

Aus der Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Prooxidatives und antioxidatives Verhalten der Usninsäure
unter Ultraviolet-B-Lichtbestrahlung – die Wirkung auf
menschliche lymphoide Zellen

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Cornelia Elisabeth Kohlhardt-Floehr

aus Schleswig

Gutachter/in: 1. Prof. Dr. Dr.-Ing. J. Lademann
 2. Priv.-Doz. Dr. U.-C. Hipler
 3. Prof. Dr. med. Prof h.c. mult. F. Boehm

Datum der Promotion: 19. November 2010

Meinen Eltern
und Matthias

Sein und Wissen ist ein uferloses Meer. Je weiter wir vordringen, umso unermesslicher dehnt sich aus, was noch vor uns liegt; jeder Triumph des Wissens schließt hundert Bekenntnisse des Nichtwissens in sich.

Isaac Newton

1.	Einleitung.....	8
1.1.	Die Haut und ihr Aufbau.....	9
1.2.	Sonnenstrahlung.....	11
1.3.	Freie Radikale.....	13
1.4.	Antioxidantien	14
1.5.	Usninsäure aus Flechten	15
1.6.	Zielstellung.....	17
2.	Material und Methoden	19
2.1.	Methoden.....	19
2.1.1.	Kultivierung der Jurkat-Zelllinie.....	19
2.1.2.	Kultivierung der HaCaT-Zellen.....	19
2.1.3.	Zellkulturarbeit	20
2.1.4.	Experimente mit Jurkat-Zellen – Allgemeiner Versuchsaufbau.....	23
2.1.5.	Die Wirkung von Usninsäure an menschlichen lymphoiden Zellen bei Ultraviolett-B-Lichtbestrahlung – direkte Membranzytotoxizität.....	24
2.1.5.1.	Untersuchung zur Dunkeltoxizität von Usninsäure in Konzentrationen von 1×10^{-8} , 1×10^{-6} und 1×10^{-4} M nach einstündiger Inkubation bei Raumtemperatur – direkte Membranzytotoxizität.....	24
2.1.5.2.	Untersuchungen zur Wirkung von Usninsäure in Konzentrationen von 1×10^{-8} , 1×10^{-6} und 1×10^{-4} M nach einstündiger Inkubation bei Raumtemperatur und UV-B-Bestrahlung in ausgewählten Dosen – direkte Membranzytotoxizität	25
2.1.5.3.	Untersuchung zur Dunkeltoxizität von Usninsäure in Konzentrationen von 1×10^{-8} und 1×10^{-6} M nach 48-stündiger Inkubation bei 37 °C – direkte Membranzytotoxizität	26
2.1.5.4.	Untersuchungen zur Wirkung von Usninsäure in Konzentrationen von 1×10^{-8} und 1×10^{-6} M nach 48-stündiger Inkubation bei 37 °C und UV-B-Bestrahlung von 20 mJ/cm ² , 100 mJ/cm ² und 1000 mJ/cm ² – direkte Membranzytotoxizität.....	27
2.1.6.	Die Wirkung von Usninsäure an menschlichen lymphoiden Zellen bei Ultraviolett-B-Lichtbestrahlung – Beeinflussung der metabolischen Aktivität	27
2.1.6.1.	Untersuchung zur Dunkeltoxizität von Usninsäure in Konzentrationen von 1×10^{-8} , 1×10^{-6} und 1×10^{-4} M nach einstündiger Inkubation bei Raumtemperatur mittels Bestimmung der metabolischen Aktivität.....	28

2.1.6.2.	Untersuchungen zur Wirkung von Usninsäure in Konzentrationen von 1×10^{-8} , 1×10^{-6} und 1×10^{-4} M nach einstündiger Inkubation bei Raumtemperatur und UV-B-Bestrahlung in ausgewählten Dosen mittels Bestimmung der metabolischen Aktivität.....	29
2.1.6.3.	Untersuchung zur Dunkeltoxizität von Usninsäure in Konzentrationen von 1×10^{-8} und 1×10^{-6} M nach 48-stündiger Inkubation bei 37 °C mittels Bestimmung der metabolischen Aktivität	29
2.1.6.4.	Untersuchungen zur Wirkung von Usninsäure in Konzentrationen von 1×10^{-8} und 1×10^{-6} M nach 48-stündiger Inkubation 37 °C und UV-B-Bestrahlung von 20 mJ/cm ² bis 1000 mJ/cm ² mittels Bestimmung der metabolischen Aktivität	30
2.1.7.	Experimente mit HaCaT-Zellen.....	30
2.1.7.1.	Toxizitätsbestimmung von Usninsäure in HaCaT-Zellkultur mittels Vialight-Assay (Biolumineszenz).....	30
2.1.7.2.	Messung reaktiver Sauerstoffspezies mittels DC-FDA-Assay und anschließende Messung der Vitalität mit Vialight Plus-Assay nach 4 h Inkubation	31
2.1.8.	Statistische Auswertung.....	33
2.2.	Materialien und Geräte	34
3.	Ergebnisse I.....	38
3.1.	Die Wirkung von Usninsäure an menschlichen lymphoiden Zellen bei Ultraviolett-B-Lichtbestrahlung – direkte Membranzytotoxizität.....	38
3.1.1.	Untersuchung zur Dunkeltoxizität von Usninsäure in Konzentrationen von 1×10^{-8} und 1×10^{-6} M nach einstündiger Inkubation bei Raumtemperatur.....	38
3.1.2.	Untersuchungen zur Wirkung von Usninsäure in Konzentrationen von 1×10^{-8} und 1×10^{-6} M nach einstündiger Inkubation bei Raumtemperatur und UV-B-Bestrahlung von 20 mJ/cm ² bis 1000 mJ/cm ²	39
3.1.3.	Untersuchungen zur Wirkung von Usninsäure in Konzentrationen von 1×10^{-8} und 1×10^{-6} M nach einstündiger Inkubation bei Raumtemperatur und UV-B-Bestrahlung von 20 mJ/cm ² bis 1000 mJ/cm ² nach Korrektur des Einflusses von Dimethylformamid (DMF) als Usninsäurelösungsmittel	43
3.1.4.	Untersuchung zur Dunkeltoxizität von Usninsäure in Konzentrationen von 1×10^{-8} und 1×10^{-6} M nach 48-stündiger Inkubation bei 37°C	45
3.1.5.	Untersuchungen zur Wirkung von Usninsäure in Konzentrationen von 1×10^{-8} und 1×10^{-6} M nach 48-stündiger Inkubation bei 37 °C und UV-B-Bestrahlung von 20 mJ/cm ² bis 1000 mJ/cm ²	47

3.1.6.	Untersuchungen zur Wirkung von Usninsäure in Konzentrationen von 1×10^{-8} und 1×10^{-6} M nach 48-stündiger Inkubation bei 37 °C und UV-B-Bestrahlung von 20 mJ/cm ² bis 1000 mJ/cm ² nach Korrektur des Einflusses von Dimethylformamid (DMF) als Usninsäurelösungsmittel.....	50
3.2.	Die Wirkung von Usninsäure (1×10^{-4} M) an menschlichen lymphoiden Zellen bei Ultraviolett-B-Lichtbestrahlung – direkte Membranzytotoxizität.....	53
3.2.1.	Untersuchung zur Dunkeltoxizität von Usninsäure in einer Konzentration von 1×10^{-4} M nach einstündiger Inkubation bei Raumtemperatur.....	53
3.2.2.	Untersuchungen zur Wirkung von Usninsäure in einer Konzentration von 1×10^{-4} M nach einstündiger Inkubation bei Raumtemperatur und UV-B-Bestrahlung von 1 J/cm ² bis 14 mJ/cm ²	54
3.2.3.	Untersuchungen zur Wirkung von Usninsäure in einer Konzentration von 1×10^{-4} M nach einstündiger Inkubation bei Raumtemperatur und UV-B-Bestrahlung von 1 J/cm ² bis 14 J/cm ² nach Korrektur des Einflusses von Dimethylformamid (DMF) als Usninsäurelösungsmittel.....	56
3.3.	Die Wirkung von Usninsäure (1×10^{-8} M und 1×10^{-6} M) an menschlichen lymphoiden Zellen bei Ultraviolett-B-Lichtbestrahlung – Beeinflussung der metabolischen Aktivität	58
3.3.1.	Untersuchung zur Dunkeltoxizität von Usninsäure in Konzentrationen von 1×10^{-8} und 1×10^{-6} M nach einstündiger Inkubation bei Raumtemperatur.....	58
3.3.2.	Untersuchungen zur Wirkung von Usninsäure in Konzentrationen von 1×10^{-8} und 1×10^{-6} M nach einstündiger Inkubation bei Raumtemperatur und UV-B-Bestrahlung von 20 mJ/cm ² bis 1000 mJ/cm ²	60
3.3.3.	Untersuchungen zur Wirkung von Usninsäure in Konzentrationen von 1×10^{-8} und 1×10^{-6} M nach einstündiger Inkubation bei Raumtemperatur und UV-B-Bestrahlung von 20 mJ/cm ² bis 1000 mJ/cm ² nach Korrektur des Einflusses von Dimethylformamid (DMF) als Usninsäurelösungsmittel	63
3.3.4.	Untersuchung zur Dunkeltoxizität von Usninsäure in Konzentrationen von 1×10^{-8} und 1×10^{-6} M nach 48-stündiger Inkubation bei 37 °C	65
3.3.5.	Untersuchungen zur Wirkung von Usninsäure in Konzentrationen von 1×10^{-8} und 1×10^{-6} M nach 48-stündiger Inkubation 37 °C und UV-B-Bestrahlung von 20 mJ/cm ² bis 1000 mJ/cm	67
3.3.6.	Untersuchungen zur Wirkung von Usninsäure in Konzentrationen von 1×10^{-8} M bis 1×10^{-6} M nach 48-stündiger Inkubation bei 37 °C und UV-B-Bestrahlung von 20 mJ/cm ² bis 1000 mJ/cm ² nach Korrektur des Einflusses von Dimethylformamid (DMF) als Usninsäurelösungsmittel.....	70

3.4.	Die Wirkung von Usninsäure (1×10^{-4} M) an menschlichen lymphoiden Zellen bei Ultraviolett-B-Lichtbestrahlung – Beeinflussung der metabolischen Aktivität.....	72
3.4.1.	Untersuchung zur Dunkeltoxizität von Usninsäure in Konzentrationen von 1×10^{-4} M nach einstündiger Inkubation bei Raumtemperatur.....	72
3.4.2.	Untersuchungen zur Wirkung von Usninsäure in einer Konzentration von 1×10^{-4} M nach einstündiger Inkubation bei Raumtemperatur und UV-B-Bestrahlung von 1 J/cm^2 bis 14 J/cm^2	73
3.4.3.	Untersuchungen zur Wirkung von Usninsäure in einer Konzentration von 1×10^{-4} M nach einstündiger Inkubation bei Raumtemperatur und UV-B-Bestrahlung von 1 J/cm^2 bis 14 J/cm^2 nach Korrektur des Einflusses von Dimethylformamid (DMF) als Usninsäurelösungsmittel.....	76
3.5.	Ergebnisse II.....	78
3.5.1.	Die Wirkung von Usninsäure an menschlichen Keratinozyten – direkte Zytotoxizität.....	78
3.5.2.	Untersuchungen zur Induktion von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) in HaCaT-Zellen durch UV-Licht (Sonnensimulator, SSR) nach Inkubation mit Usninsäure.....	80
4.	Diskussion.....	83
4.1.	Antioxidantien und Prooxidantien / Photosensibilisatoren.....	83
4.2.	Dunkeltoxizität der Usninsäure	85
4.3.	Usninsäure als Antioxidans.....	88
4.4.	Usninsäure als Prooxidans / Photosensibilisator	93
4.5.	Das antioxidativ-prooxidative Verhalten der Usninsäure	95
4.6.	Usninsäure ist ein wirkungsvolles Antioxidans.....	97
5.	Zusammenfassung	101
6.	Quellenverzeichnis	103
	Abkürzungsverzeichnis.....	114
	Publikation	116
	Danksagung	117
	Lebenslauf	119
	Erklärung	120

1. Einleitung

Es gilt als gesichert, dass die photooxidative Wirkung des UV-Lichtes nicht nur zu verfrühter Hautalterung mit Falten- und Runzelbildung, sondern auch zu einer Immunsuppression und einem gesteigerten Hautkrebsrisiko führt ¹¹⁰. Durch eine gestiegene Lebenserwartung und den Einsatz von UV-Licht in der Medizin, aber auch durch das Freizeitverhalten mit langen Aufenthalten „in der Sonne“ kommt es zu einer erhöhten Gesamtdosis des UV-Lichtes über die Lebenszeit und den damit verbundenen Risiken. Die Verwendung von kommerziellen Sonnencremes zum Schutz vor Sonnenstrahlen ist daher erforderlich und in den Industrienationen die am häufigsten angewandte Methode. Die Gefahr von Allergien bzw. photoallergischen Reaktionen auf chemische Substanzen dieser Cremes kann zu einer verminderten Akzeptanz in der Bevölkerung führen, weshalb diese wichtige Sonnenschutzmaßnahme häufig vernachlässigt wird ¹⁰⁵. Wegen der Abnahme der Ozonschicht und der damit einhergehenden Zunahme der Strahlungsintensität im kurzwelligen UV-B-Bereich gewinnt der Schutz vor UV-Strahlung im Hinblick auf die Vermeidung von schwarzem und weißem Hautkrebs jedoch weiter an Wichtigkeit.

Diese Umstände erfordern sowohl weiterentwickelte als auch neue Systeme zum Schutz des menschlichen Zellsystems vor schädigenden Einflüssen aus unserer Umwelt. Sonnenschutzmittel und kosmetische Produkte auf pflanzlicher Basis haben eine große Akzeptanz in der Bevölkerung erfahren. Um diese gefahrlos einsetzen zu können, sind sorgfältige Untersuchungen der verwendeten pflanzlichen Wirkstoffe notwendig. Die intensive Forschung auf dem Gebiet der natürlich vorkommenden Antioxidantien hat bereits einen erheblichen Erkenntnisgewinn zur Folge, wodurch diese vermehrt zum Schutz vor schädlichen Umwelteinflüssen eingesetzt werden können ^{106,64}.

Grundlage der vorliegenden Dissertation sind deshalb die detaillierte Erforschung des pflanzlichen Wirkstoffes Usninsäure hinsichtlich seines antioxidativen, aber auch seines prooxidativen Potenzials sowie die Anwendung geeigneter Methoden zu deren Analyse.

1.1. Die Haut und ihr Aufbau

Die Haut ist mit einer Größe von 1,5 m² bis 2 m² und einem Gewicht von 3,5 bis 10 kg das größte Organ des Menschen. Sie ist unsere äußere Begrenzung zur Umwelt und vereint zahlreiche Funktionen⁹³. Sie schützt uns vor Mikroorganismen dank ihrer Barrierefunktion und den ansässigen Abwehrzellen; Temperaturschwankungen können durch Schweißbildung oder Regulation der Durchblutung ausgeglichen werden und sie dient durch Fettdepots als Energiespeicher. Wegen ihrer Sinnesfunktionen ist sie wichtig für die Kommunikation mit unserer Umwelt und durch Pigmentbildung bewahrt sie uns vor den Auswirkungen schädlicher UV-Strahlen der Sonne. Vor oxidativen Schädigungen der Zellen schützen Antioxidantien, die sich in der Haut anreichern und wichtige Funktionen im Sinne einer Stabilisierung der antioxidativen-prooxidativen Balance inne haben. Es liegen bereits substanzielle Kenntnisse über die Akkumulation der beiden bedeutenden natürlich vorkommenden Antioxidantien – Lycopin und β -Carotin – vor^{27,11,121,89,50,28,51}. Schützende Substanzen können auch durch topische Anwendung in tiefere Hautschichten vordringen und die lebenden Zellen der Basalzellschicht erreichen. Dies ist über eine follikuläre Penetration, direkt oder z. B. an Nanopartikel gebunden, möglich^{77,73,74}.

Histologisch ist die Haut (Kutis) in drei Schichten aufgebaut, die sich jeweils weiter unterteilen lassen. Diese sind Oberhaut (Epidermis), Lederhaut (Dermis) und die Unterhaut (Subkutis).

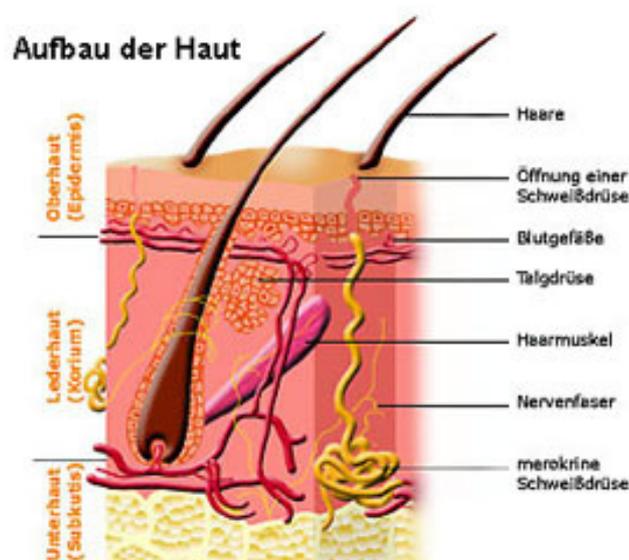


Abb. 1: Der Aufbau der Haut¹⁴⁰

Epidermis

Die Epidermis ist ein mehrschichtiges, verhornendes Plattenepithel, welches je nach Beanspruchung 30 µm-300 µm dick sein kann. Die Hauptzellmasse der Epidermis stellen die Keratinozyten⁹³. Diese unterliegen der permanenten Erneuerung vom *Stratum basale* aus, wo mitotisch aktive Basalzellen lokalisiert sind. Die Tochterzellen wandern in der Epidermis durch das *Stratum spinosum* und das *Stratum granulosum* zur obersten Hautschicht (*Stratum corneum*).

Das *Stratum spinosum* (Stachelzellschicht) besteht aus wenigen Zelllagen. Hier erfolgt eine Vergrößerung des Zellvolumens und eine Umänderung der Zellachse von vertikal nach horizontal. In der darauffolgenden Schicht –dem *Stratum granulosum* - kommt es zur Bildung von basophilen Keratohyalinkörnchen. Die Zellen erfahren einen weiteren Differenzierungsprozess und verlieren ihre Zellorganellen und -kerne. Durch Abplattung, Dehydratation und Bildung einer bindenden Lipidsubstanz wird eine starre Anordnung der Zellen erreicht.

Das *Stratum corneum* stellt die äußerste Barriere zur Umwelt dar. UV-Strahlen, Oxidantien aller Art, Hitze und Kälte wirken permanent auf diese Schicht ein¹²⁸. Dementsprechend obliegt ihr als wichtigste Funktion die Barrierefunktion^{86,87,22}. Während die innere Schicht noch Ähnlichkeiten zum *Stratum granulosum* aufweist, besteht die äußerste Schicht aus zu Hornschuppen umgestalteten Zellen. Sie weisen keine Stoffwechselfunktion mehr auf¹³². Eingebettet in eine Matrix, die aus freien Fettsäuren, Cholesterol und Ceramiden besteht, bilden sie eine nahezu undurchdringliche Begrenzung und verhindern das Eindringen externer Faktoren^{112,15}.

Neben Keratinozyten sind Melanozyten und Langerhans-Zellen in der Epidermis von Bedeutung. Melanozyten sind dendritische Zellen, die aus der Neuralleiste im dritten Fetalmonat in die Haut einwandern⁸³. Sie liegen suprabasal und produzieren das Pigment Melanin, welches sie an die benachbarten Keratinozyten abgeben. Es schützt die Hautzellen vor UV-Strahlen, da Melaninmoleküle als UV-Filter, aber auch als Antioxidans wirken, indem gebildete Melaninradikale durch nichtradikalische Melaninmoleküle gelöscht werden. Durch Neusynthese von Melaninmolekülen kann jedoch nur ein begrenzter Lichtschutz erreicht werden¹¹⁷. Langerhans-Zellen sind ebenfalls dendritische Zellen und suprabasal lokalisiert. Sie entstammen der myeloischen Reihe aus dem Knochenmark und spielen eine bedeutende Rolle bei der

Auseinandersetzung mit unserer Umwelt und der Entstehung von immunologisch bedingten Erkrankungen der Haut⁸³.

Dermis

Die Dermis besteht aus dem höher gelegenen *Stratum papillare* (Papillarkörper) und dem tiefer gelegenen *Stratum reticulare*. Das *Stratum papillare* ist mit der darüber gelegenen Epidermis verzahnt, aber durch die Basalmembran von ihr getrennt. In der Dermis befinden sich die Hautanhangsgebilde wie Talgdrüsen und Haarfollikel. Die Blutversorgung der Epidermis wird durch ein enges Kapillargeflecht von der Dermis ausgehend sichergestellt. Hauptzellen der Dermis sind Fibroblasten, die Kollagenfasern, elastische Fasern und Grundsubstanz (Matrix) produzieren. Mastzellen, die eine bedeutende Rolle bei allergischen und entzündlichen Reaktionen inne haben, kommen ebenfalls in der Dermis vor.

Subkutis

Die Subkutis besteht vornehmlich aus Fettgewebe und lockerem Bindegewebe¹⁷. Auch kommen glatte Muskelzellen, Haarwurzeln, Nerven und Gefäße vor. Des Weiteren ist die Subkutis Sitz der Schweißdrüsen. Ihre Funktion besteht in der Wärmeisolation und sie dient als Druckpolster.

1.2. Sonnenstrahlung

Spektrale Zusammensetzung und Wirkungen

UV-Strahlung ist Teil der elektromagnetischen Strahlung, die von der Sonne ausgeht. Diese umfasst Wellenlängen im Bereich von 290 bis 4000 nm. Der für photobiologische Reaktionen relevante Bereich dieses Spektrums umfasst die Infrarotstrahlung (> 800 nm), das sichtbare Licht (400-800 nm) und die ultraviolette Strahlung. International wird die UV-Strahlung wie folgend in drei Kategorien eingeteilt:

Langwelliges UV-A (320-400 nm) mit UV-A₁ (320-340 nm) und UV-A₂ (340-400 nm)

Mittelwelliges UV-B (280-320 nm)

Kurzwelliges UV-C (200- 280 nm)

Dadurch, dass die Ozonschicht Wellenlängen von unter 290 nm absorbiert, ist die UV-C-Strahlung für den Menschen nicht relevant. Ein Teil der UV-B-Strahlung wird ebenfalls von der Ozonschicht eliminiert und ein weiterer Teil durch Streuung an Partikeln in der Atmosphäre abgeschwächt. Das UV-A-Licht erreicht nahezu ungehindert die Erdoberfläche. Im Rahmen der Zerstörung der Ozonschicht nimmt der Anteil des kurzwelligen, energiereichen UV-B-Lichtes, der die Erdoberfläche erreicht, zu.

UV-B-Strahlung

Kurzwellige, energiereiche UV-B-Strahlen penetrieren weniger stark die Hautschichten und erreichen deshalb nur die Epidermis und das obere Corium³³. Hier können sie die teilungsfähigen Keratinozyten des *Stratum basale* schädigen und sind verantwortlich für den klinisch als Sonnenbrand (Dermatitis solaris) in Erscheinung tretenden Schaden. Histologisch erkennt man im *Stratum spinosum* 12-72 Stunden nach UV-Exposition in der Epidermis apoptotische Zellen („Sonnenbrandzellen“) mit pyknotischem Kern und Eosinophilie. Hinzu kommt eine Zunahme der Vaskularisation durch weit gestellte Gefäße sowie die Einwanderung von Immunzellen. Auf molekularer Ebene bewirken UV-B-Strahlen eine direkte Schädigung der DNS (z.B. Pyrimidindimerbildung). Weitere Effekte sind Hyperproliferation der Keratinozyten, die sogenannte Lichtschwiele, und eine Hyperpigmentation durch Anregung der Melanozyten. Durch diese Effekte ergibt sich aber nur ein niedriger Lichtschutzfaktor (LSF) von etwa 5¹¹⁷. Sind einerseits die Lichtschwiele und die vermehrte Pigmentierung als Resultat erhöhter Sonnenexposition als Schutzmechanismen anzusehen, so führt UV-Strahlung andererseits zu einer Immunsuppression, welche die Entstehung von Tumoren begünstigt^{45,34}. Durch eine Zunahme des UV-B-Lichtes, welches die Erdoberfläche erreicht, treten diese negativen Effekte vermehrt auf.

UV-A-Strahlung

UV-A-Strahlen gelangen bis in die Dermis⁷. Dieser Teil des solaren Spektrums interagiert mit den dermalen Fibroblasten und führt zu einer verminderten Produktion elastischer Fasern und zur Zerstörung des Kollagens. Dies äußert sich in Faltenbildung, ledrigem Aussehen sowie De- und Hyperpigmentation^{7,70,44}. Der Grund dafür ist eine durch UV-Licht angeregte verstärkte Genexpression verschiedener Gene, darunter die der Metalloproteasen MMP-1 und MMP-3. Diese Enzyme sind verantwortlich für die

Destruktion von extrazellulärer Matrix, dem Verlust vieler elastischer Fasern und damit für die vorzeitige Photo-Alterung^{53,114,17,16}. Zudem wird auch das Immunsystem lokal - in sehr hohen Dosen auch systemisch – supprimiert und die Genese maligner Hauttumore begünstigt.^{44,46,24,6,36,104}.

Neben den schon genannten negativen Wirkungen sind auch positive Einflüsse des UV-Lichtes auf unseren Organismus zu berücksichtigen. An oberster Stelle ist die Bildung von Vitamin D3 zu nennen, welches über die Regulation der Calciumhomöostase entscheidend für gesunde Knochen und Zähne ist⁴³. Weiterhin kann der Sauerstoffgehalt des Blutes erhöht werden und der Blutkreislauf wird angeregt^{79,33}. Erythemunterschwellige Dosen werden bei zahlreichen Erkrankungen in der Dermatologie standardisiert als Therapie eingesetzt. Zu nennen sind hier die Psoriasis, Neurodermitis, Akne und auch maligne Erkrankungen der Haut wie das kutane T-Zell-Lymphom. Ebenfalls hat UV-Strahlung eine nicht zu verachtende Wirkung auf die Psyche, wie an der Therapie der „Winterdepression“ zu erkennen ist^{88,62}.

1.3. Freie Radikale

Freie Radikale sind Substanzen mit ein oder zwei ungepaarten Elektronen. Dieser Umstand macht sie extrem kurzlebig und reaktionsfreudig, da jedes Atom bestrebt ist, seine Elektronenhüllen zu komplettieren. Daher entziehen sie anderen Strukturen Elektronen oder geben Elektronen ab und lösen so nicht nur eine Kette von Reaktionen aus, sondern können wichtige Zellbestandteile in tierischen und pflanzlichen Zellen schädigen. Sie spielen deshalb eine Schlüsselrolle bei der Entstehung von Arteriosklerose¹²², Krebs, inklusive Hautkrebs¹¹⁹, der so genannten altersbedingten Maculadegeneration^{146,145} und bei Alterungsprozessen der Haut^{113,139}. Die Entstehung freier Radikale ist ein normaler Vorgang während des Zellstoffwechsels, vornehmlich innerhalb der Mitochondrien und bei enzymatischen Reaktionen. Weiterhin wird eine vermehrte Radikalbildung durch externe Faktoren wie UV-Licht getriggert. Eine Übersicht über reaktive Spezies und Halbwertszeit gibt Tabelle 1.

Tab.1: ausgewählte Radikal- bzw. Sauerstoffspezies und ihre Halbwertszeit (HWZ)

Radikalspezies	Formel	HWZ in s
Molekularer Sauerstoff	O ₂	> 10 ²
Singulett-Sauerstoff	¹ O ₂	1 x 10 ⁻⁶
Superoxidanion	[•] O ₂ ⁻	1 x 10 ⁻⁶
Hydroxylradikal	[•] OH	1 x 10 ⁻⁹
Peroxyradikal	ROO [•]	1 x 10 ⁻²
Alkoxyradikal	RO [•]	1 x 10 ⁻⁶

Folge der Radikalbildung sind oxidative Schäden an zahlreichen zellulären Strukturen, zu denen Nukleinsäuren (DNS), Polypeptidbindungen und Proteine gehören⁴¹. Damit ist die Grundlage für pathologisches Geschehen wie Mutationen gelegt¹³⁸.

1.4. Antioxidantien

Antioxidantien stellen ein wichtiges, bislang jedoch nicht endgültig erforschtes Schutzsystem der tierischen und pflanzlichen Zellen dar. Dieses Schutzsystem des Organismus versucht, reaktive Spezies zu neutralisieren, bevor diese schädigend wirken können. Damit sind Antioxidantien Substanzen, die die Oxidation anderer Substanzen verringern oder verhindern können⁴⁸.

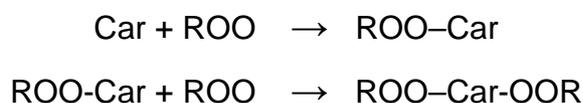
Der Mensch verfügt über körpereigene antioxidativ wirkende Substanzen, die in den Zellen oxidativem Stress entgegenwirken. In besonderem Maße kommen Antioxidantien aber in photosynthetisierenden Pflanzen vor, um beispielsweise das für ihren Stoffwechsel wichtige Chlorophyll vor UV-Strahlen und oxidativem Abbau zu schützen. Dazu gehören die Carotinoide wie das β-Carotin (gelber Karottenfarbstoff) und das Lycopin (roter Tomatenfarbstoff) sowie weitere Polyphenole und Flavonoide. Indem wir diese Substanzen mit der Nahrung zu uns nehmen, schützen sie auch uns.

Antioxidative Wirksamkeit

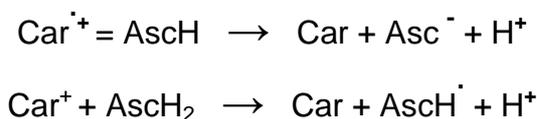
Durch die Umwandlung von Singulett-Sauerstoff in molekularen Sauerstoff („Quenchen“) durch Antioxidantien werden Schäden an Zellorganellen und Membranen verhindert. Bekannte Antioxidantien wie Lycopin und β-Carotin sind für Singulett-Sauerstoff der

ideale Reaktionspartner, da sie durch ihre konjugierten Doppelbindungen instabile und reaktive Moleküle für elektrophile Reagenzien darstellen. Der angeregte Triplettzustand des Antioxidans wird dann durch Wärmeabgabe (langwellige Strahlung) wieder aufgehoben, da die Energie der angeregten Moleküle nicht ausreicht, um mit anderen Molekülen zu reagieren. Dadurch ist die schädliche Redox-Kettenreaktion beendet und das jeweilige Antioxidans steht für weiteres „Quenchen“ zur Verfügung⁶⁷.

Weiterhin zeichnet sich eine antioxidative Aktivität durch die Reaktion mit Freien Radikalen aus. Hier können mehrere Radikale mit einem Molekül beispielsweise Lycopin reagieren, was in der langen C- Kette und den konjugierten Doppelbindungen begründet ist. Es kommt zu folgender Reaktion⁶⁸ :



Zusätzlich gibt es Hinweise, dass Antioxidantien mit anderen Molekülen wie Vitamin C (Ascorbinsäure [AscH]) und E synergistische Effekte bezüglich der Zellprotektion aufweisen. Beispielsweise wird das z. B. Carotinoid-Radikal von diesen Vitaminen regeneriert und kann damit weiteren Reaktionen zur Verfügung stehen¹³ :



In Forschungsarbeiten, wie auch der vorliegenden Dissertation, werden natürlich vorkommende Substanzen auf antioxidative Eigenschaften untersucht. In dieser Arbeit wurde Usninsäure aus chilenischen Flechten hinsichtlich antioxidativer, aber auch prooxidativer Wirkungsweisen geprüft.

1.5. Usninsäure aus Flechten

Flechten sind symbiotische Lebewesen aus Pilzen und photosynthetisierenden Partnern (vornehmlich Algen und Cyanobakterien). Die Pilze, welche für ihren Symbiosepartner physikalischen Schutz darstellen, aber auch für die Zufuhr von Wasser und Mineralien

zuständig sind, profitieren von der Photosynthese seitens der Algen. Über 17.000 verschiedene Flechtenarten sind bekannt. Etwa 8 % der Erdoberfläche sind mit Flechten bewachsen. Sie gedeihen auf unterschiedlichsten Böden – Dächern, Felsen, Baumrinde – und auch unter extremen Umweltbedingungen, wie sie im Hochgebirge oder dem subantarktischen Raum vorkommen.

Flechten enthalten Pflanzenstoffe, die seit mehr als 150 Jahren im Interesse der Wissenschaft stehen. Bekannt sind mehr als 800 Substanzen⁵⁷. Knop konnte als erster bereits 1844 die Usninsäure isolieren und charakterisieren⁶⁶. Flechten und ihre Substanzen werden seit Jahrtausenden verschiedentlich genutzt. Schon Hippokrates soll bei Krankheiten der ableitenden Harnwege sich der *U. barbata* – die unter anderem Usninsäure enthält - bedient haben⁵⁸.

Usninsäure [2,6,diacetyl-7,9-dihydroxy-8,9b-dimethyl-1,3(2H,9bH)-dibenzo-furandion] ist ein gelbes Pigment, welches von zahlreichen Lichenspezies – genau genommen von dem fungalen Anteil - produziert wird. Es existiert in zwei Enantiomeren, welche sich in der Drehung der Methylgruppe an Position 9b unterscheiden⁵².

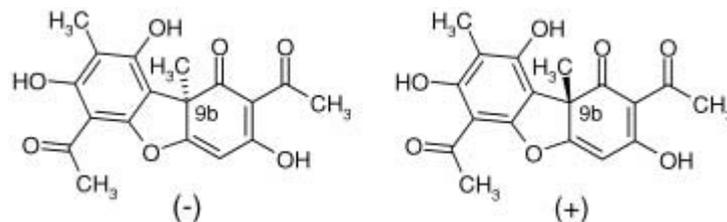


Abb. 2: Struktur von (-)Usninsäure und (+)Usninsäure-Enantiomer²¹

Seit in den 40er Jahren des vorigen Jahrhunderts antibiotische Eigenschaften der Usninsäure gezeigt werden konnten, steht dies im Mittelpunkt des Interesses^{18,123}. Auch heute, in Zeiten der vermehrten Resistenzbildung zahlreicher Bakterienstämme, wird an der antimikrobiellen Wirkung der Usninsäure geforscht^{80,30,141,116}. Ein weiterer interessanter Effekt der Usninsäure ist die antimittotische Wirkung auf Tumorzellen, die in mehreren Studien bewiesen werden konnte^{72,126,71}. Der Aktionsmechanismus ist bislang nicht geklärt; postuliert wird eine Reduktion der RNA-Biosynthese^{2,71}. Es ist davon auszugehen, dass Usninsäure zytotoxische Eigenschaften besitzt und diese möglicherweise als Prooxidans entfaltet.

Eine geringe photoallergene Potenz von Flechtensäuren ist bekannt und wird auf Flechtensäuremischungen bezogen^{90,129,130,137,49,102}. Aus diesem Grund wird für die Forschung möglichst reine Usninsäure eingesetzt.

Eine für das Überleben der Flechte wichtige weitere Funktion der Usninsäure ist die UV-Filterwirkung, die auf einer Akkumulation der Substanzen in der äußeren Schicht oberhalb der Algenzellen beruht^{21,103,12}. Damit schützen sie durch starke Absorption der UV-Strahlung die photosynthetisierenden Pigmente gegen photooxidativen Stress. Studien, die eine Erhöhung des Usningehaltes in Abhängigkeit von der Strahlungsintensität zeigen, lassen eine solche protektive Wirkung vermuten^{8,39,40}. Neuere Studien zeigen neben der UV-Filterwirkung antioxidative Eigenschaften der Usninsäure^{96,47,97}. Dies lässt die Vermutung zu, dass die UV-protektive Wirkung der Usninsäure nicht nur auf einer Filterwirkung beruht, sondern auch auf ihrer Fähigkeit, reaktive Spezies zu „quenchen“ und so als Antioxidans zu agieren.

1.6. Zielstellung

Ziel dieser Arbeit ist die zellbasierte Erforschung der Substanz Usninsäure aus chilenischen Flechten hinsichtlich antioxidativer und prooxidativer Eigenschaften unter UV-B-Lichtbestrahlung. Aufgrund der Ergebnisse bereits veröffentlichter Forschungsarbeiten war eine antioxidative, aber auch eine prooxidative Wirkungsweise der Usninsäure zu vermuten. Ein detaillierter Erkenntnisgewinn bezüglich des bifunktionalen Verhaltens der Usninsäure ist daher Vorhaben der vorliegenden Dissertation.

Es ist bekannt, dass Usninsäure antimikrobiell-zytotoxische Eigenschaften besitzt. Daher ist es zunächst nötig, einen Dosisbereich der Usninsäure zu finden, der für die eingesetzten Jurkat-Zellen im Dunkeln nicht toxisch ist. Die Beurteilung der Wirkung erfolgt mikroskopisch über die direkte Membranzytotoxizität (Eosinfärbung) und prozentuale Ermittlung der Totzellrate, sowie über die photometrische Bestimmung der metabolischen Aktivität mit Hilfe des *Cell Proliferation Kit II* (XTT) der Firma Roche.

Es ist anzunehmen, dass sich Usninsäure sowohl an die äußere Zellmembran bindet als auch im Zytoplasma der Zellen akkumuliert und dort möglicherweise an intrazelluläre Membranen bindet. Unter UV-Lichtbestrahlung entfaltet sie dort ihre antioxidative oder prooxidative Wirkung. Verschiedene Konzentrationen des im Dunkeln

nicht-toxischen Bereiches der Usninsäure sollen verwendet werden, um eine mögliche Änderung des antioxidativ-prooxidativen Verhaltens der Usninsäure abhängig von der Konzentration bei UV-B-Bestrahlung zu erfassen. Gleiches gilt für die Dauer der Inkubation der Zellen mit Usninsäure, da auch dies Auswirkungen auf die metabolische Aktivität und den zytotoxischen Membraneffekt haben könnte. Es ist weiter möglich, dass die Usninsäurewirkung durch die Höhe der Bestrahlungsdosis beeinflusst wird. Die Beurteilung der Wirkung erfolgt analog der Toxizitätsprüfung. Da vermutet wird, dass Usninsäure bei antioxidativem Verhalten durch UV-Licht entstehende reaktive Spezies löscht, bevor sie die Zellen schädigen, wird erwartet, dass weder eine Verminderung der Überlebensrate noch eine Einschränkung des Metabolismus im Vergleich zu unbestrahlten Zellen eintritt. Bei prooxidativem Verhalten der Usninsäure sollte ein gegenteiliger Effekt hinsichtlich Überlebensrate und Metabolismus im Vergleich zu unbestrahlten Zellen nachweisbar sein.

Die an Jurkat-Zellen gewonnenen Erkenntnisse sollen zur besseren Übertragbarkeit auf die Verhältnisse an der menschlichen Haut an HaCaT-Zellen (menschliche Keratinozyten) angewendet werden. Ziel ist es, mittels photometrischer Bestimmung der Vitalität für die HaCaT-Zellen ebenfalls einen im Dunkeln nicht-toxischen Konzentrationsbereich der Usninsäure zu finden. Durch die Kombination eines Vitalitätstests mit einer fluoreszenzoptischen Detektion reaktiver Spezies nach UV-Bestrahlung der Keratinozyten wird es möglich sein, diejenige Konzentration der Usninsäure zu ermitteln, welche die reaktiven Spezies löscht und bei der die Zellen gleichzeitig einen uneingeschränkten Metabolismus aufweisen – also optimal antioxidativ geschützt sind.

Entsprechend der gewonnenen Ergebnisse kann beurteilt werden, unter welcher Zielstellung Usninsäure weiter erforscht werden sollte und die Ergebnisse zukünftig in der Dermatologie angewendet werden können.

2. Material und Methoden

2.1. Methoden

2.1.1. Kultivierung der Jurkat-Zelllinie

Der Name Jurkat-Zellen leitet sich aus dem Ursprung eines T-Zell-Klones ab. Es handelt sich um eine Abwandlung der ursprünglichen Bezeichnung „JM“. Diese Zelllinie wurde 1977 von der Arbeitsgruppe U. Schneider et al. an der Kinderklinik der Universität Erlangen-Nürnberg gewonnen und etabliert ¹¹⁵. Sie entstammen dem peripheren Blut eines 14-jährigen Jungen, der an akuter lymphatischer Leukämie erkrankt war. Die Zellen wurden beim ersten Rückfall nach erfolgter und zunächst erfolgreicher Chemotherapie entnommen. Jurkat-Zellen wachsen nicht adhärent und imponieren mikroskopisch als kreisrunde, in Trauben angeordnete Strukturen. Sie zeigen auch nach zahlreichen Passagen (> 120) noch ein gutes Wachstum. Die optimale Dichte im Kulturmedium liegt zwischen 3×10^5 Zellen/ml und 9×10^5 Zellen/ml. Tote Zellen finden sich meist einzeln schwimmend mit aufgelöster, entrundeter Form.

2.1.2. Kultivierung der HaCaT-Zellen

Aus dem Ursprung der Zellen und den ursprünglichen Kulturbedingungen leitet sich der Name **HaCaT** ab (*Human adult skin keratinocytes, low Calcium [0,2 mM], high Temperature [38,5 °C]*). Diese Zelllinie wurde 1988 von der Arbeitsgruppe Boukamp et al. des Krebsforschungsinstituts Heidelberg gewonnen und untersucht ¹⁴. Die HaCaT-Zelllinie entstammt dem Sicherheitsabstand (Haut) eines Operationspräparates eines malignen Melanoms eines 62-jährigen Mannes. Sie wurde somit aus histologisch gesunder, humaner, adulter Haut gewonnen. HaCaT-Zellen behalten ihre vollständige Differenzierungsfähigkeit auch nach zahlreichen Passagen (> 140) bei und bleiben nicht maligne. Dieses ausgeprägte Differenzierungspotential zeigt sich darin, dass, als Transplantat auf Nacktmäusen aufgebracht, sich eine vollständig strukturierte Epidermis ausbildet ^{14,4}. Die Zellen wachsen adhärent und sehen in konfluenter Kultur wie Pflastersteine aus. Tote Zellen finden sich im Medium frei schwimmend und abgerundet.

2.1.3. Zellkulturarbeit

Medien und Lösungen der Zellkulturarbeit mit Jurkat-Zellen

Als Kulturmedium wurde RPMI 1640 mit Zusatz von 1 % Glutamin (2 mM), 1 % Penicillin/Streptomycin-Lösung und 10 % fetalem Kälberserum (Fetal bone serum = FBS, Serum) als Quelle von Lipiden und Wachstoffsstoffen verwendet. Glutamin, eine essentielle Aminosäure, ist nach Zugabe zu Fertigmedien meist nicht stabil und wurde aus diesem Grunde supplementiert. Medium ohne Zusätze (RPMI 1640 ohne Phenolrot ohne Zusätze, im Folgenden Medium o. Z.) wurde innerhalb der Versuche verwendet, um eine Beeinflussung der Experimente durch Bestandteile der Zusätze zu vermeiden. Alle Waschschriffe wurden mit 1x Phosphate Buffered Saline-Waschpuffer (PBS) durchgeführt. Die Kultivierung der Jurkat-Zellen erfolgte in Kompletmedium RPMI-1640 bei 37 °C, 5 % CO₂. Das Wachstum und die Sterilität wurden täglich mikroskopisch überwacht. Ein Mediumwechsel erfolgte jeden zweiten bis dritten Tag.

Medien und Lösungen der Zellkulturarbeit mit HaCaT-Zellen:

Als Kulturmedium wurde Dulbecco-modified-minimum-essential-Medium (DMEM) mit Zusatz von 10 % fetalem Kälberserum (FBS) verwendet. Ein so genanntes Magermedium, das 1 % FBS, 1 % Penicillin/Streptomycin, 1 % HEPES und 1 % MEN (Aminosäuremischung, Gibco, invitrogen Corporation, UK) enthält, wurde innerhalb der Versuche verwendet, um eine Beeinflussung durch Bestandteile des Serums weitgehend zu vermeiden. Alle Waschschriffe und Verdünnungsreihen wurden mit 1x PBS durchgeführt. Zur Ablösung der Zellen während der Passagierung wurde Trypsin Ethylendiamintetraessigsäure 0,05/0,02 % in PBS (Trypsin-EDTA, PAN biotech GmbH, Aidenbach, BRD) verwendet.

Subkultivierung der Jurkat-Zellen:

Alle Arbeiten im Rahmen der Zellkultur wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt (sterile Flowbox). Die Kulturbedingungen im Brutschrank betragen 37 °C und 5 % CO₂ bei 90 % relativer Luftfeuchtigkeit. Je nach Bedarf wurden die Stammkulturen in Zellkulturflaschen Typ 1 (25 cm²/50 ml, BD bioscience, USA) bzw. Typ 2 (75 cm²/250 ml) kultiviert. Alle Zellkulturmedien und Zusätze wurden vor Benutzung auf Raumtemperatur erwärmt. Die Zellzahl in der Suspension wurde bei 5x10⁵ Zellen/ml gehalten, um die Zellen durch Überwuchs nicht zu gefährden. Die Subkultivierung

erfolgte daher jeden zweiten bis dritten Tag. 2 ml Suspension wurden aus jeder Flasche entnommen und jeweils in eine frische Flasche mit 6 ml Vollmedium überführt. Gegebenenfalls wurde ein Mediumwechsel durchgeführt, in dem altes Medium vorsichtig abgesaugt und durch neues ersetzt wurde. So konnte die Zellzahl auf ca. 1×10^6 /ml bei Bedarf erhöht werden. Mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer wurden die Zellen vor der Subkultivierung gezählt. Hierbei war eine Färbung der Zellsuspension mit Trypanblaulösung 0,1 % in PBS notwendig, um tote Zellen zu identifizieren. Dieser Azofarbstoff kann eine zerstörte, nicht jedoch eine intakte Plasmamembran penetrieren und bindet an zytosolische Proteine. Durch diese Methode lassen sich beim Ermitteln der Zellzahl tote (erscheinen blau) von lebenden (bleiben farblos) Zellen unterscheiden. Zur Berechnung der Zellzahl wurde der Mittelwert der Zellzahl aus 4 Großfeldern mit 10^4 multipliziert (Zellzahl/ml). Zur Bestimmung der Gesamtzellzahl musste dieser Wert noch mit dem Resuspensionsvolumen multipliziert werden. Daneben war der Verdünnungsfaktor der Zellsuspension zu beachten. Die Zellen wurden für die Weiterführung der Zellkultur in Kulturflaschen oder für Experimente in Mikrotiterplatten überführt. Für alle Experimente wurden 96well-Platten (Greiner Bio-one GmbH, Frickenhausen, BRD) verwendet.

Subkultivierung der HaCaT-Zellen:

Die Subkultivierung der HaCaT-Zellen unterschied sich von der der Jurkat-Zellen in folgenden Punkten. Die Zellen wurden in Zellkulturflaschen des Typs 2 kultiviert. Die Subkultivierung der Zellen erfolgte, sobald ein konfluenten Zellrasen bestand. Das Kulturmedium wurde abgesaugt und mit 10 ml PBS nachgespült, um Zelltrümmer zu entfernen. Damit die adhärenen HaCaT-Zellen passagiert und für Versuche gewonnen werden konnten, wurden sie mit 3 ml Trypsin-EDTA 0,05/0,02 % in PBS für ca. 3 min im Brutschrank bei 37 °C inkubiert. Die durch Trypsin-EDTA bewirkte Ablösung der Zellen wurde makroskopisch wie mikroskopisch beobachtet und verifiziert. Durch Zugabe von serumhaltigem Kulturmedium und dem darin enthaltenden Proteaseinhibitor Antitrypsin wurde die Reaktion des Trypsin-EDTA und damit dessen peptische Wirkung gestoppt. Die abgelösten Zellen konnten nun geerntet und weiterverarbeitet werden. Die Zellsuspension wurde abpipettiert und in ein Blue Cap-Gefäß (Volumen 50 ml) gegeben und bei 4 °C und 1200 Umdrehungen pro Minute (UpM) für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 1 ml Kulturmedium resuspendiert. Mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer wurden die Zellen wie die Jurkat-Zellen gezählt,

wobei ebenfalls eine Färbung der Zellsuspension mit Trypanblaulösung 0,1 % in PBS hergestellt wurde. Die Zellen wurden für die Weiterführung der Zellkultur oder für Experimente in Kulturflaschen oder Mikrotiterplatten überführt. In Zellkulturflaschen des Typs 2 wurden 2×10^6 Zellen 10 ml ausplattiert. Die Zellen adhärirten rasch an der jeweiligen Unterlage, so dass nach durchschnittlich 24 h bis 48 h ein subkonfluent bis konfluent Zellrasen erreicht wurde.

Kryokonservierung von Jurkat-Zellen und HaCaT-Zellen

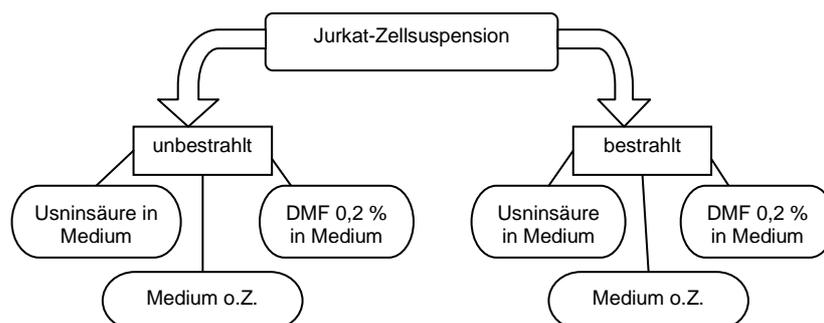
Auch stabile Zelllinien verändern sich mit der Zeit. Durch mögliche Kontaminationen (z.B. mit Mykoplasmen) können Zellkulturen außerdem zerstört beziehungsweise unbrauchbar werden. Um ein langfristiges Arbeiten mit den Zelllinien sicher zu stellen, wurden von frühen Passagen tiefgefrorene Reserven angelegt. Diese kryokonservierten Zellen lassen sich in flüssigen Stickstofftanks bei -196 °C sehr lange konservieren. Die Zellzahl sollte ungefähr 1×10^6 Zellen/ml betragen. Kritisch ist das Einfrieren und Auftauen der Zellen. Um Schäden zu vermeiden, wurden die Zellen in Gegenwart von Dimethylsulfoxid (DMSO), eingefroren. Dimethylsulfoxid verhindert die Ausbildung von Eiskristallen, durch die die Zellen zerstört werden⁷⁵. Zu beachten ist, dass die Abkühlung besonders langsam (stufenweise), das Auftauen jedoch schnell erfolgen sollte. Zellen, die eingefroren werden sollten, wurden vor dem Einfriermodus auf Mykoplasmen getestet. Nach Ermittlung der Zellzahl und nach erneuter Zentrifugation (4 °C , 1200 UpM, 5 min) wurde das Pellet mit 1 ml Dimethylsulfoxid pro 10^6 Zellen resuspendiert. Die Suspension wurde aliquotiert und für ein bis zwei Tage bei -80 °C gelagert und nachfolgend in einen Stickstofftank überführt. Um Zellen aufzutauen, wurden die Kryoröhrchen im Wasserbad erwärmt und durch Zugabe von Kulturmedium (temperiert auf Raumtemperatur) langsam resuspendiert, bis die Zellen komplett aufgetaut waren. Daraufhin wurde zentrifugiert (4 °C , 1200 UpM, 5 min) und das Pellet mit 5 ml Kulturmedium resuspendiert. Die aufgetauten Zellen wurden in eine Zellkulturflasche des Typs 1 oder des Typs 2 überführt und mit Kulturmedium kultiviert. Am nächsten Tag erfolgt ein Mediumwechsel, damit die toten und stark geschädigten Zellen entfernt werden und das Wachstum der lebenden Zellen nicht beeinträchtigt wird

Mykoplasmentestung

Zellkulturarbeit ist nur unter keimfreien Bedingungen durchführbar, weshalb auf steriles Arbeiten geachtet werden muss. Von besonderer Bedeutung bei der Zellkulturarbeit ist eine Kontamination mit Mykoplasmen (Z. B. *M. ovale*)²⁵. Diese Bakterien besitzen keine Zellwand, sind 100 bis 800 nm groß und nicht ultrafiltrierbar. Da sie zellwandlos sind, sind sie gegen die oft verwendeten Antibiotika Penicillin und Streptomycin nicht sensibel. Mit bloßem Auge sind sie nicht sichtbar. Mykoplasmen wachsen langsam und zerstören die Wirtszelle nicht, können jedoch nicht nur die Zellen und deren Stoffwechsel verändern, sondern auch die Ergebnisse von Versuchen beeinträchtigen. In regelmäßigen Abständen sowie vor jeder Kryokonservierung wurden die Zellkulturen daher mit Hilfe des *Mykoplasmen-Detection-Kit* von Roche getestet. Zu untersuchendes Kulturmedium sollte mindestens 2 Tage alt sein. Das Testprinzip basiert auf der *ELISA*-Technik, bei der polyklonale Antikörper die meistverbreiteten Spezies nachweisen. Zuerst werden Antikörper an einer Mikrotiterplatte fixiert. Unspezifische Bindungen werden mit einer Blockierungslösung gesättigt. In einem zweiten Schritt binden die Antigene einer Probe an die fixierten Antikörper. Nun wird fixiertes Antigen durch einen Biotin-gekoppelten Antikörper markiert. Streptavidin-Alkalische Phosphatase bindet im vierten Schritt an Biotin. Die im Komplex gebundene Streptavidin-Alkalische Phosphatase wird durch enzymatische Umsetzung von 4-Nitrophenylphosphat als Substrat visualisiert. Das Signal ist der Mykoplasmen-Konzentration proportional und kann makroskopisch oder mit einem *ELISA-Reader* (Sirius HT-TRF) bestimmt werden. Beide Zellkulturen wurden kontinuierlich auf Mycoplasmen getestet.

2.1.4. Experimente mit Jurkat-Zellen – Allgemeiner Versuchsaufbau

Die nachstehende graphische Darstellung zeigt den allgemeinen Versuchsaufbau, wie er in allen Versuchen mit Jurkat-Zellen angewendet wurde. Angesetzt wurden jeweils Triplikate.



2.1.5. Die Wirkung von Usninsäure an menschlichen lymphoiden Zellen bei Ultraviolett-B-Lichtbestrahlung – direkte Membranzytotoxizität

2.1.5.1. Untersuchung zur Dunkeltoxizität von Usninsäure in Konzentrationen von 1×10^{-8} , 1×10^{-6} und 1×10^{-4} M nach einstündiger Inkubation bei Raumtemperatur – direkte Membranzytotoxizität

Zur Herstellung der Versuchsansätze wurde zunächst die Zellzahl in der Suspension wie unter 2.1.3. (Subkultivierung der Jurkat-Zellen) beschrieben bestimmt. Bei einer ausreichenden Menge und bei guter Qualität der Zellen wurden diese in einem 50 ml Zentrifugenröhrchen (Sarstedt, Nümbrecht, BRD) 5 min bei 1000 Upm zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgesaugt und das Zell-Pellet in Medium o. Z. aufgenommen. Die Zellzahl pro ml wurde erneut mit einer Neubauer-Zählkammer ermittelt. Die Verdünnung auf die gewünschte Zellzahl von $1,5 \times 10^6$ /ml erfolgte mit einer entsprechenden Zugabe von Medium o. Z. Anschließend wurden Aliquots erstellt, die eine Stunde bei Raumtemperatur mit Usninsäure einer Endkonzentration im Medium von 1×10^{-8} M, 1×10^{-6} M oder 1×10^{-4} M in 0,2 % *N,N*-Dimethylformamid 99,8 % (Sigma-Aldrich Corporation, USA, folgend DMF) oder nur mit 0,2 % DMF in Medium o. Z. inkubiert wurden. Die Usninsäure wurde von Professor Ernesto Fernandez der Chemistry and Pharmacy School der Universität von Valparaiso, Chile bereitgestellt und dort aus der Flechtenart *Xanthoparmelia farinosa* (Vainio) mittels Aceton extrahiert und durch einen Kristallisationsprozess mit CHCl_3 :EtOH (1:1) gereinigt (s. in Rancan F, Rosan S, Boehm K et al. *Protection against UVB irradiation by natural filters extracted from lichens*. J Photochem Photobiol B: Biology 2002;68:133-139). Die inkubierten Versuchsansätze wurden gewaschen, indem PBS zugesetzt und 10 min bei 1000 Upm zentrifugiert wurde. Der Überstand wurde vorsichtig abgesaugt und das Zell-Pellet erneut in entsprechender Menge Medium o. Z. aufgenommen. Aliquots von 200 μl Zellsuspension wurden mit 5 μl Eosin 0,1 % in PBS angefärbt. Durch diese Färbung ist eine Unterscheidung zwischen toten und lebenden Zellen möglich, da der Farbstoff eine geschädigte Plasmamembran durchdringen kann und intrazellulär akkumuliert. Geschädigte Zellen erscheinen daher rot. Zellen mit einer intakten Plasmamembran bleiben farblos. Nach 2 Minuten erfolgte die Auszählung in der Neubauerkammer analog der Trypanblau-Färbung (s. 2.1.3.) unter dem Lichtmikroskop BO61 (Olympus Corporatin, Japan). Als Kontrolle dienten Zellen in Medium o. Z.

2.1.5.2. Untersuchungen zur Wirkung von Usninsäure in Konzentrationen von 1×10^{-8} , 1×10^{-6} und 1×10^{-4} M nach einstündiger Inkubation bei Raumtemperatur und UV-B-Bestrahlung in ausgewählten Dosen – direkte Membranzytotoxizität

Zunächst wurden wie unter 2.1.5.1. beschrieben die benötigten Versuchsansätze hergestellt. Nach einer einstündigen Inkubation mit den ausgewählten Usninsäurekonzentrationen in Medium bzw. mit dem als Lösungsmittel für die Usninsäure verwendeten DMF 0,2 % wurden die Jurkat-Zellen wie oben erwähnt mit PBS gewaschen. Daraufhin erfolgte die Aussaat in die Innenseite abgetrennter Deckel von Eppendorfgefäßen (2 ml), welche ein Volumen von 200 µl fassen. Die Zellen wurden mit einem Abstand von 2 cm mittels einer Schmalband-UV-B-Lampe (Typ TL 40W/01 RS, Philips) bestrahlt (Abb. 3). Die Lampe wurde eine Stunde vor Gebrauch eingeschaltet. Unter diesen Bedingungen betrug die durchschnittliche UV-B-Intensität am Ort der Zellen 1,908 mW/cm², was in einer Expositionszeit von 10,5 sec für 20 mJ/cm², 52,4 sec für 100 mJ/cm² und 524 sec für 1000 mJ/cm² resultierte (bei Versuchen mit einer Endkonzentration von 1×10^{-8} und 1×10^{-6} M Usninsäure) sowie in den Bestrahlungszeiten 8 min 44 sec für 1 J/cm², 43 min 40 sec für 5 J/cm², 1 h 27 min 20 sec für 10 J/cm² und 2 h 2 min 16 sec für 14 J/cm² (bei Versuchen mit einer Endkonzentration von 1×10^{-4} M Usninsäure). Als Kontrollen dienten unbestrahlte Zellen, die mit identischen Usninsäurekonzentrationen inkubiert wurden, sowie Zellen in Medium o. Z. und Zellen in Medium mit Zusatz von 0,2 % DMF - jeweils bestrahlt und unbestrahlt. Die Bestrahlungszeit wurde mit einer Stoppuhr eingestellt. Nach Ablauf der jeweiligen Bestrahlungszeit wurden die Jurkat-Zellen mit 5 µl Eosin 0,1 % in PBS auf 200 µl Zellsuspension versetzt und nach 2 Minuten konnte unter dem Lichtmikroskop BO61 in einer Neubauer-Zählkammer die Totzellrate in % ermittelt werden.

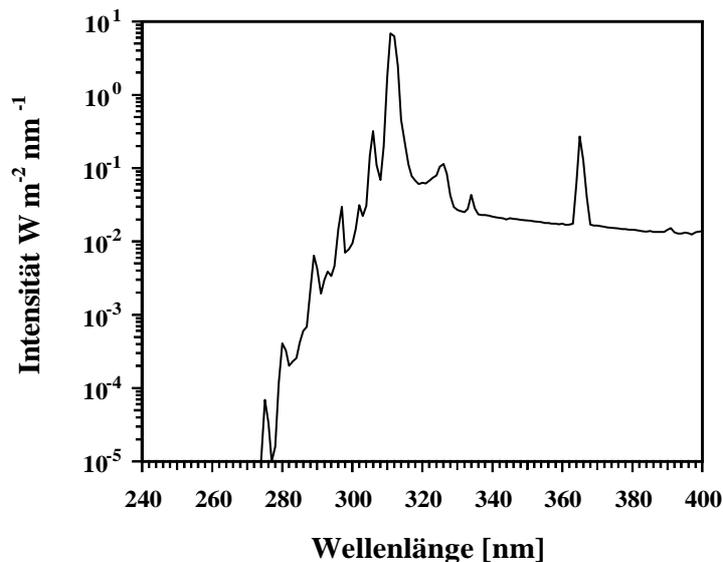


Abb. 3: Intensität der Lampe TL 40W/01 bei einem Abstand von 2,0 cm als eine Funktion der Wellenlänge zwischen 240 und 400 nm. Die Messungen am geometrischen Zentrum der Röhre wurden mit einem temperaturstabilisierten Doppelmonochromator-Spektorradiometer des Typs OL 754 (Optronic, USA) mit einer cosinus-korrigierten Ulbrichtschen Kugel als optischen Messkopf durchgeführt.

2.1.5.3. Untersuchung zur Dunkeltoxizität von Usninsäure in Konzentrationen von 1×10^{-8} und 1×10^{-6} M nach 48-stündiger Inkubation bei 37 °C – direkte Membranzytotoxizität

Je 2 Zellkulturflaschen des Typs 1 mit jeweils 8 ml Jurkat-Zellsuspension in Vollmedium wurden mit Usninsäure in den Endkonzentrationen 1×10^{-8} und 1×10^{-6} M 48 Stunden bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Als Kontrollen dienten ebenfalls 48 Stunden bei 37 °C und 5 % CO₂ mit 0,2 % DMF in Vollmedium inkubierte Zellen sowie Zellen in Vollmedium ohne Zusätze. Nach dieser Inkubationszeit wurde zunächst die Zellzahl in den Zellkulturflaschen wie unter 2.1.3. beschrieben bestimmt. Bei ausreichender Anzahl der Zellen wurde die Suspension 5 min bei 1000 Upm zentrifugiert. Der Überstand konnte dann vorsichtig abgesaugt und die jeweiligen Pellets in Medium o. Z. aufgenommen werden, so dass eine Konzentration der Jurkat-Zellen von $1,5 \times 10^6$ /ml vorlag. Aliquots von 200 µl wurden mit 0,1 % Eosin in PBS gefärbt und in einer Neubauer-Zählkammer nach Ablauf von 2 Minuten unter dem Lichtmikroskop BO61 ausgezählt.

2.1.5.4. Untersuchungen zur Wirkung von Usninsäure in Konzentrationen von 1×10^{-8} und 1×10^{-6} M nach 48-stündiger Inkubation bei 37 °C und UV-B-Bestrahlung von 20 mJ/cm², 100 mJ/cm² und 1000 mJ/cm² – direkte Membranzytotoxizität

Zunächst wurden wie unter 2.1.5.1. beschrieben die benötigten Versuchsansätze hergestellt. Daraufhin erfolgte die Ausplattierung in die Innenseite abgetrennter Deckel von Eppendorfgefäßen (2 ml). Die UV-B-Bestrahlung wurde analog wie in 2.1.5.2. beschrieben durchgeführt. Als Kontrollen dienten unbestrahlte Zellen, die mit identischen Usninsäurekonzentrationen 48 Stunden inkubiert wurden, sowie Zellen in Medium o. Z. und Zellen in Medium mit Zusatz von 0,2 % DMF - jeweils bestrahlt und unbestrahlt. Die Bestrahlungszeit wurde mit einer Stoppuhr eingestellt. Nach Ablauf der gewählten Bestrahlungszeit wurden die Jurkat-Zellen mit 5 µl Eosin 0,1 % in PBS auf 200 µl Zellsuspension versetzt. Unter dem Lichtmikroskop BO61 konnte in einer Neubauer-Zählkammer die Totzellrate in % bestimmt werden.

2.1.6. Die Wirkung von Usninsäure an menschlichen lymphoiden Zellen bei Ultraviolett-B-Lichtbestrahlung – Beeinflussung der metabolischen Aktivität

Prinzip der Methode

Die metabolische Aktivität der Zellen nach UV-B-Bestrahlung in den ausgewählten Dosen und Inkubation mit der jeweiligen zu prüfenden Usninsäurekonzentration wurde mit dem XTT-Test erfasst. Es kam das Cell Proliferation Kit II der Fa. Roche (Mannheim, Deutschland) zur Anwendung. Das Prinzip beruht auf der Messung der metabolischen Zellaktivität. XTT ist ein Tetrazoliumsalz (schwach gefärbt), welches in Anwesenheit eines Elektronenüberträgers zu einem intensiv farbigen Formazanderivat (ein Azofarbstoff) reduziert wird. Dies kann nur in vitalen Zellen mit intakten Mitochondrien (Enzym zur Reduktion: Succinatdehydrogenase) stattfinden. Wenige Minuten nach eingetretenem Zelltod erlischt die metabolische Aktivität, somit sinkt die Reduktionsrate der Testsubstanz und damit die zu messende Absorption des Formazanderivates mittels Spektrophotometer. Dies stellt eine einfache, schnelle und reproduzierbare Methode zur Unterscheidung lebender und toter Zellen dar.

Durchführung

Die Zellen wurden in einer Dichte von 5×10^4 /ml in 96well-Flachbodenplatten ausgesät und mit UV-Bestrahlungsdosen von 20 mJ/cm^2 bis 1000 mJ/cm^2 (s. 2.1.5.2.) bei einer Endkonzentration im Medium der Usninsäure von $1 \times 10^{-8} \text{ M}$ und $1 \times 10^{-6} \text{ M}$ bzw. mit 1 J/cm^2 bis 14 J/cm^2 bei einer Endkonzentration im Medium der Usninsäure von $1 \times 10^{-4} \text{ M}$ bestrahlt. Pro $100 \text{ }\mu\text{l}$ Medium wurden $50 \text{ }\mu\text{l}$ XTT-Reagenz zugefügt, angesetzt aus $5,0 \text{ ml}$ XTT-Labeling-Reagenz mit $0,1 \text{ ml}$ Electron-coupling-Reagenz (gemäß Angaben des Herstellers). Nach einer Inkubationszeit von $3,5 \text{ h}$ unter Kulturbedingungen wurde die Absorption bei einer Wellenlänge von $\lambda=492 \text{ nm}$ am ELISA-Reader bestimmt. Die optische Dichte der Proben wurde mit den Werten der Kontrollen (Zellen in Medium o. Z.; Zellen in Medium plus $0,2 \text{ \%}$ DMF, bei den Versuchen zur Dunkeltoxizität nur unbestrahlt, sonst jeweils bestrahlt und unbestrahlt) verglichen. Angesetzt wurden jeweils 3 separate Versuchsansätze (Triplikate) je Usninsäurekonzentration und Kontrollansatz.

2.1.6.1. Untersuchung zur Dunkeltoxizität von Usninsäure in Konzentrationen von 1×10^{-8} , 1×10^{-6} und $1 \times 10^{-4} \text{ M}$ nach einstündiger Inkubation bei Raumtemperatur mittels Bestimmung der metabolischen Aktivität

Zur Herstellung der Versuchsansätze wurde zunächst die Zellzahl in der Suspension wie unter 2.1.3. beschrieben bestimmt. Bei ausreichender Menge und guter Qualität der Zellen wurden diese in einem 50 ml Zentrifugenröhrchen 5 min bei 1000 Upm zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgesaugt und das Zell-Pellet in Medium o. Z. aufgenommen. Die Zellzahl pro ml wurde erneut mit einer Neubauer-Zählkammer ermittelt. Die Verdünnung auf die gewünschte Zellzahl von 5×10^4 /ml erfolgte durch entsprechende Zugabe von Medium o. Z. Anschließend wurden Aliquots erstellt, die eine Stunde bei Raumtemperatur mit Usninsäure in ausgewählten Endkonzentrationen ($1 \times 10^{-8} \text{ M}$, $1 \times 10^{-6} \text{ M}$ oder $1 \times 10^{-4} \text{ M}$ in $0,2 \text{ \%}$ DMF) oder mit $0,2 \text{ \%}$ DMF inkubiert wurden. Nach Ablauf der Zeit wurden die Ansätze gewaschen, indem PBS zugesetzt und 10 min bei 1000 Upm zentrifugiert wurde. Der Überstand wurde vorsichtig abgesaugt und das Zell-Pellet erneut in entsprechender Menge Medium o. Z. aufgenommen. Daraufhin wurden die Zellen in einer Dichte von 5×10^4 /ml in 96well-Flachbodenplatten ausgesät und mit $50 \text{ }\mu\text{l}$ XTT-Reagenz pro $100 \text{ }\mu\text{l}$ Medium (s. 2.1.6.) $3,5 \text{ h}$ bei Kulturbedingungen inkubiert. Anschließend erfolgte die Messung der Absorption des Formazanderivates,

welches von den usninsäureinkubierten Zellen gebildet wurde. Als Kontrollen dienten Zellen in Medium o. Z. und Zellen in Medium plus 0,2 % DMF.

2.1.6.2. Untersuchungen zur Wirkung von Usninsäure in Konzentrationen von 1×10^{-8} , 1×10^{-6} und 1×10^{-4} M nach einstündiger Inkubation bei Raumtemperatur und UV-B-Bestrahlung in ausgewählten Dosen mittels Bestimmung der metabolischen Aktivität

Die Versuchsansätze wurden wie unter 2.1.5.1 beschrieben hergestellt. Weiterhin wurden die Zellen in einer Dichte von 5×10^4 /ml in den 96well-Flachbodenplatten ausgesät und daraufhin mit einem Abstand von 2 cm bestrahlt (s. 2.1.5.2.). Die Inkubation erfolgte bei Kulturbedingungen für 3,5 Stunden mit 50 µl XTT-Reagenz pro 100 µl Medium (s. 2.1.6.). Anschließend wurde die Absorption bei einer Wellenlänge von 492 nm bestimmt. Als Kontrollen dienten gleich stark bestrahlte Zellen in Medium o. Z. und Zellen in Medium plus 0,2 % DMF, sowie alle erwähnten Versuchsansätze im unbestrahlten Zustand.

2.1.6.3. Untersuchung zur Dunkeltoxizität von Usninsäure in Konzentrationen von 1×10^{-8} und 1×10^{-6} M nach 48-stündiger Inkubation bei 37 °C mittels Bestimmung der metabolischen Aktivität

Je 2 Zellkulturflaschen des Typs 1 mit jeweils 8 ml Jurkat-Zellsuspension in Vollmedium wurden mit Usninsäure in den Konzentrationen 1×10^{-8} und 1×10^{-6} M 48 Stunden bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Als Kontrollen dienten ebenfalls 48 Stunden bei 37 °C und 5 % CO₂ mit 0,2 % DMF in Vollmedium inkubierte Zellen sowie Zellen in Vollmedium ohne Zusätze. Nach dieser Inkubationszeit wurde zunächst die Zellzahl in den Zellkulturflaschen wie unter 2.1.3. beschrieben bestimmt. Bei ausreichender Anzahl der Zellen wurde die Suspension 5 min bei 1000 Upm zentrifugiert. Der Überstand konnte dann vorsichtig abgesaugt und die jeweiligen Pellets in Medium o. Z. aufgenommen werden. Aliquots von 100 µl wurden im 96well-Flachbodenplatten (5×10^3 Zellen/well) ausplattiert und mit 50 µl XTT-Reagenz pro 100 µl Medium (s. 2.1.6.) 3,5 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde die Absorption bei einer Wellenlänge von 492 nm bestimmt. Als Kontrollen dienten Zellen in Medium o. Z. und Zellen in Medium plus 0,2 % DMF.

2.1.6.4. Untersuchungen zur Wirkung von Usninsäure in Konzentrationen von 1×10^{-8} und 1×10^{-6} M nach 48-stündiger Inkubation 37 °C und UV-B-Bestrahlung von 20 mJ/cm² bis 1000 mJ/cm² mittels Bestimmung der metabolischen Aktivität

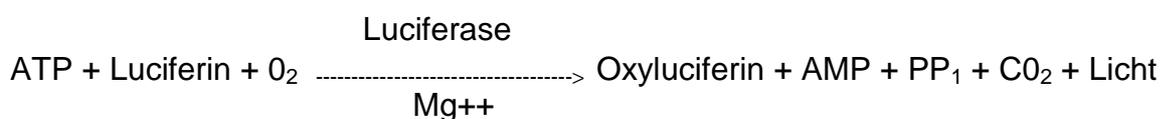
Zunächst wurden wie unter 2.1.5.1. beschrieben die benötigten Versuchsansätze hergestellt. Daraufhin erfolgte die Ausplattierung mit 5×10^5 Zellen/ml (100 µl/well) in 96-well-Flachbodenplatten. Die UV-B-Bestrahlung wurde in den Bestrahlungsdosen 20 mJ/cm² (= 10,5 sec), 100 mJ/cm² (= 52,4 sec) und 1000 mJ/cm² (= 524 sec) mit einem Abstand von 2 cm durchgeführt. Als Kontrollen dienten unbestrahlte Zellen, die mit identischen Usninsäurekonzentrationen inkubiert wurden, sowie Zellen in Medium o. Z. und Zellen in Medium mit Zusatz von 0,2 % DMF - jeweils bestrahlt und unbestrahlt. Die Bestrahlungszeit wurde mit einer Stoppuhr eingestellt. Danach erfolgte die Zugabe von 50 µl XTT-Reagenz pro 100 µl Medium aus 5,0 ml XTT-Labeling-Reagenz mit 0,1 ml Electron-coupling-Reagenz und eine Inkubation von 3,5 h bei 37 °C. Anschließend wurde die Absorption bei einer Wellenlänge von 492 nm bestimmt. Als Kontrollen dienten Zellen in Medium o. Z. und Zellen in Medium plus 0,2 % DMF, sowie alle Versuchsansätze im unbestrahlten Zustand.

2.1.7. Experimente mit HaCaT-Zellen

2.1.7.1. Toxizitätsbestimmung von Usninsäure in HaCaT-Zellkultur mittels Vialight-Assay (Biolumineszenz)

Prinzip der Methode

Das Biolumineszenz-Verfahren basiert auf dem so genannten Luciferin-Luciferase-System. Luciferasen sind in der Lage, in einer entsprechenden biochemischen Reaktion unter Zugabe von ATP (Energielieferant) und Sauerstoff die Umwandlung von Luciferin zu Oxyluciferin zu katalysieren.



Das dabei emittierte Licht kann als Signal gemessen werden und ist proportional zur vorliegenden ATP-Konzentration. Die quantitative Menge des ATP wiederum korreliert direkt mit der Anzahl an vitalen und metabolisch aktiven Zellen, die sich in Kultur befinden. Zur Anwendung kam der *ViaLight-Plus Cell Proliferation and Cytotoxicity BioAssay Kit* (Bioscience Ionza, USA).

Durchführung

Am ersten Tag der Versuchsdurchführung wurden HaCaT-Zellen mit einer Dichte von 5×10^3 Zellen/well in 100 μ l Magermedium in einer 96-well-Platte ausplattiert. Es wurden jeweils Triplikate je ausgewählter Endkonzentration der Usninsäure in Medium angesetzt. Es erfolgte eine Inkubation über Nacht bei 37 °C und am Folgetag die Zugabe der Testsubstanz in einem Konzentrationsbereich von $3,5 \times 10^{-10}$ bis 4×10^{-7} M Usninsäure (Carl Roth # 4565.1, Stammlösung: 1,28 mg/ml in 20 % Ethanol, alkalisiert, Endkonzentration Ethanol im Medium 1 %). Wieder wurden die Zellen 24 h inkubiert. Am Tag drei des Versuchsansatzes wurde die Kulturplatte zunächst auf Raumtemperatur gebracht und dann 50 μ l/well Lysis Reagenz hinzugegeben. Nach weiteren 20 min Inkubation wurden 100 μ l/well ATP-Monitoring Reagenz zugefügt und nach 2 min Wartezeit konnte die Messung mittels Luminometer (ELISA-Reader Sirius HAT, MWG Biotech, Ebersberg, BRD) erfolgen.

2.1.7.2. Messung reaktiver Sauerstoffspezies mittels DC-FDA-Assay und anschließende Messung der Vitalität mit Vialight Plus-Assay nach 4 h Inkubation

Beim DC-FDA-Assay (2',7-dichlorofluorescein-diacetat, Gibco, invitrogen Corporation, USA) handelt es sich um einen photometrisch kinetischen Assay, der aufgrund eines relativen Fluoreszenzanstiegs durch Oxidation des nichtfluoreszierenden DC-FDA zum fluoreszierenden Produkt 2',7'-Dichlorofluoreszein (DCF) die Bestimmung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) in der Zelle ermöglicht. Entwickelt wurde diese Methode von Keston und Brandt zur Detektion von Wasserstoffperoxid in Gegenwart von Peroxidase in einem zellfreien System⁶⁵. Die Messung intrazellulärer ROS in lebenden Zellen erfolgte im DC-FDA-Assay erstmals durch Bass⁵. Seitdem wurde diese Methode häufig eingesetzt, um intrazelluläre ROS mittels Fluoreszenz-Mikroskopie oder

Durchflusszytometrie sowie in neueren Arbeiten fluorimetrisch (Plattenphotometer) zu detektieren¹³⁴. Auch wenn die Spezifität des Tests nicht geklärt ist, ist dieser Assay eine Screening-Methode, die in Verbindung mit anderen Markern eine Aussage über das Ausmaß oxidativer Zellschädigung und deren Verringerung durch Antioxidantien zulässt⁴².

Prinzip der Methode

Der unpolare, nicht fluoreszierende Farbstoff DC-FDA diffundiert durch die Zellmembran ins Innere der Zelle und wird dort durch intrazelluläre Esterasen zu der nicht fluoreszierenden Substanz DCFH deacetyliert. DCFH wird durch ROS zu dem fluoreszierenden Farbstoff DCF oxidiert. Aufgrund seiner höheren Polarität kann der Farbstoff die Zellmembran nicht passieren und verbleibt in der Zelle. Der Farbstoff wird mit Licht einer Wellenlänge von 485 nm angeregt und die Fluoreszenz bei einer Wellenlänge von 525 nm gemessen⁸². Die Vermutung, dass die im DC-FDA-Assay ermittelte Fluoreszenz direkt proportional zur Konzentration von Wasserstoffperoxid ist, wurde in den letzten Jahren mehrfach widerlegt. Der Farbstoff reagiert nicht spezifisch mit reaktiven Sauerstoffspezies, vielmehr stellt er einen Detektor für verschiedene oxidierende Reaktionen dar⁵². Der DC-FDA-Assay bietet also die Möglichkeit, den Redoxstatus der Zelle zu erfassen und die Beeinflussung von ROS unter physiologischen Bedingungen zu untersuchen¹³⁴. Er lässt jedoch keine Aussage zu, welche ROS im Testsystem vorliegen.

Durchführung

Am ersten Tag der Versuchsdurchführung wurden HaCaT-Zellen mit einer Dichte von $0,5 \times 10^5$ HaCaT/ml in Vollmedium (2×10^4 HaCaT/well in 100 μ l) in einer 96-well-Platte (Weißrandplatten mit Flachboden für ROS-Messung und Vialight) ausplattiert. Benötigt werden zwei Platten, da eine im unbestrahlten Zustand belassen werden soll. Angesetzt wurden jeweils Triplikate je verwendeter Substanzkonzentration. Es erfolgte eine Inkubation über Nacht bei 37 °C und am Folgetag die Zugabe der Testsubstanz. Usninsäure wurde in ausgewählten Konzentrationen in Ethanol (alkalisiert) zugesetzt. Die Zellen wurden nun 30 Minuten bei Kulturbedingungen inkubiert. Darauf folgt eine 20-minütige Inkubation mit 5 μ M DC-FDA. Ab diesem Zeitpunkt sollten die Zellen im Dunkeln gehalten werden. Eine Abdeckung erfolgte mit Alufolie. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Zellen mit Licht eines Sonnensimulators (SSR, Oriol GmbH

& Co. KG, Darmstadt, BRD, Abb. 4) mit einem Abstand von 40 cm bestrahlt, wobei die Zellkulturplatten auf Eis gelagert wurden. Bei einer durchschnittlichen Bestrahlungsstärke von 84 mW/cm² resultiert eine Dauer von 72 Sekunden für eine Bestrahlungsdosis von 24 mJ/cm². Nach der Bestrahlung wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen und mit 100 µl Magermedium versehen. Im ELISA-Reader wurde sodann die intrazelluläre Fluoreszenz gemessen (Excitation: 485 nm und Emission: 528 nm) Nach der Messung wurden die Zellkulturplatten für weitere 4 Stunden bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert, da eine Messung der Vitalität der HaCaT-Zellen mittels Vialight-Assay (s. 2.1.7.1.) durchgeführt werden sollte.

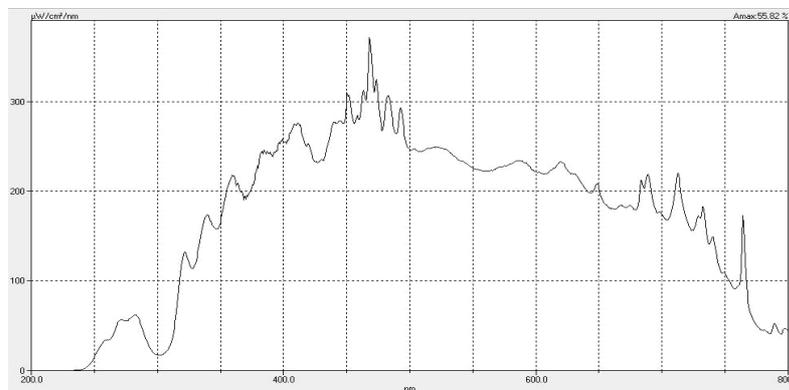


Abb. 4: Spektrum Oriel 1000 W Sonnensimulator ohne AW 1.5 Filter *

2.1.8. Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung und graphische Darstellung erfolgte mit dem Programm Microsoft Office Excel 2003. Die Ergebnisse werden als Mittelwerte und Standardabweichung angegeben.

Die Signifikanzen wurden mittels Mann-Whitney-U-Test berechnet. Differenzen zwischen Kontrollen und usninsäureinkubierten Zellen gelten als signifikant, wenn $p < 0,05$ und als hochsignifikant wenn $p < 0,01$.

* Mit freundlicher Genehmigung der Arbeitsgruppe „skintegral“, Universitäts-Hautklinik, Freiburg im Breisgau

2.2. Materialien und Geräte

Tabelle 1: Zelllinien

Zelllinie	Hersteller, Herkunftsort/-land
HaCat-Zellen	Skintegral, Hautklinik der Albert-Ludwigs-Universität Freiburg, BRD
Jurkat-Zellen	Hautphysiologie der Charité´ Universitätsmedizin Berlin, BRD

Tabelle 2: Pflanzenextrakte

Extrakt	Hersteller, Herkunftsort/-land
(+)-Usninsäure Rotichrom® 4565.	Carl Roth GmbH & CO. KG, Karlsruhe, BRD
Usninsäure (Pulverform)	Prof. Fernandez, Valparaiso, Chile

Tabelle 3: Geräte

Gerät	Hersteller, Herkunftsort/-land
CO ₂ -Brutschrank Function Line	Heraeus Instruments GmbH, Osterode, BRD
Doppelmonochromator-Spektrometrometer OL 754	Optronic, Orlando, USA
ELISA-Reader Sirius HT	MWG Biotech, Ebersberg, BRD
GS-15R Zentrifuge (Zentrifuge 2)	Beckmann Coulter GmbH, Krefeld, BRD
Lichtmikroskop Axiovert 135	Carl Zeiss AG, Oberkochen, BRD
Lichtmikroskop BO61	Olympus Corporation, Japan
Megafuge 3.OR (Zentrifuge 1)	Heraeus Sepatech GmbH, Osterode, BRD
Sonnensimulator	Oriel GmbH & Co. KG, Darmstadt, BRD
Sterilbank	Heraeus Instruments GmbH, Osterode, BRD
UV-B Lampe TL40W/01	Philips electronics, Amsterdam, NL

Tabelle 4: Verbrauchsmaterialien

Produkt	Hersteller/ Herkunftsort/-land
<i>Blue cap</i> 15 ml	BD bioscience, USA
Kryo-Vials (2 ml)	Greiner Bio-one GmbH, Frickenhausen BRD
Mikrotiterplatten 96 well	Greiner Bio-one GmbH, Frickenhausen BRD
Mikrotiterplatten 24 well	Sarstedt, Nümbrecht, BRD
Neubauer-Zählkammer	Fein-Optik, Bad Blankenburg, BRD
Röhre 50 ml	Sarstedt, Nümbrecht, BRD
<i>Save-lock-tubes</i> (1,5 ml, 2 ml)	Eppendorf AG, Hamburg, BRD
Weißrand-Mikrotiterplatten 96 well, Flachboden	Bioscience Ionza, Rockland, USA
Zellkulturflaschen Typ 1 (25 cm ² , 50 ml)	BD bioscience, USA
Zellkulturflaschen Typ 2 (75 cm ² , 250 ml)	BD bioscience, USA

Tabelle 5: Medien und Reagenzien

Produkt	Hersteller, Herkunftsort/-land
Cell Proliferation Kit II (XTT)	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, BRD
CM-HDC-FDA (5-(and-6)-chloromethyl- 2',7-dichlorodihydrofluorescein-diacetate acetylesther	Gibco invitrogen Corporation, UK
<i>N,N</i> -Dimethylformamid 99,8 % (DMF)	Sigma-Aldrich Corporation, USA
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich Corporation, USA
DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium High Glucose 1X)	Biochrom AG, Berlin, BRD
EDTA 0,5 M, pH 8,0	Gibco invitrogen Corporation, UK
Erythrosin B Stain Solution (0,1 % in PBS)	ATCC invitrogen Corporation, UK
Ethanol (100 %ig)	Merck KGaA, Darmstadt, BRD

Fetal calf serum (FCS)	Biochrom AG, Berlin, BRD
Hepes 100x	Gibco invitrogen Corporation, UK
L-Glutamin 200 mM (100x)	Gibco invitrogen Corporation, UK
(D-) PBS (1x) -CaCl ₂ /MgCl ₂	Gibco invitrogen Corporation, UK
MEN (Aminosäuremix)	Gibco invitrogen Corporation, UK
Mykoplasmen- <i>Detection-Kit</i>	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, BRD
1 M NaOH	Merck KGaA, Darmstadt, BRD
Penicillin/Streptomycin 10.000 U/ 10000µg/ml	Biochrom AG. Berlin, BRD
RPMI 1640 mit/ ohne Phenolrot	Gibco invitrogen Corporation, UK
Trypanblau	Merck KGaA, Darmstadt, BRD
Trypsin/ EDTA 0,05/0,02 % in PBS	PAN Biotech GmbH, Aidenbach, BRD
Vialight plus cell proliferation and cytotoxicity Bioassay kit	Bioscience Ionza, Rockland, USA

Tabelle 6: Kulturmedien, Lösungen, Puffer

Name	Einsatz	Zusammensetzung
Erythrosin B Stain Solution	Zellzählung	0,1 % in PBS
Kulturmedium HaCaT-Zellen	Zellkultur	DMEM mit Phenolrot mit Zugabe von: <ul style="list-style-type: none"> • 10 % FCS
Kulturmedium Jurkat-Zellen	Zellkultur	RPMI 1640 mit Phenolrot mit Zugabe von: <ul style="list-style-type: none"> • 10 % FCS • 1 % Pen/Strept • 1 % L-Glutamin
Magermedium	Experimente mit HaCaT-Zellen	DMEM mit Phenolrot mit Zugabe von: <ul style="list-style-type: none"> • 1 % Pen/Strept • 1 % Hepes • 1 % MEN • 1 % FBS

Medium ohne Zusätze	Experimente mit Jurkat-Zellen	RPMI 1640 o. Phenolrot /o Zusätze
Trypanblaulösung	Zellzählung	0,1 % in PBS (1x)
Usninsäure-Lösung	Experimente mit Jurkat- und HaCaT-Zellen	12,8 mg Usninsäure Pulver gelöst in <ul style="list-style-type: none"> • 20 % Ethanol (70 %) • H₂O • NaOH

Tabelle 7: Sonstige, im Text nicht näher erwähnte Materialien und Geräte

Produkt	Hersteller, Herkunftsort/-land
Combitips 1= 100 µl 1= 10 µl	Eppendorf AG, Hamburg, BRD
Ep T.I.P.S. Standard 50 µl – 1000 µl 2 µl – 200 µl	Eppendorf AG, Hamburg, BRD
<i>Pipetboy-acu</i>	integra Biosiece, Fernwald, BRD
Pipetten Eppendorf research 2 µl-20 µl 20 µl-200 µl 100 µl-1000 µl	Eppendorf AG, Hamburg, BRD
Pipetten Finntip (50 – 300 µl)	Labsystems GmbH, Frankfurt, BRD
Pipetten (5 ml, 10 ml, 25 ml)	BD bioscience, USA
IKA-Schüttler-MTS 4	Janke & Kunkel Labortechnik
Multipipette Finnpipette (50 – 300 µl)	Labsystems GmbH, Frankfurt, BRD
Multipipette plus	Eppendorf AG, Hamburg, BRD
Vortexer Vibrofix VF 1	Janke & Kunkel IKA- Labortechnik, Staufen, BRD
Wasserbad Julabo SW-20C	Julabo Laborteck GmbH, Seelbach, BRD

3. Ergebnisse I

3.1. Die Wirkung von Usninsäure an menschlichen lymphoiden Zellen bei Ultraviolett-B-Lichtbestrahlung – direkte Membranzytotoxizität

3.1.1. Untersuchung zur Dunkeltoxizität von Usninsäure in Konzentrationen von 1×10^{-8} und 1×10^{-6} M nach einstündiger Inkubation bei Raumtemperatur

Die Ergebnisse der Experimente zur Dunkeltoxizität sind in den Abbildungen 3.1.1.a und 3.1.1.b dargestellt. Als Kontrollen dienten Jurkat-Zellen in Medium ohne Zusätze (Medium o. Z.), sowie Zellen in Medium plus 0,2 % Dimethylformamid, welches als Lösungsmittel für die Usninsäure verwendet wurde. Die Inkubationszeit betrug jeweils eine Stunde bei etwa 22 °C. Nach dem Waschen mit PBS wurden die Zellen mit Eosin 0,1 % in PBS, 5 µl auf 200 µl Zellsuspension, angefärbt und unter dem Lichtmikroskop in einer Neubauer-Zählkammer ausgezählt. Mittelwerte und Standardabweichung wurden stets aus 24 Einzelversuchen ermittelt (s. Abb. 3.1.1.a bis 3.1.1.c).

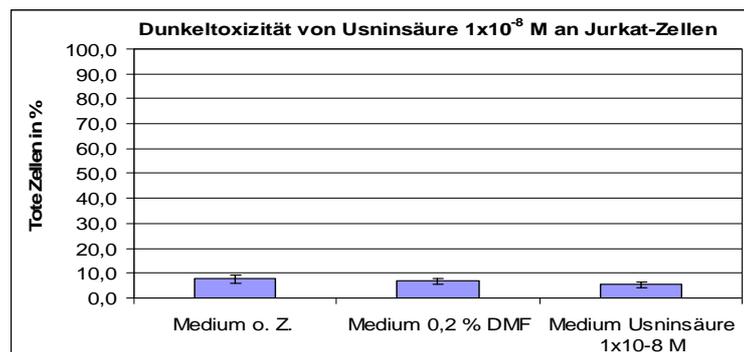


Abb. 3.1.1.a: Eosinpositive Zellen in % nach einer Stunde Inkubation in Medium ohne jeglichen Zusatz, mit Zusatz von 0,2 % DMF oder 1×10^{-8} M Usninsäure (mit 0,2 % DMF). Mittelwerte und Standardabweichung aus 24 Einzelversuchen.

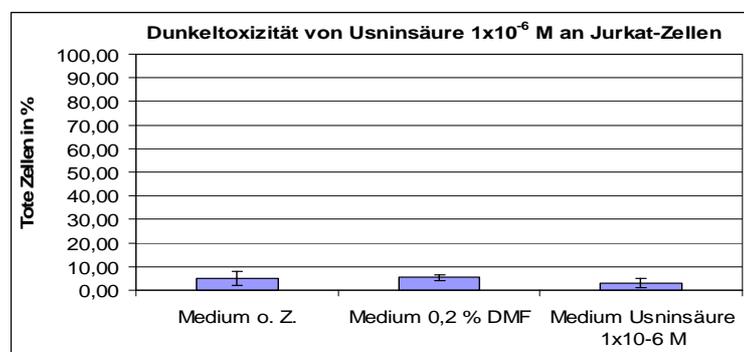


Abb. 3.1.1.b.: Eosinpositive Zellen in % nach einer Stunde Inkubation in Medium ohne jeglichen Zusatz, mit Zusatz von 0,2 % DMF oder 1×10^{-6} M Usninsäure (mit 0,2 % DMF). Mittelwerte und Standardabweichung aus 24 Einzelversuchen.

Die Experimente zur Dunkeltoxizität von Usninsäure zeigen keine signifikanten Unterschiede ($p > 0,05$) in den Totzellraten von Zellen in Medium o. Z., Medium plus 0,2 % DMF und Medium plus 1×10^{-8} M bzw. 1×10^{-6} M Usninsäure (plus 0,2 % DMF). In Zellkulturen entspricht üblicherweise eine Totzellrate von ≤ 10 % der Spontanabsterberate.

Resultat

Eine zytotoxische Wirkung der Usninsäure liegt in einem Bereich von 1×10^{-8} bis 1×10^{-6} M im Dunkeln nicht vor ($p > 0,05$).

3.1.2. Untersuchungen zur Wirkung von Usninsäure in Konzentrationen von 1×10^{-8} und 1×10^{-6} M nach einstündiger Inkubation bei Raumtemperatur und UV-B-Bestrahlung von 20 mJ/cm² bis 1000 mJ/cm²

Die Abbildung 3.1.2.a zeigt den Anteil überlebender Zellen in % in Medium ohne Zusätze nach UV-B-Lichtbestrahlung in Dosen von 20 mJ/cm², 100 mJ/cm² und 1000 mJ/cm². Nach der Bestrahlung wurde der Anteil eosinpositiver Zellen unter dem Lichtmikroskop in einer Neubauer-Zählkammer ermittelt. Abbildungen 3.1.2.b und 3.1.2.c zeigen die Totzellrate in % der mit Usninsäure in Konzentrationen von 1×10^{-8} bzw. 1×10^{-6} M (mit 0,2 % DMF) eine Stunde inkubierten Zellen. Um vergleichbare Überlebensraten für alle Einzelexperimente unter den ausgewählten Bestrahlungsdosen zu erhalten, wurde der Anteil überlebender Zellen korrigiert, indem der Anteil überlebender Zellen bei 0 J/cm² UV-B (Dunkelkontrolle) gleich 100 % gesetzt wurde und damit der Anteil überlebender Zellen unter UV-B-Bestrahlung errechnet wurde. Die Berechnung des Anteils überlebender Zellen nach UV-B-Bestrahlung erfolgte demnach nach folgender Formel:

$$\frac{\text{Lebende Zellen bei } X \text{ J/cm}^2 \text{ UVB}}{\text{Lebende Zellen bei } 0 \text{ J/cm}^2 \text{ UVB}} \times 100 \% = X \% \text{ lebende Zellen nach UV-Bestrahlung}$$

Die Untersuchungen zur Überlebensrate der Jurkat-Zellen nach UV-B-Bestrahlung in Dosen von 0 mJ/cm², 20 mJ/cm², 100 mJ/cm² und 1000 mJ/cm² in Medium o. Z. ergaben die in der Abbildung 3.1.2.a dargestellten Werte.

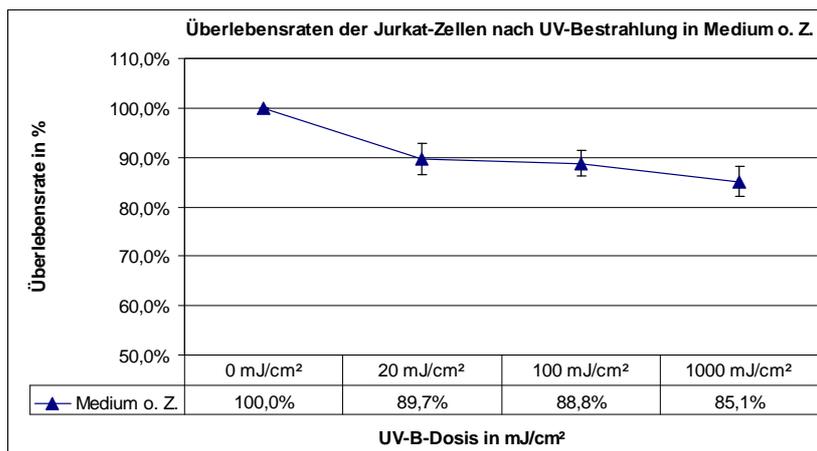


Abb.3.1.2.a: Anteil überlebender Zellen in % in Medium o. Z. Die Überlebensrate der Zellen unter den einzelnen UV-B-Dosen wurde durch oben genannte Korrekturrechnung ermittelt. Mittelwert und Standardabweichung aus 48 Einzelexperimenten.

Nach UV-B-Bestrahlung zeigt sich eine Reduktion der überlebenden Zellen im Eosintest bei 20 mJ/cm² um 10,3 % (Überlebensrate 89,7 % ±3,2), bei 100 mJ/cm² um 11,2 % (Überlebensrate 88,8 % ±2,5) und bei 1000 mJ/cm² um 14,9 % (Überlebensrate 85,1 % ±3,1). Es besteht ein signifikanter Unterschied ($p < 0,01$) von der Überlebensrate der Jurkat-Zellen im Dunkeln und solchen, die mit 20 mJ/cm², 100 mJ/cm² und 1000 mJ/cm² UV-B- Licht bestrahlt wurden.

Die Untersuchungen zur Überlebensrate der Jurkat-Zellen nach UV-B-Bestrahlung in Dosen von 0 mJ/cm², 20 mJ/cm², 100 mJ/cm² und 1000 mJ/cm² in Medium mit Zusatz von 1×10^{-8} bzw. 1×10^{-6} M Usninsäure ergaben die in den Abbildungen 3.1.2.b und 3.1.2.c dargestellten Werte.

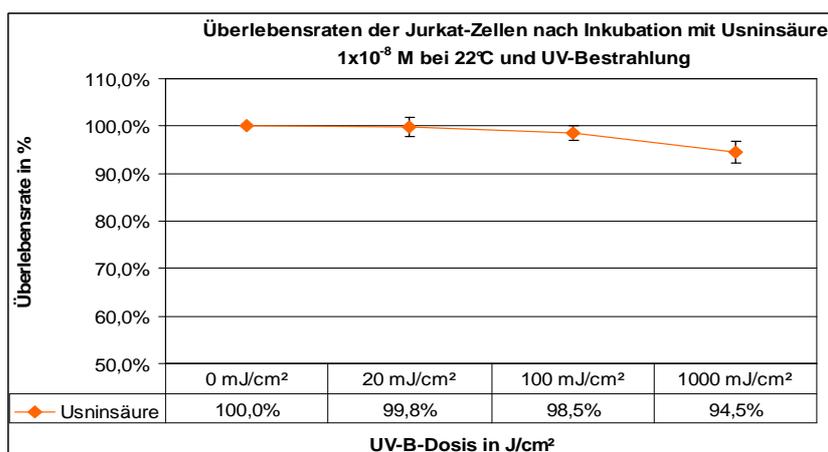


Abb. 3.1.2.b: Anteil überlebender Zellen in % in Medium nach Inkubation mit Usninsäure 1×10^{-8} M und Zusatz von 0,2 % DMF. Die Überlebensrate der Zellen unter den einzelnen UV-B-Dosen wurde durch oben genannte Korrekturrechnung ermittelt. Mittelwert und Standardabweichung aus je 24 Einzelexperimenten.

Bei einer Inkubation mit Usninsäure in einer Konzentration von 1×10^{-8} M eine Stunde bei Raumtemperatur beträgt die Rate überlebender Zellen bei 20 mJ/cm^2 $99,8 \% \pm 2,1$, bei 100 mJ/cm^2 $98,5 \% \pm 1,5$ und bei 1000 mJ/cm^2 $94,5 \% \pm 2,4$.

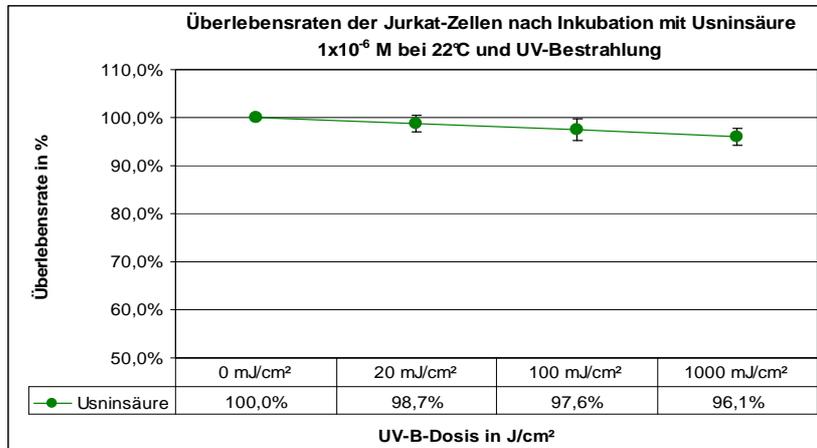


Abb.3.1.2.c: Anteil überlebender Zellen in % in Medium nach Inkubation mit Usninsäure 1×10^{-6} M und Zusatz von 0,2 % DMF. Die Überlebensrate der Zellen unter den einzelnen UV-B-Dosen wurde durch oben genannte Korrekturrechnung ermittelt. Mittelwert und Standardabweichung aus je 24 Einzelexperimenten.

Werden die Zellen vor der Bestrahlung mit 1×10^{-6} M Usninsäure inkubiert, zeigt sich ein Abfall der überlebenden Zellen von $98,7 \% \pm 1,7$ bei 20 mJ/cm^2 (Totzellrate = 1,3 %) über $97,6 \% \pm 2,2$ bei 100 mJ/cm^2 (Totzellrate = 2,4 %) bis zu $95,1 \% \pm 1,7$ bei 1000 mJ/cm^2 (Totzellrate = 3,9 %).

Der Vergleich der Kurven der Überlebensraten der Zellen nach Inkubation mit 1×10^{-8} M und 1×10^{-6} M Usninsäure (mit Zusatz von 0,2 % DMF) mit Zellen in Medium o. Z. zeigt eine deutlich verbesserte Überlebensrate in beiden Usninsäurekonzentrationen zur Überlebensrate der Zellen im Medium o. Z. (siehe Abb. 3.1.2.d). Ein signifikanter Unterschied mit $p < 0,01$ besteht für die Überlebensrate der Jurkat-Zellen in Medium o. Z. unter den angegebenen UV-B-Bestrahlungsdosen im Vergleich zur Überlebensrate mit usninsäureinkubierten Zellen (1×10^{-8} M und 1×10^{-6} M) unter gleichen UV-B-Bestrahlungsdosen.

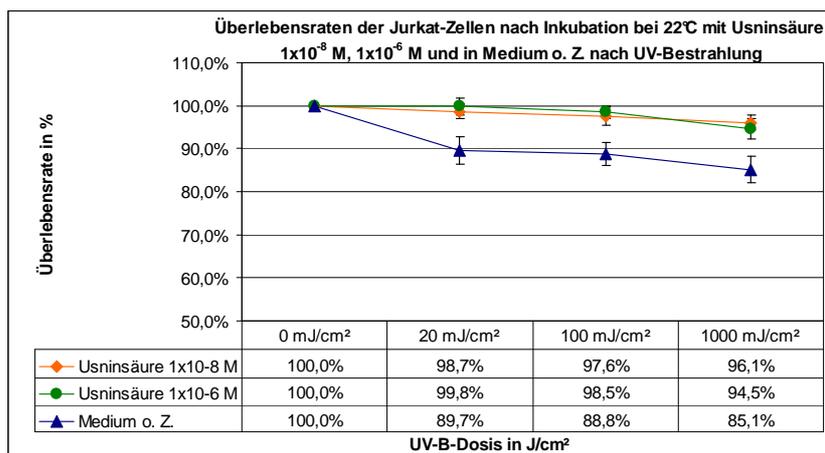


Abb. 3.1.2.d: Vergleich der Überlebensrate in % von mit Usninsäure 1x10⁻⁸ M und 1x10⁻⁶ M (mit Zusatz von 0,2 % DMF) inkubierten Zellen zur Überlebensrate von Zellen in Medium o. Z. Die Überlebensrate der Zellen unter den einzelnen UV-B-Dosen wurde durch oben genannte Korrekturrechnung ermittelt. Mittelwert und Standardabweichung aus 24 bzw. 48 Einzelexperimenten.

Resultat

Inkubation von Jurkat-Zellen mit Usninsäure in Konzentrationen von 1x10⁻⁸ bis 1x10⁻⁶ M verbessert die Überlebensrate der Zellen bei UV-B-Bestrahlung von 20 mJ/cm² bis 1000 mJ/cm² signifikant ($p < 0,01$) im Vergleich zu UV-B-bestrahlten Zellen (gleiche Dosen) in Medium o. Z.

Weiterhin ist aus der Abbildung ersichtlich, dass ein Abfall der Überlebensrate der eingesetzten Zellen mit zunehmenden Bestrahlungsdosen von 20 mJ/cm² bis 1000 mJ/cm² UV-B besteht. Bei Zellen in Medium o. Z. beträgt dieser zwischen der Dunkelkontrolle (0 mJ/cm²) und der hier als Maximaldosis gewählten 1000 mJ/cm² 14,9 % aller lebenden Zellen. Bei den mit 1x10⁻⁸ M Usninsäure Inkubierten hingegen ist eine Reduktion der überlebenden Zellen um 5,5 % und bei den Zellen, die mit 1x10⁻⁶ M Usninsäure inkubiert wurden, lediglich um 3,9 % zu beobachten.

Zwischen den beiden gewählten Konzentrationen der Usninsäure besteht ein geringer Unterschied der Überlebensraten von 1,1 % bei 20 mJ/cm² und von 0,9 % bei 100 mJ/cm². Bei 1000 mJ/cm² liegt ein Unterschied von 1,6 % vor, wobei hier die höhere Überlebensrate die Zellen aufweisen, die mit der höheren Usninsäurekonzentration

behandelt wurden. Es besteht jedoch kein signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen Usninsäurekonzentrationen ($p > 0,05$).

Resultat

Zwischen den Usninsäurekonzentrationen 1×10^{-8} und 1×10^{-6} M besteht kein signifikanter Unterschied ($p > 0,05$) in der protektiven Wirkung dieser Substanz gegenüber UV-B-Licht von 20 mJ/cm² bis 1000 mJ/cm².

3.1.3. Untersuchungen zur Wirkung von Usninsäure in Konzentrationen von 1×10^{-8} und 1×10^{-6} M nach einstündiger Inkubation bei Raumtemperatur und UV-B-Bestrahlung von 20 mJ/cm² bis 1000 mJ/cm² nach Korrektur des Einflusses von Dimethylformamid (DMF) als Usninsäurelösungsmittel

Usninsäure ist schwer löslich. Erfolgreich konnte sie im Hinblick auf Experimente mit Jurkat-Zellen in Dimethylformamid (DMF) gelöst werden. Die niedrigste erreichte Endkonzentration im Inkubationsmedium betrug dabei 0,2 %. Um einen möglichen antioxidativen Effekt von DMF nachzuweisen oder auszuschließen und diesen durch Korrekturrechnungen von der Wirkung der Usninsäure abzugrenzen, wurden die Ergebnisse der Experimente unter 3.1. folgendermaßen korrigiert:

$$\begin{aligned} & [(\% \text{ lebende Zellen in Medium mit Usninsäure in DMF unter UV-B}) - (\% \text{ lebende Zellen} \\ & \quad \text{in Medium mit DMF})] + (\% \text{ lebende Zellen in Medium unter UV-B}) \\ & = \% \text{ lebende Zellen in Medium mit Usninsäure} \end{aligned}$$

Die Ergebnisse sind in den Abbildungen 3.1.3.a und 3.1.3.b dargestellt:

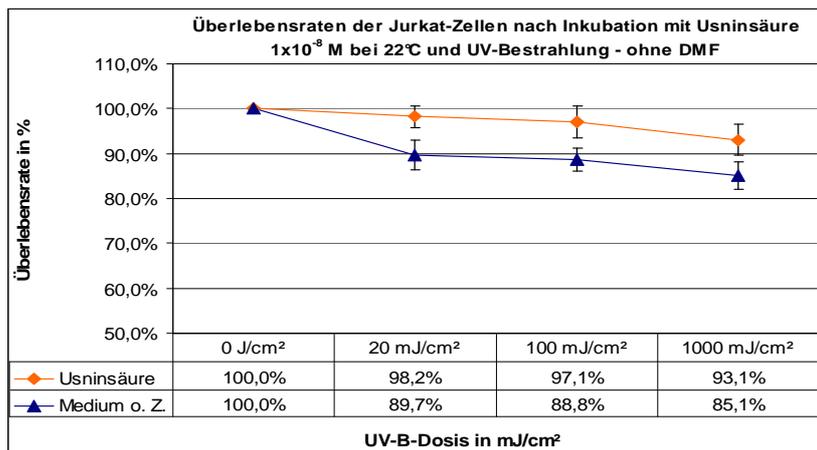


Abb. 3.1.3.a: Vergleich der Überlebensrate in % von mit 1×10^{-8} M Usninsäure inkubierten Zellen zur Überlebensrate von Zellen in Medium o. Z. Eine eventuelle Wirkung von DMF wurde durch oben genannte Korrekturrechnung eliminiert. Mittelwert und Standardabweichung aus 24 bzw. 48 Einzelversuchen.

Bei einer Inkubation mit Usninsäure in einer Konzentration von 1×10^{-8} M eine Stunde bei Raumtemperatur und nach Korrektur beträgt die Rate überlebender Zellen bei 20 mJ/cm² 98,2 % $\pm 2,4$, bei 100 mJ/cm² 97,1 % $\pm 3,6$ und bei 1000 mJ/cm² 93,1 % $\pm 3,4$. Ein hochsignifikanter Unterschied mit $p < 0,01$ besteht für die Überlebensrate der mit usninsäureinkubierten Zellen (1×10^{-8} M) unter den angegebenen UV-B-Bestrahlungsdosen im Vergleich zur Überlebensrate der Jurkat-Zellen in Medium o. Z. unter gleichen UV-B-Bestrahlungsdosen. Im Einzelnen sind dies bei 20 mJ/cm² 8,5 %, bei 100 mJ/cm² 8,3 % und bei 1000 mJ/cm² 8 %.

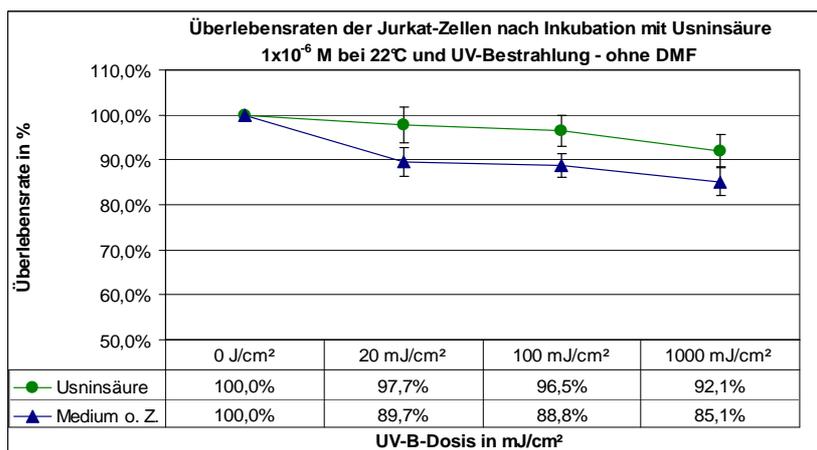


Abb. 3.1.3.b: Vergleich der Überlebensrate in % von mit Usninsäure 1×10^{-6} M inkubierten Zellen zur Überlebensrate von Zellen in Medium o. Z. Eine eventuelle Wirkung von DMF wurde durch die beschriebene Korrekturrechnung eliminiert. Mittelwert und Standardabweichung aus 24 bzw. 48 Einzelversuchen.

Aus der Abbildung 3.1.3.b wird ersichtlich, dass bei einer Inkubation mit 1×10^{-6} M Usninsäure eine signifikant höhere Überlebensrate im Vergleich zu Zellen in Medium o. Z. besteht. Im Einzelnen sind dies bei 20 mJ/cm^2 7,4 % (Überlebensrate der Zellen nach Inkubation mit Usninsäure $97,73 \% \pm 4,0$), bei 100 mJ/cm^2 7,9 % (Überlebensrate der Zellen nach Inkubation mit Usninsäure $96,46 \% \pm 3,3$) - in beiden Fällen ist $p < 0,01$ - und bei 1000 mJ/cm^2 6,4 % (Überlebensrate der Zellen nach Inkubation mit Usninsäure $92,05 \% \pm 3,6$) ($p = 0,045$). Im Vergleich der Usninsäurekonzentrationen untereinander zeigen sich geringe Unterschiede im ermittelten Überleben der Jurkat-Zellen. Diese haben sich jedoch als nicht signifikant ergeben ($p > 0,05$).

Resultat

Nach rechnerischer Korrektur der Wirkung von DMF unter UV-B-Bestrahlung ergeben sich erhöhte Überlebensraten in beiden untersuchten Konzentrationen der eingesetzten Usninsäure ($p < 0,01$). Die Unterschiede in den Überlebensraten zwischen den beiden untersuchten Usninsäurekonzentrationen sind nicht signifikant ($p > 0,05$).

3.1.4. Untersuchung zur Dunkeltoxizität von Usninsäure in Konzentrationen von 1×10^{-8} und 1×10^{-6} M nach 48-stündiger Inkubation bei 37°C

Die Ergebnisse der Experimente zur Dunkeltoxizität nach 48-stündiger Inkubation im Brutschrank sind in den Abbildungen 3.1.4.a und 3.1.4.b dargestellt. Als Kontrollen dienten Jurkat-Zellen in Medium ohne jegliche Zusätze (Medium o. Z.), sowie Zellen in Medium plus 0,2 % Dimethylformamid, welches als Lösungsmittel für die Usninsäure verwendet wurde. Die Inkubationszeit betrug jeweils 48 Stunden bei 37°C und 5 % CO_2 . Nach dem Waschen mit PBS wurden die Zellen mit Eosin 0,1 % in PBS, 5 μl auf 200 μl Zellsuspension, angefärbt und unter dem Lichtmikroskop in einer Neubauer-Zählkammer ausgezählt. Mittelwerte und Standardabweichung wurden stets aus 24 Einzelversuchen ermittelt (s. Abbildung 3.1.4.a und 3.1.4.b).

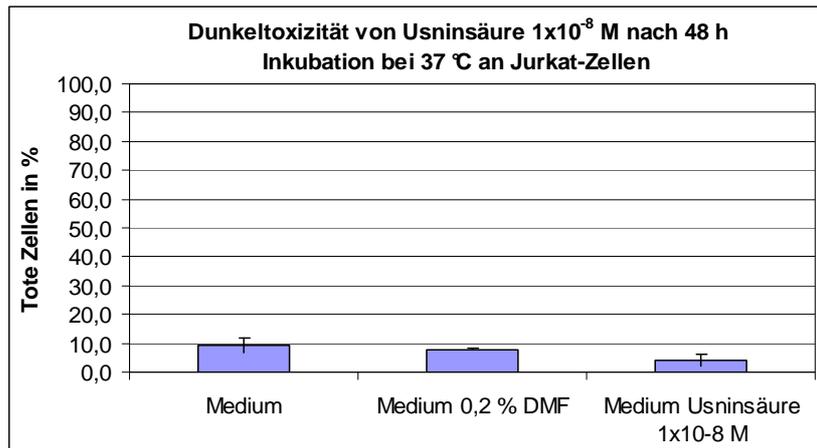


Abb. 3.1.4.a: Eosinpositive Zellen in % nach 48 Stunden Inkubation in Medium ohne jeglichen Zusatz, mit Zusatz von 0,2 % DMF oder 1x10⁻⁸ M Usninsäure (mit 0,2 % DMF). Mittelwerte und Standardabweichung aus 24 Einzelversuchen.

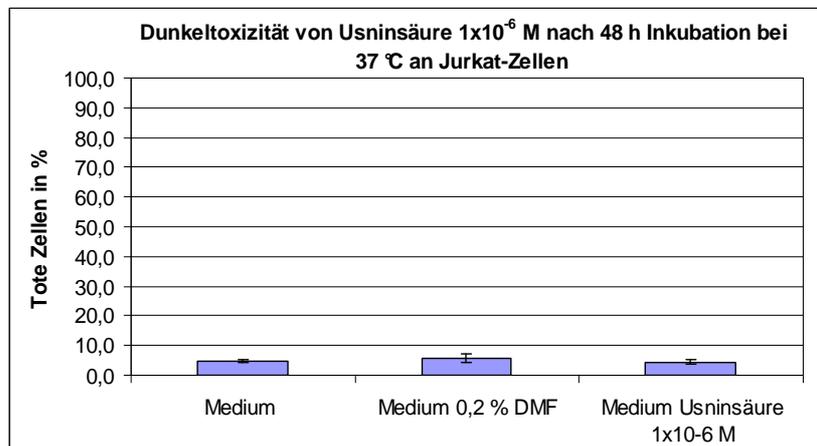


Abb. 3.1.4.b: Eosinpositive Zellen in % nach 48 Stunden Inkubation in Medium ohne jeglichen Zusatz, mit Zusatz von 0,2 % DMF oder 1x10⁻⁶ M Usninsäure (mit 0,2 % DMF). Mittelwerte und Standardabweichung aus 24 Einzelversuchen.

Die Experimente zur Dunkeltoxizität von Usninsäure zeigen keine signifikanten Unterschiede ($p > 0,05$) in den Totzellraten von Zellen in Medium o. Z., Medium plus 0,2 % DMF und Medium plus 1x10⁻⁸ M bzw. 1x10⁻⁶ M Usninsäure (plus 0,2 % DMF). In Zellkulturen entspricht üblicherweise eine Totzellrate von ≤ 10 % der Spontanabsterberate.

Resultat

Eine zytotoxische Wirkung der Usninsäure liegt in einem Bereich von 1x10⁻⁸ bis 1x10⁻⁶ M im Dunkeln nach 48-stündiger Inkubation nicht vor.

3.1.5. Untersuchungen zur Wirkung von Usninsäure in Konzentrationen von 1×10^{-8} und 1×10^{-6} M nach 48-stündiger Inkubation bei 37 °C und UV-B- Bestrahlung von 20 mJ/cm² bis 1000 mJ/cm²

Die Abbildung 3.1.5.a zeigt den Anteil Überlebender Zellen in % in Medium ohne Zusätze bei UV-B-Lichtbestrahlung in Dosen von 20 mJ/cm², 100 mJ/cm² und 1000 mJ/cm². Nach der Bestrahlung wurde der Anteil eosinpositiver Zellen unter dem Lichtmikroskop in einer Neubauer-Zählkammer ermittelt. Abbildungen 3.1.5.b und 3.1.5.c zeigen die Totzellrate in % der mit Usninsäure in Konzentrationen von 1×10^{-8} bzw. 1×10^{-6} M 48 Stunden inkubierten Zellen. Um vergleichbare Überlebensraten für alle Einzelexperimente unter den ausgewählten Bestrahlungsdosen zu erhalten, wurde der Anteil überlebender Zellen korrigiert, indem der Anteil überlebender Zellen bei 0 J/cm² UV-B (Dunkelkontrolle) gleich 100 % gesetzt wurde und damit der Anteil überlebender Zellen unter UV-B-Bestrahlung errechnet wurde. Die Berechnung des Anteils überlebender Zellen nach UV-B-Bestrahlung erfolgte demnach nach folgender Formel (s. 3.1.2):

Lebende Zellen bei X J/cm² UVB

$$\frac{\text{Lebende Zellen bei X J/cm}^2 \text{ UVB}}{\text{Lebende Zellen bei 0 J/cm}^2 \text{ UVB}} \times 100 \% = X \% \text{ lebende Zellen nach UV-Bestrahlung}$$

Lebende Zellen bei 0 J/cm² UVB

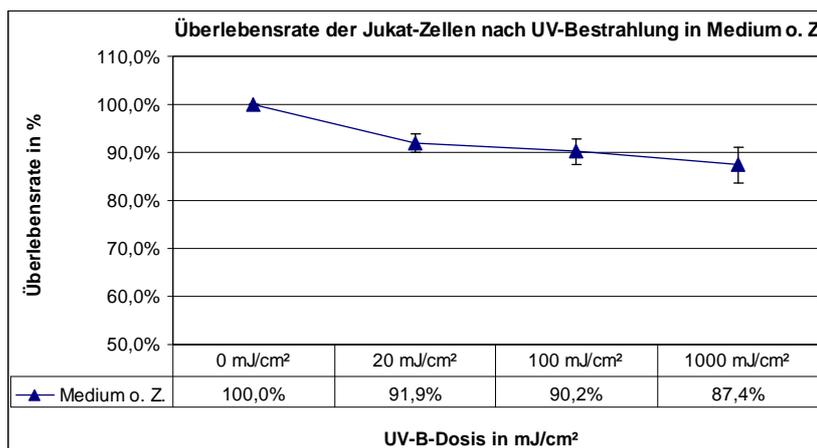


Abb. 3.1.5.a: Anteil überlebender Zellen in % in Medium o. Z., Die Überlebensrate der Zellen unter den einzelnen UV-B-Dosen wurde durch oben genannte Korrekturrechnung ermittelt. Mittelwert und Standardabweichung aus 24 Einzelexperimenten.

Die Untersuchungen zur Überlebensrate der Jurkat-Zellen nach UV-B-Bestrahlung in Dosen von 0 mJ/cm², 20 mJ/cm², 100 mJ/cm² und 1000 mJ/cm² ergaben die in der

Abbildung 3.1.2.a und 3.1.2.b dargestellten Werte. Nach UV-B-Bestrahlung zeigt sich eine Reduktion der überlebenden Zellen im Eosintest bei 20 mJ/cm² um 8,1 % (Überlebensrate 91,9 % ±2,0), bei 100 mJ/cm² um 9,8 % (Überlebensrate 90,2 % ±2,6) und bei 1000 mJ/cm² um 12,6 % (Überlebensrate 87,4 % ±3,8). Es besteht ein signifikanter Unterschied ($p < 0,01$) von der Überlebensrate der Jurkat-Zellen im Dunkeln und solchen, die mit 20 mJ/cm², 100 mJ/cm² und 1000 mJ/cm² UV-B- Licht bestrahlt wurden.

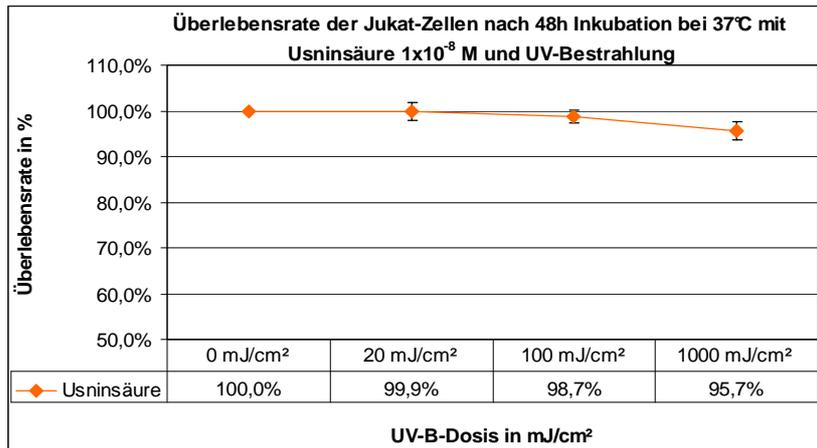


Abb. 3.1.5.b: Anteil überlebender Zellen in % in Medium nach 48-stündiger Inkubation mit Usninsäure 1×10^{-8} M und Zusatz von 0,2 % DMF. Die Überlebensrate der Zellen unter den einzelnen UV-B-Dosen wurde durch oben genannte Korrekturrechnung ermittelt. Mittelwert und Standardabweichung aus 12 Einzelexperimenten.

Bei einer Inkubation mit Usninsäure in einer Konzentration von 1×10^{-8} M 48 Stunden im Inkubator beträgt die Rate überlebender Zellen bei 20 mJ/cm² 99,9 % ±1,9, bei 100 mJ/cm² 98,7 % ± 1,3 und bei 1000 mJ/cm² 95,7 % ±1,9.

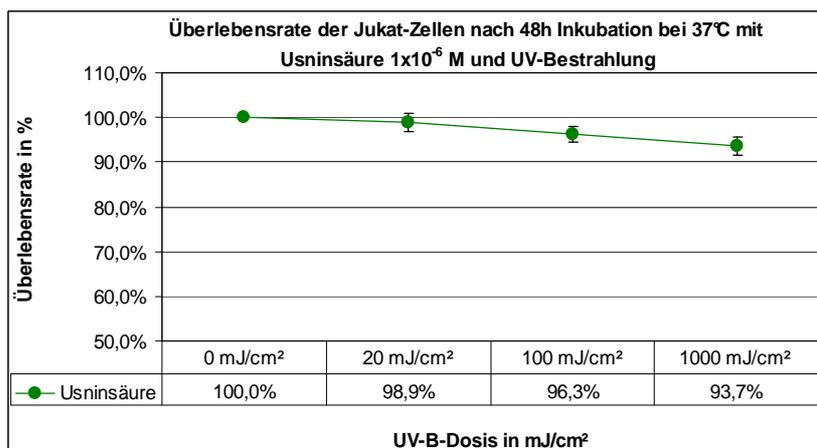


Abb. 3.1.5.c: Anteil überlebender Zellen in % in Medium nach 48-stündiger Inkubation mit Usninsäure 1×10^{-8} M und Zusatz von 0,2 % DMF. Die Überlebensrate der Zellen unter den einzelnen UV-B-Dosen wurde durch oben genannte Korrekturrechnung ermittelt. Mittelwert und Standardabweichung aus 12 Einzelexperimenten.

Werden die Zellen vor der Bestrahlung mit 1×10^{-6} M Usninsäure 48 Stunden inkubiert, zeigt sich ein Abfall der überlebenden Zellen von 98,9 % $\pm 2,0$ bei 20 mJ/cm² (Totzellrate = 1,2 %) über 96,3 % $\pm 1,8$ bei 100 mJ/cm² (Totzellrate = 3,7 %) bis zu 93,7 % $\pm 2,1$ bei 1000 mJ/cm² (Totzellrate = 6,3 %).

Der Vergleich der Kurven (s. Abb. 3.1.5.d) der Überlebensraten der Zellen nach 48-stündiger Inkubation mit 1×10^{-8} M und 1×10^{-6} M Usninsäure (mit Zusatz von 0,2 % DMF) mit Zellen in Medium o. Z. zeigt eine deutlich verbesserte Überlebensrate in beiden Konzentrationen zur Überlebensrate der Zellen im Medium o. Z. Bei allen gewählten Bestrahlungsdosen ist $p < 0,01$.

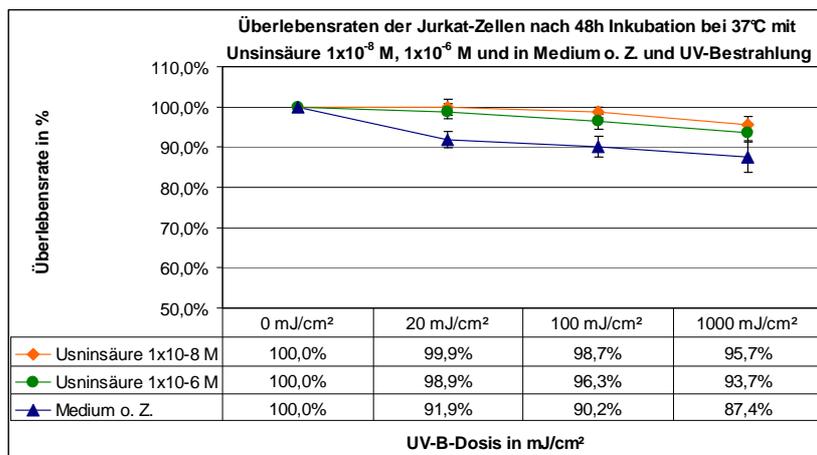


Abb. 3.1.5.d: Vergleich der Überlebensrate in % von mit Usninsäure 1×10^{-8} M und 1×10^{-6} M (mit Zusatz von 0,2 % DMF) 48 Stunden inkubierten Zellen zur Überlebensrate von Zellen in Medium o. Z. Die Überlebensrate der Zellen unter den einzelnen UV-B-Dosen wurde durch oben genannte Korrekturrechnung ermittelt. Mittelwerte und Standardabweichung aus 24 bzw. 12 Einzelversuchen.

Resultat

Usninsäure in Konzentrationen von 1×10^{-8} bis 1×10^{-6} M verbessert die Überlebensrate von Jurkat-Zellen bei UV-B-Bestrahlung von 20 mJ/cm² bis 1000 mJ/cm² signifikant ($p < 0,01$) im Vergleich zu UV-B-bestrahlten Zellen (gleiche Dosen) in Medium o. Z. nach 48-stündiger Inkubation.

Zwischen den beiden gewählten Konzentrationen der Usninsäure besteht ein geringer Unterschied der Überlebensraten von 1,0 % bei 20 mJ/cm² und von 2,4 % bei 100 mJ/cm². Bei 1000 mJ/cm² liegt ein Unterschied von 2,0 % vor, wobei unerklärlicherweise

hier durchgehend die höhere Überlebensrate die Zellen aufweisen, die mit der niedrigeren Usninsäurekonzentration behandelt wurden. Es besteht jedoch kein signifikanter Unterschied zwischen den untersuchten Usninsäurekonzentrationen ($p > 0,05$).

Resultat

Zwischen den Usninsäurekonzentrationen 1×10^{-8} und 1×10^{-6} M besteht kein signifikanter Unterschied ($p > 0,05$) in der protektiven Wirkung gegenüber UV-B-Licht von 20 mJ/cm^2 bis 1000 mJ/cm^2 nach 48-stündiger Inkubation.

3.1.6. Untersuchungen zur Wirkung von Usninsäure in Konzentrationen von 1×10^{-8} und 1×10^{-6} M nach 48-stündiger Inkubation bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$ und UV-B- Bestrahlung von 20 mJ/cm^2 bis 1000 mJ/cm^2 nach Korrektur des Einflusses von Dimethylformamid (DMF) als Usninsäurelösungsmittel

Wie unter 3.1.3. beschrieben, war die niedrigste erreichte Endkonzentration von DMF im Inkubationsmedium $0,2 \%$. Um einen möglichen antioxidativen Effekt von DMF nachzuweisen und diesen durch Korrekturrechnungen von der Wirkung der Usninsäure abzugrenzen, wurden die Ergebnisse der Experimente unter 3.1.5. folgendermaßen korrigiert (s. 3.1.3.):

$$\begin{aligned} & [(\% \text{ lebende Zellen in Medium mit Usninsäure in DMF unter UV-B}) - (\% \text{ lebende Zellen} \\ & \text{ in Medium mit DMF})] + (\% \text{ lebende Zellen in Medium unter UV-B}) \\ & = \% \text{ lebende Zellen in Medium mit Usninsäure} \end{aligned}$$

Die Ergebnisse sind in den Abbildungen 3.1.6.a und 3.1.6.b dargestellt:

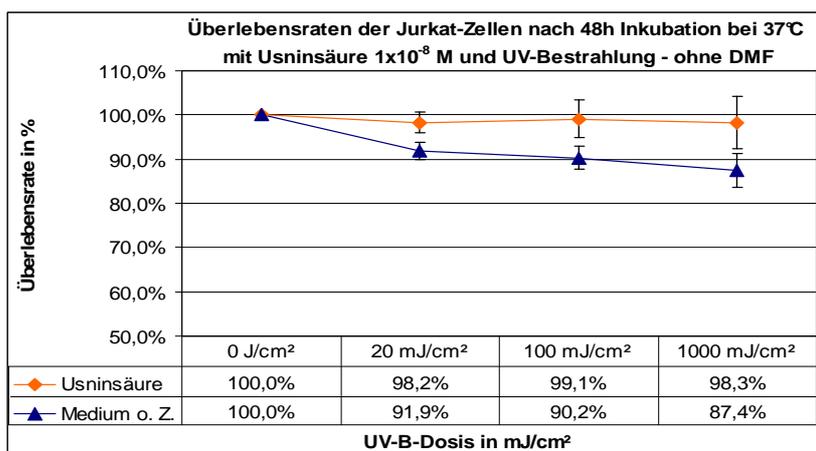


Abb. 3.1.6.a: Vergleich der Überlebensrate in % von mit Usninsäure 1×10^{-8} M inkubierten Zellen zur Überlebensrate von Zellen in Medium o. Z. Eine eventuelle Wirkung von DMF wurde durch die beschriebene Korrekturrechnung eliminiert. Mittelwerte und Standardabweichung aus 12 bzw. 24 Einzelversuchen.

Bei einer Inkubation mit Usninsäure in einer Konzentration von 1×10^{-8} M 48 Stunden bei 37 °C und 5 % CO₂ und nach der Korrektur beträgt die Rate überlebender Zellen bei 20 mJ/cm² 98,2 % ±2,3, bei 100 mJ/cm² 97,1 % ±4,2 und bei 1000 mJ/cm² 93,1 % ±5,8. Ein signifikanter Unterschied mit $p < 0,01$ besteht für die Überlebensrate der mit usninsäureinkubierten Zellen (1×10^{-8} M) unter den angegebenen UV-B-Bestrahlungsdosen im Vergleich zur Überlebensrate der Jurkat-Zellen in Medium o. Z. unter gleichen UV-B-Bestrahlungsdosen. Im Einzelnen sind dies bei 20 mJ/cm² 6,3 %, bei 100 mJ/cm² 8,9 % und bei 1000 mJ/cm² 10,9 %.

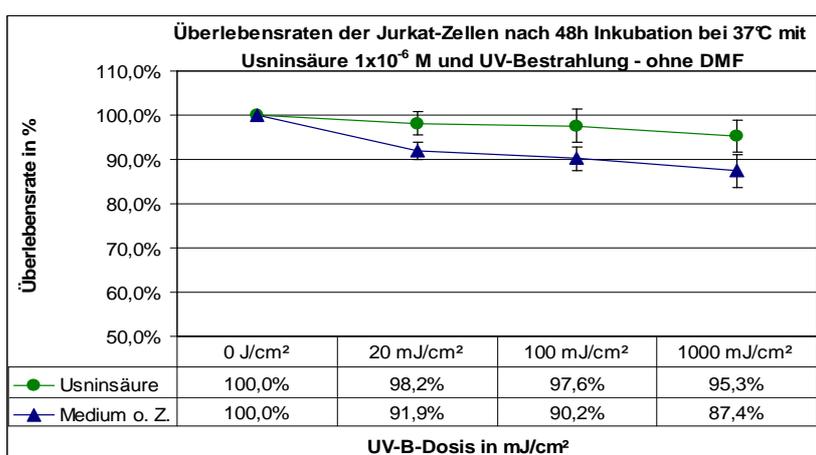


Abb. 3.1.6.b: Vergleich der Überlebensrate in % von mit Usninsäure 1×10^{-6} M inkubierten Zellen zur Überlebensrate von Zellen in Medium o. Z. Eine eventuelle Wirkung von DMF wurde durch die beschriebene Korrekturrechnung eliminiert. Mittelwerte und Standardabweichungen aus je 12 Einzelversuchen.

Bei einer 48-stündigen Inkubation bei 37 °C und 5 % CO₂ mit Usninsäure in einer Konzentration von 1x10⁻⁶ M und nach der Korrektur beträgt die Rate überlebender Zellen bei 20 mJ/cm² 98,2 % ±2,6, bei 100 mJ/cm² 97,6 % ±3,9 und bei 1000 mJ/cm² 95,3 % ±3,6. Ein signifikanter Unterschied mit p<0,01 besteht für die Überlebensrate der mit usninsäureinkubierten Zellen (1x10⁻⁶ M) unter den UV-B- Bestrahlungsdosen 20 mJ/cm² und 100 mJ/cm² im Vergleich zur Überlebensrate der Jurkat-Zellen in Medium o. Z. unter gleichen UV-B-Bestrahlungsdosen. Im Einzelnen sind dies bei 20 mJ/cm² 6,3 %, bei 100 mJ/cm² 7,4 %. Bei 1000 mJ/cm² liegt ein Unterschied von 7,9 % vor, welcher sich allerdings als nicht signifikant ergeben hat (p>0,05).

Resultat

Nach rechnerischer Korrektur der Wirkung von DMF unter UV-B-Bestrahlung ergaben sich erhöhte Überlebensraten in beiden untersuchten Konzentrationen der eingesetzten Usninsäure (p<0,01) bei 20 mJ/cm² und bei 100 mJ/cm². Bei 1000 mJ/cm² konnte dies nur für von 1x10⁻⁸ M Usninsäure ermittelt werden, für 1x10⁻⁶ M Usninsäure ist p<0,05. Die Unterschiede in den Überlebensraten zwischen den beiden untersuchten Usninsäurekonzentrationen sind nicht signifikant (p>0,05) nach 48-stündiger Inkubation.

3.2. Die Wirkung von Usninsäure (1×10^{-4} M) an menschlichen lymphoiden Zellen bei Ultraviolett-B-Lichtbestrahlung – direkte Membranzytotoxizität

3.2.1. Untersuchung zur Dunkeltoxizität von Usninsäure in einer Konzentration von 1×10^{-4} M nach einstündiger Inkubation bei Raumtemperatur

Die Ergebnisse der Experimente zur Dunkeltoxizität sind in der Abbildung 3.2.1. dargestellt. Als Kontrollen dienten Jurkat-Zellen in Medium ohne jegliche Zusätze (Medium o. Z.), sowie Zellen in Medium plus 0,2 % Dimethylformamid, welches als Lösungsmittel für die Usninsäure verwendet wurde. Die Inkubationszeit betrug jeweils eine Stunde bei etwa 22 °C. Nach dem Waschen mit PBS (s. Material und Methoden) wurden die Zellen mit Eosin 5 µl auf 200 µl Zellsuspension angefärbt und unter dem Lichtmikroskop in einer Neubauer-Zählkammer ausgezählt. Mittelwerte und Standardabweichung wurden stets aus 24 Einzelversuchen ermittelt (s. Abb. 3.2.1.).

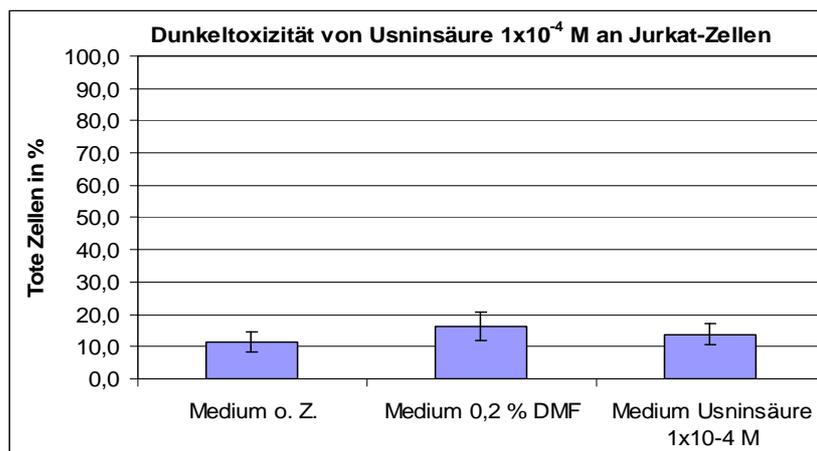


Abb. 3.2.1.: Eosinpositive Zellen in % nach einer Stunde Inkubation in Medium ohne jeglichen Zusatz, mit Zusatz von 0,2 % DMF oder 1×10^{-4} M Usninsäure (mit 0,2 % DMF). Mittelwerte und Standardabweichung aus 24 Einzelversuchen.

Die Experimente zur Dunkeltoxizität von Usninsäure zeigen keine signifikanten Unterschiede ($p > 0,05$) in den Totzellraten von Zellen in Medium o. Z., Medium plus 0,2 % DMF und Medium plus 1×10^{-4} M Usninsäure (plus 0,2 % DMF).

Resultat

Eine zytotoxische Wirkung der Usninsäure liegt in einem Bereich von 1×10^{-4} M im Dunkeln nicht vor.

3.2.2. Untersuchungen zur Wirkung von Usninsäure in einer Konzentration von 1×10^{-4} M nach einstündiger Inkubation bei Raumtemperatur und UV-B-Bestrahlung von 1 J/cm² bis 14 mJ/cm²

Die Abbildung 3.2.2.a zeigt den Anteil überlebender Zellen in % in Medium ohne Zusätze bei den Untersuchungen mit UV-B-Lichtbestrahlung in Dosen von 1 J/cm², 5 J/cm², 10 J/cm² und 14 J/cm². Nach der Bestrahlung wurde der Anteil eosinpositiver Zellen unter dem Lichtmikroskop in einer Neubauer-Zählkammer ermittelt. Die Berechnung des Anteils überlebender Zellen nach UV-B-Bestrahlung erfolgte nach der in 3.1. beschriebenen Formel:

Lebende Zellen bei X J/cm² UVB

$$\frac{\text{Lebende Zellen bei X J/cm}^2 \text{ UVB}}{\text{Lebende Zellen bei 0 J/cm}^2 \text{ UVB}} \times 100 \% = X \% \text{ lebende Zellen nach UV-Bestrahlung}$$

Lebende Zellen bei 0 J/cm² UVB

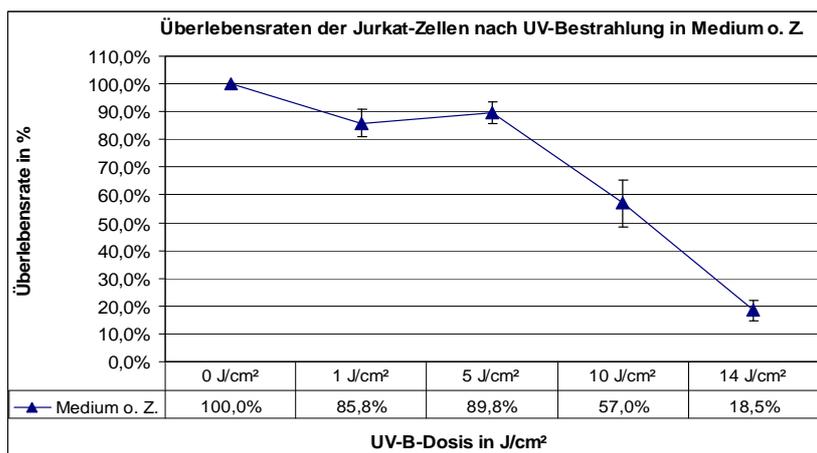


Abb. 3.2.2.a: Anteil überlebender Zellen in % in Medium o. Z. Die Überlebensrate der Zellen unter den einzelnen UV-B-Dosen wurde durch oben genannte Korrekturrechnung ermittelt. Mittelwert und Standardabweichung aus 12 Einzelexperimenten.

Es zeigt sich eine Reduktion der überlebenden Zellen bei 1 J/cm² um 14,2 % (Überlebensrate 85,9 % ±5,0), bei 5 J/cm² um 10,2 % (Überlebensrate 89,8 % ±3,9), bei 10 J/cm² um 43,0 % (Überlebensrate 57,0 % ±4,3) und bei 14 J/cm² um 81,5 % (Überlebensrate 18,5 % ±2,5). Es besteht ein signifikanter Unterschied (p<0,01) der Überlebensrate der Jurkat-Zellen im Dunkeln zu solchen, die mit 1 J/cm², 5 J/cm², 10 J/cm² und 14 J/cm² UV-B- Licht bestrahlt wurden. Abbildung 3.2.2.b zeigt die Totzellrate in % der mit Usninsäure in Konzentrationen von 1×10^{-4} M (mit 0,2 % DMF) eine Stunde

inkubierten Zellen. Zwei Minuten nach Bestrahlung wurde der Anteil eosinpositiver Zellen unter dem Lichtmikroskop in einer Neubauer-Zählkammer ermittelt. Die Berechnung des Anteils überlebender Zellen nach UV-B-Bestrahlung erfolgte nach oben genannter Formel:

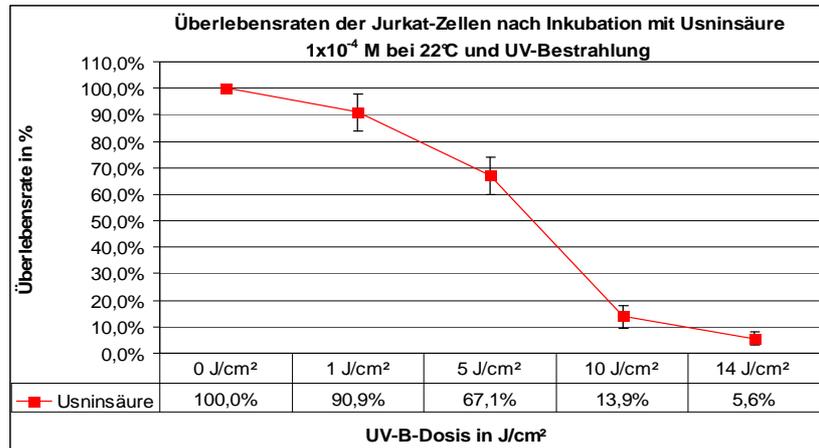


Abb. 3.2.2.b: Anteil überlebender Zellen in % in Medium nach einstündiger Inkubation mit Usninsäure 1x10⁻⁴ M und Zusatz von 0,2 % DMF. Die Überlebensrate der Zellen unter den einzelnen UV-B-Dosen wurde durch oben genannte Korrekturrechnung ermittelt. Mittelwert und Standardabweichung aus 12 Einzelexperimenten.

Werden die Zellen vor der Bestrahlung mit 1x10⁻⁴ M Usninsäure eine Stunde inkubiert, zeigt sich ein Abfall der überlebenden Zellen von 90,8 % ±7,1 bei 1 J/cm² (Totzellrate = 9,1 %) über 67,1 % ±7,0 bei 5 J/cm² (Totzellrate = 32,9 %) und 13,9 % ±4,2 bei 10 J/cm² (Totzellrate = 86,1 %) bis zu 5,6 % ±2,5 bei 14 J/cm² (Totzellrate = 94,4 %). Der Vergleich der Kurven der Überlebensraten der Zellen in Medium o. Z. mit Zellen nach Inkubation mit 1x10⁻⁴ M Usninsäure (mit Zusatz von 0,2 % DMF) zeigt eine deutlich verringerte Überlebensrate unter UV-B-Bestrahlung der usninsäureinkubierten Zellen zur Überlebensrate der Zellen im Medium o. Z. (siehe Abb. 3.2.2.c). Ab einer Bestrahlungsdosis von 5 J/cm² ist p<0,01. Nur bei 1 J/cm² ist p >0,05 - also nicht signifikant.

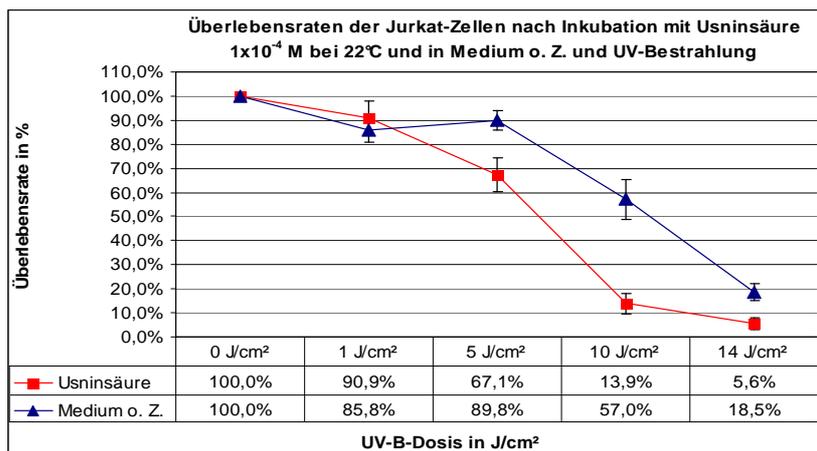


Abb. 3.2.2.c: Vergleich der Überlebensrate in % der mit Usninsäure 1x10⁻⁴ M und (in 0,2 % DMF gelöst) behandelten Zellen zur Überlebensrate der Zellen in Medium o. Z. nach einstündiger Inkubation. Die Überlebensrate der Zellen unter den einzelnen UV-B-Dosen wurde durch oben genannte Korrekturrechnung ermittelt. Mittelwert und Standardabweichung aus je 12 Einzelversuchen.

Resultat

Usninsäure in einer Konzentrationen von 1x10⁻⁴ M verringert die Überlebensrate von Jurkat-Zellen bei UV-B-Bestrahlung von 5 J/cm² bis 14 J/cm² signifikant (p<0,01) im Vergleich zu UV-B-bestrahlten Zellen (gleiche Dosen) in Medium o. Z.

3.2.3. Untersuchungen zur Wirkung von Usninsäure in einer Konzentration von 1x10⁻⁴ M nach einstündiger Inkubation bei Raumtemperatur und UV-B-Bestrahlung von 1 J/cm² bis 14 J/cm² nach Korrektur des Einflusses von Dimethylformamid (DMF) als Usninsäurelösungsmittel

Wie unter 3.1.3. beschrieben, war die niedrigste erreichte Endkonzentration von DMF im Inkubationsmedium 0,2 %. Um einen möglichen antioxidativen Effekt von DMF nachzuweisen und diesen durch Korrekturrechnungen von der Wirkung der Usninsäure abzugrenzen, wurden die Ergebnisse der Experimente unter 3.2.3. folgendermaßen korrigiert (s. 3.1.3):

$$[(\text{Absorption Zellen in Medium mit Usninsäure in DMF unter UV-B}) - (\text{Absorption Zellen in Medium mit DMF})] + (\text{Absorption Zellen in Medium unter UV-B}) = \text{Absorption Zellen in Medium mit Usninsäure}$$

Die Ergebnisse sind in der Abbildung 3.2.3. dargestellt:

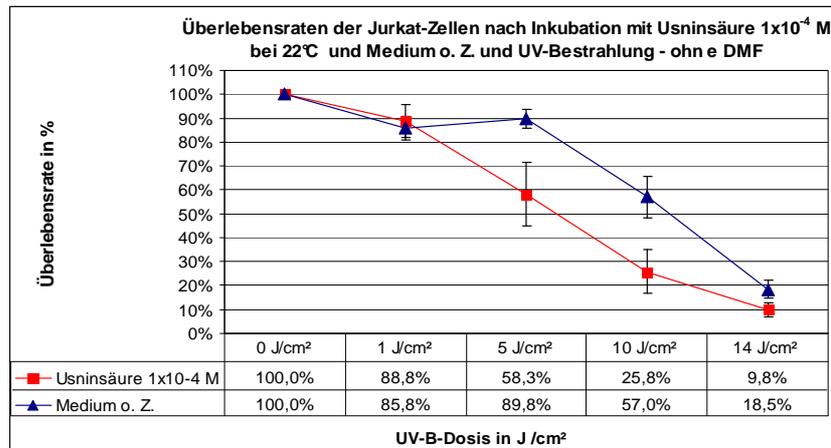


Abb. 3.2.3.: Vergleich der Überlebensraten Zellen in Medium o. Z. zu Zellen in Medium mit 1×10^{-4} M Usninsäure. Eine eventuelle Wirkung von DMF wurde durch die beschriebene Korrekturrechnung eliminiert. Mittelwerte und Standardabweichung aus 12 Einzelversuchen.

Aus der Abbildung 3.2.3. wird ersichtlich, dass bei einer Inkubation mit 1×10^{-4} M Usninsäure eine sinkende Überlebensrate im Vergleich zu Zellen in Medium o. Z. bei Zunahme der UV-B-Bestrahlungsstärke besteht. Im Einzelnen ist dies ein Unterschied von 31,5 % bei 5 J/cm², 31,2 % bei 10 J/cm² und 8,7 % bei 14 mJ/cm². Dies entspricht einem signifikanten Unterschied von $p < 0,01$. Bei 1 J/cm² konnte kein signifikanter Unterschied ($p > 0,05$) nachgewiesen werden.

Resultat

Nach rechnerischer Korrektur der Wirkung von DMF unter UV-B-Bestrahlung ergeben sich signifikant verringerte Überlebensraten in der untersuchten Konzentration der eingesetzten Usninsäure ($p < 0,01$) bei UV-B-Dosen von 5 J/cm² bis 14 J/cm². Bei 1 J/cm² UV-B konnte dies nicht ermittelt werden ($p > 0,05$).

3.3. Die Wirkung von Usninsäure (1×10^{-8} M und 1×10^{-6} M) an menschlichen lymphoiden Zellen bei Ultraviolett-B-Lichtbestrahlung – Beeinflussung der metabolischen Aktivität

3.3.1. Untersuchung zur Dunkeltoxizität von Usninsäure in Konzentrationen von 1×10^{-8} und 1×10^{-6} M nach einstündiger Inkubation bei Raumtemperatur

Der Cell Proliferation Kit II (XTT, Roche) ist eine Messmethode zur Quantifizierung des Anteils lebender Zellen mittels ihrer metabolischen Aktivität. Der Test beruht auf der Fähigkeit von Zellen das gelbe Tetrazoliumsalz XTT (sodium 3'-[1-(phenylaminocarbonyl)-3,4-tetrazolium]-bis-(4-methoxyl-6-nitro) benzene sulfonic acid hydrate) in einen kräftig orangefarbenen Formazanfarbstoff umzusetzen. Dies kann über einen ELISA-Plattenreader im Sinne einer veränderten Extinktion direkt quantifiziert werden. Die Umsetzung findet nur bei metabolisch aktiven Zellen statt. Somit ist die gemessene Extinktion proportional zur Menge vitaler Zellen.

Die Ergebnisse der Experimente zur Dunkeltoxizität sind in den Abbildungen 3.3.1.a und 3.3.1.b dargestellt. Als Kontrollen dienten Jurkat-Zellen in Medium ohne jegliche Zusätze (Medium o. Z.), sowie Zellen in Medium plus 0,2 % Dimethylformamid, welches als Lösungsmittel für die Usninsäure verwendet wurde. Die Inkubationszeit betrug jeweils eine Stunde bei etwa 22 °C. Nach einem Waschschrift mit PBS wurden die Zellen in 96er wells ausgesät und mit dem XTT-Reagenz 3,5 h bei 37 °C inkubiert. Mittelwerte und Standardabweichung wurden stets aus 18 Einzelversuchen ermittelt (s. Abb. 3.3.1.a und 3.3.1.b).

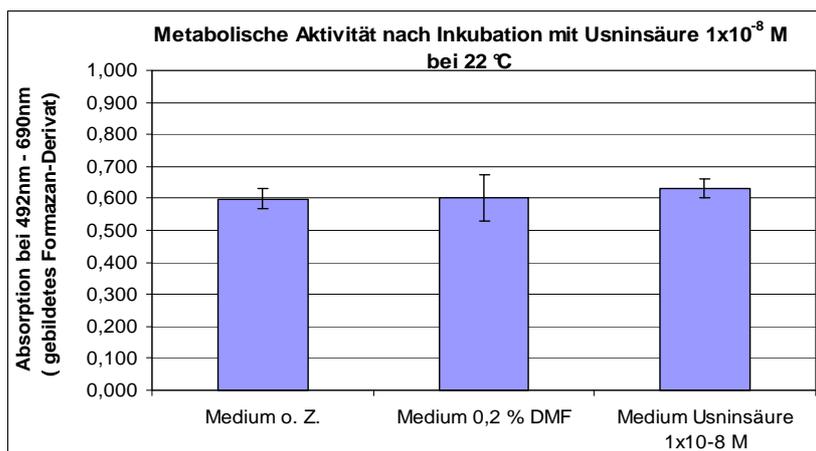


Abb. 3.3.1.a: Metabolische Aktivität der Zellen (als Absorption gebildeter Formazan-Derivate) nach einer Stunde Inkubation in Medium ohne jeglichen Zusatz, mit Zusatz von 0,2 % DMF oder 1×10^{-8} M Usninsäure (mit 0,2 % DMF). Mittelwerte und Standardabweichung aus je 18 Einzelversuchen

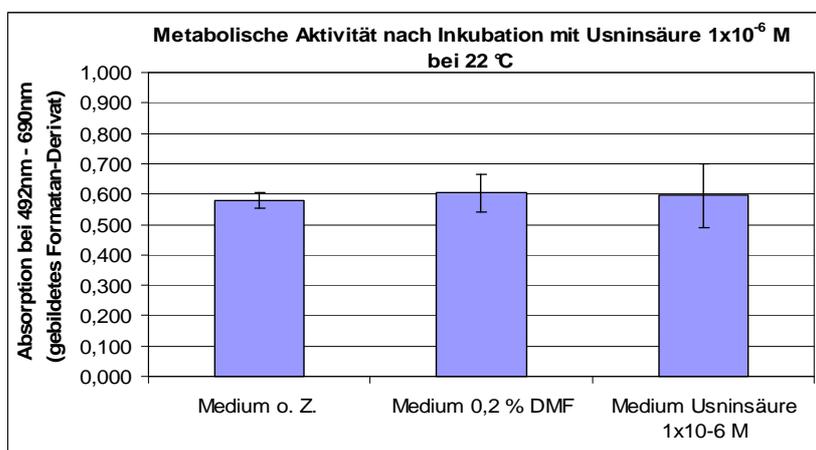


Abb. 3.3.1.b: Metabolische Aktivität der Zellen (als Absorption gebildeter Formazan-Derivate) nach einer Stunde Inkubation in Medium ohne jeglichen Zusatz, mit Zusatz von 0,2 % DMF oder 1×10^{-6} M Usninsäure (mit 0,2 % DMF). Mittelwerte und Standardabweichung aus je 18 Einzelversuchen.

Die Experimente zur Dunkeltoxizität von Usninsäure zeigen keine signifikanten Unterschiede ($p > 0,05$) in den gemessenen metabolischen Aktivität von Zellen in Medium o. Z., Medium plus 0,2 % DMF und Medium plus 1×10^{-8} M bzw. 1×10^{-6} M Usninsäure (plus 0,2 % DMF). Die Schwankung der Messwerte entspricht der gerätetypischen Toleranz.

Resultat

Eine Verringerung der metabolischen Aktivität der Zellen liegt unter Einfluss von Usninsäure in einem Bereich von 1×10^{-8} bis 1×10^{-6} M im Dunkeln nicht vor

3.3.2. Untersuchungen zur Wirkung von Usninsäure in Konzentrationen von 1×10^{-8} und 1×10^{-6} M nach einstündiger Inkubation bei Raumtemperatur und UV-B-Bestrahlung von 20 mJ/cm² bis 1000 mJ/cm²

Die Abbildung 3.3.2.a zeigt die metabolische Aktivität von Jurkat-Zellen in Medium ohne Zusätze bei UV-B-Bestrahlung in Dosen von 20 mJ/cm², 100 mJ/cm² und 1000 mJ/cm². Nach der Bestrahlung wurden die Zellen mit dem XTT-Reagenz 3,5 h bei 37 °C, 5 % CO₂ inkubiert. Danach erfolgte die Messung am ELISA-Reader. Abbildungen 3.3.2.b und 3.3.2.c zeigen die Aktivität der mit Usninsäure in Konzentrationen von 1×10^{-8} bzw. 1×10^{-6} M eine Stunde inkubierten Zellen. Die Berechnung der Absorption, begründet durch den Metabolismus überlebender Zellen nach UV-B-Bestrahlung erfolgte nach der Formel:

$$\frac{\text{Absorption bei } X \text{ J/cm}^2 \text{ UV-B}}{\text{Absorption bei } 0 \text{ J/cm}^2 \text{ UV-B}} = X \text{ Absorption nach UV-B-Bestrahlung}$$

Die Untersuchungen zur Metabolisierungsrate der Jurkat-Zellen nach UV-B-Bestrahlung in Dosen von 0 mJ/cm², 20 mJ/cm², 100 mJ/cm² und 1000 mJ/cm² in Medium o. Z. ergaben die in der Abbildung 3.3.2.a dargestellten Werte.

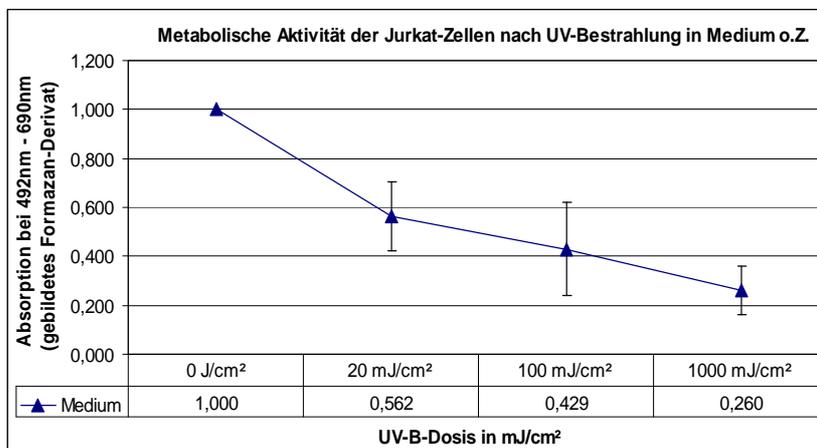


Abb. 3.3.2.a: Metabolische Aktivität der Zellen in Medium o. Z. Die Metabolisierungsrate der Zellen unter den einzelnen UV-B-Dosen wurde durch oben genannte Korrekturrechnung ermittelt. Mittelwert und Standardabweichung aus 36 Einzelexperimenten.

Im XTT zeigt sich unter UV-B-Bestrahlung eine Verringerung der metabolischen Zellaktivität mit Zunahme der Bestrahlungsdosis. Bei 20 mJ/cm² ist dies eine Differenz zur maximalen Absorption (=1) von 0,438 (gemessene Absorption 0,562 ±0,13), bei 100 mJ/cm² von 0,571 (gemessene Absorption 0,429 ±0,19) und bei 1000 mJ/cm² von 0,74

(gemessene Absorption $0,260 \pm 0,098$). Es besteht ein signifikanter Unterschied ($p < 0,01$) der metabolischen Aktivität der Jurkat-Zellen im Dunkeln zu solchen, die mit 20 mJ/cm^2 , 100 mJ/cm^2 und 1000 mJ/cm^2 UV-B bestrahlt wurden.

Die Untersuchungen zur metabolischen Aktivität der Jurkat-Zellen nach UV-B-Bestrahlung in Dosen von 0 mJ/cm^2 , 20 mJ/cm^2 , 100 mJ/cm^2 und 1000 mJ/cm^2 in Medium mit Zusatz von 1×10^{-8} bzw. 1×10^{-6} M Usninsäure ergaben die in den Abbildungen 3.3.2.b und 3.3.2.c dargestellten Werte.

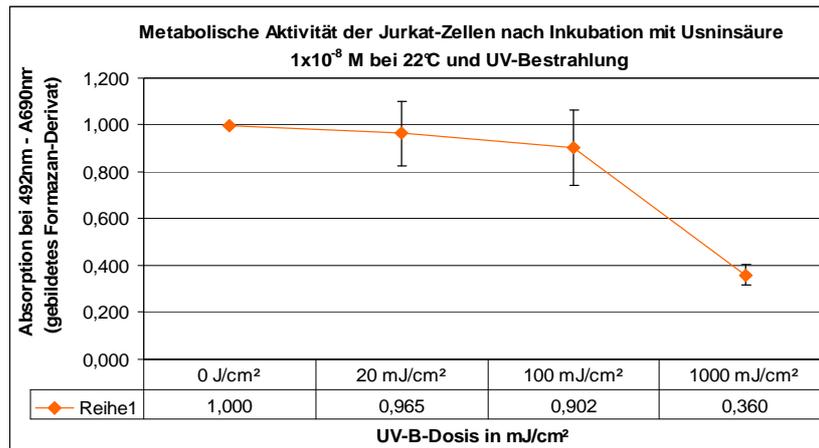


Abb. 3.3.2.b: Metabolischen Aktivität der Zellen in Medium nach Inkubation mit Usninsäure 1×10^{-8} M und Zusatz von 0,2 % DMF. Die Metabolisierungsrate der Zellen unter den einzelnen UV-B-Dosen wurde durch oben genannte Korrekturrechnung ermittelt. Mittelwert und Standardabweichung aus 18 Einzelexperimenten

Bei einer Inkubation mit Usninsäure in einer Konzentration von 1×10^{-8} M eine Stunde bei Raumtemperatur zeigt sich eine metabolische Aktivität der Zellen nach 20 mJ/cm^2 UV-B-Licht von $0,965 \pm 0,14$, nach 100 mJ/cm^2 von $0,902 \pm 0,16$ und nach 1000 mJ/cm^2 $0,360 \pm 0,042$.

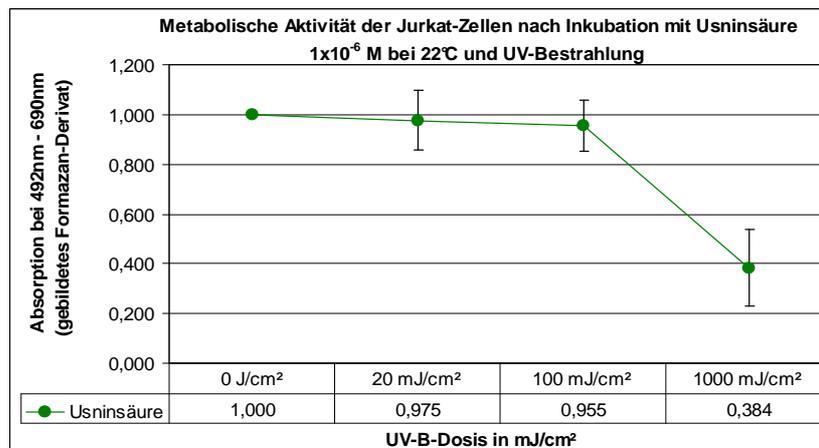


Abb. 3.3.2.c: Metabolische Aktivität der Zellen in Medium nach Inkubation mit Usninsäure 1×10^{-6} M und Zusatz von 0,2 % DMF. Die Metabolisierungsrate der Zellen unter den einzelnen UV-B-Dosen wurde durch oben genannte Korrekturrechnung ermittelt. Mittelwert und Standardabweichung aus 18 Einzelexperimenten.

Werden die Zellen vor der Bestrahlung mit 1×10^{-6} M Usninsäure inkubiert, zeigt sich ein Abfall der Zellaktivität auf $0,975 \pm 0,12$ bei 20 mJ/cm^2 , auf $0,965 \pm 0,1$ bei 100 mJ/cm^2 bis zu $0,384 \pm 0,15$ bei 1000 mJ/cm^2 .

Der Vergleich der metabolischen Aktivität der Zellen (s. Abb. 3.3.2.d) nach Inkubation mit 1×10^{-8} M oder 1×10^{-6} M Usninsäure (mit Zusatz von 0,2 % DMF) mit Zellen in Medium o. Z. zeigt eine deutlich erhöhte Zellaktivität in beiden Usninsäurekonzentrationen zur Aktivität der Zellen im Medium o. Z.. Ein signifikanter Unterschied mit $p < 0,01$ besteht für die metabolische Aktivität der Jurkat-Zellen in Medium o. Z. unter UV-B-Bestrahlungsdosen 20 mJ/cm^2 und 100 mJ/cm^2 zur metabolischen Aktivität der mit Usninsäure inkubierten Zellen (1×10^{-8} oder 10^{-6} M) unter gleichen UV-B-Bestrahlungsdosen. Bei 1000 mJ/cm^2 konnte kein signifikanter Unterschied ($p > 0,05$) in der Metabolisierungsrate der Jurkat-Zellen in Medium o. Z. zu der von Zellen, die mit Usninsäure in beiden untersuchten Konzentrationen inkubierten wurden, ermittelt werden.

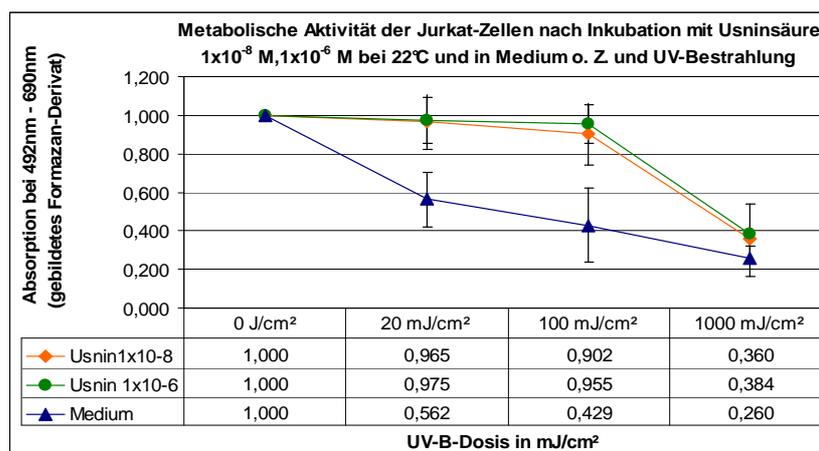


Abb. 3.3.2.d: Vergleich der metabolischen Aktivität von mit Usninsäure 1×10^{-8} M und 1×10^{-6} M (mit Zusatz von 0,2 % DMF) inkubierten Zellen zur metabolischen Aktivität von Zellen in Medium o. Z. Die Metabolisierungsrate der Zellen unter den einzelnen UV-B-Dosen wurde durch oben genannte Korrekturrechnung ermittelt Mittelwerte und Standardabweichung aus 18 bzw. 36 Einzelversuchen.

Resultat

Nach einer einstündigen Inkubation bei $22 \text{ }^\circ\text{C}$ mit Usninsäure in Konzentrationen von 1×10^{-8} bis 1×10^{-6} M zeigt sich eine signifikant erhöhte ($p < 0,05$) metabolische Aktivität von Jurkat-Zellen bei UV-B-Bestrahlung von 20 mJ/cm^2 bis 100 mJ/cm^2 im Vergleich zu UV-B-bestrahlten Zellen (gleiche Dosen) in Medium o. Z.

Zwischen den beiden gewählten Konzentrationen der Usninsäure besteht nur ein geringer Unterschied der gemessenen Metabolisierungsrate (Differenzen der Absorption: 0,01 bei 20 mJ/cm², 0,053 bei 100 mJ/cm² und 0,024 bei 1000 mJ/cm²). Die höhere Metabolisierungsrate weisen die Zellen auf, die mit der höheren Usninsäurekonzentration inkubiert wurden. Es besteht jedoch kein signifikanter Unterschied der Absorptions-Differenzen zwischen den beiden untersuchten Usninsäurekonzentrationen ($p > 0,05$).

Resultat

Zwischen den Usninsäurekonzentrationen 1×10^{-8} und 1×10^{-6} M besteht kein signifikanter Unterschied ($p > 0,05$) in der zellprotektiven Wirkung von Usninsäure bei Bestrahlung mit UV-B-Licht von 20 mJ/cm² bis 1000 mJ/cm² (einstündige Inkubation) gemessen als metabolische Aktivität von Jurkat-Zellen.

3.3.3. Untersuchungen zur Wirkung von Usninsäure in Konzentrationen von 1×10^{-8} und 1×10^{-6} M nach einstündiger Inkubation bei Raumtemperatur und UV-B-Bestrahlung von 20 mJ/cm² bis 1000 mJ/cm² nach Korrektur des Einflusses von Dimethylformamid (DMF) als Usninsäurelösungsmittel

Wie unter 3.1.3. beschrieben, war die niedrigste erreichte Endkonzentration von Dimethylformamid (DMF) im Inkubationsmedium 0,2 %. Um einen möglichen antioxidativen Effekt von DMF nachzuweisen und diesen durch Korrekturrechnungen von der Wirkung der Usninsäure abzugrenzen, wurden die Ergebnisse der Experimente unter 3.3.2. folgendermaßen korrigiert (s. 3.1.3.):

$$\begin{aligned} &[(\text{Absorption Zellen in Medium mit Usninsäure in DMF unter UV-B}) - (\text{Absorption Zellen} \\ &\quad \text{in Medium mit DMF})] + (\text{Absorption Zellen in Medium unter UV-B}) \\ &= \text{Absorption Zellen in Medium mit Usninsäure} \end{aligned}$$

Die Ergebnisse sind in den Abbildungen 3.3.3.a und 3.3.3.b dargestellt:

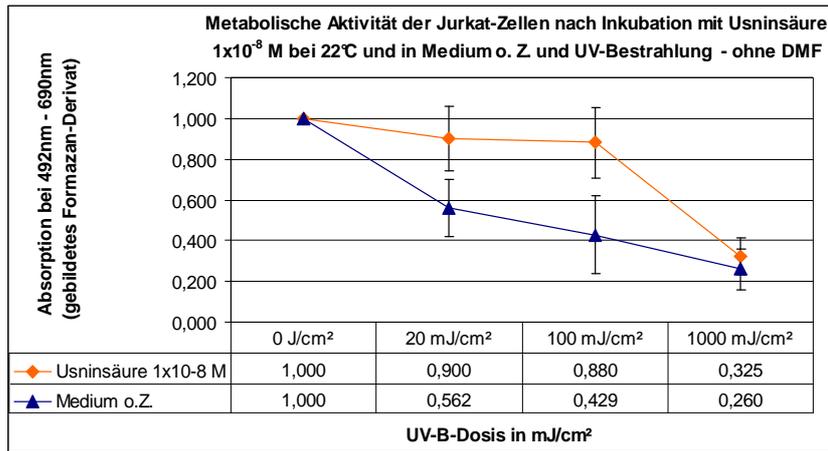


Abb. 3.3.3.a: Vergleich der metabolischen Aktivität von mit Usninsäure 1x10⁻⁸ M inkubierten Zellen zur metabolischen Aktivität von Zellen in Medium o. Z. Eine eventuelle Wirkung von DMF wurde durch die beschriebene Korrekturrechnung eliminiert. Mittelwert und Standardabweichung aus 18 bzw. 36 Einzelversuchen.

Es liegt ein signifikanter Unterschied ($p < 0,01$) in der metabolischen Aktivität der Zellen bei 20 mJ/cm² (Differenz der Absorption von 0,338, Absorption der usninsäureinkubierten Zellen 0,900 ± 0,16) und bei 100 mJ/cm² (Differenz der Absorption 0,451, Absorption der usninsäureinkubierten Zellen 0,880 ± 0,18) vor. Weiterhin besteht eine Erhöhung der metabolischen Aktivität um 0,065 bei 1000 mJ/cm² bei mit usninsäureinkubierten Zellen (Absorption 0,325 ± 0,092) im Vergleich zu Zellen in Medium. Diese ist jedoch nicht signifikant ($p > 0,05$). Zu beachten ist, dass 1000 mJ/cm² als hohe Dosis anzusehen ist. Sie entspricht etwa dem 10- bis 50-fachen der mittleren Erythemdosis (MED) eines Mitteleuropäers des Hauttypes II und III (MED 0,02-0,1 J/cm²).

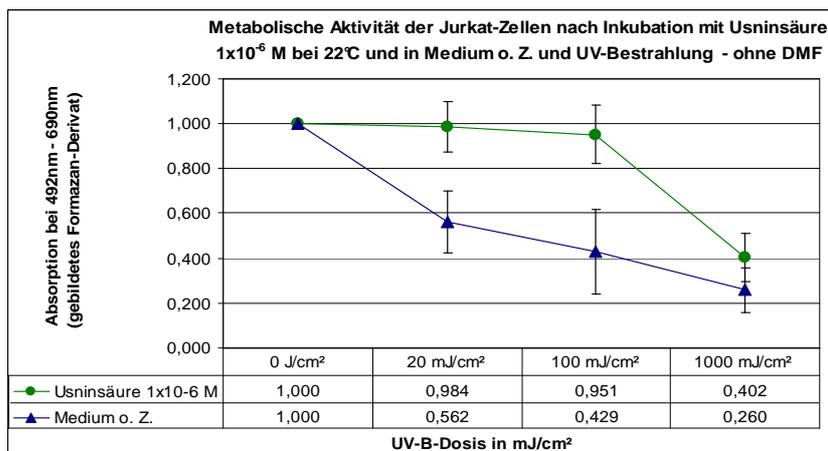


Abb. 3.3.3.b: Vergleich der metabolischen Aktivität von mit Usninsäure 1x10⁻⁶ M inkubierten Zellen zur metabolischen Aktivität von Zellen in Medium o. Z. Eine eventuelle Wirkung von DMF wurde durch oben beschriebene Korrekturrechnung eliminiert. Mittelwert und Standardabweichung aus 18 bzw. 36 Einzelversuchen.

Aus Abb. 3.3.3.b wird ersichtlich, dass nach Inkubation der Zellen mit 1×10^{-6} M Usninsäure ein stärkerer Metabolismus im Vergleich zu Zellen in Medium nach UV-B-Bestrahlung besteht. Im Einzelnen sind dies Differenzen der Absorption bei 20 mJ/cm^2 von 0,422 (Absorption der usninsäureinkubierten Zellen $0,984 \pm 0,11$) mit $p < 0,05$, bei 100 mJ/cm^2 von 0,522 (Absorption der usninsäureinkubierten Zellen $0,951 \pm 0,13$) ist $p < 0,05$ und bei 1000 mJ/cm^2 von 0,142 (Absorption der usninsäureinkubierten Zellen $0,402 \pm 0,11$) mit $p > 0,05$. Der Unterschied in der metabolischen Aktivität der UV-bestrahlten, nicht mit Usninsäure inkubierten Zellen zu UV-bestrahlten Zellen, die mit Usninsäure inkubiert wurden, ergibt für beide Usninsäurekonzentrationen einen antioxidativ-protektiven Faktor von maximal 2,1. Im Test zur direkten Membranzytotoxizität (Eosin-Test) wird dieser Wert nicht erreicht und liegt bei etwas über 1,1. Im Vergleich der untersuchten Usninsäurekonzentrationen zeigen sich geringe Unterschiede in der metabolischen Aktivität der Jurkat-Zellen. Diese sind nicht signifikant ($p > 0,05$).

Resultat

Nach rechnerischer Korrektur der Wirkung von DMF ergeben sich erhöhte metabolische Aktivitäten in beiden untersuchten Konzentrationen der eingesetzten Usninsäure ($p < 0,01$) bei 20 und 100 mJ/cm^2 . Die Unterschiede in der metabolischen Aktivität zwischen den untersuchten Usninsäurekonzentrationen sind nicht signifikant ($p > 0,05$).

3.3.4. Untersuchung zur Dunkeltoxizität von Usninsäure in Konzentrationen von 1×10^{-8} und 1×10^{-6} M nach 48-stündiger Inkubation bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$

Die Ergebnisse der Experimente zur Dunkeltoxizität sind in den Abbildungen 3.3.4.a und 3.3.4.b dargestellt. Als Kontrollen dienten Jurkat-Zellen in Medium o. Z., sowie Zellen in Medium plus 0,2 % Dimethylformamid, welches als Lösungsmittel für die Usninsäure verwendet wurde. Die Inkubationszeit betrug jeweils 48 Stunden bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$ und 5 % CO_2 . Nach einem Waschschritt mit PBS wurden die Zellen mit dem XTT-Reagenzgemisch 3,5 h bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$ und 5 % CO_2 inkubiert. Mittelwerte und Standardabweichung wurden stets aus 9 Einzelversuchen ermittelt (s. Abbildung 3.3.4.a und 3.3.4.b).

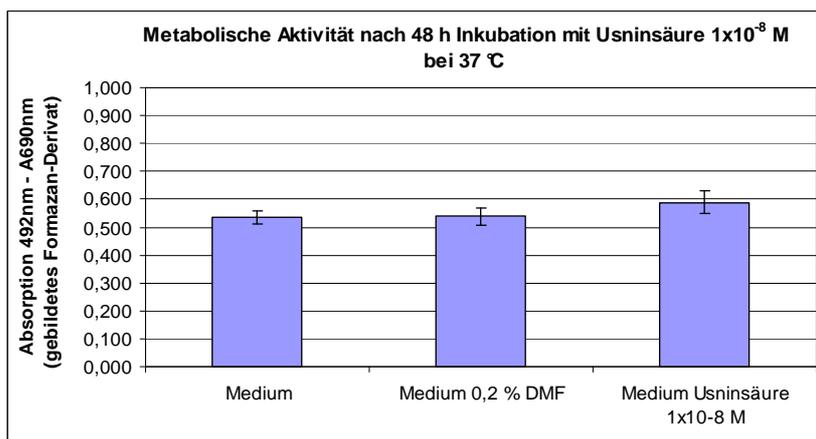


Abb. 3.3.4.a: Metabolische Aktivität nach 48 Stunden Inkubation von Zellen (als Absorption gebildeter Formazan-Derivate) in Medium, mit Zusatz von 0,2 % DMF oder Usninsäure 1×10^{-8} M (mit 0,2 % DMF) Mittelwert und Standardabweichung aus 9 Einzelerperimenten.

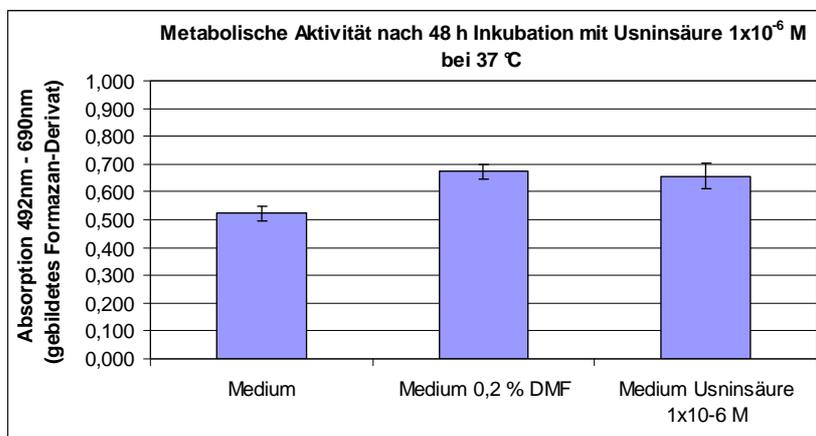


Abb. 3.3.4.b: Metabolische Aktivität nach 48 Stunden Inkubation von Zellen (als Absorption gebildeter Formazan-Derivate) in Medium, mit Zusatz von 0,2 % DMF oder Usninsäure 1×10^{-6} M (in 0,2 % DMF). Mittelwert und Standardabweichung aus 9 Einzelerperimenten.

Die Experimente zur Dunkeltoxizität von Usninsäure zeigen keine signifikanten Unterschiede ($p > 0,05$) in den gemessenen metabolischen Aktivität von Zellen in Medium o. Z., Medium plus 0,2 % DMF und Medium plus 1×10^{-8} M bzw. 1×10^{-6} M Usninsäure (plus 0,2 % DMF). Die Schwankung der Messwerte entspricht der gerätetypischen Toleranz.

Resultat

Eine Verringerung der metabolischen Aktivität der Zellen liegt im Dunkeln unter Einfluss der Usninsäure in einem Konzentrationsbereich von 1×10^{-8} bis 1×10^{-6} M im Vergleich zu Zellen in Medium o. Z. nach 48-stündiger Inkubation nicht vor ($p > 0,05$).

3.3.5. Untersuchungen zur Wirkung von Usninsäure in Konzentrationen von 1×10^{-8} und 1×10^{-6} M nach 48-stündiger Inkubation 37 °C und UV-B-Bestrahlung von 20 mJ/cm² bis 1000 mJ/cm²

Die Abbildung 3.3.5.a zeigt die metabolische Aktivität von Zellen in Medium ohne Zusätze bei UV-B-Lichtbestrahlung in Dosen von 20 mJ/cm², 100 mJ/cm² und 1000 mJ/cm². Nach der Bestrahlung wurden die Zellen mit dem XTT-Reagenz 3,5 h bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert und anschließend im ELISA-Reader gemessen. Abbildungen 3.3.5.b und 3.3.5.c zeigen die metabolische Aktivität der mit Usninsäure in Konzentrationen von 1×10^{-8} bzw. 1×10^{-6} M 48 Stunden inkubierten Zellen. Die Berechnung des Anteils überlebender Zellen nach UV-B-Bestrahlung erfolgte nach der Formel:

$$\frac{\text{Absorption bei X J/cm}^2 \text{ UV-B}}{\text{Absorption bei 0 J/cm}^2 \text{ UV-B}} = X \text{ Absorption nach UV-B-Bestrahlung}$$

Die Untersuchungen zur Metabolisierungsrate der Jurkat-Zellen nach UV-B-Bestrahlung in Dosen von 0 mJ/cm², 20 mJ/cm², 100 mJ/cm² und 1000 mJ/cm² in Medium o. Z. ergaben die in der Abbildung 3.3.5.a dargestellten Werte.

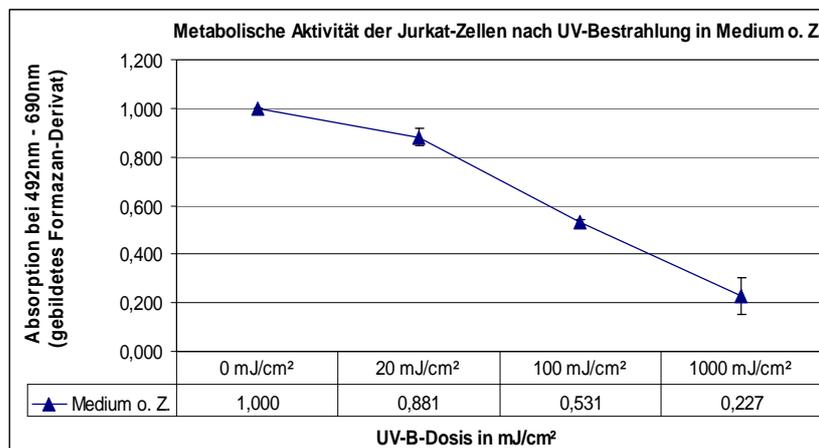


Abb. 3.3.5.a: Metabolische Aktivität der Zellen in Medium o. Z., die Metabolisierungsrate der Zellen unter den einzelnen UV-B-Dosen wurde durch oben genannte Korrekturrechnung ermittelt Mittelwert und Standardabweichung aus 18 Einzelexperimenten.

Im XTT zeigt sich unter UV-B-Bestrahlung eine Verringerung der metabolischen Aktivität mit Zunahme der Bestrahlungsdosis. Bei 20 mJ/cm² ist dies eine Differenz zur maximalen Absorption (=1) von 0,119 (gemessene Absorption 0,881 ± 0,036), bei 100

mJ/cm² von 0,469 (gemessene Absorption 0,0531 ±0,014) und bei 1000 mJ/cm² von 0,773 (gemessene Absorption 0,227 ±0,076). Es besteht ein signifikanter Unterschied (p<0,01) der metabolischen Aktivität der Jurkat-Zellen im Dunkeln zu solchen, die mit 20 mJ/cm², 100 mJ/cm² und 1000 mJ/cm² UV-B bestrahlt wurden.

Die Untersuchungen zur metabolischen Aktivität der Jurkat-Zellen nach UV-B-Bestrahlung in Dosen von 0 mJ/cm², 20 mJ/cm², 100 mJ/cm² und 1000 mJ/cm² und einer 48-stündigen Inkubation mit Usninsäure bei 37 °C und 5 % CO₂ ergaben die in den Abbildungen 3.3.5.b und 3.3.5.c dargestellten Werte.

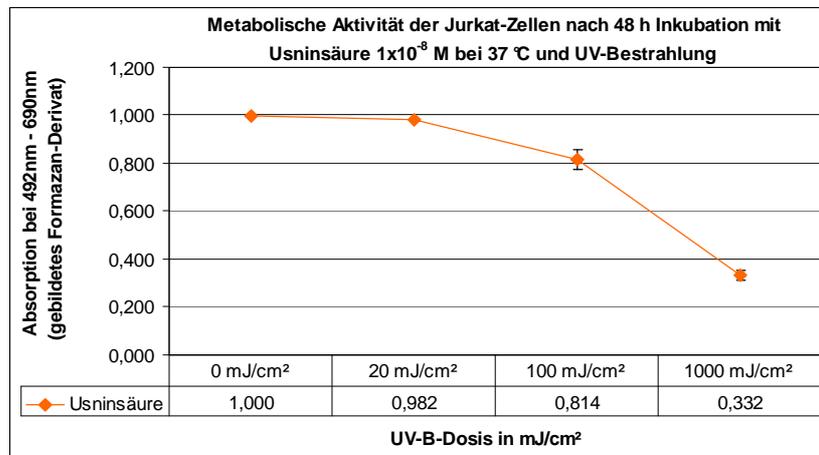


Abb. 3.3.5.b: Metabolische Aktivität der Zellen in Medium nach 48-stündiger Inkubation mit Usninsäure 1x10⁻⁸ M und Zusatz von 0,2 % DMF. Die Metabolisierungsrate der Zellen unter den einzelnen UV-B-Dosen wurde durch oben genannte Korrekturrechnung ermittelt Mittelwert und Standardabweichung aus 9 Einzelerperimenten.

Bei einer Inkubation mit Usninsäure in einer Konzentration von 1x10⁻⁸ M 48 Stunden im Inkubator zeigen die Zellen eine metabolische Aktivität bei 20 mJ/cm² von 0,982 ±0,003, bei 100 mJ/cm² 0,814 ±0,042 und bei 1000 mJ/cm² 0,332 ±0,02.

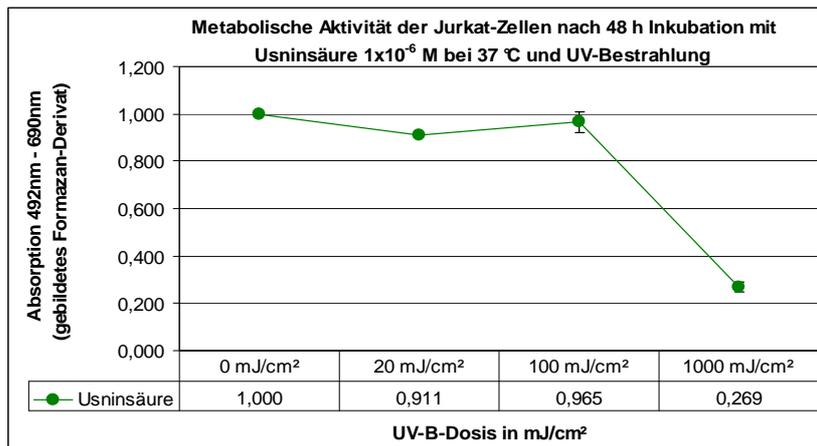


Abb. 3.3.5.c: Metabolische Aktivität der Zellen in Medium nach 48-stündiger Inkubation mit Usninsäure 1×10^{-6} M und Zusatz von 0,2 % DMF. Die Metabolisierungsrate der Zellen unter den einzelnen UV-B-Dosen wurde durch oben genannte Korrekturrechnung ermittelt Mittelwert und Standardabweichung aus 9 Einzelexperimenten.

Bei einer Inkubation mit Usninsäure in einer Konzentration von 1×10^{-6} M 48 Stunden im Inkubator zeigen die Zellen eine metabolische Aktivität bei 20 mJ/cm² von $0,911 \pm 0,078$, bei 100 mJ/cm² $0,965 \pm 0,037$ und bei 1000 mJ/cm² $0,269 \pm 0,026$. Der Vergleich der metabolischen Aktivität der Zellen (s. Abb. 3.3.5.d) nach 48-stündiger Inkubation mit 1×10^{-8} M und 1×10^{-6} M Usninsäure (mit Zusatz von 0,2 % DMF) mit Zellen in Medium o. Z. zeigt bei einer Konzentration von 1×10^{-8} M Usninsäure in allen gewählten Bestrahlungsdosen eine signifikant erhöhte Umsetzungsrate des Formazanderivates ($p < 0,01$). Bei einer Konzentration von 1×10^{-6} M Usninsäure liegt ein signifikanter Unterschied von usninsäureinkubierten Zellen zu Zellen in Medium o. Z. nur bei 100 mJ/cm² vor.

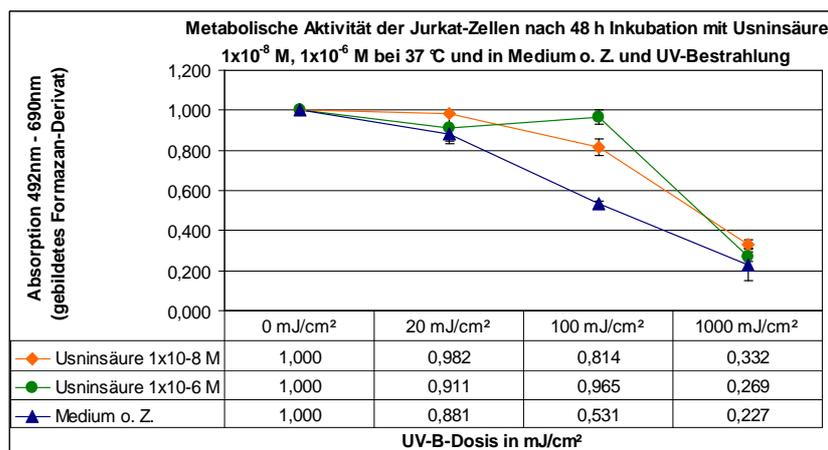


Abb. 3.3.5.d: Vergleich der metabolischen Aktivität von mit Usninsäure 1×10^{-8} M und 1×10^{-6} M (mit Zusatz von 0,2 % DMF) 48 Stunden inkubierten Zellen zur metabolischen Aktivität von Zellen in Medium o. Z. Die Metabolisierungsrate der Zellen unter den einzelnen UV-B-Dosen wurde durch oben genannte Korrekturrechnung ermittelt. Mittelwerte und Standardabweichung aus 18 bzw. 9 Einzelversuchen.

Resultat

Eine 48-stündiger Inkubation mit Usninsäure in einer Konzentration von 1×10^{-8} M verbessert die metabolische Aktivität von Jurkat-Zellen bei UV-B-Bestrahlung von 20 bis 1000 mJ/cm² signifikant ($p < 0,01$) im Vergleich zu UV-bestrahlten Zellen (gleiche Dosen) in Medium o. Z. Eine Usninsäurekonzentration von 1×10^{-6} M zeigt nach 48-stündiger Inkubation nur bei einer UV-Dosis von 100 mJ/cm² eine signifikant erhöhte metabolische Aktivität.

3.3.6. Untersuchungen zur Wirkung von Usninsäure in Konzentrationen von 1×10^{-8} M bis 1×10^{-6} M nach 48-stündiger Inkubation bei 37 °C und UV-B- Bestrahlung von 20 mJ/cm² bis 1000 mJ/cm² nach Korrektur des Einflusses von Dimethylformamid (DMF) als Usninsäurelösungsmittel

Wie unter 3.1.3. beschrieben, war die niedrigste erreichte Endkonzentration von DMF im Inkubationsmedium 0,2 %. Um einen möglichen antioxidativen Effekt von DMF nachzuweisen und diesen durch Korrekturrechnungen von der Wirkung der Usninsäure abzugrenzen, wurden die Ergebnisse der Experimente unter 3.3.5. folgendermaßen korrigiert (s. 3.1.3.):

$$\begin{aligned} &[(\text{Absorption Zellen in Medium mit Usninsäure in DMF unter UV-B}) - (\text{Absorption Zellen} \\ &\quad \text{in Medium mit DMF})] + (\text{Absorption Zellen in Medium unter UV-B}) \\ &= \text{Absorption Zellen in Medium mit Usninsäure} \end{aligned}$$

Die Ergebnisse sind in den Abbildungen 3.3.6.a und 3.3.6.b dargestellt:

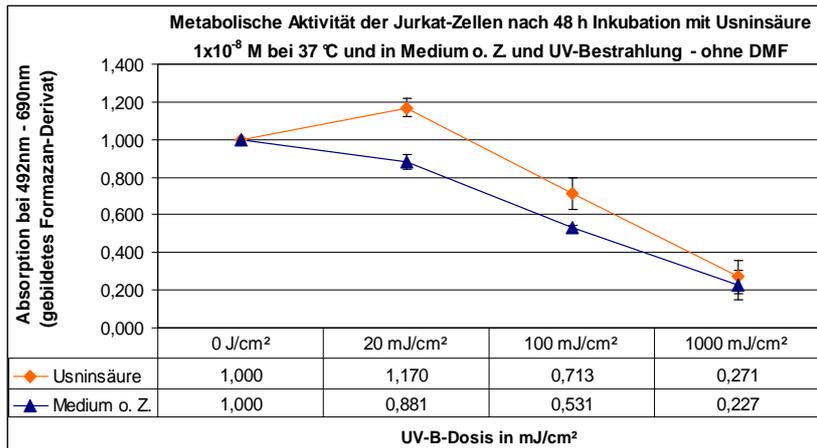


Abb. 3.3.6.a: Vergleich der metabolischen Aktivität von mit Usninsäure 1×10^{-8} M 48 h inkubierten Zellen zur metabolischen Aktivität von Zellen in Medium o. Z. Eine eventuelle Wirkung von DMF wurde durch oben beschriebene Korrekturrechnung eliminiert. Mittelwerte und Standardabweichungen aus 9 bzw. 18 Einzelversuchen.

Bei einer Inkubation mit Usninsäure in einer Konzentration von 1×10^{-8} M 48 Stunden bei 37 °C und 5 % CO₂ und nach der Korrektur zeigt sich eine metabolische Aktivität bei 20 mJ/cm², die einer Extinktion von $1,170 \pm 0,049$ entspricht. Bei 100 mJ/cm² besteht eine Extinktion von $0,713 \pm 0,086$ und bei 1000 mJ/cm² von $0,271 \pm 0,088$. Es liegt ein signifikanter Unterschied ($p < 0,01$) in der Metabolisierungsrate der usninsäureinkubierten Zellen bei 20 mJ/cm² und 100 mJ/cm² zu Zellen in Medium o. Z. vor. Bei einer Dosis von 1000 mJ/cm² besteht kein signifikanter Unterschied im Vergleich der mit Usninsäure inkubierten Zellen zu Zellen in Medium o. Z.

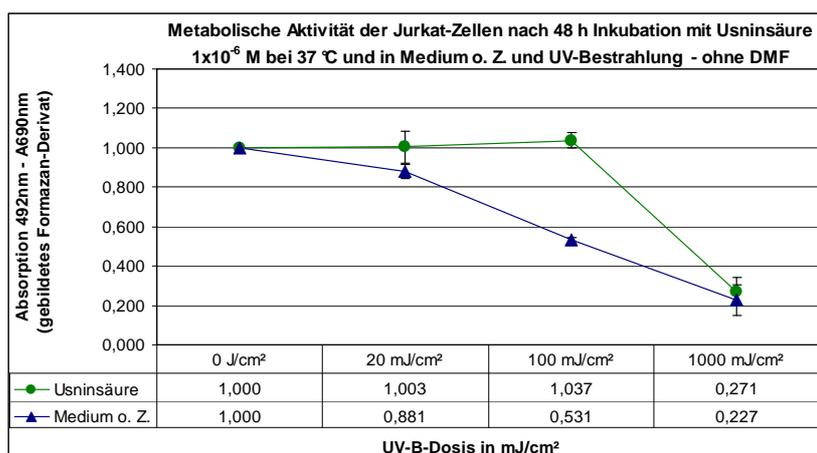


Abb. 3.3.6.b: Vergleich der metabolischen Aktivität von mit Usninsäure 1×10^{-6} M 48 h inkubierten Zellen zur metabolischen Aktivität von Zellen in Medium o. Z. Eine eventuelle Wirkung von DMF wurde durch oben genannte Rechnung eliminiert. Mittelwerte und Standardabweichungen aus 9 bzw. 18 Einzelversuchen.

Nach einer Inkubation mit Usninsäure 48 Stunden in einer Konzentration von 1×10^{-6} M bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$ und 5% CO_2 und nach der Korrektur entspricht die metabolische Aktivität der Zellen bei 20 mJ/cm^2 einer Absorption von $1,003 \pm 0,08$, bei 100 mJ/cm^2 von $1,037 \pm 0,037$ und bei 1000 mJ/cm^2 von $0,227 \pm 0,069$. Es liegt eine signifikant höhere Umsatzrate des Formazanderivates ($p < 0,01$) der mit Usninsäure 1×10^{-6} M inkubierten Zellen im Vergleich zu Zellen in Medium o. Z. bei 100 mJ/cm^2 vor. Bei 20 mJ/cm^2 und bei 1000 mJ/cm^2 besteht kein signifikanter Unterschied ($p > 0,05$) im Vergleich der mit Usninsäure inkubierten Zellen zu Zellen in Medium o. Z. Der Unterschied in der metabolischen Aktivität der UV-bestrahlten, nicht mit Usninsäure inkubierten Zellen zu UV-bestrahlten Zellen, die mit Usninsäure inkubiert wurden, ergibt für beide Usninsäurekonzentrationen einen Faktor von maximal 1,95.

Resultat

Nach 48-stündiger Inkubation von Jurkat-Zellen mit 1×10^{-8} bzw. 1×10^{-6} M Usninsäure ist eine Verbesserung der Resistenz gegenüber UV-B-Licht bei 100 mJ/cm^2 festzustellen.

Bei 20 mJ/cm^2 lässt sich dies nur bei einer Usninsäurekonzentration von 1×10^{-8} M zeigen. Bei 1000 mJ/cm^2 besteht kein signifikanter Unterschied der metabolischen Aktivität der mit Usninsäure inkubierten Zellen zu Zellen in Medium o. Z.

3.4. Die Wirkung von Usninsäure (1×10^{-4} M) an menschlichen lymphoiden Zellen bei Ultraviolett-B-Lichtbestrahlung – Beeinflussung der metabolischen Aktivität

3.4.1. Untersuchung zur Dunkeltoxizität von Usninsäure in Konzentrationen von 1×10^{-4} M nach einstündiger Inkubation bei Raumtemperatur

Die Ergebnisse der Experimente zur Dunkeltoxizität sind in der Abbildung 3.3.7. dargestellt. Als Kontrollen dienten Jurkat-Zellen in Medium o. Z., sowie Zellen in Medium plus $0,2 \%$ Dimethylformamid, welches als Lösungsmittel für die Usninsäure verwendet wurde. Die Inkubationszeit betrug jeweils eine Stunde bei etwa $22 \text{ }^\circ\text{C}$. Nach einem Waschschrift mit PBS wurden die Zellen in 96well-Platten ausgesät und mit dem

XTT-Reagenz 3,5 h bei 37 °C inkubiert. Mittelwerte und Standardabweichung wurden aus je 20 Einzelversuchen ermittelt.

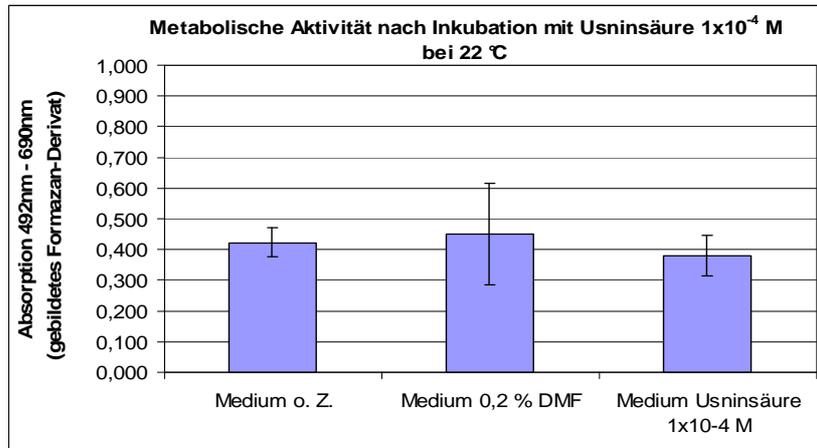


Abb. 3.3.7.: Metabolische Aktivität nach einer Stunde Inkubation bei RT in Medium ohne jeglichen Zusatz, mit Zusatz von 0,2 % DMF oder 1x10⁻⁴ M Usninsäure (mit 0,2 % DMF). Mittelwerte und Standardabweichung aus je 20 Einzelversuchen.

Die Experimente zur Dunkeltoxizität von Usninsäure zeigen keine signifikanten Unterschiede ($p > 0,05$) in der metabolischen Aktivität von Zellen in Medium o. Z., Medium plus 0,2 % DMF und Medium plus 1x10⁻⁸ M bzw. 1x10⁻⁶ M Usninsäure (plus 0,2 % DMF). Die Schwankung entspricht der gerätetypischen Toleranz.

Resultat

Eine Verringerung der metabolischen Zellaktivität liegt im Dunkeln unter Einfluss der Usninsäurekonzentration 1x10⁻⁴ M im Vergleich zu Zellen in Medium o. Z. nicht vor ($p > 0,05$).

3.4.2. Untersuchungen zur Wirkung von Usninsäure in einer Konzentration von 1x10⁻⁴ M nach einstündiger Inkubation bei Raumtemperatur und UV-B-Bestrahlung von 1 J/cm² bis 14 J/cm²

Die Abbildung 3.3.8.a zeigt die metabolische Aktivität von Jurkat-Zellen in Medium ohne Zusätze bei UV-B-Dosen von 1 J/cm², 5 J/cm², 10 J/cm² und 14 J/cm². Nach der Bestrahlung wurden die Zellen mit dem XTT-Reagenz 3,5 h bei 37 °C, 5 % CO₂ inkubiert. Danach erfolgte die Messung am ELISA-Reader. Die Abbildung 3.2.8.b zeigt die Aktivität der mit Usninsäure in einer Konzentration von 1x10⁻⁴ M eine Stunde

inkubierten Zellen. Die Berechnung des Anteils überlebender Zellen nach UV-B-Bestrahlung erfolgte nach der Formel:

$$\frac{\text{Absorption bei } X \text{ J/cm}^2 \text{ UV-B}}{\text{Absorption bei } 0 \text{ J/cm}^2 \text{ UV-B}} = X \text{ Absorption nach UV-B-Bestrahlung}$$

Die Untersuchungen zur Überlebensrate der Jurkat-Zellen nach UV-B-Bestrahlung in Dosen von 1 J/cm², 5 J/cm², 10 J/cm² und 14 J/cm² in Medium o. Z. ergaben die in der Abbildung 3.4.2.a dargestellten Werte.

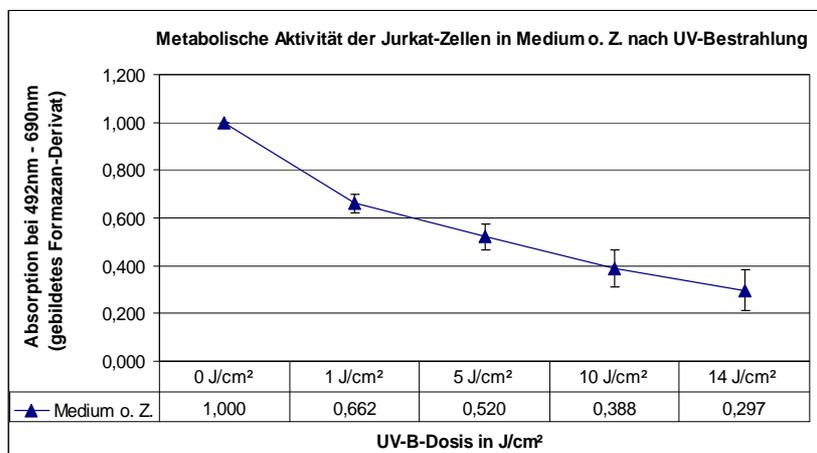


Abb. 3.4.2.a: Metabolische Aktivität der Zellen in Medium o. Z., Metabolisierungsrate der Zellen unter den einzelnen UV-B-Dosen wurde durch oben genannte Korrekturrechnung ermittelt. Mittelwert und Standardabweichung aus 24 Einzelexperimenten.

Im XTT zeigt sich unter UV-B-Bestrahlung eine Verringerung der Zellaktivität mit Zunahme der Bestrahlungsdosis. Bei 1 J/cm² ist dies eine Differenz zur maximalen Absorption (=1) von 0,338 (gemessene Absorption 0,662 ±0,04), bei 5 J/cm² von 0,48 (gemessene Absorption 0,520 ±0,055), bei 10 J/cm² von 0,612 (gemessene Absorption 0,388 ±0,079) und bei 14 J/cm² von 0,703 (gemessene Absorption 0,297 ±0,086). Es besteht ein signifikanter Unterschied (p<0,01) der metabolischen Aktivität der Jurkat-Zellen im Dunkeln zu solchen, die mit 1 J/cm², 5 J/cm², 10 J/cm² und 14 J/cm² UV-B bestrahlt wurden. Die Untersuchungen zur Überlebensrate der Jurkat-Zellen nach UV-B-Bestrahlung in Dosen von 0 mJ/cm², 1 J/cm², 5 J/cm², 10 J/cm² und 14 J/cm² in Medium mit Zusatz von 1x10⁻⁴ M Usninsäure ergaben die in den Abbildungen 3.4.2.b dargestellten Werte.

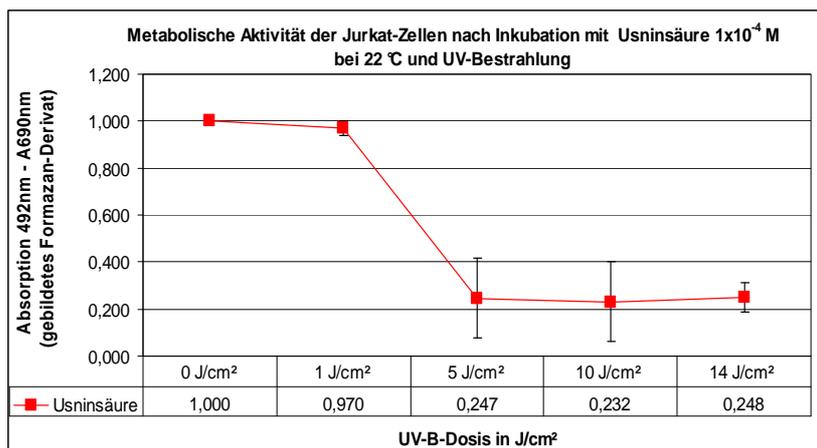


Abb. 3.4.2.b: Metabolische Aktivität der Zellen in Medium nach Inkubation mit 1×10^{-4} M Usninsäure und Zusatz von 0,2 % DMF, Metabolisierungsrate der Zellen unter den einzelnen UV-B-Dosen wurde durch oben genannte Korrekturrechnung ermittelt. Mittelwert und Standardabweichung aus 24 Einzelexperimenten.

Werden die Zellen vor der Bestrahlung mit 1×10^{-4} M Usninsäure eine Stunde inkubiert, zeigt sich ein Abfall der metabolischen Aktivität, welche einem Abfall der Absorption auf $0,970 \pm 0,03$ bei 1 J/cm^2 , auf $0,247 \pm 0,17$ bei 5 J/cm^2 und auf $0,232 \pm 0,17$ bei 10 J/cm^2 bis auf $0,248 \pm 0,06$ bei 14 J/cm^2 entspricht.

Der Vergleich der metabolischen Aktivität der Zellen (s. Abb. 3.4.2.c).nach Inkubation mit 1×10^{-4} M Usninsäure (mit Zusatz von 0,2 % DMF) mit Zellen in Medium o. Z. zeigt eine deutlich verringerte metabolische Aktivität zu derjenigen von Zellen in Medium o. Z. Ein signifikanter Unterschied mit $p < 0,01$ besteht für die metabolische Aktivität der Jurkat-Zellen in Medium o. Z. bei UV-B-Bestrahlungsdosen von 1 J/cm^2 und 5 J/cm^2 zur metabolischen Aktivität der mit Usninsäure inkubierten Zellen unter gleichen UV-B-Bestrahlungsdosen. Bei 10 J/cm^2 und 14 J/cm^2 konnte kein signifikanter Unterschied ($p > 0,05$) in der Metabolisierungsrate der Jurkat-Zellen in Medium o. Z. zu mit Usninsäure in der untersuchten Konzentration inkubierten Zellen ermittelt werden

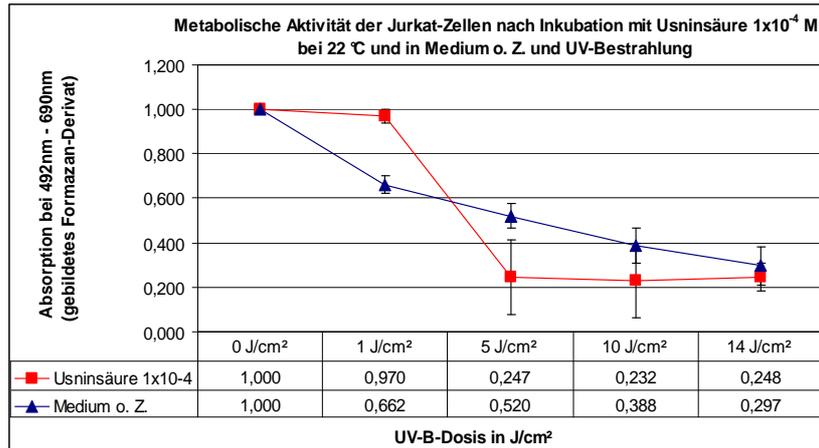


Abb. 3.4.2.c: Vergleich der metabolischen Aktivität der mit Usninsäure 1×10^{-4} M (in 0,2 % DMF gelöst) behandelten Zellen zur metabolischen Aktivität der Zellen in Medium o. Z. nach einstündiger Inkubation. Die Metabolisierungsrate der Zellen unter den einzelnen UV-B-Dosen wurde durch oben genannte Korrekturrechnung ermittelt. Mittelwerte und Standardabweichung aus 24 Einzelexperimenten.

Resultat

Usninsäure in einer Konzentrationen von 1×10^{-4} M verringert die Metabolisierungsrate (Tetrazoliumsalz zu Formazanfarbstoff) von Jurkat-Zellen bei UV-B-Bestrahlung von 1 J/cm² bis 5 J/cm² signifikant ($p < 0,01$) im Vergleich zu UV-B-bestrahlten Zellen (gleiche Dosen) in Medium o. Z.. Bei Bestrahlungsdosen von 10 J/cm² bis 14 J/cm² ist der Unterschied nicht signifikant ($p > 0,05$).

3.4.3. Untersuchungen zur Wirkung von Usninsäure in einer Konzentration von 1×10^{-4} M nach einstündiger Inkubation bei Raumtemperatur und UV-B-Bestrahlung von 1 J/cm² bis 14 J/cm² nach Korrektur des Einflusses von Dimethylformamid (DMF) als Usninsäurelösungsmittel

Wie unter 3.1.3. beschrieben, war die niedrigste erreichte Endkonzentration von Dimethylformamid (DMF) im Inkubationsmedium 0,2 %. Um einen möglichen antioxidativen Effekt von DMF nachzuweisen und diesen durch Korrekturrechnungen von der Wirkung der Usninsäure abzugrenzen, wurden die Ergebnisse der Experimente unter 3.4.2. folgendermaßen korrigiert (s. 3.1.3.):

$$[(\text{Absorption Zellen in Medium} + \text{Usninsäure} + \text{DMF unter UV-B}) - (\text{Absorption Zellen in Medium mit DMF unter UV-B})] + (\text{Absorption Zellen in Medium unter UV-B}) = \text{Absorption Zellen in Medium} + \text{Usninsäure unter UV-B}$$

Die Ergebnisse sind in der Abbildung 3.4.3. dargestellt:

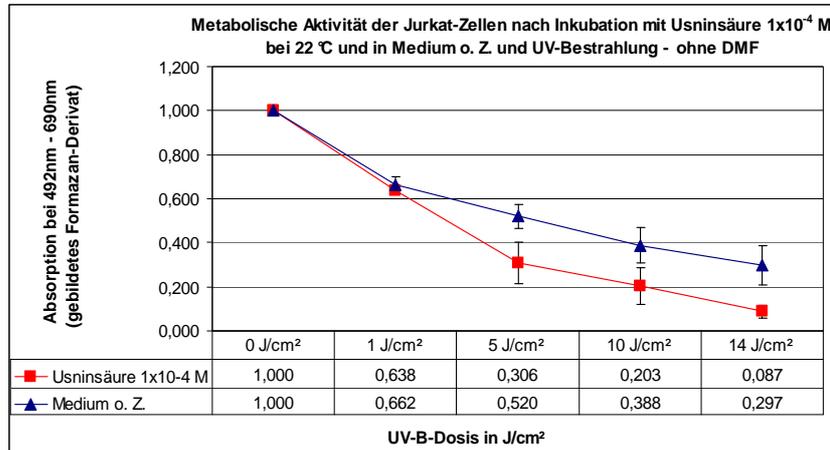


Abb. 3.4.3.: Vergleich der metabolischen Aktivität von Zellen in Medium o. Z. zur metabolischen Aktivität von Zellen in Medium mit 1×10^{-4} M Usninsäure nach einstündiger Inkubation. Eine eventuelle Wirkung von DMF wurde durch die oben beschriebene Korrekturrechnung eliminiert. Mittelwerte und Standardabweichung aus 24 Einzelexperimenten.

Es liegt ein signifikanter Unterschied ($p < 0,01$) in der metabolischen Aktivität der Zellen in Medium o. Z. zu mit Usninsäure 1×10^{-4} M inkubierten Zellen bei 5 J/cm² (Differenz der Absorption von 0,214; metabolische Aktivität der usninsäureinkubierten Zellen: $0,306 \pm 0,093$), 10 J/cm² (Differenz der Absorption 0,185; metabolische Aktivität der usninsäureinkubierten Zellen: $0,203 \pm 0,083$) und bei 14 J/cm² (Differenz der Absorption von 0,21; metabolische Aktivität der usninsäureinkubierten Zellen: $0,087 \pm 0,028$;) vor. Bei 1 J/cm² besteht kein signifikanter Unterschied ($p > 0,05$) der metabolischen Aktivität der Zellen in Medium o. Z. zu usninsäureinkubierten Zellen.

Resultat

Nach rechnerischer Korrektur der Wirkung von DMF ergeben sich niedrigere metabolische Aktivitäten der Jurkat-Zellen in der untersuchten Konzentration der eingesetzten Usninsäure ($p < 0,01$) bei Bestrahlungsdosen von 5 J/cm², 10 J/cm² und 14 J/cm² im Vergleich zu Zellen in Medium o. Z. bei gleichen UV-B-Dosen. Bei 1 J/cm² konnte kein signifikanter Unterschied der metabolischen Aktivität ermittelt werden ($p > 0,05$).

3.5. Ergebnisse II

Bisher wurde die Usninsäure an malignen menschlichen lymphoiden Zellen (Jurkat-Zellen) erforscht. Um weitere Erkenntnisse im Sinne einer besseren Übertragbarkeit auf *in vivo*-Verhältnisse zu erhalten, wurde die Usninsäure an HaCaT-Zellen untersucht. Hierbei handelt es sich um empfindliche, nichtmaligne menschliche Hautzellen, die ein adhärentes und konfluentes Wachstum aufweisen. Zunächst wurde diejenige Konzentration der Usninsäure bestimmt, bei der die Hälfte der HaCaT-Zellen zytotoxisch geschädigt ist (IC_{50}), um eine Verfälschung der Experimente durch Eigentoxizität der Substanz auf die Zellen auszuschließen. Nach der Bestimmung der optimalen Usninsäurekonzentration erfolgte die Untersuchung auf antioxidative Wirkung anhand der Messung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) im carboxy-DC-FDA-Assay (DC-FDA-Assay) und gleichzeitiger Bestimmung der überlebenden Zellen mittels ViaLight Plus Cell Proliferation and Cytotoxicity BioAssay (Vialight-Assay) unter UV-B-Bestrahlung (Tests siehe auch Material und Methoden). Bei den angewandten Methoden handelt es sich hinsichtlich der Zytotoxizitätsbestimmung und Radikalmessung um sensitive Systeme. Die Untersuchungen an HaCaT-Zellen wurden an der Universitäts-Hautklinik der Albrecht-Ludwigs-Universität in Freiburg im Breisgau in Zusammenarbeit mit und freundlicher Unterstützung durch die Arbeitsgruppe „skintegral“ (Professor C. Schempp) durchgeführt.

3.5.1. Die Wirkung von Usninsäure an menschlichen Keratinozyten – direkte Zytotoxizität

Das Ergebnis der Zytotoxizitätsmessung ist in Abbildung 3.1. dargestellt. Als Kontrollen dienten Zellen in Magermedium ohne Zusätze (Zusammensetzung s. Materialien und Geräte, Tabelle 6), Zellen in Medium mit Zusatz von 1 % Ethanol als Lösungsmittel für die Usninsäure, sowie Zellen in Medium mit Zusatz von Triton X als Negativkontrolle. Die HaCaT-Zellen wurden in einer Dichte von 25.000/ml in Magermedium in einem 96er well ausplattiert ($2,5 \times 10^3$ /well in 100 μ l) und 24 Stunden bei 37 °C inkubiert. Daraufhin erfolgte der Zusatz der Usninsäure in den Konzentrationen von $3,5 \times 10^{-10}$ M bis 4×10^{-7} M und eine nochmalige 24-stündige Inkubation bei 37 °C. Am Folgetag wurde die

Testsubstanz des verwendeten Vialight-Assay nach Protokoll hinzugegeben und gemessen. Die Angabe der Lichtausbeute erfolgte in *relative light units* (RLUs).

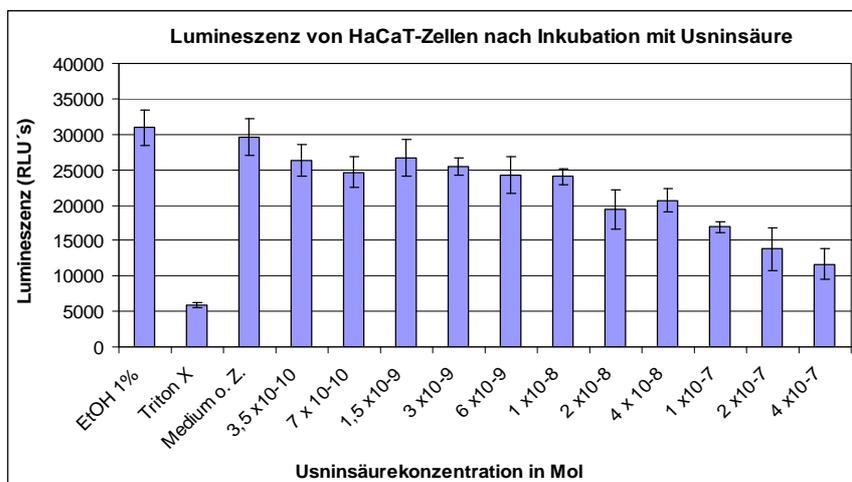


Abb. 3.5.1.: Bestimmung der Zellaktivität mittels Lumineszenz von HaCaT-Zellen nach 24-stündiger Inkubation mit Usninsäure in einem Konzentrationsbereich von $3,5 \times 10^{-10}$ M bis 4×10^{-7} M (Vialight-Assay). Mittelwerte und Standardabweichung aus je 3 Einzelversuchen.

Aus den dargestellten Ergebnissen wird ersichtlich, dass es einen Abfall in der Zellaktivität der HaCaT-Zellen mit Zunahme der Usninsäurekonzentration gibt. Bei einer Konzentration von 2×10^{-7} M Usninsäure ist die Hälfte aller in Magermedium 24 Stunden inkubierten HaCaT-Zellen inaktiv (Rückgang der Biolumineszenz von 31.000 Einheiten auf 14.000 Einheiten) mit einer Signifikanz von $p < 0,01$. Das ergibt eine IC_{50} von etwa 2×10^{-7} M. Des Weiteren wirkt das verwendete Lösungsmittel Ethanol in der Konzentration von 1 % auf die Zellen nicht toxisch.

3.5.2. Untersuchungen zur Induktion von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) in HaCaT-Zellen durch UV-Licht (Sonnensimulator, SSR) nach Inkubation mit Usninsäure

Die lichtbedingte Bildung von intrazellulären reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) wurde mit Hilfe des Detektionsreagenz 2',7'-Dichlorofluoreszein-diacetat (DC-FDA) gemessen. Gebildete ROS in den Zellen bedingen die Oxidation des nichtfluoreszierenden Reagenz DC-FDA zum fluoreszierenden Produkt 2',7'-Dichlorofluoreszein (DCF). Die Zellen wurden bei 37 °C und 5 % CO₂ mit 5 µM DC-FDA pro well 20 Minuten inkubiert. Daraufhin erfolgte die UV-Bestrahlung mittels Sonnensimulator (SSR) mit 24 mJ/cm². Das gebildete fluoreszierende Produkt DCF wurde danach mit der Wellenlänge von 495 nm angeregt und emittiert bei 527 nm. Die Fluoreszenzintensität von DCF wurde jeweils von 2x10⁴ Zellen bestimmt. Als Kontrolle dienten unbestrahlte Zellen in Magermedium ohne weitere Zusätze.

Die Ergebnisse sind in Abb. 3.5.2.a dargestellt. Nach Bestimmung der Fluoreszenz-Intensität von DCF in 2x10⁴ Zellen wurden diese Zellen für weitere 4 Stunden inkubiert, um anschließend das Überleben der Zellen mittels Vialight-Assay messen zu können. Ein fehlendes Signal im DC-FDA-Assay kann dabei zwei Ursachen haben: Entweder wurden die ROS von der zugegebenen Usninsäure eliminiert oder die zugegebene Konzentration der Usninsäure schädigt die Zellen zytotoxisch, so dass letztlich keine ROS entstehen konnten. Aus diesem Grund wurde ein Vialight-Assay anschließend durchgeführt (s. Abb. 3.5.2.b), welcher das Überleben der Zellen aufzeigt (Lumineszenz). Eine optimale Usninsäurekonzentration liegt dann vor, wenn die gebildeten ROS durch die Usninsäure inaktiviert werden (geringe Fluoreszenz-Einheiten bei der ROS-Detektion) und gleichzeitig der Vialight-Assay zwischen den Lumineszenzeinheiten der bestrahlten und unbestrahlten Probe keinen Unterschied zeigt (d.h. alle Zellen leben). Im DC-FDA-Assay haben sich die Ergebnisse nach Inkubation mit Usninsäure im Konzentrationsbereich 3x10⁻⁹ bis 2x10⁻⁷ M als signifikant (p<0,05) im Vergleich zur Positiv- als auch zur Lösungsmittelkontrolle ergeben.

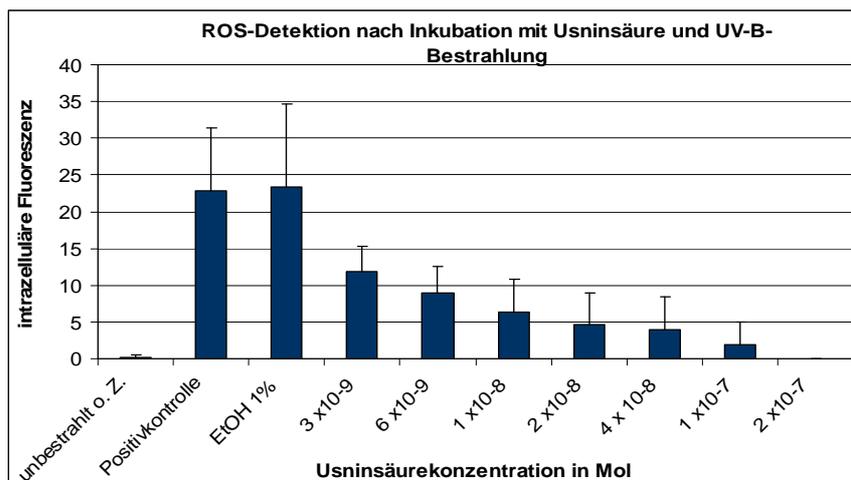


Abb. 3.5.2.a: Detektion reaktiver Sauerstoffspezies nach 24-stündiger Inkubation der HaCaT-Zellen mit Usninsäure in einem Konzentrationsbereich 3×10^{-9} M bis 2×10^{-7} M und UV-Bestrahlung mit 24 mJ/cm^2 SSR. Mittelwerte und Standardabweichung aus je 6 Einzelversuchen.

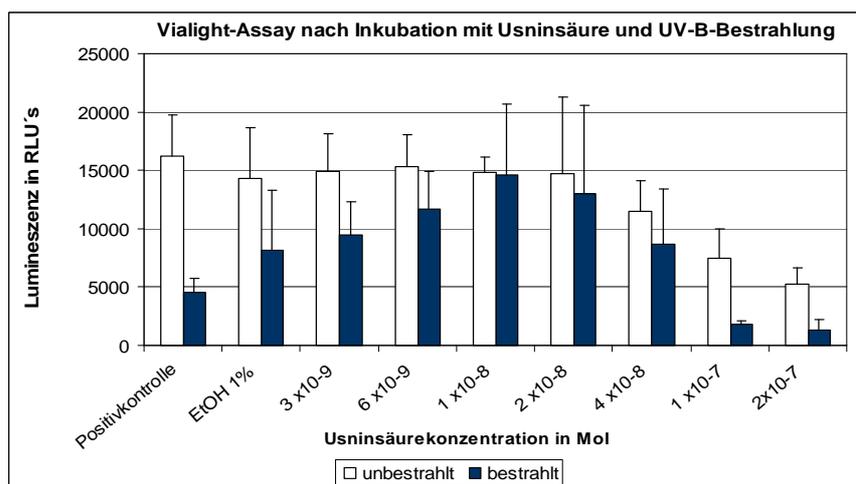


Abb. 3.5.2.b: Bestimmung der Zellaktivität mittels Lumineszenz von HaCaT-Zellen nach 24-stündiger Inkubation mit Usninsäure in einem Konzentrationsbereich von 3×10^{-9} M bis 2×10^{-7} M und UV-Bestrahlung mit 24 mJ/cm^2 SSR. Mittelwerte und Standardabweichung aus je 6 Einzelversuchen.

Aus Abb. 3.5.2.b ist ersichtlich, dass ab einer Konzentration von 2×10^{-8} M Usninsäure im Dunkeln bei steigender Konzentration ein kontinuierlicher Abfall der Lumineszenz eintrat. Dies ist gleichbedeutend mit einer Verringerung der Überlebensrate der HaCaT-Zellen (siehe auch 3.5.1.). Verstärkt wurde dieser Effekt durch die Bestrahlung mit 24 mJ/cm^2 UV-Licht. Zu beachten ist, dass bei einer Konzentration der Usninsäure von 3×10^{-9} M bis 1×10^{-8} M das Überleben der Zellen im Dunkeln relativ konstant war ($p > 0,05$ zur Positivkontrolle). Unter Bestrahlung mittels SSR wurde über diesen Usninsäure-

Konzentrationsbereich sogar ein Anstieg der Lumineszenz bis zum Niveau der unbestrahlten Zellen erreicht (siehe 1×10^{-8} M in Abb. 3.5.2.b) Bei 1×10^{-8} M Usninsäure ließ sich daher kein signifikanter Unterschied in der Vitalität der Zellen zwischen den bestrahlten und den unbestrahlten Zellen ($p > 0,05$) feststellen. Für die mit Usninsäure 1×10^{-8} M inkubierten, bestrahlten Zellen wurde ebenfalls kein signifikanter Unterschied ($p > 0,05$) der Vitalität im Vergleich zur unbestrahlten Positivkontrolle (unbehandelte Zellen) ermittelt. Ein hochsignifikanter Unterschied ($p < 0,01$) bestand jedoch zwischen der Vitalität der UV-bestrahlten Zellen, die nicht mit Usninsäure inkubiert wurden zur Vitalität der Zellen unter UV-Bestrahlung, die mit 1×10^{-8} M Usninsäure 24 Stunden inkubiert wurden.

Die Kombination von DC-FDA-Assay und Vialight-Assay zeigt, dass die Bildung und Detektion der ROS vom Überleben der HaCaT-Zellen abhängt. So sind bei 1×10^{-8} M Usninsäure nur noch 6 Fluoreszenz-Einheiten im DC-FDA-Assay und 15000 Lumineszenz-Einheiten im Vialight-Assay messbar. Dies bedeutet eine effiziente Beseitigung der ROS bei maximaler Vitalität der Zellen. Bei einer Usninsäurekonzentration von 1×10^{-7} M sind dagegen nur noch etwa 2 Fluoreszenz-Einheiten vorhanden. Dies könnte zu der Annahme führen, dass bei dieser Konzentration die Radikale noch besser gelöscht werden. Aus dem Vialight-Assay ist jedoch klar ersichtlich, dass das Überleben der Zellen bei dieser Usninsäurekonzentration stark verringert ist. ROS werden somit nicht gebildet, da der Großteil der Zellen während der Inkubation mit der ausgewählten Usninsäurekonzentration im Dunkeln zytotoxisch geschädigt wurde.

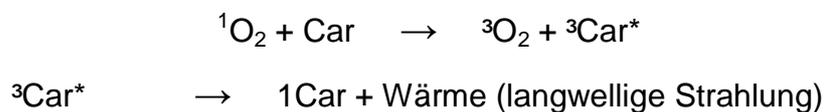
4. Diskussion

Durch die bestehenden Klimaveränderungen wächst das Interesse an natürlichen Substanzen zum Schutz vor schädigenden Umwelteinflüssen wie UV-Strahlen und aggressiven Molekülen. Daher wurde in dieser Dissertation die Substanz Usninsäure aus der Flechtenspezies *Xanthoparmelia farinosa* (Vainio) des subantarktischen Raums auf ihre Wirkungsweise unter UV-B-Bestrahlung untersucht. Im ersten Teil wurden Experimente an Jurkat-Zellen unter verschiedenen Bedingungen (Konzentrationen der Usninsäure und Bestrahlungsdosen) zur Zytotoxizität und antioxidativen UV-Protektion durchgeführt. Im zweiten Teil wurden ausgewählte Untersuchungen mit empfindlicheren Zellen (HaCaT-Zellen) und Methoden verwendet, um die Resultate des ersten Teils näher an *in-vivo*-Verhältnisse der menschlichen Haut heranzuführen. Weiterhin erlaubte die Auswertung der angewendeten Testsysteme eine unmittelbare Aussage gleichzeitig über das Überleben der Zellen nach Inkubation mit unterschiedlichen Usninsäurekonzentrationen **und** über die antioxidative Potenz der eingesetzten Usninsäure.

4.1. Antioxidantien und Prooxidantien / Photosensibilisatoren

Als Antioxidans bezeichnet man „jede Substanz, die in geringeren Konzentrationen als ein oxidierbares Substrat vorhanden ist und in der Lage ist die Oxidation des Substrates zu verringern oder zu verhindern.“⁴⁸. Antioxidantien sind somit durch Modulation oxidativer Prozesse entscheidend für die Aufrechterhaltung eines Gleichgewichtes in der Zelle. Im normalen Zellmetabolismus unter aeroben Bedingungen entstehen permanent Reaktive Sauerstoffspezies (ROS), die neutralisiert werden müssen. Zudem werden durch den Einfluss von Umweltnoxen wie UV-Strahlen, Zigarettenrauch und Luftverschmutzung Radikale gebildet, die bei Unausgewogenheit der antioxidativ-prooxidativen Balance in Richtung einer Zerstörung oder Schädigung von Makromolekülen wie DNS, Lipiden und Proteinen wirken können. Dies wird im Allgemeinen als oxidativer Stress bezeichnet, welcher das Vorliegen von Antioxidantien für das Überleben der Zelle bedeutsam macht^{31,98,118}

Das zugrunde liegende Prinzip der Antioxidantien ist, die in Elektronen gebundene Energie reaktiver Molekülspezies aufzunehmen, die für eine Zelle schädigend wirken können. Dies geschieht über die Bildung von nicht reaktiven Endprodukten. Radikale verursachen eine Kettenreaktion, indem sie – selbst Träger eines ungepaarten Elektrons – ein ungepaartes Elektron in einem Reaktionspartner generieren („Radikale bringen Radikale hervor“) ¹¹⁸. Antioxidantien, lokalisiert in Membranen, nehmen diese Energie (Elektronen) auf, geben sie entweder in Form von Wärme ab, oder geben sie an andere Antioxidantien wie z. B. Vitamin C, Carotinoide oder Gluthation in der Zelle weiter, wodurch sich die jeweilige antioxidative Substanz permanent regeneriert und eine strukturschädigende Reaktion in der Zelle gestoppt ist ⁶⁸. Die Reaktion sieht beispielhaft für Singulett-Sauerstoff ($^1\text{O}_2$) und ein Carotinoid (Car) wie folgt aus:



Das als Antioxidans vorliegende Molekül kann in Abhängigkeit der Umgebungsbedingungen prooxidativ wirken – also selbst Verursacher von oxidativem Stress sein. Wesentliche Faktoren für die Art der Wirkung sind die Struktur (Größe, Position und Anzahl der Gruppen, *cis* oder *trans* Konfiguration), die Position in der Zelle, die Fähigkeit zur Reaktion mit anderen Antioxidantien (Position in der Redoxreihe), die Konzentration der Substanz, die Anwesenheit bestimmter Metalle sowie der Sauerstoffpartialdruck ¹⁴⁴. T.G. Truscott postulierte 1996 eine Reaktion von β -Carotin, wonach unter hohem Sauerstoffpartialdruck ein oxigeniertes Produkt des β -Carotins entsteht, welches wiederum zu einer Oxidation und damit Schädigung von vor allem Lipiden führen kann ¹³¹.

Unter bestimmten Bedingungen kann also eine Substanz, bei der eine antioxidative Wirkungsweise vorliegt, ein prooxidatives Verhalten zeigen. Wenn eine reaktive Substanz unter Einfluss von UV-Strahlen Zellschädigungen verursacht, indem diese die Energie auf Moleküle wie DNS oder Lipide überträgt bzw. Radikale generiert, spricht man von einem Photosensibilisator.

4.2. Dunkeltoxizität der Usninsäure

Die Erforschung des Verhaltens der Usninsäure im Hinblick auf anti- und prooxidative Eigenschaften unter UV-Licht an menschlichen Zellen stand im eigentlichen Mittelpunkt des Interesses dieser Arbeit. Dennoch waren zunächst Untersuchungen zur Zytotoxizität (an Jurkat- wie auch an HaCaT-Zellen) notwendig, da Usninsäure vor allem in der Vergangenheit in Bereichen verwendet wurde, in denen eine zellschädigende Wirkung gewünscht ist. Dies sind vornehmlich antimikrobielle Therapien aber auch in der Tumorthherapie wurde Usninsäure bereits erforscht^{61,80,30,141,72,135,98}. Weiterhin musste auch ein Effekt der eingesetzten Lösungsmittel DMF (Jurkat-Zellen) und Ethanol (HaCaT-Zellen) ausgeschlossen werden, da diese Substanzen toxisch für Zellen sein können oder unerwünschte Effekte ausüben können⁶⁹.

Mitte des letzten Jahrhunderts wurde eine antimikrobielle Wirksamkeit der Usninsäure vor allem gegen Staphylokokken, Streptokokken und Säurefeste Stäbchen festgestellt¹²³. Durch wirksame synthetische Antibiotika ließ dieses Interesse in den 60er und 70er Jahren jedoch nach, um mit einem erhöhten Aufkommen von Resistenzen – vor allem von *Staphylokokkus aureus* (MRSA) - wieder zu erwachen^{80,107}. Weiterhin zeigten Kupchan und Koppermann 1975 die Inhibition eines Lungenkarzinoms an Mäusen, welche mit (-)-Usninsäure aus *Cladonia leptoclada* behandelt wurden. Die Überlebenszeit der kranken Mäuse konnte um 35 bis 52 % gegenüber unbehandelten erkrankten Mäusen verlängert werden, indem ein Konzentrationsbereich von 20-200 mg/kg (= 0,02 - 0,2 µg/g) eingesetzt wurde⁷². Ebenso wurde in neuerer Zeit an drei humanen malignen Zelllinien ein proliferationshemmender Effekt – abhängig von der Konzentration – nachgewiesen⁶⁹. Aufgrund der vorliegenden Publikationen war es im Rahmen der geplanten Untersuchungen an humanen Zelllinien (Jurkat- und HaCaT-Zellen) notwendig, auf eine mögliche Toxizität der Usninsäure zu testen.

Die in den Versuchen verwendete Usninsäure wurde von Professor Ernesto Fernandez der Chemistry and Pharmacy school der Universität von Valparaiso, Chile bereitgestellt und dort aus der Flechtenart *Xanthoparmelia farinosa* (Vainio) mittels Aceton extrahiert und durch einen Kristallisationsprozess mit CHCl₃ : EtOh (1:1) gereinigt (s. in¹⁰³). Professor E. Fernández *et al.* 2006 hat bereits Versuche zur Toxizität der Usninsäure

an Blutzellen durchgeführt. Es wurde Usninsäure aus *Xanthoparmelia microspora* (Müll Arg. Hale) extrahiert und in den Versuchen verwendet. Erythrozyten wurden im Dunkeln mit Usninsäure 1×10^{-7} M unter Kulturbedingungen inkubiert. Daraufhin wurde mittels Spektrophotometer der prozentuale Anstieg von freigesetztem Hämoglobin, welches zur Hämolyse rate proportional ist, in der Zellsuspension gemessen. Es zeigte sich, dass keine Zytotoxizität bzw. Hämolyse auftrat³⁹.

In den Experimenten zur Dunkeltoxizität mit Jurkat- Zellen in dieser Dissertation wurde ebenfalls weder eine direkte Membranzytotoxizität (s. 3.1.1., 3.1.4., 3.1.7.), noch ein negativer Effekt auf die metabolische Aktivität (s. 3.3.1., 3.3.4. und 3.3.7.) nach Inkubation mit den ausgewählten Usninsäurekonzentrationen 1×10^{-8} M, 1×10^{-6} M und 1×10^{-4} M in 0,2 % DMF festgestellt. Dies gilt sowohl für die gewählte Inkubationszeit von einer Stunde bei Raumtemperatur als auch für eine 48-stündige Inkubation unter Kulturbedingungen. Zudem wurde keine Membrantoxizität des eingesetzten Lösungsmittels DMF in der Endkonzentration von 0,2 % im Dunkeln festgestellt (s. 3.1.1., 3.1.4., 3.1.7.), sowie keine Beeinflussung der metabolischen Aktivität (s. 3.3.1., 3.3.4. und 3.3.7.). Durch die vorliegenden Experimente wurde der als im Dunkeln nicht toxisch anzusehende Bereich der Usninsäure für menschliche T-Lymphozyten (Jurkat-Zellen) auf eine Konzentration von 1×10^{-4} M Usninsäure erweitert.

Ebenfalls musste eine Beeinflussung der Ergebnisse der Experimente mit HaCaT-Zellen durch Zytotoxizität der Usninsäure (Carl Roth, Karlsruhe BRD; Stammlösung: 1,28 mg/ml in 20 % Ethanol, alkalisiert) ausgeschlossen werden. In Abschnitt Ergebnisse II, 3.5.1. wurden die Resultate der Zytotoxizitätsmessung an HaCaT-Zellen nach 24-stündiger Inkubation mit Usninsäure in einem Konzentrationsbereich von $3,5 \times 10^{-10}$ M bis 4×10^{-7} M gezeigt. Deutlich zu sehen ist eine Abnahme der Vitalität der Zellen ab einer Konzentration von mehr als 1×10^{-8} M, bis auf weniger als die Hälfte der vorher lebenden Zellen bei der maximal verwendeten Konzentration von 4×10^{-7} M Usninsäure. Somit liegt eine Beeinflussung der Zellvitalität im Sinne einer Toxizität der untersuchten Substanz ab einer Konzentration von 2×10^{-8} M für HaCaT-Zellen vor. Ebenfalls hat sich gezeigt, dass das verwendete Solvent Ethanol (1 % Endkonzentration) keinen negativen Einfluss auf die Zellvitalität nimmt (s. Ergebnisse II, Abb. 3.1.). Die Schwankungen sind aus den verschiedenen Messzeitpunkten und einer relativ geringen Versuchsanzahl zu erklären, denn es handelt sich um orientierende erste Experimentalserien.

Die unter 3.5.1. in Abbildung 3.5.1. dargestellten Ergebnisse korrespondieren mit bereits publizierten Untersuchungen. Bei Experimenten mit HaCaT-Zellen zur Cyclooxygenase-Aktivität (COX-2) unter Usninsäure-Einfluss aus einem *Usnea barbata*-Extrakt zeigten K. Engel et al. eine IC_{50} von $1,5 \times 10^{-7}$ M Usninsäure im Vialight-Assay³⁸. Ebenfalls an HaCaT-Zellen in Untersuchungen zur antiproliferativen Wirkung und Zytotoxizität von Usninsäure aus *Parmelia nepalensis* und *tinctorum* fanden Kumar & Müller im Laktat-Dehydrogenase-Assay eine IC_{50} von 2×10^{-6} M Usninsäure⁷¹. Die ermittelte IC_{50} liegt in unseren Experimenten (Vialight-Assay) bei 2×10^{-7} M Usninsäure.

Aus den Ergebnissen lässt sich ableiten, dass eine Toxizität der verwendeten Usninsäure in dem eingesetzten Bereich von 1×10^{-8} bis 1×10^{-4} M für Jurkat-Zellen und im Bereich von $3,5 \times 10^{-10}$ bis 1×10^{-8} M für HaCaT-Zellen nicht vorliegt. Dies unterliegt der Einschränkung, dass unterschiedliche Zellkulturen eine unterschiedliche Empfindlichkeit gegenüber der Usninsäure aufweisen. So liegen bei den verwendeten Jurkat-Zellen nach einstündiger Inkubation mit Usninsäure 1×10^{-4} M keine Anzeichen zu einer Membrantoxizität oder eines negativ beeinflussten Metabolismus vor. Gleiches gilt für die niedrigeren Konzentrationen von 1×10^{-8} M und 1×10^{-6} M Usninsäure sowohl nach einer Stunde als auch nach 48 Stunden Inkubation. Die HaCaT-Zellen zeigen jedoch bei 2×10^{-7} M Usninsäure im verwendeten Assay eine auf die Hälfte verminderte Vitalität nach 24-stündiger Inkubationszeit, jedoch nicht bei 1×10^{-8} M – hier liegt eine unverminderte Vitalität der HaCaT-Zellen vor (s. Ergebnisse II, Abb. 3.5.1.). In zahlreichen Studien zur antimikrobiellen Wirkung werden Effekte gegen verschiedenste Mikroorganismen schon ab einer Konzentration von 3×10^{-9} M Usninsäure verzeichnet⁸⁰. Stoll et al. wiesen 1947 eine Wirkung gegen grampositive Bakterien und Mycobakterien bei einer Konzentration von 2×10^{-8} M Usninsäure nach¹²³. In neueren Studien an *P. acnes*, *M. furfur*, und *Corynebacterium pseudodiphthericum* beginnt die erregershemmende Wirkung (Usninsäure eingesetzt im Agar-Nährboden) schon bei 6×10^{-10} M Usninsäure¹³⁵.

In einer Studie von T. Kristmundsdottir et al. wurde ein proliferationshemmender Effekt der Usninsäure auf drei unterschiedliche Tumorzelllinien festgestellt⁶⁹. So lag die mittlere effektive Konzentration (EC_{50}) bei der verwendeten Zelllinie Panc-1 bei 1×10^{-8} M Usninsäure, bei der Zelllinie PC-3 bei $2,5 \times 10^{-8}$ M und bei der Zelllinie T-47D bei $8,4 \times 10^{-9}$ M Usninsäure.

Odabasoglu et al. postulierten 2006 zudem einen zytoprotektiven Effekt der Usninsäure *in vitro*. In Experimenten an Ratten mit Indomethacin-induzierten Magengeschwüren fanden sie einen Anstieg der gastralen mukosaassoziierten NO-Synthase (cNOS) unter Therapie mit Usninsäure verschiedener Konzentrationen (25 bis 200 mg/kg) ⁹⁷. Nach Nishida et al. besitzt cNOS wiederum zytoprotektive Effekte ⁹⁴.

Aufgrund der vorliegenden Daten können keine allgemein gültigen Aussagen über eine toxische oder protektive Wirksamkeit der Usninsäure gemacht werden, sondern es müssen verschiedene Faktoren wie Inkubationszeiten und -bedingungen, das Verhalten und die Empfindlichkeit von Zellen und Zellkulturen bedacht werden. Auf der Grundlage der vorliegenden Ergebnisse dieser Arbeit wurde die eingesetzte Usninsäure bis zur Konzentration von 1×10^{-4} M für Jurkat-Zellen und bis zur Konzentration von 1×10^{-8} M für HaCaT-Zellen als nicht toxisch eingestuft.

4.3. Usninsäure als Antioxidans

In den Untersuchungen zur Wirkung von Usninsäure hinsichtlich der direkten Membranzytotoxizität in Konzentrationen von 1×10^{-8} M und 1×10^{-6} M nach einstündiger Inkubation bei Raumtemperatur und UV-B-Bestrahlung von 20 mJ/cm² bis 1000 mJ/cm² zeigte sich eine signifikant erhöhte Überlebensrate der usninsäureinkubierten Zellen im Vergleich zu Zellen in Medium o. Z. Die Konzentrationen 1×10^{-8} M und 1×10^{-6} M zeigen keine signifikanten Unterschiede bezüglich dieses Verhaltens im Vergleich untereinander (s. Abb. 3.1.3.a und 3.1.3.b). Nach 48-stündiger Inkubation unter Kulturbedingungen gilt dies ebenso für beide gewählten Usninsäurekonzentrationen bis zu einer Bestrahlungsdosis von 100 mJ/cm². Bei 1000 mJ/cm² zeigt sich eine höhere Überlebensrate der usninsäureinkubierten Zellen im Vergleich zu Jurkat-Zellen in Medium o. Z. bei der Konzentration 1×10^{-8} M, wobei in allen Punkten kein signifikanter Unterschied zu den Zellen, die mit 1×10^{-6} M Usninsäure inkubiert wurden, vorliegt (s. Abb. 3.1.6.a und 3.1.6.b).

Im Falle der Untersuchungen zum Einfluss auf die metabolische Aktivität von Jurkat-Zellen unter Usninsäure in den Konzentrationen 1×10^{-8} M und 1×10^{-6} M und Bestrahlungsstärken 20 mJ/cm² bis 1000 mJ/cm² ergibt sich nach einer Inkubationszeit

von einer Stunde bei Raumtemperatur ein ähnliches Bild wie bei den Untersuchungen zur Membranzytotoxizität. Beide untersuchten Konzentrationen bewirken einen uneingeschränkten Metabolismus der Jurkat-Zellen im XTT nach UV-Bestrahlung bis zu UV-B-Dosen von 100 mJ/cm² im Vergleich zu Zellen in Medium o. Z., wobei dieser Unterschied in allen Fällen als signifikant errechnet wurde. Nicht signifikant war die Differenz bei sehr hohen UV-B-Dosen von 1000 mJ/cm² bei beiden untersuchten Usninsäurekonzentrationen. Zu beachten ist, dass solch hohe Dosen einem Vielfachen der MED von Menschen der Hauttypen II und III entsprechen und nach Diffey et al. (1982) in Südeuropa selbst im Hochsommer bei einem Sonnenbad nur schwer erreicht werden^{34, 23}. Bei M. Safaei wurden maximale stündliche UV-B-Dosen von etwa 95 mJ/cm² an sonnenbadenden Probanden gemessen¹⁰⁹. Dies würde einer kumulativen UVB-Dosis von 950 mJ/cm² in 10 Stunden entsprechen.

Zwischen den beiden Usninsäurekonzentrationen sind die Unterschiede im Metabolismus der Zellen nicht signifikant (s. Abb. 3.3.3.a und 3.3.3.b). Nach 48-stündiger Inkubation der Jurkat-Zellen mit den Usninsäurekonzentrationen 1x10⁻⁸ und 1x10⁻⁶ M im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂ zeigte sich im XTT bei 100 mJ/cm² eine signifikant erhöhte Metabolisierungsrate des Formazanderivates unter Einfluss von 1x10⁻⁸ M und 1x10⁻⁶ M Usninsäure, zudem bei 20 mJ/cm² nach Inkubation mit Usninsäure 1x10⁻⁸ M (s. Abb. 3.3.6.a und 3.3.6.b).

Die Resultate der Experimente mit Usninsäure in diesen Konzentrationen zeigen eine antioxidative (UV-protective) Wirkung der Usninsäure im Zellkulturmodell mit menschlichen lymphoiden Zellen. Gestützt wird diese Annahme zunächst durch zahlreiche Studien über einen UV-abhängigen Anstieg von photoaktiven Substanzen in Flechten – insbesondere der Usninsäure. So zeigten Fernandez et al. 1998, dass mit zunehmender Höhenlage die Menge der Usninsäure in Flechtenspezies der chilenischen Anden ansteigt⁴⁰. Weitere Untersuchungen dieser Arbeitsgruppe an *Xanthoparmelia microspora* (Valparaiso, Chile) ergaben einen Anstieg der Usninsäure nach 15 Tagen UV-Bestrahlung von 1,9 % im Extrakt vor der UV-Behandlung auf bis zu 6,2 % nach der UV-Behandlung³⁹. Diese Ergebnisse wiederum bestätigen die Vermutung von Swanson und Fahselt, welche eine Interaktion zwischen UV-Licht (Photonen) und einem Photorezeptor, welcher eine Steigerung des Phenolmetabolismus in *Umbilicaria antartica* bewirkt, postulieren¹²⁴.

Diese Beobachtungen werden von weiteren Studien gestützt. So fand Rundel 1969 einen spektrophotometrisch gemessenen linearen Anstieg des Usninsäuregehaltes mit Zunahme der Sonnenlichtexposition von 0,13 % unter 3 % Sonnenlicht bis zu 2,82 % unter 51 % Sonnenlicht in *Cladonia subtenuis*¹⁰⁸. Neuere Untersuchungen zeigten eine saisonale Variabilität von 4 bis 8 % Usninsäure im Trockengewicht der untersuchten Flechten aus Arktis, Alpenraum und Patagonien mit maximalen Konzentrationen im späten Frühling und frühen Sommermonaten und niedrige Level im Herbst und Winter. Hierbei spielen UV-Einstrahlung und Temperatur eine Rolle, so dass auch innerhalb einer Flechtenspezies große Unterschiede im Usninsäuregehalt bestehen können⁸. Solche zeitlichen und räumlichen Unterschiede im Gehalt an photoaktiven Substanzen in verschiedenen Flechtenspezies werden durch zahlreiche Studien belegt^{40, 101,100,9,10}.

Die Beobachtungen zur gesteigerten Produktion von Flechtenstoffen unter starken UV-Licht-Einflüssen lassen eine UV-absorptive Wirkung dieser Substanzen vermuten. Daneben existieren Hinweise über antioxidative Wirkungsweisen anderer natürlich vorkommender Substanzen wie z. B. Boldin, Depsiden, Depsidonen und Orsellininsäure^{120,54,59,60}. So zeigte beispielsweise Jang 2000 eine Boldin-dosisabhängige Reduktion von Organschäden an diabetischen Ratten, welche auf der Behandlung mit Boldin-Extrakt aus den Blättern und der Rinde von *Peumus boldus* beruhte⁵⁹. Es wurde gezeigt, dass eine Abnahme der oxidativen Schäden an Mitochondrien der Nieren- und Pankreaszellen durch Löschung von reaktiven Sauerstoffspezies nach Therapie mit Boldin-Extrakt eintrat. Zudem wurde die Entstehung weiterer reaktiver Moleküle wie Nitritoxid verhindert und gleichzeitig ein Anstieg der endogenen antioxidativen Enzyme wie Gluthation beobachtet. Weiter führten Hidalgo et al. 1994 bereits Experimente zur antioxidativen Wirkung von Depsiden und Depsidonen aus *Protusnea malacea* und *Placopsis* sp. zur Auto-Oxidation von Rattenhirnhomogenisat und β -Carotin-Oxidation durch⁵⁴. Sie zeigten eine um bis zu $\frac{2}{3}$ verminderte Autooxidation des Homogenisates und eine bis zu $\frac{1}{3}$ verminderte Oxidation des β -Carotins unter Einfluss von Depsiden und Depsidonen aus Flechten in einem Konzentrationsbereich von 5×10^{-9} M. Ebenfalls wurde Boldin aus *Peumus boldus* von Hidalgo und Gonzalez auf UV-B-Protektion *in vivo* und *in vitro* untersucht. Hier wurden Lichtschutzfaktoren von $7,9 \pm 0,89$ (*in vivo*) mit und $5,8 \pm 0,6$ (*in vitro*) ermittelt, so dass eine antioxidative Wirkungsweise des Boldins anzunehmen ist⁵⁵.

Diese Untersuchungen zu den verschiedensten in Pflanzen vorkommenden Substanzen ließen auch bei Usninsäure – deren breites Wirkungsspektrum bereits antimikrobielle, antiproliferative, anti-inflammatorische und analgetische Eigenschaften umfasst - antioxidative bzw. photoaktive Eigenschaften vermuten. Zumal schon MacKenzie 1952 zeigte, dass das Spektrum der Usninsäure im UV-Bereich absorbiert⁸⁵. Zudem wurde von Rancan et al. 2002 eine UV-Filter-Wirkung der Usninsäure nachgewiesen, welche in *in vitro* und in *in vivo* Experimenten gezeigt wurde¹⁰³. Menschliche lymphoide Zellen wurden mit UV-B-Licht bestrahlt. Hierbei waren sie mit einer Quarzglasplatte (0,1 mm Dicke) bedeckt, welche Träger für eine Lösung mit 5×10^{-2} M Usninsäure war. Als Vergleich diente Oxylmethoxycinnamat (Parsol® MCX), als bedeutender UV-Filter in Sonnencremes. Um das Überleben der Zellen nach Bestrahlung ermitteln zu können, wurde der Trypan-Blau-Test angewendet, der - vergleichbar mit dem Eosintest – direkt eine Membrandestruktion und somit einen Zelltod anzeigt. Die verwendeten Zellen wurden mit 5 µl Trypan-Blau (0,4 %) auf 100 µl Zellsuspension gefärbt und in einer Fuchs-Rosenthalkammer ausgezählt. Das prozentuale Überleben der Jurkat-Zellen ergab sich aus der Formel: lebende Zellen/ tote Zellen x 100 %. Es wurde ein Membranprotektionsfaktor (MPF) von 4,47 für die eingesetzte Usninsäure der Konzentration 5×10^{-2} M berechnet. Für Parsol® MCX wurde der MPF 3,22 ermittelt. Weiterhin wurde an fünf Probanden der UV-Protektionsfaktor bestimmt, indem in definierter Dicke (80 µm) eine Lösung mit $2,5 \times 10^{-2}$ M Usninsäure aufgetragen und mit mittlerer Erythemdosis bestrahlt wurde. Hier ergab sich ein Lichtschutzfaktor (LSF) von 4,1; Parsol® MCX als Bestandteil eines herkömmlichen Sonnenschutzmittels erreichte einen LSF von 4,2. Der LSF ergab sich nach der Formel: spezifische MED geschützter Haut / spezifische MED von ungeschützter Haut. Rancan et al. untersuchten zusätzlich die Stabilität der getesteten Substanzen und stellten fest, dass sich Usninsäure unter UV-Bestrahlung bei vorhandener starker UV-B-Filter-Wirkung zudem als äußerst stabil erwiesen hat.

Aufgrund der beschriebenen Daten wurde in den Experimenten dieser Dissertation die Usninsäure direkt an Jurkat-Zellen auf eine antioxidative Wirkung untersucht, indem die Substanz definiert dem Zellkulturmedium zugesetzt wurde. Um eine Filter-Wirkung der Usninsäure im Medium zu verhindern, war ein Waschschrift mit PBS nötig. So konnte man davon ausgehen, dass nur noch Usninsäure, welche sich an der Zelloberfläche der Jurkat-Zellen, im Zytosol oder in den Zellmembranen befand, wirksam sein konnte. Bei

den Experimenten, bei denen Usninsäure entweder an der Membranoberfläche, in den Membranen oder im Zytosol befindlich war, ist die als Filter in betracht kommende Schichtdicke vernachlässigbar gering. Denn ein UV-Filter ist in seiner Absorption proportional zur Dicke⁹⁹. Die Ergebnisse der Experimente zur direkten Membranzytotoxizität (s. Abb. 3.1.6.a und 3.1.6.b sowie Abb. 3.1.3.a und 3.1.3.b) und zur Beeinflussung der metabolischen Aktivität (s. Abb. 3.3.3.a und 3.3.3.b sowie Abb. 3.3.6.a und 3.3.6.b) zeigen, dass Usninsäure an oder in den verwendeten Jurkat-Zellen antioxidativ unter UV-Lichtbestrahlung wirkt, da in diesen Versuchen ein höheres Überleben bzw. ein uneingeschränkter Metabolismus der Zellen im Vergleich zu nicht mit Usninsäure inkubierten Zellen besteht.

Die Ergebnisse an HaCaT-Zellen, die in Kooperation mit der Universitäts-Hautklinik der Albrecht-Ludwig Universität zu Freiburg entstanden*, verdeutlichen zudem einen UV-protektiven bzw. antioxidativen Effekt der verwendeten Usninsäure. Im DC-FDA-Assay wurde gezeigt, dass die eingesetzte Usninsäure unter UV-Licht entstandene ROS löscht (s. Abb. 3.5.2.a und 3.5.2.b). Dies ist in seiner Ausprägung ein konzentrationsabhängiger Effekt, wie aus Abbildung 3.5.2.a hervorgeht. Es zeigt sich, dass schon bei der niedrigsten eingesetzten Usninsäurekonzentration von 3×10^{-9} M eine Halbierung der im Test gemessenen Fluoreszenz eintritt, was zur Löschung der Radikale proportional ist. Bei einer Konzentration von 2×10^{-7} M Usninsäure ist im DC-FDA-Assay keine Fluoreszenz mehr messbar, gleichbedeutend damit, dass keine Radikale entstanden sind, die DCFH zu dem fluoreszierenden Produkt DCF oxidiert haben. Bei der Auswertung der Ergebnisse ist zu beachten, dass nur reaktive Spezies in diesem Test nachweisbar sind, wenn die Zellen am Leben sind. Daher sind zwei Möglichkeiten in Betracht zu ziehen. Zum Einen kann die eingesetzte Usninsäure in der Konzentration 2×10^{-7} M alle Radikale gelöscht haben, oder es sind alle Zellen dieses Ansatzes so stark geschädigt, dass kein Metabolismus mehr stattfindet.

Aus der Verknüpfung mit der Vitalitätsbestimmung der HaCaT-Zellen (s. Abb. 3.5.2.b) geht hervor, dass sich ab einer Usninsäurekonzentration von 2×10^{-8} M mit weiterer Zunahme der Usninsäurekonzentration das Überleben der Keratinozyten verringert. Bei hohen Usninsäurekonzentrationen ist der Grund für die „Löschung“ der ROS im DC-FDA-Assay (s. Abb. 3.5.2.a) somit der, dass keine mit dem Test nachweisbaren ROS in den Zellen gebildet wurden. Wie der Vialight-Assay (s. Abb. 3.5.2.b) zeigt, wurden diese

* In Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe „skintegral“. Vielen Dank an Herrn Professor Dr. med. CS Schempp, Frau Dr. rer. nat. U. Wölfle und Frau B. Simon-Haarhaus.

während der Inkubation im Dunkeln zytotoxisch geschädigt. In diesen Experimenten zeigte sich somit eine optimale Usninsäurekonzentration von 1×10^{-8} M. Denn hier ist die Fluoreszenz – sprich die Entstehung der ROS – auf weniger als $\frac{1}{3}$ des Ausgangswertes zurückgegangen bei gleichzeitig maximaler Vitalität der HaCaT-Zellen.

Die Ergebnisse an Jurkat-Zellen hinsichtlich eines antioxidativen Verhaltens von Usninsäure unter den beschriebenen Bedingungen wurden somit bestätigt. Die Erhöhung der Überlebensrate der usninsäureinkubierten Zellen im Vergleich zu Zellen in Medium o. Z. kann demnach auf eine Löschung von reaktiven Spezies durch die Usninsäure zurückgeführt werden. Außerdem wurde in einer aktuellen Veröffentlichung von Boehm et al. eine hohe Radikal-Löschungsrate seitens der Usninsäure in photochemischen Experimenten gezeigt. Die photophysikalischen Eigenschaften von Usninsäure wurden aufgrund deren Eigenschaft als UV-B-Absorber und UV-Filter untersucht. Hierbei wurde gezeigt, dass unter UV-Licht ein Usninsäure-Radikal entsteht. Dieses wurde von anderen Antioxidantien wie Vitamin C und E gelöscht. Dieses Zusammenspiel gibt Hinweise auf ein antioxidatives Verhalten – also die Aufnahme und geordnete Abgabe von Elektronen - der Usninsäure und lässt eine Position innerhalb der Redoxreihe vor Vitaminen C und E vermuten ⁶⁵.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit gemeinsam mit der Publikation von Rancan et al. betrachtet zeigen, dass Usninsäure als Antioxidans für weiterführende photobiologische oder dermatologische Studien von Interesse sein kann.

4.4. Usninsäure als Prooxidans / Photosensibilisator

Unter Verwendung einer höheren Usninsäurekonzentration von 1×10^{-4} M und unter Bestrahlungsdosen von 5 J/cm^2 bis 14 J/cm^2 konnte eine Eigenschaft der Usninsäure als Prooxidans bzw. als Photosensibilisator gezeigt werden. In diesen Versuchsreihen wurden zunehmende Totzellraten der Jurkat-Zellen (s. Abb. 3.2.3.) und eine ebenso verminderte metabolische Aktivität (s. Abb. 3.3.9.) nach Inkubation mit Usninsäure 1×10^{-4} M unter ansteigenden Bestrahlungsdosen im Vergleich zu den Kontrollen (Zellen in Medium o. Z.) ermittelt. In den Experimenten zur Dunkeltoxizität der Usninsäure (s. Abb. 3.2.1. und 3.3.9.) zeigten sich keine zytotoxische Wirkung der eingesetzten Usninsäurekonzentration, so dass die Ergebnisse als photosensibilisierende, also

prooxidative, Wirkung der Usninsäure auf Jurkat-Zellen gewertet werden müssen. Zudem zeigte sich bei Experimenten mit Usninsäure 1×10^{-4} M und relativ niedrigen UV-B-Dosen von 100 mJ/cm^2 wiederholt ein prooxidatives Verhalten der Usninsäure sowohl hinsichtlich der direkten Membranzytotoxizität (Eosin-Test), als auch bezüglich der metabolischen Aktivität (XTT). Die entsprechenden Resultate lagen stets deutlich unter denen der Versuchsergebnisse der Usninsäurekonzentrationen 1×10^{-8} und 1×10^{-6} M und gleicher Bestrahlungsdosis von 100 mJ/cm^2 UV-B. Somit scheint eine hohe Usninsäurekonzentration kein antioxidatives Verhalten der Usninsäure zu bewirken. Die Einzelwerte dieser Versuche sind nicht gezeigt, es handelt sich um orientierende Vorversuche.

Flechteninhaltsstoffe können sensibilisierend wirken und eine Kontaktallergie auslösen – dies ist gut bekannt und beschrieben. Anfang des 20. Jahrhunderts äußerte Horand die Vermutung, dass niedere Pflanzen Verursacher von Hautläsionen sein könnten, die er als „mains de crocodile“ beschrieb ⁵⁶. Weiterhin existieren bis heute zahlreiche Studien, die Fälle von Dermatitis nach Kontakt mit Rinde bzw. Holz behandeln und diese Erscheinungen auf den Kontakt mit Flechten auf der Baumrinde beziehen [siehe in: Hausen, B.M. et al. *an investigation of the allergic constituents of Cladonia stellaris (Opiz)*, 1992] ⁴⁹. Das klinische Erscheinungsbild der durch Flechteninhaltsstoffe ausgelösten Kontaktdermatitis ist laut Literatur jedoch schwer von dem einer Photodermatitis zu unterscheiden, so dass hierüber Unklarheit herrscht ^{90,130,137}.

In Experimenten an 10 Probanden mit bekannter Photosensibilität wurden Flechtenspezies auf ihre kontaktallergene Potenz und Photosensibilisierung getestet. Man fand positive Reaktionen im Patch-Test sowohl ohne UV-Bestrahlung als auch mit UV-Bestrahlung. Die Bestrahlung bewirkte bei einigen der Probanden eine verstärkte Reaktion. Dies führte zu dem Schluss, dass Flechteninhaltsstoffe sowohl eine Kontaktallergie als auch eine Photosensibilisierung auslösen können ¹²⁹.

In *in vitro* Experimenten mit 13 Flechteninhaltsstoffen wurde mittels Photohämolysetechnik der Nachweis erbracht, dass die extrahierten Substanzen einen photooxidativen Membranschaden verursachen können. Damit wurde eine photosensibilisierende Wirkung von Flechteninhaltsstoffen bestätigt ¹³⁷.

Bezüglich einer photosensibilisierenden Wirkung speziell der Usninsäure untersuchten Thune und Solberg 1980 ein Patientenkollektiv mit bekannter Kontaktallergie auf Flechteninhaltsstoffe an Händen und im Gesicht. Sie fanden eine verstärkte

entzündliche Reaktion auf Usninsäure (0,1 % in der verwendeten Lösung) nach UV-Bestrahlung im UV-Erythemtest ¹³⁰.

Zudem veröffentlichte M. Rademaker 2002 eine Fallstudie über eine Patientin in Neuseeland, die nach einem Aufenthalt im Garten und Kontakt zu Flechten eine blasige Dermatitis aufwies. Im Vorhinein war eine positive Reaktion im Photopatch-Test auf Flechtensubstanzen – unter anderem auf Usninsäure - ermittelt worden ¹⁰². Dies lässt auf eine Wirkung der Usninsäure in hohen Konzentrationen als Photosensibilisator schließen und korreliert mit den Ergebnissen aus den Experimenten dieser Arbeit. Unter 3.2.3. und 3.3.9. wird gezeigt, dass bei einer hohen Konzentration von Usninsäure eine zellschädigende Wirkung vorliegt, sowohl bezogen auf die direkte Membranzytotoxizität als auch auf die metabolische Aktivität.

4.5. Das antioxidativ-prooxidative Verhalten der Usninsäure

In Anbetracht der vorliegenden Ergebnisse und der Literatur handelt es sich bei der Usninsäure unter UV-Lichtbestrahlung um eine Substanz mit einer bifunktionalen Wirkungsweise. In niedrigen Konzentrationen und bei niedrigen UV-B-Dosen nimmt Usninsäure Energie auf und leitet diese unter Schutz der biologischen Strukturen geordnet ab. Dies ist zum einen zu sehen an der signifikant erhöhten Überlebensrate im Test zur direkten Membranzytotoxizität im Vergleich zu Zellen in Medium o. Z. (s. Abb. 3.1.6.a und 3.1.6.b). Zum anderen an der metabolischen Aktivität, die ebenfalls unter dem Einfluss von niedrigen Usninsäurekonzentrationen und unter niedrigen UV-B-Bestrahlungsdosen signifikant höher ist als die von Zellen in Medium o. Z. (s. Abb. 3.3.3.a und 3.3.3.b).

In Bezug auf die antioxidative Wirkung in niedrigen Usninsäurekonzentrationen besteht kein offensichtlicher Unterschied darin, ob die Zellen nur eine Stunde oder 48 Stunden mit Usninsäure inkubiert wurden. Die Resultate im Test zur Membranzytotoxizität und zur metabolischen Aktivität verbessern oder verschlechtern sich durch Veränderungen der Inkubationszeiten nicht (s. Abb. 3.1.3.a und 3.1.3.b sowie Abb. 3.3.6.a und 3.3.6.b).

Trotz wiederholter Parallelexperimente weichen wenige Ergebnisse vom postulierten Resultat ab oder sind nicht kongruent zu vergleichbaren anderen Experimentaldaten. Bei den Experimenten mit den Usninsäurekonzentrationen 1×10^{-8} M und 1×10^{-6} M

sollten sich im XTT die Überlebensraten der Zellen bei allen verwendeten Bestrahlungsdosen nur gering von der maximalen Überlebensrate bei 0 J/cm² unterscheiden. Im Gegensatz dazu kam es bei beiden eingesetzten Usninsäurekonzentrationen, unabhängig davon, ob eine Stunde oder 48 Stunden inkubiert wurde, zu einem Abfall der metabolischen Aktivität bei 1000 mJ/cm² UV-B. In den Experimenten zur direkten Membranzytotoxizität hat sich keine vergleichbar starke Abnahme der Überlebensrate ergeben. Dies kann durch eine Überschreitung der antioxidativen Kapazität der Jurkat-Zellen erklärt werden, denn eine UV-B-Dosis von 1000 mJ/cm² entspricht dem 10- bis 50-fachen der MED eines Mitteleuropäers des Hauttyps II oder III^{23,32,34}. Bei dosimetrischen Untersuchungen zur UV-B-Exposition während verschiedener Freizeitaktivitäten von freiwilligen Probanden wurden Maximaldosen von 95 mJ/cm²/h festgestellt¹⁰⁹. Daher ist die eingesetzte Dosis von 1000 mJ/cm² als sehr hohe Dosis anzusehen, denn nach den genannten Untersuchungen von M. Safaei würde dies die kumulative UV-B-Dosis von 950 mJ/cm² bei einem 10-stündigen Sonnenbad noch überschreiten.

Weiterhin konnte nicht geklärt werden, warum nach 48-stündiger Inkubation mit Usninsäure 1x10⁻⁸ M schon bei 100 mJ/cm² UV-B-Bestrahlung eine starke Abnahme der Metabolisierungsrate eintrat, wo hingegen nach 48-stündiger Inkubation mit 1x10⁻⁶ M Usninsäure eine unveränderte metabolische Aktivität im Vergleich zu unbestrahlten Zellen ermittelt wurde. Bei 1000 mJ/cm² UV-B-Licht zeigte sich eine starke Abnahme der metabolischen Aktivität bei beiden eingesetzten Usninsäurekonzentrationen – ebenfalls nach beiden gewählten Inkubationszeiten.

Die Ergebnisse der Versuche mit hohen Usninsäurekonzentrationen und hohen Bestrahlungsdosen lassen eine Radikalentstehung, Singulett-Sauerstoff-Bildung oder eine Entstehung angeregter Zustände wie Triplets der Usninsäure unter UV-Bestrahlung vermuten. Diese führen zur Zerstörung der Zellstruktur im Moment der UV-Licht-Einstrahlung (s. Ergebnisse 3.2.3. und 3.4.3.).

Eine Dunkeltoxizität im Sinne einer Membranzytotoxizität und einer Verringerung der metabolischen Aktivität durch die eingesetzte hohe Konzentration 1x10⁻⁴ M Usninsäure nach einer Stunde Inkubationszeit wurde nicht ermittelt (s. 3.2.1. und 3.4.1.) Daher ist anzunehmen, dass unter UV-B-Lichtbestrahlung die Usninsäure dieser Konzentration sehr schnell toxisch in Form einer Membran- bzw. Strukturdestruktion für die eingesetzten Jurkat-Zellen wirkt. Es ist anzunehmen, dass eine längere oder kürzere

Inkubationszeit der Jurkat-Zellen mit der Usninsäure 1×10^{-4} M nicht zu einem veränderten prooxidativen Verhalten der Substanz unter UV-Licht-Bestrahlung führt. Unterstützt wird diese Annahme durch die Untersuchungen mit Usninsäure an Jurkat-Zellen in den Konzentrationen 1×10^{-8} M und 1×10^{-6} M und Inkubationszeiten von einer und 48 Stunden, in denen kein verändertes antioxidatives Verhalten der Usninsäure festgestellt werden konnte. Auch mehrfach durchgeführte Experimente mit gleicher Versuchsdurchführung bei 10 J/cm^2 UV-B und 1×10^{-4} M Usninsäure zeigten, dass im Test zur direkten Membranzytotoxizität das Lösungsmittel DMF nicht, wie angenommen, zu einer gleichen oder höheren Überlebensrate der Zellen führte, als nach rechnerischer Korrektur der DMF-Wirkung zu erwarten war. Ein vergleichbares Verhalten der Zellen zeigte sich in den Experimenten zur metabolischen Aktivität bei 5 J/cm^2 UV-B und 1×10^{-4} M Usninsäure.

4.6. Usninsäure ist ein wirkungsvolles Antioxidans

Verschiedene Wirkungen der Usninsäure sind bekannt, zu denen antimikrobielle, antiinflammatorische und photoprotektive Effekte gehören^{58,21,103,81}. Bisher wurde gerade die UV-Protektion von Zellen auf eine UV-Filterwirkung zurückgeführt²¹. Zudem wird eine antioxidative Wirkung kontrovers diskutiert^{19,133,95}. Eine Testung auf antioxidative Eigenschaften schien daher von besonderem Interesse zu sein.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass ein verbessertes Überleben der eingesetzten Jurkat-Zellen nach Inkubation mit Usninsäure in den Konzentrationen 1×10^{-8} M und 1×10^{-6} M und UV-Bestrahlung im Vergleich zu Zellen, die nicht mit Usninsäure inkubiert wurden, besteht. Dies zeigt eine antioxidative Wirkung der Usninsäure direkt an oder in Zellmembranen. Die Ergebnisse der Versuche an HaCaT-Zellen bestätigen dies insofern, da hier eine effektive Löschung von Radikalen im DC-FDA-Assay durch Usninsäure gezeigt werden konnte. Hierbei wurde eine optimale Konzentration für die Radikallöschung bei gleichzeitig unveränderter Vitalität der HaCaT-Zellen von 1×10^{-8} M Usninsäure ermittelt.

Caviglia et al. zeigten 2001 einen signifikanten Anstieg im Gehalt von Usninsäure in *Parmelia soledians* und *caperata* um 13,7 % bzw. um 36,3 % nach Behandlung mit

Paraquat unter Lichteinfluss ²⁰. Paraquat ist ein Herbizid, welches unter UV-Einstrahlung reaktive Sauerstoffspezies (ROS) in den Chloroplasten von Pflanzen generiert. So wurde in diesen Studien die oxidative Seite des umweltbedingten Stresses simuliert. Der hohe Anstieg der Usninsäure unter den gegebenen Bedingungen lässt antioxidative Eigenschaften dieser Substanz vermuten.

Die Arbeitsgruppe Odabasoglu et al. untersuchte 2004 in *in vitro* Experimenten wässrige und methanolhaltige Extrakte unter anderem von *Usnea longissima* auf antioxidative Eigenschaften und Reduktionsvermögen ⁹⁶. In ihren Untersuchungen stellten sie eine signifikante antioxidative Wirkung (Thiozyanat-Methode nach Misuda et al., 1966 ⁹¹ s. in ^{35,143}) sowie ein potentes Reduktionsvermögen (Methode nach Yen und Chen, 1997 ¹⁴²) der Extrakte fest.

Weiterhin fanden Halici et al. einen antioxidativen Effekt von usninsäurehaltigen Extrakten der *Usnea longissima* in Tierversuchen und *in vitro* ⁴⁷. Ratten mit Indomethacin-induzierten gastroduodenalen Ulcera wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen (50 bis 200 mg/kg) des Extraktes behandelt. Man fand eine Reduktion zur Vergleichsgruppe (Indomethacin-behandelt) um bis zu 86,4 % unter Behandlung mit den usninsäurehaltigen Extrakten. Zudem wurde in *in vitro* Experimenten die antioxidative Eigenschaft der extrahierten Substanzen untersucht, indem ebenfalls die Thiozyanat-Methode verwendet wurde ^{47, 91}. Dem Test liegt eine Messung der Bildung reaktiver Spezies der Linolsäure zugrunde (Peroxide), wobei Thiozyanat als farbgebende Reagenz für die colorimetrisch-spektrophotometrische Messung fungiert. Die Ergebnisse von Odabasoglu et al. wurden hier bestätigt, da das *Usnea* - Extrakt eine signifikante Inhibition der Bildung reaktiver Spezies zeigte.

Weiterhin wurde von dieser Arbeitsgruppe die Aktivität von antioxidativen, körpereigenen Systemen (Glythation-S-Transferase, Superoxid-Dismutase und Katalase) aus dem Magengewebe der Ratten ermittelt. Diese Enzyme wurden in den Untersuchungen durch den wässrigen *Usnea longissima*-Extrakt aktiviert, wo hingegen das ulcerogene Indomethacin in der Kontrollgruppe diese Enzyme hemmte. Somit liegt ein gastroprotektiver Effekt der Extrakte vor, der zum einen auf der Löschung von reaktiven Spezies beruht, zum anderen auf einer Aktivierung der körpereigenen antioxidativen Schutzsysteme. Eine anschließende Studie von Odabasoglu et al. zeigte ferner am Rattenmodell mit Indomethacin - induzierten Ulcera des Magens eine reduzierte Lipidperoxidation unter Behandlung mit Usninsäure aus *Usnea longissima*-Extrakten verschiedener Konzentrationen (25 bis 200 mg/kg) ⁹⁷. Lipidperoxidation wird

als eine wichtige Ursache für Magengeschwüre angesehen, welche wiederum durch ROS verursacht wird, die ungesättigte Fettsäuren angreifen und schädigen^{92,127,3}.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zusammen mit den aufgeführten Daten zeigen ein deutliches antioxidatives Potential der Usninsäure unter den verschiedensten Bedingungen. Es ist daher anzunehmen, dass Usninsäure als natürlich vorkommendes Antioxidans positive Effekte auf lebende Organismen ausübt. Bezogen auf die Haut als äußere Barriere heißt das, dass eine Schutzwirkung gegen UV-bedingte Schädigungen (DNA-Schäden, Lipidperoxidation, Hautalterung und Immunsuppression) bestehen könnte. In zahlreichen Studien konnte ein effektiver Schutz der Hautzellen durch topisch applizierte Antioxidantien bereits gezeigt werden^{63,1,26}.

In der topischen Anwendung von antioxidativen Substanzen mag der Vorteil liegen, dass die Reaktion mit reaktiven Spezies in den obersten Hautschichten stattfindet, wo diese unter UV-Lichtbestrahlung zum größten Teil entstehen²⁹. Da auf die Haut applizierte Substanzen eine geringe Eindringtiefe in die Hautschichten haben, gelangen sie nicht zur Basalzellschicht, die im Gegensatz zu den oberen Hautschichten aus lebenden, die Haut regenerierenden Zellen besteht^{78,75,76,111,136}. Bestimmte Wellenlängen des Lichtes können jedoch bis zur Basalzellschicht (UV-B) und bis zur Dermis (UV-A) vordringen und die Zellen durch Bildung reaktiver Spezies schädigen. Daher ist es wichtig, dass das Eindringen der UV-Strahlen in die Haut verhindert wird.

Dies kann einerseits durch das Auftragen von UV-Filtern erreicht werden, andererseits können die durch UV-Licht entstehenden reaktiven Spezies durch Antioxidantien gelöscht werden. Diese können weiterhin andere Antioxidantien, die in der Haut durch Aufnahme über die Nahrung oder durch topische Applikation (Carotinoide, Vitamin C und E) enthalten sind, regenerieren bzw. selbst durch diese regeneriert werden. Durch diese Reaktionskette sinkt der „Verbrauch“ des antioxidativen Schutzsystems, wenn mehrere Substanzen synergistisch wirken²⁷.

Eine weitere Möglichkeit ist der Transport antioxidativer Substanzen an Nanopartikel gebunden über die Haarfollikel zu den lebenden Zellen der Epidermis^{89,73,77}. Hier können sie die in der Haut durch tief eindringendes UV-Licht entstehenden ROS löschen und somit die teilungsaktiven Hautzellen vor z. B. DNA-Schäden schützen. Für die Usninsäure konnte in einer Untersuchung von Boehm et al. eine Position in der Redoxreihe (Reihung von niedrig nach stark reduzierend) vor den Vitaminen C und E

gezeigt werden^{84,61,37}. Das heißt, dass ein Usninsäure-Radikal durch Vitamin C oder E gelöscht werden kann und damit als Antioxidans wieder hergestellt wird.

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass Usninsäure in höheren Konzentrationen (1×10^{-4} M) prooxidative Effekte besitzt. Damit liegt für die Usninsäure – ähnlich wie für andere Antioxidantien wie Lycopin und β -Carotin – ein konzentrationsabhängiges bifunktionales Verhalten vor^{131, 132, 133}. Daher könnte es sinnvoll sein, Usninsäure als wirksames Antioxidans in niedrigen Konzentrationen in einer Kombination mit anderen Antioxidantien bzw. als Stabilisator für UV-Filter einzusetzen. Allergien gegen Flechtensäuren sind zwar beschrieben, bislang jedoch lediglich Fallberichte^{49,130,102}. Das sensibilisierende Potential wird als gering eingestuft und beruht meist auf einem hohen Gehalt an einer ganzen Reihe von Flechtensäuren in dem lebenden Flechten-Organismus⁵⁸. Daher sollten niedrige Konzentrationen und reine Usninsäure-Extrakte eingesetzt werden.

Die vorliegenden Untersuchungen stellen einen ersten, aber erfolgversprechenden Anfang der Erforschung natürlicher antioxidativ und prooxidativ wirkenden Substanzen aus Flechten dar. Weitere intensive Arbeit ist notwendig, um das Potential dieser Substanzgruppe umfassend für Menschen nutzbar zu machen. Klinische Untersuchungen zur antioxidativen Wirkung unter UV-Bestrahlung in der Haut liegen derzeit noch nicht vor. Daher könnten *in vivo* Untersuchungen in Form von UV-Erythemtests sinnvoll sein.

5. Zusammenfassung

Aufgabe der vorliegenden Arbeit war es, die Substanz Usninsäure aus chilenischen Flechten hinsichtlich ihrer Wirkungsweise unter UV-B-Lichtbestrahlung im Zellkulturmodell zu erforschen. Zunächst wurden Untersuchungen zur Dunkeltoxizität der Usninsäure auf menschliche lymphoide Zellen (Jurkat-Zellen) durchgeführt. Die Zellen wurden nach Inkubation mit verschiedenen Usninsäurekonzentrationen und variierten Inkubationszeiten auf direkte Membranzytotoxizität geprüft und ebenfalls wurde die metabolische Aktivität bestimmt. In einem Konzentrationsbereich von 1×10^{-8} M bis 1×10^{-4} M Usninsäure ließ sich keine Dunkeltoxizität für die eingesetzten Jurkat-Zellen ermitteln. Im Mittelpunkt der experimentellen Arbeit stand außerdem die Erforschung der Usninsäurewirkung unter verschiedenen UV-B-Bestrahlungsdosen hinsichtlich eines antioxidativen oder prooxidativen Effekts. Hierzu kamen unterschiedliche UV-B-Dosen bei unterschiedlichen Usninsäurekonzentrationen zum Einsatz. Zusätzlich sollte durch weitere Variation der Ausgangsbedingungen wie Inkubationszeit und Umgebungstemperatur im ersten Teil untersucht werden, ob die von den Zellen akkumulierte Usninsäure dabei ihre Wirkungsweise verändert. Zur Beurteilung des Effektes wurden bei den Experimenten mit Jurkat-Zellen der Eosintest zur Ermittlung der prozentualen Überlebensrate und der XTT zur photometrischen Bestimmung der metabolischen Aktivität eingesetzt. Es hat sich gezeigt, dass die mit Usninsäure in einer Konzentration von 1×10^{-8} M bis 1×10^{-6} M inkubierten Zellen bei UV-B-Dosen von 20 – 1000 mJ/cm² eine höhere Überlebensrate und einen besseren Metabolismus aufwiesen, als die Zellen, die nicht mit Usninsäure inkubiert worden, aber gleichen UV-B-Bestrahlungsdosen ausgesetzt waren. Dies kann auf antioxidativen Eigenschaften der Usninsäure zurückgeführt werden.

Weiterhin wurden die Jurkat-Zellen mit 1×10^{-4} M Usninsäure inkubiert und mit UV-B-Dosen von 1 J/cm² bis 14 J/cm² bestrahlt. Auch hier kam der Eosintest zur Ermittlung der prozentualen Überlebensrate und der XTT zur photometrischen Bestimmung der metabolischen Aktivität zum Einsatz. Die Jurkat-Zellen wiesen eine verringerte Überlebensrate sowie einen verminderten Metabolismus im Vergleich zu Zellen in Medium ohne Zusätze auf, so dass ein prooxidativer Effekt der Usninsäure anzunehmen ist.

Im zweiten Teil der Promotionsarbeit wurden Untersuchungen zur Zytotoxizität der Usninsäure auf menschliche Keratinozyten (HaCaT-Zellen) durchgeführt. Zur Ermittlung einer Toxizität diente der *ViaLight Plus Cell Proliferation and Cytotoxicity BioAssay* (Vialight-Assay), mit dem die metabolische Aktivität der Zellen bestimmt wird. Zusätzlich wurde diese Methode mit dem carboxy-DC-FDA-Assay (DC-FDA-Assay) kombiniert. Dieser Assay zeigt mittels Fluoreszenz die intrazellulär, durch UV-Bestrahlung entstandenen, Radikale an. Eine anti- oder prooxidative Wirkung der Usninsäure konnte daher anhand der gemessenen Radikale nachgewiesen werden. Die Kombination mit dem Vialight-Assay diente dazu, diejenige Konzentration zu finden, bei der die eingesetzten Zellen uneingeschränkt metabolisierten und die Radikale durch die Usninsäure gelöscht wurden. Diese Konzentration lag bei den eingesetzten HaCaT-Zellen bei 1×10^{-8} M Usninsäure.

Die Untersuchungen zur Substanz Usninsäure stellen einen Anfang zur Erforschung natürlicher Substanzen aus Flechten im Hinblick auf antioxidative und prooxidative Eigenschaften unter UV-B-Lichtbestrahlung dar. Weitere intensive Studien zu dieser und ähnlichen Substanzen sind nötig, um das gesamte Wirkungsspektrum zu erfassen und um diese am Menschen anwenden zu können.

6. Quellenverzeichnis

1. Afaq F, Adhami V, Ahmad N, Mukthar H. Botanical antioxidants for chemoprevention of photocarcinogenesis. *Front Biosci* 2002;1:784-792.
2. Al-Bekairi AM, Qureshia S, Chaudhry MA, Krishnaa DR, Shahb AH. Mitodepressive, clastogenic and biochemical effects of (+)-usnic acid in mice. *Journal of Ethnopharmacology* 1991;33:217-220.
3. Ames BN, Shigenaga M, Hagen TM. Oxidants, antioxidants and the degenerative diseases of aging. In: proceedings of the National Academy of Science of the United States of America 1993;90(7915-7922).
4. Baden HP, Kubilus J, Kvedar JC, Steinberg ML, Wolman SR. Isolation and characterization of a spontaneously arising long-lived line of humankeratinocytes (NM 1). *In Vitro Cell Dev Biol* 1987;23(3):205-213.
5. Bass DA, Parce J, Dechatelet LR, Szejda P, Seeds MC, Thomas M. Flow cytometric studies of oxidative product formation by neutrophils: a graded response to membrane stimulation. *J Immunol* 1983;130:1910-1917.
6. Beissert S, Schwarz T. Mechanisms involved in ultraviolet light-induced immunosuppression. *J Investig Dermatol Symp Proc* 1999;4(1):61-64.
7. Berneburg M, Plettenberg H, Krutmann J. Photoaging of human skin. *Photodermatol Photoimmunol Photomed* 2000;16:239-244.
8. Bjerke J, Elvebakk A, Dominguez E, Dahlback A. Seasonal trends in usnic acid concentration of Arctic, alpine and Patagonian population of the lichen *Flavocetraria nivalis*. *Phytochemistry* 2005;66:337-344.
9. Bjerke J, Dahl T. Distribution patterns of usnic acid-producing lichens along local radiation gradients in West Greenland. *Nova Hedwigia* 2002;75:487-506.
10. Bjerke J, Lerfall K, Elvebakk A. Effects of ultraviolet radiation and PAR on the content of usnic and divaricatic acid in two arctic-alpine lichens. *Photochem Photobiol Sci* 2002;1:678-685.
11. Blume-Peytavi U, Rolland A, Darvin ME, et al. Cutaneous lycopene and beta-carotene levels measured by resonance Raman spectroscopy: high reliability and sensitivity to oral lactycopene deprivation and supplementation. *Eur J Pharm Biopharm* 2009;73:187-194.
12. Boehm F, Clarke K, Edge R, et al. Lichens - Photophysical studies of potential new sunscreens. *J Photochem Photobiol B: Biology* 2009;95:40-45.

13. Böhm F, Edge R, McGarvey DJ, Truscott TG. β -Carotene with vitamins E and C offers synergistic cell protection against NOx. *FEBS Letters* 1998;436:387-389.
14. Boukamp P, Petrussevska R, Breitkreutz D, Hornung J, Markham A, Fusenig NE. Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line. *J Cell Biol* 1988;106(3):761-771.
15. Bouwstra JA, Dubbelaar F, Gooris GS, Weerheim AM, Ponc M. The role of ceramide composition in the lipid organisation of the skin barrier. *Biochemica et Biophysica Acta* 1999;1419 127-136.
16. Brenneisen P, Sies H, Scharffetter-Kochanek K. Ultraviolet-B-Irradiation and Matrix Metalloproteinases; From Induction via Signaling to Initial Events. *Ann NY Acad Sci* 2002;973:31-43.
17. Brenneisen P, Wenk J, Klotz O, et al. Central Role of Ferrous/Ferric Iron in the Ultraviolet B Irradiation-mediated Signaling Pathway Leading to Increased Interstitial Collagenase (Matrix-degrading Metalloprotease (MMP)-1) and Stromelysin-1 (MMP-3) mRNA Levels in Cultured Human Dermal Fibroblasts *The Journal of Biological Chemistry* 1998;273(9):5279-5287.
18. Burkholder PR, Evans A, McVeight I, Thornton HK. Antibiotic activity of lichens. *Proceedings, National Academy of Sciences (USA)* 1944;30(9):250-255.
19. Cardarelli M, Serino G, Campanella L, et al. Antimitotic effects of usnic acid on different biological systems. *Cell Mol Life Sci* 1997;53:667-672.
20. Caviglia AM, Nicora P, Giordani P, Brunialti G, Modenesi P. Oxidative Stress and usnic acid content in *Parmelia caperata* and *Parmelia soledians* (Lichenes). *Il Farmaco* 2001;56:379-382.
21. Cocchietto M, Skert N, Nimis PL, Sava G. A review on usnic acid, an interesting natural compound. *Naturwissenschaften* 2002;89:137-146.
22. Corcuff P, Fiat F, Minondo AM. Ultrastructure of the Human Stratum corneum. *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol* 2001;14(1):4-9.
23. Curtis C. Multicenter evaluation of sunscreen UVA protectiveness with the protection factor test method. *J Am Acad Dermatol* 1994;30:729-736.
24. Damian DL, Barnetson R, Halliday GM. Measurement of in vivo sunscreen immune protection factors in humans. *Photochemistry and Photobiology* 1999;70(6):910-915.
25. Darin N, Kadhorn N, Briere JJ. Mitochondrial activities in human cultured skin fibroblasts contaminated by *Mycoplasma hyorhinis*. *BMC Biochem* 2003;4:15.
26. Darr D, Comb S, Dunston S, Manning T, Pinnell S. Topical vitamin C protects porcine skin from ultraviolet radiation-induced damage. *Brit J Dermatology* 1992;127:247-253.

27. Darvin M, Zastrow L, Sterry W, Lademann J. Effect of supplemented and topically applied antioxidant substances on human tissue. *Skin Pharmacol Physiol* 2006;19:238-247.
28. Darvin M, Gersonde I, Albrecht H, Meinke M, Sterry W, Lademann J. Non-invasive in vivo detection of the carotenoid antioxidant substance lycopene in the human skin using the resonance Raman spectroscopy. *Laser Physics* 2006;Letters 3:460-463.
29. Darvin M, Zastrow L, Sterry W, Lademann J. Effects of Supplementend and Topically Applied Antioxidants Substances on Human Tissue. *Skin Pharmacol Physiol* 2006;19:238-247.
30. De Carvalho EAB, Andrade P, Sliva NH, Pereira EC, Figueiredo E. Effect of usnic acid from the lichen *Cladonia substellata* on *Trypanosoma cruzi* in vitro: an ultrastrukturell study. *Micron* 2005;36:155-161.
31. Del Rio D, Serafini M, Pellegrini N. Selected methodologies to asses oxidative/antioxidant status in vivo: a critical review. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2002;12:343-351.
32. Diffey B. Sunscreen isn't enough. *J Photochem Photobiol B: Biology* 2001;64:105-108.
33. Diffey BL. How much Sun protection do we need? *SöFW Journal* 2002;128(6):2-8.
34. Diffey BL, Larkö O, Swanbeck G. UV-B doses received during different outdoor activities and UV-B treatment of psoriasis. *Br J Dermatol* 1882;106:33-41.
35. Duh PD, Tu YY, Yen GC. Antioxidant Activity of Water Extract of Harnng Jyur (*Chrysanthemum morifolium* Ramat). *Lebensm-Wiss u Technol* 1999;32:269-277.
36. Duthie MS, Kimber I, Norval M. The effects of ultraviolet radiation on the human immune system. *Br J Dermatol* 1999;140(6):995-1009.
37. Eichler O, Sies H, Stahl W. Divergent optimum levels of lycopene, beta-carotene and lutein protecting against UVB irradiation in human fibroblasts. *Photochem Photobiol* 2002;75:503-506.
38. Engel K, Schmidt U, Reuter J, Weckesser S, Simon-Haarhaus B, Schempp CM. *Usnea barbata* extract prevents ultraviolet-B induced prostaglandin E2 synthesis and COX-2 expression in HaCaT keratinocytes. *J Photochem Photobiol B: Biology* 2007;89:9-14.
39. Fernández E, Quilhot W, Rubio C, Hidalgo ME, Diaz R, Ojeda J. Effects of UV Radiation in Usnic Acid in *Xanthoparmelia microspora* (Müll. Arg. Hale) *Photochemistry and Photobiology*, 2006;82:1065-1068.

40. Fernández E, Reyes A, Hidalgo ME, Quilhot W. Photoprotector capacity of lichen metabolites assessed through the inhibition of 8-methoxypsoralen photobinding to protein. *J Photochem Photobiol B: Biology* 1998;42:195-201.
41. Foote C. Mechanism of Photosensitized Oxidation. *Science* 1968;162:963-970.
42. Frank J, Biesalski H, Dominici S, Pompella A. The visualization of oxidant stress in tissues and isolated cells. *Histol Histopathol* 2000;15:173-184.
43. Greten H. *Innere Medizin: Georg Thieme Verlag Stuttgart-New York* 2002.
44. Grether-Beck S, Wlaschek M, Krutmann J, Scharffetter-Kochaneck K. Photoschädigung und Photoalterung - Prävention und Behandlung. *JDDG* 2005;Suppl. 2:19-25.
45. Gruijl de F. Skin Cancer and Solar UV radiation. *Eur J Cancer* 1999;35(14):2003-2009.
46. Gruner S, Oesterwitz H, Diezel W, Schneider W. Inhibition of rat heart allograft rejection by PUVA treatment of the graft recipient. *Transplant Int* 1990;3:8-11.
47. Halici M, Odabasoglu F, Suleyman H, Cakir A, Aslan A, Bayir Y. Effects of water extract of *Usnea longissima* on antioxidant enzyme activity and mucosal damage by Indomethacin in rats. *Phytomedicine* 2005;12:656-662.
48. Halliwell BI, Gutteridge J. *Free radicals in biology and medicine*. Clarendon Press London 1989.
49. Hausen BM, Emde L, Marks V. An investigation of the allergic constituents of *Cladonia stellaris* (Opiz) Pous & Vežda ("silver moss", "reindeer moss" or "reindeer lichen"). *Contact Dermatitis* 1993;28:70-76.
50. Heinen MM, Hughes MC, Ibiebele TI, Marks GC, Green AC, van der Pols JC. Intake of antioxidant nutrients and the risk of skin cancer. *Eur J Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2007;43:2707-2716.
51. Heinrich U, Gartner C, Wiebusch M, Eichler O, Sies H, Tronnier H, Stahl W. Supplementation with beta-carotene or a similar amount of mixed carotenoids protects humans from UV-induced erythema. *J Nutr* 2003;133:98-101.
52. Hempel SL, Buettner G, O'Malley YQ, Wessels DA, Flaherty DM. Dihydrofluorescein diacetate is superior for detecting intracellular oxidants: comparison with 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, 5(and 6)-carboxy-2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, and dihydrorhodamine 123. *Free Radic Biol Med* 1999;27:146-159.
53. Herrmann G, Wlaschek M, Lange TS, Prenzel K, Goerz G, Scharffetter-Kochaneck K. UVA irradiation stimulates the synthesis of various matrix-metalloproteinases (MMPs) in cultured human fibroblasts. *Exp Dermatol* 1993;2:92-97.

54. Hidalgo ME, Fernández E, Quilhot W, Lissi E. Antioxidant Activity of depsides and depsidones. *Phytochemistry* 1994;37(6):1585-1587.
55. Hidalgo ME, Gonzalez I, Toro F, Fernández E, Speisky H, Jiminez I. Boldine as a sunscreen. *Cosmetics & Toiletries* 1998;113:59-66.
56. Horand R. Mains de crocodile, dermatose professionnelle produite par le bois de chataigner. *Gar Hôp* 1907;80:255-258.
57. Huneck S. The Significans of Lichens and their metabolites. *Naturwissenschaften* 1999;86:559-570.
58. Ingolfsdottir K. Usnic acid. *Phytochemistry* 2002;61:729-736.
59. Jang YY, Song J, Shin YK, Han ES, Lee CS. Protective Effects of Boldine on oxidative Mitochondrial Damage in streptozotocin-induced diabetic rats. *Pharmacological Research* 2000;42(4):361-371.
60. Jayaprakasha GK, Rao L. Phenolic constituents from Lichen Parmotrema stuppeum (Nyl.) Hale and their Antioxidant Activity. *Z Naturforsch* 2000;55c:1018-1022.
61. Jenkins GJ, Stephens L, Masnavi N, Parry JM. Molecular analysis of the chemoprotective effects of topical sunscreens and vitamin C in preventing UV-induced and reactive oxygen species-induced DNA damage, respectively, using the PCR inhibition methodology. *Anticancer Res* 2002;22:3873-3877.
62. Jepson TL, Ernst M, Kelly MW. Current perspectives on the management of seasonal affective disorder. *J Am Pharm Assoc (Wash)* 1999;39(6):822-829.
63. Kalka K, Mukthar H, Turowski-Wanke A. Biomelanin antioxidants in cosmetics: assessment based on inhibition of lipid peroxidation. *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol* 2000;13:143-149.
64. Kessler S. Untersuchung der antiinflammatorischen Wirkung von Pflanzenextrakten im UV-Erythemtest. Dissertation an der Medizinischen Fakultät der Albrecht-Ludwigs-Universität Freiburg i. Brg; 2004.
65. Keston A, Brandt R. The Fluorometric Analysis of Ultramicro Quantities of Hydrogen Peroxide. *AnalBiochem* 1965;11:1-5.
66. Knop W. Chemisch-physiologische Untersuchung über die Flechten. *Justus Lieb Ann Chem* 1844;49:103-124.
67. Krinsky N. Mechanism of action of biological antioxidants. *Proc Soc Exp Biol Med* 1992;200:248-254.
68. Krinsky N. The antioxidant and biological properties of Carotenoids. *Ann NY Acad Sci* 1998;854:443-447.

69. Kristmundsdóttir T, Jónsdóttir E, Ögmundsdóttir HM, Ingólfssdóttir K. Solubilization of poorly soluble lichen metabolites for biological testing on cell lines. *Europ J Pharmaceu Sci* 2005;24:539-543.
70. Krutmann L. Ultraviolet A radiation-induced biological effects in human skin: Relevance for photoaging and photodermatosis *Journal of Dermatological Science* 2000;23(1):22-26.
71. Kumar KCS, Müller K. Lichen metabolites. Antiproliferative and cytotoxic activity of gyrophoric, usnic and diffractaic acid on human keratinocyte growth. *J Nat Prod* 1999;62:821-823.
72. Kupchan SM, Koppermann H. β -Usnic Acid: Tumor Inhibitor isolated from Lichens. *Specialita* 1975;31(6):625.
73. Lademann J, Knorr F, Richter H, et al. Hair Follicels – An Efficient Storage and Penetration Pathway for Topically Applied Substances. *Skin Pharmacol Physiol* 2008;21:150-155.
74. Lademann J, Meinke MC, Sterry W, Patzelt A. Wie sicher sind Nanopartikel? *Hautarzt* 2009;60:305-309.
75. Lademann J, Otberg N, Richter H, Jacobi U, Schaefer H, Blume-Peytavi U, Sterry W. Follikuläre Penetration. *Hautarzt* 2003;54:321-323.
76. Lademann J, Otberg N, Richter H, Weigmann HJ, Lindemann U, Schaefer H, Sterry W. Investigation of Follicular Penetration of Topical Applied Substances. *Skin Pharmacol Physiol* 2001;14(1):17-22.
77. Lademann J, Richter H, Teichmann A, et al. Nanoparticles - An efficient carrier for drug delivery into the hair follicles. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 2007;66:159-164.
78. Lademann J, Schaefer H, Otberg N, Teichmann A, Blume-Peytavi U, Sterry S. Penetration von Mikropartikeln in die menschliche Haut. *Hautarzt* 2004;55:1117-1119.
79. Lademann J, Weigmann HJ, Meffert H, Sterry W. Sonnenschutz ein heißes Thema. *Humboldt Spektrum* 2000;3(4-8).
80. Lauterwein M, Oethinger M, Belsner K, Peters T, Marre R. In vitro Activities of the Lichen Secondary Metabolites Vulpinic acid, (+)-Usnic acid and (-)-Usnic acid against aerobic and Anaerobic Microorganisms. *Antimikrob Ag and Chem* 1995;39(11):2541-2543.
81. Lawrey J. Biological Role of Lichen Substances. *The Bryologist* 1986;89(2):111-122.

82. LeBel CP, Ischiropoulos H, Bondy SC. Evaluation of the probe 2',7'-dichlorofluorescein as an indicator of reactive oxygen species formation and oxidative stress. *Chem Res Toxicol* 1992(5):227-231.
83. Leonhardt H. *Histologie, Zytologie und Mikroanatomie des Menschen* Georg Thieme Verlag Stuttgart - New York; 1990.
84. Lowe GM, Booth L, Young AJ, Bilton RF. Lycopene and beta-carotene protect against oxidative damage in HT29 cells at low concentrations but rapidly lose this capacity at higher doses. *Free Radic Res* 1999;30:141-151.
85. MacKenzie S. *Ultraviolet Absorption Spectra of Derivates of Usnic Acid* 1952.
86. Madison KC. Barrier Funktion of the Skin: "La Raison d'Être" of the Epidermis. *J Invest Dermatol* 2003;121(2):231.
87. Marks R. Seeing through the stratum corneum. *Keio J Med* 2000;49(2):80-83.
88. Meffert H, Scherf H, Bäuml H, et al. Systemische Effekte der Ultraviolet, -sichtbaren bzw. Infrarotstrahlung bei seriellen Ganzkörperbestrahlungen. *Dermatol Monatsschr* 1989;175(10):609-622.
89. Meinke MC, Darvin M, Vollert H, Lademann J. Antioxidant blood and skin concentrations after supplementation of vegetable oil. in Press.
90. Mitchell MD, Fritig B, Sigh B, Towers GHN. Allergic contact Dermatitis from *Frullania* and *Compositae*. *J of Invest Dermatology* 1970;54(3):233-239.
91. Mitsuda H, Yasumoto K, Iwami K. Antioxidative action of indole compounds during the autoxidation of linoleic acid. *Eiyo to Shokuryo* 1996;19:210-214.
92. Miura T, Muraoka S, Fujimoto Y. Lipid peroxidation induced by Indomethacin with horseradish peroxidase and hydrogen peroxide: involvement of Indomethacin radicals. *Biochemical Pharmacology* 2002;63:2069-2074.
93. Moll I. *Dermatologie*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart-New York; 2005.
94. Nishida K, Otha Y, Ishiguro I. Contribution of NO synthases to neutrophil infiltration in the gastric mucosal lesions in rats with water immersion restraint stress. *FEBS letters* 1998;425:243-248.
95. Nishitoba Y, Nishimur H, Nishimyama T, Mizutani J. Lichen acids, plant growth inhibitors from *Usnea longissima*. *Phytochemistry* 1987;26:3181-3185.
96. Odabasoglu F, Aslan A, Cakir A, et al. Comparison of Antioxidant Activity and Phenolic content of Three Lichen Spezies. *Phytotherapy Research* 2004;18:938-941.

97. Odabasoglu F, Cakir A, Suleyman H, et al. Gastroprotective and antioxidant effects of usnic acid on Indomethacin-induced gastric ulcer in rats. *J of Ethnopharmacology* 2006;103:59-65.
98. Perry NB, Benn MH, Brennan NJ, et al. Antimicrobial, Antiviral and Cytotoxic Activity of New Zealand lichens. *Lichenologist* 1999;31(6):627-636.
99. Professor Dr. med. Boehm F. persönliche Mitteilung. 2009.
100. Quilhot W, Fernández E, Rubio C, Goddard M, Hidalgo ME. Lichen secondary products and their importance on environmental studies. Marcelli MP SM, editor: CETESB- Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental, Estado de Sao Paulo, Brazil; 1998.
101. Quilhot W, Pena W, Flores E, Hidalgo ME, Fernández E, Leighton G. Temporal variation in usnic acid concentration in *Usnea aurantiaco-ater* (Jaq.). *Bory Ser Cient* 1991; INACH 41:99-106.
102. Rademaker M. Allergy to lichen acids in a fragrance. *Australian Journal of Dermatology* 2000;41:50-51.
103. Rancan F, Rosan S, Boehm K, et al. Protection against UVB irritation by natural filters extracted from lichens. *J Photochem Photobiol B: Biology* 2002;68:133-139.
104. Rattis FM, Peguet-Navarro J, Courtellemont P, Redziniak G, Schmitt D. In vitro effects of ultraviolet B radiation on human Langerhans cell antigen-presenting function. *Cell Immunol* 1995;164(1):65-72.
105. Reuter J, Merfort I, Wölfle U, Seelinger G, Schempp CM. Botanicals in Dermatology and Skin Health. *Botanical Medicine – From Bench to Bedside*: Raymond C, Kronenberg F, Mary Ann Liebert Inc; 2009. p 33-65.
106. Rode T. Stabilität und Penetrationsfähigkeit von pflanzlichen Stoffen in topischen Formulierungen. Dissertation an der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Christian-Albrechts-Universität Kiel; 2001.
107. Rowe GJ, Giminez G, Rodriguez SMT. Some lichens products have antimicrobial activity. *Z Naturforsch* 1999;54:605-609.
108. Rundel P. Clinal variation in the production of usnic acid in *Cladonia subtenuis* along light gradients. *Bryologist* 1969;72:40-44.
109. Safaei M. Dosimetrische Untersuchungen zur UV-Exposition bei unterschiedlichen Freizeitaktivitäten und zur UV-Protektion unterschiedlicher Sonnenschutzmittel. Dissertation an der Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie am Biederstein des Klinikums rechts der Isar. Technische Universität München; 2005.

110. Sander CS, Chang H, Hamm F, Elsner P, Thile JJ. Role of oxidative stress and the antioxidant network in cutaneous carcinogenesis. *International Journal of Dermatology* 2004;43(5):326-335.
111. Schaefer H, Lademann J. The Role of Follicular Penetration. *Skin Pharmacol Physiol* 2001;14(1):23-27.
112. Schaefer H, Redelmeier T. Skin Barrier. Principles of Percutaneous Absorption. . Basel: Verlag Karger; 1996. 42-150.
113. Scharffetter-Kochanck K, Brenneisen P, Wenk J, et al. Photoaging of the skin - from phenotype to mechanisms. *Experimental Gerontology* 2000;35:307-316.
114. Scharffetter-Kochaneck K, Wlaschek M, Brivida K, Sies H. Singlet oxygen induces collagenase expression in human skin fibroblasts. *FEBS* 1993;331(3):304-306.
115. Schneider U, Schwenk H, Bornkamm G. Characterization of EBV-Genome Negative "Null" and "T" cell lines derived from Children with acute lymphoblastic Leukemia and Leukemic transformed Non-Hodgkin-Lymphoma. *Int J Cancer* 1977;19:621-626.
116. Scirpa P, Scambia G, Masciullo V, et al. A zinc sulphate and usnic acid preparation used as post-surgical adjuvant therapy in genital lesion by human papillomavirus. *Minerva Ginecol* 1999;51:255-260.
117. Sheehan JM, Potten C, Young AR. Tanning in Human Skin Types II and III offers Modest Photoprotection Against Erythema. *Photochemistry and Photobiology* 1998;68(4):588-592.
118. Sies H. Oxidative stress: From basic research to clinical application. *The American Journal of Medicine* 1991;91(3c):31s-36s.
119. Sies H, Stahl W. Nutritional Protection Against Skin Damage From Sunlight. *Annu Rev Nutr* 2004;24:173-200.
120. Speisky H, Cassales B, Lissi EA, Videla LA. Antioxidant properties of alkaloid Boldine in systems undergoing lipid peroxidation and Enzyme inactivation *Biochemical Pharmacology* 1991;41(11):1575-1581.
121. Stahl W, Sies H. Bioactivity and protective effects of natural carotenoids. *Biochim Biophys Acta* 2005;1740:101-107.
122. Steinberg D. Oxidative Modification of LDL and Atherogenesis. *Circulation* 1997;95:1062-1071.
123. Stoll A, Brack A, Renz J. Die antibakterielle Wirkung der Usninsäure auf Mykobakterien und andere Mikroorganismen. Fünfte Mitteilung über antibakterielle Stoffe. *Experientia* 1947;3(3):115-117.

124. Swanson A, Fahselt D, Smith D. Effects of ultraviolet on polyphenolics of *Umbilicaria americana*. *Can J Bot* 1997;75:284-289.
125. Toni Lindl *Zell- und Gewebekultur*. Berlin: Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg; 2000.
126. Takai M, Uehara Y, Beisler JA. Usnic acid derivatives as potential antineoplastic agents. *J Med Chem* 1979;22:1380-1384
127. Takeuchi K, Ueshima K, Hironaka Y, Fujioka, Matsumoto, Okabe S. Oxygen free radicals and lipid peroxidation in the pathogenesis of gastric mucosa lesions induced by Indomethacin in rats. Relation to gastric hypermotility. *Digestion* 1991;49:175-184.
128. Thiele JJ. Oxidative targets in the stratum corneum. *Skin pharmacology and physiology* 2001;14(1):87-91.
129. Thune P. Contact Allergy due to lichens in patient with a history of photosensitivity. *Contact Dermatitis* 1977;3:267-272.
130. Thune PO, Solberg Y. Photosensitivity and allergy to aromatic lichen acids, Compositae oleoresins and other plant substances. *Contact Dermatitis* 1980;6:81-87.
131. Truscott TG. β -Carotene and disease: a suggested pro-oxidant and anti-oxidant mechanism and speculations concerning its role in cigarette smoke. *J Photochem Photobiol B: Biology* 1996;35(233-235).
132. van der Molen RG, Spies F, van 't Noordende JM, Boelsma E, Mommaas AM, Koerten HK. Tape stripping of human stratum corneum yields cell layers that originate from various depths because of furrows in the skin. *Arch Dermatol Res* 1997; 289:514-518.
133. Vicente C, Ruiz JL, Estevez MP. Mobilization of usnic acid in *Evernia prunastri* under critical conditions of nutrient availability. *Phyton* 1980;39(15-19).
134. Wang H, Joseph J. Quantifying cellular oxidative stress by dichlorofluorescein assay using microplatereader. *Free Radic Biol Med* 1999b;27:612-616.
135. Weckesser S, Engel K, Simon-Haarhaus B, Wittmer A, Pelz K, Schempp C. Screening of plant extracts for antimicrobial activity against bacteria and yeasts with dermatological relevance. *Phytomedicine* 2007;14(508-516).
136. Weigmann HJ, Lademann J, Meffert H, Schaefer H, Sterry W. Determination of the Horny Layer Profile by Tape Stripping in Combination with optical Spectroscopy in the Visible Range as a Prerequisite to Quantify Percutaneous Absorption. *Skin Pharmacol Physiol* 1999;12:34-45.
137. Wennersten G. Photodynamic reactions induced by compounds derived from lichens. *Acta Dermato-venereologica* 1979;59::197-200.

138. Wiesemann H, Helliwell B. Damage to DNA by reactive oxygen and nitrogen species: role in inflammatory disease and progression to cancer. *Biochem J* 1996;313:17-29.
139. Wlaschek M, Tanchéva-Poor I, Naderi L, et al. Solar UV irradiation and dermal photoaging. *J Photochem Photobiol B: Biology* 2001;63:41-51.
140. www.hautarzt-kroehl-spreyer.de
141. Yamamoto Y, Miura Y, Kinoshita Y, et al. Screening of Tissue Cultures and Thalli of Lichens and some of Their active Constituents for Inhibition of Tumor Promotor-Induced Epstein-Barr Virus Activation. *Chem Pharm Bull* 1995;43(8):1388-1390.
142. Yen GH, Chen H. Antioxidant activity of various tea extracts in relation to their antimutagenicity. *J Agric Food Chem* 1997;43:27-32.
143. Yen WJ, Chang L, Duh PD. Antioxidant activity of peanut seed testa and its antioxidative component ethyl protocatechuate. *Food Science and Technology* 2004;38(3):193-200.
144. Young A, Lowe G. Antioxidant and Prooxidant Properties of Carotenoids. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 2001;385(1):20-27.
145. Young R. The Family of sunlight-related eye-diseases *Optom vis sci* 1994;71(2):125-144.
146. Zigman S. Ocular damage by environmental radiant energy and it`s Prevention. In: AR Young (editor). *Enviromental UV Photobiology*. Plenum Press New York 1993.

Abkürzungsverzeichnis

ATP	Adenosintriphosphat
Car	Carotinoid
Carbox-DCF	Carboxy-2',7'-Dichlorofluoreszein
CHCl ₃ : EtoH	Chloroform zu Ethanol
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
COX	Cyclooxygenase
DCF	2',7'-Dichlorofluoreszein
DC-FDA-Assay	2',7'-Dichlorofluoreszein-Diacetat-Acetylerster-Assay
DMEM	Dulbecco`s minimum essential medium
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNS	Diribonukleinsäure
EC ₅₀	Mittlere effektive Konzentration
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzyme linked Immunoassay
EtoH	Ethanol
FBS	Fetal bone Serum
FCS	Fetal calf Serum
HaCaT	<i>Human adult skin keratinocytes, low Calcium, high Temperature</i>
DC-FDA-Assay	CM-HDC-FDA (5-(and-6)-chloromethyl-2',7-dichlorodihydrofluorescein-diacetate acetylerster-Assay
IC ₅₀	Mittlere Inhibitorische Konzentration
J/cm ²	Joule pro Quardatzentimeter
LDH	Laktatdehydrogenase
LSF	Lichtschutzfaktor
M	molar
mM	millimolar

Medium o. Z.	Medium ohne Zusätze
MED	Minimale Erythemdosis
Mg ⁺⁺	Magnesium
mJ/cm ²	Millijoule pro Quadratcentimeter
M. ovale	Mycoplasma ovale
MPF	Membranprotektionsfaktor
MRSA	Multiresistenter Staphylokokkus aureus
µl	Mikroliter
nm	Nanometer
NO	Stickstoffmonoxid
O ₂	Sauerstoff
Parsol® MCX	Octyl Methoxycinnamate
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i> - Waschpuffer
Pen/Strept	Penicillin/Streptomycin
PP	Diphosphat
SSR	Sonnensimulator
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
UpM	Umdrehungen pro Minute
UV-A	Ultraviolett-A-Licht
UV-B	Ultraviolett-B-Licht
XTT	sodium 3' -[1-(phenylaminocarbonyl)- 3,4-tetrazolium]-bis-(4-methoxyl-6-nitro) benzene sulfonic acid hydrate

Publikation

Cornelia Kohlhardt-Floehr, Fritz Boehm, Stefan Troppens, Jürgen Lademann, T. George Truscott, *Prooxidant and antioxidant behaviour of usnic acid from lichens under UVB-light irradiation – studies on human cells.*
J Photochem and Photobiol B. 2010 Oct 5; 101(1):97-102

Danksagung

Ich danke Herrn Professor Dr. med. Sterry für die Möglichkeit, an der dermatologischen Klinik der Charité promovieren zu dürfen und für die Unterstützung bei der Durchführung meiner Doktorarbeit.

Meinem Doktorvater Herrn Professor Dr. Dr.-Ing. Lademann danke ich für die Überlassung des Themas der vorliegenden Dissertation, seine umfassende Hilfe bei der Klärung von Problemen und seine engagierte Betreuung. Ein außerordentliches Dankeschön gebührt der Sonnenfeld-Stiftung, die diese Arbeit durch ihre finanzielle Unterstützung im Rahmen ihrer Forschungsförderung ermöglichte. In diesem Zusammenhang gehört Herrn Freiherr von Villiez ein besonderer Dank für sein stetes Interesse und große persönliche Anteilnahme nicht nur an der geförderten Arbeit, sondern vor allem an der geförderten Person.

Herrn Professor Dr. med. Boehm danke ich sehr für die Nutzungsmöglichkeit des photobiologischen Labors der Charité, für fortwährendes Interesse an dieser Arbeit, viele Ratschläge und zahlreiche fachliche Gespräche.

Bei der Arbeitsgruppe „skintegral“ der Hautklinik der Universität Freiburg im Breisgau möchte ich mich aufrichtig bedanken. Professor Dr. med. Schempp, Dr. rer. nat. Ute Wölfe und Frau Birgit Simon-Haarhaus haben mich herzlich in ihr Team aufgenommen und mir mit den labortechnischen Möglichkeiten, ihrer experimentellen Erfahrung und ihrem Forschergeist großartige Hilfe bei den Untersuchungen geleistet. Dazu haben sie und die anderen Mitarbeiter im Labor mir viel Freude am experimentellen Arbeiten vermittelt. Dabei möchte ich noch Philipp Eßer hervorheben, der mit großem Interesse den Fortgang der Versuche beobachtet hat und uns mit kreativen Ideen und spannenden Experimenten oft neue Anstöße gab.

Stefan Troppens des Center of Experimental and Applied Cutaneous Physiology (CRC) möchte ich danken für seine tatkräftige Unterstützung bei der Zellkulturarbeit. Er hat mit seiner Hilfe, seiner Diskussionsbereitschaft und seinem Wissen sehr zum Erfolg dieser Arbeit beigetragen. Daneben gilt den anderen Mitarbeitern des CRC – im Besonderen

Fiorenza Rancan und Sabrina Hadam – ebenfalls mein Dank für die Hilfe und Unterstützung im Zellkulturlabor des CRCs.

Frau Dr. rer. nat. Susann Schweizer danke ich sehr für ihre Einführung in die Zellkulturtechnik, die tatkräftige Unterstützung zu Beginn der experimentellen Arbeit, ihr fortbestehendes Interesse an der Fertigstellung sowie ihre andauernde mentale Unterstützung. Den Forschungsgruppen der Kardiologie in der Ziegelstraße möchte ich für die freundliche Atmosphäre und die Bereitschaft, das Zelllabor mit mir zu teilen, danken. Hervorheben möchte ich dabei Frau Angelika Westphal, die mir immer mit Rat und Tat zur Seite stand.

Frau Dr. med. Franz und dem gesamten Team der Malteser Migranten Medizin möchte ich für die Möglichkeit danken, in einem tollen Team gearbeitet zu haben, für den Blick für das Wesentliche und das Gefühl, den richtigen Beruf ergriffen zu haben.

Herzlicher Dank gehört meiner „belle mère“ für die Korrektur der Rechtschreibfehler und der vielen Kleinigkeiten, die man beim Schreiben übersieht.

All meinen Freunden gebührt ein großes Dankeschön fürs Zuhören, Aufmuntern und gelegentliches Ablenken.

Meinen Eltern danke ich von ganzem Herzen für ihre stete Unterstützung, die sie mir bei diesem wie auch bei allen anderen Vorhaben in meinem Leben zukommen lassen. Danke für die Wurzeln und die Flügel, die Ihr mir gebt.

Zu letzt und nicht zu letzt danke ich Matthias: Ich danke Dir für Deinen Glauben an mich und Dein Verständnis für mich. Dich an meiner Seite zu wissen, macht mir immer Mut und hilft mir, auch Schwieriges zu meistern. Für dies und so viel mehr danke ich Dir.

Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Erklärung

Ich, Cornelia Elisabeth Kohlhardt-Floehr erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Prooxidatives und antioxidatives Verhalten der Usninsäure unter Ultraviolet-B-Lichtbestrahlung – die Wirkung auf menschliche lymphoide Zellen“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.

Datum

Unterschrift