

Aus dem Institut für Physiologische Chemie
an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
(Direktor: Prof. Dr. med. habil. T. Braun)



**EINFLUß VON CIS-LINOLSÄURE AUF DIE AKTIVITÄT UND
FUNKTION DER NA,K-ATPASE VON EPITHELZELLEN DER
AUGENLINSE**

DISSERTATION

zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Medizin (Dr. med.)

vorgelegt

der Medizinischen Fakultät
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Thi Nguyet Nga Nguyen
geboren am 06.05.1967 in Ha Son Binh, Vietnam

Gutachter:

1. Prof. Dr. med. Gläßer, Universität Halle-Wittenberg
2. Prof. Dr. med. Foth, Universität Halle-Wittenberg
3. Prof. Dr. med. Wiederanders, Universität Jena

Verteidigung am 16.12.99

Meinen Eltern Ngo Thi Nguyet und Nguyen Van Hien gewidmet.

Rindenkatarakte der Augenlinse gehen intrazellulär mit einem Na^+ -Anstieg und K^+ -Abfall einher. Daher wird vermutet, daß eine Beeinträchtigung der Funktion der Na,K-ATPase bei der Entstehung von Rindenkatarakten eine Rolle spielt. In der Arbeitsgruppe von Prof. Gläßer und Prof. Iwig, Institut für Physiologische Chemie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, wurde gefunden, daß freie ungesättigte Fettsäuren, insbesondere cis-Linolsäure, für kultivierte Epithelzellen von Rinderlinsen zytotoxisch sind und es wird vermutet, daß diese Substanzen kataraktogene Risikofaktoren sein können. In dieser Arbeit sollte geklärt werden, ob die starke Zytotoxizität der cis-Linolsäure gegenüber Linsenepithelzellen durch eine Hemmung der Aktivität und Funktion der Na,K-ATPase verursacht wird.

Dazu wurde zunächst die Zytotoxizität von ungesättigten freien Fettsäuren mit Hilfe des Zellablösungstests und des Neutralrot-Tests charakterisiert. In beiden Testen zeigte cis-Linolsäure schon mit $10 \mu\text{mol/l}$ Zellschädigungen. Einfluß von cis-Linolsäure auf die Aktivität der Na,K-ATPase wurde in teilgereinigten Plasmamembranfraktionen untersucht. Mit $100 \mu\text{mol/l}$ bewirkt cis-Linolsäure eine Hemmung der Enzymaktivität um 51,7 %, während mit $10 \mu\text{mol/l}$ eine Enzymaktivierung nachgewiesen werden konnte. Der Natriumtransport über die Plasmamembran wurde über die Messung der intrazellulären Natriumkonzentration in intakten Linsenepithelzellen und deren Änderungen unter verschiedenen Versuchsbedingungen mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie untersucht. Unter Einwirkung von $100 \mu\text{mol/l}$ cis-Linolsäure wurde eine starke Erhöhung des passiven Na^+ -Influx nachgewiesen, während die intrazelluläre Natriumkonzentration nahezu unverändert bleibt. Aus diesen Befunden geht hervor, daß mit $100 \mu\text{mol/l}$ cis-Linolsäure der aktive, durch die Na,K-ATPase betriebene Na^+ -Efflux den erhöhten Na^+ -Influx noch ausgleichen kann.

Die Ergebnisse führen zum Schluß, daß die zytotoxische Wirkung von cis-Linolsäure auf Linsenepithelzellen nicht auf eine Beeinträchtigung der Aktivität und Funktion der Na,K-ATPase zurückzuführen ist.

Nguyen, Thi Nguyet Nga: Einfluß von cis-Linolsäure auf die Aktivität und Funktion der Na,K-ATPase von Epithelzellen der Augenlinse.

Halle, Univ., Med. Fak., Diss. A, 75 Seiten, 1999

INHALTSVERZEICHNIS

VERZEICHNIS DER ABKÜRZUNGEN UND SYMBOLE

1	EINLEITUNG	1
1.1	Die Katarakt	1
1.2	Na,K-ATPase der Plasmamembran	3
1.3	Fettsäuren als ein möglicher kataraktogener Risikofaktor	5
1.4	Zielstellung der Arbeit	7
2	MATERIAL UND METHODEN	8
2.1	Verwendete Medien und Lösungen	8
2.1.1	MEM-Medien	8
2.1.2	HBS (Hepes Buffered Salt Solution)	8
2.1.3	Bei der Subkultivierung verwendete Lösungen	9
2.2	Effektoren	9
2.2.1	Verwendete Effektoren	9
2.2.2	Herstellung fettsäurehaltiger Lösungen	10
2.3	Zellkultivierung	11
2.3.1	Primärkultur	11
2.3.2	Subkultur	12
2.4	Zytotoxizitätsteste	13
2.4.1	Zellablösungstest	13
2.4.2	Neutralrot-Test	14
2.5	Bestimmung des anorganischen Phosphats	15
2.6	Proteinbestimmung	17
2.7	Aktivitätsbestimmung der Ecto-ATPase an Epithelkapsel- Präparaten	18
2.8	Aktivitätsbestimmung der Na,K-ATPase	18
2.8.1	Gewinnung von Zellmaterial aus subkultivierten Linsen- epithelzellen	18
2.8.2	Bestimmung der Na,K-ATPase-Aktivität	19
2.9	Methoden zur Untersuchung der intrazellulären Natriumkonzentration	21

2.9.1	Prinzip und Durchführung	21
2.9.2	SBFI-Kalibrierung	23
2.9.3	Untersuchungen zum Na ⁺ -Transport durch die Plasmamembran	24
3	ERGEBNISSE	25
3.1	Die Zytotoxizitätsteste	25
3.1.1	Zellablösungstest	25
3.1.2	Neutralrot-Test	28
3.2	Untersuchung der Ecto-ATPase-Aktivität	30
3.2.1	Bestimmung der Ecto-ATPase-Aktivität am Epithelkapsel- präparat	30
3.2.2	Untersuchungen zum Einfluß von Linolsäure auf die Ecto- ATPase-Aktivität	31
3.3	Untersuchungen über die Aktivität der Na,K-ATPase	32
3.3.1	Bestimmung der Na,K-ATPase-Aktivität im Zellmaterial	32
3.3.2	Einfluß von Linolsäure auf die Aktivität der Na,K-ATPase	34
3.4	Untersuchungen zum Einfluß von freien Fettsäuren auf die intrazelluläre Natriumkonzentration	36
3.4.1	Erfassung der SBFI-Fluoreszenz in intakten Linsene­pithelzellen	36
3.4.2	SBFI-Kalibrierung	37
3.4.3	Bestimmung der basalen intrazellulären Natriumkonzentration in intakten Linsene­pithelzellen	39
3.4.4	Bestimmung der intrazellulären Natriumkonzentration bei Blockierung der Na,K-ATPase	41
3.4.5	Einfluß von Linolsäure auf die intrazelluläre Natrium- konzentration	42
3.4.6	Einfluß von Albumin auf den Na ⁺ -Influx-erhöhenden Effekt von Linolsäure	44
3.4.7	Einfluß von anderen Fettsäuren und –estern auf den Na ⁺ -Influx	45
4	DISKUSSION	47
4.1	Zytotoxizitätsteste	47
4.2	Bestimmung der intrazellulären Natriumkonzentration	49
4.2.1	Zur Methodik	49

4.2.2 Die intrazelluläre Natriumkonzentration in Linsenepithelzellen aus Rinderaugen	52
4.3 Einfluß von Linolsäure auf die Na,K-ATPase von subkultivierten Linsenepithelzellen	54
4.3.1 Aktivität der Na,K-ATPase in subkultivierten Linsenepithelzellen	54
4.3.2 Einfluß von Linolsäure auf die Aktivität der Na,K-ATPase	55
4.3.3 Einfluß von Linolsäure auf die intrazelluläre Na ⁺ - konzentration und auf den transmembranen Na ⁺ -Transport	56
4.3.4 Wird die Zytotoxizität der Linolsäure gegenüber Linsenepithel- zellen durch eine Beeinträchtigung der Na,K-ATPase verursacht?	59
 LITERATURVERZEICHNIS	 60
CHEMIKALIEN- UND GERÄTEVERZEICHNIS	69
THESEN	72

VERZEICHNIS DER VERWENDETEN ABKÜRZUNGEN UND SYMBOLE

– 12:0	Laurinsäure
– 14:0	Myristinsäure
– 16:0	Palmitinsäure
– 18:0	Stearinsäure
– 16:1, cis	Palmitoleinsäure
– 18:1, cis	Ölsäure
– 18:1, trans	Elaidinsäure
– 18:1, cis, Ester	Ethyloleat
– 18:2, cis; LS	cis-Linolsäure (auch als Linolsäure bezeichnet)
– 18:2, trans	Linolelaidinsäure
– 18:2, cis, Ester	Ethyllinoleat
– 18:3, cis	α -Linolensäure
– 18:3, cis, Ester	α -Ethyllinolenat
– 20:4, cis	Arachidonsäure
– 20:4, cis, Ester	Ethylarachidonat
– Abb.	Abbildung
– AM-Ester	Acetoxymethylester
– ATP	Adenosintriphosphat
– BSA	Rinderserumalbumin (Englisch: bovine serum albumin)
– $[Ca^{++}]_{in}$	Intrazelluläre Calciumkonzentration
– DMSO	Dimethylsulfoxid
– EDTA	Ethylendiamintetraacetat
– EKP	Epithel-Kapsel-Präparat
– FKS	Foetales Kälberserum
– HBS	Hepes Buffered Salt Solution
– Hepes	2-(Hydroxyethyl)piperazin-N-2-Ethan-Sulfonsäure
– ICCD-Kamera	Attofluor image intensification charge couple device sensing system camera
– LEZ	Linsenepithelzellen

- MEM Minimum Essential Medium Eagle
- $[\text{Na}^+]_{\text{in}}$ Intrazelluläre Natriumkonzentration
- NMG N-Methyl-D-Glucamin
- Oua Ouabain
- P_i Anorganisches Phosphat (Englisch: inorganic phosphate)
- PKM Phasenkontrastmikroskop
- POC-Kammer Perfusion open closed chamber
- SBF1 sodium-binding benzofuran isophthalate
- Tab. Tabelle

1. Einleitung

1.1 Die Katarakt

Die Katarakt, auch als grauer Star bezeichnet, ist weltweit die häufigste Ursache von Erblindungen (Harding, 1991). Ca. 40 % von den registrierten 42 Millionen Erblindungen in der Welt wurden von Katarakten hervorgerufen (Hyman, 1987). Die dadurch bedingte hohe klinische Relevanz erklärt intensive Untersuchungen zur Epidemiologie und Pathogenese der Kataraktentstehung in den letzten Jahrzehnten. Unter Katarakten sind Trübungen zu verstehen, die in verschiedenen Regionen der Linse auftreten können und das Sehvermögen in unterschiedlichem Ausmaß beeinträchtigen.

Die Augenlinse ist ein Organ ohne Blutgefäße und Nerven. Die Versorgung erfolgt über das Kammerwasser an der Linsenoberfläche, welche von der Linsenkapsel überzogen ist. An der Rückseite der vorderen Kapsel befindet sich ein einschichtiges Plattenepithel, dessen Zellen am Linsenäquator mitosenaktiv sind. Die kontinuierlich neugebildeten Epithelzellen differenzieren zu Faserzellen, die sich ihrerseits nicht mehr teilen können. Das bis ins hohe Alter anhaltende Wachstum der Linse ist dadurch bedingt, daß die mitotische Aktivität der Epithelzellen in Äquaturnähe bis zu einem gewissen Grad aufrechterhalten wird und ständig neue Faserzellen gebildet werden, andererseits aber alle im Laufe des Lebens gebildeten Faserzellen im Linseninneren nach dem Abbau der Zellkerne als proteinreiche, schlauchartige Gebilde erhalten bleiben. Damit erhält der Linsenkern die ältesten Linsenfasern, während die Linsenrinde aus den jüngeren Linsenfasern besteht (Abb. 1).

Statistische Untersuchungen zeigen, daß im höheren Alter Linsentrübungen wesentlich häufiger auftreten, weshalb die Katarakt lange Zeit als altersbedingt schlechthin betrachtet wurde (senile Katarakt). Daß das Alter allein aber nicht zur Kataraktentstehung führen kann, dafür spricht die Tatsache, daß Trübungen in der jüngeren Rinde ca. 4 bis 5 mal häufiger auftreten als im älteren Linsenkern. Dies deutet auf eine zusätzliche Beteiligung von Risikofaktoren an der Kataraktentstehung hin, deren Bedeutung in einer

Verstärkung der typischen altersbedingten Linsenveränderungen zu sehen ist (Hockwin, 1997). Einer der am besten charakterisierten kataraktogenen Risikofaktoren ist der Diabetes mellitus, bei dem die Katarakt bis ca. zehn mal häufiger auftritt als in der Restbevölkerung (Harding, 1991). Auch die essentielle arterielle Hypertonie, die chronische Niereninsuffizienz, die Hypocalcämie, die Diarrhoe, eine langzeitige Behandlung mit Corticosteroiden, Mangelernährung, die UV-Bestrahlung, das Zigarettenrauchen sowie der Alkoholabusus sind häufig mit einer Erkrankung an Katarakt assoziiert (Harding, 1991; Hockwin, 1997).

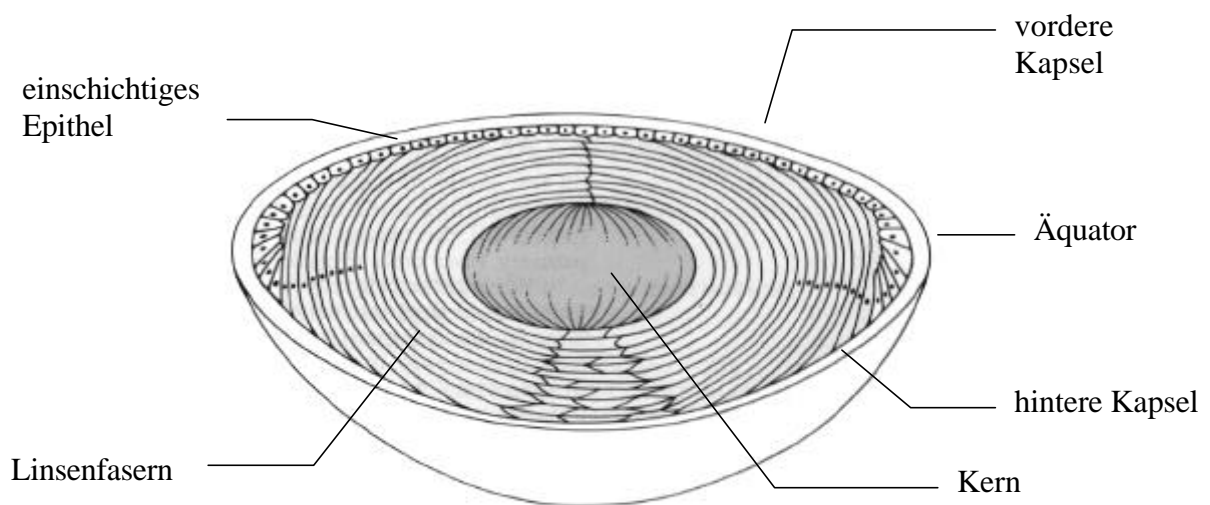


Abb. 1 Schematischer Aufbau der Augenlinse (nach Jaffe und Horwitz, 1992)

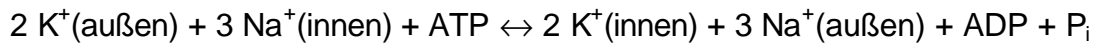
Untersuchungen der humanen senilen Kataraktlinsen ergaben häufig Änderungen der Ionenkonzentrationen, die mit dem Auftreten von corticalen Trübungen einhergehen. Diese Ionenimbalance umfaßt eine erhöhte Konzentration von Natrium und Calcium sowie eine erniedrigte Kaliumkonzentration der Linse (Duncan und Bushell, 1975). Auch in Modellversuchen mit Linsen tierischen Ursprungs wurden ähnliche Ergebnisse bei künstlich erzeugten Linsentrübungen erzielt (Hightower und McCready, 1991). Diese Befunde weisen darauf hin, daß der Ionen-transport der Linse bei corticaler Katarakt beeinträchtigt ist. Diese Überlegung wird durch weitere Befunde bestätigt, nach denen die passiven und aktiven Transportfunktionen

der Membran in Alters- und Kataraktlinsen gestört sind. Pasino und Maraini (1982) haben in humanen Linsen mit corticalen Katarakten eine erhöhte Membranpermeabilität für Ionen nachgewiesen. Bei Untersuchungen von humanen Linsen konnten Duncan et al. (1989) eine Erhöhung der Ionenpermeabilität der Membran mit dem Alter feststellen, die in enger Korrelation mit Linsentrübungen auftritt. Desweiteren gibt es Befunde über eine verminderte Aktivität der für den aktiven Natrium- und Kaliumtransport durch die Plasmamembran verantwortlichen Na,K-ATPase in Kataraktlinsen (Gupta und Harley, 1975; Kobatashi et al., 1982/1983). In in vitro-Versuchen konnte eine Hemmung der Na,K-ATPase-Aktivität unter Einwirkung von bekannten kataraktogenen Risikofaktoren wie H_2O_2 (Garner et al., 1983), UVB-Strahlung (Hightower et al., 1994) und Selen (Hightower und McCready, 1994) nachgewiesen werden. Diese Befunde führen zur Vermutung, daß eine Beeinträchtigung des Ionen transports durch die Plasmamembran eine kausale Rolle bei der Kataraktentstehung spielen kann.

1.2 Die Na,K-ATPase der Plasmamembran

Schon in den vierzigen Jahren war es bekannt, daß in den meisten Zellen Na^+ -Ionen aus dem Zytoplasma gegen einen elektrochemischen Gradient in den extrazellulären Raum transportiert werden. Auf dem Suche nach einem aktiven Natriumtransportsystem der Plasmamembran hat Skou (1957) in peripheren Nerven von Krebs die Na,K-ATPase entdeckt, ein Enzym, das unter Verbrauch von Energie aus ATP-Hydrolyse Na^+ gegen K^+ durch die Plasmamembran transportiert. In nur wenigen Jahren danach konnte das Enzymprotein aus tierischen und humanen Zellen verschiedener Gewebe isoliert und charakterisiert werden. Seitdem ist unser Kenntnis über Aufbau, Lokalisation, Eigenschaften und Funktion des Enzyms ständig erweitert, die Na,K-ATPase ist eines der am gründlichsten untersuchten Transportssysteme der Plasmamembran. Heute weiß man, daß das Enzym in gleichzeitiger Anwesenheit von Na^+ - und K^+ -Ionen ATP hydrolysiert und dabei zunächst phosphoryliert wird. Im nächsten Schritt erfolgt eine Konformationsänderung des Enzymproteins,

wobei die Ionen durch die Plasmamembran transportiert werden. Bei der darauf folgenden Dephosphorylierung wird die Ausgangskonformation wieder erreicht und damit der Zyklus abgeschlossen. Stöchiometrisch kann die Funktion der Na,K-ATPase durch folgende Gleichung beschrieben werden:



Weil das eigentliche Substrat des Enzyms aber Mg^{++} -ATP ist, werden dazu noch Mg^{++} -Ionen benötigt.

Durch die Na,K-ATPase wird der passive Natrium- und Kaliumtransport in Richtung der Konzentrationsgefälle entgegengewirkt und damit der hohe Natrium- und Kaliumgradient über die Plasmamembran aufrechterhalten. Dazu wird in den meisten Zellen ein großer Teil ihr produzierten ATP verwendet, den eine intakte Funktion der Na,K-ATPase hat für die Zelle wichtige physiologische Bedeutungen. Zum einen ermöglicht eine niedrig gehaltene intrazelluläre Na^+ -Konzentration tierischen Zellen die osmotische Kontrolle des Zellvolumens. Zum anderen wird der hohe Natriumgradient zum Cotransport bzw. Gegentransport von anderen Substanzen wie Glucose oder Ca^{++} benötigt. In Nervenzellen ist der durch das Enzym erzeugte elektrochemische Potentialgradient außerdem für die elektrische Erregbarkeit der Zelle verantwortlich. Eine Einschränkung der Funktion des Enzyms kann deshalb schwerwiegende Störungen in der Zelle zur Folge haben.

Zur Untersuchung der Na,K-ATPase wird häufig der spezifische Inhibitor Ouabain eingesetzt, der in Extrakt von rotem Fingerhut vorkommt. Diese Substanz bindet sich an der Außenseite des Enzymproteins und blockiert sowohl die Transportfunktion als auch die ATP-Hydrolyse. Auch durch Entzug von K^+ -Ionen aus dem Außenmedium kann die Na,K-ATPase gehemmt werden. Abb. 2 zeigt die schematische Struktur und Lokalisation der Na,K-ATPase in der Plasmamembran mit den Bindungsstellen für ATP und Ouabain.

In der Augenlinse wurde die Na,K-ATPase von Bonting et al. (1963) erstmalig nachgewiesen und charakterisiert. Kinsey und Reddy (1965) haben danach gefunden, daß in der Linse die Enzymaktivität hauptsächlich in dem Epithel vorkommt. Daraufhin haben sie für den Transport der monovalenten Ionen in der Linse ein Pump-leak-Modell postuliert, nach dem am hinteren Linsenpol die Ionen passiv und am vorderen Linsenpol durch die Na,K-ATPase aktiv durch

die Membran transportiert werden. Die Na,K-ATPase der Linsenepithelzellen wird deshalb als verantwortlich für eine intakte Ionenhomöostase der ganzen Linse gesehen.

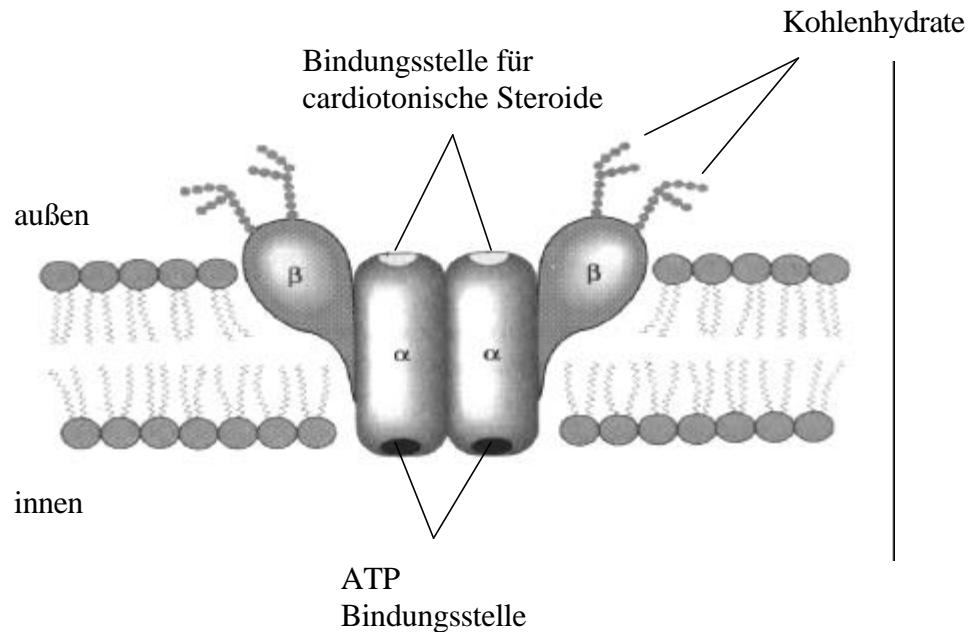


Abb. 2 Die Na,K-ATPase mit jeweils 2 α - und β -Untereinheiten und ihre Orientierung in der Plasmamembran (nach Voet und Voet, 1992).

Bei Hemmung der Na,K-ATPase ist die Natriumkonzentration der Linse erhöht und Kaliumkonzentration erniedrigt, wie es in Kataraktlinsen häufig gefunden wurde. In früheren Arbeiten der Arbeitsgruppe wurde die Na,K-ATPase in primärkultivierten und subkultivierten Linsenepithelzellen der Rinderaugen nachgewiesen und charakterisiert (Alexander und Henze, 1975).

1.3 Fettsäuren als ein möglicher kataraktogener Risikofaktor

Fettsäuren kommen als physiologische Bestandteile von Membranen in humanen und tierischen Zellen vor. Als die wichtigsten Energieträger des Körpers werden Fettsäuren hauptsächlich in veresterter Form als Triglyzeride im Fettgewebe gespeichert. Bei der Mobilisation werden sie durch Hydrolyse der Triglyzeride freigesetzt. Im Blutplasma werden sie zum größten Teil an

Albumin gebunden zu anderen Geweben transportiert und dort den Zellen zur Verfügung gestellt. Bei der β -Oxidation der Fettsäuren im Cytosol wird ATP gebildet, welches wiederum den Energielieferanten für alle Stoffwechselfvorgänge der Zelle darstellt. Als Vorstufe für die Synthese von Prostaglandinen gehören die essentiellen ungesättigten Fettsäuren wie Linolsäure zu Nahrungsbestandteilen, die dem Organismus unbedingt zugeführt werden müssen. Fettsäuren sind somit bei vielen Vorgängen des Lebens unentbehrlich.

Andererseits sind zytotoxische Wirkungen von freien Fettsäuren, insbesondere von den ungesättigten, bekannt. Als freie Fettsäuren werden diejenigen bezeichnet, die nicht verestert und nicht an Protein gebunden im Blutplasma bzw. im Gewebe vorkommen. Unter physiologischen Bedingungen machen diese nur einen sehr geringen Anteil an der gesamten Fettsäurenkonzentration aus. Es gibt zahlreiche Befunde über wachstumshemmende und zytotoxische Effekte von freien ungesättigten Fettsäuren gegenüber verschiedenen humanen Zelltypen wie leukämischen Jurkat-Zellen (Chow et al., 1989), Fibroblasten (Hori et al., 1990), Endothelzellen (Ramasamy et al., 1991), Zervixkarzinomzellen (Sagar et al., 1992) und Gliazellen (Staub et al., 1994). In vivo wird Schädigungseffekten von ungesättigten Fettsäuren eine Rolle bei der Entstehung von Arteriosklerose (Hennig et al., 1990; Toborek et al., 1997) zugeschrieben.

In vorausgegangenen Arbeiten der Arbeitsgruppe wurden an Serumalbumin gebundenen Faktoren gefunden, die kultivierte Epithelzellen von Rinderlinsen schädigen und die als ungesättigte Fettsäuren identifiziert werden konnten. Die stärkste zytotoxische Wirkung zeigte Linolsäure, die sich schon im μ molaren Konzentrationsbereich als wirksam erwies (Gläßer et al., 1996). Linolsäure wirkt sowohl gegenüber primärkultivierten als auch subkultivierten Epithelzellen von Rinderlinsen. Sie bewirkt eine Hemmung des Zellwachstums, eine Zellretraktion bis hin zur Abrundung der Zelle und zum Verlust des Zell-Substratum-Kontakts, und schließlich eine Kernpyknose als Zeichen des Zelltodes. Ein sehr frühes Zeichen der Zellschädigung unter Linolsäureeinwirkung stellt die Bildung von zahlreichen Ausstülpungen der Plasmamembran dar, die in der Literatur als blebs bezeichnet werden. Weitere

Befunde sprechen für direkte Membranschädigungen der Linsenepithelzellen durch Anhäufungen von Linolsäure kurz nach der Zugabe (Gruner, 1997).

In der Literatur wurde bereits mehrfach über Einflüsse von freien, ungesättigten Fettsäuren auf verschiedene Membraneigenschaften berichtet, wie der Membranpermeabilität (Lamers et al., 1984; Philipson und Ward, 1985), der Aktivität von membrangebundenen Enzymen wie der Na,K-ATPase (Lamers et al., 1984; Swarts et al., 1990), der Ca⁺⁺-ATPase (Davis et al., 1987) und anderen Transportsystemen (Philipson und Ward, 1985).

1.4 Zielstellung der Arbeit

Die Zielstellung für diese Arbeit ergibt sich aus der Vermutung, daß freie ungesättigte Fettsäuren über eine Hemmung der Na,K-ATPase als kataraktogene Risikofaktoren wirken könnten. Diese Vermutung wurde durch Befunde unterstützt, nach denen bei Erkrankungen, die mit einem gehäuften Auftreten von Katarakten korreliert sind, wie die essentielle arterielle Hypertonie (Filipovsky et al., 1996) und die chronische Niereninsuffizienz (Cheng et al., 1984) im Blutplasma der Patienten erhöhte Konzentration von Inhibitoren der Na,K-ATPase gefunden wurde, die als Ölsäure und Linolsäure identifiziert werden konnten (Kelly et al., 1986). Daher sollte untersucht werden, ob die zytotoxischen Effekte von Linolsäure gegenüber Linsenepithelzellen auf eine Beeinflussung der Aktivität und Transportfunktion der Na,K-ATPase der Plasmamembran zurückzuführen sind. Ferner sollten die Wirkungen von Linolsäure auf den passiven Transport von Natriumionen durch die Plasmamembran miterfaßt werden. Im Rahmen der Erfassung von Membranschädigungseffekten durch Linolsäure wurde schließlich der Einfluß von Linolsäure auf eine Ecto-ATPase überprüft, die in der Arbeitsgruppe erstmalig an Epithelzellen von Rinderlinsen nachgewiesen und charakterisiert worden ist (Bergner, 1984).

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1 Verwendete Medien und Lösungen

2.1.1 MEM-Medien

In Tabelle 1 sind die auf MEM-Basis (Minimum Essential Medium Eagle) verwendeten Medien aufgeführt. Für die Sub- und Vorkultivierung von Linsenepithelzellen (LEZ) wurde Vollmedium verwendet, das mit 10 % foetalem Kälberserum (FKS) genügend Wachstumsfaktoren und Nährstoffe für das Zellwachstum bieten kann. Die Mangelmedien wurden als Testmedien für den Neutralrot-Test verwendet.

Tab. 1 Zusammensetzung der verwendeten MEM-Medien

Mangelmedium 1	Mangelmedium 2	Vollmedium
ohne FKS	2 % FKS	10 % FKS
MEM		
L-Glutamin 2 mmol/l		
Streptomycin 0,1 g/l		
Penicillin 100 000 U/l		

2.1.2 HBS (Hepes Buffered Salt Solution)

Als Medium für den Zellablösetest, bei den Untersuchungen zur Aktivität der Ecto-ATPase und bei den Untersuchungen zu intrazellulären Natriumkonzentration wurde HBS verwendet. HBS ist eine einfache Salzlösung mit einer nahezu physiologischen Ionenzusammensetzung (Tab. 2), die mit Hepes auf pH 7,4 eingestellt ist. Mit EDTA können die Anteile der freien Ionen von Magnesium und Calcium in der Lösung konstant gehalten werden. Mit Glucose als Energiequelle werden LEZ über einige Tage im HBS vital erhalten

(Gläßer et al., 1984). Zur Untersuchung von Ionentransport durch die Plasmamembran wurde K^+ -freies HBS verwendet.

Tab. 2 Zusammensetzung des HBS-Mediums

Substanz	Konzentration
Hepes	5,0 mmol/l
NaCl	141,0 mmol/l
KCl	5,0 mmol/l
CaCl ₂	1,2 mmol/l
MgCl ₂	1,0 mmol/l
EDTA	0,2 mmol/l
Glucose	0,1 %
Penicillin	200 000 U/l

2.1.3 Bei der Subkultivierung verwendete Lösungen

Bei der Zellkultur wurde eine modifizierte calciumfreie Hanks-Lösung (Hanks' Balanced Salt Solution) zur Spülung des Zellbelages benötigt. Der Zellbelag wurde dann mit einer EDTA-haltigen 0,25 %-igen Trypsinlösung vom Substratum abgelöst.

2.2 Effektoren

2.2.1 Verwendete Effektoren

Als Effektoren wurden verschiedene Fettsäuren (Tab. 3) und der spezifische Inhibitor der Na,K-ATPase, Ouabain, eingesetzt.

Tab. 3: Die verwendeten Fettsäuren

Systematischer Name	Symbol (Zahl der C-Atome: Zahl der Doppelbindungen)	Trivialname
Dodecansäure	12:0	Laurinsäure
Tetradecansäure	14:0	Myristinsäure
Hexadecansäure	16:0	Palmitinsäure
Octadecansäure	18:0	Stearinsäure
cis-9-Hexadecensäure	16:1, cis	Palmitoleinsäure
cis-9-Octadecensäure	18:1, cis	Ölsäure
trans-9-Octadecensäure	18:1, trans	Elaidinsäure
cis-9- Octadecensäureethylester	18:1, cis, Ester	Ethyloleat
cis-9,cis-12-Octadecadiensäure	18:2, cis	Linolsäure
trans-9,trans-12- Octadecadiensäure	18:2 , trans	Linolelaidinsäure
cis-9,cis-12-Octadecadiensäureethylester	18:2, cis, Ester	Ethyllinoleat
9,12,15-Octadecatriensäure*	18:3, cis	α -Linolensäure
9,12,15-Octadecatriensäureethylester*	18:3, cis, Ester	α -Ethyllinolenat
5,8,11,14-Eicosatetraensäure*	20:4, cis	Arachidonsäure
5,8,11,14-Eicosatetraensäureethylester*	20:4, cis, Ester	Ethylarachidonat

· Alle Doppelbindungen in der C-Atomkette sind cis-konfiguriert.

2.2.2 Herstellung fettsäurehaltiger Lösungen

Fettsäuren wurden in Aceton bzw. in Ethanol zu Stammlösungen aufgelöst und in der Tiefkühltruhe bei - 20°C bis zu 4 Wochen aufbewahrt. Kurz vor dem Gebrauch wurden Stammlösungen mit Aceton bzw. Ethanol zu Zwischenlösungen verdünnt, die mit Medien dann zu gewünschten Effektorkonzentrationen weiter verdünnt wurden. Mit diesem Schritt konnten die Konzentrationen von Aceton und Ethanol in fertigen Testlösungen bei 0,5 %

konstant gehalten werden. Durch Vorversuche konnte gezeigt werden, daß bei dieser Konzentration Aceton und Ethanol nicht zu Zellschädigungen führen.

2.3 Zellkultivierung

2.3.1 Primärkultur

Native LEZ wurden auf ihrer natürlichen Unterlage, der Linsenkapsel, kultiviert. Für die Herstellung der Epithel-Kapsel-Präparate (EKP) wurden Rinderaugen verwendet, die auf dem Schlachthof sofort nach der Tötung der Tiere entnommen wurden. Die Präparation erfolgte bei 37°C unter sterilen Bedingungen nach der Methode von Gläser et al. (1972). Nach dem Eintauchen des Augenbulbus in 70%-igen Ethanol wurden die Cornea und Iris entfernt. Mit einer Schere wurde die Linsenkapsel dicht am Äquator ringförmig eingeschnitten und das EKP mit der Epithelschicht nach obenweisend auf ein Deckglas übertragen. Das Präparat wurde mit Glasstückchen am Rande fixiert und in einem Petrischälchen aus Glas (Durchmesser 40 mm) mit 2 ml Vollmedium für eine Stunde bei 37°C vorkultiviert (Abb. 3). Die Präparation war innerhalb 4 Stunden nach der Tötung der Tiere abgeschlossen.

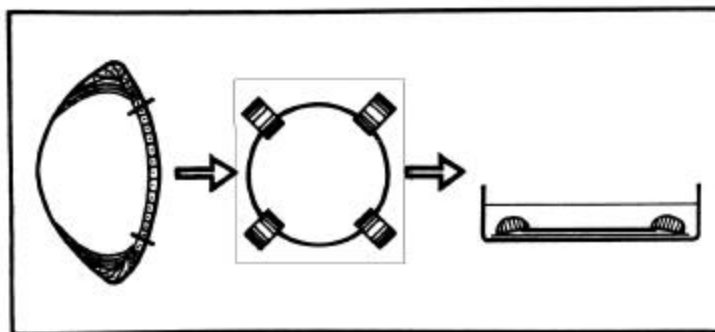


Abb. 3: Herstellung des EKP (aus Bergner, 1984). Nach dem Einschneiden am Äquator wurde die vordere Linsenkapsel zusammen mit der haftenden Epithelschicht auf ein Deckgläschen übertragen, und in einem Petrischälchen in 2 ml Vollmedium kultiviert. Mit den Glasstückchen wurde das Einrollen des EKP verhindert.

2.3.2 Subkultur

Die Subkultivierung der LEZ wurde in Vollmedium nach der Methode von Iwig und Gläßer (1975) durchgeführt. Die Zellen wurden jeweils nach 3-4 Tagen Subkultivierung für die Versuchsansätze eingesät (für das Wachstumsverhalten von LEZ im Vollmedium siehe Abb. 4 und Abb. 5). Dazu wurde der Zellbelag 2 mal mit je 5 ml Hanks-Lösung gespült und anschließend mit 3 ml EDTA-Trypsinlösung 1 Minute behandelt. Danach wurde die Trypsinlösung abgegossen und die Kulturflasche 5 Minuten bei 37°C aufgehoben. Die Zellen lösen sich unter Trypsinwirkung vom Flaschenboden ab und wurden nachfolgend in 20 ml Vollmedium aufgenommen. Nach der Zellzahlbestimmung mit der Zählkammer wurde die Zelldichte der Zellsuspension auf 50 000 Zellen/ml eingestellt, anschließend wurden die Zellen in die Versuchsansätze eingesät und 24 Stunden vorkultiviert.

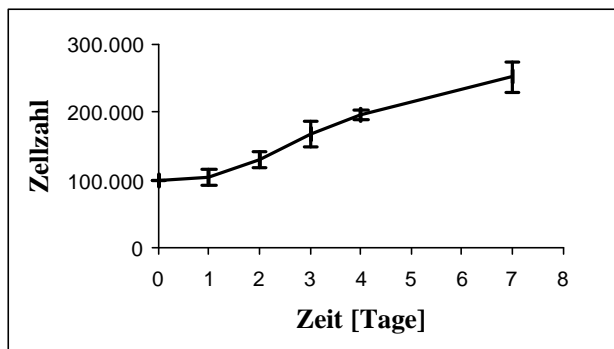


Abb. 4: Wachstumskurve der subkultivierten LEZ (bei 37°C, 1 % CO₂, Kulturmedium mit 10 % FKS). Am Tag nach der Einsaat ist die Zellzahl kaum verändert, danach ist ein lineares Zellwachstum zu beobachten, nach 4 Tagen Kultivierung hat sich die Zellzahl etwa verdoppelt.

Die Vorkultur erfolgte wie die Subkultur im Vollmedium bei 37°C im CO₂-Inkubator mit 1% CO₂. Alle Kultivierungsarbeiten wurden unter der Laminarbox (Heraeus) durchgeführt.

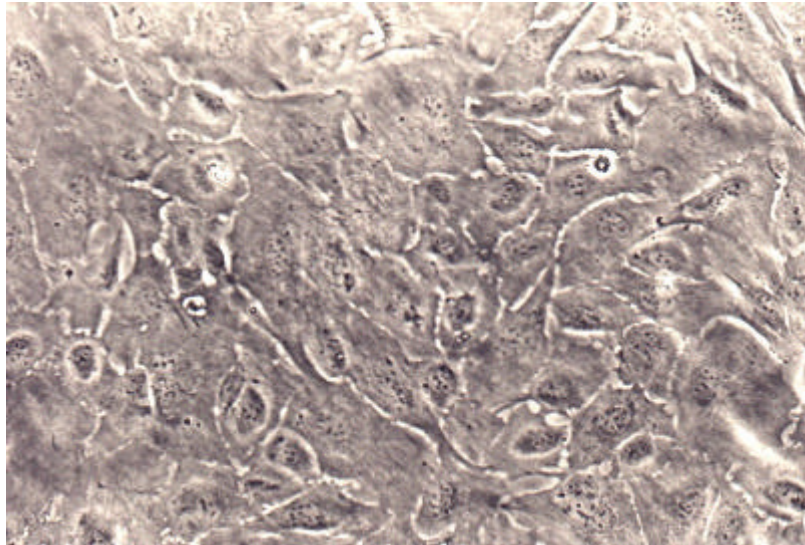


Abb. 5: LEZ am Phasenkontrastmikroskop abgebildet (150 x). Zustand nach 24 Stunden Kultivierung im Vollmedium bei 37°C, Einsaat 100 000 Zellen in 2 ml Medium in eine Gewebekulturschale aus Plaste, Durchmesser 3,5 cm.

2.4 Zytotoxizitätsteste

2.4.1 Zellablösungstest

Das Prinzip des Tests beruht darauf, daß geschädigte Zellen den Kontakt zum Substratum verlieren und durch Absaugen entfernt werden können. Die Bestimmung des Zellverlusts nach der Inkubation in effektorhaltigen Lösungen ermöglicht somit eine Aussage über die Zytotoxizität des untersuchten Effektors.

Zur Durchführung wurden jeweils 2 ml Zellsuspension mit 50 000 Zellen/ml in die Versuchsansätze (Gewebekulturschalen aus Plaste, Durchmesser 3,5 cm) eingesät und zunächst 24 Stunden in Vollmedium vorkultiviert. Nach der Vorkultur wurden die Ansätze 2 mal mit je 2 ml HBS gespült und dann 5 Stunden in einem Rotationsinkubator (G 24 Environmental Incubator Shaker) bei 37°C in 2 ml HBS mit 10 µmol/l des jeweiligen Effektors inkubiert. Dabei wurden die Ansätze mit 50 Umdrehungen pro Minute bewegt, wobei

geschädigte Zellen abgelöst werden. Nach der Inkubation wurde das Medium abgesaugt, wobei die geschädigten, abgelösten Zellen mitentfernt wurden. Anschließend wurde der Zellbelag trypsiniert und die Zellzahl bestimmt. Als Kontrollen dienten mit effektorfreiem HBS behandelte Ansätze.

2.4.2 Neutralrot-Test

Prinzip

Neutralrot ist ein Vitalfarbstoff, der durch die Plasmamembran diffundieren kann und in Lysosomen von vitalen Zellen gespeichert wird. Die aufgenommene Farbstoffmenge einer Zellpopulation ist somit der Zahl der vitalen Zellen proportional und kann photometrisch bestimmt werden (Shekhan, 1995). Der Zellverlust wird hier über die Abnahme der Extinktion gegenüber der Kontrolle erfaßt.

Reagenzien

- Testlösungen: Als Medien wurden HBS, Mangelmedium 1 bzw. 2 verwendet. Aus Stammlösungen wurden Verdünnungsreihen mit Effektorkonzentrationen im μ molaren Bereich hergestellt, die bei der Inkubation den Zellen zugegeben wurden.
- Neutralrot-haltige Medien: Am Tag vor dem Gebrauch wurde die Neutralrot-Stammlösung von PromoCell (5 mg/ml) mit Medium 1:100 verdünnt und auf 37°C aufgewärmt. Kurz vor dem Gebrauch wurde die Lösung 20 Minuten bei 20 000 g in der Biofuge 28 RS zentrifugiert um ungelöste Partikel zu entfernen.
- Wasch/Fixier-Lösung: Formaldehyd 0,5%, CaCl_2 1%
- Auflösungspuffer: Ethanol 50%, Essigsäure 1%

Ausführung

Das von PromoCell für Keratinozyten angegebene Verfahren wurde modifiziert angewendet (Sebastiao, 1996).

- Vorkultur: In jede Vertiefung einer 96-er Gewebekulturplatte wurde 250 μ l Zellsuspension mit 50 000 Zellen/ml eingesät und 24 Stunden vorkultiviert.
- Inkubation: Nach der Vorkultivierung wurden die Zellproben 2 mal mit je 250 μ l Medium gespült und dann 24 Stunden bei 37°C in 250 μ l

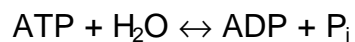
effektorhaltigem Medium inkubiert. Die Kontrolle wurde mit effektorfreiem Medium analog behandelt.

- Behandlung mit dem Farbstoff: Das effektorhaltige Medium wurde abgesaugt und die Zellen wurden 3 Stunden bei 37°C in 250 µl Neutralrot-haltigem Medium inkubiert (Meßproben). Als Leerwert dienten Zellproben, die mit der gleichen Effektorkonzentration wie die Meßproben behandelt wurden, aber anschließend mit Neutralrot-freiem Medium weiterkultiviert wurden.

- Aufarbeitung: Nachdem das farbstoffhaltige (bei den Meßproben) bzw. das farbstofffreie Medium (bei den Leerwerten) abgesaugt wurde, erfolgte eine einminütige Waschprozedur mit je 250 µl Wasch/Fixier-Lösung. Anschließend wurden die Zellen 20 Minuten in 250 µl Auflösungspuffer bei leichtem Schütteln aufgelöst und die gewonnenen rötlichen Lösungen bei 540 nm gegen den Leerwert gemessen.

2.5 Bestimmung des anorganischen Phosphats

Die Aktivität der ATPasen wurden durch photometrische Bestimmung des bei der ATP-Hydrolyse freigesetzten anorganischen Phosphats (P_i) erfaßt:



Zur P_i -Bestimmung wurde die Methode von Hess und Derr (1975) angewandt.

Herstellung des Farbreagenz

-Reagenz 1: 0,045%-ige Malachitgrünlösung in Aqua tridest.

-Reagenz 2: 4,2%-ige Ammoniummolybdatlösung in 4 N HCl

Die Reagenzien 1 und 2 wurden im Verhältnis 3:1 gemischt und 30 Minuten gerührt, danach wurden ungelöste Partikel durch Filtrieren mit hartem Filterpapier aus der Lösung entfernt. Zu je 5 ml Filtrat wurde 100 µl 2%-ige Triton-X100-Lösung gegeben. Das hergestellte Farbreagenz ist bei 4°C etwa 1 Woche haltbar.

Durchführung

Das anorganische Phosphat wurde in HBS (bei Versuchen zur Bestimmung der Ecto-ATPase-Aktivität) bzw. in Tris/HCl-Puffer in Anwesenheit von 1%-iger Trichloressigsäure (bei Untersuchungen zur Aktivität der Na,K-ATPase) bestimmt. Für die Kalibrierung diente KH_2PO_4 -Lösung in Konzentrationen bis

0,1 mmol/l als Standard. Für die Farbreaktion wurden 20 µl Standard, Probe oder Leerwert mit 200 µl Farbreagenz vermischt. Darauf entwickelte sich eine sofortige intensive Grünfärbung der Proben. Die Extinktion wurde bei 635 nm am Photometer gemessen.

In Anwesenheit vom Farbreagenz wurde eine Spontanhydrolyse von ATP beobachtet. Diese ATP-Spontanhydrolyse ist sehr gering, nimmt aber mit der Inkubationszeit zu (Abb. 6) und kann bei der Bestimmung von geringen P_i -Konzentrationen die Meßergebnisse beeinflussen. Aus diesem Grund ist es wichtig, die Messungen möglichst kurz nach der Zugabe vom Farbreagenz durchzuführen, vorausgesetzt, daß die Farbentwicklung schon weitgehend abgeschlossen ist. Um einen optimalen Meßzeitpunkt festzusetzen, wurde die Farbentwicklung nach der Zugabe vom Farbreagenz über 10 Minuten verfolgt (Abb. 7). Im Ergebnis der in Abb. 6 und Abb. 7 dargestellten Befunde wurde die Messung der Extinktion jeweils genau 3 Minuten nach Zugabe des Farbreagenz vorgenommen. Dieser Zeitpunkt stellt einen Kompromiß zwischen Spontanhydrolyse von ATP und einer optimalen Entwicklung der Farbintensität dar. Nach 3 Minuten ist die Entwicklung der Farbintensität bereits weitgehend abgeschlossen. Die geringe Säure-bedingte ATP-Hydrolyse beträgt innerhalb von 3 Minuten nur 0,37 % bei einer ATP-Konzentration von 0,5 mmol/l und wird durch Messung gegen einen entsprechenden Leerwert eliminiert.

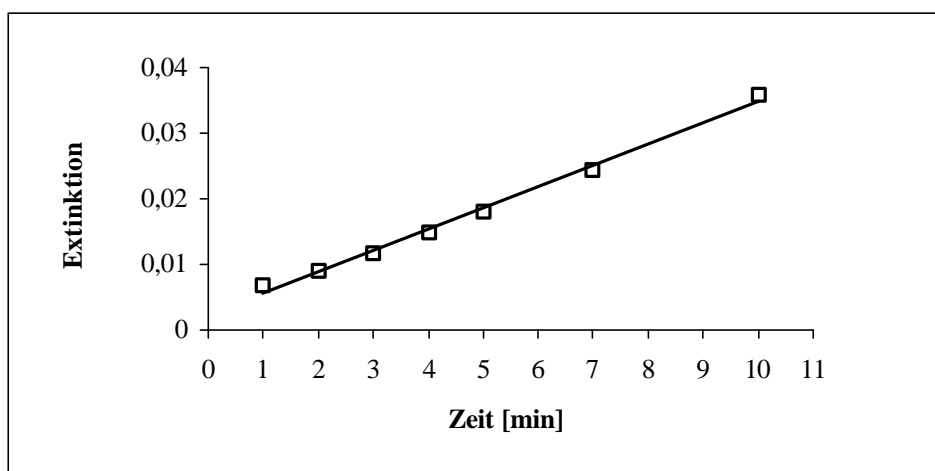


Abb. 6: ATP-Spontanhydrolyse in Anwesenheit vom Farbreagenz bei 0,5 mmol/l ATP im Ansatz.

Kupferreagenz vermischt und sofort geschüttelt. Nach 20 Minuten wurde 200 µl Folinreagenz unter kräftigem Schütteln zugegeben und die Reaktionsgefäße wurden für eine Stunde ins Dunkle gestellt. Dann wurden die Proben noch einmal gründlich geschüttelt und für eine weitere Stunde im Dunkeln aufbewahrt. Die Extinktion wurde danach bei 730 nm gemessen.

2.7 Aktivitätsbestimmung der Ecto-ATPase an Epithelkapselpräparaten

Zur Untersuchung der Ecto-ATPase-Aktivität wurden die Epithelkapselpräparate (EKP) nach der Präinkubation in Vollmedium 2 mal mit je 3 ml HBS gespült, damit alle bei der Präparation geschädigten Zellen aus der Zellkultur entfernt wurden. Der gesamte Versuch wurde im Brutraum bei 37°C durchgeführt.

Die Enzymreaktion erfolgte in 3 ml HBS mit 0,5 mmol/l ATP über 28 Minuten. Im Abstand von 7 Minuten wurde je 3 mal 20 µl Inkubationsmedium zur Erfassung der P_i -Freisetzung entnommen. Die entnommenen Proben wurden zur Vermeidung der Spontanhydrolyse von ATP bis zur Farbreaktion im Eisbad aufbewahrt. Der Volumenverlust durch die Probenentnahme wurde bei der Berechnung der P_i -Freisetzung berücksichtigt.

Zur Untersuchung des Einflusses von LS auf die Aktivität der Ecto-ATPase wurde die Enzymaktivität an denselben EKP nach 3 Stunden Inkubation in 3 ml HBS mit 10 µmol/l LS nachbestimmt. Der Unterschied der Enzymaktivität vor und nach der Inkubation in LS-haltigem Medium wurde dann mit dem der Kontrollproben verglichen, die in LS-freiem Medium inkubiert wurden.

2.8 Aktivitätsbestimmung der Na,K-ATPase

2.8.1 Gewinnung von Zellmaterial aus subkultivierten LEZ

Als Zellmaterial zur Untersuchung der Aktivität der Na,K-ATPase kamen Zellhomogenate und teilgereinigte Fraktionen der Plasmamembran aus subkultivierten LEZ zur Anwendung. Zur Herstellung des Zellhomogenats wurde eine Kulturflasche (250 ml) mit konfluentem Zellbelag 2 mal mit 10 ml

Anteil der Gesamtaktivität definiert, der Rest ist die Basisaktivität (siehe Abb. 15, Abschnitt 3.3.1).

In Tab. 4 wurde die Ansatzzusammensetzung bei der Aktivitätsbestimmung im Zellhomogenat dargestellt. Mit Ansatz 1 wurde die Gesamtaktivität und mit Ansatz 2 die Basisaktivität erfaßt, die Differenz entspricht der Na,K-ATPase-Aktivität. Die Ansätze wurden vor der ATP-Zugabe im Wasserbad bei 37°C 20 Minuten präinkubiert. Die Reaktion wurde durch ATP-Zugabe gestartet. Zur Bestimmung der P_i -Freisetzung wurde nach 30 Minuten 100 µl Probe entnommen und zu 50 µl 3%-iger eiskalter Trichloressigsäure als Vorlage pipettiert. Die Proben wurden bis zur P_i -Bestimmung unter Eiskühlung aufbewahrt. Für die P_i -Kalibrierung wurde der Standard wie die Proben behandelt. Die Bestimmung der Aktivität der Na,K-ATPase in gereinigten Membranfraktionen wurde unter gleichen Bedingungen durchgeführt, das Ansatzvolumen betrug aber 500 µl einschließlich 50 µl Membranmaterial. Der Einfluß von LS auf die Enzymaktivität wurde in Membranfraktionen untersucht, die Endkonzentration von Linolsäure im Ansatz betrug 10 bzw. 100 µmol/l.

Tab. 4: Zusammensetzung der Ansätze für die Bestimmung der Aktivität der Na,K-ATPase im Zellhomogenat (Ansatzvolumen 1 ml).

Substanzen	Ansatz 1	Ansatz 2
Zellhomogenat	200 µl pro ml Ansatz	
ATP	2 mmol/l	
Tris/HCl pH 7,0	50 mmol/l	
MgCl ₂	4 mmol/l	
Na ₂ EDTA	0,5 mmol/l	
NaCl	100 mmol/l	
KCl	20 mmol/l	
Ouabain	-	0,1 mmol/l

2.9 Methoden zur Untersuchung der intrazellulären Natriumkonzentration

2.9.1 Prinzip und Durchführung

Die intrazelluläre Natriumkonzentration wurde mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie untersucht. Das Prinzip der Methode beruht darauf, daß ionenspezifische Fluoreszenzfarbstoffe bei Anregung mit Licht bestimmter Wellenlängen Fluoreszenzlicht emittieren, dessen Intensität von der Konzentration des jeweiligen Ions abhängig ist. Ermittlung dieser emittierten Fluoreszenzintensitäten erlaubt somit einen Rückschluß auf die intrazelluläre Konzentration des selektiven Ions. Zur Natriumbestimmung wurde der Farbstoff SBFI (sodium-binding benzofuran isophthalate) verwendet, welcher in Form des Acetoxymethylesters (AM-Ester) den Zellen zugegeben wurde. In dieser Form kann der Farbstoff durch die Plasmamembran in die Zelle eindringen und wird erst im Zytoplasma durch die Wirkung unspezifischer Esterasen in die freie, fluoreszierende Form umgewandelt, die ihrerseits praktisch nicht mehr membranpermeabel ist.

Der Farbstoff wurde in wasserfreiem DMSO (Dimethylsulfoxid) zu einer Stammlösung von 1 mmol/l gelöst und in der Tiefkühltruhe bei -20°C aufbewahrt. Kurz vor Gebrauch wurde die Stammlösung zuerst mit einer 20%-igen Pluronic-Lösung (in DMSO) zum Volumenverhältnis 1:1 gemischt, dann mit HBS zu einer Beladungslösung mit SBFI-Konzentration von 10 µmol/l verdünnt. Mit Pluronic wird eine höhere Löslichkeit des Farbstoffs in wäßrigen Medien erreicht.

Zur fluoreszenzmikroskopischen Untersuchung wurden LEZ auf ein Deckgläschen (Durchmesser 42 mm, Dicke 0,17 mm) bei 37°C im Vollmedium (100 000 Zellen/4 ml) über 24 Stunden vorkultiviert. Danach erfolgte die Zellbeladung bei 37°C in 1 ml farbstoffhaltigem HBS über eine Stunde. Anschließend wurde die Zellprobe für weitere 30 Minuten in farbstofffreiem HBS inkubiert, damit die aufgenommene Farbstoffmenge weitgehend zur fluoreszierenden Form hydrolysiert und eine konstante Fluoreszenz erhalten wird. Zur Messung wurde das Deckgläschen in eine POC-Kammer (Perfusion open closed chamber) übertragen und dann in das Mikroskop eingesetzt.

Zur Anwendung kam ein Mikroskop Axiovert 100, mit einem Objektiv Achrostigmat 40 x oil. Als Lichtquelle diente eine Xenon-Kurzbogenlampe XBO 75 W. Die Aufzeichnung der mikroskopischen Bilder erfolgte mit einem Attofluor RatioVision System über eine ICCD-Kamera. Da bei diesem Gerätesystem keine temperierbare Inkubationseinrichtung zur Verfügung stand, wurden alle Bestimmungen bei Zimmertemperatur (20°C) durchgeführt. Der Farbstoff wurde im Wechsel bei 334 und 380 nm angeregt, die Fluoreszenzemission wurde bei 520 nm detektiert. Das Verhältnis der emittierten Fluoreszenzintensität bei Anregung mit 334 nm zu der bei Anregung mit 380 nm (F_{334}/F_{380}) dient als Maß für die intrazelluläre Na^+ -Konzentration ($[\text{Na}^+]_{\text{in}}$). In Abb. 8 ist das Anregungsspektrum von SBFI dargestellt. Danach nimmt bei ansteigender Na^+ -Konzentration die Fluoreszenz bei Anregung mit 334 nm stark zu, während sie bei Anregung mit 380 nm geringfügig abfällt. Daraus resultiert ein Anstieg des Wertes von F_{334}/F_{380} bei Erhöhung der Na^+ -Konzentration.

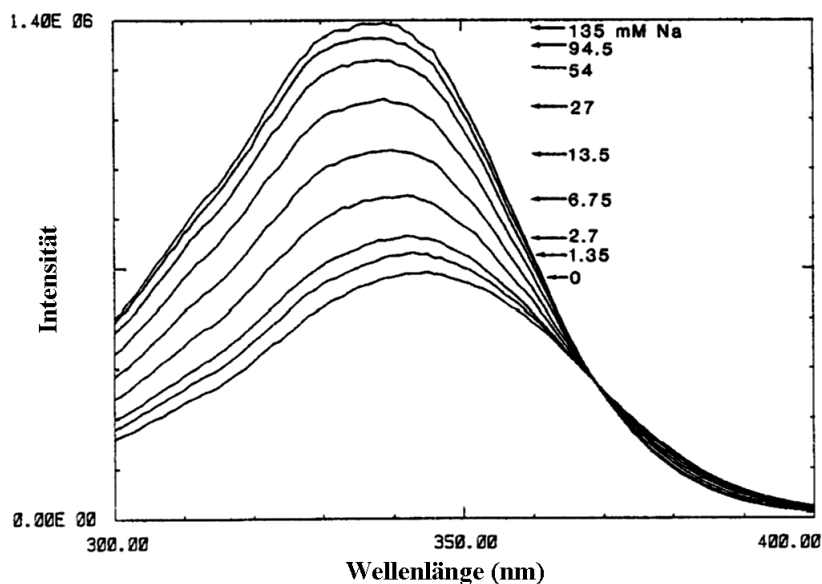


Abb. 8: Anregungsspektrum der SBFI-Fluoreszenz bei ansteigenden Na^+ -Konzentrationen (pH 7,05). Bandbreite der Anregung 1,85 nm; Emission bei 500 nm gemessen, mit 9,3 nm Bandbreite (von Minta und Tsiem, 1989).

2.9.2 SBFI-Kalibrierung

Um die $[Na^+]_{in}$ von intakten LEZ sowie ihre Änderungen unter Einfluß von Effektoren quantitativ erfassen zu können, wurde eine Kalibrierungskurve von SBFI erstellt. Dazu wurden Kalibrierungspuffer mit unterschiedlichen Na^+ -Konzentrationen verwendet, die die Ionophore Gramicidin D (10 $\mu\text{mol/l}$) und Amphotericin B (2,5 $\mu\text{mol/l}$) enthielten. Diese Ionophore haben die Eigenschaft, die Plasmamembran selektiv für monovalente Ionen durchgängig zu machen (Ring et al., 1980; Medoff, 1983). Folglich entspricht die zu messende $[Na^+]_{in}$ bei Anwesenheit von Ionophoren der bekannten Na^+ -Konzentration im Puffer (Harotunian et al., 1989). Zur Herstellung der Kalibrierungspuffer wurde eine Na^+ -freie, K^+ -hochkonzentrierte (Kaliumpuffer) und eine K^+ -freie, Na^+ -hochkonzentrierte Lösung (Natriumpuffer) verwendet (Negulescu und Machen, 1990). Tab. 5 gibt die Zusammensetzung dieser hochkonzentrierten Puffer wieder. Beide Puffer wurden mit N-Methyl-D-Glucamin (NMG), einer schwachen Base, auf pH 7,1 eingestellt. Durch Mischen der hochkonzentrierten Puffer in unterschiedlichen Verhältnissen wurden Kalibrierungspuffer mit Na^+ -Konzentration von 5 bis 160 mmol/l hergestellt, wobei die Summe der Na^+ - und K^+ -Konzentration in allen Puffern bei 160 mmol/l erhalten wird, damit die Ionenstärke konstant bleibt.

Tab. 5: Zusammensetzung der Natrium- und Kaliumpuffer. Die Puffer wurden mit NMG auf pH 7,1 eingestellt. Konzentrationsangabe in mmol/l .

Substanzen	Natriumpuffer	Kaliumpuffer
NaCl	30	-
KCl	-	30
Natriumgluconat	130	-
Kaliumgluconat	-	130
MgSO ₄	1	
CaCl ₂	1	
Hepes	10	

2.9.3 Untersuchungen zum Na⁺-Transport durch die Plasmamembran

Über die Na⁺-Messung können Änderungen der $[Na^+]_{in}$ unter Einfluß von Effektoren erfaßt werden; damit können aber keine direkten Aussagen über die Wirkung von Effektoren auf den Na⁺-Transport durch die Plasmamembran erhalten werden. Die $[Na^+]_{in}$ wird durch den passiven Na⁺-Influx und den durch die Na,K-ATPase bewirkten aktiven Na⁺-Efflux bestimmt, die sich in intakten Zellen im Gleichgewicht befinden. Jede Änderung der $[Na^+]_{in}$ kann deshalb die Folge einer Änderung des Na⁺-Influx und/ oder des Na⁺-Efflux sein. Um Änderungen der $[Na^+]_{in}$ unter der Wirkung von Effektoren den einzelnen Transportvorgängen zuordnen zu können, wurde der Einfluß von Effektoren auf die $[Na^+]_{in}$ bei Blockierung der Na,K-ATPase untersucht. Unter dieser Bedingung ist der aktive Na⁺-Transport aufgehoben und die $[Na^+]_{in}$ wird allein durch den passiven Transport bestimmt (Negulescu und Machen, 1990). Daher sind bei blockierter Na,K-ATPase Änderungen der $[Na^+]_{in}$ als Folge der Wirkung von Effektoren auf den passiven Transport zu sehen. Die Funktion der Na,K-ATPase kann sowohl durch K⁺-Entzug aus dem Medium als auch durch Zusatz des spezifischen Inhibitors Ouabain ausgeschaltet werden (Negulescu und Machen, 1990). In dieser Arbeit wurde K⁺-freies HBS bzw. HBS (K⁺-haltig) mit 1 mmol/l Ouabainzusatz verwendet.

3. ERGEBNISSE

3.1 Die Zytotoxizitätsteste

3.1.1 Zellablösungstest

Bei diesem Test wurden jeweils 100 000 Zellen in einer Gewebekulturschale 24 Stunden vorkultiviert, dann mit 10 $\mu\text{mol/l}$ Fettsäure in HBS über 5 Stunden inkubiert. Als Kriterium zur Beurteilung der Zytotoxizität von Fettsäuren wurde der Zellverlust während der Inkubation verwendet. Abb. 9 stellt die Zahl der noch an der Unterlage haftenden Zellen der jeweiligen Probe nach der Inkubation mit verschiedenen gesättigten und ungesättigten cis-konfigurierten freien Fettsäuren dar.

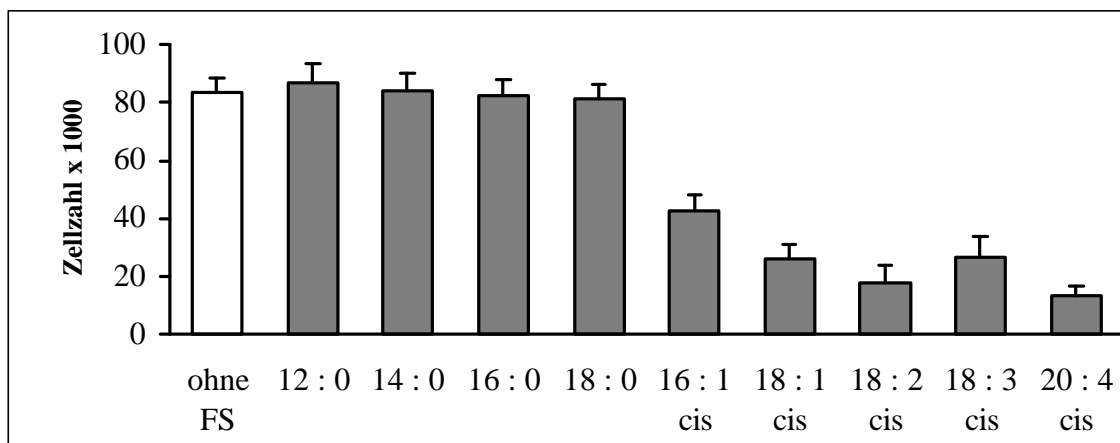


Abb. 9: Zellablösungstest: Der Zellverlust nach 5 Stunden Inkubation mit 10 $\mu\text{mol/l}$ Fettsäure in HBS als Maß für die zytotoxische Wirkung von Fettsäuren. Im Vergleich zu den gesättigten Fettsäuren verursachten die untersuchten ungesättigten einen starken Zellverlust nach der Inkubation. (Einsaat 100 000 Zellen in 2 ml Medium, 24 Stunden vorkultiviert).

Aus Abb. 9 ist ersichtlich, daß nach der Inkubation über 5 Stunden in HBS ohne Zusatz von Fettsäuren ein geringer Zellverlust auftrat. Der Zellverlust nach der Inkubation mit den gesättigten Fettsäuren (Laurinsäure 12 : 0, Myristinsäure 14 : 0, Palmitinsäure 16 : 0 und Stearinsäure 18 : 0) lag im Bereich dieses Kontrollwertes. Im Gegensatz dazu verursachten die

untersuchten ungesättigten Fettsäuren einen starken zusätzlichen Zellverlust, der bei Arachidonsäure (20 : 4 cis) 84,1 % und bei LS (18 : 2 cis) 78,5 % betrug, bezogen auf den Kontrollwert. Die Ergebnisse zeigen, daß die gesättigten Fettsäuren nicht zytotoxisch auf LEZ wirken, während die ungesättigten cis-konfigurierten freien Fettsäuren in einem serumfreien Mangelmedium schon bei 10 µmol/l einen starken zytotoxischen Effekt auf LEZ aufweisen. Von den untersuchten ungesättigten Fettsäuren hat Arachidonsäure die stärkste Zytotoxizität, gefolgt von Linolsäure, Ölsäure (18 : 1 cis), Linolensäure (18 : 3 cis) und Palmitoleinsäure (16 : 1 cis).

In Abb. 10 wurden die zytotoxischen Wirkungen von ungesättigten Fettsäuren mit cis- und trans-Konfiguration bzw. veresterten Fettsäuren mit gleicher Kettenlänge und gleicher Anzahl von Doppelbindungen miteinander verglichen. Es geht hervor, daß nur ungesättigte Fettsäuren, die eine cis-Konfiguration und eine freie Carboxylgruppe haben, zytotoxisch auf LEZ wirken. Die trans-konfigurierten und die veresterten ungesättigten Fettsäuren haben keinen zytotoxischen Effekt.

Im Ablösungstest erweisen sich damit langkettige, freie, ungesättigte cis-konfigurierte Fettsäuren als zytotoxisch, wobei sich die folgende Reihenfolge ergibt: Arachidonsäure>Linolsäure>Ölsäure>Linolensäure> Palmitoleinsäure.

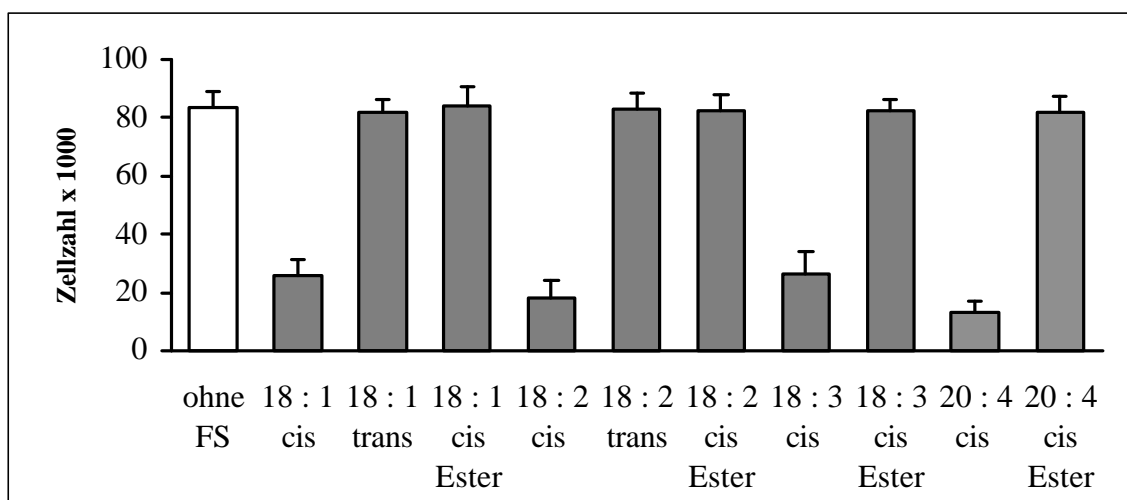
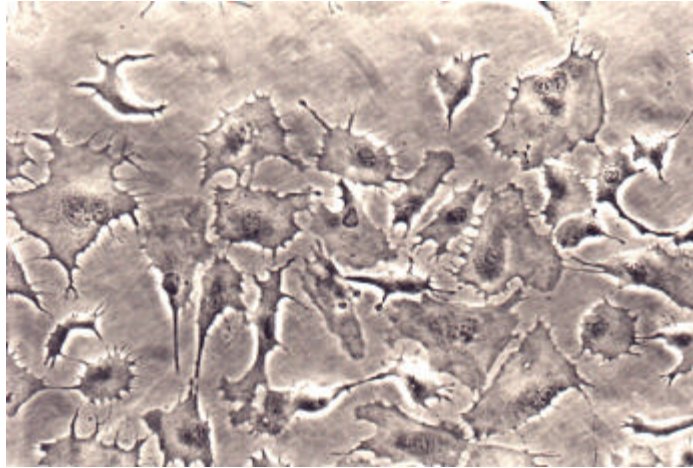


Abb. 10: Zellablösungstest mit verschiedenen ungesättigten Fettsäuren, jeweils cis- oder trans-konfiguriert bzw. verestert. Nur die cis-konfigurierten freien Fettsäuren verursachten einen signifikanten Zellverlust nach der Inkubation. Versuchsbedingungen analog Abb. 9.

Die Fettsäure-bedingten Zellschädigungen gehen mit charakteristischen morphologischen Veränderungen der LEZ einher, die mit einer blebs-Bildung beginnen. Das Sichtbarwerden von Zellkernen im Nativpräparat (Abb. 11 A und B) ist ein sicheres Zeichen für massive Zellschädigung bzw. bereits erfolgten Zelltod (Gläser et al., 1984).

A



B

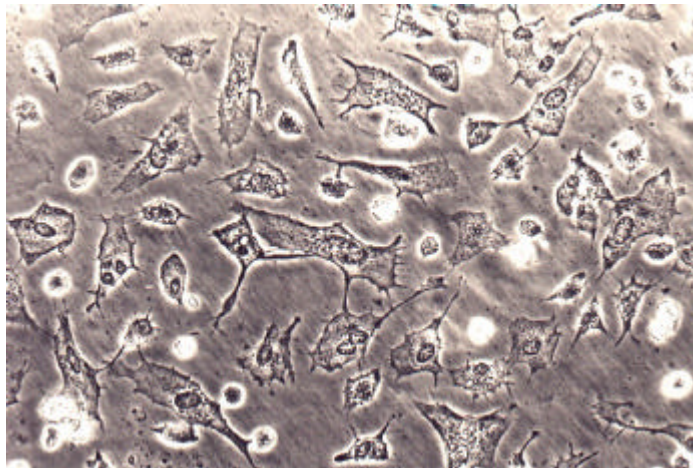


Abb. 11: LEZ bei der Inkubation mit 25 $\mu\text{mol/l}$ LS in HBS. Nativpräparat, Phasenkontrastmikroskop (150 x). **A:** Bereits nach einer Stunde sind als Zeichen der Zellschädigung hervortretene Zellkerne und Zellretraktion festzustellen. **B:** Nach 24 Stunden verkleinern sich die Zellen deutlich, zahlreiche sind abgerundet und bleiben nicht mehr auf dem Substratum haftend.

3.1.2 Neutralrot-Test

Beim Neutralrot-Test wurden LEZ nach der Inkubation mit Fettsäuren 3 Stunden mit Neutralrot behandelt. Die Zytotoxizität wurde über photometrische Bestimmung der aufgenommenen Farbstoffmenge gegenüber der Kontrolle (100 %) ermittelt. Als Maß für die zytotoxische Wirkung von Effektoren wurde der NR_{50} -Wert verwendet. Dieser Wert wird als diejenige Effekorkonzentration definiert, bei der die Farbstoffaufnahme der Probe um 50 % gegenüber der Kontrolle abnimmt (Abb. 12).

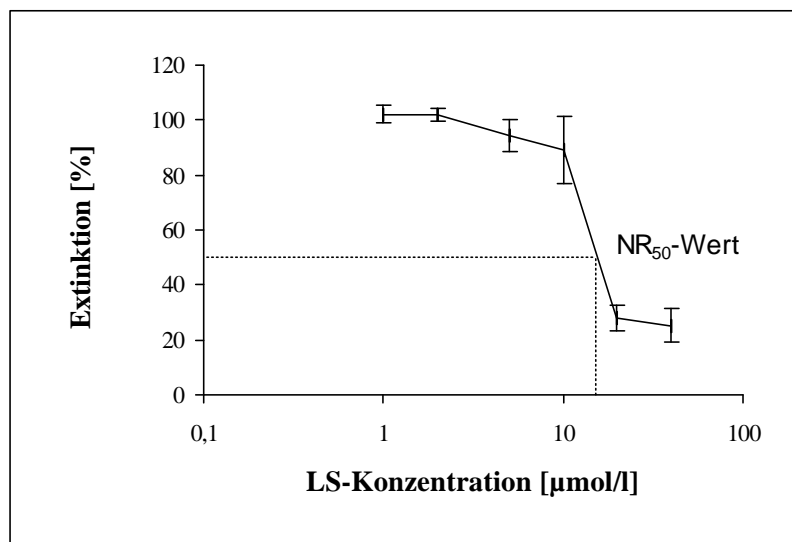


Abb. 12: Bestimmung des NR_{50} -Werts von LS. Nach 24 Stunden Inkubation mit LS (in MEM-Mangelmedium 1) wurden die Zellproben 3 Stunden unter Zusatz von 50 µg/ml Neutralrot inkubiert, danach wurde die Extinktion ermittelt. Für LS ergibt sich ein NR_{50} -Wert von 15,6 µmol/l. Angegeben sind Mittelwerte und Standardabweichungen bei $n=3$.

Über die Bestimmung des NR_{50} -wertes erlaubt der Neutralrot-Test eine genauere Aussage über die zytotoxische Wirkung von untersuchten Substanzen im Vergleich zum Zellablösungstest. Tab. 6 gibt eine Zusammenfassung der NR_{50} -Werte von untersuchten Effektoren in verschiedenen Medien. Auch hier erwiesen sich nur ungesättigte Fettsäuren als zytotoxisch für LEZ. Arachidonsäure verursachte schon mit 7,4 µmol/l eine

Abnahme der Extinktion um 50 %, LS mit 15,6 $\mu\text{mol/l}$. Auch Ölsäure und Linolensäure wirken stark zytotoxisch, mit NR_{50} -Werten von 24,1 und 25,3 $\mu\text{mol/l}$. Es ist zu betonen, daß bei diesem Test auch die trans-konfigurierte Linolelaidinsäure einen zytotoxischen Effekt zeigte, der mit dem NR_{50} -Wert von 75,9 $\mu\text{mol/l}$ jedoch viel schwächer ist als der von LS. Der Neutralrot-Test erwies sich somit als empfindlicher als der Ablösungstest. Die gesättigten Fettsäuren Myristinsäure und Stearinsäure bewirkten bis 160 $\mu\text{mol/l}$ keine Abnahme der Farbstoffaufnahme, zeigten also keinen zytotoxischen Effekt.

Zur Untersuchung des Einflusses des verwendeten Mediums auf die Zytotoxizität wurde der NR_{50} -Wert von LS und SDS in HBS, in MEM-Mangelmedium 1 (ohne FKS) und Mangelmedium 2 (mit 2 % FKS) ermittelt. Die deutliche Verminderung der LS-Zytotoxizität bei Zusatz von FKS ist sehr wahrscheinlich auf die Anwesenheit von Albumin zurückzuführen. Im Gegensatz dazu wird die Zytotoxizität von SDS durch Serumzugabe kaum vermindert.

Untersuchungen zur Zytotoxizität von Aceton und Ethanol zeigen, daß diese Lösungsmittel bei Konzentration von 0,5 % keine Zellschädigung verursachen.

Tab. 6: Die NR_{50} -Werte der untersuchten Substanzen (Angaben für Fettsäuren in $\mu\text{mol/l}$) ($m \pm s$, $n=2$ bzw. 3, mit je 3 Parallelansätzen).

Effektoren	Mangelmedium	Mangelmedium	HBS
SDS	12,3 \pm 1,89 ($\mu\text{g/ml}$)	17,1 \pm 1,15 ($\mu\text{g/ml}$)	7,5 \pm 1,39 ($\mu\text{g/ml}$)
Linolsäure	15,6 \pm 0,34	57,7 \pm 2,7	11,6 \pm 2,88
Linolensäure	25,3 \pm 2,9		
Ölsäure	24,1 \pm 1,65		
Arachidonsäure	7,4 \pm 0,59		
Linolelaidinsäure	75,9 \pm 3,5		
Stearinsäure	> 160		
Myristinsäure	> 160		

3.2 Untersuchung der Ecto-ATPase-Aktivität

3.2.1 Bestimmung der Aktivität der Ecto-ATPase am EKP

Für die genaue Erfassung der Ecto-ATPase-Aktivität der LEZ muß eine mögliche Phosphatfreisetzung aus anderen Quellen ausgeschlossen werden. Als mögliche Quellen kommen eine ATP-Hydrolyse durch die Linsenkapsel, eine ATP-Spontanhydrolyse unter den Versuchsbedingungen bei 37°C und eine P_i -Abgabe aus den Epithelzellen des EKP in Frage. In früheren Arbeiten wurde nachgewiesen, daß die Linsenkapsel keine ATPase-Aktivität aufweist (Bergner, 1984). Eine Spontanhydrolyse von ATP während der Inkubation bei 37°C konnte in Vorversuchen ausgeschlossen werden. In weiteren Vorversuchen wurde gezeigt, daß aus den EKP auch ohne ATP-Zugabe anorganisches Phosphat ins Medium abgegeben wird, die Menge ist aber im Vergleich zur P_i -Freisetzung bei der ATP-Hydrolyse durch die Ecto-ATPase gering (weniger als 5 % der Ecto-ATPase-Aktivität).

In Abb. 13 wurde die P_i -Freisetzung bei der ATP-Hydrolyse durch die Ecto-ATPase im Verlauf von 28 Minuten dargestellt. In dieser Zeit zeigte die Umsatzkurve einen linearen Verlauf, das bedeutet, daß unter den Inkubationsbedingungen bei 37°C weder eine Enzyminaktivierung noch eine Produkt-hemmung der Ecto-ATPase durch das freigesetzte Phosphat erfolgt. Am Ende der Inkubationszeit wurde eine P_i -Konzentration von 0,096 mmol/l im Ansatz gemessen, das entspricht 19,2 % ATP-Hydrolyse bei 0,5 mmol/l ATP im Ansatz. Diese P_i -Konzentration liegt noch im linearen Bereich der Kalibrierungskurve und konnte genau erfaßt werden.

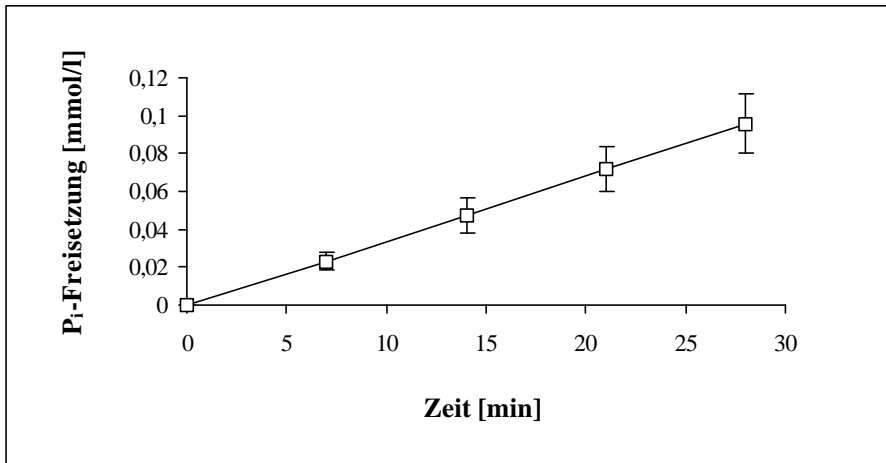


Abb. 13: Zeit-Umsatz-Kurve der Ecto-ATPase am EKP. Ansatz mit 0,5 mmol/l ATP in HBS, bei 37°C (n=7).

3.2.2 Untersuchungen zum Einfluß von LS auf die Ecto-ATPase-Aktivität

Die Ecto-ATPase ist ein Bestandteil der Plasmamembran, wird also bei der Inkubation dem Einfluß von Fettsäuren direkt ausgesetzt. Im Rahmen der Untersuchung über die Schädigungseffekte von Fettsäuren auf LEZ, insbesondere Schädigungen der Plasmamembran, wurde die Ecto-ATPase auf ihre Aktivität unter Einwirkung von LS untersucht. Dazu wurde zuerst die Enzymaktivität ohne LS bestimmt, danach erfolgte die Inkubation mit 10 µmol/l LS über 3 Stunden, anschließend wurde die Aktivität nachbestimmt. Abb. 14 faßt die Ergebnisse zusammen. Nach der Inkubation der EKP in HBS mit 10 µmol/l LS ist die Aktivität der Ecto-ATPase um 11,4 % vermindert. Aber auch bei Kontroll-EKP, die in linolsäurefreiem HBS unter gleichen Bedingungen inkubiert wurden, wurde eine Erniedrigung der Enzymaktivität um 11 % registriert. Diese Verminderung der Enzymaktivität kann sowohl durch die um 3 Stunden verlängerte Inkubation der Präparate als auch durch einen Zellverlust bei den häufigen notwendigen Spülprozessen bedingt sein. Daraus geht hervor, daß LS bei 10 µmol/l unter den Versuchsbedingungen keinen Einfluß auf die Ecto-ATPase-Aktivität hat. Höhere Konzentrationen konnten wegen der Gefahr einer starken Beeinträchtigung der Plasmamembran-permeabilität nicht eingesetzt werden, denn eine intakte, für Substrat und

Endprodukte nicht durchlässige Plasmamembran ist Voraussetzung für eine richtige Erfassung der Ecto-ATPase-Aktivität.

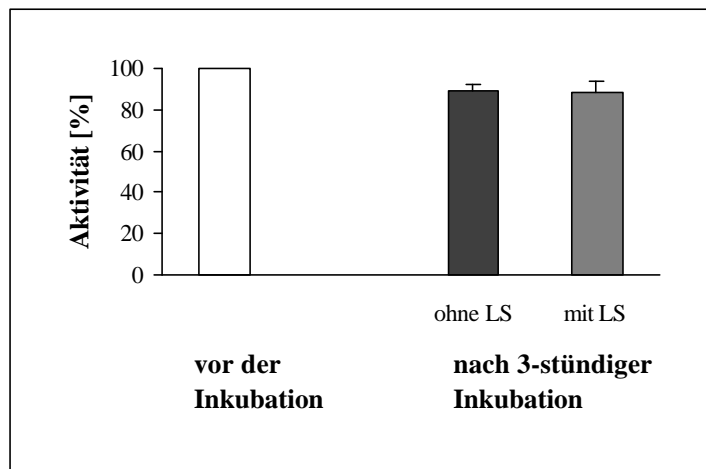


Abb. 14: Ecto-ATPase-Aktivität nach 3 Stunden Inkubation von EKP in HBS ohne und mit 10 $\mu\text{mol/l}$ Linolsäure. Es wurde kein signifikanter Unterschied nachgewiesen. Ansatz mit 0,5mmol/l ATP, Aktivität nach 28 Minuten Inkubation bei 37°C bestimmt ($n=3$).

3.3 Untersuchungen über die Aktivität der Na,K-ATPase

3.3.1 Bestimmung der Na,K-ATPase-Aktivität im Zellmaterial

Na,K-ATPase-Aktivität wurde in Zellhomogenaten und in teilgereinigten Fraktionen der Plasmamembran nachgewiesen. Abb. 15 stellt die Aktivität der Na,K-ATPase im Zellhomogenat aus subkultivierten LEZ als denjenigen Anteil an der Gesamtaktivität der erfaßten ATPasen dar, der durch Ouabain gehemmt wird. Die Basisaktivität umfaßt die Aktivität aller anderen, nicht durch Ouabain hemmbaren ATPasen.

Im Zellhomogenat von LEZ betrug der Anteil der Na,K-ATPase 18,5 % an der Gesamtaktivität, mit einer spezifischen Aktivität von 3,2 nmol P_i /min/mg Protein. Die hohe P_i -Freisetzung durch andere ATPasen (Basisaktivität) ist für die Erfassung der Na,K-ATPase-Aktivität sowie deren möglicherweise geringen Änderungen unter Einfluß von LS ungünstig. Aus diesem Grunde wurden aus Zellhomogenaten Fraktionen der Plasmamembran, in der die Na,K-ATPase

lokalisiert ist, durch Differentialzentrifugation isoliert. In diesem Material wurden die Gesamtaktivität und die Aktivität der Na,K-ATPase über 60 Minuten erfaßt, wobei bis 45 Minuten ein lineares Verhältnis zwischen P_i -Freisetzung und Inkubationszeit besteht (Abb. 16). Das bedeutet, daß innerhalb 45 Minuten keine Enzyminaktivierung aufgetreten ist. Durch weitere Untersuchungen konnte der Anteil der Na,K-ATPase-Aktivität mit 42,1 % an der Gesamtaktivität in den isolierten Plasmamembranfraktionen festgestellt werden. Die spezifische Aktivität des Enzyms betrug $9,7 \pm 2,0$ nmol P_i /min/mg Protein ($n=4$).

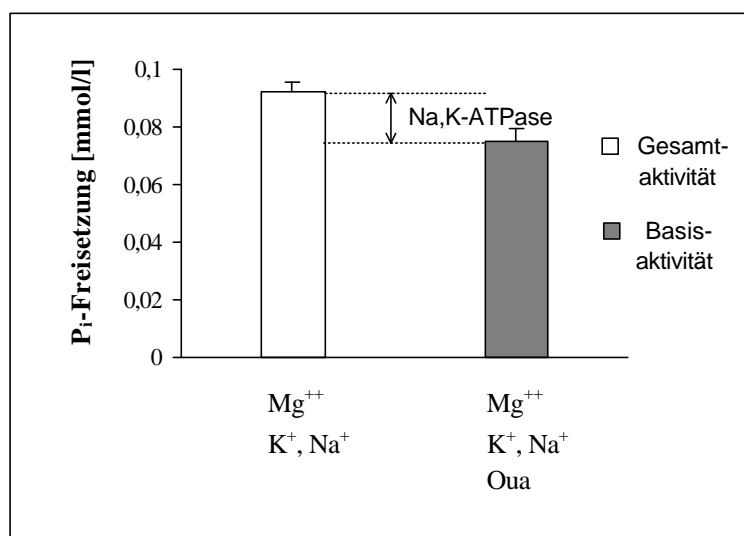


Abb. 15: Aktivität der Na,K-ATPase im Zellhomogenat

Die P_i -Freisetzung wurde nach 30 Minuten Inkubation bei 37°C in einem 50 mmolaren Tris/HCl-Puffer (pH 7,0) mit 2 mmol/l ATP bestimmt. Mg⁺⁺ 4, K⁺ 20, Na⁺ 100, Ouabain 0,1 mmol/l. Angegeben sind Mittelwerte und Standardabweichungen ($n=3$).

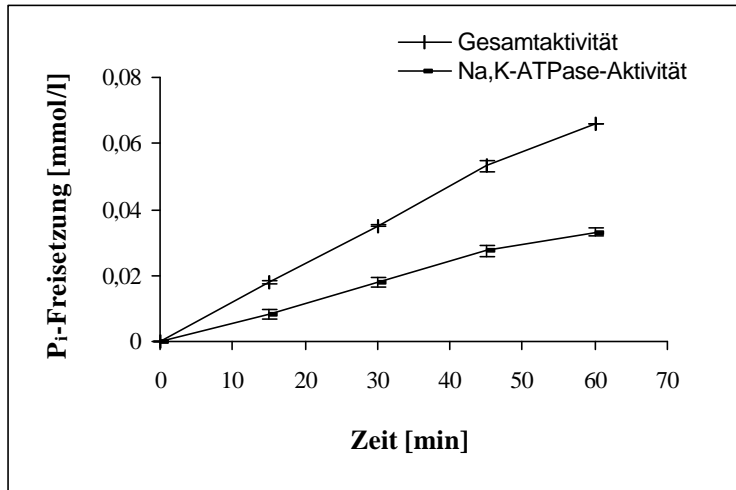


Abb. 16: Zeit-Umsatz-Kurve der Na,K-ATPase und der Gesamtaktivität der erfaßten ATPasen in den isolierten Plasmamembranfraktionen. Versuchsbedingungen: siehe Abb. 15. Angegeben sind Mittelwerte und Standardabweichungen aus zwei Parallelbestimmungen.

3.3.2 Einfluß von Linolsäure auf die Aktivität der Na,K-ATPase

Die Gesamtaktivität, Basisaktivität und Aktivität der Na,K-ATPase in den isolierten Fraktionen der Plasmamembran wurden in Ansätzen ohne oder mit Zusatz von 10 bzw. 100 $\mu\text{mol/l}$ LS bestimmt. Abb. 17 faßt die Ergebnisse der Untersuchungen zusammen.

Daraus geht hervor, daß unter Zusatz von 10 $\mu\text{mol/l}$ LS sowohl die Gesamtaktivität als auch die Aktivität der Na,K-ATPase erhöht wird, während die Basisaktivität kaum verändert ist. Die Aktivierung der Gesamtaktivität ist damit weitgehend auf die Aktivierung der Na,K-ATPase zurückzuführen. Aus Ergebnissen der einzelnen Versuche (Tab. 7) wird eine Aktivierung der Gesamtaktivität um 15,6 % und der Na,K-ATPase-Aktivität um 40,7 % berechnet. Im Gegensatz dazu wurde bei Anwesenheit von 100 $\mu\text{mol/l}$ LS im Ansatz eine starke Hemmung der Gesamtaktivität, der Basisaktivität und der Na,K-ATPase-Aktivität nachgewiesen (Abb. 17 und Tab. 7). Bezogen auf die Kontrolle betrug die Hemmung der Gesamtaktivität 40 % und die der Basisaktivität 32,8 %. Die Aktivität der Na,K-ATPase wurde durch 100 $\mu\text{mol/l}$ LS um 51,7 % gehemmt.

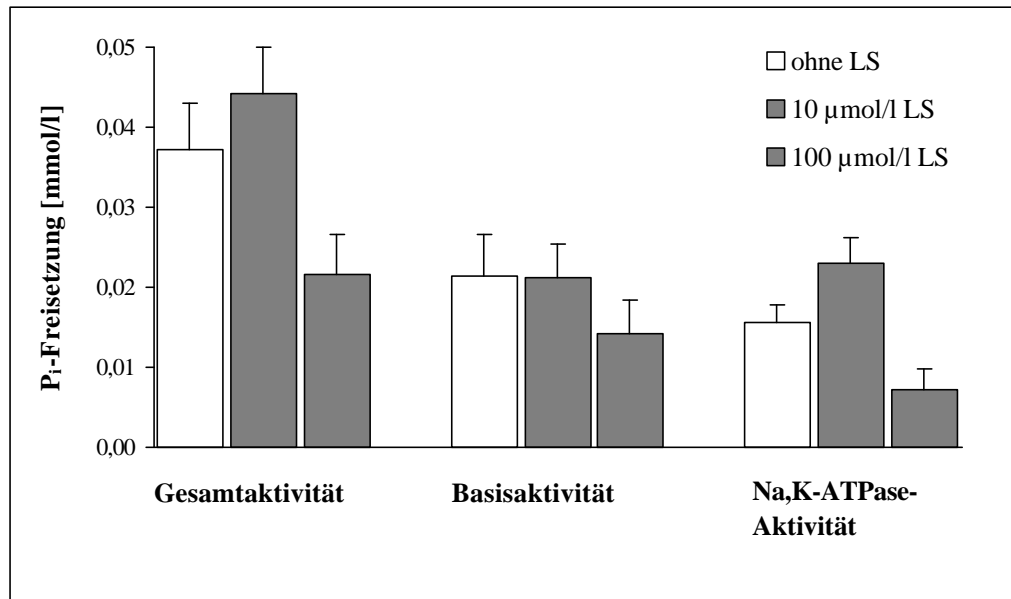


Abb. 17: Aktivität der ATPasen unter Einfluß von LS. Die P_i -Freisetzung wurde nach 30 Minuten Inkubation bei 37°C bestimmt. Versuchsbedingungen: siehe Abb. 15. Angegeben sind Mittelwerte und Standardabweichungen aus Ergebnissen von 4 bis 8 Versuchen.

Tab. 7: Einfluß von LS auf die Aktivität der ATPasen in teilgereinigten Plasmamembranfraktionen. Die Enzymaktivitäten in einzelnen Versuchen bzw. deren Mittelwerte sind in Prozent der jeweiligen Kontrolle (ohne LS) angegeben. Bei jedem Versuch wurden 2 bis 3 Parallelbestimmungen durchgeführt.

Versuchsnummer	10 µmol/l LS			100 µmol/l LS		
	Gesamtaktivität	Basisaktivität	Na,K-ATPase-Aktivität	Gesamtaktivität	Basisaktivität	Na,K-ATPase-Aktivität
1	125,7	94	162,8	57,7	75,5	27,7
2	105,7	102,3	108,7	66,4	77,8	50
3	114,2	89,2	159,9	58,4	54,6	65,1
4	116,7	107,1	131,2	55,4	60,9	50,3
m	115,6	98,1	140,7	60	67,2	48,3
s	7,15	6,97	22,2	4,14	9,73	13,35

Die dargestellten Ergebnisse führen zum Schluß, daß LS in vitro nicht nur die Aktivität der Na,K-ATPase, sondern auch die von anderen, durch Mg^{++} aktivierbaren ATPasen beeinflussen kann. Die von 10 $\mu\text{mol/l}$ LS hervorgerufene Aktivierung der Gesamtaktivität ist allein durch die Aktivierung der Na,K-ATPase erklärbar, während die Hemmung der Gesamtaktivität bei 100 $\mu\text{mol/l}$ LS aus einer Hemmung der Basisaktivität und einer Hemmung der Na,K-ATPase zusammengesetzt ist. Besonders deutlich sind jedoch die Einflüsse auf die Aktivität der Na,K-ATPase, die ihrerseits von der LS-Konzentration abhängig sind. Während unter Zusatz von 10 $\mu\text{mol/l}$ LS die Na,K-ATPase-Aktivität um 40,7 % aktiviert ist, wird bei 100 $\mu\text{mol/l}$ LS eine Aktivitätshemmung um 51,7 % nachgewiesen.

3.4 Untersuchungen zum Einfluß von freien Fettsäuren auf die intrazelluläre Natriumkonzentration

3.4.1 Erfassung der SBFI-Fluoreszenz in intakten LEZ

Um einen zuverlässigen Ausgangswert für die Untersuchungen über die intrazelluläre Natriumkonzentration zu erhalten, wurde zuerst im HBS bei intakten LEZ das Verhältnis F 334/F 380 über 35 Minuten registriert (Abb. 18). Die Emissionsintensitäten werden am Anfang des Versuchs (ca. 30 Minuten nach der Zellbeladung mit Farbstoff) bereits voll erreicht und bleiben über einen längeren Versuchszeitraum relativ konstant (Einzeldaten nicht gezeigt). Dies spricht nicht nur für eine vollständige Hydrolyse des AM-Esters des Farbstoffes im Zytoplasma (Abschnitt 2.9.1), sondern schließt auch ein starkes Ausblenden der Fluoreszenz z.B. durch Abbau des Farbstoffs während des Versuchs aus. Daraus ergibt sich für das Intensitätsverhältnis F 334/F 380 eine genügend konstante Basislinie, die am Beginn eines jeden Versuchs vor der Zugabe eines Effektors ermittelt und mit dem Wert 1,0 angegeben wird (Abb. 19). Der Ausgangswert von 1,0 repräsentiert die intrazelluläre Natriumkonzentration unter angenähert physiologischen extrazellulären Ionenkonzentrationen in HBS.

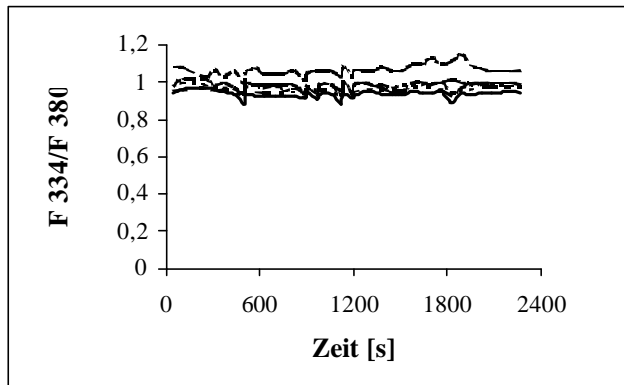


Abb. 18: F_{334}/F_{380} von SBFI, bestimmt in 5 einzelnen intakten LEZ in HBS. Die Zellen sind zuvor über eine Stunde in HBS mit $10 \mu\text{mol/l}$ SBFI beladen und vor Beginn der Messung noch 30 Minuten in farbstofffreiem HBS bei 37°C inkubiert worden.

3.4.2 SBFI-Kalibrierung

Zur intrazellulären SBFI-Kalibrierung wurde F_{334}/F_{380} in LEZ gemessen, die in Kalibrierungspuffern mit unterschiedlichen Na^+ -Konzentrationen inkubiert wurden. Durch Zusatz von Ionophoren zu den Puffern wird die Plasmamembran für Na^+ -Ionen durchgängig gemacht, sodaß die $[\text{Na}^+]_{\text{in}}$ praktisch der Na^+ -Konzentration des jeweiligen Puffers gleich ist. In Abb. 19 sind die gemessenen Werte des Kalibrierungsversuchs dargestellt. Der Ausgangswert, welcher in HBS (ohne Ionophorezusatz) ermittelt und als 1,0 definiert wird, entspricht der $[\text{Na}^+]_{\text{in}}$ bei nahezu physiologischen Ionenkonzentrationen im extrazellulären Raum. Beim Wechsel zu Kalibrierungspuffern mit ansteigender Na^+ -Konzentration, denen die Ionophore Gramicidin D ($10 \mu\text{mol/l}$) und Amphotericin B ($2,5 \mu\text{mol/l}$) zugesetzt wurden, nimmt F_{334}/F_{380} entsprechend zu. Die rasche Plateaubildung nach jedem Mediumwechsel spricht für einen wirksamen Ausgleich zwischen der intra- und der extrazellulären Na^+ -Konzentration durch die verwendeten Ionophore. Zum Versuchsende wurde der letzte Puffer ($\text{Na}^+ 160 \text{ mmol/l}$) durch HBS, ohne Zusatz von Ionophoren, ersetzt, wodurch in kurzer Zeit das Ausgangsniveau wieder erreicht wird. Dies bedeutet, daß die LEZ, sobald sie nicht mehr der

Wirkung der Ionophore unterliegen, ihre ursprüngliche $[Na^+]_{in}$ regenerieren können. Demnach ist die Wirkung der Ionophore Gramicidin D und Amphotericin B bei den verwendeten Konzentrationen völlig reversibel.

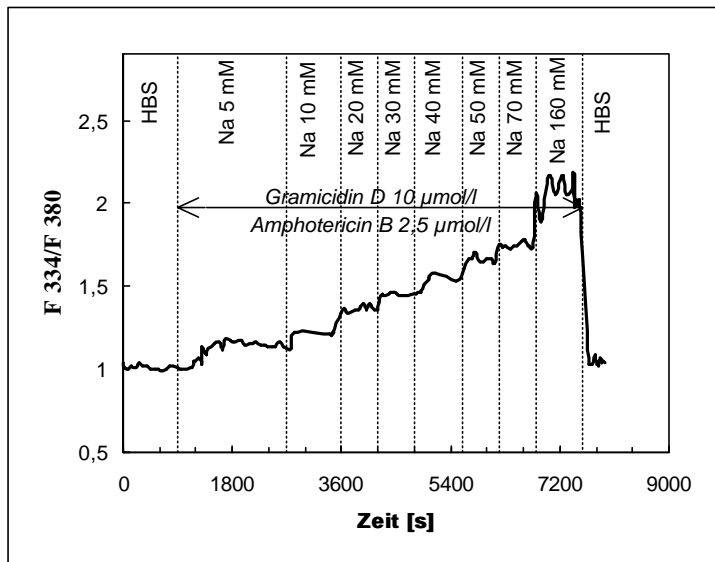


Abb. 19: SBFI-Kalibrierung mit Hilfe von Gramicidin D ($10 \mu\text{mol/l}$) und Amphotericin B ($2,5 \mu\text{mol/l}$). Angegeben sind Mittelwerte von Messungen in 10 einzelnen Zellen.

Die Kalibrierungskurve von SBFI wurde mit Hilfe von Meßwerten aus zwei Kalibrierungsversuchen erstellt (Abb. 20). Im untersuchten Konzentrationsbereich von 5 bis 160 mmol/l steigt F 334/F 380 von 1,16 auf 1,98. Im unteren Konzentrationsbereich ändert sich bei steigender Na^+ -Konzentration F 334/F 340 stärker, Bestimmungen sind in diesem Bereich deshalb auch empfindlicher als bei höheren Konzentrationen. Die gemessenen Änderungen von F 334/F 340 wurden in Abb. 21 mit Pseudofarben dargestellt. Mit ansteigender Na^+ -Konzentration von 5 bis 160 mmol/l verschieben sich die Farben von blau nach orangerot. Die in den Photos integrierte Farbskala erlaubt eine grobe Abschätzung des entsprechenden Werts von F 334/F 380.

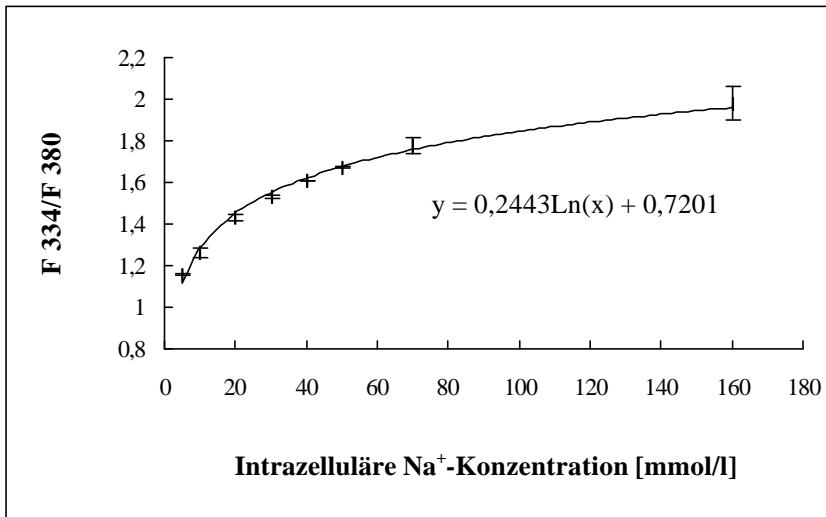


Abb. 20: SBFI-Kalibrierungskurve für $[Na^+]_{in}$ an LEZ in HBS unter Zusatz von $10 \mu\text{mol/l}$ Gramicidin D und $2,5 \mu\text{mol/l}$ Amphotericin B. Angegeben sind Mittelwerte und Standardabweichungen aus Ergebnissen von zwei Versuchen, jeweils in 10 einzelnen Zellen gemessen.

3.4.3 Bestimmung der basalen intrazellulären Natriumkonzentration in intakten LEZ

Mit Hilfe der Kalibrierungskurve kann $[Na^+]_{in}$ im Bereich von 5 bis 160 mmol/l bestimmt werden. Der Wert von F 334/F380 für LEZ, die in HBS kultiviert werden, befindet sich außerhalb des erstellten Kalibrierungsbereichs, unterhalb des Werts für 5 mmol/l Na^+ (siehe auch Abb. 19). Mit Hilfe der Formel, mit der die Kalibrierungskurve gefittet wird (Abb. 20), läßt sich die unter diesen Bedingungen gemessene $[Na^+]_{in}$ berechnen, sie beträgt 3,14 mmol/l.

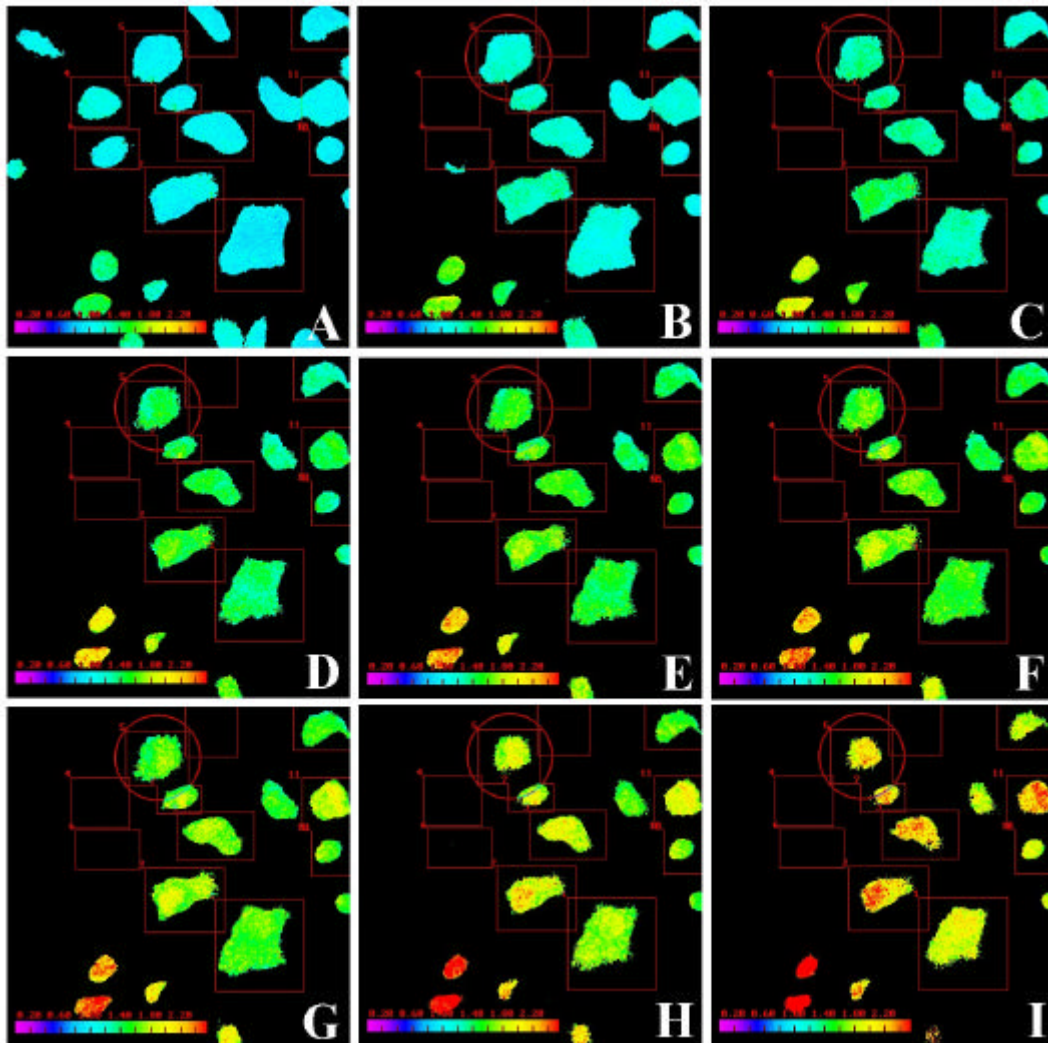


Abb. 21: Pseudofarbendarstellung von Änderungen des Verhältnisses F_{334}/F_{380} entsprechend der Natriumkonzentration. A: LEZ in HBS ohne Ionophore, B: LEZ in ionophorhaltigem Kalibrierungspuffer mit $[Na^+]=5$; C: 10; D: 20; E: 30; F: 40; G: 50; H:70; I: 160 mmol/l

3.4.4 Bestimmungen der $[Na^+]_{in}$ bei Blockierung der Na,K-ATPase

Zur Hemmung der Na,K-ATPase wurden zwei Methoden verwendet: der Einsatz von K^+ -freiem HBS und die Zugabe von Ouabain zu K^+ -haltigem HBS. Beim Mediumwechsel von HBS zu K^+ -freiem HBS konnte ein sofortiger Anstieg der $[Na^+]_{in}$ beobachtet werden (Abb. 22). Nach 30 Minuten steigt F 334/F 380 auf 1,27 an, das entspricht ca. 9,5 mmol/l $[Na^+]_{in}$. Im Vergleich zu dem ermittelten Ausgangswert von 3,14 mmol/l nimmt die $[Na^+]_{in}$ in K^+ -freiem HBS innerhalb 30 Minuten auf das Dreifache zu. Die Na,K-ATPase transportiert unter Verbrauch von ATP K^+ vom extrazellulären Raum in die Zelle und gleichzeitig Na^+ von innen nach außen, wodurch die $[Na^+]_{in}$ niedrig gehalten wird. In K^+ -freiem Medium wird die Funktion der Na,K-ATPase blockiert und damit auch der aktive Na^+ -Efflux, und die $[Na^+]_{in}$ wird allein vom passiven Na^+ -Influx bestimmt. Der in K^+ -freiem HBS gemessene Anstieg der $[Na^+]_{in}$ um 6,36 mmol/l in 30 Minuten stellt somit das Ausmaß des passiven Na^+ -Influx in LEZ dar, die Anstiegsrate beträgt 0,21 mmol/l Na^+ /min.

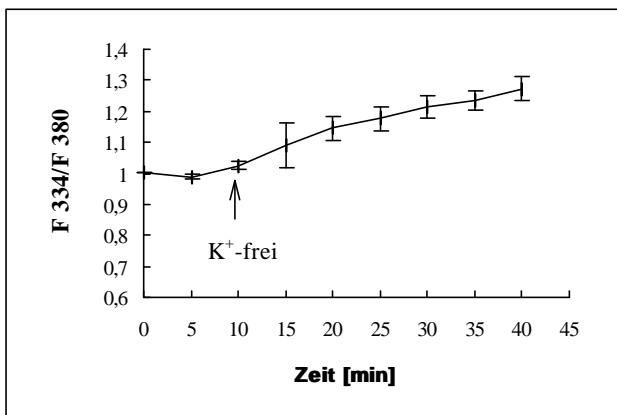


Abb. 22: Anstieg der $[Na^+]_{in}$ in LEZ beim Mediumwechsel von HBS zu K^+ -freiem HBS. Die dargestellten Werte sind Mittelwerte und Standardabweichungen von 10 Versuchen, jeweils an mindestens 5 Zellen gemessen.

Im Gegensatz dazu konnte innerhalb 35 Minuten nach der Ouabainzugabe zum Medium kein Anstieg der $[Na^+]_{in}$ beobachtet werden (Abb. 23), obwohl die

eingesetzte Konzentration von 1 mmol/l als eine wirksame Konzentration für die maximale Hemmung der Na,K-ATPase der Linse gilt (Sen und Pfeiffer, 1982). Eine Erklärung dafür kann die langsame Bindung von Ouabain zu Enzymproteinen sein, die bei Abwesenheit von ATP sowie von anorganischem Phosphat im Medium erst nach mehreren Stunden das Maximum erreicht (Schuurmans Stekhoven und Bonting, 1981), weshalb die Hemmwirkung von Ouabain auf die Na,K-ATPase nach 35 Minuten Einwirkung unzureichend ist. Hier sei auch zu erwähnen, daß die Versuche nur bei Raumtemperatur durchgeführt werden konnten. Weitere Untersuchungen, bei denen eine Blockierung der Na,K-ATPase erwünscht ist, wurden deshalb in K^+ -freiem HBS durchgeführt.

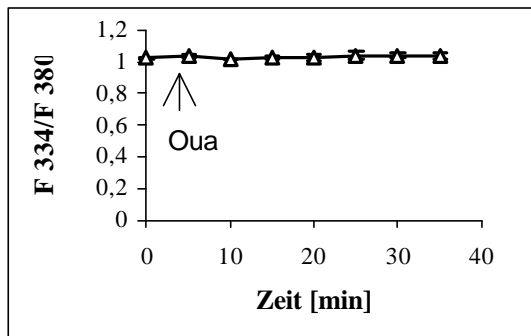


Abb. 23: Zugabe von 1 mmol/l Ouabain in HBS bewirkt keinen meßbaren Anstieg der $[Na^+]_{in}$ innerhalb von 35 Minuten. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen von 2 Versuchen, jeweils in 5 bzw. 8 Zellen gemessen.

3.4.5 Einfluß von LS auf die intrazelluläre Na^+ -Konzentration

Die intrazelluläre Na^+ -Konzentration wurde in HBS und in K^+ -freiem HBS unter Einwirkung von LS untersucht. Der in K^+ -freiem Medium beobachtete $[Na^+]_{in}$ -Anstieg wurde durch Zugabe von LS verstärkt (Abb. 24). Diese Wirkung von LS ist zeit- und konzentrationsabhängig, ist besonders deutlich bei 50 und 100 $\mu\text{mol/l}$ LS zu sehen, obwohl bei 25 $\mu\text{mol/l}$ die Tendenz auch schon zu erkennen ist. Mit 100 $\mu\text{mol/l}$ LS steigt F_{334}/F_{380} nach 15 Minuten auf 1,83 an, das entspricht einer Na^+ -Konzentration von ca. 94 mmol/l bzw. einem Na^+ -

Anstieg von 90,9 mmol/l bezogen auf den Ausgangswert. Dieser hohe Anstieg muß als Folge einer erhöhenden Wirkung von LS auf den Na^+ -Influx gesehen werden. Die Influxrate beträgt 6,06 mmol/l Na^+ /min. Im Vergleich zur vorher ermittelten Influxrate in K^+ -freiem HBS ohne LS von 0,21 mmol/l Na^+ /min bewirkten 100 $\mu\text{mol/l}$ LS einen etwa 29 fachen Anstieg.

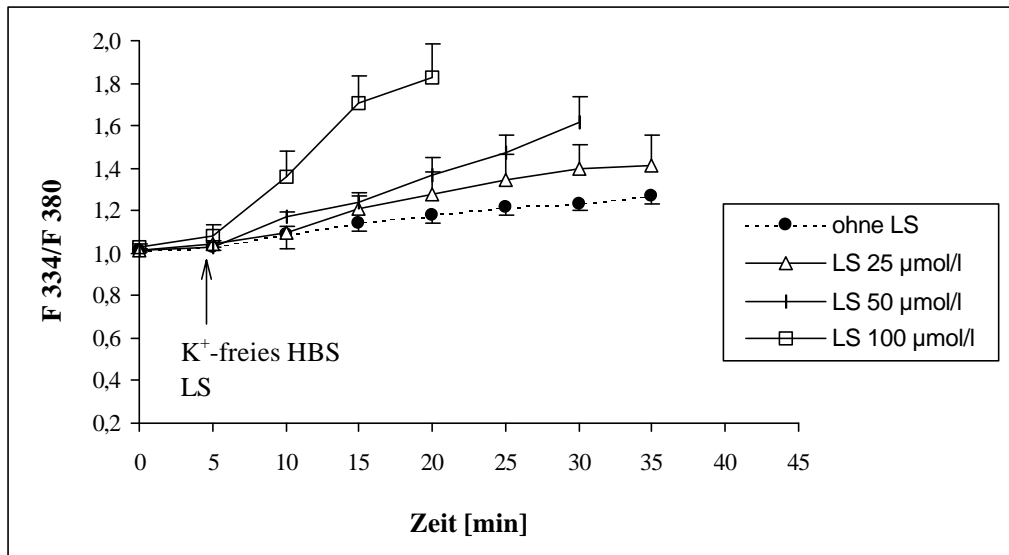


Abb. 24: LS verstärkt konzentrationsabhängig den $[\text{Na}^+]_{\text{in}}$ -Anstieg in K^+ -freiem HBS. Angegeben sind Mittelwerte und Standardabweichungen aus 3 Versuchen (mit LS), jeweils in mindestens 5 Zellen gemessen. Der Leerwert (ohne LS) wurde aus Abb. 23 entnommen.

Im Gegensatz dazu konnte in HBS nach Zugabe von 100 $\mu\text{mol/l}$ LS nur ein geringer Natriumanstieg nachgewiesen werden (Abb. 25). Nach 30 Minuten erhöht sich F 334/F 380 auf 1,12, das entspricht einem Anstieg der $[\text{Na}^+]_{\text{in}}$ von 3,14 auf 5,14 mmol/l. Daraus geht hervor, daß in HBS die erhöhende Wirkung von LS auf den Na^+ -Influx, die bei Untersuchungen in K^+ -freiem HBS nachgewiesen wurde, nahezu kompensiert wird. Diese Kompensation erfolgt offensichtlich durch einen Na^+ -Efflux über die Na,K-ATPase, die bei Anwesenheit von K^+ im Medium wieder voll in Funktion ist. Da ein um fast 30-fach erhöhter passiver Na^+ -Influx durch das Enzym weitgehend kompensiert werden kann, muß angenommen werden, daß die Funktion des Enzyms durch 100 $\mu\text{mol/l}$ LS nicht oder nicht wesentlich gehemmt wird.

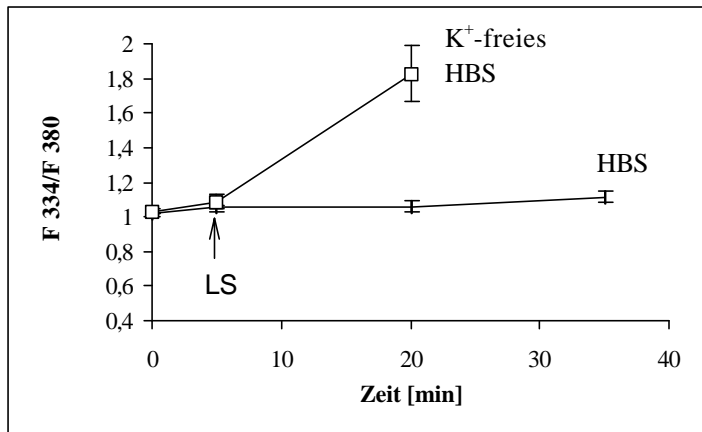


Abb. 25: Wirkung von 100 $\mu\text{mol/l}$ LS auf die $[\text{Na}^+]_{\text{in}}$ von LEZ inkubiert in HBS und K^+ -freiem HBS. Dargestellte Daten für Untersuchungen in HBS sind Mittelwerte und Standardabweichungen von 2 Versuchen, jeweils in 5 einzelnen Zellen gemessen. Daten für Untersuchungen in K^+ -freiem HBS sind aus Abb. 24 entnommen.

3.4.6 Einfluß von Albumin auf den Na^+ -Influx -erhöhenden Effekt von LS

Es wurde in den letzten Abschnitten nachgewiesen, daß unter in vitro-Bedingungen freie Fettsäuren den passiven Na^+ -Influx in die Zelle verstärken können. Im Blutplasma werden freie Fettsäuren aber hauptsächlich an Albumin gebunden transportiert, deshalb wurde die Influx-erhöhende Wirkung von LS in Anwesenheit von Serumalbumin untersucht, um Rückschlüsse auf die Wirkung von LS auf den transmembranen Na^+ -Transport in vivo ziehen zu können. In Abb. 26 ist der Anstieg der $[\text{Na}^+]_{\text{in}}$ nach Mediumwechsel von HBS zu K^+ -freiem HBS dargestellt. Unter Zusatz von 50 $\mu\text{mol/l}$ LS in K^+ -freiem HBS ist der Anstieg der $[\text{Na}^+]_{\text{in}}$ deutlich höher; bei gleichzeitiger Anwesenheit von LS und Serumalbumin, je 50 $\mu\text{mol/l}$, liegt der Anstieg der $[\text{Na}^+]_{\text{in}}$ jedoch nur im Niveau der Kontrolle (ohne LS). Das bedeutet, daß Serumalbumin die verstärkende Wirkung von LS auf den passiven Na^+ -Influx in die Zelle verhindern kann.

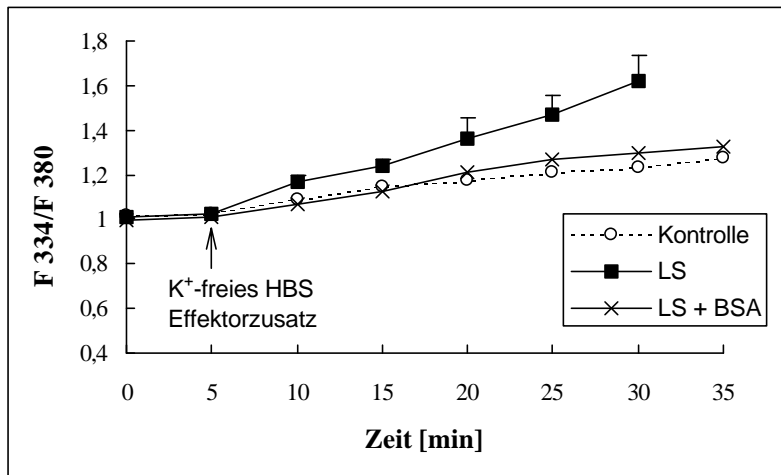


Abb. 26: Wirkung von LS ($50 \mu\text{mol/l}$) auf den Anstieg der $[\text{Na}^+]_{\text{in}}$ von LEZ in K^+ -freiem HBS bei An-/Abwesenheit von Serumalbumin ($50 \mu\text{mol/l}$). Angegeben sind Mittelwerte und Standardabweichungen aus Messungen von 10 einzelnen Zellen eines repräsentativen von 3 durchgeführten Versuchen.

3.4.7 Einfluß von anderen Fettsäuren und -estern auf den Na^+ -Influx

Die Wirkung von verschiedenen Fettsäuren auf den Na^+ -Influx in die Zelle wurde untersucht und mit der von LS verglichen. Abb. 27 zeigt den Anstieg von F 334/F 380 in LEZ inkubiert in K^+ -freiem HBS, mit oder ohne Zusatz von Fettsäure. Von den untersuchten Substanzen zeigte Arachidonsäure (20:4 cis) den stärksten Effekt, gefolgt von LS (18:2 cis). Für die anderen Fettsäuren ließen sich keine sicheren Effekte nachweisen. Daraus kann geschlußfolgert werden, daß bei der eingesetzten Konzentration von $25 \mu\text{mol/l}$ nur Arachidonsäure und LS eine verstärkende Wirkung auf den passiven Na^+ -Influx in die Zelle aufweisen. Von den untersuchten ungesättigten Fettsäuren zeigte Ölsäure (18 : 1) keine Wirkung, ähnlich wie die gesättigte Palmitinsäure (16:0), die trans-konfigurierte Linolelaidinsäure (18:2 trans) und die veresterte cis-konfigurierte Linolsäure (18:2 cis Ester).

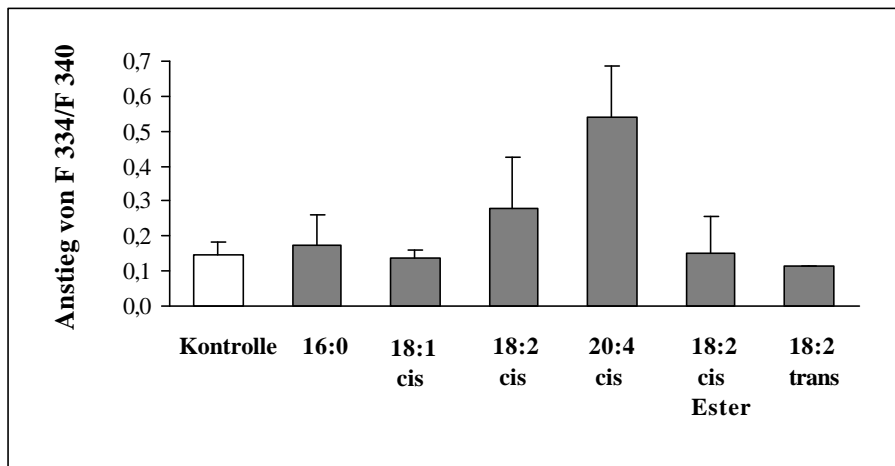


Abb. 27: Anstieg der $[Na^+]_{in}$ unter Einwirkung von 25 $\mu\text{mol/l}$ Fettsäure in K^+ -freiem HBS nach 10 Minuten Inkubation. Kontrolle: K^+ -freies HBS ohne Effektorzusatz. Angegeben sind Mittelwerte und Standardabweichungen von mindestens 2 Versuchen, jeweils in mindestens 5 einzelnen Zellen gemessen.

4. DISKUSSION

4.1 Zytotoxizitätsteste

Zur Charakterisierung der Zytotoxizität von Effektoren kommen verschiedene nicht radioaktive Methoden zum Einsatz, die auf vier Grundprinzipien zurückgeführt werden können: Zell- bzw. Kolonienzählung, Bestimmung der makromolekularen Farbstoffbindung, Bestimmung der metabolischen Schädigung und Ermittlung der Beeinträchtigung der Membranintegrität (Shekhan, 1995). In dieser Arbeit wurden zytotoxische Wirkungen von Fettsäuren gegenüber Linsenepithelzellen mit Hilfe von zwei Methoden untersucht, dem Zellablösungstest und dem Neutralrot-Test.

Der Zellablösungstest basiert auf einer Zählung der nach der Inkubation mit Effektoren noch am Substratum haftenden Zellen. Der Zell-Substratum-Kontakt ist ein sensibler Indikator für die Vitalität nichttransformierter Zellen und Voraussetzung für Wachstum, Proliferation und Differenzierung dieser Zellen.

Mit dem Neutralrot-Test wurden zytotoxische Wirkungen von Effektoren über die Erfassung der Beeinträchtigung des Zellmetabolismus charakterisiert. Der Farbstoff wird als eine schwache Base über nicht-ionische Diffusion in die Zelle aufgenommen und hauptsächlich in den Lysosomen gespeichert. Dabei gehen die Farbstoffmoleküle eine elektrostatische Bindung mit den sauren Gruppen der lysosomalen Matrix ein (Winckler, 1974). Bei Zellschädigungen verringert sich die Farbstoffaufnahme der Zellen, dies kann photometrisch erfaßt werden und erlaubt einen Rückschluß auf die Zytotoxizität der untersuchten Effektoren.

Die in der Arbeit erzielten Ergebnisse haben verdeutlicht, daß LS schon bei 10 µmol/l in vitro Zellen schädigen kann (Abschnitte 3.1.1 und 3.1.2). Dabei ist nicht nur die Adhäsion am Substratum sondern auch der Zellmetabolismus stark beeinträchtigt. Auch bei anderen untersuchten ungesättigten freien Fettsäuren wurde eine starke zytotoxische Wirkung nachgewiesen. In beiden Testen zeigte Arachidonsäure die stärkste Zytotoxizität, gefolgt von LS. Ölsäure, Linolensäure und Palmitoleinsäure bewirken auch schon mit 10 µmol/l Zellschädigungen. Der etwas schwächere Zellschädigungseffekt von der trans-konfigurierten Linolelaidinsäure konnte beim Neutralrot-Test, aber nicht beim

Zellablösungstest erfaßt werden. Diese höhere Empfindlichkeit des Neutralrot-Testes könnte u.a. durch die längere Inkubationszeit bedingt sein.

Im Gegensatz zu ungesättigten Fettsäuren zeigten die gesättigten Fettsäuren sowie die Ethylester der ungesättigten Fettsäuren in keinem Test eine Zellschädigungswirkung. Es muß deshalb angenommen werden, daß eine Doppelbindung und eine freie Carboxylgruppe Voraussetzung für die zytotoxischen Effekte von Fettsäuren sind, dabei bewirkt eine cis-Konfiguration stärkere Zellschädigungen als eine trans-Konfiguration. Ein Vergleich der zytotoxischen Effekte von Ölsäure, LS und Linolensäure ergibt keinen Zusammenhang zwischen der zytotoxischen Wirkung und der Anzahl der Doppelbindungen.

Die erzielten Ergebnisse sind mit den Befunden von Faß (1997) weitgehend in Übereinstimmung. Mittels des MTT in vitro Toxizitätstest (Erfassung der Beeinträchtigung des Zellmetabolismus über die Aktivität der Dehydrogenase) und der Bestimmung der Membranintegrität über die Erfassung der LDH-Freisetzung ist der Autor zu gleichen Rückschlüssen über die Zytotoxizität von Fettsäuren gekommen. Allerdings konnten bei diesen Testen mit einer kürzeren Inkubationszeit von 2 Stunden die zytotoxischen Effekte von LS erst bei etwas höheren Konzentrationen (ab 25 µmol/l) erfaßt werden.

Bei den morphologisch-mikroskopischen Untersuchungen wurden zytotoxische Wirkungen von LS auf LEZ qualitativ erfaßt. Schon nach einer Stunde Inkubation mit 25 µmol/l LS sind zahlreiche Erscheinungen der Zellschädigung (Hervortreten des Zellkerns, Zellretraktion) zu erkennen. Bei weiterer Inkubation tritt Kernpyknose als ein charakteristisches Zeichen des apoptotischen Zelltods auf, die Zellen runden sich ab und verlieren den Kontakt zum Substratum (Abb. 11 A und B). Die morphologischen Untersuchungen haben insofern Bedeutung, weil dadurch auf eine einfache Weise zwischen Nekrose und Apoptose unterschieden werden kann, während durch die anderen erwähnten Zytotoxizitätsteste nur das Ausmaß aber nicht die Art der Zellschädigungen festgestellt wird. Daß LS bzw. andere freie ungesättigte Fettsäuren die Apoptose herbeiführen können, wurde bereits mit Endothelzellen nachgewiesen (Toborek et al., 1997). Es wird auch

angenommen, daß die durch verschiedene Noxen induzierte Apoptose der LEZ in vivo der Entstehung von Katarakten vorausgeht (Li, 1997).

Die Untersuchungen haben bestätigt, daß ungesättigte Fettsäuren, insbesondere LS, in vitro bereits bei geringen Konzentrationen an Epithelzellen von Rinderlinsen starke Schädigungen hervorrufen, die schließlich zum Zelltod führen können. Dabei bleibt der Mechanismus der Schädigungseffekte ungeklärt. In den folgenden Abschnitten sollten Einflüsse von LS auf den Ionentransport der Plasmamembran in LEZ als mögliche Ursachen der Zellschädigung diskutiert werden.

4.2 Bestimmung der intrazellulären Natriumkonzentration

4.2.1 Zur Methodik

Fluoreszenzfarbstoffe haben die Eigenschaft, bei Anregung mit Licht bestimmter Wellenlänge die absorbierte Energie wieder als Licht anderer Wellenlängen zu emittieren. Durch Kopplung dieser fluoreszierenden Substanzen mit funktionellen Gruppen, die spezifische Bindungen mit bestimmten Zellstrukturen bzw. -bestandteilen eingehen, können letztere fluoreszenzmikroskopisch sichtbar gemacht und qualitativ sowie quantitativ untersucht werden. Auf diesem Prinzip sind in den letzten Jahrzehnten verschiedene Fluoreszenzfarbstoffe zur Erfassung von intrazellulären Ionenkonzentrationen entwickelt worden. Der Na⁺-sensitive Farbstoff SBFI wurde 1989 von Minta und Tsien eingeführt und wird seitdem zunehmend zur Untersuchung des Natriumtransports durch die Plasmamembran verwendet. In dieser Arbeit wurde der Farbstoff bei 338 und 380 nm angeregt und die dabei emittierten Fluoreszenzintensitäten bei 520 nm detektiert. Als Maß für die Ionenkonzentration wird das Verhältnis der Intensitäten (F_{334}/F_{380}) verwendet, welches infolge einer bei Konzentrationsänderungen entgegengesetzten Verschiebung der Intensitäten empfindlicher ist als die einzelnen Intensitäten (siehe auch Abschnitt 2.9.1). Außerdem bietet die Verwendung eines doppeltangeregten Farbstoffs und das damit ermittelte Intensitätsverhältnis den Vorteil, daß Artefakten, die zur Abweichung von Fluoreszenzeigenschaften des Farbstoffs führen, gleichzeitig die Intensitäten

im Zähler und Nenner beeinflussen und dadurch im Verhältnis eliminiert werden. So können Einflüsse von unterschiedlicher Farbstoffbeladung und -hydrolyse in den einzelnen Zellen, Intensitätsänderungen des Anregungslichts sowie unvermeidbarem Ausblenden des Farbstoffs im Laufe des Versuchs gering gehalten werden.

Die Beladung der Zellen erfolgt durch den Einsatz der membrangängigen Acetoxymethylester des Farbstoffs, der erst intrazellulär durch die Wirkung von unspezifischen Esterasen in die fluoreszente, nicht permeable Form umgewandelt werden. Das dabei entstandene Formaldehyd und Acetat könnte bei Anwendung höherer Farbstoffkonzentration zu Zellschädigungen führen. Nach Negulescu und Machen (1990) sind diese Schädigungen jedoch reversibel. Außerdem kann die Zellerholung durch eine unmittelbar nach der Beladung erfolgte Inkubation in farbstofffreiem Medium unterstützt werden, wobei die membranpermeablen Formaldehyd- und Acetatmoleküle ans Medium abgegeben werden. Aus diesem Grund wurde in dieser Arbeit nach der Zellbeladung stets eine Inkubationsperiode von 30 Minuten in farbstofffreiem Medium durchgeführt. Dadurch wird gleichzeitig eine vollständige Hydrolyse des aufgenommenen Farbstoffs, und damit eine konstante Fluoreszenzintensität erreicht, wie es bei der Ermittlung der Basislinie gezeigt werden konnte (Abschnitt 3.4.1).

Die Fluoreszenzeigenschaft des Farbstoffs ist vor allem von der Ionenstärke und der Viskosität des intrazellulären Mediums abhängig. Bei der Kalibrierung mit steigenden intrazellulären Na^+ -Konzentrationen ist es deshalb wichtig, Zellschwellungen durch passiven Wassereinstrom zu vermeiden. Dazu wurde ein Puffer mit einer geringen Cl^- -Konzentration (30 mmol/l) verwendet, der dafür das nichtmembrangängige Gluconat als Ersatzanion enthält. Unter diesen Bedingungen wird gleichzeitig dem Donnaneeffekt über die Plasmamembran entgegengewirkt, sodaß unter Wirkung von Ionophoren die Na^+ -Konzentration intra- und extrazellulär tatsächlich gleich ist (Harootunian et al., 1989). Als Ionophore wurden Gramicidin D und Amphotericin B eingesetzt, die die Permeabilität der Plasmamembran spezifisch für monovalente Ionen erhöhen. Als Kanalbildner haben diese Ionophore den Vorteil, daß ihre Wirkung ziemlich temperaturunabhängig ist (Voet und Voet, 1992), sodaß auch

bei Raumtemperatur ein rascher Ausgleich zwischen der intra- und extrazellulären Na^+ -Konzentration erreicht werden kann. Dies wird durch die erzielten Kalibrierungsergebnisse bestätigt (Abschnitt 3.4.2).

Bei der Kalibrierung mit SBF1 muß darauf geachtet werden, daß der Farbstoff nicht nur mit Natrium-, sondern auch mit anderen Ionen reagiert. Allerdings ist die Affinität für Ca^{++} , Mg^{++} und Li^+ in Bezug auf ihre intrazelluläre Konzentration zu gering, um eine relevante Wirkung auf Meßergebnisse zu haben. Angesichts der hohen physiologischen intrazellulären Kaliumkonzentration sollte die Reaktion mit K^+ berücksichtigt werden. Dennoch, bei einer ca. 20-fach höheren Selektivität für Na^+ gegenüber K^+ (Minta und Tsien, 1989) dürfte dieser Effekt nur im unteren Kalibrationsbereich eine praktische Bedeutung haben.

Bei der Anwendung von SBF1 haben manche Autoren (Harootunian et al., 1989) eine Differenz in der Fluoreszenzintensität zwischen der nuklearen und der cytosolischen Region festgestellt, die für eine unterschiedliche Verteilung des Farbstoffs in den Zellkompartimenten spricht. Solche Farbstoffkompartimentation innerhalb der Zelle wurde bei der Anwendung auf LEZ nicht beobachtet.

Ein weiterer Faktor, der die Meßergebnisse beeinträchtigen kann, stellen Änderungen im intrazellulären Raums dar, die unter Einwirkung von LS auf die Zelle entstehen können. Der von LS bedingte Anstieg des Na^+ -Influx kann einen stärkeren Wassereinstrom zur Folge haben, dabei kann sowohl die Viskosität als auch die Ionenstärke verändert werden. Außerdem könnten durch LS bedingte pH-Änderungen auch zu Abweichungen führen, obwohl pH-Schwankungen im physiologischen Bereich praktisch keine Änderungen in Fluoreszenzeigenschaften des Farbstoffs bewirken (Minta und Tsien, 1989). Diese möglichen Fehlerquellen müssen insbesondere bei Untersuchungen mit höheren Konzentrationen von LS berücksichtigt werden.

4.2.2 Die intrazelluläre Natriumkonzentration in Linsenepithelzellen aus Rinderaugen

Mit Hilfe der erstellten Kalibrierungskurve wurde die basale $[\text{Na}^+]_{\text{in}}$ in Epithelzellen von Rinderlinsen mit 3,14 mmol/l berechnet. In verschiedenen Zelltypen haben andere Autoren durch den Einsatz von SBF1 für die $[\text{Na}^+]_{\text{in}}$ Werte zwischen ca. 3 und 16 mmol/l gefunden (Harootunian et al., 1989; Borzak et al., 1992; Borin, 1997; Meier et al., 1997). Der in dieser Arbeit ermittelte Wert für LEZ von Rindern liegt somit an der unteren Grenze. Für die humanen Linsenepithelzellen haben Duncan et al. (1994) mit Hilfe der Flammenphotometrie einen wesentlich höheren Wert von 21 mmol/l ermittelt, der allerdings den totalen Natriumgehalt wiedergibt, der bekanntlich viel höher ist als die Konzentration von freien Na^+ -Ionen (Harootunian et al., 1989). Bei dieser Methode wird die ganze Linse lyophilisiert und das gewonnene Linsenwasser wird für die Natriumbestimmung verwendet. Dieser Wert schließt deshalb auch die Natriumkonzentration im interzellulären Raum der Linse ein, die höher als die intrazelluläre Natriumkonzentration ist. Außerdem wird nicht zwischen der $[\text{Na}^+]_{\text{in}}$ in den LEZ und der in den Linsenfasern unterschieden. Gerade in der Augenlinse besteht nach dem Pump-leak-model ein Ionenkonzentrationsgefälle zwischen vorderem und hinterem Linsenpol (Kinsey und Reddy, 1965), wobei die Natriumkonzentration von vorn nach hinten zunimmt. Der von Duncan angegebene Wert gibt somit einen Mittelwert des Natriumgehalts in verschiedenen Linsenregionen wieder. Andere Befunde über die intrazelluläre Konzentration von freien Natriumionen der LEZ liegen nicht vor. In dieser Arbeit wurde dieser Wert somit zum ersten Mal bestimmt.

Die angegebene basale $[\text{Na}^+]_{\text{in}}$ von 3,14 mmol/l wurde in intakten LEZ bei Inkubation der Zellen in HBS, einem einfachen Medium mit annähernd physiologischer Ionenzusammensetzung des Kammerwassers, ermittelt. Es kann deshalb angenommen werden, daß dieser Wert möglicherweise die physiologische intrazelluläre Natriumkonzentration wiedergibt.

Desweiteren wurde in der Arbeit der passive Natriuminflux in die Zelle durch Messung des intrazellulären Natriumanstiegs bei Hemmung der Na,K-ATPase in K^+ -freiem HBS erfaßt. Die ermittelte Anstiegsrate von 0,21 mmol/l Na^+ /min

ist im Vergleich zu Literaturbefunden in anderen Zelltypen recht niedrig. Mit der gleichen Methode fanden Negulescu und Machen (1990) für Zellen aus der Magenschleimhaut von Kaninchen einen Wert von 3,2 und Borin (1997) für glatte Muskelzellen von Ratten 1,45 mmol/l Na^+ /min. Weitere Befunde über die Anstiegsrate für die intrazelluläre Natriumkonzentration von LEZ in K^+ -freiem Medium liegen nicht vor.

Die fluoreszenzmikroskopische Bestimmung der intrazellulären Natriumkonzentration stellt eine empfindliche und elegante Alternative für die konventionelle Flammenphotometrie dar. Insbesondere hat die Methode gegenüber der letzteren den großen Vorteil, daß dabei die Konzentration von freien Ionen gemessen wird. In dieser Hinsicht ist diese Methode mit der Konzentrationsbestimmung mittels ionensensitiven Mikroelektroden vergleichbar, die letztere bringt jedoch den Nachteil der Invasivität mit sich, weshalb bei Untersuchung über Einflüsse von Effektoren auf die Zelle die Fluoreszenzmikroskopie die geeignetere Methode darstellt. Durch den Einsatz der membrangängigen Esterform der Fluoreszenzfarbstoffe erfolgen Zellbeladung und Konzentrationsbestimmung schonend und nicht invasiv, wobei sich die Zellen während der Untersuchung annähernd in ihrem nativen Zustand befinden, was insbesondere für die Untersuchung des Ionentransports der Zelle wichtig ist. Außerdem wird dabei die intrazelluläre Natriumkonzentration in wenigen einzelnen Zellen in situ bestimmt, sodaß Abweichungen innerhalb einer Population ermittelt werden können. Darüber hinaus bietet die Fluoreszenz-mikroskopie in Kombination mit einem digitalen Bildaufzeichnungssystem die Möglichkeit, Änderungen von intrazellulären Ionenkonzentrationen laufend über eine längere Versuchsdauer quantitativ und morphologisch-mikroskopisch zu verfolgen. Auch die Farbstoffverteilung innerhalb der Zelle sowie eine mögliche Kompartimentation läßt sich dadurch problemlos erkennen. Durch die Anwendung von Untersuchungsmedien mit geeigneter Ionenzusammensetzung kann der Natriumflux direkt untersucht werden, was sonst häufig nur durch den strahlenbelastenden Einsatz von Isotopen möglich ist. Die Methode hat sich zur Untersuchung der intrazellulären Natriumkonzentration und des Natriumtransports in LEZ als sehr hilfreich erwiesen.

4.3 Einfluß von LS auf die Na,K-ATPase von subkultivierten LEZ

4.3.1 Aktivität der Na,K-ATPase in subkultivierten LEZ

Die Aktivität der Na,K-ATPase wurde in Zellhomogenaten und in teilgereinigten Fraktionen der Plasmamembran aus subkultivierten LEZ untersucht. In Zellhomogenaten betrug der Anteil der Na,K-ATPase-Aktivität 18,5 % an der Gesamtaktivität, mit einer spezifischen Aktivität von 3,2 nmol P_i /min/mg Protein. Durch die Teilreinigung wurden Fremdproteine entfernt, die u.a. die Basisaktivität bedingten. Der Anteil der Na,K-ATPase-Aktivität an der gesamten ATPase-Aktivität wurde dadurch auf 42,1 % erhöht. Auch die spezifische Aktivität des Enzyms ist durch die Isolierung der Membranfraktionen wesentlich erhöht (9,7 nmol P_i /min/mg Protein). Dieses Ergebnis liegt ungefähr in der Größenordnung wie die von Borchman et al. (1988), die unter vergleichbaren Bedingungen in gereinigten Membranfraktionen aus LEZ von Kaninchen eine spezifische Aktivität der Na,K-ATPase bei 725 nmol P_i /h/mg Protein, d.h. ca. 12,1 nmol P_i /min/mg Protein gefunden haben. Ye et al. (1992 a) haben in apikalen Membranfraktionen aus primärkultivierten LEZ von Rindern eine wesentlich geringere spezifische Aktivität von 14,6 nmol P_i /h/mg Protein (d.h. ca. 0,24 nmol P_i /min/mg Protein) gefunden. U.a. dürften diese unterschiedlichen Ergebnisse durch Unterschiede in der Präparation des Untersuchungsmaterials erklärt werden. Befunde von anderen Autoren über die spezifische Enzymaktivität in Membranfraktionen aus LEZ wurden auf die gesamte Linse bezogen, können deshalb nicht zum Vergleich verwendet werden. Im Vergleich zu anderen Geweben wie Nierenmark, Nierenrinde, Hirnrinde und Herzmuskel mit einer spezifischen Enzymaktivität von ca. 200 bis 4200 nmol P_i /min/mg Protein in gereinigten Membranfraktionen (Schuurmans Stekhoven und Bonting, 1981) weist das Linsenepithel eine relativ niedrige spezifische Aktivität der Na,K-ATPase auf.

Es gibt Möglichkeiten, das Enzymprotein durch Behandlung mit Detergenzien weiter zu reinigen, wodurch die spezifische Aktivität des Enzyms noch vielfach erhöht werden kann. So konnten Sen und Pfeiffer (1982) durch Behandlung der Zellhomogenate mit Desoxycholol und anschließende Dichtegradient-zentrifugation die spezifische Aktivität der Na,K-ATPase aus Schweinelinsen

um 100-fach erhöhen. Der Nachteil dieser Methode besteht in einer Entfernung der Enzymproteine aus ihrer natürlichen Lipidumgebung; dabei wird das Enzym in der Konfiguration und damit in den Eigenschaften möglicherweise verändert. In dieser Arbeit waren wir aber bestrebt, das Enzym möglichst im nativen Zustand auf die Aktivität und Funktion unter Einwirkung von LS zu untersuchen. Aus diesem Grund wurden zur Untersuchung der Na,K-ATPase-Aktivität teilgereinigte Membranfraktionen ohne Detergenzbehandlung verwendet. Bei den gewählten Versuchsbedingungen ist die P_i -Freisetzung in Ansätzen mit teilgereinigten Membranfraktionen hoch genug, um mit der Bestimmungsmethode erfaßt werden zu können. Auch Änderungen der Enzymaktivität unter Einwirkung von LS konnten damit nachgewiesen werden.

4.3.2 Einfluß von LS auf die Aktivität der Na,K-ATPase

Die Wirkung von ungesättigten freien Fettsäuren auf die Aktivität der Na,K-ATPase wurde seit längerer Zeit *in vitro* untersucht. Ahmed und Thomas (1971) haben über eine Aktivitätshemmung der Na,K-ATPase in teilgereinigten Enzympräparationen aus Rattenhirn um 66 % durch 50 $\mu\text{mol/l}$ Ölsäure berichtet. Auch in Vesikeln aus kardiomyogenem Sarkolem wurde eine Hemmung der Enzymaktivität durch Ölsäure (Lamers et al., 1984) nachgewiesen. In hochgereinigten Enzymproteinen aus Nierenmark von Kaninchen konnten Swarts et al. (1989) ebenfalls eine Hemmwirkung von freien ungesättigten Fettsäuren auf die Enzymaktivität nachweisen, wobei mit 20 $\mu\text{mol/l}$ LS eine 50 %-ige Hemmung registriert wurde. Untersuchungen von Tamura et al. (1985) an teilgereinigten Enzympräparationen aus Rattenhirn ergaben eine 50 %-ige Aktivitätshemmung bei 110 $\mu\text{mol/l}$ LS. Die von den Autoren angegebene unterschiedlich starke Hemmwirkung von LS bzw. anderen Fettsäuren ist wahrscheinlich auf unterschiedliche Methoden der Enzymreinigung sowie auf die verschiedenen verwendeten Zelltypen zurückzuführen. Insgesamt führen alle Ergebnisse zur Schlußfolgerung, daß LS *in vitro* bei Konzentrationen im $\mu\text{molaren}$ Bereich eine Hemmung der Aktivität der Na,K-ATPase verschiedener Zelltypen bewirkt. In dieser Arbeit wurde zum ersten Mal die Wirkung von LS auf die Na,K-ATPase-Aktivität von

Linseneithelzellen untersucht. Dabei wurde mit 100 $\mu\text{mol/l}$ LS eine Aktivitätshemmung der Na,K-ATPase um 51,7 % nachgewiesen. Dieses Ergebnis stimmt mit den erwähnten Befunden von anderen Autoren überein.

Mit 10 $\mu\text{mol/l}$ LS wurde eine Erhöhung der ouabainempfindlichen ATP-Hydrolyse um 40,7 % gefunden, was eine Aktivierung der Enzymaktivität der Na,K-ATPase durch 10 $\mu\text{mol/l}$ LS bedeutet. In der Literatur wurde über eine Aktivierungswirkung von LS auf die Na,K-ATPase-Aktivität bei suboptimaler ATP-Konzentration berichtet, während bei ATP-Konzentrationen im mmolaren Bereich eine Hemmwirkung von LS auftrat (Kelly et al. 1986; Jack-Hays et al., 1996). In dieser Arbeit wurden die Versuche mit 100 sowie mit 10 $\mu\text{mol/l}$ LS aber bei gleichen Bedingungen einschließlich der ATP-Konzentration (2 mmol/l) durchgeführt. Die Ergebnisse von den vier einzelnen Versuchen (Tab. 7) zeigen zwar eine starke Streuung, jedoch ist bei jedem Versuch die Tendenz einer Erhöhung der Na,K-ATPase-Aktivität zu erkennen.

4.3.3 Einfluß von LS auf die intrazelluläre Na^+ -konzentration und auf den transmembranen Na^+ -Transport

Es wurde in dieser Arbeit nachgewiesen, daß LS konzentrationsabhängig den Na^+ -Influx erhöht (Abschnitt 3.4.5). Dieser Effekt kann schon mit 25 $\mu\text{mol/l}$ LS beobachtet werden und ist mit 100 $\mu\text{mol/l}$ LS besonders stark ausgeprägt.

In der Literatur wurden bisher folgende Mechanismen für Na^+ -Influx nachgewiesen:

- a) Na/H-Austausch, der bei einem nach außen gerichteten Protongradient Na^+ in die Zelle transportiert gegen einen H^+ -Efflux. Dieser Mechanismus wurde von Ye und Zadunaisky (1992 b) in mikrosomalen Vesikeln aus Linsenfasern nachgewiesen.
- b) Na/Ca-Austausch, der unter physiologischen Bedingungen Na^+ in die Zelle gegen einen Ca^{++} -Ausstrom transportiert. Dieser Mechanismus wurde von Tomlinson et al. (1991) in Rattenlinsen und von Ye und Zadunaisky (1992 a) in LEZ von Rindern nachgewiesen.
- c) Na^+ -Kanäle verschiedener Typen

- d) NaCl_2 -Cotransport, über dessen Vorkommen in Linsenfasern von Ye und Zadunaisky (1992 c) berichtet wurde.
- e) NaHCO_3 -Cotransport
- f) $\text{Na}^+ \text{Cl}^- \text{H}^+ \text{HCO}_3^-$ -Austausch: wurde von Duncan et al. (1992) in LEZ von Rindern nachgewiesen, spielt eine Rolle bei der pH-Regulation der Zelle.

Es ist nicht möglich, die in diese Arbeit nachgewiesene durch LS verursachte Erhöhung des Na^+ -Influx bestimmten Transportprozessen zuzuordnen. Es gibt aber einige Hinweise über die möglich von LS beeinflussten Mechanismen. Der NaHCO_3 -Cotransport sowie der $\text{Na}^+ \text{Cl}^- \text{H}^+ \text{HCO}_3^-$ -Austausch kommen wegen der Abwesenheit von CO_3^{2-} im Untersuchungsmedium nicht in Frage. Auch der NaCl_2 kann nicht zu dem beobachteten Anstieg des Na^+ -Influx beitragen, denn die Versuche wurde in K^+ -freiem HBS durchgeführt (siehe Abschnitt 3.4.5).

Es ist bekannt, daß der Na/H-Austausch bei einem niedrigen intrazellulären pH-Wert verstärkt H^+ nach außen transportiert gegen Na^+ -Einstrom (Ye und Zadunaisky, 1992 b). Daher ist es möglich, daß unter Einwirkung von LS der Na/H-Austausch indirekt über einen intrazellulären pH-Abfall aktiviert wird und den Na^+ -Influx erhöht. Darüberhinaus haben Cavallini et al. (1996) berichtet, daß Arachidonsäure eine direkte Aktivierungswirkung auf den Na/H-Austausch in den Thrombozyten ausübt. Eine direkte oder/ und indirekte Aktivierung des Na/H-Austausches könnte deshalb zum beobachteten Anstieg des Na^+ -Influx unter LS-Zugabe beitragen.

Die Möglichkeit, daß durch die Wirkung von LS der Na/Ca-Austausch aktiviert wird und dadurch mehr Na^+ in die Zelle transportiert wird gegen Ca^{++} , kann ebenfalls nicht ausgeschlossen werden. Untersuchungen über die $[\text{Ca}^{++}]_{\text{in}}$ unter Zusatz von LS ergaben einen Ca^{++} -Anstieg (Glanz et al., 1997). Es ist durchaus denkbar, daß dadurch der Na/Ca-Austausch als ein ausgleichender Mechanismus verstärkt Ca^{++} nach außen und Na^+ nach innen transportiert. Eine direkte aktivierende Wirkung von ungesättigten Fettsäuren auf den Na/Ca-Austausch wurde von Philipson und Ward (1985) in mikrosomalen Vesikeln aus Herzmuskelzellen nachgewiesen und könnte hier auch eine Rolle spielen.

In vielen Gewebstypen wurde von der Existenz unspezifischer Ionenkanäle in der Plasmamembran berichtet, die bei Aktivierung Ca^{++} , Na^+ und K^+ in die Zelle eindringen lassen. Duncan et al. (1994) haben vermutet, daß auch in der Plasmamembran der Linse solche Ionenkanäle vorkommen. Die Autoren sind von Befunden ausgegangen, nach denen in Ca^{++} -freiem Medium die Ionenpermeabilität der Linse für Na^+ , K^+ und Ca^{++} gleichzeitig erhöht ist. Das Vorkommen von unspezifischen Ionenkanälen in der Plasmamembran, die bei Abwesenheit von Ca^{++} im Untersuchungsmedium aktiviert werden, würde dieses Phänomen erklären. Dadurch könnte auch die Entstehung von hypocalcämischen Kataraktformen erklärt werden, bei denen trotz einer erniedrigten Ca^{++} -Konzentration im Kammerwasser die $[\text{Ca}^{++}]_{\text{in}}$ erhöht ist. Wenn die Vermutung von Duncan et al. richtig ist, könnte die erhöhende Wirkung von LS auf den Na^+ -Influx (Ergebnisse in dieser Arbeit) bzw. auf den Ca^{++} -Influx in LEZ (Glanz, 1997) ebenfalls, zumindest zu einem Teil, durch eine Aktivierung dieser unspezifischen Ionenkanäle zustande kommen.

Welche von den diskutierten Mechanismen auch immer von LS beeinflusst und damit für den erhöhten Na^+ -Influx verantwortlich sind, diese Influxerhöhung führt bei Untersuchungen in HBS nicht zu einem Na^+ -Anstieg in der Zelle (Abschnitt 3.4.5). Es muß daher angenommen werden, daß selbst bei Einwirkung von 100 $\mu\text{mol/l}$ LS die Na,K-ATPase noch in der Lage ist, den unter diesen Bedingungen um ca. 28-fach erhöhten Na^+ -Influx zu kompensieren. Daraus kann geschlossen werden, daß die Funktion des Enzyms durch 100 $\mu\text{mol/l}$ LS nicht oder nicht wesentlich beeinträchtigt wird. Dieser Befund wird durch Ergebnisse von Young et al. (1986) unterstützt, die besagen, daß LS bei Konzentrationen von 200 bis 400 $\mu\text{mol/l}$ keinen signifikanten Einfluß auf die Aufnahme von $^{86}\text{Rb}^+$ in Erythrozyten hat. Dwight et al. (1992) haben ebenfalls berichtet, daß beim Einbau von ungesättigten Fettsäuren in der Plasmamembran von Erythrozyten mit einer bis auf 5- bis 10-fach erhöhten Membrankonzentration die $^{86}\text{Rb}^+$ -Aufnahme nahezu unverändert bleibt. Im Gegensatz dazu haben Ng und Hockaday (1986) über Messung des ^{22}Na -Efflux eine Hemmung der Funktion der Na,K-ATPase in Leukozyten unter Einfluß von 100 $\mu\text{mol/l}$ LS nachgewiesen. Die widersprüchigen Befunde

könnten auf die unterschiedlichen verwendeten Zelltypen zurückgeführt werden.

Die Wirkung von LS auf die Na^+ -Regulation in LEZ kann wie folgt zusammengefaßt werden:

- a) Erhöhung des Na^+ -Influx, möglicherweise über
 - Aktivierung des Na/Ca-Austausch oder/ und
 - Aktivierung des Na/H-Austausch oder/ und
 - Öffnen unspezifischer Ionenkanäle
- b) Keine Änderung der intrazellulären Na^+ -Konzentration
- c) Keine Hemmung des aktiven Na^+ -Efflux

4.3.4 Wird die Toxizität der LS gegenüber LEZ durch eine Beeinträchtigung der Na,K-ATPase verursacht?

Aus den in dieser Arbeit erzielten Ergebnissen über die Wirkung von LS auf LEZ geht deutlich hervor, daß die Zytotoxizität von LS gegenüber LEZ der Rinderaugen nicht auf eine Beeinflussung der Aktivität und Funktion der Na,K-ATPase der Plasmamembran bzw. auf eine Änderung der intrazellulären Na^+ -Konzentration zurückzuführen ist. Eine Hemmung der Enzymaktivität unter LS wurde zwar nachgewiesen, aber dieser Effekt wurde mit Fraktionen der Plasmamembran nach einem Zellaufschluß- bzw. Reinigungsprozeß erzielt und nicht an intakten Zellen. Ausschlaggebend sind deshalb die Ergebnisse der Untersuchungen über die intrazelluläre Na^+ -Konzentration. Außerdem konnte keine Aktivitätshemmung mit 10 $\mu\text{mol/l}$ LS nachgewiesen werden, während zytotoxische Wirkungen schon bei dieser Konzentration auftreten. Aus diesen Überlegungen kann geschlossen werden, daß die Na^+ -Regulation der Zelle wahrscheinlich nicht der Schlüsselmechanismus ist, von dem die Zytotoxizität von LS ausgeht. Eine sekundäre Störung des Natriumtransports bzw. der intrazellulären Na^+ -Konzentration unter Einwirkung von LS ist jedoch aufgrund der engen Zusammenhänge zwischen den Ionentransportsystemen nicht ausgeschlossen. Weitere Untersuchungen über Wirkungen von LS auf anderen Transportmechanismen der Zelle würden diese Frage beantworten können.

LITERATURVERZEICHNIS

1. Ahmed K, Thomas BS: The effects of long chain fatty acids on sodium plus potassium ion-stimulated adenosine triphosphatase of rat brain. J Biol Chem 246 **(1971)** No. 1, 103-109
2. Alexander H, Henze E: Versuche zur biochemischen Charakterisierung der Zelldifferenzierung in Augenlinsen. Dissertation A, Martin-Luther-Universität, Halle **(1975)**
3. Bergner A: Nachweis und Charakterisierung einer durch Magnesium oder Calcium aktivierbaren Ecto-ATPase an Epithelzellen von Rinderaugenlinsen. Dissertation A, Martin-Luther-Universität, Halle **(1984)**
4. Bonting SL, Caravaggio LL, Hawkins NM: Its role in cation transport in the lens of cat, calf and rabbit. Arch Biochem Biophys 101 **(1963)** 47-55
5. Borchman D, Delamere NA, Paterson CA: Ca-ATPase activity in the rabbit and bovine lens. Invest Ophthalmol Vis Sci 29 **(1988)** 982-987
6. Borin, ML: Dual inhibitory effects of dopamine on Na^+ homeostasis in rat aorta smooth muscle cells. Am J Physiol 272 (Cell Physiol 41) **(1997)** C428-C438.
7. Borzak S, Reers M, Arruda J, Sharma VK, Sheu S, Smith TW, Marsh JD: Na^+ efflux mechanisms in ventricular myocytes: measurement of $[\text{Na}^+]_i$ with Na^+ -binding benzofuran isophthalate. Am J Physiol 263 (Heart Circ Physiol 32) **(1992)** H866-H874
8. Cavallini L, Coassin M, Borean A, Alexandre A: Arachidonic acid activates a proton conductance pathway and the Na^+/H^+ exchanger in platelets. Biochem J 319 **(1996)** 567-574

9. Cheng JT, Kahn T, Kaji DM: Mechanisms of alteration of sodium potassium pump of erythrocytes from patients with chronic renal failure. *J Clin Invest* 74 **(1984)** 1811-1820
10. Chow SC, Sisfontes L, Bjorkhem I, Jondal M: Suppression of growth in a leukemic T cell line by n-3 and n-6 polyunsaturated fatty acids. *Lipids* 24 (8) **(1989)** 700-704
11. Davis FB, Davis PJ, Blas SD, Schoenl M: Action of long-chain fatty acids in vitro on Ca^{2+} -stimulatable, Mg^{2+} -dependent ATPase activity in human red cell membranes. *Biochem J* 248 **(1987)** 511-516
12. Delamere NA, Paterson CA: Characteristics of ^{45}Ca uptake by the rabbit lens. *Exp Eye Res* 41 **(1985)** 11-16
13. Duncan G, Bushell AR: Ion analyses of human cataractous lenses. *Exp Eye Res* 20 **(1975)** 223-230
14. Duncan G, Hightower KR, Gandolfi SA, Tomlinson J, Maraini G: Human lens membrane cation permeability increases with age. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 30, No 8 **(1989)** 1855-1859
15. Duncan G, Dart C, Croghan PC, Gandolfi SA: Evidence for a $\text{Na}^+ \text{Cl}^- \text{H}^+ \text{HCO}_3^-$ exchange system in the mammalian lens. *Exp Eye Res* 54 **(1992)** 941-946
16. Duncan G, Williams MR, Riach RA: Calcium, cell signalling and cataract. *Prog Retinal Eye Res* 13 **(1994)** 623-652
17. Dwight JFStJ, Ribeiro ACM, Hendry BM: Membrane incorporation of non-esterified fatty acids and effects on the sodium pump of human erythrocytes. *Clin Sci* 82 **(1992)** 99-104

18. Faß U: Studien zur Morphologie und Biochemie der Zytotoxizität von cis-ungesättigten Fettsäuren im Vergleich zu Prozessen der Lipidperoxidation an subkultivierten Epithelzellen von Rinderlinsen. Dissertation A, Martin-Luther-Universität, Halle **(1997)**
19. Filipovsky J, Ducimetiere P, Eschwege E, Richard JL, Rosselin G, Claude JR: The relationship of blood pressure with glucose, insulin, heart rate, free fatty acids and plasma cortisol levels according to degree of obesity in middle-aged men. *J Hypertens* 14(2) **(1996)** 229-235
20. Garner WH, Garner MH, Spector A: H₂O₂ induced uncoupling of bovine lens Na,K-ATPase. *Proc Natl Acad Sci USA* 80 **(1983)** 2044-2048
21. Garrett JR, Winston DC, Proctor GB, Schulte BA: Na,K-ATPase in resting and stimulated submandibular salivary glands in cats, studied by means of ouabain-sensitive, K⁺-dependent p-nitrophenyl-phosphatase activity. *Archs oral Biol* 37 **(1992)** 711-716
22. Gläßer D, Kleine R: Beitrag zur Eiweißbestimmung in stark verdünnten Lösungen. *Die Pharmazie, Sonderdruck, Jahrgang 17, Heft 1* **(1962)** 32-36
23. Gläßer D, Friedrich E, Iwig M, Weber E: Über ein Aggregationsphänomen von Augenlinsenepithelien und seine Beeinflussung durch physiologische Purinderivate. *Exp Cell Res* 72 **(1972)** 409-420
24. Gläßer D, Iwig M, Ngoli D, Udelnow C: Alkalinisation stimulates Ca⁺⁺-dependent spreading during the activation of resting lens epithelial cells in primary culture. *Cell Tissue Kinet* 17 **(1984)** 557-571
25. Gläßer D, Faß U, Gruner M, Thust O, Iwig M, Spindler M: Low concentrations of cis-linoleic acid induce cell damage in epithelial cells from bovine lenses. *Eur J Cell Biol* 71 **(1996)** 286-292

26. Gruner M: Untersuchungen zur Zytotoxizität von Linolsäure an Linsenepithel-zellen. Dissertationsarbeit A, Martin-Luther-Universität, Halle **(1997)**
27. Gupta JD, Harley JD: Decreased adenosine triphosphatase activity in human senile cataractous lenses. *Exp Eye Res* 20 **(1975)** 207-209
28. Harding J: Cataract Biochemistry, Epidemiology and Pharmacology. Chapman & Hall, London, New York, Tokyo (usw.) **1991**, S. 84, S. 101 ff.
29. Harootunian AT, Kao JPY, Eckert BK, Tsien RY: Fluorescence ratio imaging of cytosolic free na^+ in individual fibroblasts and lymphocytes. *J Biol Chem* 264, No 32 **(1989)** 19458-19467
30. Hennig B, Alvarado A, Ramasamy S, Boissonnialt GA, Decker EA, Means WJ: Fatty acids-induced disruption of endothelial barrier function in culture. *Biochem Arch* 6 **(1990)** 409-417
31. Hess HH, Derr JE: Assay of inorganic and organic phosphorus in the 0,1-5 nanomol range. *Analyt Biochem* 63 **(1975)** 607-613
32. Hightower KR, Duncan G, Harrison SE: Intracellular calcium concentration and calcium transport in the rabbit lens. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 26 **(1985)** 1032-1034
33. Hightower KR, McCready J: Physiological Changes in Rabbit Lenses Exposed to Ultraviolet Light. In Vrensen GFJM, Clauwaert J (Hrsg): *Eye Lens Membranes and Aging*, Topics in aging research in europe, volume 15, Eurage, Leiden, **1991**, 21-31
34. Hightower K, McCready J: Selenite-induced damage to lens membranes. *Exp Eye Res* 58 **(1994)**, 225-229
35. Hightower K, Reddan JR, McCready J, Dziedzic DC: A primary target of UVB irradiation. *Exp Eye Res* 59 **(1994)**, 557-564

36. Hockwin O: Multifactorial pathogenesis of „senile cataract“. Nova Acta Leopoldina NF 75, Nr. 299 **(1997)** 37-44
37. Hori T, Yamanaka Y, Hayakawa M, Shibamoto S, Oku N, Ito F: Growth inhibition of human fibroblasts by epidermal growth factor in the presence of arachidonic acid. *Biochem Biophys Res Commun* 29 **(1990)** 169 (3) 959-965
38. Hyman L: Epidemiology of eye disease in the elderly. *Eye* 1 **(1987)** 330-341
39. Iwig M, Gläßer D: DNA und Proteinbiosynthese in kultivierten Linsenepithelzellen I. Testsystem. *Acta Biol Med Germ* 34 **(1975)** 987-996
40. Jack-Hays MG, Xie Z, Wang Y, Huang WH, Askari A: Activation of Na⁺/K⁺-ATPase by fatty acids, acylglycerols, and related amphiphiles: structure-activity relationship. *Biochim Biophys Acta* 1279 **(1996)** 43-48
41. Jaffe NS, Horwitz J: Lens and cataract. In Podos SM, Yanoff M. (Hrsg): *Textbook of Ophthalmology*, Vol. 3. Gower Medical Publishing, New York, London, **1992**, S.1.2
42. Kelly RA, O'Hara DS, Mitch WE, Smith TW: Identification of NaK-ATPase inhibitors in human plasma as nonesterified fatty acids and lysophospholipids. *J Biol Chem* 261 **(1986)** No 25, 11704-11711
43. Kinsey VE, Reddy DVN: Studies on the crystallin lens. *Invest Ophthalmol* 4 **(1965)** 104-116
44. Kobatashi S, Roy D, Spector A: Sodium/potassium ATPase in normal and cataractous human lenses. *Curr Eye Res* 2 **(1982/1983)** 327-334
45. Lamers JMJ, Stinis HT, Montfoort A, Hülsmann WC: The effects of lipid intermediates on Ca²⁺ and Na⁺ permeability and (Na⁺ + K⁺)-ATPase of cardiac sarcolemma. A possible role in myocardial ischemia. *Biochim Biophys Acta* 774 **(1984)** 127-137

46. Li DWC: The lens epithelium, apoptosis and cataract formation. Nova Acta Leopoldina NF 75 **(1997)** Nr. 299, 81-108
47. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ: Protein measurement with folinphenol reagent. J Biol Chem 193 **(1951)** 265-275
48. Maraini G, Passino M: Active and passive rubidium influx in normal human lenses and in senile cataracts. Exp Eye Res 33 **(1983)** 543-550
49. Meier LS, Pieske B, Allen DG: Influence of stimulation frequency on $[Na^+]_i$ and contractile function in Langendorff-perfused rat heart. Am J Physiol 273 (Heart Circ Physiol 42) **(1997)** H1246-H1254
50. Minta A, Tsien RY: Fluorescent indicators for cytosolic sodium. J Biol Chem 264 **(1989)** No 32, 19449-19457
51. Medoff G, Brajtburg J, Kobayashi GS: Antifungal agents useful in therapy of systemic fungal infections. Annu Rev Pharmacol Toxicol 23 **(1983)** 303-330
52. Negulescu PA, Machen TE: Intracellular ion activities and membrane transport in parietal cells measured with fluorescent dyes. Methods-Enzymol 192 **(1990)** 38-81
53. Ng LL, Hockaday TDR: Non-esterified fatty acids may regulate human leucocyte sodium pump activity. Clin Sci 71 **(1986)** 737-742
54. Pasino M, Maraini G: Cation pump activity and membrane permeability in human senile cataractous lenses. Exp Eye Res 34 **(1982)** 887-893
55. Philipson KD, Ward R: Effects of fatty acids on Na^+-Ca^{2+} exchange and Ca^{2+} permeability of cardiac sarcolemmal vesicles. J Biol Chem 260 **(1985)** Vol 17, 9666-9671

56. Ramasamy S, Boissonneault GA, Decker EA, Hennig B: Linoleic acid-induced endothelial cell injury: role of membrane-bound enzyme activities and lipid oxidation. *J Biochem Toxicol* 6(1) **(1991)** 29-35
57. Ring TJ, Montecuccoc, Hesketh TR, Tsien RY: Lymphocyte membrane potential assessed with fluorescent probes. *Biochim Biophys Acta* 595 **(1980)** 15-30
58. Sagar PS, Das UN, Koratkar R, Ramesh G, Padma M, Kumar GS: Cytotoxic action of cis-unsaturated fatty acids on human cervical carcinoma (HeLa) cells: relationship to free radicals and lipid peroxidation and its modulation by calmodulin antagonists. *Cancer-Lett* 30 **(1992)** 63(3), 189-198
59. Schuurmans Stekhoven F, Bonting SL: Transport adenosine triphosphatases: properties and functions. *Physiol Reviews* 61 **(1981)** 1-28
60. Sebastiao A: Einfluß von Linolsäure auf die Struktur und Funktion von Endothelzellen. Diplomarbeit, Martin-Luther-Universität, Halle **(1996)**
61. Sen PC, Pfeiffer DR: Characterization of partially purified (Na⁺ + K⁺)-ATPase from porcine lens. *Biochim Biophys Acta* 693 **(1982)** 34-44
62. Skou JC: The influence of some cations on an adenosine triphosphatase from peripheral nerves. *Biochem Biophys Acta* 23 **(1957)** 394-401
63. Staub F, Winkler A, Peters J, Kempfski O, Kachel V, Baethmann A: Swelling, acidosis, and irreversible damage of glial cells from exposure to arachidonic acid in vitro. *J Cereb Blood Flow Metab* 14(6) **(1994)** 1030-1039
64. Stewart DJ, Sen AK: Role of cyclic GMP in cholinergic activation of Na-K pump. *Am J Physiol* 240 (Cell Physiol 9) **(1981)** C207-C214
65. Skehan P: Assays of cell growth and cytotoxicity. In Studzinski GP (Hrsg): *Cell Growth and Apoptosis, The practical approach series*, Oxford University Press, Oxford, New York, Tokyo, **1995**, S. 169-191

66. Swarts HGP, Schuurmans Stekhoven FMAH, De Pont JJHHM: Binding of unsaturated fatty acids to Na^+, K^+ -ATPase leading to inhibition and inactivation. *Biochim Biophys Acta* 1024 **(1990)** 32-40
67. Tamura M, Kuwano H, Kinoshita T, Inagami T: Identification of linoleic and oleic acids as endogenous Na^+, K^+ -ATPase inhibitors from acute volume-expanded hog plasma. *J Biol Chem* 260 **(1985)** No 17, 9672-9677
68. Tal DM, Yanuck MD, Hall G, Karlish SJD: Identification of Na^+/K^+ -ATPase inhibitors in bovine plasma as fatty acids and hydrocarbons. *Biochim Biophys Acta* 985 **(1989)** 55-59
69. Toborek M, Blanc EM, Kaiser S, Mattson MP, Hennig B: Linoleic acid potentiates TNF-mediated oxidative stress, disruption of calcium homeostasis, and apoptosis of cultured vascular endothelial cells. *J Lipid Res* 38 (10) **(1997)** 2155-2167
70. Tomlinson J, Bannister SC, Croghan PC, Duncan G: Analysis of rat lens $^{45}\text{Ca}^{++}$ fluxes: evidence for $\text{Na}^+/\text{Ca}^{++}$ exchange. *Exp Eye Res* 52 **(1991)** 619-627
71. Voet D, Voet JG: Biochemistry. In Maelicke A, Müller-Esterl W. (Hrsg): Biochemie. VCH, Weinheim, New York, Basel (usw.), **1992**, S.487, S. 492
72. Winckler J: Vitalfärbung von Lysosomen und anderen Zellorganellen der Ratte mit Neutralrot. In Graumann W, Lojda Z, Pearse AGE, Schiebler TH (Hrsg): Progress in histochemistry and cytochemistry, Vol 6, No 3, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, **1973**
73. Ye JJ, Zadunaisky JA: Study of the $\text{Ca}^{2+}/\text{Na}^+$ exchange mechanism in vesicles isolated from apical membranes of lens epithelium of spiny dogfish (*squalus acanthias*) and bovine eye. *Exp Eye Res* 55 **(1992 a)** 243-250

74. Ye JJ, Zadunaisky JA: A Na^+/H^+ exchanger and its relation to oxidative effects in plasma membrane vesicles from lens fibers. Exp Eye Res 55 **(1992 b)** 251-260
75. Ye JJ, Zadunaisky JA: $\text{Ca}^{2+}/\text{Na}^+$ exchanger and $\text{Na}^+, \text{K}^+ 2\text{Cl}^-$ cotransporter in lens fiber plasma membrane vesicles. Exp Eye Res 55 **(1992 c)** 797-804
76. Young A, Giesbrecht E, Soldin SJ: A study of lipid effects on the digoxin immunoassay and on the binding to and activity of Na^+/K^+ -ATPase. Clin Biochem 19 **(1986)** 195-200

CHEMIKALIEN- UND GERÄTEVERZEICHNIS

Chemikalienverzeichnis

- Aceton, Laborchemie Apolda
- Adenosintriphosphat (ATP), Sigma, Deisenhofen
- Albumin (Rinderserumalbumin), Serva, Heidelberg
- Amoniummolybdat, Labor- und Feinchemikalien
- Amphotericin B, Sigma, Deisenhofen
- Arachidonsäure, Sigma, Deisenhofen
- Auflösungspuffer, PromoCell, Heidelberg
- Calciumchlorid, Merck, Darmstadt
- Dimethylsulfoxid (DMSO), Sigma, Deisenhofen
- Elaidinsäure, Sigma, Deisenhofen
- Ethanol, Laborchemie Apolda
- Ethylarachidonat, Sigma, Deisenhofen
- Ethylendiamintetraacetat (EDTA), Sigma, Deisenhofen
- Ethyllinoleat, Sigma, Deisenhofen
- Ethyllinolenat, Sigma, Deisenhofen
- Ethyloleat, Sigma, Deisenhofen
- Foetales Kälberserum (FKS), c.c.pro, Karlsruhe
- Folinreagenz, Pharmazeitica, Leipzig
- Glucose, Laborchemie Apolda
- Gramicidin D, Sigma, Deisenhofen
- Hanks´ balanced salt solution (modified), Sigma, Deisenhofen
- Kaliumchlorid, Sigma, Deisenhofen
- Kaliumdihydrogenphosphat, Riedel-De Haen AG
- Kaliumgluconat, Sigma, Deisenhofen
- Kaliumhydrogentartrat, Laborchemie Apolda
- Kupfersulfat, Laborchemie Apolda
- Laurinsäure, Sigma, Deisenhofen
- Linolensäure, Sigma, Deisenhofen

- Linolelaidinsäure, Sigma, Deisenhofen
- cis-Linolsäure, Sigma, Deisenhofen
- Magnesiumchlorid, Sigma, Deisenhofen
- Magnesiumsulfat, Sigma, Deisenhofen
- Malachitgrün, Feinchemie K.-H. Kallies KG
- Minimum Essential Medium Eagle (MEM), Sigma, Deisenhofen
- Myristinsäure, Sigma, Deisenhofen
- Natriumcarbonat, Sigma, Deisenhofen
- Natriumchlorid, Sigma, Deisenhofen
- Natriumgluconat, Sigma, Deisenhofen
- Natriumhydroxid (Titrisol-Ampulle), Merck, Darmstadt
- Neutralrot, PromoCell, Heidelberg
- (2-Hydroxyethyl)piperazin-N'-2-Ethan-Sulfonsäure (HEPES), Sigma, Deisenhofen
- N-Methyl-D-Glucamin (NMG), Sigma, Deisenhofen
- Palmitinsäure, Sigma, Deisenhofen
- Palmitoleinsäure, Sigma, Deisenhofen
- Penicillin G, Jenapharm, Jena
- Pluronic, Molecular Probes, Leiden, Niederland
- Ölsäure, Sigma, Deisenhofen
- Ouabain, Sigma, Deisenhofen
- Sacharose, Labor- und Feinchemikalien
- Salzsäure (Titrisol-Ampulle), Merck, Darmstadt
- SBF1 (sodium-binding benzofuran isophthalate), Molecular Probes, Leiden, Niederland
- Stearinsäure, Sigma, Deisenhofen
- Streptomycin, Jenapharm, Jena
- Trichloressigsäure (TCE), Ferak, Berlin
- Tris, Labor- und Feinchemikalien
- Triton-X100, Ferak, Berlin
- Wasch/Fixierlösung, PromoCell, Heidelberg

Geräte- und Hilfsmittelverzeichnis

- Attofluor Image intensification charge couple device sensing system (ICCD) Camera, Atto Instruments Inc., USA
- Attofluor RatioVision Imaging System, Atto Instruments Inc., USA
- Biofuge RS, Heraeus, Hanau
- CO₂-Inkubator 3149, Forma Scientific Marietta-Ohio, USA
- CP-7m Multi-Program SLR Camera, Chinon, Tokyo, Japan
- G 24 Environmental Incubator Shaker, New Brunswick Scientific, Edison, USA
- Gewebekulturflaschen und -schälchen, Greiner, Nürtingen
- Laminarbox Hera safe, Heraeus, Hanau
- Mikroskop Axiovert 100, Zeiss, Oberkochen
- POC-Kammer (Perfusion open closed chamber), Bachofer, Reutlingen
- Spektralphotometer UV-1610 UV/Visible, Shimadzu, Tokyo, Japan
- Standard pH-Meter PHM 210, Radiometer Kopenhagen, Dänemark
- Sterile Plastikpipetten (12 ml), Greiner, Nürtingen
- Ultrazentrifuge Spinco L2-65 B, Beckman
- Xenon Kurzbogenlampe XBO 75 W, Zeiss, Oberkochen
- Zählkammer Fuchs-Rosenthal, Fein-Optik, Bad Blankenburg
- Zellkulturplatten, Falcon

Aus dem Institut für Physiologische Chemie
an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
(Direktor: Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. habil. T. Braun)

THESEN DER DISSERTATION

EINFLUß VON CIS-LINOLSÄURE AUF DIE AKTIVITÄT UND FUNKTION DER
NA,K-ATPASE VON EPITHELZELLEN DER AUGENLINSE

zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Medizin (Dr. med.)

vorgelegt
der Medizinischen Fakultät
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Thi Nguyet Nga Nguyen
geboren am 06.05.1967 in Ha Son Binh, Vietnam

1. Die Zytotoxizität von verschiedenen Fettsäuren wurde an subkultivierten Linseneithelzellen mit Zellablösungstest und Neutralrot-Test charakterisiert. Bei beiden Testen bewirkte cis-Linolsäure schon mit 10 $\mu\text{mol/l}$ Zellschädigungen.
2. Die anderen untersuchten ungesättigten nicht veresterten Fettsäuren (Arachidonsäure, Linolensäure, Ölsäure und Palmitoleinsäure) wirkten ebenfalls zytotoxisch, wobei der stärkste Zellschädigungseffekt von Arachidonsäure ausgeht.
3. Vergleich zwischen cis- und trans-Isomeren ungesättigter Fettsäuren ergab eine stärkere Zytotoxizität der cis-Konfigurierten.
4. Die untersuchten gesättigten bzw. veresterten ungesättigten Fettsäuren zeigten keine Zellschädigungswirkungen. Daher scheint das Vorhandensein von Doppelbindung(en) und einer freien Carboxylgruppe die Voraussetzung für die Zytotoxizität von Fettsäuren auf Linseneithelzellen zu sein.
5. Unter Einwirkung von cis-Linolsäure wiesen Linseneithelzellen morphologisch-mikroskopische Änderungen auf, die für einen apoptotischen Zelltod sprechen, wie Kernpyknose und Zellretraktion.
6. Die Aktivität der Na,K-ATPase wurde in Zellhomogenaten und in teilgereinigten Plasmamembranfraktionen von subkultivierten Linseneithelzellen untersucht. Im Zellhomogenat betrug der Anteil der Na,K-ATPase 18,5 % an der Gesamtaktivität der erfaßten ATPasen. Durch die Reinigung der Membranfraktionen mit Hilfe der Differentialzentrifugation konnte dieser Anteil auf 42,1 % erhöht werden.
7. Die spezifische Aktivität der Na,K-ATPase in teilgereinigten Membranfraktionen der subkultivierten Linseneithelzellen von Rinderaugen betrug 9,7 nmol P_i /min/mg Protein.

8. cis-Linolsäure bewirkte mit 100 $\mu\text{mol/l}$ eine Hemmung der Na,K-ATPase-Aktivität um 51,7 %, während mit 10 $\mu\text{mol/l}$ cis-Linolsäure eine Aktivierung des Enzyms um 40,7 % nachgewiesen wurde.
9. Mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie unter Anwendung des Farbstoffs SBFI (sodium-binding benzofuran isophthalate) und des Aufzeichnungs- und Auswertungssystems Attofluor RatioVision Imaging wurde die intrazelluläre Natriumkonzentration in intakten subkultivierten Linsenepithelzellen untersucht. Die Methode wurde damit erstmalig an Linsenepithelzellen angewendet und hat sich als eine geeignete, empfindliche Möglichkeit zur Untersuchung der intrazellulären Konzentration von freien Natriumionen erwiesen.
10. Unter Anwendung der Ionophore Gramicidin D und Amphotericin B wurde intrazelluläre SBFI-Kalibrierung durchgeführt, die eine quantitative Erfassung der Natriumkonzentration in intakten Zellen erlaubt.
11. Mit Hilfe der Kalibrierungskurve wurde die basale intrazelluläre Natriumkonzentration in Linsenepithelzellen bestimmt, sie liegt bei 3,14 mmol/l. Im Unterschied zu den bisherigen Ergebnissen in der Literatur stellt dieser Wert nicht einen Mittelwert des Natriumgehalts verschiedener Linsenregionen dar, sondern die Konzentration von freien Natriumionen, die in einzelnen intakten Linsenepithelzellen ermittelt wurde. Daher kann angenommen werden, daß dieser Wert die physiologische basale intrazelluläre Natriumkonzentration der Linsenepithelzellen annähernd wiedergibt.
12. Die intrazelluläre Natriumkonzentration wurde unter Zusatz von 100 $\mu\text{mol/l}$ cis-Linolsäure in HBS nicht verändert.
13. Durch Inkubation in K^+ -freiem HBS konnte die Na,K-ATPase ausgeschaltet werden, sodaß unter diesen Bedingungen das Ausmaß des passiven Na^+ -Influx in die Zelle direkt als ein Anstieg der intrazellulären

Natriumkonzentration erfaßt werden konnte. Die Influxrate betrug 0,21 mmol/l Na⁺/min.

14. Der Anstieg der intrazellulären Natriumkonzentration bei der Inkubation der Zellen in K⁺-freiem HBS wurde durch Zusatz von 100 µmol/l cis-Linolsäure stark erhöht. Die Influxrate betrug bei diesen Untersuchungen 6,06 mmol/l Na⁺/min. Damit bewirkte 100 µmol/l cis-Linolsäure eine Erhöhung des passiven Na⁺-Influx um ca. 28-fach.

15. Das Ausbleiben einer Erhöhung der intrazellulären Natriumkonzentration unter Zusatz von 100 µmol/l cis-Linolsäure in HBS bedeutet, daß unter diesen Bedingungen die Na,K-ATPase noch in der Lage ist, den stark erhöhten passiven Na⁺-Influx zu kompensieren. Dies weist darauf hin, daß mit 100 µmol/l cis-Linolsäure die Transportfunktion der Na,K-ATPase wahrscheinlich nicht oder nicht wesentlich beeinträchtigt wird.

16. Bei den Zytotoxizitätstesten zeigte cis-Linolsäure schon mit 10 µmol/l Zellschädigungen, während die Aktivität der Na,K-ATPase bei Anwesenheit von 10 µmol/l cis-Linolsäure und die Funktion des Enzyms selbst mit 100 µmol/l cis-Linolsäure nicht gehemmt wird und die intrazelluläre Natriumkonzentration unverändert bleibt. Daraus kann geschlossen werden, daß die zytotoxischen Wirkungen von cis-Linolsäure gegenüber Linsenepithelzellen nicht auf eine Beeinträchtigung der Aktivität und Funktion der Na,K-ATPase zurückzuführen ist.

17. Der Na⁺-Influx-erhöhende Effekt von cis-Linolsäure wurde auch bei Arachidonsäure beobachtet.

Hiermit erkläre ich, daß ich diese Promotionsarbeit selbständig angefertigt habe und daß ich nur solche Mittel und Quellen benutzt habe, die in der Arbeit ausdrücklich angeführt sind.

Darmstadt, den 30. März 1999

Hiermit erkläre ich, daß von mir nur dieses Promotionsverfahren beantragt wurde.

Darmstadt, den 30. März 1999

Ergebnisse meiner Promotionsarbeit wurden in folgenden Artikeln veröffentlicht:

- Glanz D, Gläßer D, Lennarz B, Nguyen N: Low concentration of cis-linoleic acid induce intracellular calcium rise and cell damage in bovine lens epithelial cells. Nova Acta Leopoldina NF 75, Nr. 299 (1997) 113-120
- Nguyen N, Glanz D: Fettsäuren als Risikofaktoren? Innovation, das Magazin von Carl Zeiss, Nr. 4 (1998) 13-15

LEBENS LAUF

Name: Thi Nguyet Nga Nguyen
Geburtsdatum: 06.05.67
Geburtsort: Ha Son Binh, Vietnam

Ausbildung:

1973 - 1983 Schulbesuch in Hanoi, Vietnam, Abschluß: Abitur
1983 - 1984 Sprachkurs „Deutsch Intensiv“ an der Hochschule für
Fremdsprachen Hanoi, Vietnam
1984 - 1985 Vorbereitungskurs auf das Hochschulstudium, am
Herder-Institut der Karl-Marx-Universität Leipzig

Studium:

1985 - 1991 Medizinstudium an der Martin-Luther-Universität
Halle-Wittenberg
Prädikat: Gut

Berufstätigkeiten:

1991 - 1993 Tätigkeit als Ärztin im Praktikum im Inneren
Krankenhaus Wettin und am Pathologischen Institut
des Krankenhauses Halle/Dölau
Seit 1995 Tätigkeit als Doktorandin am Institut für physiologische
Chemie an der Martin-Luther-Universität Halle-
Wittenberg
Seit 1998 Lehrtätigkeit für medizinische Fächer in
der Erwachsenenbildung

Darmstadt, den 30.03.1999

Thi Nguyet Nga Nguyen

DANKSAGUNG

Herrn Prof. Dr. med. habil. D. Gläßer, meinem Mentor, möchte ich herzlich danken für die Überlassung des Themas, für die Anregung und Unterstützung bei der Ausarbeitung der Thematik sowie für die hilfreichen Diskussionen und die wertvollen Ratschläge bei der Anfertigung der Arbeit.

Mein Dank gilt Herrn Dr. rer. nat. D. Glanz für die Einführung in die Methodik der Fluoreszenzmikroskopie und für die Unterstützung bei der Arbeit am Attofluor RatioVision.

Herrn Prof. Dr. med. habil. M. Iwig danke ich für die Unterstützung bei der Arbeit am Phasenkontrastmikroskop sowie für die Beratung zum Thema Zellkultivierung.

Frau G. Zschau, Frau B. Michel, Frau A. Thate und Frau Säger gilt mein Dank für ihre vielfältigen Hilfestellungen während meiner Arbeit am Institut für Physiologischen Chemie.

Ich hatte die Möglichkeit, die Promotionsarbeit im Rahmen des durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft geförderten Graduiertenkollegs „Transport von Wirkstoffen in biologischen Systemen“ durchzuführen; dafür möchte ich mich bedanken.

Mein besonderer Dank gilt meinem Mann Vu Dinh Hung für sein Verständnis und seine Unterstützung während meines Promotionsstudiums.