

Untersuchungen zum Mechanismus der UV-B-protektiven Wirkung von Huminsäuren in vitro



Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
doctor rerum naturalium (Dr.rer.nat.)

vorgelegt der

Mathematisch-Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät
(mathematisch-naturwissenschaftlicher Bereich)
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Frau Simone Kühn
geb. am: 04.09.1974 in: Saalfeld

Gutachter bzw. Gutachterin:

1. Prof. Dr. Dr. H.-P. Klöcking
2. PD Dr. E. Krause
3. PD Dr. A. Wegener

Halle (Saale), den 7.12.2005

urn:nbn:de:gbv:3-000009631

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000009631>]

Inhaltsverzeichnis	Seite
1. Einleitung	1
1.1. Strahlung	1
1.2. Wirkungen der UV-B-Strahlung	1
1.2.1. Synthese von Vitamin D ₃	1
1.2.2. Direkte DNA-Schäden	2
1.2.3. Indirekte DNA-Schäden	4
1.2.4. Apoptose	4
1.2.5. Wirkung auf das Immunsystem	6
1.3. Charakterisierung der Melanine	7
1.3.1. Bildung der Melanine	7
1.3.2. Chemie der Melanine	8
1.3.3. Partikelbildung	9
1.3.4. Melanine in Pilzen	9
1.4. Charakterisierung der Huminsäuren	10
1.5. Aufgabenstellung	13
2. Materialien und Methoden	15
2.1. Prüfsubstanzen	15
2.1.1. Synthetisierte Huminsäuren	15
2.1.2. Natürliche Huminsäuren	19
2.1.3. Herstellung der Untersuchungslösungen der natürlichen und synthetischen Huminsäuren	21
2.1.4. Paraaminobenzoessäure (PABA) – ein UV-B-Lichtschutzfilter	22
2.1.5. Kaffeesäure, Hydrokaffeesäure, Dihydroxyphenylalanin (DOPA)	22
2.2. Zellen	23
2.2.1. Zellkultur	23
2.2.2. Zellzüchtung	24
2.3. Chemikalien und weitere Geräte	24
2.3.1. Materialien zur Herstellung der synthetischen Huminsäuren	24
2.3.2. Materialien für die Zellzucht und zur Versuchsdurchführung	25
2.4. Testmethoden	26
2.4.1. Bestimmung der Zytotoxizität mit dem XTT-Tetrazoliumreduktionstest	26

	EZ4U	
2.4.2.	Berechnung und Darstellung der halbmaximalen zytotoxischen Konzentration (CC ₅₀)	28
2.4.3.	Bestimmung der UV-B-protektiven Wirkung mit dem XTT-Tetrazolium-reduktionstest EZ4U	28
2.4.4.	Berechnung und Darstellung der halbmaximalen UV-B-protektiven Konzentration (UV-B-PC ₅₀)	33
2.4.5.	Bestimmung der Zytotoxizität der Huminsäuren bei 96-stündiger Exposition	34
2.4.6.	Bestrahlungsdosis	34
2.4.7.	Morphologische Beurteilung der Zellen	34
2.4.8.	Statistische Auswertung der Ergebnisse	35
3.	Ergebnisse	36
3.1.	Ermittlung der Bestrahlungsdosis	36
3.2.	Morphologische Veränderungen der U937-Zellen	38
3.3.	Zytotoxizität und UV-B-protektive Wirkung von natürlich vorkommenden Huminsäuren	41
3.3.1.	Huminsäure Alteicher Moor I	41
3.3.2.	Huminsäure Alteicher Moor II	43
3.3.3.	Huminsäure Alteicher Moor III	45
3.3.4.	Huminsäure Natriumhumat	46
3.3.5.	Huminsäure Ammoniumhumat	50
3.3.6.	Huminsäure Aldrich	54
3.4.	Zytotoxizität und UV-B-protektive Wirkung von synthetisch hergestellten Huminsäuren	57
3.4.1.	Kaffeesäure-Oxidationsprodukt, Na-Salz (Na-KOP)	57
3.4.2.	Kaffeesäure-Oxidationsprodukt, K-Salz (K-KOP)	62
3.4.3.	Kaffeesäure-Oxidationsprodukt, Ammonium-Salz (NH ₄ -KOP)	63
3.4.4.	Hydrokaffeesäure-Oxidationsprodukt, Na-Salz (HYKOP)	64
3.4.5.	DOPA-Oxidationsprodukt, Na-Salz	68
3.5.	Zytotoxizität von DOPA-OP_{Luft}	72
3.6.	Zytotoxizität der monomeren Ausgangsverbindungen der Huminsäuren	74
3.6.1.	Kaffeesäure	74
3.6.2.	Hydrokaffeesäure	75

3.6.3.	DOPA	76
3.7.	Zytotoxizität und UV-B-protective Wirkung von Paraaminobenzoesäure – einer UV-B-Lichtschutzsubstanz nach Kosmetikverordnung	76
3.8.	Zytotoxizität der Huminsäuren nach 96-stündiger Exposition	80
3.8.1.	Hydrokaffeesäure-Oxidationsprodukt	80
3.8.2.	DOPA-Oxidationsprodukt	80
3.8.3.	Ammoniumhumat	81
3.8.4.	Natriumhumat	82
3.8.5.	Huminsäure Alteicher Moor II	83
3.9.	Ermittelte halbmaximale UV-B-protective Konzentrationen (UV-B- PC₅₀) der Huminsäuren	83
3.10.	Ermittelte halbmaximale zytotoxische Konzentrationen (CC₅₀) der Huminsäuren	85
3.11.	Errechnete relative UV-B-protective Wirkungen der Huminsäuren bezogen auf PABA	85
3.12.	Einteilung und Vergleich der halbmaximalen UV-B-protectiven Kon- zentration (UV-B-PC₅₀) der Huminsäuren in den Versuchsanord- nungen 1 und 2	88
3.13.	Einteilung und Vergleich der halbmaximalen UV-B-protectiven Kon- zentration (UV-B-PC₅₀) der Huminsäuren in den Versuchsanord- nungen 1 und 5	91
4.	Diskussion	93
4.1.	Eigenschaften der natürlichen und synthetischen Huminsäuren	93
4.2.	Wirkungen der natürlichen und synthetischen Huminsäuren	98
4.3.	Gemeinsamkeiten der Huminsäuren mit Melaninen	108
4.5.	Schädliche Wirkungen der Strahlen auf die Haut	117
4.6.	Anwendungsmöglichkeiten des UV-B-protectiven Schutzes der Huminsäuren	119
4.7.	Huminsäure-Lichtschutzcreme	121
5.	Zusammenfassung	123
6.	Literatur	

Abkürzungen

ACTH	Adreno Corticotropes Hormon
α -MSH	α Melanin stimulierendes Hormon
AP	Apurin
APO1	apoptosis 1
AT	Adenin-Thymin
ATCC	American Tissue Culture Catalog
Bak, Bax, Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-xS, Bid	apoptosesteuernde Proteine
BFD	Blackfoot Disease
Ca-KOP	Calcium-Kaffeesäure-Oxidationsprodukt
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CC ₅₀	halbmaximale zytotoxische Konzentration
CD 95	cell death domain 95 (Todesrezeptor)
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
CNLAC-1	Cryptococcus neoformans Laccase Gen 1
CO ₂	Kohlendioxid
CPD	Cyclobutan-Pyrimidin-Dimer
CT	Zytotoxizität
DC	Dünnschichtchromatographie
DHN	Dihydroxynaphthalen
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DOPA	Dihydroxyphenylalanin

DOPA-OP	Dihydroxyphenylalanin-Oxidationsprodukt
GC	Guanin-Cytidin
Fas	fibroblast associated
FCS	Foetales Kälber Serum
Häm	Baustein des Hämoglobins
15-HETE, 12-HETE	15- bzw. 12-Hydroxyeicosatetraenendoperoxid
HS	Huminsäure
HO ₂ [•]	Hydroperoxyl-Radikal
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HIV	Human-Immunodeficiency-Virus
HSV	Herpes-simplex-Virus
HYKOP	Hydrokaffeesäure-Oxidationsprodukt
ICR	Institute of Cancer Research
IL-1β, IL-8, IL-6, IL-10, IL-12	Interleukin 1β, 8, 6, 10 und 12
IR	Infrarot
JNK	c-Jun-NH ₂ -terminale Kinase
K-KOP	Kalium-Kaffeesäure-Oxidationsprodukt
LDL	Low-density-Lipoprotein
LDH	Laktat-Dehydrogenase
LEC	lens epithelial cells
MCF-7	mamma carcinoma cells - lane 7
MMR	mismatch repair proteins
n	Anzahl der Versuche
Na-humat	Natriumhumat
Na-KOP	Natrium-Kaffeesäure-Oxidationsprodukt

NaOH	Natriumhydroxid
n.b.	nicht bestimmbar
NER	Nukleotid-Exzisionsreparatur
NF-kappa B	nuclear factor kappa B
NH ₄ -KOP	Ammonium-Kaffeesäure-Oxidationsprodukt
NH ₄ -humat	Ammoniumhumat
NMDA	N-Methyl-D-aspartat
NMR	Nuklear-Magnet-Resonanz
NO	Stickstoffmonoxid
8-OxoG	8-Oxo-Guanin
O ₂ ^{•-}	Superoxid-Anion
OH [•]	Hydroxyl-Radikal
p	signifikant
p53	apoptoseförderndes Protein 53
p-Typ	p-type = positive charge
PABA	Paraaminobenzoessäure
PDTC	Pyrrolidin-Dithiocarbamat
PGD ₂ , PGE, PGE ₂ , PGF _{2α}	Prostaglandin D ₂ , E, E ₂ , F _{2α}
PP	Photoprodukt
PPAR gamma Rezeptor	peroxisome proliferator-activated receptor gamma
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	reactive oxygen species
RPE	retinal pigment epithelium
RPMI	Roswell Park Memorial Institute (Zellzuchtmedium)
SD	Standardabweichung

SE	Standardfehler des Mittelwertes
SOD	Superoxid-Dismutase
TGF β	Tumorwachstumsfaktor β , transforming growth factor β
TNF α	Tumornekrosefaktor α
UCA	Urocaninsäure
UV	Ultraviolett
UV-B-PC ₅₀	Halbmaximale UV-B-protective Konzentration
UV-B-PW	UV-B-protective Wirkung
Uvr A, Uvr B, Uvr C	ultraviolet repair A, B, C
VA	Versuchsordnung
VEGF	vascular endothelial growth factor
XTT	Na-3,3'-[1-(phenylamino)carbonyl-3,4-tetrazolium]-bis(4-methoxy-6-nitrobenzol)-sulfonsäurehydrat

Abbildungsverzeichnis

	Seite
Abb. 1: Bildung von Cyclobutan-Pyrimidin-Dimeren unter UV-B-Einwirkung (modifiziert nach Alves, 2003)	2
Abb. 2: Bildung eines 6-4-Photoprodukts. Ein Molekül Thymin wird in Position 6 mit einem Molekül Cytosin in Position 4 verknüpft; nachweisbar nach einer UV-Bestrahlung von <i>Drosophila-melanogaster</i> -Zellen mit einer Dosis von 20 bis 40 J/m ² (de Cock et al., 1992).	3
Abb. 3: 8-Oxo-Guanin paart sich bevorzugt mit Adenin (links) oder mit Cytosin (rechts)	4
Abb. 4: Verschiedene Modelle der chemischen Strukturen von Humin- und Fulvosäuren	11
A) nach Christman und Ghassemi (1966)	12
B) nach Schnitzer (1978)	
C) nach Riede (1992)	
Abb. 5: Kaffeesäure (3,4-Dihydroxycimtsäure) als monomere Ausgangsverbindung für die Synthese der verschiedenen Salze von KOP	15
Abb. 6: Kaffeesäure und ihre Übergangsverbindungen bei der Synthese von KOP	16
Abb. 7: Mögliche Reaktionsschritte bei der Oxidation der Kaffeesäure	17
Abb. 8: DOPA (Dihydroxyphenylalanin) als monomere Ausgangsverbindung für die Synthese des DOPA-OP	17
Abb. 9: Hydrokaffeesäure (3,4-Dihydroxyhydroxycimtsäure) als monomere Ausgangsverbindung für die Synthese des HYKOP	18
Abb.10: Paraaminobenzoesäure (4-Aminobenzoesäure, PABA) als Referenzsubstanz für die UV-B-protective Wirkung	22
Abb.11: Reduktion des Tetrazoliumsalses zum intensiv gefärbten Formazan als Indikatorreaktion des EZ4U-Testes	27
Abb.12: Variation der Versuchsanordnungen zur Ermittlung der UV-B-protectiven Wirkung unter Verwendung von Cytomorph [®] -b-Platten	33
Abb.13: Ausmaß der Zytotoxizität nach UV-B-Bestrahlung von U937-Zellen in Abhängigkeit von der Bestrahlungsdauer und der Postexpositionszeit ($\bar{x} \pm SE$; $n_{1h}=3$, $n_{24h}=3$, $n_{48h}=3$, $n_{72h}=3$)	36
Abb.14: Darstellung der morphologischen Merkmale von wahrscheinlich apoptotisch veränderten U937-Zellen nach 48-stündiger Postexposition	40

	mit Na-humat (125 µg/ml) und einer UV-B-Bestrahlung von 360 J/m ² , 160-fache Vergrößerung	
Abb.15:	Darstellung der morphologischen Merkmale von unbehandelten U937-Zellen nach 48-stündiger Inkubation (Zellkontrolle), 160-fache Vergrößerung	40
Abb.16:	Darstellung der morphologischen Merkmale von nekrotischen U937-Zellen nach 48-stündiger Postexposition mit NH ₄ -humat (250 µg/ml), 160-fache Vergrößerung	40
Abb.17:	UV-B-protective Wirkung (UV-B-PW) und Zytotoxizität (CT) von HS Altteicher Moor I auf U937-Zellen ($\bar{x} \pm SE$) nach 24-stündiger Exposition	41
Abb.18:	UV-B-protective Wirkung (UV-B-PW) und Zytotoxizität (CT) von HS Altteicher Moor I auf U937-Zellen ($\bar{x} \pm SE$) nach 48-stündiger Exposition	42
Abb.19:	UV-B-protective Wirkung (UV-B-PW) und Zytotoxizität (CT) von HS Altteicher Moor II auf U937-Zellen ($\bar{x} \pm SE$) nach 24-stündiger Exposition	43
Abb.20:	UV-B-protective Wirkung (UV-B-PW) und Zytotoxizität (CT) von HS Altteicher Moor II auf U937-Zellen ($\bar{x} \pm SE$) nach 48-stündiger Exposition	44
Abb.21:	UV-B-protective Wirkung (UV-B-PW) und Zytotoxizität (CT) von HS Altteicher Moor III auf U937-Zellen ($\bar{x} \pm SE$) nach 24-stündiger Exposition	45
Abb.22:	UV-B-protective Wirkung (UV-B-PW) und Zytotoxizität (CT) von Na-humat auf U937-Zellen ($\bar{x} \pm SE$) nach 24-stündiger Exposition	46
Abb.23:	UV-B-protective Wirkung (UV-B-PW) und Zytotoxizität (CT) von Na-humat auf U937-Zellen ($\bar{x} \pm SE$) nach 48-stündiger Exposition	47
Abb.24:	UV-B-protective Wirkung (UV-B-PW) und Zytotoxizität (CT) von Na-humat auf U937-Zellen ($\bar{x} \pm SE$) nach 72-stündiger Exposition	48
Abb.25:	UV-B-protective Wirkung (UV-B-PW) und Zytotoxizität (CT) von Ammoniumhumat auf U937-Zellen ($\bar{x} \pm SE$) nach 24-stündiger Exposition	50
Abb.26:	UV-B-protective Wirkung (UV-B-PW) und Zytotoxizität (CT) von Ammoniumhumat auf U937-Zellen ($\bar{x} \pm SE$) nach 48-stündiger Exposition	51

Abb.27: UV-B-protective Wirkung (UV-B-PW) und Zytotoxizität (CT) von Ammoniumhumat auf U937-Zellen ($\bar{x} \pm SE$) nach 72-stündiger Exposition	52
Abb.28: UV-B-protective Wirkung (UV-B-PW) und Zytotoxizität (CT) von HS Aldrich auf U937-Zellen ($\bar{x} \pm SE$) nach 24-stündiger Exposition	54
Abb.29: UV-B-protective Wirkung (UV-B-PW) und Zytotoxizität (CT) von HS Aldrich auf U937-Zellen ($\bar{x} \pm SE$) nach 48-stündiger Exposition	55
Abb.30: UV-B-protective Wirkung (UV-B-PW) und Zytotoxizität (CT) von Na-KOP auf U937-Zellen ($\bar{x} \pm SE$) nach 24-stündiger Exposition	58
Abb.31: UV-B-protective Wirkung (UV-B-PW) und Zytotoxizität (CT) von Na-KOP auf U937-Zellen ($\bar{x} \pm SE$) nach 48-stündiger Exposition	59
Abb.32: UV-B-protective Wirkung (UV-B-PW) und Zytotoxizität (CT) von Na-KOP auf U937-Zellen ($\bar{x} \pm SE$) nach 72-stündiger Exposition	60
Abb.33: UV-B-protective Wirkung (UV-B-PW) und Zytotoxizität (CT) von K-KOP auf U937-Zellen ($\bar{x} \pm SE$) nach 24-stündiger Exposition	62
Abb.34: UV-B-protective Wirkung (UV-B-PW) und Zytotoxizität (CT) von NH ₄ -KOP auf U937-Zellen ($\bar{x} \pm SE$) nach 24-stündiger Exposition	63
Abb.35: UV-B-protective Wirkung (UV-B-PW) und Zytotoxizität (CT) von HYKOP auf U937-Zellen ($\bar{x} \pm SE$) nach 24-stündiger Exposition	65
Abb.36: UV-B-protective Wirkung (UV-B-PW) und Zytotoxizität (CT) von HYKOP auf U937-Zellen ($\bar{x} \pm SE$) nach 48-stündiger Exposition	66
Abb.37: UV-B-protective Wirkung (UV-B-PW) und Zytotoxizität (CT) von HYKOP auf U937-Zellen ($\bar{x} \pm SE$) nach 72-stündiger Exposition	67
Abb.38: UV-B-protective Wirkung (UV-B-PW) und Zytotoxizität (CT) von DOPA-OP auf U937-Zellen ($\bar{x} \pm SE$) nach 24-stündiger Exposition	69
Abb.39: UV-B-protective Wirkung (UV-B-PW) und Zytotoxizität (CT) von DOPA-OP auf U937-Zellen ($\bar{x} \pm SE$) nach 48-stündiger Exposition	70
Abb.40: UV-B-protective Wirkung (UV-B-PW) und Zytotoxizität (CT) von DOPA-OP auf U937-Zellen ($\bar{x} \pm SE$) nach 72-stündiger Exposition	71
Abb.41: Zytotoxizität von DOPA-OP _{Luft} nach 1- und 24-stündiger Exposition an U937-Zellen ($\bar{x} \pm SE$; n _{CT1h} =3, n _{CT24h} =3)	73
Abb.42: Zytotoxizität von Kaffeesäure nach 1- und 24-stündiger Exposition an U937-Zellen ($\bar{x} \pm SE$; n _{CT1h} =4, n _{CT24h} =3)	74

Abb.43: Zytotoxizität von Hydrokaffeesäure bei 1- und 24-stündiger Inkubation an U937-Zellen ($\bar{x} \pm SE$; $n_{CT1h}=4$, $n_{CT24h}=4$)	75
Abb.44: UV-B-protective Wirkung (UV-B-PW) und Zytotoxizität (CT) von PABA auf U937-Zellen ($\bar{x} \pm SE$) nach 24-stündiger Exposition	76
Abb.45: UV-B-protective Wirkung (UV-B-PW) und Zytotoxizität (CT) von PABA auf U937-Zellen ($\bar{x} \pm SE$) nach 48-stündiger Exposition	77
Abb.46: UV-B-protective Wirkung (UV-B-PW) und Zytotoxizität (CT) von PABA auf U937-Zellen ($\bar{x} \pm SE$) nach 72-stündiger Exposition	78
Abb.47: Zytotoxizität von HYKOP bei 96-stündiger Inkubation an U937-Zellen ($\bar{x} \pm SE$; $n=3$)	80
Abb.48: Zytotoxizität von DOPA-OP bei 96-stündiger Inkubation an U937-Zellen ($\bar{x} \pm SE$; $n=3$)	81
Abb.49: Zytotoxizität von NH_4 -humat bei 96-stündiger Inkubation an U937-Zellen ($\bar{x} \pm SE$; $n=3$)	81
Abb.50: Zytotoxizität von Na-humat bei 96-stündiger Inkubation an U937-Zellen ($\bar{x} \pm SE$; $n=3$)	82
Abb.51: Zytotoxizität der HS Alteicher Moor II bei 96-stündiger Inkubation an U937-Zellen ($\bar{x} \pm SE$; $n=3$)	83
Abb.52: Ferulasäure als eine natürliche Hydroxycimtsäure und mögliche Reaktionsprodukte im Sekundärstoffmetabolismus der Pflanzen (nach Flaig, 1966)	94
Abb.53: UV-B-protective Wirkung und Zytotoxizität von PABA an U937-Zellen	99
Abb.54: Bildung des Melanins in der Haut	108
Abb.55: Struktur des Eumelanins in der Haut (nach Olivieri u. Nicolaus, 1999)	109
Abb.56: Struktur der Eumelanine und der Phäomelanine (Simon u. Geller, 1999)	110
Abb.57: Morphologische Veränderungen der U937-Zellen nach UV-B-Bestrahlung und einer Behandlung mit Na-KOP (125 μ g/ml) nach 72-stündiger (100-fache Vergrößerung)	114
Abb.58: Schematischer Ablauf der Apoptose und der Nekrose von Zellen (nach Kerr et al., 1994)	115

Tabellenverzeichnis

	Seite
Tabelle 1: Charakterisierung der aus den natürlichen und synthetischen Huminsäuren hergestellten Testlösungen bei einer Konzentration von 1 mg/ml in RPMI	21
Tabelle 2: Morphologische Unterschiede zwischen apoptotischen, unbehandelten und nekrotischen U937-Zellen	39
Tabelle 3: Ermittelte halbmaximale UV-B-protective Konzentrationen (UV-B-PC ₅₀) der getesteten Huminsäuren in µg/ml	84
Tabelle 4: Ermittelte halbmaximale zytotoxische Konzentrationen von DOPA-Oxidationsprodukt und Ammoniumhumat (CC ₅₀) in µg/ml	85
Tabelle 5: Errechnete relative UV-B-protective Wirkungen bezogen auf PABA	86
Tabelle 6: Gegenüberstellung der UV-B-protectiven Konzentrationen (UV-B-PC ₅₀) der Huminsäuren und PABA in den Versuchsanordnungen 1 und 2 nach 24-stündiger Exposition geordnet nach den ermittelten UV-B-PC ₅₀	88
Tabelle 7: Gegenüberstellung der UV-B-protectiven Konzentrationen (UV-B-PC ₅₀) der Huminsäuren und PABA in den Versuchsanordnungen 1 und 2 nach 48-stündiger Exposition geordnet nach den ermittelten UV-B-PC ₅₀	89
Tabelle 8: Gegenüberstellung der UV-B-protectiven Konzentrationen (UV-B-PC ₅₀) der Huminsäuren und PABA in den Versuchsanordnungen 1 und 2 nach 72-stündiger Exposition geordnet nach den ermittelten UV-B-PC ₅₀	89
Tabelle 9: Einteilung der Huminsäuren nach ihrer UV-B-protectiven Wirkung nach 24-stündiger Exposition in den Versuchsanordnungen 1 und 2	90
Tabelle 10: Einteilung der Huminsäuren nach ihrer UV-B-protectiven Wirkung nach 48-stündiger Exposition in den Versuchsanordnungen 1 und 2	90
Tabelle 11: Einteilung der Huminsäuren nach ihrer UV-B-protectiven Wirkung nach 72-stündiger Exposition in den Versuchsanordnungen 1 und 2	90
Tabelle 12: Einteilung der Huminsäuren nach ihrer UV-B-protectiven Wirkung nach 24-stündiger Exposition in den Versuchsanordnungen 1 und 5	91
Tabelle 13: Einteilung der Huminsäuren nach ihrer UV-B-protectiven Wirkung bei 48-stündiger Exposition in den Versuchsanordnungen 1 und 5	92

Tabelle 14: Einteilung der Huminsäuren nach ihrer UV-B-protectiven Wirkung bei 72-stündiger Exposition in den Versuchsanordnungen 1 und 5	92
Tabelle 15: Einige laut Kosmetikverordnung zugelassene UV-Filter	119

1. Einleitung

1.1. Strahlung

In der Geschichte der Menschheit hat das Sonnenlicht stets eine bedeutende Rolle gespielt. Die alten Assyrer und Ägypter besaßen Kenntnisse über die Wirkungen des Sonnenlichtes und bauten Sonnenterrassen, um sich in der Sonne zu baden. In der Heilkunst der alten Römer sind Lichtbehandlungen beschrieben. Auch in anderen Kulturen wie dem Aztekenreich herrschte ein ausgeprägter Sonnenkult. Zu Beginn des 19. Jahrhunderts im Jahre 1801 wurde die ultraviolette Strahlung in Jena durch Johann Wilhelm Ritter entdeckt (Ritter u. Böckmann, 1801). In den folgenden Jahren fanden die positiven Wirkungen der Sonnenstrahlen Anwendung in der Therapie der Rachitis, der Skrophulose und bei Gelenkleiden.

Das Sonnenlicht setzt sich aus dem ultravioletten, dem sichtbaren und dem infraroten Strahlenbereich zusammen. Die ultraviolette Strahlung unterteilt man in den UV-C- (100-280 nm), in den UV-B- (280-320 nm) und den UV-A-Bereich (320-400 nm), der noch einmal in das UV-A²- (320-340 nm) und das UV-A¹-Licht (340-400 nm) unterteilt werden kann. Die sichtbare Strahlung schließt in dem Wellenlängenbereich von 400-780 nm und die infrarote Strahlung im Bereich von 780-5000 nm an.

Der Wirkungsort der Strahlung ist in erster Linie die Haut, die sich von außen nach innen aus der Oberhaut (Epidermis), der Lederhaut (Dermis, Cutis, Corium) und der Unterhaut (Subcutis) zusammensetzt. Das Eindringvermögen der ultravioletten Strahlung in die Haut ist unterschiedlich. Im sehr kurzwelligen Spektralbereich unter 200 nm werden die Strahlen fast vollständig in der Oberhaut vom Stratum corneum absorbiert. Mit steigender Wellenlänge nimmt die Eindringtiefe in die Haut zu. Bei einer Wellenlänge von 300 nm erreichen ca. 10 % der Strahlen das Stratum basale in der Dermis. Die UV-A-Strahlen dringen noch tiefer in die Dermis vor. Bei einer Wellenlänge von 400 nm erreichen ca. 57 % der Strahlen die Dermis und 1 % die Subcutis. Die infraroten Strahlen im Bereich von 750 bis 1000 nm dringen am tiefsten in die Subcutis ein (Kindl u. Raab, 1998).

1.2. Wirkungen der UV-B-Strahlung

1.2.1. Synthese von Vitamin D₃

Die Wirkungen der UV-B-Strahlung auf den Organismus können für diesen sowohl nützlich als auch schädlich sein. Ein Beispiel für die nützliche, ja sogar lebensnotwendige Wirkung stellt die Synthese des Vitamins D₃ dar. Dabei findet in der Epidermis bei Einwirkung von UV-B-Strahlung die Bildung von 7-Dehydrocholesterol statt, das dann in der Leber zu 25-Hydroxycholecalciferol und in der Niere zu 1,25-Dihydroxycholecalciferol hydroxyliert wird.

Die UV-B-Strahlung hat nicht nur einen Einfluss auf die Synthese des Vitamin D₃, sondern auch umgekehrt beeinflusst 1,25-Dihydroxycholecalciferol die Wirkungen des UV-B-Lichtes. So wird die UV-B-induzierte Apoptose in menschlichen Keratinozyten in Gegenwart von 1,25-Dihydroxycholecalciferol gehemmt. Infolge einer UV-B-Bestrahlung werden in der Haut Mediatoren [Zytokin IL-6, c-Jun-NH₂-terminale Kinase (JNK), mitochondriales Cytochrom C] gebildet, deren Freisetzung durch 1,25-Dihydroxycholecalciferol gehemmt wird. Durch die Beeinflussung dieser Mediatoren und der daraus resultierenden reduzierten Apoptoserate wirkt 1,25-Dihydroxycholecalciferol photoprotektiv (De Haes, 2003). Zusätzlich besitzt 1,25-Dihydroxycholecalciferol die Fähigkeit, bei einer UV-B-Bestrahlung die Proliferation der Melanozyten anzuregen (Xu et al., 2004).

1.2.2. Direkte DNA-Schäden

Die UV-B-Strahlung übt auch eine Reihe von schädlichen Wirkungen auf den Organismus aus, indem sie bestimmte Biomoleküle und Zellstrukturen, wie z.B. die DNA, Zellmembranen und Enzyme, verändert. Diese Wirkungen der UV-B-Strahlung sind anhand von Veränderungen am menschlichen Genom nachweisbar. So führt eine UV-B-Bestrahlung in der DNA zur Bildung von Cyclobutan-Pyrimidin-Dimeren (CPDs) (Ley et al., 1983) und von 6-4-Pyrimidin-Pyrimidon-Photoprodukten (6-4-PP) der DNA (Rosenstein u. Mitchell, 1987). CPDs und 6-4-PP entstehen in einem Verhältnis von 10:1 (Kao et al., 1993). In Abbildung 1 ist die Bildung der CPDs unter UV-B-Bestrahlung dargestellt. Die Bindung zwischen den beiden Thymin-Molekülen wird an den Positionen 5 und 6 geknüpft.

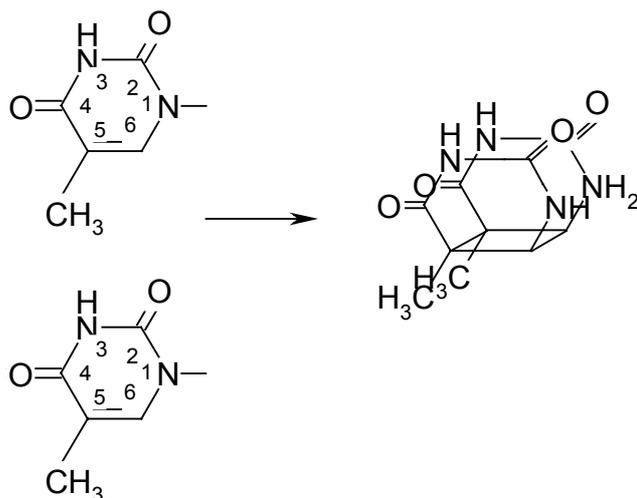


Abb. 1: Bildung von Cyclobutan-Pyrimidin-Dimeren unter UV-B-Einwirkung
(modifiziert nach Alves, 2003)

Anders als bei der Bildung der CPDs entsteht bei den 6-4-PP eine Verbindung – wie in Abbildung 2 dargestellt – an den Positionen 4 und 6 der Pyrimidin-Moleküle.

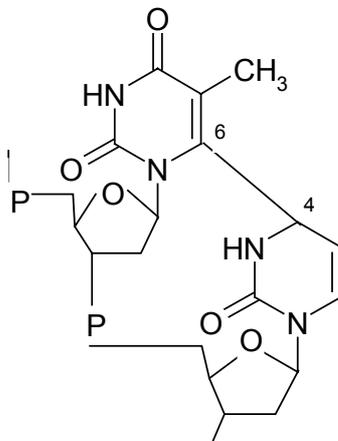


Abb. 2: Bildung eines 6-4-Photoprodukts. Ein Molekül Thymin wird in Position 6 mit einem Molekül Cytosin in Position 4 verknüpft; nachweisbar nach einer UV-Bestrahlung von *Drosophila-melanogaster*-Zellen mit einer Dosis von 20 bis 40 J/m² (de Cock et al., 1992).

Befinden sich auf einem DNA-Strang zwei Thymin-Moleküle in unmittelbarer Nachbarschaft, ist diese Region besonders gefährdet. Man nennt diese Stelle auf der DNA „hot spot“ (Brash u. Haseltine, 1982). Sind infolge einer UV-B-Bestrahlung CPDs entstanden, werden spezifische Reparatursysteme aktiviert, um die mutagenen DNA-Veränderungen zu reparieren. Zum einen ist eine Photoreaktivierung möglich, bei der DNA-Photolyasen an das Thymin-Dimer binden und unter dem Einfluss von sichtbarem Licht den Cyclobutanring spalten. Ein zweiter Reparaturmechanismus, die Nucleotid-Exzisionsreparatur (NER), wurde bei *Escherichia coli* gefunden (Sancar u. Sancar, 1988). Dabei bildet sich aus mehreren Reparaturproteinen (Uvr A, Uvr B, Uvr C) ein Komplex, der an die DNA bindet und beim „Abtasten“ der DNA CPDs erkennt. Das fehlerhafte DNA-Stück bestehend aus 8 Nucleotiden in Richtung 5' und 5 Nucleotiden in Richtung 3' wird durch eine DNA-Helicase herausgetrennt und durch eine Polymerase neu synthetisiert (Demple u. Levin, 1991).

Die nach UV-B- oder UV-C-Bestrahlung gebildeten CPDs werden auch unter Beteiligung der T4 Endonuclease V repariert. Die Pyrimidindimer-spezifische T4 Endonuclease V vereint in sich die Enzymaktivitäten einer DNA-Glykosylase und einer Apurin-Endonuclease (AP-Endonuclease) (Kuluncsics et al., 1999). Dabei spaltet die DNA-Glykosylase zunächst die glycosidische Bindung zwischen der Purin-Base und der Desoxyribose, wodurch eine

sogenannte AP-Stelle entsteht. Die AP-Endonuclease spaltet danach die Verbindung zwischen der Desoxyribose und dem Phosphatrest und öffnet den DNA-Strang.

1.2.3. Indirekte DNA-Schäden

Die CPDs und 6-4-PP entstehen unter dem direkten Einfluss der UV-B-Strahlen. Ein indirekter Schädigungsmechanismus der DNA läuft über die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (reactive oxygen species = ROS) ab. Als Vertreter der ROS treten infolge einer UV-B-Bestrahlung das Superoxid-Anion ($O_2^{\bullet-}$), das Hydroperoxyl-Radikal (HO_2^{\bullet}), Wasserstoffperoxid (H_2O_2) und das Hydroxyl-Radikal (OH^{\bullet}) auf. Ein wichtiges Produkt, das unter dem Einfluss der ROS entsteht, ist das 8-Oxo-Guanin (8-OxoG) (Floyd et al., 1988). Dieses paart sich bei der Replikation mit Cytosin, aber auch häufig mit Adenin, was zu einer Transversion von GC zu AT in der DNA führt (Kasai u. Nishimura, 1991). In Abbildung 3 sind die Paarungsmöglichkeiten des 8-OxoG dargestellt.

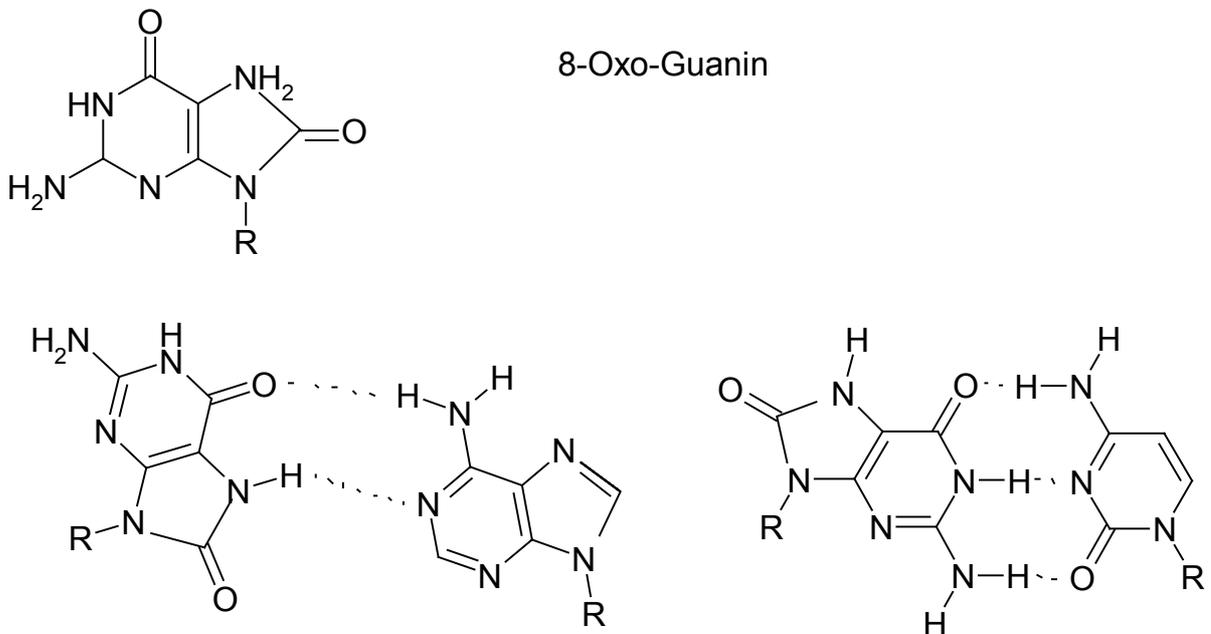


Abb. 3: 8-Oxo-Guanin paart sich bevorzugt mit Adenin (links) oder mit Cytosin (rechts)

1.2.4. Apoptose

Die Apoptose¹ stellt einen weiteren Schutzmechanismus des Körpers gegen mutagene UV-B-bedingte DNA-Veränderungen dar. Dabei werden die Veränderungen nicht repariert, sondern die gesamte Zelle wird nach einem bestimmten Programmablauf getötet. Im Gegensatz zur Nekrose hat die Apoptose keine negativen Auswirkungen auf die überlebenden Zellen.

¹ Der Begriff Apoptose ist griechischen Ursprungs und beschreibt den Fall der Blätter im Herbst.
apo = ab, weg, los; ptosis = Senkung

Die Apoptose wird als aktiver Lebensvorgang durch spezifische Mediatoren gesteuert. Die Zellmembran bleibt unbeschädigt, so dass eine Entzündungsreaktion ausbleibt. Die Zelle zerfällt, indem sich kleine membranumschlossene Abschnürungen - die apoptotischen Körperchen - bilden, die dann von Fresszellen oder von Nachbarzellen aufgenommen und abgebaut werden.

Die Apoptose läuft in 3 Stadien ab. In der Induktionsphase wird durch ein extra- oder intrazelluläres Signal die Apoptose aktiviert. Daran schließen sich die Exekutionsphase und schließlich die von der Beseitigung von Zellresten und –fragmenten geprägte Endphase an.

Das Endstadium beider Formen des Zelltodes – sowohl der Apoptose als auch der Nekrose - ist die Phagozytose der Zellreste durch Phagozyten (Depraetere u. Golstein, 1998). Die überlebenden Zellen reagieren jedoch völlig unterschiedlich auf beide Mechanismen. Bei der Nekrose werden proinflammatorische Zytokine wie TNF-alpha freigesetzt, bei der Apoptose antiinflammatorische Mediatoren wie TGF-1beta (Baker u. Premkumar Reddy, 1996). Auf molekularer Ebene ist p53, ein Protein, das die Intaktheit der DNA überprüft, für das Auslösen der Kaskade verantwortlich. Wenn das Protein einen Fehler erkennt, induziert es ein apoptoseförderndes Protein. Die Proteine der bcl-2-Familie überprüfen noch einmal, ob das ausgelöste Signal korrekt ist. Sie verbinden sich untereinander zu Dimeren, die dann apoptosefördernd (z.B. Bax, Bak, Bcl-xS) (Brady u. Gil-Gomez, 1998) oder –hemmend (z.B. Bcl-2, Bcl-xL) wirken (Vollmer, 2003a). Wenn diese Proteine an die Membranen der Mitochondrien gebunden sind, bilden sie häufig Poren aus, durch die dann Ionen hindurchdringen können (Green u. Reed, 1998). Auf enzymatischer Ebene zerlegen die Caspasen (Cohen, 1997) und die Endonucleasen die DNA. Die sterbende Zelle wird zu kleinen apoptotischen Körperchen abgebaut, die dann von anderen Zellen phagozytiert werden.

Die Apoptose kann auf einem intrinsischen und einem extrinsischen Weg ausgelöst werden. Bei der intrinsischen Kaskade bindet ein Proteinligand an einen sogenannten membranständigen Todesrezeptor und löst intrazellulär eine Aktivierung von Caspasen - darunter auch der Caspase 3 - aus.

Ein typisches Beispiel für die Aktivierung der Apoptose auf extrinsischem Weg stellt eine Bestrahlung mit UV-B dar. Die Zelle gerät dadurch unter Stress. Es werden Proteine gebildet (Bax, Bak), die sich in die Membranen der Mitochondrien einlagern und dort Poren bilden. Das löchrige Mitochondrium setzt Mediatoren, wie z.B. Cytochrom C (Skulachev, 1998), in das Zytoplasma frei. Dieses bindet an ein Adaptorprotein und bildet ein Apoptosom – einen Caspase 3 aktivierenden Komplex aus den Mediatoren und dem Rezeptor.

1.2.5. Wirkung auf das Immunsystem

UV-B-Strahlung führt zu Veränderungen des Immunsystems meist im Sinne einer Immunsuppression. Der Mechanismus der immunsuppressiven Wirkung wird kontrovers diskutiert. Unterschieden werden die lokale und die systemische Immunsuppression.

Eine UV-B-Exposition führt zu einem Anstieg der Anzahl der Granulozyten und einem Abfall der Lymphozyten im peripheren Blut von Plötzen, wobei der Hämatokrit und die Anzahl der roten und weißen Blutkörperchen unverändert bleibt. Es resultiert ein verändertes Verhältnis in der Zusammensetzung der Leukozyten. Gleichzeitig steigt die Plasmacortisol-Konzentration an. Eine UV-B-Bestrahlung löst in den Fischen Stressreaktionen aus, die zu der beobachteten Veränderung der Immunparameter und der Lymphozyten führen (Salo et al., 2000).

Neben den systemischen Veränderungen führen UV-B-Strahlen auch lokal zu einer Immunsuppression.

Schwarz (1998) erklärte den Mechanismus der UV-induzierten Immunsuppression mit der Ausbildung einer Toleranz gegen Haptene. In der Haut befindet sich das CD95/CD95L-System. Synonyme für CD95/CD95L sind Fas/FasL und APO-1/APO-1L. Dieses System löst die Apoptose von Zellen aus. Die T-Suppressor-Zellen vermitteln die Immunsuppression, indem sie das CD95/CD95L-System aktivieren, Antigen-präsentierende Zellen zur Apoptose zu aktivieren. Dadurch kommt es zu einem Absinken der Antigen-präsentierenden Zellen und zu einer gesteigerten Toleranz gegen den Einfluss von Haptenen. Liegt ein genetischer Fehler in dem CD95/CD95L-System vor, lässt sich die Immunsuppression über diesen Weg nicht vermitteln. Als Gegenspieler dieses Systems ließ sich IL-12 identifizieren, das die Expression von CD95/CD95L unterdrückt.

Eine weitere Ursache, die zu einer Immunsuppression führt, stellen DNA-Schäden dar. Dabei kommt es zur vermehrten Bildung von immunsuppressiven Zytokinen wie TNF-alpha und IL-10. Werden die DNA-Schäden enzymatisch über die T4 Endonuclease V oder die Photolyase repariert, wird auch die UV-B-induzierte Immunsuppression verhindert (Yarosh et al., 2002). Huminsäuren aktivieren die Photolyase (Yang et al., 2004).

TNF ist als Mediator am Mechanismus der lokalen Immunantwort über die Steuerung der Prävalenz der Mastzellen beteiligt. Wenn in der Haut weniger Mastzellen vorhanden sind, korreliert dies mit einer verminderten Empfindlichkeit für die UV-B-bedingte systemische Immunsuppression (Hart et al., 1998).

Einen weiteren Erklärungsansatz für die immunsuppressive Wirkung der UV-B-Strahlung bietet die Urocaninsäure (UCA). Im Stratum corneum befindet sich die trans-UCA, die durch UV-B-Bestrahlung in die cis-UCA isomerisiert. Nach einer UV-B-Bestrahlung steigt der

Gehalt der cis-UCA um ca. 10 bis 40 % in der Haut an. Wahrscheinlich ist eine erhöhte Konzentration von cis-UCA mit einer durch eine verminderte Immunabwehr verursachten erhöhten Infektionsrate verbunden (Garssen et al., 1999).

1.3. Charakterisierung der Melanine

1.3.1. Bildung der Melanine

Die Haut reagiert auf den Einfluss von UV-Strahlung mit der Bildung von Melanin. Humane Melanine sind von den Melanozyten synthetisierte Biopolymere. Die Melanozyten sind in der Epidermis der Haut lokalisiert. Sie besitzen dendritische Ausläufer, über die sie mit den Keratinozyten in Verbindung stehen, die sich im Stratum basale und in höheren Epidermisschichten befinden. In den Melanozyten wird das Melanin gebildet und dann mit Hilfe der Melanosomen (ca. 0,5 bis 1,5 μm große Zellorganellen) in die angrenzenden Keratinozyten übertragen. Die Melanosomen werden durch Exozytose aus den Melanozytendendriten gebildet (Cesarini, 1996). Um die Melaninbildung auszulösen, senden die Keratinozyten parakrine Signale aus. So wird z.B. in den Keratinozyten infolge einer UV-A- und UV-B-Bestrahlung über die NO-Synthase NO gebildet, das die Melaninbildung auslöst. Werden Keratinozyten und Melanozyten in einer Zellkultur zusammen gezüchtet, steigt nach einer UV-Bestrahlung NO-vermittelt die Tyrosinaseaktivität in den Melanozyten an. Die Melanozyten reagieren auf den parakrinen Mediator NO mit einem vermehrten Zellwachstum, bilden verstärkt Dendriten und steigern die Melanogenese (Romero-Graillet et al., 1997).

In der frühen Evolution diente das Melanin zunächst der Tarnung und dem Schutz vor Hitze. Die Melanogenese fand extrazellulär statt. Das Melanin selbst, aber auch seine Bildung waren für die Zellen toxisch. Da die extrazelluläre Melaninsynthese in Gegenwart von Sauerstoff abläuft, entstehen Indolchinone und Wasserstoffperoxid. Diese reagieren mit verschiedenen Zellbestandteilen. So entstehen bei der Melaninbildung aus Tyrosin durch die Tyrosinase Orthochinone, die mit Amin- und Sulfatgruppen zu Chinoniminen und Sulfonen reagieren. Diese zytotoxischen Reaktionen haben in der Zelle negative Einflüsse, werden aber andererseits in Pilzen (Doering et al., 1999), Insekten und Cephalopoden (Kopffüßer) auch genutzt, um Viren und Bakterien abzuwehren. Hier kann das Melanin eine mikrobizide Funktion erfüllen (Riley, 1995).

Erst später in der sekundären Evolution wurde die Melanogenese intrazellulär in die Melanozyten verlagert. Durch die Abschirmung der zytotoxischen Zwischenprodukte der

Melaninsynthese gegenüber anderen Zellbestandteilen mit Hilfe von Zellkompartimenten konnte sich die photoprotektive Funktion des Melanins voll entfalten. Die in den Melanozyten entstehenden zytotoxischen Zwischenprodukte werden auf eine spezielle Weise entgiftet. Das gebildete Melanin reagiert in den Melanozyten mit Cystein und Glutathion zu Phäomelaninen. Diese fangen die potenzielle Toxizität der Zwischenprodukte ab. Außerdem wird die Zytotoxizität von Dopachrom durch Tautomerisierung und die der Indolchinone durch Polymerisation vermindert (Prota, 2000).

Die Regulierung der Melanogenese in den Melanozyten unterliegt der Steuerung durch Hormone (α -MSH, ACTH, cAMP) und Gene. Außerdem regulieren melanosomale Proteine die Melaninsynthese über ihre Fähigkeit, spezifisch an Melanin zu binden (Sharma et al., 2002). Glutamat steigert über die Aktivierung der Tyrosinase die Melaninsynthese. Dabei erfolgt die Signaltransduktion über die Stimulation des NMDA-Rezeptors (N-Methyl-D-aspartat) unter Beteiligung von NO und cGMP (Palumbo et al., 2000).

1.3.2. Chemie der Melanine

Chemisch werden die Melanine in die gelben bis roten Phäomelanine und die braunen bis schwarzen Eumelanine unterteilt. Der Unterschied im Aufbau der beiden Melanine besteht darin, dass die Eumelanine nur aus L-DOPA-Einheiten aufgebaut und die Phäomelanine zusätzlich mit Cysteinyll-Molekülen verknüpft sind. Im Melanozyten liegen die beiden Typen in unterschiedlichen genetisch determinierten Konzentrationsverhältnissen vor. Während die bei pH 7,4 löslichen Phäomelanine vor allem UV-B-Strahlen absorbieren, umfasst das Absorptionsspektrum der unlöslichen Eumelanine den UV-B-, UV-A- und den sichtbaren Strahlungsbereich (Jimbow et al., 1984).

Melanine sind selbst natürliche freie Radikale. Die Eumelanine absorbieren einwirkende UV-Strahlung und neutralisieren die gebildeten freien Radikale, wodurch sie die Zellen gegen die Lipidperoxidation schützen. Reaktive Sauerstoffspezies werden in einer Reaktion vom Superoxiddismutase (SOD)-Typ neutralisiert. Die SOD setzt das Superoxid-Anion ($O_2^{\bullet-}$) zu Wasserstoffperoxid (H_2O_2) um, das in einer nachfolgenden Reaktion durch Katalase zu Wasser und Sauerstoff entgiftet wird (Sealy, 1984).

Während die Eumelanine die freien Radikale stabilisieren, werden die Phäomelanine unter UV-Strahlung unter Bildung von zwei Radikalen gespalten. Die Schwefelkohlenstoffbindungen der Phäomelanine werden homolysiert, und es entstehen aus 5-S-Cysteinyldopa-Einheiten Alanyl- und Thiylradikale. Diese werden durch die Antioxidanzienwirkung der Eumelanine der Melanozyten und Keratinozyten stabilisiert. Unter Einwirkung von UV-B-Strahlung bindet 5-S-Cysteinyldopa an die DNA und induziert Strangbrüche. Aus schwach antioxidativ wirkenden Phäomelaninen werden in Gegenwart von Fe(III)-Ionen Prooxidanzien. Die löslichen Phäomelanine gelangen nach der Lyse der

Membranen in den Zellkern, wo sie Strukturen verändern. Durch diese Unterschiede in der Photochemie der Melanine erklärt sich der Unterschied zwischen der phototoxischen Wirkung der Phäomelanine und der photoprotektiven Wirkung der Eumelanine. Beim Einwirken der polychromen Strahlung des Sonnenlichtes auf den Organismus ist das Konzentrationsverhältnis der beiden Melanintypen in der Haut für die auftretenden Effekte entscheidend (Fitzpatrick u. Bologna, 1995).

Die durch UV-A-Strahlung ausgelösten prämutagenen, oxidativen DNA-Veränderungen werden durch die Melaninsynthese, aber nicht durch das Melanin gesteigert (Kvam u. Tyrell, 1999). Dagegen verursacht Melanin in Anwesenheit von Cu(II) DNA-Strangbrüche. Sowohl Melanin als auch L-DOPA bilden Superoxid-Anionen. Daher wird das L-DOPA-Cu(II)-System für die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies verantwortlich gemacht (Husain u. Hadi, 1998).

1.3.3. Partikelbildung

Die Schutzmechanismen der Melanine gegenüber dem ultravioletten Licht sind nicht nur von den chemischen Strukturen, sondern auch von den physikalischen Eigenschaften der Melanine abhängig. Die Melanine liegen in den Melanosomen als Partikel vor, deren Größe das optische Verhalten bestimmt. Haben die Melaninpartikel einen Durchmesser von über 300 nm (intakte Melanosomen) leiten sie die UV-A- und UV-B-Strahlung in der Progressionsrichtung des einfallenden Lichtes durch Streuung weiter. Haben die Melaninpartikel einen Durchmesser unter 30 nm (Staubpartikel) wirken sie vor allem absorbierend. Weist das Stratum corneum nun eine hohe Konzentration an kleinen Melaninpartikeln auf, wird das UV-Licht fast vollständig absorbiert (Cesarini, 1995).

1.3.4. Melanine in Pilzen

Melanine sind in der Natur weit verbreitet. Nicht nur im Menschen sondern auch in Pilzen und Mikroorganismen kommen als Melanine bezeichnete braune bis schwarze Pigmente vor. Pilzmelanine haben häufig eine für den Wirtsorganismus pathogene Wirkung. So kann es zu einer Vernetzung der Pilzzellwand kommen, die als Virulenzfaktor angesehen wird. Pilzmelanine können auch als Redoxsystem fungieren und mit Metallen, Arzneistoffen und extrazellulären Enzymen interagieren (Jacobson, 2000).

Am häufigsten findet man in Pilzen die DHN-Melanine (Dihydroxynaphthalen) und die DOPA-Melanine (Dihydroxyphenylalanin), deren Bildung über einen c-AMP-abhängigen Weg gesteuert wird (Langfelder et al., 2003).

Ein besonders gut erforschter Modellorganismus für die Funktion des Melanins in Pilzen stellt *Cryptococcus neoformans* dar. Der pathogene Pilz zeichnet sich dadurch aus, dass er in Gegenwart von phenolischen Substraten Melanin synthetisieren kann. Das gebildete

Melanin stellt einen Virulenzfaktor des Pilzes dar, da es verschiedene mikrobizide Proteine (Defensin, Protegrin, Magainin) binden kann. So sind die melaninhaltigen Typen des Pilzes weniger empfindlich gegen mikrobizide Peptide als die nicht-melaninhaltigen Varianten (Doering et al., 1999). Neben der Affinität gegenüber mikrobiziden Proteinen besitzt das Melanin auch die Fähigkeit, den Pilz gegen stickstoff- und sauerstoffbasierte oxidative Angriffe des Wirtsorganismus zu schützen (Wang et al., 1995). Hydroxyl-Radikale werden durch Melanin entgiftet, indem in einer gekoppelten Reaktion eine Oxidation von Fe(II) zu Fe(III) stattfindet. Der Oxidationsstatus des Melanins wird über die Oxidation des Fe(II) geregelt (Jacobson, 2000).

Die melaninabhängige Virulenz von *Cryptococcus neoformans* ist besonders gut erforscht, da die Melaninsynthese nur von einem einzigen Enzym – der Laccase – abhängig ist, das genetisch durch das CNLAC1- Gen determiniert wird (Perfect et al., 1998).

Cryptococcus neoformans ist in der Lage, unterschiedliche Substrate für die Melaninsynthese zu nutzen, so z.B. Neurocatecholamine wie Dopamin, Norepinephrin, Epinephrin. Katecholaminhaltige Gewebe werden schnell durch *Cryptococcus neoformans* infiziert.

Neben den Katecholaminen können auch andere diphenolische Verbindungen als Ausgangsstoffe der Melaninsynthese dienen. Wird der Pilz z.B. in Gegenwart von ortho-diphenolischen Substraten wie 3,4-Dihydroxyphenylalanin (L-DOPA) gezüchtet, verfärben sich die Kolonien infolge Melaninbildung braun. Der Typ des Melanins ist von den zugegebenen Substraten abhängig. Werden ortho-diphenolische Substrate mit Hydroxylgruppen in 2,3- oder 3,4-Stellung verwendet, sind die Melanine dunkel und meist mit der Zellwand verbunden. Aus para-diphenolischen Substraten mit in 1,4- oder 2,5-Stellung befindlichen Hydroxylgruppen entstehen lösliche und diffus im Medium befindliche Melanine (Chaskes u. Tyndall, 1975).

1.4. Charakterisierung der Huminsäuren

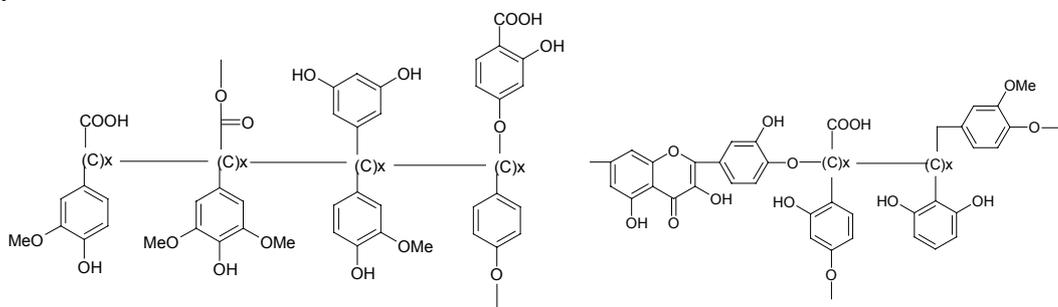
Huminsäuren sind höhermolekulare, anionische, braun bis schwarzbraun gefärbte, chemisch uneinheitlich aufgebaute Substanzen, die ubiquitär in der Umwelt vorkommen. Die organischen Komponenten des Bodens, der Moore und des Wassers bestehen vorwiegend aus degradierten pflanzlichen, zum Teil auch tierischen Materialien, die man in zwei große Gruppen einteilt – die Humusstoffe und die Nicht-Humusstoffe. Zur Charakterisierung der HS können ihre chemischen, physikalischen und pharmakologischen Eigenschaften herangezogen werden. Die HS sind negativ geladene, amorphe, hydrophile, polydisperse Substanzen, deren Molekulargewicht zwischen einigen Hundert bis zu über zehntausend Dalton liegen kann. Chemisch kann der Kohlenstoff-, Wasserstoff-, Stickstoff-, Schwefel- und Sauerstoffgehalt der HS bestimmt werden. Bei der Synthese von HS unter

ammoniakalischen Bedingungen wird Stickstoff in das Huminsäuremolekül eingebaut. Die so synthetisierten HS weisen veränderte Wirkungen auf (Witthauer u. Klöcking, 1971). Neben der elementaren Zusammensetzung haben auch die Kationen der HS einen Einfluss auf die pharmakologische Wirkung (Klöcking et al., 1968; Hübner, 2004).

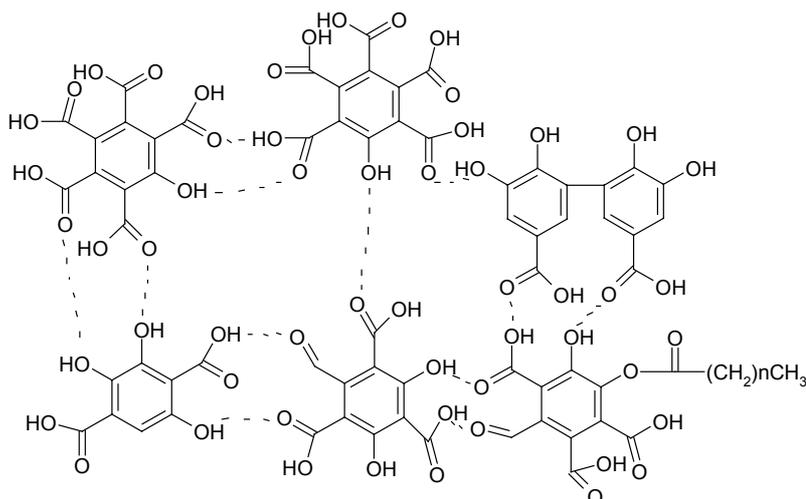
Von den vorhandenen funktionellen Gruppen spielen für die biologische Wirkung vor allem sauerstoffhaltige funktionelle Gruppen, wie die Carboxyl-, Hydroxyl- und Carbonylgruppen, eine Rolle. Sie können sowohl an die phenolischen Grundkörper der HS gebunden oder in der Seitenkette enthalten sein (Choudhry, 1984a).

Die folgende Abbildung zeigt 3 verschiedene HS-Modelle, in denen die typischen Strukturelemente enthalten sind.

A



B



C

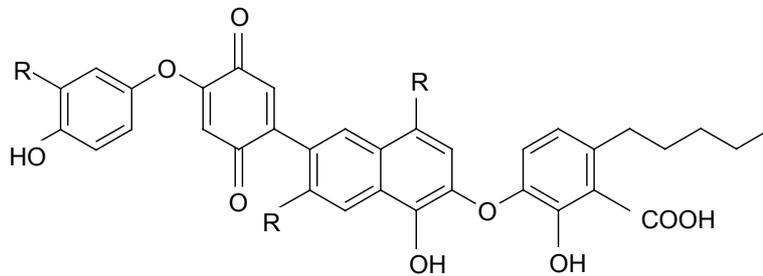


Abb. 4: Verschiedene Modelle der chemischen Strukturen von Humin- und Fulvosäuren

A) nach Christman und Ghassemi (1966)

B) nach Schnitzer (1978)

C) nach Riede (1992)

Die HS zeigen im sichtbaren Spektralbereich von 400 bis 800 nm und im ultravioletten Bereich von 200 bis 400 nm ein uncharakteristisches Absorptionsspektrum. Die Extinktion nimmt vom kurz- zum langwelligem Spektralbereich nahezu kontinuierlich ab. Sowohl die in basischen als auch die in neutralen wässrigen Lösungen der HS aufgenommenen Absorptionsspektren zeigen kaum Maxima oder Minima. Die optische Dichte nimmt mit steigender Wellenlänge ab (Schnitzer, 1978; Schnitzer u. Khan, 1972).

HS mit einem höheren Anteil an aromatischen Ringen haben eine höhere spezifische Absorption als HS mit vorherrschend aliphatischen Strukturen (Kononowa, 1966).

Die grüne Fraktion der p-Typ-HS (p-Typ = p-type = positive charge) besitzt im Bereich von 260 bis 320 nm ein Absorptionsmaximum (Sato u. Kumada, 1967). Unter der Einwirkung von UV-Licht ist bei einigen HS eine Fluoreszenz zu beobachten (Choudhry, 1984a).

HS enthalten freie Radikale. Diese entstehen z.B. bei Polymerisations- oder Depolymerisationsreaktionen und bei Reaktionen mit organischen Molekülen (Schnitzer, 1978).

Die Stabilität der freien Radikale in den HS wird mit Hilfe der Strukturen erklärt. Aus den enthaltenen Semiquinonen werden durch Dehydratation Chinone gebildet (Rex, 1960). In den HS liegen zwei Typen von Radikalen vor – der Semichinon-Typ und der Chinhydron-Typ (Steelink u. Tollin, 1962).

HS besitzen vielfältige pharmakologische Wirkungen. Die viruzide Wirkung der HS im Torfmüll zur Bekämpfung des Maul- und Klauenseuche-Virus beschrieb Schultz (1962).

Untersuchungen zur antiviralen Wirksamkeit der HS beschrieben Klöcking und Sprössig (1972) und die der phenolischen Polymere vom HS-Typ gegen Herpes-simplex-Virus Typ 1 Helbig et al. (1997) und Klöcking et al. (2002). HS besitzen antiphlogistische Wirksamkeit (Klöcking et al., 1968) – nachgewiesen am Rattenpfotenödem. Im Tierversuch an kastrierten weiblichen ICR-Mäusen erwiesen sich einige HS als östrogen wirksam (Klöcking et al. 1992). HS hemmen die Thrombinwirkung und die Thrombinbildung, wodurch sie blutgerinnungshemmend wirken (Mahr, 2003).

Weiterhin besitzen HS eine desmutagene Wirkung (Sato et al., 1987). Bei Behandlung von Chinesischen Hamster-Ovarialzellen mit den mutagenen Mitomycin C und Maleinhydrazid zeigen HS eher desmutagene als antimutagene Wirkung, d.h. sie binden die Mutagene, so dass diese ihre mutagene Wirkung nicht ausüben können (Cozzi et al., 1992).

Die Kollagen-stabilisierende Wirkung der HS zeigt sich, wenn Kollagen in HS-Lösung gegeben wird, wodurch Schwellungen verhindert werden. Die Zunahme der mechanischen Beanspruchbarkeit des Kollagens wird mit einer Gerbwirkung erklärt (Riede et al., 1992).

HS sind befähigt, in humanen Endothelzellen Apoptose auszulösen. Dies könnte eine Erklärung für das Auftreten der Blackfoot Disease (BFD) sein. Die BFD ist eine periphere, arterielle, okklusive Beinerkkrankung, die unter den Einwohnern der Südwestküste Taiwans auftritt. Es wird postuliert, dass an der Ätiologie der BFD die im taiwanesischen Brunnenwasser vorkommenden HS beteiligt sind (Hseu et al., 2002).

1.5. Aufgabenstellung

In einer von Klöcking et al. (2003) publizierten Studie wurde die protektive Wirkung von natürlichen Moorwasser-HS und einigen synthetischen HS-ähnlichen Polymeren gegenüber UV-B-bedingten Strahlenschäden an U937-Zellen nachgewiesen.

Parallel hierzu und teilweise aufbauend auf diesen Ergebnissen war es die Aufgabe der vorliegenden Arbeit, den Mechanismus der UV-B-protektiven Wirkung von HS und synthetischen HS-ähnlichen Polymeren an der humanen promonozytären Zelllinie U937 zu untersuchen. Zu diesem Zweck werden die HS-ähnlichen Polymere Hydrokaffeesäure-Oxidationsprodukt (HYKOP), DOPA-Oxidationsprodukt (DOPA-OP) und die Natrium-, Kalium- und Ammoniumsalze des Kaffeesäure-Oxidationsproduktes (Na-KOP, K-KOP, NH₄-KOP) mittels Periodatoxidation (Helbig u. Klöcking, 1983) synthetisiert.

Durch Variation der Versuchsanordnungen wird die UV-B-protektive Wirkung und deren Mechanismus untersucht. Im Vergleich zu den HS-ähnlichen Polymeren werden auch die natürlichen HS Na-humat, NH₄-humat, die HS Aldrich und drei HS aus dem Alteicher Moor hinsichtlich ihrer UV-B-protektiven Wirkung getestet. Die beiden HS-Salze Na-humat und NH₄-humat stammen aus einem Küstenhochmoor (Regenmoor) auf der Halbinsel Darß. Das

Altteicher Moor ist ein in der Nähe von Weißwasser gelegenes Niedermoor. Die HS Aldrich wird aus Braunkohle gewonnen. Als UV-B-protective Referenzsubstanz wird die Paraaminobenzoessäure verwendet.

Zur Klassifizierung der UV-B-protectiven Wirkung und zur Bestimmung der Zytotoxizität dient der XTT-Tetrazoliumreduktionstest EZ4U. Um zwischen einer physikalischen, einer chemischen, einer pharmakologischen und/oder zytotoxischen Wirkung der Testsubstanzen unterscheiden zu können, werden Cytomorph[®]-b-Mikrotestplatten als Reaktions- und Messgefäße verwendet. Durch den speziellen Aufbau der Cytomorph[®]-b-Mikrotestplatten ist es möglich, die UV-B-protectiven Wirkung der HS in direktem Kontakt mit den Zellen und getrennt von diesen zu untersuchen.

Die chemische UV-B-Schutzwirkung ist auf die Absorption der UV-B-Strahlung zurückzuführen. Die physikalische UV-B-Protectio n wird durch Streuung und Reflexion des UV-B-Lichtes hervorgerufen. Als Ausdruck einer pharmakologischen Wirkung könnten die HS beispielsweise als Radikalfänger oder als Antioxidanzien fungieren. Einen pharmakologischen Erklärungsansatz stellen auch die antientzündlichen und membranstabilisierenden Eigenschaften der HS dar. Außerdem ist eine Beeinflussung von protectiven Enzymen (Superoxid-Dismutase, Katalase) denkbar (Punnonen et al., 1991a).

Im nachfolgenden Kapitel werden die zur Bestimmung der UV-B-protectiven Wirkung verwendeten Materialien und Methoden beschrieben. Danach folgt die Darstellung der UV-B-protectiven Wirkungen der HS und die Berechnung der relativen UV-B-protectiven Wirkungen. Im abschließenden Kapitel werden die gefundenen Ergebnisse anhand der vorliegenden Literatur diskutiert.

2. Materialien und Methoden

2.1. Prüfsubstanzen

2.1.1. Synthetisierte Huminsäuren

Zur Herstellung der verschiedenen Salze des Kaffeesäure-Oxidationsproduktes (KOP), des DOPA-Oxidationsproduktes (DOPA-OP) und des Hydrokaffeesäure-Oxidationsproduktes (HYKOP) werden die monomeren Ausgangssubstanzen mit Natriummetaperiodat oder Periodsäure in einem alkalischen Milieu polymerisiert. Dabei entstehen braun gefärbte, hochmolekulare, wasserlösliche HS, die nach ihren Ausgangsstoffen, ihren Synthesebedingungen und ihrem Molekulargewicht charakterisiert werden können. Die Synthesevorschrift wurde von Helbig und Klöcking (1983) entwickelt. Werden die Ausgangsverbindungen in ein alkalisches Milieu gegeben, entstehen zunächst fluoreszierende Verbindungen. Die Lösungen verfärben sich über gelb, nach grün-braun bis dunkelbraun (Hänninen et al., 1987). Die Phenolkörperpolymerisate stellen Modellsubstanzen für die natürlichen HS dar. Sie werden unter definierten Bedingungen hergestellt. Klöcking et al. (1983) charakterisierten die Phenolkörperpolymerisate hinsichtlich ihrer chemischen und physikalischen Eigenschaften. Man kann die Substanzen mittels Elementaranalyse, über ihr mittleres Molekulargewicht, die Anzahl ihrer sauren Gruppen, mit Hilfe des reduktiven Abbaus, anhand der IR-Spektren und der ^{13}C -NMR-Spektren beschreiben.

Synthese von Na-KOP: 1,8 g (0,01 Mol) Kaffeesäure werden mit 0,6 g Natriummetaperiodat in 500 ml Aqua gelöst, mit 15 ml 1 M Natriumhydroxid-Lösung versetzt und der pH-Wert auf 8-9 eingestellt. Anschließend erwärmt man für 1 h auf 50°C im Wasserbad unter Luftabschluss und lässt die Lösung über Nacht stehen. Die Lösung wird auf ein Volumen von ca. 5 ml eingengt und mit 96 %igem Ethanol ausgefällt. Der Niederschlag wird abfiltriert, mit Ethanol gewaschen und getrocknet.

Kaffeesäure + Natriummetaperiodat \rightarrow Kaffeesäureoxidationsprodukt, Natrium-Salz

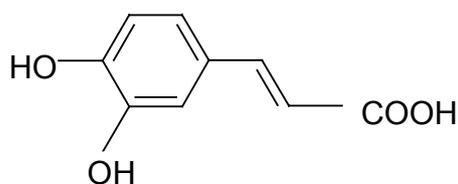


Abb. 5: Kaffeesäure (3,4-Dihydroxycimtsäure) als monomere Ausgangsverbindung für die Synthese der verschiedenen Salze von KOP

In der Abbildung 6 sind die möglichen bei der Synthese von KOP vorkommenden Übergangsverbindungen dargestellt. Kaffeesäure ist unter alkalischen Bedingungen deprotoniert.

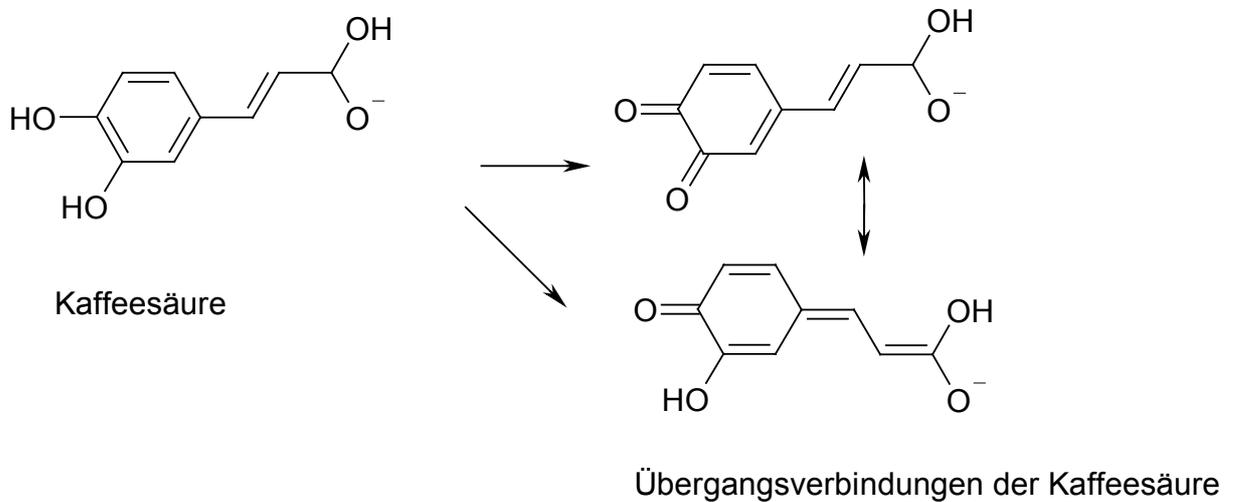


Abb. 6: Kaffeesäure und ihre Übergangsverbindungen bei der Synthese von KOP

Ferne Korn (1988) untersuchte die spektralen Eigenschaften des KOP und fand eine Abnahme der Extinktion mit zunehmender Wellenlänge. Das UV-VIS-Spektrum der Kaffeesäure weist bei 300 nm und 345 nm Maxima auf.

Synthese von K-KOP: Die Herstellung des Kalium-Salzes des KOP erfolgt mit Periodsäure anstelle des Natriummetaperiodates und mit 1 M Kaliumhydroxid-Lösung anstelle der Natriumhydroxid-Lösung. Die anderen Herstellungsschritte verlaufen analog der Synthese des Natriumsalzes.

Kaffeesäure + Periodsäure → Kaffeesäureoxidaionsprodukt, Kalium-Salz

Synthese des NH₄-KOP: Die Herstellung erfolgt wiederum analog zur Herstellung des Na-KOP aber mit Periodsäure anstelle des Natriummetaperiodates und Ammoniak statt der Natriumhydroxid-Lösung zur Alkalisierung.

Kaffeesäure + Periodsäure → Kaffeesäureoxidaionsprodukt, Ammonium-Salz

Synthese von Ca-KOP: Bei der Herstellung wird Periodsäure und Calciumhydroxid-Lösung verwendet. Die restlichen Schritte werden wie beim Na-KOP durchgeführt. Das Calcium-Salz ist schwer wasserlöslich, weswegen die Zytotoxizitätsuntersuchungen und die Bestimmung der UV-B-protaktiven Wirkung nicht erfolgen konnte.

Kaffeesäure + Periodsäure → Kaffeesäureoxidaionsprodukt, Calcium-Salz

In der Abbildung 7 sind Reaktionsschritte dargestellt, wie sie möglicherweise bei der Bildung von KOP ablaufen.

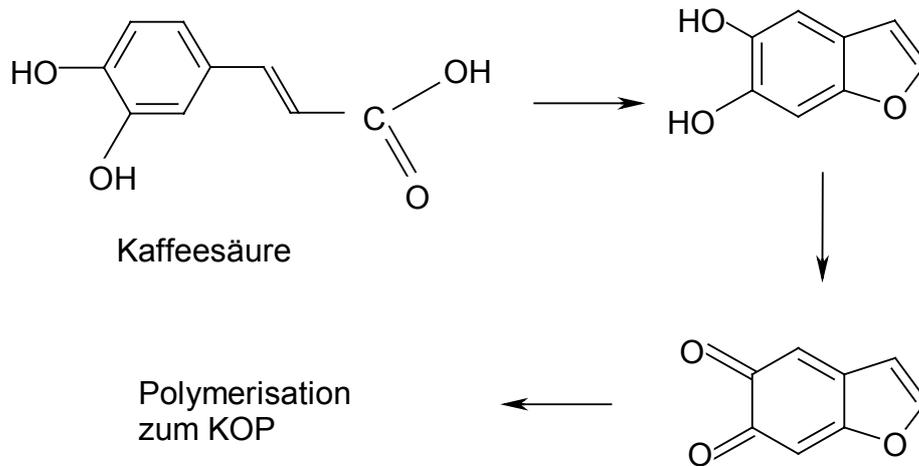


Abb. 7: Mögliche Reaktionsschritte bei der Oxidation der Kaffeensäure

Synthese von DOPA-OP: Bei der Synthese des DOPA-OP wird als Ausgangssubstanz DOPA (Dihydroxyphenylalanin) verwendet. Es werden 2,0 g DOPA unter Verwendung von 0,6 g Natriummetaperiodat und 1 M Natriumhydroxid-Lösung nach der gleichen Synthesevorschrift wie die Kaffeensäure polymerisiert. Man erhält also das Natriumsalz von DOPA-OP.

DOPA + Natriummetaperiodat → DOPA-Oxidationsprodukt, Natrium-Salz

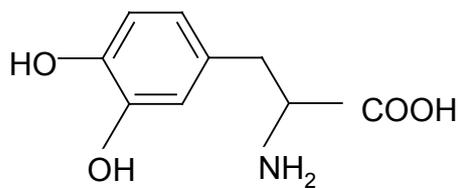


Abb. 8: DOPA (Dihydroxyphenylalanin) als monomere Ausgangsverbindung für die Synthese des DOPA-OP

Synthese von HYKOP: Man oxidiert 1,8 g Hydrokaffeensäure mit 0,6 g Natriummetaperiodat und einem mit 1 M Natriumhydroxid-Lösung eingestelltem pH-Wert von 9 wiederum nach der gleichen Vorschrift wie die Kaffeensäure und erhält das Natrium-Salz von HYKOP.

Hydrokaffeensäure + Natriummetaperiodat → Hydrokaffeensäureoxidationsprodukt, Natrium-Salz

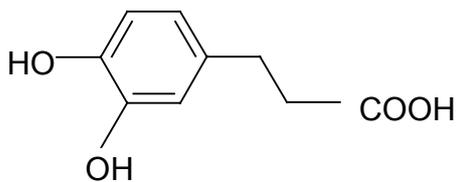


Abb. 9: Hydrokaffeesäure (3,4-Dihydroxyhydrozimtsäure) als monomere Ausgangsverbindung für die Synthese des HYKOP

Die drei verwendeten Ausgangsverbindungen haben gleiche chemische Grundgerüste und unterscheiden sich nur in der Seitenkette voneinander. Hydrokaffeesäure ist die reduzierte Form der Kaffeesäure, und DOPA ist die entsprechende Aminosäure zu den beiden Verbindungen. Als gleiche Strukturen sind der aromatische Ring mit den beiden ortho-ständigen Hydroxylgruppen und die Seitenkette bestehend aus drei C-Atomen anzusehen.

Zur Überprüfung, ob die synthetisierten HS noch monomere Ausgangssubstanzen enthalten, wird eine Dünnschichtchromatographie durchgeführt. Als Fließmittel wird ein Gemisch bestehend aus Toluol 6 Teile, Ethylacetat 1 Teil, Ethanol 3 Teile und für DOPA Butanol 7 Teile, Essigsäure 1,5 Teile, Wasser 1,5 Teile verwendet. Kaffeesäure, Hydrokaffeesäure und DOPA wandern auf der DC-Platte nach oben und können mit einem DC-Sprühreagenz bestehend aus diazotierter Sulfanilsäure und p-Nitranilin sichtbar gemacht werden. Man erkennt die Substanzen auf der DC-Platte aber auch unter einer UV-Lampe, weil die verwendeten DC-Platten einen Fluoreszenzindikator enthalten. Die DC muss unter Lichtausschluss erfolgen, da die Substanzen bereits unter DC-Bedingungen polymerisieren. Zur Kontrolle werden die Vergleichssubstanzen aufgetragen. Es sind keine monomeren Verbindungen mehr nachweisbar.

Die meisten natürlich vorkommenden HS haben einen mehr oder weniger großen Anteil an fluoreszierenden Verbindungen. Auch bei der Synthese unserer HS kann bei der Polymerisation bei der Betrachtung unter UV-Licht und z.T. bereits bei Tageslicht eine grüne Fluoreszenz nachgewiesen werden. Setzt man einer schwach alkalischen Lösung von Kaffeesäure einige Tropfen 30 %ige Wasserstoffperoxid-Lösung zu, färbt sich die Lösung innerhalb weniger Sekunden gelb bis bräunlich an. Diese Lösung fluoresziert unter UV-Licht. Die fluoreszierenden Verbindungen bei der Synthese der HS sind wahrscheinlich auf die chinoiden Übergangsverbindungen zurückzuführen. Die aromatischen phenolischen Ausgangsverbindungen besitzen je zwei ortho-ständige Hydroxylgruppen, die leicht eine chinoide Struktur unter oxidativem Einfluss ausbilden können.

In der Natur kommen auch sogenannte grüne HS vor, die durch ihre Absorptionskurve klassifiziert werden können. In podsoligen Böden, auf den Britischen Inseln und in alpinen Böden sind diese „P-Typen“ vorhanden, die sich durch ein grünes Pigment auszeichnen. Dieses Pigment kann chromatographisch getrennt werden und wird als ein Chinon angesehen (Kumada u. Hurst, 1967).

Herstellung von DOPA-OP_{Luft}: 2,0 g DOPA werden abgewogen und mit 1 M Natriumhydroxid-Lösung auf einen pH-Wert von 9 eingestellt. Man erwärmt die Lösung 1 h lang im Wasserbad auf 50°C und lässt die Lösung für weitere 48 h an der Luft stehen. Die Lösung wird dann auf ein Volumen von ca. 5 ml eingengt und die HS mit Ethanol ausgefällt. Der Rückstand wird noch einmal mit Ethanol gewaschen und getrocknet.

2.1.2. Natürliche Huminsäuren

Huminsäuren aus dem Alteicher Moor

Das Alteicher Moor ist ein bei Bad Muskau/Weißwasser in Niederschlesien gelegenes Naturmoor. Das Naturmoor ist ein Endprodukt eines natürlichen, über viele hunderte bis tausende Jahre ablaufenden Umwandlungsprozesses von Pflanzen unter Luftabschluss. Bei den Mooren unterscheidet man zwei Haupttypen, das Hochmoor und das Niedermoor. Beim Hochmoor wird das zur Bildung notwendige Wasser nur durch den Regen oder Tau eingespeist, während das Niedermoor aus Boden-, Oberflächen- oder Grundwasser gebildet wird. Die Wasserqualitäten und -dynamik bestimmen maßgeblich die Vegetation im Moor und die Torfbildung. In vielen volkstümlichen Überlieferungen wird die heilsame Wirkung des Moores beschrieben. Naturmoor wird seit über 150 Jahren in Form von Bädern in Kureinrichtungen angewandt. Das Alteicher Moor wird zur Linderung von rheumatischen und Hautbeschwerden, zur Schmerzlinderung, zur Durchblutungsförderung und aufgrund der desodorierenden Wirkung in Kurbädern eingesetzt. Hierzu gehören die Kurbäder in Bad Düben, in Bad Liebenwerda, in Bad Muskau, in Bad Schandau und Bad Schmiedeberg. Die beschriebenen Wirkungen lassen sich auf die enthaltenen Huminstoffe zurückführen. Der Torf enthält als feste Bestandteile neben HS, die in einer Konzentration von ca. 5 % enthalten sind, noch Mineralstoffe und organische Substanzen. Zu den Mineralien gehören z.B. Natrium, Kalium, Calcium, Magnesium, Eisen, Mangan, Aluminium, Silikat, Sulfat, Chlorid und Phosphat. Zu den organischen Stoffen gehören Pektine, Cellulosen und Lignine.

HS Alteicher Moor I ist eine schwarz gefärbte HS, die durch Alkalisierung und Ansäuerung des Moores mit Natriumhydroxid-Lösung und Salzsäure ausgefällt und danach bei 60°C getrocknet wurde. Nach der Fällung fanden keine weiteren Aufbereitungsschritte statt.

HS Alteicher Moor II ist eine braune HS, die zunächst in der gleichen Weise wie die HS Alteicher Moor I durch Base-Säure-Behandlung ausgefällt, aber anschließend weiter aufbereitet wurde.

Die Isolierung und Aufbereitung der HS Alteicher Moor I und II fand im Jahre 2002 im Rahmen einer Diplomarbeit (Kirsch, 2002) statt.

HS Alteicher Moor III ist eine sehr dunkel, fast schwarz gefärbte HS, die ebenfalls durch eine Base-Säure-Behandlung isoliert und dann weiter aufbereitet wurde (Liers, 2002).

Huminsäuren aus einem Naturmoor bei Dierhagen

Die HS Natriumhumat (Na-humat) und Ammoniumhumat (NH₄-humat) entstammen dem Küstenhochmoor bei Dierhagen-Neuhaus im Kreis Ribnitz-Damgarten auf der Halbinsel Darß in Mecklenburg-Vorpommern. Beide HS wurden nach einer von Klöcking et al. (1977) beschriebenen Methode am Institut für Medizinische Mikrobiologie der Medizinischen Akademie Erfurt isoliert.

Na-humat: Charge: Moorwasser-HS I – IV/1980 Dr. He., MG 10100 Dalton

Na-humat ist eine hellbraune, wasserlösliche HS.

NH₄-humat: Charge: Moorwasser-HS I – X/1979 Dr. He., MG 7500 Dalton

NH₄-humat ist eine braune, wasserlösliche HS.

Bei der reduktiven Aufspaltung mit Amalgam konnten Helbig et al. (1985) nachweisen, dass NH₄-humat und Na-humat die Verbindungen Phloroglucin, α -Resorcyssäure, Resorcin und β -Resorcyssäure liefern. Die reduktiv aufgespaltenen HS wurden bereits im Jahr 1976 nach der gleichen Vorschrift wie die von uns verwendeten isoliert. Fernekorn (1988) zeigte, dass die Extinktion von Na-humat mit zunehmender Wellenlänge abnimmt.

Huminsäure aus Braunkohle

Zusätzlich wurde eine natürlich gewonnene HS untersucht, die käuflich von der Sigma Aldrich Chemie GmbH, D-89555 Steinheim, erworben wurde.

HS Aldrich: Catalog. No: HI,675-2, Lot: 31620-099

Die HS Aldrich ist eine dunkelbraun gefärbte, wasserlösliche HS, die aus Braunkohle isoliert wurde. In Wasser gelöst, ergibt sie keine klare durchsichtige, sondern eine trübe, aufgeschlemmte Lösung.

2.1.3. Herstellung der Untersuchungslösungen der natürlichen und synthetischen Huminsäuren

In den Versuchen wurde eine Lösung der HS verwendet, die wie im folgenden beschrieben hergestellt wurde. 10 mg des jeweiligen HS-Präparates wurden im Mörser fein zerrieben, mit 2,0 ml 0,05 M NaOH versetzt und stehen gelassen, bis sich die HS nahezu vollständig gelöst hatte. Anschließend versetzt man die Lösung mit weiteren 0,5 ml 0,05 M NaOH und füllt mit RPMI-Medium auf 10 ml auf. Beim unvollständigen Lösen der HS wird die Lösung zum Abtrennen von unlöslichen Partikeln 5 min lang bei 1500 U/min zentrifugiert und der klare Überstand zur Herstellung der Verdünnungsreihe genutzt. Diese wird im Sinne einer geometrischen Reihe mit 6 verschiedenen Untersuchungskonzentrationen pipettiert.

Werden die HS in farblosem RPMI in einer Konzentration von 1 mg/ml gelöst und der pH-Wert mittels Indikatorpapier überprüft, ergeben sich die in der nachfolgenden Tabelle charakterisierten Lösungen (Tab. 1). Der saure pH-Wert der HS wird durch das RPMI-Medium abgepuffert. Ein pH-Wert im physiologischen Bereich ist notwendig, um eine säure- oder alkalibedingte Schädigung der U937-Zellen während der Exposition zu vermeiden.

Tabelle 1: Charakterisierung der aus den natürlichen und synthetischen Huminsäuren hergestellten Testlösungen bei einer Konzentration von 1 mg/ml in RPMI

Huminsäure	Charakterisierung der Testlösungen
HS Aldrich	<ul style="list-style-type: none"> • trübe Lösung, milchig oder kreidig, braun, undurchsichtig • bei einer Konzentration von 1 mg/ml dunkelbraun gefärbt • pH-Wert von 7-8
NH₄-humat	<ul style="list-style-type: none"> • klare, durchsichtige Lösung • bei einer Konzentration von 1 mg/ml dunkelbraun gefärbt, schimmert rotbraun • pH-Wert von 7-8
Na-humat	<ul style="list-style-type: none"> • klare, durchsichtige Lösung • bei einer Konzentration von 1 mg/ml braun gefärbt, aber heller als die von NH₄-humat, rötlich braun • pH-Wert von 7-8
HYKOP	<ul style="list-style-type: none"> • klare, durchsichtige Lösung • bei einer Konzentration von 1 mg/ml braun gefärbt • pH-Wert von 7-8
K-KOP	<ul style="list-style-type: none"> • klare, durchsichtige Lösung • bei einer Konzentration von 1 mg/ml braun gefärbt • pH-Wert von 7-8
NH₄-KOP	<ul style="list-style-type: none"> • klare, durchsichtige Lösung • bei einer Konzentration von 1 mg/ml leicht braun bis gelbbraun gefärbt • pH-Wert von 7-8
Na-KOP	<ul style="list-style-type: none"> • klare, durchsichtige Lösung • bei einer Konzentration von 1mg/ml dunkelbraun, intensiv gefärbt • pH-Wert von 7-8

HS Alteicher Moor I HS Alteicher Moor II HS Alteicher Moor III	<ul style="list-style-type: none"> • klare, durchsichtige Lösung • bei einer Konzentration von 1 mg/ml dunkelbraun gefärbt • nur unvollständig gelöst, es bleiben einige ungelöste Partikel zurück, die einen Anteil von 1 bis 2 % ausmachen • pH-Wert 7-8 • es sind keine Lösungsunterschiede zwischen den 3 verschiedenen Aufbereitungsformen festzustellen
DOPA-OP	<ul style="list-style-type: none"> • klare, durchsichtige Lösung • bei einer Konzentration von 1 mg/ml dunkelbraun gefärbt • pH-Wert von 7-8

2.1.4. Paraaminobenzoesäure (PABA) – ein UV-B-Lichtschutzfilter

Paraaminobenzoesäure (4-Aminobenzoesäure, PABA) ist eine UV-B-protective Substanz, die laut Kosmetikverordnung als UV-Filter mit einer zulässigen Höchstkonzentration von 5 % in kosmetischen Mitteln eingesetzt werden darf. Sie wurde als Referenzsubstanz für die UV-B-protective Wirkung ausgewählt, weil sie eine gute Löslichkeit im Versuchsmedium besitzt, selbst keine störende Eigenfärbung aufweist und strukturelle Gemeinsamkeiten mit den monomeren Ausgangsverbindungen unserer synthetischen HS aufweist. Physiologisch greift PABA in den Zellstoffwechsel und dort speziell in den Folsäurestoffwechsel ein. In Bakterien wirkt PABA als Coenzym bei der Folsäuresynthese. Säugetiere nehmen die Folsäure mit der Nahrung auf, da sie nicht befähigt sind, Folsäure selbst zu synthetisieren. Bei einem Mangel an PABA treten Ekzeme auf. PABA ist in verschiedenen Nahrungsmitteln, wie z.B. in Leber, Bierhefe, Nieren, Vollkorn, Reis, Kleie, Weizenkeimen, schwarzer Melasse und Milch enthalten.

PABA [4-Aminobenzoesäure]

$C_7H_7NO_2$ MG 137,1 g/mol

Merck Darmstadt

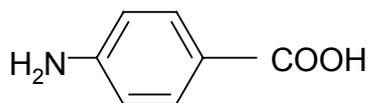


Abb.10: Paraaminobenzoesäure (4-Aminobenzoesäure, PABA) als Referenzsubstanz für die UV-B-protective Wirkung

2.1.5. Kaffeesäure, Hydrokaffeesäure, Dihydroxyphenylalanin (DOPA)

Zur Herstellung der synthetisierten HS wurden die Substanzen Kaffeesäure (Abb. 5), Hydrokaffeesäure (Abb. 9) und DOPA (Abb. 8) verwendet. Diese beginnen in Lösung z.T. von selbst zu polymerisieren, was sich an einer gelblichen, rötlichen oder bräunlichen Verfärbung der Lösungen erkennen lässt. Kaffeesäure und Hydrokaffeesäure kommen als

sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe vor. So ist z.B. im gerösteten Kaffee Coffein an Chlorogensäure gebunden, die sich wiederum aus je einem Molekül Chinasäure und Kaffeesäure zusammensetzt. Pharmakologisch wird die Chlorogensäure beim Kaffeegenuss für das Aufstoßen, eventuelle Durchfälle, Spasmen und eine gesteigerte Säurebildung im Magen verantwortlich gemacht. Kaffeesäure ist eine Dihydroxizimtsäure, eine Bezeichnung, die auf ihr Vorkommen in der Zimtrinde hinweist. Hier tritt sie zusammen mit strukturell ähnlichen Verbindungen, wie z.B. Zimtaldehyd, Zimtalkohol, Hydrokaffeesäure u.a. Hydroxizimtsäuren auf. Kaffeesäure und auch die methoxylierte Kaffeesäure (Ferulasäure) wirken antkarzinogen, indem sie die Karzinogenbildung aus Vorläuferzellen und Karzinogenreaktionen mit zellulären Molekülen verhindern.

DOPA ist die Ausgangsverbindung für die in der menschlichen Haut ablaufende Melaninbildung. DOPA entsteht aus der Aminosäure Tyrosin durch das Anhängen einer Hydroxylgruppe durch die Tyrosinase (Karlson et al., 1994).

Kaffeesäure [3,4-Dihydroxizimtsäure]

$C_9H_6O_4$ MG 180,2 g/mol

Serva (Feinbiochemica Heidelberg)

Hydrokaffeesäure [3,4-Dihydroxyhydroxizimtsäure; 3-(3,4-Dihydroxyphenyl-)propionsäure]

$C_9H_{10}O_4$ MG 182,2 g/mol

Serva (Feinbiochemica Heidelberg)

DOPA [3-(3,4-Dihydroxyphenyl-)alanin]

$C_9H_{11}O_4N$ MG 197,2 g/mol

Merck (Darmstadt)

2.2. Zellen

2.2.1. Zellkultur

Zur Bestimmung der Zytotoxizität und der UV-B-protektiven Wirkung werden die humanen U937-Zellen (ATCC, CRL 1593) verwendet. U937-Zellen sind eine Suspensionszellkultur mit monozytären Eigenschaften, die einem malignen Pleuraerguss eines 37-jährigen Mannes mit einem diffusen histiozytären Lymphom entstammen und seitdem kontinuierlich weitervermehrt werden. Diese humane Zelllinie wurde 1974 von Sundström und Nilsson eingeführt. Zur Aufbewahrung über einen Zeitraum von mehreren Wochen oder Monaten können sie tiefgefroren werden. Die Zellen wurden vom Institut für Physiologische Chemie der Universität Mainz, Abteilung für Angewandte Molekularbiologie (Prof. Dr. W.E.G. Müller) vor einigen Jahren übernommen.

2.2.2. Zellzüchtung

Die U937-Zellen werden in rotem RPMI 1640, das mit 10 % fetalem, hitzeinaktiviertem Kälberserum (FCS) versetzt wird, in Schräghalszellkulturflaschen (250 ml Volumen, 75 cm² Wachstumsfläche) kultiviert. Die Züchtung findet in einer humiden, 5 % CO₂-enthaltenden Atmosphäre bei einer Temperatur von 37°C statt. Die U937-Zellen können in Abhängigkeit von den Ansatzbedingungen nach 2*, 3** oder 5*** Tagen geerntet werden. Dabei wird unter dem Mikroskop der Proliferationsgrad und die Zelldichte beurteilt und nach dem folgenden Pipettierschema unter aseptischen Bedingungen umgesetzt.

* 1:3.....10 ml U937-Zellen + 17 ml farbloses RPMI 1640 + 3 ml FCS

** 1:5.....6 ml U937-Zellen + 21 ml farbloses RPMI 1640 + 3 ml FCS

*** 1:10.....3 ml U937-Zellen + 24 ml farbloses RPMI 1640 + 3 ml FCS

2.3. Chemikalien und weitere Geräte

2.3.1. Materialien zur Herstellung der synthetischen Huminsäuren

- Periodsäure (H₅IO₆) (Merck, Darmstadt)
- Natriummetaperiodat (NaIO₄) (Merck, Darmstadt)
- 1 M Natriumhydroxid-Lösung (NaOH) (Krankenhaus-Apotheke, Vogtland-Klinikum Plauen)
- 1 M Kaliumhydroxid-Lösung (KOH) (Krankenhaus-Apotheke, Vogtland-Klinikum Plauen)
- Ammoniak 25 % (NH₃) (Krankenhaus-Apotheke, Vogtland-Klinikum Plauen)
- Calciumhydroxid-Lösung, gesättigt [Ca(OH)₂] (Krankenhaus-Apotheke, Vogtland-Klinikum Plauen)
- 10 %ige und 30 %ige Wasserstoffperoxid-Lösung (H₂O₂) (Krankenhaus-Apotheke, Vogtland-Klinikum Plauen)
- Ethanol, rein (Merck, Darmstadt)
- 500 ml Glasflaschen, hydrolytische Klasse 1 (Krankenhaus-Apotheke, Vogtland-Klinikum Plauen)
- Thermometer (Krankenhaus-Apotheke, Vogtland-Klinikum Plauen)
- Laborwaagen (Krankenhaus-Apotheke, Vogtland-Klinikum Plauen)
- Kammer für die Dünnschichtchromatographie (Krankenhaus-Apotheke, Vogtland-Klinikum Plauen)
- Dünnschichtchromatographie-Alufolie 20 x 20 cm Kieselgel 60 F₂₅₄ (Merck, Darmstadt)
- UV-Lampe 254 nm für die Dünnschichtchromatographie (Merck, Darmstadt)

- Fließmittel: Toluol, Ethylacetat, Ethanol, Butanol, Essigsäure (Krankenhaus-Apotheke, Vogtland-Klinikum Plauen)
- Sprühreagenz für die Dünnschichtchromatographie: diazotierte Sulfanilsäure, p-Nitranilin (Krankenhaus-Apotheke, Vogtland-Klinikum Plauen)
- pH-Meter CG 840 (Schott-Geräte GmbH, Hofheim am Ts.)
- Indikatorpapier (Merck, Darmstadt)

2.3.2. Materialien für die Zellzucht und zur Versuchsdurchführung

- RPMI-Medium 1640, farblos, ohne Indikator, ohne L-Glutamin (Invitrogen GmbH, Karlsruhe)
- RPMI-Medium 1640, rot, mit Indikator, mit L-Glutamin (Invitrogen GmbH, Karlsruhe)
- Fetales Bovines Serum (FCS) (Biochrom AG seromed[®], Berlin)
- XTT-Tetrazoliumreduktionstest EZ4U (Biomedica Medizinprodukte GmbH & Co KG, Wien)
- Auslaufpipetten, wattiert, steril, 5 und 10 ml (Greiner Labortechnik GmbH, Frickenhausen)
- Rundbodenröhrchen aus Polystyren, 17x100 mm, 14 ml (Becton-Dickinson, Meylan Cedex, F)
- Cytomorph[®]-b-Mikrotiterplatten (nerbe plus GmbH, Winsen/ Luhe)
- Schrāghalszellkulturflaschen, 50 ml, 250 ml (Becton-Dickinson, England)
- Zentrifugenröhrchen aus Polystyrol, 17x120 mm, 15 ml (Becton-Dickinson, Meylan Cedex, F)
- Pipettenspitzen 10 µl, 100 µl, 1 ml (Eppendorf GmbH, Hamburg)
- UV-B-Quelle: dermalight 80 (Dr. Hönle Medizintechnik GmbH, Kaufering)
- Stoppuhr (Krankenhaus-Apotheke, Vogtland-Klinikum Plauen)
- Schutzbrille (Krankenhaus-Apotheke, Vogtland-Klinikum Plauen)
- Silberpapier (Krankenhaus-Apotheke, Vogtland-Klinikum Plauen)
- Zellkulturflaschen mit Schrāghals und blauer selbstabdichtender Schraubkappe, 50 ml Volumen, 25 cm² Wachstumsfläche (Becton Dickinson Labware, England)
- Megafuge 1.0R (Heraeus Holding GmbH, Hanau)
- Begasungsbrutschrank BB 6060 (Heraeus GmbH, Hanau)
- Reinraumwerkbank (Elektromat Dresden, Dresden)
- Inverses Durchlicht-Mikroskop TELEVAL³¹ (Carl Zeiss Jena GmbH, Jena)
- Fotoapparat Nikon AF (Japan)
- Mikroskop Nikon TMS (Japan)

- Bürker-Zählkammer (Feinoptik GmbH, Bad Blankenburg)
- Varipette (Eppendorf GmbH, Hamburg)
- Mikrotiter-Platten-Reader "Easy Reader" EAR 340 AT (SLT Labinstruments Deutschland GmbH, Crailheim)
- Mikrotiter-Platten-Schüttler Shaker Inkubator AM 89 A (Dynatech Deutschland GmbH, Denkendorf)
- Analysenwaage MC 210 P (Satorius AG, Göttingen)
- Matrixdrucker KX-P1081 (Panasonic, Osaka, Japan)
- Pipettierhilfe „Pipetboy“ (Integra Biosciences, Fernwald)
- Pipettierhilfe „Sarpette“ (Sarstedt AG & Co, Nürmbrecht)
- Untersuchungshandschuhe aus Latex, puderfrei, unsteril (Ansell GmbH, Stahlgruberring 3, München)
- Buraton[®] 10F Flächendesinfektions- und Reinigungsmittel (Schülke & Mayr GmbH, Norderstedt, Wien)
- Peressigsäure 40 % (Kesla Pharma Wolfen GmbH, Wolfen)
- Ethanol 80 %, zur Desinfektion (Krankenhaus-Apotheke, Vogtland-Klinikum Plauen)

2.4. Testmethoden

2.4.1. Bestimmung der Zytotoxizität mit dem XTT-Tetrazoliumreduktionstest EZ4U

Die U937-Zellen werden zunächst serumfrei gewaschen. Dazu werden sie bei 1200 U/min (200 x g) und einer Temperatur von 4°C 5 min lang zentrifugiert, der Überstand abgegossen, in 5 ml RPMI-Medium resuspendiert und erneut zentrifugiert. Danach füllt man mit ca. 10 ml farblosem RPMI-Medium auf und bestimmt die Zellzahl mittels Bürker-Zählkammer unter dem Mikroskop. Es wird eine Zellzahl von 0,75 bis 1,25 x 10⁶ Zellen pro ml Medium eingestellt. Die Zellzahl richtet sich nach der Empfindlichkeit des verwendeten Zytotoxizitätstests und sollte nicht zu hoch sein, da sonst die Linearität des Zusammenhanges zwischen Vitalität und Farbentwicklung nicht gewährleistet ist (Biomedica EZ4U). Es werden pro Kavität 100 µl Zellsuspension und 100 µl der in absteigenden Konzentrationen vorliegenden HS-Lösung pipettiert. Anschließend erfolgt die 1-, 24-, 48- und 72-stündige Exposition und die Ermittlung der Zytotoxizität. Bei der mitgeführten Zellkontrolle wird anstelle der HS-Lösung farbloses RPMI-Medium zugegeben. Bevor die photometrische Bestimmung der Zellvitalität erfolgen kann, müssen die Cytomorph[®]-b-Platten zentrifugiert (1200 U/min, 4°C, 5 min) und der Überstand abgegossen werden. Die Zentrifugation ist aufgrund der Eigenfärbung der HS-Lösung, die die photometrische Vermessung stört, notwendig. Die Zellen werden mit 200 µl farblosem RPMI-Medium aufpipettiert.

Unmittelbar vor der Zugabe des Testkits zur Probe wird das lyophilisierte XTT-Salz in 2,5 ml der etwas angewärmten Aktivatorlösung gelöst und jeweils 20 µl in die Kavitäten pipettiert. Anschließend werden die Platten für 3 h im Brutschrank erneut inkubiert, dann in einem Shaker geschüttelt und im Easy Reader bei einer Wellenlänge von 450 nm und einer Vergleichswellenlänge von 620 nm photometrisch vermessen. Durch Verwendung einer Referenzwellenlänge erzielt man eine höhere Genauigkeit. Der Test ist schnell, zuverlässig und einfach in der Anwendung (Biomedica EZ4U).

Es wurden jeweils 3 Zellkontrollwerte und 6 in Folge einer geometrischen Reihe pipettierten HS-Lösungen getestet.

Der EZ4U-Test ist ein nichtradioaktiver Tetrazoliumreduktionstest, in dem die reduktive Umwandlung von gelb gefärbten Tetrazoliumsalzen in intensiv orange bis rot gefärbte Formazan-Derivate durch Dehydrogenasen ausgenutzt wird (Mosmann, 1983). Die U937-Zellen können die Derivate nur reduzieren, wenn intakte Mitochondrien vorhanden sind. Beim Zelltod sterben innerhalb weniger Minuten die Mitochondrien ab, so dass man sehr gut zwischen lebenden und toten Zellen unterscheiden kann. Bei den ersten bereits in den 50er Jahren eingeführten Tetrazoliumreduktionstesten waren die gebildeten Formazan-Derivate unlöslich, und man musste mehrere zusätzliche Arbeitsschritte einfügen, um diese wieder in Lösung zu bringen. Außerdem waren die ursprünglichen Tetrazoliumsalze selbst zytotoxisch. Die neueren gebräuchlichen Teste sind selbst nur noch wenig toxisch auf die Zellen und besitzen lösliche Reduktionsprodukte. In der folgenden Abbildung 11 ist die mit einem Farbwechsel einhergehende Reduktion des Tetrazoliumsalzes zum Formazan dargestellt (Klöcking et al., 1995).

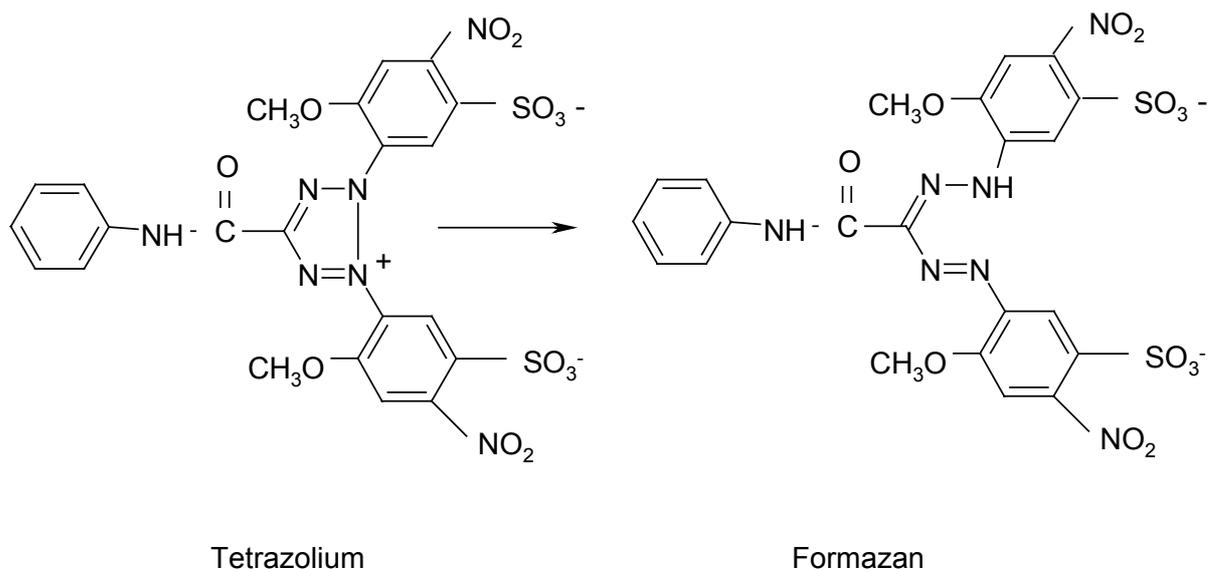


Abb.11: Reduktion des Tetrazoliumsalzes zum intensiv gefärbten Formazan als Indikatorreaktion des EZ4U-Testes

2.4.2. Berechnung und Darstellung der halbmaximalen zytotoxischen Konzentration (CC₅₀)

Die Zytotoxizität wird wie folgt berechnet:

$$CT = \left[\frac{x_0 - x_i}{x_0} \right] 100 \%$$

x_0 – Messwert der Zellkontrolle

x_i – Messwert der mit HS inkubierten Zellen

Die ermittelte Zytotoxizität wird in einem Diagramm mit halblogarithmischem Maßstab über der Konzentration aufgetragen. Es ergibt sich eine sigmoide Kurve. Die halbmaximale Zytotoxizität (CC₅₀) wird mit Hilfe einer Regressionsgeraden ermittelt. Die Regressionsfunktion beschreibt den mathematischen Zusammenhang zwischen der Konzentration und der ermittelten CT. Da die x-Achse im Diagramm logarithmisch dargestellt ist, erhält man in der Geradengleichung statt der Konzentration x die logarithmische Konzentration $\ln x$.

Man berechnet $y = 50 \%$ in der Geradengleichung der Form $y = m (\ln x) + b$.

Von den erhaltenen $\ln x$ -Werten wird der Mittelwert und die Standardabweichung berechnet und anschließend entlogarithmiert. Dabei erhält man den CC₅₀-Wert und das zugehörige Konfidenzintervall. Die Versuche wurden mindestens 3 mal durchgeführt.

2.4.3. Bestimmung der UV-B-protektiven Wirkung mit dem XTT-Tetrazolium-reduktionstest EZ4U

Zur Bestimmung der Photoprotektivität werden 100 μl Zellsuspension und 100 μl HS-Lösung in die Kavitäten des Bodens der Cytomorph[®]-b-Platten pipettiert und mit einer UV-B-Lampe bestrahlt. Es wird eine mit RPMI-Medium aufpipettierte Zellkontrolle und eine ohne HS-Lösung bestrahlte Positivkontrolle mitgeführt. Die Versuchsanordnung wurde in verschiedenen Variationen durchgeführt (Abb.12).

Die Bestrahlung der U937-Zellen erfolgte stets mit aufgesetztem Deckel der Cytomorph[®]-b-Platten und einer UV-B-Dosis von 36 mJ/cm^2 .

In der **Anordnung 1** erfolgt die UV-B-Bestrahlung der Zellen in direktem Kontakt mit den HS. 100 μl Zellsuspension und 100 μl HS-Lösung werden gemeinsam im Boden der Cytomorph[®]-b-Platten mit UV-B bestrahlt.

In der **Anordnung 2** werden 100 µl Zellen in die Kavitäten des Bodens der Cytomorph[®]-b-Platten gegeben und 100 µl HS in die Kavitäten des Deckels. Bei der anschließenden Bestrahlung befinden sich die HS getrennt von den Zellen.

In der **Anordnung 3** werden 100 µl Zellen in den Kavitäten des Bodens der Cytomorph[®]-b-Platten pipettiert und mit UV-B-Licht bestrahlt. Erst im Anschluss an die UV-B-Bestrahlung werden 100 µl der HS-Lösungen hinzugegeben, um eine mögliche pharmakologische oder membranstabilisierende Wirkung zu untersuchen.

In der **Anordnung 4** wird die Zytotoxizität der HS gegenüber U937-Zellen getestet. Dabei werden 100 µl Zellen zusammen mit den HS-Lösungen in die Kavitäten des Bodens der Cytomorph[®]-b-Platten gegeben und deren Zytotoxizität bestimmt.

In der **Anordnung 5** werden 100 µl Zellen und 100 µl HS zusammen in die Kavitäten des Bodens der Cytomorph[®]-b-Platten gegeben und zunächst 1 h lang im Brutschrank exponiert. Anschließend werden die in direktem Kontakt stehenden Zellen und HS mit UV-B bestrahlt. In dieser Versuchsanordnung wird der Frage nach möglichen Wechselwirkungen der HS mit den Membranoberflächen bzw. einer möglichen Partikelbildung und einer damit verbundenen physikalischen UV-B-Schutzwirkung nachgegangen.

In der **Anordnung 6** wird untersucht, ob die HS bei der UV-B-Bestrahlung zytotoxische Abbauprodukte bilden (Photostabilität). Dabei werden 100 µl HS in den Kavitäten des Bodens der Cytomorph[®]-b-Platten mit UV-B bestrahlt. Im Anschluss werden 100 µl Zellen hinzupipettiert und die Zytotoxizität bestimmt.

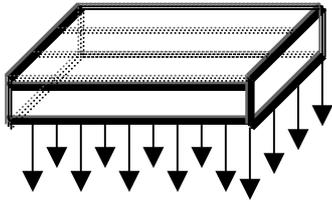
Die Exposition der bestrahlten Zellen erfolgte im Brutschrank für 24 h, 48 h und 72 h. Expositionsdauern von 24 h, 48 h und 72 h wurden schon von Nagy (1970) verwendet, um menschliche Haut nach UV-Bestrahlung elektronenmikroskopisch zu untersuchen.

Es werden jeweils 2 Zellkontrollwerte, 1 Positivkontrollwert und 6 verschiedene HS-Lösungen getestet.

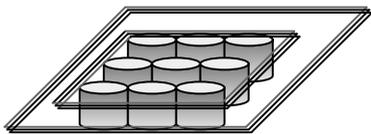
In den folgenden Abbildungen sind die unterschiedlichen Versuchsanordnungen dargestellt.

Versuchsanordnung 1

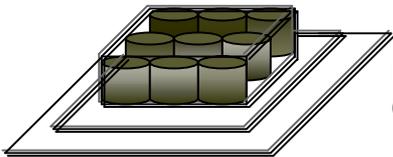
U937-Zellen werden in Gegenwart von Huminsäuren bestrahlt.



UV-B-Lampe



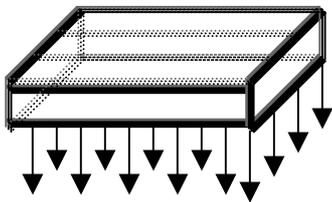
Kavitäten des Oberteils der Cytomorph[®]-b-Platten
(enthalten je 100 μ l farbloses RPMI)



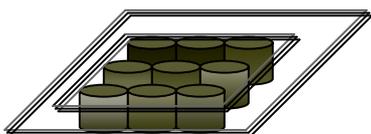
Kavitäten des Unterteils der Cytomorph[®]-b-Platten
(enthalten Huminsäure-Lösung und U937-Zellen)

Versuchsanordnung 2

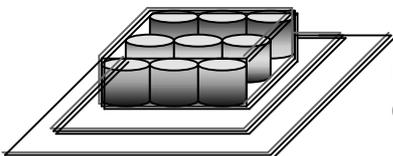
U937-Zellen und Huminsäuren sind voneinander getrennt; die UV-B-Strahlen erreichen die Zellen erst nach Passieren der Filterschicht (Huminsäuren, PABA).



UV-B-Lampe



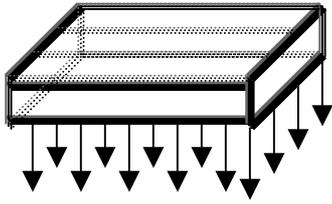
Kavitäten des Oberteils der Cytomorph[®]-b-Platten
(enthalten je 100 μ l Huminsäure-Lösung)



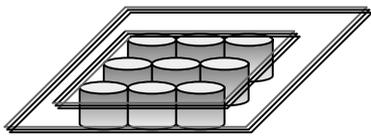
Kavitäten des Unterteils der Cytomorph[®]-b-Platten
(enthalten U937-Zellen)

Versuchsanordnung 3

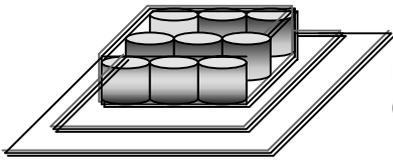
U937-Zellen werden bestrahlt, 1 h danach werden Huminsäuren zugesetzt.



UV-B-Lampe



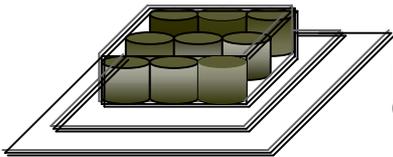
Kavitäten des Oberteils der Cytomorph®-b-Platten
(enthalten je 100 µl farbloses RPMI)



Kavitäten des Unterteils der Cytomorph®-b-Platten
(enthalten U937-Zellen)



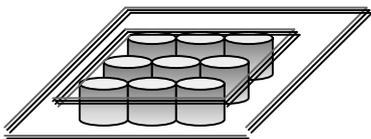
nach der UV-B-Bestrahlung wird Huminsäure-Lösung hinzugegeben



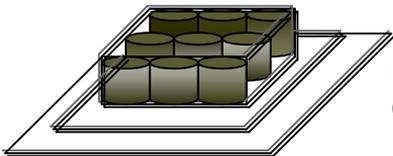
Kavitäten des Unterteils der Cytomorph®-b-Platten
(enthalten U937-Zellen und Huminsäure-Lösung)

Versuchsanordnung 4

U937-Zellen in Gegenwart von Huminsäuren ohne Bestrahlung (Zytotoxizitätsprüfung).



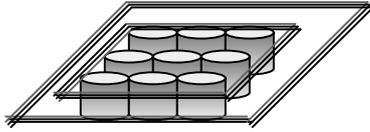
Kavitäten des Oberteils der Cytomorph®-b-Platten (leer)



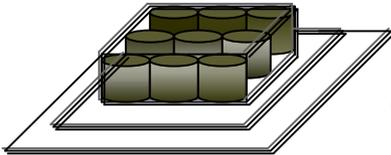
Kavitäten des Unterteils der Cytomorph®-b-Platten
(enthalten U937-Zellen und Huminsäure-Lösung)

Versuchsanordnung 5

U937-Zellen werden 1 h mit Huminsäuren vorinkubiert und danach bestrahlt.



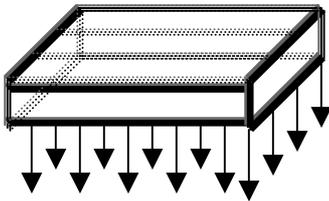
Kavitäten des Oberteils der Cytomorph®-b-Platten
(enthalten je 100 µl farbloses RPMI)



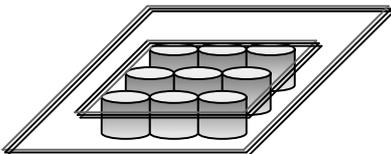
Kavitäten des Unterteils der Cytomorph®-b-Platten
(enthalten Huminsäure-Lösung und U937-Zellen)



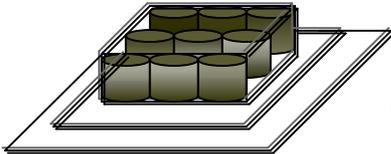
1-stündige Exposition bei 37°C und 5% CO₂



UV-B-Lampe



Kavitäten des Oberteils der Cytomorph®-b-Platten
(enthalten je 100 µl farbloses RPMI)



Kavitäten des Unterteils der Cytomorph®-b-Platten
(enthalten Huminsäure-Lösung und U937-Zellen)

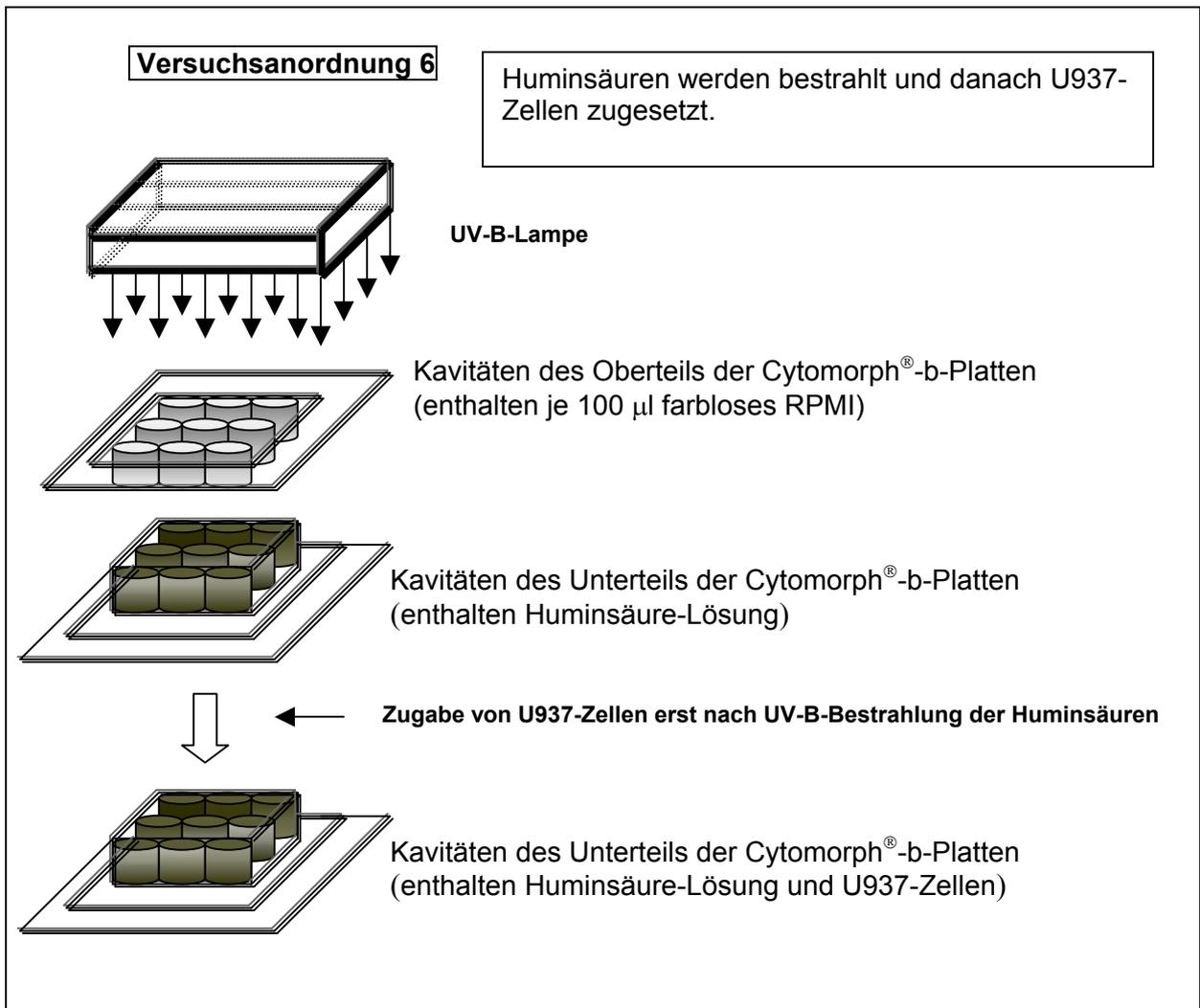


Abb.12: Variation der Versuchsanordnungen zur Ermittlung der UV-B-protektiven Wirkung unter Verwendung von Cytomorph[®]-b-Platten

2.4.4. Berechnung und Darstellung der halbmaximalen UV-B-protektiven Konzentration (UV-B-PC₅₀)

Die UV-B-protektive Wirkung wird wie folgt berechnet:

$$\text{UV-B-PW} = \left[\frac{x'_i - x'_o}{x_o - x'_o} \right] 100 \%$$

x_o – Messwert der unbestrahlten Zellkontrolle

x'_o – Messwert der bestrahlten Zellkontrolle

x'_i – Messwert der mit HS inkubierten und bestrahlten Zellen

Die Darstellung erfolgt in einem halblogarithmischen Diagramm. Die halbmaximale UV-B-protektive Konzentration UV-B-PC₅₀ wird analog der CC₅₀ ermittelt. Zur statistischen

Auswertung wurde der Student-Test (t-Test) zweiseitig mit gepaarten Stichproben verwendet.

2.4.5. Bestimmung der Zytotoxizität der Huminsäuren bei 96-stündiger Exposition

Die Zellen werden zweimal gewaschen und eine Zellzahl von $0,5 \times 10^5$ Zellen pro ml Medium eingestellt. Anschließend werden die Zellen mit HS-Lösung versetzt und für 96 h im Brutschrank inkubiert. Die Ermittlung der Zellvitalität erfolgt mittels EZ4U und die Zellzahlbestimmung mittels Bürkerkammer. Es wurden jeweils 3 Zellkontrollen und 6 verschiedene Konzentrationen der HS-Lösungen untersucht.

2.4.6. Bestrahlungsdosis

Um die Strahlendosis, die in den weiteren Versuchen verwendet werden soll, zu ermitteln, werden zunächst die Zellen mit verschiedenen UV-B-Dosen bestrahlt und die Zytotoxizität bestimmt. Dazu werden die Zellen in der gleichen Weise vorbereitet, wie zur Bestimmung der Zytotoxizität der Substanzen, in die Cytomorph[®]-b-Platten pipettiert und mit der UV-B-Lampe in einem Abstand von 3 cm bestrahlt. Die Dosis wird durch Variation der Bestrahlungsdauer verändert und die Zellvitalität mit dem EZ4U-Test bestimmt. Für die nachfolgenden Versuche wird eine Strahlendosis von 360 J/m^2 bzw. $36 \text{ mJ/cm}^2 \pm 10 \%$ ausgewählt. Praktisch entspricht das einer Bestrahlungsdauer von 60 s in einem Abstand von 3 cm. In der Literatur findet man einen Bereich von 10 bis 100 mJ/cm^2 als UV-B-Erythemschwelle (Kindl u. Raab, 1998). Es ist durchaus üblich bei der Nutzung von UV-B-Strahlung in der Therapie zunächst die MED (minimale Erythemdosis) zu bestimmen und anschließend eine Behandlungsdosis festzulegen (Neumann et al., 2000). So wird auch bei der UV-Provokationstestung beim systemischen Lupus erythematoses zunächst die MED bestimmt und dann mit der 1,5-fachen Dosis bestrahlt. Eine pathologische Erythemschwelle liegt bei $< 0,025 \text{ J/cm}^2$ UV-B bzw. $< 15 \text{ J/cm}^2$ für UV-A (Kowalzik et al., 1998). Filipe et al. (1995) untersuchten an humanen Hautfibroblasten die UV-induzierte Zellsterblichkeit, die Lipidperoxidation und die Produktion des Entzündungsparameters PGE_2 . Dabei wurden die Zellen mit Dosen von 50, 100 und 150 mJ/cm^2 bestrahlt. Auch Danno et al. (1984) bestrahlten humane epidermale Zellen, um die Rolle der Sauerstoffintermediate in „Sonnenbrandzellen“ zu untersuchen. Sie bestrahlten mit 300 mJ/cm^2 bei 280 bis 320 nm.

2.4.7. Morphologische Beurteilung der Zellen

Die morphologische Beurteilung der U937-Zellen erfolgte nach 24-, 48- und 72-stündiger Expositionsdauer mit den Testsubstanzen vor der Durchführung des Zytotoxizitätstestes. Die beobachteten Veränderungen der Zellen hinsichtlich ihrer Struktur und ihrem Erscheinungsbild unter dem Lichtmikroskop werden im Ergebnisteil kurz zusammengefasst.

Die Auswertung und Beurteilung der Ergebnisse der Versuche kann nur in Kombination mit dem Erscheinungsbild der geschädigten Zellen und der Zellkontrolle erfolgen.

2.4.8. Statistische Auswertung der Ergebnisse

Die einzelnen Versuche wurden mindestens drei mal durchgeführt und aus den berechneten Zytotoxizitäten die Mittelwerte gebildet.

$$\bar{x} = \frac{\sum x_i}{n}$$

\bar{x} – Mittelwert der Zytotoxizität
 x_i – Einzelwerte der Zytotoxizität
 n – Anzahl der Versuche

Die Standardabweichung errechnet sich:

$$SD = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{n - 1}}$$

SD – Standardabweichung der Zytotoxizität
 x_i – Einzelwerte der Zytotoxizität
 \bar{x} – Mittelwert der Zytotoxizität

Daraus berechnet man den Standardfehler des Mittelwertes:

$$SE = \frac{SD}{\sqrt{n}}$$

SE – Standardfehler des Mittelwertes

Der Begriff t-Test umschreibt mehrere Verfahren zur Überprüfung von Mittelwertunterschieden. In unserem Fall haben wir zwei miteinander zu vergleichende Stichproben, die nicht voneinander abhängig sind. Mit Hilfe des F-Testes wird zunächst überprüft, ob die beiden Varianzen homogen d.h. gleich oder ähnlich sind. Man berechnet den Quotienten der Varianzen, wobei die größere oben steht.

$$F = \frac{\sigma_1^2}{\sigma_2^2}$$

F – Ergebnis des F-Testes
 σ_1 – Varianz der Stichprobe 1
 σ_2 – Varianz der Stichprobe 2

Anschließend wurde auf Signifikanz mit Hilfe des t-Test nach Student zweiseitig mit ungepaarten Stichproben geprüft. Es wurde eine Irrtumswahrscheinlichkeit von 0,05 bzw. 0,01 gewählt. Daraus ergab sich die Entscheidung, ob ein Ergebnis signifikant bzw. hochsignifikant ist. Die Prüfung erfolgte mit dem Programm Excel.

$$T = \frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}{\sqrt{(n_1-1)SD_{x1}^2 + (n_2-1)SD_{x2}^2}} \sqrt{\frac{n_1 n_2 (n_1 + n_2 - 2)}{n_1 + n_2}}$$

- \bar{x}_1 - Mittelwert 1
- \bar{x}_2 - Mittelwert 2
- n_1 - Anzahl der Messwerte 1
- n_2 - Anzahl der Messwerte 2
- SD_{x1} - Standardabweichung von \bar{x}_1
- SD_{x2} - Standardabweichung von \bar{x}_2

3. Ergebnisse

3.1. Ermittlung der Bestrahlungsdosis

Um die Huminsäuren hinsichtlich ihrer UV-B-protaktiven Eigenschaften untersuchen zu können, musste zunächst die Strahlendosis ermittelt werden, die zu einer Schädigung der U937-Zellen führt, aber sie nicht vollständig abtötet. Dazu wurden die U937-Zellen 20 s, 40 s und 60 s lang mit UV-B-Strahlung in einem Abstand von 3 cm bestrahlt und 1 h, 24 h, 48 h und 72 h lang im Brutschrank bei 37°C, 5 % CO₂ und einer humiden Atmosphäre inkubiert. In der folgenden Abbildung 13 ist der Zusammenhang zwischen der Bestrahlungs- und Postexpositionszeit und der Zytotoxizität dargestellt.

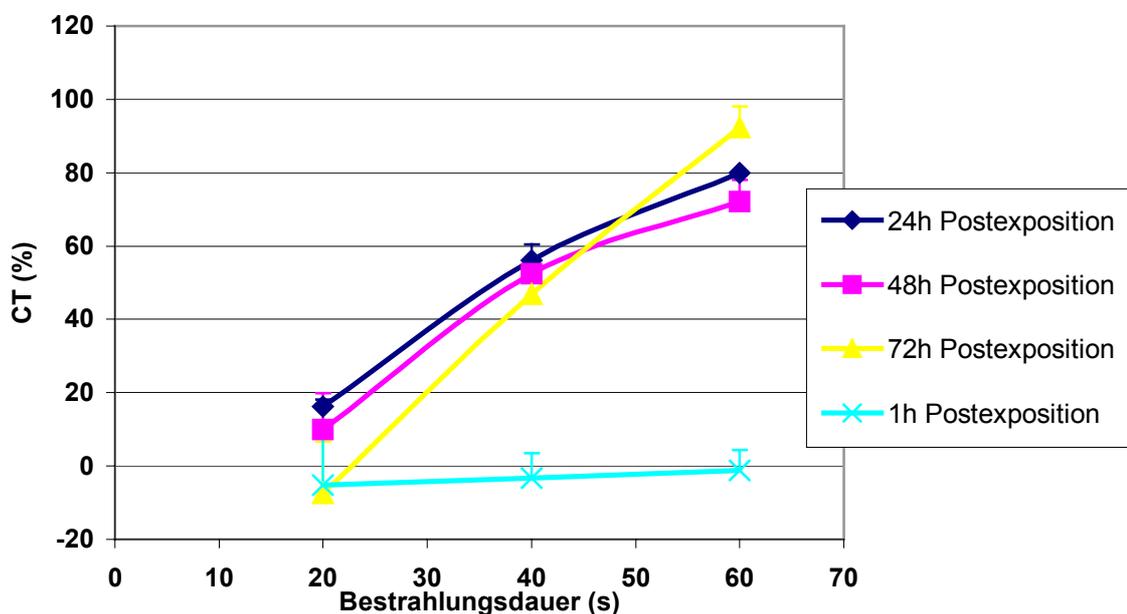


Abb.13: Ausmaß der Zytotoxizität nach UV-B-Bestrahlung von U937-Zellen in Abhängigkeit von der Bestrahlungsdauer und der Postexpositionszeit ($\bar{x} \pm SE$; $n_{1h}=3$, $n_{24h}=3$, $n_{48h}=3$, $n_{72h}=3$)

Bei der 1-stündigen Postexposition verläuft die CT-Kurve ganz leicht im negativen Bereich. In dem gewählten Dosisbereich der UV-B-Strahlen werden die Zellen in einer so kurzen Postexpositionszeit nicht abgetötet, aber der Stoffwechsel durch die zugeführte Energie angeregt. Erst einige Stunden nach der UV-B-Bestrahlung zeigt sich der zytotoxische Effekt. Die U937-Zellen sterben ab. Die UV-B-Strahlen lösen in den Zellen eine Nekrose aus. Solche Veränderungen werden auch ausgelöst, wenn die U937-Zellen einem Sauerstoffmangel, extremen Temperaturen oder unphysiologischen Agenzien ausgesetzt sind. Die CT-Kurven bei 24- und 48-stündiger Postexposition verlaufen nahezu gleich. Die

CT-Kurve bei 72-stündiger Postexposition zeigt den steilsten Anstieg. Bei einer Bestrahlungsdauer von 60 s werden ca. 90 % der U937-Zellen abgetötet.

Die U937-Zellen sind eine Suspensionskultur mit einzeln schwimmenden oder in kleinen Träubchen wachsenden, lose zusammengelagerten Zellen, die sich beim vorsichtigen Schwenken der Suspension voneinander lösen. Sie sind rund und besitzen je nach Proliferationszustand eine einheitliche Größe. Der Zellrand ist glatt und grenzt die Zellen durch einen schwachen Kontrast vom Medium ab. Das Zellinnere ist homogen, kontrastarm und durchscheinend. Ältere oder apoptotische Zellen erscheinen kontrastreicher, etwas kleiner und kompakter. Das Zellinnere ist kondensiert, und am Rand beginnen sich kleine Bläschen zu formieren. Sie haben einen rauen Rand. Beim Absterben aufgrund eines schädigenden oder toxischen Einflusses wie durch UV-B-Bestrahlung sind die Zellen zunächst nach 3 bis 5 h sehr stark aufgebläht und geschwollen, die Membranen platzen, und das Zellinnere läuft aus. Im weiteren Verlauf schrumpfen die verbliebenen Zellteile durch die osmotischen Einflüsse in sich zusammen, erscheinen kompakt, verklumpt und kontrastreich und haben einen fransigen oder zerklüfteten Zellrand. Teilweise sind Zellfragmente, Bruchstücke, abgelöste Membranstücke und geschrumpfte Zellen zu erkennen. Die morphologische Beurteilung des Zustandes der Zellen erfolgt unter Berücksichtigung der Zellzahl und Zelldichte sowie über die Beschreibung des Membranzustandes, der Zellgröße und der Kontrastvermehrung des Zellinneren.

Die UV-B-Strahlen führen zu Entzündungsreaktionen und der Freisetzung von Entzündungsmediatoren, wodurch die Zellen Flüssigkeit einlagern. Nicht nur die Zelle selbst ist ödematös geschwollen, sondern auch die Zellorganellen, wie z.B. die Mitochondrien. Der Zellrand ist glatt abgegrenzt. Während die unbestrahlten Zellen nicht völlig kreisrund erscheinen und manchmal auch etwas abgeflacht sind, sehen die bestrahlten Zellen prall und geschwollen aus. Nach weiteren 1 bis 2 h beginnen die Membranen durch den entstandenen Druck zu zerplatzen, und es tritt meist an einer Stelle Zytoplasma aus. In den folgenden Stunden laufen die Zellen aus, Medium tritt ein und die Zellorganelle und Membranbestandteile treten in die Lösung über. Das Zytoplasma kann sich verflüssigen oder auch gerinnen. Durch die Membranschäden sind die Flüssigkeits- und Elektrolytverhältnisse gestört, die Ionen- und Wasserpermeabilität ist verändert. Es werden Mediatoren freigesetzt, die das Entzündungsgeschehen aufrechterhalten und die anderen Zellen beeinflussen. Nach 24 h erscheinen die durch UV-B-Strahlung geschädigten U937-Zellen geschrumpft, verkleinert, ohne scharfe Begrenzung und kontrastverstärkt. Man erkennt in der Lösung Zellfragmente wie z.B. Membranen und zerrissene, tote Zellen. Bei nekrotischen Veränderungen treten zunächst keine typischen Kernveränderungen auf.

3.2. Morphologische Veränderungen der U937-Zellen

Von den nekrotischen Veränderungen durch UV-B-Strahlung sind die apoptotischen Veränderungen abzugrenzen. Jelinek (2001) untersuchte die HS hinsichtlich ihrer apoptoseinduzierenden Eigenschaften und fand, dass die U937-Zellen bei HS-Behandlung apoptotische Veränderungen zeigen. Wenn U937-Zellen mit UV-B in Gegenwart von HS bestrahlt werden, sind auch apoptotische Erscheinungen möglich. Die Apoptose geht mit spezifischen morphologischen Veränderungen des Zellkerns einher. Das Chromatin kondensiert klumpenartig und lagert sich in den Randbereichen des Zellkerns an. Die Zelle schrumpft, wobei die ersten charakteristischen Veränderungen vom Zellkern ausgehen. Die Zellen scheinen zu brodeln (Zeiose), und es bilden sich kleine Bläschen (Protrusionen). Diese enthalten Fragmente der Zelle, die durch eine Membran sauber vom Medium abgegrenzt sind und dadurch keinen negativen Einfluss auf die Nachbarzellen haben. Die anderen Zellen phagozytieren diese apoptotischen Körperchen und nutzen die Bestandteile für den eigenen Stoffwechsel. Durch die Abkapselung behalten die Zellorganellen ihre Struktur. In der folgenden Tabelle 2 und den Abbildungen 14, 15 und 16 sind die morphologischen Merkmale der gesunden U937-Zellen denen der apoptotischen und nekrotischen Zellen gegenübergestellt.

Tabelle 2: Morphologische Unterschiede zwischen apoptotischen, unbehandelten und nekrotischen U937-Zellen

<u>Apoptotische U937-Zellen</u>	<u>Unbehandelte U937-Zellen</u>	<u>Nekrotische U937-Zellen</u>
<ul style="list-style-type: none"> • ohne feste Membran • löchrig • zusammengezogen, verkleinert, geschrumpft • zerfallen beim Schwenken der Zellkulturflasche • erscheinen dunkler und kontrastreicher • sind kleiner (ca. 1/3 so groß wie gesunde) • nicht in Träubchen, sondern einzeln schwimmend • keine klare Lösung unter dem Mikroskop, sondern mit Zellfragmenten versetzt • Zellen nicht rund, z.T. eckig • schwer suspendierbar • Membran nur schwer zu erkennen • Zellen undurchsichtig, mit verdichtetem Zytoplasma • kleben zusammen, setzen sich am Boden fest • schwer zu zählen, da nicht eindeutig abgrenzbar 	<ul style="list-style-type: none"> • groß • rund • kontrastarm • glatte Membran • wachsen in Trauben • lagern sich locker zusammen • leicht suspendierbar • schwimmen in Lösung • viel größer als apoptotische Zellen • Membran deutlich erkennbar und abzugrenzen • Zellen durchscheinend 	<ul style="list-style-type: none"> • zunächst groß und hell • dann aufgebläht, geschwollen • äußerst kontrastarm • sehr locker aneinanderhaftend oder einzeln schwimmend • haften nicht am Rand an • nach einigen Stunden platzen die Membranen auf • die integralen Bestandteile werden freigesetzt • Membranfetzen erscheinen • das Zytoplasma tritt ins Medium aus • nach einigen weiteren Stunden zerfallen die Strukturen, die Zellen sind nicht mehr als solche zu erkennen • es schwimmen Fragmente in der Lösung, die einen starken Kontrast haben

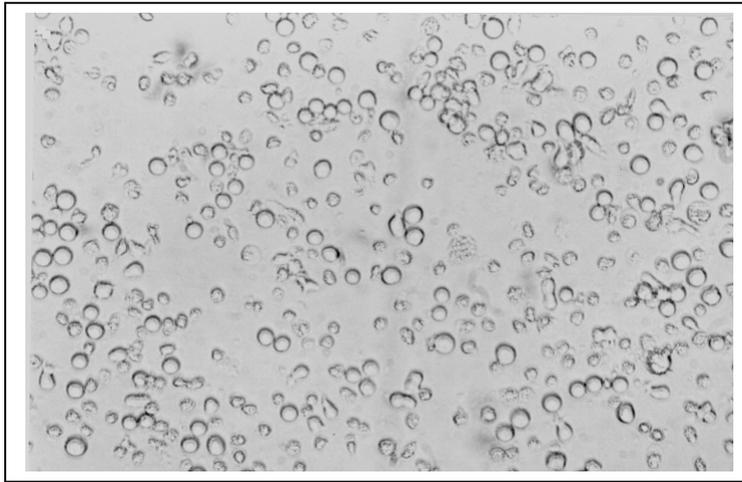


Abb.14: Darstellung der morphologischen Merkmale von wahrscheinlich apoptotisch veränderten U937-Zellen nach 48-stündiger Postexposition mit Na-humat (125 µg/ml) und einer UV-B-Bestrahlung von 360 J/m², 160-fache Vergrößerung

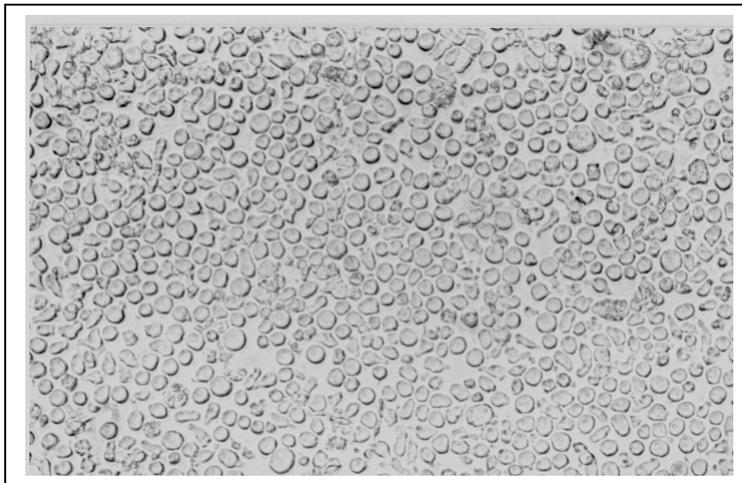


Abb.15: Darstellung der morphologischen Merkmale von unbehandelten U937-Zellen nach 48-stündiger Inkubation (Zellkontrolle), 160-fache Vergrößerung

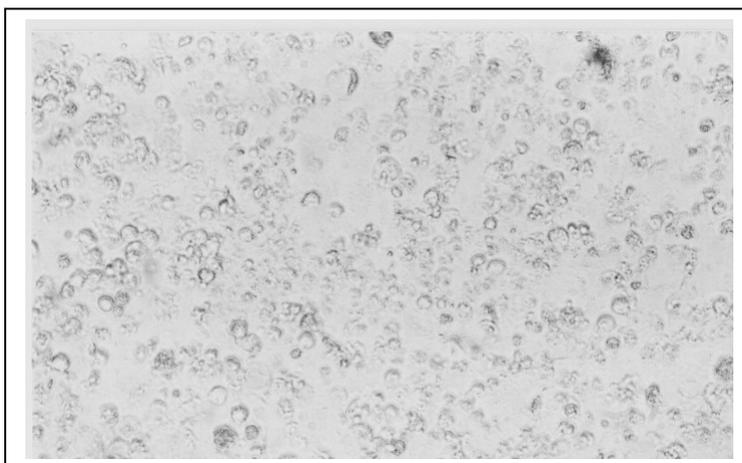


Abb.16: Darstellung der morphologischen Merkmale von nekrotischen U937-Zellen nach 48-stündiger Postexposition mit NH₄-humat (250 µg/ml), 160-fache Vergrößerung

3.3. Zytotoxizität und UV-B-protective Wirkung von natürlich vorkommenden Huminsäuren

Die natürlich vorkommenden HS sollten auf ihre zytotoxischen Eigenschaften und ihre UV-B-protective Wirkung untersucht werden. Hierzu wurden die HS Alteicher Moor in drei verschiedenen Aufbereitungsvarianten (HS Alteicher Moor I,II und III), das Natrium- und das Ammoniumsalz einer HS aus einem Moor bei Dierhagen (Na-humat, NH₄-humat) und eine käuflich erworbene HS Aldrich ausgewählt.

3.3.1. Huminsäure Alteicher Moor I

Die HS Alteicher Moor I wurde im Konzentrationsbereich bis zu 500 µg/ml auf ihre zytotoxischen und UV-B-protectiven Effekte an U937-Zellen untersucht. Es wurden Expositionsdauern von 24 h und 48 h und die Versuchsanordnungen 1 und 2 ausgewählt.

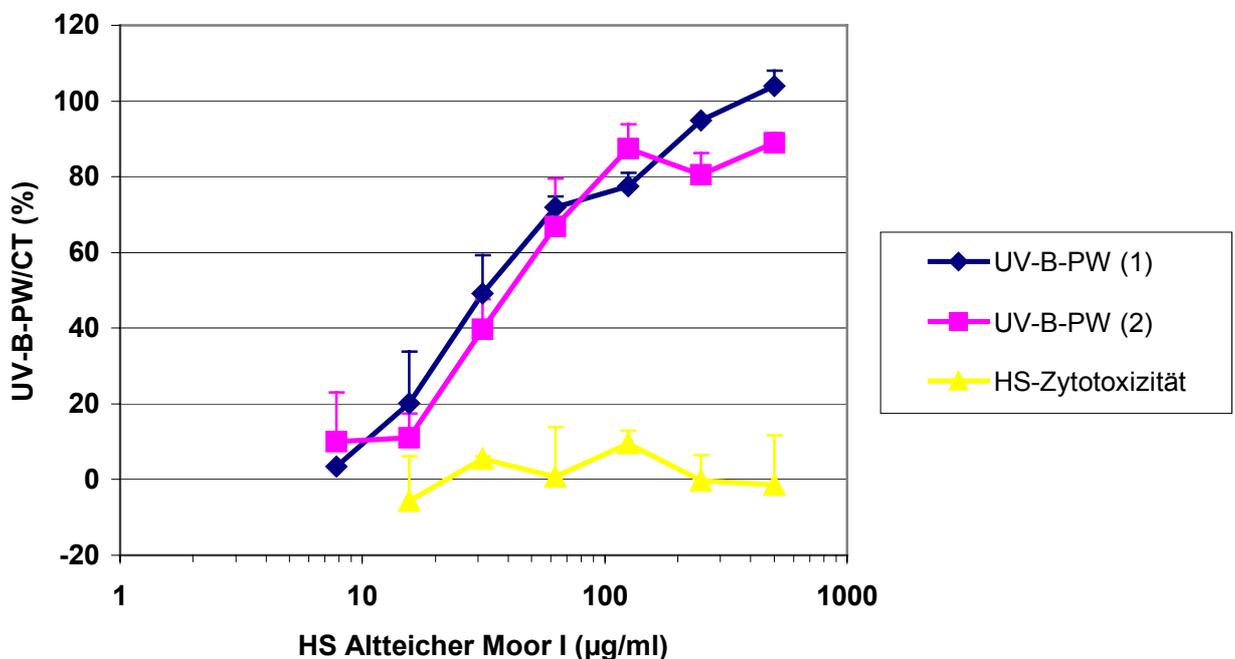


Abb.17: UV-B-protective Wirkung (UV-B-PW) und Zytotoxizität (CT) von HS Alteicher Moor I auf U937-Zellen ($\bar{x} \pm SE$) nach 24-stündiger Exposition
 UV-B-PW (1): 24 h direkte Wirkung von HS auf bestrahlte U937-Zellen (n=4)
 UV-B-PW (2): 24 h indirekte Wirkung von HS auf bestrahlte U937-Zellen (n=5)
 Zytotoxizität nach 24 h HS-Einwirkung auf unbestrahlte U937-Zellen (n=4)

Die HS Alteicher Moor I (Abb.17) zeigt im 24 h-Versuch keine zytotoxischen Effekte. Die UV-B-PW ist sowohl in VA 1 als auch in der VA 2 nachweisbar. Die Kurve der UV-B-PW steigt in VA 1 von ca. 0 % bei einer Konzentration von 7,8 µg/ml bis auf 100 % bei 500 µg/ml konstant an. Die Kurve der UV-B-PW in der VA 2 steigt von 10 % bei 15,6 µg/ml bis auf 90 %

bei 125 µg/ml konstant an. Im Konzentrationsbereich bis zu 500 µg/ml liegt die UV-B-PW in der VA 2 zwischen 80 % und 90 %.

Die ermittelten UV-B-PC₅₀ der HS Alteicher Moor I nach 24-stündiger Exposition sind:

- VA 1: 31,4 µg/ml (19,6 – 50,5 µg/ml)
- VA 2: 40,7 µg/ml (28,9 – 57,2 µg/ml)

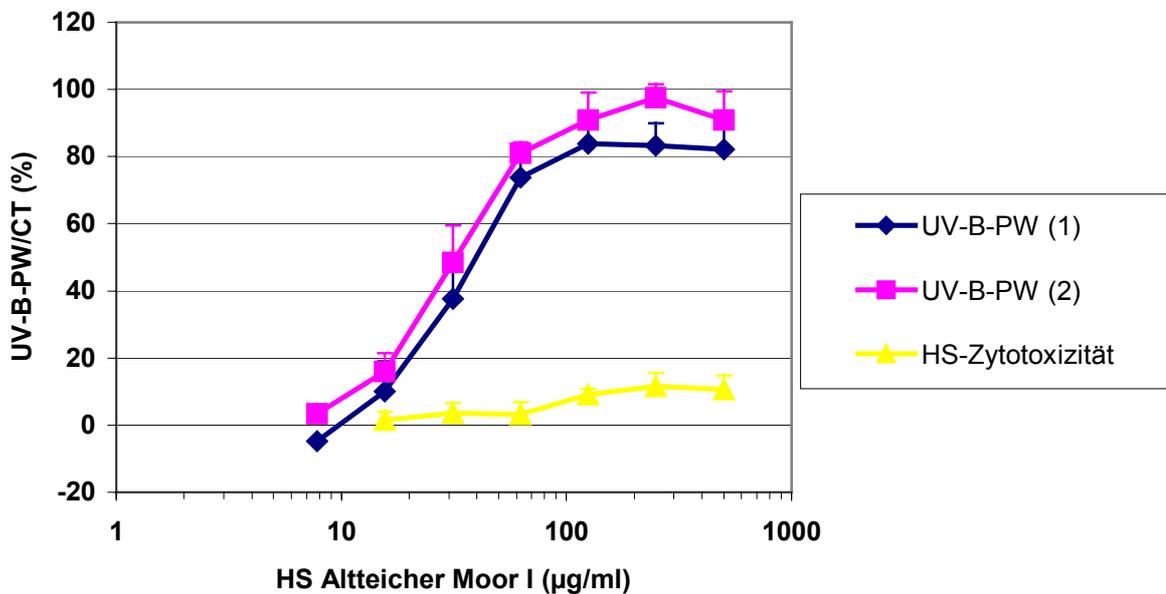


Abb.18: UV-B-protective Wirkung (UV-B-PW) und Zytotoxizität (CT) von HS Alteicher Moor I auf U937-Zellen ($\bar{x} \pm SE$) nach 48-stündiger Exposition

UV-B-PW (1): 48 h direkte Wirkung von HS auf bestrahlte U937-Zellen (n=4)

UV-B-PW (2): 48 h indirekte Wirkung von HS auf bestrahlte U937-Zellen (n=5)

Zytotoxizität nach 48 h HS-Einwirkung auf unbestrahlte U937-Zellen (n=4)

Die HS Alteicher Moor I zeigt bei 48-stündiger Exposition (Abb.18) eine sehr geringe CT von bis zu 10 % bei Konzentrationen über 125 µg/ml. Die UV-B-PW steigt in VA 1 von –5 % bei einer Konzentration von 7,8 µg/ml auf über 80 % bei einer Konzentration von 125 µg/ml an. In diesem Konzentrationsbereich zeigt die Substanz eine geringe CT, so dass kein Ansteigen der UV-B-PW bis auf 100 % erfolgt. In VA 2 erreicht die UV-B-PW dagegen bei 250 µg/ml nahezu 100 %. Der Anstieg der UV-B-PW ist in VA 2 ähnlich dem in VA 1. Der Kurvenverlauf ist leicht nach links verschoben, so dass der UV-B-protective Schutz in VA 2 geringfügig besser ist.

Die ermittelten UV-B-PC₅₀ der HS Alteicher Moor I nach 48-stündiger Exposition sind:

- VA 1: 41,5 µg/ml (28,5 – 60,5 µg/ml)
- VA 2: 34,8 µg/ml (26,4 – 46,1 µg/ml)

Die durch die UV-B-Strahlung geschädigten U937-Zellen weisen die typischen nekrotischen Veränderungen auf. Sie erscheinen geschrumpft, eckig, mit rauen Oberflächen und ausgelaufenen Zellbestandteilen. Sie sind z.T. in Bruchstücke zerfallen. Die nicht vollständig nekrotischen Zellen (Konzentrationen zwischen 15,6 und 62,5 µg/ml) sind z.T. aufgebläht, vergrößert, einige auch deformiert. Bei hohen HS-Konzentrationen erscheinen die U937-Zellen z.T. wie eingebettet. Die HS haben eine Tendenz, sich an den Oberflächen der Zellen anzulagern.

3.3.2. Huminsäure Altteicher Moor II

Die HS Altteicher Moor II wurde im Konzentrationsbereich bis zu 500 µg/ml auf ihr zytotoxisches und UV-B-protektives Verhalten untersucht. Dabei wurden in den Versuchsanordnungen 1 und 2 ein 24- und ein 48-stündiges Expositionsintervall ausgewählt.

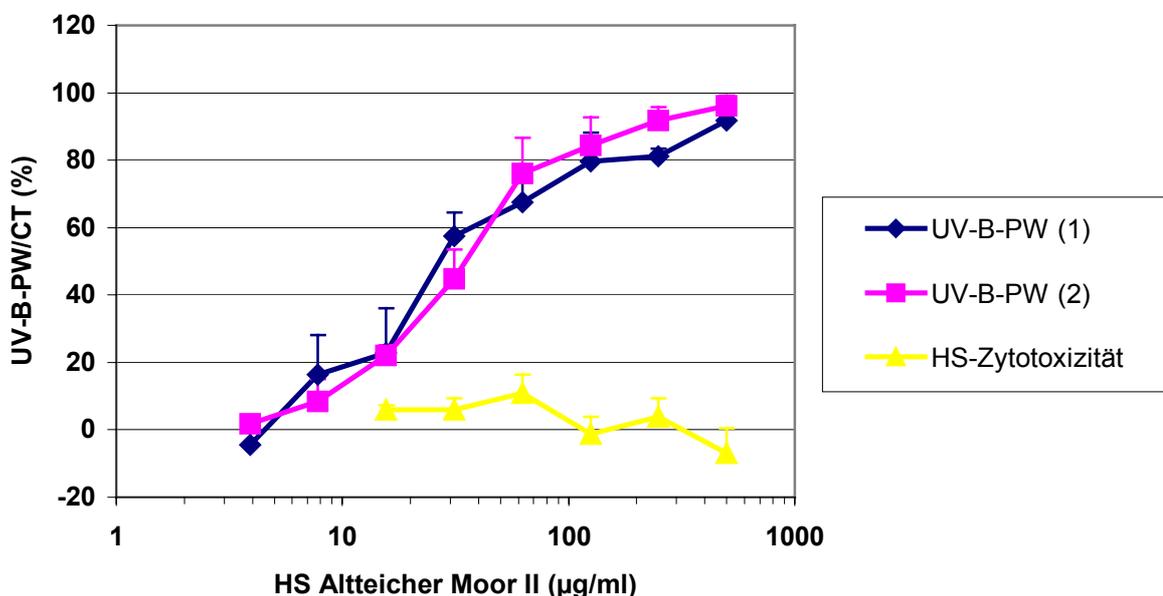


Abb.19: UV-B-protective Wirkung (UV-B-PW) und Zytotoxizität (CT) von

HS Altteicher Moor II auf U937-Zellen ($\bar{x} \pm SE$) nach 24-stündiger Exposition

UV-B-PW (1): 24 h direkte Wirkung von HS auf bestrahlte U937-Zellen (n=5)

UV-B-PW (2): 24 h indirekte Wirkung von HS auf bestrahlte U937-Zellen (n=5)

Zytotoxizität nach 24 h HS-Einwirkung auf unbestrahlte U937-Zellen (n=3)

Die HS Altteicher Moor II zeigt bei 24-stündiger Exposition (Abb.19) praktisch keinen Anstieg der CT im Konzentrationsbereich von 3,9 µg/ml bis 500 µg/ml. Sowohl in der VA 1 als auch in der VA 2 zeigt sich eine gute UV-B-PW. Die Kurven verlaufen nahezu identisch und zeigen im Konzentrationsbereich von 3,9 µg/ml bis 125 µg/ml einen konstanten Anstieg. Im Konzentrationsbereich über 62,5 µg/ml verläuft die Kurve der VA 2 über der VA 1. Sie

steigt bei 500 µg/ml auf nahezu 100 % an, während die Kurve der VA 1 erst bei 500 µg/ml auf über 90 % ansteigt.

Die ermittelten UV-B-PC₅₀ der HS Altteicher Moor II nach 24-stündiger Exposition sind:

- VA 1: 34,8 µg/ml (25,4 – 47,8 µg/ml)
- VA 2: 29,1 µg/ml (24,2 – 35,1 µg/ml)

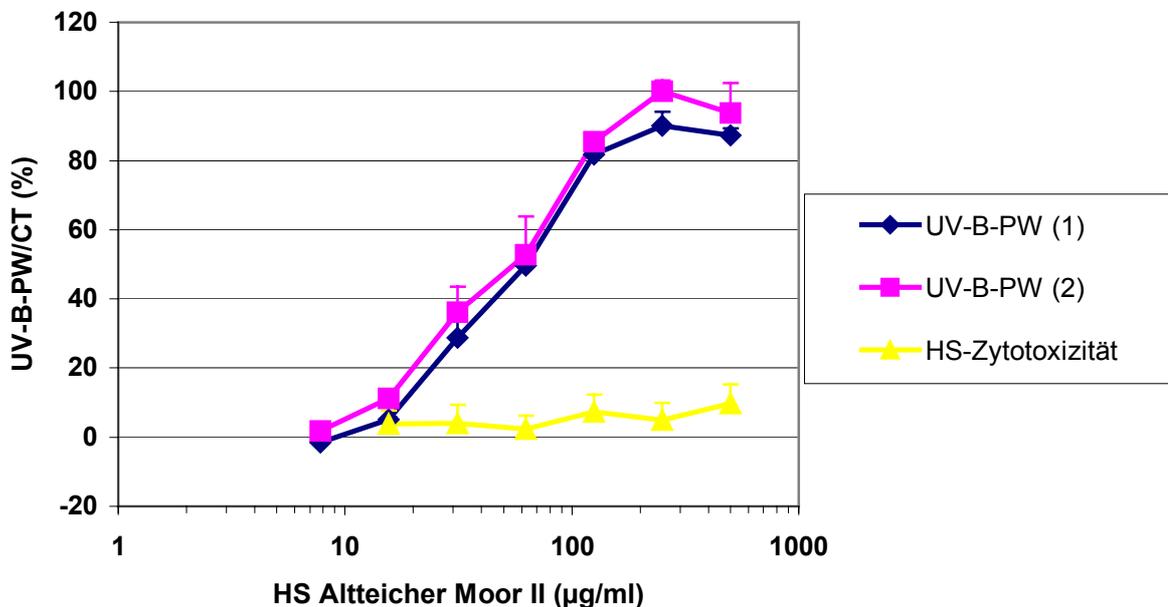


Abb.20: UV-B-protective Wirkung (UV-B-PW) und Zytotoxizität (CT) von

HS Altteicher Moor II auf U937-Zellen ($\bar{x} \pm SE$) nach 48-stündiger Exposition

UV-B-PW (1): 48 h direkte Wirkung von HS auf bestrahlte U937-Zellen (n=3)

UV-B-PW (2): 48 h indirekte Wirkung von HS auf bestrahlte U937-Zellen (n=3)

Zytotoxizität nach 48 h HS-Einwirkung auf unbestrahlte U937-Zellen (n=4)

Die zytotoxische Wirkung der HS Altteicher Moor II ist auch nach 48-stündiger Exposition (Abb.20) gering und liegt bei Konzentrationen über 125 µg/ml um die 10 %. Die UV-B-PW ist in VA 1 und VA 2 gleich. Sie steigt von 0 % bei einer Konzentration von 7,8 µg/ml auf über 80 % bei 125 µg/ml an. Im Konzentrationsbereich von 250 µg/ml bis 500 µg/ml liegt die UV-B-PW in VA 2 bei 100 %. Die UV-B-PW in der VA 1 erreicht maximale Werte von ca. 90 %. Dies korreliert mit der geringen CT von 10 %.

Die ermittelten UV-B-PC₅₀ der HS Altteicher Moor II nach 48-stündiger Exposition sind:

- VA 1: 56,4 µg/ml (50,6 – 63,0 µg/ml)
- VA 2: 48,5 µg/ml (37,1 – 63,4 µg/ml)

Die bestrahlten U937-Zellen zeigen bei niedrigen HS-Konzentrationen intensive nekrotische Veränderungen. Die Zellen sind in ihre Fragmente zerfallen. Die Zellen können nicht mehr klar von den ausgelaufenen Fragmenten abgegrenzt werden. Die Membranen sind zerrissen,

zusammengefasst und rau. Bei hohen HS-Konzentrationen zeigen die Zellen keine strahlentypischen Veränderungen. Sie sind rund und glattrandig und erscheinen von den HS umgeben. Die Zellen haben bei hohen HS-Konzentrationen einen intensiveren Kontrast, eventuell färben sie sich gelblich oder bräunlich an.

Die HS in den Aufarbeitungsvarianten I und II aus dem Alteicher Moor unterscheiden sich nicht in Bezug auf ihre Zytotoxizität und ihre UV-B-protective Wirkung an U937-Zellen. Sie zeigen auch nach 48-stündiger Exposition bei Konzentrationen bis zu 500 µg/ml nur geringe zytotoxische Effekte. Die Zellen bleiben unbeeinträchtigt und zeigen bei mikroskopischer Betrachtung keine Anzeichen von Membranschäden. Sie erscheinen gesund und ihre Morphologie weist im Vergleich zu den Kontrollzellen keine Unterschiede auf. Sie scheinen in das HS-Gerüst eingebettet zu sein. Die UV-B-protective Wirkung ist sehr gut. Die Unterschiede der beiden HS und der Versuchsanordnungen sind nicht signifikant.

3.3.3. Huminsäure Alteicher Moor III

Da sich die HS I und II des Alteicher Moores in ihrem zytotoxischen und UV-B-protectiven Verhalten nicht unterscheiden, wurde zusätzlich eine dritte Variante ausgewählt und die Zytotoxizität und die UV-B-Protectivität im gleichen Konzentrationsbereich und einer 24-stündigen Exposition untersucht.

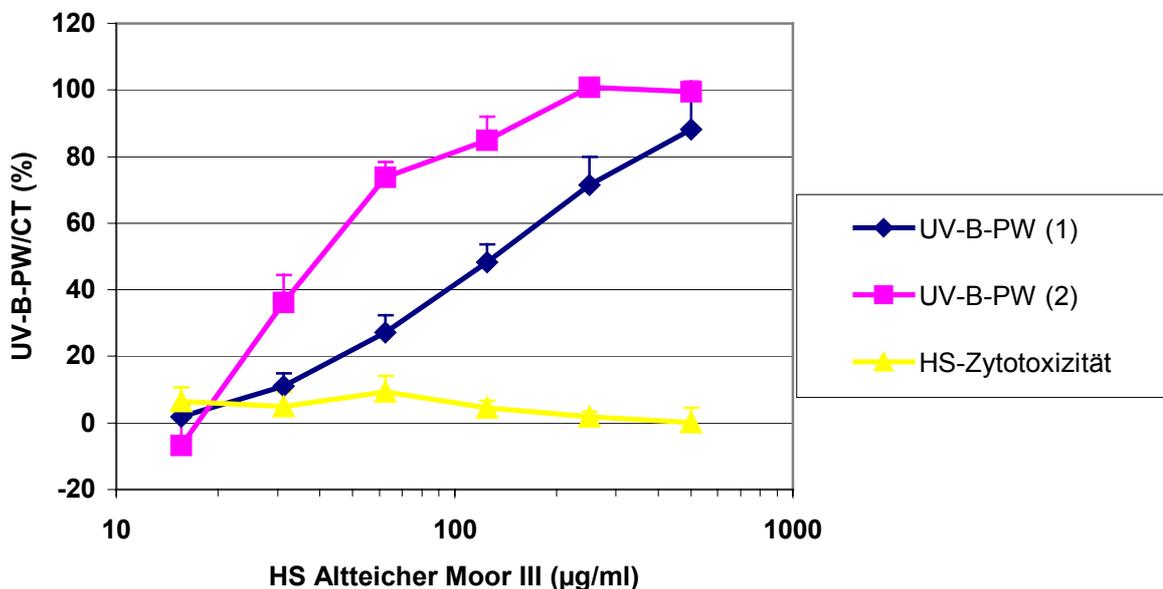


Abb.21: UV-B-protective Wirkung (UV-B-PW) und Zytotoxizität (CT) von

HS Alteicher Moor III auf U937-Zellen ($\bar{x} \pm SE$) nach 24-stündiger Exposition

UV-B-PW (1): 24 h direkte Wirkung von HS auf bestrahlte U937-Zellen (n=3)

UV-B-PW (2): 24 h indirekte Wirkung von HS auf bestrahlte U937-Zellen (n=3)

Zytotoxizität nach 24 h HS-Einwirkung auf unbestrahlte U937-Zellen (n=3)

Die HS Alteicher Moor III (Abb.21) zeigt im Konzentrationsbereich bis 500 µg/ml keine CT. Die UV-B-PW ist in VA 2 wesentlich effektiver als in VA 1. In der VA 1 steigt sie von 0 % bei 15,6 µg/ml bis auf 90 % bei 500 µg/ml konstant an. In VA 2 ist der Anstieg im Konzentrationsbereich von 15,6 µg/ml bis 62,5 µg/ml wesentlich steiler. Die UV-B-PW in der VA 2 liegt bei 250 µg/ml und darüber bei 100 %.

Die ermittelten UV-B-PC₅₀ der HS Alteicher Moor III nach 24-stündiger Exposition sind:

- VA 1: 124,5 µg/ml (97,7 – 158,5 µg/ml)
- VA 2: 41,1 µg/ml ** (34,0 – 49,7 µg/ml)

In der VA 2 wird ein hochsignifikant (**) besserer UV-B-Schutz erzielt als in der VA 1.

Die U937-Zellen werden bei niedrigen HS-Konzentrationen vollständig durch die UV-B-Strahlung geschädigt. Die Zellen weisen wiederum die typischen morphologischen Veränderungen wie Zellyse, Auslaufen der Zellen und Fragmentierung auf.

3.3.4. Huminsäure Natriumhumat

Die HS aus dem Naturmoor in Dierhagen wurde hinsichtlich ihrer Zytotoxizität und ihrer UV-B-protektiven Wirkung in 2 Versuchsanordnungen an U937-Zellen untersucht. Es wurden Expositionsintervalle von 24 h, 48 h und 72 h ausgewählt.

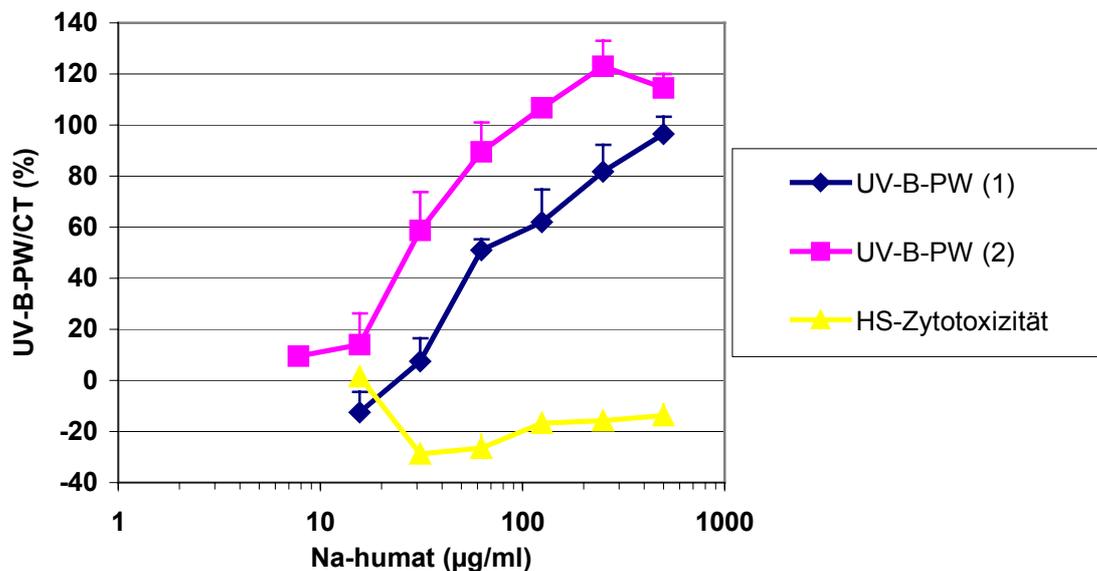


Abb.22: UV-B-protective Wirkung (UV-B-PW) und Zytotoxizität (CT) von

Na-humate auf U937-Zellen ($\bar{x} \pm SE$) nach 24-stündiger Exposition

UV-B-PW (1): 24 h direkte Wirkung von HS auf bestrahlte U937-Zellen (n=3)

UV-B-PW (2): 24 h indirekte Wirkung von HS auf bestrahlte U937-Zellen (n=4)

Zytotoxizität nach 24 h HS-Einwirkung auf unbestrahlte U937-Zellen (n=3)

Die CT-Kurve von Na-humat (Abb.22) verläuft in dem Konzentrationsbereich von 31,25  ml bis 500 µg/ml im negativen Bereich. Das bedeutet, dass die mit Na-humat inkubierten Zellen ein besseres Wachstum oder einen verbesserten Stoffwechsel als die unbehandelten Zellen aufweisen. Die Zugabe der Substanz führt dazu, dass der EZ4U-Test besser reduziert wird. Die UV-B-protective Wirkung in Anordnung 1 steigt im Konzentrationsbereich von 15,6 µg/ml von ca. -10 % auf ca. 100 % bei 500 µg/ml an.

Die Kurve der UV-B-protectiven Wirkung in Anordnung 2 zeigt den gleichen Anstieg, liegt aber im Vergleich zur Kurve der VA 1 nach links und nach oben versetzt. Das Maximum findet sich bei einer Konzentration von 250 µg/ml bei ca. 120 %.

Die ermittelten UV-B-PC₅₀ von Na-humat nach 24-stündiger Exposition sind:

- VA 1: 47,7 µg/ml (27,7 – 82,2 µg/ml)
- VA 2: 30,2 µg/ml (23,1 – 39,4 µg/ml)

Die bestrahlten Zellen zeigen bei niedrigen HS-Konzentrationen intensive nekrotische Veränderungen. Die Membranen sind zerrissen, die Zellen verklumpt und ausgelaufen. Bei hohen HS-Konzentrationen sehen die Zellen morphologisch gesund aus. Sie weisen keine Anzeichen von Membran- oder Größenveränderungen auf.

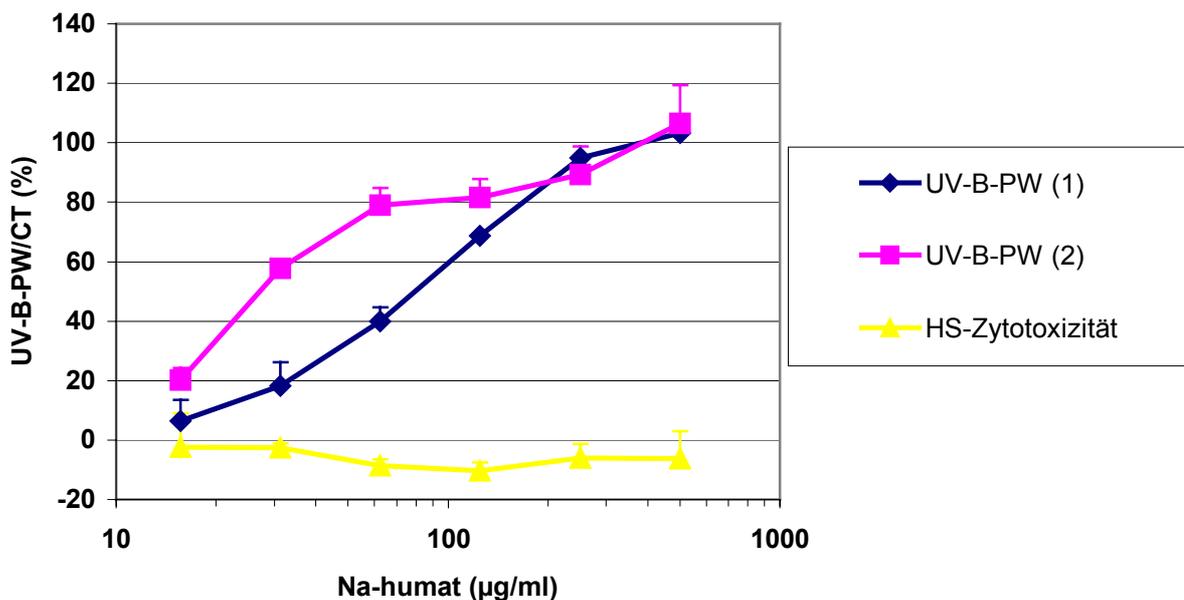


Abb.23: UV-B-protective Wirkung (UV-B-PW) und Zytotoxizität (CT) von Na-humat auf U937-Zellen ($\bar{x} \pm SE$) nach 48-stündiger Exposition
 UV-B-PW (1): 48 h direkte Wirkung von HS auf bestrahlte U937-Zellen (n=3)
 UV-B-PW (2): 48 h indirekte Wirkung von HS auf bestrahlte U937-Zellen (n=6)
 Zytotoxizität nach 48 h HS-Einwirkung auf unbestrahlte U937-Zellen (n=3)

Die Kurve der Zytotoxizität liegt nach 48-stündiger Exposition (Abb.23) knapp unter 0 % im getesteten Konzentrationsbereich. Im Vergleich zu der CT-Kurve nach 24-stündiger

Exposition verläuft sie aber nur leicht im Negativen. Das bedeutet, dass Na-humat möglicherweise einen wachstumsfördernden oder aktivierenden Effekt hat. Die UV-B-PW in Anordnung 1 zeigt einen kontinuierlichen Anstieg von 15,6 µg/ml bis zu 500 µg/ml, wo die Schutzwirkung etwa 100 % beträgt. Die UV-B-PW in der Anordnung 2 steigt sehr steil bis auf 80 % bei einer Konzentration von 62,5 µg/ml an. Im Konzentrationsbereich bis zu 500 µg/ml verläuft der Anstieg flacher und erreicht bei 500 µg/ml die 100 %.

Die ermittelten UV-B-PC₅₀ von Na-humat nach 48-stündiger Exposition sind:

- VA1: 79,4 µg/ml (61,9 – 101,8 µg/ml)
- VA2: 29,5 µg/ml ** (26,9 – 32,4 µg/ml)

Beim Na-humat ist der Unterschied in der UV-B-PW nach 48-stündiger Exposition hochsignifikant (**). In der VA 2 ist eine Konzentration von ca. 30 µg/ml ausreichend, um eine 50 %ige UV-B-Schutzwirkung zu erreichen. Gibt man die HS zu den U937-Zellen in die gleiche Lösung ist die UV-B-Schutzwirkung schlechter.

Das morphologische Bild der bestrahlten U937-Zellen in der VA 1 ist verändert. Sie haben eine etwas geringere Größe als die Kontrollzellen und erscheinen etwas kompakter. Ihre Anzahl und ihr Wachstum scheint nicht beeinträchtigt zu sein. Im Vergleich zu den Zellen in der VA 2 sind sie intensiver angefärbt und kontrastreicher. Dies kann entweder durch eine Anfärbung durch die HS oder durch Veränderungen im Zellinneren begründet sein.

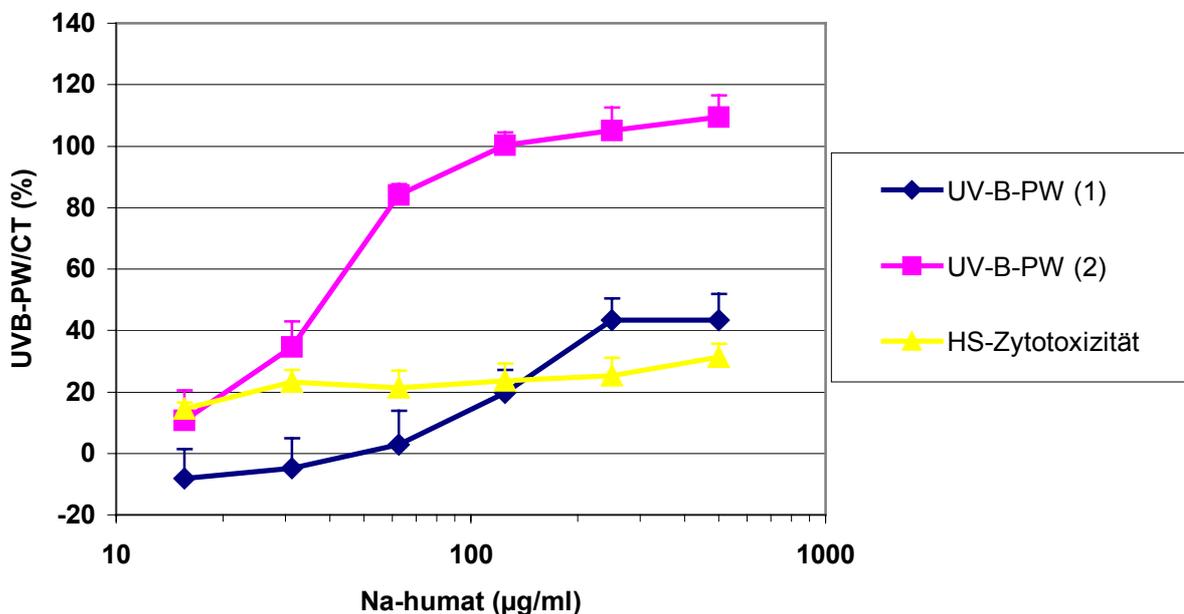


Abb.24: UV-B-protective Wirkung (UV-B-PW) und Zytotoxizität (CT) von Na-humat auf U937-Zellen ($\bar{x} \pm SE$) nach 72-stündiger Exposition
 UV-B-PW (1): 72 h direkte Wirkung von HS auf bestrahlte U937-Zellen (n=3)
 UV-B-PW (2): 72 h indirekte Wirkung von HS auf bestrahlte U937-Zellen (n=3)
 Zytotoxizität nach 72 h HS-Einwirkung auf unbestrahlte U937-Zellen (n=3)

Das Na-humat besitzt im 72 h-Versuch (Abb.24) geringe bis mittlere zytotoxische Effekte. Die Kurve verläuft relativ konstant bei ungefähr 20 bis 25 % im Konzentrationsbereich von 31,25 µg/ml bis zu 250 µg/ml. Bei 500 µg/ml steigt die Zytotoxizität auf über 30 % an. Da die Kurve keinen steilen Anstieg wie charakteristische CT-Kurven zeigt, sondern relativ gleichmäßig parallel der x-Achse verläuft, liegt keine klassisch zytotoxische Wirkung zu Grunde. Wahrscheinlicher ist die Annahme, dass das Na-humat die Proliferation der Zellen begünstigt und nach 72-stündiger Exposition das normale Zellsterben bzw. Apoptose einsetzt. Die UV-B-PW in Anordnung 1 liegt bei 15,6 µg/ml und 31,25 µg/ml unter der 0 %-Grenze, was sich durch einen wachstumshemmenden Effekt von Na-humat erklären würde bzw. eine proliferationsfördernde Wirkung in den ersten 48 h. Danach steigt die UV-B-PW bei 250 µg/ml auf ca. 40 % an und verläuft dann konstant weiter. Auch hier ist der Einfluss von Na-humat für die relativ geringe Schutzwirkung entscheidend. Im Gegensatz dazu zeigt die UV-B-PW der Anordnung 2 einen deutlichen Anstieg der Schutzwirkung auf 100 % bei einer Konzentration von 125 µg/ml. In den höheren Konzentrationen bis zu 500 µg/ml steigt die Kurve bis auf 110 % an.

Die ermittelten UV-B-PC₅₀ von Na-humat nach 72-stündiger Exposition sind:

- VA 1: keine
- VA 2: 36,4 µg/ml (28,6 – 46,2 µg/ml)

Die Kurven der UV-B-PW von Na-humat der VA 1 verlaufen nach 24-stündiger und nach 48-stündiger Exposition identisch. Sie zeigen einen kontinuierlichen Anstieg im Konzentrationsbereich von 15,6 µg/ml bis zu 500 µg/ml, wo die Schutzwirkung vor den UV-B-Strahlen 100 % beträgt. Im 72 h-Versuch verläuft die Kurve zunächst im negativen Bereich und steigt auch bei einer Konzentration von 500 µg/ml nur bis auf 40 % an.

Die CT-Untersuchungen zeigen, dass Na-humat nach 24-stündiger und 48-stündiger Exposition einen leicht wachstumsfördernden Effekt hat. Die Kurven verlaufen in beiden Fällen im negativen Bereich. Die mit Na-humat behandelten Zellen weisen ein besseres Wachstum als die Kontrollzellen auf. Anders verhielten sich die Zellen im 72 h-Versuch. Dort verlief die CT-Kurve bei einer ungefähr 20 %igen CT. Das bedeutet, dass die mit Na-humat behandelten Zellen im Vergleich zu den Kontrollzellen ein vermindertes Wachstum oder eine verminderte Stoffwechselaktivität zeigen. In Kombination mit den CT-Ergebnissen nach 24-stündiger und 48-stündiger Exposition ist aber eher von einer verbesserten Proliferation auszugehen. Da der natürliche Zellzyklus der U937-Zellen ca. 3 Tage beträgt und sie zunächst mit Na-humat schneller wachsen, sterben sie bei längerer Inkubation natürlich auch etwas früher als die Kontrollzellen ab. Aus den Ergebnissen der CT und auch der UV-B-PW in VA 1 nach 72-stündiger Exposition kann ein um einen Tag verkürzter Zellzyklus in Gegenwart von Na-humat im untersuchten Konzentrationsbereich angenommen werden.

Nur geringe Differenzen zeigen die UV-B-PW in der VA 2. Der Schutzeffekt steigt in den Konzentrationen bis 62,5 µg/ml auf über 80 % an und nimmt dann bei Konzentrationen bis zu 500 µg/ml Werte von ca. 100 % an.

Das Na-humat hat nach Jelinek (1996) zytotoxische Effekte. Nach 1-stündiger Exposition ist die CC_{50} 4160 µg/ml und nach 24 h 660 µg/ml. Die CT des Na-humat war in unseren Versuchen geringer, eine 50 % CT konnte nicht ermittelt werden. Allerdings könnten die Ergebnisse nach 72-stündiger Exposition auch darauf hindeuten, dass die Substanz nicht völlig untoxisch ist. Jelinek fand, dass sich selbst bei einer mit dem EZ4U-Test ermittelten 100 % CT noch einige Zellen mit Trypanblau anfärben ließen. Sie sahen gesund und völlig unverändert aus und lebten noch. Außerdem konnte gezeigt werden, dass Na-humat eine Wachstumshemmung der U937-Zellen bewirkt. Dies könnte erklären, weswegen der UV-B-Schutz in den VA 1 schlechter ist als in der VA 2. Die UV-B-Strahlung wird zwar genauso gut abgeblockt, aber die Zellen sind in der HS-Lösung in ihrem Wachstum behindert.

3.3.5. Huminsäure Ammoniumhumat

Die zweite aus dem Naturmoor bei Dierhagen stammende HS wurde ebenfalls auf ihre Zytotoxizität und ihre UV-B-protective Wirkung in zwei Versuchsanordnungen untersucht. Als Expositionszeiten wurden 24 h, 48 h und 72 h getestet.

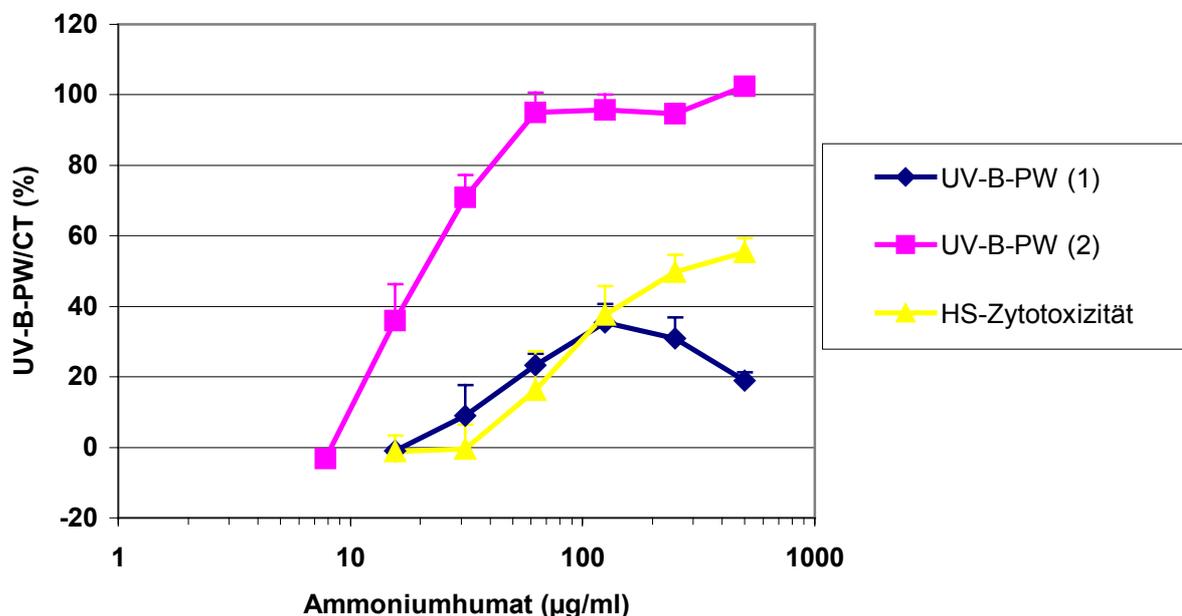


Abb.25: UV-B-protective Wirkung (UV-B-PW) und Zytotoxizität (CT) von

Ammoniumhumat auf U937-Zellen ($\bar{x} \pm SE$) nach 24-stündiger Exposition

UV-B-PW (1): 24 h direkte Wirkung von HS auf bestrahlte U937-Zellen (n=3)

UV-B-PW (2): 24 h indirekte Wirkung von HS auf bestrahlte U937-Zellen (n=5)

Zytotoxizität nach 24 h HS-Einwirkung auf unbestrahlte U937-Zellen (n=4)

NH₄-humat (Abb.25) zeigt einen konzentrationsabhängigen Anstieg der CT. Im Konzentrationsbereich bis zu 31,25 µg/ml ist NH₄-humat im 24 h-Versuch nicht zytotoxisch. Danach steigt die CT bis auf über 50 % bei einer Konzentration von 500 µg/ml an. Die ermittelte CC₅₀ beträgt 242,5 µg/ml.

In der VA 1 zeigt die Kurve der UV-B-PW einen Anstieg bis zu ca. 35 % und fällt dann in den höheren Konzentrationsbereichen bis 500 µg/ml wieder ab. Der Abfall begründet sich mit dem Anstieg der CT in diesem Konzentrationsbereich.

In der VA 2 steigt die Kurve der UV-B-PW ab einer Konzentration von 7,8 µg/ml sehr steil bis auf ca. 90 % bei einer Konzentration von 62,5 µg/ml an und verläuft dann konstant weiter. Der maximale UV-B-protective Schutz ist bei einer Konzentration von 62,5 µg/ml erreicht.

Die ermittelten UV-B-PC₅₀ von Ammoniumhumat nach 24-stündiger Exposition sind:

- VA 1: keine
- VA 2: 21,6 µg/ml (17,1 – 27,4 µg/ml)

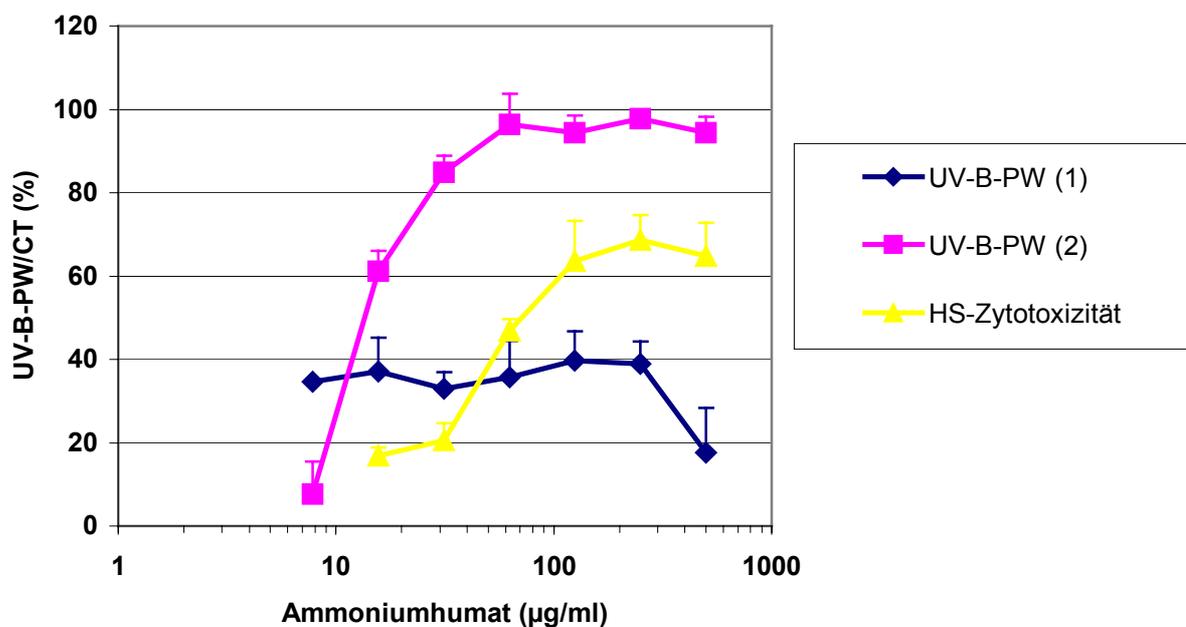


Abb.26: UV-B-protective Wirkung (UV-B-PW) und Zytotoxizität (CT) von

Ammoniumhumat auf U937-Zellen ($\bar{x} \pm SE$) nach 48-stündiger Exposition

UV-B-PW (1): 48 h direkte Wirkung von HS auf bestrahlte U937-Zellen (n=4)

UV-B-PW (2): 48 h indirekte Wirkung von HS auf bestrahlte U937-Zellen (n=7)

Zytotoxizität nach 48 h HS-Einwirkung auf unbestrahlte U937-Zellen (n=3)

NH₄-humat besitzt auch nach 48-stündiger Exposition (Abb.26) eine zytotoxische Wirkung auf die U937-Zellen. Dabei liegt die ermittelte zytotoxische Wirkung bei einer Konzentration von 15,6 µg/ml unter 20 % und steigt dann auf über 60 % in den Konzentrationsbereichen größer 125 µg/ml an. Die ermittelte CC₅₀ ist 88,4 µg/ml. Dabei zeigt der zytotoxische Effekt

im Konzentrationsbereich von 125 bis 500 $\mu\text{g/ml}$ keine weitere Zunahme. Der zytotoxische Effekt spiegelt sich auch in der Kurve der UV-B-PW der VA 1 wieder. Diese verläuft im Konzentrationsbereich von 7,8 $\mu\text{g/ml}$ bis zu 250 $\mu\text{g/ml}$ unter 40 % nahezu konstant und fällt dann bei 500 $\mu\text{g/ml}$ ab. Dabei überlagern bzw. potenzieren sich die zellschädigenden Wirkungen der Bestrahlung mit UV-B-Licht und der Eigenzytotoxizität von NH_4 -humat. Es ist möglich, dass die geringe Zytotoxizität der HS bei niedrigen Konzentrationen durch eine UV-B-Bestrahlung erhöht wird bzw. die Strahlen bei vorgeschädigten Zellen eine größere Schädigung haben. Die toxische Strahlenwirkung dominiert im Konzentrationsbereich bis 31,25 $\mu\text{g/ml}$, die CT von NH_4 -humat im Bereich bis 500 $\mu\text{g/ml}$.

In der VA 2 zeigt sich, dass NH_4 -humat in der Konzentration von 7,8 $\mu\text{g/ml}$ noch keinen UV-B-protectiven Effekt besitzt. Dieser nimmt bei höheren Konzentrationen stark zu und beträgt ab einer Konzentration von 62,5 $\mu\text{g/ml}$ ca. 100 %.

Die ermittelten UV-B-PC₅₀ von Ammoniumhumat nach 48-stündiger Exposition sind:

- VA 1: keine
- VA 2: 15,2 $\mu\text{g/ml}$ (13,8 – 16,8 $\mu\text{g/ml}$)

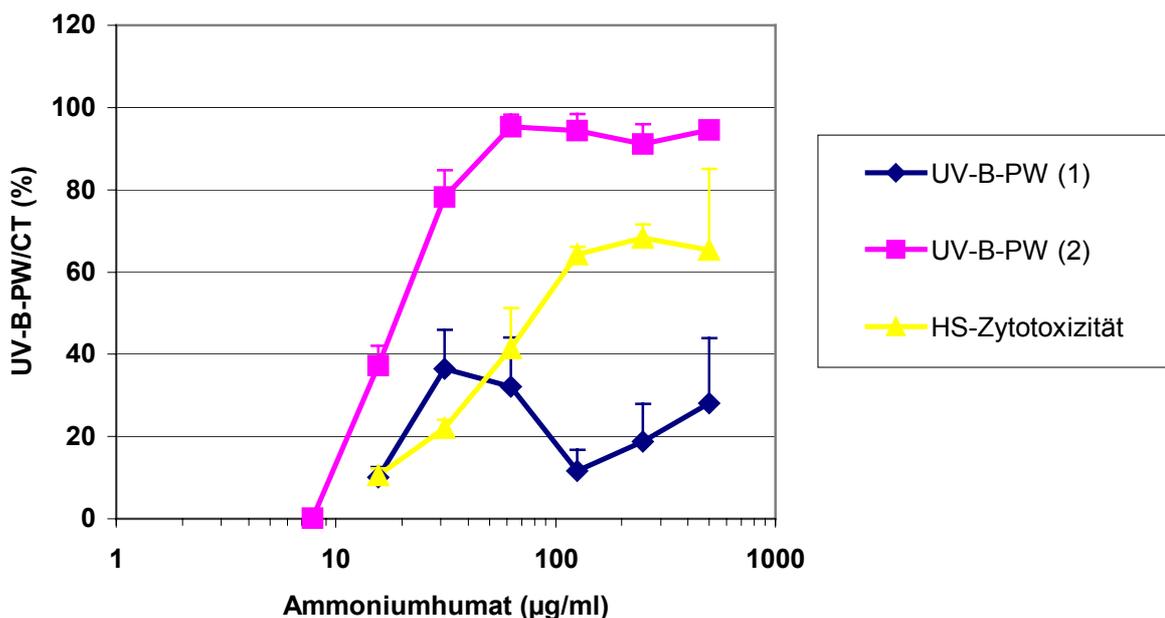


Abb.27: UV-B-protective Wirkung (UV-B-PW) und Zytotoxizität (CT) von

Ammoniumhumat auf U937-Zellen ($\bar{x} \pm \text{SE}$) nach 72-stündiger Exposition

UV-B-PW (1): 72 h direkte Wirkung von HS auf bestrahlte U937-Zellen (n=3)

UV-B-PW (2): 72 h indirekte Wirkung von HS auf bestrahlte U937-Zellen (n=4)

Zytotoxizität nach 72 h HS-Einwirkung auf unbestrahlte U937-Zellen (n=3)

NH_4 -humat weist im 72 h-Versuch (Abb.27) nahezu die gleiche CT-Kurve wie im 48 h-Versuch auf. Die CT steigt bis zu einer Konzentration von 125 $\mu\text{g/ml}$ bis auf über 60 % an

und bleibt bis zu 500 µg/ml nahezu konstant. Die ermittelte CC₅₀ liegt bei 81,5 µg/ml. Die UV-B-PW in VA 1 liegt bei einer Konzentration von 15,6 µg/ml bei ungefähr 10 %, steigt dann auf Werte über 30 % an. Im Konzentrationsbereich über 62,5 µg/ml schwankt die Kurve der UV-B-PW zwischen 10 % und 30 %. Die Schwankungen liegen in den toxischen Effekten der UV-B-Strahlung und der CT von NH₄-humat begründet.

Die UV-B-PW von NH₄-humat konnte in der VA 2 nachgewiesen werden. Auch im 72 h-Versuch steigt die Kurve von 0 % bei einer Konzentration von 7,8 µg/ml auf ca. 100 % ab einer Konzentration von 62,5 µg/ml an.

Die ermittelten UV-B-PC₅₀ von Ammoniumhumat nach 72-stündiger Exposition sind:

- VA 1: keine
- VA 2: 18,7 µg/ml (16,0 – 21,8 µg/ml)

Die CT von NH₄-humat nimmt mit steigender Expositionsdauer zu. Im 24 h-Versuch nimmt die CT konzentrationsabhängig zu und erreicht erst im Konzentrationsbereich über 250 µg/ml die 50 %-Grenze. Die CT bei 48- und 72-stündiger Exposition ist nahezu identisch, steigt aber im untersuchten Konzentrationsbereich bis 500 µg/ml nicht über 70 % an, sondern verläuft ab einer Konzentration von 125 µg/ml nahezu konstant.

Die ermittelten CC₅₀ von Ammoniumhumat sind:

- VA 4 nach 24-stündiger Exposition: 242,5 µg/ml (154,2 – 381,5 µg/ml)
- VA 4 nach 48-stündiger Exposition: 88,4 µg/ml (58,0 – 134,7 µg/ml)
- VA 4 nach 72-stündiger Exposition: 81,5 µg/ml (67,9 – 97,7 µg/ml)

Die UV-B-PW erreicht in der VA 1 nach 24-, 48- und 72-stündiger Exposition nicht die Grenze 50 %iger Zytotoxizität. Die Kurven spiegeln die zytotoxischen Effekte von NH₄-humat und die der UV-B-Strahlung wieder. In den niedrigen Konzentrationen bis 62,5 µg/ml wird die Zytotoxizität eher durch die Strahlung verursacht; in den höheren Konzentrationen größer 62,5 µg/ml steht die Toxizität der Huminsäure im Vordergrund. Eventuell ist die Substanztoxizität auf bestrahlte U937-Zellen noch etwas größer als auf unbestrahlte Zellen.

In der VA 2 kann nach 24-, 48- und 72-stündiger Exposition die UV-B-protective Wirkung gezeigt werden. Die Kurven verlaufen sehr ähnlich. Sie steigen im Konzentrationsbereich zwischen 7,8 µg/ml und 125 µg/ml von 0 % auf knapp 100 % an und verlaufen dann konstant weiter.

NH₄-humat besitzt zytotoxische Effekte. Die bestrahlten und mit NH₄-humat behandelten U937-Zellen zeigen morphologische Veränderungen, die nicht immer eindeutig einem der beiden schädigenden Einflüsse zugeordnet werden können. Während die strahlengeschädigten U937-Zellen bei niedrigen HS-Konzentrationen zerfallen und lysiert

sind, zeigen die durch die HS geschädigten Zellen eher Schrumpfungen, Verklumpungen und eine Kondensation. Wenige Zellen sehen noch rund und glatt aus. Die meisten zeigen Abflachungen und haben eine eckige Form. Einige sind zusammengezogen oder zerfallen. Die HS ist im höheren Konzentrationsbereich nach Inkubation nicht mehr völlig gelöst, sondern erscheint unter dem Mikroskop gerüstartig.

3.3.6. Huminsäure Aldrich

Die HS Aldrich wurde auf ihre zytotoxische und ihre UV-B-protective Wirkung in zwei verschiedenen Versuchsanordnungen untersucht. Es wurde der 24- und der 48-stündige Expositionszeitraum getestet.

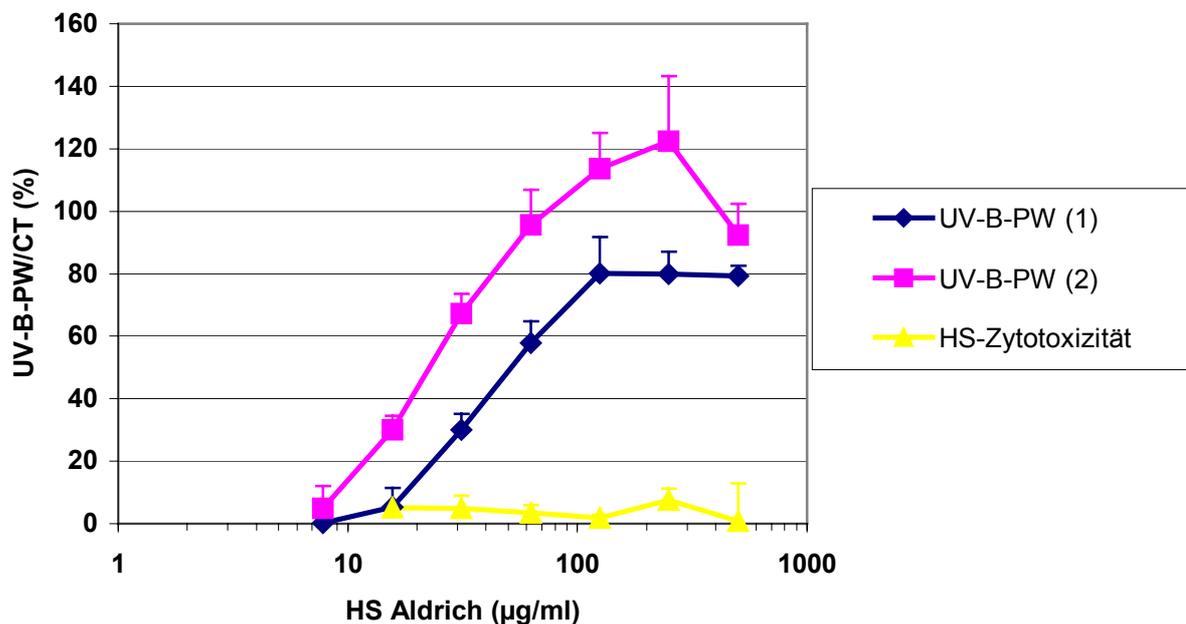


Abb.28: UV-B-protective Wirkung (UV-B-PW) und Zytotoxizität (CT) von HS Aldrich auf U937-Zellen ($\bar{x} \pm SE$) nach 24-stündiger Exposition
 UV-B-PW (1): 24 h direkte Wirkung von HS auf bestrahlte U937-Zellen (n=4)
 UV-B-PW (2): 24 h indirekte Wirkung von HS auf bestrahlte U937-Zellen (n=4)
 Zytotoxizität nach 24 h HS-Einwirkung auf unbestrahlte U937-Zellen (n=3)

Die HS Aldrich (Abb.28) ist im Konzentrationsbereich von 15,6 µg/ml bis zu 500 µg/ml völlig untoxisch.

Die UV-B-PW ist in der VA 1 nachweisbar. Sie steigt ab einer Konzentration von 15,6 µg/ml bis zu einer Konzentration von 125 µg/ml an und verläuft dann konstant. Die maximale UV-B-PW liegt in der VA 1 bei 80 %.

In der VA 2 steigt die Kurve der UV-B-PW bereits ab einer Konzentration von 7,8 µg/ml an. Bei 62,5 µg/ml erreicht sie ca. 100 %, steigt in den Konzentrationen von 125 µg/ml bis 250 µg/ml auf ca. 120 % und sinkt bei 500 µg/ml wieder auf ca. 90 % ab. Insgesamt ist die Kurve

der UV-B-PW der VA 2 nach links und nach oben gegenüber der VA 1 verschoben, was auf einen effektiveren Schutz in der VA 2 hinweist.

Die ermittelten UV-B-PC₅₀ der HS Aldrich nach 24-stündiger Exposition sind:

- VA 1: 51,2 µg/ml (38,7 – 68,6 µg/ml)
- VA 2: 23,2 µg/ml * (18,4 – 29,2 µg/ml)

Der UV-B-Schutz ist in der Anordnung 2 signifikant (*) besser als in der Anordnung 1.

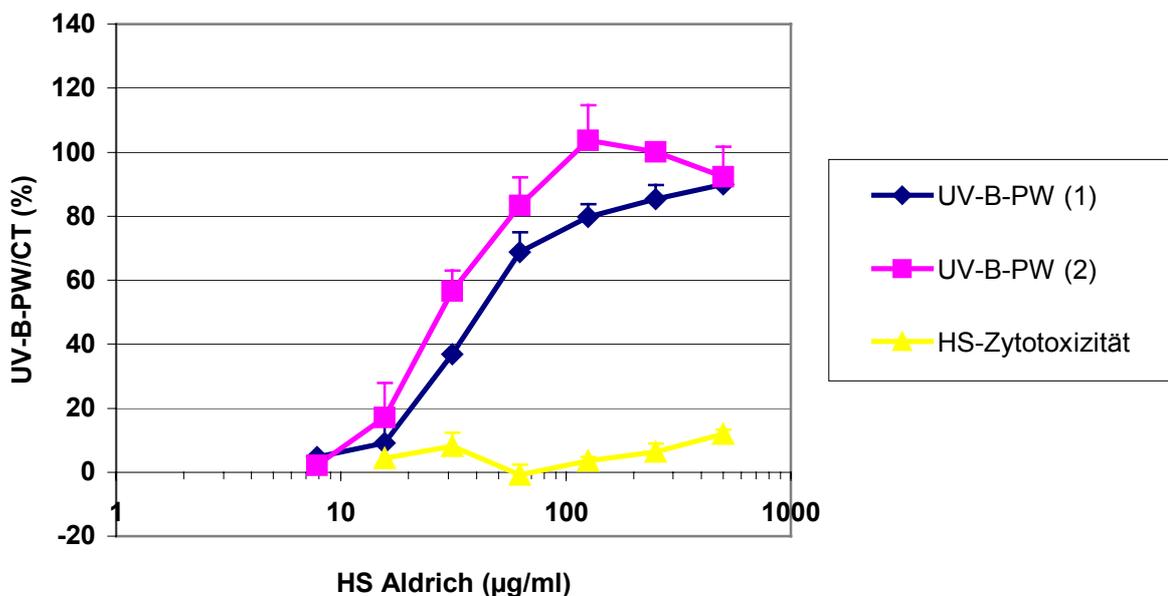


Abb.29: UV-B-protective Wirkung (UV-B-PW) und Zytotoxizität (CT) von

HS Aldrich auf U937-Zellen ($\bar{x} \pm SE$) nach 48-stündiger Exposition

UV-B-PW (1): 48 h direkte Wirkung von HS auf bestrahlte U937-Zellen (n=4)

UV-B-PW (2): 48 h indirekte Wirkung von HS auf bestrahlte U937-Zellen (n=4)

Zytotoxizität nach 48 h HS-Einwirkung auf unbestrahlte U937-Zellen (n=3)

Die HS Aldrich zeigt nach einer 48-stündigen Exposition (Abb.29) sehr geringe zytotoxische Wirkung auf U937-Zellen. Sie liegt bei einer Konzentration von 500 µg/ml zwischen 10 % und 15 %.

Die UV-B-PW in VA 1 steigt ähnlich wie nach der 24-stündigen Exposition zwischen 15,6 und 125 µg/ml auf ungefähr 80 % an. Der maximale UV-B-Schutz erreicht bei einer Konzentration von 500 µg/ml ca. 90 %.

Die UV-B-PW in VA 2 steigt zwischen 7,8 µg/ml und 125 µg/ml auf 100 % an und verläuft dann mit einem leichten Abfall bis auf 95 %. Auch in der VA 2 lässt sich die bessere UV-B-PW in VA 2 gegenüber VA 1 zeigen. Der Unterschied ist nicht so deutlich wie nach 24-stündiger Exposition.

Die ermittelten UV-B-PC₅₀ der HS Aldrich nach 48-stündiger Exposition sind:

- VA 1: 44,3 µg/ml (39,6 – 49,5 µg/ml)
- VA 2: 26,3 µg/ml * (21,0 – 33,0 µg/ml)

In beiden untersuchten Expositionsintervallen ist die UV-B-PW in der VA 2 signifikant (*) besser als in der VA 1. Da die HS Aldrich in Lösung eine aufgeschlämmte, trübe Lösung bildet, könnte es sein, dass ein Teil der Strahlung in der VA 2 durch kleine Partikel gestreut oder reflektiert wird. Dieser UV-B-protective Effekt stellt die Grundlage der physikalischen Schutzwirkung dar. Eine geringe Bestrahlung bzw. längerwellige Anteile können eine Anregung des Wachstums und des Stoffwechsels bewirken.

3.4. Zytotoxizität und UV-B-protective Wirkung von synthetisch hergestellten

Huminsäuren

Neben den natürlich vorkommenden HS kann man HS auch auf synthetischem Wege herstellen. Dazu polymerisiert man die monomeren Ausgangsverbindungen nach einer speziellen Vorschrift und erhält durch Variation der zugegebenen Laugen, z.B. Natronlauge oder Kalilauge, die verschiedenen Salzformen. Die Strukturen der hergestellten Verbindungen hängen von den Ausgangssubstanzen wie z.B. der Kaffeesäure oder Hydrokaffeesäure, den Polymerisationsbedingungen und den zugegebenen Basen ab. So müssen bestimmte Temperaturen und pH-Werte eingehalten werden.

3.4.1. Kaffeesäure-Oxidationsprodukt, Na-Salz (Na-KOP)

Na-KOP wurde hinsichtlich seiner Zytotoxizität und seiner UV-B-protectiven Eigenschaften an U937-Zellen nach 24-, 48- und 72-stündiger Exposition untersucht. Die Versuchsanordnungen der UV-B-PW wurden variiert, um den Mechanismus der UV-B-Schutzwirkung charakterisieren zu können. Dabei wurden zum einen die Zellen und die HS getrennt voneinander pipettiert und zum anderen der Zeitpunkt verändert, an dem die HS zugegeben wurden. Werden die HS erst nach der Bestrahlung hinzupipettiert, schließt man UV-B-Schutzeffekte durch eine absorptive Wirkung aus. Es kommen praktisch nur pharmakologische Wirkungen, wie z.B. antientzündliche, antioxidative oder membran-stabilisierende, in Betracht. Werden die HS zuerst bestrahlt und erst im Anschluss mit den Zellen versetzt, kann man prüfen, ob sich die HS bei Bestrahlung verändern und sich möglicherweise zytotoxische Abbauprodukte bilden.

Wie in Abbildung 30 dargestellt, liegt die CT von Na-KOP nach 24-stündiger Exposition im Konzentrationsbereich von 15,6 µg/ml bis 250 µg/ml zwischen 10 % und 15 %. Bei 500 µg/ml steigt die CT auf über 25 % an. Die UV-B-PW in VA 1 steigt steil im Konzentrationsbereich von 15,6 µg/ml und 125 µg/ml an. Sie erreicht bei 125 µg/ml bis 250 µg/ml über 100 % und fällt dann auf ca. 100 % wieder ab.

Die UV-B-PW in VA 2 steigt ebenfalls sehr steil im Bereich von 15,6 µg/ml und 125 µg/ml bis auf 110 % an und fällt dann bei 500 µg/ml wieder auf 95 % ab. Die Kurve der UV-B-PW in der VA 3 schwankt zwischen -10 % bei 15,6 µg/ml und 20 % bei 500 µg/ml. Man kann aber keine UV-B-protective Wirkung ableiten. In der VA 5 dagegen ist ein sehr effektiver UV-B-Schutz nachweisbar. Die UV-B-PW steigt von 0 % bei einer Konzentration von 7,8 µg/ml auf über 120 % bei 250 µg/ml an. Insgesamt verläuft die Kurve in der VA 5 über denen der VA 1 und 2. Die CT-Kurve der VA 6 ist im Konzentrationsbereich von 15,6 µg/ml bis zu 62,5 µg/ml mit der der VA 4 identisch. Danach steigt sie etwas mehr an als die Kurve der VA 4. Bei

einer Konzentration von 500 µg/ml werden CT-Werte von über 30 % erreicht. Es ist aber davon auszugehen, dass sich keine zytotoxischen Abbauprodukte gebildet haben.

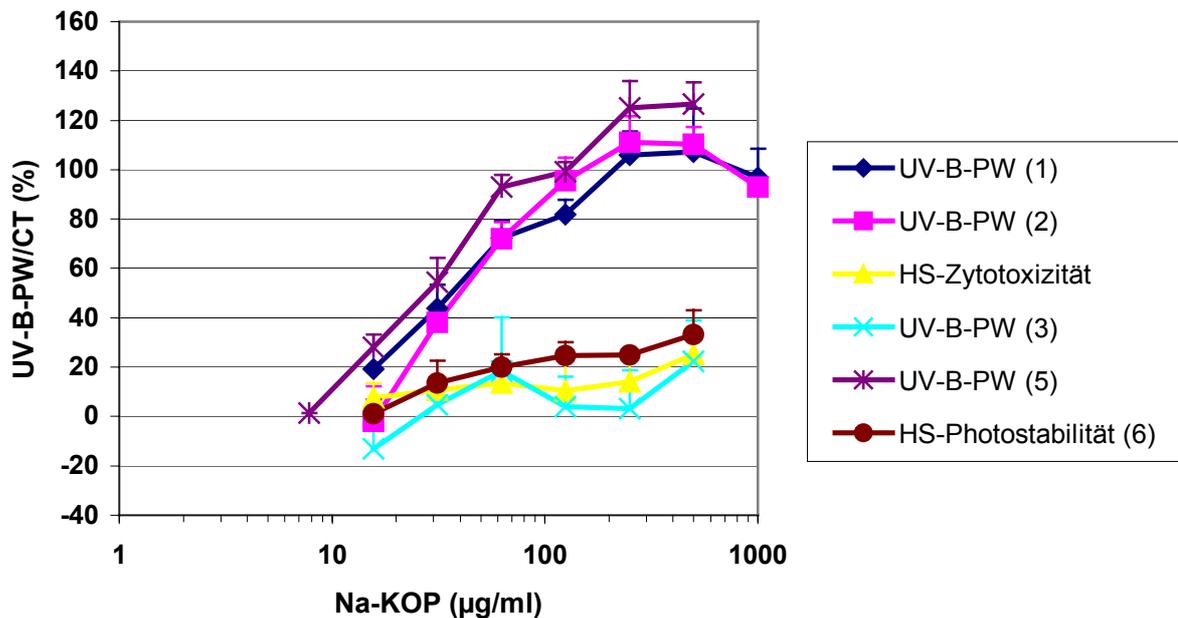


Abb.30: UV-B-protective Wirkung (UV-B-PW) und Zytotoxizität (CT) von

Na-KOP auf U937-Zellen ($\bar{x} \pm SE$) nach 24-stündiger Exposition

UV-B-PW (1): 24 h direkte Wirkung von HS auf bestrahlte U937-Zellen (n=4)

UV-B-PW (2): 24 h indirekte Wirkung von HS auf bestrahlte U937-Zellen (n=4)

Zytotoxizität nach 24 h HS-Einwirkung auf unbestrahlte U937-Zellen (n=5)

UV-B-PW (3): 24 h direkte Wirkung von HS auf zuvor bestrahlte U937-Zellen (n=4)

UV-B-PW (5): 24 h direkte Wirkung von HS auf 1 h exponierte und danach bestrahlte U937-Zellen (n=3)

Photostabilität der HS (n=6)

Die ermittelten UV-B-PC₅₀ von Na-KOP nach 24-stündiger Exposition sind:

- VA 1: 35,4 µg/ml (31,6 – 39,7 µg/ml)
- VA 2: 40,4 µg/ml (35,4 – 46,2 µg/ml)
- VA 5: 25,8 µg/ml (21,4 – 31,1 µg/ml)

Jelinek (1996) untersuchte die Zytotoxizität von KOP an U937-Zellen mit dem EZ4U-Test und ermittelte eine CC₅₀ nach 1-stündiger Exposition von 210 µg/ml und nach 24-stündiger Exposition von 200 µg/ml. In unseren Versuchen zeigte sich nur ein Anstieg der CT bis auf maximal 30 % bei 500 µg/ml und 24-stündiger Exposition. Das von mir hergestellte Na-KOP erwies sich als untoxischer, besitzt aber dennoch geringe zytotoxische Effekte. Jelinek fand, dass KOP eine Wachstumshemmung der U937-Zellen bewirkt. In diesem Sinne könnte man auch die Effekte unseres Na-KOP deuten, weil die Kurve der CT nur allmählich ansteigt und nicht den typischen sprunghaften, sigmoiden Verlauf zeigt.

Die morphologischen Veränderungen der Zellen unter dem Einfluss von Na-KOP deuten auch eher auf wachstumshemmende und nur geringe zytotoxische Effekte hin. Die Zellen erscheinen bei hohen HS-Konzentrationen im allgemeinen noch intakt. Zellbruchstücke treten nur ganz vereinzelt auf. Die Zellen erscheinen kontrastreicher, was aber auch durch die Anfärbung durch die braune HS bedingt sein kann. Die Membranen sind nicht glattrandig, sondern etwas zerfurcht. Die Zellen haben z.T. Ecken und kleine Ausstülpungen und sind insgesamt kleiner als die Kontrollzellen.

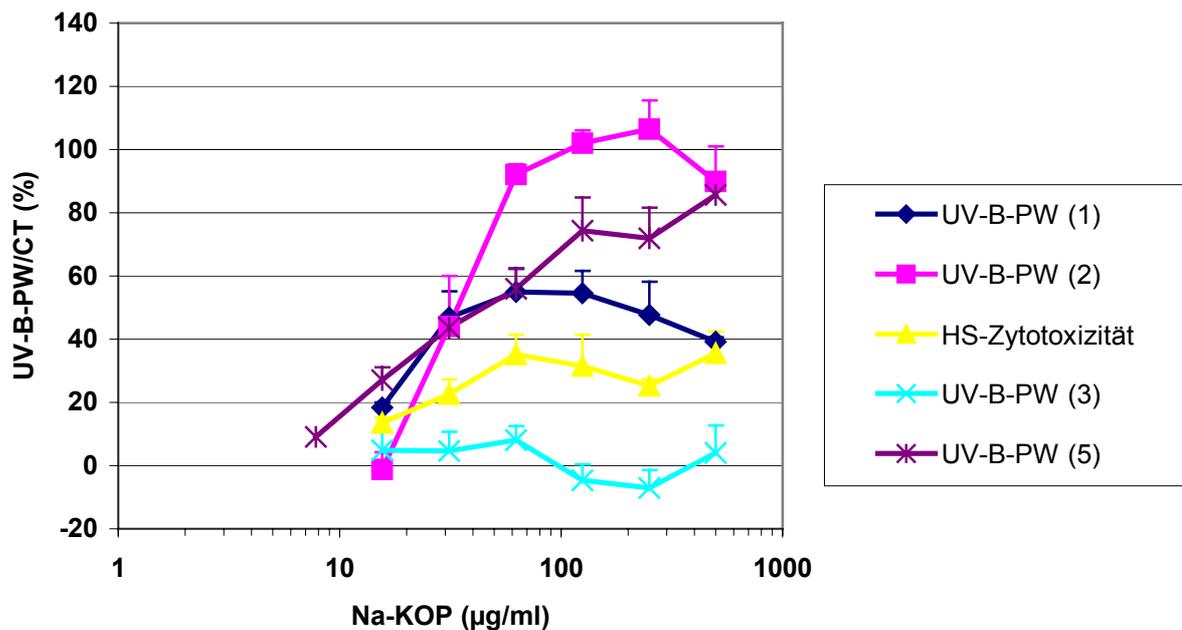


Abb.31: UV-B-protective Wirkung (UV-B-PW) und Zytotoxizität (CT) von

Na-KOP auf U937-Zellen ($\bar{x} \pm SE$) nach 48-stündiger Exposition

UV-B-PW (1): 48 h direkte Wirkung von HS auf bestrahlte U937-Zellen (n=3)

UV-B-PW (2): 48 h indirekte Wirkung von HS auf bestrahlte U937-Zellen (n=4)

Zytotoxizität nach 48 h HS-Einwirkung auf unbestrahlte U937-Zellen (n=3)

UV-B-PW (3): 48 h direkte Wirkung von HS auf zuvor bestrahlte U937-Zellen (n=3)

UV-B-PW (5): 48 h direkte Wirkung von HS auf 1 h exponierte und danach bestrahlte U937-Zellen (n=5)

Die CT (Abb.31) von Na-KOP liegt nach 48-stündiger Exposition bei einer Konzentration von 15,6 µg/ml bei 15 %, steigt dann bei 62,5 µg/ml auf über 30 % an und verläuft dann bis zu 500 µg/ml annähernd gleichbleibend. Die UV-B-PW in der VA 1 steigt bei 31,25 µg/ml auf knapp 50 % an und verläuft dann konstant bei 50 % bis 55 % bis zu 250 µg/ml. Anschließend fällt sie bei 500 µg/ml auf 40 % wieder ab. Eine deutliche UV-B-Schutzwirkung lässt sich in der VA 2 nachweisen. Man findet einen steilen Anstieg der UV-B-PW im Konzentrationsbereich von 15,6 µg/ml bis zu 62,5 µg/ml von 0 % bis auf 90 %. Bei höheren Konzentrationen bleibt der UV-B-Schutz bestehen. In der VA 3 konnte keine UV-B-PW

nachgewiesen werden. Die ermittelte Kurve verläuft im gesamten Konzentrationsbereich von 15,6 µg/ml bis zu 500 µg/ml entlang der 0 %-Linie. In der VA 5 ist ein guter UV-B-Schutz nachweisbar. Die Kurve steigt bis auf 75 % bei einer Konzentration von 125 µg/ml an. Bei 500 µg/ml erreicht sie ihren maximalen UV-B-Schutz mit ca. 85 %. Die Kurve der VA 5 verläuft im Konzentrationsbereich von 62,5 µg/ml bis zu 500 µg/ml zwischen denen der VA 1 und 2. Die ermittelten UV-B-PC₅₀ von Na-KOP nach 48-stündiger Exposition sind:

- VA 1: 62,7 µg/ml (39,5 – 99,4 µg/ml)
- VA 2: 35,9 µg/ml (28,6 – 45,2 µg/ml)
- VA 5: 70,8 µg/ml (38,9 – 129,0 µg/ml)

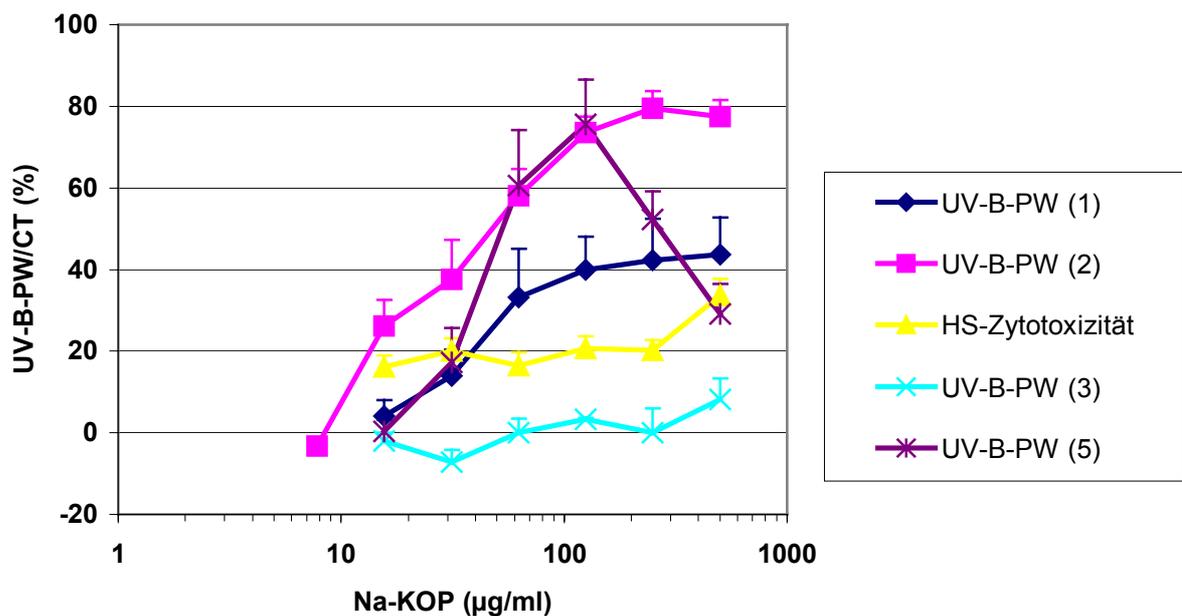


Abb.32: UV-B-protective Wirkung (UV-B-PW) und Zytotoxizität (CT) von Na-KOP auf U937-Zellen ($\bar{x} \pm SE$) nach 72-stündiger Exposition

UV-B-PW (1): 72 h direkte Wirkung von HS auf bestrahlte U937-Zellen (n=3)

UV-B-PW (2): 72 h indirekte Wirkung von HS auf bestrahlte U937-Zellen (n=4)

Zytotoxizität nach 72 h HS-Einwirkung auf unbestrahlte U937-Zellen (n=5)

UV-B-PW (3): 72 h direkte Wirkung von HS auf zuvor bestrahlte U937-Zellen (n=3)

UV-B-PW (5): 72 h direkte Wirkung von HS auf 1 h exponierte und danach bestrahlte U937-Zellen (n=4)

Die CT von Na-KOP (Abb.32) nach 72-stündiger Exposition beträgt im Konzentrationsbereich von 15,6 µg/ml und 250 µg/ml ca. 20 % und steigt bei 500 µg/ml auf über 30 % an.

Die UV-B-PW in VA 1 zeigt einen flachen Anstieg von 0 % auf über 40 % im Konzentrationsbereich von 15,6 µg/ml bis zu 500 µg/ml.

Die UV-B-PW in VA 2 steigt von 0 % bei 7,8 µg/ml auf 80 % bei 250 µg/ml allmählich an und bleibt dann bis zu 500 µg/ml auf dem 80 %-Niveau.

In der VA 3 ist auch nach der 72-stündigen Exposition keine UV-B-protective Wirkung nachweisbar. Die Kurve verläuft im Konzentrationsbereich von 15,6 µg/ml bis zu 250 µg/ml entlang der 0 %-Linie und steigt bei 500 µg/ml auf 10 % an.

Die Kurve der UV-B-PW in der VA 5 zeigt einen sehr steilen Anstieg im Konzentrationsbereich von 15,6 µg/ml bis zu 125 µg/ml von 0 % auf 75 %. Danach fällt die UV-B-PW wieder steil ab bis auf 30 % bei 500 µg/ml.

Die ermittelten UV-B-PC₅₀ von Na-KOP nach 72-stündiger Exposition sind:

- VA 1: keine
- VA 2: 48,8 µg/ml (35,3 – 66,5 µg/ml)
- VA 5: 51,0 µg/ml (35,4 – 73,3 µg/ml)

Die Kurven der CT von Na-KOP zeigen nach 24-, 48- und 72-stündiger Exposition einen leichten Anstieg von 15,6 µg/ml bis zu 500 µg/ml. Der flache Verlauf der CT-Kurve lässt eher auf einen wachstumshemmenden als einen zytotoxischen Effekt schließen. Die Kurvenzüge scheinen bei zunehmender Inkubationsdauer um 5 % bis 10 % nach oben verschoben zu sein. Auch die morphologischen Betrachtungen der U937-Zellen deuten auf keine massiven zytotoxischen Effekte hin. Die HS bewirkt, dass die Zellen etwas kleiner und vor allem kontrastreicher erscheinen. Sie haben nicht mehr die lose Träubchenstruktur, sondern scheinen durch die HS bei höheren Konzentrationen regelrecht fixiert zu sein. Auch beim leichten Schwenken schwimmen sie nicht lose in der Lösung. Die Membranen sind dunkler und die Zellen generell etwas eckiger.

Entsprechend der mittelgradigen zytotoxischen Effekte flachen die Kurven der UV-B-PW in der VA 1 bei zunehmender Inkubationsdauer nach unten ab. Der maximale UV-B-protective Schutz liegt nach 24-stündiger Exposition bei über 100 %, nach 48-stündiger Exposition liegt er unter 80 % und nach 72-stündiger Exposition unter 50 %.

Dagegen lässt sich die UV-B-PW in der VA 2 gut nachweisen. Nach 24- und 48-stündiger Exposition zeigen die Kurven einen steilen Anstieg auf über 100 %. Nach 72-stündiger Exposition ist nur ein etwas flacherer Anstieg bis auf 80 % zu sehen.

In der VA 3 konnte keine UV-B-PW nachgewiesen werden. Je nach CT von Na-KOP und der Konzentration schwanken die Werte um die 0 %-Marke. Wenn die U937-Zellen durch die UV-B-Strahlen geschädigt sind, kann die Schädigung durch die Zugabe von Na-KOP nicht mehr behoben werden.

Eine gute UV-B-PW hat sich in der VA 5 gezeigt. Der Schutz ist etwas effektiver als in der VA 1. Auch in dieser Anordnung ist der leicht zytotoxische Effekt von Na-KOP zu beobachten.

3.4.2. Kaffeesäure-Oxidationsprodukt, K-Salz (K-KOP)

K-KOP wurde auf seine zytotoxischen und UV-B-protectiven Eigenschaften in insgesamt drei verschiedenen Versuchsanordnungen nach 24-stündiger Exposition untersucht. Zusätzlich wurde K-KOP bestrahlt und mit Zellen versetzt, um auf zytotoxische Abbauprodukte zu prüfen (VA 6).

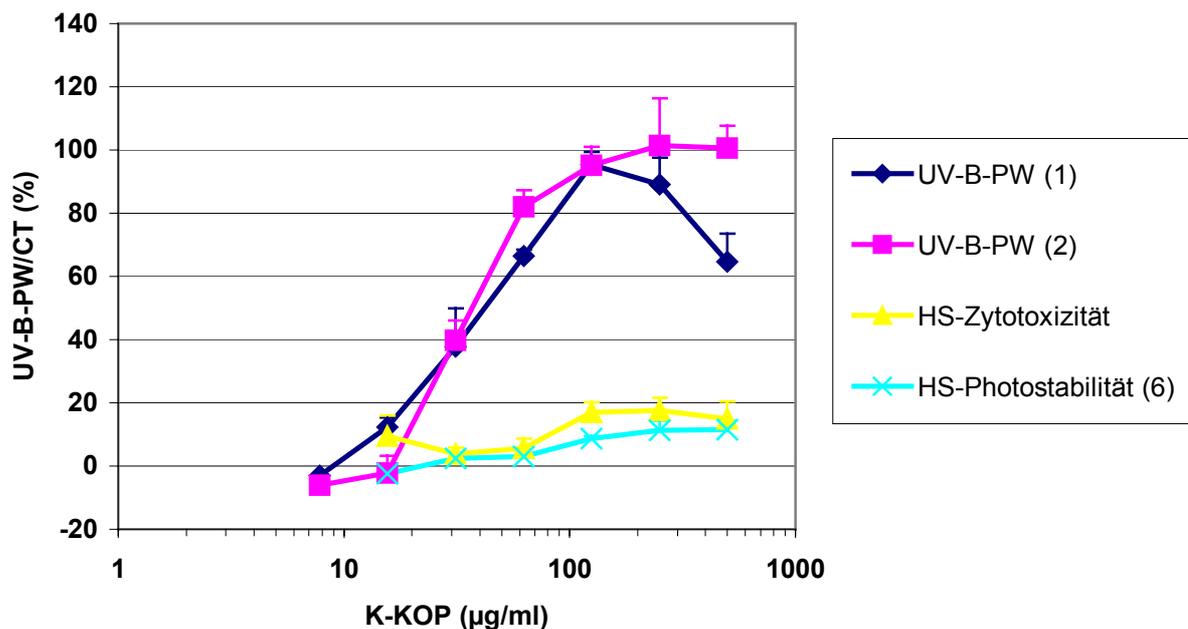


Abb.33: UV-B-protective Wirkung (UV-B-PW) und Zytotoxizität (CT) von

K-KOP auf U937-Zellen ($\bar{x} \pm SE$) nach 24-stündiger Exposition

UV-B-PW (1): 24 h direkte Wirkung von HS auf bestrahlte U937-Zellen (n=5)

UV-B-PW (2): 24 h indirekte Wirkung von HS auf bestrahlte U937-Zellen (n=3)

Zytotoxizität nach 24 h HS-Einwirkung auf unbestrahlte U937-Zellen (n=3)

Photostabilität der HS (n=3)

K-KOP (Abb.33) zeigt im 24 h-Versuch leichte zytotoxische oder wachstumshemmende Eigenschaften im Konzentrationsbereich über 62,5 µg/ml. Die Kurve verläuft unterhalb von 20 %iger CT.

Die Kurve der UV-B-PW in der VA 1 steigt im Konzentrationsbereich von 7,8 µg/ml bis zu 125 µg/ml von 0 % auf eine 95 %ige Schutzwirkung an. Danach fällt sie auf unter 70 % bei einer Konzentration von 500 µg/ml wieder ab. Dieser Abfall der UV-B-PW liegt in der ungefähr 20 %igen CT von K-KOP bei dieser Konzentration begründet. Die UV-B-PW in der VA 2 steigt im Konzentrationsbereich von 15,6 µg/ml bis zu 125 µg/ml steil an und erreicht

fast 100 %. Anschließend verläuft sie bis zu 500 µg/ml bei 100 % konstant. Der Anstieg der Kurve in VA 2 ist steiler als der in VA 1, der Schnittpunkt beider Kurven liegt bei ca. 40 %iger UV-B-PW.

Die ermittelten UV-B-PC₅₀ von K-KOP nach 24-stündiger Exposition sind:

- VA 1: 38,6 µg/ml (35,6 – 41,9 µg/ml)
- VA 2: 40,4 µg/ml (39,1 – 41,8 µg/ml)

In der VA 6 wurde das K-KOP zuerst mit UV-B-Strahlung bestrahlt und erst danach mit U937-Zellen inkubiert. Die CT-Kurve der VA 6 verläuft ganz leicht unterhalb der CT-Kurve der VA 4. Es ist ein leichter Anstieg der CT im Konzentrationsbereich von 125 µg/ml bis 500 µg/ml zu sehen. Insgesamt liegt die CT nicht über 15 %. Das K-KOP wird durch Bestrahlung nicht aktiviert, und es lassen sich keine zytotoxischen Abbauprodukte nachweisen.

3.4.3. Kaffeesäure-Oxidationsprodukt, Ammonium-Salz (NH₄-KOP)

Das NH₄-KOP wurde in der gleichen Weise wie das K-KOP bezüglich seiner zytotoxischen und seiner UV-B-protektiven Eigenschaften sowie auf UV-B-Stabilität untersucht.

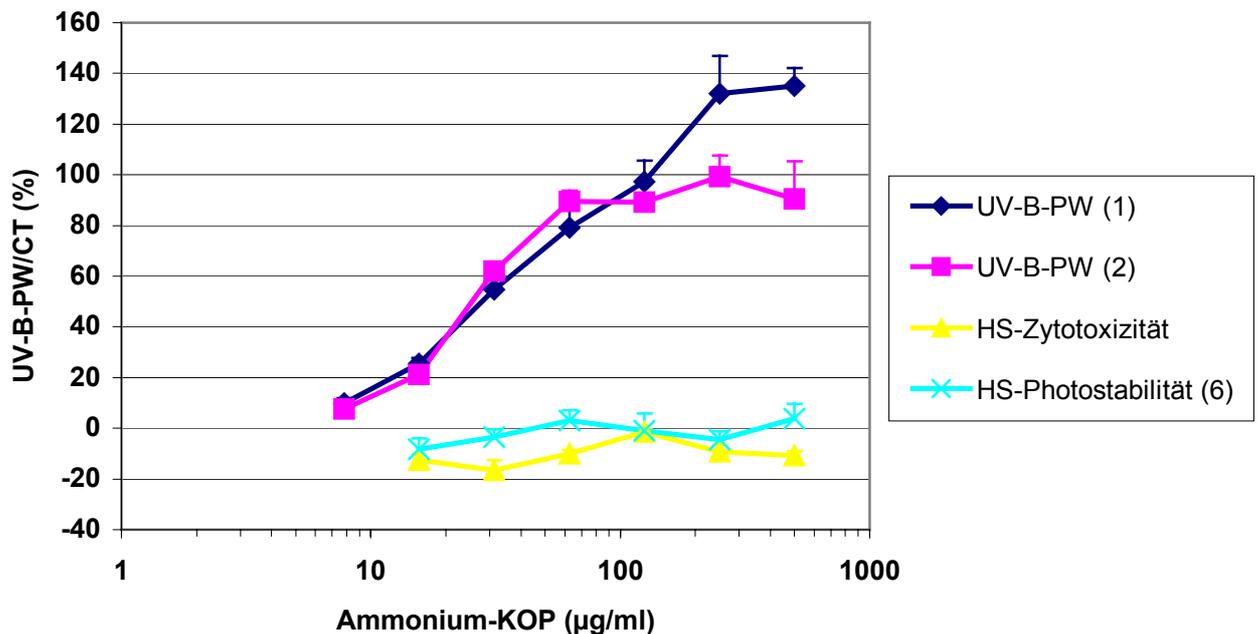


Abb.34: UV-B-protective Wirkung (UV-B-PW) und Zytotoxizität (CT) von

NH₄-KOP auf U937-Zellen ($\bar{x} \pm SE$) nach 24-stündiger Exposition

UV-B-PW (1): 24 h direkte Wirkung von HS auf bestrahlte U937-Zellen (n=4)

UV-B-PW (2): 24 h indirekte Wirkung von HS auf bestrahlte U937-Zellen (n=4)

Zytotoxizität nach 24 h HS-Einwirkung auf unbestrahlte U937-Zellen (n=3)

Photostabilität der HS (n=3)

NH₄-KOP zeigt nach 24-stündiger Exposition (Abb.34) schwach stoffwechselaktivierende Effekte auf die U937-Zellen. Die Kurve verläuft im negativen Bereich im Konzentrationsbereich von 15,6 µg/ml bis 500 µg/ml. Die UV-B-PW in VA 1 steigt von 0 % bei 3,9 µg/ml auf über 130 % bei 250 µg/ml kontinuierlich an. Das Ansteigen auf über 100 % liegt möglicherweise in der Stoffwechselaktivierung von NH₄-KOP begründet. Es hat sich gezeigt, dass beim Versetzen von HS mit stickstoffhaltigen Verbindungen, der Stickstoff z.T. in das HS-Gerüst eingebaut wird und diese Verbindungen modifizierte Eigenschaften im Vergleich zu den stickstofffreien Verbindungen aufweisen. Die UV-B-PW in VA 2 zeigt nahezu den gleichen Verlauf wie in VA 1 im Konzentrationsbereich von 7,8 µg/ml bis zu 62,5 µg/ml. Bei höheren Konzentrationen bis 500 µg/ml verläuft die Kurve der VA 2 deutlich unter der von VA 1. Sie erreicht UV-B-protective Werte zwischen 90 % und 100 %.

Die ermittelten UV-B-PC₅₀ von NH₄-KOP nach 24-stündiger Exposition sind:

- VA 1: 30,4 µg/ml (27,7 – 33,3 µg/ml)
- VA 2: 24,9 µg/ml (20,1 – 30,8 µg/ml)

Die CT-Kurve der VA 6 verläuft leicht oberhalb der CT-Kurve der VA 4. Sie verläuft entlang der 0 %-Linie. Das NH₄-KOP zeigt nach UV-B-Bestrahlung keine zytotoxischen Effekte. Es werden also keine zytotoxischen Abbauprodukte gebildet.

3.4.4. Hydrokaffeesäure-Oxidationsprodukt, Na-Salz (HYKOP)

Das HYKOP wurde nach 24-, 48- und 72-stündiger Exposition bezüglich der Zytotoxizität und der UV-B-protectiven Wirkung getestet. Dabei wurden analog zum Na-KOP noch einige zusätzliche Versuchsvariationen aufgenommen, um die Fragen nach dem möglichen Mechanismus der UV-B-protectiven Wirkung und der UV-B-Stabilität zu untersuchen.

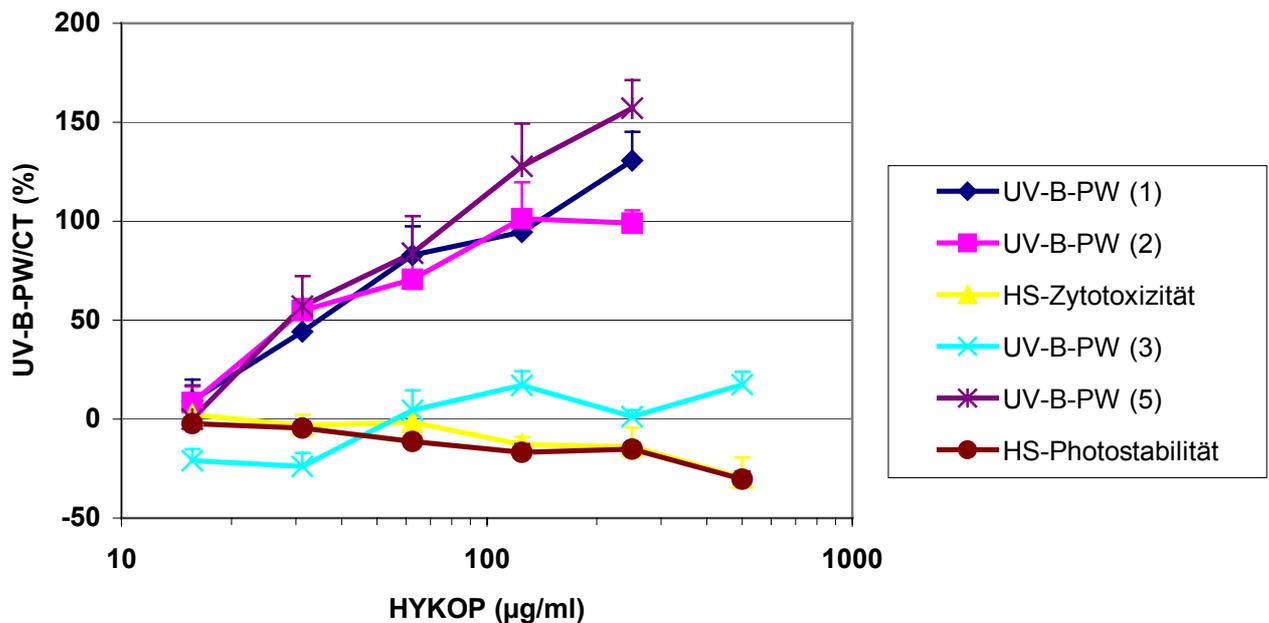


Abb.35: UV-B-protective Wirkung (UV-B-PW) und Zytotoxizität (CT) von

HYKOP auf U937-Zellen ($\bar{x} \pm SE$) nach 24-stündiger Exposition

UV-B-PW (1): 24 h direkte Wirkung von HS auf bestrahlte U937-Zellen (n=4)

UV-B-PW (2): 24 h indirekte Wirkung von HS auf bestrahlte U937-Zellen (n=4)

Zytotoxizität nach 24 h HS-Einwirkung auf unbestrahlte U937-Zellen (n=4)

UV-B-PW (3): 24 h direkte Wirkung von HS auf zuvor bestrahlte U937-Zellen (n=5)

UV-B-PW (5): 24 h direkte Wirkung von HS auf 1 h exponierte und danach bestrahlte U937-Zellen (n=3)

Photostabilität der HS (n=3)

HYKOP (Abb.35) zeigt im Konzentrationsbereich von 62,5 µg/ml bis 500 µg/ml wachstumsfördernde bzw. stoffwechselaktivierende Effekte. Die CT-Kurve verläuft im negativen Bereich bis zu -30 % bei 500 µg/ml. In gleicher Weise verläuft die CT in der VA 6, die ebenfalls bis auf -30 % abfällt. HYKOP erfährt durch die Bestrahlung mit UV-B-Licht keine Veränderung im Sinne einer CT-Zunahme.

Die CT-Kurve fällt auf -30 % ab, und die Kurve der UV-B-PW in der VA 1 steigt bis auf ungefähr 130 % an. Der stoffwechselaktivierende Effekt zeigt sich in beiden VA. Der Anstieg erfolgt sehr steil von 10 % auf über 130 % im Konzentrationsbereich von 15,6 µg/ml bis 250 µg/ml. Die UV-B-PW der VA 2 steigt bis zu einer Konzentration von 125 µg/ml in gleicher Weise an bis auf 100 %. Die Kurve der VA 1 liegt bei 250µg/ml deutlich über der der VA 2, was den aktivierenden Effekt des HYKOP noch einmal unterstreicht. Die Kurve der UV-B-PW in der VA 5 steigt sehr steil von 0 % bei einer Konzentration von 15,6 µg/ml auf über 150 % bei 250 µg/ml an. Damit verläuft die Kurve der VA 5 über der der VA 1 und 2. In der VA 3 ist ein leichter Anstieg der UV-B-PW von -20 % bei 15,6 µg/ml auf ca. 25 % bei 500 µg/ml zu

sehen. Auch hier führen wir den Anstieg, d.h. das verbesserte Wachstum der behandelten Zellen im Vergleich zu den Kontrollzellen, auf den wachstumsfördernden oder stoffwechselaktivierenden Effekt des HYKOP zurück.

Die ermittelten UV-B-PC₅₀ von HYKOP nach 24-stündiger Exposition sind:

- VA 1: 37,9 µg/ml (21,9 – 65,6 µg/ml)
- VA 2: 44,4 µg/ml (34,3 – 57,5 µg/ml)
- VA 5: 34,3 µg/ml (22,8 – 51,5 µg/ml)

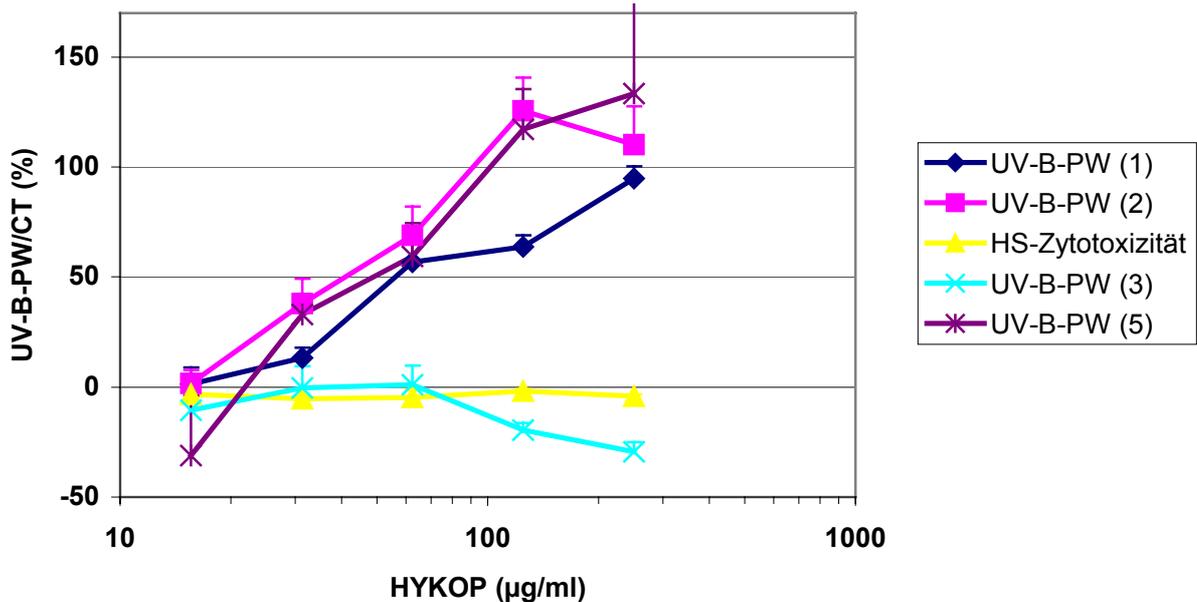


Abb.36: UV-B-protective Wirkung (UV-B-PW) und Zytotoxizität (CT) von

HYKOP auf U937-Zellen ($\bar{x} \pm SE$) nach 48-stündiger Exposition

UV-B-PW (1): 48 h direkte Wirkung von HS auf bestrahlte U937-Zellen (n=3)

UV-B-PW (2): 48 h indirekte Wirkung von HS auf bestrahlte U937-Zellen (n=4)

Zytotoxizität nach 48 h HS-Einwirkung auf unbestrahlte U937-Zellen (n=3)

UV-B-PW (3): 48 h direkte Wirkung von HS auf zuvor bestrahlte U937-Zellen (n=3)

UV-B-PW (5): 48 h direkte Wirkung von HS auf 1 h exponierte und danach bestrahlte U937-Zellen (n=4)

HYKOP zeigt nach 48-stündiger Exposition (Abb.36) keine zytotoxische Wirkung. Die Kurve verläuft bei -5 % bis -10 % im negativen Bereich bei Konzentrationen von 15,6 µg/ml bis 250 µg/ml.

Die UV-B-PW in VA 1 steigt von 0 % bei 15,6 µg/ml auf 95 % bei 250 µg/ml. Die Kurve der UV-B-PW in VA 2 verläuft deutlich oberhalb der der VA 1. Die UV-B-PW steigt in VA 2 linear von 0 % bei 15,6 µg/ml auf 125 % bei 125 µg/ml an.

In der VA 3 ist keine UV-B-PW nachweisbar. Die Kurve verläuft ab einer Konzentration von 125 µg/ml im negativen Bereich. In der VA 5 ist eine gute UV-B-PW zu sehen. Die Kurve

liegt bis zu einer Konzentration von 125 µg/ml nahezu parallel zu der der VA 2, steigt aber danach noch weiter an.

Die ermittelten UV-B-PC₅₀ von HYKOP nach 48-stündiger Exposition sind:

- VA 1: 74,0 µg/ml (71,7 – 76,3 µg/ml)
- VA 2: 41,9 µg/ml (27,6 – 63,8 µg/ml)
- VA 5: 49,6 µg/ml (34,8 – 70,7 µg/ml)

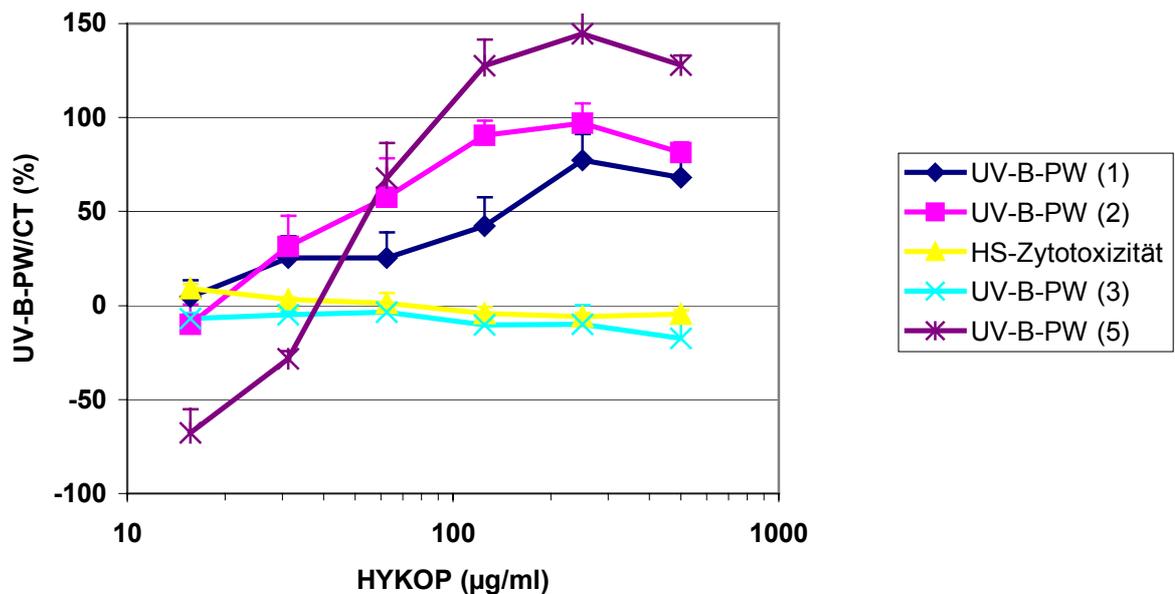


Abb.37: UV-B-protective Wirkung (UV-B-PW) und Zytotoxizität (CT) von

HYKOP auf U937-Zellen ($\bar{x} \pm SE$) nach 72-stündiger Exposition

UV-B-PW (1): 72 h direkte Wirkung von HS auf bestrahlte U937-Zellen (n=3)

UV-B-PW (2): 72 h indirekte Wirkung von HS auf bestrahlte U937-Zellen (n=3)

Zytotoxizität nach 72 h HS-Einwirkung auf unbestrahlte U937-Zellen (n=3)

UV-B-PW (3): 72 h direkte Wirkung von HS auf zuvor bestrahlte U937-Zellen (n=3)

UV-B-PW (5): 72 h direkte Wirkung von HS auf 1 h exponierte und danach bestrahlte U937-Zellen (n=3)

HYKOP zeigt auch nach 72-stündiger Exposition (Abb.37) keine zytotoxische Wirkung. Im Konzentrationsbereich von 125 µg/ml bis 500 µg/ml verläuft die CT-Kurve im negativen Bereich.

Die UV-B-PW der VA 1 steigt bis auf 90 % bei 125 µg/ml an. Die Kurve der UV-B-PW liegt bei 250 µg/ml bei 95 % und sinkt dann bei 500 µg/ml auf 80 %. Die UV-B-PW der VA 2 steigt bis auf knapp 80 % bei 250 µg/ml an und fällt bei 500 µg/ml auf unter 70 %. Auch nach 72-stündiger Exposition liegt die Kurve der UV-B-PW der VA 2 über der der VA 1. Da nach 72-stündiger Exposition keine wachstumsfördernden Effekte mehr zu verzeichnen sind, erreichen die Kurvenzüge maximal die 100 %-Grenze.

Die ermittelten UV-B-PC₅₀ von HYKOP nach 72-stündiger Exposition sind:

- VA 1: 121,4 µg/ml (54,4 – 271,0 µg/ml)
- VA 2: 43,3 µg/ml (28,2 – 66,4 µg/ml)
- VA 5: 59,0 µg/ml (52,7 – 66,1 µg/ml)

Bei der morphologischen Beschreibung der U937-Zellen fällt auf, dass sie ein ausgezeichnetes Wachstum zeigen. Sie sind groß und rund. Nach der Bestrahlung treten in den Konzentrationen, die nicht protektiv wirksam sind, nekrotische Veränderungen, Zellschrumpfungen und -lysen auf. Die Zellen, die bestrahlt sind und die sich in der HYKOP-Lösung bei höheren Konzentrationen befinden, sind völlig gesund und sind etwas größer als die Kontrollzellen. Sie schwimmen locker in der HS-Lösung. Die Zellen erscheinen in der Lösung nicht kontrastvermehrt und besitzen eher helle Membranen.

3.4.5. DOPA-Oxidationsprodukt, Na-Salz

DOPA-OP wurde auf seine zytotoxischen und seine UV-B-protectiven Effekte nach 24-, 48- und 72-stündiger Exposition untersucht. Dabei wurden wiederum noch zusätzliche Versuchsanordnungen gewählt, um die Frage nach dem Mechanismus der Wirkung aufzuklären.

Die CT von DOPA-OP nach 24-stündiger Exposition (Abb.38) steigt ab einer Konzentration von 250 µg/ml ganz leicht an und erreicht bei 500 µg/ml ungefähr 15 %. Annähernd gleich verläuft die Kurve der CT in der VA 6, in der DOPA-OP zuerst bestrahlt und erst im Anschluss mit U937-Zellen versetzt wurde. Eine UV-B-Bestrahlung führt zu keiner Zytotoxizitätszunahme des DOPA-OP im Sinne toxischer Abbauprodukte. Die UV-B-PW in VA 1 steigt fast linear von 0 % auf 100 % im Konzentrationsbereich von 15,6 µg/ml bis zu 250 µg/ml an. Im Bereich bis 500 µg/ml fällt sie auf 90 %.

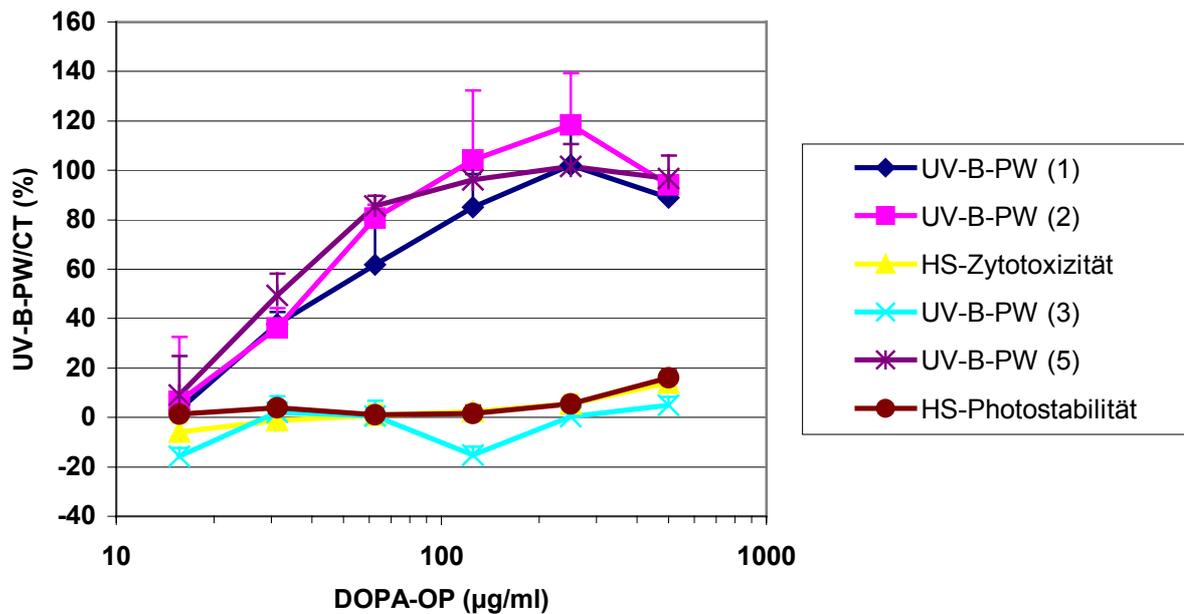


Abb.38: UV-B-protective Wirkung (UV-B-PW) und Zytotoxizität (CT) von

DOPA-OP auf U937-Zellen ($\bar{x} \pm SE$) nach 24-stündiger Exposition

UV-B-PW (1): 24 h direkte Wirkung von HS auf bestrahlte U937-Zellen (n=4)

UV-B-PW (2): 24 h indirekte Wirkung von HS auf bestrahlte U937-Zellen (n=4)

Zytotoxizität nach 24 h HS-Einwirkung auf unbestrahlte U937-Zellen (n=5)

UV-B-PW (3): 24 h direkte Wirkung von HS auf zuvor bestrahlte U937-Zellen (n=5)

UV-B-PW (5): 24 h direkte Wirkung von HS auf 1 h exponierte und danach bestrahlte U937-Zellen (n=4)

Photostabilität der HS (n=3)

Die UV-B-PW in der VA 2 zeigt einen steileren Anstieg als die in der VA 1 und erreicht die 100 %ige Schutzwirkung bereits bei 125 µg/ml. Sie steigt dann bis auf 120 % bei 250 µg/ml an und fällt bei 500 µg/ml wieder auf 95 % ab.

Die UV-B-PW in der VA 3 verläuft von 15,6 µg/ml bis zu 500 µg/ml entlang der 0 %-Grenze. Es ist keine protektive pharmakologische Wirkung zu erkennen.

Die Kurve der UV-B-PW in der VA 5 steigt im Konzentrationsbereich von 15,6 µg/ml bis zu 125 µg/ml von 0 % auf 100 % an und verläuft dann parallel der 100 %-Grenze. Der Anstieg ist im Konzentrationsbereich bis zu 62,5 µg/ml noch etwas steiler als in der VA 2, so dass die Schutzwirkung am effektivsten ist.

Die ermittelten UV-B-PC₅₀ von DOPA-OP nach 24-stündiger Exposition sind:

- VA 1: 36,7 µg/ml (32,7 – 41,2 µg/ml)
- VA 2: 35,9 µg/ml (29,2 – 44,3 µg/ml)
- VA 5: 29,6 µg/ml (19,0 – 46,1 µg/ml)

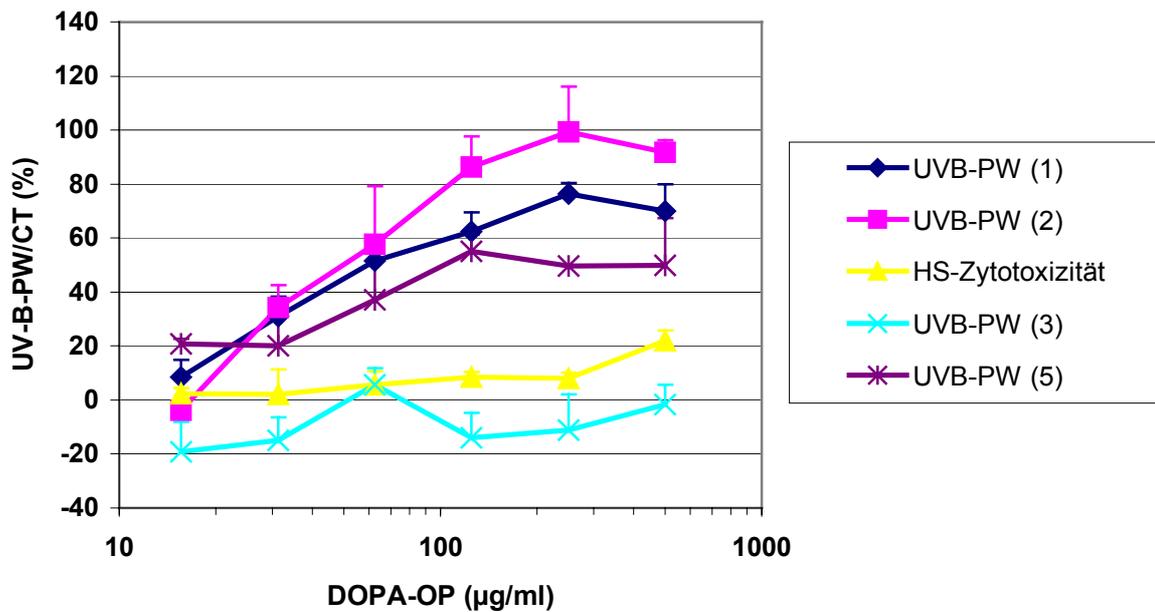


Abb.39: UV-B-protective Wirkung (UV-B-PW) und Zytotoxizität (CT) von

DOPA-OP auf U937-Zellen ($\bar{x} \pm SE$) nach 48-stündiger Exposition

UV-B-PW (1): 48 h direkte Wirkung von HS auf bestrahlte U937-Zellen (n=4)

UV-B-PW (2): 48 h indirekte Wirkung von HS auf bestrahlte U937-Zellen (n=4)

Zytotoxizität nach 48 h HS-Einwirkung auf unbestrahlte U937-Zellen (n=3)

UV-B-PW (3): 48 h direkte Wirkung von HS auf zuvor bestrahlte U937-Zellen (n=3)

UV-B-PW (5): 48 h direkte Wirkung von HS auf 1 h exponierte und danach bestrahlte U937-Zellen (n=3)

Die CT des DOPA-OP steigt nach 48-stündiger Exposition (Abb.39) von 0 % bei 15,6 µg/ml auf ca. 20 % bei 500 µg/ml an. Es lassen sich also geringe zytotoxische Effekte nachweisen. Die Kurve der UV-B-PW in VA 1 verläuft steil ansteigend von ca. 10 % bei einer Konzentration von 15,6 µg/ml bis auf knapp 80 % bei 250 µg/ml. Bei 500 µg/ml fällt die UV-B-Schutzwirkung leicht ab.

Die UV-B-PW in der VA 2 steigt sehr steil an von 0 % auf 100 % im Konzentrationsbereich von 15,6 µg/ml bis 250 µg/ml. Der Kurvenzug der VA 2 ist um ca. 20 % im Konzentrationsbereich von 125 µg/ml bis zu 500 µg/ml nach oben verschoben. Das lässt sich sehr gut durch die geringe Substanzzytotoxizität des DOPA-OP begründen. Im untoxischen Bereich entsprechen die Kurvenzüge der VA 1 und 2 einander.

Die UV-B-PW in der VA 3 schwankt zwischen 0 % und -20 % im gesamten Konzentrationsbereich von 15,6 µg/ml bis 500 µg/ml. Auch dieser Effekt liegt zum einen in der geringen Zytotoxizität des DOPA-OP und zum anderen in dem Einfluss der schädigenden UV-B-Strahlung begründet.

In der VA 5 steigt die Kurve im Konzentrationsbereich von 15,6 $\mu\text{g/ml}$ bis 125 $\mu\text{g/ml}$ bis auf knapp 60 % an und verläuft dann bis zu einer Konzentration von 500 $\mu\text{g/ml}$ annähernd linear. Sie liegt damit noch unterhalb der der VA 1.

Die ermittelten UV-B-PC₅₀ von DOPA-OP nach 48-stündiger Exposition sind:

- VA 1: 68,0 $\mu\text{g/ml}$ (47,6 – 97,0 $\mu\text{g/ml}$)
- VA 2: 47,5 $\mu\text{g/ml}$ (36,5 – 61,7 $\mu\text{g/ml}$)
- VA 5: 92,2 $\mu\text{g/ml}$ (64,1 – 132,6 $\mu\text{g/ml}$)

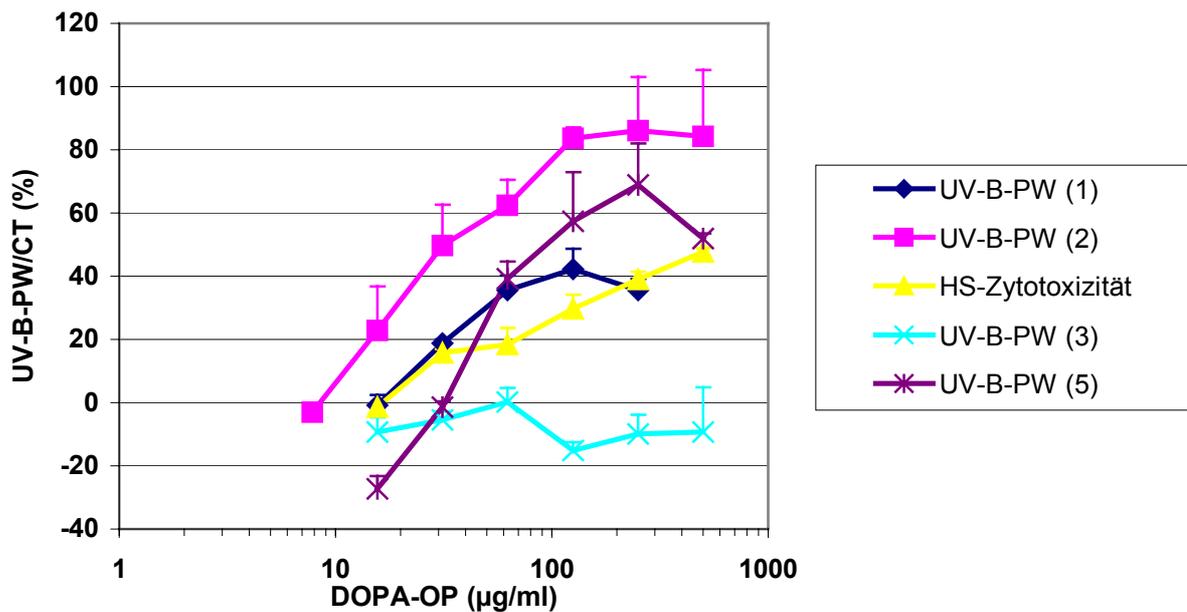


Abb.40: UV-B-protective Wirkung (UV-B-PW) und Zytotoxizität (CT) von

DOPA-OP auf U937-Zellen ($\bar{x} \pm \text{SE}$) nach 72-stündiger Exposition

UV-B-PW (1): 72 h direkte Wirkung von HS auf bestrahlte U937-Zellen (n=3)

UV-B-PW (2): 72 h indirekte Wirkung von HS auf bestrahlte U937-Zellen (n=4)

Zytotoxizität nach 72 h HS-Einwirkung auf unbestrahlte U937-Zellen (n=3)

UV-B-PW (3): 72 h direkte Wirkung von HS auf zuvor bestrahlte U937-Zellen (n=3)

UV-B-PW (5): 72 h direkte Wirkung von HS auf 1 h exponierte und danach bestrahlte U937-Zellen (n=3)

Die CT von DOPA-OP steigt nach 72-stündiger Exposition (Abb.40) von 0 % bei einer Konzentration von 15,6 $\mu\text{g/ml}$ auf knapp 50 % bei 500 $\mu\text{g/ml}$ an. Die ansteigende CT von DOPA-OP kommt auch in der Kurve der UV-B-PW in VA 1 zum Ausdruck. Diese zeigt einen flachen Anstieg von 0 % bei 15,6 $\mu\text{g/ml}$ auf knapp 50 % bei 250 $\mu\text{g/ml}$. Addiert man zu den Werten der UV-B-PW in VA 1 die ermittelten CT-Werte der zugehörigen Konzentration dazu, nimmt die Kurve einen ähnlichen Verlauf wie die in der VA 2.

Einen steileren Anstieg der UV-B-PW zeigt die Kurve der VA 2. Im Konzentrationsbereich von 7,8 $\mu\text{g/ml}$ bis zu 125 $\mu\text{g/ml}$ steigt die UV-B-Schutzwirkung auf über 80 % an und verläuft

dann konstant bis zu 500 µg/ml. In der VA 3 verläuft die Kurve der UV-B-PW im Konzentrationsbereich von 15,6 µg/ml bis 500 µg/ml zwischen 0 % und -15 %. Es ist kein protektiver pharmakologischer Schutz nachweisbar. In der VA 5 steigt die UV-B-PW von unter -20 % relativ steil bis auf 70 % im Konzentrationsbereich von 15,6 µg/ml bis 250 µg/ml an und nimmt bei 500 µg/ml bis auf 50 % ab, da hier die zytotoxischen Effekte des DOPA-OP eine Rolle spielen.

Die ermittelten UV-B-PC₅₀ von DOPA-OP nach 72-stündiger Exposition sind:

- VA 1: keine
- VA 2: 50,6 µg/ml (45,6 – 55,9 µg/ml)
- VA 5: 101,5 µg/ml (58,3 – 176,8 µg/ml)

Die CT von DOPA-OP nimmt mit steigender Expositionsdauer zu. Aus diesem Grunde zeigen die Kurven der UV-B-PW der VA 1 bei zunehmender Expositionsdauer von 24 h auf schließlich 72 h einen flacheren Anstieg und eine geringere maximale UV-B-Schutzwirkung. Deutlich nachweisbar ist der UV-B-protektive Schutz in der VA 2 auch bei zunehmender Expositionsdauer. Nach 72-stündiger Inkubation erreicht die UV-B-PW maximale Werte von ca. 90 % bei einem steilen Anstieg der Kurve.

Die morphologischen Veränderungen der U937-Zellen lassen sich gut auf die zytotoxischen Einflüsse des DOPA-OP und die der UV-B-Strahlen zurückführen. Während die strahlengeschädigten Zellen lysieren, auslaufen und sich in der Lösung nur noch Bruchstücke befinden, führt das DOPA-OP zu einer Kontrastvermehrung und wahrscheinlich zu Membranschädigungen. Die Zellen erscheinen sehr dunkel, abgeflacht und eckig. Einige Zellen stellen sich völlig unverändert dar. Sie sind groß und rund. Die meisten Zellen scheinen in das HS-Gerüst eingebunden und fixiert zu sein. Eventuell hat die filmartig aufgelagerte HS einen membranschädigenden Effekt.

3.5. Zytotoxizität von DOPA-OP_{Luft}

Beim Herstellen einer Lösung beginnt DOPA, spontan zu polymerisieren und sich zu verfärben. Es stellt sich die Frage, inwieweit das entstandene Reaktionsprodukt zytotoxisch ist. Dazu wurden definierte Reaktionsbedingungen festgelegt und ein DOPA-OP durch den Einfluss von Luftsauerstoff polymerisiert. Das entstandene Produkt wurde in Anlehnung der HS-Synthesevorschrift 24 h stehen gelassen und dann ausgefällt.

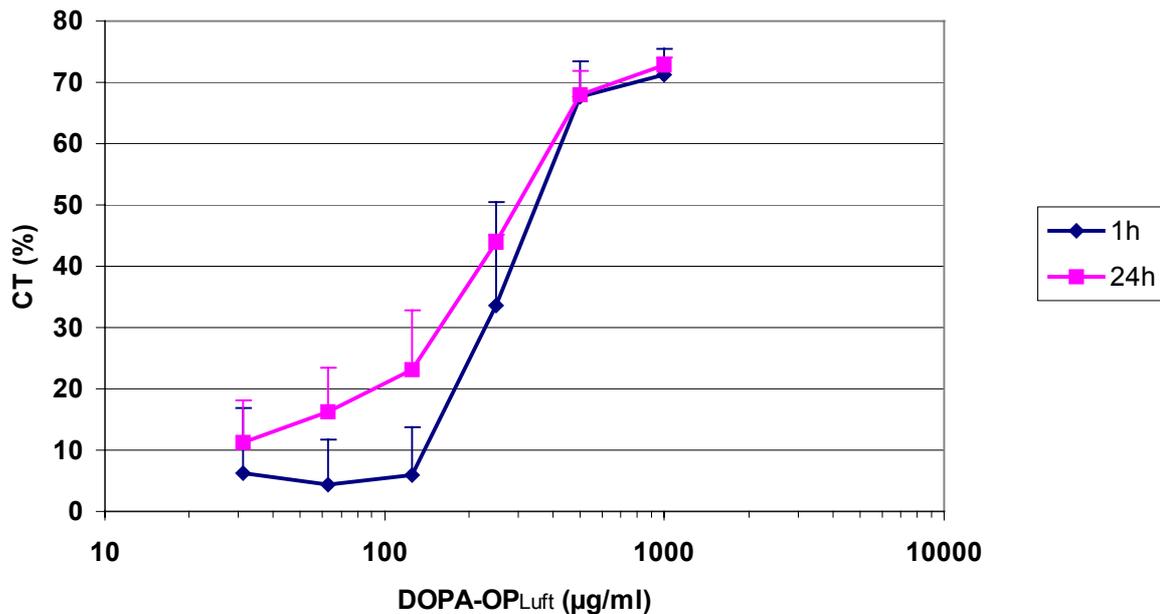


Abb.41: Zytotoxizität von DOPA-OP_{Luft} nach 1- und 24-stündiger Exposition an U937-Zellen ($\bar{x} \pm SE$; $n_{CT1h}=3$, $n_{CT24h}=3$)

Die CT des DOPA-OP_{Luft} (Abb.41) steigt nach 1-stündiger Exposition im Konzentrationsbereich von 62,5 µg/ml bis zu 250 µg/ml steil an. Sie erreicht maximale Werte von 70 %. Die zytotoxische Wirkung steigt im 24 h-Versuch früher an als im 1 h-Versuch. Das Maximum der CT findet sich auch hier im Konzentrationsbereich von 250 µg/ml bis 500 µg/ml bei ungefähr 70 %.

Die ermittelten CC₅₀ von DOPA-OP_{Luft} nach 1- und 24-stündiger Exposition sind:

- 1 h: 361,0 µg/ml (268,0 – 486,4 µg/ml)
- 24 h: 275,6 µg/ml (236,7 – 320,9 µg/ml)

DOPA-OP_{Luft} hat zytotoxische Effekte und eignet sich deswegen nicht zur weiteren Untersuchung und Charakterisierung seiner UV-B-protektiven Eigenschaften. Bei einer Weiterentwicklung und klinischen Anwendung müssen die HS unbedingt untoxisch sein, um Irritationen und Hautschäden zu verhindern. Die zytotoxischen Effekte lassen sich möglicherweise dadurch erklären, dass der Luftsauerstoff ein geringeres Oxidationspotential besitzt und die entstandene HS nicht genügend oxidiert war, sondern noch reaktionsfähige Gruppen enthielt. Werden diese Produkte wieder in Lösung gegeben, beginnen sie erneut zu reagieren. Dabei werden Radikale gebildet, was zu einer Schädigung der Zellen führt.

Die U937-Zellen weisen morphologische Veränderungen auf. In den zytotoxischen Konzentrationsbereichen schrumpfen sie, erscheinen als kleine Klümpchen und dunkle

Masse. Teilweise platzen die Membranen. Die Zellen schwimmen nicht mehr lose im Medium, sondern haften an den Rändern der Cytomorph[®]-b-Platten.

3.6. Zytotoxizität der monomeren Ausgangsverbindungen der Huminsäuren

3.6.1. Kaffeesäure

Zur Synthese der HS werden definierte chemische Ausgangssubstanzen verwendet, die hinsichtlich ihrer zytotoxischen Effekte untersucht werden sollen. Die CT der Kaffeesäure wurde nach 1- und 24-stündiger Exposition an U937-Zellen bestimmt.

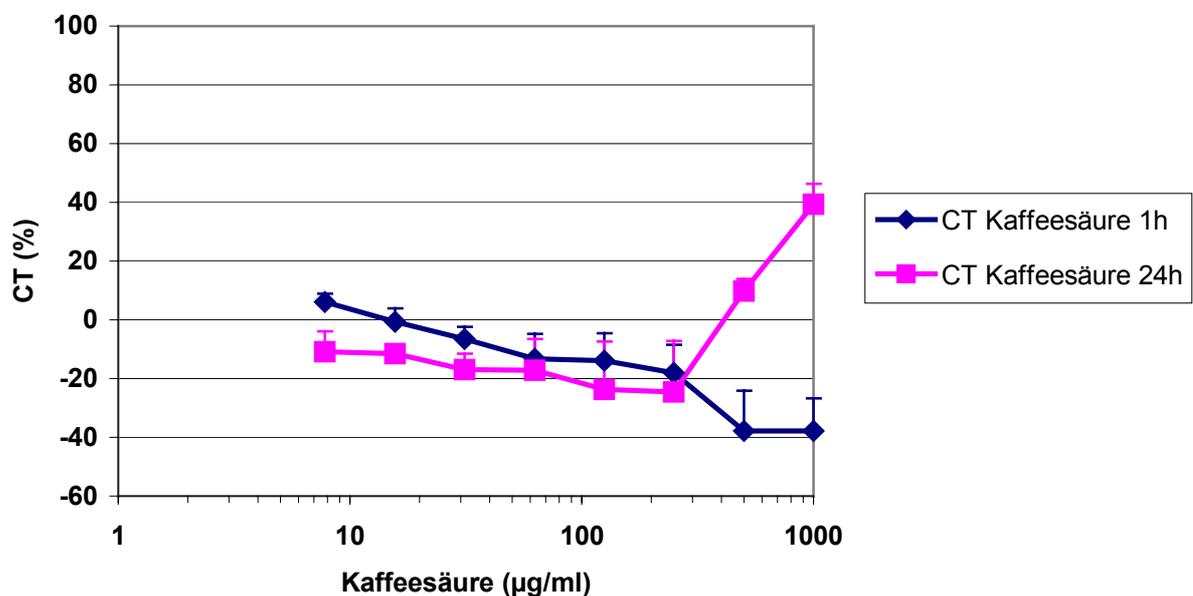


Abb.42: Zytotoxizität von Kaffeesäure nach 1- und 24-stündiger Exposition an U937-Zellen ($\bar{x} \pm SE$; $n_{CT1h}=4$, $n_{CT24h}=3$)

Die mit Kaffeesäure (Abb.42) exponierten Zellen zeigen nach 1 h Exposition eine im negativen Bereich verlaufende CT-Kurve. Dies bedeutet, dass die Zugabe von Kaffeesäure den Stoffwechsel der Zellen aktiviert. Der Effekt ist konzentrationsabhängig. Bei 500 µg/ml liegt die Kurve bei -40 %.

Nach 24-stündiger Exposition der U937-Zellen mit Kaffeesäure zeigt sich sowohl eine wachstums- und stoffwechselfördernde Wirkung bei Konzentrationen von 7,8 µg/ml bis zu 125 µg/ml, als auch eine zytotoxische Wirkung mit steigender Konzentration. Bei 500 µg/ml erreicht die Zytotoxizität 40 %.

Die Untersuchungslösung der Kaffeesäure weist bei hohen Konzentrationen von 500 µg/ml und 1000 µg/ml nach 24-stündiger Exposition eine leicht bräunliche Verfärbung auf, die nach

1-stündiger Exposition noch nicht zu beobachten ist. Unter Licht- und Sauerstoffeinfluss beginnt die Kaffeesäure in Lösung zu polymerisieren, was durch die leichte bräunliche Färbung erkennbar ist. Möglicherweise ist der CT-Anstieg nach 24-stündiger Exposition bei 500 µg/ml und 1000 µg/ml eine Folge des gestörten Zellstoffwechsels infolge der chemischen Reaktion der Kaffeesäure und der damit verbundenen energetischen Veränderungen.

3.6.2. Hydrokaffeesäure

In der gleichen Weise wie bei der Kaffeesäure wurde auch von der Hydrokaffeesäure die Zytotoxizität nach 1- und 24-stündiger Exposition an U937-Zellen untersucht.

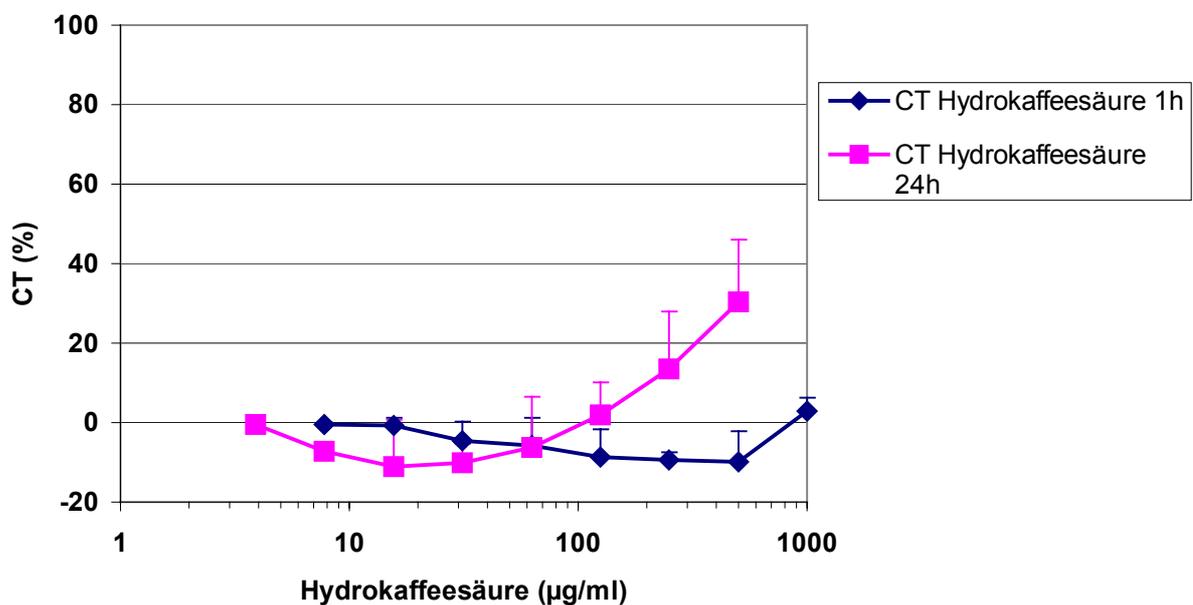


Abb.43: Zytotoxizität von Hydrokaffeesäure bei 1- und 24-stündiger Inkubation an U937-Zellen ($\bar{x} \pm SE$; $n_{CT1h}=4$, $n_{CT24h}=4$)

Hydrokaffeesäure (Abb.43) zeigt nach 1-stündiger Exposition ebenfalls konzentrationsabhängig leicht stoffwechselstimulierende Effekte wie die Kaffeesäure. Dabei verläuft die CT-Kurve im negativen Bereich in den Konzentrationen von 31,25 µg/ml bis zu 500 µg/ml. Nach 24-stündiger Exposition stimuliert die Hydrokaffeesäure zunächst den Stoffwechsel und das Wachstum der U937-Zellen. Die Kurve verläuft im Negativen im Konzentrationsbereich von 7,8 µg/ml bis 62,5 µg/ml. Danach nimmt die CT bis auf 30 % bei 500 µg/ml zu.

Wie auch die Kaffeesäure zeigt die Hydrokaffeesäure nach einer 24-stündigen Exposition bei 500 µg/ml und bei 1000 µg/ml eine leichte gelbliche Verfärbung. Diese ist schwächer als die,

die bei der Kaffeesäure zu beobachten ist, deutet aber ebenfalls auf eine beginnende Polymerisation hin.

3.6.3. DOPA

DOPA wurde in analoger Weise wie die Kaffeesäure und die Hydrokaffeesäure hinsichtlich der zytotoxischen Eigenschaften untersucht. Bereits nach einer 1-stündigen Exposition verfärbten sich die Prüflösungen konzentrationsabhängig relativ kräftig rot. Dies bedeutet, dass in den Testlösungen bereits chemische Reaktionen stattfinden, die die Untersuchungssubstanz verändern. Die Substanz ist unter den Testbedingungen nicht stabil und beginnt bereits zu polymerisieren. Außerdem stört die rote Farbgebung die Farbentwicklung des EZ4U-Testes.

3.7. Zytotoxizität und UV-B-protektiven Wirkung von Paraaminobenzoessäure – einer UV-B-Lichtschutzsubstanz nach Kosmetikverordnung

Um die UV-B-protektiven Eigenschaften der HS klassifizieren zu können, wurde ein Standard gesucht. Die PABA ist eine getestete und zugelassene UV-B-Schutzsubstanz nach Kosmetikverordnung und lässt sich unter den gewählten Versuchsbedingungen testen. Es wurden die Zytotoxizitäten und die UV-B-protektiven Wirkungen in zwei Versuchsanordnungen nach 24-, 48- und 72-stündiger Exposition untersucht.

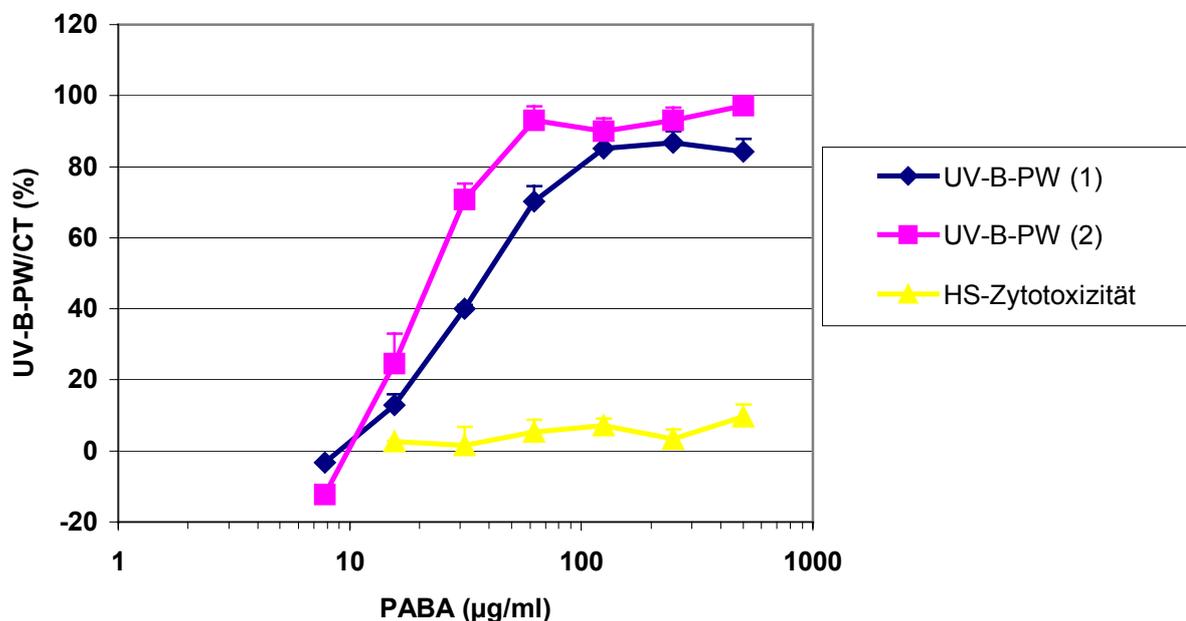


Abb.44: UV-B-protective Wirkung (UV-B-PW) und Zytotoxizität (CT) von

PABA auf U937-Zellen ($\bar{x} \pm SE$) nach 24-stündiger Exposition

UV-B-PW (1): 24 h direkte Wirkung von HS auf bestrahlte U937-Zellen (n=4)

UV-B-PW (2): 24 h indirekte Wirkung von HS auf bestrahlte U937-Zellen (n=4)

Zytotoxizität nach 24 h HS-Einwirkung auf unbestrahlte U937-Zellen (n=3)

PABA zeigt nach 24-stündiger Exposition (Abb.44) keine oder sehr geringe Zytotoxizität. Die CT bei 500 µg/ml liegt bei unter 10 %.

Die UV-B-PW in VA 1 steigt im Konzentrationsbereich von 7,8 µg/ml bis zu 125 µg/ml kontinuierlich an und verläuft dann bei annähernd 90 % konstant. Die UV-B-PW in VA 2 steigt im Konzentrationsbereich von 7,8 µg/ml bis 62,5 µg/ml steiler an als in VA 1. Im höheren Konzentrationsbereich bis zu 500 µg/ml verläuft sie zwischen 90- und 100 %iger UV-B-Schutzwirkung. Die maximale Schutzwirkung ist in VA 2 um 5 bis 10 % größer als in VA 1.

Die ermittelten UV-B-PC₅₀ von PABA nach 24-stündiger Exposition sind:

- VA 1: 39,3 µg/ml (36,0 – 43,0 µg/ml)
- VA 2: 23,3 µg/ml** (18,0 – 30,2 µg/ml)

Der UV-B-Schutz ist in der VA 2 hochsignifikant (**) besser als in der VA 1.

Bei der morphologischen Betrachtung der Zellen zeigten sich keine Veränderungen, wenn man die Zellen mit PABA inkubiert. Die Zellen erscheinen gesund. Sie sind groß und rund und schwimmen lose in der Lösung. Die bestrahlten Zellen zeigen das typische nekrotische Aussehen. Sie sind zerplatzt, geschwollen und fragmentiert. Die ausgelaufenen Zellorganellen sind in dem Medium zu sehen. Bei den höheren Konzentrationen der PABA werden die Zellen nicht durch die UV-B-Strahlen geschädigt. Die Zellen sehen gesund und vital aus.

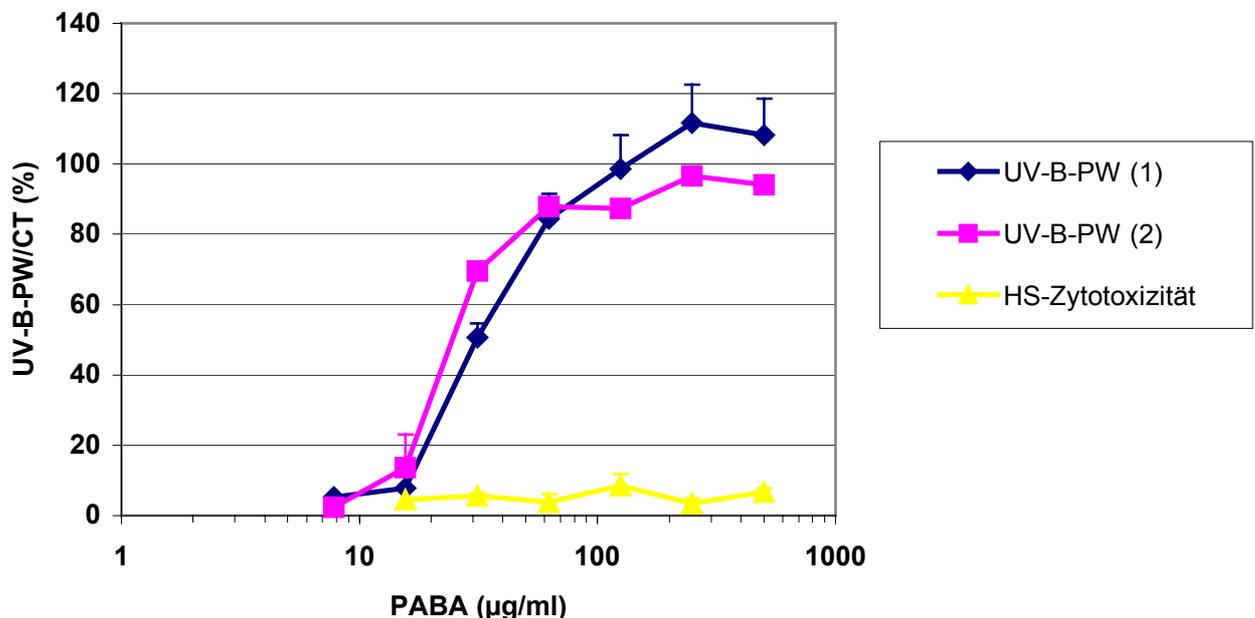


Abb.45: UV-B-protective Wirkung (UV-B-PW) und Zytotoxizität (CT) von

PABA auf U937-Zellen ($\bar{x} \pm SE$) nach 48-stündiger Exposition

UV-B-PW (1): 48 h direkte Wirkung von HS auf bestrahlte U937-Zellen (n=3)

UV-B-PW (2): 48 h indirekte Wirkung von HS auf bestrahlte U937-Zellen (n=3)

Zytotoxizität nach 48 h HS-Einwirkung auf unbestrahlte U937-Zellen (n=3)

Die CT-Kurve von PABA nach 48-stündiger Exposition (Abb.45) zeigt den gleichen Verlauf wie nach 24-stündiger Exposition. Die Kurve liegt bei 5 bis 10 %iger CT.

Die UV-B-PW in VA 1 zeigt einen steilen Anstieg im Konzentrationsbereich von 15,6 µg/ml bis zu 125 µg/ml. Bei 125 µg/ml ist eine 100 %ige Schutzwirkung erreicht. Bei 250 µg/ml und 500 µg/ml steigt die UV-B-PW noch auf 110 % an und liegt damit über der in VA 2. Die UV-B-PW in VA 2 zeigt zwischen 15,6 µg/ml und 62,5 µg/ml einen steileren Anstieg als in VA 1, verläuft aber im Konzentrationsbereich bis 500 µg/ml konstant bei 90 bis 100 % und damit unterhalb der Kurve von VA 1. Der Kurvenverlauf der VA 2 nach 48-stündiger Exposition entspricht dem nach 24-stündiger Exposition. Sowohl der Anstieg als auch der maximale Verlauf sind identisch. In VA 1 steigt die Kurve nach 48-stündiger Exposition nicht steiler aber höher an als nach 24-stündiger Exposition.

Die ermittelten UV-B-PC₅₀ von PABA nach 48-stündiger Exposition sind:

- VA 1: 32,5 µg/ml (30,1 – 35,1 µg/ml)
- VA 2: 24,9 µg/ml (19,7 – 31,3 µg/ml)

Die Zellen weisen keine morphologischen Veränderungen auf, wenn sie mit PABA exponiert werden. Die bestrahlten U937-Zellen zeigen die gleichen Zeichen der Nekrose wie nach 24-stündiger Exposition. In den Konzentrationsbereichen, in denen die PABA die schädigenden Einflüsse der UV-B-Strahlung abblockt, sehen die Zellen völlig gesund aus. Sie schwimmen locker im Zellverband in der Lösung.

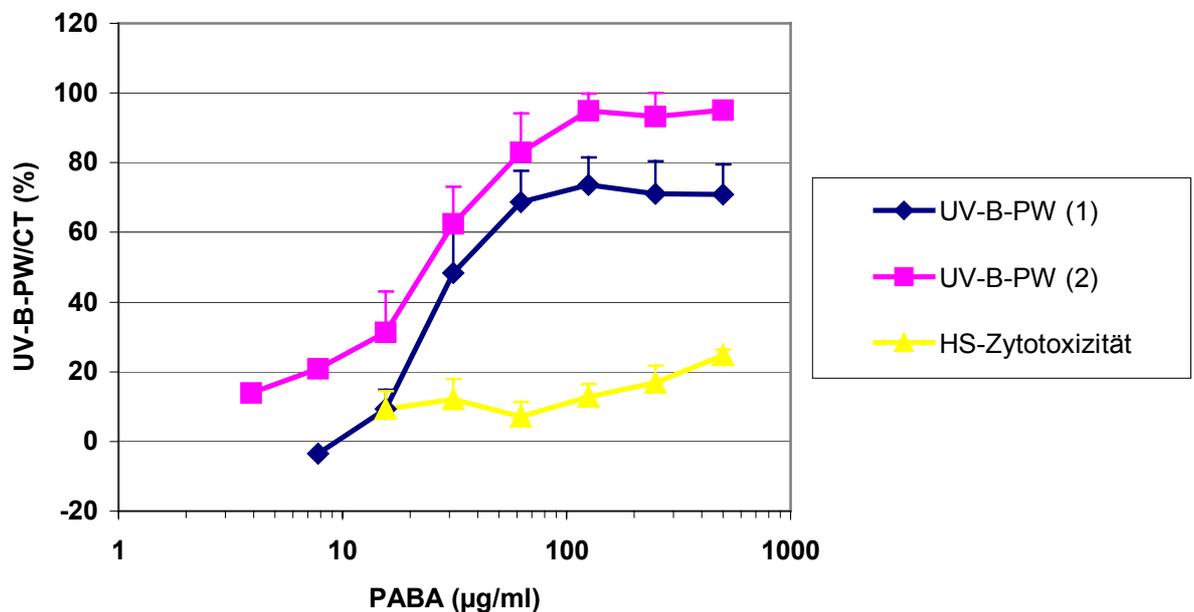


Abb.46: UV-B-protective Wirkung (UV-B-PW) und Zytotoxizität (CT) von

PABA auf U937-Zellen ($\bar{x} \pm SE$) nach 72-stündiger Exposition

UV-B-PW (1): 72 h direkte Wirkung von HS auf bestrahlte U937-Zellen (n=3)

UV-B-PW (2): 72 h indirekte Wirkung von HS auf bestrahlte U937-Zellen (n=5)

Zytotoxizität nach 72 h HS-Einwirkung auf unbestrahlte U937-Zellen (n=3)

Die PABA zeigt nach 72-stündiger Exposition (Abb.46) leichte zytotoxische Effekte. Die CT liegt im Konzentrationsbereich zwischen 15,6 µg/ml und 62,5 µg/ml bei ca. 10 % und steigt dann bei 500 µg/ml bis auf 25 % an.

Die UV-B-PW in VA 1 steigt im Konzentrationsbereich von 15,6 µg/ml bis zu 62,5 µg/ml steil an und zeigt bis zu 500 µg/ml einen konstanten Verlauf bei 70 bis 75 %. Die Kurve steigt nicht bis auf 100 % an, weil PABA eine 20 bis 25 %ige CT im Konzentrationsbereich von 250 bis 500 µg/ml hat. Addiert man zu den Werten der UV-B-PW in VA 1 die Werte der CT hinzu, ergibt sich der nahezu identische Kurvenverlauf wie in der VA 2. Im Gegensatz zur VA 1 steigt die Kurve der UV-B-PW in VA 2 bereits früher an. Die UV-B-PW in VA 2 liegt bei einer Konzentration von 7,8 µg/ml bereits bei 20 %. Bei 125 µg/ml liegt die UV-B-PW bei über 90 % und bleibt dann bis 500 µg/ml konstant.

Die ermittelten UV-B-PC₅₀ von PABA nach 72-stündiger Exposition sind:

- VA 1: 41,5 µg/ml (25,5 – 67,6 µg/ml)
- VA 2: 24,8 µg/ml (13,3 – 46,2 µg/ml)

Nach 72-stündiger Exposition weisen die Zellen einige morphologische Veränderungen durch den Einfluss der PABA auf. Sie sind etwas geschrumpft und etwas kompakter als die Kontrollzellen. Die Membranen erscheinen dunkler und weniger glattrandig. Es treten keine Lysen oder Fragmentierungen auf. Die einzelnen Zellen sind in geschrumpfter und kompakterer Form noch vorhanden.

Die ermittelten UV-B-PC₅₀ der PABA unterscheiden sich nur nach 24-stündiger Exposition in den VA 1 und 2 statistisch signifikant voneinander. Bei einem verlängerten Expositionsintervall treten geringe bis mittlere zytotoxische Effekte auf. Die maximal ermittelte CT lag nach 72-stündiger Exposition bei einer Konzentration von 500 µg/ml bei ca. 25 %. Die PABA zeigt eine sehr gute UV-B-PW bei allen Expositionsintervallen, was sie zu einer guten Vergleichssubstanz für die UV-B-PW macht. Wir klassifizieren die UV-B-Schutzwirkungen der HS anhand der UV-B-PW der PABA.

3.8. Zytotoxizität der Huminsäuren nach 96-stündiger Exposition

3.8.1. Hydrokaffeesäure-Oxidationsprodukt

Die U937-Zellen wurden mit HYKOP 96 h lang exponiert. Das HYKOP hat nach 24-, 48- und 72-stündiger Exposition keine zytotoxischen Effekte.

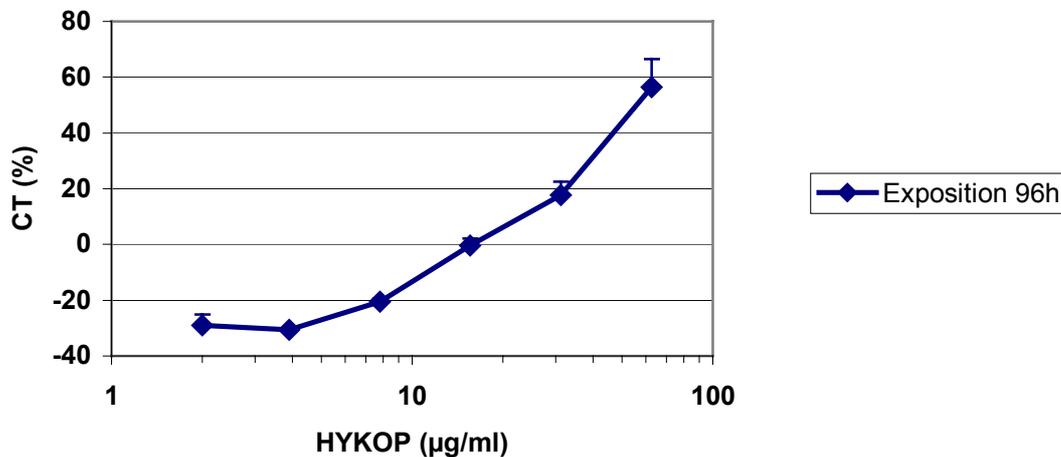


Abb.47: Zytotoxizität von HYKOP nach 96-stündiger Exposition an U937-Zellen

($\bar{x} \pm SE$; n=3)

Die CT-Kurve (Abb.47) verläuft im Konzentrationsbereich von 2 µg/ml bis zu 7,8 µg/ml im negativen Bereich, d.h. das Wachstum der behandelten Zellen ist besser als das der Kontrollzellen. Die HS HYKOP besitzt also bei niedrigen Konzentrationen einen wachstumsfördernden Effekt. Bei der Konzentration von 15,6 µg/ml ist die CT bei 0 % und steigt bei höheren Konzentrationen nahezu konstant an. Bei 62,5 µg/ml übersteigt die Kurve die 50 %-Grenze. Möglicherweise liegen dem Absterben der Zellen apoptotische Vorgänge zu Grunde.

3.8.2. DOPA-Oxidationsprodukt

Die U937-Zellen wurden mit DOPA-OP 96 h lang exponiert. Die Zytotoxizität des DOPA-OP nimmt bereits nach 72-stündiger Exposition stark zu. Während nach 24-stündiger Exposition noch keine CT zu beobachten ist, steigt die CT bei 72 h und 500 µg/ml bis auf über 40 %.

Die Konzentrationen von 2 µg/ml hat einen stark proliferationsfördernden Effekt nach 96-stündiger Exposition (Abb.48). Dieser ist auch bei einer Konzentration von 3,9 µg/ml noch deutlich ausgeprägt. Bereits bei einer Konzentration von 7,8 µg/ml wachsen die behandelten Zellen schlechter als die Kontrollzellen. Die CT steigt dann bis zu 40 % bei einer Konzentration von 62,5 µg/ml an. Die Zellzahl ist bei Konzentrationen über 7,8 µg/ml vermindert. Die Zellen sehen aber vor allem kleiner, kompakter und kontrastverstärkt aus. Die Zellzahl in den niedrigen Konzentrationen ist im Prinzip zu der der Zellkontrolle nicht

verändert, aber die Zellen sehen groß, rund und gesund aus. Die Zellkontrollzellen erscheinen etwas kleiner und kompakter.

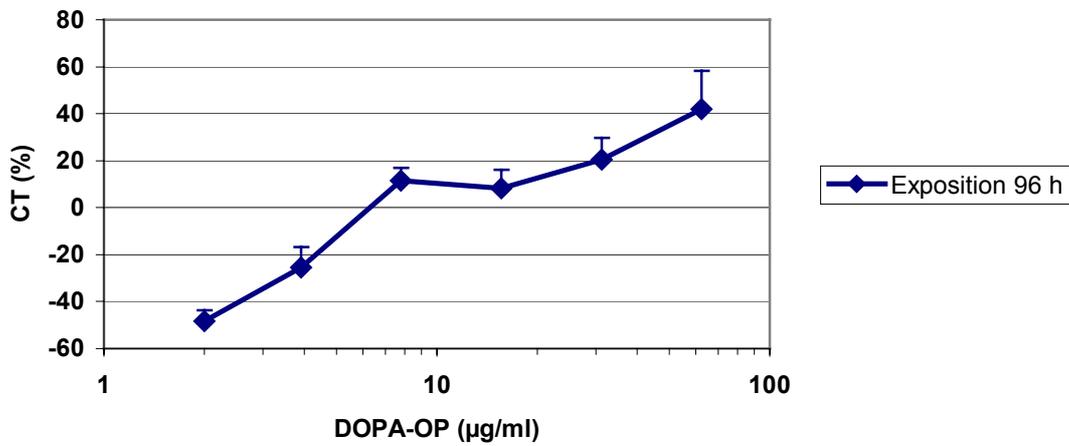


Abb.48: Zytotoxizität von DOPA-OP nach 96-stündiger Exposition an U937-Zellen

($\bar{x} \pm SE$; n=3)

3.8.3. Ammoniumhumat

Die U937-Zellen wurden mit der natürlichen HS NH_4 -humat 96 h lang exponiert. NH_4 -humat besitzt bereits nach 24-stündiger Exposition erhebliche zytotoxische Effekte. Ob sich diese Einflüsse auch nach längerer Expositionsdauer und niedrigen Konzentrationen nachweisen lassen, sollten diese Versuche klären.

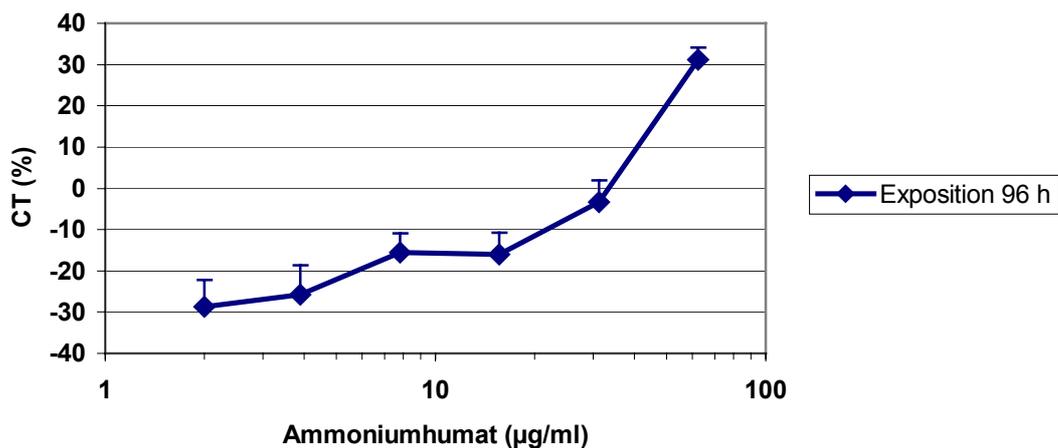


Abb.49: Zytotoxizität von NH_4 -humat nach 96-stündiger Exposition

an U937-Zellen ($\bar{x} \pm SE$; n=3)

NH₄-humat (Abb.49) besitzt im Konzentrationsbereich von 2 µg/ml bis zu 15,6 µg/ml einen proliferationsfördernden Effekt auf die U937-Zellen. Die CT-Kurve der mit NH₄-humat exponierten Zellen liegt zwischen –30 % und –15 %. Sie verläuft im negativen Bereich, d.h. die Kontrollzellen wachsen schlechter als die Vergleichszellen. Bei einer Konzentration von 31,25 µg/ml beträgt das Wachstum der Zellen nahezu 100 %. Danach steigt die Kurve der CT bei 62,5 µg/ml auf ca. 30 % an. Die zytotoxischen Effekte zeigen sich nach 96-stündiger Exposition also erst bei einer Konzentration von 62,5 µg/ml. Die Zellzahl ist bei den niedrigen Konzentrationen bis zu 7,8 µg/ml geringfügig höher als die der Zellkontrolle. Dann ermittelt man praktisch keinen Unterschied mehr in der Zellzahl, aber bei einer Konzentration von über 31,25 µg/ml sind die Zellen merklich verkleinert und kompakter.

3.8.4. Natriumhumat

Die U937-Zellen wurden mit der natürlichen Huminsäure Na-humat 96 h lang exponiert. Die Kurven der CT verlaufen nach 24- und 48-stündiger Exposition z.T. stark im negativen Bereich. Erst nach 72-stündiger Exposition ist eine mäßig starke CT zu beobachten. Ob dieses Verhalten tatsächlich als zytotoxisch oder eher im Sinne proliferationsfördernden Einflüsse zu deuten ist, sollte anhand der Versuche nach 96 h Exposition untersucht werden.

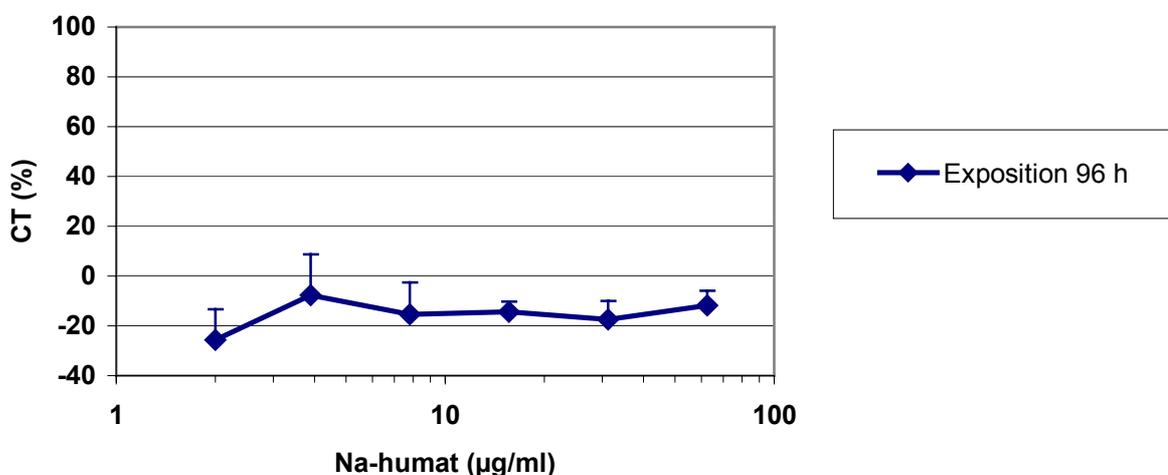


Abb.50: Zytotoxizität von Na-humat nach 96-stündiger Exposition

an U937-Zellen ($\bar{x} \pm SE$; n=3)

Na-humat (Abb.50) hat einen proliferationsfördernden Effekt im Konzentrationsbereich von 2 bis 62,5 µg/ml. Die CT-Kurve verläuft im negativen Bereich bei –10 bis –20 % relativ konstant. Die Zellzahl ist im Vergleich zu der der Zellkontrolle leicht erhöht, aber die Zellen erscheinen etwas kleiner als die Kontrollzellen.

3.8.5. Huminsäure Altteicher Moor II

Die U937-Zellen wurden mit der HS Altteicher Moor II 96 h lang exponiert. Die HS Altteicher Moor II zeigt nach 24- und 48-stündiger Exposition keine CT.

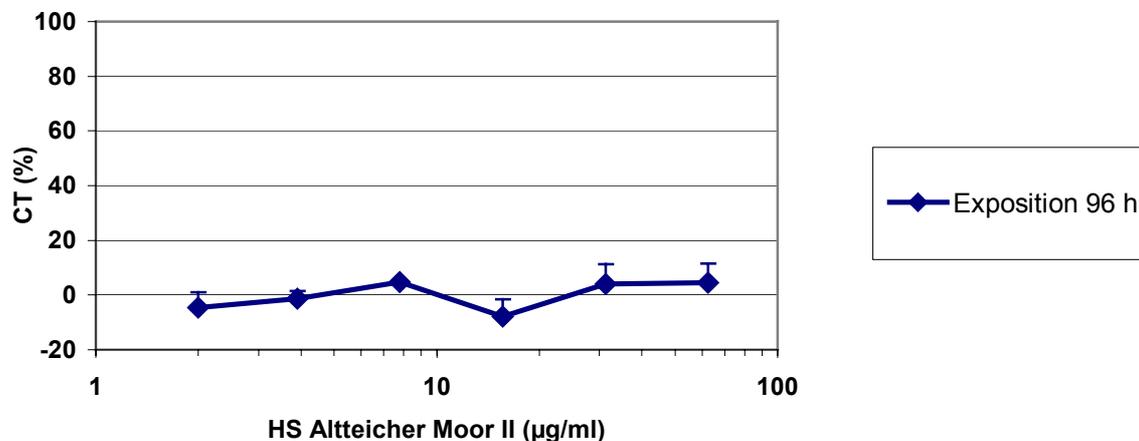


Abb.51: Zytotoxizität der HS Altteicher Moor II nach 96-stündiger Exposition

an U937-Zellen ($\bar{x} \pm SE$; n=3)

Die HS Altteicher Moor II (Abb.51) zeigt im Konzentrationsbereich von 2 µg/ml bis 62,5 µg/ml keinen Einfluss auf das Proliferationsverhalten von U937-Zellen. Die Kurve verläuft entlang der 0 %-Linie. Die Zellen sehen morphologisch gesund aus und weisen keine charakteristischen Veränderungen im Vergleich zu den Kontrollzellen auf. Die Zellzahl ist im Vergleich zu der der Kontrollzellen nicht verändert.

3.9. Ermittelte halbmaximale UV-B-protective Konzentrationen (UV-B-PC₅₀) der Huminsäuren

In der folgenden Tabelle 3 sind die errechneten halbmaximalen UV-B-protectiven Konzentrationen der unterschiedlichen Versuchsanordnungen und Expositionsdauern mit den dazugehörigen Konfidenzintervallen zusammengefasst.

Tabelle 3: Ermittelte halbmaximale UV-B-protective Konzentrationen (UV-B-PC₅₀)
der getesteten Huminsäuren in µg/ml

Huminsäure	Anordnung	Exposition	UV-B-PC ₅₀ (µg/ml)	Konfidenzintervall (µg/ml)
Na-KOP	Anordnung 1	24 h	35,4	31,6 - 39,7
		48 h	62,7	39,5 - 99,4
		72 h	n.b.	
	Anordnung 2	24 h	40,4	35,4 - 46,2
		48 h	35,9	28,6 - 45,2
		72 h	48,8	35,3 - 66,5
	Anordnung 5	24 h	25,8	21,4 - 31,1
		48 h	70,8	38,9 - 129,0
		72 h	51,0	35,4 - 73,3
DOPA-OP	Anordnung 1	24 h	36,7	32,7 - 41,2
		48 h	68,0	47,6 - 97,0
		72 h	n.b.	
	Anordnung 2	24 h	35,9	29,2 - 44,3
		48 h	47,5	36,5 - 61,7
		72 h	50,6	45,6 - 55,9
	Anordnung 5	24 h	29,6	19,0 - 46,1
		48 h	92,2	64,1 - 132,6
		72 h	101,5	58,3 - 176,8
HYKOP	Anordnung 1	24 h	37,9	21,9 - 65,6
		48 h	74,0	71,7 - 76,3
		72 h	121,4	54,4 - 271,0
	Anordnung 2	24 h	44,4	34,3 - 57,5
		48 h	41,9	27,6 - 63,8
		72 h	43,3	28,2 - 66,4
	Anordnung 5	24 h	34,3	22,8 - 51,5
		48 h	49,6	34,8 - 70,7
		72 h	59,0	52,7 - 66,1
K-KOP	Anordnung 1	24 h	38,6	35,6 - 41,9
	Anordnung 2	24 h	40,4	39,1 - 41,8
NH ₄ -KOP	Anordnung 1	24 h	30,4	27,7 - 33,3
	Anordnung 2	24 h	24,9	20,1 - 30,8
Na-humat	Anordnung 1	24 h	47,7	27,7 - 82,2
		48 h	79,4	61,9 - 101,8
		72 h	n.b.	
	Anordnung 2	24 h	30,2	23,1 - 39,4
		48 h	29,5	26,9 - 32,4
		72 h	36,4	28,6 - 46,2
NH ₄ -humat	Anordnung 1	24 h	n.b.	
		48 h	n.b.	
		72 h	n.b.	
	Anordnung 2	24 h	21,6	17,1 - 27,4
		48 h	15,2	13,8 - 16,8
		72 h	18,7	16,0 - 21,8
HS Aldrich	Anordnung 1	24 h	51,2	38,7 - 68,6
		48 h	44,3	39,6 - 49,5
	Anordnung 2	24 h	23,2	18,4 - 29,2
		48 h	26,3	21,0 - 33,0
HS Altteicher Moor I	Anordnung 1	24 h	31,4	19,6 - 50,5
		48 h	41,5	28,5 - 60,5
	Anordnung 2	24 h	40,7	28,9 - 57,2
		48 h	34,8	26,4 - 46,1

HS Altteicher Moor II	Anordnung 1	24 h	34,8	25,4 - 47,8
		48 h	56,4	50,6 - 63,0
	Anordnung 2	24 h	29,1	24,2 - 35,1
		48 h	48,5	37,1 - 63,4
HS Altteicher Moor III	Anordnung 1	24 h	124,5	97,7 - 158,5
	Anordnung 2	24 h	41,1	34,0 - 49,7
PABA	Anordnung 1	24 h	39,3	36,0 - 43,0
		48 h	32,5	30,1 - 35,1
		72 h	41,5	25,5 - 67,6
	Anordnung 2	24 h	23,3	18,0 - 30,2
		48 h	24,9	19,7 - 31,3
		72 h	24,8	13,3 - 46,2

3.10. Ermittelte halbmaximale zytotoxische Konzentrationen (CC₅₀) der Huminsäuren

In der folgenden Tabelle 4 sind die halbmaximalen zytotoxischen Konzentrationen der beiden Huminsäuren dargestellt, von denen sie bestimmt werden konnte. Die anderen Huminsäuren sowie PABA, Kaffeesäure und Hydrokaffeesäure zeigten im Konzentrationsbereich bis 500 µg/ml keine halbmaximale Zytotoxizität.

Tabelle 4: Ermittelte halbmaximale zytotoxische Konzentrationen von DOPA-Oxidationsprodukt_{Luft} und Ammoniumhumat (CC₅₀) in µg/ml

Huminsäure	Exposition	CC ₅₀ (µg/ml)	Konfidenzintervall (µg/ml)
DOPA-OP _{Luft}	1 h	361,0	268,0 - 486,4
	24 h	275,6	236,7 - 320,9
NH ₄ -humat	24 h	242,5	154,2 - 381,5
	48 h	88,4	58,0 - 134,7
	72 h	81,5	67,9 - 97,7

3.11. Errechnete relative UV-B-protective Wirkungen der Huminsäuren bezogen auf PABA

In der folgenden Tabelle 5 wurden die relativen UV-B-protectiven Wirkungen errechnet. Dabei wurde der von PABA in der gleichen Versuchsanordnung und der gleichen Expositionsdauer ermittelte UV-B-PC₅₀-Wert als 100 % angenommen.

Um auf Signifikanz zu prüfen, wurden die UV-B-PC₅₀ der Huminsäuren der Einzelversuche und die von PABA mit dem Programm Excel in den t-Test zweiseitig mit ungepaarten Stichproben eingesetzt. Bei einem $p \leq 0,05$ ist der Unterschied signifikant, bei $p \leq 0,01$ hoch signifikant.

Tabelle 5: Errechnete relative UV-B-protective Wirkungen bezogen auf PABA

Huminsäure	Anordnung	Exposition	Relative UV-B-PC ₅₀ (%) bezogen auf PABA	Signifikanz
Na-KOP	Anordnung 1	24 h	111 %	-
		48 h	52 %	*
		72 h	n.b.	
	Anordnung 2	24 h	58 %	**
		48 h	69 %	-
		72 h	51 %	-
DOPA-OP	Anordnung 1	24 h	107 %	-
		48 h	48 %	*
		72 h	n.b.	
	Anordnung 2	24 h	65 %	-
		48 h	52 %	*
		72 h	49 %	-
HYKOP	Anordnung 1	24 h	104 %	-
		48 h	44 %	**
		72 h	34 %	-
	Anordnung 2	24 h	52 %	*
		48 h	59 %	-
		72 h	57 %	-
K-KOP	Anordnung 1	24 h	102 %	-
	Anordnung 2	24 h	58 %	**
NH ₄ -KOP	Anordnung 1	24 h	129 %	*
	Anordnung 2	24 h	94 %	-
Na-humat	Anordnung 1	24 h	82 %	-
		48 h	41 %	*
		72 h	n.b.	
	Anordnung 2	24 h	77 %	-
		48 h	84 %	-
		72 h	68 %	-
NH ₄ -humat	Anordnung 1	24 h	n.b.	
		48 h	n.b.	
		72 h	n.b.	
	Anordnung 2	24 h	108 %	-
		48 h	164 %	*
		72 h	133 %	-
HS Aldrich	Anordnung 1	24 h	77 %	-
		48 h	73 %	*
	Anordnung 2	24 h	100 %	-
		48 h	95 %	-
HS Altteicher Moor I	Anordnung 1	24 h	80 %	-
		48 h	78 %	-
	Anordnung 2	24 h	57 %	-
		48 h	72 %	-
HS Altteicher Moor II	Anordnung 1	24 h	89 %	-
		48 h	58 %	**
	Anordnung 2	24 h	80 %	-
		48 h	51 %	*
HS Altteicher Moor III	Anordnung 1	24 h	32 %	**
	Anordnung 2	24 h	57 %	*
PABA	Anordnung 1	24 h	100 %	-
		48 h	100 %	-
		72 h	100 %	-
	Anordnung 2	24 h	100 %	-
		48 h	100 %	-
		72 h	100 %	-

* $p \leq 0,05$ signifikant

** $p \leq 0,01$ hoch signifikant

Der Vergleich der relativen UV-B-protaktiven Wirkungen der synthetischen Huminsäuren Na-KOP, DOPA-OP und HYKOP zeigt, dass die UV-B-Schutzwirkung in der VA 1 mit zunehmender Expositionsdauer abnimmt. Die relative UV-B-PW von Na-KOP nimmt von 111% (24 h) auf 52 % (48 h) ab und lässt sich nach 72 h nicht mehr ermitteln. DOPA-OP [107 % (24 h); 48 % (48 h); n.b. (72 h)] und HYKOP [104 % (24 h); 44 % (48 h); 34 % (72 h)] verhalten sich analog. Die relativen UV-B-PW von Na-KOP, DOPA-OP und HYKOP liegen nach 24-stündiger Exposition über 100 % und sinken nach 48-stündiger Exposition unter 50% ab. Nach 72-stündiger Exposition können die relativen UV-B-PW von Na-KOP und DOPA-OP nicht mehr bestimmt werden. Im Gegensatz zu den Ergebnissen der VA 1 bleiben in der VA 2 die relativen UV-B-PW bei Verlängerung der Expositionsdauer nahezu konstant. Die relative UV-W-PW in VA 2 von Na-KOP liegt zwischen 51 und 69 %, von DOPA-OP zwischen 49 und 65 % und von HYKOP zwischen 52 und 59 %. Während die synthetischen Huminsäuren nach 24 h Exposition in der VA 1 einen stärkeren relativen UV-B-protaktiven Effekt als in VA 2 besitzen, ist die UV-B-Schutzwirkung bei verlängerter Expositionsdauer (48h, 72h) in der VA 2 effektiver.

Die synthetischen Huminsäuren Na-KOP (111 %), DOPA-OP (107 %), HYKOP (104 %), K-KOP (102 %) und NH_4 -KOP (129 %) sind nach 24-stündiger Exposition in der VA 1 stärker UV-B-protaktiv wirksam als PABA. Die relativen UV-B- PC_{50} liegen über 100 %. Dagegen erweist sich in der VA 2 PABA als effektiver im Vergleich zu den synthetischen Huminsäuren [Na-KOP (58 %), DOPA-OP (65 %), HYKOP (52 %), K-KOP (58 %) und NH_4 -KOP (94 %)]. Die relativen UV-B- PC_{50} liegen unter 100 %.

NH_4 -KOP besitzt mit 129 % in VA 1 und 94 % in VA 2 von den synthetischen Huminsäuren die effektivste relative UV-B-P C_{50} . Die anderen synthetischen HS (Na-KOP, DOPA-OP, HYKOP, K-KOP) zeigen untereinander in ihren UV-B-protaktiven Wirkungen in der gleichen VA keine Unterschiede. Der UV-B-protaktive Schutz von KOP tritt also unabhängig vom vorhandenen Gegenion (Natrium, Kalium, Ammonium) ein. Auch die strukturellen Unterschiede der Ausgangsverbindungen (Kaffeensäure, Hydrokaffeensäure, DOPA) der synthetischen Huminsäuren haben keinen Einfluss auf deren UV-B-protaktives Verhalten.

Die UV-B-PW von Na-humat nimmt in VA 1 mit zunehmender Expositionsdauer ab, bleibt dagegen in der VA 2 annähernd konstant. Sie liegt stets unter 100 %.

NH_4 -humat besitzt in der VA 1 zytotoxische Wirkung, weswegen kein UV-B-Schutz nachgewiesen werden kann. Dagegen ist die UV-B-PW in der VA 2 von allen getesteten Huminsäuren die effektivste.

Die HS Aldrich zeigt in der VA 1 eine etwas schwächere UV-B-PW als in VA 2. Diese verändert sich bei Verlängerung der Expositionsdauer von 24 h auf 48 h nicht.

Die HS Alteicher Moor I, II und III besitzen unterschiedliche UV-B-PW. HS Alteicher Moor I besitzt in VA 1 eine UV-B-PW von ca. 80 % nach 24 h und 48 h Exposition. Die UV-B-PW in VA 2 liegt mit 57 % bzw. 72 % unter der der VA 1. Die HS Alteicher Moor II besitzt nach 24 h Exposition in VA 1 (89 %) und VA 2 (80 %) eine stärkere UV-B-PW als nach 48 h Exposition [VA 1 (58 %), VA 2 (51 %)]. Die HS Alteicher Moor III zeigt nach 24 h Exposition mit 32 % in VA 1 und 57 % in VA 2 eine schwache UV-B-PW.

Die natürlichen HS zeigen in Bezug auf ihre UV-B-protektiven Eigenschaften weniger Gemeinsamkeiten als die synthetischen. Es zeigen sich Unterschiede in Abhängigkeit vom Ursprung der HS (Moor Dierhagen, Alteicher Moor, HS aus Braunkohle), von der Aufbereitungstechnik (HS Alteicher Moor I,II und III) und vom vorhandenen Gegenion (Nahumat, NH₄-humat).

3.12. Einteilung und Vergleich der halbmaximalen UV-B-protektiven Konzentration (UV-B-PC₅₀) der Huminsäuren in den Versuchsanordnungen 1 und 2

In den Tabellen 6, 7 und 8 wurden die HS nach ihrer UV-B-PC₅₀ nach abnehmender UV-B-Schutzwirkung geordnet. In Tabelle 6 sind die HS nach 24-stündiger, in der Tabelle 7 nach 48-stündiger und in Tabelle 8 nach 72-stündiger Exposition dargestellt.

Tabelle 6: Gegenüberstellung der halbmaximalen UV-B-protektiven Konzentrationen (UV-B-PC₅₀) der Huminsäuren und PABA in den Versuchsanordnungen 1 und 2 nach 24-stündiger Exposition geordnet nach aufsteigenden UV-B-PC₅₀

Exposition 24h			
Versuchsanordnung 1	UV-B-PC₅₀ (µg/ml)	Versuchsanordnung 2	UV-B-PC₅₀ (µg/ml)
NH ₄ -KOP	30,4	NH ₄ -humat	21,6
HS Alteicher Moor I	31,4	HS Aldrich	23,2
HS Alteicher Moor II	34,8	PABA	23,3
Na-KOP	35,4	NH ₄ -KOP	24,9
DOPA-OP	36,7	HS Alteicher Moor II	29,1
HYKOP	37,9	Na-humat	30,2
K-KOP	38,6	DOPA-OP	35,9
PABA	39,3	K-KOP	40,4
Na-humat	47,7	Na-KOP	40,4
HS Aldrich	51,2	HS Alteicher Moor I	40,7
HS Alteicher Moor III	124,5	HS Alteicher Moor III	41,1
NH ₄ -humat	n.b.	HYKOP	44,4

Tabelle 7: Gegenüberstellung der halbmaximalen UV-B-protektiven Konzentrationen (UV-B-PC₅₀) der Huminsäuren und PABA in den Versuchsanordnungen 1 und 2 nach 48-stündiger Exposition geordnet nach aufsteigenden UV-B-PC₅₀

Exposition 48h			
Versuchsanordnung 1	UV-B-PC₅₀ (µg/ml)	Versuchsanordnung 2	UV-B-PC₅₀ (µg/ml)
PABA	32,5	NH ₄ -humat	15,2
HS Alteicher Moor I	41,5	PABA	24,9
HS Aldrich	44,3	HS Aldrich	26,3
HS Alteicher Moor II	56,4	Na-humat	29,5
Na-KOP	62,7	HS Alteicher Moor I	34,8
DOPA-OP	68,0	Na-KOP	35,9
HYKOP	74,0	HYKOP	41,9
Na-humat	79,4	DOPA-OP	47,5
NH ₄ -humat	n.b.	HS Alteicher Moor II	48,5

Tabelle 8: Gegenüberstellung der halbmaximalen UV-B-protektiven Konzentrationen (UV-B-PC₅₀) der Huminsäuren und PABA in den Versuchsanordnungen 1 und 2 nach 72-stündiger Exposition geordnet nach aufsteigenden UV-B-PC₅₀

Exposition 72h			
Versuchsanordnung 1	UV-B-PC₅₀ (µg/ml)	Versuchsanordnung 2	UV-B-PC₅₀ (µg/ml)
PABA	41,5	NH ₄ -humat	18,7
HYKOP	121,4	PABA	24,8
DOPA-OP	258,0	Na-humat	36,4
Na-KOP	n.b.	HYKOP	43,3
Na-humat	n.b.	Na-KOP	48,8
NH ₄ -humat	n.b.	DOPA-OP	50,6

Zur Beurteilung der UV-B-protektiven Wirkung der Huminsäuren werden die UV-B-PC₅₀ der Versuchsanordnung 1 und 2 bei 24-, 48- und 72-stündiger Exposition miteinander verglichen und in 3 Gruppen eingeteilt:

- a) HS, deren UV-B-PW in VA 1 effektiver ist als in VA 2*
- b) HS, deren UV-B-PW in VA 2 effektiver ist als in VA 1**
- c) HS, deren UV-B-PW in VA 1 und 2 gleich ist***

* UV-B-PC₅₀ (VA1) < UV-B-PC₅₀ (VA2); UV-B-PC₅₀ (VA2) - UV-B-PC₅₀ (VA1) > 16 µg/ml

** UV-B-PC₅₀ (VA1) > UV-B-PC₅₀ (VA2); UV-B-PC₅₀ (VA1) - UV-B-PC₅₀ (VA2) > 16 µg/ml

*** UV-B-PC₅₀ (VA1) = UV-B-PC₅₀ (VA2); |UV-B-PC₅₀ (VA1) - UV-B-PC₅₀ (VA2)| ≤ 16 µg/ml

Unterscheiden sich die halbmaximalen UV-B-protektiven Konzentrationen um weniger oder maximal 16 µg/ml, werden die UV-B-protektiven Wirkungen als gleich bewertet. Die Konzentration von 16 µg/ml wurde festgelegt, da auch bei der Bestimmung der UV-B-PW von PABA versuchsbedingt Unterschiede auftreten.

Tabelle 9: Einteilung der Huminsäuren nach ihrer UV-B-protektiven Wirkung nach 24-stündiger Exposition in den Versuchsanordnungen 1 und 2

Einteilung der Huminsäuren	Huminsäuren
HS, deren UV-B-PW in VA 1 effektiver ist als in VA 2*	keine
HS, deren UV-B-PW in VA 2 effektiver ist als in VA 1**	HS Aldrich, HS Alteicher Moor III, NH ₄ -humat, Na-humat
HS, deren UV-B-PW in VA 1 und 2 gleich ist***	K-KOP, DOPA-OP, Na-KOP, HYKOP, HS Alteicher Moor I und II, NH ₄ -KOP

Tabelle 10: Einteilung der Huminsäuren nach ihrer UV-B-protektiven Wirkung nach 48-stündiger Exposition in den Versuchsanordnungen 1 und 2

Einteilung der Huminsäuren und PABA	Huminsäuren
HS, deren UV-B-PW in VA 1 effektiver ist als in VA 2*	keine
HS, deren UV-B-PW in VA 2 effektiver ist als in VA 1**	HS Aldrich, NH ₄ -humat, Na-humat, DOPA-OP, Na-KOP, HYKOP
HS, deren UV-B-PW in VA 1 und 2 gleich ist***	HS Alteicher Moor I, HS Alteicher Moor II

Tabelle 11: Einteilung der Huminsäuren nach ihrer UV-B-protektiven Wirkung nach 72-stündiger Exposition in den Versuchsanordnungen 1 und 2

Einteilung der Huminsäuren und PABA	Huminsäuren
HS, deren UV-B-PW in VA 1 effektiver ist als in VA 2*	keine
HS, deren UV-B-PW in VA 2 effektiver ist als in VA 1**	HYKOP, DOPA-OP, Na-KOP, Na-humat, NH ₄ -humat
HS, deren UV-B-PW in VA 1 und 2 gleich ist***	keine

Nach 24 h, 48 h und 72 h Exposition ist keine der untersuchten Huminsäuren in der VA 1 stärker UV-B-protektiv wirksam als in der VA 2.

Die synthetischen Huminsäuren (Na-KOP, DOPA-OP, HYKOP, K-KOP, NH₄-KOP) und die zwei HS aus dem Alteicher Moor I und II besitzen nach 24 h Exposition in den VA 1 und 2 gleich starke UV-B-PW. Vier natürliche Huminsäuren erweisen sich in der VA 2 effektiver UV-B-protektiv als in VA 1.

Nach 48-stündiger Exposition zeigen nur noch die beiden Huminsäuren aus dem Altteicher Moor in den VA 1 und 2 eine gleich starke UV-B-protective Wirksamkeit, während bei 6 Huminsäuren der UV-B-Schutz in der VA 2 effektiver ist.

Nach 72 h Exposition zeigen alle 5 untersuchten Huminsäuren in der VA 2 eine effektivere UV-B-protective Wirkung als in VA 1.

Beim Vergleich der UV-B-PC₅₀ zeigt sich, dass die synthetischen HS in der VA 1 und 2 nach 24 h Exposition eine effektive UV-B-PW besitzen. Mit zunehmender Expositionsdauer (72 h) erweist sich die UV-B-PW in VA 2 als effektiver.

Dagegen ist die UV-B-PW der natürlichen Huminsäuren HS Aldrich, Na-humat und NH₄-humat in VA 2 stärker als in VA 1. Dies ändert sich auch bei verlängerter Expositionsdauer (48 h, 72 h) nicht.

Die beiden HS Altteicher Moor I und II besitzen in VA 1 und 2 gleich gute UV-B-protective Effekte unabhängig von der Expositionsdauer.

3.13. Einteilung und Vergleich der halbmaximalen UV-B-protectiven Konzentration (UV-B-PC₅₀) der synthetischen Huminsäuren in den Versuchsanordnungen 1 und 5

Analog der Einteilung der Huminsäuren anhand ihrer UV-B-PC₅₀ der VA 1 und 2 werden die UV-B-protectiven Wirkungen der VA 1 und 5 miteinander verglichen. Es werden wiederum 3 Gruppen gebildet:

- a) HS, deren UV-B-PW in VA 1 effektiver ist als in VA 5*
- b) HS, deren UV-B-PW in VA 5 effektiver ist als in VA 1**
- c) HS, deren UV-B-PW in VA 1 und 5 gleich ist***

* UV-B-PC₅₀ (VA1) < UV-B-PC₅₀ (VA5); UV-B-PC₅₀ (VA5) - UV-B-PC₅₀ (VA1) > 16 µg/ml

** UV-B-PC₅₀ (VA1) > UV-B-PC₅₀ (VA5); UV-B-PC₅₀ (VA1) - UV-B-PC₅₀ (VA5) > 16 µg/ml

*** UV-B-PC₅₀ (VA1) = UV-B-PC₅₀ (VA5); |UV-B-PC₅₀ (VA1) - UV-B-PC₅₀ (VA5)| ≤ 16 µg/ml

Tabelle 12: Einteilung der Huminsäuren nach ihrer UV-B-protectiven Wirkung nach 24-stündiger Exposition in den Versuchsanordnungen 1 und 5

Einteilung der Huminsäuren	Huminsäuren
HS, deren UV-B-PW in VA 1 effektiver ist als in VA 5*	keine
HS, deren UV-B-PW in VA 5 effektiver ist als in VA 1**	keine
HS, deren UV-B-PW in VA 1 und 5 gleich ist***	Na-KOP, DOPA-OP, HYKOP

Tabelle 13: Einteilung der Huminsäuren und PABA nach ihrer UV-B-protektiven Wirkung nach 48-stündiger Exposition in den Versuchsanordnungen 1 und 5

Einteilung der Huminsäuren	Huminsäuren
HS, deren UV-B-PW in VA 1 effektiver ist als in VA 5*	DOPA-OP
HS, deren UV-B-PW in VA 5 effektiver ist als in VA 1**	HYKOP
HS, deren UV-B-PW in VA 1 und 5 gleich ist***	Na-KOP

Tabelle 14: Einteilung der Huminsäuren und PABA nach ihrer UV-B-protektiven Wirkung nach 72-stündiger Exposition in den Versuchsanordnungen 1 und 5

Einteilung der Huminsäuren	Huminsäuren
HS, deren UV-B-PW in VA 1 effektiver ist als in VA 5*	keine
HS, deren UV-B-PW in VA 5 effektiver ist als in VA 1**	Na-KOP, DOPA-OP, HYKOP
HS, deren UV-B-PW in VA 1 und 5 gleich ist***	keine

Nach 24-stündiger Exposition zeigen alle 3 Huminsäuren in den VA 1 und 5 gleich starke UV-B-PW. Nach 48 h Exposition ist eine Huminsäure in der VA 1 stärker UV-B-protektiv wirksam als in der VA 5, eine in der VA 5 effektiver als in VA 1 und eine zeigt in beiden VA gleich starke UV-B-PW. Nach 72 h Exposition sind alle 3 Huminsäuren in der VA 5 stärker UV-B-protektiv wirksam als in VA 1. Da sich in beiden VA die Zellen und Huminsäuren in direktem Kontakt befinden, würde man eine gleich starke UV-B-protektive Wirksamkeit erwarten. Die VA 5 erweist sich bei verlängerter Expositionsdauer (72 h) als effektiver, was auf zusätzliche protektive Effekte neben der reinen Absorptionswirkung hinweist.

4. Diskussion

4.1. Eigenschaften der natürlichen und synthetischen Huminsäuren

Synthese, Reaktionsverlauf und Struktur der Huminsäuren

Kaffeesäure ist eine gebräuchliche Ausgangssubstanz zur HS-Herstellung, die enzymatisch mit Phenoloxidase oder chemisch mit Natriumperiodat durchgeführt werden kann (Helbig u. Klöcking, 1983). Dabei verläuft die Reaktionskette über ein semichinoides Zwischenprodukt. Kaffeesäure kann in einer cis- oder trans-Form vorliegen (Fenton et al., 1978). Bei der radikalischen Polymerisation finden bei der cis-Isoform wahrscheinlich andere Ringschlüsse statt. Die Kaffeesäure zyklisiert intramolekular mit Hilfe ihrer Doppelbindung. Dies ist möglich, weil sich durch die ortho-ständigen Hydroxylgruppen und die konjugierte Doppelbindung (Abb. 6 Seite 16) resonanzstabilisierte Radikale und Chinone ausbilden können (Rex, 1960; Dubach u. Mehta, 1963). Ebenfalls radikalisch interagieren mehrere Kaffeesäuremoleküle miteinander, so dass sich höhermolekulare komplexe HS-Gerüste bilden. Als strukturelle Merkmale weisen sie Hydroxyl- und Carboxylgruppen sowie ketonische und aromatische Strukturen auf (Lewis u. Broadbent, 1961). Diese Strukturelemente lassen sich mit Hilfe der IR-Spektren identifizieren. Die hochmolekularen HS-Gerüste von KOP und HYKOP haben eine polyanionische Struktur und ein MG von ca. 6000 Dalton. HYKOP enthält deutlich mehr Carboxyl- und Hydroxylgruppen als KOP (Helbig et al., 1997). Die HS zeigen einheitlich im UV-VIS-Spektrum eine kontinuierliche Abnahme der Extinktion vom kurz- zum langwelligen Bereich hin. Je geringer das MG der HS ist, um so geringer ist die Absorption der UV-Strahlung (Helbig u. Klöcking, 1983). Wenn die Ausgangsverbindung, die reduktiven Abbauprodukte, die IR- und NMR-Spektren bekannt sind, können Formeln für den möglichen Aufbau der HS entwickelt werden.

Die Synthese der HS verläuft im Sinne einer radikalischen Polymerisation, bei der im Gegensatz zur Polykondensation keine Nebenprodukte auftreten (Kononowa, 1958). Dies zeigten Helbig et al. (1985), die Na-KOP, NH₄-KOP und HYKOP reduktiv mit Amalgam abbauten und als monomere Verbindung einheitlich Hydrokaffeesäure nachwiesen, d.h. die Syntheseausgangsverbindungen bzw. deren reduzierte Formen wiederfanden. Beim KOP erhält man bei der reduktiven Aufspaltung Hydrokaffeesäure. Im Gegensatz dazu bleibt bei der Polymerisation unter oxidativen Bedingungen die Doppelbindung der Kaffeesäure erhalten.

Die Reaktionsmöglichkeiten der Ferulasäure (4-Hydroxy-3-methoxy-zimtsäure) sind in der nachfolgenden Abbildung 52 dargestellt. In ähnlicher Weise könnte man sich auch eine Reaktion der Kaffeesäure, die sich chemisch lediglich durch die fehlende Methylgruppe in der ortho-ständigen phenolischen Hydroxylgruppe von der Ferulasäure unterscheidet, vorstellen. Die Doppelbindung in der Seitenkette stellt einen Angriffspunkt für Oxidationen

dar (Broadbent, 1964). Die Verbindungen könnten auch unter Verlust von Kohlendioxid reagieren. Ist die para-ständige Hydroxylgruppe verethert, wird bei der Polymerisation kein Kohlendioxid freigesetzt (Flaig, 1966). In unseren Hydroxyzimtsäuren ist die para-ständige Hydroxylgruppe nicht verethert.

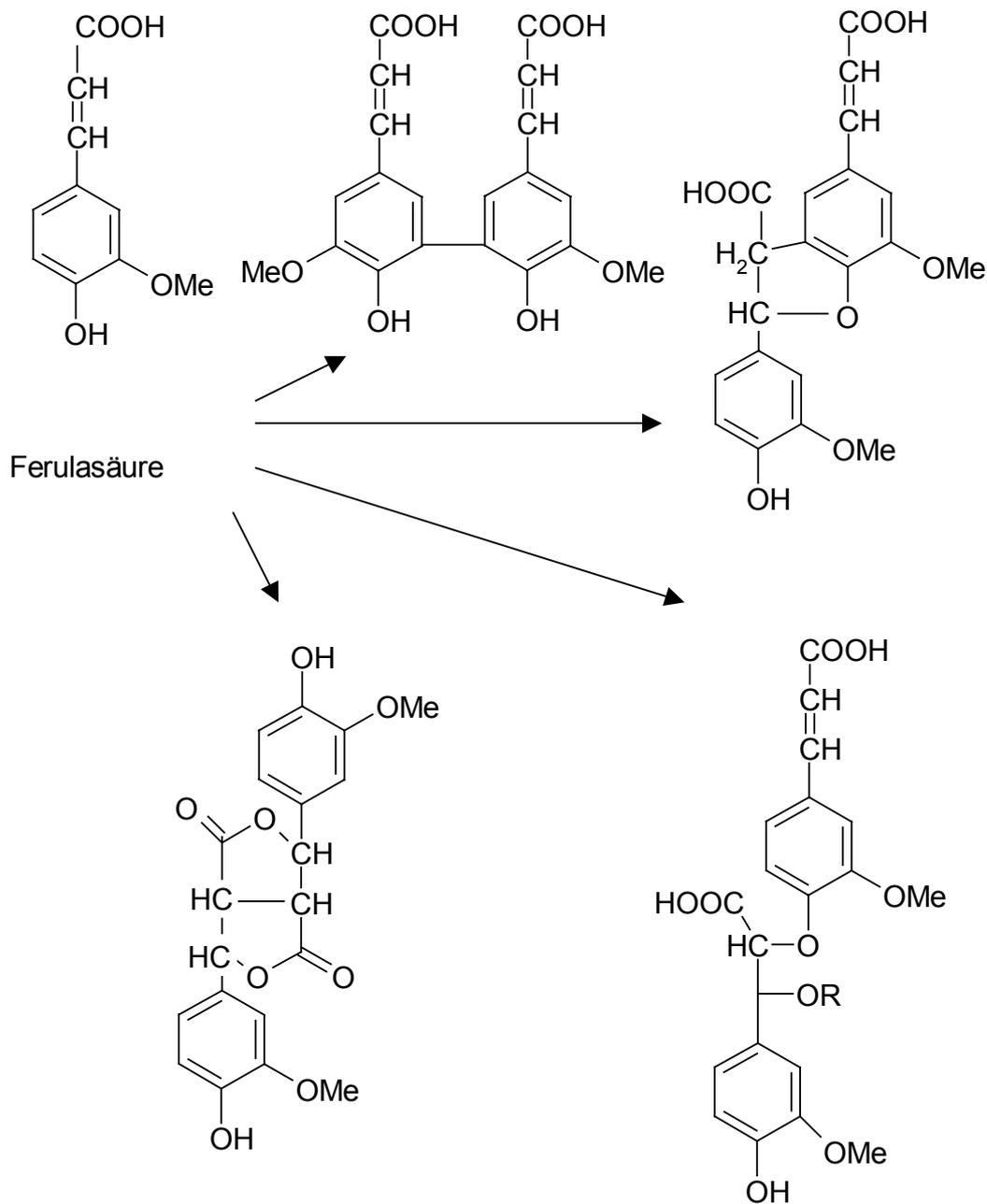


Abb.52: Ferulasäure als eine natürliche Hydroxyzimtsäure und mögliche Reaktionsprodukte im Sekundärstoffmetabolismus der Pflanzen (nach Flaig, 1966)

Der Reaktionsverlauf der Oxidation der Kaffeesäure wurde mittels elektrochemischer Methoden und durch Puls-Radiolyse in wässriger und organischer Lösung untersucht. Während bei 4-Cumarsäure und Ferulasäure initial ein Radikal gebildet wird, das sich dann in einer Radikal-Radikal-Kopplungsreaktion paart, führt die Oxidation der Kaffeesäure zur Ausbildung korrespondierender ortho-Chinone. Diese sind das Ergebnis einer Disproportionierung des initialen Semichinon-Radikals (Hapiot et al., 1996). Diese Untersuchungen bestätigen die Beobachtung, dass während der Synthese der synthetischen HS eine Fluoreszenz auftritt.

Komplexbildung

Die HS können wasserlösliche und –unlösliche Komplexe mit Metallionen bilden. Sie interagieren mit Lehmen und Erden und mit hydrophoben organischen Komponenten, wie z.B. Fettsäuren, Dialkylphthalaten und Pestiziden (Felbeck, 1971; Schnitzer, 1975). In den Versuchsanordnungen 1, 3, 4, 5 und 6 haben die U937-Zellen direkten Kontakt mit den HS. HS interagieren mit den Membranen der Zellen und beeinflussen die lockeren Zellverbände, wie z.B. die Träubchenbildung der Zellen. Es treten Wechselwirkungen über die negativen Ladungen der HS auf. Angelagerte Zellen kommunizieren miteinander über freigesetzte Mediatoren. Diese Mediatoren werden möglicherweise wie auch Farbstoffe und Ionen durch die HS komplexiert (Kühnert et al., 1982; Klöcking u. Helbig, 1991) und gebunden.

Röntgenstrukturanalysen zeigten, dass das Kohlenstoffgrundgerüst der HS ein durchbrochenes Netzwerk darstellt, das vereinzelt aromatische Strukturen enthält, die über aliphatische Ketten miteinander verbrückt sind. Dies wurde durch elektronenmikroskopische Untersuchungen bestätigt. Die unterschiedlich dicken HS-Schichten besitzen eine schwammartige Struktur. Die Perforationen haben eine Größe von einigen hundert Angström (Schnitzer, 1975). In die Löcher können organische und anorganische Substanzen eingelagert und fixiert werden. Enzyme können durch Komplexbildung gehemmt werden. Es erscheint möglich, dass die U937-Zellen direkt in die löchrigen Strukturen der HS integriert und adsorbiert werden. In diesem Verhalten scheinen sich die natürlichen und die synthetischen HS nicht zu unterscheiden. Da die HS bis auf zwei Ausnahmen (NH₄-humat und DOPA-OP_{Luft}) keine oder nur geringe Zytotoxizität zeigen, ist eher von einer membranstabilisierenden Wirkung auszugehen. Das Komplexbildungsverhalten der HS hat möglicherweise einen Einfluss auf die UV-B-PW. Bei Veränderungen der Strukturen bilden sich andere Resonanzen der Radikalstabilisierung aus.

Abbauprodukte der HS

Neben der alkalischen hydrolytischen Spaltung und der Photohydrolyse der HS können HS-Modellsubstanzen (z.B. KOP) auch reduktiv mit Natriumamalgam zu farblosen Produkten abgebaut und chromatographisch identifiziert werden. Man erhält ausschließlich

Hydrokaffeesäure, weil bei dem Abbau die Doppelbindung in der Seitenkette der Kaffeesäure reduziert wird. KOP ist einheitlich aus Kaffeesäuremolekülen aufgebaut, die bei der Polymerisierung weder einer Spaltung, noch einer Umlagerung unterliegen (Helbig et al., 1985).

Auch die Ergebnisse aus Untersuchungen zur antiviralen Aktivität von KOP und HYKOP lassen auf den Erhalt der unterschiedlichen Ausgangsstrukturen bei der Polymerisation schließen, da sich die Aktivitäten der HS charakteristisch unterscheiden. KOP besitzt eine 100-fach größere antivirale Aktivität als HYKOP (Helbig u. Thiel, 1982). Dagegen zeigen die UV-B-PW keine Unterschiede zwischen den beiden HS.

Beim reduktiven Abbau von Na-humat mit Natriumamalgam bestätigt sich der im Vergleich zu KOP uneinheitliche Aufbau. Man erhält Phloroglucin, α -Resorcylnsäure, Resorcin, Protocatechusäure und m-Hydroxybenzoesäure als Abbauprodukte (Helbig u. Klöcking, 1983).

Stickstoff

Die natürlichen HS enthalten aus Aminosäuren, Peptiden oder Proteinen stammenden Stickstoff in unterschiedlichen Anteilen. Er ist in das HS-Gerüst eingebaut (Broadbent, 1964). HS, die mit Ammoniak behandelt wurden, weisen differenzierte Eigenschaften auf. Wie auch Flaig (1966) berichtet, bilden sich chinoide Strukturen aus (Müller-Wegener, 1982). In den untersuchten HS liegt der Stickstoff auf unterschiedliche Weise gebunden vor. Stickstoff kann in Form des Ammoniumkations als Gegenion der HS (NH_4 -KOP, NH_4 -humat) vorkommen oder bei der oxidativen Polymerisation heterozyklisch gebunden werden. Der Stickstoff im DOPA-OP stammt aus der Aminosäure DOPA. Beim NH_4 -KOP wird der Stickstoff während der Synthese möglicherweise ebenfalls heterozyklisch in das Polymergerüst eingebunden (Broadbent, 1964). Dies würde erklären, warum die stickstoffhaltigen HS häufig eine stärkere pharmakologische Wirkung haben (Witthauer u. Klöcking, 1971). So erweist sich das NH_4 -humat nicht nur als sehr gut UV-B-protektiv wirksam, sondern auch als einzige natürliche HS als stark zytotoxisch. Die ermittelte CC_{50} liegt nach 1-stündiger Exposition bei 242,5 $\mu\text{g/ml}$ und steigt nach 48- und 72-stündiger Exposition auf 88,4 bzw. 81,5 $\mu\text{g/ml}$ an. Allerdings sind nie alle Zellen geschädigt. Nach 24-stündiger Exposition steigt die Zytotoxizität allmählich bis auf maximal 55 %, nach 48- und 72-stündiger Exposition nur bis auf ca. 70 % an. Einige der U937-Zellen sind noch lebensfähig und werden auch bei steigender Konzentration von NH_4 -humat nicht geschädigt. Möglicherweise werden die Zellen in das HS-Gerüst eingebettet und die Membranen stabilisiert, so dass ein Teil der Zellen überlebt. Mikroskopisch beobachtet man, dass ein Teil

der Zellen zerfällt und Zellfragmente in der Lösung schwimmen. Einige Zellen erscheinen jedoch intakt und lebensfähig. Die stickstoffhaltigen HS (NH₄-humat, NH₄-KOP, DOPA-OP) unterscheiden sich von den stickstofffreien HS in ihrer pharmakologischen und ihrer UV-B-protectiven Aktivität. NH₄-humat, NH₄-KOP und DOPA-OP sind nach 24-stündiger Exposition sehr gut UV-B-protectiv wirksam.

NH₄-KOP [30,4 µg/ml (1), 24,9 µg/ml (2)] zeigt nach 24-stündiger Exposition im Vergleich zu den strukturanalogen stickstofffreien HS Na-KOP und K-KOP in den VA 1 und 2 [Na-KOP: 35,4 µg/ml (1), 40,4 µg/ml (2); K-KOP: 38,6 µg/ml (1), 40,4 µg/ml (2)] eine etwas effektivere UV-B-PW. Na-KOP und K-KOP besitzen praktisch gleiche UV-B-PW. Allerdings ist die UV-B-PW von DOPA-OP nach 24-stündiger Exposition im Vergleich zu Na-KOP und K-KOP nicht effektiver. Da DOPA-OP ebenfalls den Stickstoff im Heterozyklus enthält, müsste auch diese HS eine leicht effektivere UV-B-Schutzwirkung besitzen. Dies konnte nicht bestätigt werden.

Mizellbildung

Wird humines Material mit organischen Agenzien behandelt, der pH-Wert oder das Lösungsmittel variiert, ändert sich die Molekulargewichtsverteilung, die mittels Gelfiltration bestimmt werden kann (Mehta et al., 1963). HS bilden in Lösung Mizellen, in deren Struktur die HS-Moleküle über hydrophobe Bindungen zusammengehalten werden. Bei Zugabe von organischen Mitteln ordnen sich die sauren Funktionen der HS im Inneren der Huminmizelle an. Die stereochemische Struktur ändert sich. Unter alkalischen Bedingungen stoßen sich die gebildeten negativen Ladungen ab, was zu einem Auseinanderbrechen der Huminmizellen und zur Bildung disperser kleiner Mizellen führt (Piccolo et al., 1996). Das Mizellbildungverhalten ist für die Erklärung der biologischen Aktivitäten und des Verhaltens der HS wichtig. So wurden auch von uns Veränderungen der Struktur bei der Exposition der Zellen mit HS beobachtet. Die Untersuchungslösung hatte zuerst immer einen physiologischen pH-Wert, der durch das RPMI-Medium vorgegeben war. Auch bei Zugabe der HS blieb der physiologische pH-Wert erhalten. Die U937-Zellen bewirken, dass im Verlaufe der Exposition der pH-Wert absinkt, was man bei Zugabe eines pH-Indikators beobachten kann. Dies erklärt möglicherweise die Unterschiede in den VA 1 und 2 bei längerer Expositionsdauer. In der VA 1 interagieren die HS nicht nur mit den Membranen der Zellen, sondern ändern auch ihr mizellares Verhalten. Die Zellen werden in das HS-Gerüst eingebettet, die Säurefunktionen in das Innere der Mizellen gekehrt bzw. die anionischen Funktionen protoniert, d.h. es treten einerseits ladungsbedingte und andererseits pH-bedingte Unterschiede auf. Die Löslichkeit der HS nimmt beim Ansäuern der Lösung ab. Diese Veränderungen sind unter dem Mikroskop gut zu beobachten. Während die HS-

Lösung ohne Zellen über Tage hinweg unverändert bleiben, bildet sich in den Lösungen mit Zellen eine Art lockeres Gerüst mit darin eingelagerten Zellen aus.

4.2. Wirkungen der natürlichen und synthetischen Huminsäuren

Lösen der Huminsäuren

Wegen des komplizierten Aufbaus der natürlichen HS nutzt man die Möglichkeit zur Synthese von HS-Modellsubstanzen, um ihre Wirkungen zu untersuchen und mögliche Rückschlüsse auf die Strukturen zu ziehen (Felbeck, 1971). Die in den Untersuchungen verwendeten natürlichen und synthetischen HS sind höhermolekulare, braun bis schwarzbraun gefärbte, polyanionische Verbindungen. Sie sind gut löslich in alkalischen Lösungen. Um die HS in unseren Versuchen in Lösung zu bringen, werden sie zunächst mit 2 ml 0,05 M NaOH versetzt. Die HS deprotonieren und liegen als Anionen in Lösung vor. Alle untersuchten HS mit Ausnahme der HS aus dem Alteicher Moor gehen vollständig in Lösung. Bei diesen bleiben einige unlösliche Partikel zurück, die abzentrifugiert werden und einen Anteil von ca. 1 bis 2 % ausmachen. Dieser Anteil wird bei der Berechnung der Konzentrationen berücksichtigt. Möglicherweise sind die unlöslichen Partikel der HS des Alteicher Moores ein Hinweis auf eine inhomogene Zusammensetzung mit hochmolekularen Anteilen. Das nach dem Lösen der HS zugegebene Zellzuchtmedium puffert die Lösung, so dass ein für das Wachstum der U937-Zellen erforderlicher pH-Wert von 7,4 vorliegt. Auch in den Versuchen, in denen die Zellen und die HS keinen direkten Kontakt haben, werden die HS-Lösungen mit RPMI hergestellt, da die enthaltenen Ionen und der pH-Wert einen Einfluss auf das Lösungsverhalten der Huminsäuren besitzen.

Unterschiede in den Versuchsanordnungen

Der auf eine Lichtabsorption zurückgeführte protektive Effekt von HS gegen UV-Strahlung wurde an *Klebsiella aerogenes* gefunden. Die Klebsiellen überlebten besser, wenn sich in der Inkubationslösung HS befanden (Bitton et al., 1972).

Die VA wurden so gewählt, dass die U937-Zellen entweder direkten Kontakt mit den HS haben oder sich getrennt von den Zellen befinden. In der VA, in der kein direkter Kontakt bestand, trifft der nicht absorbierte Anteil der UV-B-Strahlen auf die Zellen und schädigt diese. In den VA, in denen direkter Kontakt besteht, trifft der nichtabsorbierte Anteil der UV-B-Strahlen auf die Zellen, die aber zusätzlich den Einflüssen der HS ausgesetzt sind. Die Kurvenzüge der UV-B-PW der VA 1 zeigen häufig einen flacheren Anstieg als die der VA 2 (HS Alteicher Moor III 24h; Na-humat 24h, 48h, 72h; HS Aldrich 24h, 48h; HYKOP 48h, 72h; DOPA-OP 24h, 48h, 72h).

Ein wichtiger Unterschied zwischen den VA besteht in der Eigenfärbung der HS, weswegen sie vor der photometrischen Messung möglichst vollständig aus dem Versuchsmedium abzentrifugiert werden müssen. In den unterschiedlichen VA wurde gleich verfahren, allerdings hatten die U937-Zellen mit direktem Kontakt zu den HS noch braun gefärbte Oberflächen.

Teilweise lassen sich die Unterschiede zwischen den VA 1 und 2 auch auf die Zytotoxizitäten der HS zurückführen. Im Konzentrationsbereich bis 500 µg/ml sind die HS mit Ausnahme von NH₄-humat und DOPA-OP_{Luft} nach 24-stündiger Exposition nicht oder nur wenig zytotoxisch (HS Aldrich, HS Alteicher Moor I, II und III, K-KOP, NH₄-KOP, HYKOP). Die Zytotoxizitätskurven steigen nur bei einigen HS erst bei längerer Expositionsdauer an (Na-KOP, DOPA-OP). DOPA-OP zeigt nach 72 h Exposition mit ca. 50 % die größte Zytotoxizität. Wenn man z.B. die Zytotoxizitätskurven zu den UV-B-PW-Kurven der Versuchsanordnung 1 addiert, erhält man die Kurve der UV-B-PW der Versuchsanordnung 2 bzw. die Kurven nähern sich einander an (HS Alteicher Moor I 48h; HS Alteicher Moor II 48h; Na-KOP 48h, 72h; K-KOP 24h; DOPA-OP 48h, 72h). In der Abbildung 53 sind die Kurven der UV-B-PW von PABA nach 72 h Exposition gezeigt.

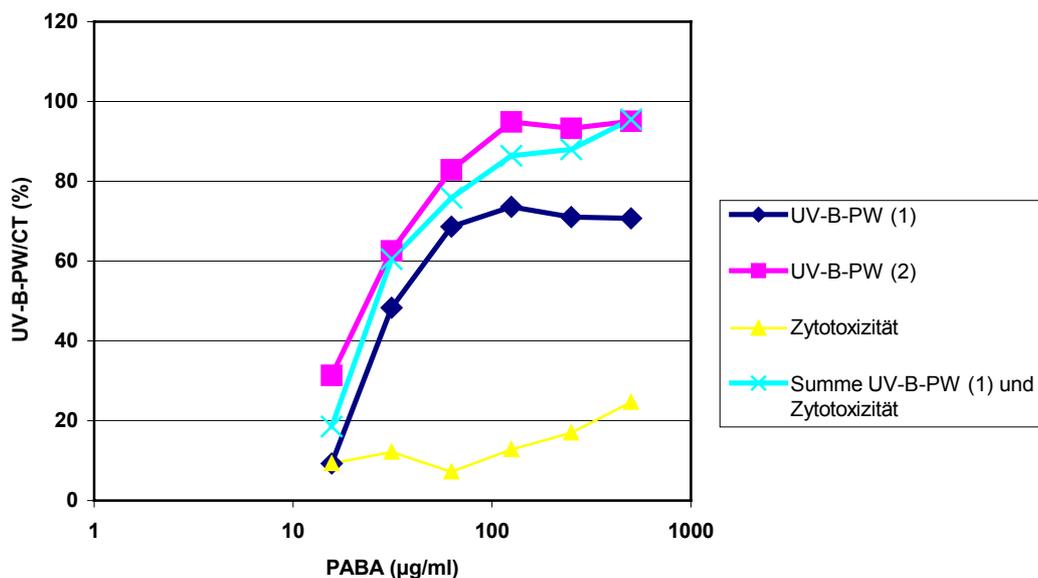


Abb.53: UV-B-protective Wirkung und Zytotoxizität von PABA an U937-Zellen.

Addiert man die Zytotoxizität (gelbe Kurve) und die UV-B-PW der VA 1 (blaue Kurve) zusammen, erhält man eine Kurve (türkis), die der UV-B-PW der VA 2 (pinke Kurve) nahezu entspricht.

Auch bei der Referenzsubstanz PABA treten Unterschiede zwischen den VA 1 und 2 auf. Die UV-B-PW ist nach 24-stündiger Exposition in der VA 1 schlechter als in der VA 2. In der VA 2

werden die UV-B-Strahlen von der Substanz in den Kavitäten des Deckels der Cytomorph[®]-b-Platten absorbiert und treffen somit nicht oder nur abgeschwächt auf die Zellen. In der Versuchsanordnung 1 befinden sich die Substanzen in direktem Kontakt mit den Zellen in den Kavitäten des Bodens der Cytomorph[®]-b-Platten. Befinden sich die Zellen nicht am Boden der Kavitäten, sondern schwimmen in der Lösung, trifft ein erhöhter Anteil der UV-B-Strahlen auf die Zellen. Der Unterschied in der UV-B-PC₅₀ zwischen der VA 1 und 2 beträgt bei PABA 16 µg/ml (24 h), 7,6 µg/ml (48 h) und 16,7 µg/ml (72 h). Die Zytotoxizität von PABA liegt nach 24 und 48 h Exposition zwischen 0 und 10% und nach 72 h zwischen 10 und 20 % im Konzentrationsbereich bis 500 µg/ml. Man kann davon ausgehen, dass bedingt durch die Unterschiede in den Versuchsanordnungen und durch den Einfluss der Substanzen auf die Zellen ein Unterschied in den UV-B-PC₅₀ von ca. 16 µg/ml ermittelt wird, der bei Vergleich der UV-B-PC₅₀ einkalkuliert werden muss.

Die Unterschiede zwischen den VA 1 und 5 liegen vermutlich in den Wechselwirkungen begründet. Die HS lagern sich als schützende Schicht um die Zellen, was den UV-B-Schutz sehr effektiv macht. Außerdem sind nach einer 1-stündigen Exposition die Zellen auf den Boden der Kavitäten der Cytomorph[®]-b-Platten gesunken, so dass sich die gesamte HS als schützende Schicht darüber befindet. Die Beeinflussung der Adhäsionstendenz von Organismen durch HS zeigten auch Versuche, in denen *Escherichia coli* in Gegenwart von HS besser an Glas anhaften als ohne HS (Parent u. Velegol, 2004).

Beeinflussung von Wachstumsfaktoren durch HS

U937-Zellen besitzen als Wachstumsfaktoren TGF β (1) (transforming growth factor beta (1)) und VEGF (vascular endothelial growth factor). Durch Lipopolysaccharide können U937-Zellen zur Sekretion dieser Faktoren angeregt werden (Ming et al., 2004). Die Expression von VEGF wird durch Salbeisäure B (Salvianolic acid B) und Ginkgo-biloba-Extrakt gehemmt (Yang et al., 2002). Prostaglandine fördern das Wachstum der U937-Zellen über die VEGF-Produktion. Sie steigern die Produktion von VEGF über den spezifischen PGE- und den PPAR gamma Rezeptor (peroxisome proliferator-activated receptor gamma) (Bamba et al., 2000). HS könnten durch Komplexierung Wachstumsfaktoren hemmen.

HS-Behandlung erhöht die Adhäsion und die für die Aktivierung charakteristische Produktion von Superoxid-Radikalen von Neutrophilen. Durch Kinase-Inhibitoren können diese Mechanismen blockiert werden. Eine längerdauernde Aktivierung der Neutrophilen schädigt Endothelzellen und ist möglicherweise die Erklärung für die Entstehung der Blackfoot Disease (BFD) (Chen et al., 2002).

Einfluss von Ionen

Für die Zytotoxizität der HS in Mammazellen werden zwei Mechanismen verantwortlich gemacht. Zum einen können Huminsäuren Fe (III) zu Fe (II) in wässriger Lösung in einem pH-Bereich von 4,0 bis 9,0 reduzieren. Zum anderen steigern HS die Lipidperoxidation der Linolsäure in Rattenleber-Mikrosomen. Die Exposition mit HS führt zur Bildung von Superoxid und der Freisetzung und Reduktion von Eisen aus Ferritin. Die HS bilden mit den freigesetzten Eisen-Ionen Komplexe, wodurch die Redoxbalance gestört wird. Es entsteht oxidativer Stress in den Zellen (Ho et al., 2003). Die Komplexe bestehen aus mehreren Molekülen Ferulasäure, Eisen und Wasser und sind dazu befähigt, an Redoxreaktionen teilzunehmen. Fe (III)-Ionen oxidieren Ferulasäure zu einem Dilacton (Graf et al., 1984).

Bei steigender Temperatur steigt aufgrund der veränderten Oberflächenspannung die Partikelgröße von HS. Gibt man zu der Lösung Kationen hinzu, kommt es in Abhängigkeit von der Ladung und der Partikelgröße entweder zu einer Kontraktion oder einer Expansion der Partikel. Erniedrigung des pH-Wertes führt zunächst zu einer Kontraktion, dann zu Wachstum und schließlich in einem stark saurem Medium zur Präzipitation der HS-Partikel (Palmer u. von Wandruszka, 2001). HS können Ionen austauschen und adsorbieren (Kühnert et al., 1982)

In unseren Versuchen hat weder die Wahl des Gegenions (Na^+ , K^+ , NH_4^+) beim KOP noch die unterschiedliche Struktur der monomeren Ausgangsstoffe der synthetischen HS beim KOP, HYKOP und DOPA-OP einen Einfluss auf die UV-B-PW. Sowohl die sich lediglich durch unterschiedliche Gegenionen unterscheidenden HS Na-KOP, K-KOP und NH_4 -KOP als auch HYKOP und DOPA-OP haben gleiche UV-B-PW nach 24-stündiger Exposition.

Huminsäuren Altteicher Moor nach 24-stündiger Exposition

HS Altteicher Moor I und II besitzen in den VA 1 und 2 nahezu gleiche UV-B-PW, die HS Altteicher Moor III in VA 1 eine deutlich schlechtere. Diese Unterschiede lassen sich durch die unterschiedlichen Aufarbeitungsmethoden begründen. Während die HS Altteicher Moor I lediglich durch Alkalisierung gelöst und anschließend mit Säure wieder ausgefällt wurde, fanden bei den anderen beiden HS weitere Aufbereitungsschritte statt (Kirsch, 2002; Liers 2002).

Die HS Altteicher Moor I und II besitzen eine mit den synthetischen HS vergleichbare UV-B-PW nach 24-stündiger Exposition. Nach 48 h Exposition ist die UV-B-PW der HS Altteicher Moor I und II in der VA 1 effektiver als die der synthetischen HS. In der VA 2 zeigen sie gleiche UV-B-PW.

Von den HS des Altteicher Moores wurden drei verschieden aufbereitete HS hergestellt, die sich in ihren UV-B-protaktiven Eigenschaften unterscheiden. So können verschiedene Aufbereitungstechniken von huminem Material zu einer Reduktion der Größe der Polymere

und deren Oberfläche (Kühnert et al., 1982) führen, weswegen die aufbereiteten HS nicht unbedingt mit dem ursprünglichen Material vergleichbar sind (Felbeck, 1971). Führt man mittels UV-Bestrahlung eine Photolyse von HS durch, werden die HS-Moleküle verkleinert und die Bildung von Pseudomizellen verhindert. Wenn die Größe der Huminpolymere reduziert wird, werden HS-Aggregationen vermindert (von Wandruszka, 1995).

Huminsäuren aus Dierhagen

Die beiden aus dem Naturmoor bei Dierhagen stammenden HS Na-humat und NH₄-humat unterscheiden sich erheblich in ihrer Zytotoxizität und ihrer UV-B-PW. NH₄-humat ist zytotoxisch [CC₅₀ 242,5 µg/ml (24 h), 88,4 µg/ml (48 h), 81,5 µg/ml (72 h)]. Aus diesem Grund lässt sich in der VA 1 keine UV-B-PW nachweisen. Dagegen besitzt NH₄-humat in der VA 2 nach 24-, 48- und 72-stündiger Exposition von allen untersuchten HS die beste UV-B-protective Wirkung. Die relative UV-B-PW bezogen auf PABA beträgt 108 % (24 h), 164 % (48h) und 133 % (72h). Die UV-B-PW von Na-humat liegt in der VA 2 zwischen 51 und 69 % der von PABA nach 24- bis 72-stündiger Exposition. Dagegen nimmt sie in VA 1 von 111 % nach 24 h Exposition auf 52 % nach 48 h Exposition ab. Nach 72 h Exposition kann die UV-B-PC₅₀ nicht mehr ermittelt werden. Wie bei den HS des Alteicher Moores liegt auch bei denen aus Dierhagen das unterschiedliche UV-B-protective und zytotoxische Verhalten in den verschiedenen Isolierungsmethoden begründet.

Huminsäure Aldrich

HS Aldrich besitzt nach 24-stündiger Exposition in der VA 1 eine schlechtere UV-B-PW als in der VA 2, was möglicherweise auf die Bildung von Radikalen zurückzuführen ist. So wird bei einer 4-stündigen Bestrahlung mit einer Hochdruck-Quecksilber-Lampe in wässriger Lösung die Bildung von Hydroxyl-Radikalen induziert (Liu et al., 2004).

Pharmakologische UV-B-protective Wirkung (VA 3)

Die synthetischen HS Na-KOP, HYKOP und DOPA-OP zeigen in der VA 3 keine pharmakologische, photoprotective Wirkung. Der UV-B-induzierte Zellschaden veränderte sich nicht. Die HS üben auf vorgeschädigte U937-Zellen aber auch keine weitere zytotoxische Wirkung aus. Die Beeinflussung der durch UV-B-Strahlen verursachten Veränderungen des Genoms in Form von Cyclobutan-Pyrimidin-Dimer (CPD) und 6-4-Photoprodukt (6-4-PP) und des oxidativen Stresses durch ROS (reactive oxygen species) kann in unserem Zellmodell nicht untersucht werden.

Vergleicht man die UV-B-PC₅₀ von Na-KOP, HYKOP und DOPA-OP, lässt sich möglicherweise indirekt doch eine pharmakologische Wirkung ableiten. Die UV-B-PC₅₀ nach

24-stündiger Exposition der 3 HS unterscheidet sich in den VA 1 und 5 nicht voneinander. Nach 48 h Exposition zeigt HYKOP in der VA 5 eine bessere UV-B-PW als in VA 1, und nach 72 h Exposition erweisen sich alle 3 HS in der VA 5 als besser wirksam im Vergleich zu der VA 1. Die auf die Zellmembranen aufgelagerten HS beeinflussen die Zellen positiv im Sinne einer verbesserten UV-B-PW, was möglicherweise auf die Fähigkeit der HS, Radikale zu binden und zu stabilisieren zurückzuführen ist. Möglicherweise haben auch die komplexierenden Eigenschaften der HS einen Einfluss auf die Stabilität der Zellmembran und auf die Freisetzung von Radikalen und Entzündungsparametern.

UV-B-PW nach 48 h und 72 h Exposition

Nach 48 h Exposition ist die UV-B-PW von keiner der untersuchten HS in der VA 1 besser als in der VA 2. Während die HS Altteicher Moor I und II in den beiden VA nahezu gleiche UV-B-PW besitzen, sind die anderen HS (HS Aldrich, Na-KOP, DOPA-OP, HYKOP, Na-humat und NH₄-humat) in der VA 2 besser UV-B-protektiv wirksam als in der VA 1. Die HS Na-KOP, DOPA-OP, HYKOP und Na-humat besitzen in der VA 1 nach 48 h deutlich schlechtere UV-B-PW als nach 24 h Exposition.

Insgesamt zeigt sich, dass zur Beurteilung der UV-B-PW eine Expositionsdauer von bis zu 72 h sinnvoll ist, da sich die Unterschiede in den unterschiedlichen VA erst nach längeren Expositionsdauern als 24 h herausstellen. Einen optimalen UV-B-protaktiven Schutz haben die HS, wenn sie sich als schützende Schicht über den Zellen befinden. In diesem Sinne ist es ein Vorteil, dass sie als höhermolekulare Substanzen nicht durch das Stratum corneum der Haut penetrieren (Wohlrab et al., 1984; Saija et al., 1998). Die HS besitzen neben der UV-B-PW weitere pharmakologische nach UV-B-Bestrahlung ausgelöste Effekte, da die Ergebnisse der VA 1 und 2 unterschiedlich sind, sich aber nicht allein durch die Zytotoxizität, Photostabilität oder pharmakologische Photoprotektion erklären lassen. Die HS sind außer NH₄-humat in dem untersuchten Konzentrationsbereich bis 500 µg/ml nicht oder nur schwach zytotoxisch, photostabil und zeigen in der VA 3 keine UV-B-protaktiven Effekte. Auch durch die unterschiedlichen VA sind diese Unterschiede nicht zu erklären, da PABA zwar Unterschiede in der UV-B-PC₅₀ von bis zu 16 µg/ml zeigt, diese Differenz aber berücksichtigt wurde. Ein möglicher Erklärungsansatz ist die Apoptose.

Da die HS photoprotektiv sind, dürfte die durch Kernveränderungen (CPD, 6-4 PP) oder ROS ausgelöste Apoptose nur in geringem Maß auftreten. Dagegen könnte die Apoptose durch HS ausgelöst werden. Dies würde erklären, warum einige HS nach 24-stündiger Exposition in VA 1 eine sehr gute UV-B-protaktive Wirkung aufweisen, die bei Verlängerung der Expositionsdauer abgeschwächt wird (Na-KOP, DOPA-OP, HYKOP, Na-humat).

In einigen Versuchen stiegen die Kurven der UV-B-PW bis auf über 100 % an, was möglicherweise durch die durch die HS gesteigerte oxidative Phosphorylierung begründet

werden kann. Nach einer Kontaktzeit von über 1 h steigern HS im Konzentrationsbereich von 40 bis 400 µg/ml die Respiration der Mitochondrien. Dabei sind HS mit kleinerem MG signifikant effektiver als die mit höheren MG (Visser, 1987).

Photostabilität (VA 6)

In unseren Versuchen konnten makroskopisch keine Veränderungen wie z.B. eine Entfärbung der Lösung beobachtet werden. Die bestrahlten HS zeigen keine erhöhte Zytotoxizität, wie dies bei phototoxischen Reaktionen bei UV-Filtersubstanzen manchmal zu beobachten ist (Shaath, 1991). Dagegen unterliegen mit UV-Licht verschiedener Wellenlängen bestrahlte Fulvosäuren einer pH-abhängigen Photooxidation. Mit ansteigendem pH-Wert nimmt die Photooxidation zu. Ungefähr 90 % der Fulvosäuren wurden durch die mehrstündige Bestrahlung abgebaut, vor allem die für die Farbgebung verantwortlichen phenolischen Säuren wurden zerstört (Chen et al., 1978).

Bei der Bestrahlung von HS kommt es zu Veränderungen des Radikalanteils. Es werden radikalische Reaktionen angeregt, die zu einer Kopplung der vorhandenen Radikale und der Bildung von neuen führen. Die Reaktion verläuft über einen photoinduzierten Charge-Transfer-Komplex zwischen der Donor-Verbindung und der Akzeptor-Verbindung (Lagercrantz u. Yhland, 1963). Die HS werden als Akzeptoren angesehen. Die durch Bestrahlung gebildeten Radikale entstehen wahrscheinlich sowohl in den HS-Molekülen als auch in den Membranen der Zellen. Die HS können in ihrem Gerüst Radikale stabilisieren und mit anderen Radikalen paaren (Flaig, 1966; Rice-Evans et al., 1996).

Neben der photooxidativen Radikalbildung werden auch durch die mitochondriale Atmungskette Radikale gebildet, wenn der molekulare Sauerstoff nicht vollständig zu Wasser reduziert wird. Es entstehen Superoxidanion-Radikale. Die Superoxidanionen werden durch die Superoxiddismutase in Wasserstoffperoxid umgesetzt, das von der Katalase oder durch das Glutathionsystem weiter zu Wasser reduziert wird.

Die HS Na-KOP, K-KOP, NH₄-KOP, HYKOP und DOPA-OP zeigen nach UV-B-Bestrahlung mit einer Dosis von 360 J/m² keine erhöhte Zytotoxizität.

Desmutagene Wirkung

Da UV-B-Strahlen das Potenzial haben, DNA-Mutationen auszulösen, stellt sich die Frage, ob HS in der Lage sind, diese Mutationen zu verhindern. In der Literatur findet man, dass HS selbst nicht mutagen sind. Sie inhibieren aber auch keine Spontanmutationen. Die Ursache der desmutagenen Wirkung ist eine konzentrationsabhängige Adsorption der mutagenen Substanz (z.B. Benzo[a]pyrens oder 3-Aminoanthracens) durch die HS (Sato et al., 1987). Bei der kritischen Mizellbildungskonzentration ist die Adsorption gering. Das Mutagen wird

abgefangen, bevor es die Zelle attackieren kann. Der desmutagene Effekt nimmt mit ansteigendem MG zu. Bei zusätzlich einwirkenden oxidativen Einflüssen, wie z.B. Ozon, wird der desmutagene Effekt abgeschwächt (Sato et al., 1986; Kowbel et al., 1986). Auch gegen die Mutagene Mitomycin C und Malonhydrazid erwiesen sich die HS als desmutagen (Cozzi et al., 1993).

Kohle-HS besitzen kein mutagenes Potential gegen *Salmonella typhimurium* (Bernacchi et al., 1996b). Dagegen führen HS an intestinalen Zellen zu strukturellen Veränderungen und chromosomalen Abnormalitäten (Bernacchi et al., 1996a).

In unseren Versuchen umgeben die HS die Zellen. Sie schützen die U937-Zellen vor UV-B-Strahlung, indem sie diese absorbieren und in Wärme umwandeln. Gelangen die Strahlen in das Zellinnere und lösen dort oxidativen Stress aus, können die HS keine Protektion mehr bewirken. Anders verhält es sich, wenn mutagene Substanzen die Zelle von außen attackieren, weil dann die komplexierenden Eigenschaften der HS den Angriff des Mutagens auf die Zelle vereiteln.

Antiinflammatorische Wirkung

Bei einer UV-B-Bestrahlung treten in den Zellen nicht nur mutagene Veränderungen sondern auch membranverändernde Effekte auf. Bei der UV-B-Bestrahlung werden Entzündungsmediatoren gebildet. Wenn die Zellen bereits geschädigt sind, haben die HS, die sich außen auf die Membranen auflagern, keinen Einfluss mehr auf die Entzündungsvorgänge. Der Pathomechanismus der Lipidperoxidation und der Arachidonsäurefreisetzung ist ausgelöst und läuft weiter ab. Sicherlich binden die HS die in das Medium freigesetzten Mediatoren. In unserer VA 3 konnte keine pharmakologische Wirkung gezeigt werden. Dennoch beeinflussen HS die Arachidonsäurefreisetzung aus den Zellmembranen (Helbig et al., 1985) und die Bildung von Entzündungsmediatoren. So hemmen polyphenolische, antiviral wirksame Oxidationsprodukte konzentrationsabhängig die Lipoxygenase von Kaninchen-Retikulozyten. Diese Inhibierung der Lipoxygenase tritt in dem gleichen Konzentrationsbereich auf, wie die HS ihre antivirale Aktivität entfalten. Die Oxidationsprodukte von Kaffeesäure, von 2,5-Dihydroxytoluen und 3,4-Dihydroxytoluen waren die potentesten Inhibitoren der Lipoxygenase (Schewe et al., 1991). Bei Herpes-simplex-Infektionen am Kaninchenauge wurden virusinduzierte Veränderungen im zellulären Arachidonsäure-Metabolismus beschrieben. In unseren Versuchen kommt es wahrscheinlich zu membrandestabilisierenden Einflüssen infolge der UV-B-Strahlung und zu membranstabilisierenden Effekten durch die HS.

HS haben strukturelle Gemeinsamkeiten mit nichtsteroidalen Hemmstoffen der Prostaglandinsynthese, wie z.B. mit Salicylsäurederivaten, phenolischen Säuren und Polyphenolen (Rice-Evans et al., 1996). Eine Hemmung der Prostaglandinsäuresynthese erklärt den

pharmakologischen Hintergrund des analgetischen und antiphlogistischen Effektes. Es wurde gezeigt, dass in In-vitro-Untersuchungen die HS einen besseren Effekt als Acetylsalicylsäure, aber einen schlechteren Effekt als Indometacin in Bezug auf die Verminderung der Prostaglandin-synthese haben (Brenng et al., 1981).

Die antiphlogistische Wirkung der natürlichen HS NH_4 - und Na-humat wurde am Eiweißödem der Rattenpfote und mit dem Granulombbeuteltest nachgewiesen und mit Antiphlogistika (Aminophenazon, Acetylsalicylsäure) verglichen. NH_4 -humat ist stärker antiphlogistisch wirksam als Na-humat. Der Effekt von NH_4 -humat ist vergleichbar mit dem des Aminophenazon (Klößing et al., 1968).

Ein schützender Effekt gegen die UV-induzierte Peroxidation von Phosphatidylcholin in Membranen ist auch für Flavonoide (Quercetin, Hesperetin, Naringenin) beschrieben (Bonina et al., 1996). In der menschlichen Haut penetrieren sie durch das Stratum corneum in tiefere Hautschichten. Flavonoide stellen erfolgversprechende Kandidaten zum UV-Schutz dar (Pietschmann et al., 1992; Saija et al., 1998).

Bei einer Bestrahlung mit UV-B-Licht nimmt die Umwandlung der Arachidonsäure in Cyclooxygenase-Produkte (PGD_2 , PGE_2 , $\text{PGF}_{2\alpha}$) ab, während die Lipoxygenase-Produkte (15-HETE, 12-HETE) ansteigen. Man nimmt an, dass ein endogener Inhibitor der Cyclooxygenase gebildet und ins Zytoplasma freigesetzt wird. Dies führt zu einem Ansteigen der Lipoxygenase-Produkte und bedingt den verlängerten Entzündungsprozess (Ziboh u. Burrall, 1987). Im Gegensatz dazu wird die Arachidonsäure durch Tenside (Alkylpolyglucoside) durch Solubilisierung und die Zerstörung der Membranen freigesetzt (Kühn, 1998). Allerdings kann Natrium-humat die Oberflächenspannung des Wassers herabsetzen und somit als Surfactant eingesetzt werden (Visser, 1964).

In Abhängigkeit von der Strahlendosis wird in humanen Fibroblasten eine Lipidperoxidation und die Bildung von PGE_2 ausgelöst und die Viabilität gesenkt. Diese Phänomene treten gemeinsam bei Strahlendosen ab 100 bis 150 mJ/cm^2 auf (Filipe et al., 1995).

Außerdem wird nach der UV-A- und UV-B-Bestrahlung von humanen Keratinozyten die Aktivitäten der Superoxid-Dismutase und der Katalase gesenkt (Punnonen et al., 1991a). Das bestätigen auch die Untersuchungen von Pence und Naylor (1990), die haarlose Mäuse mit einer einmaligen UV-B-Dosis bestrahlten und beobachteten, dass die Aktivitäten der Superoxid-Dismutase und die der Katalase nach 12 h vermindert sind und diese Depression bis zu 72 h anhält (Punnonen et al., 1991c). Obwohl nach einer UV-B-Bestrahlung die Radikalbildung ansteigt, wird die Aktivität antioxidativer Enzyme gesenkt.

Andere Untersuchungen beschäftigen sich mit den antioxidativen Vitaminen in der Haut. Dazu wurden haarlose Mäuse mit unterschiedlichen Dosen von UV-A und UV-B bestrahlt und gefunden, dass zwar bei geringen UV-Dosen Ascorbat schnell verbraucht wird, der

Ascorbatgehalt bei höheren Dosen aber nicht beeinflusst wird. Den entgegengesetzten Effekt zeigten Glutathion, Ubiquinol und α -Tocopherol. Bei niedrigen UV-Dosen wurde der Gehalt nicht beeinflusst und bei hohen UV-Dosen sank deren Gehalt ab. Dagegen stieg der Gehalt der Lipidperoxide in allen Dosisbereichen an (Shindo et al., 1994). Dies beweist, dass in Abhängigkeit von der gewählten Bestrahlungsdosis unterschiedliche antioxidative Schutzmechanismen auftreten.

Monomere Verbindungen der synthetischen Huminsäuren

Kaffeesäure und Ferulasäure als Vertreter der Hydroxycimtsäuren in Pflanzen besitzen antioxidative Aktivität und stellen photoprotektive Agenzien dar (Fenton et al., 1978). Der Nachweis gelang anhand zweier Modelle - in einem wurde der Einfluss der durch UV-Strahlung ausgelösten Peroxidbildung in Phosphatidylcholin liposomaler Membranen untersucht – in dem anderen die Aktivität von Stickoxid, das am oxidativen Geschehen beteiligt ist, nachgewiesen. Die UV-Strahlung wird durch Hydroxycimtsäuren geblockt und Irritationen verhindert. Dabei ist die perkutane Absorption der Hydroxycimtsäuren als eine Voraussetzung für die photoprotektiven Effekte anzusehen (Saija et al., 1999). Ferulasäure und Kaffeesäure dringen in die Haut ein und penetrieren durch das Stratum corneum. Die Bildung des bei der Lipidperoxidation freigesetzten Malondialdehyds wird durch die Ferulasäure und die Kaffeesäure dosisabhängig vermindert. Die ermittelte IC_{50} von Ferulasäure war 12,0 $\mu\text{g/ml}$ (10,8 – 15,1 $\mu\text{g/ml}$), und die IC_{50} von Kaffeesäure betrug 4,9 $\mu\text{g/ml}$ (4,1 – 5,4 $\mu\text{g/ml}$) (Saija et al., 1999). Sie besitzen eine Aktivität gegen Hydroxyl- und Peroxidradikale sowie gegen das Superoxid-Anion. Allerdings unterliegen die beiden Hydroxycimtsäuren selbst einer Veränderung unter UV-Einfluss (Graf, 1992). Um einen antioxidativen Effekt ausüben zu können, müssen sich die Substanzen also in direktem Kontakt zu den Membranen und oxidationsempfindlichen Strukturen befinden und auch bereits dort sein, bevor die schädigende Exposition erfolgt. Im Gegensatz dazu belegen unsere Versuche, dass die HS auch UV-B-protektiv wirken, wenn sie sich in einer getrennten Schicht über den Zellen befinden (VA 2).

Mit Kaffeesäure inkubierte U937-Zellen zeigen eine verbesserte Toleranz gegen oxidative Einflüsse, was sich in einem erhöhten Überleben der Zellen zeigt. Der Effekt scheint auf die Fähigkeit der Kaffeesäure zurückzuführen zu sein, den Glutathionverbrauch zu reduzieren und die Lipidperoxidation zu hemmen (Nardini et al., 1998). Kaffeesäure und Ferulasäure haben also ein antioxidatives Potenzial in den Zellen (Graf, 1992). Sie besitzt die Eigenschaft eines Radikalfängers. Zusätzlich ist ein Einfluss auf die Leukotrienbiosynthese beschrieben. Die 5- und 12-Lipoxygenaseaktivität und die Oxidation der LDL im Plasma wird gehemmt. Sie ist beteiligt an der Rückführung des α -Tocopheryl-Radikals in das α -Tocopherol. Die Plasmakonzentrationen, die postprandial erreicht werden, liegen im

Mikromolarbereich (Chen u. Ho, 1997). Eine antioxidative Wirkung der HS konnte nicht gezeigt werden. In der VA 3 besitzen die HS keine UV-B-PW. U937-Zellen besitzen keine verbesserte Toleranz gegen UV-B-Bestrahlung, wenn die HS erst nach der Bestrahlung zu den Zellen gegeben werden.

Hydroxyzimt-, Chlorogen-, Kaffee-, Ferula- und p-Cumarsäure steigern die Resistenz von LDL gegen Peroxidation. Dabei sind Kaffeesäure und Chlorogensäure besser wirksam als Ferulasäure. Am schwächsten wirkt p-Cumarsäure (Castelluccio et al., 1995). Die Ferulasäure liegt in den Pflanzen in freier Form oder in kovalenter Bindung mit Ligninen oder anderen Biopolymeren vor. Durch den phenolischen Kern und die konjugierte Seitenkette ist sie resonanzstabilisiert. Sie übt eine antioxidative Funktion bei der Erhaltung der Zellintegrität gegen Sauerstoff und Strahlung aus. Auf die gleiche Weise wirkt die Ferulasäure antiphlogistisch (Graf, 1992).

4.3. Gemeinsamkeiten der Huminsäuren mit Melaninen

Strukturen der Melanine und der Huminsäuren

Zwischen dem Melanin, den HS und den HS-ähnlichen Verbindungen treten einige strukturelle Gemeinsamkeiten auf. So haben alle Substanzen ein hohes MG, sind dunkel gefärbte Verbindungen mit aromatischen Kernen, konjugierten Doppelbindungen und gleichen monomeren Ausgangsverbindungen. Chemisch gesehen gibt es Gemeinsamkeiten zwischen den HS, den Ligninen, den Flavonoiden (Flaig, 1966; Felbeck 1971) und den Melaninen. Melanine üben an erster Stelle eine Schutzfunktion gegen die schädigenden UV-Strahlen aus. Die UV-Strahlen werden absorbiert und freie Radikale gebunden. Neben dem Schutz der Zellkerne vor mutagenen Einflüssen der UV-Strahlen bieten die Melanine durch die Absorption der infraroten und sichtbaren Strahlung zusätzlich einen Schutz vor Wärme.

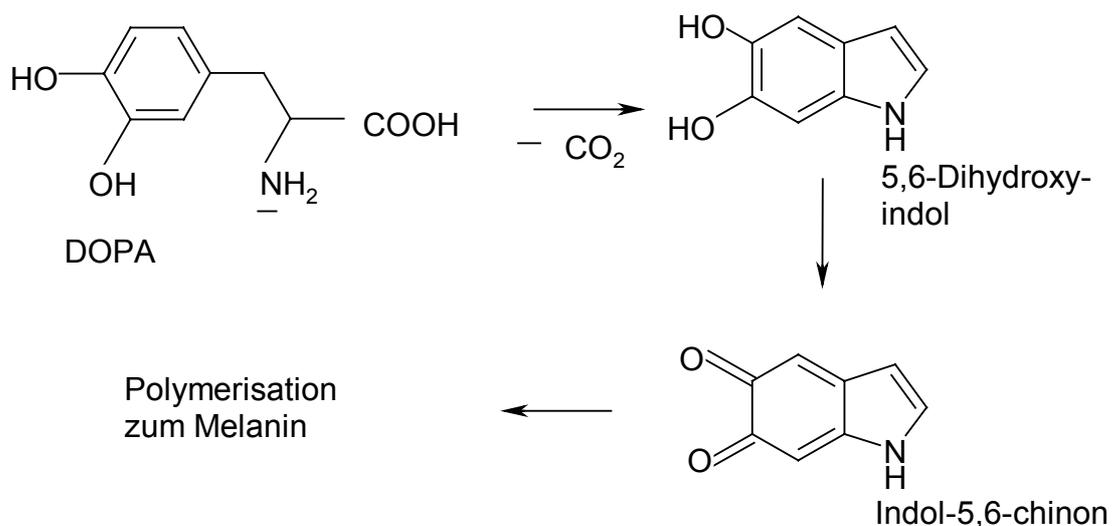


Abb.54: Bildung des Melanins in der Haut

Eumelanine sind einheitlich aus den verschiedenen Oxidationsstufen des DOPA-Chinons, der Indol-5,6-chinon-2-carbonsäure und des Indol-5,6-chinons aufgebaut. Die Indolchinone werden durch Polymerisation gekoppelt, wobei sie aber ihre spezifischen Eigenschaften behalten (Abb.54) (Prota, 2000).

Es ergibt sich ein polymeres Gerüst, dessen Struktur in der folgenden Abbildung 55 dargestellt ist.

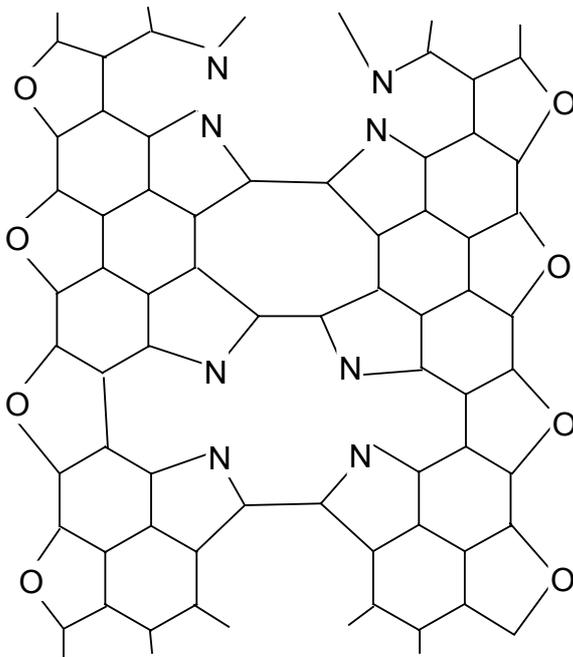
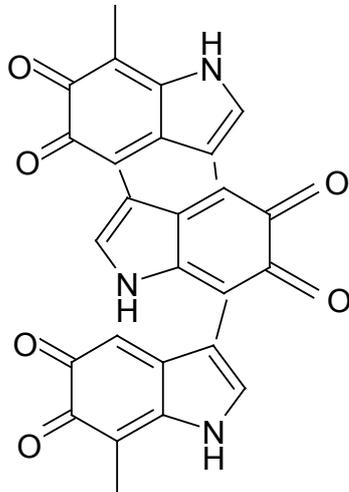


Abb.55: Struktur des Eumelanins in der Haut (nach Olivieri u. Nicolaus, 1999)

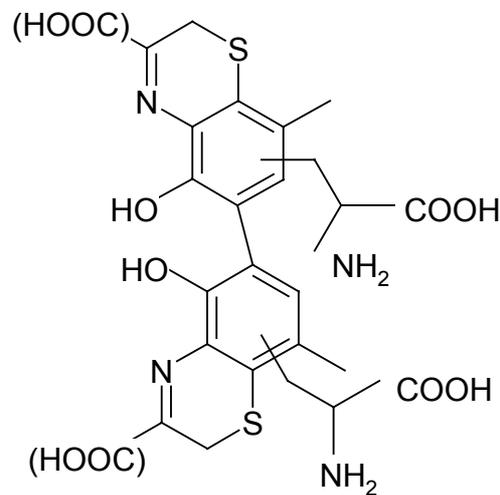
Wenn das Melanin mit Cystein und Glutathion reagiert, entstehen die Phäomelanine, die die potentielle Toxizität von Zwischenprodukten abfangen. Das körpereigene Schutzsystem liegt in den Phäomelaninen in kovalenter Bindung mit den Pigmenten vor. Die Eu- und die Phäomelanine bilden eine Einheit, indem die Eumelanine die UV-Strahlung absorbieren und die freien Radikale abfangen und die Phäomelanine vorwiegend die reaktiven Sauerstoffspezies neutralisieren (Nicolaus u. Scherillo, 1995). Die Melaninpolymere sind natürliche freie Radikale (Nicolaus, 2003), in denen auf 200 bis 300 Melanineinheiten ein ungepaartes Elektron entfällt. Die freien Radikale stellen nur einen sehr kleinen Anteil des Melanins dar, spielen aber in der Pathophysiologie eine immense Rolle.

Melanine bestehen aus porös zusammengelagerten Aggregaten, in die Ionen und neutrale Moleküle absorbiert werden können (Crippa et al., 2004).

HS weisen strukturelle Gemeinsamkeiten mit den Melaninen auf, die sich in ihren Eigenschaften (z.B. UV-B-protektiv) widerspiegeln. Da HS UV-B-Strahlen absorbieren und in unseren Versuchen nicht antioxidativ wirken, ähneln sie eher den Eumelaninen (Abb.56).



Eumelanin



Phäomelanin

Abb.56: Struktur der Eumelanine und der Phäomelanine (Simon u. Geller, 1999)

Fluoreszenz und Radikalbildung

Bei der Synthese der HS beobachtet man beim Alkalisieren der Lösung eine charakteristische grüne Fluoreszenz, die ein Hinweis auf die Ausbildung chinoider Übergangszustände ist. Die fluoreszierenden Produkte haben meist ein niedrigeres MG (Choudhry, 1984a). Als Endprodukte der Synthese entstehen dunkelbraun gefärbte Substanzen, die nicht mehr fluoreszieren.

Ebenfalls eine starke, aber gelbe Fluoreszenz zeigen mittels Licht oder Wasserstoffperoxid oxidierte Melanine in RPE- (retinal pigment epithelium) und Aderhaut- (choroid) Zellen (Kayatz et al., 2001). Auch isolierte natürliche und in vitro präparierte Melanine zeigen eine Autofluoreszenz, die durch Natriumazid, Katalase oder unter wasserfreien Bedingungen gehemmt wird. Der schnelle Abbau von Melanin durch UV-Bestrahlung in Wasserstoffperoxid- oder Natriumperiodat-enthaltendem Medium führt zu fluoreszierenden Übergangszuständen. Dagegen fluoreszieren Melanine bei Oxidationen ohne UV-Bestrahlung nicht (Elleder u. Borovansky, 2001).

Ein Beispiel für die Bildung freier Radikale ist die Photohomolyse der Schwefelkohlenstoffbindungen der Phäomelanine. Es entstehen Radikale des 5-S-

Cysteinyldopa (Sealy, 1984). Melanine können die enthaltenen Radikale in ihren Ketten stabilisieren (Simon u. Geller, 1999). Auch HS enthalten in dem Humingerüst stabilisierte, freie Radikale.

Partikelbildung

Da sich die Moleküle des Melanins partikelartig zusammenlagern, verhindern auch Reflexions- und Streuungseffekte das Eindringen der UV-Strahlen in die Epidermis. Melaninpartikel von über 300 nm Durchmesser (intakte Melanosome) können UV-A- und UV-B-Strahlung streuen. Liegt der Durchmesser der Melaninpartikel unter 30 nm (Staubpartikel), wirken sie viel stärker absorbierend. Die Photoprotektion der Melanine ist eine relative Wirkung, da verschiedene Mechanismen zusammenspielen (Cesarini, 1988). Auch HS bilden in Abhängigkeit von ihrem MG, dem pH-Wert, vorhandenen Ionen und der Temperatur Partikel.

DOPA-OP – DOPA-Melanin

DOPA wurde als Ausgangssubstanz für die HS-Synthese ausgewählt, weil es am Aufbau des physiologischen Melanins der humanen Haut beteiligt ist. Die Bildung des Melanins verläuft von der Aminosäure Tyrosin ausgehend über chinoide Zwischenstufen bis zum polymerisierten und konjugierten Melanin (Land et al., 2001). Die HS DOPA-OP wird aus DOPA oxidativ mittels Periodatoxidation oder enzymatisch mit Phenoloxidase hergestellt. Ein Beispiel für die Synthese des Melanins aus DOPA stellt die Hefe *Histoplasma capsulatum* dar. Setzt man ihrem Wachstumsmedium L-3,4-Dihydroxyphenylalanin (DOPA) oder (-)-Epinephrin zu, produziert sie pigmentierte Zellen. Mit Hilfe von Antikörpern können diese Pigmente als Melanine mit einem Gehalt an freien Radikalen identifiziert werden. Die Hefe kann Melanin bzw. melaninähnliche Pigmente aus L-DOPA mittels Phenoloxidase in vitro und in vivo synthetisieren (Nosanchuk et al., 2002).

Kaffeensäure und Hydrokaffeensäure als monomere Ausgangsverbindungen für die HS-Synthese wurden ausgewählt, weil sie strukturelle Gemeinsamkeiten zum DOPA aufweisen und sich bei der Polymerisation dem DOPA-OP und dem natürlichen Melanin ähnlich aufgebaute Produkte bilden. Außerdem wurde bei dem Pilz *Cryptococcus neoformans* beschrieben, dass er auf einem Kaffeensäure-Agar gezüchtet werden kann und dann dunkelgefärbte Melanine bildet (Larone, 1995).

Allerdings unterscheidet sich die Bildung von Melanin beim Menschen von der des Pilzes *Cryptococcus neoformans* in ihrem Mechanismus (Casadevall et al., 2000). In Abhängigkeit von den funktionellen Gruppen der Ausgangsverbindungen werden bei der Melaninsynthese verschiedene Übergangszustände ausgebildet. So wird Melanin sequentiell von der Tyrosinase über Dopachinon und Leucodopachrom zu Dopachrom oxidiert. Die Laccasen

anderer Pilze, wie z.B. die von *Coriolus versicolor*, oxidieren phenolische Substrate durch die Übertragung von freien Elektronen, d.h. über einen radikalischen Mechanismus (Williamson, 1997).

Wenn man sich die strukturellen Gemeinsamkeiten der Hydroxymelansäuren bzw. abgeleiteter Verbindungen mit dem DOPA verdeutlicht, diese Verbindungen polymerisiert – ähnlich den physiologischen Prozessen in den Melanosomen – und auf diese Weise HS herstellt, werden wiederum die Parallelen zu den Eumelaninen deutlich.

Funktionelle Gemeinsamkeiten zwischen den Melaninen und Huminsäuren

Melanin und melaninhaltige Gewebe weisen vielfältige Bindungsmöglichkeiten auf. So interagiert Melanin mit Arzneistoffen, wie z.B. mit Antimalariamitteln und psychotropen Substanzen (Forest, 2000). Auch HS besitzen ein ausgezeichnetes Komplexierungsverhalten. Dafür ist zum einen die porige Struktur und zum anderen die Interaktion über Ionenpaare und Wasserstoffbrückenbindungen verantwortlich. Sowohl die Melanine als auch die HS können porphyrinartige Strukturen ausbilden, in denen Metallionen komplexiert werden können.

Das Porphyrin-Modell erlaubt die Bildung interessanter biologischer Komplexe und erklärt auch die Ausbildung von Metall- oder Ionenkomplexen sowie die Absorption und Koordination von Enzymen. Das HS-Modell geht von einer Graphit-Sandwich-Struktur aus, d.h. es bilden sich Schichten, die sich in einem Abstand von 3,4 Angström anlagern (Olivieri u. Nicolaus, 1999).

Verschiedene Pilze bilden Melanin, dem einerseits eine bedeutsame Rolle als Virulenzfaktor zukommt und das andererseits die Aufgaben hat, die Pilze vor antimikrobiellen Oxidanzien, vor Hitze und Kälte, vor UV-Licht und vor Amphotericin B zu schützen. *Cryptococcus neoformans* ist ein Modellorganismus zur Untersuchung der Virulenz von Melanin und der ausgelösten Antwort des Wirtsorganismus (Casadevall et al., 2000). Neben dem Melanin stellt die Kapsel den zweiten Hauptvirulenzfaktoren dar (Perfect et al., 1998). Die Kapselpolysaccharide hemmen die Phagozytose, und die löslichen Polysaccharide interferieren mit immunologischen Funktionen (Doering et al., 1999). Dagegen ist das Melanin für den Schutz des *Cryptococcus neoformans* gegen stickstoff- und sauerstoffbasierte oxidative Angriffe des Wirtsorganismus wichtig (Perfect et al., 1998). Der Pilz ist in der Lage, in Anwesenheit von phenolischen Substraten - was die Verbindung zu den HS zeigt - Melanin zu bilden. Es findet eine Autopolymerisation von DOPA und Epinephrin über chinoide Intermediate zu Melanin statt. Die isolierten Melaninpartikel besitzen die Größe und Form der Hefezellen. Melaninhaltige Zellen waren im Gegensatz zu melaninfreien unempfindlich gegen mikrobizide Peptide, deren fungizide Aktivität durch

Interaktionen zwischen Peptiden und Melanin reduziert oder verhindert wurde. Die Bindung kommt durch ladungsbedingte und hydrophobe Wechselwirkungen zustande (Doering et al., 1999). *Cryptococcus neoformans* wandelt mittels Phenoloxidase auch Kaffeesäure in Melanin um. Auf einem Kaffeesäure-Agar gezüchtet, färbt das gebildete Melanin die Pilzkolonie braun (Larone, 1995). Anhand des Modellorganismus *Cryptococcus neoformans* werden die Parallelen zwischen der Melanin- und der HS-Bildung deutlich. Normalerweise ist die Kaffeesäure ein charakteristischer Baustein der HS. Der Pilz verwendet sie zum Aufbau seines Melanins, das aber wiederum nicht der UV-Protektion dient, sondern als ein Virulenzfaktor angesehen werden muss.

Spektrale Eigenschaften

Melanin hat eine breite, uncharakteristische Absorptionsbande, wobei die Absorption im Wellenlängenbereich von 700 nm bis zu 250 nm ansteigt. Die Photoreaktivität und die Photochemie des Melanins ist komplexer als die simple Umwandlung von Lichtenergie in Wärme. Anhand von Fluoreszenzstudien konnte in Abhängigkeit von der Zeit und der Wellenlänge die Ausbildung verschiedener Energie-Transfer-Komplexe nachgewiesen werden (Forest, 2000). Die zusammengelagerten Melaninmoleküle haben im Vergleich zu den Einzelmolekülen veränderte Eigenschaften. Die Melaninpartikel unterschiedlicher Größe besitzen ein verändertes optisches Verhalten. Dies könnte bei den HS ähnlich und ein Grund für die unterschiedlichen Versuchsergebnisse in den VA 1 und 2 sein. Während die Melanine innerhalb der Zellen in speziellen Kompartimenten abgegrenzt sind, sind die HS auf die Biomembranen der Zellen aufgelagert.

Wenn man die UV-VIS-Spektren des Melanins misst, stellt man fest, dass sich das Absorptionsspektrum und das Aktionsspektrum voneinander unterscheiden. Durch die Bestrahlung werden reaktive Sauerstoffspezies und freie Radikale gebildet (Sarna u. Sealy, 1984). Diese entstehen bei längeren Wellenlängen ab 400 nm nur in geringem Umfang, bei kurzen Wellenlängen unter 300 nm jedoch in einem starken Ausmaß. Warum die Bildung von reaktiven Spezies und Radikalen nicht proportional zu der Strahlung verläuft, ist nicht bekannt. Der Sauerstoffverbrauch und die Bildung von freien Radikalen und reaktiven Sauerstoffspezies steigt bei kurzen Wellenlängen überproportional an. Von großer Bedeutung für die Absorption der Strahlung ist auch das MG des Melanins. Die Absorptionskurve von Melaninen mit einem MG bis zu 3000 Dalton verläuft unterhalb der Kurve der größeren Partikel und weist einen charakteristischen Peak bei 270 nm auf. Dieser verschwindet im Absorptionsspektrum der Melanine mit MG über 3000 Dalton (Simon u. Geller, 1999). Im Vergleich dazu besitzt die Kaffeesäure charakteristisch ausgeprägte Absorptionsmaxima bei 220 nm und 245 nm, während KOP einen gleichmäßigen Abfall der Absorption bei steigender Wellenlänge zeigt (Helbig u. Klöcking, 1983).

Es wurden die Absorptionsspektren der kleinen Partikel und das gemessene Aktionsspektrum verglichen und eine Übereinstimmung festgestellt. Wahrscheinlich sind die kleinen Partikel bis zu 1000 Dalton für die Radikalbildung und für die DNA-Schäden verantwortlich (Simon u. Geller, 1999).

4.4. Apoptose und Nekrose der U937-Zellen infolge der UV-B-Bestrahlung und der Huminsäurebehandlung

Morphologische Veränderungen der U937-Zellen nach UV-B-Bestrahlung

Bei der UV-B-Bestrahlung und einer Huminsäure-Behandlung treten nekrotische und apoptotische Prozesse simultan nebeneinander auf.

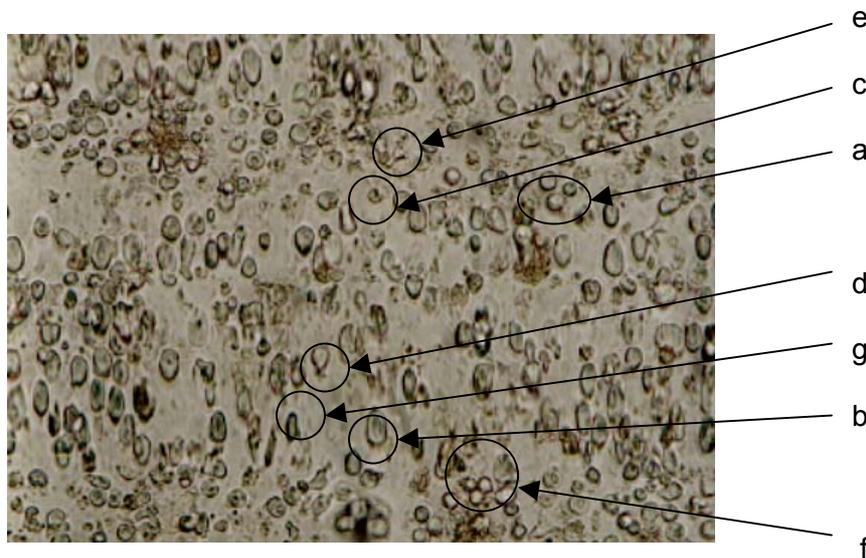


Abb.57: Morphologische Veränderungen der U937-Zellen nach UV-B-Bestrahlung und einer Behandlung mit Na-KOP (125 µg/ml) nach 72-stündiger Exposition (100-fache Vergrößerung)

In der Abbildung 57 sind die typischen morphologischen Veränderungen der U937-Zellen nach einer UV-B-Bestrahlung und einer HS-Behandlung zu sehen. Einige Zellen sehen unverändert (a) aus. Viele Zellen sind infolge des zytotoxischen Einflusses der UV-B-Strahlen angeschwollen (b), andere sind geschrumpft (c), deformiert und beginnen auszulaufen (d) oder sind zerfallen (e). Einige Zellen sind lediglich verkleinert und etwas kompakter (f). Sie sind dicht zusammengelagert. Die Membranen sind häufig infolge der HS-Behandlung dunkel abgegrenzt (g).

In der folgenden Abbildung 58 sind die morphologischen Veränderungen der Zellen bei der Apoptose und der Nekrose dargestellt.

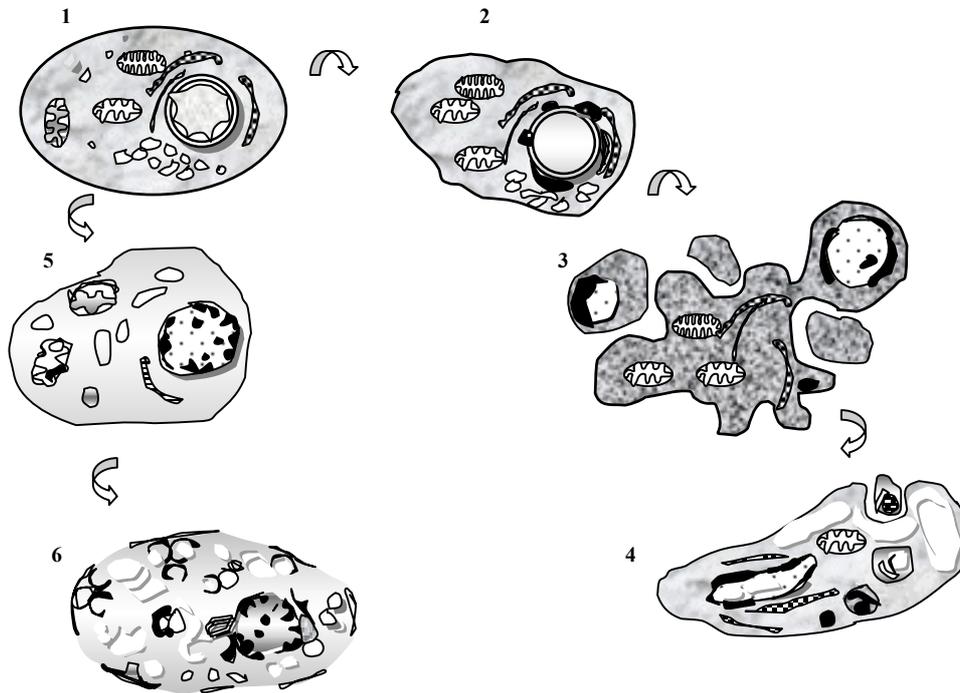


Abb.58: Schematischer Ablauf der Apoptose und der Nekrose von Zellen
(nach Kerr et al., 1994)

normale Zelle (1)

Apoptose (2, 3, 4)

- 2 Chromatinkondensation und Aggregation an der nukleären Membran
- 3 Fragmentierung des Nukleus, Ausbildung apoptotischer Körperchen
- 4 Phagozytose und lysosomale Verdauung durch Nachbarzellen

Nekrose (5, 6)

- 5 Zerstörung der Membranintegrität
- 6 Ruptur und Desintegration von Zellbestandteilen

In den Bestrahlungsversuchen laufen eine Vielzahl von Mechanismen parallel nebeneinander und nacheinander ab, die man in ihrer Komplexität betrachten muss. UV-B-Strahlen können dosisabhängig sowohl apoptotische als auch nekrotische Veränderungen in Zellen bewirken. Bestrahlt man U937-Zellen mit einer Dosis UV-B von über 1000 J/m², sterben die Zellen vollständig ab. Man beobachtet die typischen nekrotischen Veränderungen wie Zellschwellung, Aufreißen der Zellmembranen und das Auslaufen der Zellen. In unseren Versuchen wählten wir eine Strahlendosis von 360 J/m² ± 10 % aus. Diese Dosis tötet ca. 70 % der U937-Zellen, die restlichen 30 % überleben. Gibt man UV-B-protective Agenzien hinzu, überleben in Abhängigkeit von der Konzentration prozentual mehr

Zellen, die aber ebenfalls typischen morphologischen Veränderungen in Folge des Strahleneinflusses unterliegen. Man kann also schlussfolgern, dass in unseren Untersuchungen sowohl apoptotische als auch nekrotische Vorgänge in den U937-Zellen zu beobachten sind. In vielen Versuchen werden die Zellen nicht vollständig abgetötet, sondern erleiden nur Schädigungen. Auch die mikroskopischen Beobachtungen deuten auf die unterschiedlichen Mechanismen hin. In einigen Versuchen kommt es zu einem regelrechten Zerfall der Zellen und in anderen nur zu Kondensationserscheinungen und Größenveränderungen.

Ablauf der Apoptose und Nekrose

HS können in geringerer Dosierung der Auslöser für die Apoptose sein. Bei der Behandlung von Endothelzellen mit HS der Konzentrationen von 50 bis 200 µg/ml zeigen sich dosis- und zeitabhängige apoptotische Veränderungen. Diese äußern sich in einer verminderten Zellviabilität, einer Chromatinkondensation (2002). HS können auch in U937-Zellen Apoptose auslösen (Jelinek, 2001).

Die Nekrose von Zellen erfolgt durch und einer internukleosomalen DNA-Fragmentierung. Antioxidantien und Chelatbildner verhindern die HS-induzierte Apoptose. HS aktivieren die Ca^{2+} -abhängige Caspase. Der Anstieg der HS-induzierten Apoptose geht mit einer reduzierten Konzentration des Apoptoseinhibitors Bcl-2 und mit einem Anstieg des Bax-Proteins, das Bcl-2 inhibiert, einher. Weiterhin nimmt in Korrelation zum Anstieg der Apoptoserate die Menge von p53 zu (Hseu et al., einen massiven toxischen Einfluss, der meist schnell und ungerichtet erfolgt. Die Nekrose ist also destruktiv, unspezifisch und führt oft zu massiven Schädigungen oder sogar zum Funktionsverlust von ganzen Geweben.

Werden RPE-Zellen mit einer niedrigen Dosis UV-B bestrahlt, sind nach 24 h die meisten Zellschäden repariert. Im Gegensatz dazu führen hohe UV-B-Dosen zur Apoptose (Patton et al., 1999). Dabei verläuft die UV-B-induzierte Apoptose zunächst über die Bildung von DNA-mismatch-repair-Proteinen (MMR) (Young et al., 2004). Das DNA-mismatch-Reparatur-System identifiziert und beseitigt Basenfehlpaarungen in der DNA-Doppelhelix. Ein Defekt dieses Systems hat zur Folge, dass die Fehler in der DNA-Replikation nicht mehr erkannt werden und Mutationen auftreten. Normalerweise werden unter Mitwirkung der MMR geschädigte epidermale Zellen eliminiert (Young et al., 2004).

Die UV-B-induzierte Apoptose kann außerdem durch reaktive Sauerstoffspezies (ROS), eine DNA-Schädigung und über CD 95 ausgelöst werden. Einen Beweis dafür, dass diese Mechanismen unabhängig voneinander ablaufen, erbrachten Kulms et al. (2002). So schützt

Pyrrolidin-Dithiocarbamat (PDTTC) die Zellen zwar vor der durch Wasserstoffperoxid - als einen Vertreter der ROS – ausgelösten Apoptose, aber die CD 95 vermittelte Apoptose läuft weiterhin ab. Während an dem Mechanismus der ROS-angefassten Apoptose das mitochondriale Cytochrom C beteiligt ist, ist bei dem Weg über CD 95 das proapoptotische Protein Bid, das unter UV-B-Einfluss gespalten wird, entscheidend.

Neben apoptotischen und nekrotischen Veränderungen induzieren UV-B-Strahlen in humanen Keratinozyten auch die Lipidperoxidation und führen zu einer Reduktion der Aktivität antioxidativer Enzyme. So sind die Aktivitäten der vor oxidativem Stress schützenden Superoxid-Dismutase und der Katalase 0,5 h nach Bestrahlung signifikant reduziert. Dagegen zeigen Keratinozyten bei einer UV-B-Bestrahlung der Wellenlänge von 280 bis 315 nm und Dosen von 330 mJ/cm² und 1090 mJ/cm² keine Veränderungen in der Zellviabilität (Punnonen et al., 1991c). In unseren Versuchen zeigen die U937-Zellen nach UV-B-Bestrahlung mit einer Dosis von 30 bis 40 mJ/cm² und 1-stündiger Inkubation keine Veränderungen weder in ihrem morphologischen Bild noch in ihrer Stoffwechselaktivität. Erst nach 24-stündiger Inkubation treten UV-B-induzierte Zellschäden auf. Keratinozyten zeigen bei niedrigen Bestrahlungsdosen von 20 mJ/cm² UV-B keine Veränderungen in Form reaktiver Thiobarbitursäure oder fluoreszierender Produkte. Hingegen ist bei einer Bestrahlungsdosis von 330 mJ/cm² UV-B ein signifikantes Auftreten von Thiobarbitursäure und fluoreszierenden Produkten zu beobachten.

4.5. Schädliche Wirkungen der Strahlen auf die Haut

Photosensibilisierung

Die möglichen Mechanismen einer Photosensibilisierung können phototoxisch oder photoallergisch sein. Die Phototoxizität beruht auf einer auf physikochemischem Weg induzierten Lichtüberempfindlichkeit (Schauder u. Ippen, 1997). Bei der Photoallergie liegt eine Sensibilisierung des Immunsystems zu Grunde. Bei der phototoxischen Reaktion kommt es innerhalb von 24 h zu einem begrenzten, gering infiltrierten und gelegentlich ödematösem Erythem. Die Vesikel- und Blasenbildung geht meist mit brennenden Schmerzen und Juckreiz einher. Eine Vielzahl von Substanzen lösen phototoxische Reaktionen aus, z.B. Parfüme, Pflanzeninhaltsstoffe, Medikamente und Kosmetika. Auch PABA ist eine phototoxische Substanz. Im Bereich der Medikamente sind vor allem Antibiotika, Antiphlogistika, Psychopharmaka, Phenothiazine, Diuretika, Antidiabetika und Phototherapeutika zu nennen (Carbonare u. Pathak, 1992; Schauder, 2001).

UV-Licht hat eine lokale und eine systemische immunmodulierende Wirkung. Bei UV-Bestrahlung werden Langerhanszellen in ihrer Funktion beeinträchtigt und Keratinozyten

angeregt, immunmodulierende Zytokine zu produzieren. So kann eine UV-Bestrahlung die Sensibilisierung gegen Kontaktallergene unterdrücken und eine durch die Zytokine IL-10, TNF α und IL-12 vermittelte Immuntoleranz induzieren (Schwarz, 1996).

Zugelassene Filtersubstanzen dürfen nur ein minimales toxikologisches Potenzial besitzen. Unter dem Einfluss der Strahlung können photodynamische Prozesse ablaufen, die die Moleküle verändern und allergene Potenziale aufbauen (Funk et al., 1995; Schrader et al., 1994). So können Lichtschutzfilter bei UV-Bestrahlung in Abhängigkeit von verschiedenen Lösungsmitteln und der Bestrahlungsdosis abgebaut werden (Shaath, 1991).

Toxikologie, phototoxische und photoallergische Reaktionen von UV-Filtern

Im St John's Institute of Dermatology wurden die Daten von 2715 Patienten im Zeitraum von 1983 bis 1998 ausgewertet, die sich einem Photopatch-Test unterzogen hatten. Von 111 Patienten, die eine positive Reaktion zeigten, waren 52 Reaktionen ursächlich auf UV-Filter zurückzuführen. Am häufigsten waren die Reaktionen bei Benzophenon-3 mit 14 Fällen gefolgt von Benzophenon-10 (9), Isopropyl-dibenzoylmethan (6), PABA (5), Octyl-dimethyl-PABA (5), Butyl-methoxydibenzoylmethan (4), Isoamyl-methoxycinnamat (2), Ethyl-methoxycinnamat (2), Octyl-methoxycinnamat (2), Amyl-dimethyl-PABA (2) und Phenylbenzimidazol-sulfonsäure (1). In dieser Studie wurden UV-Filter als Photoallergene identifiziert (Darvay et al., 2001).

Die kombinierten Effekte von Licht und exogen Licht sensibilisierenden Substanzen führen zu phototoxischen und photoallergischen Reaktionen. Die in Kosmetika, Arzneien und Pflanzen enthaltenen sensibilisierenden Stoffe besitzen eine trizyklische Struktur und die Fähigkeit, UV-Strahlung zu absorbieren (Kiec-Swierczynska u. Krecisz, 2001). Die UV-Filter Octyltriazon (Sommer et al., 2002), Methoxycinnamat und Oxybenzon (Cook u. Freeman, 2002) können zu einer photoallergischen Kontaktdermatitis führen.

In einer skandinavischen Studie zeigten 3,9 % der Probanden gegenüber PABA allergische oder photoallergische Reaktionen (Thune et al., 1988). UV-protective Substanzen (z.B. PABA, Oxybenzon, Isopropyl-methoxy-dibenzoylmethan, 3-(4-methyl-benzyliden)campher, Octyl-dimethyl-PABA) können eine Kontakt- oder Photokontaktsensibilisierung auslösen. Zwischen strukturell verwandten Substanzen können Kreuzsensibilisierungen bestehen (Funk et al., 1995). Im Zeitraum von 1981 bis 1999 wurden insgesamt 480 Patienten auf allergische und photoallergische Reaktionen auf chemische UV-Filter getestet, von denen 88 eine positive Reaktion zeigten. 2 Patienten reagierten auf PABA allergisch und 2 photoallergisch (Schauder, 2001).

Die derzeit gebräuchlichen Lichtschutzfilter sind toxikologisch nicht völlig unbedenklich, so dass die Suche nach neuen Substanzen eine große Bedeutung hat. So wurden in Muttermilchproben Spuren verschiedener Lichtschutzsubstanzen nachgewiesen, darunter p-Methoxyzimtsäureisoamylester und Octylmethoxyzimtsäureester. Die Substanzen werden nach Angaben der Hersteller bis zu 2 % über die Haut resorbiert und können zu gesundheitlichen Risiken führen (Hany u. Nagel, 1995). Weitere Untersuchungen über das Vorkommen von Lichtschutzfiltersubstanzen im Wasser und in Fischen weisen darauf hin, dass die Filtersubstanzen weit verbreitet vorkommen und eventuell als Umweltchemikalien zu betrachten sind. Der Nachweis der Substanzen in Fischen ist ein guter Bioindikator für das Vorkommen im Wasser (Nagtegaal et al., 1997). HS sind ein natürlicher Bestandteil des Wassers und des Ökosystems.

Kaffee-HS und Polykondensate aus Aminosäuren und Phenolkörpern zeigen eine gute intravenöse Verträglichkeit und geringe Toxizität (Klöcking et al., 1967).

PABA hat eine LD₅₀ bei der oralen Applikation an der Ratte von 6000 mg/kg. Dagegen wird die Toxizität der Kaffeesäure und der Humussäure lediglich als reizend eingestuft. In der folgenden Tabelle 15 sind einige gebräuchliche Lichtschutzfilter laut Kosmetikverordnung und deren Toxizität aufgeführt (Mang u. Stege, 2003; Fluka, 1999/2000).

Tabelle 15: Einige laut Kosmetikverordnung zugelassene UV-Filter

Lichtschutzfilter	Summenformel	MG	Toxizität
3,3,5-Trimethylcyclohexyl-salicylat	C ₁₆ H ₂₃ O ₃	262,35 g/mol	LD ₅₀ oral Ratte >8400 mg/kg
2-Hydroxy-4-methoxy-benzophenon	C ₁₄ H ₁₂ O ₃	228,25 g/mol	LD ₅₀ oral Ratte >12800 mg/kg
2-Phenylbenzimidazol-5-sulfonsäure	C ₁₃ H ₁₀ N ₂ O ₃ S	274,29 g/mol	LD ₅₀ oral Ratte >16000 mg/kg
1-(4-tert. Butylphenyl)-3-(4-methoxyphenyl)-propan-1,3-dion	C ₂₀ H ₂₂ O ₃	310,38 g/mol	LD ₅₀ oral Ratte >16000 mg/kg
4-Methoxy-zimtsäure-2-ethyl-hexylester	C ₁₈ H ₂₆ O ₃	290,40 g/mol	LD ₅₀ oral Ratte >20000 mg/kg

In einer norwegischen Studie erwies sich Octylmethoxycinnamat als zytotoxisch (Butt u. Christensen, 2000). Außerdem besitzen einige UV-Filter an MCF-7-Zellen eine östrogene Aktivität (Schlumpf, 2001).

4.6. Anwendungsmöglichkeiten des UV-B-protektiven Schutzes der Huminsäuren

Sonnenschutz

Die HS zeigen gute UV-B-protective Eigenschaften, so dass ein Einsatz in den verschiedensten Bereichen denkbar wäre. Man könnte sie in Cremes einsetzen, um einerseits die Haut vor UV-B-Strahlung zu schützen und andererseits in wirkstoffhaltigen

Dermatika, um lichtempfindliche Wirkstoffe zu schützen. Bei der Herstellung von Pflastern, die Steroidhormone enthalten, die über die Haut resorbiert werden, ist die Lichtempfindlichkeit der Wirkstoffe ein großes Problem. Hier könnten die HS in die Deckschichten eingearbeitet werden. Von Vorteil hierbei sind die hohen Molekulargewichte, so dass eine Resorption über die Haut oder Membranen nicht zu erwarten ist.

Radikalfänger

Radikale besitzen als ungepaarte freie Elektronen nur eine extrem kurze Lebensdauer und reagieren mit Molekülstrukturen. Radikale sind an vielen Stoffwechselfvorgängen beteiligt. Erst wenn die zellulären Radikalbindungsmechanismen keine Kapazität mehr besitzen, greifen die Radikale ungeschützte Strukturen an und schädigen die Zelle. Zu diesen Schutzsystemen gehören die Superoxid-Dismutase und die Glutathion-Peroxidase als antioxidative Enzyme und Vitamin E, Beta-Carotin und Vitamin C als antioxidative Substanzen. In der Haut entstehen durch die UV-Strahlung ROS, weil die Radikale unter Sauerstoffbeteiligung zu reaktiven Verbindungen reagieren. Zu diesen gehören das Superoxid-Anion-Radikal, das Hydroxyl-Radikal und das Peroxid-Radikal (Carbonare u. Pathak, 1992). Analog dem Melanin können auch HS als Radikalfänger wirken.

Lippenschutz

Die Lippen unterscheiden sich in ihrem Aufbau grundlegend von der normalen Haut. Sie besitzen keine Talg- und Schweißdrüsen, die Oberfläche ist fettfrei. Die Lippen trocknen sehr schnell aus. Es ist nur sehr wenig Melanin enthalten, das Lippenrot kommt durch die durchschimmernden, durchbluteten Bindegewebspapillen zustande. Die Lippen besitzen nicht die natürlichen Schutzmechanismen vor UV-B-Strahlen. Als Folge reißen die Lippen ein, werden spröde und bilden durch die Verbrennung Blasen. Setzt man die Haut einer UV-B-Bestrahlung aus, kommt es lokal zu einer herabgesetzten Immunabwehr, wodurch das Auftreten von Herpes-simplex-Infektionen begünstigt wird.

HS und andere polyanionische Substanzen stellen einen Inhibitor für das HSV-1 dar.

KOP zeigt eine sehr gute antivirale Aktivität und nur eine schwache Zytotoxizität (ca. 20 % bei 64 µg/ml). Auch Kaffeesäure besitzt eine antivirale Wirkung ab einer Konzentration von 32 µg/ml, ist aber im Vergleich zu KOP im gleichen Konzentrationsbereich zytotoxisch (80 % bei 512 µg/ml) (Helbig et al., 1997).

HS besitzen gute UV-B-protective Eigenschaften und zusätzlich eine gute antivirale Aktivität. Sie bieten sich somit zur Vorbeugung und zur Therapie der lokalen Herpes-simplex-Infektionen an. Hierzu wäre die Entwicklung eines therapeutischen HS-haltigen Lippenstiftes zu empfehlen.

Augenschutz

UV-B-Strahlen können am Auge mit einer Verzögerung von einigen Stunden eine Hornhautentzündung (Photokeratitis) hervorrufen. Strahlen einer Wellenlänge unter 295 nm werden von der Hornhaut abgefangen. Mit zunehmender Wellenlänge nimmt die Durchlässigkeit zu. Bei 310 nm treten bereits 35 % und bei 360 nm ca. 70 % der UV-Strahlung in das Augeninnere ein. Die Linse absorbiert den spektralen Anteil zwischen 325 und 370 nm fast vollständig. Die absorbierte Energie führt allerdings zu Trübungen der Linse. Die gelb-braunen Verfärbungen sind vermutlich auf den Abbau von Tryptophan zurückzuführen. Netzhautschäden treten bei normalen Bestrahlungen nicht auf, sind jedoch bei der Einnahme von Photosensibilisatoren oder beim Aufenthalt auf stark reflektierenden Flächen, wie z.B. Gletschereis, zu beachten. Es besteht ein Zusammenhang zwischen der chronischen UV-B-Belastung des Auges und der Kataraktentstehung (Taylor et al., 1988). Am Modell der LEC (lens epithelial cells) können die Auswirkungen der UV-Strahlen am Auge untersucht werden (Andley et al., 1994). Vor diesem Hintergrund könnte die Anwendung von Augentropfen mit UV-B-absorptiven Eigenschaften sinnvoll sein.

Photoprotektion der Haare

Haare bestehen aus Proteinen, Lipiden, Nukleinsäureresten, Polysacchariden, Mineralien und Wasser – Strukturen, die eine Angriffsfläche für Radikale bieten. In erster Linie bewirken die Sonnenstrahlen ein Ausbleichen der Haare. Es kommt intermediär zur Bildung von Wasserstoffperoxid und zur oxidativen Pigmentzerstörung. Aber auch Peptidketten werden gespalten, Aminosäuren abgebaut und Disulfidbrücken ausgebildet. Praktisch erscheinen die Haare spröde, rau und glanzlos, die Festigkeit und Elastizität nehmen ab. Diesen Veränderungen kann man vorbeugen, indem Produkte aufgetragen werden, die einen UV-Filter enthalten und Radikalfängereigenschaften haben. Dabei ist es wichtig, dass die UV-Filter eine gewisse Haftungstendenz an den Haaren haben. Eine Einarbeitung von HS in Shampoos und Haarpflegeprodukte könnte erprobt werden.

4.7. Huminsäure-Lichtschutzcreme

UV-protective Substanzen

Das Verhältnis von UV-A zu UV-B im Tageslicht verhält sich wie 1:100 bis 1:500. Die UV-B-Dosis wird über die Erythembildung beurteilt, für die UV-A-Dosen benutzt man die persistierende Sofortpigmentierung. Sonnenschutzmittel wirken chemisch und/oder physikalisch. Die chemischen Blocker wie PABA, PABA-, Zimtsäure- und Benzophenon-Derivate erzielen ihre Schutzwirkung durch Absorption. Zu den physikalisch wirksamen Filtern zählen mikronisiertes Titandioxid und mikronisiertes Zinkoxid, die in einer

Konzentration von maximal 25 % enthalten sind. Die Einarbeitung von physikalischen Filtern in kosmetische Grundlagen ist aufgrund des auftretenden Weißeffektes schwierig. Die Partikelgrößen von Zinkoxid und Titandioxid liegen zwischen 10 und 100 nm. Diese streuen und reflektieren die UV-Strahlen.

Als einziger natürlich vorkommender, zugelassener Lichtschutzfilter ist die Urocaninsäure zu nennen. Allerdings findet man in der Kencur-Wurzel p-Methoxyzimtsäure und einige ihrer Ester (Langner, 1996).

Rezeptur einer Huminsäure-Lichtschutzcreme

Der Begriff der „Cosmoceuticals“ bezeichnet die Kosmetika der Zukunft, die eine Zwischenstellung zwischen Arzneimitteln und Kosmetika einnehmen, weil der Stellenwert der Wirksamkeit und der Sicherheit gegenüber den reinen Kosmetika steigt.

Ein Problem stellt die Photoinstabilität einiger Lichtschutzfilter dar. Die Photostabilität kann durch die Wahl einer geeigneten Formulierung verbessert werden. Zimtsäure-Derivate zeigen Isomerien, so dass sie gegen einen Photoabbau geschützt sind. Dagegen erweisen sich PABA-Derivate als photoinstabil (Shaath, 1991).

Ein idealer UV-Filter sollte nicht in die Haut penetrieren und keinen Abbau durch UV-Strahlung zeigen. Die Hersteller bieten als galenische Lösungen für diese Probleme liposomale Trägersubstanzen, Polymerketten oder Pigmente an. Liposomen enthalten in ihrem Inneren die Filtersubstanzen und haften als Einheit an den Keratinozyten. Mit Polymeren verknüpfte Filtersubstanzen können nicht in die Haut eindringen (Zimmer u. Herzfeldt, 1997).

KOP wurde hinsichtlich seines Penetrationsvermögens in die Haut untersucht. Eine 1%ige W/O-Emulsion dringt schnell in die Haut ein und bildet in der Hornschicht ein Reservoir. Nach 30 min sind 1 bis 3 % der applizierten Menge bis in die Epidermis und Dermis penetriert. Diese Menge bleibt auch bei längeren Penetrationszeiten unverändert (Wohlrab et al., 1984).

Ferulasäure besitzt eine antioxidative, entzündungshemmende und photoprotektive Wirkung (Graf, 1992). Sie wird in einer Konzentration von ca. 4 % in W/O-Sonnenschutzcreme eingearbeitet (Eggensperger u. Wilker, 1996).

PABA wird in einer Konzentration von bis zu 5 % in Sonnencreme angewandt. Anhand der UV-B-PC₅₀ lassen sich für die natürlichen und synthetischen HS Äquivalentdosen errechnen. Für eine Sonnencreme mit der untersuchten Substanzklasse der HS kann der folgende Rezepturvorschlag gemacht werden (Tronnier u. Schmohl, 1990).

Huminsäure 5,0

Unguentum polyethylenglycoli DAB 8 ad 100,0

5. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wird die UV-B-protective Wirkung der Huminsäuren und der zugrunde liegende Mechanismus der UV-B-Protecttion untersucht.

Hierzu wurden die natürlichen Huminsäuren Natriumhumat (Na-humat), Ammoniumhumat (NH₄-humat), die Huminsäure Aldrich (HS Aldrich) und drei Huminsäuren aus dem Altteicher Moor (HS Altteicher Moor I, II, III) sowie die synthetischen Huminsäuren Natrium-Kaffeesäure-Oxidationsprodukt (Na-KOP), Kalium-Kaffeesäure-Oxidationsprodukt (K-KOP), Ammonium-Kaffeesäure-Oxidationsprodukt (NH₄-KOP), Hydrokaffeesäure-Oxidationsprodukt (HYKOP, Natrium-Salz) und DOPA-Oxidationsprodukt (DOPA-OP, Natrium-Salz) hinsichtlich ihrer UV-B-protectiven Wirkung und ihrer Zytotoxizität untersucht.

Die natürlichen Huminsäuren stammen aus verschiedenen Naturmooren. Sie wurden nach unterschiedlichen Methoden isoliert und aufbereitet.

Die synthetischen Huminsäuren wurden unter definierten Bedingungen mittels Periodat-oxidation, zum Teil auch durch Luftoxidation, aus definierten Ausgangsverbindungen hergestellt.

Als Referenzsubstanz der UV-B-protectiven Wirkung diente Paraaminobenzoessäure (PABA).

Das Calciumsalz des Kaffeesäure-Oxidationsproduktes erwies sich in dem verwendeten Versuchsmedium als unlöslich und konnte daher nicht untersucht werden. Das luftoxidierte DOPA-Oxidationsprodukt ist zytotoxisch und wurde deshalb nicht hinsichtlich seiner UV-B-Protectivität untersucht.

Der Mechanismus der UV-B-protectiven Wirkung kann chemischer, physikalischer oder pharmakologischer Natur sein. Die UV-B-Strahlen können absorbiert (chemisch), reflektiert oder gestreut (physikalisch) werden. Außerdem können die entstehenden Strahlenschäden pharmakologisch beeinflusst werden. Für die Aufklärung des Mechanismus der UV-B-protectiven Wirkung fanden Cytomorph[®]-b-Platten Verwendung. Sie ermöglichen dank ihrer besonderen Konstruktion, die Zellen zusammen mit den Huminsäuren oder getrennt von diesen zu inkubieren.

Insgesamt wurden fünf verschiedene Versuchsanordnungen (VA) gewählt und zusätzlich die Zytotoxizität der Huminsäuren untersucht.

In der Versuchsanordnung 1 wurden die Zellen und die Huminsäuren zusammen bestrahlt und über eine Dauer von 24 h, 48 h und 72 h inkubiert. In dieser Versuchsanordnung kann man unspezifisch den UV-B-protectiven Effekt der Huminsäuren nachweisen. Verändern sich

mit Huminsäuren versetzt. In dieser Anordnung kann eine eventuelle pharmakologische Wirkung auf die durch UV-B-Strahlen geschädigten Zellen nachgewiesen werden.

In der Versuchsanordnung 4 wurden die Huminsäuren hinsichtlich ihrer Zytotoxizität gegen U937-Zellen untersucht.

In der Versuchsanordnung 5 wurden die Huminsäuren und die Zellen zusammen in das Unterteil der Cytomorph[®]-b-Platten gegeben, dann 1 h inkubiert und erst danach mit UV-B bestrahlt. Die Huminsäuren infolge der Bestrahlung oder sind sie selbst zytotoxisch, werden die Zellen auch durch diese zytotoxischen Effekte geschädigt.

In der Versuchsanordnung 2 wurden die Huminsäuren in den Deckel der Cytomorph[®]-b-Platten gegeben und die Zellen in das Unterteil. Anschließend wurde mit UV-B-Strahlung bestrahlt und inkubiert. In dieser Versuchsanordnung wird die chemische Schutzwirkung aufgrund der Absorption der UV-B-Strahlung nachgewiesen. Wenn die Huminsäuren Veränderungen durch die UV-B-Bestrahlung erfahren, können sie die Zellen nicht schädigen. Die Schädigung ist zu 100 % auf die UV-B-Strahlung zurückzuführen.

In der Versuchsanordnung 3 wurden die Zellen zunächst mit UV-B bestrahlt und erst im Anschluss an die Bestrahlung Dabei können sich vor der Bestrahlung durch Wechselwirkung der Zellen mit den Huminsäuren neue Ordnungszustände ausbilden und kleine Partikel bilden. Zusätzlich können als UV-B-protective Mechanismen Streuungs-, Brechungs- und Reflektionseffekte auftreten.

In der Versuchsanordnung 6 wurden die Huminsäuren zunächst bestrahlt und erst nach der Bestrahlung die Zellen hinzugegeben. Die Huminsäuren können durch die Einwirkung der Strahlungsenergie abgebaut und verändert werden, so dass möglicherweise zytotoxische Produkte entstehen.

Die Ergebnisse zeigen, dass sowohl die natürlichen als auch die synthetischen Huminsäuren UV-B-protective Eigenschaften besitzen. Sie sind im untersuchten Konzentrationsbereich in der Regel nicht oder nur sehr gering zytotoxisch. Lediglich zwei Huminsäuren erwiesen sich als zytotoxisch: ein durch Luftoxidation hergestelltes DOPA-Oxidationsprodukt ($CC_{50} = 276 \mu\text{g/ml}$, Einwirkungszeit 24 h) und die natürliche Huminsäure Ammoniumhumat ($CC_{50} = 243 \mu\text{g/ml}$, Einwirkungszeit 24 h).

Die Referenzsubstanz – Paraaminobenzoessäure (PABA) – verhinderte im Konzentrationsbereich ab $125 \mu\text{g/ml}$ vollständig die Ausbildung von UV-B-bedingten Zellschädigungen, soweit diese durch XTT-Reaktion und mikroskopische Auswertung erfassbar waren. Dies gilt sowohl für eine Postexpositionszeit von 24 h, 48 h und 72 h sowohl für die Versuchsanordnungen 1 und 2. 24 Stunden nach Bestrahlung der Zellen beträgt die 50%ige UV-B-

protektive Konzentration (PC_{50}) von PABA in Versuchsanordnung 1 (VA 1) 39 $\mu\text{g/ml}$, in VA 2 23 $\mu\text{g/ml}$.

Für Na-KOP wurde eine PC_{50} von 35 $\mu\text{g/ml}$ in VA 1 und von 40 $\mu\text{g/ml}$ in VA 2 gefunden. Na-KOP hat somit in VA 1 eine etwas stärkere und in VA 2 eine geringere Filterwirkung als PABA.

DOPA-OP, die Modellsubstanz für Eumelanin, zeigte ebenfalls eine deutliche UV-B-protektive Wirkung [PC_{50} (VA 1) 37 $\mu\text{g/ml}$; PC_{50} (VA 2) 36 $\mu\text{g/ml}$], die in VA 1 etwas effektiver und in VA 2 geringer als die von PABA ist.

HYKOP besitzt in VA 1 eine PC_{50} von 38 $\mu\text{g/ml}$, in VA 2 von 44 $\mu\text{g/ml}$. HYKOP übertrifft damit die UV-B-protektive Wirkung von PABA in VA 1, ist in VA 2 jedoch weniger effektiv.

Für K-KOP wurde in VA 1 eine PC_{50} von 39 $\mu\text{g/ml}$ und in VA 2 von 40 $\mu\text{g/ml}$ ermittelt. Damit besitzt K-KOP in VA 1 die gleiche UV-B-Schutzwirkung wie PABA, in VA 2 erweist sich K-KOP jedoch als weniger effektiv.

NH_4 -KOP besitzt mit einer PC_{50} von 30 $\mu\text{g/ml}$ in VA 1 eine deutlich bessere Filterwirkung als PABA. Dagegen ist NH_4 -KOP in VA 2 ($PC_{50} = 25 \mu\text{g/ml}$) etwas weniger effektiv.

Die synthetischen Huminsäuren Na-KOP (111 %), DOPA-OP (107 %), HYKOP (104 %), K-KOP (102 %) und NH_4 -KOP (129 %) sind nach 24-stündiger Exposition in der VA 1 stärker UV-B-protektiv wirksam als PABA. Die relativen UV-B- PC_{50} liegen über 100 %. Dagegen erweist sich in der VA 2 PABA als effektiver im Vergleich zu den synthetischen Huminsäuren [Na-KOP (58 %), DOPA-OP (65 %), HYKOP (52 %), K-KOP (58 %) und NH_4 -KOP (94 %)]. Die relativen UV-B- PC_{50} liegen unter 100 %.

NH_4 -KOP besitzt mit 129 % in VA 1 und 94 % in VA 2 von den synthetischen Huminsäuren die effektivste relative UV-B- PC_{50} . Die anderen synthetischen HS (Na-KOP, DOPA-OP, HYKOP, K-KOP) zeigen untereinander in ihren UV-B-protektiven Wirkungen in der gleichen VA keine Unterschiede.

Natriumhumat besitzt sowohl in VA 1 ($PC_{50} = 48 \mu\text{g/ml}$) als auch in VA 2 ($PC_{50} = 30 \mu\text{g/ml}$) eine schwächere UV-B-Filterwirkung als PABA.

Ammoniumhumat ist in dem untersuchten Konzentrationsbereich von 62,5 $\mu\text{g/ml}$ bis 500 $\mu\text{g/ml}$ zytotoxisch, so dass in VA 1 keine UV-B-protektive Wirkung zu beobachten war. Dagegen besitzt Ammoniumhumat in VA 2 von allen untersuchten Huminsäuren einschließlich PABA die effektivste UV-B-Schutzwirkung ($PC_{50} = 17 \mu\text{g/ml}$).

Huminsäure Aldrich zeigt in VA 1 ($PC_{50} = 51 \mu\text{g/ml}$) eine etwas geringere und in VA 2 ($PC_{50} = 23 \mu\text{g/ml}$) die gleiche Schutzwirkung wie PABA.

Huminsäure Alteicher Moor I ist sowohl in VA 1 ($PC_{50} = 31 \mu\text{g/ml}$) als auch in VA 2 ($PC_{50} = 41 \mu\text{g/ml}$) etwas schwächer UV-B-protektiv wirksam als PABA.

Huminsäure Alteicher Moor II ist sowohl in VA 1 ($PC_{50} = 35 \mu\text{g/ml}$) als auch in VA 2 ($PC_{50} = 29 \mu\text{g/ml}$) etwas weniger effektiv als PABA.

Huminsäure Alteicher Moor III besitzt in VA 1 ($PC_{50} = 125 \mu\text{g/ml}$) eine sehr schwache UV-B-protektive Wirkung. Die Filterwirkung in VA 2 ($PC_{50} = 41 \mu\text{g/ml}$) entspricht der der Huminsäure Alteicher Moor I.

Damit erweisen sich alle drei Huminsäuren aus dem Alteicher Moor in den VA 1 und 2 als weniger effektiv als PABA. Huminsäure Alteicher Moor II besitzt im Vergleich zu den Huminsäuren Alteicher Moor I und II die stärkste UV-B-protektive Wirkung.

Bei Verlängerung der Expositionsdauer (48 h, 72 h) zeigen die synthetischen Huminsäuren in den VA 1 und 2 ein unterschiedliches Verhalten. Der Vergleich der relativen UV-B-protektiven Wirkungen der synthetischen Huminsäuren Na-KOP, DOPA-OP und HYKOP zeigt, dass die UV-B-Schutzwirkung bei direktem Kontakt der Zellen mit den Huminsäuren (VA 1) mit zunehmender Expositionsdauer abnimmt. Die relative UV-B-PW von Na-KOP nimmt von 111% (24 h) auf 52 % (48 h) ab und kann nach 72 h Exposition nicht mehr bestimmt werden. DOPA-OP [107 % (24 h); 48 % (48 h); n.b. (72 h)] und HYKOP [104 % (24 h); 44 % (48 h); 34 % (72 h)] verhalten sich analog. Im Gegensatz zu den Ergebnissen der VA 1 bleiben die relativen UV-B-PW in der Versuchsanordnung ohne direkten Kontakt (VA 2) bei Verlängerung der Expositionsdauer nahezu konstant. Die relativen UV-B-PW in VA 2 von Na-KOP liegen zwischen 51 und 69 %, von DOPA-OP zwischen 49 und 65 % und von HYKOP zwischen 52 und 59 %. Während die synthetischen Huminsäuren nach 24 h Exposition in der VA 1 einen stärkeren relativen UV-B-protektiven Effekt als in der VA 2 besitzen, ist die UV-B-Schutzwirkung bei verlängerter Expositionsdauer (48h, 72h) in der VA 2 effektiver.

Im Gegensatz zu den synthetischen Huminsäuren ist das UV-B-protektive Verhalten der natürlichen Huminsäuren bei Verlängerung der Expositionsdauer nicht einheitlich.

Na-humat zeigt ein ähnliches Verhalten wie die synthetischen Huminsäuren. Die relative UV-B-PW von Na-humat [24 h (82 %); 48 h (41 %); 72 h (n.b.)] nimmt in VA 1 mit zunehmender Expositionsdauer ab, bleibt dagegen in der VA 2 [24 h (77 %); 48 h (84 %); 72 h (68 %)] annähernd konstant.

NH_4 -humat besitzt in der VA 1 zytotoxische Wirkung, weswegen kein UV-B-Schutz nachgewiesen werden kann. Dagegen ist die UV-B-PW in der VA 2 von allen getesteten

Huminsäuren die effektivste. Die relativen UV-B-PW bezogen auf PABA sind: 108 % (24 h), 164 % (48 h), 133 % (72 h).

Huminsäure Aldrich zeigt in VA 1 (77 %) nach 24 h Exposition eine etwas schwächere relative UV-B-PW als in VA 2 (100 %). Nach 48 h Exposition liegt die Schutzwirkung nahezu unverändert bei 73 % (VA 1) und 95 % (VA 2).

Die HS Alteicher Moor I, II und III besitzen unterschiedliche UV-B-PW. HS Alteicher Moor I besitzt in VA 1 eine relative UV-B-PW von ca. 80 % nach 24 h und 48 h Exposition. Die UV-B-PW in VA 2 liegt mit 57 % bzw. 72 % unter der der VA 1. Die HS Alteicher Moor II besitzt nach 24 h Exposition in VA 1 (89 %) und VA 2 (80 %) eine stärkere UV-B-PW als nach 48 h Exposition [VA 1 (58 %), VA 2 (51 %)]. Die HS Alteicher Moor III zeigt nach 24 h Exposition mit 32 % in VA 1 und 57 % in VA 2 eine schwache UV-B-PW.

Die natürlichen HS weisen in Bezug auf ihre UV-B-protaktiven Eigenschaften weniger Gemeinsamkeiten auf als die synthetischen. Es zeigen sich Unterschiede in Abhängigkeit vom Ursprung der HS (Naturmoor bei Dierhagen, Alteicher Moor, HS Aldrich), von der Aufbereitungstechnik (HS Alteicher Moor I,II und III) und vom vorhandenen Gegenion (Nahumat, NH_4 -humat).

Eine pharmakologische Wirkung (VA 3) konnte bei keiner der untersuchten Huminsäuren Na-KOP, DOPA-OP und HYKOP nachgewiesen werden. Der durch UV-B induzierte Zellschaden konnte nicht beeinflusst werden.

Werden die Zellen vor der UV-B-Bestrahlung zunächst 1 h lang mit Huminsäuren exponiert (VA 5), weisen die getesteten Huminsäuren (Na-KOP, DOPA-OP, HYKOP) nach 24-stündiger Exposition eine gleich starke UV-B-PW wie in VA 1 (ohne vorherige Exposition) auf. Die UV-B-PW unterscheiden sich erst bei Verlängerung der Expositionszeit. Nach 48h Exposition ist eine Huminsäure in der VA 1 stärker UV-B-protaktiv wirksam als in der VA 5 (DOPA-OP), eine in der VA 5 effektiver als in VA 1 (HYKOP) und eine zeigt in beiden VA gleich starke UV-B-PW (Na-KOP). Nach 72 h Exposition sind alle 3 Huminsäuren in der VA 5 stärker UV-B-protaktiv wirksam als in VA 1. Da sich in beiden VA die Zellen und Huminsäuren in direktem Kontakt befinden, würde man eine gleich starke UV-B-protaktive Wirksamkeit erwarten. Die VA 5 erweist sich bei verlängerter Expositionszeit (72 h) als effektiver.

Die Huminsäuren Na-KOP, DOPA-OP, HYKOP, K-KOP und NH_4 -KOP zeigen nach einer UV-B-Bestrahlung von 36 mJ/cm^2 und einer Expositionszeit von 24 h (VA 6) keine höhere Zytotoxizität als ohne Bestrahlung. Die ermittelten Zytotoxizitäten liegen im Konzentrationsbereich bis $500 \text{ } \mu\text{g/ml}$ unter 30 %. Die UV-B-protaktiven Eigenschaften der Huminsäuren können ausgenutzt werden, um UV-B-Lichtschutzcremes herzustellen. Die Huminsäuren imitieren den natürlichen UV-B-Schutz der Melanine.

6. Literatur

Alert D, Finkel P, Huber B (1994) COLIPA-Methode zur Bestimmung des Lichtschutzfaktors. *Parfümerie und Kosmetik*, 75: 856-862

Alves J (2003) *Praktikum Nukleinsäuren Teil 2*.
www.bpc.mh-hannover.de/lehre/alves/medprak/nukl2_02.htm

Anderson JA, Ogston GD (1983) Influence of cider on the fibrinolytic enzyme system. *Acta Haematol*, 69: 344-348

Andley UP, Lewis RM, Reddan JR, Kochevar IE (1994) Action spectrum for cytotoxicity in the UVA- and UVB-wavelength region in cultured lens epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 35: 367-373

Aschheim S, Hohlweg W (1933) Über das Vorkommen östrogenen Wirkstoffe in Bitumen. *Dtsch Med Wochenschr*, 59: 12-14

Ass RH, Opez-Guerrero (1997) Aggressive tumor growth of human TUR leukemia cells is associated with high levels of c-myc expression and down-regulation of p20-max. *Int J Cancer*, 72: 1113-1116

Azurdia RM, Pagliaro JA, Diffey BL, Rhodes LE (1999) Sunscreen application by photosensitive patients is inadequate for protection. *Br J Dermatol*, 140: 255-258

Baker S, Premkumar Reddy E (1996) Transducers of life and death: TNF receptor superfamily and associated proteins. *Oncogene*, 12: 1-9

Bamba H, Ota S, Kato A, Kawamoto C, Fujiwara K (2000) Prostaglandins up-regulate vascular endothelial growth factor production through distinct pathways in differentiated U937 cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 273 (2): 485-491

Barth J (1991) Welche positiven Wirkungen hat die UV-Strahlung auf den menschlichen Organismus? *Therapiewoche Dermatol*, 21: 412-424

Beneden van G, zitiert nach Harriehausen FW (1957) Über physikalische, chemische und biologische Probleme des Moorbades. *Zeitschrift für angewandte Bäder-Klimaheilkunde*, 4: 454-460

Bernacchi F, Ponzanelli I, Barale R, Loprieno N (1996a) Mutagenic activity of some coal-derived humic compounds evaluated by the Ames test. *Mutat Res*, 369: 107-112

Bernacchi F, Ponzanelli I, Minunni M, Falezza A, Loprieno N, Barale R (1996b) In vivo cytogenetic effects of natural humic acid. *Mutagenesis*, 11: 467-469

Biomedica Informationsschrift: EZ4U Easy For You (rev.no.020604). Nichtradioaktiver Zellproliferations- und Zytotoxizitätstest. Biomedica Medizinprodukte GmbH & Co KG, A-1210 Wien

- Bitton G, Henis Y, Lahav N (1972) Effect of several clay minerals and humic acid on the survival of *Klebsiella aerogenes* exposed to ultraviolet irradiation. *Applied Microbiol*, 23: 870-874
- Bonina F, Lanza M, Montenegro L, Puglisi C, Tomaino A, Trombetta D, Castelli F, Saija A (1996) Flavonoids as potential protective agents against photo-oxidative skin damage. *Int J Pharm*, 145: 87-94
- Bonina F, Montenegro L (1994) Effect of some non-toxic penetration enhancers on in vitro heparin skin permeation from gel vehicles. *Int J Pharm*, 111: 191-196
- Born W (1970) Effect of ultraviolet light on epidermal DNA synthesis. *Arch Klin Exp Dermatol*, 237 (1): 466-471
- Bourne LC, Rice-Evans CA (1997) The effect of the phenolic antioxidant ferulic acid on the oxidation of low density lipoprotein depends on the pro-oxidant used. *Free Radic Res*, 27: 337-344
- Brady HJ, Gil-Gomez G (1998) Bax. The pro-apoptotic Bcl-2 family members, Bax. *Int J Biochem Cell Biol*, 30: 647-650
- Brash DE, Haseltine WA (1982) UV-induced mutation hotspots occur at DNA damage hotspots. *Nature*, 298 (5870): 189-192
- Bremner JM (1951) A review of recent work on soil organic matter. *J Soil Sci*, 2: 67-82
- Breng R, Waldow R, Plötner G (1981) Hemmung der Prostaglandinsynthese durch wasserlösliche Huminstoffe in vitro. In: *Torf in der Medizin*. Plötner G, Weber U [Hrsg] Symposium der Kommission VI der IMTG, Bad Elster, S. 97-104
- Broadbent FE (1964) The characterization of soil humus. In: *Microbiology and soil fertility*. Gilmour CM, Allan ON [Eds] Oregon State Univ Corvallis, pp. 59-76
- Brunborg G, Holme JA, Söderlund EJ, Hongslo JK, Vartiainen T, Lötjönen S, Becher G (1991) Genotoxic effects of the drinking water mutagen 3-chloro-4-(dichloromethyl)-5-hydroxy-2[5H]-furanone (MX) in mammalian cells in vitro and in rats in vivo. *Mutat Res*, 260: 55-64
- Bush JA, Ho VC, Mitchell DL, Tron VA, Li G (1999) Effect of N-acetylcysteine on UVB-induced apoptosis and DNA repairing in human and mouse keratinocytes. *Photochem Photobiol*, 70 (3): 329-333
- Butler JHA, Ladd JN (1969) Effect of extractant and molecular size on the optical and chemical properties of soil humic acids. *Austr J Soil Res*, 7: 229-239
- Butt ST, Christensen T (2000) Toxicity and phototoxicity of chemical sun filters. *Radiat Prot Dosimetry*, 91: 83-84
- Carbonare MD, Pathak MA (1992) Skin photosensitising agents and the role of reactive oxygen species in photoaging. *J Photochem Photobiol B: Biol*, 14: 105-124
- Carlsen H, Moskaug JØ, Fromm SH, Blomhoff R (2002) In vivo imaging of NF-B activity. *J Immunol*, 168: 1441-1446
- Casadevall A, Rosas AL, Nosanchuk JD (2000) Melanin and virulence in *Cryptococcus neoformans*. *Curr Opin Microbiol*, 3: 354-358

Castelluccio C, Paganga G, Melikian N, Bolwell GP, Pridham J, Sampson J, Rice-Evans C (1995) Antioxidant potential of intermediates in phenylpropanoid metabolism in higher plants. *FEBS Lett*, 368: 188-192

Cesarini JP (1988) Photo-induced events in the human melanocytic system. Photoaggression and photoprotection. *Pigment Cell Res*, 1: 223-233

Cesarini JP, Msika P (1995) Photoprotection from UV-induced and melanin introduced in sunscreens. In: *Melanin: its role in human photoprotection*. Valdenmar Publishing, Overland Park, KS, USA, pp. 239-244

Cesarini JP (1996) Melanine und Photoprotektion. *Aktuelle Dermatol*, 22: 80-82

Chaskes S, Tyndall RL (1975) Pigment production by *Cryptococcus neoformans* from para- and ortho-diphenols: effect of the nitrogen source. *J Clin Microbiol*, 1: 509-514

Chen CH, Liu JJ, Lu FJ, Yang ML, Lee Y, Huang TS (2002) The effect of humic acid on the adhesibility of neutrophils. *Thromb Res*, 108 (1): 67-76

Chen GS, Asai T, Suzuki Y, Nishioka K, Nishiyama S (1990) A possible pathogenesis for blackfoot disease. *J Dermatol*, 17: 599-608

Chen JH, Ho CT (1997) Antioxidant activities of caffeic acid and its related hydroxycinnamic acid compounds. *J Agric Food Chem*, 45: 2374-2378

Chen Y, Khan SU, Schnitzer M (1978) Ultraviolet irradiation of dilute fulvic acid solutions. *Soil Sci Soc Am J*, 42: 292-296

Choudhry GG (1981) Humic substances. Part II: Photophysical, photochemical and free radical characteristics. *Toxicol Environ Chem*, 4: 261-295

Choudhry GG (1984a) [Ed] Humic substances: Structural, photophysical, photochemical and free radical aspects and interactions with environmental chemicals. Gordon and Breach Science Publishers, New York, London, Paris, Montreux, Tokyo, pp. 3-53, 57-91, 143-169

Choudhry GG (1984b) Photophysical and photochemical properties of soil and aquatic humic materials. *Residue Rev*, 92: 59-112

Christl I, Milne CJ, Kinniburgh DG, Kretzschmar R (2001) Relating ion binding by fulvic and humic acids to chemical composition and molecular size. 2. Metal binding. *Environ Sci Technol*, 35 (12): 2512-2517

Christman F, Ghassemi M (1966) Chemical nature of organic color in water. *J Amer Water Works Assoc*, 58: 723

Christopher TBS (1996a) Humic substances.
http://agri.upm.edu.my/jst/resources/as/om_humicsubs.html.

Christopher TBS (1996b) Properties of humic substances.
www.av.wroc.pl/~weber/kwasy2.htm.

Cohen G (1997) Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem J*, 326: 1-16

Cook N, Freeman S (2002) Photosensitive dermatitis due to sunscreen allergy in a child. *Australas J Dermatol*, 43 (2): 133-135

- Cozzi R, Nicolai M, Perticone P, De Salvia R, Spuntarelli F (1993) Desmutagenic activity of natural humic acids: inhibition of mitomycin C and maleic hydrazide mutagenicity. *Mutat Res*, 299: 37-44
- Crippa PR, Fornes JA, Ito AS (2004) Photophysical properties of pyrene in interaction with the surface of melanin particles. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 35 (2): 137-141
- Danno K, Horio T, Takigawa M, Imamura S (1984) Role of oxygen intermediates in UV-induced epidermal cell injury. *J Invest Dermatol*, 83: 166-168
- Darr D, Dunston S, Faust H, Pinnell S (1996) Effectiveness of antioxidants (Vitamin C and E) with and without sunscreens as topical photoprotectants. *Acta Derm Venereol (Stockholm)*, 76: 264-268
- Darr D, Fridovich I (1994) Free radicals in cutaneous biology. *J Invest Dermatol*, 102: 671-675
- Darvay A, White IR, Rycroft RJ, Jones AB, Hawk JL, McFadden JP (2001) Photoallergic contact dermatitis is uncommon. *Br J Dermatol*, 145 (4): 597-601
- Davies G, Ghabbour EA (1998) Humic substances: structure, properties and uses. www.hagroup.neu.edu/book1.htm, University of Boston, USA
- Davies RI, Coulson CB, Lewis DA (1960) Polyphenols in soil profile development. *Sci Proc Royal Dublin Soc, Series A*, 1: 53-58
- De Cock JG, Hoffen van A, Wijnands J, Molenaar G, Lohmann PH, Eeken JC (1992) Repair of UV-induced (6-4)photoproducts measured in individual genes in the *Drosophila* embryonic Kc cell line. *Nucleic Acids Res*, 20 (18): 4789-4793
- De Haes P, Garmyn M, Degreef H, Vantieghem K, Bouillon R, Segaert S (2003) 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ inhibits ultraviolet B-induced apoptosis, Jun kinase activation, and interleukin-6 production in primary human keratinocytes. *J Cell Biochem*, 89 (4): 663-673
- Demple B, Levin JD (1991) Repair systems for radical-damaged DNA. In: *Oxidative stress: Oxidants and Antioxidants*. Sies H [Ed] Academic press, London, San Diego, New York, Boston, Sydney, Tokyo, Toronto, pp. 119-150
- Depraetere V, Golstein P (1998) Dismantling in cell death: molecular mechanisms and relationship to caspase activation. *Scan J human*, 47: 523-531
- Diffey BL (2001) When should sunscreen be reapplied? *J Am Acad Dermatol*, 45: 882-885
- Doctorfungus (2001) *Cryptococcus neoformans*. www.doctorfungus.org/thefungi/Cryptococcus.htm
- Doering TL, Nosanchuk JD, Roberts WK, Casadevall A (1999) Melanin as a potential cryptococcal defence against microbicidal proteins. *Med Mycol*, 37: 175-181
- Dorvault Ch, Pasculle WA, Anhalt JP, Richert CA (2000): Final diagnosis – disseminated cryptococcosis (severe headache and fever). <http://path.upmc.edu/cases/case57/dx.html>.
- Dubach P, Mehta NC (1963) The chemistry of soil humic substances. *Soils and fertilizers*, 26: 293-300

- Eggensperger H, Wilker M (1996) Zur multiaktiven Wirkung von Ferulasäure und ihren Estern in Kosmetika. Seifen, Öle, Fette, Wachse (SÖFW), 122, Teil 1 bis 3: 146-156, 210-215, 554-556
- Eichhorn U, Klöcking R, Helbig B (1984) Anwendung von ⁵¹Cr-markierten FL-Zellen zur Testung der antiviralen Aktivität von Phenolkörperpolymerisaten gegen Coxsackieviren in vitro. Dtsch Gesundheitsw, 39: 1514-1519
- Elleder M, Borovansky J (2001) Autofluorescence of melanins induced by ultraviolet radiation and near ultraviolet light. A histochemical and biochemical study. Histochem, 33 (5): 273-281
- Enninga IC, Groenendijk RTL, Filon AR, van Zeeland AA, Simons JWIM (1986) The wavelength dependence of u.v.-induced pyrimidine dimer formation, cell killing and mutation induction in human diploid skin fibroblasts. Carcinogenesis, 7: 1829-1836
- Erkel G, Gehrt A, Anke T, Sterner O (2002) Induction of differentiation in acute promyelocytic leukemia cells (HL-60) by the verticillin derivative Sch 52900. Z Naturforsch, 57c: 759-767
- Farmer VC, Morrison RI (1960) Chemical and infrared studies on phragmites peat and its humic acid. The scientific Proceedings of the Royal Dublin Society, Series A, 1: 85-104
- Felbeck GT (1971) Chemical and biological characterization of humic water. In: Soil Biochemistry. McLaren AD, Skyjins J [Eds] New York, Dekker, Vol 2, pp. 55-56
- Fenton TW, Mueller MM, Clandinin DR (1978) Isomerization of some cinnamic acid derivatives. J Chromat, 152: 517-522
- Ferbeyre G, Lowe SW (2002) The price of tumour suppression? Nature, 415: 26-27
- Ferneborn A (1988) Beitrag zur chemischen und biologischen Charakterisierung von Huminsäuren und huminsäureähnlichen Polymeren. Dissertation, Akademie der Wissenschaften der DDR, Berlin
- Filipe PM, Freitas JP, Castro M, Pinto R, Fernandes A, De Castro JLC, Rico T, Rodrigo FG (1995) Lipid peroxidation, PGE₂ production and cellular injury induced by UV in cultured human skin fibroblasts. Comptes rendus des séances de la Societe de biologie et de ses filiales, 189: 443-451
- Fitzpatrick TB, Bolognia JL (1995) Human melanin pigmentation: role in pathogenesis of cutaneous melanoma. In: Melanin: its role in human photoprotection. Valdenmar Publishing, Overland Park, KS, USA, pp. 177-182
- Flaig W (1960) Chemie der Humusstoffe. Suomen Kemistilehti, A, 33: 229-251
- Flaig W (1966) The chemistry of humic substances. In: The use of isotopes in soil organic matter. Report of FAO/IAEA Technical Meeting, Pergamon, New York, pp. 103-127
- Floyd RA, West MS, Eneff KL, Hogseff WE, Tingey DT (1988) Hydroxyl free radical mediated formation of 8-hydroxyguanine in isolated DNA. Arch Biochem Biophys, 262: 266-272
- Fluka-Chemikalienkatalog (1999/2000)
- Forest SE (2000) Research summary. www.chem.duke.edu/~forest/rs2.html.
- Fuchs J (1992) Oxidative injury in Dermatopathology. Springer, Berlin, Heidelberg, New York, London, Paris, Tokyo, Hong Kong, Barcelona, Budapest

- Fuchs J, Huflejt ME, Rothfuss LN, Wilson DS, Carcamo G, Packer L (1989a) Impairment of enzymic and nonenzymic antioxidants in skin by UVB irradiation. *J Invest Dermatol*, 93: 769-773
- Fuchs J, Huflejt ME, Rothfuss LM, Wilson DS, Carcamo G, Packer L (1989b) Acute effects of near ultraviolet and visible light on the cutaneous antioxidant defense system. *Photochem Photobiol*, 50: 739-744
- Fuchs J, Packer L (1990) Ultraviolet irradiation and the skin antioxidant system. *Photodermatol Photoimmunol Photomed*, 7: 90-92
- Fuchs J, Packer L (1991) Photooxidative stress in the skin. In: *Oxidative stress: Oxidants and Antioxidants*. Sies H [Ed] Academic press, London, San Diego, New York, Boston, Sydney, Tokyo, Toronto, pp. 559-584
- Funk JO, Dromgoole SH, Maibach HI (1995) Sunscreen intolerance. Contact sensitization, photocontact sensitization, and irritancy of sunscreen agents. *Dermatol Clin*, 13: 473-481
- Gabard B, Treffel P, Bieli E, Schwab S (1996) In-vitro-Messung des Lichtschutzfaktors. *Aktuelle Dermatol*, 22: 25-30
- Garssen J, Norval M, Crosby J, Dortant P, Van Loveren H (1999) The role of urocanic acid in UVB-induced suppression of immunity to *Trichinella spiralis* infection in the rat. *Immunology*, 96 (2): 298-306
- Gau RJ, Yang HL, Chow SN, Suen JL, Lu FJ (2000) Humic acid suppresses the LPS-induced expression of cell-surface adhesion proteins through the inhibition of NF-kappa B activation. *Toxicol Appl Pharmacol*, 166 (1): 59-67
- Ghannoum MA (2000) Potential role of phospholipases in virulence and fungal pathogenesis. *Clin Microbiol*, 13: 122-143
- Gomez BL, Nosanchuk JD (2003) Melanin and fungi. *Curr Opin Infect Dis*, 16 (2): 91-96
- Graf E (1992) Antioxidant potential of ferulic acid. *Free Radic Biol Med*, 13: 435-448
- Graf E, Mahoney JR, Bryant RG, Eaton JW (1984) Iron-catalyzed hydroxyl radical formation. Stringent requirement for free iron coordination site. *J Biol Chem*, 259: 3620-3624
- Green DR, Reed JC (1998) Mitochondria and apoptosis. *Science*, 281: 1309-1312
- Hänninen KI, Klöcking R, Helbig B (1987) Synthesis and characterization of humic acid-like polymers. *Sci Total Environ*, 62: 201-210
- Hadshiew I, Stäb F, Untiedt S, Bohnsack K, Rippke F, Hölzle E (1997) Effects of topically applied antioxidants in experimentally provoked polymorphous light eruption. *Dermatology*, 195: 362-368
- Hanson WR (1987) Radiation protection by exogenous arachidonic acid and several metabolites. In: *Prostaglandin and lipid metabolism in radiation injury*. Walden TL, Hughes HN [Eds] Plenum Press, New York, London, pp. 233-244
- Hany J, Nagel R (1995) Nachweis von UV-Filtersubstanzen in Muttermilch. *Deutsche Lebensmittel Rundschau*, 91: 314-345

- Hapiot P, Neudeck A, Pinson J, Fulcrand H, Neta P, Rolando C (1996) Oxidation of caffeic acid and related hydroxycinnamic acids. *J Electroanal Chem*, 405: 169-176
- Harriehausen FW (1957) Über physikalische, chemische und biologische Probleme des Moorbades. *Zeitschrift für angewandte Bäder- und Klimaheilkunde*, 4: 454-460
- Hart PH, Grimbaldston MA, Swift GJ, Sedwick JD, Korner H (1998) TNF modulates susceptibility to UVB-induced systemic immunomodulation in mice by effects on dermal mast cell prevalence. *Eur J Immunol*, 28 (9): 2893-2901
- Hegedus ZL, Dana CA (2000) The probable involvement of soluble and deposited melanins, their intermediates and the reactive oxygen side-products in human diseases and aging. *Toxicology*, 145 (2-3): 85-101
- Heinrich U, Koop U, Leneveu-Duchemin M-C, Osterrieder K, Bielfeldt S, Chkarnat C, Degwert J, Häntschel D, Jaspers S, Nissen H-P, Rohr M, Schneider G, Tronnier H (2003) Multicentre comparison of skin hydration in terms of physical-, physiological- and product-dependent parameters by the capacitive method (Corneometer CM 825). *Int J Cosmet Sci*, 25: 45-53
- Helbig B, Hartung J, Klöcking R, Sprössig M, Gräser H (1985) Reduktiver Abbau einer Huminsäure-Modellsubstanz: Nachweis der Abbauprodukte mittels Chromatographie. *Geoderma*, 36: 255-261
- Helbig B, Klöcking R (1983) Darstellung und Charakterisierung von Huminsäure-Modellsubstanzen. *Z Physiother*, 33: 31-37
- Helbig B, Klöcking R, Hänninen K (1994) Phenolkörperpolymerisate als Modellsubstanzen für natürliche Huminsäuren: Darstellung und vorläufige Charakterisierung. *TELMA*, 24: 131-142
- Helbig B, Klöcking R, Wutzler P (1997) Anti-herpes simplex virus type 1 activity of humic acid-like polymers and their o-diphenolic starting compounds. *Antivir Chem Chemother*, 8: 265-273
- Helbig B, Thiel K-D (1982) Vergleich der antiviralen Aktivität von oxydierter Kaffeesäure und Hydrokaffeesäure gegen Herpesvirus hominis Typ 1 und Typ 2. *Pharmazie*, 37: 603-604
- Herdering W (1998) Modellsubstanzen für ROS.
<http://analytik.chemie.uni-hamburg.de/rosig/Modelle.html>
- Hönigsmann H (1989) Effect of therapeutic sunscreen cream on phototest reaction in polymorphic light dermatosis. *Z Hautkr*, 64 (12): 1065-1068
- Ho KJ, Liu TK, Huang TS, Lu FJ (2003) Humic acid mediates iron release from ferritin and promotes lipid peroxidation in vitro: a possible mechanism for humic acid-induced cytotoxicity. *Arch Toxicol*, 77 (2): 100-109
- Horn M (1989) Statistische Methoden für Biowissenschaftler. VEB Kongreß- und Werbedruck Oberlungwitz, 2.erw. Auflage
- Hseu YC, Huang H-W, Wang S-Y, Chen H-Y, Lu F-J, Gau R-J, Yang H-L (2002) Humic acid induces apoptosis in human endothelial cells. *Toxicol Appl Pharmacol*, 182: 34-43

Hübner KV (2004) Einfluß von natürlichen Huminsäuren und Huminsäure-ähnlichen Polymeren auf die zellschädigende Wirkung einer UVB-Bestrahlung. Dissertation, Medizinische Fakultät der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

Husain S, Hadi SM (1998) DNA breakage by L-DOPA and Cu (II): breakage by melanin and bacteriophage inactivation. *Mutat Res*, 397 (2): 161-168

Ito S, Wakamatsu K (2003) Quantitative analysis of eumelanin and pheomelanin in humans, mice, and other animals: a comparative review. *Pigment Cell Res*, 16 (5): 523-531

Jacobson ES (2000) Pathogenic roles for fungal melanins. *Clin Microbiol Rev*, 13: 708-717

Jacques S (2001) Optical absorption of melanin. Oregon Medical Laser Center, <http://omlc.ogi.edu/spectra/melanin/>

Janicsak G, Mathe I (1997) Parallel determination of rosmarinic and caffeic acids by TLC-densitometry. *Chromatographia*, 46: 322-324

Jelinek A (1996) Einfluß von profibrinolytisch wirksamen Substanzen auf Proliferation und Vitalität von U937-Zellen. Diplomarbeit, Fachbereich Pharmazie der Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald

Jelinek A (2001) In-vitro-Toxizität grenzflächenaktiver Substanzen, Wirkung auf Zellmembranen, mitochondriale Funktion und Apoptose. Dissertation, Mathematisch-Naturwissenschaftlich-Technische Fakultät (mathematisch-naturwissenschaftlicher Bereich) der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

Jimbow K, Reszka S, Schmitz S, Salopek T, Thomas P (1995) Distribution of eu- and phaeomelanins in human skin and melanocytic tumors, and their photoprotective vs phototoxic properties. In: *Melanin: its role in human photoprotection*. Valdenmar Publishing, Overland Parks, KS, USA, pp. 155-175

Jones CA (1987) Mutagenesis and cytotoxicity in human epithelial cells by far- and near-ultraviolet radiations: action spectra. *Radiat Res*, 110: 244-254

Kahl R (1991) Protective and adverse biological actions of phenolic antioxidants. In: *Oxidative stress: Oxidants and Antioxidants*. Sies H [Ed] Academic press, London, San Diego, New York, Boston, Sydney, Tokyo, Toronto, pp. 245-275

Kao JL, Nadji S, Taylor JS (1993) Identification and structure determination of a third cyclobutane photodimer of thymidyl-(3'-->5')-thymidine: the trans-syn-II product. *Chem Res Toxicol*, 6: 561-567

Karlson P, Doenecke D, Koolman J (1994) Kurzes Lehrbuch der Biochemie für Mediziner und Naturwissenschaftler. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York, 14. neubearbeitete Auflage, S. 183-184

Kasai H, Nishimura S (1991) Formation of 8-hydroxydeoxyguanosine in DNA by oxygen radicals and its biological significance. In: *Oxidative stress: Oxidants and Antioxidants*. Sies H [Ed] Academic press, London, San Diego, New York, Boston, Sydney, Tokyo, Toronto, pp. 99-113

Kayatz P, Thumann G, Luther TT, Jordan JF, Bartz-Schmidt KU, Esser PJ, Schraermeyer U (2001) Oxidation causes melanin fluorescence. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 42 (1): 241-246

- Kerc A, Bekbolet M, Saatci AM (2004) Effects of oxidative treatment techniques on molecular size distribution of humic acids. *Water Sci Technol*, 49 (4): 7-12
- Kerr JF, Winterford CM, Harmon BV (1994) Apoptosis. Its significance in cancer and cancer therapy. *Cancer*, 73: 2013-2026
- Khairy AH (1981) Presence of humic substances in human feces. *Erfahrungsheilkunde*, 30: 898-903
- Kiec-Swierczynska M, Krecisz B (2001) Photosensitivity induced skin diseases. *Med Pr*, 52 (5): 383-387
- Kim YH, Yang HE, Kim JH, Heo MY, Kim HP (2000) Protection of the flowers of prunus persica extract from ultraviolet B-induced damage of normal human keratinocytes. *Arch Pharm Res*, 23: 396-400
- Kindl G, Raab W (1998) Licht und Haut. Govi, Frankfurt, 4. neubearbeitete Auflage, S. 48, 56, 65-68, 117-120
- Kirsch F (2002) Verfahrenstechnische Untersuchungen zur Verarbeitung von Torfen. Diplomarbeit, Hochschule für Technik, Wirtschaft & Sozialwesen Zittau/Görlitz, 73 S.
- Kleinschmidt J (1988) Moortherapie bei rheumatischen Erkrankungen. In: Moortherapie: Grundlagen und Anwendungen. Flaig W, Goecke C, Kauffels W [Hrsg] Ueberreuter-Wiss.-Verlag, Wien, Berlin, S. 216-224
- Klößing HP (1991) Influence of natural humic acids and synthetic phenolic polymers on fibrinolysis. In: Humic substances in the aquatic and terrestrial environment. Allard B, Boren H, Grimvall A [Eds] Springer, Berlin, pp. 423-428
- Klößing R (1973) Ein System zur Polyacrylamidgelelektrophorese von Huminsäuren. *J Chromatogr*, 78: 409-416
- Klößing R (1980) Giftung und Entgiftung von Schwermetallen durch Huminsäuren. *Arch Exp Veterinarmed*, 34: 389-293
- Klößing R (1994) Humic substances as potential therapeutics. In: Humic substances in the global environment and implication on human health. Senesi N, Miano TM [Eds] Elsevier, Amsterdam, pp. 1245-1257
- Klößing R, Fernekorn A, Stölzner W (1992) Nachweis einer östrogenen Aktivität von Huminsäuren und huminsäureähnlichen Polymeren. *TELMA*, 22: 187-197
- Klößing R, Friemel H, Mücke D (1967) Zur Biochemie der Huminsäuren. *Acta Biol Med Ger*, 18: 9-13
- Klößing R, Hänninen K, Helbig B (1994) Rückschlüsse aus der Alcianblaureaktion auf Besonderheiten der chemischen Struktur von Huminsäuren. *TELMA*, 24: 165-171
- Klößing R, Helbig B (1991) Physiologische Wirkung von Huminstoffen als Grundlage für ihre medizinische Anwendung. In: Refraktäre organische Säuren in Gewässern. Frimmel FH, Abbt-Braun G [Hrsg] VCH Weinheim, S. 173-189
- Klößing R, Helbig B (2001) Medical aspects and applications of humic substances. In: Biopolymers. WILEY-VCH, Weinheim, S. 379-392

- Klöcking R, Helbig B, Drabke P (1977) Eine verbesserte Methode für die Isolierung wasserlöslicher Huminsäuren und enzymatisch oxydierter o-Diphenolverbindungen. *Pharmazie*, 32: 297
- Klöcking R, Helbig B, Schötz G, Schacke M, Wutzler P (2002) Anti-HSV-1 activity of synthetic humic acid-like polymers derived from p-phenolic starting compounds. *Antiviral Chemistry & Chemotherapy*, 13: 241-249
- Klöcking R, Hofmann R, Mücke D (1968) Tierexperimentelle Untersuchungen zur entzündungshemmenden Wirkung von Humaten. *Drug Res*, 18: 941-942
- Klöcking R, Hofmann R, Mücke D (1971) Stoffe vom Huminsäuretyp in Röstkaffee-Extrakten. *Z Lebensm Unters Forsch*, 146: 79-82
- Klöcking HP, Hübner K, Klöcking R, Wegener A (2004) UV-B-protective Wirkung von Moorwasser-Huminsäuren im Vergleich zu synthetischen huminsäure-ähnlichen Polymeren. *Sitzungsberichte der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Klassen 12 der Akademie gemeinnütziger Wissenschaften zu Erfurt*, S. 177-184
- Klöcking R, Kühn S, Klöcking HP (2004) Comparison of the UV-B protective effect of natural peat humic acids and para-aminobenzoic acid (PABA). In: *Proceedings of the 12th International Peat Congress*. Päivänen J [Ed] Saarijärven Offset Oy, Saarijärvi, pp. 421-425
- Klöcking R, Kühn S, Klöcking HP (2004) Investigations on the UV-B protective effect of humic acids and humic acid like polymers. In: *Humic Substances and Soil and Water Environment*. Martin-Neto L, Milori DMBP, da Silva WTL [Eds] Embrapa Instrumentacas Agropecuaria, Sao Carlos, pp. 462-464
- Klöcking R, Schacke M, Wutzler P (1995) Primärscreening antiherpetischer Verbindungen mit EZ4U. *Chemotherapy J*, 3: 141-147
- Klöcking R, Sprössig M (1972) Antiviral properties of humic acids. *Experientia*, 28: 607-608
- Klöcking R, Sprössig M, Wutzler P, Thiel K-D, Helbig B (1983) Antiviral wirksame Huminsäuren und huminsäureähnliche Polymere. *Z Physiother*, 33: 95-101
- Klöcking R, Thiel K-D, Helbig B, Blumöhr T, Wutzler P, Sprössig M, Schiller F (1979) Gewinnung, Charakterisierung und antivirale Aktivität von Phenolkörperpolymerisaten. Teil 2: Antivirale Aktivität von Phenolkörperpolymerisaten. *Pharmazie*, 34: 293
- Kononowa MM (1958) *Die Humusstoffe des Bodens*. VEB Deutscher Verlag der Wissenschaften, Berlin, erweiterte und veränderte Ausgabe
- Kononowa MM (1966) *Soil organic matter, its nature, its role in soils formation and in soil fertility*. Pergamon Press Oxford, 2: 13-45
- Kowalzik L, Suckow M, Carl A, Waldmann T, Bohnsack K, Pönnighaus J-M (1998) UV-B-induzierte polymorphe Lichtdermatose: Protektion durch topische Antioxidantien. *Aktuelle Dermatol*, 24: 11-14
- Kowbel DJ, Ramaswamy S, Malaiyandi M, Nestmann ER (1986) Mutagenicity studies in salmonella: residues of ozonated and/or chlorinated water fulvic acids. *Environ Mutagen*, 8: 253-262

- Krutmann J (1998) Ultraviolet A radiation-induced immunomodulation: molecular and photobiological mechanisms. *Eur J Dermatol*, 8: 200-201
- Kuan JK, Passaro E (1998) Apoptosis: programmed cell death. *Arch Surg*, 133: 773-775
- Kulms D, Zeise E, Poppelmann B, Schwarz T (2002) DNA damage, death receptor activation and reactive oxygen species contribute to ultraviolet radiation-induced apoptosis in an essential and independent way. *Oncogene*, 21 (38): 5844-5851
- Kumada K, Hurst HM (1967) Green humic acid and its possible origin as a fungal metabolite. *Nature*, 214: 631-633
- Kühn S (1998) Untersuchungen zur Membrantoxizität von Alkylglucosiden mit dem [³H]Arachidonsäure-Freisetzungstest an U937-Zellen. Diplomarbeit, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
- Kühn S, Klöcking HP, Klöcking R (2003) Untersuchungen zum Mechanismus der UV-B-protaktiven Wirkung von Huminsäuren. *Sitzungsberichte der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Klasse 12 der Akademie gemeinnütziger Wissenschaften zu Erfurt*, S. 185-197
- Kühnert M, Fuchs V, Golbs S (1982) Chemische Charakterisierung und besondere pharmakologisch-toxikologische Eigenschaften von Huminsäuren. *Arch Exp Veterinarmed*, 36: 169-177
- Künzig W, Chau J, Norkus E, Holowaschenko H, Newmark H, Mergens W, Conney AH (1984) Caffeic and ferulic acid as blockers of nitrosamine formation. *Carcinogenesis*, 5: 309-313
- Kuluncsics Z, Perdiz D, Brulay E, Muel B, Sage E (1999) Wavelength dependence of ultraviolet-induced DNA damage distribution: involvement of direct or indirect mechanisms and possible artefacts. *J Photochem Photobiol B*, 49 (1): 71-80
- Kvam E, Tyrrell RM (1999) The role of melanin in the induction of oxidative DNA base damage by ultraviolet A irradiation of DNA or melanoma cells. *J Invest Dermatol*, 113 (2): 209-213
- Lærke PE (2003) Impact-induced blackspots in potato tubers. <http://www.agrsci.dk/PHD/pvj/pvjpouleriklærke.html>
- Lagercrantz C, Yhland M (1963) Photo-induced free radical reactions in the solutions of some tars and humic acids. *Acta Chem Scand*, 17: 1299-1306
- Land EJ, Ito S, Wakamatsu K, Riley PA (2003) Rate constants for the first two chemical steps of eumelanogenesis. *Pigment Cell Res*, 16 (5): 487-493
- Land EJ, Ramsden CA, Riley PA (2001) Pulse radiolysis studies of ortho-quinone chemistry relevant to melanogenesis. *J Photochem Photobiol B*, 64 (2-3): 123-135
- Land EJ, Ramsden CA, Riley PA, Yoganathan G (2003) Formation of para-quinomethanes via 4-aminobutylcatechol oxidation and ortho-quinone tautomerism. *Org Biomol Chem*, 1 (17): 3120-3124
- Land EJ, Riley PA (2000) Spontaneous redox reactions of dopaquinone and the balance between the eumelanin and pheomelanin pathways. *Pigment Cell Res*, 13 (4): 273-277

- Landmann L (1991) Die Permeabilitätsbarriere der Haut. Pharmazie in unserer Zeit, 20: 155-163
- Lange N, Golbs S, Kühnert M (1987) Grundlagenuntersuchungen zu immunologischen Reaktionen an der Laboratoriumsratte unter dem Einfluß von Huminsäuren. Arch Exp Veterinarmed, 41: 140-146
- Langfelder K, Streibel M, Jahn B, Haase G, Brakhage AA (2003) Biosynthesis of fungal melanins and their importance for human pathogenic fungi. Fungal Genet Biol, 38 (2): 143-158
- Langner R (1996) Natürlich vorkommende UV-Schutzfilter: p-Methoxyzimtsäureisomylester. Parfümerie und Kosmetik, 77: 322-324
- Larone DH (1995) Medically important fungi – a guide to identification. ASM Press, Washington D.C., 3rd ed.
- Lewis TE, Broadbent FE (1961) Soil organic matter-metal complexes: 4. Nature and properties of exchange sites. Soil Sci, 91: 393-399
- Ley RD, Peak JM, Lyon LL (1983) Induction of pyrimidine dimers in epidermal DNA of hairless mice by UVB: an action spectrum. J Invest Dermatol, 80: 188-191
- Liers Ch (2002) Untersuchungen zu Struktur-Wirkungsbeziehungen von Huminstoffen, gewonnen aus heimischen Torf und Schwarzwasser. Hochschule für Technik, Wirtschaft und Sozialwesen Zittau/Görlitz (FH)
- Liu X, Xu D, Wu F, Liao Z, Liu J, Deng N (2004) Preliminary study on the photoprotection of hydroxyl radicals in aqueous solution with Aldrich humic acid, algae and Fe(III) under high-pressure mercury lamp irradiation. Photochem Photobiol, 79 (3): 259-264
- Lu FJ (1990) Fluorescent humic substances and blackfoot disease in Taiwan. Appl Organometallic Chem, 4: 191-195
- Lu FJ, Shih SR, Liu TM, Shown SH (1990) The effect of fluorescent humic substances existing in the well water of blackfoot disease endemic areas in Taiwan on prothrombin time and activated partial thromboplastin time in vitro. Thrombosis Res, 57: 747-753
- Maggioni A, Varanini Z, Nardi S, Pinton R (1987) Action of soil humic matter on plant roots: stimulation of ion uptake and effects on (Mg²⁺+K⁺) ATPase activity. Sci Total Environ, 62: 355-363
- Mahr N (2003) Einfluss von sulfatierten Hyaluronsäuren, natürlichen Huminsäuren und synthetischen Huminsäure-ähnlichen Polymeren auf das Gerinnungssystem in vitro. Dissertation, Mathematisch-Naturwissenschaftlich-Technische Fakultät (mathematisch-naturwissenschaftlicher Bereich) der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
- Mang R, Krutmann J (2003) Sun protection during holidays. Hautarzt 54: 498-505
- Mang R, Stege H (2003) Unverträglichkeitsreaktionen von Sonnenschutzmitteln. Pharmazeutische Zeitung, Prisma, 10: 177-184
- Mathias CGT, Maibach HI, Epstein J (1978) Allergic contact photodermatitis to para-aminobenzoic acid. Arch Dermatol, 114: 1665-1666

Maurice PDL, Parker S, Azadian BS, Cream JJ (1991) Minor skin surgery. *Acta Derm Venereol* (Stockholm), 71: 267-268

Mc Guinness JE, Proctor PA (2001) The melanin in Sepia. www.tightrope.it/nicolaus/fundamental.htm.

Meffert H, Reich P (1969) The effect of lipoperoxide und dithranol (cignolin) on psoriasis vulgaris. *Dermatol Monatsschr*, 155 (3): 157-161

Mehta NC, Dubach P, Deuel H (1963) Untersuchungen über die Molekulargewichtsverteilung von Huminstoffen durch Gelfiltration an Sephadex. *Agrikulturchemisches Institut der Eidgenössischen Technischen Hochschule Zürich, Band 102, Heft 2: 128-137*

Mesroglu M, Maas DHA, Schneider S (1988) Stellenwert der Moorthherapie in der Sterilitätsbehandlung der Frau. In: *Moorthherapie. Grundlagen und Anwendungen*. Flaig W, Goecke C, Kauffels W [Hrsg] Ueberreuter Verlag, Wien, Berlin, S. 216-224

Meunier L (1998) Photoprotection and photo-immunosuppression in man. *Eur J Dermatol*, 8: 207-208

Ming J, Liu XS, Liu L, Xu H, Ran XZ, Cheng TM (2004) Effect of lipopolysaccharide on the biological features and growth factor secretion power of U937 cell line. *Zhonghua Shao Shang Za Zhi*, 20 (2): 92-94

Mitchell DL, Nairn RS (1989) The biology of the (6-4) photoproducts. *Photochem Photobiol*, 49 (6): 805-819

Miyachi Y, Imamura S, Niwa Y (1987) Decreased skin superoxide dismutase activity by a single exposure of ultraviolet radiation is reduced by liposomal superoxide dismutase pretreatment. *J Invest Dermatol*, 89: 111-112

Mosmann T (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*, 65: 55-63

Moyal D (1998) Immunosuppression induced by chronic ultraviolet irradiation in humans and its prevention by sunscreens. *Eur J Dermatol*, 8: 209-211

Moysan A, Marquis I, Gaboriau F, Santus R, Dubertret L, Morliere P (1993) Ultraviolet A – induced lipid peroxidation and antioxidant defense systems in cultured human skin fibroblasts. *J Invest Dermatol*, 100: 692-698

Mücke D, Obenaus R (1959) Zur Kenntnis von *Cephalosporium gordonii* nov.spec.= *Allescheria boydii* Shear, 1922; Stamm 1699 (Dr. A. Chury). *Arch Mikrobiol*, 33: 283-304

Mücke D, Obenaus R (1959/60) Pigmentationsstadien bei *Cephalosporium gordonii*. *Wissenschaftliche Zeitschrift der Universität Rostock*, 9: 171-173

Mücke D, Obenaus R (1963) Neuere Untersuchungen zur Chemie und Biologie der Huminsäuren. *Wissenschaftliche Zeitschrift der Universität Rostock*, 12: 731-741

Mücke D, Obenaus R, Kipke L (1959) Isolierung der Huminsäure von *Cephalosporium gordonii*. *Acta Biol Ger*, 3: 221-234

Muhl H, Chang JH, Huwiler A, Bosmann M, Paulukat J, Ninic R, Nold M, Hellmuth M, Pfeilschifter J (2000) Nitric oxide augments release of chemokines from monocytic U937 cells: modulation by anti-inflammatory pathways. *Free Radic Biol Med*, 29 (10): 969-980

- Müller-Wegener U (1982) Wechselwirkungen von Huminstoffen mit Aminosäuren. Zeitschrift für Pflanzenernährung und Bodenkunde, 145: 411-420
- Murphy D, Moore AW (1960) A possible structural basis of natural humic acid. The scientific proceedings of the Royal Dublin Society, Series A, 1: 191-195
- Nagtegaal M, Ternes TA, Baumann W, Nagel R (1997) UV-Filtersubstanzen in Wasser und Fischen. Umweltwissenschaften und Schadstoff-Forschung: UWSF, 9: 79-86
- Nagy G (1970) Elektronenmikroskopische Untersuchungen zur Wirkung der UV-Strahlen auf die Haut. Arch Klin Exp Dermatol, 237 (1): 471-476
- Nardini M, Leonardi F, Scaccini C, Virgili F (2001) Modulation of ceramide-induced NF- κ B binding activity and apoptotic response by caffeic acid in U937 cells: comparison with other antioxidants. Free Radic Biol Med, 30: 722-733
- Nardini M, Pisu P, Gentili V, Natella F, Di Filize M, Piccolella E, Scaccini C (1998) Effect of caffeic acid on tert-butyl hydroperoxide-induced oxidative stress in U937. Free Radic Biol Med, 25: 1098-1105
- Navara V (2001) Einfluss von natürlichen Huminsäuren und synthetischen Huminsäure-ähnlichen Polymeren auf die Blutgerinnung. Dissertation, Medizinische Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität Jena
- Neumann NJ, Fritsch C, Lehmann P (2000) Photodiagnostische Testverfahren. Hautarzt, 51: 113-125
- Neyts J, Snoeck R, Wutzler P, Cushman M, Klöcking R, Helbig B, Wang P, De Clercq E (1992) Poly(hydroxy)carboxylates as selective inhibitors of cytomegalovirus and herpes simplex virus replication. Antiviral Chem Chemother, 3 (4): 215-222
- Nicolaus RA (2003) Link 4 - Melanin 95-97. Link 10 – Perspectives in Biology and Melanin Chemistry. www.tightrope.it/nicolaus/index.htm
- Nicolaus RA, Scherillo G (1995) La Melanina. Un riesame su struttura, proprietà e sistemi. Atti della Accademia Pontaniana, XLIV: 265-287
- Nohynek GJ, Schaefer H (2001) Benefit and risk of organic ultraviolet filters. Regul Toxicol Pharmacol, 33 (3): 285-299
- Nosanchuk JD, Casadevall A (2003) The contribution of melanin to microbial pathogenesis. Cell Microbiol, 5 (4): 203-223
- Nosanchuk JD, Gomez BL, Youngchim S, Diez S, Aisen P, Zancope-Oliveira RM, Restrepo A, Casadevall A, Hamilton AJ (2002) Histoplasma capsulatum synthesizes melanin-like pigments in vitro and during mammalian infection. Infect Immun, 70 (9): 5124-5131
- Nunn JW, Chipman JK (1994) Induction of DNA strand breaks by 3-chloro-4-(dichloromethyl)-5-hydroxy-2(5H)-furanone and humic substances in relation to glutathione and calcium status in human white blood cells. Mutat Res, 341: 133-140
- Obenaus R, Friemel H, Mücke D (1965) Zur Biochemie der Huminsäuren. Acta Biol Med Ger, 15: 14-19

Obenaus R (1967) Stoffe vom Huminsäuretyp und ihre Metallverbindungen. Habilitation, Universität Rostock

Obenaus R, Mücke D (1964) Eine neue Methode zur Bestimmung des spezifischen Kaliumpermanganatverbrauches von Huminsäuren. Zeitschrift für analytische Chemie, 201: 428-435

Oelschläger H, Rothley D, Müller M (1982) The antihistaminic effect of a gel for burns and wounds containing tyrothricin, fomocaine, diphenhydramine and 8-hydroxychinoline. Drug Res, 32 (1): 72-75

Olivieri M, Nicolaus RA (1999) On the structure of DHI-melanin. www.tightrope.it/nicolaus/11b.htm.

Osterwald U, Luther H, Herzog B (2001) Über den Lichtschutzfaktor hinaus – neue effiziente und photostabile UVA-Filter. Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz, 44: 463-470

Palmer NE, von Wandruszka R (2001) Dynamic light scattering measurements of particle size development in aqueous humic materials. Fresenius J Anal Chem, 371 (7): 951-954

Palumbo A, Poli A, Di Cosmo A, d'Ischia M (2000) N-Methyl-D-aspartate receptor stimulation activates tyrosinase and promotes melanin synthesis in the ink gland of the cuttlefish *Sepia officinalis* through the nitric Oxide/cGMP signal transduction pathway. A novel possible role for glutamate as physiologic activator of melanogenesis. J Biol Chem, 275 (22): 16885-16890

Parent ME, Velegol D (2004) E.coli adhesion to silica in the presence of humic acid. Colloids Surf B Biointerfaces, 39 (1-2): 45-51

Parrish JA, Jaenicke KF (1981) Action spectrum for phototherapy of psoriasis. J Invest Dermatol, 76: 359-362

Patton WP, Chakravarthy U, Davies RJ, Archer DB (1999) Comet assay of UV-induced DNA damage in retinal pigment epithelial cells. Invest Ophthalmol Vis Sci, 40 (13): 3268-3275

Peak MJ, Peak J, Jones CA (1985) Different (direct and indirect) mechanisms for the induction of DNA-protein crosslinks in human cells by far- and near-ultraviolet radiations (290 and 405nm). Photochem Photobiol, 42: 141-146

Pence BC, Naylor MF (1990) Effects of single-dose ultraviolet radiation on skin superoxide dismutase, catalase, and xanthine oxidase in hairless mice. J Invest Dermatol, 95: 213-216

Perfect JR, Wong B, Chang YC, Kwon-Chung KJ, Williamson PR (1998) *Cryptococcus neoformans*: virulence and host defence. Med Mycol, 36: 79-86

Piccolo A, Nardi S, Concheri G (1996) Micelle-like conformation of humic substances as revealed by size-exclusion chromatography. Chemosphere, 33: 595-602

Pietschmann A, Kuklinski B, Otterstein A (1992) Protection from uv-light-induced oxidative stress by nutritional radical scavengers. Zeitschrift der Gesamten Inneren Medizin, 47 (11): 518-522

Podda M, Traber MG, Weber C, Yan L-J, Packer L (1998) UV-irradiation depletes antioxidants and causes oxidative damage in a model of human skin. Free Radic Biol Med, 24: 55-65

Prochaska HJ, Talalay P (1991) The role of NAD(P)H: Quinone reductase in protection against the toxicity of quinones and related agents. In: Oxidative stress: Oxidants and Antioxidants. Sies H [Ed] Academic press, London, San Diego, New York, Boston, Sydney, Tokyo, Toronto, pp. 195-209

Prota G (2000) Melanins, melanogenesis and melanocytes: looking at their functional significance from the chemist's viewpoint. *Pigment Cell Res*, 13: 283-293

Prota G, D'Ischia M, Napolitano A (1998) The chemistry of melanins and related metabolites. In: The pigmentary system. physiology and pathophysiology. Nordlund JJ, Boissy RE, Hearing VJ, King RA, Ortonne JP [Eds] Oxford University Press, pp. 307-322

Punnonen K, Jansen CT, Puntala A, Ahotupa M (1991a) Effects of in vitro UVA irradiation and PUVA treatment on membrane fatty acids and activities of antioxidant enzymes in human keratinocytes. *J Invest Dermatol*, 96: 255-259

Punnonen K, Puntala A, Ahotupa M (1991b) Effects of ultraviolet A and B irradiation on lipid peroxidation and activity of the antioxidant enzymes in keratinocytes in culture. *Photodermatol Photoimmun Photomed*, 8: 3-6

Punnonen K, Puntala A, Jansen CT, Ahotupa M (1991c) UVB irradiation induces lipid peroxidation and reduces antioxidant enzyme activities in human keratinocytes in vitro. *Acta Derm Venereol (Stockholm)*, 71: 239-273

Rao GHR, Cox CA, Witkop CJ, White JG (1987) Influence of UV light (250 nm) on platelet activation. In: Prostaglandin and lipid metabolism in radiation injury. Walden TL, Hughes HN [Eds] Plenum Press, New York, London, pp. 339-344

Rex RW (1960) Electron paramagnetic resonance studies of stable free radicals in lignins and humic acids. *Nature*, 188: 1185

Rice-Evans CA, Miller NJ, Paganga G (1996) Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acid. *Free Radic Biol Med*, 20: 933-956

Riede UN, Jonas I, Kirn B, Usener UH, Kreutz W, Schlickewey W (1992) Collagen stabilization induced by natural humic substances. *Arch Orthop Trauma Surg*, 111: 259-264

Riede UN, Zeck-Kapp G, Freudenberg N, Keller HU, Seubert B (1991) Humate-induced activation of human granulocytes. *Virchows Arch B Cell Pathol*, 60: 27-34

Riley PA (1995) The evolution of melanogenesis. In: Melanins: its role in human photoprotection. Valdenmar Publishing, Overland Parks, KS, USA, pp. 1-10

Ritter JW, Böckmann (1801) Auffindung nicht-sichtbarer Sonnenstrahlen außerhalb des Farbenspektrums, an der Seite des Violetts (am 22. Februar 1801 gefunden). In: *Annalen der Physik*. Gilbert LW [Hrsg] S. 527

Romero-Graillet CH, Aberdam E, Clement M, Ortonne J-P, Ballotti R (1997) Nitric oxide produced by ultraviolet-irradiated keratinocytes stimulates melanogenesis. *J Clin Invest*, 99: 635-642

Rosenstein BS, Mitchell DL (1987) Action spectra for the induction of pyrimidine(6-4)pyrimidone photoproducts and cyclobutane pyrimidine dimers in normal skin fibroblasts. *Photochem Photobiol*, 45 (6): 775-780

- Roth HJ (2003) Photodynamische Therapie. *Dtsch Apoth Ztg*, 27: 48-54
- Saija A, Tomaino A, Lo Cascio R, Trombetta D, Proteggente A, De Pasquale A, Uccella N, Bonina F (1999) Ferulic and caffeic acids as potential protective agents against photooxidative skin damage. *J Sci Food Agric*, 79: 476-480
- Saija A, Tomaino A, Trombetta D, Giacchi M, De Pasquale A, Bonina F (1998) Influence of different penetration enhancers on in vitro skin permeation and in vivo photoprotective effect of flavonoids. *Int J Pharm*, 175: 85-93
- Sancar A, Sancar G (1988) DNA repair enzymes. *Annu Rev Biochem*, 57: 29-67
- Salo HM, Jokinen EI, Markkula SE, Aaltonen TM (2000) Ultraviolet B irradiation modulates the immune system of fish (*Rutilus rutilus*, Cyprinidae). II: Blood. *Photochem Photobiol*, 71 (1): 65-70
- Sarna T, Sealy RC (1984) Photoinduced oxygen consumption in melanin systems. Action spectra and quantum Yields for eumelanin and synthetic melanin. *Photochem Photobiol*, 39: 69-74
- Sato O, Kumada K (1967) The chemical nature of green fraction of P type humic acid. *Soil Sci Plant Nutr*, 13: 121
- Sato T, Ose Y, Nagase H (1986) Desmutagenic effect of humic acid. *Mutat Res*, 162: 173-178
- Sato T, Ose Y, Nagase H, Hayase K (1987) Mechanism of the desmutagenic effect of humic acid. *Mutat Res*, 176: 199-204
- Schauder S, Ippen H (1997) Contact and photocontact sensitivity to sunscreens. *Contact Dermatitis*, 37: 343-344
- Schauder S (1997) News about sun protection for children and adolescents, part 1 and 2. *Kosmetische Medizin*, 18: 198-202, 262-271
- Schauder S (2001) Dermatologische Verträglichkeit von UV-Filtern, Duftstoffen und Konservierungsstoffen in Sonnenschutzpräparaten. *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz*, 44: 471-479
- Schewe CH, Klöcking R, Helbig B, Schewe T (1991) Lipoxygenase-inhibitory action of antiviral polymeric oxidation products of polyphenols. *Biomed Biochim Acta*, 50: 299-305
- Schleicher E (2001) Über den Reaktionsmechanismus der DNA Photolyase. Dissertation, Technische Universität München
- Schlumpf, M (2001) Estrogenic activity of UV screens. www.mediadesk.unizh.ch/2001/0198
- Schnitzer M (1975) The chemistry of humic substances. *Proceedings of the International Symposium on Environmental Biogeochemistry*, 2: 89-107
- Schnitzer M (1978) Humic substances: Chemistry and reactions. In: Schnitzer M, Khan SU [Eds] *Soil Organic Matter*. Elsevier Sci Publish Co, Amsterdam, 8, p. 57
- Schnitzer M, Khan SU (1972) Humic substances in the environment. Marcel Dekker, New York, pp. 64-67

- Schols D, Wutzler P, Klöcking R, Helbig B, De Clercq E (1991) Selective inhibitory activity of polyhydroxycarboxylates derived from phenolic compounds against human immunodeficiency virus replication. *J acquired immune deficiency syndromes*, 4: 677-685
- Schrader K (2001) Die Sonnenschutzfaktorbestimmung. *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz*, 5: 457-461
- Schrader A, Jakupovic J, Baltes W (1994) Photochemical studies on trans-3-methylbutyl 4-methoxycinnamate. *J Soc Cosmet Chem*, 45: 43-52
- Schultz H (1962) Die viricide Wirkung der Huminsäuren im Torfmull auf das Virus der Maul- und Klauenseuche. *Dtsch Tierärztl Wochenschr*, 69: 613-616
- Schultz H (1965) Untersuchungen über die viricide Wirkungsweise der Huminsäuren im Torfmull. *Dtsch Tierärztl Wochenschr*, 72: 294-297
- Schwarz T (1996) Photoimmunologie. *Aktuelle Dermatol, Sonderheft* 22: 72-74
- Schwarz T (1998a) Akute UV-bedingte Hautschäden. *Therapie & Erfolg Dermatologie*, 28: 210-215
- Schwarz T (1998b) Chronische UV-bedingte Hautschäden. *Therapie & Erfolg Dermatologie*, 28: 216-221
- Schwarz T (1998c) Mechanisms of UV-induced immunosuppression. *Eur J Dermatol*, 8: 196-197
- Sealy RC (1984) Free radicals in melanin formation, structure and reactions. In: Free radical in molecular biology, aging and disease. Armstrong D, Sohal RS, Cutler RGC, Slater TR [Eds] Raven Press, New York, pp. 67-76
- Setlow RB (1974) The wavelengths in sunlight effective in producing skin cancer: a theoretical analysis. *Proceedings of the National Academy of sciences of the United States of America*, 71: 3363-3366
- Shaath NA (1991) Stability and efficacy of UV-Filters. *Seifen, Öle, Fette, Wachse, SÖFW*, 117: 45-47
- Shindo Y, Witt E, Han D, Packer L (1994) Dose-response effects of acute ultraviolet irradiation on antioxidants and molecular markers of oxidation in murine epidermis and dermis. *J Invest Dermatol*, 102: 470-475
- Sies H (1991) [Ed] *Oxidative stress: Oxidants and Antioxidants*. Academic press, London, San Diego, New York, Boston, Sydney, Tokyo, Toronto, pp. XV-XXI
- Simon JD, Geller GB (1999) The spectroscopy of melanin: the role of small melanin particles in generating free radicals. www.aps.org/meet/CENT99/vpr/layic19-04.html.
- Skulachev V (1998) Cytochrome C in the apoptotic and antioxidant cascades. *FEBS Letters*, 423: 275-280
- Slawinski J, Puzyna W, Slawinska D (1978) Chemiluminescence during photooxidation of melanins and soil humic acids arising from a singlet oxygen mechanism. *Photochem Photobiol*, 28: 459-462

- Sommer S, Wilkinson SM, English JS, Ferguson J (2002) Photoallergic contact dermatitis from the sunscreen octyl triazone. *Contact Dermatitis*, 46 (5): 304-305
- Stamford IF, Gaffen JD, Melhuish PB, Bennett A (1987) Eicosanoids and radiotherapy in human and animal tumors. In: Prostaglandin and lipid metabolism in radiation injury. Walden TL, Hughes HN [Eds] Plenum Press, New York, pp. 319-330
- Steelink C, Tollin G (1962) Stable free radicals in soil humic acid. *Biochim Biophys Acta*, 59: 25
- Stephan H, Mannherz HG (1998) Der programmierte Zelltod: Harakiri mit tausend Schnitten. Medizinische Fakultät, Bochum, www.ruhr-uni-bochum.de/rubin/rbin2_98/rubin3.htm.
- Stocker R, Frei B (1991) Endogenous antioxidant defences in human blood plasma. In: Oxidative stress: Oxidants and Antioxidants. Sies H [Ed] Academic press, London, San Diego, New York, Boston, Sydney, Tokyo, Toronto, pp. 213-243
- Strobel H, Köstler G, Spielvogel H (2003) Kosmetikherstellung in der Apotheke. *Dtsch Apoth Ztg*, 143: 1327-1329, 1469-1471, 1612-1614, 1806-1809, 2060-2063, 2186-2189
- Stüttgen G (1965) The effect of ultraviolet light on allergic test reactions. *Dermatol Int*, 4 (3): 180-183
- Tartaglia LA, Storz G, Farr SB, Ames BN (1991) The bacterial adaptation to hydrogen peroxide stress. In: Oxidative stress: Oxidants and Antioxidants. Sies H [Ed] Academic press, London, San Diego, New York, Boston, Sydney, Tokyo, Toronto, pp. 155-168
- Taylor HR, West SK, Rosenthal FS, Munoz B, Newland HS, Abbey H, Emmett EA (1988) Effect of ultraviolet radiation on cataract formation. *N Engl J Med*, 22: 1429-1433
- Thiel K-D, Klöcking R, Helbig B (1976) In vitro-Untersuchungen zur antiviralen Aktivität enzymatisch oxidiertes o-Diphenolverbindungen gegenüber Herpes simplex Virus Typ I und Typ II. *Zbl Bakt Hyg*, 234: 159-169
- Thune P (1984) Contact and photocontact allergy to sunscreens. *Photodermatology*, 1: 5-9
- Thune P, Jansen C, Wennersten G, Rystedt I, Brodthagen H, McFadden N (1988) The scandinavian multicenter photopatch study 1980-1985. Final report. *Photodermatology*, 5: 261-269
- Treder-Conrad C, Kloker B, Dörschner A, Stäb F, Rippke F (2003) Wirksamkeit des antioxidativen Lichtschutzes bei polymorpher Lichtdermatose und Mallorca-Akne. *Aktuelle Dermatol*, 29: 121-126
- Tronnier H (1976) Protection against light in normal and diseased skin. *Hautarzt*, 27 (1): 12-15
- Tronnier H (1984) Ultraviolet protection of the skin by β -carotene and xanthaxanthin. *Z Hautkr*, 59 (13): 859-870
- Tronnier H (1996) Testprobleme bei der exakten Bestimmung hoher Lichtschutzfaktoren. *Apo J*, 18: 6-7
- Tronnier H (2000) Bildanalytische Testverfahren an der menschlichen Haut. *Aktuelle Dermatol*, 26: 200-206

Tronnier H, Schmohl U (1990) Dermatologische Rezepturen und Wirkstoffe. Georg Thieme Verlag Stuttgart, New York, S. 68

Trush MA, Kensler TW (1991) Role of free radicals in carcinogen activation. In: Oxidative stress: Oxidants and Antioxidants. Sies H [Ed] Academic press, London, San Diego, New York, Boston, Sydney, Tokyo, Toronto, pp. 277-318

Tyner SD, Venkatachalam S, Choi J, Jones S, Ghebranious N, Igelmann H, Lu X, Soron G, Cooper B, Brayton C, Park SH, Thompson T, Karsenty G, Bradley A, Donehower LA (2002) p53 mutant mice that display early ageing-associated phenotypes. *Nature*, 415: 45-53

Tyrrell RM (1991) UVA (320-380 nm) radiation as an oxidative stress. In: Oxidative stress: Oxidants and Antioxidants. Sies H [Ed] Academic press, London, San Diego, New York, Boston, Sydney, Tokyo, Toronto, pp. 57-79

Tzung TY, Runger TM (1998) Assessment of DNA damage induced by broadband and narrowband UVB in cultured lymphoblasts and keratinocytes using the comet assay. *Photochem Photobiol*, 67 (6): 647-650

Ullrich O, Grune T (2001) Angriff auf Neurone. *Pharmazeutische Zeitung*, 46: 10-14

Ursini F, Maiorino M, Sevanian A (1991) Membrane hydroperoxides. In: Oxidative stress: Oxidants and Antioxidants. Sies H [Ed] Academic press, London, San Diego, New York, Boston, Sydney, Tokyo, Toronto, pp. 319-336

Van Acker SABE, van den Berg DJ, Tromp MNJL, Griffioen DH, van Bennekom WP, van der Vijgh WJF, Bast A (1996) Structural aspects of antioxidant activity of flavonoids. *Free Radic Biol Med*, 20: 331-342

Van Zsunshuj, Pan Tschan, Ljan Njanzy, Tschan Sjaona (1981) Untersuchungen des antiphlogistischen Effektes von Huminsäuren. In: *Torf in der Medizin*. Plötner G, Weber U [Hrsg] Symposium der Kommission VI der IMTG, Bad Elster, S. 268-285

Visser SA (1964) Oxidation-reduction potentials and capillary activities of humic acids. *Nature*, 204: 581

Visser SA (1987) Effects of humic substances on mitochondrial respiration and oxidative phosphorylation. *Sci Total Environ*, 62: 347-354

Vollmar A (2003a) Faszination Zytotoxizität. Vortrag auf der Jahrestagung der DPhG in Würzburg vom 08.-11.10.2003

Vollmar A (2003b) Todesstoß für Tumorzellen. *Pharmazeutische Zeitung*, 148: 39-40

Von Felbert V (2003) Developments in photodynamic therapy. *Hosp Pharm Eur*, 10: 33-35

Von Wandruszka R (1995) Final report: The secondary structure of humic acid and its environmental implications.

<http://es.gov/ncer/final/grants/95/chemistrywater/vonwandruszka.html>.

Wagner H (1993) Drogen und ihre Inhaltsstoffe. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, New York, 5. neubearbeitete Auflage, S. 208-209

Wätzig H (2003) Statistik in der Pharmazeutischen Analytik. *Pharmazeutische Zeitung*, Prisma, 4: 257-265

- Wang Y, Aisen P, Casadevall A (1995) Cryptococcus neoformans melanin and virulence: mechanism of action. *Infection and Immunity*, 63: 3131-3136
- Weber C, Podda M, Rallis M, Thiele JJ, Traber MG, Packer L (1997) Efficacy of topically applied tocopherols and tocotrienols in protection of murine skin from oxidative damage induced by UV-irradiation. *Free Radic Biol Med*, 22: 761-769
- Williamson PR (1997) Laccase and melanin in the pathogenesis of cryptococcus neoformans. <http://www.bioscience.org/1997/v2/e/william/4.htm>.
- Witthauer J, Klöcking R (1971) Bindungsarten des Stickstoffs in Huminsäuren. *Arch Acker- und Pflanzenbau und Bodenkunde*, 15: 577-588
- Wohlrab W, Helbig B, Klöcking R, Sprössig M (1984) Penetrationskinetik eines potentiellen Virustatikums in die menschliche Haut. *Pharmazie*, 39: 562-564
- Xu QX, Du J, He PY, Zhang JZ, Zhu TJ (2004) Effects of 1alpha,25-dihydroxyvitamin D₃ and UVB on cell proliferation and melanin synthesis of cultured human melanocyte. *Beijing Da Xue Xue Bao*, 36 (5): 483-486
- Yang CM, Wang MC, Lu YK, Chang IF, Chou CH (2004) Humic substances affect the activity of chlorophyllase. *J Chem Ecol*, 30 (5): 1057-1065
- Yang PY, Rui YC, Zhang L, Li TJ, Qiu Y, Wang JS, Zhang WD (2002) Expression of vascular endothelial growth factor in U937 foam cells and the inhibitory effect of drugs. *Yao Xue Xue Bao*, 37 (2): 86-89
- Yarosh DB, Boumakis S, Brown AB, Canning MT, Galvin JW, Both DM, Kraus E, O' Connor A, Brown DA (2002) Measurement of UVB-induced DNA damage and its consequences in models of immunosuppression. *Methods*, 28 (1): 55-62
- Young LC, Thulien KJ, Campbell MR, Tron VA, Andrew SE (2004) DNA mismatch repair proteins promote apoptosis and suppress tumorigenesis in response to UVB irradiation: an in vivo study. *Carcinogenesis*, 25 (10): 1821-1827
- Zafiriou OC, Jousset-Dubien J, Zepp RG, Zika RG (1984) Photochemistry of natural waters. *Environ Sci Technol*, 18: 358A-371A
- Zeng K, Hwang HM, Zhang Y, Yu H (2003) Identification of 6-aminochrysene photoproducts and study of the effect of a humic acid and riboflavin on its photolysis. *J Photochem Photobiol B*, 72 (1-3): 95-100
- Zepp RG, Baughman GL, Schlotzhauer PF (1981) Comparison of photochemical behavior of various humic substances in water: I. Sunlight induced reactions of aquatic pollutants photosensitized by humic substances. *Chemosphere*, 10: 109-117
- Ziboh VA, Burrall B (1987) Eicosanoid changes in skin following ultraviolet light irradiation. In: Prostaglandin and lipid metabolism in radiation injury. Walden TL, Hughes HN [Eds] Plenum Press, New York, pp. 159-171
- Ziegler DM (1991) Non-radical mechanisms for the oxidation of glutathione. In: Oxidative stress: Oxidants and Antioxidants. Sies H [Ed] Academic press, London, San Diego, New York, Boston, Sydney, Tokyo, Toronto, pp. 85-98
- Zimmer A, Herzfeldt CD (1997) Galenik apothekenüblicher Sonnenschutzmittel. *Pharmazeutische Zeitung, Prisma*, 4: 173-184

Danksagung

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Dr. H.-P. Klöcking, Institut für Pharmakologie und Toxikologie/Bereich Erfurt der Friedrich-Schiller-Universität Jena, für das Überlassen des Themas und die intensive Betreuung beim Bearbeiten der Dissertation.

Frau Prof. Dr. R. Klöcking, Institut für Antivirale Chemotherapie der Friedrich-Schiller-Universität Jena/Bereich Erfurt danke ich für die wertvollen Ratschläge und Diskussionen bei der Durchführung der Versuche und deren Auswertung.

Frau PD Dr. E. Krause, Institut für Pharmakologie und Toxikologie für Naturwissenschaftler der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, danke ich ebenfalls für die Betreuung der Arbeit.

Herr Keil und die Mitarbeiter der Krankenhausapotheke im Vogtland-Klinikum Plauen haben mich in meiner Arbeit unterstützt und bestärkt. Für das entgegengebrachte Verständnis, das das Durchführen der Arbeit erst ermöglicht hat, möchte ich mich ganz herzlich bedanken.

Für die Unterstützung bei den Fotoarbeiten und den EDV-technischen Problemen gilt mein Dank Herrn R. Hager und Herrn Dr. St. Hummel.

Außerdem bedanke ich mich bei den Mitarbeitern der Bibliothek im Vogtland-Klinikum Plauen, die mich stets hilfreich bei der Literaturrecherche unterstützt haben und den Mitarbeitern der Apotheke des Kreiskrankenhauses Greiz für die aufmunternden Worte und das kollegiale Verständnis.

Mein größter Dank gilt meiner Familie, ohne deren Hilfe, Verständnis, Unterstützung und Motivation diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Angaben zur Person

Name:	Simone Kühn
Geburtstag:	04.09.1974
Geburtsort:	Saalfeld/Saale
Familienstand:	ledig
Anschrift:	Fischersdorf 62 07338 Kaulsdorf/Saale
09/1981 – 07/1990	Polytechnische Oberschule in Kaulsdorf
09/1990 – 06/1993	2. Staatliches Gymnasium in Saalfeld/Saale
06/1993	Abitur
10/1993 – 10/1997	Studium der Pharmazie an der Friedrich-Schiller-Universität Jena
11/1997	II. Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung
11/1997 – 04/1998	Anfertigen einer Diplomarbeit am Institut für Pharmakologie und Toxikologie/Bereich Erfurt der Friedrich-Schiller- Universität Jena unter Leitung von Herrn Prof. Dr. Dr. H.-P. Klöcking
07/1998	Abschluss der Diplomarbeit
05/1998 – 11/1998	Praktikum in der Stadtapotheke Leutenberg
12/1998	III. Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung
01/1999	Approbation als Apothekerin
01/1999 – 04/1999	Tätigkeit als Apotheker in der Marktapotheke Bayreuth
05/1999 – 12/2003	Tätigkeit als Krankenhausapotheker in der Apotheke des Vogtland-Klinikums Plauen Lehrtätigkeit an der Krankenpflegeschule des Vogtland- Klinikums Plauen im Fach Arzneimittellehre
06/1999 – 04/2003	Ausbildung zum Fachapotheker für Klinische Pharmazie unter Leitung von Herrn Keil
seit 01/2004	Chefapothekerin der Apotheke der Kreiskrankenhaus Greiz GmbH
06/2001 – 06/2005	Arbeit an der Promotion

Fischersdorf, den 7.7.2005 Simone Kühn

Erklärung

Meine Arbeit wurde seit Oktober 2002 von Frau PD Dr. E. Krause, Institut für Pharmakologie und Toxikologie für Naturwissenschaftler der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, als Mitglied der Mathematisch-Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg betreut.

Fischersdorf, den 7.7.2005 Simone Kühn

Selbständigkeitserklärung

Ich erkläre, dass ich die der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg zur Promotion eingereichte Dissertation mit dem Titel:

Untersuchungen zum Mechanismus der UV-B-protectiven Wirkung von Huminsäuren in vitro

unter Leitung von
Prof. Dr. Dr. H.-P. Klöcking

selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst und andere als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt habe. Die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen wurden als solche kenntlich gemacht.

Fischersdorf, den 7.7.2005

Simone Kühn

Erklärung

Ich habe bisher an keiner in- oder ausländischen Fakultät ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht noch die vorliegende Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Fischersdorf, den 7.7.2005

Simone Kühn