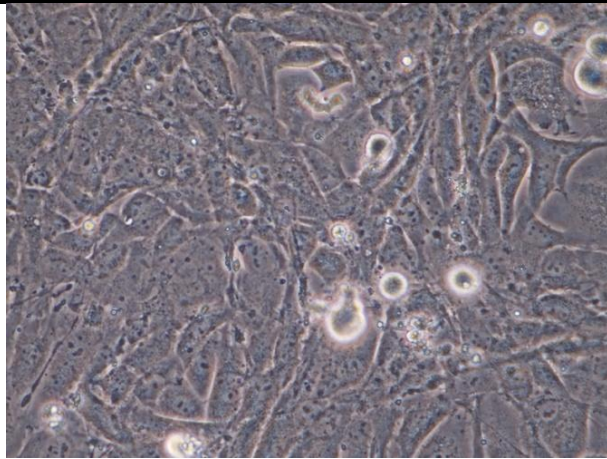
Abb. 19: UVB-protaktive Wirkung von HS HYKOP auf hLEC. Getestet wurden HS- Konzentrationen von 60, 120 und 250 µg/ml. Ausgewertet wurde mit NRU nach 24, 48 und 72 h ($\bar{x} \pm \sigma_n$; $n_{24h}=3$; $n_{48h}=3$; $n_{72h}=3$)

Wie bei HS Aldrich findet man auch für das HYKOP bei einem Postexpositionsintervall von 72 h den stärksten UVB-protaktiven Effekt. Für das Hydrokaffeesäure-Oxidationsprodukt übersteigt die UVB-protaktive Wirkung aber bei keiner Konzentrationsstufe 100 %. Auffällig ist auch hier, dass die 48-h-Kurve deutlich unter den anderen beiden verläuft und somit den geringsten Schutzeffekt aufweist, allerdings muss auch hier darauf hingewiesen werden, dass der Zellschaden nach 48 h sein Maximum erreicht und nach 72 h, auch ohne protaktive Substanz, ein Erholungseffekt eintritt.

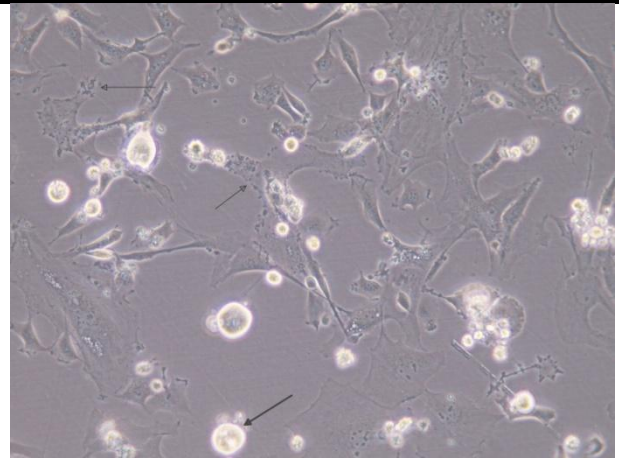
Insgesamt ist der Schutzeffekt schon in geringeren Konzentrationen höher, als dies bei der HS Aldrich der Fall war. Allerdings steigen die Kurven zwischen den Konzentrationen 120 und 250 µg/ml nur noch wenig an und erreicht nach 72 h bei 250 µg/ml mit 90,5 % ihre maximale UVB-protaktive Wirkung.

Bei einer Konzentration von 60 µg/ml HS HYKOP findet man nach UVB-Bestrahlung die typischen Apoptosezeichen (Tab. 2). Mit zunehmender HS-Konzentration werden die morphologisch veränderten Zellen weniger und der Zellrasen dichter. Bei einer Konzentration von 250 µg/ml HYKOP kann nach einem

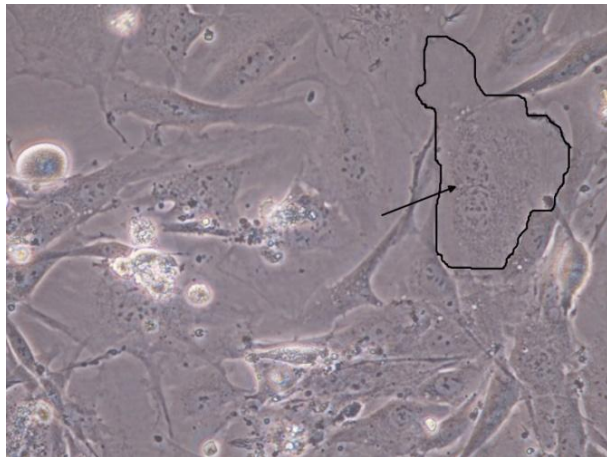
Postexpositionsintervall von 72 h unter dem Phasenkontrastmikroskop kaum ein Unterschied zur Kontrolle festgestellt werden, lediglich die Zelldichte ist etwas geringer (Abb. 20). Dennoch kommen auch hier mehrkernigen Riesenzellen vor.



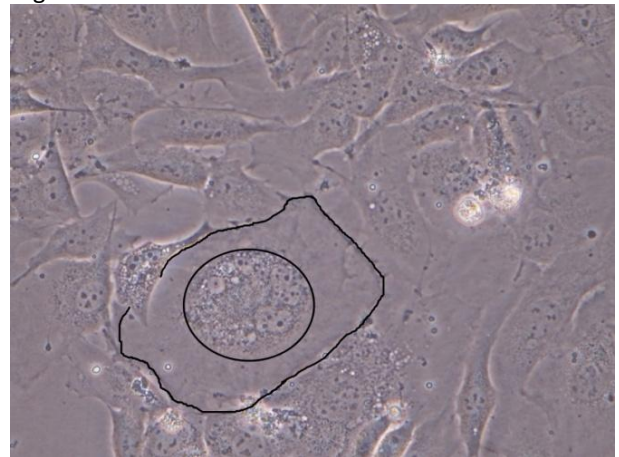
a) Sehr dichter Zellrasen. Einzelne Zellen sind kaum abgrenzbar. Kerne und Nucleoli sind kontrastreich vom Zytoplasma abgrenzbar. Vereinzelt apoptotische, abgelöste Zellen sichtbar.



b) Dicker Pfeil: abgelöste, frei flottierende apoptotische Zelle
Dünne Pfeile: „Membranblebbing“, Abschnürung von membranumschlossenen Vesikeln.
Insgesamt geschrumpfte Zellen mit unscharf abgrenzbaren Zellkernen



c) Die schwarz eingekreiste Zelle hat zwei Zellkerne (Pfeil). Das Epithel ist dicht gewachsen und die Kerne mit ihren Nucleoli heben sich kontrastreich vom Zytoplasma ab. Im Medium flottieren apoptotische Zellen.



d) Im Vergleich zur Zellkontrolle etwas weniger dichter Zellrasen. Schwarz eingekreist sieht man eine mehrkernige Riesenzelle

Abb. 20: 20 s lang in Anwesenheit von HYKOP bestrahlte hLEC nach 72-h-Postexpositionsintervall

(a= Kontrolle. Phako: 120x, b= 60 µg/ml. Phako: 120x, c= 120 µg/ml. Phako: 240x, d= 250 µg/ml. Phako: 240x)

Die ermittelte UV-B-PC₅₀ von HS HYKOP liegt 24 h nach UVB-Exposition bei 54,4 µg/ml (42,9–68,8 µg/ml), nach 48 h bei 94,3 µg/ml (89,4–99,5 µg/ml) und nach 72 h bei 16 µg/ml (9,88–26 µg/ml) (Tab. 3).

3.2.3 Paraaminobenzoesäure (PABA) – Referenzsubstanz

3.2.3.1 Bestimmung der Zytotoxizität von PABA

PABA gehört zu den chemischen Sonnenschutzfiltern, meist bestehen diese aus einem Benzolring mit Substituenten, die eine ausreichende Zahl an Doppelbindungen haben (Abb.5). Diese Strukturbedingungen sind notwendig, um möglichst viel UV-Strahlung absorbieren zu können. Durch die Absorption eines Photons wird ein Elektron innerhalb des bestrahlten Moleküls von einem Grundzustand in einen energetisch höheren, angeregten, Zustand versetzt.

PABA absorbiert vor allem im UVB-Bereich und weist zudem strukturelle Ähnlichkeiten zu den hier untersuchten Huminsäuren auf.

Für die Bestimmung der Zytotoxizität von PABA auf humane Linseneithelzellen, wurde PABA in den Konzentrationen 10, 60, 120, 250 und 500 µg/ml für 24, 48 und 72 h inkubiert und anschließend mit NRU ausgewertet.

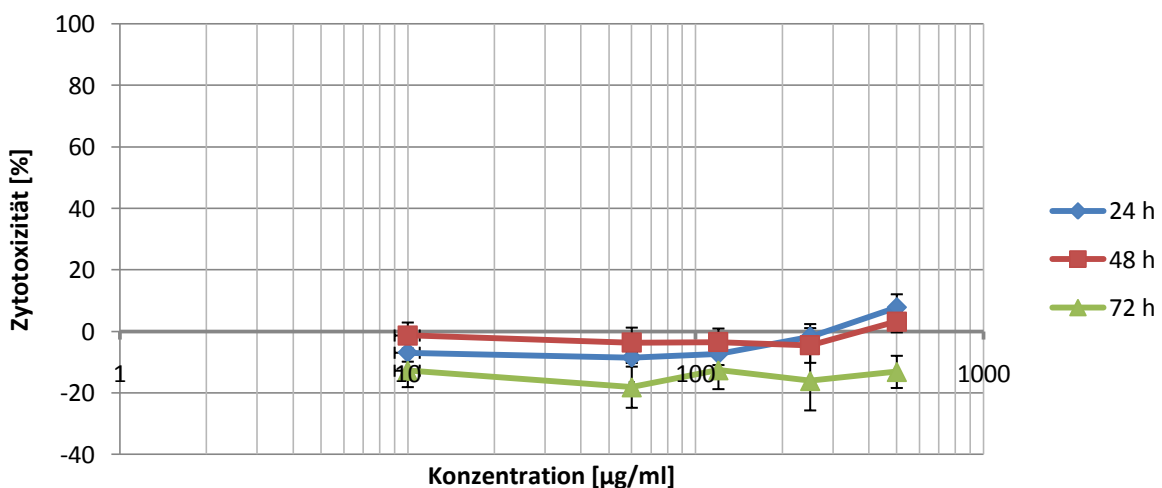


Abb. 21: Zytotoxizität (CT) von HS PABA auf hLEC. Ausgewertet mit NRU nach 24, 48 und 72 h Expositionszeit. Getestete PABA-Konzentrationen: 10, 20, 60, 120 und 250 µg/ml ($\bar{x} \pm \sigma_n$; $n_{24h}=4$; $n_{48h}=5$; $n_{72h}=5$)

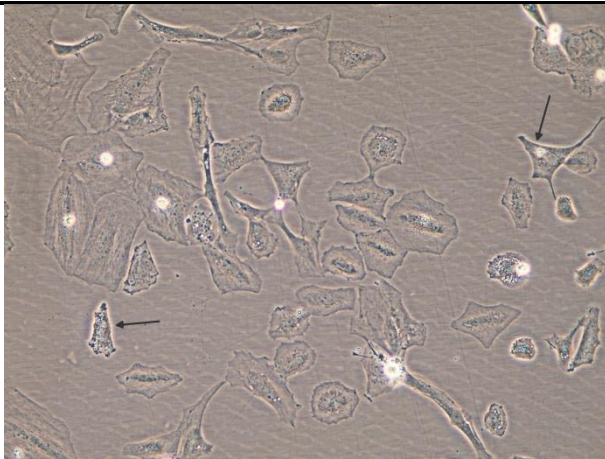
Während die Auswertung der 24- und 48-h-Expositionszeiten einen etwa gleichen Verlauf aufweisen und ein insgesamt untoxisches Verhalten darstellen, scheint die 72-h-Expositionszeit ein wachstumsförderndes Verhalten aufzuweisen. An dieser Stelle sei aber darauf hingewiesen, dass sich die hier verwendeten humane Linsenepithelzellen in serumfreiem Medium (und ohne L-Glutamin) nicht mehr weiter vermehren und mehr Apoptose auftritt, als dies nach gleichem Zeitintervall in serumhaltigem Medium der Fall wäre (Abb. 25). So könnte der hier gezeigt wachstumsfördernde Effekt von PABA ebenso gut eine Hemmung des Zelltodes sein, der durch ein mangelndes Nährstoffangebot ausgelöst wird.

Insgesamt sterben bei allen getesteten Konzentrationen nie mehr als 10 % der Zellen im Vergleich zu einer mit serumfreiem Medium behandelten Zellkontrolle ab.

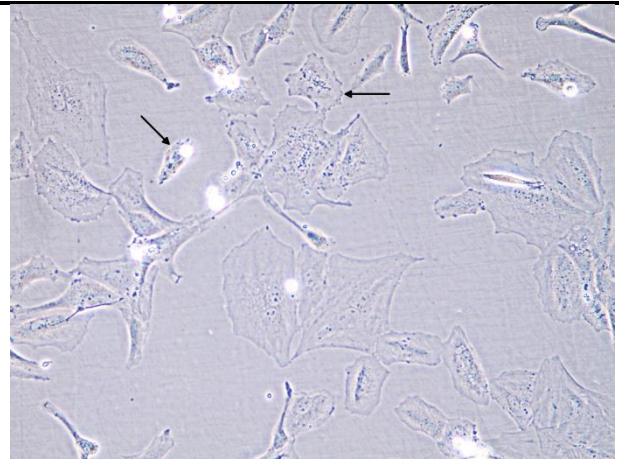
Bei der morphologischen Betrachtung der Zellen fällt auf, dass bereits die in serumfreiem Medium wachsende Zellkontrolle nach 72 h deutlich Veränderungen gegenüber hLEC in serumhaltigem Medium aufweisen (Abb. 20a). Die Apoptoserate ist erhöht und auch die überlebenden Zellen weisen Veränderungen hinsichtlich ihrer Membranen und Kerne auf. Die Zellen scheinen geschwollen und die Membranen sind leicht ausgefranst an den Stellen, an denen wahrscheinlich vorher Zellkontakte bestanden. Die Zellkerne sind nicht mehr eindeutig vom Zytoplasma abgrenzbar und die Nucleoli sind nicht mehr sichtbar. Trotz Zellschwellung konnten aber keine „geplatzten“ Zellen oder Zellen mit anderen morphologischen Merkmalen, die einer Nekrose entsprächen, gefunden werden. Der hier eingeleitete Zelltod ist vermutlich auf den kachektischen Ernährungszustand der Zellen zurückzuführen. Man spricht auch vom „death by neglect“, dieser leitet das intrinsische Apoptose Programm ein (1.5).

Bei höheren PABA Konzentrationen scheint der Zellverband insgesamt besser erhalten zu bleiben und die Zellzahl ist weniger reduziert als in der serumfreien Kontrolle. Allerdings finden sich auch hier die oben geschilderten Veränderungen der Zellen.

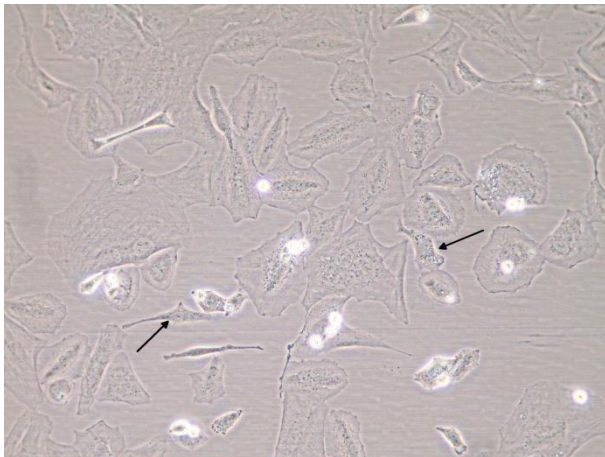
Es sei weiterhin darauf hingewiesen, dass mit erhöhter PABA-Konzentration die Auswertung mit dem NRU-Test erschwert war. Der Test macht insgesamt drei Absaugvorgänge notwendig (2.4.1), bei denen es immer zu vereinzelt Zellablösungen kommen kann. Allerdings scheint PABA die Zelladhärenz von hLEC zu verringern. Regelmäßig waren in Kavitäten, die unter dem Phasenkontrastmikroskop einen zuvor unversehrten Zellbesatz aufwiesen, größere Stücke aus dem Zellrasen herausgebrochen. Um dem entgegen zu wirken, wurde für PABA jede Zellreihe einzeln abgesaugt und extrem vorsichtig wieder mit dem jeweiligen Reagenz beträufelt. Nur so konnten auswertbare Ergebnisse erzielt werden.



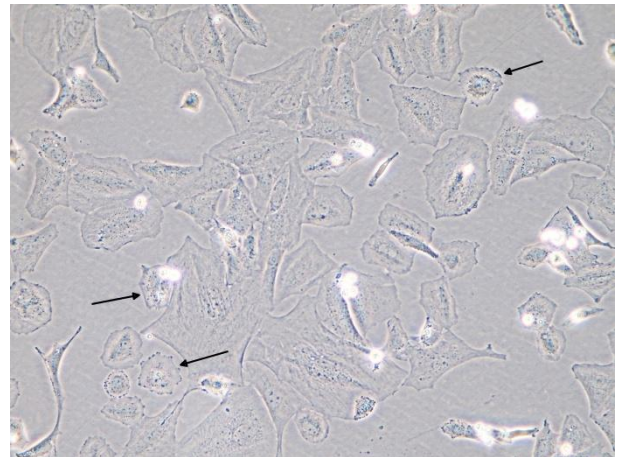
a) Die Pfeile zeigen auf apoptotisch veränderte Zellen. Auch die übrigen Zellen haben sich aus dem Zellverband gelöst und erscheinen teilweise geschwollen.



b) Pfeile deuten auf geschrumpfte, apoptotische Zellen.



c) Neben apoptotischen Zellen (Pfeile) finden sich noch viele unveränderte Zellen, deren Zellverband nicht aufgehoben ist.



d) Im Vergleich zur Kontrolle vermehrte Zellzahl



e) Pfeile zeigen auf apoptotische Zellen

Abb. 22: 72-h-Inkubation mit PABA bei 120facher Vergrößerung (a=Kontrolle in MEM ohne Serum, b= 60 µg/ml, c= 120 µg/ml, d= 250 µg/ml, e= 500 µg/ml)

3.2.3.2 Bestimmung der UVB-protaktiven Wirkung von PABA

Für diese Arbeit wurde PABA als Referenzsubstanz für die UVB-protaktive Wirkung ausgewählt. Der jahrzehntelange Einsatz dieser Substanz als Sonnenschutzmittel spricht für eine gute Wirksamkeit als Schutzsubstanz vor UVB-Strahlen auf Hautepithelzellen.

Ob diese Schutzwirkung nun auch auf Linsenepithelzellen übertragbar ist, sollte in dem folgenden Versuch festgestellt werden. Ausgewählt wurden auch hier, genau wie bei den beiden anderen Substanzen, die Konzentrationen 60, 120, 250 $\mu\text{g/ml}$.

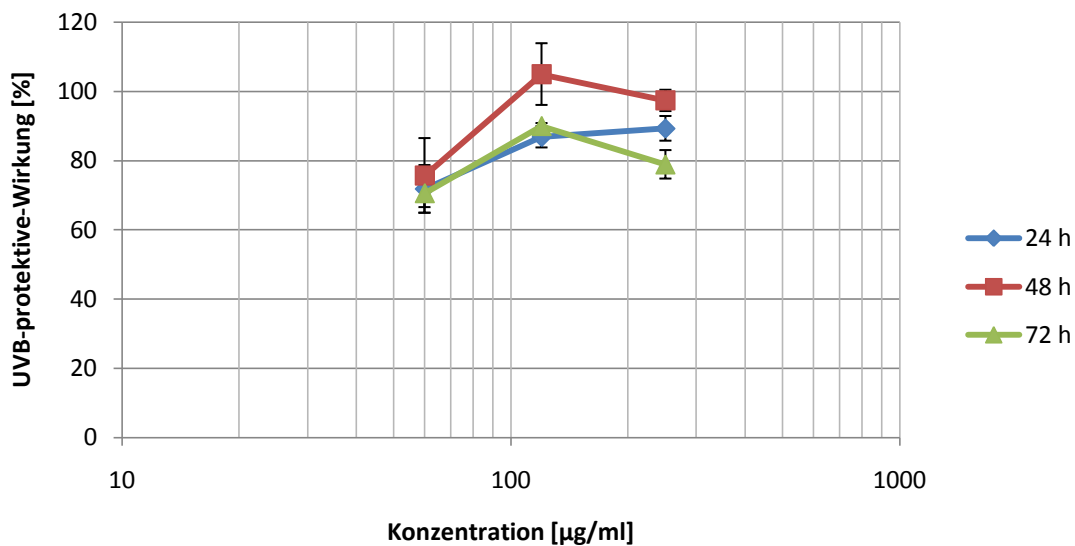
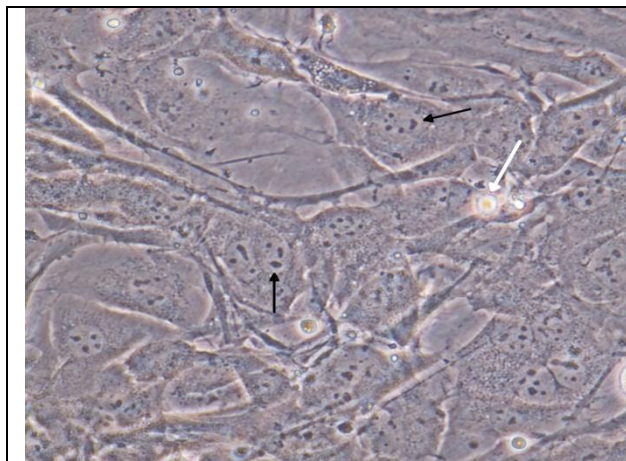


Abb. 23: UV-B-protaktive Wirkung (UV-B-PW) von PABA auf hLEC. Getestet wurden HS-Konzentrationen von 60, 120 und 250 $\mu\text{g/ml}$. Ausgewertet wurde mit NRU nach 24, 48 und 72 h ($\bar{x} \pm \sigma_n$; $n_{24\text{h}}=3$; $n_{48\text{h}}=3$; $n_{72\text{h}}=3$)

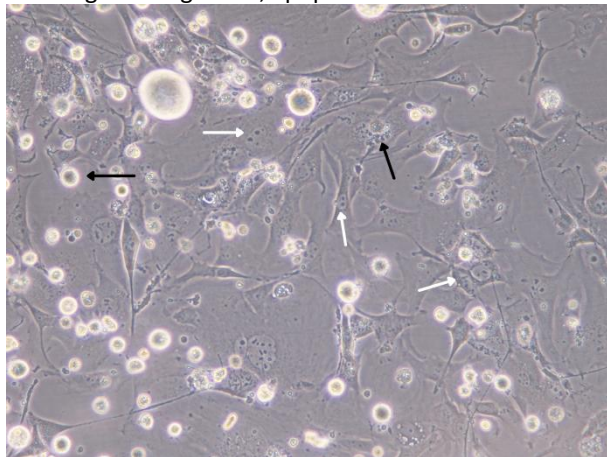
Bereits ab einer Konzentration von 60 $\mu\text{g/ml}$ zeigt PABA für alle drei Postexpositionsintervalle eine UVB-protaktive Wirkung von über 70 %. Bei einer Steigerung der Konzentration auf 120 $\mu\text{g/ml}$ verhalten sich die Kurven des 24- und 72-h-Intervalls ähnlich, beide erreichen eine UVB-protaktive Wirkung von über 85 %. Nach 48 h findet sich für diese Konzentration eine 105%ige protaktive Wirkung. D.h. im Vergleich zur unbestrahlten Zellkontrolle ist das Zellwachstum sogar beschleunigt. Bei der höchsten Konzentration von 250 $\mu\text{g/ml}$ ist das protaktive Verhalten von PABA für die verschiedenen Konzentrationen leicht unterschiedlich. Auch hier ist nach einem 48h-Intervall die Schutzwirkung am stärksten, erreicht aber nur noch knapp die 100%ige Schutzwirkung. Nach 24 h beträgt sie nur etwa 90 % und nach 72 h fällt diese noch weiter auf 78,9%.



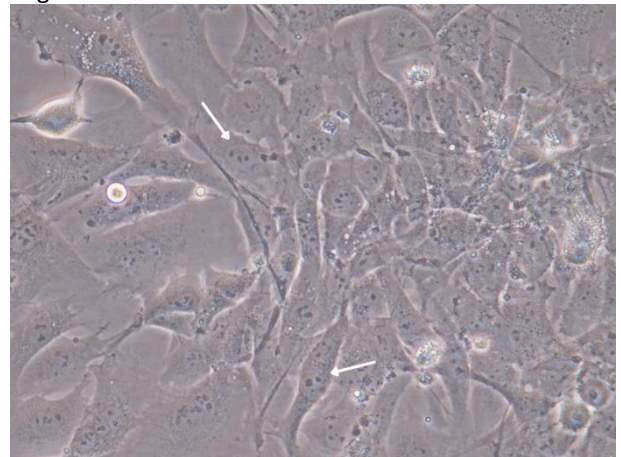
a) Kontrolle: Schwarze Pfeile zeigen auf Nucleoli. Die Kerne sind gut vom Zytoplasma abgrenzbar. Weißer Pfeil zeigt auf abgelöste, apoptotische Zelle.



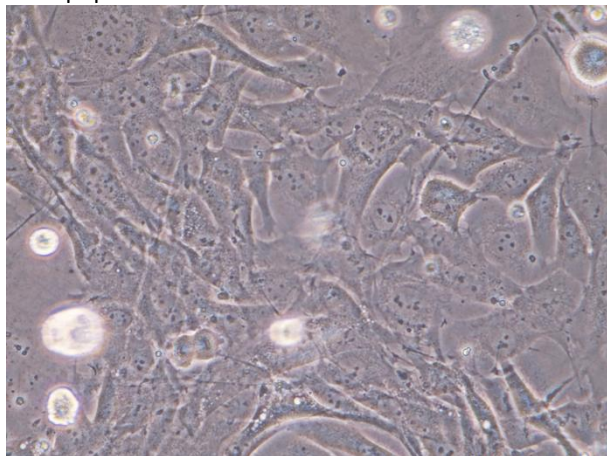
b) Schadenskontrolle: Schwarze Pfeile zeigen auf apoptotische Zellen. Der weiße Pfeil zeigt einen fragmentierten Nucleolus.



c) Weiße Pfeile zeigen kontrastreiche (normale) Nucleoli. Schwarz markierte und weiße runde Zellen sind apoptotisch.



d) Zellen weisen weitgehend normale morphologische Merkmale auf. Fast lückenloser Zellrasen.



e) Keine morphologischen Unterschiede zur Zellkontrolle

Abb. 24: 20 s lang in Anwesenheit von PABA bestrahlte hLEC nach 48-h-Postexpositionsintervall (a= Kontrolle. Phako: 240x, b= 20 s bestrahlt ohne PABA. Phako: 240x, c= 60 µg/ml. Phako: 120x, d= 120 µg/ml. Phako: 240x, e= 250 µg/ml. Phako: 240x)

Der morphologische Vergleich der Kontrolle mit den 20 s lang bestrahlten Zellen zeigt, dass ab einer Konzentration von 120 µg/ml PABA keine sichtbaren Bestrahlungsschäden an den hLEC mehr hervorgerufen werden. Die in jedem Versuch mitgeführte Schadenskontrolle, die in serumfreiem Medium ebenfalls für 20 s bestrahlt wurde, zeigt die typischen apoptotischen Veränderungen von hLEC. Die Zellen haben sich aus dem Verband gelöst und ihre Membranen erscheinen ausgefranst. Die Kerne, sofern sie noch eindeutig auszumachen sind, haben fragmentierte Nucleoli. Die gesamte Zelle ist geschrumpft oder gar bereits komplett abgekugelt und schwimmt dann frei im Medium. Bei einer Konzentration von 60 µg/ml PABA findet man ebenfalls zahlreiche abgelöste hLEC. Unterhalb der abgelösten Zellen befinden sich aber noch viele Zellen, die adhärent auf dem Schalenboden wachsen. Die überlebenden Zellen weisen kaum morphologische Veränderungen auf. Auffällig ist das Fehlen von mehrkernigen Riesenzellen, die häufig bei der Bestrahlung in Anwesenheit von HS aufgetreten waren. Die Steigerung der PABA-Konzentration auf 120 und 250 µg/ml steigert den UVB-protectiven Effekt soweit, dass unter dem Phasenkontrastmikroskop keine Unterschiede zur Zellkontrolle auszumachen sind (Abb. 24).

Die Bestimmung eines UVB-PW₅₀ für PABA ist mit diesen Konzentrationen nicht möglich, da bereits bei der niedrigsten Konzentration von 60 µg/ml die 50%ige Schutzwirkung deutlich überschritten wurde. D.h. die UVB-PW₅₀ ist für alle Postexpositionsintervalle < 60 µg/ml PABA (Tab. 3).

3.2.4 Linsenepithelzellen in serumfreiem Medium

Die hLEC vermehren sich in MEM mit 10 % FBS recht schnell und zeigen ein exponentielles Wachstum. Eldred et al. (2003) haben an humanen Linsenepithelzellen zeigen können, dass diese sich auch in serumfreiem Medium weiter vermehren. Anhand der Kontrollen in den Zytotoxizitätstests wurde überprüft, ob dies auch für die hier verwendeten hLEC zutrifft.

Die Absolutwerte der O.D. in den Kontrollen wurden gemittelt und in einem Diagramm aufgetragen (Abb. 25). Nach einer Expositionszeit von 24 h in serumfreiem Medium ergibt sich eine mittlere optische Dichte von etwa 0,26. Nach 48 h findet sich lediglich eine O.D. von 0,22. Diese fällt bei einer Verlängerung der Expositionszeit auf 72 h aber nicht weiter ab. Nach 48 h leben etwa 15 % weniger Zellen, als dies noch nach 24 h der Fall war. Eine Proliferation der Zellen in Medium ohne Serum konnte somit nicht bestätigt werden. Für morphologische Bilder nach 24 h (Abb. 18a) und 72 h (Abb. 22a).

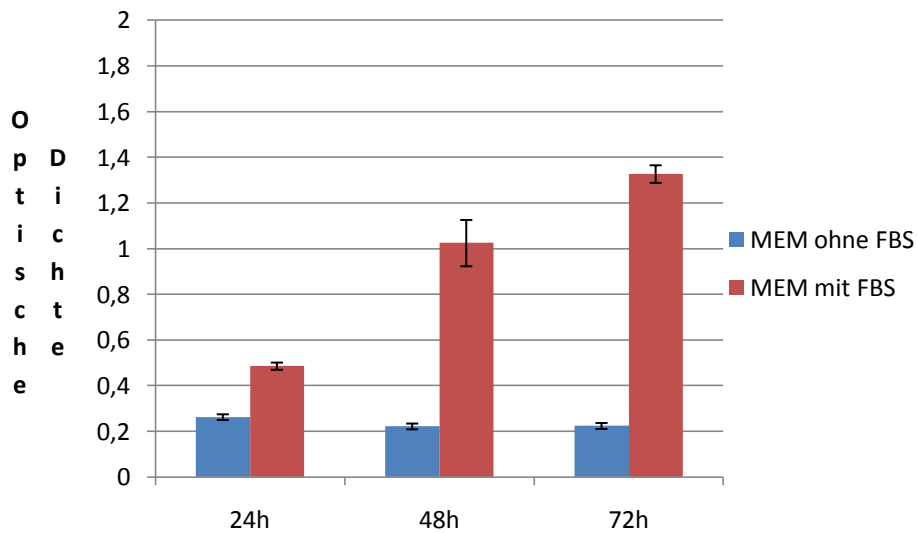


Abb. 25: Darstellung des hLEC-Wachstums in Medium mit und ohne FBS. Die O.D. wurde mit NRU bestimmt. Inkubationszeiten: 24, 48 und 72 h. ($\bar{x} \pm \sigma_n$ MEM ohne FBS: $n_{24h}=9$; $n_{48h}=10$; $n_{72h}=9$; $\bar{x} \pm \sigma_n$ MEM mit FBS: $n_{24h}=6$; $n_{48h}=6$; $n_{72h}=6$)

3.3 Mitochondrienmorphologie und Verteilung in humanen Linseneithelzellen

3.3.1 Mitochondrien in der humanen Linseneithelzelle

Wie bereits eingangs erwähnt können Mitochondrien verschiedene morphologische Erscheinungsformen innerhalb einer Zelle haben. Ihr Aussehen wird zum einen vom Zell-Typ, der Zellaktivität, dem Zellzyklus und natürlich von äußeren Einflüssen bestimmt. Damit Abweichungen von der, für humane Linseneithelzellen, normalen Mitochondrienverteilung und -form auf äußere Einflüsse zurückgeführt werden können, muss das normale Erscheinungsbild für diese Zellen bekannt sein. Versuche von Bansev und Sivak (2005) konnten zeigen, dass die Verteilung und Morphologie von Mitochondrien in bovinen Linseneithelzellen und bovinen kortikalen Linsenfaserzellen sehr verschieden sind. Die Mitochondrien der Linseneithelzellen waren bis zu 10 μm dick, lagerten sich zahlreich rund um den Kern an und schienen untereinander Vernetzungen zu bilden. Die Mitochondrien waren über das gesamte Zellvolumen verteilt. Die Mitochondrien der Linsenfaserzellen hingegen waren weniger dicht und wesentlich stärker gestreckt (bis zu 65 μm), deutlich voneinander getrennt und wiesen Verzweigungen auf. Die dynamischen Analysen hatten ergeben, dass sich die Mitochondrien von

Linseneithelzellen multidirektional bewegen konnten, während sich die Linsenfaserzellen nur bidirektional bewegten.

Trotz dieser Variabilität zwischen den beiden Zelltypen gibt es aber anscheinend keine offensichtlichen Unterschiede bezüglich Morphologie und Verteilung von Mitochondrien in Linsenzellen von unterschiedlichen Spezies, darunter Fische und Säugetiere (Bantseev et al., 2004).

Für die nachfolgenden Versuche wurden die Mitochondrien von hLEC mit MitoTracker® angefärbt und anschließend unter einem Fluoreszenzmikroskop beobachtet und fotografiert.

Für die Kontrolle wurden die Zellen in serumhaltigem MEM inkubiert und nach 0, 12 und 24 h fotografiert. Alle Versuche wurden in mindestens drei Wiederholungen durchgeführt.

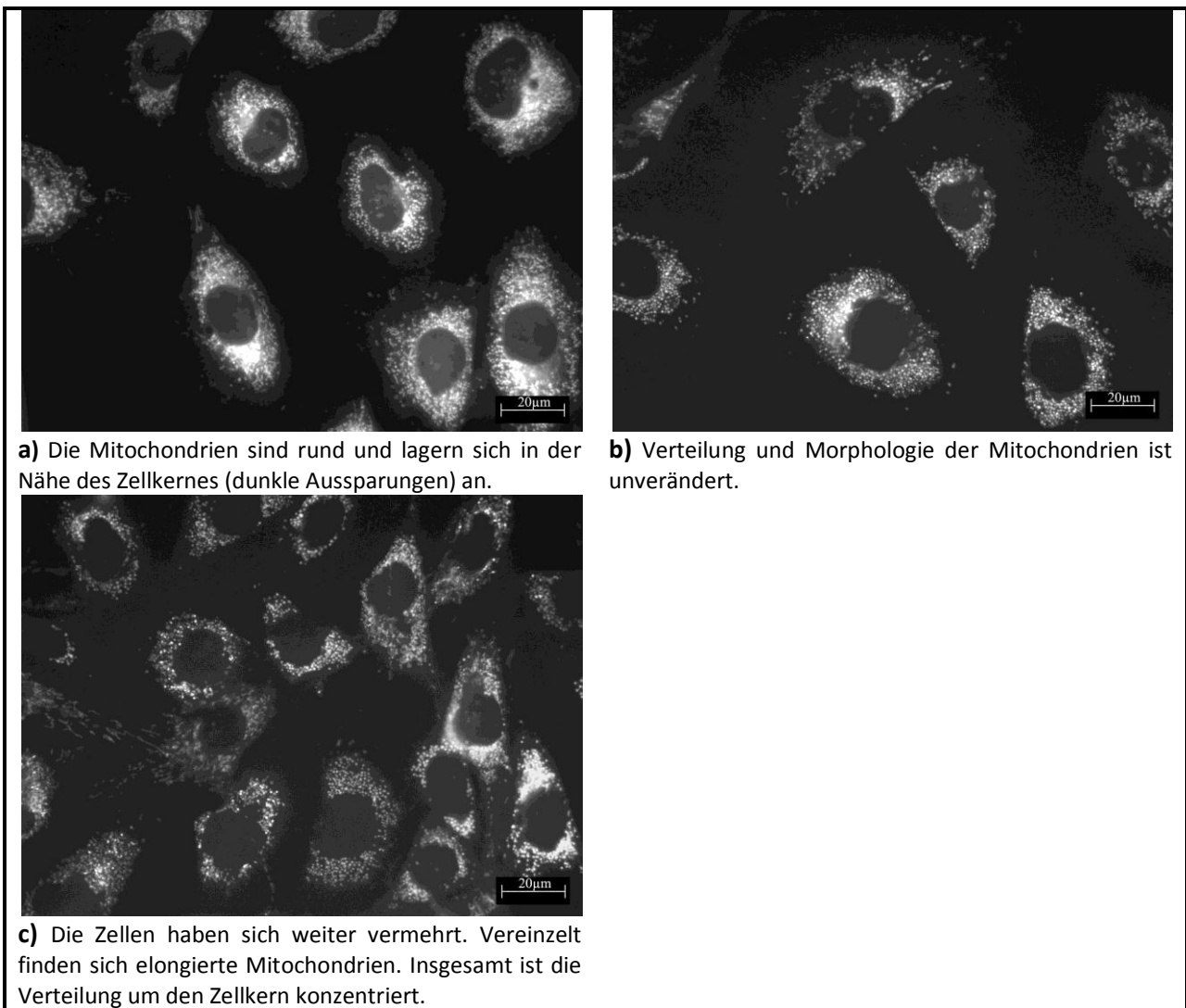


Abb. 26: Fluoreszenzbilder von hLEC in serumhaltigem MEM in (a= nach 0 h, b= 12 h, c= 24 h)

Ähnlich wie schon von Bansev und Sivak (2005) beschrieben, haben auch die in dieser Arbeit verwendeten humanen Linseneithelzellen ein um den Zellkern herum konzentriertes Verteilungsmuster der Mitochondrien. Die Mitochondrien sind in der Mehrzahl rundlich und oft nicht genau voneinander abzugrenzen. An Stellen mit sehr hohen Mitochondrienkonzentrationen kann es zu Überlagerungseffekten kommen, die sich dann als sehr helle Flecken darstellen.

Die weitere Inkubation von zuvor angefärbten Zellen über den 24-h-Zeitraum hinaus hat sich als wenig sinnvoll erwiesen. Unter dem Phasenkontrastmikroskop konnte man zwar beobachten, dass die Zellen sich weiter vermehrt haben, die Farbstoffkonzentration in den Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop war aber durch die Zellteilung und die Ausbleichungseffekte so stark reduziert, dass keine auswertbaren Bilder zu machen waren.

3.3.2 Mitochondrien in serumfreiem Medium

In den vorangegangenen Versuchen war aufgefallen, dass die hLEC in serumfreiem Medium anschwellen und sich nicht weiter vermehren. Die Zellverbindungen brechen auseinander und nach längeren Inkubationszeiten nimmt die Anzahl der apoptotischen Zellen deutlich zu.

Daher erschien es interessant zu beobachten, was mit den Mitochondrien in den ersten 24 h nach Umsetzen der Zellen in serumfreies Medium passiert. Dazu wurden die zuvor mit MitoTracker® angefärbten Zellen nach 1, 3, 6, 12 und 24 h unter dem Fluoreszenzmikroskop begutachtet und fotografiert.

Insgesamt bietet sich hier ein ähnliches Bild wie schon für die Linseneithelzellen in serumhaltigem Medium. Allerdings ist hier auffällig, dass bereits nach 3 h die Tendenz besteht, dass die Mitochondrien von einer kugelförmigen in eine tubulär gestreckte Form übergehen. Zusätzlich findet man im Zytoplasma neben den dunklen Aussparungen der Kerne auch kleinere dunkle „Löcher“, dabei handelt es sich um erste Vakuolen.

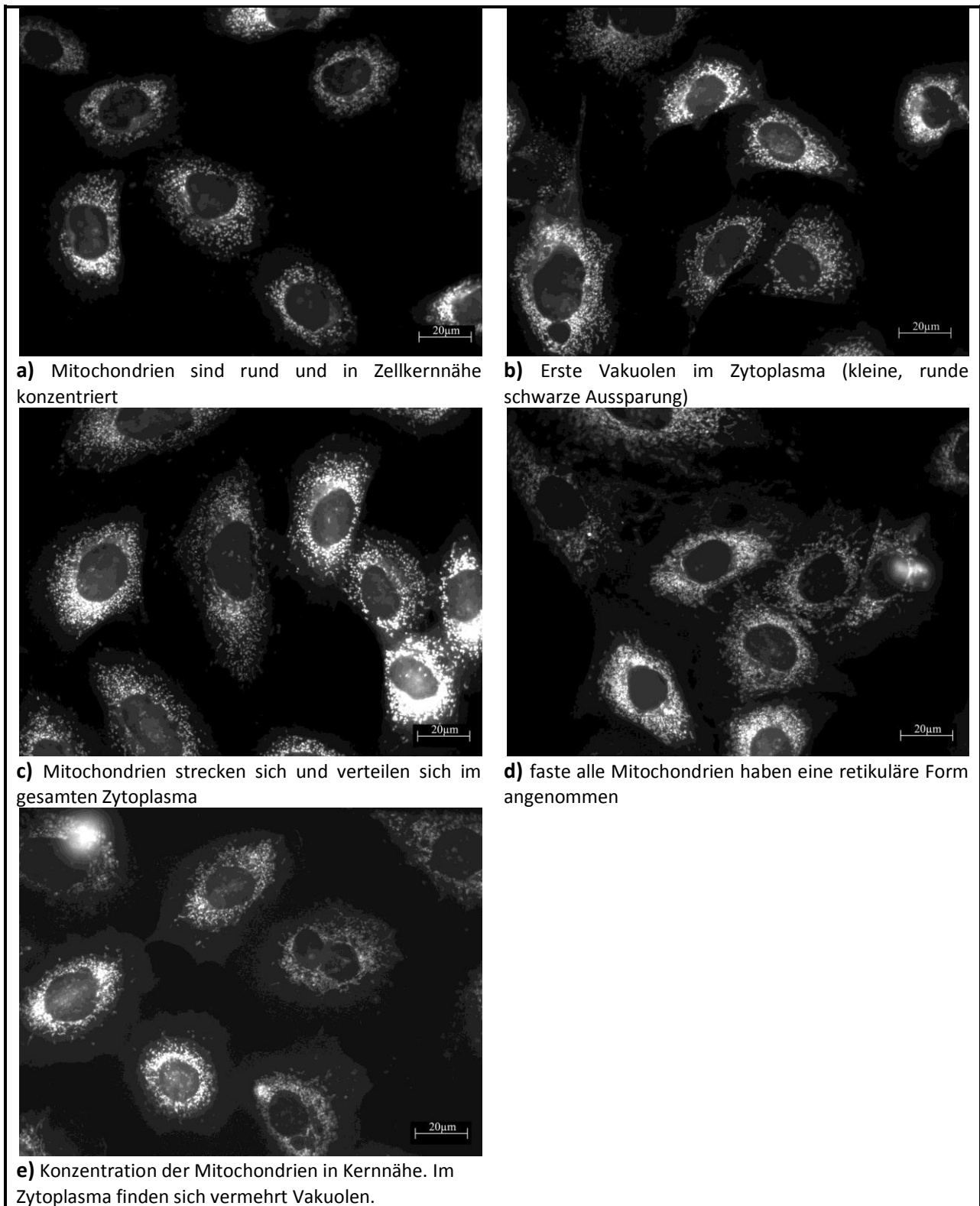


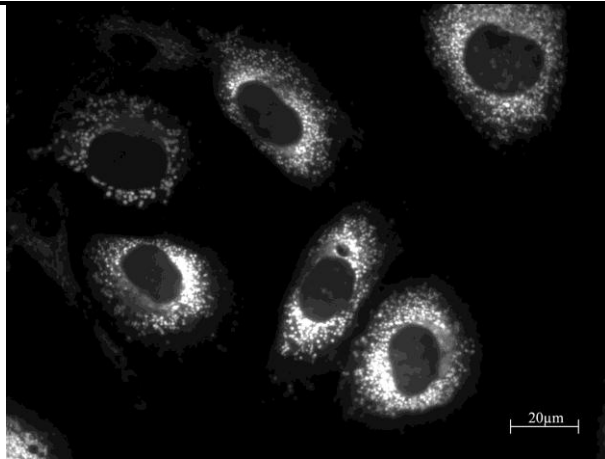
Abb. 27: Fluoreszenzbilder von hLEC in serumfreiem Medium aufgenommen (a= nach 1 h, b= nach 3 h, c= nach 6 h, d= nach 12 h, e= nach 24 h). Mit zunehmender Inkubationszeit gehen die Mitochondrien von einer rundlichen in eine gestreckte Form über. Große dunkle Aussparungen=Zellkerne.

3.3.3 UVB-Strahleneinfluss auf humane Linsenepithelzellen

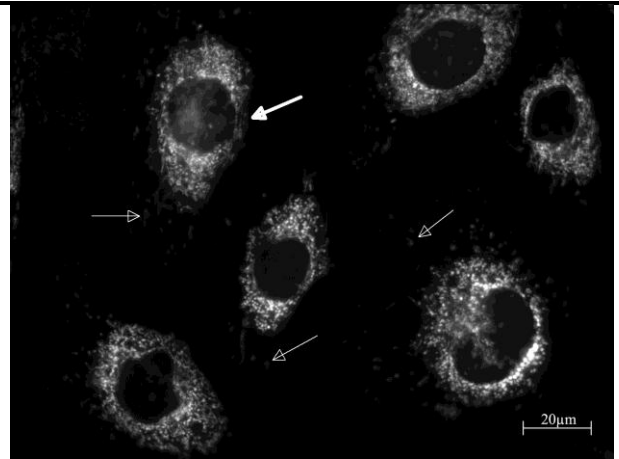
Damit eine eventuelle Schutzwirkung von HS bzw. PABA auf die Linsenepithelzellen nachgewiesen werden kann, muss zuvor der Effekt der UV-Strahlung auf die Mitochondrien, ihre Verteilung und vor allem Ihre Morphologie bekannt sein. Zum einen wurde der Bestrahlungsschaden mittels Neutralrottest und zum anderen die morphologische Beurteilung der Zellen unter dem Phasenkontrastmikroskop vorgenommen. Als dritte Methode soll nun der Fluoreszenzfarbstoff MitoTracker® zum Einsatz kommen. Die Zellen wurden vor der Bestrahlung mit dem Farbstoff inkubiert, um so eine gleichmäßige Aufnahme des Farbstoffes in den Mitochondrien zu gewährleisten. Ausgewertet wurde auch hier nach 1, 3, 6, 12 und 24 h.

Bereits eine Stunde nach der UVB-Bestrahlung können die ersten Veränderungen in der Mitochondrienmorphologie ausgemacht werden. Die Mitochondrien beginnen sich, aus einer anfangs sphärischen Konformation, in eine länglich, tubuläre Form umzuwandeln. Außerdem finden sich, vor allem kernfern, Mitochondrienfragmente im Zytoplasma. Insgesamt nimmt die Farbstoffemission mit längerem Postexpositionsintervall ab, so dass die Belichtungszeiten nachgeregelt werden müssen, um kontrastreiche Bilder aufnehmen zu können.

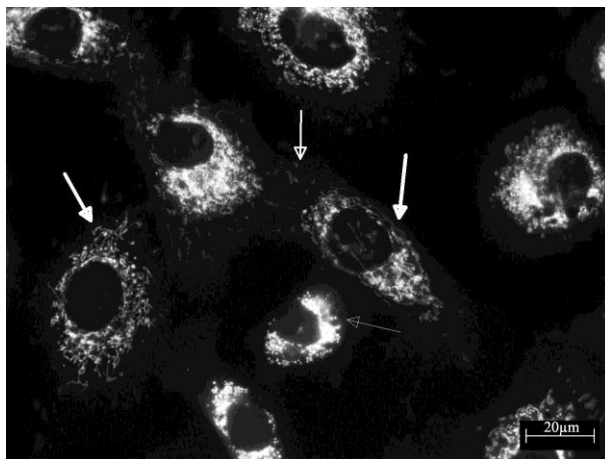
Nach 24 h weisen alle Zellen Mitochondrien mit veränderter Morphologie auf. Nach anfänglicher Streckung konzentrieren sich die Mitochondrien wieder zunehmend um den Zellkern herum. Im Medium schwimmen vereinzelt hell leuchtende, runde, abgelöste Linsenepithelzellen (Apoptose).



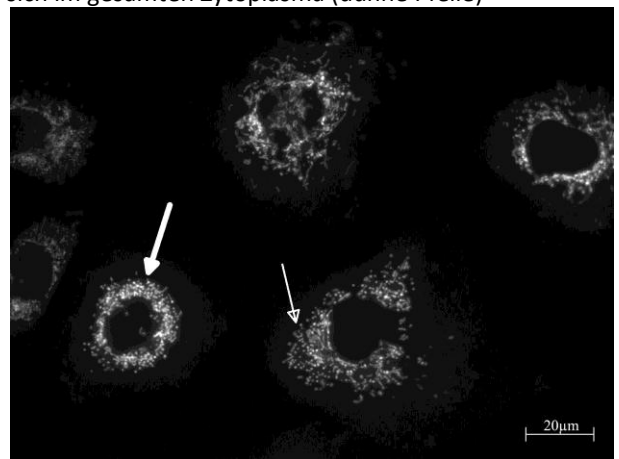
a) Die Mitochondrien sind rundlich und befinden sich in Kernnähe



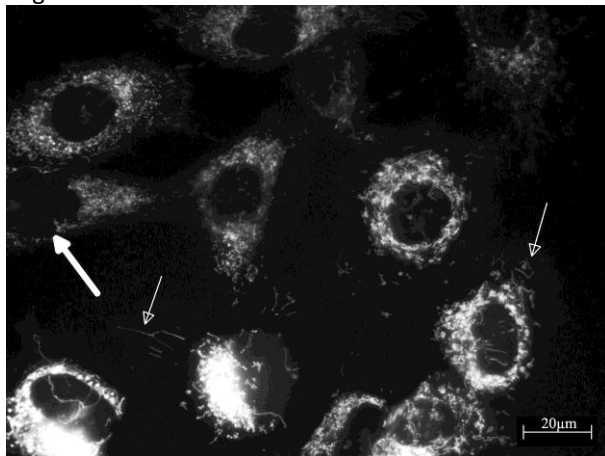
b) Die Mitochondrien gehen in eine tubuläre Form über (dicker Pfeil). Fragmentierte Mitochondrien verteilen sich im gesamten Zytoplasma (dünne Pfeile)



c) Vakuolenbildung. Die dickeren Pfeile zeigen auf tubuläre Mitochondrien. Der dünne Pfeil weist auf fragmentierte Mitochondrien hin.



d) Die Mitochondrien erscheinen geschwollen und wieder stärker um den Kern herum konzentriert.



e) Alle Zellen weisen veränderte Mitochondrien auf. Meist tubulär, teils mit Verzweigungen (siehe dünne Pfeile). Der dicke Pfeil zeigt auf einen gelappten Kern (bzw. dessen Aussparung hin).

Abb. 28: Fluoreszenzbilder von hLEC nach 20 s UVB-Bestrahlung (a= nach 1 h, b= nach 3 h, c= nach 6 h, d= nach 12 h, e= nach 24 h)

3.4. Untersuchung der Mitochondrien in humanen Linseneithelzellen bei Testsubstanz-Exposition

3.4.1 Huminsäure Aldrich

Schon bei Betrachtung der hLEC unter dem Phasenkontrastmikroskop wurde deutlich, dass nach 24 h Exposition mit HS Aldrich eine deutliche Veränderung in den Linseneithelzellen stattfand. Die Zellen schrumpften und in ihrem Zytoplasma traten Vakuolen auf. Mittels Fluoreszenzfärbung von Mitochondrien sollten diese Veränderungen noch genauer untersucht werden. Viele Studien konnten zeigen, dass Apoptoseinduktion sehr sensitiv an morphologischen Veränderungen von Mitochondrien gesehen werden kann. Frank et al. (2001) konnten zeigen, dass die Mitochondrien von COS-7 Zellen nach Einleitung von Apoptose durch verschiedene Stimuli, von einer vorübergehenden Phase der Streckung, in eine punktförmige, rundliche Konformation übergehen.

Auch in dieser Arbeit soll überprüft werden, ob Huminsäuren Apoptose an humanen Linseneithelzellen einleiten. Dazu werden, wie in den vorherigen Experimenten auch, die Zellen vor der Exposition mit HS mit dem Farbstoff MitoTracker® Red inkubiert und anschließend mit 250 µg/ml HS-Lösung kultiviert. Bilder wurden unter dem Fluoreszenzmikroskop nach 1, 3, 6, 12 und 24 h gemacht.

Mittels der Fluoreszenzfärbung sind die morphologischen Veränderungen der Mitochondrien deutlich ersichtlich. Während nach einer Stunde Inkubationszeit die Mehrzahl der Mitochondrien noch ihre sphärische, rund um den Kern angeordnete Konformation aufweisen, so beginnen sie sich bereits nach 3 h zu strecken und in eine retikulo-tubuläre Form überzugehen. Diese transiente Streckung ist nach 6 h bereits wieder rückläufig. Die Zellen sind geschrumpft und die Mitochondrien finden sich wieder konzentriert rund um den Kern. Mit weiterer Inkubationszeit finden sich vermehrt Vakuolen in den Zellen (kleine dunkle Aussparungen) und einige hell leuchtende runde Zellen. Bei letzteren handelt es sich um apoptotische Zellen, die sich abgelöst haben und frei im Medium flottieren.

Auch hier war es notwendig die Belichtungszeit mit zunehmender Versuchsdauer zu erhöhen, da mit zunehmendem Zellschaden die Farbstoffintensität abnimmt.

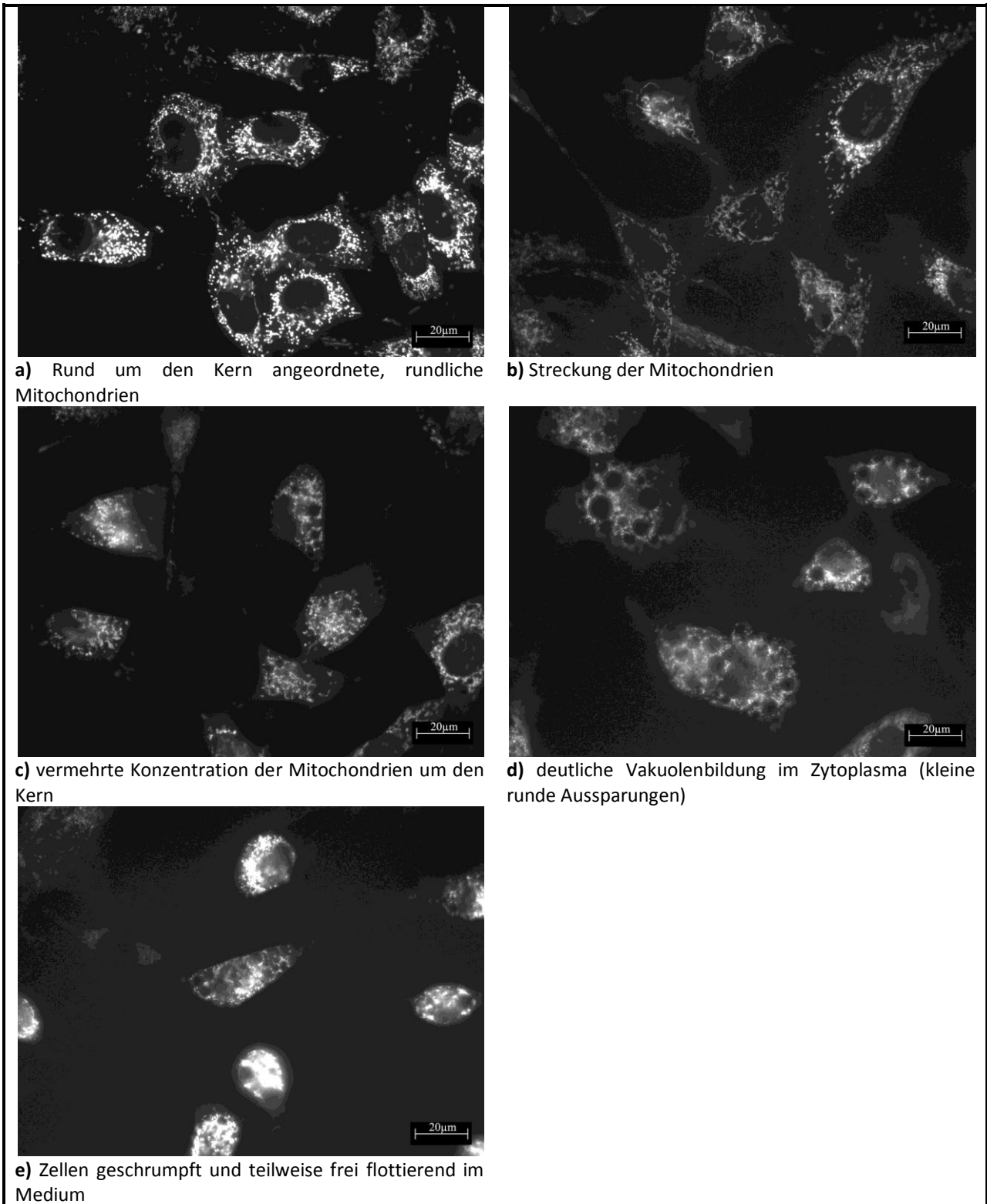


Abb. 29: Fluoreszenzbilder von hLEC nach Inkubation mit 250 µg/ml HS Aldrich (a= nach 1 h, b= nach 3 h, c= nach 6 h, d= nach 12 h, e= nach 24 h)

3.4.2 Hydrokaffeesäure-Oxidationsprodukt

Vor allem in niedrigeren Konzentrationsbereichen hatte der Neutralrottest für diese HS eine geringere Toxizität angezeigt als für HS Aldrich. Damit der zeitliche Verlauf der Apoptoseinduktion gezeigt werden kann, wurde auch hier eine Konzentration von 250 µg/ml gewählt (Abb. 30).

Auffällig ist hier, dass die Mitochondrien weniger Tendenz zeigen, sich zu strecken. Bereits nach 3 h nimmt die Mehrzahl der Mitochondrien eine sphärische Konformation an. Mit zunehmender Versuchsdauer schwellen die Mitochondrien an. Im Vergleich zu den Bildern bei Inkubation mit HS Aldrich, ist die Vakuolenbildung der Zellen (dunkle Aussparungen im Zytoplasma) weniger drastisch. Auch hier fangen die Zellen nach einer Inkubationszeit von 12 h an zu schrumpfen, die Mitochondrien lagern sich vermehrt um den Kern an, bis schließlich kein Zytoplasma mehr sichtbar ist und die gesamte Zelle abgekugelt im Medium schwimmt.

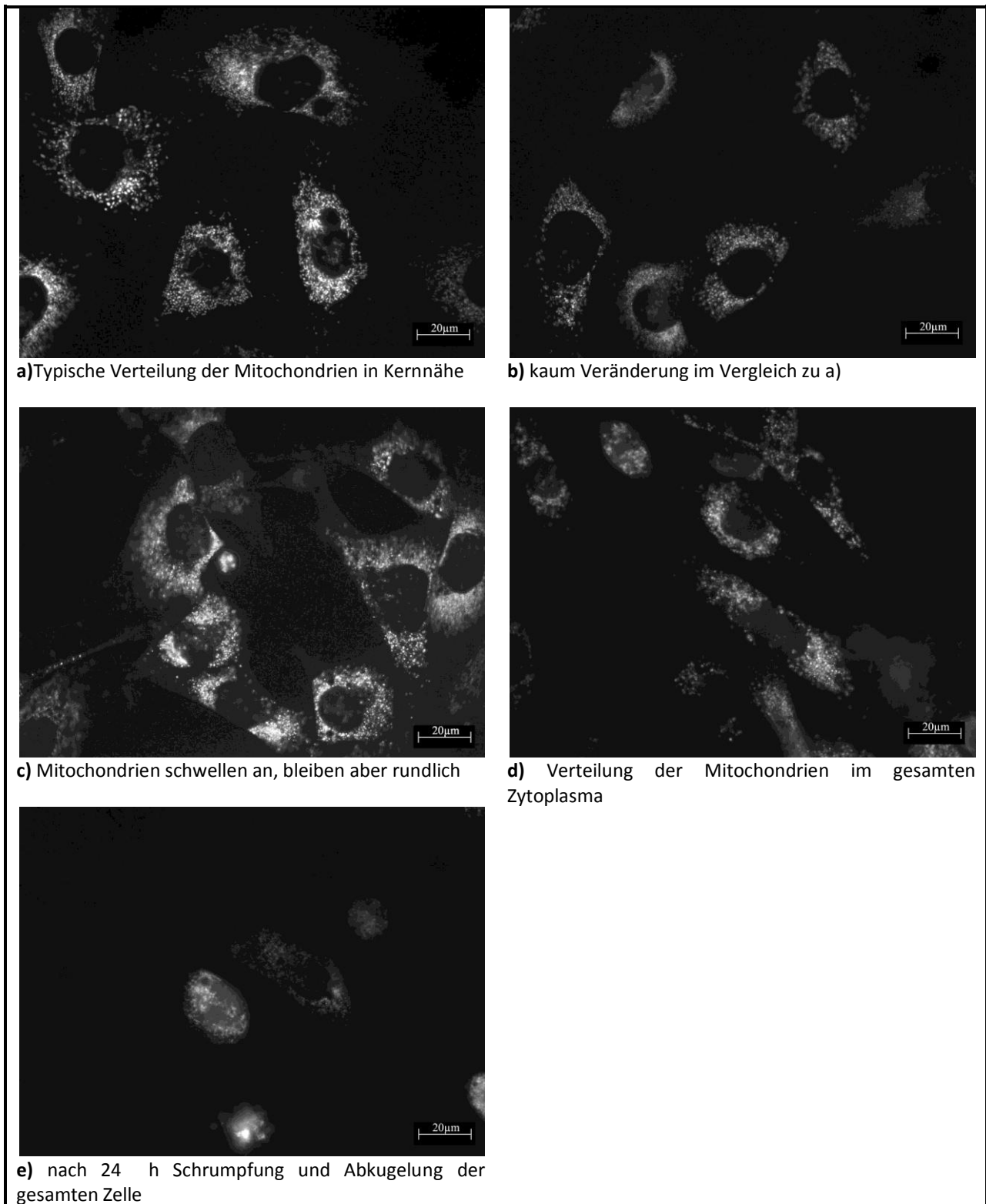


Abb. 30: Fluoreszenzbilder von hLEC nach Inkubation mit 250 µg/ml HYKOP. Große dunkle Aussparungen=Zellkerne. (a= nach 1 h, b= nach 3 h, c= nach 6 h, d= nach 12 h, e= nach 24 h)

3.4.3 Paraaminobenzoensäure

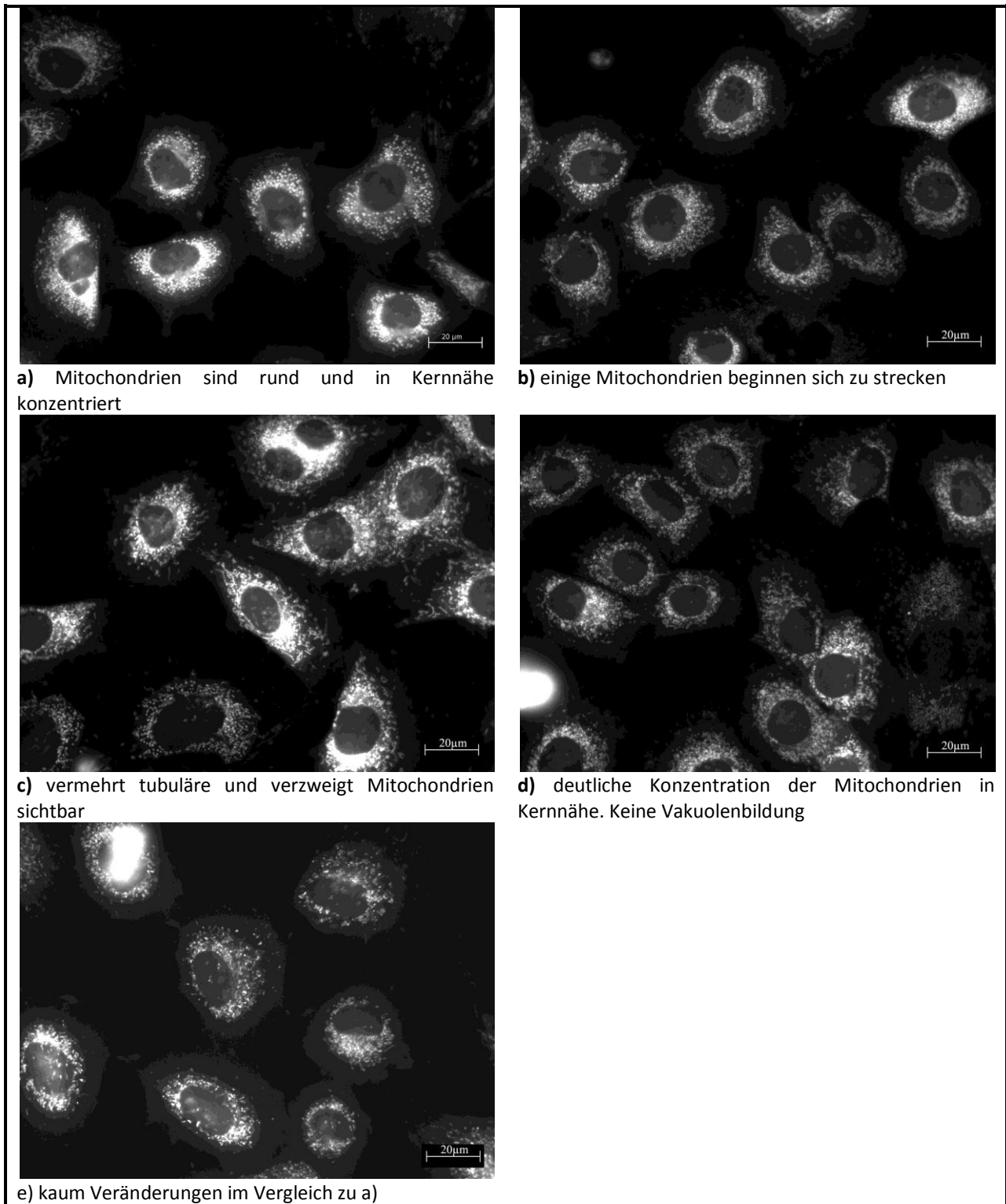


Abb. 31: Fluoreszenzbilder von hLEC nach Inkubation mit 250 µg/ml PABA. Die Mitochondrien verändern sich in ihrer Form und Verteilung innerhalb der 24 h Inkubationszeit kaum. Die runden dunklen Aussparungen entsprechen den Zellkernen. (a= nach 1 h, b= nach 3 h, c= nach 6 h, d= nach 12 h, e= nach 24 h)

Auch die Referenzsubstanz PABA wurde auf eventuelle morphologische Veränderungen der Mitochondrien untersucht. Unter dem Phasenkontrastmikroskop waren keine Veränderungen der Zelle im Vergleich zur Kontrolle aufgefallen, auch der Neutralrottest bestätigte dies.

Die mit PABA behandelten Zellen haben - wie auch die Zellen in serumfreiem Medium - nach einem Intervall von 3 h die Tendenz, tubuläre Mitochondrien zu bilden. Insgesamt findet man wenige fragmentierte Mitochondrien. Die Mitochondrien bleiben klar um den Kern herum angeordnet und auch die Farbintensität nimmt nach 24 h wenig ab. Dies spricht für einen Erhalt der Membranintegrität und somit für eine intakte Zelle.

3.5 Untersuchung der Schutzwirkung der Prüfsubstanzen vor UVB-Strahlenschäden anhand der Mitochondrienmorphologie

3.5.1 HS Aldrich

Die HS Aldrich zeigt bereits nach kurzen Inkubationszeiten eine toxische Wirkung auf humane Linsenepithelzellen. Bei den Bestrahlungsversuchen wurde die Kontaktzeit der HS mit den Zellen möglichst kurz gehalten, um eventuelle Schäden der Zelle auf die UVB-Strahlung zurückführen zu können und nicht auf die HS.

Die höchste Konzentration von 250 µg/ml HS hatte sich als die wirksamste im Neutralrottest erwiesen, daher wurde auch diese Konzentration bei der Fluoreszenzmikroskopie verwendet. Analog zu den vorangegangenen Versuchen wurden die Zellen zuerst angefärbt, anschließend in farblosem MEM ohne FBS bestrahlt und in serumhaltigem Medium unter Standardbedingungen kultiviert. Zudem war so eine Wechselwirkung der HS mit dem MitoTracker®-Farbstoff ausgeschlossen.

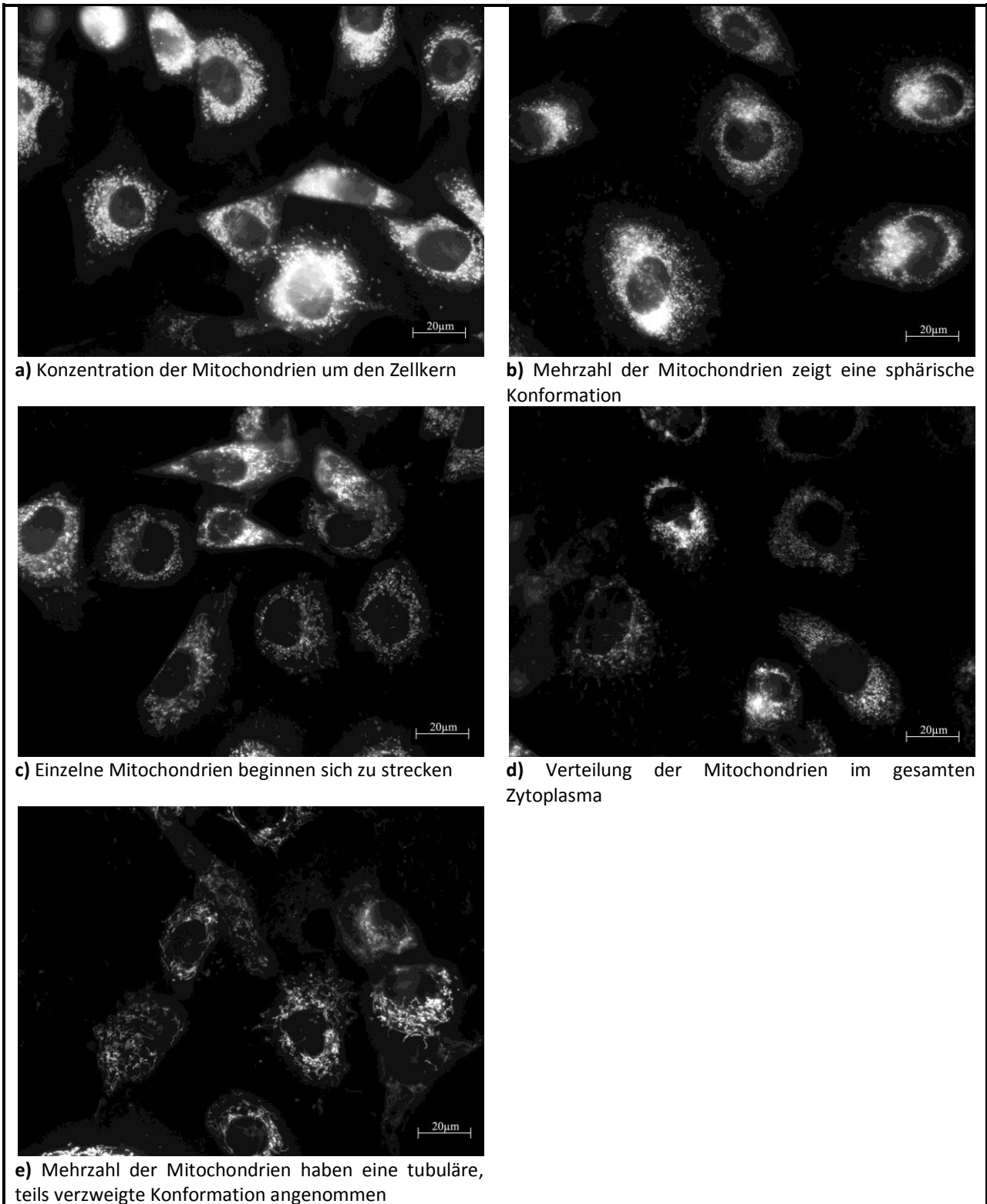


Abb. 32: Fluoreszenzbilder von 20 s UVB-bestrahlten hLEC in Anwesenheit von 250 $\mu\text{g/ml}$ HS Aldrich. Dunkle runde Aussparungen entsprechen den Zellkernen. (a= nach 1 h, b= nach 3 h, c= nach 6 h, d= nach 12 h, e= nach 24 h)

Insgesamt ähnelt das Erscheinungsbild der mit HS Aldrich bestrahlten Zellen dem von Zellen, die in serumfreiem Medium bestrahlt wurden. Auch hier kommt es zu Streckung der Mitochondrien aus einer anfangs sphärischen Konformation heraus. Die Zellen sind jedoch weniger geschrumpft als dies bei bestrahlten Zellen ohne Huminsäuren der Fall wäre. Die Mitochondrienmembranen scheinen auch weitestgehend erhalten zu bleiben, die Farbintensität nimmt kaum ab. Dennoch finden sich auch hier apoptotische Zellen, die frei im Medium flottieren.

3.5.2 Hydrokaffeensäure-Oxidationsprodukt

Die UVB-protective Wirkung von HYKOP, einer synthetischen HS-ähnlichen Substanz, war Gegenstand der folgenden Experimente. Mit dem Neutralrottest hatte eine Konzentration von 250 µg/ml HYKOP nach 24 h eine UVB-protective Wirkung von ca. 80 %.

Auch hier sind wieder deutliche Veränderungen sichtbar. Die bestrahlten Zellen neigen zu einer eher tubulären Konformation ihrer Mitochondrien. Einige wenige Zellen zeigen Veränderungen bezüglich ihrer gesamten Zellform, es werden aber kaum Vakuolen gebildet. Vereinzelt findet man apoptotische Zellen.

Die Elongation der Mitochondrien spricht dafür, dass die UVB-Strahlung die HS zumindest teilweise passieren konnte. Da die Bilder unter dem Phasenkontrastmikroskop sowie der Neutralrottest hohe UVB-protective Wirkung für eine Konzentration von 250 µg/ml HYKOP-Lösung ergaben, ist davon auszugehen, dass die Elongation der Mitochondrien kein Zeichen für einen irreparablen Zellschaden darstellt.

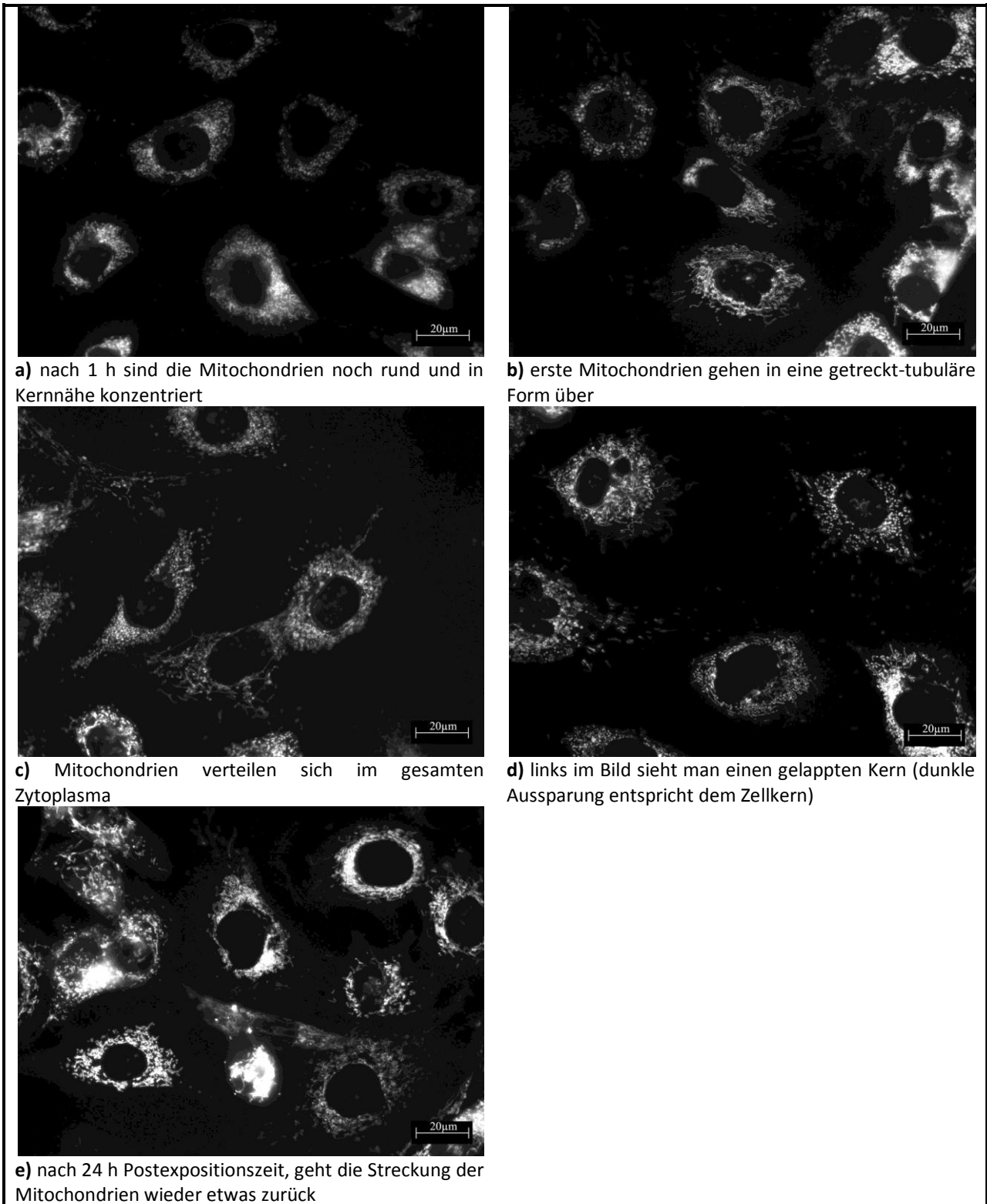


Abb. 33: Fluoreszenzbilder von 20 s UVB-bestrahlten hLEC in Anwesenheit von 250 µg/ml HYKOP. Runde dunkle Aussparungen entsprechen den Zellkernen. (a= nach 1 h, b= nach 3 h, c= nach 6 h, d= nach 12 h, e= nach 24 h)

3.5.3 Paraaminobenzoensäure – PABA

Für die Referenzsubstanz PABA musste überprüft werden, ob diese die hLEC vor UVB-Strahlenschäden schützen kann. Der Neutralrottest lieferte vielversprechende Ergebnisse (Abb. 23). Hier wurden noch einmal die Mitochondrien auf Strahlenschäden untersucht.

Wie auch in den beiden vorherigen Versuchen, in denen humane Linsenepithelzellen in Anwesenheit von HS bestrahlt wurden, findet man auch hier die für UVB-Strahlung typischen Konformationsänderungen. Die Strahlung wird nicht komplett von PABA absorbiert, so dass die Mitochondrien in einen angeregten Zustand geraten (Abb. 34). Da aber die Bilder unter dem Phasenkontrastmikroskop keine offensichtlichen Veränderungen an den Zellen zeigen und der Neutralrottest ebenfalls eine gute UVB-protective Wirkung anzeigt, kann man davon ausgehen, dass die UVB-Strahlung, die noch bis zu den Zellen vordringt keine irreparablen Schäden hinterlässt.

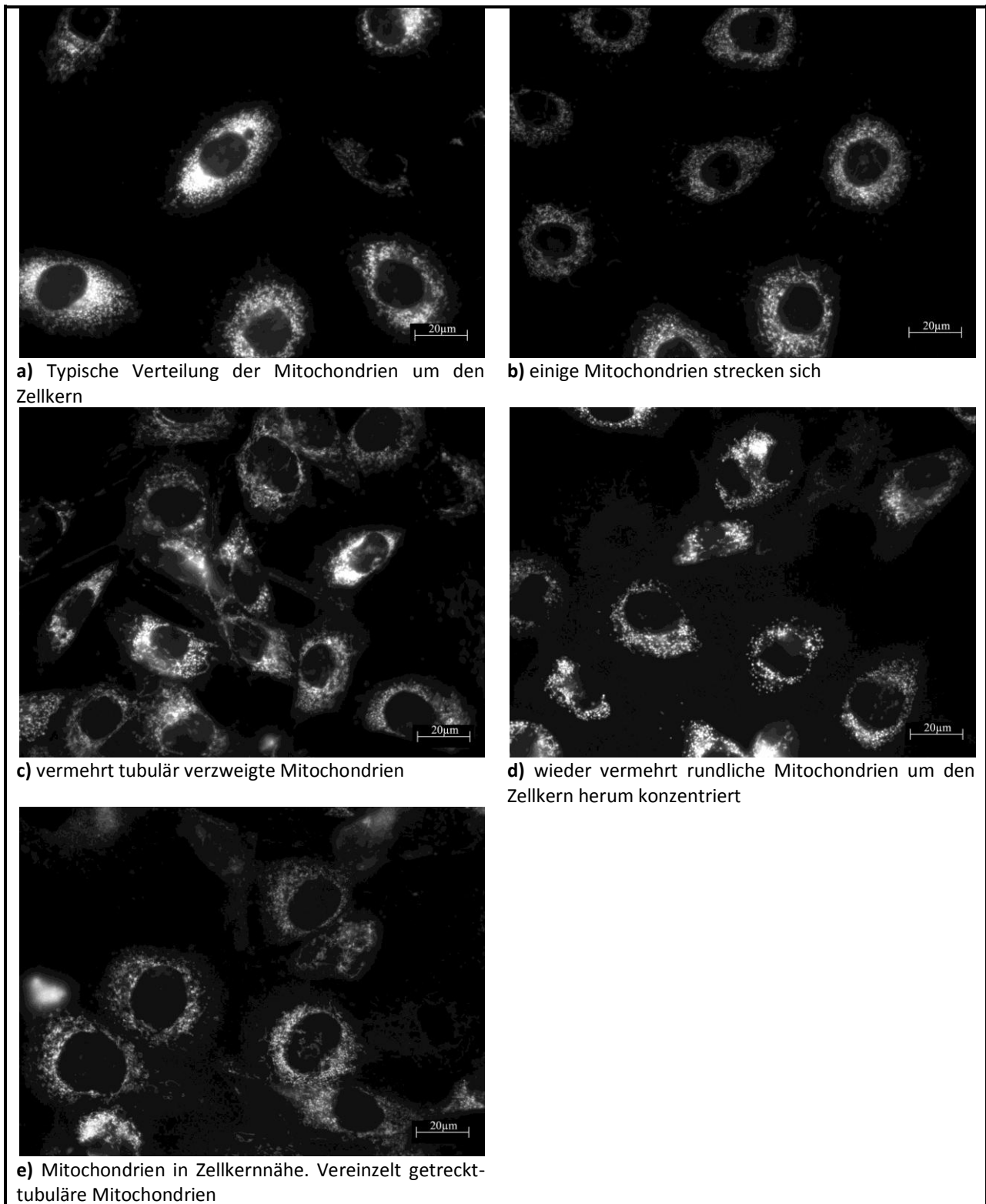


Abb. 34: Fluoreszenzbilder von 20 s UVB-bestrahlten hLEC in Anwesenheit von 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$ PABA. Die runden dunklen Aussparungen entsprechen den Zellkernen. (a= nach 1 h, b= nach 3 h, c= nach 6 h, d= nach 12 h, e= nach 24 h)

3.6 Tabellarische Zusammenfassung der Ergebnisse

Testsubstanzen mit Expositionszeiten	CC ₅₀ [µg/ml]	Konfidenzintervall CC ₅₀ [µg/ml]	UVB-PC ₅₀ [µg/ml]	Konfidenzintervall UVB-PC ₅₀ [µg/ml]
PABA				
24 h	> 500	-	0,12	0 – 5,72
48 h	> 500	-	0,07	0 – 18,1
72 h	> 500	-	0,36	0,09 – 1,55
HS Aldrich				
24 h	> 250	-	113	90,8 – 140
48 h	141	92,2 – 215	143	122 – 168
72 h	107	57,5 – 200	48,1	40,2 – 57,6
HYKOP				
24 h	> 250	-	54,4	42,9 – 68,8
48 h	166	124 – 223	94,3	89,4 – 99,5
72 h	209	192 - 229	16	9,88 – 26

Grau unterlegte Kästchen sind theoretische Werte, da die UVB-PW₅₀ unter 60µg/ml lag (niedrigste getestete Konzentration für UVB-protective Wirkung). Die Berechnungen erfolgten mit Excel 2007.

Tab. 3: Zusammenfassung der CC₅₀ und UVB-PW₅₀ Werte aus den NRU-Tests mit den drei Testsubstanzen (PABA, HS Aldrich, HYKOP)

4. Diskussion

Luftverschmutzung und die zunehmende Abnahme der Ozonschicht sorgen in den letzten Jahrzehnten für dauerhaften Gesprächsstoff. Die Abnahme der Ozonschicht hat eine Zunahme der Strahlenbelastung auf der Erdoberfläche zur Konsequenz, weshalb die Suche nach neuen, effizienteren Sonnenschutzmitteln ein wichtiger Forschungsgegenstand geworden ist. Fast alle der auf dem Markt befindlichen Sonnenschutzmittel sind vor allem für die Anwendung auf der Haut vorgesehen. Zahlreiche Studien konnten zeigen, dass UV-B-Strahlung Ursache von verschiedenen Augenerkrankungen sein können, darunter auch die Katarakt. Katarakt ist weltweit führende Ursache von Blindheit. Die Katarakt-OP ist die weltweit am häufigsten durchgeführte Operation. Dies macht deutlich, dass die Erforschung von geeigneten Schutzsubstanzen für das Auge durchaus sinnvoll ist, sowohl aus medizinischer, als auch aus wirtschaftlicher Sicht.

4.1 Protektion vor UV-Strahlung

UV-Filtersubstanzen können auf physikalischem, chemischem und biologischem Weg vor Strahlenschäden schützen. Als physikalische UV-Filter werden meist weiße Mikropigmente mit einer Größe zwischen 20 bis 50 nm eingesetzt. Sie enthalten häufig Zinkoxide und Titandioxide. Ihre Wirkung beruht hauptsächlich auf Reflexion, Streuung und zum Teil auf Absorption. Die Partikel können auf Grund ihrer Größe nicht in die Haut eindringen und bilden auf der Haut einen weißen Film, der leicht abgewaschen werden kann. Daher finden diese Stoffe nur sehr selten Anwendung (Mitchnick et al., 1999). Für das Auge ist ein physikalischer Filter eben aus diesen Gründen äußerst ungünstig; er würde das Sehvermögen beeinträchtigen und sehr schnell durch den Tränenfilm weggespült.

Die chemischen UVB-Filter wie z.B. Cinnamate und Kampferderivate sind die meist eingesetzten Filter, sie bestehen aus Benzolringen mit konjugierten Doppelbindungen an ihren Substituenten. Diese absorbieren die UV-Strahlung in bestimmten Wellenlängenbereichen (Lautenschläger et al., 2007).

Ein biologischer Schutz greift in den Zellstoffwechsel einer Zelle ein und kann sie über verschiedene Mechanismen schützen, z.B. durch Erhöhung der mitochondrialen Atmung, oxidative Phosphorylierung, Enzymaktivierung, antioxidative Aktivität (Radikalfänger), Hemmung der Entzündungsreaktion, etc.

Neben diesen Substanzen gibt es noch einige weitere Möglichkeiten Zellen vor UV-Strahlenschäden zu schützen.

Antioxidantien, wie Ascorbinsäure und Vitamin E konnten in Tierexperimenten wirkungsvoll vor UV-Strahlenkatarakt schützen (Ayala und Söderberg, 2004). Auch die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Huminsäuren und die Kaffeesäure haben in zahlreichen Experimenten ihre Schutzwirkung vor UVB-Bestrahlung unter Beweis gestellt.

Die hier genannten möglichen Schutzwirkungen von unterschiedlichen Substanzen sind für die Beurteilung der UV-protektiven Wirkung von Huminsäuren von Interesse. Kühn (2005) fand in ihren Untersuchungen zum Mechanismus der UV-protektiven Wirkung von HS in erster Linie eine absorptive Schutzwirkung der HS gegen Strahlenschäden an U937-Zellen.

4.1.1 Antioxidantien

Bei der Bestrahlung von Zellen mit UVB entstehen ROS (reaktive oxygen species), welche die Zellen von innen heraus schädigen können. Die freien Radikale werden zum einen durch zelleigene und zum anderen durch zugeführte Antioxidantien abgefangen.

An Keratinozyten haben Jin et al. (2007) die UV-protektive Wirkung von Vitamin C und E sowie von ginsenoidem Panoxatriol nachweisen können. Ebenso soll der Verzehr von Gemüse, das reich an Xanthophyll und Karotenoiden ist, vor altersbedingter Katarakt schützen. Untersuchungen an humanen Linsenepithelzellen konnten zeigen, dass Xanthophyll und α -Tocopherol, dem aktiven Anteil von Vitamin E, vor UV-B-Strahlenschäden schützen können (Chitchumroonchokchai et al., 2004). Dabei war die Wirkung von α -Tocopherol vor allem auf einer Verminderung der Lipidperoxidation, die durch UVB-Strahlung hervorgerufen wird, zurückzuführen.

4.1.2 Kaffeesäure

Kaffeesäure ist eine weitere Substanz, der man eine Radikal-abfangende-Wirkung nachweisen konnte. Facino et al. (1995) haben Kaffeesäure und einige andere Polyphenole des Echinaceaextraktes eine Stunde lang auf O₂-Radikalen inkubiert und ihre Wirkung an Typ-3-Kollagen untersucht. Dabei wird der Schutz vor freien Radikalen zum einen durch eine Verminderung der Lipidperoxidation und zum anderen auf einem verminderten Glutathionverbrauch zurückgeführt (Nardini et al., 1998). Der Glutathionverbrauch lag bei U937-Zellen, die mit tert.-Butyl-Wasserstoffperoxid behandelt wurden, bei 50 %. Während zuvor mit Kaffeesäure behandelte Zellen noch 72 % der Ausgangsglutathion-Konzentration enthielten.

Bemerkenswert war ebenfalls die Entdeckung von Nardini et al. (2001), dass Kaffeesäure den Cermid-induzierten apoptotischen Zelltod von U937 Zellen verhindern konnte. Weiterhin haben Saija et al. (2000) in vitro und in vivo nachweisen können, dass Kaffeesäure die Erythemschwelle nach UVB-Exposition erhöht. Die Kaffeesäure schützt Phospholipid Biomembranen vor UVB-induzierter Peroxidation und kann freie Stickstoffoxide abfangen (Saija et al., 1999).

In wie weit diese Ergebnisse auch auf diese Arbeit übertragbar ist fraglich. Im Gegensatz zu der in der Literatur verwendeten Kaffeesäure wird in der vorliegenden Arbeit mit dem Oxidationsprodukt von Hydrokaffeesäure gearbeitet. Hydrokaffeesäure ist die reduzierte Form der Kaffeesäure. Beiden gemeinsam sind ihre beiden orthoständigen Hydroxylgruppen und die Seitenketten bestehend aus drei C-Atomen. Die genaue Struktur des Hydrokaffeesäure-Oxidationsprodukts ist aber noch nicht vollständig geklärt, so bleibt also noch offen, in wie weit die oben genannten Beobachtungen von Kaffeesäure auf HYKOP übertragbar sind.

4.1.3 Huminsäuren

Ausschlaggebend für diese Arbeit und somit die Untersuchung der UVB-protektiven Wirkung von Huminsäuren auf humane Linsenepithelzellen waren die Arbeiten von Hübner (2004) und Kühn (2005). Beide Arbeiten konnten eine UVB-protektive Wirkung von verschiedenen natürlichen und synthetischen HS auf U937-Zellen nachweisen. Eine Eigentoxizität der HS wurde dabei nicht gefunden. Die Untersuchung des zugrundeliegenden Schutzmechanismus von HS ergab eine relativ geringe Beteiligung

von biologischen oder pharmakologischen Schutzwirkungen. Somit beruht die Schutzwirkung vermutlich vorwiegend auf Absorption (Kühn, 2005).

Unter diesem Aspekt sollten noch einige weitere Arbeiten zum UVB-protectiven Effekt von HS Erwähnung finden. Bereits 1972 hatten Bitton et al. beobachtet, dass *Klebsiella aerogenes* unter einer letalen UV-Strahlung ihre Fähigkeit zur Kolonienbildung erhalten bleibt, wenn sie mit HS inkubiert wurden. Davies und Evison (1991) bestrahlten *E.coli* und *Salmonellen* kontaminiertes Meer- und Süßwasser mit UV-Licht. Nach 7-tägiger Inkubation stellten sie eine signifikant höhere Vitalität der Zellen in den Süßwasserproben fest. Entgegen der herkömmlichen Meinung führten sie dies nicht allein auf den Salzgehalt des Meerwassers zurück, sondern ebenso auf die Anwesenheit von HS in Süßwasser. Schließlich untersuchten Muela et al. (2000) HS, die Licht im Wellenlängenbereich von 270-500 nm absorbieren und in Konzentrationen von 1-50 µg/ml *E.coli* vor Fotoinaktivierung schützten. Bemerkenswert war daran, dass dieser Effekt auch dann eintraf, wenn sich die HS nicht in direktem Kontakt mit den Zellen befanden. Die Autoren deuteten die Wirkung der HS daher als Folge einer Absorption der Strahlen durch HS und einer verminderten Energie, die die Zelle erreicht.

4.2 Methodendiskussion

Für die Fragestellung in dieser Arbeit mussten geeignete Testmethoden ausgewählt werden. Für die Bestimmung der Zytotoxizität, sowie der UV-B-protectiven Wirkung wurde der Neutralrottest angewandt. Während zur Beurteilung der Mitochondrienverteilung und -morphologie die Anfärbung mit MitoTracker® Red und anschließende Fluoreszenzmikroskopie ausgewählt wurde. Diese beiden Methoden werden nachfolgend ausführlich diskutiert.

4.2.1 Auswahl der Testverfahren

4.2.1.1 Neutralrottest

Toxische Agenzien und UV-Strahlung können die Membranintegrität von Zellen beeinträchtigen. Die Membran ist das äußere Schutzschild der Zelle, ist dieses beschädigt, so kann die Zelle ihre Homöostase nicht mehr aufrecht erhalten und stirbt, sofern der Schaden nicht repariert werden kann. Der

Neutralrottest ist ein etabliertes Verfahren zur Bestimmung der Zytotoxizität von diversen toxischen Agenzien. Entwickelt wurde er Anfang der 80er Jahre von (Borenfreund und Puerner, 1985). Für die vorliegende Arbeit war dieser Test aus mehreren Gründen geeignet. Zum einen eignet sich der Test gut für Monolayer-Zellkulturen, da adhärenz Zellen nicht zuvor trypsiniert und in Lösung gebracht werden müssen bevor sie ausgewertet werden können (Borenfreund und Puerner, 1984). Zum anderen sind die benötigten Reagenzien relativ kostengünstig und in fast jedem Labor vorhanden.

Darüber hinaus ist der Neutralrottest in früheren Studien an hLEC angewendet worden, um die Eignung dieser Linsenzelllinie für Zytotoxizitätstestungen zu untersuchen (Iwig et al., 2001 b). Durch den Einsatz von Desoxyglukose und Natriumcyanid, konnte gezeigt werden, dass die NR-Aufnahme energieabhängig ist. Außerdem konnte durch Applikation von Zytochalasin D (bindet an Aktinfilamente und blockiert die Polymerisation und Elongation von Aktin) gezeigt werden, dass der Aufnahmemechanismus intakte Mikrofilamente erfordert (Iwig et al., 2001 b).

Die Membranintegrität der Zelle wird bei diesem Test durch die Fähigkeit von Lysosomen, den Farbstoff in ihrem Inneren zu binden, gemessen. Ist die Lysosomenmembran intakt, so wird der Farbstoff an anionischen Molekülen der Lysosomenmatrix gebunden und wird auch bei dem Wasch/Fixiervorgang (2.4.1) nicht herausgelöst. Erst durch den ethanolhaltigen Auflösungspuffer wird der Farbstoff aus den Lysosomen herausgewaschen. Die O.D. wird fotometrisch bei 540 nm bestimmt und gegen einen Kontrollwert dargestellt.

Die ursprüngliche Idee von Zytotoxizitätstests war, die Anzahl von Tierexperimenten für die Testung von toxischen Substanzen zu reduzieren. In der Medikamentenforschung wird üblicherweise zunächst ein In-vitro-Test an geeigneten Zellkulturen durchgeführt, bevor dann ausgewählte Substanzen in vivo, d.h. im Tierversuch geprüft werden. Nur Substanzen, die in-vitro als unbedenklich und vielversprechend eingestuft werden konnten, kommen für den Tierversuch in Betracht.

Dass das Tierexperiment weiterhin unabdingbar bleibt, liegt unter anderem daran, dass jeder Zytotoxizitätstest nur einen kleinen Teil des möglichen schädigenden Potenzials einer Substanz erfasst. Der in dieser Arbeit verwendete Test untersucht die Lysosomenfunktion. Andere Tests, wie z.B. der MTT-Test basieren auf der Reduktion durch die mitochondriale Succinyl-Dehydrogenase von wasserlöslichem, gelblichem MTT-Tetrazolium-Salz in ein unlösliches blaues MTT-Formazan-Produkt (Denizot und Lang, 1986; Mosmann, 1983). Somit wird bei diesem Test vor allem die Mitochondrienfunktion getestet. Da Mitochondrien für die Energieproduktion in Zellen zuständig sind, ist ein Verlust der Mitochondrienfunktion ebenso tödlich, wie die Zerstörung der Zellmembranen.

Jeder Test hat seine spezifischen Schwachstellen. So können z.B. reduzierende Agenzien und Inhibitoren der mitochondrialen Atmungskette die MTT-Reduktion durch mitochondriale Dehydrogenasen zu MTT-Formazan beeinträchtigen. Darüber hinaus wird dieser Test noch durch weitere Parameter beeinflusst wie dem pH-Wert des Mediums (Jabbar et al., 1989), D-Glucose-Konzentration im Medium und die zelluläre Konzentration von Pyridinnukleotiden (Vistica et al., 1991).

Der Neutralrottest hingegen kann die Zytotoxizität von Testagenzien als zu niedrig einschätzen, wenn die Lysosomen der untersuchten Zellen anschwellen und somit ein größeres Volumen zur Aufnahme des Farbstoffes besitzen. Zu den lysosomalen „Schwellungssubstanzen“ gehören schwach basische Stoffe (Ohkuma und Poole, 1981) und Polyole (Olivier et al., 1995). Schwach basische Substanzen haben zu intensiver Vakuolisierung des Zytoplasmas in verschiedenen Zelltypen geführt. Diese Vakuolen waren auf die Schwellung von Lysosomen zurückgeführt worden. Allerdings können Vakuolen auch von vielen anderen perinukleären Zellorganellen ausgehen, wie z.B. dem Golgi-Apparat oder dem endoplasmatischem Retikulum (Henics und Weatley, 1999). In der Literatur finden sich unzählige Substanzen, die in den verschiedensten Zelltypen zu Vakuolisierung führen können.

Alle fotometrischen Zytotoxizitätstests können Ungenauigkeiten aufweisen, wenn die Eigenfärbung der Testsubstanzen mit dem Absorptionsmaximum des jeweiligen Tests interferiert.

Daraus ergeben sich bereits drei potentielle Schwierigkeiten bei der Bestimmung der Zytotoxizität der HS auf Linsenepithelzellen.

Damit HS in Lösung gebracht werden können, müssen sie zunächst mit NaOH behandelt werden. Um den pH-Wert in einem physiologischen Bereich halten zu können, wurde lediglich 0,05 M NaOH mit einer 1:20 Verdünnung in der 1 mg/ml Stammlösung verwendet. Der pH-Wert der Lösung war von der Pufferkapazität und dem pH-Wert des verwendeten Mediums abhängig und ergab für alle Konzentrationen sowie für das Medium selbst außerhalb des Inkubators einen pH-Wert von 8,0. Der pH-Wert des Mediums wird vom Hersteller mit 7,0-7,4 angegeben, dieser wird erreicht, wenn das Medium in den CO₂-Inkubator gestellt wird.

Die Behandlung der Zellen mit den HS-Lösungen führte zu einer sehr intensiven Vakuolisierung des Zytoplasmas. Sollten diese Vakuolen von den Lysosomen der Zellen ausgehen, so wird ersichtlich, dass hier die Zytotoxizität als zu niedrig eingeschätzt wird, da die Lysosomen durch ihr vergrößertes Volumen mehr Farbstoff aufnehmen können.

Darüber hinaus sind HS polyphenolische Substanzen mit zahlreichen Carboxyl- und Hydroxylgruppen. Hydroxylgruppen könne die Lysosomen zum Schwellen bringen, weshalb hier die Zytotoxizität dieser Stoffe unterschätzt werden kann (Olivier et al., 1995).

Das Problem der Eigenfärbung durch die Huminsäuren konnte weitestgehend dadurch eliminiert werden, dass für den Neutralrottest drei Absaugvorgänge notwendig sind, bei denen das gesamte HS-haltige Medium entfernt wurde.

Insgesamt war der Neutralrottest sehr gut geeignet für die Bestimmung der Zytotoxizität durch UVB-Bestrahlung auf hLEC sowie für die Bestimmung der UVB-protektiven Wirkung der HS. Die Ergebnisse korrelierten mit den Phasenkontrast- und Fluoreszenzbildern.

Dagegen hat der NRU-Test nur eingeschränkte Aussagekraft für die Darstellung der Zytotoxizität von HS auf hLEC. Daher war hier die Kombination des NRU-Tests mit den Phasenkontrast- und Fluoreszenzbildern durchaus sinnvoll für die Beurteilung der Zytotoxizität von HS auf hLEC.

Trotz der oben genannten Einschränkungen war der Neutralrottest für die folgenden Versuche gewählt worden, da er eine gute Reproduzierbarkeit hat und bereits vielfach zur Beurteilung von zytotoxischen Effekten an Linsenepithelzellen zum Einsatz gekommen ist. Darüber hinaus überzeugt er durch seine einfache Handhabung.

4.2.1.2 MitoTracker® Red

In den letzten Jahren sind durch die Fluoreszenzmikroskopie zahlreiche wertvolle Erkenntnisse über die Mitochondrien und Ihre Funktion im Ablauf des programmierten Zelltodes gewonnen worden (Frank et al., 2001; Macho et al., 1996; Poot und Pierce, 1999). Da eine UV-Bestrahlung von Linsenepithelzellen zu apoptotischen Veränderungen der Zellen führt (Ayala et al., 2007; Li et al., 1995; Li et al., 1996; Michael et al., 1998), ist die Anwendung dieser Methode für die Fragestellung dieser Arbeit von großem Interesse. Die angefärbten Mitochondrien geben Aufschluss über deren Verteilung und Form vor und nach einer Exposition mit UV-Strahlen. Darüber hinaus konnte auch die apoptotische Wirkung der HS auf die hLEC untersucht werden.

Es gibt eine Vielzahl von Fluoreszenzfarbstoffen, die spezifisch die Mitochondrien von Zellen in-vitro anfärben. Allen gemeinsam sind ihre kationischen und lipophilen Eigenschaften, weshalb sie alle die Zellmembran passieren können und vom Mitochondrienmembranpotenzial (MMP) abhängig in die Mitochondrien aufgenommen werden. Das MMP ist das Ergebnis einer ungleichen Verteilung von Protonen an der inneren Mitochondrienmembran, wodurch dort eine negative Ladung entsteht.

Neben dem MMP hat auch das Plasmamembranpotenzial (PMP) Einfluss auf die Farbstoffaufnahme in den Mitochondrien. Lediglich CMXRos (MitoTracker® Red) scheint vom PMP weitestgehend unabhängig zu sein (Macho et al., 1996).

Der Farbstoff Rhodamine 123 hat eine gute Korrelation mit dem MMP, ist aber bei Lichteinfall relativ flüchtig und bleicht unter dem Mikroskop schnell aus, weshalb er für die folgenden Versuche ungeeignet war.

Unglücklicherweise sind die Mehrzahl der Fluoreszenzfarbstoffe, wie z.B. DiOC₆, Rhodamine 123, Tetramethylrosamine und JC-1 nicht fixierbar.

Lediglich MitoTracker® Red erfüllt diese Eigenschaft durch eine Chloromethyl-Gruppe, die sich kovalent mit intramitochondrialen Thiolen zu Thioestern verbindet. Die Fixierung mit Paraformaldehyd (PFA) zerstört die intrazelluläre Kompartimentierung, weshalb alle anderen Farbstoffe durch diesen Vorgang ausgewaschen werden.

Eine Fixierung von Zellen kann unter folgenden Gesichtspunkten von Interesse sein:

- 1) Eine Mehrfachmarkierung mit Antikörpern oder weiteren Farbstoffen wird möglich, z.B. mit DAPI, einem kernspezifischen Fluoreszenzfarbstoff.
- 2) Eine größere Anzahl von Versuchen kann zeitlich nacheinander ablaufen, ohne dass das MMP abfällt.
- 3) Infektiöses Material kann vor der Untersuchung unschädlich gemacht und so unbedenklich untersucht werden.

Es stellt sich nun die berechtigte Frage, ob die Färbung der Mitochondrien nicht selbst schon eine Veränderung der Mitochondrien verursacht und somit schädigende Auswirkungen auf die Zelle hat. Minamikawa et al. (1999) beobachteten an humanen Osteosarkom-Zellen, die mit CMXRos angefärbt waren, einen deutlichen fotosensibilisierenden Effekt. Gleichzeitig kam es zu einem vermehrten Zelluntergang nach hochdosierter UV-Bestrahlung ($>1,2 \text{ J/m}^2$).

Diese Ergebnisse konnten von Pendergrass et al. (2004) nicht bestätigt werden, sie fanden für diesen Farbstoff keine Fotosensibilisierung und auch keine Eigentoxizität. Die Eigentoxizität von CMXRos wurde von ihnen über die Bestimmung der NADH Abnahme in Linsenepithelzellen von Mäusen untersucht.

Auch in der vorliegenden Arbeit wurden keine morphologischen Unterschiede von mit MitoTracker® Red gefärbten Zellen im Vergleich zu ungefärbten Kontrollen festgestellt. Weder bestrahlte Zellen, noch Zellen, die mit den Testsubstanzen behandelt wurden, zeigten offensichtliche Veränderungen, die auf den Fluoreszenzfarbstoff hätten zurückgeführt werden können. In den Fluoreszenzbildern (Abb. 26 a-c) kann man sehen, dass bereits mit MitoTracker® Red angefärbte Zellen sich noch weiter vermehren können.

Die Apoptose ist vor allem durch morphologische Veränderungen gekennzeichnet (1.5). Einige Arbeiten konnten aber zeigen, dass die Mitochondrienfärbung und die damit verbundene Evaluation der durch Apoptose induzierten Veränderungen an Mitochondrien sehr gut geeignet sind für die Beurteilung der „Frühen-Apoptose“ (Macho et al., 1996; Poot und Pierce, 1999). Die Autoren postulieren, dass eine Störung des MMP den nukleären Veränderungen bei Apoptose vorausgeht. Ihre Literaturrecherche hatte ergeben, dass die MMP-Veränderung in vielen Arbeiten den folgenden Kriterien entspricht:

- 1) *Frühzeitigkeit*, im Sinne von einem ersten Merkmal, das noch vor allen anderen Anzeichen der Apoptose auftritt, darunter Plasmamembranveränderungen, Chromatinkondensation und DNA Fragmentierung
- 2) *Spezifität*, da die MMP-Veränderungen ausschließlich in prä-apoptotischen Zellen zu beobachten sind
- 3) *Allgemeingültigkeit*, da die Veränderungen in allen untersuchten Zelltypen gleichermaßen auftraten, unabhängig vom apoptoseauslösenden Agens
- 4) *Irreversibilität*, im Sinne eines „*point-of-no-return*“. Zellen, die einmal ihr MMP verloren haben, werden unweigerlich dem programmierten Zelltod zum Opfer fallen

Die Auswahl des Farbstoffes MitoTracker® Red erfolgte, weil dieser Farbstoff abhängig vom MMP in der Zelle aufgenommen wird, d.h. nur von vitalen Zellen. Einmal angefärbte Mitochondrien binden den Farbstoff durch die kovalenten Thiolersterbindungen fest an sich und bleiben auch nach Abfall des MMP angefärbt. So können morphologische Veränderungen dokumentiert werden, auch wenn im Verlauf des Versuches das MMP abfällt (Pendergrass et al., 2004).

Poot und Pierce (1999) konnten in ihren Versuchen zeigen, dass Zellen, die schon eindeutig apoptotische Veränderungen aufweisen, einen deutlichen Abfall des MMP zeigen. Andere Zellen, die demselben apoptoseauslösenden Agens ausgesetzt waren, aber noch keine sichtbaren Veränderungen aufwiesen, zeigten dagegen ein erhöhtes MMP. Daraus schlossen sie, dass während der frühen Apoptose die Mitochondrien der Zellen in einen erhöhten metabolischen Zustand versetzt werden.

Diese Erkenntnisse über den Zusammenhang von MMP und Apoptose waren für die Bearbeitung der Fragestellung in dieser Arbeit von Interesse. So konnte gemeinsam mit den Ergebnissen aus dem Neutralrottest und den morphologischen Beobachtungen an den hLEC der Mechanismus des Zelltodes untersucht werden.

Über die Aussage des MMP der Zellen hinaus, gibt es auch zahlreiche Arbeiten, die sich mit den morphologischen Veränderungen der Mitochondrien während der Apoptose beschäftigen.

So zeigten Frank et al. (2001), dass COS-7 Zellen nach einer vorübergehenden Phase der Streckung die typischerweise retikulär um den Kern angeordneten Mitochondrien in kleine punktförmige Mitochondrien zerfielen, nachdem sie mit verschiedensten Apoptosestimuli in Berührung kamen. Da die Mitochondrienlänge von Fusion und Teilung der Organellen abhängig ist, wird vermutet, dass die punktförmigen Fragmente der Mitochondrien durch Aktivierung der physiologischen Teilung hervorgerufen werden. Somit spielen die Teilungsproteine (*fission-proteins*) der Mitochondrien vermutlich eine wesentliche Rolle im Apoptosevorgang (Lee et al., 2004).

Neben Fragmentierung wird ebenfalls häufig eine Schwellung der Mitochondrien beobachtet. Lange Zeit wurde vermutet, dass diese Schwellung zu einem Abfall des MMP führt und die Mitochondrienmembran rupturieren lässt, wodurch dann bestimmte apoptoseeinleitende Proteine (Procaspasen, AIF, Zytocrom C, Smac/DIABLO) freigesetzt werden sollen. Allerdings konnten Gao et al. (2001) an HeLa-Zellen zeigen, dass das Zytocrom C bereits vor dem Auftreten der Mitochondrien-schwellung in das Cytoplasma ausgeschüttet wurde. Somit ist mitochondriale Schwellung eher das Ergebnis der Zytocrom-C-Freisetzung als dessen Ursache.

Auch in dieser Arbeit wurden die morphologischen Veränderungen von Mitochondrien in hLEC in Abhängigkeit von der Zeit festgehalten. Die beobachteten Veränderungen stehen in Einklang mit den oben genannten typischen Veränderungen von Mitochondrien in apoptotischen Zellen und werden weiter unten genauer beschrieben.

4.2.2 Auswahl der Zelllinie

Die bislang durchgeführten In-vitro-Untersuchungen der UV-protektiven Wirkung von HS wurden an U937-Zellen durchgeführt (Hübner, 2004; Kühn, 2005). Bei diesen Zellen handelt es sich um promonozytäre Suspensionszellkulturen humanen Ursprungs. Kern und Zytoplasma dieser Zellen lassen sich unter dem Phasenkontrastmikroskop nur sehr schwer beurteilen.

Dagegen sollte in dieser Arbeit untersucht werden, ob sich HS zum Schutz vor UV-Schäden am Auge einsetzen lassen. Daher mussten die Zellen folgende Eigenschaften aufweisen:

- 1) Sie sollten humanen Ursprungs sein und noch möglichst viele der Eigenschaften des Ursprungsgewebes haben
- 2) Sie sollten sich möglichst unbegrenzt passagieren lassen, damit alle Experimente an der selben Zelllinie durchgeführt werden können
- 3) Kern und Zytoplasma sollten unter dem Phasenkontrastmikroskop gut erkennbar sein, damit morphologische Veränderungen dokumentiert werden können

Bei den hier verwendeten hLEC handelt es sich um spontantransformierte Linsenepithelzellen aus einem Kapsulorhexispräparat. Die Untersuchungen zur Eignung dieser Linsenzelllinie zur Zytotoxizitätstestung ergaben, dass diese Zellen sehr sensibel auf toxische Substanzen reagieren (Iwig et al., 2001 b). Die transformierten Zellen wurden vergleichenden Untersuchungen mit nichttransformierten Primärlinsenzellkulturen unterzogen, um zu überprüfen, ob die transformierten Zellen in ihren Eigenschaften noch der Primärzelllinie entsprechen. Dabei wurde unter anderem mittels Anti-Vimentin-Fluoreszenzfärbung das Zytoskelett der hLEC untersucht. Diese Untersuchungen ergaben, dass die Intermediärfilamente vom Vimentin-Typ waren und sich abhängig von der Zellform innerhalb der Zelle verteilten (Iwig et al., 2001 b).

Die in dieser Arbeit verwendeten hLEC wurden ebenfalls einer Markierung mit Anti-Vimentin-Fluoreszenzfarbstoff unterzogen und unter dem Fluoreszenzmikroskop betrachtet. Darüber hinaus wurde ein Western Blot mit Vimentinantikörpern durchgeführt. In beiden Verfahren fiel der Vimentin-Nachweis positiv aus (Resultate hier nicht gezeigt).

Ein Unterschied zu den ursprünglichen hLEC aus Halle-Wittenberg war die deutliche Abhängigkeit des Zellwachstums der hLEC von FBS. Die Kontrollen in serumfreiem Medium zeigten im Neutralrottest eine Abnahme der O.D., was mit einer Abnahme der Zellzahl korrelierte (Abb. 25). Einschränkend ist zu sagen, dass das serumfreie Medium kein L-Glutamin enthielt. Wahrscheinlich ist der Zelluntergang auf den

Mangel an L-Glutamin zurückzuführen. Die transformierten hLEC Zellen aus Halle-Wittenberg zeigten deutliche Proliferation schon bei niedrigen FBS Konzentrationen von 0,5 % (Iwig et al., 2001 a). Dies steht auch in Einklang mit den Ergebnissen von (Eldred et al., 2003). Diese Arbeitsgruppe hatte ebenfalls ein Zellwachstum von humanen Linsenepithelzellen (FHL-124) in serumfreiem Medium zeigen können.

Die morphologischen Merkmale, der für diese Arbeit verwendeten Zellen, blieben im Vergleich zu den ursprünglichen hLEC aus Halle-Wittenberg identisch. Somit eigneten sich die hLEC für die Untersuchungen zur Zytotoxizität von HS und UVB-Bestrahlung.

Damit Schwankungen bei den fotometrischen Messungen so gering wie möglich gehalten werden konnten, wurden alle 24-Well-Platten vor der Versuchsdurchführung unter dem Phasenkontrastmikroskop auf Gleichmäßigkeit des Zellwachstums überprüft. Nur Kavitäten, die eine mindestens 70%ige Konfluenz erreicht hatten, wurden für die Versuche verwendet.

Alle Arbeitsschritte wurden möglichst rasch unter der Werkbank durchgeführt, da die hLEC extrem empfindlich auf Austrocknung reagieren.

Da es sich bei Zellkulturen um lebendes Gewebe handelt, lassen sich Schwankungen in der Wachstumsgeschwindigkeit und gewisse Unterschiede in der Reaktion auf zytotoxische Substanzen nicht ganz ausschließen. Dennoch sind in der vorliegenden Arbeit deutliche Trends der Versuchsergebnisse sichtbar.

4.2.3 Bestimmung der optimalen UVB-Bestrahlungszeit

Um die UVB-protective Wirkung von HS an hLEC testen zu können, wurde die Bestrahlungsintensität ermittelt, bei der eine eindeutige, aber keine vollständige Schädigung der Zellen auftritt. Zu diesem Zweck wurden Bestrahlungstests mit unterschiedlichen Zeitintervallen durchgeführt (10, 20 und 40 s).

Dabei ergaben sich drei unterschiedliche Verlaufsformen.

Für die kürzeste Bestrahlungszeit von 10 s ($= 2,96 \text{ mJ/cm}^2$) ergab sich für das 24-h-Postexpositionsintervall keine Schädigung an den Zellen. Im weiteren Verlauf wuchsen die Zellen allerdings zunächst langsamer als die Zellen der mitgeführten unbestrahlten Kontrolle, wodurch sich hier eine rechnerische

Zytotoxizität für die 10-s-Bestrahlung ergibt. Nach 48 Stunden zeigten sich auch zahlreiche abgelöste apoptotische Zellen unter dem Phasenkontrastmikroskop.

Das verlangsamte Zellwachstum könnte auf Reparaturmechanismen der Zelle zurückzuführen sein. Diejenigen Zellen, deren Schaden zu groß war, wurden durch Apoptose aus dem Zellverband herausgelöst. Dieser Vorgang ist in etwa vergleichbar mit dem Verlauf eines Sonnenbrandes. Das Erythem, verursacht durch das Sonnenbad, tritt meist erst einige Stunden nach der Sonnenexposition auf. Einige Tage später lösen sich die oberen, geschädigten Hautschichten ab.

Insgesamt nähert sich der Wachstumsverlauf der 10 s bestrahlten Zellen nach 72 h Postexposition dem der Zellkontrolle. Dies ist ein Hinweis darauf, dass zwar ein Schaden entstanden war, der aber noch von den zelleigenen Reparaturmechanismen aufgefangen werden konnte.

Nach einer Bestrahlungsdauer von 40 s ($= 11,84 \text{ mJ/cm}^2$) zeigte sich ein zeitabhängig zunehmender Zelltod. Bereits nach 24 h war hier eine zytotoxische Wirkung der UVB-Strahlung von über 40 % zu finden. Nach 48 h stieg diese noch auf über 90 % und ließ sich bis zu einem Postexpositionsintervall von 72 h sogar noch weiter steigern auf fast 93 % (Abb. 10 und Tab. 7).

Anhand dieser Ergebnisse ist deutlich ersichtlich, dass die hLEC nicht mehr in der Lage sind, den entstandenen Schaden zu reparieren. Es ist davon auszugehen, dass Apoptose eingeleitet wurde, damit sich die geschädigten Zellen nicht mehr weiter vermehren können. Dies ist ein physiologischer Vorgang, um entartete oder geschädigte Zellen aus der Linse zu eliminieren (Li et al., 1995).

Zusätzlich zu dem unmittelbar durch die Bestrahlung eingeleiteten Zelltod könnten freie Radikale, die bei der Bestrahlung der Zellen entstehen, zu einer zusätzlichen Langzeitschädigung führen. Somit würden Zellen, die nicht unmittelbar durch die Bestrahlung geschädigt wurden, durch freie *reactive oxygen species* (ROS) (1.4) noch zu einem späteren Zeitpunkt in Mitleidenschaft gezogen (Heck et al., 2003). Die Entstehung von zusätzlichen freien Radikalen aus Mediumbestandteilen wie Proteinen etc. wurde durch einen Mediumwechsel unmittelbar nach der Bestrahlung verhindert.

Die mittlere Bestrahlungsdauer von 20 s ($= 5,92 \text{ mJ/cm}^2$) zeigt ein weniger lineares Verhaltensmuster als die anderen beiden Bestrahlungszeiten (Abb. 11). Mit einer zytotoxischen Wirkung der UVB-Bestrahlung von ca. 37 % nach einem 24-h-Postexpositionsintervall zeigt sich hier zunächst ein ähnliches Bild wie nach der 40-s-Bestrahlung. Nach 48 h erreicht die 20-s-Bestrahlung ihre maximal schädigende Wirkung mit einer Zytotoxizität von ca. 78 % (Abb. 10 und Tab. 7). Mit Verlängerung des Postexpositionsintervalls zeigt sich jedoch hier eine deutliche Erholung der bestrahlten hLEC. Die Zytotoxizität fällt auf unter 70 %.

Dies ist ein Hinweis darauf, dass nicht bei allen Zellen Apoptose eingeleitet wurde und die überlebenden Zellen sich weiter vermehren können.

Somit eignete sich die Bestrahlungszeit von 20 s und einer UVB-Dosis von $5,92 \text{ mJ/cm}^2$ für die Versuche in der vorliegenden Arbeit. Dass diese Bestrahlungsintensität durchaus sinnvoll ist, zeigt sich auch an den morphologischen Bildern (Abb. 12).

4.2.4 Auswahl der UVB-Wellenlänge

Erste Untersuchungen zum Aktionspektrum von UV-Strahlung an Linsen wurden bereits 1977 von Pitts et al. durchgeführt. Dabei wurden Linsenepithelschäden an Kaninchenlinsen gemessen. Der deutlichste Schaden fand sich im Wellenlängenbereich zwischen 295 nm und 315 nm.

Da in der vorliegenden Arbeit nicht mit kompletten Linsen, sondern lediglich mit Linsenepithelzellen experimentiert wurde, sind hier die Ergebnisse von Andley et al. (1994) und Okuno (2007) von Interesse.

Andley et al. (1994) experimentierten an Linsenzellen von Kaninchen und fanden hier einen maximal schädigenden Effekt der UV-Strahlung bei einer Wellenlänge von 297 nm.

Eine neuere Studie von Okuno (2007) hatte sich erstmals mit humanen Linsenepithelzellen und ihrem ultravioletten Aktionsspektrum auseinandergesetzt. Interessant war, dass hier das Schädigungsmaximum bei 267,5 nm gefunden wurde. Diese Wellenlänge wird aber üblicherweise von der Ozonschicht und der Atmosphäre bereits absorbiert und gelangt somit gar nicht bis zur Erdoberfläche.

Eine Verwendung dieser Wellenlänge hätte aus medizinischer Sicht also nur eine theoretische Bedeutung bei der Untersuchung der Kataraktentstehung. Auch die Arbeit von Okuno (2007) befasst sich mit dem Problem, dass die UV-Strahlung in vivo, bevor sie das eigentliche Linsenepithel erreicht, zuvor die Kornea und die vordere Augenkammer passieren muss (Abb. 1). Anhand des Absorptionskoeffizienten von Kornea und der Flüssigkeit der vorderen Augenkammer, konnte er ein Aktionspektrum für das menschliche Auge errechnen. Dabei liegt das Maximum der UVB-Zytotoxizität in vivo bei 300 nm (Okuno, 2007).

Die für die Versuche in dieser Arbeit eingesetzte Philipps UVB-Leuchtröhre emittiert UV-Licht im Wellenlängenbereich von 265-400 nm. Das Maximum des Emissionsspektrums liegt bei etwa 303 nm. Die Verwendung einer Breitspektrum-UVB-Röhre kommt der physiologischen Bestrahlungssituation näher als die Verwendung von einzelnen gefilterten Wellenlängen, wie sie in den oben geschilderten Versuchen zum Einsatz gekommen sind. Darüber hinaus lag das Maximum der UVB-Strahlung in dem Bereich, der in In-vivo-Situationen den größten Schaden am Linsenepithel verursacht.

4.3 Mitochondrien von Linsenepithelzellen nach UVB-Bestrahlung

Diese Arbeit beschäftigt sich erstmals mit der Untersuchung der Mitochondrienmorphologie von humanen Linsenepithelzellen in vitro nach UVB-Bestrahlung. Anhand von anderen In-vitro-Bestrahlungsversuchen an verschiedenen Zelltypen, konnten morphologische Veränderungen und Veränderungen des MMP in Mitochondrien nach Bestrahlung beobachtet werden (4.2.1.2). Bantseev und Youn (2005) untersuchten Mitochondrienbewegungen und -veränderungen nach UVB-Bestrahlung von kompletten bovinen Linsen. Sie beobachteten nach einer Bestrahlung mit $1,0 \text{ J/m}^2$ einen Stillstand der Mitochondrien sowie Mitochondrienschwellung und -fragmentierung.

Untersucht wurde in der vorliegenden Arbeit die Mitochondrienmorphologie der hLEC über einen Zeitraum von 24 h nach einer Bestrahlungsdauer von 20 s, was einer Bestrahlungsdosis von $5,92 \text{ mJ/cm}^2$ entspricht. Nach einer Latenzphase von etwa 3 h zeigten sich erste Veränderungen in der Mitochondrienmorphologie und -verteilung innerhalb der Zelle. Die Mitochondrien gingen von ihrer eher sphärischen Konformation und Verteilung in Kernnähe in eine längliche, tubuläre Konformation über und verteilten sich im gesamten Zytoplasma (Abb. 28). Dies kann ein Hinweis auf eine erhöhte Aktivität der Mitochondrien sein. Die sphärische Konformation stellt auf Grund ihres günstigen Oberflächen/Volumen-Verhältnisses eine energetisch günstige Form dar. Längliche Mitochondrien hingegen haben eine größere Oberfläche, dies könnte mit einer erhöhten Energieproduktion in Zusammenhang stehen. Amchenkova et al. (1988) hatten bereits Ende der 80er Jahre die Hypothese aufgestellt, dass sich die Protonenpumpen der Mitochondrien durch eine vergrößerte Membranoberfläche besser verteilen und somit die ATP-Synthese beschleunigen können. Auch Frank et al. (2001) beobachteten während des Frühstadiums der Apoptose eine vorübergehende Streckung der Mitochondrien in COS 7-Zellen.

Eine weitere Ursache dieser Streckung könnte ein erhöhter Energiebedarf in kernfernen Gebieten darstellen. Mitochondrien bewegen sich entlang des Zytoskeletts, genauer den Mikrotubuli, zu den Orten mit erhöhtem Energiebedarf (Boldogh und Pon, 2007). Mikrotubuli sind röhrenförmige Proteinfilamente, die sich fadenförmig durch die Zellen spannen. Somit könnte die Streckung der Mitochondrien unter anderem durch den Transport entlang der Mikrotubuli entstehen.

Zeitgleich mit der Streckung der Mitochondrien finden sich auch schon erste Mitochondrienfragmente nach einer 3-h-Postexpositionszeit. Fragmentierung von Mitochondrien wird von vielen Autoren als ein erstes Anzeichen von Apoptose genannt (Lee et al., 2004).

Mit zunehmendem Postexpositionsintervall nehmen die Fragmentierung der Mitochondrien und ihre Konzentration in Kernnähe zu (Abb. 28).

Wenn man davon ausgeht, dass die Mitochondrien sich immer dort in der Zelle befinden, wo gerade der höchste Energiebedarf besteht, so ist dieses Verhalten durchaus sinnvoll. Anfänglich wird Energie gebraucht, um entstandene Schäden in der Zelle zu reparieren. Ist der Schaden aber zu groß, so wird Apoptose eingeleitet. Bei der Apoptose kommt es u.a. zu DNA-Strangbrüchen. Somit ist davon auszugehen, dass der Ort des höchsten Energiebedarfes, nach Einleitung der Apoptose, der Kern ist. Weiterhin führt UVB-Bestrahlung zu einer Zerstörung von Membran- und Zytoskelettbestandteilen, wodurch der Bewegungsspielraum für die Mitochondrien eingeschränkt wird (Bantseev und Youn, 2006).

4.4 Eigentoxizität und UVB-protective Wirksamkeit der HS

In dieser Arbeit wurden eine natürliche und eine synthetische HS im Vergleich zu PABA auf ihre UVB-protective Wirkung getestet.

Zur Beurteilung der UVB-protectiven Wirkung ist auch die Eigentoxizität zu berücksichtigen, da diese wie die UV-Strahlung selbst einen negativen Einfluss auf die Zellvitalität hat.

Die Eigentoxizität sowie die UVB-protective Wirkung wurden durch drei voneinander unabhängige Methoden bestimmt und dokumentiert. Zum einen wurden morphologische Veränderungen unter dem Phasenkontrastmikroskop festgehalten, zum anderen wurde der Neutralrottest durchgeführt und Fluoreszenzbilder mit mitochondrienspezifischer Färbung angefertigt.

Beim Vergleich der getesteten HS wird zunächst auf die Eigentoxizität der HS eingegangen und anschließend die UVB-protective Wirksamkeit der HS diskutiert.

4.4.1 Natürliche Huminsäure: Aldrich

Die Zytotoxizität von HS Aldrich gegenüber hLEC zeigt nach 24-stündiger Inkubationszeit einen nichtlinearen Verlauf. Ab einer Konzentration von 60 µg/ml nimmt sie konzentrationsabhängig zu.

Die scheinbar negative Zytotoxizität bei 60 µg/ml liegt vermutlich an der Auswertung mit dem Neutralrottest. Spezifische Schwachstellen des Neutralrottests wurden unter (4.2.1.1) besprochen. Die morphologischen Bilder unter dem Phasenkontrastmikroskop zeigen deutliche Veränderungen der hLEC, schon bei der niedrigsten HS-Konzentration von 10 µg/ml (Abb. 14). Die Zellen erscheinen geschrumpft, der Zellverband aufgelöst und im Zytoplasma finden sich vermehrt Vakuolen. Eben diese Vakuolen können bei dem Neutralrottest für eine vermehrte Farbstoffaufnahme verantwortlich sein und zu einer zu niedrigen Einschätzung der Zytotoxizität führen. Die morphologischen Kriterien der Apoptose wie Membranblebbing, Kernfragmentierung und Zellschrumpfung sind erfüllt.

Die mit dem Farbstoff MitoTracker® Red angefertigten Fluoreszenzbilder bestätigen die Annahme, dass es sich um ein apoptotisches Geschehen handelt. Bei einer Konzentration von 250 µg/ml HS Aldrich finden sich bereits nach 3 h deutliche Veränderungen der Mitochondrien. Nach 6 h sind alle Zellen betroffen. Ihre Mitochondrien sind von anfänglicher Streckung in kleine fragmentierte Mitochondrien rund um den Kern übergegangen. Dies ist ein Zeichen des intrinsischen Apoptoseweges, der über die Mitochondrien eingeleitet wird (1.6).

Die toxische Wirkung von hohen HS-Konzentrationen ist bekannt. Ebenso gibt es einige Arbeiten, die sich mit der Ursache des Zelltodes durch HS beschäftigen. So konnten Hseu et al. (2002) an humanen Endothelzellen zeigen, dass HS Apoptose einleiten. Sie fanden Hinweise darauf, dass unter anderem oxidativer Stress durch die HS auf die Endothelzellen ausgeübt wird. Für die Beurteilung der Wirkung von HS Aldrich ist in diesem Zusammenhang die Arbeit von Cheng et al. (2002) von Interesse. Diese Arbeitsgruppe untersuchte die zytotoxische Wirkung von HS Aldrich an humanen Fibroblasten und fand, dass eine Konzentration von 100 µg/ml bereits ausreichte, um nach 24-stündiger Inkubationszeit in der Mehrzahl der Zellen Apoptose einzuleiten. Auch hier wurde oxidativer Stress als Hauptursache des Zellunterganges genannt.

Die vorliegende Arbeit untersucht erstmalig die HS-Wirkung auf humane Linseneithelzellen. Linseneithelzellen sind für morphologische Betrachtungen sehr gut geeignet, da sie relativ flach sind und unter dem Phasenkontrastmikroskop ein deutlich vom Zytoplasma abgrenzbarer Zellkern zu sehen ist.

Die Expositionszeiten von 48 und 72 h zeigen einen sehr ähnlichen Verlauf (Abb. 35). Die Eigentoxizität der HS steigt sehr rasch zwischen 10 und 20 µg/ml an und verbleibt dann, auch bei steigenden Konzentrationen, auf einem Plateau von unter 60 %. Wie auch schon bei der 24-stündigen Exposition, stehen diese Ergebnisse in Diskrepanz zu den Phasenkontrast- und den Fluoreszenzbildern.

24 h nach UVB-Exposition liegt die UVB-protective Wirkung von HS Aldrich schon bei 120 µg/ml über 50 % und steigt konzentrationsabhängig bis auf über 80 % an. Die Eigentoxizität der HS spielt in die UVB-protective Wirkung nicht mit hinein, da die HS nur zum Bestrahlungszeitpunkt mit den hLEC in Kontakt gebracht wurden und die Zellen unmittelbar nach der Bestrahlung in frischem FBS-haltigem Medium inkubiert wurden.

Die geringste rechnerische UVB-protective Wirkung entfaltet HS Aldrich 48 h nach UVB-Exposition. Das liegt daran, dass der Zellschaden durch die Bestrahlung ohne protective Substanz nach diesem Intervall sein Maximum erreicht.

Dagegen findet sich nach einer Ausdehnung des Versuches auf 72 h Postexpositionszeit eine ausgezeichnete UVB-protective Wirkung. Schon eine Konzentration von 60 µg/ml schützt über 50 % der Zellen vor UVB-Strahlung. Bei einer Konzentration von 250 µg/ml liegt die Protection durch die HS bei über 100 %. Eine Schutzwirkung von über 100 % bedeutet, dass im Vergleich zu der unbestrahlten Zellkontrolle das Zellwachstum in den UVB-bestrahlten hLEC beschleunigt bzw. vermehrt ist.

Die Ergebnisse lassen darauf schließen, dass die UV-protective Wirkung der HS auf Lichtabsorption zurückgeht. Bei zu geringen HS-Konzentrationen wird nur ein Teil der UV-Strahlung absorbiert, so dass der nicht absorbierte Anteil die Zellen schädigen kann.

Hier liegt auch die mögliche Erklärung für die Entstehung von mehrkernigen Riesenzellen bei Bestrahlung der hLEC in Anwesenheit von HS (Abb. 16). Werden Zellen in der M-Phase ihres Zellzyklus bestrahlt, so kommt es zu einer Zerstörung des Spindelapparates bei erhaltener DNA-Synthese. Dies führt zur Bildung von polyploiden und/oder mehrkernigen Riesenzellen (Riede et al., 1998). Auch in den Bestrahlungsversuchen ohne HS hätten der Wahrscheinlichkeit nach mehrere Zellen zum Bestrahlungszeitpunkt in der M-Phase ihres Zyklus sein müssen. Dass hier keine mehrkernigen Riesenzellen auftraten, lag vermutlich an der höheren Strahlendosis. Die Zellen waren so schwer

geschädigt, dass neben dem Spindelapparat auch die DNA-Synthese gestört war, so dass sie durch programmierten Zelltod eliminiert wurden. Die HS schwächen die Strahlendosis durch Absorption der UVB-Strahlung ab, wodurch die Bildung von mehrkernigen Riesenzellen möglich wird.

Mit steigender HS-Konzentration wird mehr UVB-Strahlung absorbiert. Eine UVB-protective Wirkung von über 100 % lässt sich so erklären, dass zwar ein Großteil der UVB-Strahlung von den HS absorbiert wurde, aber energetisch schwächere Anteile der Strahlung noch bis zu den Zellen vordringen und diese zur Proliferation anregen. Eine akute Bestrahlung von Linsenzellen führt zwar zu programmiertem Zelltod, Langzeit- und wiederholte, niedrig dosierte UV-Bestrahlungen der Linse hingegen führen zu epithelialer Hyperplasie (Wegener, 1994). Liegt die Bestrahlungsdosis also unterhalb der Schwellendosis, so kann sie auch proliferierenden Einfluss auf die Zellen haben.

Bei Betrachtung der Mitochondrien unter dem Fluoreszenzmikroskop konnte der stimulierende Effekt der UVB-Bestrahlung auf die Zelle gezeigt werden. Die Mitochondrien von ungeschützt bestrahlten Zellen strecken sich anfangs, bevor sie dann fragmentieren und sich wieder um den Kern herum anordnen. Werden die hLEC aber zum Bestrahlungszeitpunkt mit HS Aldrich inkubiert, so vollzieht sich diese Ausstreckung der Mitochondrien erst wesentlich später (Abb. 32).

Insgesamt hat HS Aldrich eine deutliche UVB-protective Wirkung. Sollten HS, wie von Wang et al. (2001) beschrieben durch UV-Strahlung molekular verändert und abgebaut werden, so würden sie an Eigentoxizität verlieren. Jedoch könnte dies auch die UVB-Absorption der HS verringern.

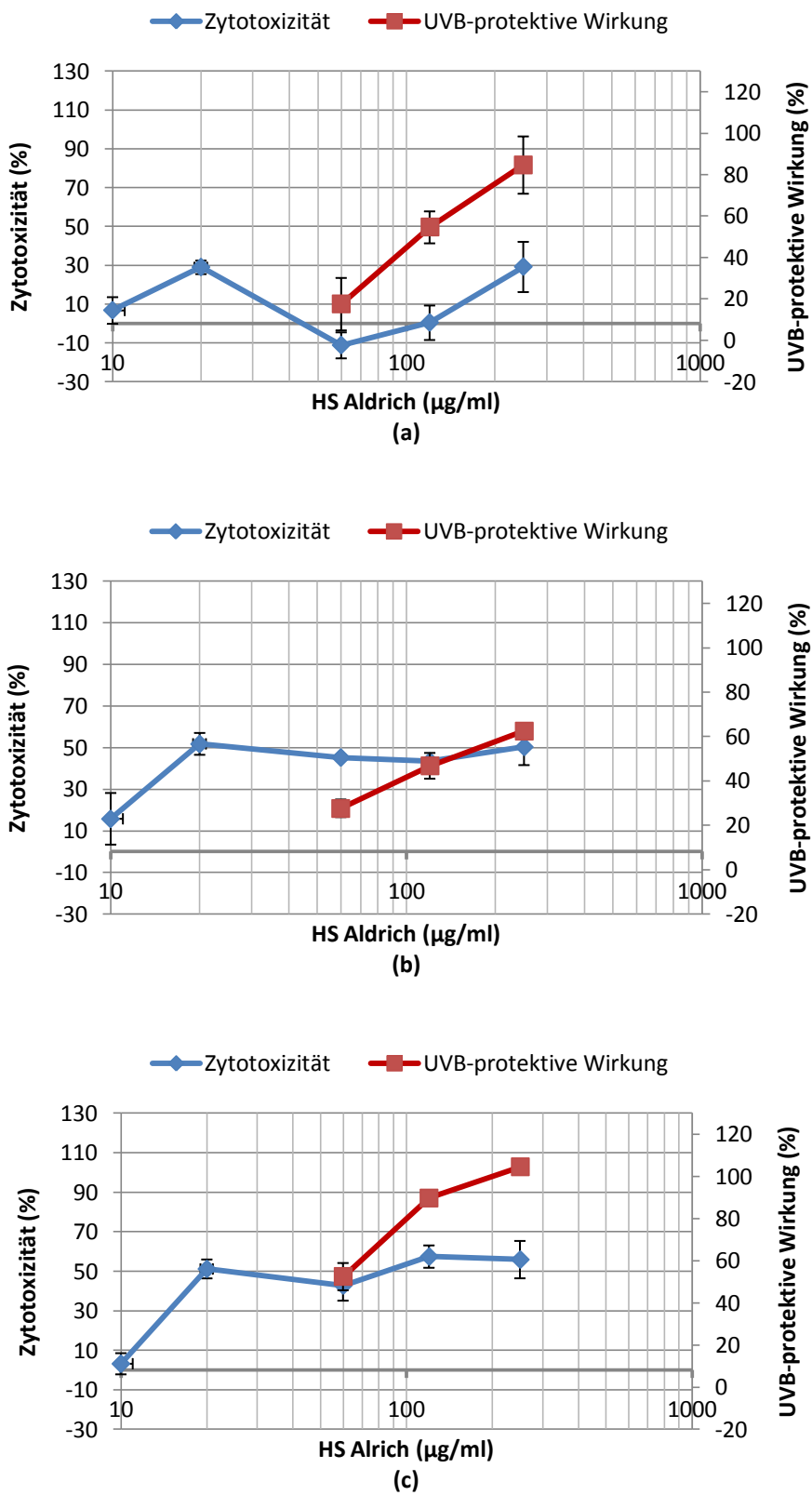


Abb. 35: UVB-protective Wirkung und Zytotoxizität von HS Aldrich auf hLEC-Zellen. Postexpositionszeit: (a) 24h, (b) 48h, (c) 72h. Ausgewertet mit NRU

4.4.2 Synthetische HS: Hydrokaffeesäure-Oxidationsprodukt

HYKOP ist ein HS-ähnliches Polymer, welches bereits in der Arbeit von Kühn (2005) bezüglich seiner Eigentoxizität auf U937-Zellen untersucht wurde. Auf diese promonozytäre Zelllinie hatte HYKOP keine toxischen Auswirkungen. Im Gegenteil, nach einem Expositionsintervall von 24 h zeigten sich ab einer Konzentration von 30 µg/ml wachstumsfördernde bzw. stoffwechselaktivierende Eigenschaften.

Auch der NRU-Test in dieser Arbeit zeigte eine negative Zytotoxizität auf hLEC nach einem 24-stündigen Expositionsintervall für einen Konzentrationsbereich von ca. 40-180 µg/ml an. Hier gilt aber zu beachten, dass sich bei diesen Konzentrationen bereits morphologische Veränderungen der Zellen vollzogen hatten (Abb.18). Im Vergleich zu den Zellen, die mit HS Aldrich behandelt wurden, sind diese Veränderungen weniger dramatisch und bei den niedrigeren Konzentrationen scheint der Zellrasen dichter zu sein als in der Kontrolle.

Die Anfärbung der Mitochondrien mit MitoTracker® Red zeigt auch für HYKOP eine deutliche Konzentration von sphärischen und fragmentierten Mitochondrien rund um den Kern (siehe Abb. 30). Insgesamt vollzogen sich die Mitochondrienveränderungen etwas langsamer als bei HS Aldrich und die Vakuolisierung des Zytoplasmas war weniger stark ausgeprägt.

Henics und Wheatly (1999) untersuchten das Phänomen der Zellvakuolisierung an unterschiedlichen Zelltypen. Sie fanden heraus, dass dies neben Spontanveränderungen auch reversible Reaktionen auf verschiedenste toxische Stimuli sein können. Die Vakuolisierung selbst muss noch nicht unbedingt zum Zelluntergang führen. Erst, wenn ihr Ausmaß so groß ist, dass einzelne Zellorganellen in ihrer Funktion eingeschränkt werden, wird von der Zelle der programmierte Zelltod eingeleitet. Offensichtlich tritt dieser Fall für HS bei höheren HS-Konzentrationen und Inkubationszeiten von über 24 h ein.

Die Zytotoxizität der HS auf hLEC für die Expositionsintervalle 48 h und 72 h sind wieder sehr ähnlich. Sie steigt konzentrationsabhängig an und erreicht ab etwa 60 µg/ml ein Plateau, das 60 % nicht übersteigt.

Die UVB-protective Wirkung von HYKOP zeigt für alle drei Postexpositionsintervalle einen ähnlichen, konzentrationsabhängig steigenden, Verlauf. Eine protective Wirkung von etwa 90 % wird nach 72 h bei einer Konzentration von 250 µg/ml HYKOP erreicht. Eine weitere Steigerung der UVB-protectiven Wirkung erscheint möglich, wurde aber aufgrund der Eigentoxizität der Substanz nicht geprüft. Ähnlich wie bei HS Aldrich ist die schwächste UVB-protective Wirkung bei einem Postexpositionsintervall von 48 h zu finden.

Insgesamt ist die UVB-protective Wirkung für alle drei Zeitintervalle zufriedenstellend.

Eine Beobachtung der Mitochondrien während der ersten 24 h nach UVB-Bestrahlung in Anwesenheit von HYKOP zeigt, dass im Vergleich zu HS Aldrich die Streckung der Mitochondrien schon etwas früher auftritt (Abb. 33). Dies könnte ein Zeichen für vermehrte Zellaktivität sein, hervorgerufen durch die UVB-Bestrahlung. Dass diese Aktivität nicht unbedingt schädlich für die Zelle sein muss, zeigt der Neutralrottest, denn insgesamt ist die UVB-protective Wirkung von HYKOP höher als die von HS Aldrich.

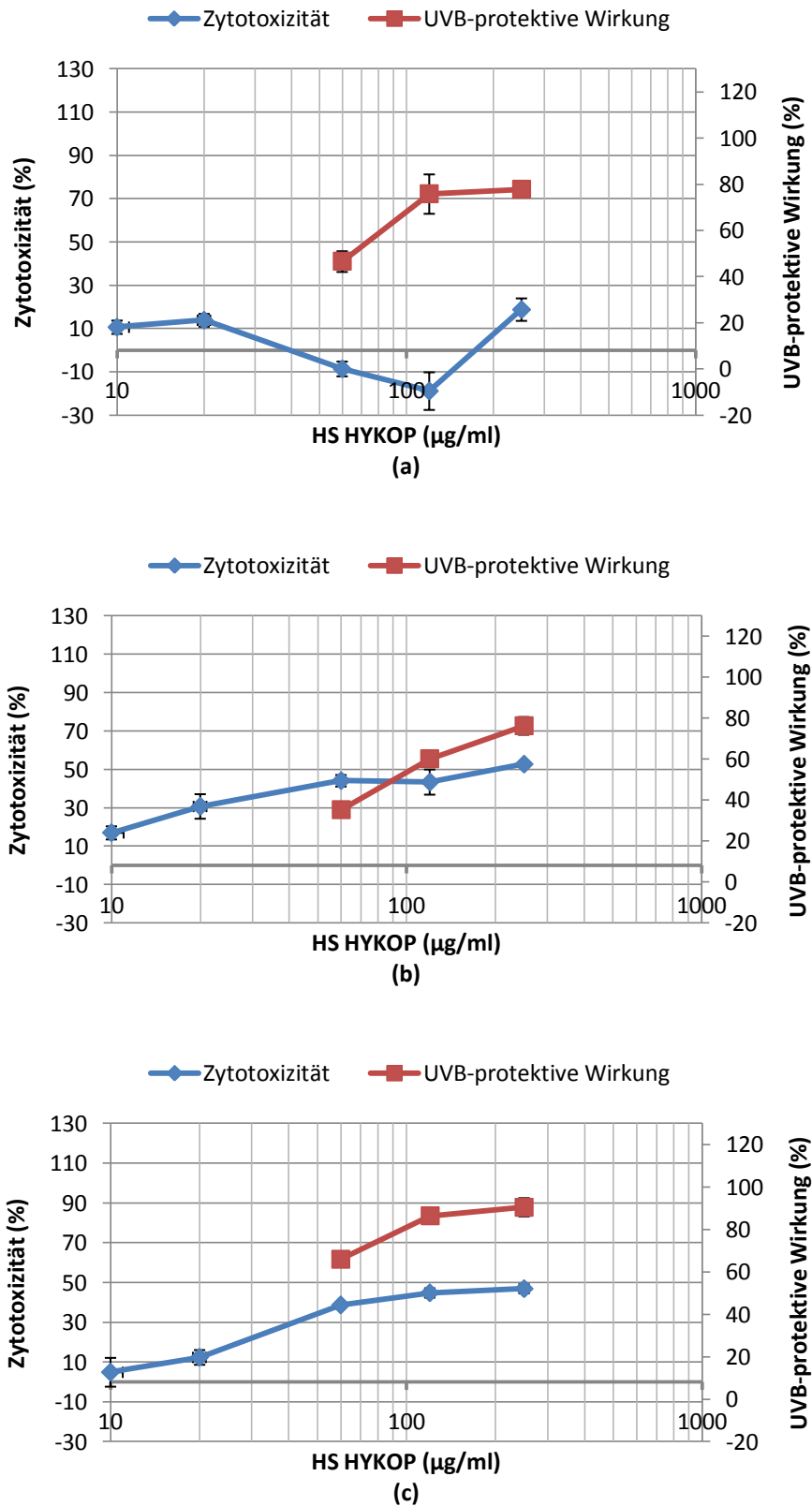


Abb. 36: UVB-protective Wirkung und Zytotoxizität von HS HYKOP auf hLEC-Zellen. Postexpositionszeit: (a) 24h, (b) 48h, (c) 72h. Ausgewertet wurde mit NRU.

4.4.3 Referenzsubstanz: PABA

PABA hat in den getesteten Konzentrationen zwischen 10 und 500 µg/ml keine toxische Wirkung auf hLEC. Nach 72 h zeigte sich sogar ein zytoprotektiver Effekt auf die hLEC unter PABA-Einfluss. Die Kontrollen der Zytotoxizitätstests enthielten ebenso wie die Testsubstanzlösungen kein Serum. Ohne Serum zeigten die hLEC keine Proliferation, sowie mit zunehmender Versuchsdauer einen Rückgang der Zellzahl (Abb. 25). Unter Zugabe von PABA war der Zelluntergang jedoch weniger stark.

Die Anfärbung der Mitochondrien mit MitoTracker® Red bestätigte die geringe Eigentoxizität von PABA (Abb. 31). Die Farbintensität nimmt nicht ab und die Morphologie der Mitochondrien bleibt weitgehend unverändert.

Die UVB-protective Wirkung zeigt für die getesteten Konzentrationen ausgezeichnete Schutzwirkung auf hLEC vor UV-Bestrahlung. Nach 48 h wurde bei einer Konzentration von 120 µg/ml ein Schutz von über 100 % gemessen. Auch hier gilt, wie bereits bei der HS Aldrich erläutert (4.4.1), dass ein gemessener Wert von über 100 % ein vermehrtes bzw. beschleunigtes Wachstum der UVB-bestrahlten Zellen im Vergleich zur unbestrahlten Zellkontrolle darstellt. Ähnlich wie schon für HS Aldrich wird hier vermutlich ein Teil der nicht absorbierten Strahlung als Strahlung mit niedriger Energie zu den hLEC durchgelassen, wodurch diese zur Proliferation angeregt werden. Eine Steigerung der PABA-Konzentration auf 250 µg/ml führte zu einer geringeren UV-protectiven Wirkung. Die UVB-Strahlung wurde zwar größtenteils von PABA absorbiert, jedoch wurden die Zellen nicht zu vermehrter Proliferation angeregt.

Auch für PABA wurden Fluoreszenzfärbungen der Mitochondrien angefertigt, um die UVB-Strahlenwirkung auf mit PABA geschützten hLEC zu dokumentieren. Die Bilder (Abb. 34) zeigen zwar auch eine geringe Streckung der Mitochondrien von einigen Zellen, jedoch sind insgesamt die Strahlenschäden bzw. Veränderungen an den Mitochondrien durch UVB-Strahlung recht gering.

Die UVB-protective Wirkung von PABA ist bei allen drei Postexpositionsintervallen sehr hoch, zudem hat PABA keine Eigentoxizität auf hLEC.

Somit eignet sich PABA als Referenzsubstanz für die beiden getesteten HS.

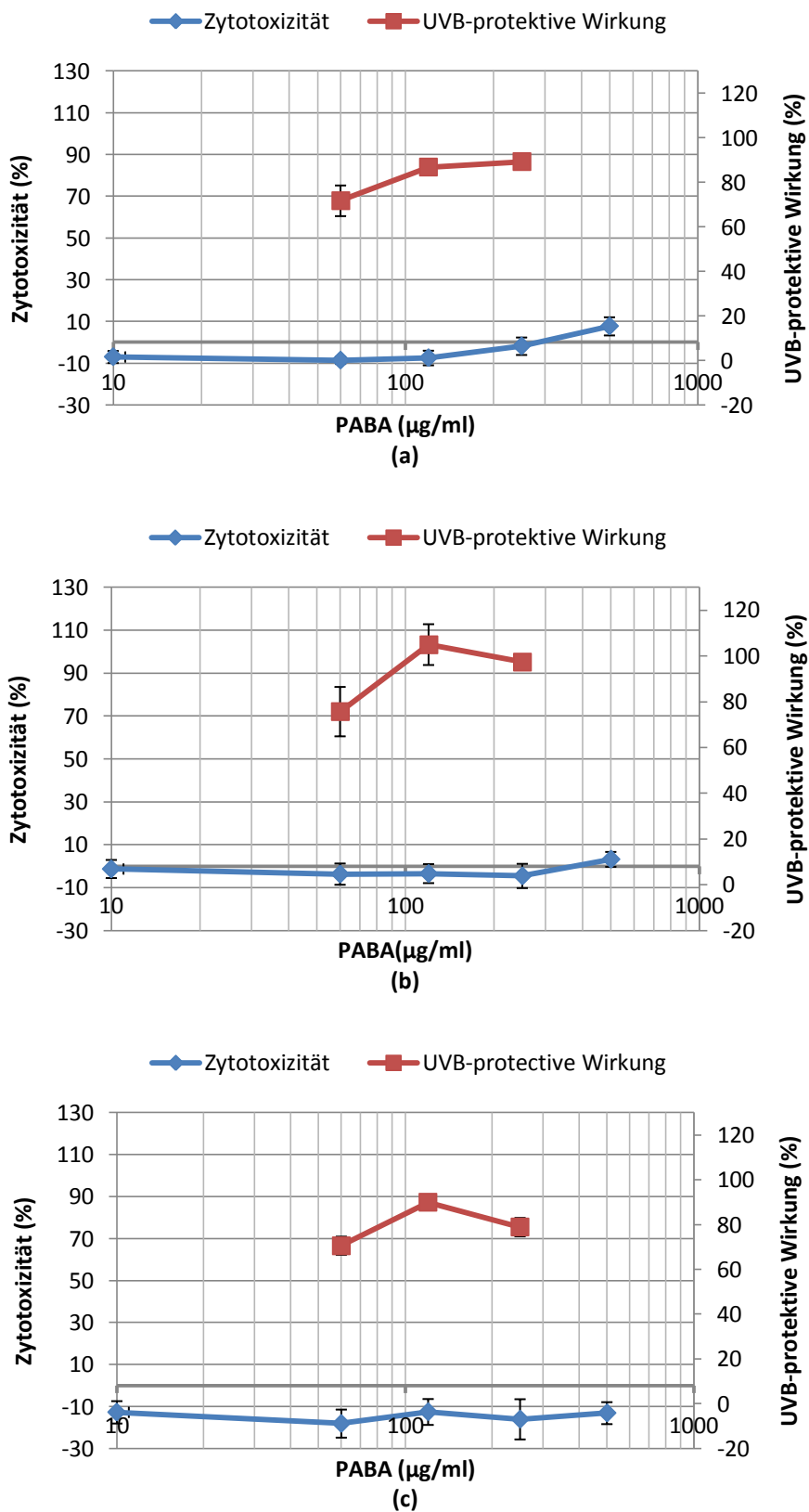


Abb. 37: UVB-protective Wirkung und Zytotoxizität von PABA auf hLEC-Zellen. Postexpositionszeit: (a) 24h, (b) 48h, (c) 72h

Der Vergleich der natürlichen HS Aldrich, der synthetischen HS HYKOP und der Referenzsubstanz PABA bezüglich ihrer UVB-protaktiven Wirkung ergab, dass PABA insgesamt den höchsten Schutz über den gesamten Versuchszeitraum bietet. Gleichzeitig wies PABA im Gegensatz zu den HS keine Eigentoxizität gegenüber hLEC auf. Vor allem in niedrigeren Konzentrationen war PABA deutlich wirksamer als die HS.

Dagegen waren die HS Aldrich und HYKOP nach 72 h bei einer Konzentration von 250 µg/ml der Referenzsubstanz überlegen und zeigten hier für HS Aldrich eine 26 % und für HYKOP eine 12 % stärkere Schutzwirkung als für PABA (Tab. 4c, 5c und 6c).

Der Vergleich der beiden getesteten HS untereinander ergibt eine gleichmäßigere Schutzwirkung für das HYKOP bei allen Postexpositionszeiten. So liegt die UVB-protaktive Wirkung des HYKOP nach 48 h deutlich über der von HS Aldrich. Zudem ist die Eigentoxizität der synthetischen HS niedriger einzuschätzen als die der natürlichen HS.

Die unterschiedlich ausgeprägte UVB-Protaktion könnte auf einen unterschiedlichen Absorptionskoeffizienten der HS zurückzuführen sein (Abb. 35 und 36).

Obwohl die HS Aldrich ebenfalls hohe UVB-protaktive Wirkung aufweist, ist HYKOP als Sonnenschutzsubstanz besser geeignet. Ihre UVB-protaktive Wirkung ist bei niedrigeren Konzentrationen effektiver als die von HS Aldrich und ihre Eigentoxizität geringer.

Die synthetische Herstellung eines HS-Polymers aus einer einheitlichen Ausgangssubstanz, in diesem Falle Hydrokaffeensäure, ist in der Arzneimittelforschung von Vorteil. So kann der Wirkungsmechanismus besser untersucht und die Reproduzierbarkeit der Versuchsergebnisse erhöht werden.

4.5 Huminsäuren als UV-Schutz für das Auge

4.5.1 Fotosensibilisierung

Absorption eines Photons führt dazu, dass ein Elektron aus dem Molekülverband herausgelöst wird, wodurch es in einen angeregten Zustand versetzt wird. Dies kann zu zwei unterschiedlichen Reaktionen führen.

Zum einen zu einer fototoxischen Reaktion. Dies ist eine Reaktion, bei der auf direktem physikochemischem Weg Zellschaden entsteht. Das angeregte Elektron gibt seine überschüssige Energie an Wasserstoffmoleküle ab. Dabei entstehen freie Sauerstoffradikale, die die Zellmembranen und die Zell-DNA angreifen. Die fototoxische Reaktion läuft ohne vorherige Sensibilisierung ab und ist unabhängig vom Immunsystem. Ihr Resultat ist eine inflammatorische Antwort, die beim Menschen meist wie ein starker Sonnenbrand aussieht, häufig auch mit Blasenbildung. Zum anderen zu einer fotoallergische Reaktion. Diese hingegen entspricht einer T-Zell-vermittelten allergischen Reaktion und ist eine zeitlich verzögerte Reaktion auf das fotosensibilisierende Agens (Zhang und Elmets, 2009).

Die meisten dieser Reaktionen vollziehen sich an der Haut. Dennoch hat die fotosensibilisierende und fototoxische Reaktion durchaus auch Relevanz am Auge. Normalerweise ist das Auge vor UV-Schäden durch ein wirksames antioxidatives System und seine Chromophoren geschützt. Mit zunehmendem Alter nehmen diese Schutzmechanismen jedoch ab und so können fotosensibilisierende Substanzen das Auge gegenüber UV-Strahlung angreifbar machen. Zu diesen Substanzen gehören vor allem trizyklische, heterozyklische und Porphyrin-Ring-Strukturen (Roberts, 2002). Die Behandlung mit Antidepressiva und Neuroleptika, etwa in Kombination mit einer Lichttherapie gegen Saisonale Winterdepression, können zu fototoxischen Reaktionen am Auge führen (Wang et al., 1992). Psoralen, eine fotosensibilisierende Substanz, die in Kombination mit UVA unter anderem zur Behandlung der Psoriasis Anwendung findet, steht in Verdacht die UV-Katarakt beim Menschen zu begünstigen (Lafond et al., 1984). Vor allem sind Patienten gefährdet, die sich nach der Behandlung ungeschützt dem Sonnenlicht aussetzen. Für diese Patientengruppe wäre eine geeignete UV-Schutzsubstanz für das Auge durchaus wünschenswert.

4.5.2 Toxikologie, fototoxische und fotoallergische Reaktionen von UV-Filtern

Die vermehrte Anwendung von UV-Schutzcremes in den letzten Jahren machte Untersuchungen zu fotoallergischen Reaktionen notwendig. Eine große klinische Studie von Darvay et al. (2001) untersuchte zahlreiche UV-Filter-Substanzen auf fotoallergische sowie kontaktallergische Reaktionen. Unter den getesteten Substanzen befand sich u.a. PABA, die auch in der vorliegenden Arbeit zur Anwendung kam. Insgesamt zeigten von 2715 getesteten Patienten, 111 Patienten fotoallergische Reaktionen auf verschiedene UV-Filter, darunter 5 Patienten mit allergischen Reaktionen auf PABA. Somit konnten UV-Filter als potentielle Fotoallergene identifiziert werden.

Einige UV-Filter stehen unter Verdacht, mutagene Wirkung unter UV-Bestrahlung zu entwickeln. Zwar schützen sie vor einem Sonnenerythem durch Absorption der UV-Strahlung, doch entstehen bei ihrer Bestrahlung freie Radikale, die dann die DNA der Zellen schädigen können (Knowland et al., 1993). PABA gehört zu diesen instabilen Substanzen und ist heute nicht mehr als Sonnenschutzmittel zugelassen.

Sonnencreme ist stark lipophil, weshalb davon auszugehen ist, dass sich diese Substanzen in der Umwelt bioakkumulieren. In einem See in der Eifel (Deutschland) wurden sechs unterschiedliche UV-Filtersubstanzen im Fettgewebe von Fischen identifiziert (Nagtegaal et al., 1997). Dieser Befund lässt vermuten, dass UV-Filter relevante Umweltgifte sind. Auch in Menschen konnte eine Akkumulation von UV-Filtersubstanzen gefunden werden. In fünf von sechs Muttermilchproben wurden Spuren von Methoxycinnamat und/oder Benzoephenon-3, beides oft verwendete UV-Filter, gefunden (Hany und Nagel, 1995).

Darüber hinaus stehen Sonnenschutzmittel unter dem Verdacht, östrogene Aktivität zu besitzen (Schlumpf et al., 2001).

Die Suche nach UV-Filtern mit einem günstigeren Nebenwirkungsprofil scheint also mehr als gerechtfertigt. Zudem stellt die Situation am Auge weitere Anforderungen an eine geeignete UV-Schutzsubstanz. Durch den ständigen Tränenfilm auf dem Auge, bleiben herkömmliche Lichtschutzmittel nicht ausreichend lange im Auge, um vor UV-Strahlenschäden schützen zu können.

Zellen von Hornhaut, Konjunktiva und Linse reagieren sehr empfindlich auf zytotoxische Substanzen, weshalb die Suche nach biokompatiblen Alternativen gefragt ist.

Bei oraler Aufnahme von HS werden HS kaum resorbiert, was zum einen an ihrer Polarität und zum anderen an ihrer Molekülgröße liegt (Kühnert et al. 1989, 1991). Von daher sind HS bei oraler Aufnahme

lediglich als reizend einzustufen. Die orale Aufnahme von PABA, gemessen an der Ratte, hat dagegen eine LD₅₀ von 6000 mg/kg.

Hinsichtlich ihrer pharmakologisch-toxikologischen Eigenschaften sind die natürlichen HS aufgrund ihrer unterschiedlichen Herkunft und Zusammensetzung nicht ohne weiteres vergleichbar. So konnte keine zytotoxische Wirkung von HS HYKOP auf U937-Zellen nachgewiesen werden (Kühn, 2005), während die vorliegende Arbeit deutliche Eigentoxizität gegenüber hLEC zeigt.

Vor allem nach operativen Eingriffen am Auge könnte die antiphlogistische und antivirale Wirkung der HS einen günstigen Effekt auf den Heilungsprozess haben. So konnte am Eiweißödem der Rattenpfote die beschleunigte Rückbildung, bzw. ein verzögertes Auftreten des Ödems nach dermalen und subkutanen HS-Applikation nachgewiesen werden (Klöcking et al., 1968).

Es ist bekannt, dass HS sich an Zellmembranen anlagern (Lange et al., 1996; Riede et al., 1992; Schlickeewey et al., 1993) bzw. im Gewebe, z.B. in der Lunge, akkumulieren (Ghio und Quigley, 1994), wobei es sich vornehmlich um einen Adsorptionsprozess handelt.

Während bei der kohlestämmigen Aldrich-HS unspezifische (hydrophobe) Sorptionswechselwirkungen überwiegen, sind die synthetischen HS durch ein hohes Maß an spezifischen (Dipol-Dipol, H-Brücken, charge-transfer) Adsorptionskräfte charakterisiert. Möglicherweise lässt sich damit erklären, warum allein auf Grund abiotischer Prozesse das „Andocken“ synthetischer HS an Zellen und Viren sehr ausgeprägt ist und neben biotischen Reaktionen zur Virusminderung durch KOP und HYKOP beiträgt (Pörschmann et al., 2003).

Bei der Keratitis dendritica handelt es sich um eine oberflächliche Infektion der Hornhaut mit Herpes-simplex-Viren (HSV). 85% aller Erwachsenen sind mit dem HSV Typ 1 infiziert, nach Abheilung des Primäraffektes kann es in Situationen der Resistenzschwäche (Stress, UV-Strahlung, akute Erkrankung) zu Rezidiven kommen. Die Patienten klagen neben ausgeprägtem Fremdkörpergefühl, Schmerzen und Tränenfluss auch über Fotophobie (Sachsenweger et al., 2003). Augentropfen mit HS könnten hier zur Prophylaxe dienen. Sie könnten vor UV-Stress schützen und gleichzeitig antiviral wirksam sein (Meerbach et al., 2001).

4.5.3 Rezepturvorschlag für huminsäurehaltige Augentropfen mit UV-Schutz

Bei der zusammenfassenden Betrachtung der Ergebnisse schneidet HS HYKOP als vielversprechende UV-Schutzsubstanz ab.

Zwar zeigt sich bei direkter In-vitro-Testung auf humanen Linsenepithelzellen Eigentoxizität, jedoch muss man beachten, dass die HS unter physiologischen Bedingungen, aufgrund des anatomischen Aufbaus des Auges, das Linsenepithel nicht erreichen würden (Abb.1). Die HS müsste dazu die Kornea, sowie die vordere Augenkammer passieren. Als polare Substanz und aufgrund ihres relativ hohen MG, werden HS jedoch nur in äußerst geringem Maße resorbiert.

Insbesondere die synthetische HS HYKOP verfügt über hohe adsorptive Kräfte, wodurch sie sich an Zellen „andocken“ kann (Pörschmann et al., 2003). Dies ist eine wichtige Eigenschaft für eine UV-Schutzsubstanz am Auge. Der ständige Tränenfilm verhindert einen gleichmäßigen Sonnenschutz des Auges mit herkömmlichen Mitteln.

Um nun HS-haltige, UV-B-protective Augentropfen herstellen zu können, müssten diese in eine geeignete Applikationsform gebracht werden. Als besonders geeignet scheinen die sogenannten Filmbildner zu sein. Diese werden als Tränenersatzmittel häufig in der Augenheilkunde angewandt. Es gibt verschiedene Substanzklassen darunter Carbomere, Hypermellose, Carmellose, Hydroxyethylcellulose, Polyvinylalkohol und einige andere. Sie unterscheiden sich nicht in ihrer Wirkungsweise, jedoch in ihrer Viskosität. Da HS ausgeprägte Neigung zu Komplexbildung haben, müsste zunächst getestet werden, welche der oben genannten chemischen Verbindungen am besten für eine HS-Rezeptur geeignet sind.

Des Weiteren wäre eine In-vitro-Testung der Zytotoxizität von HS an Hornhautepithelzellen wünschenswert, da diese mit den HS längere Zeit in Kontakt bleiben würden. Darauf aufbauend könnten HS-Augentropfen im Tierversuch an Kaninchenaugen getestet werden. Kaninchenaugen entsprechen, bezogen auf die Größenverhältnisse und auf die Lidschlagfrequenz am ehesten den Bedingungen am menschlichen Auge.

5. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden eine natürliche (HS Aldrich) und eine synthetische Huminsäure (HYKOP) mit einer Referenzsubstanz (PABA) hinsichtlich ihrer Eigentoxizität und ihrer UVB-protectiven Wirkung auf humanen Linseneithelzellen (hLEC) untersucht.

Für die Untersuchung der Eigentoxizität kamen drei Methoden zur Anwendung. Nach Inkubationszeiten von 24, 48 und 72 h wurden morphologische Betrachtungen unter dem Phasenkontrastmikroskop angestellt und die Eigentoxizität der HS sowie der PABA mit dem Neutralrottest bestimmt. Hinzu kam eine morphologische Betrachtung der Mitochondrien von hLEC während der ersten 24 h unter dem Fluoreszenzmikroskop in Zeitabständen von 1, 3, 6, 12, und 24 h.

Für die Untersuchung der UVB-protectiven Wirksamkeit der Testsubstanzen, wurden die Zellen in Anwesenheit der HS bzw. von PABA mit einer experimentell ermittelten Strahlendosis (5,92 mJ/cm²) bestrahlt.

Die Eigentoxizität der Testsubstanzen variiert je nach Bestimmungsmethode und fällt im Neutralrottest deutlich niedriger aus, als die morphologischen Bilder unter dem Phasenkontrast- und Fluoreszenzmikroskop vermuten lassen. Die Versuche für die Bestimmung der halbmaximalen Konzentrationen wurden in nur je drei Wiederholungen mit dem Neutralrottest durchgeführt. Somit sind die im Folgenden angegebenen Werte der CC₅₀ und der UVB-PC₅₀ als Näherungswerte zu betrachten.

Die Referenzsubstanz (PABA) lässt sich anhand der Ergebnisse des Neutralrottests und der beiden anderen Methoden, als nicht toxisch einstufen. Die errechnete CC₅₀ liegt für alle Expositionszeiten unter den maximal getesteten 500 µg/ml. Die natürliche HS Aldrich hingegen zeigte nach 24 h noch eine CC₅₀, die unter den getesteten 250 µg/ml lag, diese fiel aber nach 48 h auf 141 µg/ml und lag nach 72 h bei 107,3 µg/ml. Die morphologischen Bilder unter dem Phasenkontrastmikroskop zeigten allerdings schon bei einer Konzentrationen von 10 µg/ml HS deutliche Veränderungen der hLEC. Die Mitochondrien in den Fluoreszenzbildern bestätigten diese deutlichen Veränderungen während der ersten 24 h nach HS-Exposition. Die synthetische HS HYKOP zeigt im Neutralrottest genau wie HS Aldrich eine CC₅₀ >250 µg/ml. Nach 48 h lag diese bei 166 µg/ml und nach 72 h bei 209 µg/ml. Gemessen mit dem Neutralrottest ist HYKOP somit weniger toxisch als HS Aldrich. Dennoch waren auch hier schon bei niedrigen HS-Konzentrationen morphologische Veränderungen der hLEC sichtbar. Gleiches gilt für die Mitochondrien der hLEC. Bei einer Konzentration von 250 µg/ml und einem Expositionsintervall von 24 h deuteten die Veränderungen der Mitochondrien auf Apoptose in hLEC durch beide getesteten HS hin.

Für die Darstellung und den Vergleich der HS mit der Referenzsubstanz wurde die UVB-PC₅₀ bestimmt. Um negative Einflüsse auf die Zellvitalität durch die Eigentoxizität der HS ausschließen zu können, wurden die Zellen nur zum Bestrahlungszeitpunkt mit den HS und PABA in Berührung gebracht. Anschließend wurde in frischem serumhaltigem Medium inkubiert.

Beide getesteten HS zeigen deutlich UVB-protective Wirkung nach Postexpositionsintervallen von 24, 48 und 72 h. Die HS HYKOP hat bei allen drei Postexpositionszeiten starke protective Eigenschaften (UVB-PC₅₀ 24 h: 54,4 µg/ml; 48 h: 94,3 µg/ml; 72 h: 16 µg/ml). Ihre Wirksamkeit übertrifft nach 72 h bei einer Konzentration von 250 µg/ml sogar die der Referenzsubstanz PABA. Während HYKOP hier eine UVB-protective Wirkung von 90,5 % hat, bietet PABA bei dieser Konzentration lediglich eine UVB-PW von 78,9 %.

Die HS Aldrich hat insgesamt etwas schwächere UVB-protective Wirkung als HYKOP, doch ergibt sich nach 72 h bei einer Konzentration von 250 µg/ml eine rechnerische UVB-protective Wirkung von 104 %. Relativ schwach ist ihre protective Wirkung allerdings nach 48 h, hier findet sich eine UVB-PC₅₀ von lediglich 143 µg/ml.

Die zusätzliche Betrachtung der Zellen unter dem Phasenkontrast- und dem Fluoreszenzmikroskop konnte zeigen, dass mit steigender HS-Konzentration die UVB-Strahlenschäden abnehmen.

Der zugrunde liegende Schutzmechanismus durch die HS auf hLEC beruht sehr wahrscheinlich auf der Absorption schädigender Strahlung. Der Teil der Strahlung, der die HS passieren konnte, führte entweder zu einem Zellschaden, oder aber zu einer Proliferation der Zellen, wenn die Strahlungsenergie durch die HS auf eine niedrigere UVB-Strahlendosis abgemildert werden konnte.

Insgesamt stellt sich HYKOP gegenüber Aldrich-HS als die effektivere Substanz für den UVB-Schutz an hLEC heraus.

Neben den Ergebnissen zur UVB-protectiven Wirkung der HS auf hLEC, zeigte diese Arbeit, dass sich der Neutralrottest für die Bestimmung des Zellschadens durch UVB-Strahlung an hLEC eignet. Ebenso konnte er zuverlässige Ergebnisse für die UVB-protective Wirkung liefern. Nur zur Beurteilung der Eigentoxizität von HS ist dieser Test aufgrund der Vakuolenbildung durch HS in hLEC nur bedingt anwendbar. Daher war die Kombination mit weiteren Methoden, hier der Fluoreszenzfärbung der Mitochondrien mit MitoTracker® und die Beurteilung unter dem Phasenkontrastmikroskop unentbehrlich.

6. Anhang: Wertetabellen

Unbestrahlte Zellen

$\mu\text{g/ml}$	\bar{x}	N	V80.1	V80.2	V80.3	σ	σ_n
10	6,79	3	19,93	3,62	-3,19	11,88	6,86
20	29,02	3	35,41	28,21	23,43	6,03	3,48
60	-11,18	3	1,51	-13,83	-21,24	11,6	6,7
120	0,47	3	16,9	-13,61	-1,89	15,39	8,89
250	29,22	3	51,72	6,92	29,01	22,41	12,94
O.D. ZK	0,26	3	0,3	0,23	0,25	0,04	0,02
(ln)							
CC ₅₀	> 250						

Bestrahlte Zellen

$\mu\text{g/ml}$	\bar{x}	N	V88.1	V88.2	V88.3	σ	σ_n
60	23,28	3	25,22	26,3	18,32	4,33	2,5
120	13,09	3	10,43	18,37	10,47	4,57	2,64
250	4,93	3	-2,77	10,82	6,75	6,97	4,03
O.D. ZK unbestrahlt	0,53	3				0,09	0,02
O.D. ZK bestrahlt	0,38	3	0,4	0,37	0,37	0,02	0,01
ZS (%)	28,76	3	24,61	30,62	31,05	3,6	2,08

UVB-protective Wirkung (%)

$\mu\text{g/ml}$	\bar{x}	N	V88.1	V88.2	V88.3	σ	σ_n
60	17,54	3	-2,48	14,11	41,00	21,94	12,67
120	54,64	3	57,63	40,03	66,26	13,37	7,72
250	84,73	3	111,26	64,67	78,27	23,96	13,83
(ln)	4,72	3	4,73	5,09	4,35	0,37	0,22
UVB- PC ₅₀	112,68		113,51	163,14	77,26	1,45	1,24

Tabelle 4a: Zytotoxizität (%) von HS Aldrich in unbestrahlten und bestrahlten hLEC sowie UVB-protective Wirkung (%) nach 24-stündiger Exposition. Mittelwerte (\bar{x}) aus den Einzelversuchen, Standardabweichung (σ) und Fehler des Mittelwertes (σ_n). O.D. ZK = Optische Dichte der Zellkontrolle

Unbestrahlte Zellen

$\mu\text{g/ml}$	\bar{x}	N	V80.1	V80.2	V80.3	σ	σ_n
10	15,75	3	32,07	23,78	-8,61	21,49	12,41
20	51,77	3	61,6	50,07	43,64	9,1	5,26
60	45,26	3	45,85	47,15	42,79	2,24	1,29
120	43,45	3	41,35	43,53	45,45	2,05	1,19
250	50,35	3	61,18	56,88	32,97	15,2	8,78
O.D. ZK	0,19	3	0,18	0,18	0,21	0,02	0,01
(ln)	4,95	3	4,33	4,76	5,77	0,74	0,43
CC ₅₀	141,18		75,74	116,32	319,4	2,09	1,53

Bestrahlte Zellen

$\mu\text{g/ml}$	\bar{x}	N	V88.1	V88.2	V88.3	σ	σ_n
60	50,66	3	52,98	45,59	53,42	4,4	2,54
120	37,24	3	41,55	29,44	40,74	6,77	3,91
250	26,23	3	28,59	23,78	26,32	2,4	1,39
O.D. ZK unbestrahlt	1,11	3				0,08	0,02
O.D. ZK bestrahlt	0,34	3	0,34	0,33	0,34	0,01	0,00
ZS (%)	70,04	3	69,82	70,72	69,59	0,59	0,34

UVB-protective Wirkung (%)

$\mu\text{g/ml}$	\bar{x}	N	V88.1	V88.2	V88.3	σ	σ_n
60	27,63	3	24,12	35,54	23,23	6,86	3,96
120	46,78	3	40,5	58,37	41,46	10,05	5,8
250	62,54	3	59,05	66,37	62,18	3,67	2,12
(ln)	4,96	3	5,16	4,64	5,08	0,28	0,16
UVB-PC ₅₀	142,86		174,19	103,74	161,34	1,32	1,18

Tabelle 4b: Zytotoxizität (%) von HS Aldrich in unbestrahlten und bestrahlten hLEC sowie UVB-protective Wirkung (%) nach 48-stündiger Exposition. Mittelwerte (\bar{x}) aus den Einzelversuchen, Standardabweichung (σ) und Fehler des Mittelwertes (σ_n). O.D. ZK = Optische Dichte der Zellkontrolle.

Unbestrahlte Zellen

$\mu\text{g/ml}$	\bar{x}	N	V80.1	V80.2	V80.3	σ	σ_n
10	3,18	3	13,44	-4,61	0,73	9,27	5,35
20	51,18	3	55,05	41,68	56,8	8,27	4,78
60	42,79	3	49,35	27,51	51,51	13,28	7,66
120	57,42	3	62,47	46,13	63,66	9,8	5,66
250	55,9	3	67,85	37,23	62,62	16,38	9,46
O.D. ZK	0,21	3	0,23	0,15	0,24	0,05	0,03
(ln)	4,68	3	3,98	5,92	4,13	1,08	0,62
CC ₅₀	107,26		53,29	372,25	62,21	2,95	1,87

Bestrahlte Zellen

$\mu\text{g/ml}$	\bar{x}	N	V88.1	V88.2	V88.3	σ	σ_n
60	25,21	3	28,07	28,55	19,00	5,38	3,11
120	5,32	3	2,54	6,44	6,99	2,43	1,4
250	-2,55	3	-6,21	0,47	-1,9	3,38	1,95
O.D. ZK unbestrahlt	1,22	3				0,11	0,02
O.D. ZK bestrahlt	0,57	3	0,52	0,62	0,57	0,05	0,03
ZS (%)	53,26	3	57,71	49,05	53,01	4,34	2,5

UVB-protective Wirkung (%)

$\mu\text{g/ml}$	\bar{x}	N	V88.1	V88.2	V88.3	σ	σ_n
60	52,44	3	51,36	41,8	64,16	11,22	6,48
120	89,76	3	95,6	86,87	86,81	5,06	2,92
250	104,46	3	110,75	99,05	103,58	5,9	3,41
(ln)	3,87	3	3,93	4,15	3,54	0,31	0,18
UVB-PC ₅₀	48,12		51,1	63,43	34,38	1,36	1,2

Tabelle 4c: Zytotoxizität (%) von HS Aldrich in unbestrahlten und bestrahlten hLEC sowie UVB-protective Wirkung (%) nach 72-stündiger Exposition. Mittelwerte (\bar{x}) aus den Einzelversuchen, Standardabweichung (σ) und Fehler des Mittelwertes (σ_n). O.D. ZK = Optische Dichte der Zellkontrolle.

Unbestrahlte Zellen

$\mu\text{g/ml}$	\bar{x}	N	V81.1	V81.2	V81.3	σ	σ_n
10	10,72	3	4,58	13,65	13,93	5,32	3,07
20	13,93	3	9,34	13,04	19,43	5,1	2,95
60	-8,57	3	-13,63	-9,97	-2,11	5,89	3,4
120	-18,8	3	-30,53	-24,06	-1,81	15,07	8,7
250	18,85	3	8,5	24,85	23,19	9,00	5,2
O.D. ZK	0,3	3	0,27	0,29	0,33	0,03	0,02
(ln)							
CC ₅₀	> 250						

Bestrahlte Zellen

$\mu\text{g/ml}$	\bar{x}	N	V89.1	V89.2	V89.3	σ	σ_n
60	22,8	3	18,1	27,54	22,75	4,72	2,73
120	10,66	3	8,02	19,12	4,83	7,5	4,33
250	9,43	3	6,62	10,88	10,78	2,43	1,4
O.D. ZK unbestrahlt	0,52	3				0,05	0,01
O.D. ZK bestrahlt	0,3	3	0,31	0,27	0,31	0,02	0,01
ZS (%)	42,51	3	40,72	47,01	39,8	3,93	2,27

UVB-protective Wirkung (%)

$\mu\text{g/ml}$	\bar{x}	N	V89.1	V89.2	V89.3	σ	σ_n
60	46,6	3	55,55	41,41	42,84	7,78	4,49
120	75,83	3	80,29	59,34	87,87	12,78	8,53
250	77,83	3	83,74	76,85	72,9	5,49	3,17
(ln)	4,0	3	3,62	4,43	3,94	0,41	0,24
UVB-PC ₅₀	54,35		37,29	83,99	51,27	1,51	1,27

Tabelle 5a: Zytotoxizität (%) von HS HYKOP in unbestrahlten und bestrahlten hLEC sowie UVB-protective Wirkung (%) nach 24-stündiger Exposition. Mittelwerte (\bar{x}) aus den Einzelversuchen, Standardabweichung (σ) und Fehler des Mittelwertes (σ_n). O.D. ZK = Optische Dichte der Zellkontrolle.

Unbestrahlte Zellen

$\mu\text{g/ml}$	\bar{x}	N	V81.1	V81.2	V81.3	σ	σ_n
10	16,93	3	11,08	22,95	16,77	5,94	3,43
20	30,71	3	22,66	43,34	26,14	11,07	6,39
60	44,09	3	38,07	47,03	47,17	5,22	3,01
120	43,41	3	32,12	54,82	43,28	11,35	6,55
250	52,7	3	51,26	51,33	55,51	2,44	1,41
O.D. ZK	0,25	3	0,25	0,24	0,27	0,01	0,01
(ln)	5,11	3	5,67	4,68	4,99	0,51	0,29
CC ₅₀	166,34		291,1	107,82	146,65	1,66	1,34

Bestrahlte Zellen

$\mu\text{g/ml}$	\bar{x}	N	V89.1	V89.2	V89.3	σ	σ_n
60	43,73	3	42,4	45,89	42,88	1,89	1,09
120	26,98	3	28,08	25,56	27,28	1,29	0,74
250	16,07	3	18,1	10,32	19,79	5,05	2,92
O.D. ZK unbestrahlt	0,97	3				0,05	0,01
O.D. ZK bestrahlt	0,31	3	0,28	0,33	0,34	0,03	0,02
ZS (%)	67,68	3	71,1	66,45	65,48	3,0	1,73

UVB-protective Wirkung (%)

$\mu\text{g/ml}$	\bar{x}	N	V89.1	V89.2	V89.3	σ	σ_n
60	35,27	3	40,36	30,94	34,51	4,76	2,75
120	60,12	3	60,51	61,53	58,33	1,63	0,94
250	76,27	3	74,55	84,47	69,78	7,5	4,33
(ln)	4,55	3	4,45	4,56	4,63	0,09	0,05
UVB-PC ₅₀	94,3		85,47	95,65	102,59	1,1	1,05

Tabelle 5b: Zytotoxizität (%) von HS HYKOP in unbestrahlten und bestrahlten hLEC sowie UVB-protective Wirkung (%) nach 48-stündiger Exposition. Mittelwerte (\bar{x}) aus den Einzelversuchen, Standardabweichung (σ) und Fehler des Mittelwertes (σ_n). O.D. ZK = Optische Dichte der Zellkontrolle.

Unbestrahlte Zellen

$\mu\text{g/ml}$	\bar{x}	N	V81.1	V81.2	V81.3	σ	σ_n
10	4,93	3	-5,89	2,02	18,67	12,54	7,24
20	12,39	3	5,89	12,61	18,67	6,39	3,69
60	38,71	3	37,81	39,22	39,12	0,79	0,45
120	44,81	3	42,19	42,75	49,5	4,07	2,35
250	46,87	3	43,56	45,78	51,27	3,97	2,29
O.D. ZK	0,2	3	0,18	0,2	0,23	0,02	0,01
(ln)	5,34	3	5,45	5,42	5,17	0,15	0,09
CC ₅₀	209,47		231,79	225,51	175,84	1,16	1,09

Bestrahlte Zellen

$\mu\text{g/ml}$	\bar{x}	N	V89.1	V89.2	V89.3	σ	σ_n
60	19,46	3	20,77	21,12	16,46	2,6	1,5
120	7,69	3	9,53	5,18	8,36	2,25	1,3
250	5,2	3	4,7	1,67	9,22	3,8	2,19
O.D. ZK unbestrahlt	1,28	3				0,1	0,03
O.D. ZK bestrahlt	0,55	3	0,55	0,49	0,6	0,06	0,03
ZS (%)	57,16	3	56,78	62,00	52,71	4,65	2,69

UVB-protective Wirkung (%)

$\mu\text{g/ml}$	\bar{x}	N	V89.1	V89.2	V89.3	σ	σ_n
60	66,02	3	63,42	65,88	68,77	2,68	1,55
120	86,34	3	83,22	91,65	84,15	4,62	2,67
250	90,51	3	91,72	97,31	82,52	7,47	4,31
(ln)	2,77	3	3,31	3,2	1,8	0,84	0,48
UVB-PC ₅₀	16,02		27,38	24,63	6,1	2,31	1,62

Tabelle 5c: Zytotoxizität (%) von HS HYKOP in unbestrahlten und bestrahlten hLEC sowie UVB-protective Wirkung (%) nach 72-stündiger Exposition. Mittelwerte (\bar{x}) aus den Einzelversuchen, Standardabweichung (σ) und Fehler des Mittelwertes (σ_n). O.D. ZK = Optische Dichte der Zellkontrolle.

Unbestrahlte Zellen

$\mu\text{g/ml}$	\bar{x}	N	V87.1	V87.2	V87.3	V87.4	σ	σ_n
10	-6,93	4	-11,96	-11,15	-5,06	0,46	5,81	2,9
60	-8,55	4	-8,63	-8,37	-12,77	-4,45	3,4	1,7
120	-7,42	4	-7,15	-10,52	-14,16	2,17	7,0	3,5
250	-1,78	4	-8,38	-5,7	-3,41	10,39	8,36	4,18
500	7,74	4	2,47	5,2	2,65	20,66	8,7	4,35
O.D. ZK	0,27	4	0,27	0,26	0,26	0,29	0,01	0,01
(ln)								
CC ₅₀	>250							

Bestrahlte Zellen

$\mu\text{g/ml}$	\bar{x}	N	V87.1	V87.2	V87.3	σ	σ_n
60	11,74	3	17,7	7,68	9,84	5,28	3,05
120	5,46	3	7,82	3,27	5,29	2,28	1,32
250	4,39	3	1,54	6,02	5,62	2,48	1,43
O.D. ZK unbestrahlt	0,68	3				0,03	0,01
O.D. ZK bestrahlt	0,4	3	0,39	0,39	0,42	0,02	0,01
ZS (%)	41,46	3	42,87	42,69	38,83	2,28	1,32

UVB-protective Wirkung (%)

$\mu\text{g/ml}$	\bar{x}	N	V89.1	V89.2	V89.3	σ	σ_n
60	71,79	3	58,7	82,02	74,65	11,92	6,88
120	86,83	3	81,75	92,35	86,38	5,31	3,07
250	89,28	3	96,41	85,89	85,53	6,18	3,57
(ln)							
UVB-PC ₅₀	<60						

Tabelle 6a: Zytotoxizität (%) von PABA in unbestrahlten und bestrahlten hLEC sowie UVB-protective Wirkung (%) nach 24-stündiger Exposition. Mittelwerte (\bar{x}) aus den Einzelversuchen, Standardabweichung (σ) und Fehler des Mittelwertes (σ_n). O.D. ZK = Optische Dichte der Zellkontrolle.

Unbestrahlte Zellen

$\mu\text{g/ml}$	\bar{x}	N	V86.1	V86.2	V83.1	V87.1	V87.2	σ	σ_n
10	-1,32	5	7,25	-7,94	9,59	-12,09	-3,39	9,44	4,22
60	-3,7	5	0,08	-1,37	10,74	-19,02	-8,94	11,07	4,95
120	-3,47	5	8,18	-8,79	5,01	-15,63	-6,11	9,88	4,42
250	-4,56	5	2,53	-4,01	10,48	-23,1	-8,71	12,63	5,65
500	3,17	5	12,14	-0,6	10,1	-6,39	0,57	7,76	3,47
O.D. ZK	0,24	5	0,3	0,29	0,2	0,18	0,22	0,05	0,02
(ln)									
CC ₅₀	>250								

Bestrahlte Zellen

$\mu\text{g/ml}$	\bar{x}	N	V87.1	V87.2	V87.3	σ	σ_n
60	14,48	3	1,57	19,03	22,83	11,34	6,55
120	-2,5	3	-8,28	-6,75	7,51	8,71	5,03
250	1,65	3	-0,79	5,22	0,52	3,16	1,82
O.D. ZK unbestrahlt	1,11	3				0,07	0,02
O.D. ZK bestrahlt	0,48	3	0,55	0,44	0,45	0,06	0,03
ZS (%)	56,87	3	50,73	60,36	59,53	5,34	3,08

UVB-protective Wirkung (%)

$\mu\text{g/ml}$	\bar{x}	N	V89.1	V89.2	V89.3	σ	σ_n
60	75,67	3	96,9	68,47	61,64	18,7	10,8
120	104,96	3	116,32	111,18	87,38	15,44	8,92
250	97,35	3	101,55	91,35	99,13	5,33	3,08
(ln)							
UVB-PC ₅₀	<60						

Tabelle 6b: Zytotoxizität (%) von PABA in unbestrahlten und bestrahlten hLEC sowie UVB-protective Wirkung (%) nach 48-stündiger Exposition. Mittelwerte (\bar{x}) aus den Einzelversuchen, Standardabweichung (σ) und Fehler des Mittelwertes (σ_n). O.D. ZK = Optische Dichte der Zellkontrolle.

Unbestrahlte Zellen

$\mu\text{g/ml}$	\bar{x}	N	V86.1	V86.2	V86.3	V87.1	V87.2	σ	σ_n
10	-12,77	4	-6,45	-2,07		-25,83	-16,73	10,66	5,33
60	-18,13	4	-14,03	-0,99		-28,67	-28,85	13,37	6,69
120	-12,59	5	-12,04	-0,99	2,71	-29,00	-23,65	13,79	6,17
250	-16,1	5	-5,97	-5,43	8,32	-38,17	-39,65	21,42	9,58
500	-13,15	5	-4,27	-0,59	-10,65	-22,17	-28,08	11,69	5,23
O.D. ZK	0,21	5	0,26	0,25	0,27	0,15	0,13	0,07	0,03
(ln)									
CC ₅₀	>250								

Bestrahlte Zellen

$\mu\text{g/ml}$	\bar{x}	N	V87.1	V87.2	V87.3	σ	σ_n
60	15,77	3	19,28	13,55	14,48	3,08	1,78
120	5,44	3	5,94	4,34	6,04	0,95	0,55
250	11,37	3	15,03	7,92	11,16	3,56	2,06
O.D. ZK unbestrahlt	1,5	3				0,04	0,01
O.D. ZK bestrahlt	0,69	3	0,73	0,74	0,6	0,08	0,04
ZS (%)	54,1	3	51,54	50,82	59,93	5,06	2,92

UVB-protective Wirkung (%)

$\mu\text{g/ml}$	\bar{x}	N	V89.1	V89.2	V89.3	σ	σ_n
60	70,59	3	62,59	73,34	75,84	7,04	4,07
120	89,95	3	88,48	91,46	89,93	1,49	0,86
250	78,88	3	70,84	84,43	81,39	7,13	4,12
(ln)							
UVB-PC ₅₀	<60						

Tabelle 6c: Zytotoxizität (%) von PABA in unbestrahlten und bestrahlten hLEC sowie UVB-protective Wirkung (%) nach 72-stündiger Exposition. Mittelwerte (\bar{x}) aus den Einzelversuchen, Standardabweichung (σ) und Fehler des Mittelwertes (σ_n). O.D. ZK = Optische Dichte der Zellkontrolle.

24 h

s	\bar{x}	N	V84.1	V84.2	V84.3	V92.1	V92.2	V92.3	σ	σ_n
10	1,24	6	-3,64	-19,93	-8,99	15,46	13,05	22,49	14,31	5,85
20	36,34	3				35,91	36,05	37,06	0,63	0,36
40	44,35	6	53,22	49,92	45,93	44,44	38,52	34,08	7,09	2,90
O.D. ZK	0,49	6	0,45 N=8	0,45 N=8	0,45 N=6	0,52 N=6	0,52 N=6	0,52 N=5	0,04	0,02

48 h

s	\bar{x}	N	V84.1	V84.2	V84.3	V92.1	V92.2	V92.3	σ	σ_n
10	26,17	6	36,33	36,57	32,63	15,35	15,05	21,08	10,19	4,16
20	77,81	3	82,64	79,06	71,72				5,56	3,21
40	91,49	3	93,78	91,71	88,97				2,41	1,39
O.D. ZK	1,06	6	1,25 N=8	1,25 N=8	1,25 N=8	0,8 N=6	0,8 N=6	0,8 N=5	0,25	0,1

72 h

s	\bar{x}	N	V84.1	V84.2	V84.3	V92.1	V92.2	V92.3	σ	σ_n
10	14,45	6	4,41	9,76	23,1	14,89	18,86	15,7	6,61	2,7
20	62,76	3				60,31	66,04	61,93	2,95	1,71
40	92,72	6	90,8	92,27	95,82	92,08	93,12	92,25	1,69	0,69
O.D. ZK	1,33	6	1,41 N=8	1,41 N=8	1,41 N=8	1,24 N=6	1,24 N=5	1,24 N=5	0,09	0,04

Tabelle 7: Zytotoxizität (%) unterschiedlicher Strahlendosen (10, 20 und 40 s) auf hLEC nach 24, 48 und 72-stündiger Postexpositionszeit. Mittelwerte (\bar{x}) aus den Einzelversuchen, Standardabweichung (σ) und Fehler des Mittelwertes (σ_n). O.D. ZK = Optische Dichte der Zellkontrolle.

9. Literaturverzeichnis

- Abbas** AK, Lichtman AH, Apoptosis in Lymphocytes. In: Abbas AK, Lichtman AH, eds. Cellular and Molecular Immunology, 5. Edition. Philadelphia: Elsevier Saunders, 2005: 227-231
- Amchenkova** AA, Bakeeva LE, Chentsov YS. Coupling membranes as energy-transmitting cables. I. Filamentous mitochondria in fibroblasts and mitochondrial clusters in cardiomyocytes. J Cell Biol 1988; 107: 481-495
- Andley** UP, Lewis RM, Reddan JR, Kochevar IE. Action Spectrum for Cytotoxicity in the UVA- and UVB Wavelength Region in Cultured Lens Epithelial Cells. Invest Ophthalmol 1994; 35: 367-373
- Ayala** MN, Michael R, Söderberg PG. Influence of exposure time for UV radiation-induced cataract. Invest Ophthalmol Vis Sci 2000; 41: 3539-3543
- Ayala** MN, Söderberg PG. Vitamin E can protect against ultraviolet induced cataract in the albino rats. Ophthal Res 2004; 36: 264-269
- Ayala** MN, Strid H, Jacobsson U, Söderberg PG. p53 Expression and Apoptosis in the Lens after Ultraviolet Radiation Exposure. Invest Ophthalmol Vis Sci 2007; 48: 4187-4191
- Bachem** A. Ophthalmic ultraviolet action spectra. Am J Ophthalmol 1956; 41: 969-975
- Bantsev** V, Moran KL, Dixon DG, Trevithick JR, Sivak JG. Optical properties, mitochondria and sutures of lenses of fishes: a comparative study of nine species. Can J Zool 2004; 82: 86-93
- Bantsev** V, Sivak JG. Confocal laser scanning microscopy imaging of dynamic TMRE movement in the mitochondria of epithelial and superficial cortical fiber cells of bovine lenses. Molecular Vision 2005; 11: 518-523
- Bantsev** V, Youn HY. Mitochondrial "movement" and lens optics following oxidative stress from UV-B irradiation: cultured bovine lenses and human retinal pigment epithelial cells (ARPE-19) as examples. Ann N Y Acad Sc. 2006; 1091: 17-33
- Bargoil** S, Erdman L. Safe tan. An oxymoron. Cancer Nurs 1993; 16: 139-144
- Bickel-Sandkötter** S, 2009: Elektromagnetische Spektrum und sichtbares Licht. <http://www.edyounet.de/biologie/downloads/Fotosynthese/dateien/licht/licht.html> (Zugriffsdatum: 08.10.2009)
- Bitton** G, Henis Y, Lahav N. Effect of Several Clay Minerals and Humic Acid on the Survival of Klebsiella aerogenes Exposed to Ultraviolet Irradiation. American Society for Microbiology 1972; 23: 870-874
- Boldogh** IR, Pon LA. Mitochondria on the move. Trends in Cell Biology 2007; 17: 502-510
- Borenfreund** E, Puerner JA. A simple quantitative procedure using monolayer cultures for cytotoxicity assays (HTD/NR-90). Journal of Tissue Culture Methods 1984; 9: 7-9

- Borenfreund E, Puerner JA.** Toxicity determined in vitro by morphological alterations and neutral red absorption. *Toxicol Lett* 1985; 24: 119-124
- Breadsell RO, Wegener A, Breipohl W.** UV-B radiation-induced cataract in the royal college of Surgeons rat. *Ophthalmic Res* 1994; 26: 848-849
- Brown KS.** The ozone layer. Burnt by the sun down under. *Science* 1999; 285: 1647-1649
- Burniston JG, Chester N, Clark WA, Tan LB, Goldspink DF.** Dose-dependent apoptotic and necrotic myocyte death induced by the β_2 -adrenergic receptor agonist, clenbuterol. *Muscle Nerve* 2005; 32: 767-774
- Burton M, Fergusson E, Hart A, Knight K, Lary D, Liu C.** The prevalence of cataract in two villages of northern Pakistan with different levels of ultraviolet radiation. *Eye* 1997; 11: 95-101
- Chitchumroonchokchai C, Bomser JA, Glamm JE, Failla ML.** Xanthophylls and α -Tocopherol Decrease UVB-Induced Lipid Peroxidation and Stress Signaling in Human Lens Epithelial Cells. *Am Soc Nutr Sci* 2004; 134: 3225-3232
- Cheng ML, Ho HY, Huang YW, Lu FJ, Chiu DTY.** Humic Acid Induces Oxidative DNA Damage, Growth Retardation, and Apoptosis in Human Primary Fibroblasts. *Exp Biol Med* 2003; 228: 413-423
- Choudry GG.** Humic substances: Structural, photophysical, photochemical and free radical aspects and interactions with environmental chemicals. New York, London, Paris, Montreux, Tokyo: Gordon and Breach Science Publishers 1984: 3-53, 57-91, 143-169
- Christiaens F, Chardon A, Fourtanier A, Frederik J.** Standard Ultraviolet Daylight for non extreme exposure conditions. *Photochem Photobiol* 2005; 5: 1-18
- Chylack L.** Surgical Anatomy, Biochemistry, Pathogenesis, and Classification of Cataracts. In: Steinert R, ed. *Cataract Surgery*. Philadelphia: Saunders, 2004: 9-17
- CIE.** Solar spectrum irradiance. Wien: Commission International de l'Eclairage, 1989
- CIE.** 134/1: TC 6-26 report: Standardization of the terms UV-A1, UV-A2, and UV-B. Wien: Commission International de l'Eclairage, 1999
- Coolesy RC, Gaitan E, Lindsay RJ, Hill JR, Keely K.** Humic substances, a possible source of environmental goitrogens. *Org Geochem* 1985; 8: 77-80
- Daniels F, Van der Leun J, Johnson B.** Sunburn. *Sci Am* 1968; 38-46
- Darr D, Fridovich I.** Free radicals in cutaneous biology. *J Invest Dermatol* 1994; 102: 671-675
- Darvay A, White IR, Rycroft RJ, Jones AB, Hawk JL, McFadden JP.** Photoallergic contact dermatitis is uncommon. *Br J Dermatol* 2001; 145: 597-601

- Davies** CM, Evison LM. Sunlight and the survival of enteric bacteria in natural waters. *J Appl Bacteriol* 1991; 70: 265-274
- Delcourt** C, Carrière I, Ponton-Sanchez A, Lacroux A, Caovacho MJ, Papoz L. Light exposure and the risk of cortical, nuclear and posterior subcapsular cataracts: Pathologies Oculaires Liees à l'Age (POLA) study. *Arch Ophthalmol* 2000; 118: 385-392
- Denizot** F, Lang R. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival: Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *Journal of Immunological Methods* 1986; 89: 271-277
- Desagher** S, Martinou J-C. Mitochondria as the control point of apoptosis. *Trends Cell Biol* 2000; 10: 369-377
- Eldred** JA, Sanderson J, Wormstone M, Reddan JR, Duncan G. Stress-induced ATP release from growth modulation of human and retinal pigment epithelial cells. *Biochem Soc Trans* 2003; 31: 1213-1215
- Elwood** J, Jopson J. Melanoma and sun exposure: an overview of published studies. *Int J Cancer* 1997; 73: 198-203
- Facino** RM, Carini M, Aldini G, Saibene L, Pietta P, Mauri P. Echinacoide and caffeoyl conjugates protect collagen from free radical-induced degradation: a potential use of Echinacea extracts in the prevention of skin photodamage. *Planta Med* 1995; 61: 510-514
- Frank** S, Gaume B, Bergmann-Leitner ES, Leitner WW, Robert EG, Catez F, Smith CL, Youle RJ. The Role of Dynamin-Related Protein 1, a Mediator of Mitochondrial Fission, in Apoptosis. *Dev Cell* 2001; 1: 515-525
- Frey** TG, Mannella CA. The internal structure of mitochondria. *Trends Biochem Sci* 2000; 25: 319-24
- Gao** W, Pu Y, Luo KQ, Chang DC. Temporal relationship between cytochrome c release and mitochondrial swelling during UV-induced apoptosis in living HeLa cells. *J Cell Sci* 2001; 114: 2855-2862
- Ghio** AJ, Quigley DR. Complexion of iron by humic-like substances in lung tissues: role in coalworkers' pneumoconiosis. *Amer J Physiol* 1994; 267: 173-179
- Godar** D, Wengraitis S, Shreffler J, Sliney D. UV Doses of Americans. *Photochem Photobiol* 2001; 73: 621-629
- Hany** J, Nagel R. Nachweis von UV-Filtersubstanzen in Muttermilch. *Deutsche Lebensmittel-Rundschau* 1995; 91: 341-345
- Harding** CV, Reddan JR, Unakar NJ, Bagchi M. The control of cell division in the ocular lens. *Int Rev Cytol* 1971; 31: 215-300
- Hayashi** LC, Tamiya N, Yano E. Correlation between UVB irradiation and the proportion of cataract: An epidemiological study based on a nationwide patient survey in Japan. *Ind Health* 1998; 36: 354-360

- Heck** DE, Vetrano AM, Mariano TM, Laskin JD. UVB light stimulates production of reactive oxygen species: unexpected role for catalase. *J Biol Chem* 2003; 278: 22432-22436
- Hedge** KR, Varma SD. Protective effect of ascorbate against oxidative stress in the mouse lens. *Biochim Biophys Acta* 2004; 1670: 12-18
- Helbig** B, Klöcking R. Darstellung und Charakterisierung von Huminsäure-Modellsubstanzen. *Z Physiother* 1983; 33: 31-37
- Henics** T, Weatley NW. Cytoplasmatic vacuolation, adaption of cell death: A view on new perspectives and features. *Biology of the cell* 1999; 91: 485-498
- Hseu** YC, Huang HW, Wang SY, Chen HY, Lu FJ, Gau RJ, Yang HL. Humic acid induces apoptosis in human endothelial cells. *Toxicol Appl Pharmacol* 2002; 182: 34-43
- Hübner** KV. Einfluß von natürlichen Huminsäuren und Huminsäure-ähnlichen Polymeren auf die zellschädigende Wirkung einer UVB-Bestrahlung. Dissertation, Medizinische Fakultät der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn, 2004
- Iwig** M, Glaesser D, Luther M, Struck HG. Humane Linsenzellen in der Kultur. I. Gewinnung von adulten Linsenepithelzellen aus Linsenkapselpräparaten nach Kataraktoperationen und von fetalen Linsenzellen durch Reaktivierung kernhaltiger Faserzellen. *Klin Monatsbl Augenheilkd* 2001 a; 218: 102-110
- Iwig** M, Glaesser D, Struck HG. Humane Linsenzellen in der Kultur. II. Charakterisierung von etablierten Linsenzelllinien und der Testung auf Eignung für Zytotoxizitätsuntersuchungen. *Klin Monatsbl Augenheilkd* 2001 b; 218: 251-261
- Jabbar** SAB, Twentyman PR, Watson JV. The MTT assay underestimates the growth inhibitory effects of interferons. *British Journal of Cancer* 1989; 60: 523-528
- Jin** GH, Liu Y, Jin SZ, Liu XD, Liu SZ. UVB induced oxidative stress in human keratinocytes and protective effect of antioxidant agents. *Radiat Environ Biophys* 2007; 46: 61-68
- Jooné** GK, Dekker J, van Rensburg CE. Investigation of the immunostimulating properties of oxihumate. *Z Naturforsch* 2003; 58: 263-267
- Jones** C, Huberman E, Cunningham M, Peak M. Mutagenesis and cytotoxicity in human epithelial cells by far- and near-ultraviolet radiations: action spectrum. *Radiat Res* 1987; 110: 244-254
- Klöcking** R, Helbig B, Schötz G, Schacke M, Wutzler P. Anti-HSV-1 activity of synthetic humic acid-like polymers derived from p-diphenolic starting compounds. *Antivir Chem Chemother*. 2002; 13: 241-249
- Klöcking** R, Hofmann R, Mücke D. Tierexperimentelle Untersuchung zur entzündungshemmenden Wirkung von Humaten. *Drug Res* 1968; 18: 941-942
- Knowland** J, McKenzie A, McHugh PJ, Cridland NA. Sunlight-induced mutagenicity of common sunscreen ingredient. *FEBS Lett* 1993; 324: 309-313

- Kodama H.** Antitumor Effect of Humus Extract on Murine Transplantable L1210 Leukemia. *J Vet Med Sci* 2007; 69: 1069-1071
- Kühn S.** Untersuchungen zum Mechanismus der UV-B-protectiven Wirkung von Huminsäuren in vitro. Dissertation, Mathematisch-Naturwissenschaftlich-Technische Fakultät (mathematischnaturwissenschaftlicher Bereich) der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, 2005
- Kühnert M, Bartels KP, Kröll S, Lange N.** Huminsäurehaltige Tierarzneimittel in Therapie und Prophylaxe von gastrointestinalen Erkrankungen von Hund und Katze. *Monatsh Vet Med* 1991; 46: 4-8
- Kühnert M, Fuchs V, Golbs S.** Pharmakologisch-toxikologische Eigenschaften von Huminsäuren und ihre Wirkungsprofile für eine veterinärmedizinische Therapie. *Dtsch Tierärztl Wschr* 1989; 96: 3-10
- Lafond G, Roy PE, Grenier R.** Lens opacities appearing during therapy with methoxsalen and long wavelength ultraviolet radiation. *Can J Ophthalmol* 1984; 19: 173-175
- Lange N, Kühnert M, Haase A, Hoke H, Seubert B.** The resorptive behavior of a low-molecular weight humic substance after a single oral administration to the rat. *Dtsch Tierärztl Wochenschr* 1996; 103: 134-135
- Lautenschläger S, Wulf HC, Pittelkow MR.** Photoprotection. *Lancet* 2007; 370: 528-537
- Lee YJ, Jeong SY, Karbowski M, Smith CL, Youle RJ.** Roles of the Mammalian Mitochondrial Fission and Fusion Mediators Fis1, Drp1, and Opa1 in Apoptosis. *Molecular Biology of the Cell* 2004; 15: 5001-5011
- Lerman S.** Human ultraviolet radiation cataracts. *Ophthalmic Res* 1980; 12: 303-314
- Leske MC, Chylack LT Jr, Wu SY.** The lens opacities case-control study. *Arch Ophthalmol* 1991; 109: 244-251
- Li WC, Kuszak JR, Dunn K, Wand RR, Ma W, Wang GM, Spector A, Leib M, Cotliar AM, Weiss M, Epsy J, Howard G, Farris RL, Auran J, Donn A, Hofeld A, Mackay C, Merriam J, Mittle R, Smith TR.** Lens epithelial cell apoptosis appears to be a common cellular basis for non-congenital cataract development in humans and animals. *J Cell Biol* 1995; 130: 169-181
- Li WC, Spector A.** Lens epithelial cell apoptosis is an early event in the development of UVB-induced cataract. *Free Radic Biol Med* 1996; 20: 301-311
- Longstreth J.** Health risks. *Photochem Photobiol B* 1998; 46: 20-39
- Lou M.** Redox regulation in the lens. *Prog Retinal Eye Res* 2003; 22: 657-682
- Macho A, Decaudin D, Castedo M, Hisch T, Susin SA, Zamzami N, Kroemer G.** Chloromethyl-X-Rosamine is an aldehyde-fixable potential-sensitive fluorochrome for the detection of early apoptosis. *Cytometry* 1996; 25: 333-340
- Majno G, Joris I.** Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. *Am J Pathol* 1995; 146: 3-15

- McKenzie R.** Increased summertime UV radiation in New Zealand in response to ozone loss. *Science* 1999; 285: 1709-1711
- Meerbach A,** Neyts J, Balzarini J, Helbig B, De Clerq E, Wutzler P. In vitro activity of polyhydroxycarboxylates against herpesviruses and HIV. *Antiviral Chem Chemother* 2001; 12: 337-345
- Merriam J,** Löfgren S, Michael R, Söderberg PG, Dillon J, Zheng L, et al. An Action Spectrum for UV-B Radiation in the Rat Lens. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000; 41: 2642-2647
- Meyer LM,** Söderberg P, Dong X, Wegener A, UVR-B induced cataract development in C57 mice. *Exp Eye Res* 2005; 81: 389-394
- Michael R.** Development and repair of cataract induced by ultraviolet radiation. *Ophthalmic Res* 2000; 1: 1-44
- Michael R,** Vrensen G, van Marle J, Gan L, Söderberg PG. Apoptosis in the rat lens after in vivo threshold dose ultraviolet irradiation. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1998; 13: 2681-2697
- Minamikawa T,** Sriratana A, Williams DA, Bowser DN, Hill JS, Nagley P. Chloromethyl-X-rosamine (MitoTracker Red) photosensitises mitochondria and induces apoptosis in intact human cells. *Journal of Cell Science* 1999; 122: 2419-2430
- Mitchnick MA,** Fairhurst D, Pinnell SR. Microfine zinc oxide (Z-cote) as a photostable UVA/UVB sunblock agent. *J Am Acad Dermatol* 1999; 40: 85-90
- Mosmann T.** Rapid colorimetric assay for cellular growth and survivals: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journals of Immunological Methods* 1983; 65: 55-63
- Muela A,** Garcia-Bringas JM, Arana I, Barcina I. Humic Materials Offer Photoprotective Effect to *Escherichia coli* Exposed to Damaging Luminous Radiation. *Microb Ecol* 2000; 40: 336-344
- Müller-Breitenkamp U,** Hockwin O, Siekmann H, Dragomirescu V. Ultraviolet radiation as cataract risk factor: A case report. *Dev Ophthalmol* 1997; 27: 76-80
- Nagtegaal M,** Ternes TA, Baumann W, Nagel R. UV-Filtersubstanzen in Wasser und Fischen. *UWSF-Z Umweltchem Ökotox* 1997; 9: 79-86
- Nardini M,** Leonardi F, Scaccini C, Virgili F. Modulation of ceramide-induced NF-kappaB binding activity and apoptotic response by caffeic acid in U937 cells: comparison with other antioxidants. *Free Radic Biol Med* 2001; 30: 722-733
- Nardini M,** Pisu P, Gentili V, Natella F, Di Felice M, Piccolella E, Scaccini C. Effect of caffeic acid on tert-butyl hydroperoxid-induced oxidative stress in U937. *Free Radic Biol Med* 1998; 25: 1098-1105
- Nemes Z,** Dietz R, Luth JB, Gomba S, Hackenthal F, Gross F. The pharmacological relevance of vital staining with neutral red. *Experientia* 1979; 35: 1475-1476

- Ohkuma S**, Poole B. Cytoplasmic vacuolation of mouse peritoneal macrophages and the uptake into lysosomes of weakly basic substances. *Journal of Cell Biology* 1981; 90: 656-664
- Okuno T**. Ultraviolet Action Spectrum for Cell Killing in a Human Lens Epithelial Cell Line. *Industrial Health* 2007; 47: 137-142
- Olivier P**, Testard P, Marzin D, Abbott D. Effect of high polyol concentrations on neutral red absorption assay and tetrazolinum-MTT test of rat hepatocytes in primary culture. *Toxicology in Vitro* 1995; 9: 133-138
- Papaconstantinou J**. Molecular aspects of lens cell differentiation. *Science* 1969; 156: 338-346
- Pendergrass W**, Wolf N, Poot M. Efficacy of MitoTracker Green™ and CMXRosamine to Measure Changes in Mitochondrial Membrane Potential in Living Cells and Tissues. *Cytometry* 2004; 61: 162-169
- Piatigorsky J**. Lens differentiation in vertebrates. A review of cellular and molecular features. *Differentiation* 1981; 19: 134-153
- Pitts DG**, Cullen AP, Hacker PD. Ocular effects of ultraviolet radiation from 295 to 365 nm. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1977; 16: 932-939
- Pitts DG**. Ocular effects of near ultraviolet radiation: literature review. *Am J Optom Physiol Opt* 1977; 54: 542-549
- Pitts D**. The electromagnetic spectrum. In: Pitts D, Kleinstein R, eds. *Environmental Vision*. Oxford: Butterworth-Heinemann, 1993: 87-128
- Poot M**, Pierce RH. Detection of changes in mitochondrial function during apoptosis by simultaneous staining with multiple fluorescent dyes and correlated multiparameter flow cytometry. *Cytometry* 1999; 38: 311-317
- Pörschmann J**, Górecki T, Helbig B, Klöcking R. Chemische Charakterisierung pharmakologisch wirksamer synthetischer Huminstoffe. In: Klöcking R, Klöcking HP, eds. *Torfpräparate in der Medizin, Veterinärmedizin und Körperpflege*. Sitzungsberichte, Mathematisch-Naturwissenschaftliche Klasse, Erfurt: 2003
- Remmler M**, Georgi A, Kopinke FD. Evaluation of matrix-assisted laser desorption/ionization (MALDI) time-of-flight (TOF) mass spectrometry as a method for the determination of the molecular mass distribution of humic acid. *Eur J Mass Spectrom* 1995; 403-407
- Riddell RJ**, Clothier RH, Balls M. An evaluation of three in vitro cytotoxicity assays. *Food Chem Toxicol*. 1986; 24: 469-471
- Riede UN**, Jonas I, Kirn B, Usener UH, Kreutz W, Schlickewey W. Collagen stabilization induced by natural humic substances. *Arch Orthop Trauma Surg* 1992; 111: 259-264
- Riede UN**. Strahlenfolgekrankheiten. In: Riede UN, Köhler G, Orłowska-Volk, Schwarzkop G, eds. *Taschenatlas der allgemeinen Pathologie*. Stuttgart – New York: Thieme, 1998: 150

- Roberts JE.** Screening for ocular phototoxicity. *Int J Toxicol* 2002; 21: 491-500
- Sachsenweger M.** Lens cristallina (Linse). In: Sachsenweger M, Klauß V, Nasemann J, Ugi I, eds. *Augenheilkunde*. Stuttgart – New York: Thieme Duale Reihe, 2003: 146-171
- Sachsenweger M.** Keratitis dendritica (Herpes-simplex-Virus). In: Sachsenweger M, Klauß V, Nasemann J, Ugi I, eds. *Augenheilkunde*. Stuttgart – New York: Thieme Duale Reihe, 2003: 119
- Saija A, Tomaino A, Lo Cascio R, Trombetta D, Protegente A, De Pasquale A, Uccella N, Bonina F.** Ferulic and caffeic acids as potential protective agents against photooxidative skin damage. *J Sci Food Agric* 1999; 79: 476-480
- Saija A, Tomaino A, Trombetta D, De Pasquale A, Uccella N, Barbuzzi T, Paolino D, Bonina F.** In vitro and in vivo evaluation of caffeic and ferulic acids as topical photoprotective agents. *Int J Pharm* 2000; 199: 39-47
- Schewe C, Klöcking R, Helbig B, Schewe T.** Lipoxygenase-inhibitory action of antiviral polymeric oxidation products of polyphenols. *Biomed Biochim Acta* 1991; 3: 299-305
- Schlickewey W, Riede UN, Yu J, Ziechmann W, Kuner EH, Seubert B.** Influence of humate on calcium hydroxyapatite implants. *Arch Orthop Traum Surg* 1993; 116: 275-279
- Schlumpf M, Cotton B, Conscience M, Haller V, Steinmann B, Lichtensteiger W.** In Vitro and in Vivo Estrogenicity of UV Screens. *Environ Health Perspect* 2001; 109: 239-244
- Schneider J, Weis R, Männer C, Kary B, Werner A, Seubert BJ, Riede UN.** Inhibition of HIV-1 in cell culture by synthetic humate analogues derived from hydroquinone: mechanism of inhibition. *Virology* 1996; 218: 389-395
- Schultz H.** Untersuchung über die viricide Wirkungsweise der Huminsäuren im Torfmüll. *Dtsch Tierärztl Wochenschr* 1965; 72: 294-297
- Setlow RB.** The wavelength in sunlight effective in producing skin cancer: A theoretical analysis. *Proc Nat Acad Sci USA* 1974; 71: 3363-3366
- Sliney DH.** Physical factors in carcinogenesis: Ambient ultraviolet radiation and temperature. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1986; 27: 781-790
- Sliney DH.** Epidemiological studies of sunlight and cataract: the critical factor of ultraviolet exposure geometry. *Ophthalmic Epidemiol* 1994; 1: 107-119
- Sliney DH.** How light reaches the eye and its components. *Int J Toxicol* 2002; 21: 501-509
- Söderberg PG.** Acute cataract in the rat after exposure to radiation in the 300 nm wavelength region. A study of the macro-, micro- and ultrastructure. *Acta Ophthalmol* 1988; 66: 141-152
- Spector A.** Oxidative stress-induced cataract: mechanism of action. *FASEB J* 1995; 9: 1173-1182

Stevenson FJ. Geochemistry of soil humic substances. In: Aiken GR, McKnight DM, Wershaw RL, Maccarthy P, eds. Humic Substances in Soil, Sediment and Water. New York: John Wiley & Sons, 1985: 13–52

The Italian-American Cataract study Group. Risk factors for age-related cortical, nuclear, and posterior subcapsular cataract. *Am J Epidemiol* 1991; 133: 541-552

Urbach F. Incidence of non-melanoma skin cancer. *Dermatol Clin* 1991; 9: 751-755

Van Rensburg CE, Dekker J, Weis R, Smith TI, Janse van Rensburg E, Schneider J. Investigation of the anti-HIV properties of oxihumate. *Chemotherapy* 2002; 48: 138-143

Vink A, Yarosh D, Kripke M. Chromophore for UV-induced immunosuppression: DNA. *Photochem Photobiol* 1996; 63: 383-386

Vistica D, Skehan P, Scudiero D, Monks A, Pittman A, Boyd R. Tetrazolium-based assays for cellular viability: a critical examination of selected parameters affecting formazan production. *Cancer Research* 1991; 51: 2515-2520

Wallace DC, Brown MD, Melov S, Graham B, Lott M. Mitochondrial biology, degenerative diseases and aging. *Biofactors* 1998; 7: 187-190

Wang GS, Liao CH, Wu FJ. Photodegradation of humic acids in the presence of hydrogen peroxide. *Chemosphere* 2001; 42: 379-387

Wang RH, Dillon J, Reme C, Whitt R, Roberts JE. The potential ocular phototoxicity of antidepressant drugs. *Lens Eye Toxic Res* 1992; 9: 483-491

Wegener AR. In vivo studies on the effect of UV-radiation on the eye lens in animals. *Doc Ophthalmol* 1994; 88: 221-232

World Health Organization. UV sources. In: Ultraviolet radiation. Environmental Health Criteria. Geneva : World Health Organization 1994; 160: 26-42

Widmark J. Über die Durchlässigkeit der Augenmedien für ultraviolette Strahlen. Stockholm: Beiträge zur Ophthalmologie 1891; 460-502

Widmark J. Über den Einfluss des Lichtes auf die Linse. In: Widmark J, ed. Mitteilung aus der Augenklinik des carolinischen Medico-Chirurgischen Instituts in Stockholm. Jena: Verlag von Gustav Fischer, 1901: 135-149

Wikonkai N, Brash D. Ultraviolet radiation induced signature mutations in photocarcinogenesis. *J Investig Dermatol Symp Proc* 1999; 4: 6-10

Worgul BV, Merriam GR, Medvedovsky C. Cortical cataract development: An expression of primary damage to the lens epithelium. *Lens Eye Tox Res.* 1989; 6: 559-571

Wride MA. Cellular and molecular features of lens differentiation: a review of recent advances. *Differentiation* 1996; 61: 77-93

Wyllie A.H. Cell death - apoptosis and necrosis. In: *Apoptosis and Cell Proliferation*, 3. Aufl., Mannheim: Roche Applied Science, 2005: 2

Yang ML, Lee Y, Huang TS, Lu FJ. Humic acid extracted from Blackfoot diseased-endemic well water induces adipocyte differentiation of C3H10T1/2 fibroblast cells: a possible mechanism leading to atherosclerotic-like plaque in Blackfoot disease. *Arch Toxicol* 2002; 76: 48-54

Yang ML, Hseu YC, Hseu YT, Lu FJ, Lin E, Lai JS. Humic acid induces apoptosis in human premyelocytic leukemia HL-60 cells. *Life Sci* 2004; 75: 1817-1831

Yaar M, Gilchrist B. Aging and Photoaging: Postulated mechanisms and effectors. *J Investig Dermatol Symp Proc* 1998; 3: 47-51

Zaucke F, Zöltzer H, Krug HF. Dose-dependent induction of apoptosis or necrosis in human cells by organotin compounds. *Fresenius J Anal Chem* 1998; 361: 386-392

Zhang AY, Elmets CA, 2009: Drug-induced photosensitivity. <http://www.emedicine.com/derm/topic108.htm> (Zugriffsdatum: 20.08.2009)

Zigman S. Photobiology of the lens. In: Maisel H, ed. *The ocular lens. Structure, function and pathology*. New York: Marcel Dekker, 1985: 301-347

10. Danksagung

Ich danke

Herrn PD. Dr. Alfred Wegener

für das Überlassen des Themas und die intensive Betreuung beim Bearbeiten der Dissertation
sowie für die vielen anregenden Gespräche – auch nichtwissenschaftlicher Natur

Frau Prof. Dr. R. Klöcking und Herrn Prof. Dr. Dr. H.-P. Klöcking, Institut für Antivirale
Chemotherapie der Friedrich-Schiller-Universität Jena/Bereich Erfurt für die wertvollen
Ratschläge und die freundliche Durchsicht der Arbeit

Heike Laser, Claudine Strack und Parand Pour Nouroz

für die nette Betreuung und Einführung in das wissenschaftliche Arbeiten sowie ihre stets
geduldige Hilfe

Dr. med. Tim U. Krohne und Dr. med. Linda Meyer

für die schöne Zeit im Labor

Dipl.-Physiker Marcel Martini

für seine schier unendliche Geduld und stets kompetente Beratung bei statistischen und EDV-
technischen Problemen

und natürlich meinen Eltern,

ohne deren Unterstützung diese Arbeit

nicht möglich gewesen wäre.