

2 MATERIAL UND METHODEN

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Agarosegeldetektionssystem Bio Doc Analyze	Biometra, Göttingen
Autoklav	Guwina Hofmann, Berlin
Brutschränke	Heraeus, Hanau
Dermatom	Aesculap, Tuttlingen
ELISA-Reader	Labsystems, Finnland
FACS-Calibur	Becton & Dickinson, Heidelberg
Filtrationseinheit Millipore®	Millipore-Waters, Eschborn
Fluoreszenzmikroskop Olympus BX-41	Zeiss, Oberkochen
Fluoreszenzmikroskop (invers) Axiovert 200	Zeiss, Jena
Bildbearbeitungssoftware Axiovision 3.1.3.1	Zeiss, Jena
Fraktionssammler RF III/SMTS 5000	Roth, Karlsruhe
Franz-Diffusionszelle, Ø 9mm, Durchfluss	Crown Scientific, Somerville, NJ
Franz-Diffusionszelle, Modell 4G-01-00-15-12 und Modell 4G-01-00-15-16-FT	PermeGear, Bethlehem, PA
HPLC LaChrom®-System	Merck-Hitachi, Darmstadt
Autosampler L-7200	
Interface L-7000	
Pumpe L-7100	
UV-Detektor L-7400	
Merck System-Manager-Software	
Locheisen, Ø 30mm	Bauhaus, Berlin
Magnetrührer IKAMAG® RO 5 Power	IKA®-Werke, Staufen
Monochrom-Kamera AxioCam HR, Version 5.05.10	Zeiss, Jena
Neubauer-Zählkammer (0,0025 mm ² /0,1 mm)	Zeiss, Jena
Phasenkontrast-Mikroskop Axiovert 135	Zeiss, Jena

pH-Meter 766 Calimatic	Knick, Nürnberg
Peristaltik-Kassettenpumpe Sarah®	Crown Scientific, Somerville, NJ
Pipetten Eppendorf Reference®	Eppendorf, Hamburg
Pipettierhilfe Pipetboy®	Integra Bioscience, Fernwald
Schüttler IKA® MTS 2	IKA®-Werke, Staufen
Sterilarbeitsbank LaminAir®	Heraeus, Hanau
Szintillationszähler 1450 Microbeta™ Plus	Wallac, Freiburg
Thermoblock	Biometra, Göttingen
Ultraschallbad Sonorex® RK 100	Bandelin, Berlin
Vakuum-Pumpe Universal Vacuum System Plus UVS 400A	Savant, Bethesda, MD
Vakuum-Zentrifuge Speed-Vac® Plus SC 110A	Savant, Bethesda, MD
Vortex-Gerät	Bender & Hobein, Zürich, Schweiz
Wasserbad DC10-P5/U	Haake, Karlsruhe
Wasser-Deionisierungsanlage Milli-Q®	Millipore-Waters, Eschborn
Wasserstrahlpumpe	Brand, Wertheim
Zentrifugen	
Megafuge® 1.0R	Heraeus, Hanau
Eppendorf 5415 C	Eppendorf, Hamburg

2.1.2 Reagenzien und Verbrauchsmaterialien

Acetonitril, HPLC-Qualität	VWR International GmbH, Darmstadt
Actinomycin D	Sigma/Aldrich, Deisenhofen
Agarose	Gibco, Karlsruhe
Agarosegelmarker	New England Biolabs, Frankfurt
Amphotericin B	Cambrex BioScience, Walkersville, MD
Annexin V-FITC	Alexis, Grünberg
Borsäure	VWR International GmbH, Darmstadt

2 MATERIAL UND METHODEN

Caspase 8 - Inhibitor (Z-IETD-fmk)	BD Biosciences (Clontech), Palo Alto, CA
Cellulosenitrat-Membranfilter (Porengröße 0,1 µm, Ø 25 mm)	Schleicher und Schuell MicroScience GmbH, Dassel
Chloroform für die Flüssigkeitschromatographie	VWR International GmbH, Darmstadt
Cisplatin	Ebewe, Unterach, Österreich
Coffein	Sigma/Aldrich, Deisenhofen
1-Methyl- ¹⁴ C-Coffein (spezifische Aktivität 51,2 mCi/mmol)	Perkin Elmer Life Sciences, Boston, MA
Diagnostika - Objektträger mit Epoxy-Beschichtung	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Dialysemembran Diachema (MW cutoff 10.000, very high permeability, Ø 63 mm)	Dianorm GmbH, München
4',6-Diamidino-2-Phenylindol (DAPI)	Sigma, Deisenhofen
Dimethylsulfoxid (DMSO)	VWR International GmbH, Darmstadt
Dimethylthiazoldiphenyltetrazoliumbromid (MTT)	Sigma/Aldrich, Deisenhofen
1,3-Dimethylurat (13U)	Sigma/Aldrich, Deisenhofen
1,7-Dimethylurat (17U)	Sigma/Aldrich, Deisenhofen
1,7-Dimethylxanthin (17X)	Sigma/Aldrich, Deisenhofen
Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)	Sigma, Deisenhofen
ECV304-Medium M199 mit Earle's Salz und L-Glutamin	Gibco BRL, Karlsruhe
Einmalkanülen (0.8 / 80 mm)	VWR International GmbH, Darmstadt
Einmalspritzen (1 ml, Braun Omnifix Tuberkulin)	VWR International GmbH, Darmstadt
Einmalspritzen (Braun Injekt 5 ml und 20 ml)	VWR International GmbH, Darmstadt
Essigsäure, konzentriert	Sigma/Aldrich,

2 MATERIAL UND METHODEN

Epidermaler Wachstumsfaktor, human (hEGF)	Deisenhofen VWR International GmbH, Darmstadt
Eppendorfgefäße Safe-Lock (0,5, 1,5, 2 ml)	VWR International GmbH, Darmstadt
Ethanol	VWR International GmbH, Darmstadt
Ethidiumbromid	Sigma/Aldrich, Deisenhofen
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma/Aldrich, Deisenhofen
FACS Clean	Becton Dickinson, Heidelberg
FACS Flow	Becton Dickinson, Heidelberg
FACS Rinse	Becton Dickinson, Heidelberg
FACS-Röhrchen, Falcon	VWR International GmbH, Darmstadt
Fetales Kälberserum (FKS)	Biochrom, Berlin
Filtermembranen, Nylon, 0,22 µm, Ø 47 mm	Sigma/Aldrich, Deisenhofen
Gentamicinsulfat	Biochrom, Berlin
D-(+)-Glucose-Monohydrat	VWR International GmbH, Darmstadt
Glutaraldehyd	Sigma/Aldrich, Deisenhofen
Humanes Serumalbumin	Sigma/Aldrich, Deisenhofen
Hydroxyethylpiperazin-N-ethansulfonsäure, HEPES	Gibco BRL, Karlsruhe
HPLC-Zubehör	
Säule: LiChroCart® 125-4 (LiChrosphere® 100 RP-18 (5 µm))	VWR International GmbH, Darmstadt
Vorsäule: LiChroCart® 4-4 (LiChrosphere® 100 RP-18 (5 µm))	VWR International GmbH, Darmstadt
Autosampler-Gefäße	VWR International GmbH, Darmstadt

2 MATERIAL UND METHODEN

Mikroeinsätze G30s	VWR International GmbH, Darmstadt
Hypophysenextrakt vom Rind (BPE)	Cambrex BioScience, Walkersville, MD
L-Glutamin	Sigma/Aldrich, Deisenhofen
Hydrocortison	Cambrex BioScience, Walkersville, MD
7-(β -Hydroxyethyl)theophyllin	Sigma/Aldrich, Deisenhofen
Insulin	Cambrex BioScience, Walkersville, MD
Isopropanol	VWR International GmbH, Darmstadt
Kaliumchlorid	Sigma/Aldrich, Deisenhofen
Kaliumdihydrogenphosphat, KH_2PO_4	Sigma/Aldrich, Deisenhofen
Keratinozytenbasalmedium (KBM)	Cambrex BioScience, Walkersville, MD
Medium Biotect Schutzmedium	Seromed, Berlin
Methanol	VWR International GmbH, Darmstadt
Methanol, HPLC-Qualität	VWR International GmbH, Darmstadt
1-Methylurat (1U)	Sigma/Aldrich, Deisenhofen
1-Methylxanthin (1X)	Sigma/Aldrich, Deisenhofen
3-Methylxanthin (3X)	Sigma/Aldrich, Deisenhofen
Minimum Essential Medium Eagle (MEME)	Cambrex BioScience, Walkersville, MD
Multititerplatten (6-, 24-, 96-Loch, Flachboden)	Renner, Dannstadt
Natriumbutyrat	Sigma/Aldrich, Deisenhofen
Natriumchlorid	Sigma/Aldrich,

2 MATERIAL UND METHODEN

Natriumhydrogenphosphat, Na ₂ HPO ₄	Deisenhofen Sigma/Aldrich, Deisenhofen
Natriumpyruvat	Gibco BRL, Karlsruhe
Natronlauge (1 M)	VWR International GmbH, Darmstadt
Parafilm® M	Brand GmbH + Co., Wertheim
Nicht-essentielle Aminosäuren	Gibco BRL, Karlsruhe
Objektträger	Menzel-Gläser, Braunschweig
Objektträger (Lab-Tek® -Borosilikatdeckglas- Kammerobjektträger)	Nalgene Nunc Int. Corp., IL
[Octylphenoxy]polyethoxyethanol (Igepal® CA-630)	Sigma/Aldrich, Deisenhofen
Pan-caspase - Inhibitor (Biotin-VAD-fmk)	Sigma/Aldrich, Deisenhofen
Paraformaldehyd	Sigma/Aldrich, Deisenhofen
Penicillin / Streptomycin	Sigma/Aldrich, Deisenhofen
Probenpuffer Agarosegelelektrophorese	New England Biolabs, Frankfurt
Propidiumiodid (PI)	Alexis, Grünberg
Reagenzgläser, Pyrex, 16 x 100 mm mit Deckel	Dunn Labortechnik, Ansbach
Rinderserumalbumin	Sigma/Aldrich, Deisenhofen
Skalpelle	Hammacher, Solingen
Sterilfilter Minisart®, 0,22 µm	Sartorius, Göttingen
Stickstoff, flüssig	Air Liquide, Berlin
Szintillationsflüssigkeit Optiphase® Supermix	Wallac, Freiburg
Testsatz (ApoTarget™ Quick Apoptotic DNA Ladder Detection Kit)	BioSource International, Inc., Camarillo, CA
Theophyllin	Sigma/Aldrich, Deisenhofen
[³ H]-Thymidin (spezifische Aktivität 35,0 Ci/mmol)	Amersham, Freiburg

Trichloressigsäure	Sigma/Aldrich, Deisenhofen
Tris Base	Sigma/Aldrich, Deisenhofen
Tumornekrosefaktor α , TNF- α	Sigma/Aldrich, Deisenhofen
Trypsin	Biochrom, Berlin
Vancomycin	Sigma/Aldrich, Deisenhofen
Vectashield® Trägermedium	Vector Laboratories, CA
Zellkulturflaschen (25 cm ² und 75 cm ²)	Renner, Dannstadt
Zellkulturschalen TPP, 10 cm	Biochrom, Berlin
Zellschaber	Renner, Dannstadt
Zentrifugenröhrchen TPP (15 und 50 ml)	Biochrom, Berlin

2.1.3 Nährmedien und Lösungen

Keratinocytenmedium. Für Anzucht und Kultivierung der Keratinocyten als auch für die Experimente wurde, wenn nicht anders angegeben, Keratinocytenwachstumsmedium (KGM) eingesetzt. Die Herstellung erfolgte aus Keratinocytenbasalmedium (KBM) durch Zusatz folgender Supplemente:

BPE	30 $\mu\text{g/ml}$
hEGF	0,1 ng/ml
Hydrocortison	0,5 $\mu\text{g/ml}$
Insulin	5 $\mu\text{g/ml}$
Amphotericin B	50 ng/ml
Gentamicinsulfat	50 $\mu\text{g/ml}$

Fibroblastenmedium. Für Anzucht und Kultivierung der Fibroblasten als auch für die Experimente mit diesen Zellen diente, wenn nicht anders angegeben, Fibroblastenwachstumsmedium (FGM). Die Herstellung erfolgte aus Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) durch Zusatz folgender Supplemente:

FKS	10 %
Glutamin	2 mM
Amphotericin B	50 ng/ml
Gentamicinsulfat	20 µg/ml

Medium für die humane endothelähnliche Zelllinie ECV304. Für Anzucht und Kultivierung der humanen endothelähnlichen Zelllinie ECV304 als auch für die Experimente mit diesen Zellen diente, wenn nicht anders angegeben, Endothelzellwachstumsmedium (EGM). Die Herstellung erfolgte aus Medium 199 mit Earle's Salz und L-Glutamin durch Zusatz folgender Supplemente:

FKS	10 %
Glutamin	2 mM
HEPES-Puffer	10 mM
Penicillin	1000 I.U./ml
Streptomycin	1000 µg/ml
nicht essentielle Aminosäuren	1 %
Natriumpyruvat	1 mM
Medium Biotect Schutzmedium	0,5 ml/100 ml

2.1.4 Lösungen für die Keratinozyten- und Fibroblastenisolierung und deren Behandlung

Antibiotikallösung:

Amphotericin B	2,5 µg/ml
Gentamicinsulfat	50 µg/ml
in PBS	

Einfriermedium:

DMSO	10 %
FKS	10 %
in DMEM	

Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS):

KCl	0,2 g/l
NaCl	8,0 g/l
KH ₂ PO ₄	0,2 g/l
Na ₂ HPO ₄	1,44 g/l
in Aqua bidest	

Stopmedium:

FKS	10 %
in DMEM	

Transportmedium:

Gentamicinsulfat	50 µg/ml
Vancomycin	50 µg/ml
in DMEM	

Trypsin-EDTA-Lösung:

Trypsin	1,67 mg/ml
EDTA	0,67 mg/ml
in PBS	

2.1.5 Lösungen für die Apoptosebestimmungen

Annexin V-Bindungspuffer (pH 7,4):

HEPES / NaOH	10 mM
NaCl	140 mM
CaCl ₂	2,5 mM
in Aqua bidest	

Im Anschluss erfolgte eine Sterilfiltration des Puffers.

Agarosegel (1,2 % Agarose in TBE-Puffer (pH 8,0)):

Agarose	1,2 %
Tris-Borat	0,045 M
EDTA	0,001 M
in Aqua bidest	

2.1.6 Lösungen der Testsubstanzen

Zur Erfassung des kutanen Xanthinstoffwechsels mittels HPLC-Analytik wurden Coffein, Theophyllin und der interne Standard 7-(β -Hydroxyethyl)theophyllin im Fließmittelgemisch (siehe **2.10**) (Puffer / Lösungsmittelgemisch (90 / 10 (V/V))) zu 10^{-2} M gelöst und zur Erstellung der Kalibriergeraden entsprechend verdünnt. Die Metaboliten 1,3-Dimethylurat (13U), 1,7-Dimethylurat (17U) und 1,7-Dimethylxanthin (17X) wurden ebenfalls im Fließmittelgemisch zu 10^{-3} M gelöst. Aufgrund ihrer schlechten Löslichkeit wurden die Metaboliten 1-Methylxanthin (1X), 1-Methylurat (1U) und 3-Methylxanthin (3X) zunächst in 1 M-NaOH angelöst und schließlich mit Aqua bidest zu 10^{-3} M verdünnt. Alle Lösungen der Testsubstanzen wurden immer direkt vor den Experimenten neu hergestellt (Stabilität des Internen Standards z.B. bei 4°C nur wenige Tage).

2.1.7 Pufferlösung für die HPLC-Analytik

Natriumacetatpuffer (pH 4,8):

Natriumacetattrihydrat	20 mM
CH ₃ COOH	20 mM
in Aqua bidest	

2.1.8 Fixationsmedium nach Karnovsky (pH 7,5)

Paraformaldehyd	4 %
Glutaraldehyd	2 %
PBS	ad 100 %

2.2 Gewinnung und Kultivierung primärer kutaner Zellen

Keratinocyten und Fibroblasten. Primäre Keratinocyten und Fibroblasten wurden aus juveniler Vorhaut isoliert und anschließend kultiviert. Vorhaut, die bei Zirkumzisionen in kinderchirurgischen Ambulanzen der Ärzte Dr. Jung, Dr. Knoblauch, Dr. Schildknecht, Dr. Eule und dem St. Josephskrankenhaus anfiel,

wurde uns - nach Genehmigung durch die Berliner Ärztekammer - freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

Die Häute wurden sofort nach operativer Entfernung in unter aseptischen Bedingungen hergestelltem Transportmedium bei 4°C gekühlt befördert und anschließend 1 h bei 37°C oder alternativ 24 h bei 4°C mit Trypsin / EDTA inkubiert. Die Enzymreaktion wurde durch Überführen der Häute in STOP-Medium beendet. Mit Hilfe einer Pinzette wurden die Häute in STOP-Medium und anschließend in PBS geschwenkt. Bei diesem Prozeß lösten sich die Keratinozyten und ein Teil der Fibroblasten ab. Die so gewonnenen Zellsuspensionen wurden bei 250 x g für 5 Minuten zentrifugiert, das Zellpellet in PBS resuspendiert, die Suspension erneut bei 250 x g für 5 Minuten zentrifugiert, in KGM resuspendiert und in eine Zellkulturflasche eingesät. Nachdem die Zellen nach einigen Tagen angewachsen waren (Passage 0), erfolgte die Trennung von Keratinozyten und Fibroblasten, indem nach Absaugen des Mediums und Waschen der Zellen mit PBS 1,5 ml Trypsin / EDTA-Lösung zu den Zellen gegeben wurde. Dadurch lösten sich zunächst die Fibroblasten vom Boden der Zellkulturflasche. Sie wurden in ein Zentrifugenrohr überführt, mit STOP-Medium behandelt, mit PBS gewaschen, zentrifugiert, in FGM resuspendiert und in eine Zellkulturflasche eingesät. Anschließend wurde erneut Trypsin / EDTA zu den verbleibenden Keratinozyten hinzugegeben, welche sich nach wenigen Minuten Inkubation bei 37°C vom Boden der Zellkulturflasche ablösten. Die Reaktion wurde durch Zugabe von STOP-Medium beendet, die Zellsuspension wie oben beschrieben zentrifugiert, die Zellen mit PBS gewaschen, zentrifugiert, in KGM resuspendiert und in eine Zellkulturflasche eingesät. Die so gewonnenen Keratinozyten und Fibroblasten wurden als Zellen der 1. Passage bezeichnet. Keratinozytenkulturen wurden bei einem Konfluenzgrad von 50-70 %, Fibroblastenkulturen bei einem Konfluenzgrad von nahezu 100 % im Verhältnis 1:3 verbreitert. Die Ausbeute an Fibroblasten wurde erhöht, indem die Resthaut erneut mit Trypsin / EDTA für 20 Minuten bei 37°C inkubiert und wie beschrieben weiterverarbeitet wurde. Mediumwechsel erfolgte alle 2-3 Tage. Um starke interindividuelle Unterschiede in der Biotransformationsleistung auszugleichen, wurden für die Versuche mit Vorhautzellen Zellpools eingesetzt, d.h. Zellen mindestens dreier Spender wurden nach der 0. Passage vereint und so weiterkultiviert. Für die Versuche dienten Zellen der 2. - 4. (Keratinozyten) oder der 2. - 5. Passage (Fibroblasten).

2.3 Kultivierung von Zelllinien

Humane endothelähnliche Zelllinie (ECV304). Die als humane spontan transformierte und immortalisierte Nabelschnuroendothelzelle von Takahashi et al. etablierte Zelllinie ECV304 (Takahashi et al., 1990) wurde freundlicherweise vom Max-Delbrück-Centrum für Molekulare Medizin in Berlin-Buch zur Verfügung gestellt. Die ECV304-Zellen wurden in Medium 199 mit Earle's Salz und L-Glutamin in Zellkulturflaschen (75 cm²) bei 37°C und 5 % CO₂ kultiviert. Das Zellkulturmedium wurde mit folgenden Zusätzen supplementiert: 10 % FKS, 2 mM Glutamin, 10 mM HEPES-Puffer, 1000 I.U./ml Penicillin, 1000 µg/ml Streptomycin, 1 % nicht essentielle Aminosäuren, 1 mM Natriumpyruvat, 0,5 ml/100 ml Medium Biotect Schutzmedium. Zur Verbreiterung und Aussaat wurden die Zellen nach Entfernen des Mediums und Waschen für 2 min mit Trypsin/EDTA (0,05 % / 0,02 % w/v) behandelt. Nach Zugabe von STOP-Medium wurden die Zellen bei 170 x g für 5 min abzentrifugiert und für die Viabilitätsuntersuchungen in einer Dichte von 1x10⁵ / Loch auf 24-Loch-Platten ausgesät. Nach 24 h erfolgten in der Regel die Experimente.

2.4 Vorbehandlung und Inkubation der Humanhautmodelle

Rekonstruierte Epidermis - Modelle: SkinEthic®. Sofort nach Erhalt wurden die Hautmodelle nach Herstellerangaben unter sterilen Bedingungen aus den Agarosegelen, auf denen sie geliefert wurden, entnommen und in mit 4ml Erhaltungsmedium der Firma SkinEthic® gefüllte 6-Loch-Platten überführt. Die Hautmodelle wurden bei 37°C und 5 % CO₂ im Brutschrank über Nacht, maximal aber für 48 h vor Durchführung eines Experimentes inkubiert. Sollte der Versuch erst ≥ 24 h nach dem Erhalt der Kunsthaut erfolgen, wurde nach 24 h ein Mediumwechsel mit dem Erhaltungsmedium vorgenommen.

Rekonstruierte Epidermis - Modelle: EpiDerm™. Die Kunsthaut wurde nach Erhalt nach den Angaben des Herstellers für max. 48 h bei 4°C in der versiegelten 6-Loch-Platte, die das Hautmodell auf Agarosegel enthielt, gelagert. Anschließend wurden die Kunsthäute unter sterilen Bedingungen in mit 4 ml Erhaltungsmedium der Firma Mattek gefüllte 6-Loch-Platten überführt und mindestens 1 h bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert.

Vollhautmodelle: EpiDerm™ - FT. Nach Erhalt wurden die Hautmodelle nach den Angaben des Herstellers für einen möglichst kurzen Zeitraum bei 4°C in der versiegelten 6-Loch-Platte, die das Hautmodell auf Agarosegel enthielt, gelagert. Anschließend wurden die Kunsthäute unter sterilen Bedingungen in mit 2 ml Erhaltungsmedium der Firma Mattek gefüllte 6-Loch-Platten überführt und mindestens 1 h bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert.

2.5 Hautgewinnung

Vollhaut. Die für die Franzzelluntersuchungen verwendete Schweinehaut wurde von 5-8 Monate alten weiblichen Schweinen (Deutsche Landrasse Hybriden) nach der Schlachtung in der Lehr- und Versuchsanstalt für Tierzucht und Tierhaltung Ruhlsdorf / Groß Kreuz e.V. durch Exzision aus dem Bereich 20 cm links und rechts des Rückgrats oder aus der Bauchregion entnommen. Die Humanhaut fiel bei Mamma- oder Bauchreduktionen 20 - 62 Jahre alter Frauen im Emil von Behring-Krankenhaus Zehlendorf an.

Die Haut wurde anschließend in OP-Tücher eingeschlagen, um eine Kontamination mit subkutanem Fettgewebe zu vermeiden und bei ca. 4 - 8 °C transportiert. Nach Reinigung der Hautoberfläche mit PBS-Puffer erfolgte die Entfernung des subkutanen Fettgewebes mittels Skalpell. Die Haut wurde direkt nach Präparation frisch verwendet oder mindestens 24 Stunden und maximal 6 Monate bei -20°C gelagert. Für den Franzzellversuch wurden 1000 ± 100 µm dicke Vollhaut mit einem Dermatom gewonnen und im Anschluß Präparate mit einem Durchmesser von 30 mm ausgestanzt.

Hitzeseparierte Epidermis. Zur Gewinnung der humanen Epidermis wurden von der präparierten Haut Stanzen mit einem Durchmesser von 30 mm gewonnen, diese für 60 - 90 Sekunden in einem 60°C temperierten Wasserbad erwärmt und die Epidermis mittels einer Pinzette abpräpariert. Diese wurde auf eine zuvor 24 h in destilliertem Wasser aufbewahrte und im Anschluß 1 h im entsprechenden Rezeptormedium umhydratisierte Dialysemembran aufgebracht.

2.6 Untersuchungen zur Viabilität und Integrität rekonstruierter Haut

MTT-Reduktionsassay an Hautmodellen. Zur Prüfung der kutanen Verträglichkeit verschiedener für Franzzellversuche verwendeter Rezeptormedien wurde das Hautmodell SkinEthic® in die Franz-Durchflußzelle ($\varnothing = 15 \text{ mm}$) eingebracht, 30 min äquillibriert und 6 h mit dem entsprechenden Rezeptormedium bei einer Flußrate von 12 ml/h umspült (s. auch **2.13 Franzzelluntersuchungen**). Folgende Rezeptormedien wurden hinsichtlich ihrer Eignung untersucht:

PBS pH 7,4 und Minimal Essential Medium Eagle (MEME), jeweils unter Zusatz von 0,1 % Glucose und mit und ohne Zusatz von 5 % BSA. Als Kontrolle diente Skinethic®- ErhaltungsmEDIUM. Nach Versuchsende wurde die Viabilität der Hautmodelle mittels MTT-Test, wie bereits beschrieben (Liebsch, 2000; Mosmann, 1983), untersucht. Dazu wurden von jeder Haut Biopsiestanzen von 4 mm Durchmesser entnommen, jeweils unter Lichtausschluß in eine vorher mit 300 μl MTT-Lösung (2 mg/ml in PBS) gefüllte Vertiefung einer 24-Loch-Platte gegeben und 3 h bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert. Das Hautstück wurde in ein mit 0,4 ml Isopropanol gefülltes Probenröhrchen gegeben, und das gebildete Formazan über Nacht durch Schütteln extrahiert. Die Formazanmenge in 200 μl des Überstandes wurde in einer 96 - Loch - Platte bei 540 nm gegen Isopropanol als Kontrolle gemessen.

Lactat - Bestimmung. Der anaerobe Abbau von Glucose in der Haut dient dem Energiegewinn. Als Produkt dieser Reaktion entsteht Lactat, seine Bildung sollte ebenfalls eine Aussage über die Viabilität des Gewebes ermöglichen. Nach ½-stündiger Äquillibrierungszeit und im Anschluß an den oben beschriebenen 6-stündigen Franzzellversuch wurde daher eine UV-photometrische Bestimmung (340 nm) von Lactat im Rezeptormedium (Analyseautomat Roche/Hitachi) anhand der Extinktionszunahme (NADH-Bildung) durchgeführt (**Abb. 4**). Die Messung erfolgte in der Medizinischen Klinik (Kardiologie, Angiologie, Pneumologie) der Humboldt-Universität zu Berlin.

Bestimmung der LDH-Aktivität. Durch eine Schädigung der Zellmembranen und damit Verletzung der Integrität der Hautzellen kommt es zur Freisetzung von LDH in das Rezeptormedium, dessen Aktivität ebenfalls über die UV-metrische Bestimmung der NADH-Bildung gemessen werden kann (**Abb. 4**). Die Bestimmung erfolgte nach ½-stündiger Äquillibrierung und im Anschluß an einen 6 - stündigen Franzzellversuch

am SkinEthic® - Hautmodell mit kleineren Franz-Durchflußzellen ($\varnothing = 9$ mm; Flußrate = 6 ml / h). Als Rezeptormedien dienten MEME, supplementiert mit 20 μg / ml Gentamicin, 50 ng / ml Amphotericin B, 2 mM Glutamin und 0,1 % Glucose mit und ohne den Zusatz von 5 % BSA. Die Bestimmung wurde ebenfalls in der Medizinischen Klinik (Kardiologie, Angiologie, Pneumologie) der Humboldt-Universität zu Berlin durchgeführt.

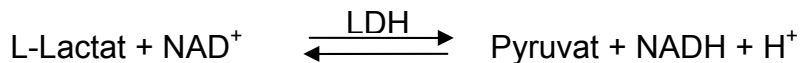


Abb. 4: Reaktionsprinzip zum Nachweis von Lactat oder LDH im Medium.

Histologische Untersuchung. Zur Charakterisierung des Einflusses insbesondere des Zusatzes von 5 % BSA auf das morphologische Erscheinungsbild der Kunsthaut erfolgten histologische Untersuchungen nach Beendigung eines 6 - stündigen statischen Franzzellversuches. Dazu wurden Stanzen der Kunsthaut ($\varnothing = 8$ mm) entnommen und diese zum Transport bei 4°C in Karnovsky-Lösung fixiert. Die weitere Bearbeitung erfolgte im Elektronenmikroskopischen Labor der Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie des Klinikums der Ludwig-Maximilians-Universität München. Die Proben wurden zunächst verschiedenen Waschschritten unterzogen, eine graduelle Entwässerungsprozedur folgte. Die Stanzen wurden anschließend in Kunstharz eingebettet (Eponeinbettung nach Luft) (Luft, 1961) und in 1-2 μm Semidünnschnitte zerteilt. Der Färbung mit 1 % Toluidin / 1 % Pyronin G folgte eine histologische Beurteilung der Schnitte unter Blindbedingungen mittels Lichtmikroskopie. Folgender Score und Kriterien zur Auswertung wurden zugrunde gelegt (**Tab. 3**):

Histologischer Score	Auswertungskriterien
8 = n = normal	normale Morphologie
7 = n-l = normal bis leicht	normale Morphologie bis leichte Schädigung
6 = l = leicht	leichte Irritation, Hyperkeratose der Hornschicht, Ödem der lebenden Zellen
5 = l-m = leicht bis mäßig	leichte bis mäßige Schädigung
4 = m = mäßig	Irritation, wenige intra- und interzelluläre Vakuolen der lebenden Keratinozyten, Verlust einiger Hornzellen
3 = m-s = mäßig bis schwer	mäßige bis schwere Schädigung
2 = s = schwer	schwere Irritation, zahlreiche intra- und interzelluläre Vakuolen der lebenden Keratinozyten, massiver Verlust von Hornzellen, Ablösung der lebenden Keratinozyten von der Unterlage
1 = v = verhornt	Verhornung der oberen Hautschichten

Tab. 3: Histologischer Score und Auswertungskriterien bei der Beurteilung der Kunsthautschnitte.

Ebenfalls histologisch inspiziert wurden unbehandelte Hautstücke porciner Haut sowohl aus dem Abdominal- als auch aus dem Rückenbereich. Die Aufarbeitung, Untersuchung und Evaluierung der Schnitte erfolgte wie bei der Kunsthaut beschrieben.

2.7 Viabilitätsuntersuchungen an primären Keratinozyten

MTT-Test an Monolayerkulturen. Mittels MTT-Reduktionsassay wurde der Einfluß verschiedener Medien (KGM, MEME und PBS) mit und ohne den Zusatz von 10 % FKS oder 5 % BSA (oder 5 % HSA) auf die Viabilität von primären Keratinozyten untersucht. Dazu wurden ungefähr 10^5 Zellen pro Loch in eine 24-Loch-Platte gesät und nach 24 h für 2 h mit den entsprechenden Medien präinkubiert. Als Kontrolle

dienten mit KGM behandelte Zellen. Im Anschluß wurde im Dunklen mit 60 µl MTT-Reagenz (5 mg/ml in PBS) versetzt, für 5 Minuten geschüttelt und für 4 h bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert. Das Inkubationsmedium wurde abgesaugt, die Zellen zur Extraktion des gebildeten Formazans mit 210 µl DMSO lysiert, 5 Minuten im Dunklen stehengelassen, und die Formazankristalle während weiterer 5 Minuten Schüttelns gelöst. 200 µl des Überstandes wurden ebenfalls unter Lichtausschluß in eine 96-Loch-Platte pipettiert, und die Extinktion sofort bei 540 nm vermessen. Als Leerwert dienten 200 µl DMSO.

Die Versuche wurden in Gegenwart von 100 µM Pan-caspase - Inhibitor (Biotin-VAD-fmk) oder Caspase 8 - Inhibitor (Z-IETD-fmk) wiederholt. Nach Präinkubation der Zellen mit dem jeweiligen Inhibitor für 1 h wurde eine 100 µM Lösung des jeweiligen Caspase - Inhibitors im entsprechenden Medium für 2 h dazugegeben; anschließend erfolgte der MTT-Test, wie oben beschrieben.

Viabilitätsuntersuchungen wurden ergänzend mit der humanen endothelähnlichen Zelllinie ECV304 durchgeführt. Dazu wurden ungefähr $1,5 \times 10^5$ Zellen pro Loch in eine 24 - Loch-Platte gesät und, wie oben für Keratinozyten beschrieben, behandelt. Untersucht wurde der Einfluß des Zusatzes von 10 % FKS oder 5 % BSA zum speziellen Endothelzellwachstumsmedium (EGM), das gleichzeitig als 100 % - Kontrolle diente, oder zu PBS.

Lichtmikroskopie. Im Anschluß an eine 6- stündige Inkubation der Keratinozyten mit den o.g. Medien wurden lichtmikroskopische Aufnahmen der Primärkulturen in 320-facher Vergrößerung angefertigt. Die Zellen wurden zu diesem Zweck bis fast zur Konfluenz kultiviert, um ein ähnliches Bild wie im Hautmodell zu schaffen.

Fluoreszenzmikroskopie nach Propidiumiodidfärbung. Zur fluoreszenzmikroskopischen Inspektion mit Propidiumiodid (PI) gefärbter Zellen wurden zunächst ungefähr 10.000 Zellen pro Vertiefung auf einen Diagnostika-Objektträger mit Epoxy-Beschichtung gesät und nach dem Anwachsen für 6 h mit den o.g. Medien inkubiert. Im Anschluß wurden die Zellen mit PBS gewaschen, für 15 min mit eiskaltem, absolutem Methanol fixiert und wiederum mit PBS gewaschen. Die Fixierung mit Methanol permeabilisierte gleichzeitig die Zellen und machte eine RNase-Behandlung der Zellen überflüssig (PI bindet auch an RNA). Danach erfolgte die Färbung der Zellen durch 5-minütige Inkubation mit 5 µg/ml PI unter Lichtausschluß. Nach Waschen und Trocknen wurden die Zellen in Vectashield[®] Trägermedium eingebettet, um ein schnelles Verblässen der Fluoreszenz zu

vermeiden, und mit dem Olympus Mikroskop BX-41 fluoreszenzmikroskopisch untersucht.

Osmolaritätsmessung. Die Osmolaritätsmessung von Keratinozytenbasalmedium (KBM) mit und ohne den Zusatz von 5 % BSA wurde mit einem Knauer Osmometer (Halbmikro-Osmometer Typ Dig. L) durchgeführt. Die Bestimmung erfolgte in der Medizinischen Klinik (Kardiologie, Angiologie, Pneumologie) der Humboldt-Universität zu Berlin.

2.8 Untersuchungen zur Zellproliferation

Bestimmung antiproliferativer Effekte an Keratinozyten. Es wurden ungefähr 10^5 Zellen pro Loch in eine 24-Loch-Platte gesät, und einen Tag später in der logarithmischen Wachstumsphase der [^3H]-Thymidin-Einbau in die DNA gemessen. Dazu wurde zuvor, nachdem die Zellen angewachsen waren, über Nacht das Wachstumsmedium durch Basalmedium ersetzt, und die Zellen am nächsten Tag für 6 h mit verschiedenen Medien (KBM und PBS mit und ohne den Zusatz von 5 % BSA) inkubiert. Nach Ersatz der Medien durch Basalmedium wurden die Zellen für 24 h mit 1 μCi [^3H]-Thymidin pro Loch (spezifische Aktivität 35,0 Ci/mmol) inkubiert. Nach Entfernung des Mediums wurden die Zellen mit PBS und 5 %iger eiskalter Trichloressigsäure gewaschen. Das Präzipitat wurde durch eine einstündige Inkubation mit 200 μl NaOH (0,3 N) unter Schütteln gelöst. 190 μl des Lysats wurden entnommen und mit 1,8 ml OptiPhase-Szintillationsflüssigkeit in Eppendorf-Gefäßen bis zur vollständigen Phasenmischung mit dem Vortexgerät behandelt. Die durch die Radioaktivität evozierte Fluoreszenz des Szintillationscocktails wurde schließlich im β -Counter ermittelt.

2.9 Untersuchungen zur Apoptose und Nekrose an primären Keratinozyten

Bestimmung der Apoptose- und Nekroserate mittels Durchflußzytometrie. Zellen in der frühen Apoptose können durch Färbung mit Annexin V quantifiziert werden. Das Prinzip der durchflußzytometrischen (FACS-) Bestimmung der Apoptoserate beruht dabei auf der Bindung von Fluoresceinisothiocyanat-(FITC)-gekoppeltem Annexin V an Phosphatidylserin, das in der frühen Apoptosephase zur

Außenseite der Plasmamembran der Zelle transloziert wird (Vermees et al., 1995). Früh apoptotische Zellen sind daher selektiv mit Annexin V anfärbbar (Annexin V⁺ / PI⁻). Nekrotische und spät apoptotische Zellen verlieren ihre Membranintegrität, so dass normalerweise von der Penetration ausgeschlossene Substanzen wie Propidiumiodid (PI) in die Zelle eindringen und interkalierend an die DNA binden können. Diese Zellen sind anhand der Doppelfärbung mit Annexin und PI (Annexin V⁺ / PI⁺) detektierbar.

Keratinocyten wurden in einer Dichte von ungefähr 5×10^5 Zellen / Loch in 6-Loch-Platten gesät und bei 70-80 % Konfluenz (die Zellen dürfen nicht vollständig konfluent sein, um möglichst sensitiv auf Apoptoseinduktion zu reagieren) mit den verschiedenen Medien (KGM, MEME und PBS mit und ohne Zusatz von 10 % FKS oder 5 % BSA) inkubiert. Nach 5 h wurden die Zellen gewaschen, trypsiniert und bei $270 \times g$ für 5 min zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 0,5 ml Annexin V-Bindungspuffer resuspendiert. Nach der Färbung mit Annexin V (Endkonzentration 0,5 µg/ml; 10 min Inkubation) und Waschen wurde PI (Endkonzentration 5 µg/ml) zu 0,19 ml der Zellsuspension gegeben, gefolgt von einer Inkubationszeit von 5 min. Die angefärbten Zellen wurden anschließend mit dem Durchflußzytometer quantifiziert.

Einstellungen des Durchflußzytometers vor der Messung. Zunächst musste, wie in **Abb. 5** dargestellt, eine Einstellung des Zytometers nach Größe der Zellen (Forwardscatter FSC) und Granularität (Sidewardscatter SSC) erfolgen. Anhand von viablen, ungefärbten Zellen wurde die Hauptzellpopulation ausgewählt (**Abb. 5 A**). Um nur tatsächlich gefärbte Zellen auch als diese zu erkennen, erfolgte nun eine Einstellung der FL-2- und FL-1-Achsen einer ungefärbten Zellpopulation anhand ihrer Eigenfluoreszenzintensität. Dabei sollten sich möglichst alle Zellen im linken unteren Quadranten befinden (**Abb. 5 B**). Zur Unterscheidung der Fluoreszenzemission von Annexin V-FITC (525 nm, FL-1) und von PI (575 nm, FL-2) musste eine Kompensation jeweils einfach angefärbter Zellen erfolgen (**Abb. 5 C, D**). Doppeltgefärbte viable Zellen sollten möglichst wenige Signale außerhalb des linken unteren Quadranten zeigen (**Abb. 5 E**). Erst nach den Grundeinstellungen des Durchflußzytometers konnten die Proben vermessen werden.

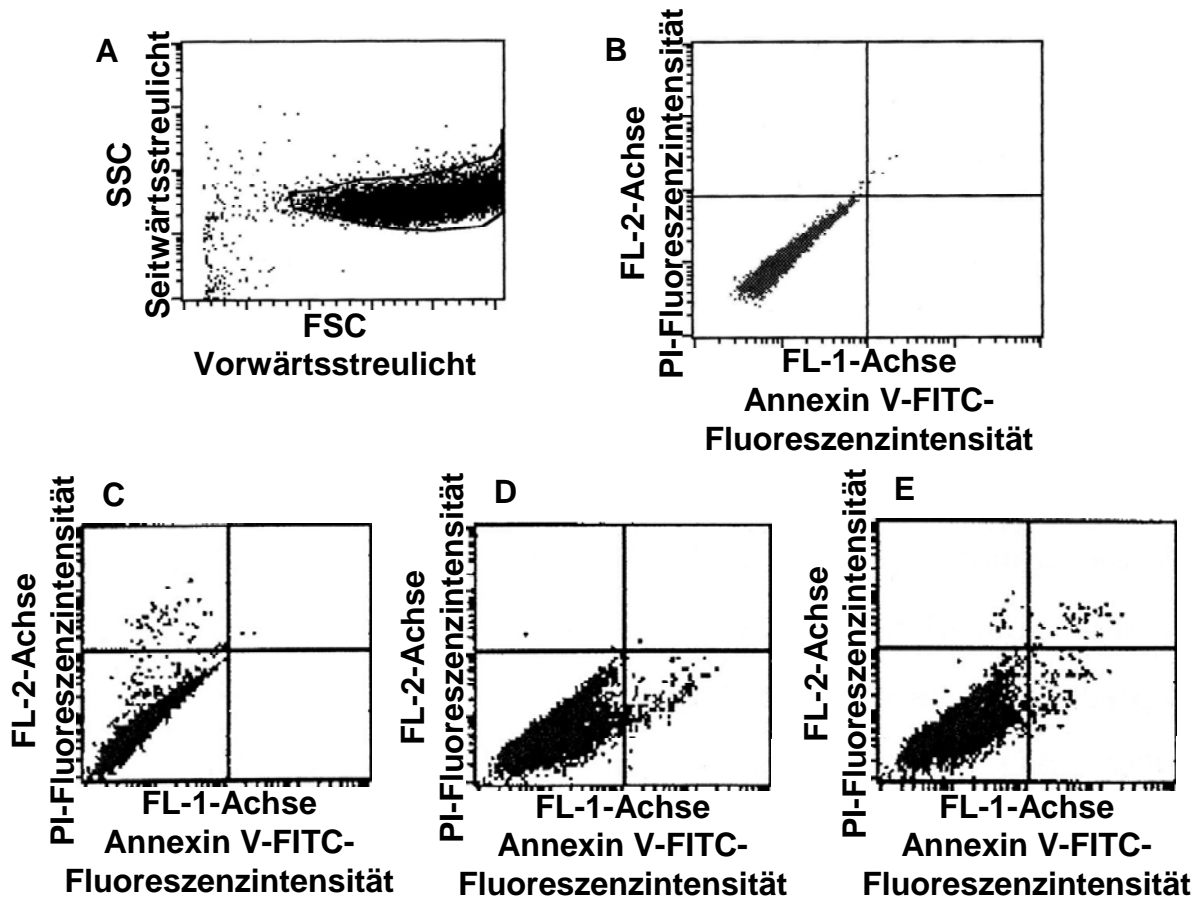


Abb. 5: Grundeinstellungen des Durchflußzytometers anhand einer viablen Keratinozytenpopulation. **A**, Auswahl der Hauptzellpopulation nach Größe und Granularität; **B**, Einstellung der ungefärbten Zellpopulation anhand FL-1- und FL-2-Detektion; **C**, Einstellung PI-einzelgefärbter Zellen; **D**, Einstellung Annexin V-FITC-einzelgefärbter Zellen; **E**, Einstellung doppelt-gefärbter Zellen.

Fluoreszenzmikroskopische Visualisierung apoptotischer Zellen durch DAPI-Färbung. 4',6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI) dient der Sichtbarmachung von Zellkernen als Gegenfärbung oder Detektion apoptotischer Kerne. DAPI ist in der hier verwendeten Konzentration zellpermeabel und bindet an die kleine Furche der DNA aller Zellen. An die DNA gebunden emittiert DAPI nach Anregung im UV-Bereich (358 nm) blaues Licht (461 nm). Apoptotische Kerne sind zu erkennen an der deutlich helleren Fluoreszenzintensität und gleichzeitig stärker gekörnten Struktur der Fluoreszenz, die auf eine Fragmentierung der DNA hindeutet. Auch sind sichelförmige Zellkernstrukturen ein Anzeichen für Apoptose.

Monolayerkulturen primärer Keratinozyten und dermaler Fibroblasten wurden auf Lab-Tek[®] - Borosilikatdeckglas - Kammerobjektträgern kultiviert und mit KGM oder PBS mit und ohne Zusatz von 5 % BSA für 6 h inkubiert. Die Zellen wurden mit PBS

gewaschen und mit Methanol für 15 min fixiert. Anschließend wurden die Zellkerne mit 0,5 µg/ml DAPI für 5 min unter Lichtausschluß angefärbt. Nach Waschen und Trocknen wurden die Zellen in Vectashield® Trägermedium eingebettet und mit dem Zeiss Axioplan-Fluoreszenzmikroskop auf apoptotische Zellkerne geprüft. Dermale Fibroblasten dienten als Positivkontrolle. Apoptose wurde in diesem Fall durch 24-stündige Inkubation mit Actinomycin D (100 ng/ml) und TNF-α (20 ng/ml) induziert. Die Zellen wurden im Anschluß gewaschen, fixiert und angefärbt wie für Keratinozyten beschrieben.

Visualisierung der DNA-Fragmentierung nach elektrophoretischer Auftrennung. Da die internukleosomale DNA-Fragmentierung als eindeutiges Kennzeichen der Apoptose gilt, wurde diese ebenfalls untersucht. Das Prinzip der Methode besteht darin, dass während apoptotischer Prozesse DNA durch aktivierte Nukleasen in Fragmente von 50 bis 300 Kilobasen und nachfolgend in kleine DNA-Stücke unterschiedlicher Länge (ca. 200 Basenpaare) gespalten wird. Diese Fragmente können nach Extraktion und Gel-elektrophoretischer Auftrennung mit anschließender Ethidiumbromidfärbung in Form einer für Apoptose typischen DNA-Leiter visualisiert werden. Dazu wurden ungefähr 250.000 Keratinozyten pro Loch in 6-Loch-Platten kultiviert, für 6 h mit den bei der Durchflußzytometrie beschriebenen Medien behandelt, und im Anschluß die DNA der Zellen mit Hilfe eines Testsatzes (ApoTarget™ Quick Apoptotic DNA Ladder Detection Kit) extrahiert und mittels horizontaler Gel-Elektrophorese (1,2 %-iges Agarosegel) aufgetrennt. Die Visualisierung der DNA-Fragmente wurde durch anschließende Ethidiumbromidfärbung (0,5 µg/ml) und Belichtung im UV-Bereich vorgenommen. Als Positivkontrolle dienten mit Cisplatin (0,2 mM) für 3 h oder mit Natriumbutyrat (4 mM) für 24 h inkubierte Keratinozyten.

2.10 Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC)

Zur Auftrennung und Quantifizierung der Xanthine Coffein und Theophyllin, deren Metabolite 1,3-Dimethylurat (13U), 3-Methylxanthin (3X), 1-Methylurat (1U), 1-Methylxanthin (1X), 1,7-Dimethylurat (17U) und 1,7-Dimethylxanthin (17X) (siehe **Abb. 3**) sowie des als interner Standard verwendeten 7-(β-Hydroxyethyl)theophyllin (**Abb. 18**) wurde folgende HPLC-Analytik, basierend auf einer Methode von Kizu et al. (Kizu et al., 1999b), entwickelt:

Als Fließmittel diente ein 20 mM Natriumacetatpuffer, eingestellt auf pH 4,8 und ein Lösungsmittelgemisch aus Acetonitril / Methanol (35 / 65 (V/V)). Mit dem in **Tab. 4** dargestellten Fließmittelgradienten erfolgte über die Dauer von 60 Minuten bei einer Flußrate von 1,0 ml/min die Detektion der Substanzen bei 275 nm.

Zeit [min]	Puffer [%]	Acetonitril / Methanol [%]
0	95	5
45	90	10
50	95	5
60	95	5

Tab. 4: Fließmittelgradient zur Bestimmung von Coffein, Theophyllin und Metaboliten.

Zur Auftrennung von Theophyllin und 17X, die mit dieser Methode nicht eindeutig zu separieren waren, diente eine Variante mit isokratischer Eluierung: Die Trennung gelang mit einer Fließmittelzusammensetzung im Verhältnis von 92,5 : 7,5 (% V / V) (Puffer : Lösungsmittelgemisch) bei einer Flußrate von ebenfalls 1,0 ml / min.

2.11 Untersuchung des kutanen Xanthinstoffwechsels an primären Keratinozyten und Fibroblasten

Inkubationsbedingungen. Für die Metabolisierungsuntersuchungen wurden die Zellen in einer Dichte von ca. 1,5 Millionen (Keratinozyten) bzw. 2 Millionen (Fibroblasten) in eine Zellkulturflasche mit einer Fläche von 75 cm² eingesät und in je 10 ml des entsprechenden Wachstumsmediums bis zur Konfluenz (Fibroblasten) bzw. bis ca. 80 % Konfluenz (Keratinozyten) kultiviert. Anschließend wurde das Medium abgesaugt, die Zellen mit PBS gewaschen und frisches Wachstumsmedium sowie pro Flasche 1 ml einer 10⁻² M Lösung von Coffein bzw. Theophyllin in PBS hinzugefügt. Die Endkonzentration in den Inkubationsmedien betrug demnach 10⁻³ M. Um bei der später folgenden HPLC-analytischen Auftrennung der eventuell auftretenden Metaboliten der Substanzen sicher über dem Konzentrationsbereich der Bestimmungsgrenze zu liegen, wurden jeweils 5 Flaschen der entsprechenden Zellen mit den oben genannten Substanzlösungen inkubiert. Die Inkubation erfolgte

über 24 h oder 48 h bei 37°C und 5 % CO₂. Anschließend erfolgte die Aufarbeitung wie unten beschrieben. Um eine nichtenzymatische Umwandlung der Xanthine unter Inkubationsbedingungen auszuschließen bzw. ebenfalls zu erfassen, dienten entsprechende zellfreie, aber mit Coffein oder Theophyllin (Endkonzentration 10⁻³ M) versetzte Medien als Kontrolle. Zusätzlich wurden substanzfreie Zellkulturen über den gleichen Zeitraum inkubiert, um bei der folgenden HPLC-analytischen Auftrennung Substanz- oder Metabolitensignale und Signale aus dem Medium oder den Zellen zu unterscheiden.

Probengewinnung und Xanthinextraktion aus den Zellkulturmedien. Nach der 24-stündigen oder 48-stündigen Inkubationszeit wurde je 1 ml der entsprechenden Inkubationsmedien in 2 ml Eppendorfgefäße überführt, mit 100 µl internem Standard mit einer Konzentration von 10⁻² M in PBS versetzt und anschließend fünfmal mit je 0,5 ml Chloroform / Isopropanol 4:1 (V/V) extrahiert. Die organischen Phasen wurden in 2 ml Eppendorfgefäßen vereinigt, eingedampft und in 200 µl des Fließmittelgemisches (Verhältnis Puffer : organisches Lösungsmittel: 90:10, V/V) aufgenommen. Dieses Volumen wurde nach fünfminütiger Behandlung im Ultraschallbad und mit dem Vortexgerät wiederholt zur Trockne eingedampft, wiederum in 200 µl des Fließmittelgemisches aufgenommen und 100 µl davon HPLC-analytisch (siehe **2.10**) untersucht.

Probengewinnung und Xanthinextraktion aus den Zellkulturen. Das restliche Medium aus den Zellkulturflaschen wurde abgesaugt, die Zellen mit dem Zellschaber abgekratzt und diese mit 500 µl PBS, mit dem vorher die Kulturflasche nachgespült wurde, vereinigt. Die Zellsuspension wurde mit fünf Gefrier- / Auftauzyklen in flüssigem Stickstoff / 30°C warmem Wasserbad behandelt und im Anschluß mit 100 µl des internen Standards (10⁻² M in PBS) versetzt. Nach Behandlung mit dem Vortexgerät und fünfminütigem Zentrifugieren wurde der Überstand abgenommen und, wie bei den Zellkulturmedien beschrieben, extrahiert und für die HPLC-Analyse (siehe **2.10**) vorbereitet.

Zellviabilitätsbestimmungen mittels MTT-Test. Um einen toxischen Einfluß der getesteten Substanzen und damit eine artifiziell verminderte Biotransformationsrate auszuschließen, wurde parallel zu den Metabolisierungsuntersuchungen die Zellviabilität mittels MTT-Test überprüft. Dazu wurden ungefähr 100.000 Keratinozyten oder Fibroblasten in jede Vertiefung einer 6-Loch-Platte gesät und nach 24-stündiger Inkubation bei 37°C / 5 % CO₂ für weitere 24 h mit Coffein oder

Theophyllin in einer Endkonzentration von 10^{-3} M inkubiert. Als Kontrolle dienten unbehandelte Zellen. Im Anschluß wurde der MTT-Test, wie unter **2.7** beschrieben, durchgeführt. In Abwandlung wurden allerdings 200 μ l MTT-Lösung pro Loch zupipettiert, die Extraktion des Formazans erfolgte mit 1 ml DMSO.

2.12 Untersuchung des kutanen Xanthinstoffwechsels an Humanhautmodellen

Inkubationsbedingungen. Die Metabolisierungsuntersuchungen wurden mit dem Epidermismodell EpiDerm™ bzw. dem Vollhautmodell EpiDerm™-FT im Insert durchgeführt. Dazu wurden nach der Vorbehandlung der Modelle, wie unter **2.4** beschrieben, 400 μ l bzw. 200 μ l einer $2,5 \times 10^{-2}$ M Lösung von Coffein oder Theophyllin in PBS auf die Oberfläche des jeweiligen Hautmodells aufgetragen und für 48 h bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert. Nach 24 h erfolgte ein Ersatz des evaporierten Medienvolumens, um den Kontakt der Haut zum Medium aufrecht zu erhalten. Damit ergab sich eine Endkonzentration der Xanthine im gesamten System von $2,2 \times 10^{-3}$ M bzw. $1,85 \times 10^{-3}$ M. Anschließend erfolgte die Aufarbeitung wie unten beschrieben. Um eine nichtenzymatische Umwandlung der Xanthine unter Inkubationsbedingungen auszuschließen bzw. ebenfalls zu erfassen, dienten entsprechende mit Coffein oder Theophyllin (Endkonzentration 2×10^{-3} M) versetzte Medien als Kontrolle. Zusätzlich wurden Hautmodelle xanthinfrei über den gleichen Zeitraum inkubiert, um bei der folgenden HPLC-analytischen Auftrennung Substanz- oder Metabolitensignale und Signale aus dem Medium oder der Haut zu differenzieren.

Probengewinnung und Xanthinextraktion aus den Hautkulturmedien. Die Aufarbeitung der Hautkulturmedien und die Vorbereitung für die HPLC-Analytik erfolgten analog der Aufarbeitung der Zellkulturmedien wie unter **2.11** beschrieben.

Probengewinnung und Xanthinextraktion aus den Hautmodellen. Die Hautmodelle wurden aus den 6-Loch-Platten entnommen, der noch verbleibende Überstand abgenommen, und die Haut mit dem Skalpell vollständig aus dem Insert entfernt. Dieses wurde mit 500 μ l PBS nachgespült, und die Spüllösung mit dem Überstand und dem Hautmodell in ein 2 ml Eppendorfgefäß überführt. Anschließend erfolgte eine Behandlung mit fünf Gefrier- / Auftauzyklen in flüssigem Stickstoff / 30°C warmem Wasserbad und der Zusatz von 100 μ l des internen Standards (10^{-2} M in PBS). Nach Behandlung mit dem Vortexgerät und fünfminütigem Zentrifugieren

wurde der Überstand abgenommen und, wie bei den Zellkulturmedien unter **2.11** beschrieben, extrahiert und für die HPLC-Analyse (siehe **2.10**) vorbereitet.

2.13 Franzzelluntersuchungen

Die Versuchsbedingungen der im Folgenden beschriebenen Franzzelluntersuchungen orientieren sich an der OECD Testrichtlinie 428 (OECD, 2004b) sowie dem zugehörigen Guidance Document 28 (OECD, 2003).

Vorbereitung der Häute / Membranen für den Franzzellversuch. Die Hautstanzen / Membranen wurden so in die Franzzellapparatur eingebracht, dass das Stratum corneum der Haut mit Luft in Kontakt stand und die Unterseite oder die Stützmembran mit Rezeptormedium umspült wurde. Die Kunsthäute mussten dazu nach der Vorbehandlung (siehe unter **2.4**) vor Beginn des Permeationsversuches mit Hilfe eines chirurgischen Skalpells aus dem Insert herausgeschnitten und mit einer Pinzette entnommen werden. Die Stützmembranen blieben dabei in Kontakt mit den Häuten.

Versuchsordnung. Die Franzzelluntersuchungen wurden mit dynamischen (\varnothing 9 mm oder 15 mm, Flußraten 8 ml/h oder 4 ml/h) oder statischen Franzzellen (\varnothing 15 mm, $V = 12$ ml) durchgeführt; das Rezeptormedium wurde dabei über ein Wasserbad konstant auf 37 °C temperiert, so dass die Hautoberflächentemperatur 32 ± 1 °C betrug, und mit einem Magnetrührer gleich bleibend bei 500 rpm durchmischt. Als Rezeptormedien dienten PBS mit und ohne Zusatz von 5 % BSA oder 0,5 % Igepal® CA-630. Alle Häute wurden nach einer 30-minütigen Äquillibrierung visuell auf Integrität untersucht. Vor Versuchsbeginn wurde eine entsprechende Menge des Rezeptormediums (s.u.) als Nullprobe entnommen. Im Anschluß wurden 500 μ l ($282,5 \mu$ l / cm^2) einer 1 %-igen oder 0,1 %-igen Coffein-Lösung in Wasser oder PBS, mit oder ohne den Zusatz von 2 % Igepal® CA-630, die zuvor mit radioaktiv markiertem 1-Methyl- ^{14}C -Coffein (spezifische Aktivität = 51,2 mCi/mmol) versetzt worden war, auf die Häute aufgetragen. Die Aktivität in jeder Franzzelle betrug damit 37 kBq ($\equiv 20,9$ kBq / cm^2). Die Öffnung der Franzzelle wurde aus Gründen der besseren Handhabbarkeit für die Dauer des Versuches mit Parafilm® bedeckt. Ein Einfluss der Okklusion mit Parafilm® auf die Coffeinpermeation konnte ausgeschlossen werden (Treffel et al., 1992). Über einen Zeitraum von 6, 8 oder 26 h

wurden im Falle der statischen Versuchsanordnung stündlich oder in längeren Zeitabständen 8 ml, 4 ml oder 0,4 ml Rezeptormedium entnommen und durch frisches Medium ersetzt.

Probenanalytik. Da es sich bei allen Franzzelluntersuchungen um sogenannte 'infinite - dose' - Versuche, d.h. Untersuchungen mit Volumina von $\geq 100 \mu\text{l}/\text{cm}^2$, die einen konstanten Überschuß der Testsubstanz im Donormedium sicherstellen (OECD, 2003), handelt, wurde nur die Permeation betrachtet, d.h. die entnommenen Proben des Rezeptormediums wurden hinsichtlich der Menge pro Zeiteinheit permeierter Substanz analysiert. Dazu wurde 1 ml der Probe (bei Entnahme von 8 ml oder 4 ml) oder das gesamte Volumen (0,4 ml) in einem Eppendorfgesäß mit je 1 ml OptiPhase-Szintillationsflüssigkeit auf dem Vortexgerät bis zur vollständigen Phasenmischung behandelt und die durch die Radioaktivität evozierte Fluoreszenz des Szintillationscocktails im β -Counter ermittelt. Um eine Störung der Resultate durch Signaldämpfung durch BSA oder andere Rezeptormedienkomponenten zu umgehen, wurden die Kalibriergeraden in den entsprechenden Rezeptormedien erstellt.

Datenanalytik. Mit Hilfe der Kalibrierung wurde die permeierte Substanzmenge ermittelt. Dargestellt wurden kumulative Mengen permeierter Substanz, normiert auf die Hautfläche in Kontakt mit dem Rezeptormedium ($\cong 1,77 \text{ cm}^2$) im Verhältnis zur Zeit. Folgende Permeationsparameter wurden zur Bewertung der Ergebnisse hinzugezogen: die permeierte Substanzmenge nach einer bestimmten Zeit (6 oder 24 h) in $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ oder % (im Verhältnis zur aufgetragenen Menge), die 'Lag' - Zeit (in h) und die Permeabilitätskonstante K_p (in cm/h). Zunächst musste allerdings der lineare Bereich ('steady state') der Permeationskurven definiert werden. Dies erfolgte durch Regression, wobei die Steigung der Regressionsgeraden (Steigung des linearen Teils der Funktion) als Flux (J_{ss}) bezeichnet wird. Der Flux wird von der OECD als die Menge Testsubstanz, die unter 'steady state'-Bedingungen eine Flächeneinheit Haut pro Zeiteinheit passiert, definiert (OECD, 2003). Für eine akkurate Bestimmung des Flux-Wertes sollte das Permeationsexperiment für eine Dauer von mindestens 6-10 'Lag' - Zeiten durchgeführt werden (Cooper and Berner, 1985). Außerdem waren mindestens 6 Entnahmezeitpunkte des Rezeptormediums im linearen Bereich zur Bestimmung des linearen Teils der Permeationskurve erforderlich. Den Schnittpunkt der Verlängerung dieser Regressionsgerade mit der Abszisse bezeichnet man als 'Lag' - Zeit (OECD, 2003), die die Dauer wiedergibt, die

eine Substanz für die Permeation durch die Haut benötigt, also die Verzögerung zwischen Versuchsbeginn und Erscheinen der Substanz im Rezeptormedium. Aus dem Flux lässt sich schließlich die Permeabilitätskonstante K_p berechnen, indem man den Flux durch die Ausgangskonzentration der Substanz im Donor dividiert. K_p repräsentiert für 'infinite-dose' -Experimente die Geschwindigkeit, mit der eine Substanz die Haut unter 'steady-state' - Bedingungen permeiert (Nokhodchi et al., 2003; OECD, 2003), charakterisiert demnach abhängig von der Betrachtung die Permeabilität der Membran oder auch das Permeationsvermögen einer Substanz. K_p wurde in dieser Arbeit wie bereits beschrieben (Jaeckle et al., 2003; Moss and Cronin, 2002) berechnet unter der Annahme gleicher Bedingungen, d.h. konstanter Hautdicke und Diffusionsfläche der Haut. Unter diesen Voraussetzungen resultiert folgende Gleichung, in die nur der Flux und die aufgetragene Donorkonzentration (s.o.) eingeht:

$$K_p = [V / A \cdot C_i] \cdot dC_A / dt .$$

K_p wird in cm/h angegeben, wobei V das Volumen der Rezeptorkammer (12 cm^3), A die Fläche der Haut in Kontakt mit dem Rezeptormedium ($1,77 \text{ cm}^2$), C_i die Ausgangskonzentration der applizierten Substanz in $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ und dC_A/dt die zunehmende Konzentration der Substanz im Rezeptormedium mit zunehmender Zeit darstellt.

MTT-Reduktionsassay an Hautmodellen. Im Anschluss an die Franzzellversuche wurde der MTT-Test, wie bereits beschrieben (siehe **2.6**), durchgeführt. Als Kontrolle dienten dabei unbehandelte, in der Franzzelle inkubierte Häute (Inkubation mit PBS, falls nichts anderes angegeben ist).

Parallel dazu wurde zur Bestimmung des Einflusses des Lösungsvermittlers Igepal[®] CA-630 auf die Viabilität des Kunsthautmodells EpiDerm[™] das MTT-Assay direkt im Insert unter Hautkulturbedingungen durchgeführt. Diese Untersuchungen wurden von Frau Helena Kandárová im Labor der ZEBET (Bundesinstitut für Risikobewertung) vorgenommen. Die Hautmodelle wurden dazu für 24 h mit jeweils $11,3 \mu\text{l}/\text{cm}^2$ Igepal[®] in PBS in unterschiedlichen Konzentrationen (0,5 %, 1 %, 2 %, 4 %, 5 %, 20 %) auf der Hautoberfläche inkubiert und im Anschluss dem MTT-Test (s.o.) unterzogen.

2.14 Statistik

Alle Ergebnisse sind als arithmetische Mittelwerte mit der Standardabweichung (\pm SD) als Streuungsmaß angegeben. Zur Prüfung auf Normalverteilung wurde der Shapiro-Wilk-Test verwendet. Der Student's t-Test wurde zwecks Feststellung signifikanter Unterschiede zwischen zwei Mittelwerten herangezogen, nachdem die Homogenität der Varianzen mittels F-Test überprüft wurde. Erwiesen sich die Varianzen als inhomogen, wurde der Welch-Test verwendet. Der Vergleich mehrerer Mittelwerte erfolgte mit Hilfe einer einfachen Varianzanalyse (ANOVA).

Die ANOVA-Analyse der K_p -Werte weiterführender Permeationsversuche sowie die statistische Auswertung der Streudiagramme (s. **3.3.3**) wurde von Frau E. Schmidt, ZEBET, vorgenommen. P -Werte $\leq 0,05$ wurden als signifikant erachtet.