

3. Material und Methoden

3.1. Chemikalien

· Zellzucht

Dulbecco's Minimum Essential Medium: DMEM with Glutamax-1, high Glucose; Gibco BRL, Life Technologies

Fötales Kälberserum: FCS, Lot No: A01125-427; PAA Laboratories GmbH

Penicillin/Streptomycin; Gibco BRL, Life Technologies

Trypsin/EDTA-Lösung: Trypsin-EDTA; Gibco BRL, Life Technologies

PBS: phosphat buffered saline; Gibco BRL, Life Technologies

Trypanblau-Lösung: Trypan Blue 0,5%; PAA Laboratories GmbH

EDTA: 0,05% EDTA in PBS; Gibco BRL, Life Technologies

Einfriermedium (mit 10 % DMSO); Gibco BRL, Life Technologies

· Textilextraktion

Natriumchlorid; Merck

Natriumdihydrogenphosphathydrat x Wasser

L-Histidinmonohydrochlorid x Wasser

Natriumhydroxidlösung (0,1 M) zur pH-Einstellung

· Trennung eines Textilextraktes

Chloroform; Merck

Methanol; Merck

Hexan; Roth

Kieselgel 60

· Atmungsmessung

Meßmedium: DMEM/Hepes; Gibco BRL, Life Technologies

2-Methoxyethanol; Merck

Oligomycin (Endkonzentration: 3,0 µMol; Stammlösung: 1,8 mMol); Sigma

Carbonylcyanid-3-chlorphenylhydrazon (CCCP)

(Endkonzentration: 4,0 µMol; Stammlösung: 2,4 mMol); Sigma

Antimycin A (Endkonzentration: 7,7 µMol; Stammlösung: 4,62 mMol); Serva

· **Daphnientest**

Kalziumchlorid, $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$

Kaliumchlorid, KCl

Kaliumdichromat, $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$

Magnesiumsulfat, $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$

Natriumhydrogencarbonat, NaHCO_3

· **Leuchtbakterientest**

2% wäßrige Natriumchloridlösung (Verdünnungswasser)

1 M Natriumhydroxid

1 M Salzsäure

3.2. Biologisches Material

· **Keratinocytenzelllinie**

HaCaT (Dr. Rosenbach, Virchow-Klinikum Berlin, Dermatologie)

· **Kleinkrebse**

Daphnia Magna STRAUS (LFU GmbH Schönwalde)

· **Leuchtbakterien**

Photobakterium phosphoreum NRRL B – 11177 (LFU GmbH Schönwalde)

3.3. Geräte

- Textilextraktion

Probenschüttler CERTOMAT R; B. Braun

Osmometer Automatic; Knauer

Calimatic pH-Meter 761; Knick

- **GC/MS**

IST 40 Finnigan GC-MS-System

- **Zellzucht**

Brutschrank: Heraeus Instruments

Sterilbox: antair BSK

Zentrifuge: Sorvall TC; Du Pont

Mikroskop: Olympus CK2, Objektiv 20x

- **Atmungstest**

Oxygen meter Model 781; Strathkelvin Instruments

- **Daphnientest**

pH-Meßgerät

Sauerstoffmeßgerät

Siebsatz mit Siebgewebe aus Chemiefasern DIN 419S, Maschenweite 0,65 - 0,20 mm

- **Leuchtbakterientest**

Thermostat mit Thermoblock

Lumimometer, Meßzelle auf $15 \pm 0,2^\circ\text{C}$ thermostatiert, geeignete Glasküvetten

pH-Meßgerät

Reagenzglasschüttler

3.4. Probenvorbereitung und –extraktion

3.4.1. Herstellen der Textilextrakte

- **Schweiß sauer, DIN 54020**

5,00 g Natriumchlorid, 1,95 g Natriumdihydrogenphosphathydrat und 0,50 g L-Histidinmonohydrochloridhydrat werden in 800 ml destilliertem Wasser gelöst, der pH-Wert der Lösung mit einer 0,1 M Natriumhydroxidlösung auf pH 5,5 eingestellt und anschließend auf 1000 ml mit destilliertem Wasser aufgefüllt.

- **Textilextraktion**

100 g der grob zerkleinerten Textilprobe werden mit 1000 ml Schweiß sauer versetzt und 24 Stunden bei einer Temperatur von 37°C und 150 U/min⁻¹ im Probenschüttler Certomat R geschüttelt. Nach Beendigung der Extraktion wird die Lösung von den Textilrückständen mit Hilfe eines Papierfilters getrennt.

- **pH-Wert und Osmolarität der Extrakte**

Durch Zugabe von 0,1 M Natriumhydroxidlösung werden die Extrakte auf pH 7,4 eingestellt. Anschließend wird durch Zugabe der entsprechenden Menge kristallinem Natriumchlorids die Osmolarität des Extrakts auf 300 mOsmol/Liter gebracht.

3.4.2. Herstellen der Teppich- und Buchextrakte

- **Teppiche**

Nach sorgfältiger Trennung der Fasern von der Teppichunterlage (Schaumstoff o.ä.) erfolgt die Extraktion der Proben wie unter 3.4.1. beschrieben.

Zur Vorbereitung der Proben für die GC/MS-Analyse wird eine Heißextraktion der Teppichfasern und eine anschließende Extraktreinigung mittels Gelchromatographie (*Florisil*-Fertigsäule) durchgeführt.

· **Bücher**

Der Querschnitt eines Buches, das heißt sowohl Umschlag als auch Seiten mit Druck und Bildern, wird zerkleinert und wie unter 3.4.1. beschrieben extrahiert.

3.4.3. Herstellen der Substanzlösungen und Kosmetikinhaltstoffproben

Die Reinsubstanzen bzw. Kosmetikinhaltstoffproben werden, sofern nicht wasserlöslich in 2-Methoxyethanol gelöst und direkt im Keratinozytenatmungstest eingesetzt. Dabei werden Stammlösungen von 1 M hergestellt und je nach Wirkung im Keratinozytenatmungstest weiter verdünnt.

3.5. Analytik der Extrakte

Die Identifikation der Probeninhaltsstoffe erfolgt mittels Gaschromatografie-Massenspektrometrie. Dazu werden 500 ml des Textilextraktes mit 50 ml Chloroform extrahiert und unter vermindertem Druck fast vollständig eingeeengt. Der so erhaltene Rückstand wird in 1 ml Chloroform aufgenommen und mit Hilfe der GC/MS-Apparatur IST 40 Finnigan GC-MS-System (Massenbereich: 1 - 650 amu) untersucht.

Das Probengemisch wird an einer schwach polaren Trennsäule (DB5MS, Länge: 30 m, Durchmesser: 0,25 mm, Filmdicke: 25 µm, Temperaturregime: 60°C – 300°C mit 6°C/min, Vorsäulendruck: 15 psi) mit Helium als Trägergas chromatografiert.

Die Auswertung der erhaltenen Massenspektren erfolgt mit Hilfe der Spektrenbibliothek NIST.

3.6. Trennung des Textilextraktes

· Blight-Dyer-Extraktion

1 ml Textilextrakt, 1,25 ml Chloroform, 2,5 ml Methanol werden pipettiert, ca. 1 min kräftig geschüttelt (Vortex), ca. 5 min. stehengelassen und nach Zugabe von 1,25 ml Chloroform und 1,25 ml PBS noch einmal 1 min kräftig geschüttelt. Nach einer kurzen Zentrifugation (ca. 5min. bei 500*g) werden die Phasen getrennt im Keratinozytenatmungstest getestet. Die organische Unterphase wird einer weiteren Trennung durch Säulenchromatografie unterworfen.

· Säulenchromatografie

Eine Säule (Durchmesser: 2cm; Länge: 10 cm; Volumen: 31,4 cm³) wird mit Kieselgel 60 gefüllt. Die Probe, d. h. die eingeeengte organische Unterphase nach der Blight-Dyer-Extraktion, wird aufgetragen und nacheinander mit einem Laufmittelgemisch von je 150 ml Hexan : Chloroform 19:1; Hexan : Chloroform 2:1, Chloroform : Hexan 2:1, Chloroform : Hexan 19:1, Methanol getrennt. Man erhält 5 Fraktionen zu je 150 ml.

3.7. Zellzucht

Die Kultivierung von Zellen erfolgt zur Vermeidung von Pilz- und Bakterieninfektionen ausschließlich unter sterilen Bedingungen. Mikroskopische Kontrollen der Zellen bezüglich der Wachstumsgeschwindigkeit und eventueller Infektionen sind vor jedem Arbeitsschritt durchzuführen. [18]

· Zellkultivierung

Die HaCaT-Zellen werden in DMEM mit 5% FCS, 1% Penicillin/Streptomycin und 0,5% Glutamin bei 37°C und 5% CO₂ in Gewebekulturschalen (145 cm², Falcon) bzw. Kulturflaschen (75 cm², Falcon) gehalten. Der Wechsel des Kulturmediums erfolgt alle 2 bis 3 Tage. Zum Keratinozytenatmungstest finden nur solche Zellen Verwendung, deren Alter zwischen 20 und 80 Passagen liegt.

· **Zellernte**

Nach 10 bis 14 Tagen werden die HaCaT-Zellen geerntet. Dazu wird das verbrauchte Medium abgesaugt, 5 bis 10 Minuten mit Trypsin inkubiert, bis die Zellen sich aus dem Zellverband bzw. von der Unterlage ablösen. Mit FCS-haltigem DMEM wird die Trypsinreaktion unterbrochen. Die Zellsuspension wird 10 Minuten bei 400 g zentrifugiert (Falcontubes 50 ml), der Überstand abgesaugt und das Zellpellet in 1ml DMEM aufgenommen. Anschließend wird die Zellzahl mittels Neubauer-Zählkammer und Trypanblaufärbung zur Erkennung von abgestorbenen Zellen bestimmt. Die Ausbeute an HaCaT-Zellen beträgt ca. 12 Millionen Zellen auf 100 cm² Kulturfläche. Die so gewonnene Suspension wird im Eisbad gekühlt und gelegentlich geschüttelt. Sie kann so für mehrere Stunden für die Atmungsmessung verwendet werden.

· **Passagieren der Zellen**

Die Zellvermehrung erfolgt nach 7 Tagen. Nach dieser Zeitspanne sind die Zellen konfluent, daß heißt lückenlos auf der Unterlage gewachsen. Das Medium wird aus den Kulturgefäßen entfernt und die Zellen mit 0,05% EDTA-haltiger PBS-Lösung gewaschen. Nach der Trypsinbehandlung werden sie im Verhältnis 1:10 im Kulturmedium ausgesät. Der erste Mediumwechsel erfolgt nach 10 bis 24 Stunden.

· **Cryokonservierung der Zellen**

Die Cryokonservierung der Zellen ist notwendig, damit für die Atmungsmessung auf Zellen der 20. bis 80. Passage zurückgegriffen werden kann und bei einer Unterbrechung der Zellvermehrung genügend Ausgangszellen zur Verfügung stehen.

Die frisch geernteten Zellen werden zentrifugiert (10 Minuten, 400 g) und das Pellet in DMSO-haltigen Einfriermedium aufgenommen ($2 \cdot 10^6$ Zellen/ml) und in Cryotubes (2 ml, Falcon) überführt. Nach 1 bis 2 Stunden im Kühlschrank (3 bis 5°C), 12 Stunden im Tiefkühlschrank (-78°C) werden die Cryotubes in flüssigem Stickstoff gelagert. Zum Auftauen werden die Tubes zügig auf 37°C erwärmt und die Zellen in DMEM ausgesät. Nach einigen Stunden erfolgt ein Mediumwechsel, um die abgestorbenen Zellen und das DMSO zu entfernen.

3.8. Atmungstest

· Durchführung

Die Messung des Sauerstoffverbrauchs erfolgt mikrooxigrafisch mittels Clark-Elektrode. Von den Standardwirkstoffe (Oligomycin, CCCP und Antimycin A) und von den zu untersuchenden Substanzproben werden vor der Messung Stammlösungen in 2-Methoxyethanol hergestellt. Für die Messung wird in eine auf 37°C temperierte Meßkammer (Volumen: 600 µl) Meßmedium (DMEM/HEPES) gegeben. Mit dem Elektrodenaufsatz wird die Meßkammer luftdicht und blasenfrei verschlossen. Nacheinander werden während der Messung die Zellsuspension (eine Millionen Zellen), die Probenlösung, 1 µl Oligomycin (3,0 µMol Endkonz.), 1 µl CCCP (4,0 µMol Endkonz.) und 1 µl Antimycin A (7,7 µMol Endkonz.) mittels Mikroliterspritzen und Kapillarschlauch (Teflon) unter ständigem Rühren zugegeben. Der Sauerstoffverbrauch wird aufgezeichnet und die Anstiege der daraus resultierenden Kurven ermittelt. Alle vier bis sechs Messungen werden Kontrollmessungen ohne Textilextrakte bzw. Substanzlösungen vorgenommen, um das intakte Atmungsprofil der Zellen zu überprüfen. Sinkt die Atmung der HaCaT-Zellen nach CCCP-Zugabe auf weniger als 120 % gegenüber der Basalatmung, so sind weitere Messungen nicht mehr bzw. nur noch bedingt für die Auswertung verwendbar. Die Konzentrationen der Textilextrakte werden in ppm angegeben. Dies sind quasi-ppm; weil angenommen wird, daß die Gesamtmenge der Textilprobe bzw. der Inhaltsstoffe in dem Extraktionsmittel gelöst ist.

· Auswertung

Der an die Clark-Elektrode angeschlossene Schreiber zeichnet die Veränderung der Sauerstoffkonzentration in Abhängigkeit von der Zeit auf. Aus diesen Anstiegen kann man die unterschiedlichen Atmungsparameter berechnen.

$$\boxed{\text{Wert}_{[\text{Basalatmung}]}} = \boxed{\text{Wert}_{[\text{Gesamtsauerstoffverbrauch nach Zugabe der Zellsuspension}]}} - \boxed{\text{Wert}_{[\text{Sauerstoffverbrauch nach Antimycin A-Zugabe}]}}$$

$$\text{Hemmung der Basalatmung durch Extrakt/Substanz} = \frac{\left[\text{Wert}_{[\text{Gesamtsauerstoffverbrauch nach Zugabe des Extraktes}]} - \text{Wert}_{[\text{Sauerstoffverbrauch nach Antimycin A-Zugabe}]} \right] * 100 \%}{\text{Wert}_{[\text{Basalatmung}]}}$$

$$\text{Entkopplerstimulierung} = \frac{\left[\text{Wert}_{[\text{Gesamtsauerstoffverbrauch nach CCCP-Zugabe}]} - \text{Wert}_{[\text{Sauerstoffverbrauch nach Antimycin A-Zugabe}]} \right] * 100 \%}{\text{Wert}_{[\text{Basalatmung}]}}$$

$$\text{Hemmung der entkoppelten Atmung durch Extrakt/Substanz} = \frac{\text{Wert}_{[\text{Basalatmung}]} * \text{Entkopplerstimulierung}}{\left[\text{Wert}_{[\text{Gesamtsauerstoffverbrauch nach Zugabe des Extraktes und CCCP}]} - \text{Wert}_{[\text{Sauerstoffverbrauch nach Antimycin A-Zugabe}]} \right] * 100 \%}$$

Die Dosis-Wirkungsbeziehungen werden aus den Hemmungen der Basal- bzw. entkoppelten Atmung in Abhängigkeit von den eingesetzten Konzentrationen der Extrakte bzw. Substanzen ermittelt. Die Berechnungen werden mit dem Programm SIMFIT durchgeführt. Dabei wird aus einer festgelegten Kurve diese soweit angepaßt, bis eine optimale Anpassungskurve an die Datenpunkte gefunden wird. [19] Aus diesen Kurvenberechnungen ist dann der IC₅₀-Wert mit den Standardabweichungen zu entnehmen.

3.9. Leuchtbakterientest

· Herstellung der Bakteriensuspension

Für die Rekonstitution der Leuchtbakterien wird 1 ml Wasser in einer Glasküvette auf $3 \pm 3^\circ\text{C}$ gekühlt und das gesamte Volumen auf einmal auf die konservierten Bakterien gegossen. Die Bakterien müssen dabei schlagartig mit dem Wasser in Berührung kommen, damit sie bei der Rehydratation nicht geschädigt werden. Die so erhaltene Leuchtbakteriensuspension kann nach einer Wartezeit von mindestens 5 Minuten weiterverwendet werden. Sie sollte ca. 10^8 Zellen je Milliliter enthalten und bei $3 \pm 3^\circ\text{C}$ aufbewahrt werden.

· Testdurchführung

500 μl der auf $15 \pm 0,2^\circ\text{C}$ temperierten 2% NaCl-Lösung wird in die Meßküvette gegeben, 10 μl Bakteriensuspension zugesetzt, geschüttelt und nach einer Angleichungszeit von mindestens 15 min die Leuchtintensität I_0 der einzelnen Testsuspensionen mit Hilfe des Luminometers bestimmt. Unmittelbar nach der Bestimmung der Leuchtintensität I_0 werden 500 μl der ebenfalls auf $15 \pm 0,2^\circ\text{C}$ gekühlten Proben hinzugefügt und erneut gut gemischt. Die Leuchtintensitäten werden nach 30 min (I_{30}) erneut bestimmt, es ist darauf zu achten, daß die Kontaktzeit aller Testansätze gleich lang ist!

3.10. Daphnientest (DIN 38412 - L11)

· Probenvorbereitung

Es werden je 25 ml wäßriger 0,08 M, 0,02 M, 0,03 M Natriumhydrogencarbonatlösung und 0,003 M Kaliumchloridlösung in einen Meßkolben pipettiert und mit dest. Wasser auf 1000 ml aufgefüllt. Anschließend wird die Lösung bis zum Erreichen der Sauerstoffsättigung belüftet.

Aus der zu untersuchenden Probe werden mit dem so erhaltenen Verdünnungswasser die Testlösungen unterschiedlicher Verdünnungsstufen hergestellt.

· Daphnienzucht

Die Zucht der Daphnien (Wasserflöhe) erfolgt in 2000 ml Bechergläsern in entchlortem, sauerstoffgesättigtem Trinkwasser bei diffusem Licht und 20 ± 2 °C. Dabei sollten nicht mehr als 100 Alttiere je Liter gehalten werden. Die Fütterung erfolgt täglich durch Zugabe einzelliger Grünalgen. Das Zuchtwasser wird ein- bis zweimal wöchentlich erneuert und die Jung- und Alttiere wie im folgenden beschrieben durch einen Siebsatz (Maschenweite 0,65 - 0,20 mm) voneinander getrennt.

Für den Daphnien-Kurzzeittest werden 6 bis 24 Stunden alte Daphnien verwendet. Dazu werden die ausgewählten Alttiere in ein Gefäß mit Zuchtwasser überführt und nach 18 Stunden abgeseibt (grobes Sieb), wobei nur die inzwischen geborenen Tiere das grobe Sieb passieren und dann auf dem feinen Sieb zurückgehalten werden. Die so erhaltenen Jungtiere werden mit wenig Wasser in ein Becherglas überführt und nach etwa 6 Stunden zum Test verwendet.

· **Testdurchführung**

20 ml Testlösung werden zur besseren Sauerstoffversorgung in Petrischalen pipettiert und je 10 Daphnien dazugegeben (Doppelbestimmung). In jede Testserie wird ein Kontrollansatz ohne Testgut einbezogen. Zum Ausschluß von Störungen bzw. ungeeigneter Testtiere wird zu jeder Testserie der EC_{50} -Wert von Kaliumdichromat bestimmt. Die Kontroll- und Testansätze bleiben 24 Stunden ohne Futterzugabe bei 20 ± 2 °C im Dunkeln stehen.

Nach Ablauf von 24 Stunden wird die Zahl der schwimmunfähigen Daphnien ermittelt. Die Testflüssigkeit wird dazu in leichte Bewegung versetzt. Zeigen Daphnien daraufhin keine Schwimmbewegungen, gelten sie als schwimmunfähig.

Die Dosis-Wirkungs-Kurven werden ähnlich wie beim Keratinozytenatmungstest bestimmt.