

**In-vitro-Untersuchungen zur Zellverträglichkeit
und antikoagulierenden Wirkung von
carboxymethylierten und nicht carboxymethylierten
sulfatierten Hyaluronsäuren und natürlichen Huminsäuren**



Dissertation

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

vorgelegt der

Naturwissenschaftlichen Fakultät I
Biowissenschaften
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Frau Susanne Kunze geb. Keßler

geb. am: 31. 03. 1976 in: Friedrichroda

Gutachterin bzw. Gutachter:

1. Prof. Dr. Dr. H.-P. Klöcking
2. Prof. Dr. H. Schröder
3. PD Dr. habil. E. Krause

Halle (Saale), den 3. April 2007

urn:nbn:de:gbv:3-000011774

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000011774>]

Meinem Opa Walter

INHALTSVERZEICHNIS

1	Einleitung	1
2	Materialien	6
2.1	Testsubstanzen	6
2.1.1	Sulfatierte Hyaluronsäuren	6
2.1.2	Carboxymethylierte sulfatierte Hyaluronsäuren	8
2.1.3	Torfhuminsäuren	9
2.2	U937-Zellen	10
2.3	Chemikalien und Testkits	11
2.4	Geräte und Hilfsmittel	13
3	Methoden	16
3.1	Globaltest zur Gerinnungsanalytik	16
3.1.1	Thrombelastographie	16
3.2	Gruppentests zur Gerinnungsanalytik	17
3.2.1	Thrombinzeit	18
3.2.2	Prothrombinzeit	18
3.2.3	Aktivierte partielle Thromboplastinzeit	19
3.2.4	Auswertung	20
3.3	Neutralisation der antikoagulierenden Wirkung	20
3.4	Cytotoxizitätsbestimmung	21
3.4.1	Allgemeines	21
3.4.2	Zellzüchtung	22
3.4.3	Aufbereitung der Zellen	22
3.4.4	Versuchsansätze	23
3.4.5	Durchführung	23
3.4.6	Auswertung	24
3.5	Untersuchung der Zellproliferation	25
3.6	[³H]Arachidonsäure-Freisetzungstest (AART)	26
3.6.1	Allgemeines	26
3.6.2	Testdurchführung	28
3.6.3	Auswertung	29

3.7	Weitere Methoden	30
3.7.1	Optische Beurteilung der Zellen	30
3.7.2	Statistik	31
4	Ergebnisse	32
4.1	Sulfatierte Hyaluronsäuren – S-Hya	32
4.1.1	Global- und Gruppentests zur Gerinnungsanalytik	32
4.1.1.1	Thrombelastographie	32
4.1.1.2	Thrombinzeit	33
4.1.1.3	Prothrombinzeit	34
4.1.1.4	Aktivierte partielle Thromboplastinzeit	35
4.1.1.5	Wirkung in Abhängigkeit von der Molmasse	35
4.1.1.6	Wirkung in Abhängigkeit vom Sulfatierungsgrad	37
4.1.2	Neutralisation der antikoagulierenden Wirkung	38
4.1.3	Cytotoxizität	39
4.1.4	Zellproliferation	42
4.1.5	[³ H]Arachidonsäure-Freisetzungstest	45
4.2	Carboxymethylierte hochsulfatierte Hyaluronsäuren – CMS-1	47
4.2.1	Global- und Gruppentests zur Gerinnungsanalytik	47
4.2.1.1	Thrombelastographie	47
4.2.1.2	Thrombinzeit	48
4.2.1.3	Prothrombinzeit	49
4.2.1.4	Aktivierte partielle Thromboplastinzeit	50
4.2.2	Neutralisation der antikoagulierenden Wirkung	50
4.2.3	Cytotoxizität	51
4.2.4	Zellproliferation	54
4.2.5	[³ H]Arachidonsäure-Freisetzungstest	57
4.3	Carboxymethylierte niedersulfatierte Hyaluronsäuren – CMS-2	59
4.3.1	Global- und Gruppentests zur Gerinnungsanalytik	59
4.3.1.1	Thrombelastographie	59
4.3.1.2	Thrombinzeit	60

4.3.1.3	Prothrombinzeit	61
4.3.1.4	Aktivierte partielle Thromboplastinzeit	62
4.3.2	Neutralisation der antikoagulierenden Wirkung	62
4.3.3	Cytotoxizität	63
4.3.4	Zellproliferation	65
4.3.5	[³ H]Arachidonsäure-Freisetzungstest	68
4.4	Torfhuminsäure A1 (THS-A1)	70
4.4.1	Global- und Gruppentests zur Gerinnungsanalytik	70
4.4.1.1	Thrombelastographie	70
4.4.1.2	Thrombinzeit	71
4.4.1.3	Prothrombinzeit	72
4.4.1.4	Aktivierte partielle Thromboplastinzeit	73
4.4.2	Neutralisation der antikoagulierenden Wirkung	73
4.4.3	[³ H]Arachidonsäure-Freisetzungstest	74
4.5	Torfhuminsäure A2 (THS-A2)	76
4.5.1	Global- und Gruppentests zur Gerinnungsanalytik	76
4.5.1.1	Thrombelastographie	76
4.5.1.2	Thrombinzeit	77
4.5.1.3	Prothrombinzeit	78
4.5.1.4	Aktivierte partielle Thromboplastinzeit	79
4.5.2	Neutralisation der antikoagulierenden Wirkung	79
4.5.3	[³ H]Arachidonsäure-Freisetzungstest	80
5	Diskussion	82
6	Zusammenfassung	98
7	Literatur	102

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abb. 1: Ausschnitt aus einem Heparin-Molekül (nach Forth et al., 2001)	1
Abb. 2: Strukturformel Fondaparinux	2
Abb. 3: Strukturformel Hyaluronsäure	3
Abb. 4: Strukturformel von sulfatierter Hyaluronsäure	6
Abb. 5: Strukturformel von carboxymethylierter sulfatierter Hyaluronsäure	8
Abb. 6: U937-Zellen, 280-fache Vergrößerung	10
Abb. 7: Thrombelastogramm modifiziert nach Jaenecke, 1996	17
Abb. 8: Prinzip der Tetrazoliumreduktion	22
Abb. 9: Beschickung der Mikrotiterplatte für den Cytotoxizitätstest	23
Abb. 10: Bestimmung der CC_{50} (CMS-1; Versuch 3 -24 h-)	25
Abb. 11: Strukturformel Arachidonsäure	27
Abb. 12: Einfluss von sulfatierter Hyaluronsäure (S-Hya-15) auf das Thrombelastogramm in Humancitratplasma nach Rekalzifikation (n = 3)	32
Abb. 13: Einfluss von sulfatierter Hyaluronsäure (S-Hya-15) auf die Thrombin-Humancitratplasma-Reaktion ($\bar{x} \pm SE$; n = 3)	33
Abb. 14: Einfluss von sulfatierter Hyaluronsäure (S-Hya-15) auf die Thrombin-Fibrinogen-Reaktion ($\bar{x} \pm SE$; n = 3)	34
Abb. 15: Einfluss von sulfatierter Hyaluronsäure (S-Hya-15) auf die Prothrombinzeit im Humancitratplasma ($\bar{x} \pm SE$; n = 3)	34
Abb. 16: Einfluss von sulfatierter Hyaluronsäure (S-Hya-15) auf die aktivierte partielle Thromboplastinzeit (aPTT) in Humancitratplasma ($\bar{x} \pm SE$; n = 3)	35
Abb. 17: Einfluss von sulfatierter Hyaluronsäure (S-Hya) mit unterschiedlichen Molmassen auf die Thrombin-Humancitratplasma-Reaktion ($\bar{x} \pm SE$; n = 3)	36
Abb. 18: Einfluss der Molmasse von sulfatierter Hyaluronsäure auf die Verdopplung der Thrombinzeit ($\bar{x} \pm SE$; n = 3)	36
Abb. 19: Einfluss des Sulfatierungsgrades von sulfatierter Hyaluronsäure auf die Verdopplung der Thrombinzeit ($\bar{x} \pm SE$; n = 3)	37

Abb. 20: Einfluss von Protaminsulfat auf die Thrombin-Humancitratplasma-Reaktion in vitro ($\bar{x} \pm SE$; n = 2)	38
Abb. 21: Neutralisation der Wirkung von sulfatierter Hyaluronsäure (S-Hya-15; 1,6 µg/ml) durch Protaminsulfat in Humancitratplasma ($\bar{x} \pm SE$; n = 3)	39
Abb. 22: Cytotoxizität von sulfatierter Hyaluronsäure (S-Hya-15) an U937-Zellen im XTT-Tetrazoliumreduktionstest nach 1- und 24-stündiger Exposition ($\bar{x} \pm SE$; n = 3)	40
Abb. 23: U937-Zellen nach 1- und 24-stündiger Exposition mit sulfatierter Hyaluronsäure (S-Hya-15) (280-fache Vergrößerung)	41
Abb. 24: Proliferation von U937-Zellen unter dem Einfluss von sulfatierter Hyaluronsäure (S-Hya-15) – Zellzahlbestimmung – ($\bar{x} \pm SE$; n = 3)	42
Abb. 25: Proliferation von U937-Zellen unter dem Einfluss von sulfatierter Hyaluronsäure (S-Hya-15) – XTT-Tetrazoliumreduktionstest – ($\bar{x} \pm SE$; n = 3)	42
Abb. 26: Einfluss von sulfatierter Hyaluronsäure (S-Hya-15) auf die Proliferation von U937-Zellen; Zellzahl in Prozent der Kontrolle im Konzentrationsbereich 0,1 - 0,8 mg/ml ($\bar{x} \pm SE$, n = 3)	43
Abb. 27: Einfluss von sulfatierter Hyaluronsäure (S-Hya-15) auf die Proliferation von U937-Zellen; Zellzahl in Prozent der Kontrolle im Konzentrationsbereich 1,6 - 12,8 mg/ml ($\bar{x} \pm SE$, n = 3)	43
Abb. 28: Einfluss von sulfatierter Hyaluronsäure (S-Hya-15) auf die Proliferation von U937-Zellen; Optische Dichte in Prozent der Kontrolle im Konzentrationsbereich 0,1 - 0,8 mg/ml ($\bar{x} \pm SE$, n = 3)	44
Abb. 29: Einfluss von sulfatierter Hyaluronsäure (S-Hya-15) auf die Proliferation von U937-Zellen; Optische Dichte in Prozent der Kontrolle im Konzentrationsbereich 1,6 - 12,8 mg/ml ($\bar{x} \pm SE$, n = 3)	44
Abb. 30: Beeinflussung der Zellproliferation von U937-Zellen durch sulfatierte Hyaluronsäure (S-Hya-15) nach 96 Stunden Einwirkung ($\bar{x} \pm SE$, n = 3)	45

Abb. 31: Membrantoxizität von sulfatierter Hyaluronsäure (S-Hya-15) an U937-Zellen nach 1- und 24-stündiger Exposition bei 37 °C sowie 1 Stunde bei 4 °C ($\bar{x} \pm SE$, n = 3)	46
Abb. 32: Einfluss von carboxymethylierter sulfatierter Hyaluronsäure (CMS-1) auf das Thrombelastogramm in Humancitratplasma nach Rekalzifikation (n = 3)	47
Abb. 33: Einfluss von carboxymethylierter sulfatierter Hyaluronsäure (CMS-1) auf die Thrombin-Humancitratplasma-Reaktion ($\bar{x} \pm SE$; n = 3)	48
Abb. 34: Einfluss von carboxymethylierter sulfatierter Hyaluronsäure (CMS-1) auf die Thrombin-Fibrinogen-Interaktion ($\bar{x} \pm SE$; n = 3)	49
Abb. 35: Einfluss von carboxymethylierter sulfatierter Hyaluronsäure (CMS-1) auf die Prothrombinzeit in Humancitratplasma ($\bar{x} \pm SE$, n = 3)	49
Abb. 36: Einfluss von carboxymethylierter sulfatierter Hyaluronsäure (CMS-1) auf die aktivierte partielle Thromboplastinzeit (aPTT) in Humancitratplasma ($\bar{x} \pm SE$; n = 3)	50
Abb. 37: Neutralisation der Wirkung von carboxymethylierter sulfatierter Hyaluronsäure (CMS-1; 1,6 µg/ml) durch Protaminsulfat in Humancitratplasma ($\bar{x} \pm SE$; n = 3)	51
Abb. 38: Cytotoxizität von carboxymethylierter sulfatierter Hyaluronsäure (CMS-1) an U937-Zellen im XTT-Tetrazoliumreduktionstest nach 1- und 24-stündiger Exposition ($\bar{x} \pm SE$; n = 3)	52
Abb. 39: U937-Zellen nach 1- und 24-stündiger Exposition mit carboxymethylierter sulfatierter Hyaluronsäure (CMS-1) (280-fache Vergrößerung)	53
Abb. 40: Proliferation von U937-Zellen unter dem Einfluss von carboxymethylierter sulfatierter Hyaluronsäure (CMS-1) – Zellzahlbestimmung – ($\bar{x} \pm SE$; n = 3)	54
Abb. 41: Proliferation von U937-Zellen unter dem Einfluss von carboxymethylierter sulfatierter Hyaluronsäure (CMS-1) – XTT-Tetrazoliumreduktionstest – ($\bar{x} \pm SE$; n = 3)	54

Abb. 42: Einfluss von carboxymethylierter sulfatierter Hyaluronsäure (CMS-1) auf die Proliferation von U937-Zellen; Zellzahl in Prozent der Kontrolle im Konzentrationsbereich 0,1 - 0,8 mg/ml ($\bar{x} \pm SE$; n = 3)	55
Abb. 43: Einfluss von carboxymethylierter sulfatierter Hyaluronsäure (CMS-1) auf die Proliferation von U937-Zellen; Zellzahl in Prozent der Kontrolle im Konzentrationsbereich 1,6 - 12,8 mg/ml ($\bar{x} \pm SE$; n = 3)	55
Abb. 44: Einfluss von carboxymethylierter sulfatierter Hyaluronsäure (CMS-1) auf die Proliferation von U937-Zellen ; Optische Dichte in Prozent der Kontrolle im Konzentrationsbereich 0,1 - 0,8 mg/ml ($\bar{x} \pm SE$, n = 3)	56
Abb. 45: Einfluss von carboxymethylierter sulfatierter Hyaluronsäure (CMS-1) auf die Proliferation von U937-Zellen; Optische Dichte in Prozent der Kontrolle im Konzentrationsbereich 1,6 - 12,8 mg/ml ($\bar{x} \pm SE$; n = 3)	56
Abb. 46: Beeinflussung der Zellproliferation von U937-Zellen durch carboxymethylierte sulfatierte Hyaluronsäure (CMS-1) nach 96-stündiger Exposition ($\bar{x} \pm SE$, n = 3)	57
Abb. 47: Membrantoxizität von carboxymethylierter sulfatierter Hyaluronsäure (CMS-1) an U937-Zellen nach 1- und 24-stündiger Exposition bei 37 °C sowie 1 Stunde bei 4 °C ($\bar{x} \pm SE$, n = 3)	58
Abb. 48: Einfluss von carboxymethylierter sulfatierter Hyaluronsäure (CMS-2) auf das Thrombelastogramm in Humancitratplasma nach Rekalzifizierung	59
Abb. 49: Verlängerung der Thrombinzeiten in Humancitratplasma durch carboxymethylierte sulfatierte Hyaluronsäure (CMS-2) ($\bar{x} \pm SE$; n = 3)	60
Abb. 50: Einfluss von carboxymethylierter sulfatierter Hyaluronsäure (CMS-2) auf die Thrombin-Fibrinogen-Interaktion ($\bar{x} \pm SE$; n = 3)	61

Abb. 51: Einfluss von carboxymethylierter sulfatierter Hyaluronsäure (CMS-2) auf die Prothrombinzeit in Humancitratplasma ($\bar{x} \pm SE$; n = 3)	61
Abb. 52: Einfluss von carboxymethylierter sulfatierter Hyaluronsäure (CMS-2) auf die aktivierte partielle Thromboplastinzeit (aPTT) in Humancitratplasma ($\bar{x} \pm SE$; n = 3)	62
Abb. 53: Neutralisation der Wirkung von carboxymethylierter sulfatierter Hyaluronsäure (CMS-2; 6,3 µg/ml) durch Protaminsulfat in Humancitratplasma ($\bar{x} \pm SE$; n = 3)	63
Abb. 54: Cytotoxizität von carboxymethylierter sulfatierter Hyaluronsäure (CMS-2) an U937-Zellen im XTT-Tetrazoliumreduktionstest nach 1- und 24-stündiger Exposition ($\bar{x} \pm SE$; n = 3)	63
Abb. 55: U937-Zellen nach 1- und 24-stündiger Exposition mit carboxymethylierter sulfatierter Hyaluronsäure (CMS-2) (280-fache Vergrößerung)	64
Abb. 56: Proliferation von U937-Zellen unter dem Einfluss von carboxymethylierter sulfatierter Hyaluronsäure (CMS-2) – Zellzahlbestimmung – ($\bar{x} \pm SE$; n = 3)	65
Abb. 57: Proliferation von U937-Zellen unter dem Einfluss von carboxymethylierter sulfatierter Hyaluronsäure (CMS-2) – XTT-Tetrazoliumreduktionstest – ($\bar{x} \pm SE$; n = 3)	65
Abb. 58: Einfluss von carboxymethylierter sulfatierter Hyaluronsäure (CMS-2) auf die Proliferation von U937-Zellen; Zellzahl in Prozent der Kontrolle im Konzentrationsbereich 0,1 - 0,8 mg/ml ($\bar{x} \pm SE$; n = 3)	66
Abb. 59: Einfluss von carboxymethylierter sulfatierter Hyaluronsäure (CMS-2) auf die Proliferation von U937-Zellen; Zellzahl in Prozent der Kontrolle im Konzentrationsbereich 1,6 - 12,8 mg/ml ($\bar{x} \pm SE$; n = 3)	66
Abb. 60: Einfluss von carboxymethylierter sulfatierter Hyaluronsäure (CMS-2) auf die Proliferation von U937-Zellen; Optische Dichte in Prozent der Kontrolle im Konzentrationsbereich 0,1 - 0,8 mg/ml ($\bar{x} \pm SE$; n = 3)	67

Abb. 61: Einfluss von carboxymethylierter sulfatierter Hyaluronsäure (CMS-2) auf die Proliferation von U937-Zellen; Optische Dichte in Prozent der Kontrolle im Konzentrationsbereich 1,6 - 12,8 mg/ml ($\bar{x} \pm SE$; n = 3)	67
Abb. 62: Beeinflussung der Zellproliferation von U937-Zellen durch carboxymethylierte sulfatierte Hyaluronsäure (CMS-2) nach 96-stündiger Exposition ($\bar{x} \pm SE$, n = 3)	68
Abb. 63: Membrantoxizität von carboxymethylierter sulfatierter Hyaluron- säure (CMS-2) an U937-Zellen nach 1- und 24-stündiger Exposition bei 37 °C sowie 1 Stunde bei 4 °C ($\bar{x} \pm SE$, n = 3)	69
Abb. 64: Einfluss von Torfhuminsäure A1 (THS-A1) auf das Thrombelastogramm in Humancitratplasma nach Rekalzifizierung	70
Abb. 65: Einfluss von Torfhuminsäure A1 (THS-A1) auf die Thrombin- Humancitratplasma-Reaktion ($\bar{x} \pm SE$; n = 3)	71
Abb. 66: Einfluss von Torfhuminsäure A1 (THS-A1) auf die Thrombin-Fibrinogen-Reaktion ($\bar{x} \pm SE$; n = 3)	72
Abb. 67: Einfluss von Torfhuminsäure A1 (THS-A1) auf die Prothrombinzeit in Humancitratplasma ($\bar{x} \pm SE$; n = 3)	72
Abb. 68: Einfluss von Torfhuminsäure A1 (THS-A1) auf die aktivierte partielle Thromboplastinzeit (aPTT) in Humancitratplasma ($\bar{x} \pm SE$; n = 3)	73
Abb. 69: Einfluss von Protaminsulfat auf die von Torfhuminsäure A1 (THS-A1; 200,0 µg/ml) ausgelöste Gerinnungsverzögerung ($\bar{x} \pm SE$; n = 3)	74
Abb. 70: Membrantoxizität von Torfhuminsäure A1 (THS-A1) an U937-Zellen nach 1- und 24-stündiger Exposition bei 37 °C sowie 1 Stunde bei 4 °C ($\bar{x} \pm SE$, n = 3)	75
Abb. 71: Einfluss von Torfhuminsäure A2 (THS-A2) auf das Thrombelastogramm in Humancitratplasma nach Rekalzifizierung	76
Abb. 72: Einfluss von Torfhuminsäure A2 (THS-A2) auf die Thrombin- Humancitratplasma-Reaktion ($\bar{x} \pm SE$; n = 3)	77
Abb. 73: Einfluss von Torfhuminsäure A2 (THS-A2) auf die Thrombin- Fibrinogen-Reaktion ($\bar{x} \pm SE$; n = 3)	78

Abb. 74: Einfluss von Torfhuminsäure A2 (THS-A2) auf die Prothrombinzeit in Humancitratplasma ($\bar{x} \pm SE$; n = 3)	78
Abb. 75: Einfluss von Torfhuminsäure A2 (THS-A2) auf die aktivierte partielle Thromboplastinzeit (aPTT) in Humancitratplasma ($\bar{x} \pm SE$; n = 3)	79
Abb. 76: Einfluss von Protaminsulfat auf die von Torfhuminsäure A2 (THS-A2) ausgelöste Gerinnungsverzögerung ($\bar{x} \pm SE$; n = 3)	80
Abb. 77: Membrantoxizität von Torfhuminsäure A2 (THS-A2) an U937-Zellen nach 1- und 24-stündiger Exposition bei 37 °C sowie 1 Stunde bei 4 °C ($\bar{x} \pm SE$, n = 3)	81
Abb. 78: Antikoagulierende Wirkung von sulfatierter Hyaluronsäure (S-Hya-15) in vitro in Humancitratplasma ($\bar{x} \pm SE$; n = 3)	84
Abb. 79: Antikoagulierende Wirkung von carboxymethylierter sulfatierter Hyaluronsäure (CMS-1) in vitro in Humancitratplasma ($\bar{x} \pm SE$; n = 3)	85
Abb. 80: Antikoagulierende Wirkung von carboxymethylierter sulfatierter Hyaluronsäure (CMS-2) in vitro in Humancitratplasma ($\bar{x} \pm SE$; n = 3)	85
Abb. 81: Antikoagulierende Wirkung von Torfhuminsäure A1 (THS-A1) in vitro in Humancitratplasma ($\bar{x} \pm SE$; n = 3)	88
Abb. 82: Antikoagulierende Wirkung von Torfhuminsäure A2 (THS-A2) in vitro in Humancitratplasma ($\bar{x} \pm SE$; n = 3)	88
Abb. 83: Wachstumsbeeinflussung von U937-Zellen durch S-Hya-15, CMS-1 und CMS-2 nach 96 Stunden Exposition ($\bar{x} \pm SE$; n = 3)	94

TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1:	Eigenschaften der sulfatierten Hyaluronsäuren	7
Tabelle 2:	Gruppeneinteilung der sulfatierten Hyaluronsäuren nach der Molmasse (M_w) und dem Sulfatierungsgrad (DS_s)	7
Tabelle 3:	Eigenschaften der carboxymethylierten sulfatierten Hyaluronsäuren	9
Tabelle 4:	Gruppeneinteilung der carboxymethylierten sulfatierten Hyaluronsäuren nach dem Sulfatierungsgrad	9
Tabelle 5:	Wirkung der sulfatierten Hyaluronsäuren auf die plasmatische Gerinnung in Abhängigkeit von der Molmasse	35
Tabelle 6:	Wirkung der sulfatierten Hyaluronsäuren auf die plasmatische Gerinnung in Abhängigkeit vom Sulfatierungsgrad	37
Tabelle 7:	Konzentrationen ($\mu\text{g/ml}$) der untersuchten Substanzen, die eine Verdopplung der Gerinnungszeiten in den Gruppentests Thrombinzeit (TZ)-, aktivierte partielle Thromboplastinzeit (aPTT)- und Prothrombinzeit (PT)-Bestimmung in Humancitratplasma bewirken	82
Tabelle 8:	Antikoagulierende Wirkung polyanionischer Verbindungen in vitro (Humancitratplasma) im Thrombelastogramm	83
Tabelle 9:	Neutralisation der antikoagulierenden Wirkung von polyanionischen Verbindungen durch Protaminsulfat	90
Tabelle 10:	Halbmaximale cytotoxische Konzentrationen (CC_{50}) von polyanionischen Verbindungen in U937-Zellen. XTT-Tetrazoliumreduktionstest	93
Tabelle 11:	RC_5 -Werte mit Konfidenzintervallen, ermittelt mit Hilfe des [^3H]AA-Freisetzungstests, als Parameter für die Membrantoxizität der untersuchten Substanzen	96
Tabelle 12:	Testsubstanzen im Vergleich [^3H]AA-Freisetzungstest und XTT-Tetrazoliumreduktionstest nach 24 h Exposition bei 37 °C	97

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

a	Amplitude
AA	Arachidonsäure
AART	Arachidonsäure-Freisetzungstest
Ald-HS	Aldrich-Huminsäure
aPTT	Aktivierte partielle Thromboplastinzeit
AT III	Antithrombin III
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BSE	<i>Bovine Spongiforme Enzephalopathie</i>
CC ₅₀	Halbmaximale cytotoxische Konzentration
CMS-1/CMS-2	Gruppenbezeichnung für carboxymethylierte sulfatierte Hyaluronsäuren
CT	Cytotoxizität
Da	Dalton
DMF	Dimethylformamid
DS _s	<i>Degree of substitution</i>
E	Einbaurate
ECACC	<i>European Collection of Cell Cultures</i>
EMA	<i>European Medicines Agency</i>
EZ4U	<i>Easy for you</i>
FI	Faktor I, Fibrinogen
FII	Prothrombin
FXa	aktivierter Faktor Xa, Stuart Prower Faktor
FCS	Foetales Kälberserum
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
[³ H]	Tritium
[³ H]AA	Tritiummarkierte Arachidonsäure
HIT-Typ II	Heparin induzierte Thrombocytopenie Typ II
HKI	Hans-Knöll-Institut
HS	Huminsäure
IL1	Interleukin 1
INR	Internationale Normalisierte Ratio
k	Gerinnselbildungszeit

LW	Leerwert
ma	maximale Thrombusfestigkeit
M _w	gewichtsmittlere Molmasse
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazoliumbromid
NADPH	Nicotinamid-adenin-dinucleotid-phosphat
NaHS	Natriumhumat HD80
NHS	Natürliche Huminstoffe
NIH	<i>National Institute of Health</i>
NMH	Niedermolekulares Heparin
PS	Protaminsulfat
PT	Prothrombinzeit
r	Reaktionszeit
RC ₅	<i>Releasing concentration</i> (Freisetzungskonzentration) bei 5 % Membrantoxizität
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
SC	Szintillatorcocktail
SD	Standardabweichung
SDS	Natriumdodecylsulfat
SE	mittlerer Fehler
S-Hya	Gruppenbezeichnung für sulfatierte Hyaluronsäure
S-Hya-1	
bis S-Hya-15	Substanzbezeichnung für sulfatierte Hyaluronsäure
SP ₅₄	Pentosanpolysulfat
TEG	Thrombelastogramm
TF	Tissue faktor
THS	Torhuminsäuren
THS-A1	Torhuminsäure A1
THS-A2	Torhuminsäure A2
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TZ	Thrombinzeit
UFH	Unfraktioniertes Heparin
U/min	Umdrehungen pro Minute
VKA	Vitamin-K-Antagonisten
WHO	Weltgesundheitsorganisation

\bar{x}

Mittelwert

XTT

Na-3,3`-[1-(phenylamino)-carbonyl-3,4-tetrazolium]-bis(4-methoxy-6-nitro)-benzol-sulfonsäurehydrat

1 Einleitung

Die koronare Arteriosklerose mit ihren unterschiedlichen klinischen Manifestationen – Angina pectoris, Herzinfarkt, plötzlicher Herztod und Herzinsuffizienz – ist die bedeutendste Ursache für Arbeitsunfähigkeit, vorzeitige Invalidisierung und Tod in den westlichen Industrienationen (Saubier und Bode, 2005). Das Arzneimittelrepertoire zur Behandlung thromboembolischer Erkrankungen bestand jahrzehntelang aus zwei Zufallsentdeckungen, dem direkt wirksamen Antikoagulans Heparin (unfraktioniertes Heparin, UFH) und den Vitamin-K-Antagonisten (VKA). UFH, ein komplexes Polysaccharidgemisch tierischen Ursprungs und VKA, Derivate pflanzlicher Cumarine, werden durchaus als effiziente Antikoagulanzen eingesetzt, doch bergen sie auch eine Reihe unerwünschter Wirkungen. Zahlreiche Medikamenteninteraktionen haben unterschiedlich starke Einflüsse auf die Pharmakokinetik und Pharmakodynamik der VKA (Harder and Thurmman, 1996). Daraus resultieren starke inter- und intraindividuelle Schwankungen der Gerinnungshemmung durch VKA, so dass sie anhand eines engmaschigen Gerinnungs-Monitoring (INR-Bestimmung) individuell dosiert werden müssen.

Unfraktioniertes Heparin bindet an eine Reihe von Plasmaproteinen und Zellen, daraus resultiert eine ungünstige Bioverfügbarkeit nach subkutaner Gabe und eine große Variabilität des antikoagulatorischen Effekts von UFH (Harder und Breddin, 2004). Das Blutungsrisiko steigt mit zunehmender Dosis (Hirsh et al., 2001).

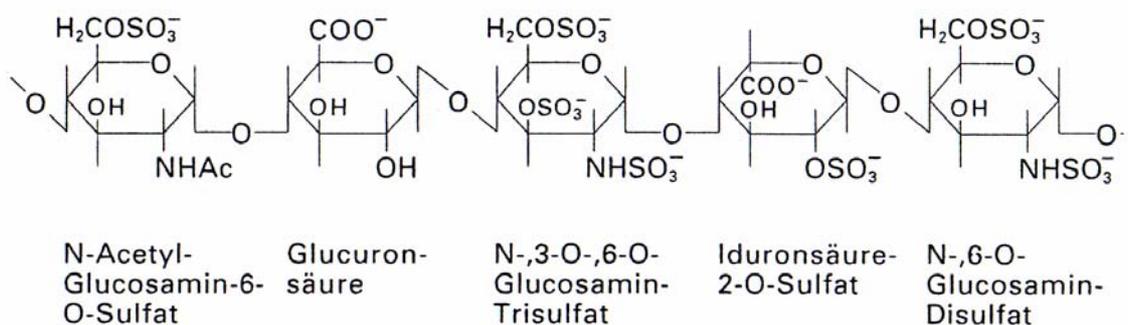


Abb. 1: Ausschnitt aus einem Heparin-Molekül (nach Forth et al., 2001)

Ein großer Fortschritt ist in der Entwicklung der niedermolekularen Heparine (NMH, Abb. 1) zu sehen, die durch chemische oder enzymatische Degradation aus unfraktioniertem Heparin hergestellt werden.

Sie haben eine Bioverfügbarkeit von mehr als 90 Prozent nach subkutaner Gabe und einen vorhersehbaren und reproduzierbaren gerinnungshemmenden Effekt (Harder und Breddin, 2004).

Doch auch diese Arzneistoffe (UFH und NMH) sind keine idealen Antikoagulanzen, da sie mit Thrombose-Inzidenzen bis zu 30 % (z. B. bei Kniegelenkersatz), einem nicht auszuschließenden Blutungsrisiko nur bedingt einsetzbar sind. Als schwerwiegendste Nebenwirkung können bei der Heparin-gabe schwere Formen der Heparin induzierten Thrombocytopenie Typ II (HIT-Typ II) auftreten (Haas, 2004).

Heparine (UFH und NMH) sind ausschließlich tierischen Ursprungs. Laut WHO-, FDA- und EMEA-Empfehlung soll aber die Anwendung tierischer Produkte in der Medizin nach Möglichkeit vermieden werden, um die Übertragung von Pathogenen zu vermeiden (Alban, 2003). Heparin wird mittlerweile nicht mehr aus Rinderlunge, sondern aus Schweinedarmmukosa isoliert, was jedoch nur einen Schutz gegen die Rinderkrankheit BSE darstellt.

Diese Problematik führte zur Entwicklung weiterer Arzneistoffe. Fondaparinux (Arixtra[®], Abb. 2) ist der erste spezifisch wirkende Arzneistoff auf der Basis eines strukturell definierten, synthetisch hergestellten Oligosaccharids und der erste Vertreter einer neuen Klasse von Antikoagulanzen, den selektiven FXa-Inhibitoren. Er ist derzeit für die Thromboseprophylaxe bei orthopädischen Eingriffen zugelassen. Fondaparinux hat ein lineares, dosisabhängiges, pharmakokinetisches Profil. Die Bioverfügbarkeit beträgt nach subkutaner Gabe 100 %, die Halbwertszeit 17 bis 21 Stunden. Dies ermöglicht eine einmalige Gabe (Harder und Breddin, 2004).

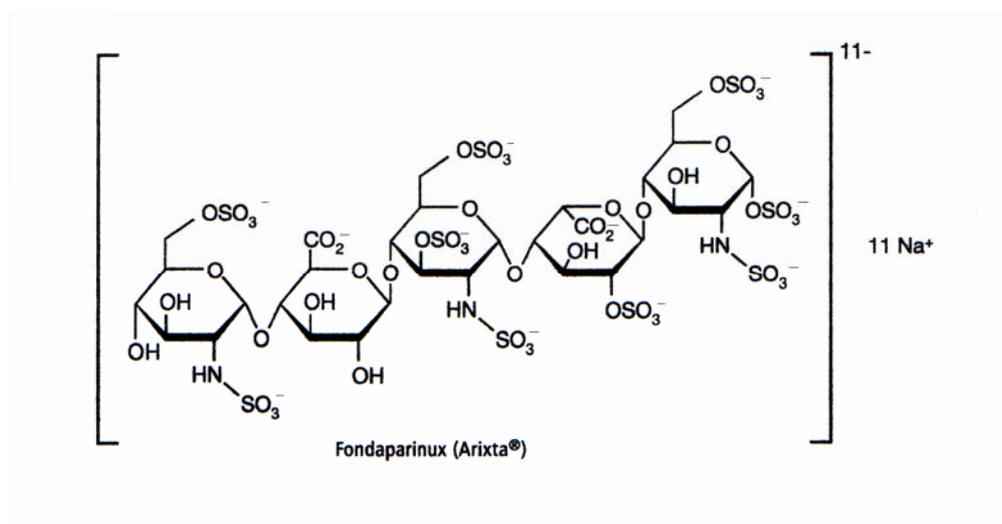


Abb. 2: Strukturformel Fondaparinux

Die beschriebenen Substanzen haben eine Gemeinsamkeit – sie gehören alle zu den sulfatierten Oligo- bzw. Polysacchariden. Es lag daher nahe, weitere sulfatierte Verbindungen zu entwickeln und ihre antikoagulierende Aktivität zu untersuchen.

Hyaluronsäure (Abb. 3) ist eine natürliche Substanz aus der großen Gruppe der Polysaccharid-Biopolymere, die wichtige Bestandteile von Knorpel und Gelenkflüssigkeit darstellen (Karen et al., 1994). Sie besitzt als einziges nicht sulfatiertes Mitglied der Glykosaminoglykane keine antikoagulierenden und antithrombotischen Eigenschaften.

Erst die Sulfatierung führt zu Derivaten mit einer antikoagulierenden Aktivität, die im Bereich von Heparin liegt (Barbucci et al., 1994; Magnani et al., 1996; Klöcking et al., 1998a). Durch eine spezifische Reaktionsführung ist es gelungen, Verbindungen mit einstellbarem und reproduzierbarem Sulfatierungsgrad zu erhalten (Tan et al., 1990; Wada et al., 1994; Möller et al., 1998). Diese Strukturstabilität ist Voraussetzung für eine gleichbleibende antikoagulierende Wirkung.

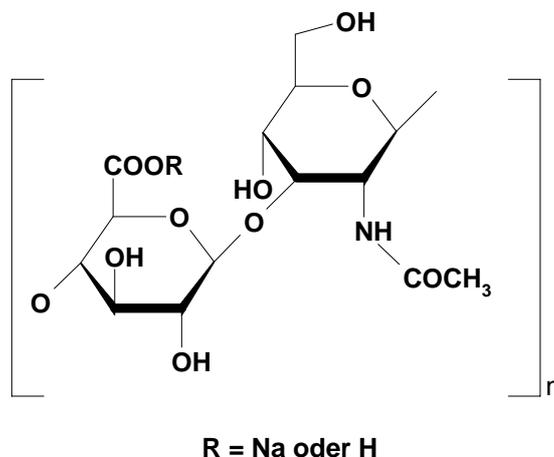


Abb. 3: Strukturformel Hyaluronsäure

Unter dem Aspekt der Kosten und des von BSE ausgehenden gesundheitlichen Risikos bei der Verwendung von Hyaluronsäure tierischer Herkunft kam der Erschließung neuer Hyaluronsäurequellen eine große Bedeutung zu. 1995 wurde im Naturstofftechnikum des Hans-Knöll-Instituts für Naturstoff-Forschung (HKI) Jena ein Verfahren zur biotechnologischen Herstellung einer sehr reinen Hyaluronsäure aus Mikroorganismen der Gattung *Streptococcus* entwickelt.

Dieses Verfahren wurde 1998 von der Aqua Biochem GmbH in Dessau als Produktionsverfahren etabliert und bot für diese Arbeit die Grundlage zur Synthese sulfatierter Hyaluronsäuren.

Die Einführung von Carboxylgruppen in das Molekül durch Veresterung mit Halogencarbonsäuren und die anschließende Sulfatierung der noch freien Hydroxylgruppen erlaubt – neben der durch die Sulfatreste bedingten antikoagulierenden bzw. antiviralen Wirkung der Substanzen – eine zusätzliche Einführung weiterer aktiver Gruppen über eine Bindung an die noch vorhandenen freien Carboxylgruppen.

Eine Substanzklasse, deren Vertreter ebenfalls zu den polyanionischen Verbindungen gehören, bilden die Torfhuminsäuren (THS). Sie sind die organischen Hauptbestandteile von Hoch- und Niedermoortorfen und entstehen überwiegend bei der Humifizierung von pflanzlichen Ausgangsmaterialien (Lignin, Laub, „Torf“-Moos etc.). Das zugrundeliegende Reaktionsprinzip, die Oxidation niedermolekularer phenolischer Verbindungen zu mineralischen braunen Pigmenten mit höher Molmasse als die Ausgangssubstanzen, wurde auch zur Herstellung synthetischer Huminsäuren genutzt (Helbig et al., 1994).

Sowohl natürliche als auch synthetische Huminsäuren besitzen antikoagulierende, fibrinolytische und entzündungshemmende Eigenschaften (Klöcking, 1990, 1991, 1991a, 1994a; Klöcking et al., 1968, 1984, 1992, 1994a; Klöcking und Klöcking, 1986; Navara, 2001; Zsunshuj et al., 1981).

Den Huminstoffen werden nicht nur Erfolge bei der Behandlung von Thrombophlebitiden (Lachmann, 1964) zugeschrieben, sondern – auf Grund ihrer thermophysikalischen Eigenschaften – auch die Linderung der Leiden von Rheumatikern (Kleinschmidt, 1988; Priegnitz, 1986). Dank verschiedener galenischer Zubereitungsformen helfen sie z. B. als Tinkturen bei Magen-Darm-Störungen (Siedeck et al., 1960) oder als Moorpackung bei Hauterkrankungen wie Akne und Dermatitis (Groven, 2006). Trotz langjähriger, überwiegend positiver Erfahrungen mit Moorbehandlungen ist wenig über die pharmakologischen und toxikologischen Wirkungen des Torfes bekannt. Die Klärung dieser Fragen gewinnt daher zunehmend an Bedeutung.

Zu den Anforderungen an ein ideales Antikoagulanzen gehören nach Oldenburg (2006) folgende Charakteristika: Ein vorhersagbarer antikoagulatorischer Effekt mit möglichst großer therapeutischer Breite, keine Cofaktorbeteiligung an der Wirkung (z. B. Antithrombin III) und die Verfügbarkeit eines Antidots.

Aufgabe der vorliegenden Arbeit ist es, drei verschiedene polyanionische Substanzklassen im Hinblick auf diese Anforderungen zu untersuchen und mit bisherigen Ergebnissen zur Beeinflussung der Hämostase zu vergleichen. Entsprechend ihrer Struktur, ihrem Vorkommen und ihrer Verwendung repräsentieren die Test- und Vergleichssubstanzen zwei Gruppen polyanionischer Verbindungen:

1. Sulfatierte Verbindungen (sulfatierte Hyaluronsäuren, carboxymethylierte sulfatierte Hyaluronsäuren, Heparin, Pentosanpolysulfat, Reviparin)
2. Natürlich vorkommende Huminsäuren (Torfhuminsäure A1 und Torfhuminsäure A2, Aldrich Huminsäure, Natriumhumat)

Methodische Grundlage bilden zum einen die Thrombelastographie und zum anderen die mittels Gerinnungsanalyse bestimmte Thrombinzeit (im Plasma und Fibrinogen), aktivierte partielle Thromboplastinzeit und Prothrombinzeit. Zur Antagonisierung der antikoagulierenden Wirkung wird Protaminsulfat eingesetzt. Durch die Bestimmung der Cytotoxizität, Proliferation und Membrantoxizität wird die Zellverträglichkeit der Testsubstanzen an U937-Zellen näher charakterisiert.

2 Materialien

2.1 Testsubstanzen

2.1.1 Sulfatierte Hyaluronsäuren

Die in den Versuchen verwendeten sulfatierten Hyaluronsäuren (Abb. 4) werden folgendermaßen synthetisiert: Durch Überführung der Hyaluronsäure in ein Ammoniumsalz wird die Löslichkeit in einem technisch gebräuchlichen organischen dipolar aprotischen Lösungsmittel erreicht. Das Sulfatierungsreagens Schwefeltrioxid/Dimethylformamid-Komplex (SO_3/DMF) ermöglicht die Sulfatierung in homogener Phase, wobei je nach Konzentration des Sulfatierungsreagens und der Reaktionszeit der Sulfatierungsgrad eingestellt werden kann (Möller et al., 1998; Tan et al., 1990; Wada et al., 1994).

Der Schwefelgehalt des Polymers wird mittels elementaranalytischer und NMR-spektroskopischer Untersuchungen ermittelt. Der Substitutionsgrad der Sulfatierung (Sulfatierungsgrad DS_s) wird rechnerisch bestimmt. Er gibt die Anzahl der funktionalisierten Hydroxylgruppen bezogen auf eine Disaccharid-Wiederholungseinheit der Hyaluronsäure an. Entsprechend der Anzahl der Hydroxylgruppen pro Disaccharid-Wiederholungseinheit der Hyaluronsäure sind DS_s -Werte zwischen 0 und 4,0 realisierbar.

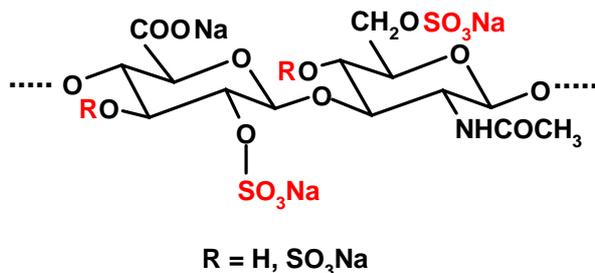


Abb. 4: Strukturformel von sulfatierter Hyaluronsäure

Während der Sulfatierungsreaktion kommt es größtenteils zum Molmassenabbau des Polymermoleküls. Ausgehend von Polymermassen von etwa 1 Million Da werden im sulfatierten Endprodukt Molmassen bis zu 65.000 Da (Tab. 1) erreicht (Möller et al., 1998). Nach Angaben der Firma Innovent in Jena wurden die Molmasse und die Molmassenverteilung der Hyaluronsäurederivate mit Hilfe der Gelpermeationschromatographie unter Verwendung von Pullulan-Standards (Molmassen: 342 bis

710.000) bestimmt. Die Messungen erfolgten als Doppelbestimmungen mit einer GPC-Anlage der Firma Jasco, die Detektion mittels eines Lichtstreuendetektors.

Tabelle 1: *Eigenschaften der sulfatierten Hyaluronsäuren¹⁾*

Nummer S-Hya	DS _s ²⁾	M _w (Da) Lichtstreuung ³⁾
1	3,70	65.560
2	2,40	88.500
3	2,15	145.200
4	2,10	275.800
5	3,00	1.240.000
6	3,50	169.755
7	3,00	1.634.000
8	2,85	555.400
9	2,40	1.199.000
10	2,65	505.000
11	2,20	818.425
12	2,15	1.071.000
13	2,60	140.970
14	2,60	189.675
15	2,73	1.033.000

¹⁾ Angaben von Innovent e.V.

²⁾ Sulfatierungsgrad

³⁾ M_w: gewichtsmittlere Molmasse

In den Abschnitten 4.1.1.5 und 4.1.1.6 werden die sulfatierten Hyaluronsäuren hinsichtlich ihrer Wirkung in Abhängigkeit von der Molmasse (M_w) bzw. vom Sulfatierungsgrad (DS_s) getestet. Dabei erfolgt eine Einteilung in verschiedene Gruppen. Jede Gruppe besteht aus drei sulfatierten Hyaluronsäuren mit ähnlichem M_w bzw. DS_s (Tab. 2).

Tabelle 2: *Gruppeneinteilung der sulfatierten Hyaluronsäuren nach der Molmasse (M_w) und dem Sulfatierungsgrad (DS_s)*

Gruppenbezeichnung	Nummer S-Hya	DS _s (\bar{x})	M _w (\bar{x}) Lichtstreuung
Gruppe 1	1, 2, 3	2,75	99.783
Gruppe 2	8, 10, 11	2,57	626.275
Gruppe 3	5, 7, 9	2,80	1.357.667
Gruppe 4	4, 11, 12	2,15	721.742
Gruppe 5	10, 13, 14	2,62	278.548
Gruppe 6	6, 7, 8	3,12	786.385

2.1.2 Carboxymethylierte sulfatierte Hyaluronsäuren

Ausgehend von Hyaluronsäure wird die carboxymethylierte sulfatierte Hyaluronsäure (CMS) in zwei Schritten synthetisiert. Zuerst erfolgt die Carboxymethylierung des Natriumhyaluronats mit Chloressigsäure in Gegenwart von Natriumhydroxid. Der durchschnittliche Substitutionsgrad an neu eingeführten Carboxymethylgruppen (DS_{CM}) wird durch Säure-Base-Titration bestimmt und liegt zwischen 0,3 und 0,4.

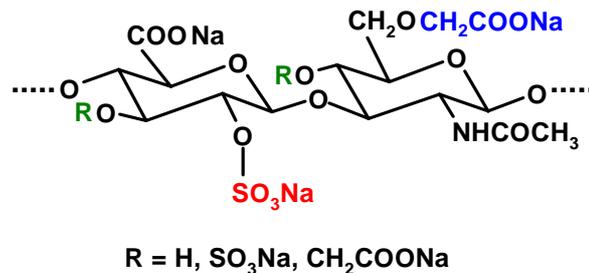


Abb. 5: Strukturformel von carboxymethylierter sulfatierter Hyaluronsäure

Aus dem Natriumsalz der carboxymethylierten Hyaluronsäure erfolgt über die Stufe des Ammoniumsalzes die Sulfatierung mit dem SO_3/DMF -Komplex. Der Schwefelgehalt wird elementaranalytisch bestimmt und daraus der Sulfatierungsgrad errechnet. Die Bestimmung der Molmassen erfolgte durch die Firma Innovent in Jena durch Gelpermeationschromatographie, durch Trennung nach molekularer Größe. Zur Detektion wurden ein Brechungsindex (RI)- und ein Lichtstreuendetektor verwendet. Dies war notwendig, da sich die Molmassen der synthetisierten Polymere oft in den Grenzbereichen der beiden Methoden befinden und somit Messfehler relativ groß sind. Bei sehr hohen Molmassen lag der RI-Peak oft außerhalb der Kalibrierung (Pullulan-Standards PPS; 342 bis 710.000) und eine Auswertung ist dann mit einem großen Fehler behaftet. Deshalb wurde die Lichtstreuendetektion zur genaueren Molmassenbestimmung herangezogen. War die Molmasse des Polymers aber gering (unter 50.000), dann ist das Lichtstreusignal zu klein, um eine sichere Auswertung zu geben. Hier ist demzufolge eine Bestimmung durch RI-Detektion vorzuziehen. Deshalb wurden beide Methoden zur Molmassenbestimmung genutzt.

Die in den Versuchen verwendeten Substanzen sind in Tabelle 3 aufgeführt.

Tabelle 3: Eigenschaften der carboxymethylierten sulfatierten Hyaluronsäuren¹⁾

Nummer CMS-Hya	DS _s ²⁾	M _w ³⁾ (RI-Detektion)	M _w ³⁾ (Lichtstredetektion)
1	3,0	-	112.950
2	2,7	-	204.125
3	3,0	-	129.555
4	3,2	-	142.450
5	2,9	-	168.820
6	2,8	-	153.630
7	3,5	-	179.370
8	3,0	-	161.043
9	2,9	-	147.940
10	2,6	-	178.610
11	0,5	191.980	-
12	0,2	141.455	-
13	0,1	-	40.985
14	0,5	-	42.430
15	0,6	-	50.345
16	0,3	145.510	-
17	0,2	49.600	-
18	0,8	65.300	-
19	1,0		
20	1,3	47.325	-

¹⁾ Angaben von Innovent e.V.

²⁾ Sulfatierungsgrad

³⁾ M_w: gewichtsmittlere Molmasse

Aufgrund der unterschiedlichen Schwefelgehalte erfolgt eine Einteilung der CMS-Verbindungen in zwei Gruppen (Tab. 4). Dazu werden die der jeweiligen Gruppe zugehörigen Polymerderivate nochmals in Wasser aufgelöst und gefriergetrocknet.

Tabelle 4: Gruppeneinteilung der carboxymethylierten sulfatierten Hyaluronsäuren nach dem Sulfatierungsgrad

Gruppenbezeichnung	Zusammensetzung aus CMS-Hya	Sulfatierungsgrad DS _s (\bar{x})
CMS-1	1 bis 10	3,0 ± 0,08
CMS-2	11 bis 20	0,6 ± 0,12

Alle nachfolgenden Versuche werden mit den Verbindungen CMS-1 und CMS-2 durchgeführt (Tab. 4).

2.1.3 Torfhuminsäuren

Als natürliche Huminsäuren werden Torfhuminsäuren verwendet, die aus dem nahe Weißwasser (Sachsen) gelegenen Altteicher Moor stammen. Sie wurden von Herrn

Professor J. Schoenherr, MVSF-Forschungslaboratorium an der Hochschule Zittau/Görlitz (FH), zur Verfügung gestellt. Aus dem medizinisch-balneologischen Gutachten des Badetorfs aus dem Vorkommen „Altteicher Moor“ von Prof. Resch geht hervor, dass der Torf einen Huminsäuregehalt von 49 % der Trockenmasse aufweist. Dies wird als balneotherapeutisch günstig erachtet (Höll, 2004; Resch und Dorer, 2005).

Torfhuminsäure A1 (THS-A1) ist eine schwarz gefärbte Huminsäure (HS), die durch Alkalisierung des Moores mit Natriumhydroxid-Lösung und Ansäuerung mit Salzsäure ausgefällt und danach bei 60 °C getrocknet wurde. Nach der Fällung fanden keine weiteren Aufbereitungsschritte statt.

Torfhuminsäure A2 (THS-A2) ist eine braune Huminsäure, die in der gleichen Weise wie THS-A1, also durch Säure-Base-Behandlung, ausgefällt, jedoch anschließend weiter aufbereitet wurde.

Die Isolierung und Aufbereitung der HS aus dem Alteicher Moor wurde erstmalig im Rahmen einer Diplomarbeit im Jahre 2002 durchgeführt (Kirsch, 2002).

2.2 U937-Zellen

Für die Versuche zur Bestimmung der Cytotoxizität, der Proliferation und dem [³H]Arachidonsäure-Freisetzungstest wird die promonocytäre menschliche Zelllinie U937-ATCC (CRL 1593) verwendet (Abb. 6). Diese wurde 1974 von C. Sundstrom und K. Nilsson (Sundstrom and Nilsson, 1974) eingeführt und entstammt einem Pleuraerguß eines 37-jährigen Mannes mit diffusem histocytären Lymphom (Klassifikation nach Rappaport, 1966). Sie ist eine von wenigen humanen Zelllinien, die noch heute Monocyteneigenschaften entsprechend dem histocytären Original aufweist (America Type Culture Collection, 1992; Shaw, 1994; Ushijima et al., 1992).

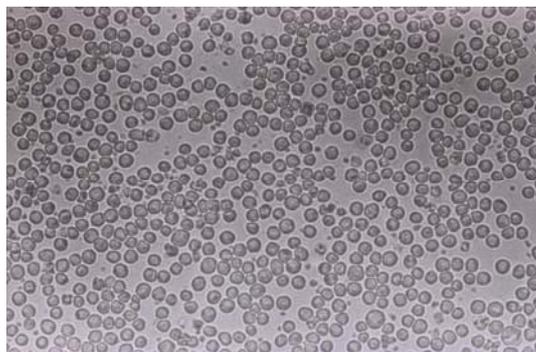


Abb. 6: U937-Zellen, 280-fache Vergrößerung

2.3 Chemikalien und Testkits

- [³H]Arachidonsäure
radioaktive Konzentration 37 MBq/ml,
spezifische Aktivität 23,8 GBq/mg
NEN Life Science Products, Inc.
Boston MA 02118
Service Center: 51151 Köln
- Calciumchlorid
Carl Roth GmbH & Co KG,
76185 Karlsruhe
- Fibrinogen
(Haemokompletan[®])
Behringwerke Marburg
35041 Marburg
- Foetales Kälberserum, hitzeinaktiviert
GIBCO BRL Life Technologies,
76344 Eggenstein
- Humancitratplasma
- Poolplasma aus Humancitratblut
von 10 bis 15 Personen mit
normalem Gerinnungsstatus)
- Verhältnis Blut zu Natrium-
citratlösung 0,1 mol/l ist 9 : 1
Gerinnungslabor HELIOS
Klinikum Erfurt GmbH,
99089 Erfurt
- Inkubationspuffer
Roche Diagnostics GmbH,
68298 Mannheim
- Natriumazid
Munitionsfabrik, Schönebeck
- Natriumchlorid
Carl Roth GmbH & Co KG,
76185 Karlsruhe
- Natriumdodecylsulfat (SDS)
Ferak, 12055 Berlin
- Natriumhydroxid
Apotheke HELIOS Klinikum
Erfurt GmbH,
99089 Erfurt

- Nichtradioaktiver Testkit zur Cytotoxizitäts- und Zellproliferationsbestimmung XTT-Tetrazoliumreduktionstest
Biomedica GmbH,
Divischgasse 4, A-1210 Wien,
(Vertrieb in Deutschland durch Biozol GmbH, 85386 Eching)
- Protaminsulfat
Firma Merck, 64293 Darmstadt
- PTT-Reagenz
- R1 = gepufferte Kaolinsuspension (Kaolin 5 mg/ml)
- R2 = Cephalin (Plättchensubstitut)
Roche Diagnostics GmbH,
68298 Mannheim
- RPMI-Medium 1640 (mit Glutamin und Phenolrot)
GIBCO BRL Life Technologies,
76344 Eggenstein
- RPMI-Medium 1640 (ohne Glutamin und Phenolrot)
GIBCO BRL Life Technologies,
76344 Eggenstein
- Salzsäure
Carl Roth GmbH & Co KG,
76185 Karlsruhe
- Szintillatorcocktail Rotiszint[®]2200
Carl Roth GmbH & Co KG,
76185 Karlsruhe
- Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)
Fluka Chemie GmbH,
CH-9471 Buchs SG
Schweiz
- Tris/NaCl-Puffer
- Gemisch aus Tris(hydroxymethyl)aminomethan (6,08g), NaCl (8,77 g), NaN₃ (0,2g) und bidestilliertem Wasser (ad 1 L); pH-Wert Einstellung mittels konzentrierter Salzsäure auf 7,4
Eigenherstellung

- Thrombin vom Rind für Testzwecke
240 NIH-E/Flasche
Feinchemie GmbH,
01855 Sebnitz
- Thrombokinase
Arzneimittelwerk Dresden,
01097 Dresden

2.4 Geräte und Hilfsmittel

- Analysenwaage AC 210S-OD1
Sartorius AG, 37075 Göttingen
- Auslaufpipetten wattiert, steril,
5, 10 ml
Nunc GmbH & Co KG,
65203 Wiesbaden
- Begasungsbrutschrank BB 6060
Heraeus Holding GmbH,
63450 Hanau
- Bürker-Türk-Zählkammer
Feinoptik GmbH,
07422 Bad Blankenburg
- Easy Reader EAR 340 AT
SLT-Labinstruments GmbH
Deutschland, 74564 Crailsheim
- Einmalkanülen Sterican[®] 1,20x40mm
B. Braun Melsungen AG,
34212 Melsungen
- Flüssigkeitsszintillationsmessgerät
Liquid scintillation counter Wallac 1410
Pharmacia, Uppsala, Schweden
- Fotoapparat Contax 167 MT
Carl-Zeiss-Jena GmbH,
07745 Jena
- Hellige Thrombelatograph D
Hellige GmbH,
7800 Freiburg im Breisgau
- Koagulometer CL4
Behnk Elektronik,
20095 Hamburg

- Küvettenriegel und Kugeln
Immuno GmbH,
69020 Heidelberg
- Megafuge 1,0 R
Heraeus Holding GmbH,
63450 Hanau
- Mehrkanalpipette Transferpipette-8
20-200 µl
Brand GmbH,
97877 Wertheim/Main
- Mikrotiterplatten:
Nunc 96-Mikrowellplatten, steril
flach, 86x127 mm
Nunc GmbH & Co KG,
65203 Wiesbaden
- Minisart-Sterilfilter 0,2 µm
Sartorius AG, 37075 Göttingen
- pH-Meter CG840
Schott-Geräte GmbH, 07745 Jena
- Pipettenspitzen 100 µl, 1000 µl
Eppendorf GmbH,
20251 Hamburg
- Pipettierhilfe "Sarpette"
Sarstedt GmbH,
51588 Nürnberg
- Reinraumwerkbank
Elektromat Dresden,
01097 Dresden
- Schräghalszellkulturflaschen aus
Polystyren 50 ml und 250 ml
Nunc GmbH & Co KG,
65203 Wiesbaden
- Schüttler Varishaker-Inkubator
Dynatech Deutschland GmbH,
73770 Denkendorf
- Scintillationsröhrchen Mini Vials B
aus Niederdruckpolyethylen, mit
weißem, nicht überstehenden Stopfen,
zur Verwendung ohne Trägerröhrchen,
Volumen 6 ml
Carl Roth GmbH & Co,
76185 Karlsruhe

- Spritzen (steril) 10 ml
B. Braun Melsungen AG,
34212 Melsungen
- TEG-Meter nach Dr. Hildgard
Medizintechnik Hanke GmbH &
Co KG, 34131 Kassel
- Umkehrmikroskop Telaval 31
Carl-Zeiss-Jena GmbH,
07745 Jena
- Varipette 100 µl, 500 µl, 1000 µl
Eppendorf GmbH,
20251 Hamburg
- Zentrifugenröhrchen aus Polystyren;
17x100 mm, 14 ml, Falcon[®]2027
Beckton-Dickinson GmbH,
69126 Heidelberg (jetzt BD
Biosciences Clontech)

3 Methoden

Die im Ergebnisteil angegebenen Konzentrationen der Testsubstanzen beziehen sich auf die Konzentration pro Milliliter Ansatz. Für die Bestimmung der Thrombinzeit, Prothrombinzeit und aktivierten partiellen Thromboplastinzeit wird eine Thrombin-konzentration von 10 NIH-E/ml verwendet.

3.1 Globaltest zur Gerinnungsanalytik

3.1.1 Thrombelastographie

Diese Methode gehört zu den globalen Gerinnungstests (Pindur und Pindur, 1991). Sie wurde 1948 von Hartert eingeführt (Hartert, 1948). Hierbei wird der Blutgerinnungsablauf einschließlich der Fibrinolyse in Form eines Thrombelastogramms (TEG) registriert (Hartert, 1952, 1955; Salooja and Perri, 2001).

Die signifikanten Größen eines Thrombelastogramms sind die Reaktionszeit r , die Gerinnselbildungszeit k und die maximale Thrombusfestigkeit ma (Abb. 7). Die Reaktionszeit r kennzeichnet den Beginn der Gerinnung und gilt als verstrichen, wenn der Ausschlag des Schreibzeigers 1 mm - gegenüber dem Beginn der Kurve - gestiegen ist. Als Gerinnselbildungszeit k bezeichnet Hartert die Zeit, die vom Ende der Reaktionszeit r bis zum Erreichen einer Amplitude $a = 20$ mm verstreicht. Sie stellt ein Maß für die Geschwindigkeit, mit der sich ein Thrombus von bestimmten Festigkeitseigenschaften bildet, dar. Eine weitere Messgröße ist die maximale Thrombusfestigkeit (ma). Dies ist der größte Abstand der beiden Kurvenschenkel voneinander, der bei der Messung des TEG erreicht wird. Aus diesem Wert kann die maximale Thrombuselastizität berechnet werden, welche eine direkte Relation zur maximalen Amplitude besitzt (Vinazzer, 1972). Bei der technischen Ausführung thrombelastographischer Messungen spielt die sog. Einfüllzeit eine Rolle. Es ist die Zeit, die vom Eintauchen des Stiftes in den Reaktionsansatz bis zum Beginn der Registrierung vergeht. Die Einfüllzeit wird zur Reaktionszeit addiert.

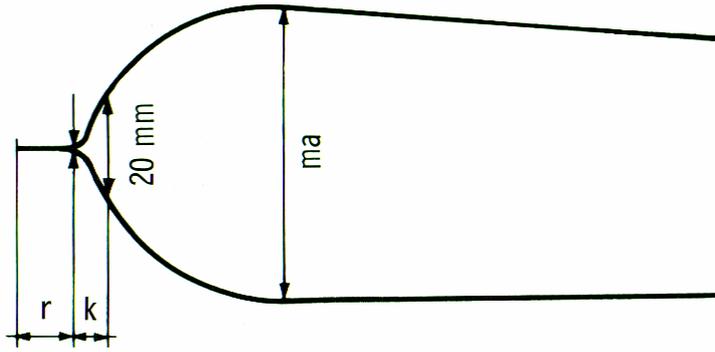


Abb. 7: Thrombelastogramm modifiziert nach Jaenecke, 1996

r = Reaktionszeit
k = Gerinnelbildungszeit
ma = Maximale Amplitude

Die Bestimmung erfolgt in einem Thrombelastograph. Zur Durchführung werden Humancitratplasma, Tris/NaCl-Puffer sowie CaCl_2 -Lösung (0,1 mol/l) benötigt. Das Plasma und der Puffer werden in die Küvette gegeben, und mit CaCl_2 -Lösung wird die Reaktion gestartet (Stoppuhr drücken). Durch Bewegung der Stempel wird die Probe gemischt und anschließend mit Paraffin abgedeckt. Durch Drücken des Transportknopfes beginnt das Gerät, das Thrombelastogramm aufzuzeichnen. In diesem Moment wird die Zeit gestoppt, die der Einfüllzeit entspricht. Die Laufzeit beträgt 60 min.

Messansatz: 200 μl Humancitratplasma
100 μl Tris/NaCl-Puffer (pH 7,4)
bzw.
100 μl Probelösung (in Tris/NaCl-Puffer gelöst)
50 μl CaCl_2 (0,1 mol/l)

3.2 Gruppentests zur Gerinnungsanalytik

Die Gruppentests erfassen Teilbereiche des Gerinnungsablaufes. Das exogene System wird durch die Bestimmung der Thrombinzeit und Prothrombinzeit erfasst, der endogene Teil durch die aktivierte partielle Thromboplastinzeit.

Die Bestimmung der Thrombinzeit (TZ), Prothrombinzeit (PT) und der aktivierten partiellen Thromboplastinzeit (aPTT) erfolgt in einem Koagulometer.

Pro Messansatz werden 3 Proben gemessen. Der Gerinnungsansatz befindet sich in einer Rundküvette, in der eine Kugel an einer exakt vorgegeben Stelle mit 125 U/min rotiert.

Dies wird durch ein von außen angelegtes und genau definiertes Magnetfeld erreicht und stellt somit eine schonende Durchmischung der Probe sicher. Der Gerinnungsvorgang ist durch Bildung von Fibrinfasern gekennzeichnet. Die Kugel wird in dieser „viskösen Masse“ langsamer und löst dadurch einen Impuls am magnetischen Sensor aus, die Gerinnungszeit erscheint auf dem Display. Die Versuchsdauer beträgt maximal 600 sec.

3.2.1 Thrombinzeit

Die Thrombinzeit ist ein Test für die gemeinsame Endstrecke des endogenen und exogenen Gerinnungssystems (Klöcking, 1981; Spaethe und Kolde, 1992). Im Testansatz wird eine verdünnte Thrombinlösung zum Plasma bzw. Fibrinogen gegeben. Hierdurch kommt es zur Umwandlung von Fibrinogen zu Fibrin, während alle anderen Schritte der Gerinnungskaskade umgangen werden. Die Thrombinzeit erfasst somit die letzte Phase der Gerinnungskaskade (Klöcking, 2002).

Messansatz: 200 µl Humancitratplasma (bzw. Fibrinogen)
200 µl Tris/NaCl-Puffer (Leerwert mit pH 7,4)
bzw.
200 µl Probelösung (in Tris/NaCl-Puffer gelöst)
⇒ 2 min bei 37 °C inkubieren
100 µl Thrombinlösung (10 NIH-E/ml)
⇒ Gerinnungszeit bestimmen

3.2.2 Prothrombinzeit

Die Prothrombinzeit (PT) ist ein einfacher funktioneller Test für das exogene System (Klöcking, 1981; Spaethe und Kolde, 1992) Je nachdem, woher die Thromboplastinpräparate stammen (hinsichtlich Organ: Plazenta, Gehirn, Herz, Lunge; hinsichtlich Spezies: Mensch, Kaninchen, Schwein, Rind), werden die Faktoren I, II, V, VII und X des Extrinsic-Systems mit unterschiedlicher Empfindlichkeit erfasst.

Bei der Durchführung dieser Bestimmung wird zum Humancitratplasma Thrombokinase-Lösung gegeben.

Nach einer Inkubationszeit von 2 min bei 37 °C wird mit CaCl₂-Lösung (0,02 mol/l) die Reaktion gestartet. Die Bildung eines Gerinnsels zeigt das Ende der Reaktion an.

Messansatz: 100 µl Humancitratplasma
30 µl Tris/NaCl-Puffer (Leerwert)
bzw.
30 µl Probelösung (in Tris/NaCl-Puffer gelöst)
100 µl Thrombokinase-Lösung
⇒ 2 min bei 37 °C inkubieren
100 µl CaCl₂-Lösung (0,02 mol)
⇒ Gerinnungszeit bestimmen

3.2.3 Aktivierte partielle Thromboplastinzeit

Bei der Bestimmung der aktivierten partiellen Thromboplastinzeit wird in vitro die physiologischerweise ablaufende Reaktionsfolge der Kontaktaktivierung des endogenen Systems simuliert. Durch Zusatz eines Kontaktaktivators (Kaolin) werden die sogenannten Kontaktfaktoren (F XII und hochmolekulares Kininogen) aktiviert (Hiller und Riess, 1988). Gleichzeitig werden Phospholipide (Kephalin) als Ersatz für die Thrombocyten zugesetzt. Letztere katalysieren in einem zweiten Schritt die Aktivierung des endogenen Gerinnungssystems. Hierfür sind Calciumionen erforderlich, die ebenfalls zugesetzt werden. Eine Inkubationszeit von 3 min dient dazu, eine ausreichende Kontaktaktivierung zu erhalten (Klöcking, 2002; Spaethe und Kolde, 1992).

Messansatz: 100 µl Humancitratplasma
30 µl Tris/NaCl-Puffer (Leerwert)
bzw.
30 µl Probelösung (in Tris/NaCl-Puffer gelöst)
100 µl PTT-Reagenz
⇒ 3 min bei 37 °C inkubieren
100 µl CaCl₂-Lösung (0,02 mol)
⇒ Gerinnungszeit bestimmen

3.2.4 Auswertung

Thrombelastographie

Die Werte für die Reaktionszeit r , die Gerinnselbildungszeit k und die maximale Amplitude ma werden unter Verwendung des TEG-Meters nach Dr. Hildgard abgelesen.

Thrombinzeit, Prothrombinzeit, aktivierte partielle Thromboplastinzeit

Diese 3 Zeiten werden direkt am Koagulometer abgelesen. Aus mindestens 3 Versuchen werden dann der Mittelwert und die Standardabweichung (SD) gebildet.

Im Ergebnis wird die Verlängerung der Gerinnungszeit (Verlängerung um ein Vielfaches vom Leerwert) in Abhängigkeit von der Konzentration an Testsubstanz (in $\mu\text{g/ml}$) dargestellt. Um die Ergebnisse untereinander vergleichen zu können, wird eine Verdopplung der Gerinnungszeiten berechnet. Dies gelingt mittels einer Trendlinie im jeweiligen Diagramm im Microsoft Programm Exel 2000.

3.3 Neutralisation der antikoagulierenden Wirkung

Bei diesem Versuch wird geprüft, ob Protaminsulfat (Antidot zu Heparin) die antikoagulierende Wirkung der Testsubstanzen aufhebt. Die Prüfsubstanzen enthalten negativ geladene funktionelle Gruppen, die durch die vorwiegend positiv geladenen Oberflächengruppen des Protaminsulfates (PS) neutralisiert werden könnten (Racanelli et al., 1985). Aus dem Versuch „Bestimmung der Thrombinzeiten“ wird eine Konzentration an Testsubstanz gewählt, die die Thrombinzeit (TZ) in dem Maße verlängert, dass bei Zusatz von Protaminsulfat (PS) eine Verkürzung derselben sichtbar wird. Um die Eigenwirkung von Protaminsulfat auf den Reaktionsansatz auszuschließen, wird vorher eine Eichgerade erstellt. Im Bereich von $0,02 \mu\text{g/ml}$ bis $20 \mu\text{g/ml}$ PS wird anschließend mit der geeigneten Testsubstanz-Konzentration die TZ bestimmt.

Im Ergebnis wird diejenige Konzentration an PS bestimmt, die eine Verkürzung der Thrombinzeit der jeweiligen Testsubstanz auf den Leerwert und damit eine Aufhebung der antikoagulierenden Wirkung erreicht.

3.4 Cytotoxizitätsbestimmung

3.4.1 Allgemeines

Der XTT-Tetrazoliumreduktionstest ist ein Indikator für die metabolische Aktivität der Zellen. Es handelt sich um einen nichtradioaktiven Zellproliferations- und Cytotoxizitätstest.

Das Prinzip der Tests besteht darin, dass von lebenden Zellen farblose oder schwach gefärbte Tetrazoliumsalze in intensiv gefärbte Formazanderivate umgewandelt werden können, die mittels eines Spektrophotometers quantifiziert werden (Paull et al., 1988; Renzi et al., 1993; Abb. 8). Er orientiert sich am klassischen MTT-Test, hat jedoch den Vorteil eines wasserlöslichen Formazans (Denizot and Lang, 1986; Moosmann, 1983; Scudiero, 1988; Tada et al., 1986). Damit entfallen der Einsatz von toxischen Lösungsmitteln sowie die zeitaufwendige Lösung des Reaktionsproduktes. Grund dafür ist die Einführung von Sulfonsäuregruppen in das Testreagens. Im Gegensatz zu MTT, dessen Endprodukt keine Ladung mehr trägt, besitzt das Formazan beim XTT-Tetrazoliumreduktionstest zwei geladene Komponenten, die einen entscheidenden Effekt auf die Löslichkeit haben (Comley and Turner, 1990).

Nachteile bestehen jedoch in der relativen Instabilität und der weniger intensiven Färbung des Formazanproduktes im Gegensatz zu den MTT-Produkten. Deshalb werden etwas niedrigere Absorptionswerte gemessen (Comley and Turner, 1990; Hansen et al., 1989). Im XTT-Tetrazoliumreduktionstest-Testkit liegen ein spezielles Puffer-Aktivator-Gemisch und die lyophilisierte Testsubstanz getrennt voneinander vor und werden erst bei Bedarf miteinander gemischt. Der Zerfall des entstehenden Formazans wird durch die Einstellung dieses günstigen Milieus verhindert und gleichzeitig erhöht sich infolge einer vereinfachten Elektronenübertragung (Puffer) dessen Absorption (Brosin et al., 1997).

Vorraussetzung für diese Reduktion sind intakte Mitochondrien. Sie besitzen ein intrazelluläres Reduktionssystem mit Enzymen wie Succinatdehydrogenase und NADPH-Dehydrogenase (Cory et al., 1991), welches nur im vitalen Zellzustand funktioniert. So kommt es wenige Minuten nach Eintritt des Zelltodes zur Inaktivierung der Mitochondrien, die Viabilität der Zellen sinkt. Folglich verringern sich die Reduktionsrate des Testsubstrates und die gemessene Absorption.

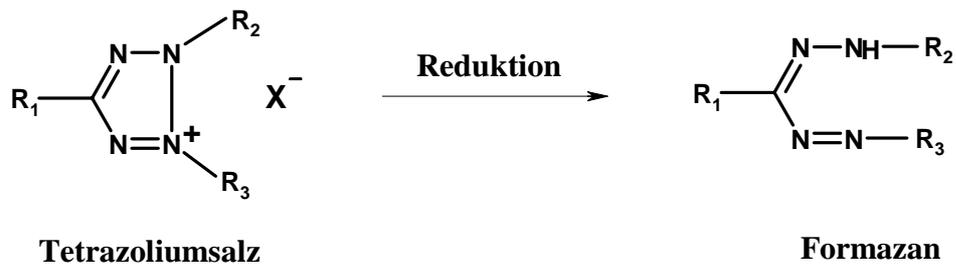


Abb. 8: Prinzip der Tetrazoliumreduktion

3.4.2 Zellzüchtung

Die Anzucht der U937-Zellen erfolgt in Schräghalszellkulturflaschen mit Filterkappe. Die Verschlusskappe mit einem hydrophoben Filter (\varnothing 0,22 μm) dient dazu, einen optimalen Gasaustausch bei bestmöglichem Kontaminationsschutz zu gewährleisten. Als Anzuchtmedium wird RPMI 1640 mit 10 % hitzeinaktiviertem foetalem Kälberserum (FCS) verwendet. Die Umsetzung erfolgt stets unter einer Reinraumwerkbank und unter Verwendung steriler Pipetten. Die Zellen werden stationär in einer CO_2 -Atmosphäre (5 %) bei 37 °C aufbewahrt. Je nach Verwendungszeitpunkt werden die Zellen im Verhältnis 1 : 3 (nach 2 Tagen verwendbar) oder 1 : 5 (nach 3 bis 4 Tagen verwendbar) umgesetzt. Bei den so kultivierten Zellen beträgt die Zellzahl etwa 10^6 Zellen/ml.

3.4.3 Aufbereitung der Zellen

Die U937-Zellen einer Schräghalszellkulturflasche werden in 2 Polystyren-Zentrifugenröhrchen aufgeteilt. Es erfolgt eine 5-minütige Zentrifugation bei 1200 U/min und 4 °C. Nach Verwerfung des Überstandes wird das verbleibende Zellpellet in 5 ml RPMI 1640 (ohne L-Glutamin) resuspendiert und nochmals unter gleichen Bedingungen 5 Minuten zentrifugiert.

Der Überstand wird ebenfalls verworfen, die verbleibenden Zellpellets mit 10 ml RPMI-Medium resuspendiert und in einer neuen Schräghalszellkulturflasche vereinigt. Mit dieser Suspension erfolgt die Bestimmung der Zellzahl in einer Bürkerkammer. Gegebenfalls erfolgt eine Einstellung auf ca. 10^6 Zellen/ml (\pm 25 %).

3.4.4 Versuchsansätze

Die Exposition der Zellen mit der zu untersuchenden Substanz erfolgt in 96iger Mikrotiterplatten. Dabei werden die Kavitäten wie folgt belegt (Abb. 9):

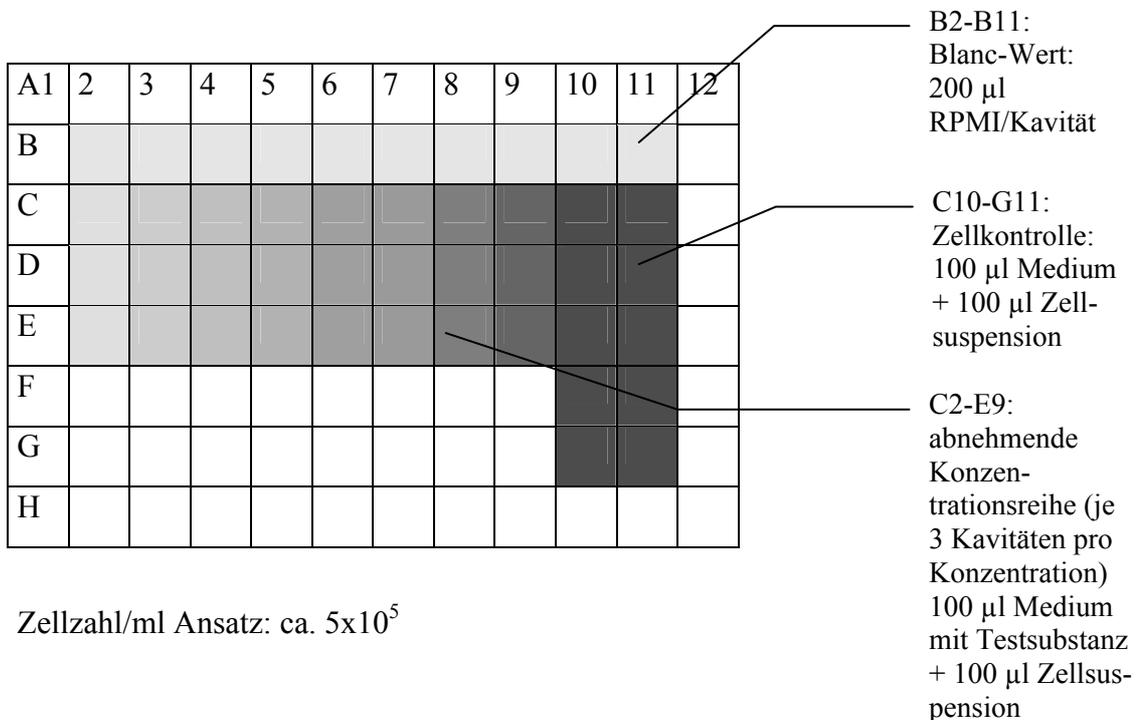


Abb. 9: Beschickung der Mikrotiterplatte für den Cytotoxizitätstest

Die äußeren Felder werden nicht belegt, um Randeffekte zu vermeiden. Die Beschickung der Mikrotiterplatten erfolgt mit je 3 Kavitäten pro Substanzkonzentration. Im Anschluss daran werden sie 1 bzw. 24 h im Brutschrank bei 37 °C, 5 % CO₂ aufbewahrt.

Nach diesem Zeitraum werden die Zellen nach Zusatz verschiedener Substanzkonzentrationen bei 280-facher Vergrößerung fotografiert.

3.4.5 Durchführung

Nach der Expositionszeit werden die Zellen in den Mikrotiterplatten bei 1200 U/min zentrifugiert und der Überstand im Anschluss verworfen. Die Kavitäten werden dann mit je 200 µl Medium wieder gefüllt. Grund für diesen Schritt ist die Einhaltung der Inkubationszeit, da bei Nichtentfernung der Testsubstanz diese um weitere 2 Stunden verlängert wäre.

Ein zusätzlicher Einfluss auf die Toxizität der Testsubstanz wird damit ausgeschlossen (Jelinek, 1996). Danach werden jeweils 20 µl der nach der Testvorschrift hergestellten strohgelben Substratlösung in die jeweiligen Kavitäten pipettiert. Es erfolgt nach kurzem Durchmischen eine Inkubationszeit von 2 Stunden bei 37 °C. Diese Zeit erweist sich als ausreichend, damit sich das ziegelrote Formazan bilden kann. Die Absorption wird bei einer Wellenlänge von 450 nm (Referenz 620 nm) im Plattenphotometer gemessen.

3.4.6 Auswertung

Die folgenden Berechnungen gelten sowohl für den Cytotoxizitäts- als auch für den Proliferationstest.

Aus den 3 Extinktionswerten pro Konzentration und den 10 Messwerten der Zellkontrolle (ohne Testsubstanz) wird das jeweilige arithmetische Mittel gebildet.

Die Cytotoxizität (CT) wird nach folgender Formel berechnet:

$$CT = \left(\frac{x_0 - x_i}{x_0} \right) 100\%$$

X₀ = Mittelwert der Absorptionswerte der Zellkontrolle

X₁ = Mittelwert der Absorptionswerte der mit der jeweiligen Testsubstanz behandelten Zellen

Aus den für jede Konzentration erhaltenen prozentualen Cytotoxizitätswerten wird die halbmaximale cytotoxische Konzentration (CC₅₀) mittels Regressionsanalyse nach der allgemeinen Gleichung der logarithmischen Funktion:

$$50 = \ln(x) + b$$

umgestellt nach x berechnet.

Hierfür finden in der Regel alle Werte zwischen 10 % und 90 % auf dem ansteigenden Teil der Cytotoxizitätskurve Berücksichtigung. Zur Ermittlung des Endergebnisses werden die Resultate aus mindestens 3 Versuchen herangezogen. Um die Konfidenzintervalle der einzelnen CC₅₀-Werte zu ermitteln, wird zu jedem Versuch der (lnx)-Wert berechnet. Aus diesen (lnx)-Werten wird dann das arithmetische Mittel (lnx') und die zugehörige Standardabweichung (s') gebildet.

Die $(\ln x)$ -, $(\ln x \cdot s)$ - und $(\ln x + s)$ -Werte werden wieder entlogarithmiert. Der kleinere so erhaltene Wert stellt die untere und der größere Wert die obere Grenze des Schwankungsbereiches dar. Daraus ergeben sich die Konzentrationen mit den dazugehörigen Konfidenzgrenzen, bei denen 50 % der Zellen keine metabolische Aktivität im XTT-Tetrazoliumreduktionstest aufweisen.

Bei den Proliferationsversuchen werden jeweils die Mittelwerte von 5 Absorptionssmesswerten ausgewertet.

Zur Ermittlung der CC_{50} wird nur der lineare Abschnitt der Kurven (im halblogarithmischen Maßstab) verwendet. In das Diagramm wird die logarithmische Trendlinie eingefügt, deren Formel zur Berechnung der CC_{50} dient. Abbildung 10 zeigt dies am Beispiel von CMS-1 Versuch 3 (24 h).

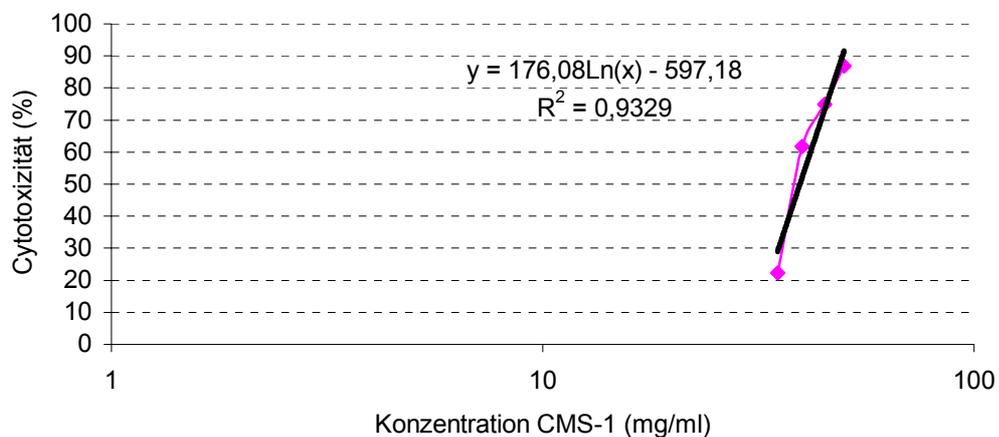


Abb. 10: Bestimmung der CC_{50} (CMS-1; Versuch 3 -24 h-)

3.5 Untersuchung der Zellproliferation

Für die Proliferationsuntersuchungen werden die Zellen zentrifugiert, gewaschen und auf eine Zellzahl von 100.000 Zellen/ml eingestellt. Dies erfolgt durch eine 1 : 10-Verdünnung der ursprünglichen Zellsuspension (siehe unter 3.4.3; Aufbereitung der Zellen). Davon werden je 100 μ l in die einzelnen Kavitäten pipettiert (10.000 Zellen/Kavität bzw. 10.000 Zellen/200 μ l Ansatz). Das entspricht einer Zellzahl von 50.000/ml Ansatz. Zur Zellsuspension wird 5 % FCS gegeben, um die Proliferation der Zellkontrolle zu gewährleisten.

Die Inkubation erfolgt in 10 Mikrotiterplatten über 5 Tage bei 37 °C im CO_2 -Inkubator. Es werden 8 verschiedene Konzentrationen der zu untersuchenden Substanz im Vergleich zu substanzfreiem Medium (Zellkontrolle) getestet.

In Abständen von 24 Stunden werden je eine Mikrotiterplatte für den XTT-Tetrazoliumreduktionstest und eine für die Zählung der Zellzahl verwendet. Die Durchführung des XTT-Tetrazoliumreduktionstests erfolgt in gleicher Weise wie beim Cytotoxizitätstest mit je 5 Kavitäten pro Konzentration.

3.6 [³H]Arachidonsäure-Freisetzungstest (AART)

3.6.1 Allgemeines

Arachidonsäure (AA) ist der Ausgangsstoff für die Biosynthese der Prostaglandine und verwandter Produkte des Arachidonsäurestoffwechsels. Diese haben in den letzten 25 Jahren größtes Interesse hinsichtlich ihrer physiologischen, pathophysiologischen und pharmakologischen Bedeutung gefunden. Viele der Arachidonsäuremetaboliten zeichnen sich durch ihr breites pharmakologisches Wirkungsspektrum aus (Forth et al., 2001). Sie werden in den verschiedenen Zellen normalerweise nicht gespeichert, sondern auf unterschiedliche Stimuli hin neu synthetisiert und freigesetzt. Durch die Aktivität des Enzyms Cyclooxygenase entstehen dabei die Prostaglandine und Thromboxane. Über die 5-Lipoxygenase entstehen die Leukotriene.

Arachidonsäure gehört zu den Eicosanoiden (mehrfach ungesättigte C₂₀-Fettsäuren) und ist Bestandteil der Phospholipide, die den Hauptbestandteil der Zellmembran bilden. Sie sind in einer fluiden Lipid-Doppelschicht (phospholipid-bilayer) angeordnet.

Diese wird von Proteinmolekülen umgeben und durchzogen und bildet eine so genannte Lipid-Protein-Mosaikstruktur. Hauptaufgabe dieser Bilayer ist die Abgrenzung einer Zelle nach außen. Für polare Moleküle ist sie fast undurchlässig, während sich Lipidmoleküle relativ frei hindurch bewegen können.

Die AA liegt in den Zellen zum größten Teil in veresterter Form in Membranphospholipiden vor. Da nur freie Arachidonsäure als Substrat der Cyclooxygenase dienen kann, hängt die Eicosanoid-Biosynthese primär von der Freisetzung der AA aus den Phospholipiden ab. Dies geschieht durch Aktivierung membrangebundener Phospholipase A₂ oder in zwei Schritten durch Phospholipase C und Phospholipase D (Fonteh et al., 1994).

Die beiden letztgenannten erzeugen im ersten Schritt Lipidprodukte, die AA enthalten und aus denen die Arachidonsäure später freigesetzt wird.

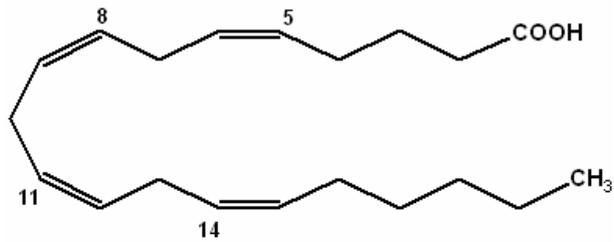


Abb. 11: Strukturformel Arachidonsäure

Ein weiteres charakteristisches Merkmal der AA ist ihre Funktion als Signalsubstanz. Informationsmoleküle müssen mit Proteinen in Wechselwirkung treten (d. h. an Rezeptoren, Enzyme, Ionenkanäle u. a. binden) und selektiv deren Aktivität verändern können. AA ist aufgrund ihrer low-energy Konformation, die sie nach ihrer Freisetzung aus den Membranphospholipiden annimmt, dazu in der Lage. Die Tendenz von freier AA zu starken Wechselwirkungen mit Proteinen erklärt den besonders umfangreichen Metabolismus.

Für den [³H]Arachidonsäure-Freisetzungstest werden U937-Zellen verwendet, weil diese Zelllinie Monozyteneigenschaften entsprechend dem histozytären Original aufweist. Sie besitzen u. a. die Fähigkeit, eine Form von Interleukin (IL1) zu bilden (Klöcking et al., 1998; Reif, 2003). Dieses ist ein endogenes Pyrogen und stimuliert die Prostaglandin-E₂-Freisetzung verschiedener Zelltypen.

Ziel des Tests ist es, die Menge an [³H]Arachidonsäure zu bestimmen, die nach aktivem Einbau in die Zellmembran durch Einwirkung der Testsubstanz aus der Zellmembran freigesetzt wird (Klöcking, 1994; Klöcking et al., 1994a, 1995).

Bei einer Temperatur von 4 °C werden Stoffe identifiziert, die zu einer AA-Freisetzung auf nicht enzymatischem Weg führen. Erfolgt die erhöhte Freisetzung erst nach Inkubation bei 37 °C, so handelt es sich um einen enzymvermittelten Mechanismus. Ein Beobachtungszeitraum von 24 Stunden wird gewählt, um eine Unterscheidung zwischen einem reversiblen (physiologischen) oder irreversiblen (toxischen) Prozess zu treffen (Klöcking, 1994).

Im AART werden außer [³H]Arachidonsäure ([³H]AA) und Phosphoglyceriden, die [³H]AA enthalten, auch aus [³H]AA entstandene Metabolite erfasst.

Um die Schädigung der U937-Zellen durch die Prüfsubstanzen quantifizieren zu können, erfolgt die radioaktive Markierung mit Arachidonsäure, bei der Tritium (^3H) in den Positionen 5, 6, 8, 9, 11, 12, 14 und 15 eingebaut ist. Die Messung der Radioaktivität erfolgt mit einem Flüssigkeitsszintillationsmessgerät, einem sehr empfindlichen Gerät zur Ermittlung von β -Strahlung. Das gilt besonders für die Messung Tritium-markierter Verbindungen (Valentini, 1998).

3.6.2 Testdurchführung

Vorinkubation und Markierung der U937-Zellen

30 ml der U937-Zellsuspension werden auf 3 sterile Zentrifugenröhrchen aufgeteilt und 5 min bei 1200 U/min und 4 °C zentrifugiert. Der Zentrifugationsüberstand wird verworfen und das verbleibende Zellpellet in je 5 ml serumfreien RPMI-Medium (mit L-Glutamin und Phenolrot) resuspendiert. Nach erfolgter Zentrifugation unter denselben Bedingungen werden die Zellen in jeweils 9 ml Medium wieder aufgenommen. Die Inhalte der 3 Röhrchen werden in einer Zellkulturflasche vereinigt. Die Zellzahl wird mittels Bürkerzählkammer bestimmt und gegebenenfalls auf 10^6 Zellen/ml eingestellt.

Die Zellen werden zunächst ohne foetalem Kälberserum (FCS) für eine Stunde bei 37 °C und 5 % CO_2 inkubiert. Danach werden 3 ml FCS und 15 μl [^3H]Arachidonsäure (AA) zugesetzt. Man erhält 30 ml [^3H]-markierte Zellsuspension, der sofort 3 x 100 μl entnommen, zu je 1,9 ml Szintillatorcocktail (SC) gegeben und anschließend im Flüssigkeitsszintillationsmessgerät vermessen werden (Proben 1 - 3). Dies ist Bestandteil der Bestimmung der Einbaurrate, was in Abschnitt 3.6.3 näher beschrieben wird.

Die mit Tritium markierte Arachidonsäure wird während der nun folgenden 24-stündigen Inkubationszeit (37 °C, 5 % CO_2) in die Zellmembran eingebaut.

Nach diesem Zeitraum werden die Zellen zentrifugiert (1200 U/min, 4 °C, 5 min). Es folgt eine Entnahme von 100 μl Flüssigkeit aus dem Überstand, mit der in der gleichen Art und Weise wie vorher beschrieben verfahren wird (Proben 4 - 6).

Um die nicht eingebaute AA quantitativ zu entfernen, werden die Zellen einem doppelten Waschvorgang unterzogen.

Am Ende erfolgt eine Resuspension in je 10 ml Medium. Die so erhaltenen 30 ml [^3H]-markierter U937-Zellsuspension bilden die Grundlage für den Versuchsansatz.

Versuchsansatz

Pro Versuchsansatz werden acht Konzentrationsstufen, eine Zellkontrolle und eine Positivkontrolle untersucht. Für die Zellkontrolle werden die U937-Zellen ausschließlich mit Medium inkubiert. Dadurch wird die natürliche [³H]Arachidonsäure-Freisetzung ermittelt. Die Positivkontrolle besteht aus U937-Zellen und 320 µg/ml Natriumdodecylsulfat (SDS), welches in dieser Konzentration eine 100%ige Freisetzung der Arachidonsäure aus der Zellmembran bewirkt.

Für jede Konzentration sowie die beiden Kontrollwerte werden jeweils 3 Inkubationsröhrchen mit 0,5 ml der Substanzlösung und 0,5 ml Zellsuspension belegt. Die Röhrchen werden fest verschlossen und für 1 Stunde bzw. 24 Stunden bei 37 °C inkubiert. Um enzymatische Prozesse auszuschließen, wird außerdem eine Versuchsreihe bei 4 °C und einer Stunde Einwirkungszeit durchgeführt.

Nach der jeweiligen Expositionszeit erfolgt eine Zentrifugation (1200 U/min , 4 °C, 5 min), bei welcher die noch intakten Zellen und Bruchstücke zerstörter Zellen vom Überstand getrennt werden. Aus diesem werden je 0,5 ml abpipettiert und zu 2,5 ml Szintillatorcocktail gegeben. Die beiden Flüssigkeiten werden bis zur Schlierenfreiheit vermischt. Die Vials mit den Untersuchungslösungen werden dann im Szintillationsmessgerät vermessen. Im Ergebnis wird die Radioaktivität in Impulsen/Minute und Milliliter (dpm/ml) auf dem Display angezeigt.

3.6.3 Auswertung

Einbaurrate (E):

Aus den Proben 1 - 3 und 4 - 6 wird die Einbaurrate von [³H]AA in die U937-Zellen bestimmt:

$$E = \frac{G - \ddot{U}}{G} \cdot 100\%$$

G = Gesamtradioaktivität in der Zellsuspension vor dem Einbau der [³H]AA
(Proben 1 - 3)

Ü = Radioaktivität im Überstand, in dem sich die nicht eingebaute [³H]AA befindet (Proben 4 - 6)

Die durchschnittliche Einbaurrate aller Versuche beträgt $51,1 \pm 2,0 \%$ (n = 20).

Membrantoxizitätswerte

Die angegebenen Membrantoxizitätswerte im Text und in den Abbildungen beziehen sich alle auf SDS = 100 %.

Freisetzungskonzentration RC

Die prozentuale Arachidonsäure-Freisetzung (RC) der Testsubstanzen bezogen auf die Freisetzung durch SDS (Maximum) wird nach folgender Formel berechnet:

$$RC = \frac{x_p - x_0}{x_i - x_0} \cdot 100\%$$

x_0 = Mittelwert der [³H]AA-Freisetzung der Zellkontrolle (dpm/ml)

x_i = Mittelwert der [³H]AA-Freisetzung der mit Testsubstanz behandelten Zellen (dpm/ml)

x_p = Mittelwert der [³H]AA-Freisetzung der Positivkontrolle (mit 320 µg/ml Natriumdodecylsulfat behandelte Zellen)

Die RC-Werte für 5 % [³H]AA-Freisetzung im Vergleich zur Positivkontrolle werden mit Hilfe eines Membrantoxizitäts-Konzentrations-Diagramms bestimmt. Durch Erstellung einer linearen Regressionsgerade entsteht folgende Funktionsgleichung:

$$y = mx + b$$

Umgestellt nach x können die jeweiligen RC-Werte berechnet werden. Die letztendliche Berechnung der Mittelwerte und Standardabweichungen verhält sich analog der Berechnung zur Cytotoxizität (Kapitel 3.4.6).

3.7 Weitere Methoden

3.7.1 Optische Beurteilung der Zellen

Bei den Versuchen zur Cytotoxizitätsbestimmung werden die Zellen nach 1- und 24-stündiger Inkubation mit der Testsubstanz mikroskopisch begutachtet und Veränderungen in ihrer Morphologie fotografisch festgehalten. Für die Fotografien werden die Konzentrationen verwendet, die im XTT-Tetrazoliumreduktionstest Cytotoxizitätswerte zwischen 0 % und 100 % verursachen. Die Vergrößerung beträgt generell 280-fach.

3.7.2 Statistik

Um die Messdaten statistisch auszuwerten, wird das Programm Microsoft Excel (Version 2000) verwendet.

Hiermit werden für alle ermittelten Messwerte die statistischen Kennzahlen arithmetischer Mittelwerte (\bar{x}), die Standardabweichungen (SD) und der mittlere Fehler (SE) berechnet. Diese statistischen Parameter können als Basis für eine deskriptive Beurteilung der Ergebnisse benutzt werden. SD macht eine Aussage über die Streuung der Einzelwerte. SE gibt Hinweise auf die Schätzgenauigkeit des Mittelwertes (Rinne und Ickler, 1986). Die Mittelwerte setzen sich aus 3 voneinander unabhängigen Versuchen mit je 3 Messreihen zusammen.

Die Bestimmung der Konfidenzintervalle beim Cytotoxizitäts- und Proliferationstest wird in Kapitel 3.4.6 beschrieben.

Um zu entscheiden, ob sich die statistischen Kenngrößen von der Grundgesamtheit signifikant unterscheiden oder nicht, wird der t-Test herangezogen. Dieser dient dem Vergleich zweier Mittelwerte aus normalverteilten Grundgesamtheiten (Bronstein und Semendjajew, 1981). Normalverteilung und Gleichheit der Streuungen werden vorausgesetzt. Für die Signifikanzentscheidung wird eine Irrtumswahrscheinlichkeit von 5 % ($p = 0,05$) zugrunde gelegt.

4 Ergebnisse

4.1 Sulfatierte Hyaluronsäuren – S-Hya

4.1.1 Global- und Gruppentests zur Gerinnungsanalytik

4.1.1.1 Thrombelastographie

Jede Versuchsreihe beginnt mit der Aufzeichnung eines Thrombelastogramms von Humancitratplasma ohne Substanzzusatz (Leerwert). Die Reaktionszeit beträgt $9,0 \pm 1,2$ min, d. h. vom Beginn der Reaktion bis zum Eintritt der Gerinnung vergehen 9,0 min. Nach Zusatz der geringsten Konzentration an S-Hya-15 ($4,5 \mu\text{g/ml}$) beträgt diese Zeit $4,7 \pm 0,7$ min. Der Leerwert wird erst bei einer Konzentration von $8,9 \mu\text{g/ml}$ S-Hya-15 erreicht. Bei einer Konzentration von $28,6 \mu\text{g/ml}$ S-Hya-15 wird die Reaktionszeit auf $26,0 \pm 6,0$ min verlängert, bei $35,8 \mu\text{g/ml}$ tritt innerhalb einer Stunde keine Gerinnung ein.

Im Leerwertplasma bildet sich ein Thrombus mit bestimmten Festigkeitseigenschaften nach $4,3 \pm 0,3$ min (Gerinnselbildungszeit k). Mit zunehmender Konzentration verlängert sich diese Zeit auf $15,7 \pm 3,3$ min bei einer Konzentration von $28,6 \mu\text{g/ml}$. S-Hya-15 führt im Konzentrationsbereich von 0 bis $17,9 \mu\text{g/ml}$ zu keiner wesentlichen Veränderung der maximalen Amplitude ma (Abb. 12).

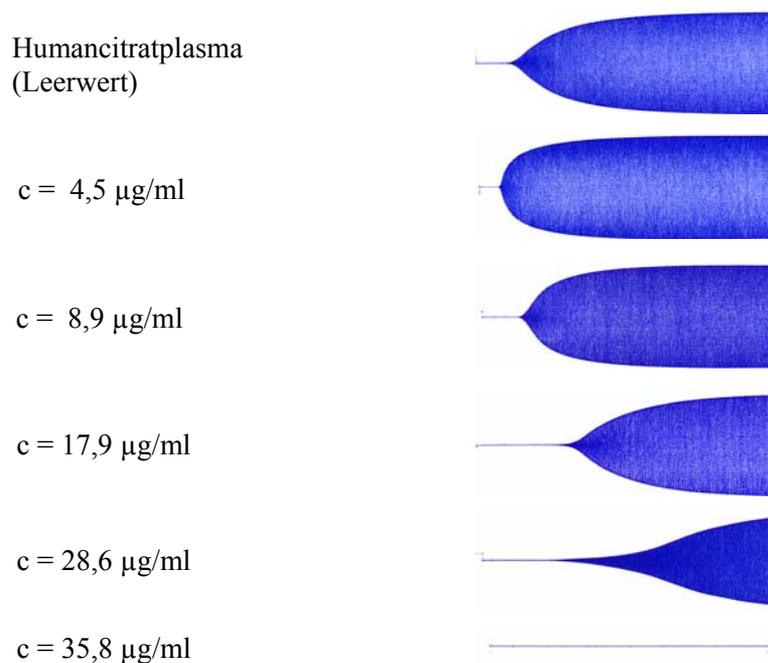


Abb. 12: Einfluss von sulfatierter Hyaluronsäure (S-Hya-15) auf das Thrombelastogramm in Humancitratplasma nach Rekalzifikation ($n = 3$)

4.1.1.2 Thrombinzeit

a) mit Plasma

Bei diesem Versuch wird eine Thrombinkonzentration von 10 NIH-E/ml verwendet. Sie erweist sich als ideal, um gut auswertbare Thrombinzeiten zu erhalten. Die Gerinnungszeit wird mit zunehmender S-Hya-15-Konzentration zunächst allmählich verlängert (bis 0,39 $\mu\text{g/ml}$) und nimmt dann sprunghaft zu (Abb. 13). Die Thrombinzeit wird bei einer Konzentration von 1,6 $\mu\text{g/ml}$ um das 10,9-fache verlängert.

Eine Verdopplung der Thrombinzeit (Leerwert $17,3 \pm 0,1 \text{ sec}$) wird durch **$0,50 \pm 0,03 \mu\text{g/ml}$** S-Hya-15 bewirkt.

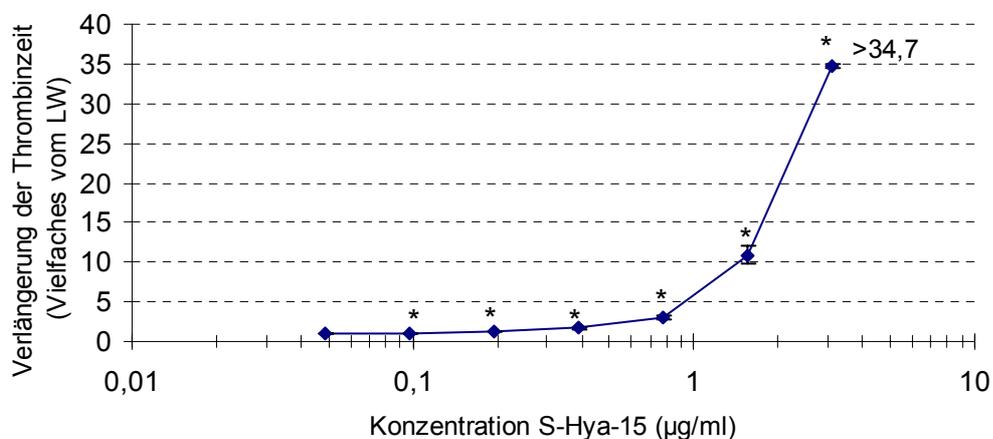


Abb. 13: Einfluss von sulfatierter Hyaluronsäure (S-Hya-15) auf die Thrombin-Humancitratplasma-Reaktion ($\bar{x} \pm SE$; $n = 3$)

* signifikant gegenüber Leerwert, $p \leq 0,05$

b) mit Fibrinogen

Auch bei diesem Versuch wird die geeignete Thrombinkonzentration 10 NIH-E/ml verwendet. In Abhängigkeit von der Konzentration an S-Hya-15 nimmt die Verlängerung der Thrombinzeit bis 3,1 $\mu\text{g/ml}$ zu und sinkt dann mit einem flachen Abfall bis 100 $\mu\text{g/ml}$ (Abb. 14). Ab 200 $\mu\text{g/ml}$ kommt es zu einem erneuten steilen Anstieg der Kurve. Bei der höchsten Konzentration von 1600 $\mu\text{g/ml}$ S-Hya-15 wird die TZ um das über 31,2-fache vom Leerwert verlängert. Die Verdopplung der Thrombinzeit (Leerwert $19,8 \pm 0,7 \text{ sec}$) wird durch **$0,33 \pm 0,03 \mu\text{g/ml}$** erreicht.

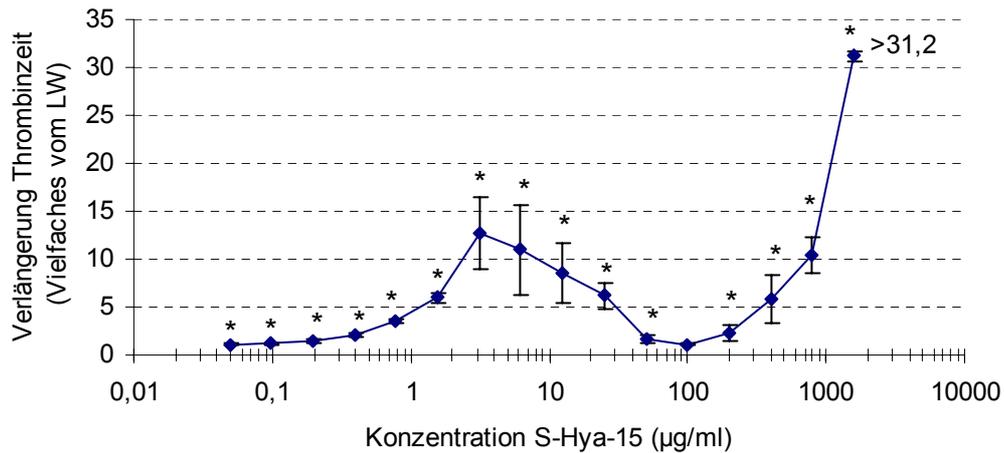


Abb. 14: Einfluss von sulfatierter Hyaluronsäure (S-Hya-15) auf die Thrombin-Fibrinogen-Reaktion ($\bar{x} \pm SE$; $n = 3$)
 * signifikant gegenüber Leerwert, $p \leq 0,05$

4.1.1.3 Prothrombinzeit

Die Prothrombinzeit wird durch S-Hya-15 erst ab einer Konzentration von 22,7 µg/ml deutlich verlängert. Die Kurve in Abbildung 15 zeigt dann einen sehr steilen Anstieg. Eine Verdopplung der Prothrombinzeit gegenüber dem Leerwert ($27,2 \pm 0,9$ sec) wird durch **13,9 ± 2,4 µg/ml** S-Hya-15 erreicht.

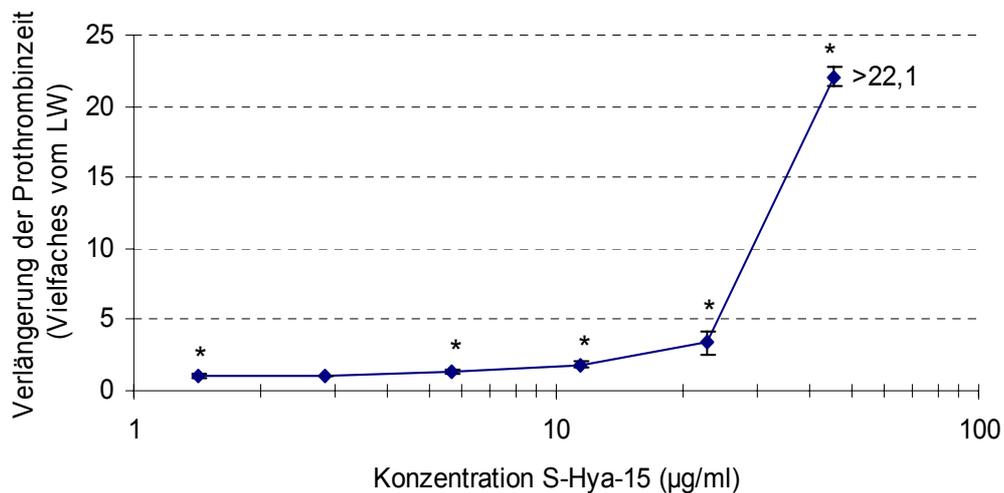


Abb. 15: Einfluss von sulfatierter Hyaluronsäure (S-Hya-15) auf die Prothrombinzeit in Humancitratplasma ($\bar{x} \pm SE$; $n = 3$)
 * signifikant gegenüber Leerwert, $p \leq 0,05$

4.1.1.4 Aktivierte partielle Thromboplastinzeit

Der Kurvenverlauf in Abbildung 16 ist bis zur Konzentration von 5,7 $\mu\text{g/ml}$ flach und beinhaltet die Verdopplung der aktivierten partiellen Thromboplastinzeit (aPTT). Im weiteren Verlauf steigt die Kurve allmählich an und endet bei einer Konzentration von 45,5 $\mu\text{g/ml}$. Das Humancitratplasma gerinnt nicht mehr. Bezogen auf den Leerwert ($32,5 \pm 1,0 \text{ sec}$) beträgt die Verdopplung der aPTT **$4,6 \pm 0,2 \mu\text{g/ml}$** .

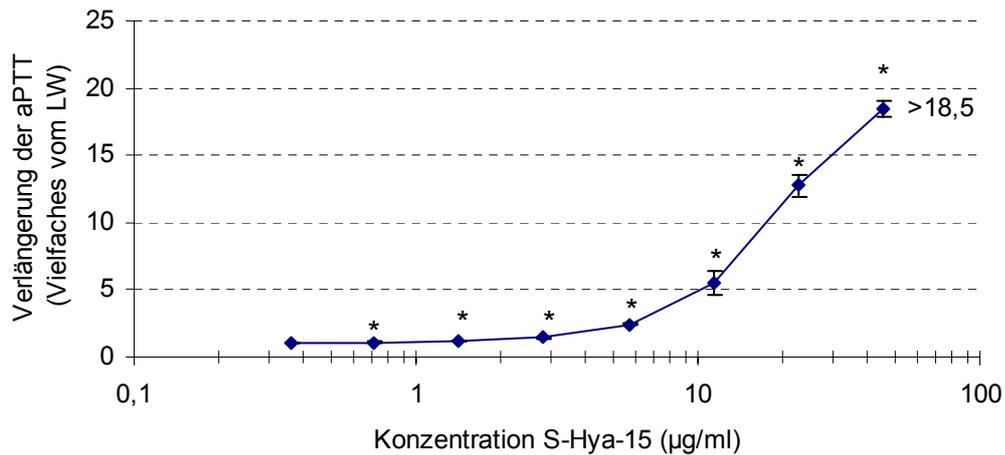


Abb. 16: Einfluss von sulfatierter Hyaluronsäure (S-Hya-15) auf die aktivierte partielle Thromboplastinzeit (aPTT) in Humancitratplasma ($\bar{x} \pm \text{SE}$; $n = 3$)
* signifikant gegenüber Leerwert, $p \leq 0,05$

4.1.1.5 Wirkung in Abhängigkeit von der Molmasse

Um zu überprüfen, ob die antikoagulierende Wirkung von der Molmasse abhängig ist, werden die Thrombinzeiten im Plasma von sulfatierter Hyaluronsäure (S-Hya) unterschiedlicher Molmasse bestimmt. In Tabelle 5 ist die Abhängigkeit der plasmatischen Gerinnung von der Molmasse der sulfatierten Hyaluronsäuren dargestellt. Die Wirkung der S-Hya steigt mit Zunahme der Molmasse an.

Tabelle 5: Wirkung der sulfatierten Hyaluronsäuren auf die plasmatische Gerinnung in Abhängigkeit von der Molmasse

Sulfatierte Hyaluronsäure	M_w	Konzentration, die eine Verdopplung der Thrombinzeit bewirkt ($\mu\text{g/ml}$)	SE
Gruppe 1	99.800	1,10	0,20
Gruppe 2	626.300	0,76	0,08
Gruppe 3	1.358.000	0,55	0,03

M_w = Mittlere Molmasse
SE = mittlerer Fehler

Die Kurvenverläufe in Abbildung 17 zeigen den Unterschied zwischen den einzelnen Substanzen. Es sind nur die Ausschnitte mit den Steigungen dargestellt, um den Effekt besser zu erkennen. Von links nach rechts erfolgt mit Zunahme der Konzentration eine Verlängerung der Thrombinzeit.

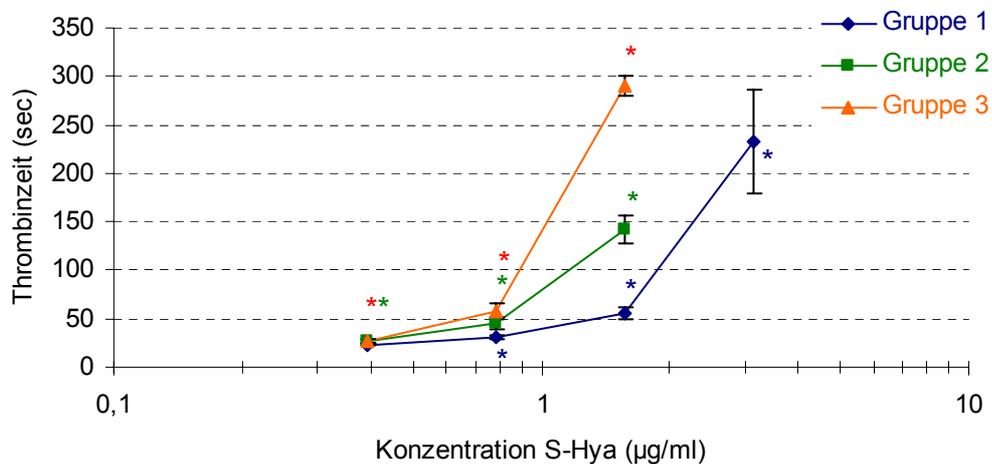


Abb. 17: Einfluss von sulfatierter Hyaluronsäure (S-Hya) mit unterschiedlichen Molmassen auf die Thrombin-Humancitratplasma-Reaktion ($\bar{x} \pm SE$; $n = 3$)
 *** signifikant gegenüber Leerwert, $p \leq 0,05$

In Abbildung 18 sind die Konzentrationen an S-Hya aufgeführt, bei denen es zur Verdopplung der Thrombinzeit in Abhängigkeit von der Molmasse kommt. Die Säulen werden mit zunehmender Molmasse kleiner, d.h. die Konzentrationen, die eine Verdopplung der Thrombinzeit bewirken, nehmen ab.

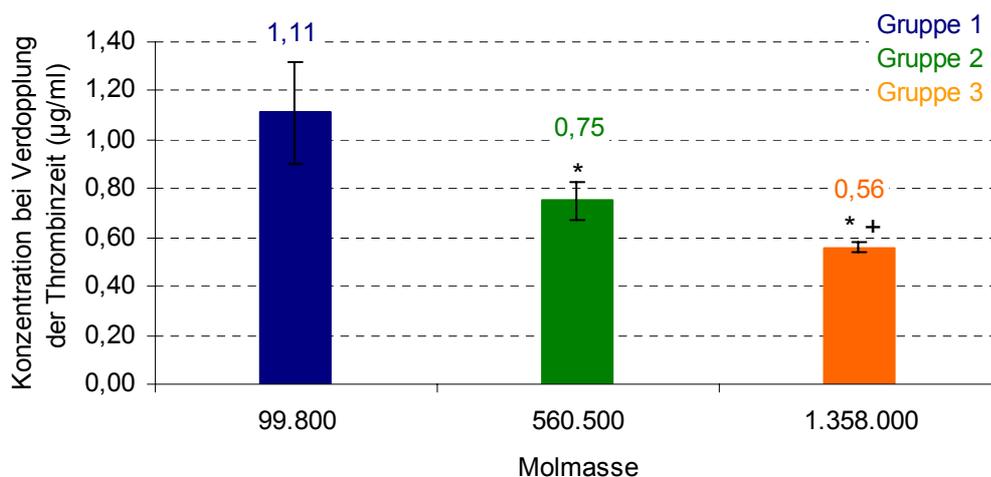


Abb. 18: Einfluss der Molmasse von sulfatierter Hyaluronsäure auf die Verdopplung der Thrombinzeit ($\bar{x} \pm SE$; $n = 3$)
 * signifikant gegenüber Gruppe 1, $p \leq 0,05$
 + signifikant gegenüber Gruppe 2, $p \leq 0,05$

Sulfatierte Hyaluronsäuren mit unterschiedlichem Sulfatierungsgrad zeigen Unterschiede in ihrer antikoagulierenden Wirkung. Mit zunehmendem Sulfatierungsgrad steigt die Wirkung, denn die Konzentrationen, die eine Verdopplung der Thrombinzeit bewirken, nehmen ab (Abb. 19, Tab. 6).

Tabelle 6: Wirkung der sulfatierten Hyaluronsäuren auf die plasmatische Gerinnung in Abhängigkeit vom Sulfatierungsgrad

Sulfatierte Hyaluronsäure	DS _s	Konzentration, die eine Verdopplung der Thrombinzeit bewirkt (µg/ml)	SE
Gruppe 4	2,15	0,99	0,06
Gruppe 5	2,62	0,71	0,09
Gruppe 6	3,12	0,55	0,03

DS_s = Sulfatierungsgrad

SE = mittlerer Fehler

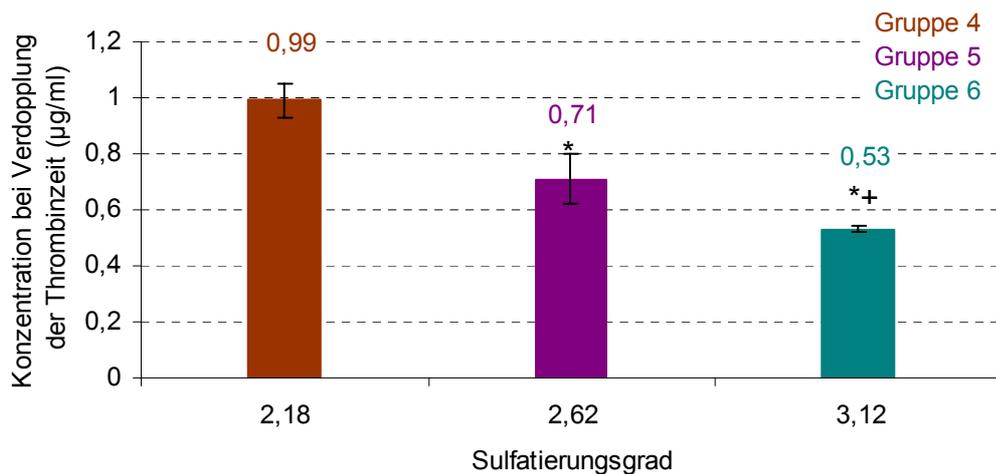


Abb. 19: Einfluss des Sulfatierungsgrades von sulfatierter Hyaluronsäure auf die Verdopplung der Thrombinzeit ($\bar{x} \pm SE$; $n = 3$)

* signifikant gegenüber Gruppe 4, $p \leq 0,05$

+ signifikant gegenüber Gruppe 5, $p \leq 0,05$

4.1.2 Neutralisation der antikoagulierenden Wirkung

Der Einfluss von Protaminsulfat auf die Thrombin-Humancitratplasma-Reaktion *in vitro* wurde bereits in der Diplomarbeit Kessler, 2000 geprüft. Demnach sind die Thrombinzeiten von Protaminsulfat (PS) in den Konzentrationen 0,02 bis 20 µg/ml annähernd konstant (Abb. 20).

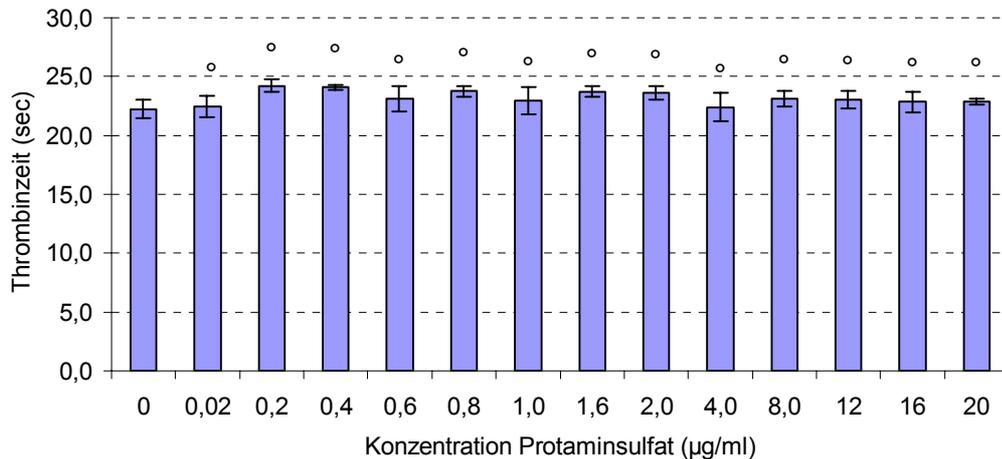


Abb. 20: Einfluss von Protaminsulfat auf die Thrombin-Humancitratplasma-Reaktion *in vitro* ($\bar{x} \pm SE$; $n = 2$)
° nicht signifikant gegenüber Leerwert

Werden dieser Konzentrationsreihe je 1,6 µg/ml S-Hya-15 zugesetzt, wird folgendes ersichtlich (Abb. 21): Die braune Säule stellt den Leerwert (LW) dar. Dieser ergibt sich aus dem Plasma, Tris-Puffer und Thrombin (10 NIH-E/ml). Die Thrombinzeit (TZ) des Leerwerts beträgt $21,0 \pm 0,1$ sec. Durch Zusatz von 1,6 µg/ml S-Hya-15 wird die Gerinnungszeit auf über 600 sec verlängert (2. Säule, grün). Bei der geringsten Konzentration an Protaminsulfat (0,02 µg/ml) liegt die Thrombinzeit bei $88,1 \pm 8,4$ sec. Je höher die Konzentration an PS, desto niedriger werden die Thrombinzeiten. Werden 1,6 µg/ml S-Hya-15 zu $1,5 \pm 0,1$ µg/ml PS gegeben, erreicht die TZ den LW. Bei diesem Mischungsverhältnis kommt es demzufolge zu einer Aufhebung der antikoagulierenden Wirkung von S-Hya-15. Die sulfatierte Hyaluronsäure wird von Protaminsulfat etwa im Verhältnis **1 : 1** antagonisiert.

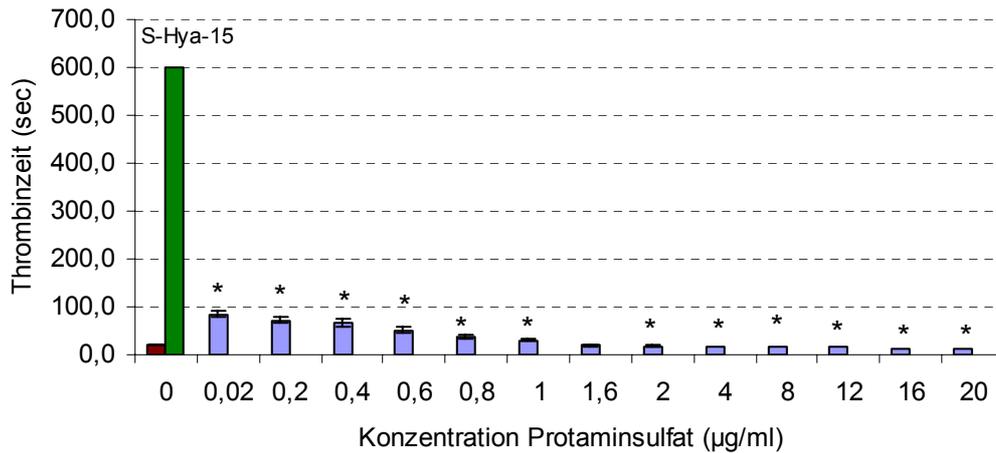


Abb. 21: Neutralisation der Wirkung von sulfatierter Hyaluronsäure (S-Hya-15; 1,6 µg/ml) durch Protaminsulfat in Humancitratplasma ($\bar{x} \pm SE$; $n = 3$)
 * signifikant gegenüber Leerwert, $p \leq 0,05$

4.1.3 Cytotoxizität

Eine Konzentrationsreihe von 6 mg/ml bis 32 mg/ml erweist sich als geeignet, um einen Cytotoxizitätsbereich von 10 % bis 90 % zu erfassen. Beim 1-Stunden-Versuch können aufgrund der Löslichkeitsgrenze von S-Hya-15 nur 60 % Cytotoxizität erreicht werden.

In Abbildung 22 ist der Verlauf der Konzentrations-Wirkungs-Kurve nach 1- und 24-stündiger Exposition dargestellt. Nach einer Expositionsdauer von 1 Stunde beträgt die Cytotoxizität bei 6 mg/ml $-7,7 \pm 3,9$ % und steigt dann allmählich auf $58,7 \pm 4,6$ % bei einer Konzentration von 32 mg/ml an. Die Konzentration, bei der 50 % aller Zellen ihre Aktivität verlieren (CC_{50}), liegt bei **19,0 (16,9 – 21,3) mg/ml**.

Nach 24 Stunden Exposition beträgt die Cytotoxizität bei 6 mg/ml $-4,1 \pm 9,2$ %. Die Kurve zeigt ab 12 mg/ml einen steilen Anstieg. Sie endet bei 32 mg/ml mit einer Cytotoxizität von $89,6 \pm 4,0$ %. Der CC_{50} -Wert beträgt **20,1 (18,0 - 22,4) mg/ml**.

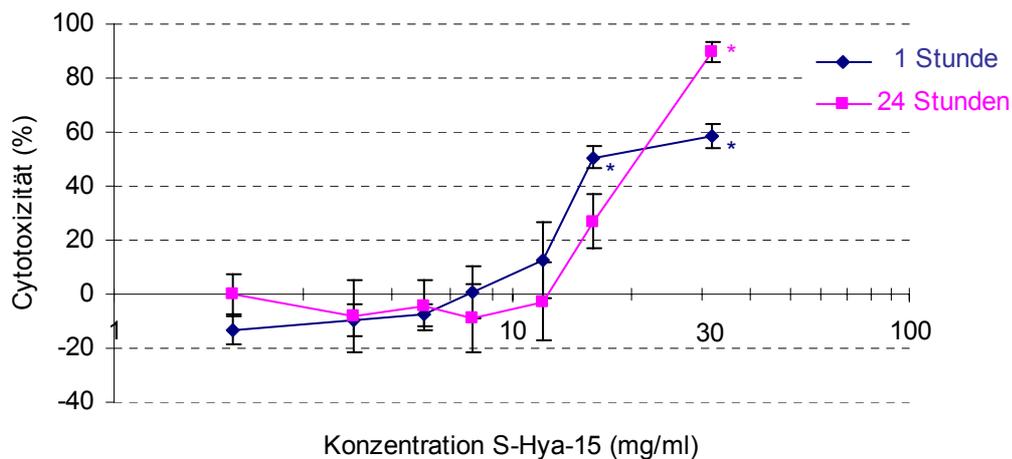


Abb. 22: Cytotoxizität von sulfatierter Hyaluronsäure (S-Hya-15) an U937-Zellen im XTT-Tetrazoliumreduktionstest nach 1- und 24-stündiger Exposition

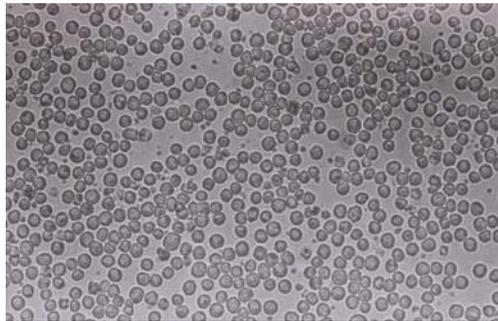
($\bar{x} \pm SE$; $n = 3$)

** signifikant gegenüber Leerwert, $p \leq 0,05$

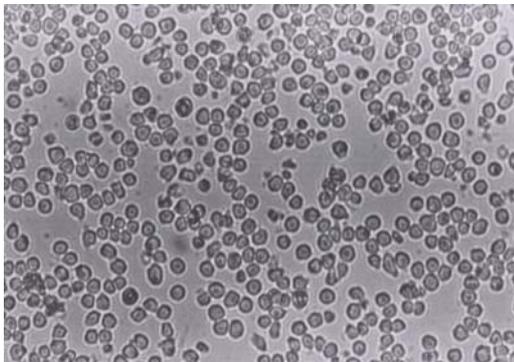
Optische Beurteilung der Zellen

Parallel zur Durchführung des XTT-Tetrazoliumreduktionstests werden die Zellen mikroskopisch betrachtet und fotografiert. Die Zellen der Zellkontrolle haben eine fast einheitliche runde Form (Abb. 23). Nach 1-stündiger Exposition mit 12 mg/ml S-Hya-15 ist der Zellrasen etwas aufgelockerter, die Zellform bleibt bestehen. Unter Zugabe von 32 mg/ml S-Hya-15 werden im XTT-Tetrazoliumreduktionstest 58,7 % Cytotoxizität erreicht, im Foto sind einige Zellen z.T. aufgelöst.

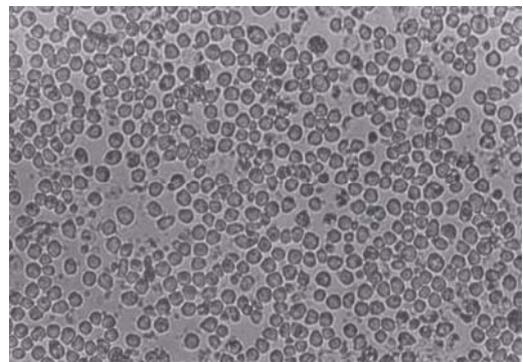
Die gleiche Konzentration ruft nach 24 Stunden Inkubation Veränderungen in Form, Größe und Struktur der Zellen hervor. Die ehemals runden Zellen sind stark deformiert und geschrumpft.



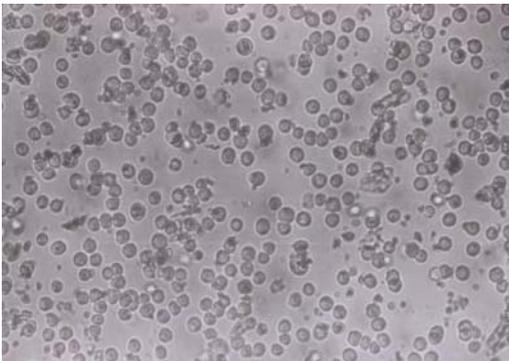
Zellkontrolle



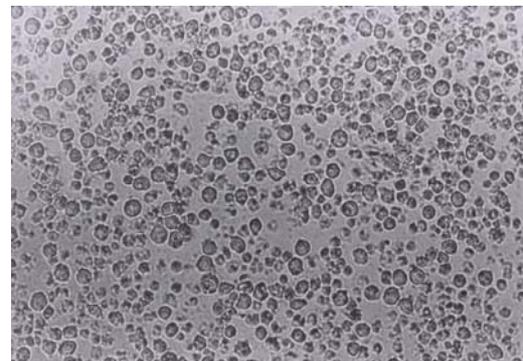
c = 12 mg/ml S-Hya-15 (12,7 % Toxizität)
1 Stunde Exposition



c = 12 mg/ml S-Hya-15 (-2,9 % Toxizität)
24 Stunden Exposition



c = 32 mg/ml S-Hya-15 (58,7 % Toxizität)
1 Stunde Exposition



c = 32 mg/ml S-Hya-15 (89,6 % Toxizität)
24 Stunden Exposition

Abb. 23: U937-Zellen nach 1- und 24-stündiger Exposition mit sulfatierter Hyaluronsäure (S-Hya-15) (280-fache Vergrößerung)

4.1.4 Zellproliferation

Als höchste zu untersuchende Substanzkonzentration wird eine Konzentration gewählt, die im XTT-Tetrazoliumreduktionstest nicht oder nur gering toxisch ist. Es wird eine Konzentrationsreihe ausgehend von 12,8 mg/ml S-Hya-15 in 7 Stufen bis 100 µg/ml hergestellt und untersucht.

Um zu erkennen, dass sich die Zellen der Zellkontrolle im Laufe von 96 Stunden in ihrer Anzahl vergrößern, sind in den Abbildungen 24 und 25 die Zellzahl bzw. die Absorption in Abhängigkeit von der Zeit dargestellt.

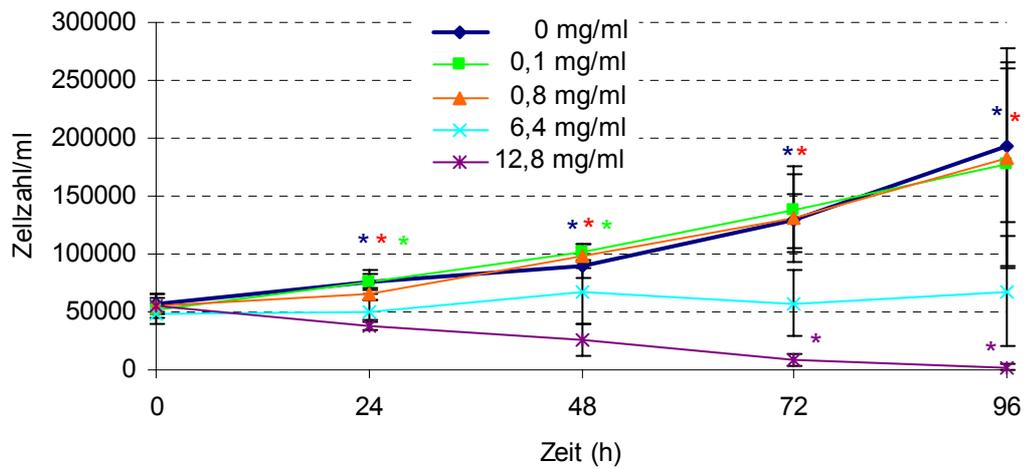


Abb. 24: Proliferation von U937-Zellen unter dem Einfluss von sulfatierter Hyaluronsäure (S-Hya-15) – Zellzahlbestimmung – ($\bar{x} \pm SE$; $n = 3$)

***signifikant gegenüber Leerwert, $p \leq 0,05$

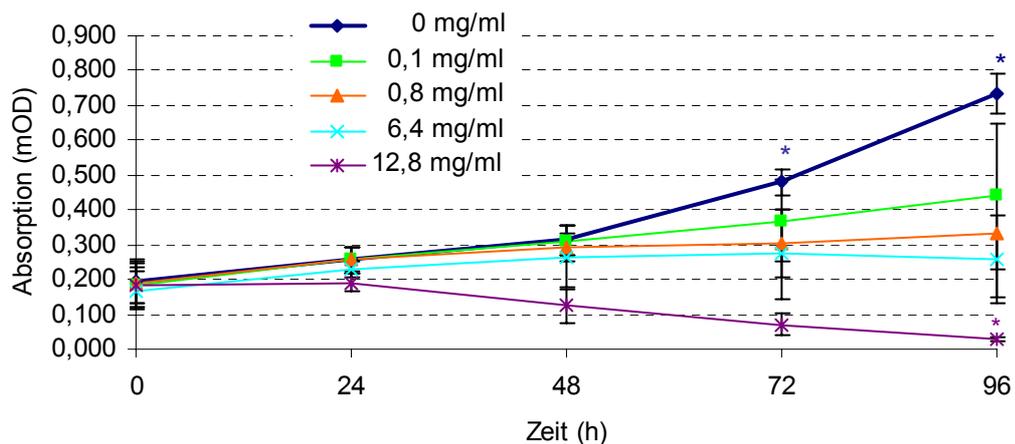


Abb. 25: Proliferation von U937-Zellen unter dem Einfluss von sulfatierter Hyaluronsäure (S-Hya-15) – XTT-Tetrazoliumreduktionstest – ($\bar{x} \pm SE$; $n = 3$)

** signifikant gegenüber Leerwert, $p \leq 0,05$

Für die Darstellung der prozentualen Zellzahl vom Leerwert sowohl nach Auszählung als auch im XTT-Tetrazoliumreduktionstest werden die Abbildungen 26 und 27 herangezogen. Die Zellzahl sinkt unter dem Einfluss der höchsten Konzentration S-Hya-15 (12,8 mg/ml) bis zum 5. Tag auf Null. Bis 1,6 mg/ml sind noch ca. 70 % der Zellen im Vergleich zur Zellkontrolle vorhanden (Abb. 26 und 27). Bei den niedrigen Konzentrationen (bis 1,6 mg/ml) steigt die Zellzahl innerhalb von 48 Stunden an, nach 72 Stunden kommt es dann zu einer Verringerung derselben. Im Gegensatz dazu wird das Wachstum der Zellen ab einer Konzentration von 3,2 mg/ml S-Hya-15 schon nach 24 Stunden negativ beeinflusst, die Zellzahl liegt immer unterhalb des entsprechenden Ausgangswertes.

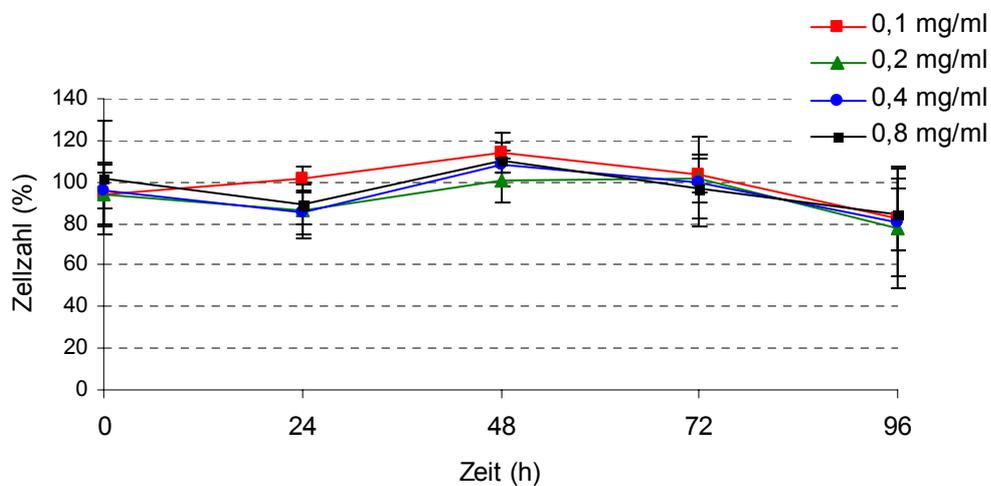


Abb. 26: Einfluss von sulfatierter Hyaluronsäure (S-Hya-15) auf die Proliferation von U937-Zellen; Zellzahl in Prozent der Kontrolle im Konzentrationsbereich 0,1 - 0,8 mg/ml ($\bar{x} \pm SE$, $n = 3$)

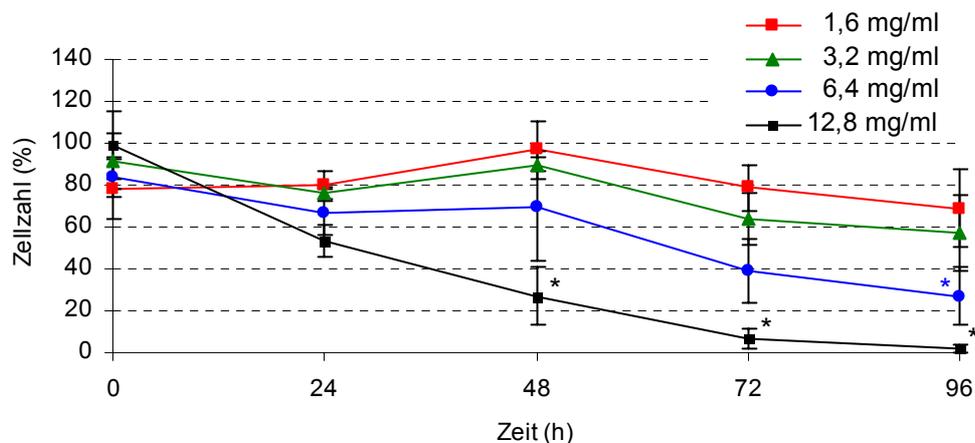


Abb. 27: Einfluss von sulfatierter Hyaluronsäure (S-Hya-15) auf die Proliferation von U937-Zellen; Zellzahl in Prozent der Kontrolle im Konzentrationsbereich 1,6 - 12,8 mg/ml ($\bar{x} \pm SE$, $n = 3$)
 ** signifikant gegenüber Leerwert, $p \leq 0,05$

Die Stoffwechselaktivität im XTT-Tetrazoliumreduktionstest nimmt bis zur Konzentration von 6,4 mg/ml erst nach 72 Stunden ab und liegt nach 96 Stunden nur noch zwischen 40 % und 60 % im Vergleich zur Zellkontrolle. Nur bei 12,8 mg/ml sinkt sie schon nach 24 Stunden und endet nach 96 Stunden mit 4 % (Abb. 28 und 29).

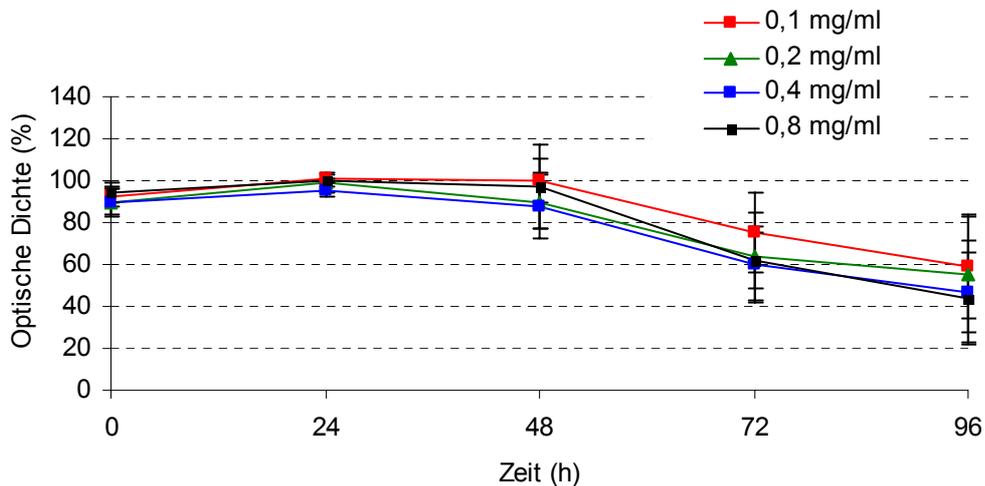


Abb. 28: Einfluss von sulfatierter Hyaluronsäure (S-Hya-15) auf die Proliferation von U937-Zellen; Optische Dichte in Prozent der Kontrolle im Konzentrationsbereich 0,1 - 0,8 mg/ml ($\bar{x} \pm SE$, $n = 3$)

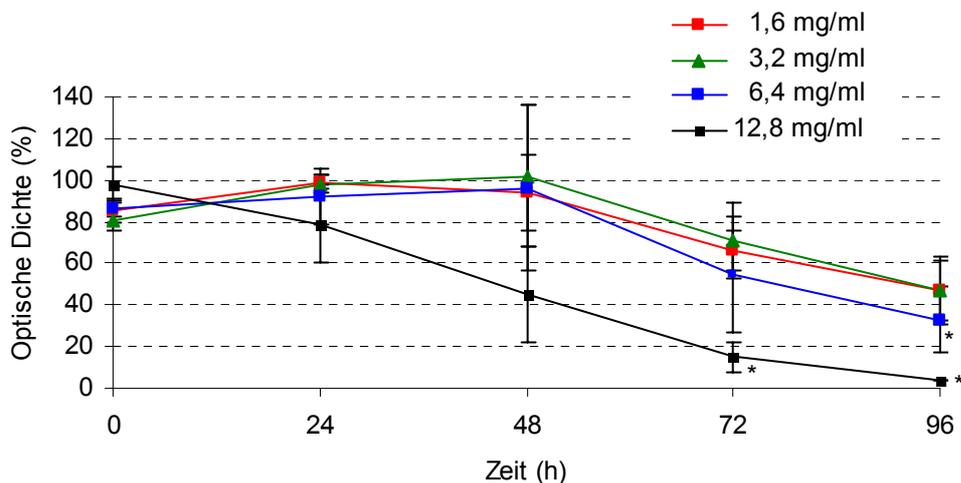


Abb. 29: Einfluss von sulfatierter Hyaluronsäure (S-Hya-15) auf die Proliferation von U937-Zellen; Optische Dichte in Prozent der Kontrolle im Konzentrationsbereich 1,6 - 12,8 mg/ml ($\bar{x} \pm SE$, $n = 3$)

** signifikant gegenüber Leerwert, $p \leq 0,05$

Da sowohl die Stoffwechselaktivität (XTT-Tetrazoliumreduktionstest) als auch die Zellzahl nach 5 Tagen geringer sind als der entsprechende Ausgangswert, handelt es sich bei den Konzentrationen 6,4 mg/ml bis 12,8 mg/ml um eine toxische bzw. antiproliferierende Wirkung der S-Hya-15 (Abb. 30).

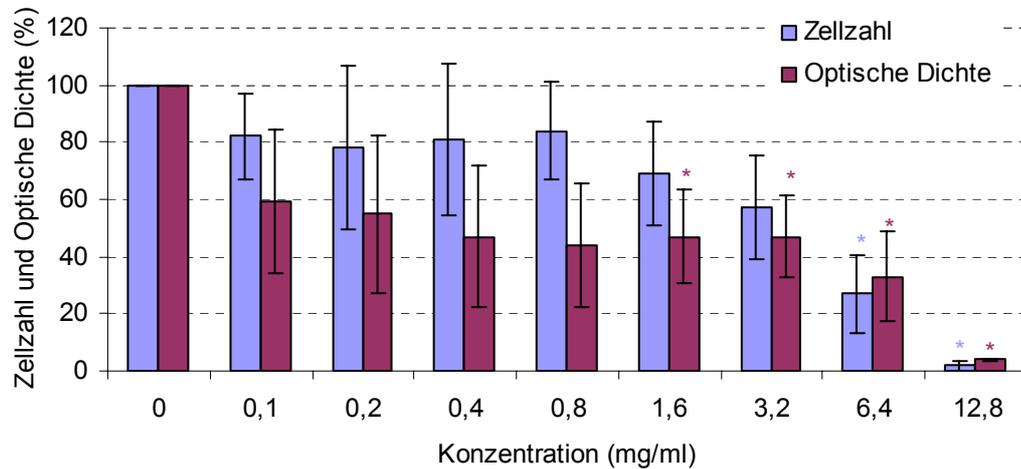


Abb. 30: Beeinflussung der Zellproliferation von U937-Zellen durch sulfatierte Hyaluronsäure (S-Hya-15) nach 96 Stunden Einwirkung ($\bar{x} \pm SE$, $n = 3$)
 **signifikant gegenüber Leerwert, $p \leq 0,05$

4.1.5 [³H]Arachidonsäure-Freisetzungstest

Der untersuchte Konzentrationsbereich erstreckt sich von 8,0 bis 22,0 mg/ml sulfatierte Hyaluronsäure (S-Hya-15). Auch hier ist die Löslichkeitsgrenze im physiologischen Puffer die begrenzende Größe. Natriumdodecylsulfat (SDS) führt in einer Konzentration von 0,32 mg/ml zu einer 100%igen [³H]AA-Freisetzung.

Die Membrantoxizität von S-Hya-15 ist weder von der Temperatur noch von der Exposition abhängig (Abb. 31). Im Membrantoxizitäts-Konzentrations-Diagramm ist erkennbar, dass nach 1 Stunde bei einer Temperatur von 37 °C und einer Konzentration von 8 mg/ml die Membrantoxizität $1,1 \pm 0,3$ % und nach 24 Stunden $-2,4 \pm 1,1$ % [³H]AA-Freisetzung im Vergleich zur AA-Freisetzung von Natriumdodecylsulfat (SDS) beträgt.

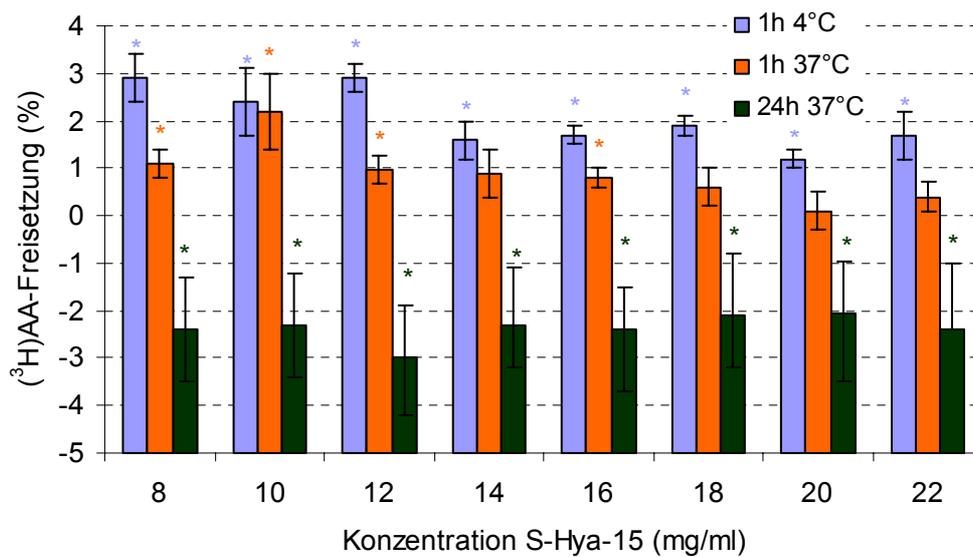


Abb. 31: Membrantoxizität von sulfatierter Hyaluronsäure (S-Hya-15) an U937-Zellen nach 1- und 24-stündiger Exposition bei 37 °C sowie 1 Stunde bei 4 °C ($\bar{x} \pm SE$, $n = 3$)

*** signifikant gegenüber Leerwert, $p \leq 0,05$

Die Konzentration, bei der 5 % [^3H]Arachidonsäure aus den U937-Zellen freigesetzt werden, wird bei keiner Einwirkungszeit erreicht. Der RC_5 -Wert liegt somit **über 22,0 mg/ml**.

4.2 Carboxymethylierte hochsulfatierte Hyaluronsäuren – CMS-1

4.2.1 Global- und Gruppentests zur Gerinnungsanalytik

4.2.1.1 Thrombelastographie

Es wird zunächst der Leerwert bestimmt. Die Reaktionszeit beträgt $4,7 \pm 0,3$ min. Nach Zusatz von CMS-1 in einer Konzentration von $4,5 \mu\text{g/ml}$ liegt sie im Bereich des Leerwerts, nämlich bei $4,5 \pm 0,5$ min. Bei einer Konzentration von $35,7 \mu\text{g/ml}$ setzt die Gerinnung erst nach $48,0 \pm 10,0$ min ein, bei $71,4 \mu\text{g/ml}$ bleibt sie innerhalb einer Stunde aus. Diese Zeiten ergeben sich aus der Reaktionszeit plus Einfüllzeit. Die Gerinnselbildungszeit verändert sich kaum, beim LW beträgt sie $2,3 \pm 0,3$ min und bei $17,9 \mu\text{g/ml}$ $3,3 \pm 1,2$ min (Abb. 32). CMS-1 führt im Konzentrationsbereich von 0 bis $17,9 \mu\text{g/ml}$ zu keiner wesentlichen Veränderung der maximalen Amplitude ma (Abb. 32).

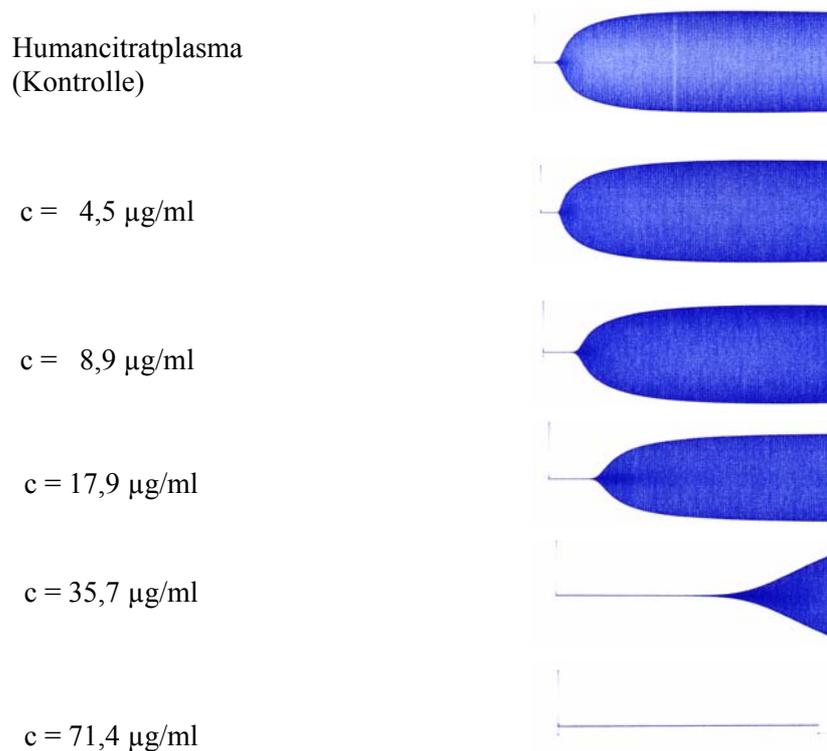


Abb. 32: Einfluss von carboxymethylierter sulfatierter Hyaluronsäure (CMS-1) auf das Thrombelastogramm in Humancitratplasma nach Rekalzifikation ($n = 3$)

4.2.1.2 Thrombinzeit

a) mit Plasma

Ähnlich wie bei der Gruppe der sulfatierten Hyaluronsäure wird die Thrombinzeit bis zur Konzentration von 0,78 µg/ml allmählich und danach sprunghaft verlängert (Abb. 33). Bei 1,56 µg/ml wird die Thrombinzeit bereits um das 5,9-fache verlängert. Die Konzentration, bei der es zur Verdopplung der Gerinnungszeit kommt, beträgt **0,67 ± 0,03 µg/ml**.

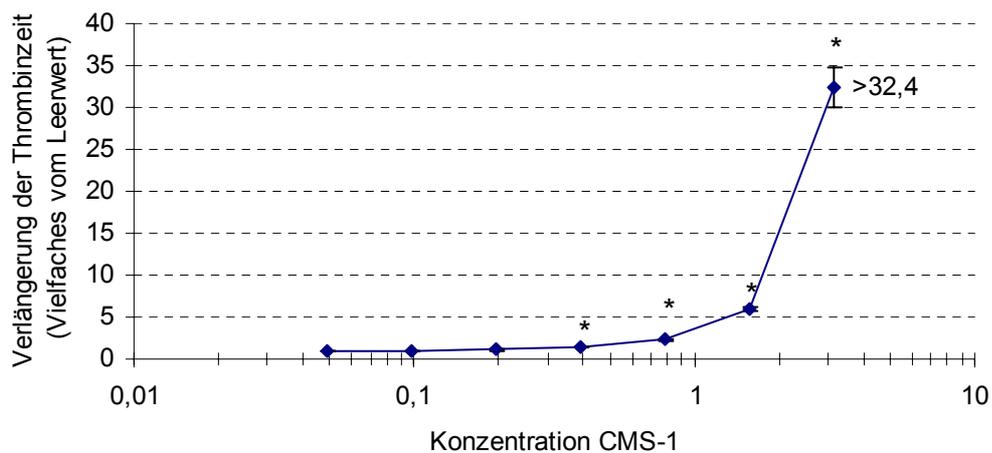


Abb. 33: Einfluss von carboxymethylierter sulfatierter Hyaluronsäure (CMS-1) auf die Thrombin-Humancitratplasma-Reaktion ($\bar{x} \pm SE$; $n = 3$)
* signifikant gegenüber Leerwert, $p \leq 0,05$

b) mit Fibrinogen

Nach der in Abbildung 34 gezeigten Konzentrations-Zeit-Kurve wird die Thrombinzeit mit zunehmender Konzentration immer mehr verlängert. Bei 1,56 µg/ml erreicht die Kurve ein Maximum, um dann in einer leichten Kurve bis 25 µg/ml zu sinken. Ab 100 µg/ml kommt es zu einem erneuten, diesmal steilen, Anstieg, der bei 1600 µg/ml CMS-1 mit einer über 27,7-fachen Verlängerung der Thrombinzeit endet. Das bedeutet, dass das Fibrinogen bei dieser Konzentration nicht mehr gerinnt. Eine Verdopplung der Thrombinzeit ist bei **0,46 ± 0,08 µg/ml** CMS-1 erreicht.

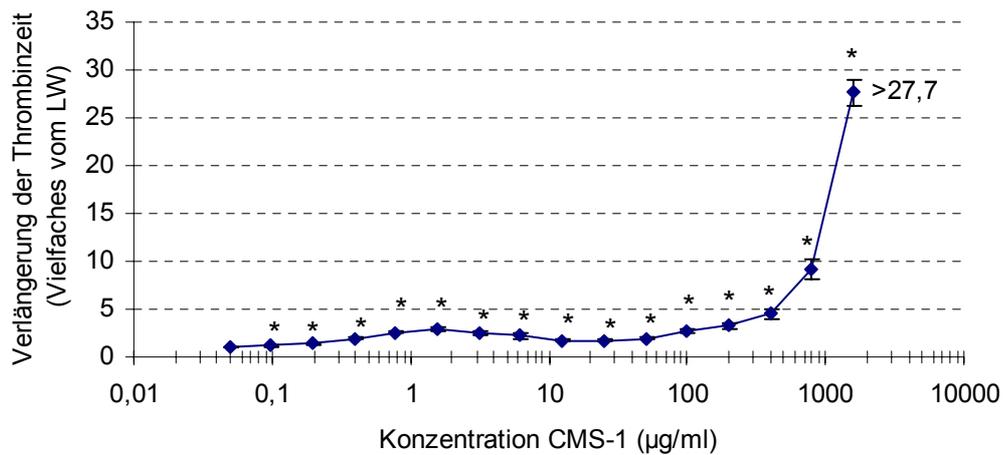


Abb. 34: Einfluss von carboxymethylierter sulfatierter Hyaluronsäure (CMS-1) auf die Thrombin-Fibrinogen-Interaktion ($\bar{x} \pm SE$; $n = 3$)
* signifikant gegenüber Leerwert, $p \leq 0,05$

4.2.1.3 Prothrombinzeit

Der Kurvenverlauf in Abbildung 35 zeigt bei einer Konzentration von 22,7 µg/ml CMS-1 einen sprunghaften Anstieg der Prothrombinzeit um das 2,8-fache vom Leerwert. Eine Verdopplung der Prothrombinzeit (Leerwert $24,9 \pm 1,7$ sec) wird durch $13,8 \pm 2,6$ µg/ml bewirkt.

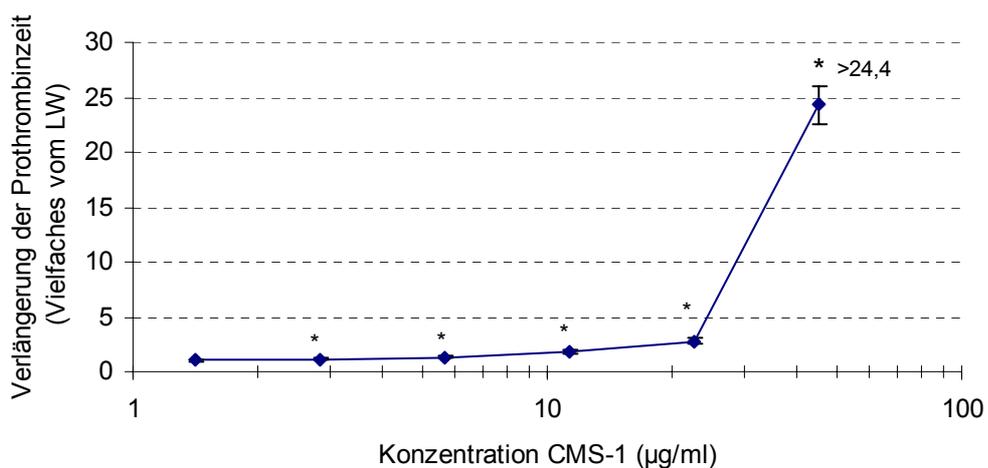


Abb. 35: Einfluss von carboxymethylierter sulfatierter Hyaluronsäure (CMS-1) auf die Prothrombinzeit in Humancitratplasma ($\bar{x} \pm SE$; $n = 3$)
* signifikant gegenüber Leerwert, $p \leq 0,5$

4.2.1.4 Aktivierte partielle Thromboplastinzeit

Abbildung 36 zeigt eine Kurve, die sich aus der Verlängerung der aktivierten partiellen Thromboplastinzeit (aPTT) und der Konzentration ergibt. Bis 1,42 µg/ml wird die aPTT nur in geringfügigem Maß erhöht, ab 2,84 µg/ml kommt es zu einer stärkeren Erhöhung (um das 2,4-fache vom LW). Der Kurvenverlauf endet bei einer Konzentration von 11,4 µg/ml mit einer Verlängerung der aPTT um das 22-fache. Eine Verdopplung der aPTT wird durch **2,2 ± 0,6 µg/ml CMS-1** bei einem Leerwert von $27,5 \pm 1,8$ sec bewirkt (Abb. 36).

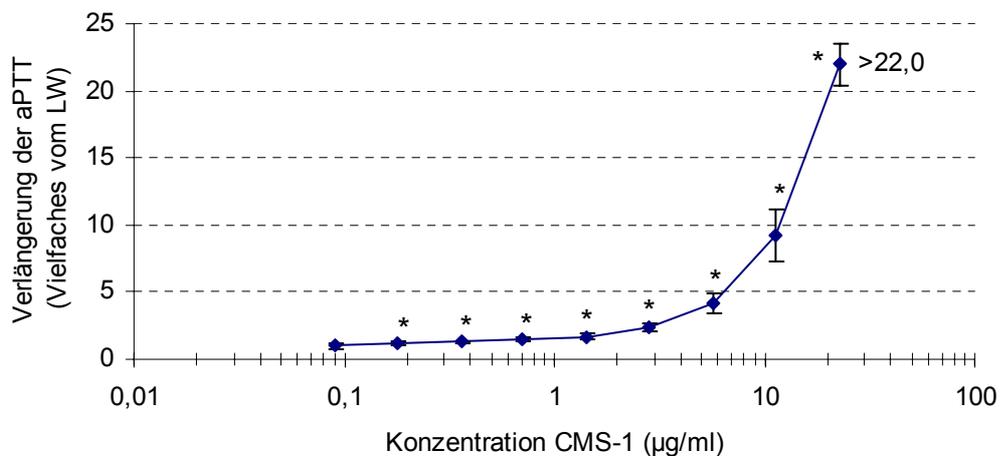


Abb. 36: Einfluss von carboxymethylierter sulfatierter Hyaluronsäure (CMS-1) auf die aktivierte partielle Thromboplastinzeit (aPTT) in Humancitratplasma ($\bar{x} \pm SE$; $n = 3$)

* signifikant gegenüber Leerwert, $p \leq 0,05$

4.2.2 Neutralisation der antikoagulierenden Wirkung

In Abbildung 37 werden die Thrombinzeiten (TZ) von Protaminsulfat (PS) nach Zusatz von 1,6 µg/ml CMS-1 dargestellt. Es wird eine Konzentrationsreihe von 0,02 bis 4,0 µg/ml PS getestet. Durch die linke Säule ist die TZ vom Leerwert (Plasma, Puffer, Thrombin) dargestellt, die bei diesem Versuch $19,3 \pm 0,1$ sec beträgt. Die grüne Säule zeigt die Thrombinzeit von 1,6 µg/ml CMS-1 ohne Protaminsulfat. Werden dieser Konzentration 0,02 µg/ml PS zugesetzt beträgt die TZ $200,4 \pm 28,5$ sec, die mit zunehmender PS-Konzentration abnimmt. Bei der errechneten Konzentration von $3,5 \pm 0,1$ µg/ml PS erreicht die TZ wieder den Leerwert.

Im Ergebnis wird die carboxymethylierte sulfatierte Hyaluronsäure im Verhältnis **1 : 2,2** von Protaminsulfat antagonisiert.

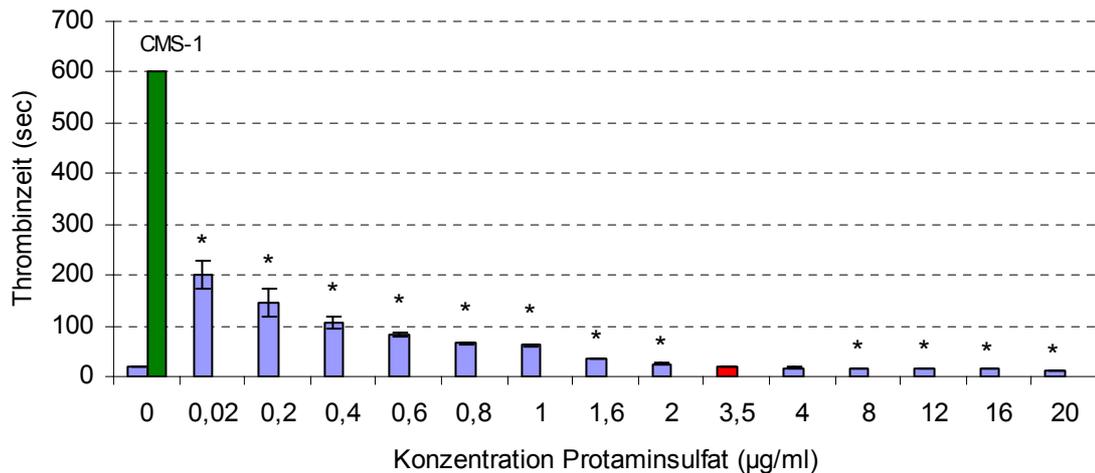


Abb. 37: Neutralisation der Wirkung von carboxymethylierter sulfatierter Hyaluronsäure (CMS-1; 1,6 µg/ml) durch Protaminsulfat in Humancitratplasma ($\bar{x} \pm SE$; $n = 3$)
*signifikant gegenüber Leerwert, $p \leq 0,05$

4.2.3 Cytotoxizität

Die etwas niedrigere Viskosität der carboxymethylierten sulfatierten Hyaluronsäure CMS-1 (in Lösung) im Vergleich zur uncarboxylierten sulfatierten Hyaluronsäure S-Hya erlaubt die Untersuchung eines höheren Konzentrationsbereiches. Ausgehend von 50 mg/ml wird eine Konzentrationsreihe bis 15 mg/ml CMS-1 hergestellt.

Nach *einstündiger Einwirkung* von CMS-1 zeigt sich in der Konzentrations-Zeit-Darstellung einen annähernd parallelen Verlauf der Datenreihe zur x-Achse. Die höchst gemessene Cytotoxizität beträgt $14,2 \pm 0,9 \%$ (Abb. 38). Die **CC₅₀** liegt **über 50 mg/ml** CMS-1.

Nach *24-stündiger Exposition* steigt die Kurve von der niedrigen zur hohen Konzentration steil an und endet bei 50 mg/ml CMS-1 mit $87,6 \pm 2,3 \%$. Der ermittelte **CC₅₀**-Wert beträgt **28,2 (23,4-34,1) mg/ml** CMS-1.

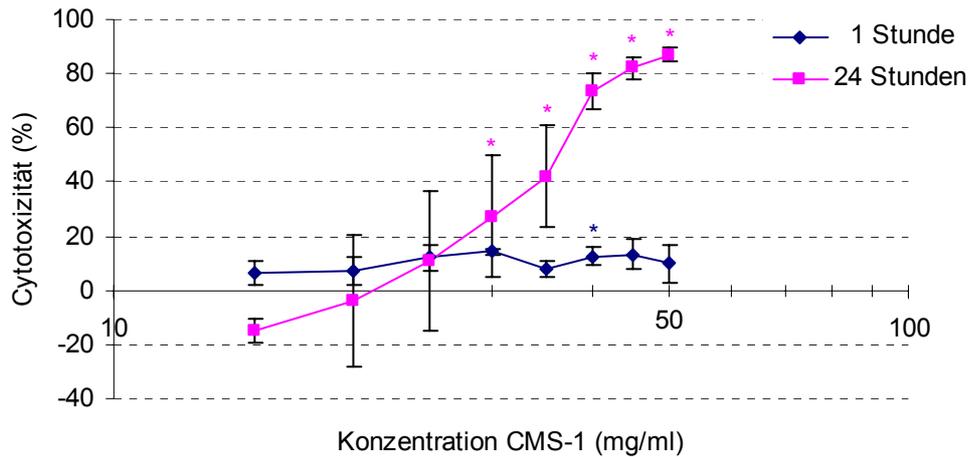
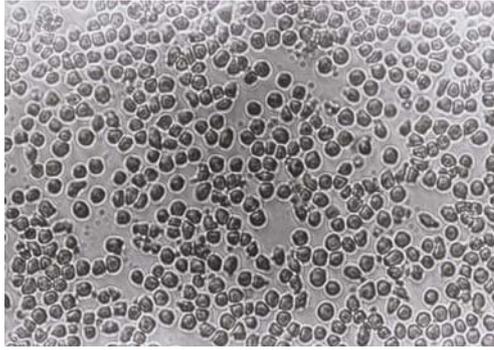


Abb. 38: Cytotoxizität von carboxymethylierter sulfatierter Hyaluronsäure (CMS-1) an U937-Zellen im XTT-Tetrazoliumreduktionstest nach 1- und 24-stündiger Exposition ($\bar{x} \pm SE$; $n = 3$)
 ** signifikant gegenüber Leerwert, $p \leq 0,05$

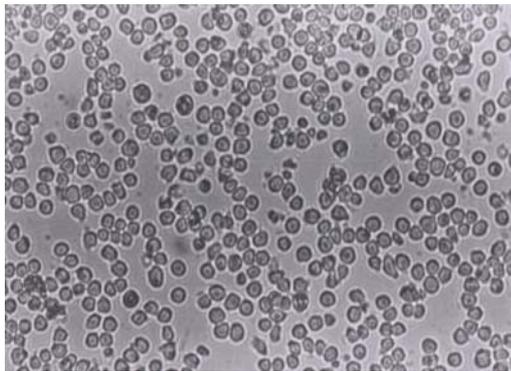
Optische Beurteilung der Zellen

Die Zellen haben nach einer Stunde Inkubationszeit mit 35 bzw. 50 mg/ml CMS-1 die gleiche Form und Größe wie die der Zellkontrolle (Abb. 39).

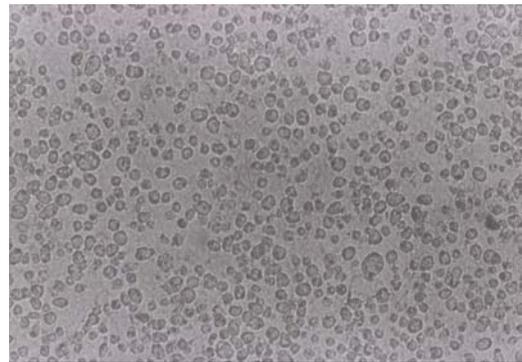
Nach 24 Stunden erscheinen die Zellen abgeflacht mit rauer Oberfläche (35 mg/ml). In Gegenwart von 50 mg/ml CMS-1 sind nur noch kleine Zellfragmente ohne erkennbare intakte Zelloberfläche vorhanden. Das stimmt gut mit der ermittelten Cytotoxizität im XTT-Tetrazoliumreduktionstest überein. Sie beträgt 87,1 %.



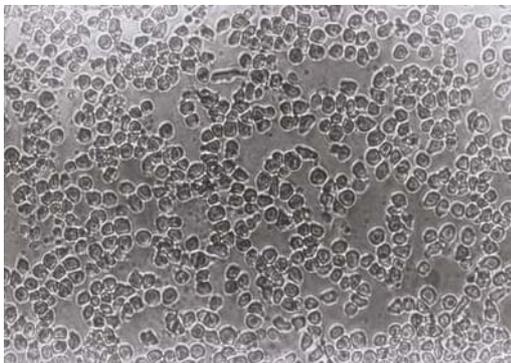
Zellkontrolle



c = 35 mg/ml CMS-1 (7,7 % Toxizität)
1 Stunde Exposition



c = 35 mg/ml CMS-1 (42,1 % Toxizität)
24 Stunden Exposition



c = 50 mg/ml CMS-1 (9,9 % Toxizität)
1 Stunde Exposition



c = 50 mg/ml CMS-1 (87,1 % Toxizität)
24 Stunden Exposition

Abb. 39: U937-Zellen nach 1- und 24-stündiger Exposition mit carboxymethylierter sulfatierter Hyaluronsäure (CMS-1) (280-fache Vergrößerung)

4.2.4 Zellproliferation

Für die Substanz CMS-1 wird der gleiche Konzentrationsbereich (0,1 mg/ml bis 12,8 mg/ml) wie für die S-Hya-15 gewählt. Abbildung 40 zeigt, dass die Anzahl der Zellen in der Zellkontrolle im Verlauf von 96 Stunden zunimmt. Analog verhält sich auch die optische Dichte (Abb. 41).

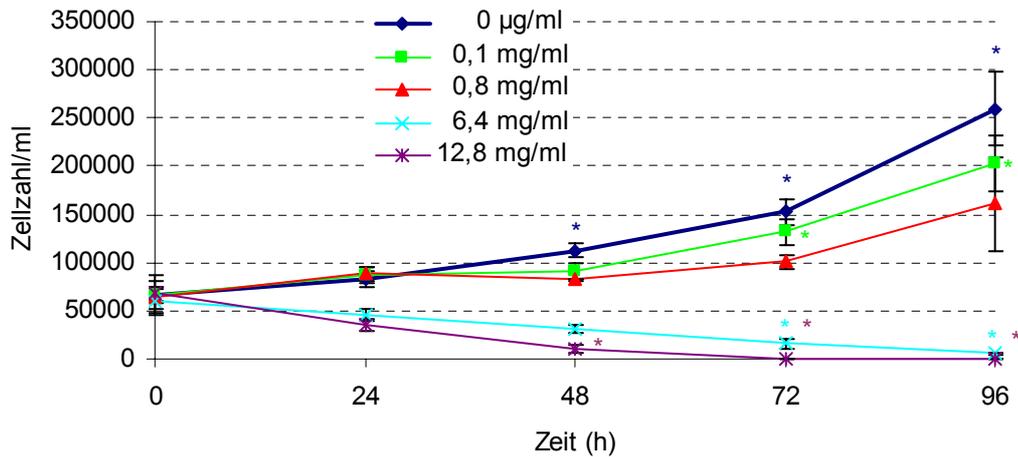


Abb. 40: Proliferation von U937-Zellen unter dem Einfluss von carboxymethylierter sulfatierter Hyaluronsäure (CMS-1) – Zellzahlbestimmung – ($\bar{x} \pm SE$; $n = 3$)
 **** signifikant gegenüber Leerwert, $p \leq 0,05$

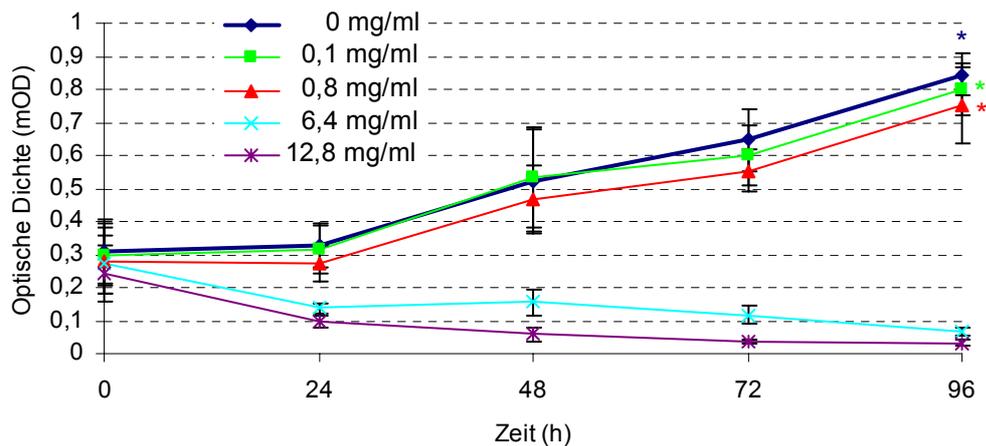


Abb. 41: Proliferation von U937-Zellen unter dem Einfluss von carboxymethylierter sulfatierter Hyaluronsäure (CMS-1) – XTT-Tetrazoliumreduktionstest – ($\bar{x} \pm SE$; $n = 3$)
 **** signifikant gegenüber Leerwert, $p \leq 0,05$

In den Konzentrationen 0,1 bis 0,4 mg/ml verhält sich CMS-1 den U937-Zellen gegenüber relativ indifferent (Abb. 42). Bei 0,8 mg/ml wird die Zellzahl nach 24 Stunden zunächst erhöht, um dann auf Werte zwischen 60 % und 40 % nach 96 Stunden zu sinken.

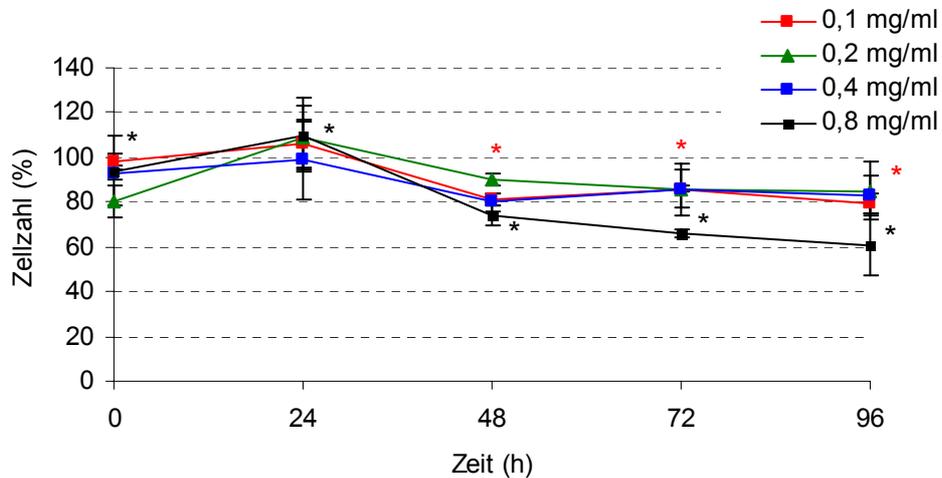


Abb. 42: Einfluss von carboxymethylierter sulfatierter Hyaluronsäure (CMS-1) auf die Proliferation von U937-Zellen; Zellzahl in Prozent der Kontrolle im Konzentrationsbereich 0,1 - 0,8 mg/ml ($\bar{x} \pm SE$, $n = 3$)
 ** signifikant gegenüber Leerwert, $p \leq 0,05$

Die nachfolgenden höheren Konzentrationen 3,2 mg/ml bis 12,8 mg/ml besitzen sofort eine antiproliferierende Wirkung, denn die Zellzahl sinkt schon nach 24 Stunden unterhalb des entsprechenden Ausgangswertes, nach 96 Stunden liegt sie unter 20 % (Abb.43).

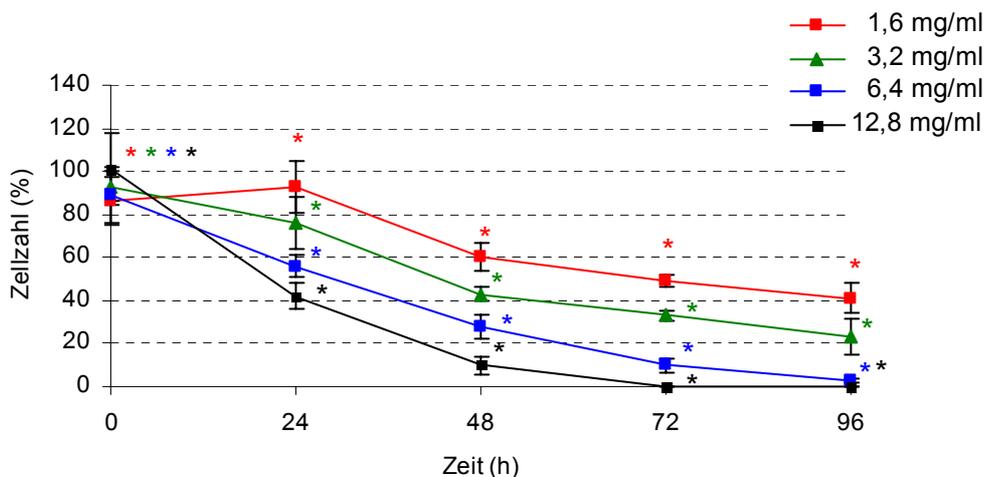


Abb. 43: Einfluss von carboxymethylierter sulfatierter Hyaluronsäure (CMS-1) auf die Proliferation von U937-Zellen; Zellzahl in Prozent der Kontrolle im Konzentrationsbereich 1,6 - 12,8 mg/ml ($\bar{x} \pm SE$; $n = 3$)
 **** signifikant gegenüber Leerwert, $p \leq 0,05$

Im Gegensatz zur Zellzahl bleibt die Stoffwechselaktivität bis zur Konzentration 1,6 mg/ml im Vergleich zum Ausgangswert unverändert (Abb. 44). In den höheren Konzentrationen wird sie schon nach 24-stündiger Inkubation mit CMS-1 verringert und beträgt nach 96 Stunden nur noch 4 % bei 12,8 mg/ml (Abb. 45, Abb. 46).

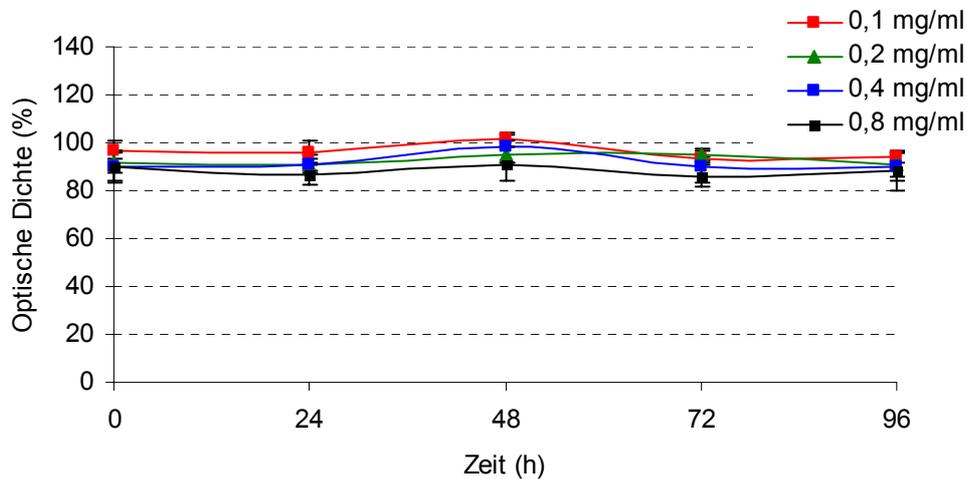


Abb. 44: Einfluss von carboxymethylierter sulfatierter Hyaluronsäure (CMS-1) auf die Proliferation von U937-Zellen; Optische Dichte in Prozent der Kontrolle im Konzentrationsbereich 0,1 - 0,8 mg/ml ($\bar{x} \pm SE$, $n = 3$)

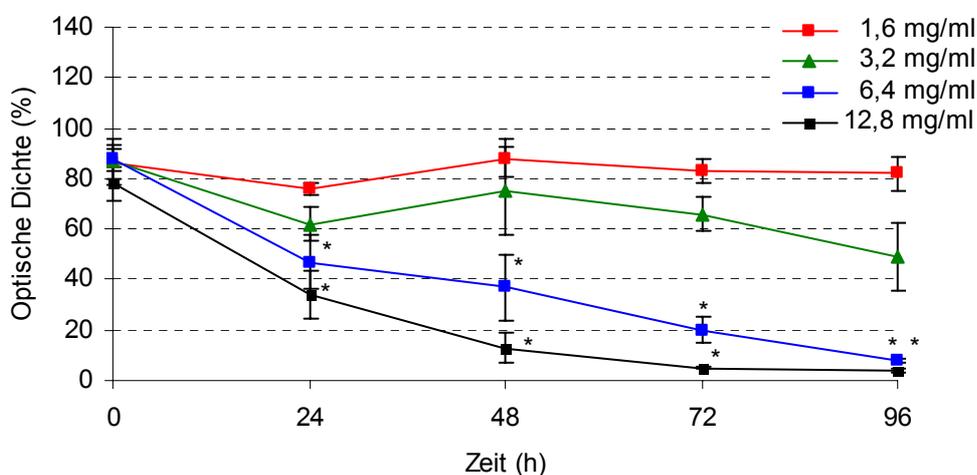


Abb. 45: Einfluss von carboxymethylierter sulfatierter Hyaluronsäure (CMS-1) auf die Proliferation von U937-Zellen; Optische Dichte in Prozent der Kontrolle im Konzentrationsbereich 1,6 - 12,8 mg/ml ($\bar{x} \pm SE$; $n = 3$)
 ** signifikant gegenüber Leerwert, $p \leq 0,05$

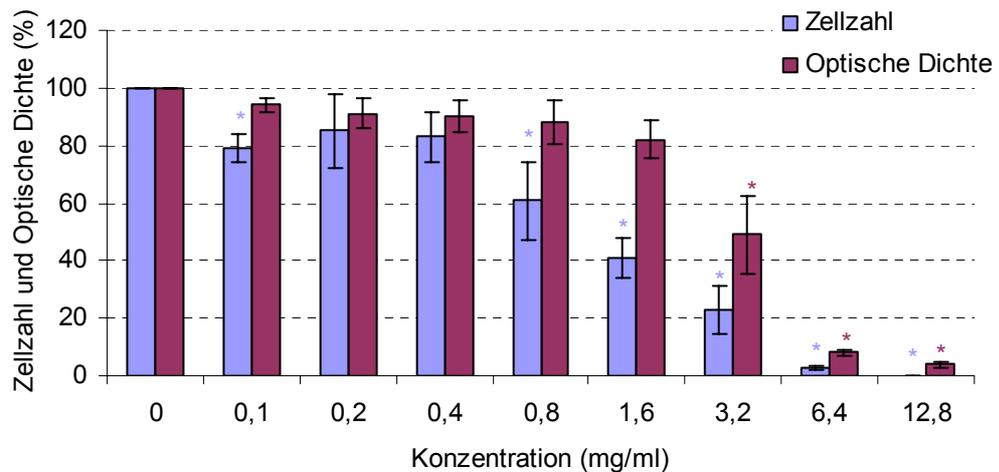


Abb. 46: Beeinflussung der Zellproliferation von U937-Zellen durch carboxymethylierte sulfatierte Hyaluronsäure (CMS-1) nach 96-stündiger Exposition ($\bar{x} \pm SE$, $n = 3$)
 ** signifikant gegenüber Leerwert, $p \leq 0,05$

4.2.5 [³H]Arachidonsäure-Freisetzungstest

Der untersuchte Konzentrationsbereich erstreckt sich von 0,2 bis 30,0 mg/ml CMS-1. In diesem Bereich zeigt der Säulenverlauf nach 1 h 4 °C einen ganz leichten Anstieg von $0,3 \pm 0,4$ % (0,2 mg/ml) auf $1,8 \pm 0,5$ % (30,0 mg/ml) Arachidonsäure-Freisetzung im Vergleich zu SDS (100 %). Etwas anders verhält es sich nach 1-stündiger Exposition bei 37 °C. Bei Temperaturerhöhung werden höhere Toxizitätswerte erreicht. Die am stärksten toxische Konzentration liegt bei 15 mg/ml und hat im Vergleich zu SDS eine Membrantoxizität von $5,2 \pm 1,2$ % (Abb. 47). Eine Zeitausdehnung auf 24 Stunden hat keinen Einfluss auf die Membrantoxizität, der höchste Wert ist $2,2 \pm 1,4$ % (bei 30 mg/ml CMS-1).

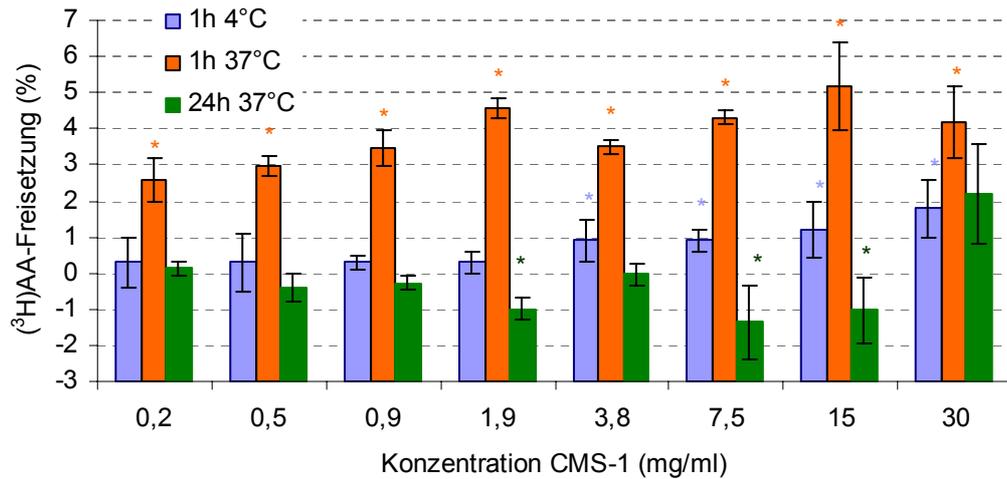


Abb. 47: Membrantoxizität von carboxymethylierter sulfatierter Hyaluronsäure (CMS-1) an U937-Zellen nach 1- und 24-stündiger Exposition bei 37 °C sowie 1 Stunde bei 4 °C ($\bar{x} \pm SE$, $n = 3$)
 *** signifikant gegenüber Leerwert, $p \leq 0,05$

Die Konzentration, bei der 5 % [³H]Arachidonsäure aus den U937-Zellen freigesetzt werden, beträgt nach 1 Stunde bei 4 °C **über 30,0 mg/ml**, bei 37 °C **8,9** (7,7 – 10,3 mg/ml) und nach 24 Stunden bei 37 °C **über 30,0 mg/ml**.

4.3 Carboxymethylierte niedersulfatierte Hyaluronsäuren – CMS-2

4.3.1 Global- und Gruppentests zur Gerinnungsanalytik

4.3.1.1 Thrombelastographie

Vom Beginn der Reaktion bis zum Eintritt der Gerinnung vergehen beim Leerwert $8,3 \pm 1,2$ min. Bei der niedrigsten Konzentration von $8,9 \mu\text{g/ml}$ liegt diese Reaktionszeit unterhalb des Leerwerts, nämlich bei $5,0 \pm 0$ min. Mit zunehmender Konzentration steigt die Reaktionszeit an und beträgt bei $71,4 \mu\text{g/ml}$ $23,0 \pm 1,5$ min.

Der Verlauf der Gerinnselbildungszeit k verhält sich analog der Reaktionszeit r . Bis zur Konzentration $8,9 \mu\text{g/ml}$ ($2,0 \pm 0,6$ min) befindet sie sich unterhalb vom Leerwert ($4,3 \pm 0,9$ min), steigt dann bis $71,4 \mu\text{g/ml}$ auf $7,0 \pm 0,6$ min an. Die maximale Amplitude beträgt beim Leerwert $50,0 \pm 3,1$ mm, nimmt mit zunehmender Konzentration ab und zeigt bei $71,4 \mu\text{g/ml}$ einen Wert von $43,3 \pm 0,7$ mm (Abb. 48).

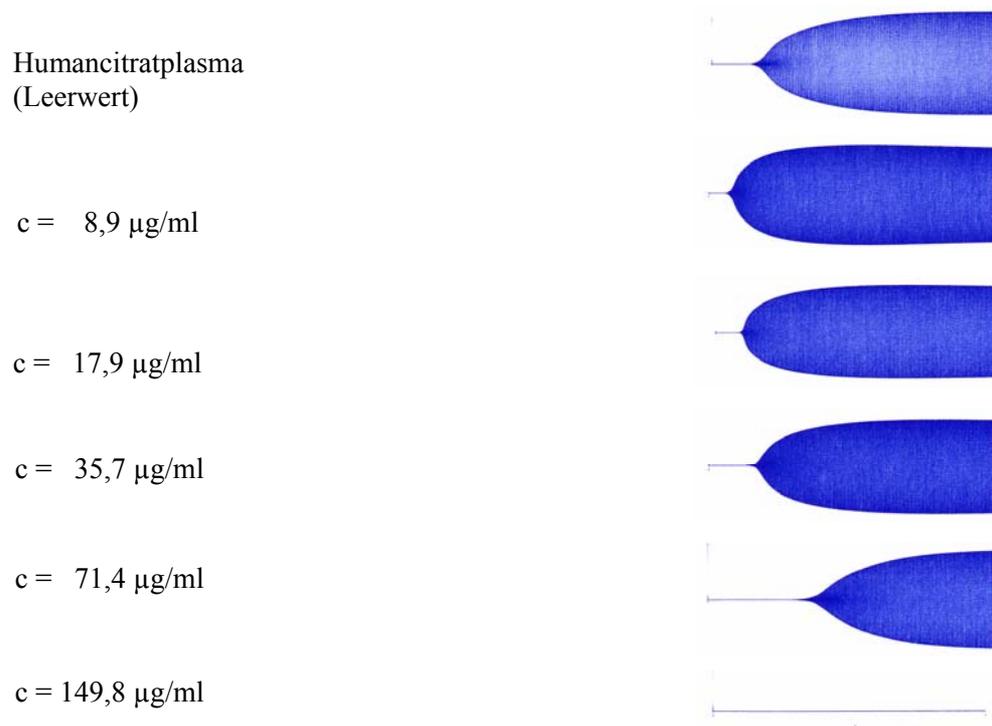


Abb. 48: Einfluss von carboxymethylierter sulfatierter Hyaluronsäure (CMS-2) auf das Thrombelastogramm in Humancitratplasma nach Rekalzifizierung

4.3.1.2 Thrombinzeit

a) mit Plasma

Abbildung 49 stellt die Thrombinzeit (TZ) in Abhängigkeit von der Konzentration CMS-2 dar. Die Kurve zeigt zunächst einen leichten Anstieg bis zur Konzentration von 1,6 $\mu\text{g/ml}$ und steigt dann sprunghaft an. Bei 12,5 $\mu\text{g/ml}$ wird die Thrombinzeit um das mehr als 32,3-fache vom Leerwert verlängert. Die Konzentration, bei der es zur Verdopplung der Gerinnungszeit kommt, beträgt **$2,5 \pm 0,2 \mu\text{g/ml}$** .

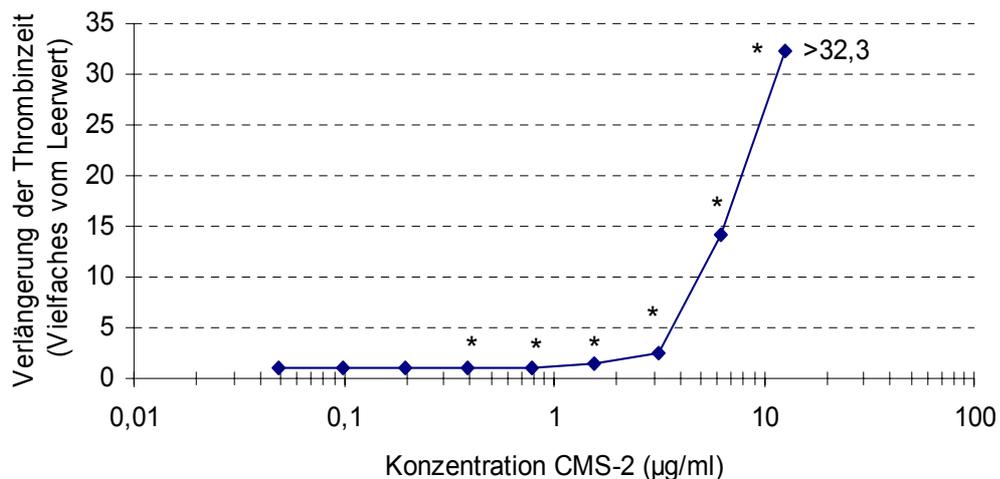


Abb. 49: Verlängerung der Thrombinzeiten in Humancitratplasma durch carboxymethylierte sulfatierte Hyaluronsäure (CMS-2) ($\bar{x} \pm SE$; $n = 3$)
* signifikant gegenüber Leerwert, $p \leq 0,05$

b) mit Fibrinogen

Zwischen 0,05 und 1600 $\mu\text{g/ml}$ verändert sich die Thrombinzeit kaum, sie wird vom 1,03-fachen auf das 2,17-fache vom Leerwert verlängert. Bei einer Konzentration von 3200 $\mu\text{g/ml}$ CMS-2 kommt es zu einem sprunghaften Anstieg, die Verlängerung beträgt 12,6-fach (Abb. 50). Eine Verdopplung der Thrombinzeit wird bei einer Konzentrationen von **$1,44 \pm 0,20 \mu\text{g/ml}$** CMS-2 erreicht.

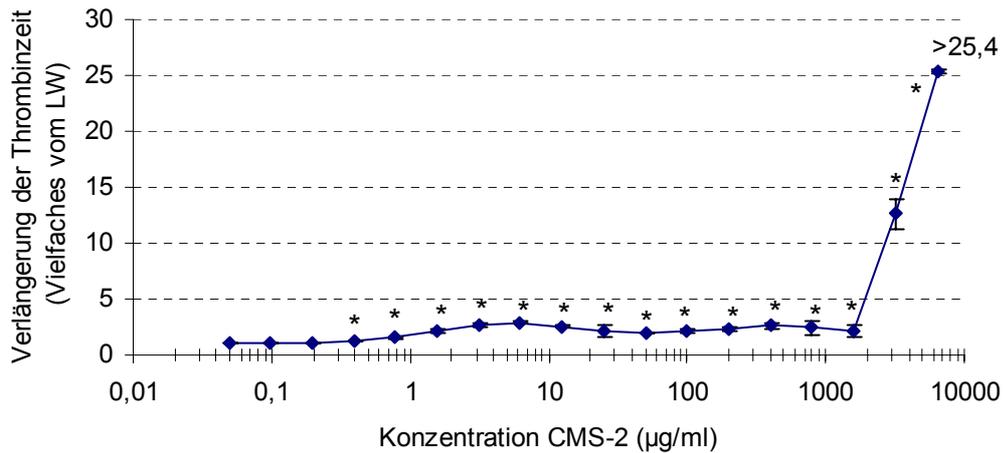


Abb. 50: Einfluss von carboxymethylierter sulfatierter Hyaluronsäure (CMS-2) auf die Thrombin-Fibrinogen-Interaktion ($\bar{x} \pm SE$; $n = 3$)
 * signifikant gegenüber Leerwert, $p \leq 0,05$

4.3.1.3 Prothrombinzeit

Die Prothrombinzeit wird bei CMS-2 erst ab einer Konzentration von 45,5 µg/ml deutlich verlängert (um das 2,3-fache vom LW). Der Kurvenverlauf zeigt dann einen steileren Anstieg und endet bei 181,8 µg/ml mit einer Verlängerung der Thrombinzeit um das über 21-fache (Abb. 51). Eine Verdopplung der Prothrombinzeit gegenüber dem Leerwert ($28,8 \pm 1,3$ sec) wird durch **33,8 ± 2,0 µg/ml** CMS-2 erreicht .

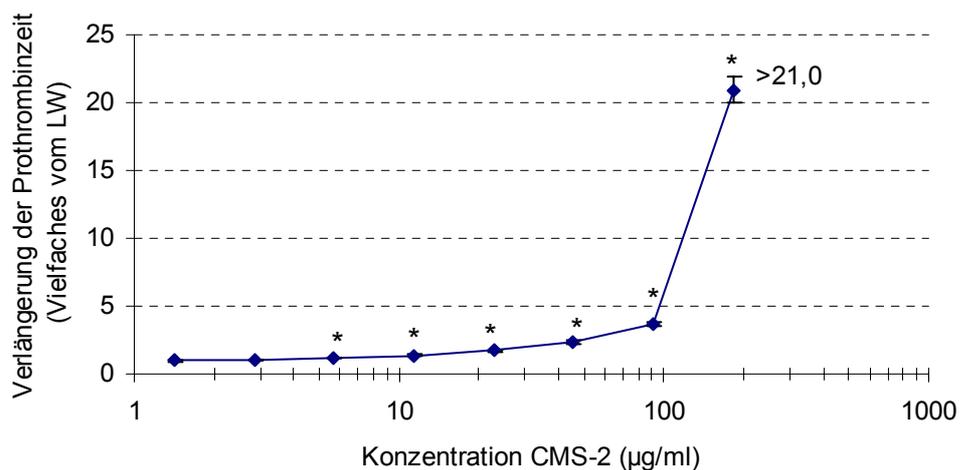


Abb. 51: Einfluss von carboxymethylierter sulfatierter Hyaluronsäure (CMS-2) auf die Prothrombinzeit in Humancitratplasma ($\bar{x} \pm SE$; $n = 3$)
 * signifikant gegenüber Leerwert, $p \leq 0,05$

4.3.1.4 Aktivierte partielle Thromboplastinzeit

Auch die aPTT steigt mit zunehmender CMS-2-Konzentration an (Abb. 52). Hier zeigt sich ab der niedrigsten Konzentration von 0,36 µg/ml CMS-2 ein gleichmäßiger Anstieg der Kurve. Die Gerinnungszeit wird bei der höchsten Konzentration (90,9 µg/ml) um das 20,9-fache vom Leerwert verlängert. Eine Verdopplung der aPTT gegenüber dem Leerwert ($29,0 \pm 1,9$ sec) wird durch $7,6 \pm 2,3$ µg/ml bewirkt.

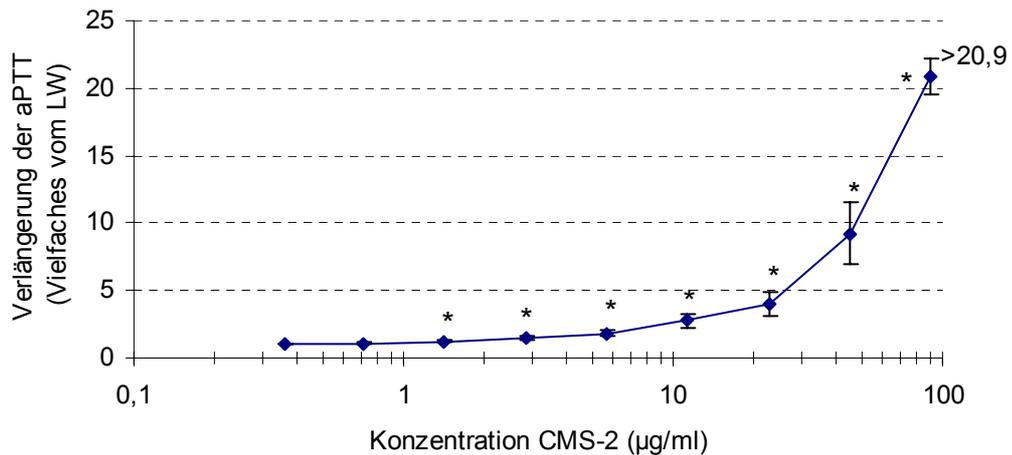


Abb. 52: Einfluss von carboxymethylierter sulfatierter Hyaluronsäure (CMS-2) auf die aktivierte partielle Thromboplastinzeit (aPTT) in Humancitratplasma ($\bar{x} \pm SE$; $n = 3$)
* signifikant gegenüber Leerwert, $p \leq 0,05$

4.3.2 Neutralisation der antikoagulierenden Wirkung

Bei diesem Versuch wird die gleiche Konzentrationsreihe Protaminsulfat (PS) verwendet wie zur Untersuchung von CMS-1 (0,02 – 4,0 µg/ml PS). CMS-2 wird in der Konzentration 6,3 µg/ml zu den zunehmenden Konzentrationen Protaminsulfat gegeben. Das Ergebnis ist in Abbildung 53 dargestellt. Die braune Säule zeigt den Leerwert ($18,9 \pm 0,3$ sec), der durch Zugabe von Pufferlösung bestimmt wird. Durch Zusatz von 6,3 µg/ml CMS-2 wird die Thrombinzeit auf über 600 sec verlängert (grüne Säule). Bei der geringsten Konzentration Protaminsulfat (0,02 µg/ml) liegt die Thrombinzeit (TZ) bei $175,4 \pm 5,3$ sec. Je höher PS konzentriert ist, desto niedriger wird die TZ, bis sie schließlich den Leerwert erreicht. An dieser Stelle kommt es zu einer Aufhebung der antikoagulierenden Wirkung von CMS-2. 6,3 µg/ml CMS-2 werden von $3,4 \pm 0,5$ µg/ml Protaminsulfat antagonisiert. Dies entspricht einem Verhältnis von **1,85 : 1**.

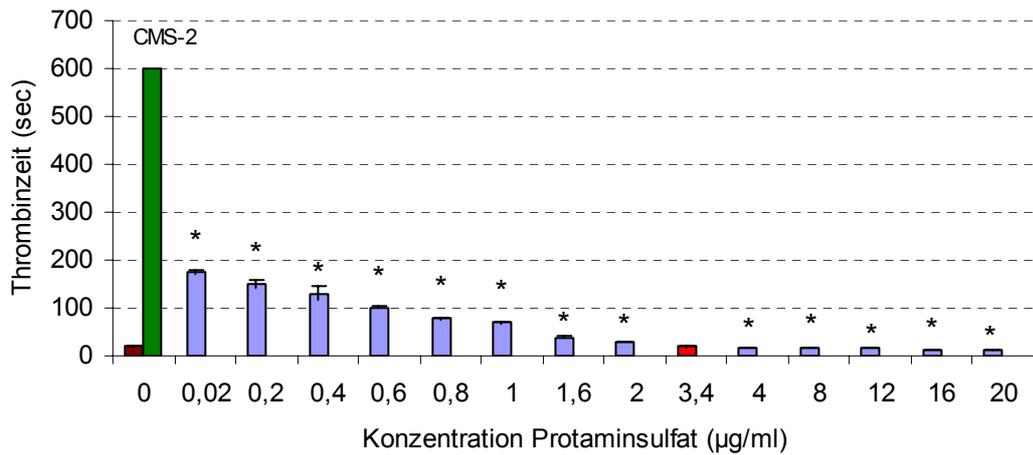


Abb. 53: Neutralisation der Wirkung von carboxymethylierter sulfatierter Hyaluronsäure (CMS-2; 6,3 µg/ml) durch Protaminsulfat in Humancitratplasma ($\bar{x} \pm SE$; $n = 3$)
* signifikant gegenüber Leerwert, $p \leq 0,05$

4.3.3 Cytotoxizität

Die Cytotoxizität von CMS-2 wird wie die der CMS-1 im Konzentrationsbereich 10 bis 50 mg/ml überprüft. Die CC_{50} kann in diesem Bereich nach 1 Stunde nicht errechnet werden, da der höchste Wert $32,8 \pm 3,6$ % Cytotoxizität bei 50 mg/ml CMS-2 beträgt. Sie liegt demzufolge **über 50 mg/ml**.

Nach einer Exposition von 24 Stunden liegen die Cytotoxizitätswerte deutlich höher. Die rote Kurve in Abbildung 54 zeigt einen Anstieg von $47,6 \pm 2,3$ % bei einer Konzentration von 10 mg/ml auf $94,3 \pm 0,4$ % bei 50 mg/ml CMS-2. Die CC_{50} beträgt **10,3 (9,7 – 11,0) mg/ml CMS-2**.

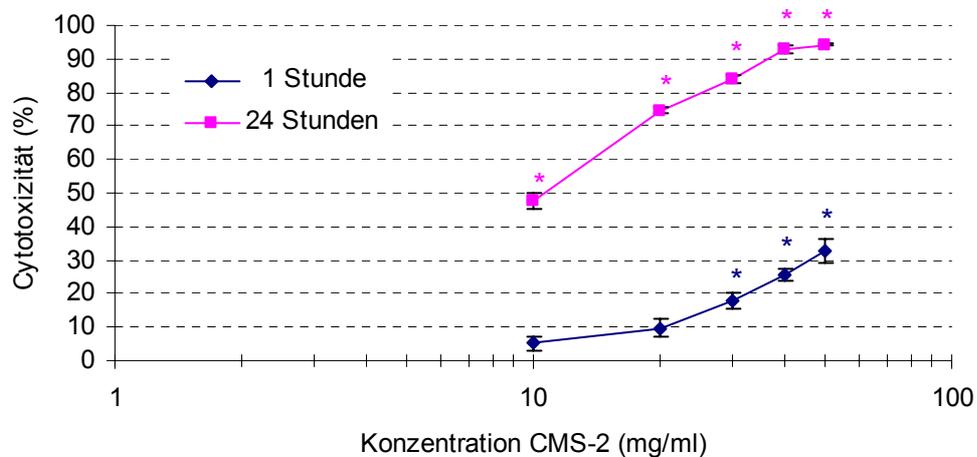
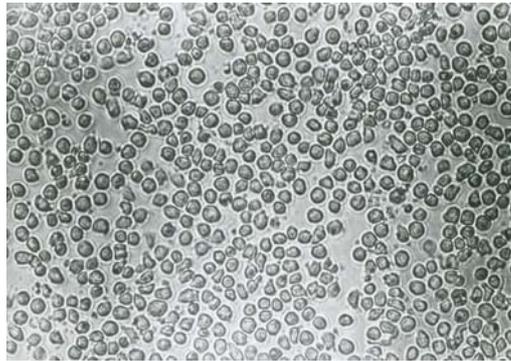


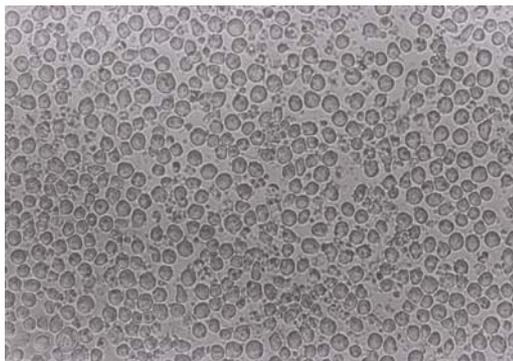
Abb. 54: Cytotoxizität von carboxymethylierter sulfatierter Hyaluronsäure (CMS-2) an U937-Zellen im XTT-Tetrazoliumreduktionstest nach 1- und 24-stündiger Exposition ($\bar{x} \pm SE$; $n = 3$)
**signifikant gegenüber Leerwert, $p \leq 0,05$

Optische Beurteilung der Zellen

Aus den in Abbildung 55 dargestellten Fotos ist ersichtlich, dass sich die U937-Zellen unter Einfluss von CMS-2 nach 24-stündiger Exposition in ihrer Form und Gestalt verändern. Beide abgebildeten Konzentrationen bewirken eine starke Schrumpfung der Zellen. Bei der höchsten untersuchten Substanzkonzentration (50 mg/ml) sind die Zellen vollständig aufgelöst.



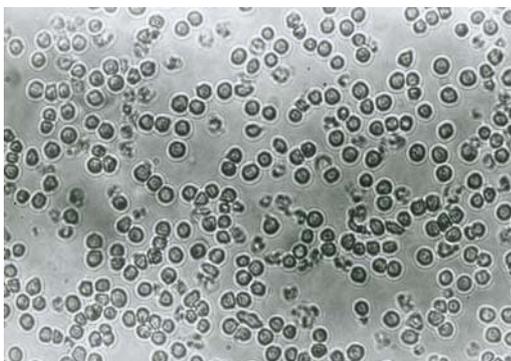
Zellkontrolle



c = 30 mg/ml CMS-2 (18,0 % Toxizität)
1 Stunde Exposition



c = 30 mg/ml CMS-2 (83,9 % Toxizität)
24 Stunden Exposition



c = 50 mg/ml CMS-2 (32,8 % Toxizität)
1 Stunde Exposition



c = 50 mg/ml CMS-2 (94,3 % Toxizität)
24 Stunden Exposition

Abb. 55: U937-Zellen nach 1- und 24-stündiger Exposition mit carboxymethylierter sulfatierter Hyaluronsäure (CMS-2) (280-fache Vergrößerung)

4.3.4 Zellproliferation

Für diesen Versuch wird der gleiche Konzentrationsbereich wie bei den beiden vorangegangenen Substanzen untersucht.

Die Leerwerte der Zellzahl und der Absorption steigen innerhalb von 96 Stunden an (Abb. 56 und 57).

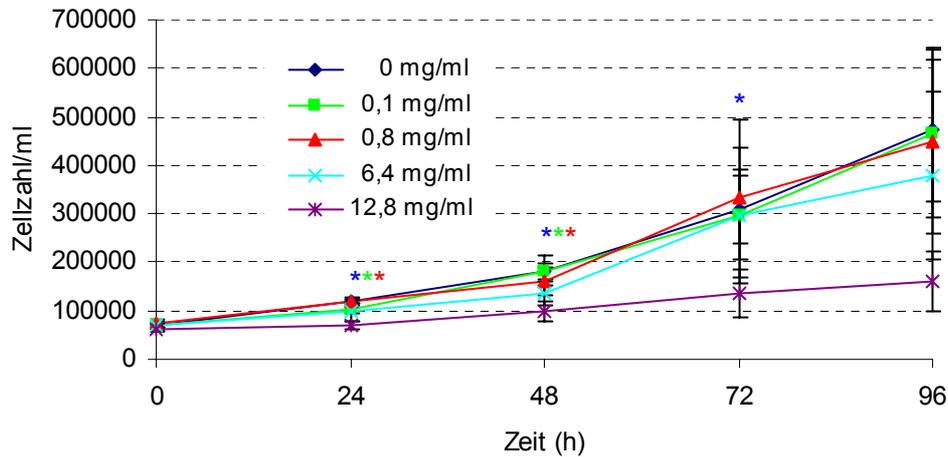


Abb. 56: Proliferation von U937-Zellen unter dem Einfluss von carboxymethylierter sulfatierter Hyaluronsäure (CMS-2) – Zellzahlbestimmung – ($\bar{x} \pm SE$; $n = 3$)

***signifikant gegenüber Leerwert, $p \leq 0,05$

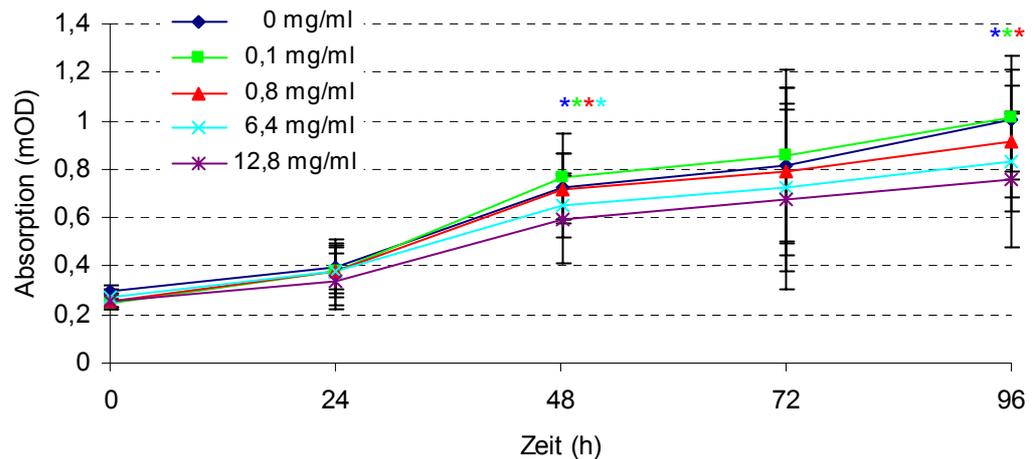


Abb. 57: Proliferation von U937-Zellen unter dem Einfluss von carboxymethylierter sulfatierter Hyaluronsäure (CMS-2) – XTT-Tetrazoliumreduktionstest – ($\bar{x} \pm SE$; $n = 3$)

****signifikant gegenüber Leerwert, $p \leq 0,05$

In den niedrigeren Konzentrationen bis 1,6 mg/ml CMS-2 hat die Testsubstanz nur einen geringen Einfluss auf das Wachstum der U937-Zellen. Die Zellzahl liegt nach 96 Stunden und 1,6 mg/ml bei $82 \pm 13,5 \%$ im Vergleich zur Zellkontrolle. Mit zunehmender Konzentration sinkt die Zellzahl leicht und macht dann zwischen 6,4 mg/ml und 12,8 mg/ml einen größeren Sprung. Nach 96 Stunden beträgt sie noch $71 \pm 15,7 \%$ bei 6,4 mg/ml und $37 \pm 11,5 \%$ bei 12,8 mg/ml im Vergleich zur Zellkontrolle (Abb. 58, 59 und 62).

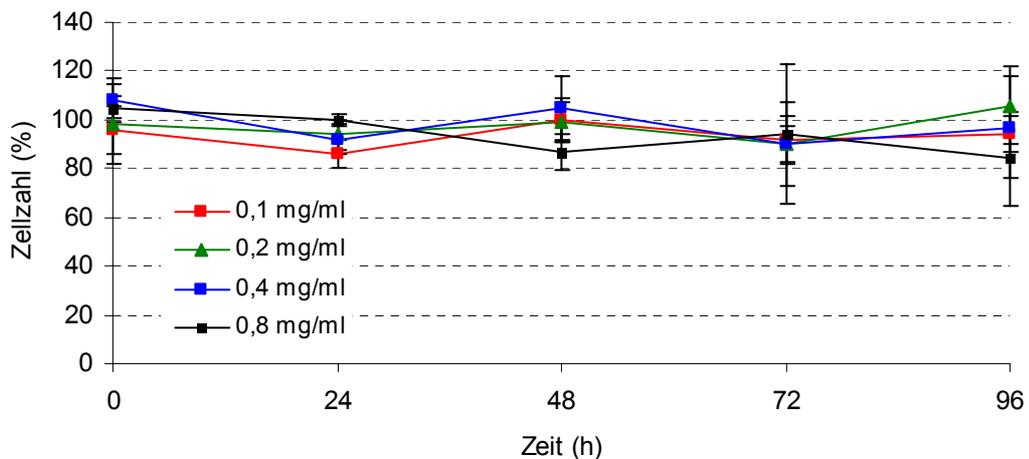


Abb. 58: Einfluss von carboxymethylierter sulfatierter Hyaluronsäure (CMS-2) auf die Proliferation von U937-Zellen; Zellzahl in Prozent der Kontrolle im Konzentrationsbereich 0,1 - 0,8 mg/ml ($\bar{x} \pm SE$; n = 3)

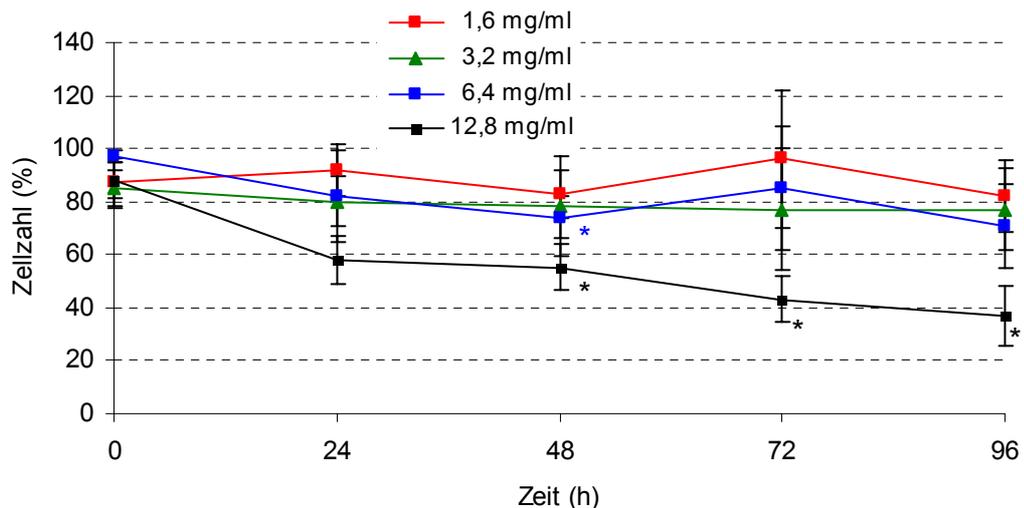


Abb. 59: Einfluss von carboxymethylierter sulfatierter Hyaluronsäure (CMS-2) auf die Proliferation von U937-Zellen; Zellzahl in Prozent der Kontrolle im Konzentrationsbereich 1,6 - 12,8 mg/ml ($\bar{x} \pm SE$; n = 3)

** signifikant gegenüber Leerwert, $p \leq 0,05$

Ein ähnliches Ergebnis stellt sich bei der Betrachtung der Absorption dar. Die Testsubstanz CMS-2 verhält sich bis zur Konzentration 1,6 mg/ml relativ indifferent gegenüber den U937-Zellen, regt deren Wachstum sogar ein wenig an (Abb. 60). Nach 72 Stunden steigt bei 0,2 mg/ml die Absorption im Vergleich zur Zellkontrolle auf $113 \pm 26,8 \%$ an. Selbst bei der höchsten Konzentration von 12,8 mg/ml sinkt die Absorption nach 96 Stunden auf nur $68,0 \pm 18,5 \%$ und verursacht somit keine toxische bzw. antiproliferierende Wirkung (Abb. 61 und 62).

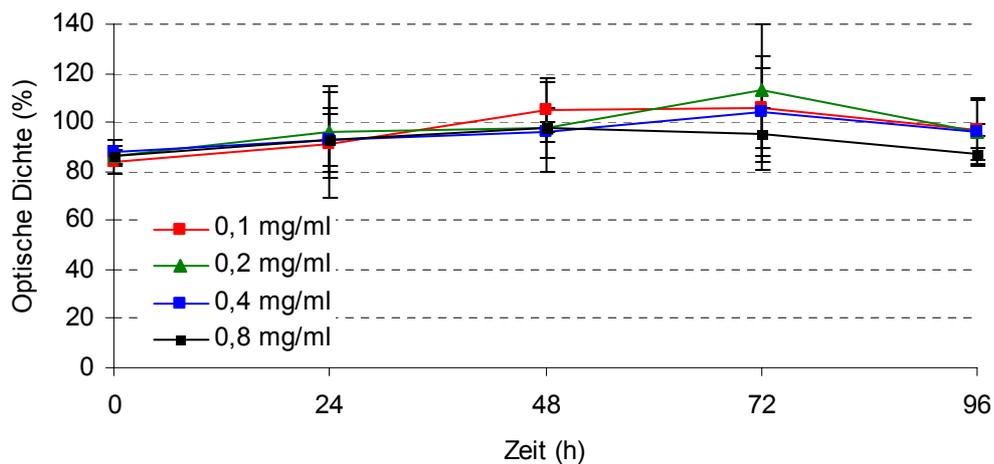


Abb. 60: Einfluss von carboxymethylierter sulfatierter Hyaluronsäure (CMS-2) auf die Proliferation von U937-Zellen; Optische Dichte in Prozent der Kontrolle im Konzentrationsbereich 0,1 - 0,8 mg/ml ($\bar{x} \pm SE$; $n = 3$)

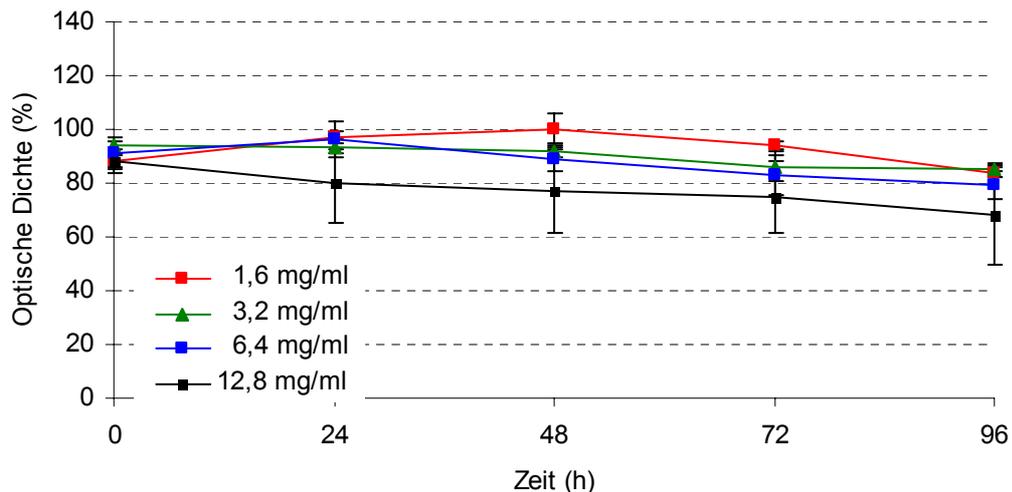


Abb. 61: Einfluss von carboxymethylierter sulfatierter Hyaluronsäure (CMS-2) auf die Proliferation von U937-Zellen; Optische Dichte in Prozent der Kontrolle im Konzentrationsbereich 1,6 - 12,8 mg/ml ($\bar{x} \pm SE$; $n = 3$)

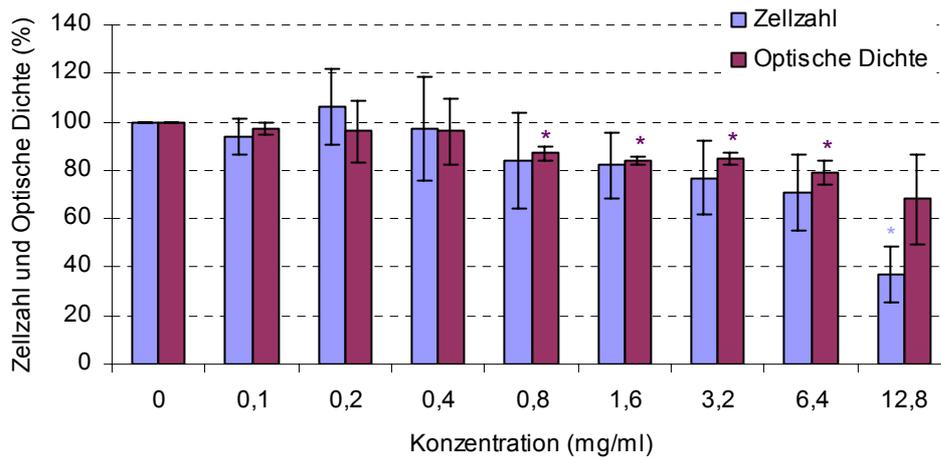


Abb. 62: Beeinflussung der Zellproliferation von U937-Zellen durch carboxymethylierte sulfatierte Hyaluronsäure (CMS-2) nach 96-stündiger Exposition ($\bar{x} \pm SE$, $n = 3$)

** signifikant gegenüber Leerwert, $p \leq 0,05$

4.3.5 [³H]Arachidonsäure-Freisetzungstest

Die [³H]AA-Freisetzung der U937-Zellen in Gegenwart von CMS-2 ist konzentrations- und temperaturabhängig (Abb. 63).

Es wird bei allen drei Expositionszeiten ein Konzentrationsbereich von 0,2 mg/ml bis 30 mg/ml untersucht. Die Konzentrationsabhängigkeit zeigt sich deutlich in den beiden Versuchsbedingungen 1h 37 °C und 24h 37 °C. Im Membrantoxizitäts-Konzentrations-Diagramm wird erkennbar, dass die Säulen jeweils ein Maximum zeigen. Dies liegt nach 1-stündiger Einwirkungszeit bei 3,8 mg/ml mit einer Membrantoxizität von $7,4 \pm 3,1$ % und nach 24-stündiger Exposition bei 0,9 mg/ml mit einer Membrantoxizität von $3,7 \pm 1,4$ % im Vergleich zu SDS. Danach nehmen die Werte für die prozentuale [³H]AA-Freisetzung mit steigender Konzentration wieder ab.

Die Temperaturabhängigkeit zeigt sich an den wesentlich höheren Freisetzungsraten nach Temperaturerhöhung von 4 °C auf 37 °C.

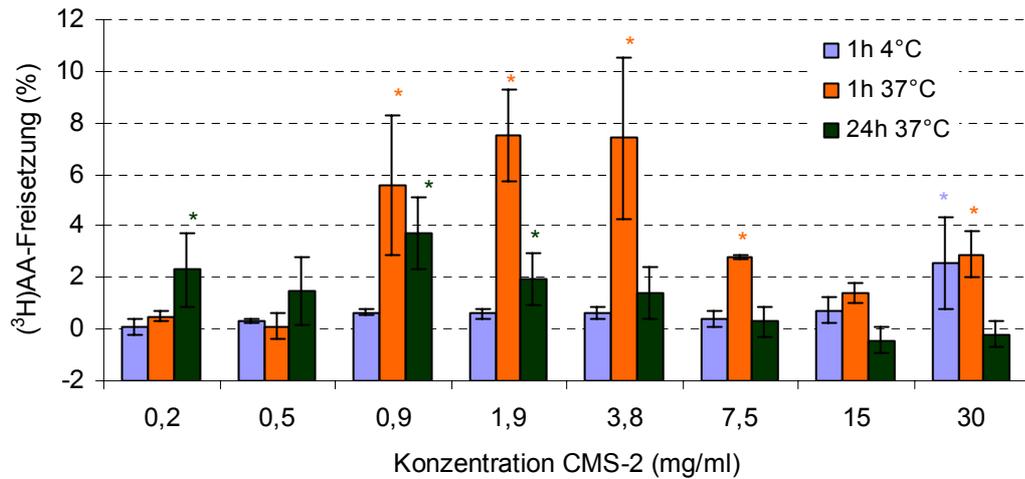


Abb. 63: Membrantoxizität von carboxymethylierter sulfatierter Hyaluronsäure (CMS-2) an U937-Zellen nach 1- und 24-stündiger Exposition bei 37 °C sowie 1 Stunde bei 4 °C ($\bar{x} \pm SE$, $n = 3$)
 *** signifikant gegenüber Leerwert, $p \leq 0,05$

Die Konzentration, bei der **5 %** [³H]Arachidonsäure aus den U937-Zellen freigesetzt werden, beträgt nach 1 Stunde bei 4 °C **über 30,0** mg/ml, bei 37 °C **0,82** (0,66 – 1,24 mg/ml) und nach 24 Stunden bei 37 °C **über 30,0** mg/ml.

4.4 Torhuminsäure A1 (THS-A1)

4.4.1 Global- und Gruppentests zur Gerinnungsanalytik

4.4.1.1 Thrombelastographie

Zunächst wird mit dem Humancitratplasma ohne Substanzzusatz ein Thrombelastogramm (Leerwert) aufgezeichnet. Die Reaktionszeit r beträgt $8,0 \pm 1,0$ min. Nach Zusatz der geringsten Konzentration an THS-A1 ($143,0 \mu\text{g/ml}$) verlängert sich diese Zeit auf $10,7 \pm 1,7$ min. Mit zunehmender Substanzkonzentration gerinnt das Plasma zu einem immer späteren Zeitpunkt, bei $858,0 \mu\text{g/ml}$ THS-A1 bleibt die Gerinnung aus (Abb. 64).

Auch die Geschwindigkeit, mit der sich ein Thrombus von bestimmten Festigkeitseigenschaften bildet, verlangsamt sich mit zunehmender Konzentration. Diese sogenannte Gerinnselformungszeit k steigt von $3,7 \pm 0,3$ min (Leerwert) auf $8,0 \pm 1,0$ min ($572,0 \mu\text{g/ml}$). Die maximale Amplitude ma verändert sich im Konzentrationsbereich 0 bis $286,0 \mu\text{g/ml}$ nicht, sie beträgt $57,8 \pm 2,3$ mm. Ab $429,0 \mu\text{g/ml}$ ist ma nicht mehr messbar.

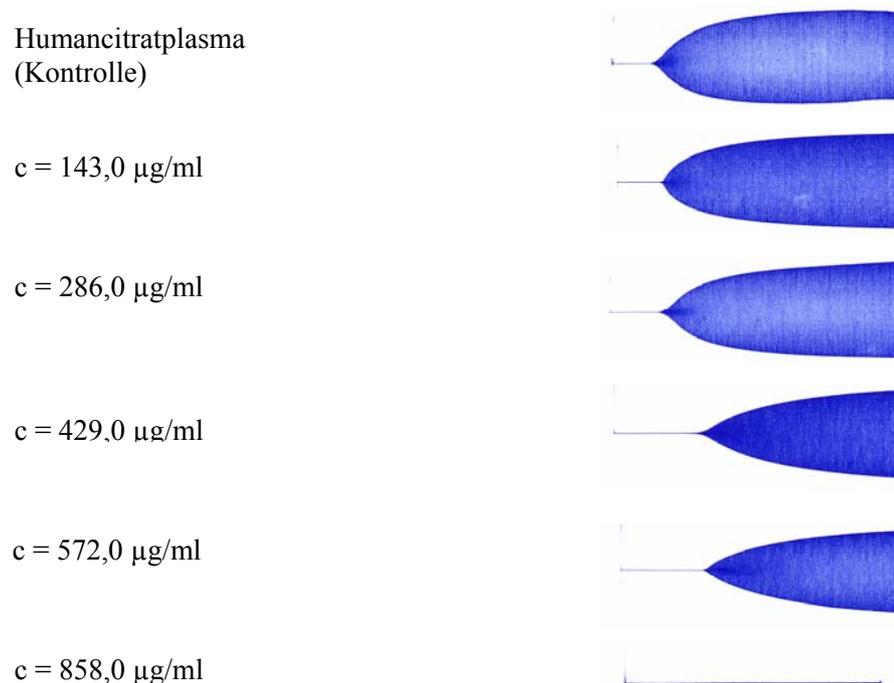


Abb. 64: Einfluss von Torhuminsäure A1 (THS-A1) auf das Thrombelastogramm in Humancitratplasma nach Rekalzifizierung

4.4.1.2 Thrombinzeit

a) mit Plasma

In Abbildung 65 ist die Verlängerung der Gerinnungszeit in Abhängigkeit von der Konzentration an Torfhuminsäure A1 (THS-A1) dargestellt. Mit zunehmender Konzentration steigt die Kurve zunächst allmählich an (bis 200 $\mu\text{g/ml}$) und zeigt dann einen steilen Anstieg. Bei 400 $\mu\text{g/ml}$ THS-A1 wird die Thrombinzeit um das 6,7-fache vom LW verlängert.

Eine Verdopplung der Thrombinzeit (Leerwert $20,1 \pm 0,4$ sec) wird durch $121,9 \pm 12,1$ $\mu\text{g/ml}$ THS-A1 bewirkt.

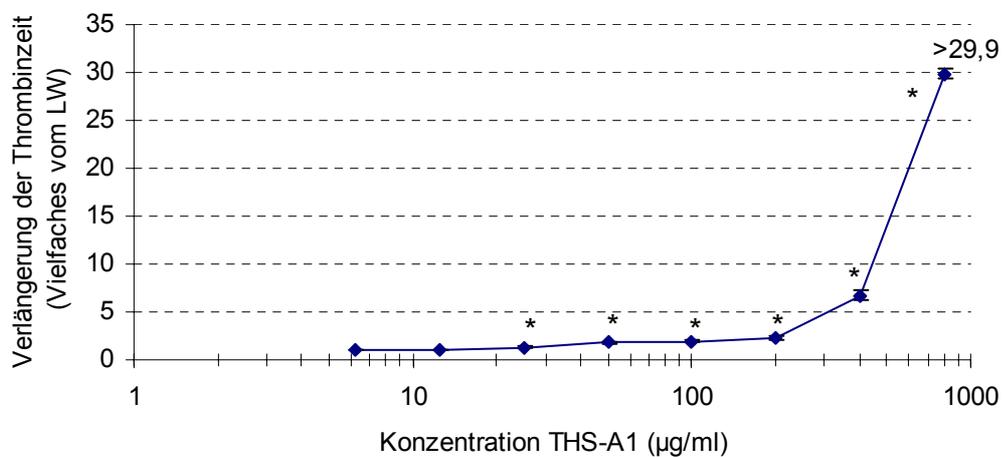


Abb. 65: Einfluss von Torfhuminsäure A1 (THS-A1) auf die Thrombin-Humancitratplasma-Reaktion ($\bar{x} \pm SE$; $n = 3$)
* signifikant gegenüber Leerwert, $p \leq 0,05$

b) mit Fibrinogen

Die Verlängerung der Thrombinzeit in Abhängigkeit von der Konzentration an THS-A1 ist in Abbildung 66 dargestellt. Mit zunehmender Konzentration wird die Umwandlung vom Fibrinogen zu Fibrin stärker gehemmt, bei 6400 $\mu\text{g/ml}$ THS-A1 wird die Thrombinzeit um das über 35,9-fache verlängert, das Fibrinogen gerinnt nicht mehr. Bei $382,9 \pm 40,4$ $\mu\text{g/ml}$ THS-A1 kommt es zur Verdopplung der Thrombinzeit.

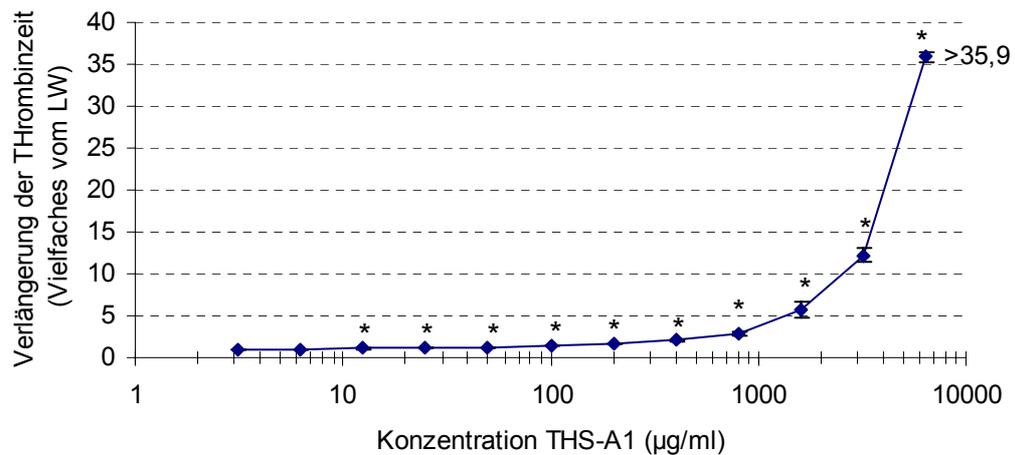


Abb. 66: Einfluss von Torfhuminsäure A1(THS-A1) auf die Thrombin-Fibrinogen-Reaktion ($\bar{x} \pm SE$; $n = 3$)

* signifikant gegenüber Leerwert, $p \leq 0,05$

4.4.1.3 Prothrombinzeit

Die Prothrombinzeit wird durch THS-A1 erst ab einer Konzentration von 2908,8 µg/ml verlängert (um das 3,0-fache vom LW). Der Kurvenverlauf zeigt dann einen sehr steilen Anstieg und endet bei 5817,6 µg/ml mit einer Verlängerung um das über 14,1-fache (Abb. 67). Eine Verdopplung der Prothrombinzeit gegenüber dem Leerwert ($42,9 \pm 2,8$ sec) wird durch **2536,7 ± 348,4 µg/ml** THS-A1 erreicht.

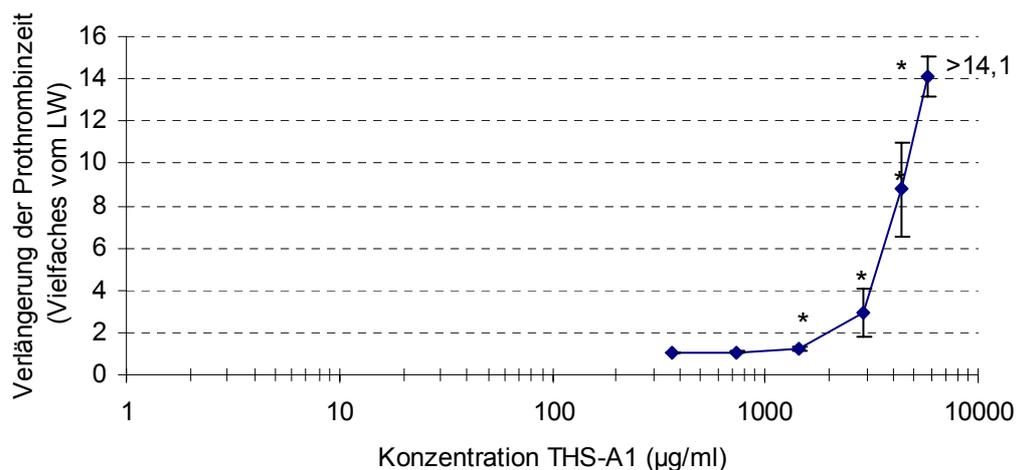


Abb. 67: Einfluss von Torfhuminsäure A1(THS-A1) auf die Prothrombinzeit in Humancitratplasma ($\bar{x} \pm SE$; $n = 3$)

* signifikant gegenüber Leerwert, $p \leq 0,05$

4.4.1.4 Aktivierte partielle Thromboplastinzeit

Abbildung 68 zeigt eine Kurve, die sich aus der Verlängerung der aPTT und der Konzentration an THS-A1 ergibt. Die Gerinnungszeit wird erst in sehr hohen Konzentrationen verlängert (ab 45,5 µg/ml um das 1,7-fache vom LW). Der Kurvenverlauf endet bei einer Konzentration von 727,2 µg/ml mit einer Verlängerung der aPTT um das 19,9-fache. Eine *Verdopplung der aPTT* wird durch **74,1 ± 18,1 µg/ml** THS-A1 bewirkt (Leerwert 30,5 ± 2,4 sec).

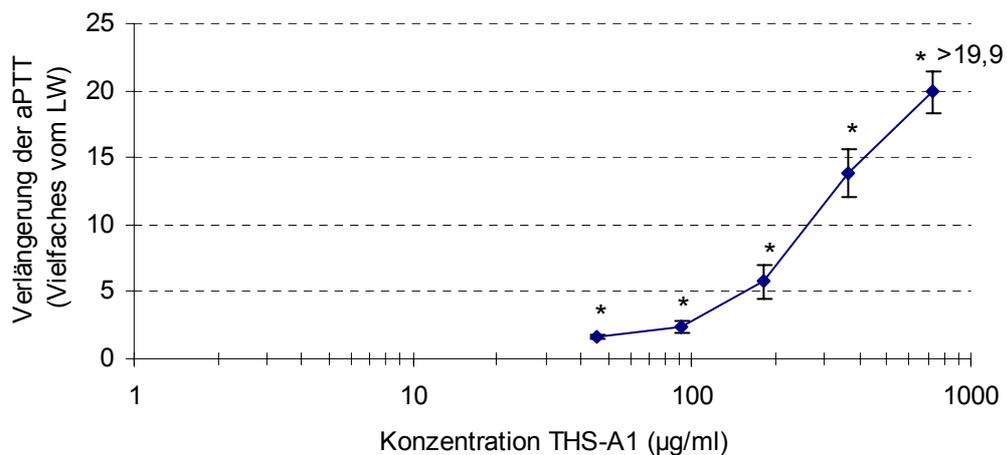


Abb. 68: Einfluss von Torfhuminsäure A1 (THS-A1) auf die aktivierte partielle Thromboplastinzeit (aPTT) in Humancitratplasma ($\bar{x} \pm SE$; $n = 3$)
* signifikant gegenüber Leerwert, $p \leq 0,05$

4.4.2 Neutralisation der antikoagulierenden Wirkung

Auch für die Substanz Torfhuminsäure A1 (THS-A1) wird Protaminsulfat (PS) in den Konzentrationen 0,02 bis 20,0 µg/ml verwendet. THS-A1 wird in der Konzentration 200 µg/ml zu den ansteigenden Konzentrationen von Protaminsulfat gegeben. In Abbildung 69 ist erkennbar, dass sich die Thrombinzeit mit zunehmender Konzentration an PS nicht verändert, der Leerwert (braune Säule; $14,9 \pm 0,4$ sec) wird nicht wieder erreicht. Das bedeutet, dass die antikoagulierende Wirkung von THS-A1 **nicht vollständig** von Protaminsulfat antagonisiert wird. Es findet nur eine partielle Reduktion der Wirkung statt (75,7 % nach Zusatz von 20 µg/ml PS).

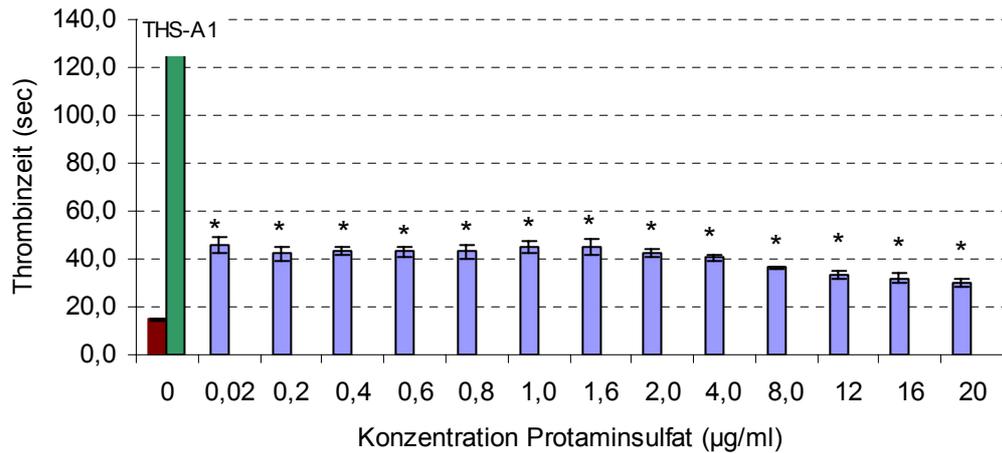


Abb. 69: Einfluss von Protaminsulfat auf die von Torfhuminsäure A1 (THS-A1; 200,0 µg/ml) ausgelöste Gerinnungsverzögerung ($\bar{x} \pm SE$; $n = 3$)
* signifikant gegenüber Leerwert, $p \leq 0,05$

4.4.3 [³H]Arachidonsäure-Freisetzungstest

Die [³H]AA-Freisetzung der U937-Zellen in Gegenwart von THS-A1 ist konzentrationsabhängig (Abb. 70).

Abbildung 70 zeigt den Verlauf der prozentualen Arachidonsäurefreisetzung in Abhängigkeit von der Konzentration an THS-A1 bei drei verschiedenen Einwirkungszeiten (1h 4 °C, 1h 37 °C, 24h 37 °C). Mit zunehmender Konzentration THS-A1 (0,05 bis 3,1 mg/ml) nimmt auch die [³H]AA-Freisetzung der U937-Zellen allmählich zu. Die größten Membrantoxizitätswerte werden nach einstündiger Exposition bei 4 °C und 37 °C bei einer Konzentration von $2,3 \pm 0,02$ mg/ml THS-A1 erreicht ($7,1 \pm 1,0$ % bei 1h 4 °C; $7,9 \pm 1,8$ % bei 1h 37 °C). Nach 24-stündiger Exposition ist die maximale Freisetzung ($6,3 \pm 1,8$ %) bei einer Konzentration von 3,1 mg/ml erreicht.

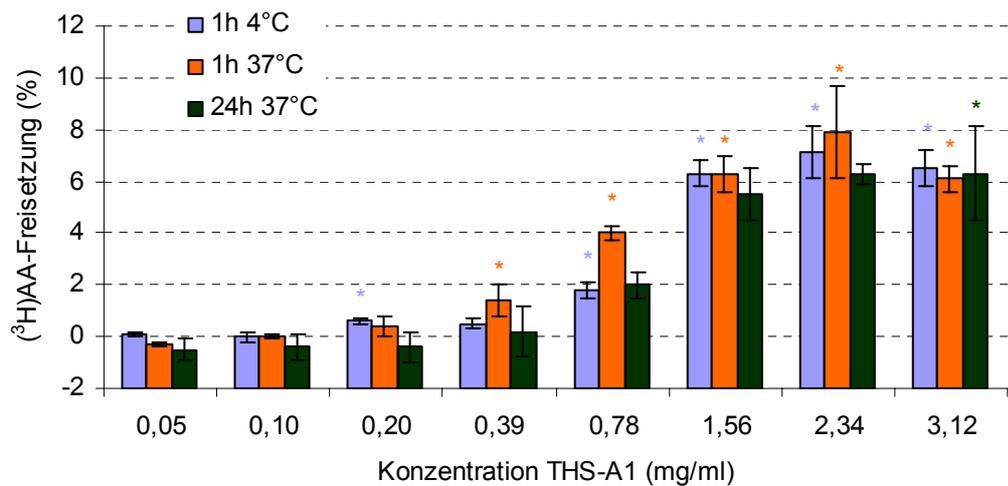


Abb. 70: Membrantoxizität von Torfhuminsäure A1 (THS-A1) an U937-Zellen nach 1- und 24-stündiger Exposition bei 37 °C sowie 1 Stunde bei 4 °C ($\bar{x} \pm SE$, $n = 3$)
 *** signifikant gegenüber Leerwert, $p \leq 0,05$

Die Konzentration, bei der **5 %** [³H]Arachidonsäure aus den U937-Zellen freigesetzt werden, beträgt nach 1 Stunde bei 4 °C **0,92** (0,87 – 0,97 mg/ml), bei 37 °C **1,06** (0,94 – 1,19 mg/ml) und nach 24 Stunden bei 37 °C **1,49** (1,25 – 1,76) mg/ml.

4.5 Torfhuminsäure A2 (THS-A2)

4.5.1 Global- und Gruppentests zur Gerinnungsanalytik

4.5.1.1 Thrombelastographie

Die Reaktionszeit r und die Gerinnselbildungszeit k liegen bei der niedrigsten Konzentration Torfhuminsäure A2 (143,0 $\mu\text{g/ml}$) unterhalb des Leerwertes (r : $10,0 \pm 0,06$ min; k : $4,3 \pm 0,3$ min). Der Wert für r beträgt $8,0 \pm 0,06$ min und der für k $2,7 \pm 0,3$ min. Mit zunehmender Konzentration tritt die Gerinnung zu einem immer späteren Zeitpunkt ein. Bei 1142,7 $\mu\text{g/ml}$ bleibt sie nach 1-stündiger Laufzeit des TEGs ganz aus (Abb. 71). Auch die Gerinnselbildungszeit verlängert sich. Der letzte messbare Wert beträgt $17,0 \pm 2,5$ min bei einer Konzentration von 858,0 $\mu\text{g/ml}$ THS-A2. Die maximale Amplitude ist nur bei den ersten drei Werten (einschließlich Leerwert) messbar und beträgt $54,2 \pm 1,1$ mm.

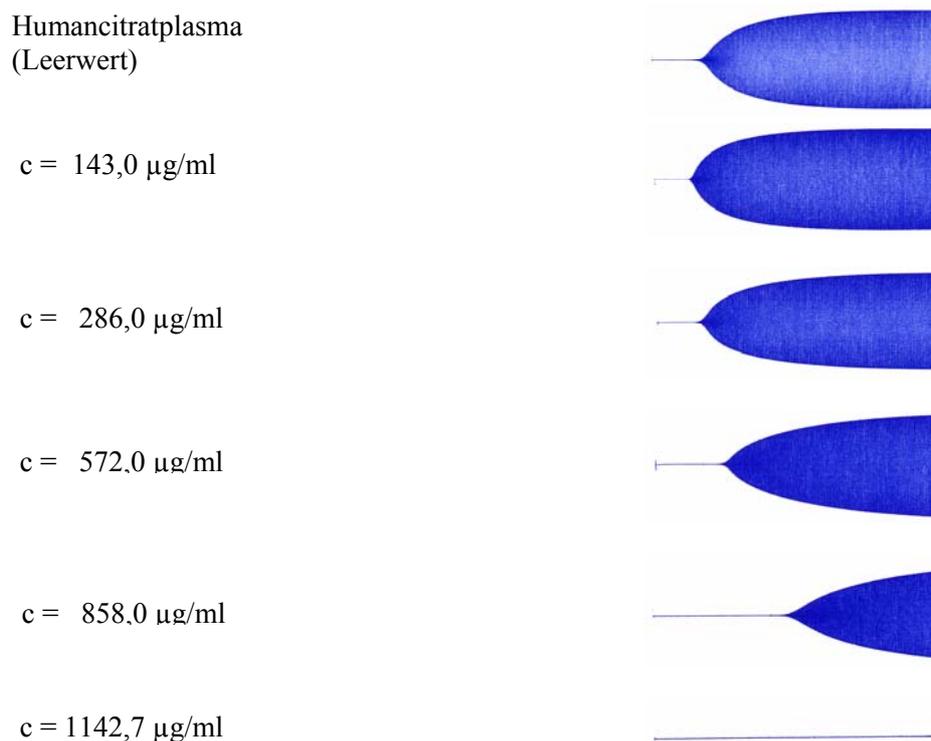


Abb. 71: Einfluss von Torfhuminsäure A2 (THS-A2) auf das Thrombelastogramm in Humancitratplasma nach Rekalzifizierung

4.5.1.2 Thrombinzeit

a) mit Plasma

Die Gerinnungszeit wird mit zunehmender Konzentration an THS-A2 verlängert. Der Kurvenverlauf in Abbildung 72 zeigt zunächst einen allmählichen Anstieg und ab 400 $\mu\text{g/ml}$ erfolgt eine sprunghafte Zunahme, die bei 1600 $\mu\text{g/ml}$ THS-A2 mit einer Verlängerung der Gerinnungszeit um das 29,0-fache endet.

Eine *Verdopplung der Thrombinzeit* (Leerwert $20,7 \pm 0,6$ sec) wird durch **$410,3 \pm 6,6$ $\mu\text{g/ml}$** THS-A2 bewirkt.

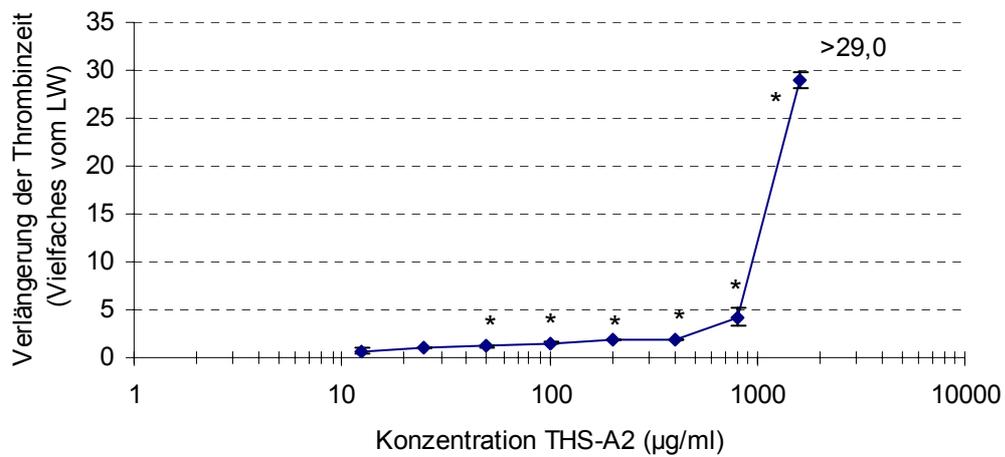


Abb. 72: Einfluss von Torfhuminsäure A2 (THS-A2) auf die Thrombin-Humancitrat-plasma-Reaktion ($\bar{x} \pm SE$; $n = 3$)

* signifikant gegenüber Leerwert, $p \leq 0,05$

b) mit Fibrinogen

In Abbildung 73 ist die Gerinnungszeit in Abhängigkeit von der Konzentration an THS-A2 dargestellt. Nach Zusatz von 10 NIH-E/ml Thrombin zur steigenden Konzentration THS-A2 wird die Umwandlung von Fibrinogen zum Fibrin stärker gehemmt. Bei der höchsten untersuchten Konzentration von 6400 $\mu\text{g/ml}$ THS-A2 erfolgt eine Verlängerung der Thrombinzeit in Fibrinogen um das 36,6-fache vom Leerwert ($16,4 \pm 0,5$ sec). Eine *Verdopplung der Gerinnungszeit* (Leerwert $16,4 \pm 0,5$ sec) wird durch **$356,3 \pm 87,4$ $\mu\text{g/ml}$** THS-A2 erreicht.

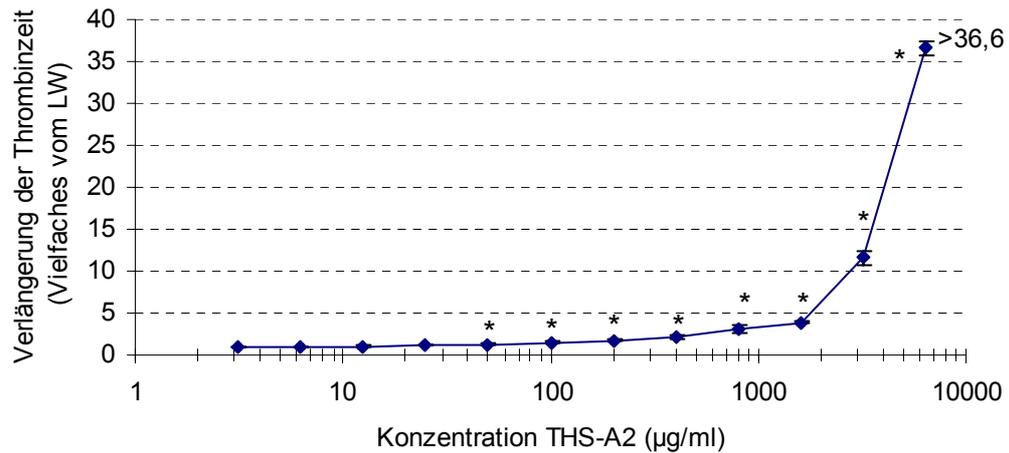


Abb. 73: Einfluss von Torfhuminsäure A2 (THS-A2) auf die Thrombin-Fibrinogen-Reaktion ($\bar{x} \pm SE$; $n = 3$)

* signifikant gegenüber Leerwert, $p \leq 0,05$

4.5.1.3 Prothrombinzeit

Ähnlich wie bei der THS-A1 wird die Prothrombinzeit (PT) erst bei sehr hohen Konzentrationen von THS-A2 sichtbar verlängert. Bei 999,9 µg/ml erfolgt eine Verlängerung um das 3,0-fache vom Leerwert ($15,8 \pm 0,5$ sec), bei der nächst höheren Konzentration (1090,8 µg/ml) kommt es bereits zur Ungerinnbarkeit. Die Prothrombinzeit wird um das über 38,1-fache verlängert (Abb. 74). Eine Verdopplung der Prothrombinzeit wird durch $727,9 \pm 24,4$ µg/ml erreicht.

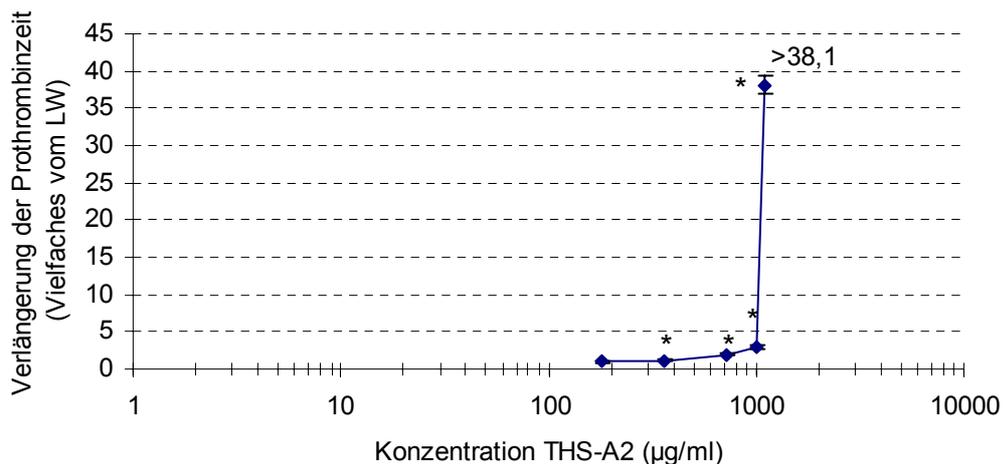


Abb. 74: Einfluss von Torfhuminsäure A2 (THS-A2) auf die Prothrombinzeit in Humancitratplasma ($\bar{x} \pm SE$; $n = 3$)

* signifikant gegenüber Leerwert, $p \leq 0,05$

4.5.1.4 Aktivierte partielle Thromboplastinzeit

Die Verlängerung der aPTT steigt mit zunehmender THS-A2-Konzentration (Abb. 75). Die Kurve folgt einem exponentiellen Verlauf und endet bei einer Konzentration von 1454,4 µg/ml mit einer Vervielfachung des Leerwerts ($34,0 \pm 0,7$ µg/ml) um den Faktor 17,7. Eine *Verdopplung der aPTT* gegenüber dem Leerwert wird durch **147,3 ± 10,3 µg/ml** bewirkt.

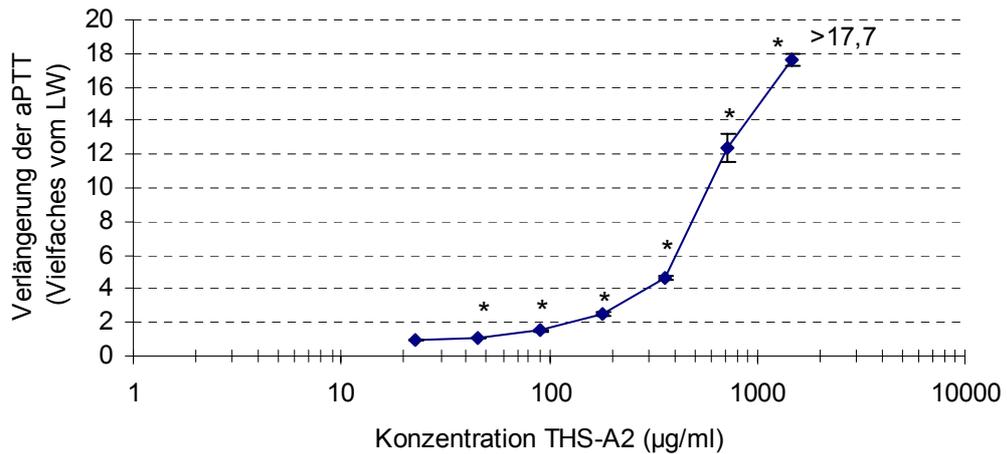


Abb. 75: Einfluss von Torfhuminsäure A2 (THS-A2) auf die aktivierte partielle Thromboplastinzeit (aPTT) in Humancitratplasma ($\bar{x} \pm SE$; $n = 3$)
* signifikant gegenüber Leerwert, $p \leq 0,05$

4.5.2 Neutralisation der antikoagulierenden Wirkung

Protaminsulfat in den Konzentrationen 0,02 bis 4,0 µg/ml ist ebenfalls die Substanz, mit der die antikoagulierende Wirkung der Torfhuminsäure A2 (THS-A2) aufgehoben werden soll. THS-A2 wird in der Konzentration 600 µg/ml vorgelegt (grüne Säule in Abb. 76). Durch Zusatz einer ansteigenden Konzentrationsreihe Protaminsulfat (PS) werden die Thrombinzeiten stetig verkürzt. Durch die linke, braune Säule in Abbildung 76 ist die Thrombinzeit vom Leerwert dargestellt ($13,7 \pm 0,3$ sec). Dieser Wert müsste bei einer kompletten Neutralisation der Wirkung von THS-2 wieder erreicht werden, was selbst bei der höchsten Konzentration Protaminsulfat (20 µg/ml) nicht eintritt.

Das heißt, dass sich die antikoagulierende Wirkung von THS-A2 **nicht vollständig** neutralisieren lässt. Die Thrombinzeit wird um 96,4 % bei einer Konzentration von 20 µg/ml Protaminsulfat verkürzt.

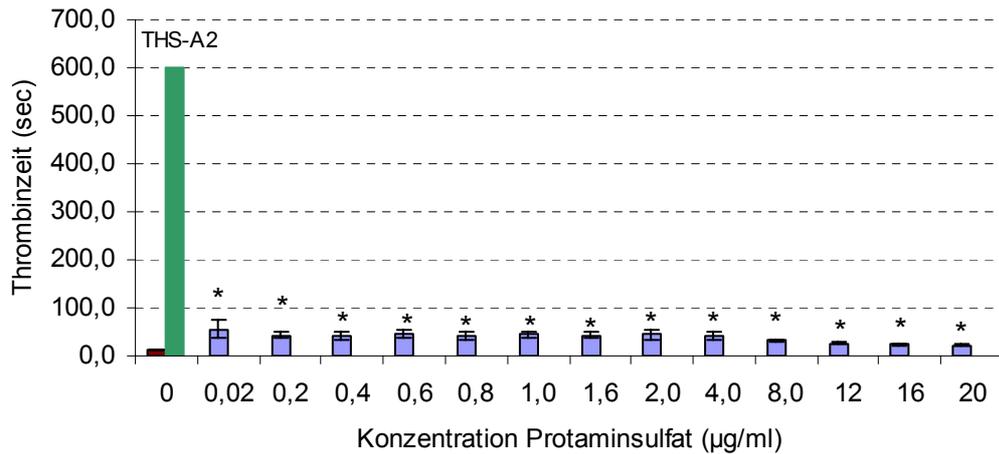


Abb. 76: Einfluss von Protaminsulfat auf die von Torfhuminsäure A2 (THS-A2) ausgelöste Gerinnungsverzögerung ($\bar{x} \pm SE$; $n = 3$)
 * signifikant gegenüber Leerwert, $p \leq 0,05$

4.5.3 [³H]Arachidonsäure-Freisetzungstest

Die [³H]AA-Freisetzung der U937-Zellen in Gegenwart von THS-A2 ist konzentrationsabhängig. Es wird bei allen drei Expositionszeiten ein Konzentrationsbereich von $0,04 \pm 0$ bis $2,20 \pm 0,10$ mg/ml untersucht.

Im Membrantoxizitäts-Konzentrations-Diagramm ist erkennbar, dass die Membrantoxizität erst in den letzten Konzentrationsschritten zwischen 1,1 und 2,2 mg/ml ansteigt und ihren größten Wert bei 7,4 % (1 h 37 °C) und 7,2 % (1 h 4 °C) [³H]AA-Freisetzung im Vergleich zu der AA-Freisetzung von Natriumdodecylsulfat (SDS) erreicht (Abb. 77).

Bei einer Expositionszeit von 24 Stunden ist der Anstieg der Säulen in den niedrigen Konzentrationen zunächst negativ und steigt dann in den höheren Konzentrationen in den gleichen Membrantoxizitätsbereich wie die beiden anderen Versuchsanordnungen. Die höchste toxische Konzentration liegt bei 2,2 mg/ml mit einer Membrantoxizität von 10,2 % im Vergleich zu SDS.

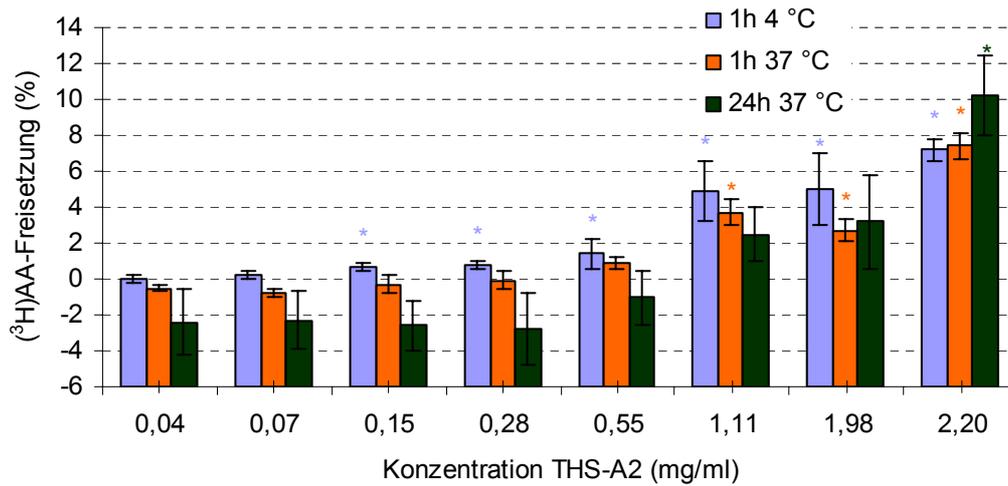


Abb. 77: Membrantoxizität von Torfhuminsäure A2 (THS-A2) an U937-Zellen nach 1- und 24-stündiger Exposition bei 37 °C sowie 1 Stunde bei 4 °C ($\bar{x} \pm SE$, $n = 3$)
 *** signifikant gegenüber Leerwert, $p \leq 0,05$

Die Konzentration, bei der 5 % [^3H]Arachidonsäure aus den U937-Zellen freigesetzt werden, beträgt nach 1 Stunde bei 4 °C **1,47** (1,05 – 2,04 mg/ml), bei 37 °C **2,06** (1,95 – 2,18 mg/ml) und nach 24 Stunden bei 37 °C **2,03** (1,74 – 2,32) mg/ml.

5 Diskussion

Einfluss der Testsubstanzen auf das Gerinnungssystem

Auf eine antikoagulierende Wirkung werden sulfatierte Hyaluronsäuren, carboxymethylierte sulfatierte Hyaluronsäuren und die natürlichen Huminsäuren aus dem Altteicher Moor in vitro im Globaltest (thrombelastographische Untersuchung) und in den Gruppentests Thrombinzeitbestimmung (TZ), aktivierte partielle Thromboplastinzeit (aPTT) und Prothrombinzeit (PT) untersucht. Anhand Tabelle 7 soll der Einfluss der Testsubstanzen auf das Gerinnungssystem diskutiert werden.

Tabelle 7: Konzentrationen ($\mu\text{g/ml}$) der untersuchten Substanzen, die eine Verdopplung der Gerinnungszeiten in den Gruppentests Thrombinzeit (TZ)-, aktivierte partielle Thromboplastinzeit (aPTT)- und Prothrombinzeit (PT)-Bestimmung in Humancitratplasma bewirken

Substanz	TZ (Plasma) [$\mu\text{g/ml}$]	TZ (Fibrinogen) [$\mu\text{g/ml}$]	aPTT [$\mu\text{g/ml}$]	PT [$\mu\text{g/ml}$]
S-Hya-15	0,5 \pm 0,03	0,3 \pm 0,03	4,6 \pm 0,2	13,9 \pm 2,4
CMS-1	* 0,7 \pm 0,03	0,5 \pm 0,1	* 2,2 \pm 0,6	13,8 \pm 2,6
CMS-2	* 2,5 \pm 0,2	** 1,4 \pm 0,2	7,6 \pm 2,3	** 33,8 \pm 2,0
THS-A1	** 121,9 \pm 12,1	** 382,9 \pm 40,4	** 74,1 \pm 18,1	** 2536,7 \pm 348,4
THS-A2	** 410,3 \pm 6,6	** 356,3 \pm 87,4	** 147,3 \pm 10,3	** 727,9 \pm 24,4
UFH ¹⁾	0,2	~ 2400	0,4	8,6
SP ₅₄ ¹⁾	14,0	~ 2400	1,8	28,2
NaHS ²⁾	35,0	85,7	n. b.	n. b.
Ald-HS ²⁾	19,5	28,9	n. b.	n. b.

* signifikant gegenüber S-Hya-15

* signifikant gegenüber CMS-1

* signifikant gegenüber CMS-2

* signifikant gegenüber THS-A1

n. b. = nicht bestimmt

¹⁾ Werte nach Klöcking et al. (1998a)

²⁾ Werte nach Mahr (2003)

Thrombelastographie

Die Thrombelastographie macht eine differenzierte Analyse des gesamten endogenen Gerinnungsprozesses, einschließlich Fibrinolyse, Thrombocytenzahl und Thrombocytenfunktion möglich. Bei der Verwendung von Citratvollblut und einer Stahlküvette sind bei einem gesunden Probanden folgende Werte normal:

Reaktionszeit (*r-Wert*) ca. 8 min , Gerinnungsbildungszeit (*k-Wert*) ca. 5 min (Jaencke, 1996).

Alle untersuchten Substanzen bewirken im Humancitratplasma eine konzentrationsabhängige Verlängerung der Reaktionszeit *r*. Die gerinnungshemmende Wirkung ist bei der sulfatierten Hyaluronsäure am stärksten, denn bei einer Konzentration von 35,8 µg/ml bleibt die Gerinnung innerhalb von 60 min vollständig aus (Tab. 8). Damit liegt S-Hya-15 im Wirkungsbereich von Pentosanpolysulfat (SP₅₄). Die carboxymethylierten sulfatierten Hyaluronsäurederivate (CMS-1/CMS-2) verhindern erst in höheren Konzentrationen die Gerinnung des Plasmas, nämlich CMS-1 bei dem doppelten Wert und CMS-2 beim 4-fachen Wert von S-Hya-15.

Die beiden Testsubstanzen Torfhuminsäuren A1 und A2 hemmen erst ab 800 µg/ml die Gerinnung. Sie sind um das ca. 24-32-fache schwächer wirksam als die sulfatierten Hyaluronsäurederivate. Im Vergleich zu allen anderen polyanionischen Verbindungen aus Tabelle 8 ist unfraktioniertes Heparin (UFH) am stärksten wirksam. Es verhindert den Gerinnungsvorgang bereits bei einer Konzentration von 4,9 µg/ml.

Tabelle 8: Antikoagulierende Wirkung polyanionischer Verbindungen in vitro (Humancitratplasma) im Thrombelastogramm

Substanz	Thrombelastogramm Laufzeit 1h Konzentrationen für <i>r</i> > 60 min (µg/ml)
S-Hya-15	35,8
CMS-1	71,5
CMS-2	143,0
THS-A1	858,0
THS-A2	1142,7
UFH¹⁾	4,9
SP₅₄¹⁾	39,1

¹⁾ Werte nach Klöcking et al. (1998a)

Thrombinzeit

Die Thrombinzeit (TZ) ist der klassische Test zur Überprüfung der Fibrinpolymerisation. Von den einzelnen Faktoren der plasmatischen Gerinnung wird nur Fibrinogen erfasst. Die Bestimmung der Thrombinzeit im Plasma lässt erkennen, ob die zu testenden Substanzen die Umwandlung des Fibrinogens zu Fibrin verzögern, indem sie

das zugesetzte Testthrombin in seiner Aktivität hemmen. Alle anderen Faktoren, auch der fibrinstabilisierende Faktor XIII, werden nicht erfasst.

Die sulfatierten (S-Hya-15) und carboxymethylierten sulfatierten (CMS-1/CMS-2) Hyaluronsäuren verlängern konzentrationsabhängig in allen drei Gruppentests im Plasma die Gerinnungszeiten. Die stärkste Hemmwirkung wird von allen drei Substanzen gegenüber Thrombin entfaltet (Abb. 78 bis 80). Der Angriff der beiden Hyaluronsäurederivate erfolgt demnach im letzten Schritt der Gerinnung, nämlich der Umwandlung von Fibrinogen zu Fibrin. Die quantitativen Unterschiede im Wirkungsprofil von S-Hya-15, CMS-1 und CMS-2 sind in dem Test Thrombinzeitbestimmung signifikant voneinander abweichend.

Nach den Ergebnissen der Thrombinzeitbestimmung sind die sulfatierten und carboxymethylierten Hyaluronsäurederivate schwächer wirksam als unfraktioniertes Heparin (UFH), aber etwa 28-fach (S-Hya-15), 20-fach (CMS-1) und 6-fach (CMS-2) stärker wirksam als Pentosanpolysulfat (Tabelle 7, Seite 82).

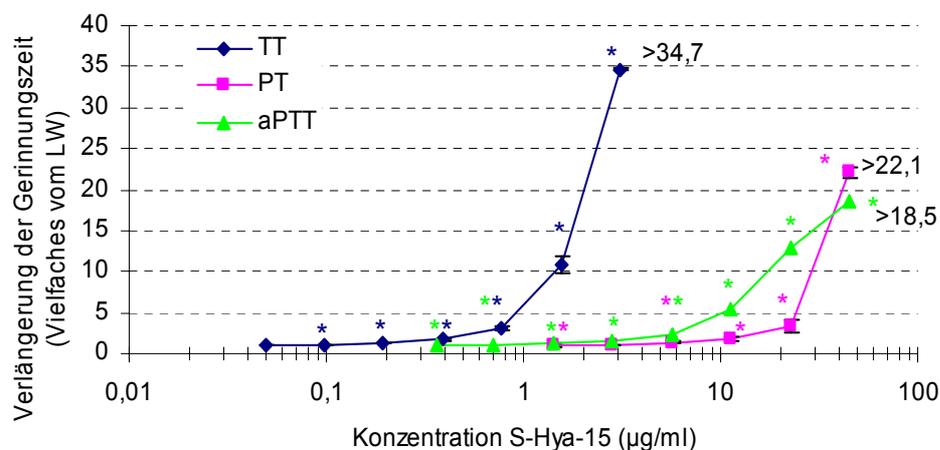


Abb. 78: Antikoagulierende Wirkung von sulfatierter Hyaluronsäure (S-Hya-15) *in vitro* in Humancitratplasma ($\bar{x} \pm SE$; $n = 3$)

* ** signifikant gegenüber Leerwert, $p \leq 0,05$

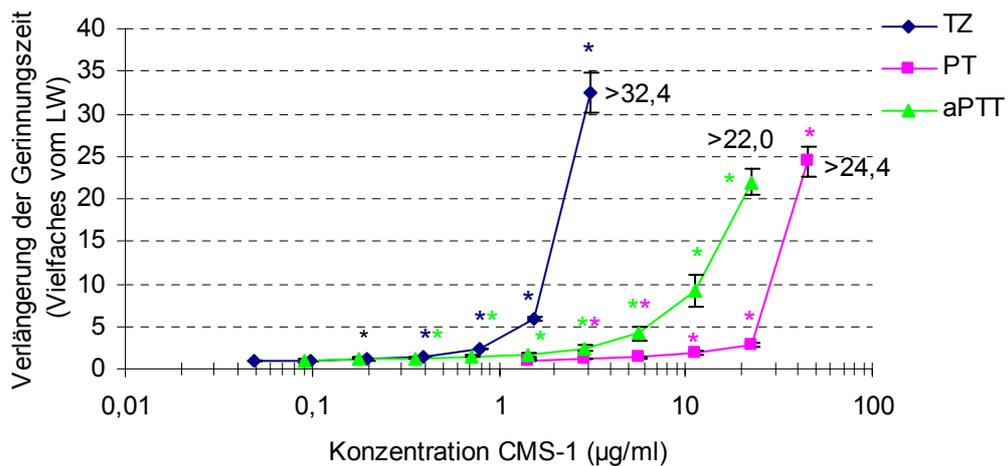


Abb. 79: Antikoagulierende Wirkung von carboxymethylierter sulfatierter Hyaluronsäure (CMS-1) *in vitro* in Humancitratplasma ($\bar{x} \pm SE$; $n = 3$)

* ** signifikant gegenüber Leerwert, $p \leq 0,05$

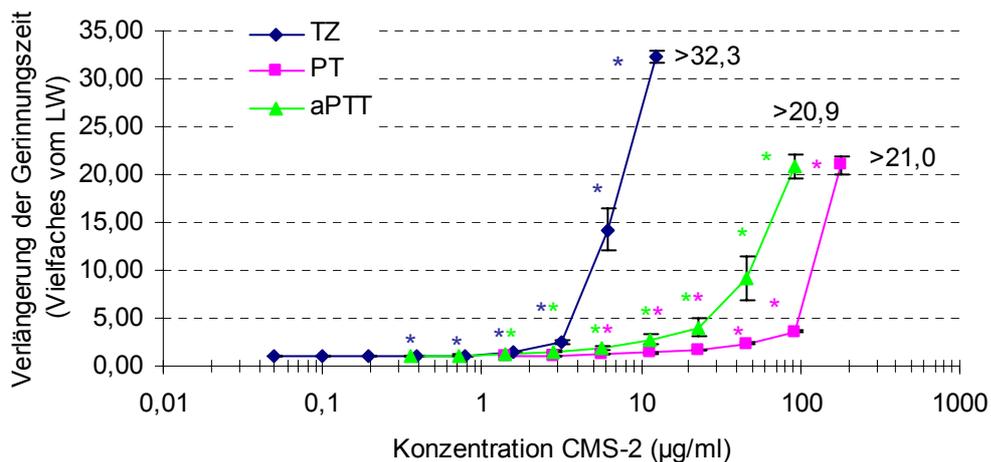


Abb. 80: Antikoagulierende Wirkung von carboxymethylierter sulfatierter Hyaluronsäure (CMS-2) *in vitro* in Humancitratplasma ($\bar{x} \pm SE$; $n = 3$)

* ** signifikant gegenüber Leerwert, $p \leq 0,05$

Aus Arbeiten von Barbucci et al. (1995) und Magnani et al. (1996) geht hervor, dass die antikoagulierende Aktivität der sulfatierten Hyaluronsäuren mit dem Sulfatierungsgrad, d. h. der Anzahl der Sulfatgruppen pro Disaccharideinheit, zunimmt. Die Bestimmung der Thrombinzeit in Abhängigkeit von der Molmasse (M_w) der Verbindungen zeigt außerdem, dass die Hemmung der Thrombinaktivität im Plasma mit zunehmender Molmasse ansteigt (Barbucci et al., 1996, 1998).

Diese Ergebnisse können in der vorliegenden Arbeit bestätigt werden. Die sulfatierten Hyaluronsäuren aus der Gruppe 3 mit einer Molmasse von 1.358.000 Da hem-

men Thrombin stärker als diejenigen aus der Gruppe 1 mit einer Molmasse von 99.753 Da. Beim Sulfatierungsgrad zeigen die Testsubstanzen aus der Gruppe 6 (DS 3,12) die stärkere antikoagulierende Wirkung gegenüber der Gruppe 4 (DS 2,15). Barbucci et al. (1998) kamen zu dem Ergebnis, dass bei verschiedenen Molmassen der Einfluss der drei Faktoren AT III, Thrombin und HCII unterschiedlich ist. Bei den S-Hya-Verbindungen mit niedrigen Molmassen (21.000 und 320.000) wird Thrombin durch eine direkte unspezifische Interaktion und über Heparin Cofaktor II (HCII) inhibiert, während die Aktivität von hochmolekularen Verbindungen (M_w 3.500.000) hauptsächlich auf die elektrostatische Interaktion mit HCII zurückzuführen ist.

Die Interaktion zwischen Thrombin und den sulfatierten Verbindungen ist eine einfache elektrostatische Anziehungskraft, die mit zunehmender Ladungsdichte zunimmt. Mit steigender Anzahl Sulfatgruppen pro Disaccharideinheit kommt es immer zu einer Zunahme der Heparin-ähnlichen Aktivität (Mangani et al., 1996).

Auch bei den carboxymethylierten Derivaten sind diejenigen mit höherem Schwefelgehalt (CMS-1) wirksamer als die mit niedrigem Schwefelgehalt (CMS-2).

Die gerinnungshemmende Wirkung von Heparin ist an das Vorhandensein des so genannten Heparin-Cofaktors gebunden. Dieser Cofaktor ist ein natürlich vorkommendes Plasmaprotein und ist identisch mit dem Antithrombin III (AT III). Es entwickelt sich eine Komplexbindung, die die eigentliche Antithrombinwirkung des Heparins darstellt (Jaenecke, 1996). Im Plasma ist neben Thrombin und Fibrinogen das oben genannte AT III vorhanden. Um eine Aussage darüber zu treffen, ob die antikoagulierende Wirkung der Testsubstanzen an die Anwesenheit von AT III gebunden ist, wird die Thrombinzeit in reinem Fibrinogen bestimmt. In der Fibrinogen-Thrombin-Reaktion benötigt UFH ein Vielfaches ($\sim 12.000x$) an Konzentration zur Verdoppelung der Gerinnungszeiten gegenüber der Humancitrat-Thrombin-Reaktion. Die untersuchten Testsubstanzen besitzen in reiner Fibrinogenlösung annähernd die gleiche Anti-Thrombin-Wirksamkeit wie im Plasma.

Dieser Befund lässt darauf schließen, dass die Hemmung von Thrombin (FIIa) durch die Testsubstanzen nicht durch Cofaktoren vermittelt oder verstärkt wird, sondern hauptsächlich durch eine direkte Hemmung der Protease verursacht wird. Für die antikoagulierende Wirkung wird demnach kein Cofaktor (z. B. Antithrombin III) benötigt. Mahr (2003) zeigte, dass die sulfatierten Hyaluronsäuren eine direkte Hemmung von Faktor IIa bewirken. Werden sulfatierte Hyaluronsäure und AT III kombiniert,

kommt es zu einem synergistischen Effekt. Im Gegensatz dazu wird die Anti-IIa-Wirkung der natürlichen Huminstoffe (Natriumhumat HD 80 aus dem Moorwasser Dierhagen [NaHS] und dem Aldrich-Huminsäure [Ald-HS]) nicht durch AT III vermittelt oder verstärkt. Im Vergleich zu den natürlichen Moorwasser- und Braunkohlehuminsäuren sind die hier getesteten Torfhuminsäuren A1 und A2 schwächer wirksam. Die Ald-HS besitzt gegenüber NaHS eine stärkere antikoagulierende Wirkung.

Aktivierte partielle Thromboplastinzeit

Die aktivierte partielle Thromboplastinzeit (aPTT) ist der wichtigste Gruppentest zur Überprüfung des intrinsischen (endogenen) Aktivierungsweges des plasmatischen Gerinnungssystems (Spannagl und Moessmer, 2006). Sie erfasst in erster Linie die Aktivität der Kontaktfaktoren Präkallikrein und hochmolekulares Kininogen sowie die Vorphasenfaktoren VIII, IX, XI und XII. Auf die Aktivierung der Faktoren II, V und X reagiert die aPTT weniger empfindlich. Die Faktoren VII und XIII werden von diesem Test nicht erfasst. Das Prinzip der Methode besteht darin, dass dem Plasma vor der Rekalzifizierung ein Phospholipid zugesetzt wird. Dadurch läuft der Gerinnungsmechanismus unabhängig von der Funktion der Thrombocyten ab.

Die sulfatierte Hyaluronsäure ist im endogenen System (aPTT) stärker wirksam als CMS-2 und schwächer wirksam als CMS-1. Die höher sulfatierte Gruppe CMS-1 ist in der Wirkung der weniger sulfatierten Gruppe CMS-2 überlegen. Die Sulfatierungsgrade von CMS-1 ($DS_s = 3,0$) und S-Hya-15 ($DS_s = 2,7$) liegen im selben Bereich. Vermutlich müssten sie dieselbe Wirkung auf das endogene System besitzen.

CMS-1 ist jedoch stärker wirksam. Anhand dieses Ergebnisses stellt sich die Frage, ob die Carboxymethylgruppe für diese Wirkungssteigerung verantwortlich ist. Ist der Sulfatierungsgrad gering ($DS_s = 0,3$ bei CMS-2), führt die Einführung der Carboxylgruppe nicht zu einer Wirkungsverstärkung.

Die beiden Vertreter aus der Klasse der Huminstoffe, Torfhuminsäure A1 (THS-A1) und Torfhuminsäure A2 (THS-A2) sind um ein Vielfaches schwächer wirksam als die Hyaluronsäurederivate. Entgegen den Untersuchungen von Klöcking und Klöcking (1986) sowie Klöcking et al. (1994a), die Hinweise auf einen stärkeren Einfluss der natürlichen Huminstoffe (NHS) auf das exogene als auf das endogene System lieferten, zeigen die Torfhuminsäuren A1 und A2 die stärkste Wirkung gegenüber der aktivierten partiellen Thromboplastinzeit (aPTT). Eine etwas schwächere

Hemmwirkung wird gegenüber Thrombin entfaltet. Auf das exogene System besteht der geringste Einfluss (Tab. 7 S. 82, Abb. 81 und 82).

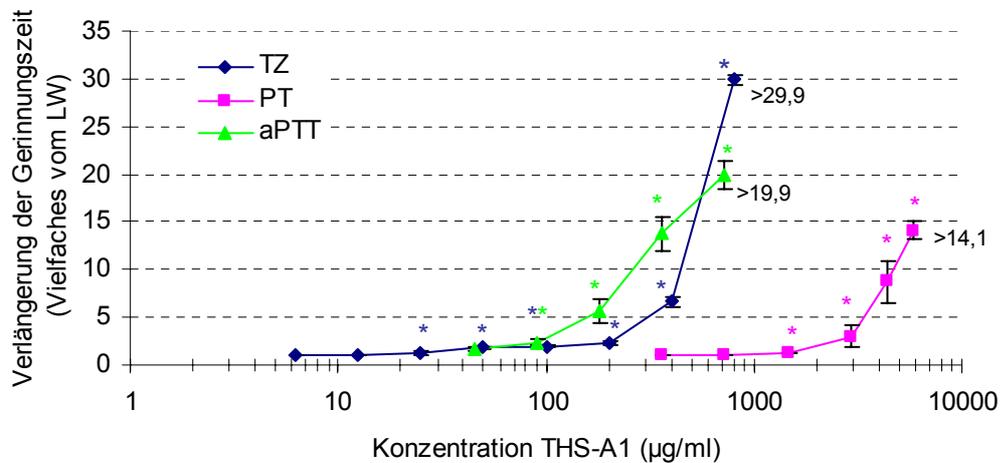


Abb. 81: Antikoagulierende Wirkung von Torfhuminsäure A1 (THS-A1) *in vitro* in Humancitratplasma ($\bar{x} \pm SE$; $n = 3$)
 *** signifikant gegenüber Leerwert, $p \leq 0,05$

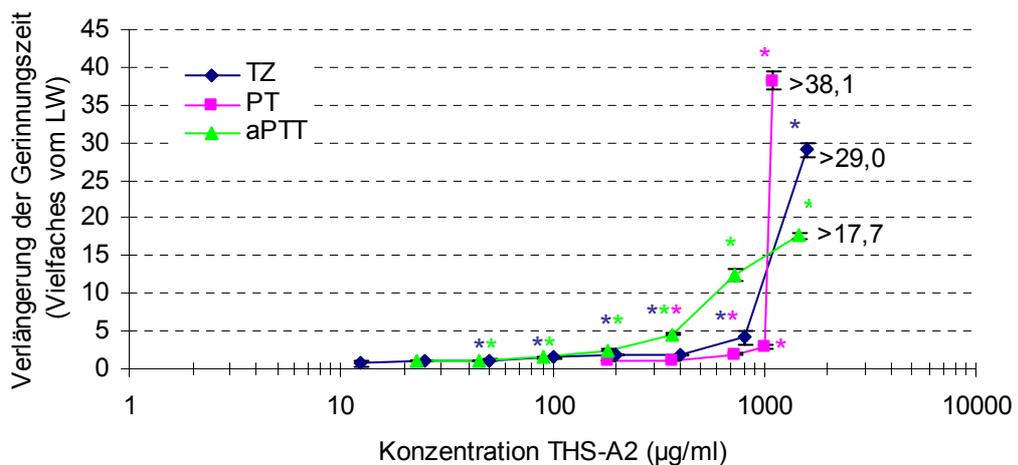


Abb. 82: Antikoagulierende Wirkung von Torfhuminsäure A2 (THS-A2) *in vitro* in Humancitratplasma ($\bar{x} \pm SE$; $n = 3$)
 *** signifikant gegenüber Leerwert, $p \leq 0,05$

Prothrombinzeit

Die Prothrombinzeitbestimmung (PT) lässt auf Störungen im exogenen System schließen. Das Reagens enthält als aktive Bestandteile TF (tissue factor), Phospholipide und Calciumionen. Die Ergebnisse der PT-Bestimmung werden seit 1980 zur Überwachung der Antikoagulationstherapie mit Vitamin-K-Antagonisten genutzt. Um eine internationale Vergleichbarkeit der Messwerte und der therapeutischen Be-

reiche zu gewährleisten, führten die Weltgesundheitsorganisation (WHO) und die Bundesärztekammer die Internationale Normalisierte Ratio (INR) ein. Sie setzt sich zusammen aus dem Quotient der Prothrombinzeit des Patienten und der mittleren PT normaler Probanden und beträgt 2,0 bis 3,0 unter Vitamin-K-Therapie. Neben den Faktoren II, V und VIII wird auch die Hemmung von Faktor X erfasst, der über die Aktivierung von F Xa für die Umwandlung von Prothrombin zu Thrombin verantwortlich ist. Magnani et al. (1996), Barbucci et al. (1998) und Mahr (2003) untersuchten diesen Schritt der Gerinnungskaskade. Sie kamen zu dem Ergebnis, dass niedrig sulfatierte Hyaluronsäurederivate Faktor Xa ohne Abhängigkeit von AT III hemmen. Die Interaktion zwischen AT III und den Polysacchariden ist elektrostatischer Natur. Sie funktioniert jedoch nur bei einer optimalen Konfiguration des Makromoleküls. Vermutlich können die S-Hya-Verbindungen diese besondere Struktur nicht annehmen, so dass die Interaktion zwischen S-Hya und AT III keinen Einfluss auf die FXa-Inaktivierung hat (Villanueva, 1984; Scully et al., 1987).

Eine Substanz, die ebenfalls F Xa und Thrombin inaktiviert, ist Heparin. Es verstärkt die Wirkung antikoagulatorischer Proteine im Plasma, nämlich die von Antithrombin III (AT III) und von Heparin-Cofaktor II. Der AT III-Heparin-Komplex hat eine hohe Affinität zu F Xa. Zur Hemmung von Thrombin, die sowohl durch Antithrombin III- wie über Heparin Cofaktor II-Heparin bewirkt wird, bedarf es wesentlich höherer Heparin-Dosen gegenüber Faktor Xa (Forth et al., 2001). Im exogenen System (PT) wiesen S-Hya und CMS-1 eine etwa gleich starke Wirkung auf, die um das ca. 2,5-fache stärker ist als von CMS-2 (Tab. 7, S. 82). Die Torfhuminsäuren A1 und A2 sind gegenüber den anderen Testsubstanzen am schwächsten wirksam. Von THS-A1 wird die 180-fache Menge benötigt, um die Wirkung von S-Hya-15 zu erreichen. Auf das exogene System wirkt Heparin am stärksten gegenüber allen getesteten Substanzen.

Antagonisierung der antikoagulierenden Wirkung durch Protaminsulfat

Es ist bekannt, dass Protaminsulfat Komplexe mit Heparin bildet, die Heparin als Antikoagulanzen unwirksam machen. Grund für diese Reaktion ist die hohe Dichte basischer Oberflächengruppen im Protaminmolekül, die in der Lage sind, über die Sulfatgruppen der Heparine Komplexe zu bilden (Cuming et al., 1986; Racanelli et al., 1985).

Die Untersuchungen zur Interaktion von hochsulfatierter Hyaluronsäure (S-Hya-15) sowie der carboxymethylierten sulfatierten Hyaluronäuren (CMS-1, CMS-2) mit Protaminsulfat haben ergeben, dass die verlängerten Thrombinzeiten von allen drei Testsubstanzen durch Protaminsulfat verkürzt werden.

Da die genannten Substanzen über eine große Anzahl an Sulfatgruppen und eine hohe Dichte negativer Ladungen verfügen, ist auch hier davon auszugehen, dass die Bildung eines Komplexes zum Verlust der antikoagulierenden Wirkung führt. Protaminsulfat kann dabei entweder die freie Substanz direkt komplexieren oder die Substanz aus einem vermutlich leicht dissoziierbaren Gleichgewicht mit der Serinprotease verdrängen und anschließend inaktivieren. Für sulfatierte Hyaluronsäuren niedrigerer Molmasse (5.000 – 10.000 Da) wird dieses Ergebnis bereits 1996 von Magnani et al. beschrieben. In Tabelle 9 ist für alle Testsubstanzen die jeweils untersuchte Konzentration und das durch den Versuch bestimmte Verhältnis Testsubstanz : Protaminsulfat, bei dem eine Neutralisierung der antikoagulierenden Wirkung stattfindet, zusammengefasst.

Tabelle 9: Neutralisation der antikoagulierenden Wirkung von polyanionischen Verbindungen durch Protaminsulfat

Substanz	Konzentration (µg/ml)	Medium	Verhältnis Testsubstanz : Protaminsulfat
S-Hya-15	1,6	Plasma	1 : 1,0
CMS-1	1,6	Plasma	1 : 2,2
CMS-2	6,3	Plasma	1 : 0,5
THS-A1	200,0	Plasma	1 : 0,1
THS-A2	600,0	Plasma	1 : 0,03
UFH	0,5	Plasma	1 : 1,8
SP₅₄	3,1	Plasma	1 : 1,2
NaHS¹⁾	120,0	Fibrinogen	1 : 0,3
Ald-HS¹⁾	75,0	Fibrinogen	1 : 0,4

¹⁾ Werte nach Mahr (2003)

Die sulfatierten Hyaluronsäuren werden im Verhältnis 1 : 1 (S-Hya-15 : PS) und die carboxymethylierten Derivate im Verhältnis 1 : 2,2 (CMS-1 : PS) sowie 1 : 0,5 (CMS-2 : PS) neutralisiert.

Entgegen den Untersuchungen von Mahr (2003), nach denen die antikoagulierende Wirkung der natürlichen Huminsäuren (Huminsäure aus dem Küstenhochmoor Dierhagen, Aldrich-Huminsäure) durch Protaminsulfat vollständig neutralisiert werden

kann, wird die antikoagulierende Wirkung der beiden Torhuminsäuren THS-A1 und THS-A2 nicht vollständig durch Protaminsulfat aufgehoben (etwa zu 85 %). Um eine 100%ige Neutralisation zu erreichen, sind Konzentrationen an Protaminsulfat notwendig, die selbst prokoagulierende Eigenschaften besitzen.

Einfluss der Testsubstanzen auf die Zellverträglichkeit

Zur Beurteilung der Zellverträglichkeit der sulfatierten Hyaluronsäuren, carboxymethylierten sulfatierten Hyaluronsäuren und Huminsäuren werden konzentrationsabhängig Untersuchungen zur Cytotoxizität, zur Proliferation und zur Membrantoxizität gemacht. Sie werden realisiert durch den Tetrazoliumreduktionstest und den Arachidonsäure-Freisetzungstest ergänzt durch optische Beurteilung der Zellen.

Die Messung der Stoffwechselaktivität mit dem XTT-Tetrazoliumreduktionstest erweist sich als geeignet für die Cytotoxizitätsbestimmung an U937-Zellen, da ein wichtiges Vitalitätsmerkmal lebender Zellen – das Reduktionsvermögen mitochondrialer Dehydrogenasen – erfasst wird. Die in den Versuchen gemessene Absorption ist direkt proportional der Anzahl lebender Zellen, so dass die Cytotoxizität prozentual im Vergleich mit der unbehandelten Zellkontrolle bestimmt werden kann (Gettings and McEwen, 1990).

Auch die Proliferation (zahlenmäßiger Anstieg der Zellen ohne Volumenänderung) kann infolge einer toxischen Wirkung von Substanzen gehemmt sein (Shaw, 1994). Um die Proliferation der Zellen zu ermitteln, wird die Zellzahl durch direktes Auszählen unter dem Mikroskop sowie indirekt durch Messung der Stoffwechselaktivität mit Hilfe des XTT-Tetrazoliumreduktionstests bestimmt. Tote Zellen weisen im Gegensatz zu lebenden Zellen deutliche morphologische Veränderungen auf, die nach 24 Stunden und mehr sehr gut sichtbar sind. Häufig wird zur Unterscheidung von lebenden und toten Zellen die Trypanblaufärbung verwendet. Nachteilig sind jedoch die Toxizität des Farbstoffs sowie die Tatsache, dass vorgeschädigte, aber noch lebende Zellen von Trypanblau abgetötet werden. Da geschädigte Zellen morphologische Veränderungen (z.B. Abrundung und Schrumpfung der Zellen) aufweisen, ist auch die mikroskopische Beurteilung der Zellen für die Einschätzung der Cytotoxizität geeignet. Derartige Zellveränderungen korrelieren in mehreren Studien gut mit In-vivo-Daten (Bloom et al., 1994; Grant et al., 1992; Guenicke and Ponec, 1993).

Um Störungen in der Membranintegrität der Zelle zu untersuchen, wird der Arachidonsäure-Freisetzungstest (AART) verwendet. Dieser Test beruht auf dem Einbau tritiummarkierter Arachidonsäure ($[^3\text{H}]\text{AA}$) in die Membran von U937-Zellen und ihrer (Wieder-)Freisetzung in das umgebende Medium durch membrantoxische Substanzen (Stark et al., 1983; Klöcking, 1994). Dieser Test hat sich bereits für Augenreizstoffe (Klöcking et al., 1995; Valentini et al., 1996; Valentini 1998), Umweltchemikalien (Schlegelmilch, 1993; Schlegelmilch et al., 1993; Müller-Decker et al., 1994; Klöcking et al., 1994, 1994b), Detergentien (DeLeo et al., 1987), Thromboseprophylaktika (Klöcking et al., 1996) und Biomaterialien (Hoffmann, 1995; Klöcking et al., 1995; 1998) bewährt.

Bei einer initialen Testtemperatur von 4 °C werden die Stoffe identifiziert, die die AA-Freisetzung nicht enzymatisch, sondern in Form eines direkten Angriffs auf die Zellmembran herbeiführen. Membrantoxische Substanzen wirken über eine temperaturunabhängige Desintegration der Zellmembran. Erfolgt die erhöhte Freisetzung der AA jedoch erst nach der Exposition bei 37 °C, so kann von einem enzymvermittelten Mechanismus ausgegangen werden. Die Beobachtung der AA-Freisetzung über einen Zeitraum von 24 Stunden erlaubt außerdem festzustellen, ob es sich um einen reversiblen (physiologischen) oder irreversiblen (toxischen) Prozess handelt (Klöcking, 1994; Klöcking et al., 1994c).

Cytotoxizität

Als Kenngröße für die cytotoxische Wirkung der untersuchten Substanzen dient die halbmaximale cytotoxische Konzentration (CC_{50}). Die sulfatierten Hyaluronsäuren (S-Hya) wurden bereits in der Diplomarbeit Keßler (2000) auf ihren cytotoxischen Einfluss auf U937-Zellen getestet. Allerdings wurden sie zu diesem Zeitpunkt nach zwei verschiedenen Synthesewegen hergestellt. Diese Verbindungen sind cytotoxischer als die neue S-Hya-15-Verbindung (Tab. 10), was in den damals noch nicht optimierten Reinigungsverfahren begründet sein könnte. Durch eine Optimierung der Reaktionsführung ist es der Firma Innovent gelungen, reproduzierbare Verbindungen mit einstellbarem Sulfatierungsgrad zu synthetisieren.

Im Vergleich zu den carboxymethylierten Derivaten besitzt die S-Hya-15 eine höhere Cytotoxizität nach 1-stündiger Exposition. Nach 24 Stunden ist sie cytotoxischer als CMS-1, jedoch weniger toxisch als CMS-2 (Tab. 10). Der Einfluss der carboxy-

methylierten sulfatierten Hyaluronsäuren auf die Aktivität der mitochondrialen Dehydrogenasen der U937-Zellen ist stark zeitabhängig. Um eine Cytotoxizität von 50 % zu erreichen, sind bei 1-stündiger Inkubationszeit über 50 mg/ml CMS-1 und CMS-2 notwendig, während nach 24 Stunden schon 28,2 mg/ml CMS-1 bzw. 10,3 mg/ml CMS-2 für diese Wirkung ausreichen (Tab. 10). Die Cytotoxizität nimmt mit zunehmender Expositionszeit zu, wobei CMS-2 toxischer ist als CMS-1.

Im Vergleich zu Heparin (UFH), Pentosanpolysulfat (SP₅₄), Hyaluronsäure (Hya) und Reviparin sind die sulfatierten Hyaluronsäuren und die carboxymethylierten sulfatierten Hyaluronsäure der Gruppe 2 (CMS-2) nach 24-stündiger Exposition cytotoxischer. Die Zellverträglichkeit von CMS-1 liegt im Bereich von UFH und SP₅₄.

Die carboxymethylierten Derivate unterscheiden sich von allen anderen Substanzen durch die höheren Cytotoxizitätswerte nach 24-stündiger Versuchsdauer im Gegensatz zu einer Stunde. Bei S-Hya-15, THS-A1, THS-A2, Heparin, SP₅₄ und Reviparin hat die Einwirkungszeit keinen Einfluss auf die Zellverträglichkeit. Die Torfhuminsäuren A1 und A2 zeigen bis zum Konzentrationsbereich 0,5 mg/ml im 24 Stunden-Versuch keine cytotoxischen Effekte (Kühn, 2005).

Tabelle 10: Halbmaximale cytotoxische Konzentrationen (CC₅₀) von polyanionischen Verbindungen in U937-Zellen. XTT-Tetrazoliumreduktionstest

Substanz	CC₅₀ (mg/ml) 1h Exposition	CC₅₀ (mg/ml) 24h Exposition
S-Hya-15	19,0 (16,9 – 21,3)	20,1 (18,0 – 22,4)
CMS-1	> 50,0	28,2 (23,4 – 34,1)
CMS-2	> 50,0	10,3 (9,7 – 11,0)
THS-A1	> 0,5	> 0,5
THS-A2	> 0,5	> 0,5
UFH¹⁾	27,7 (25,1 – 30,6)	29,1 (27,3 – 31,1)
SP₅₄¹⁾	31,1 (26,6 – 36,4)	27,3 (23,9 – 31,1)
Reviparin¹⁾	36,6 (29,9 – 44,7)	37,4 (31,5 – 44,5)
Hya-DS (61,62,64,65,70)²⁾	16,5 (13,5 – 20,1)	4,2 (3,3 – 5,4)
Hya-DS (58,60,67,73,74)²⁾	16,5 (13,7 – 19,8)	12,0 (9,1 – 15,7)
niedermolekulare Hya²⁾	> 32,0	> 32,0

¹⁾ Werte nach Klöcking et al. (1998)

²⁾ Werte nach Kessler (2000)

Proliferation

S-Hya-15 bewirkt in den Konzentrationen ab 6,4 mg/ml eine signifikante Hemmung des Zellwachstums nach 96-stündiger Exposition. Bei 12,8 mg/ml sinkt die Zellzahl

um 97 % im Vergleich zur Zellkontrolle. Hinsichtlich der Wachstumsbeeinflussung von U937-Zellen verhalten sich die beiden carboxymethylierten sulfatierten Hyaluronsäuren unterschiedlich. CMS-1 hemmt das Zellwachstum wesentlich stärker als CMS-2. Abbildung 83 zeigt eine Abnahme der Zellzahl nach 96-stündiger Inkubationszeit um über 95 % bei einer Konzentration von 12,8 mg/ml CMS-1. Unter dem Einfluss von CMS-2 sind hingegen noch 37 % aller Zellen vorhanden.

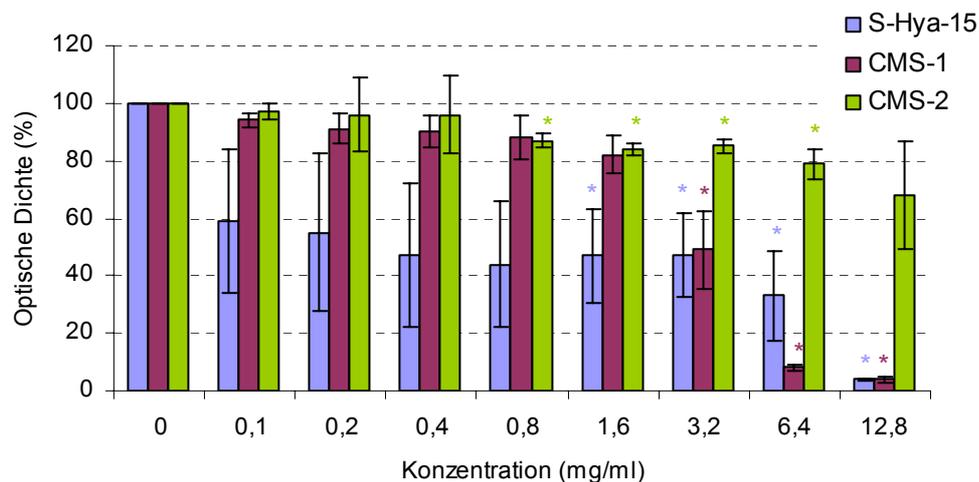


Abb. 83: Wachstumsbeeinflussung von U937-Zellen durch S-Hya-15, CMS-1 und CMS-2 nach 96 Stunden Exposition ($\bar{x} \pm SE$; $n = 3$)
 *** signifikant gegenüber Leerwert, $p \leq 0,05$

Abatangelo et al. (1997) stellten fest, dass sulfatierte Hyaluronsäuren keinen Einfluss auf morphologische und strukturelle Veränderungen im Zellverband von Endothelzellen haben. Es wird eine Förderung der Proliferation durch die Substanzklasse beobachtet. Die Sulfatierung hat weiterhin keinen negativen Einfluss auf das Verhalten der Polysaccharide gegenüber Fibroblasten, Endothelzellen und Erythrocyten.

Werden Heparin und sulfatierte Hyaluronsäuren im Hinblick auf die Beeinflussung der Proliferation verglichen, so ergibt sich, dass unfraktioniertes Heparin in der Lage ist, das Wachstum der Zellen nach einer Versuchsdauer von 5 Tagen zu fördern. Dies wurde im Konzentrationsbereich 0,08 bis 10 mg/ml von Jelinek (1996) untersucht, wobei es bei den beiden Konzentrationen 0,08 und 0,16 mg/ml zu einer Förderung des Zellwachstums kam.

Johann et al. (1995) untersuchten den Einfluss von Glycosaminoglycanen auf die In-vitro-Proliferation von menschlichen Zellen (mononukleäre Leukocyten). Dabei konnte für UFH in vergleichbarer Konzentration zur Arbeit von Jelinek (10 U/ml)

eine geringe Wachstumserhöhung festgestellt werden. Ohne Stimulation des Wachstums durch mitogene Substanzen wurde für Pentosanpolysulfat und niedermolekulares Heparin kein Einfluss auf die Proliferation festgestellt (Johann et al., 1995). Der Einfluss von Heparin und verwandten Glycosaminoglycanen auf ASM (airway smooth muscle)-Zellen wurde durch Kanabar et al. (2005) untersucht. Die Substanzen hemmen die Proliferation. Der Hemmmechanismus ist unbekannt.

Die Autoren konnten jedoch zeigen, dass für die antiproliferative Wirkung die Sulfatierung eine strukturelle Voraussetzung darstellt, während die antikoagulierende Aktivität, Anzahl der anionischen Ladungen und die Molekülgröße keine Rolle spielen. Kühn (2005) untersuchte den Einfluss der Torfhuminsäure A2 (THS-A2) und Natriumhumat (NaHS) auf die Proliferation von U937-Zellen. Im Ergebnis zeigt die THS-A2 von 2 bis 62,5 µg/ml keine Beeinflussung des Wachstums nach 96-stündiger Exposition. Natriumhumat hat im selben Konzentrationsbereich einen proliferationsfördernden Effekt.

Membrantoxizität

Im Gegensatz zur Cytotoxizität ist die Membrantoxizität der Verbindungen sehr gering, so dass keine halbmaximalen Freisetzungswerte bestimmt werden können. Beim Vergleich der Testsubstanzen untereinander werden daher die 5%-Werte (RC_5) der Arachidonsäure-Freisetzung herangezogen, die sich auf eine 100%ige Freisetzung der Arachidonsäure durch SDS als Positivkontrolle beziehen. Die Membrantoxizität wird in der vorliegenden Arbeit in Abhängigkeit von der Temperatur und von der Zeit analysiert.

Nach einer Einwirkungszeit von einer Stunde und einem Temperaturanstieg von 4 °C auf 37 °C sind die Substanzen CMS-1 und CMS-2 bei der höheren Temperatur membrantoxischer. Anhand der Freisetzungskonzentration RC_5 ist ersichtlich, dass nach Temperaturanstieg wesentlich niedrigere Konzentrationen notwendig sind, um 5 % [3H]AA aus den U937-Zellen freizusetzen (Tab. 11). Diese erhöhte Freisetzung nach Temperaturanstieg lässt auf einen enzymvermittelten Mechanismus der [3H]AA-Freisetzung schließen. Die Substanzen S-Hya-15, THS-A1 und THS-A2 zeigen keinen Wirkungsunterschied nach Temperaturerhöhung.

Tabelle 11: *RC₅-Werte mit Konfidenzintervallen, ermittelt mit Hilfe des [³H]AA-Freisetzungstests, als Parameter für die Membrantoxizität der untersuchten Substanzen*

Substanz	RC ₅ 1h 4 °C (mg/ml)	RC ₅ 1h 37 °C (mg/ml)	RC ₅ 24h 37 °C (mg/ml)
S-Hya-15	> 22,0	> 22,0	> 22,0
CMS-1	> 30,0	8,90 (7,70 – 10,3)	> 30,0
CMS-2	> 30,0	0,82 (0,66 – 1,24)	> 30,0
THS-A1	0,92 (0,87 – 0,97)	1,06 (0,94 – 1,19)	1,49 (1,25 – 1,76)
THS-A2	1,47 (1,05 – 2,04)	2,06 (1,95 – 2,18)	2,03 (1,74 – 2,32)

Die Untersuchungen zur Membrantoxizität in Abhängigkeit von der Zeit zeigen ein anderes Ergebnis. Die Torfhuminsäuren sind gegenüber den anderen polyanionischen Verbindungen nach 24-stündiger Einwirkungszeit wesentlich toxischer, THS-A1 besitzt eine 20-fach, THS-A2 eine 15-fach höhere Membrantoxizität. Da Huminsäuren sowohl hydrophile als auch hydrophobe Bereiche im Molekül besitzen können, sind sie imstande, als oberflächenaktive Stoffe zu wirken (Quagliotto et al., 2006). Solche oberflächenaktive Substanzen weisen immer eine Membrantoxizität auf. Die sulfatierte Hyaluronsäure S-Hya-15 hat im untersuchten Konzentrationsbereich (bis 22,0 mg/ml) nach 24 Stunden Exposition die gleiche membrantoxische Wirkung auf U937-Zellen wie nach 1-stündiger Exposition (Tab. 11). Die einzigste Substanzklasse, die nach längerer Exposition eine geringere Membrantoxizität aufweist, sind die carboxymethylierten sulfatierten Hyaluronsäuren CMS-1 und CMS-2. Im Unterschied zu den anderen Testsubstanzen werden nach 24 Stunden 5 % [³H]AA durch eine wesentlich höhere Konzentration freigesetzt (CMS-1: 1h 37 °C 8,9 mg/ml und 24h 37 °C > 30,0 mg/ml; CMS-2: 1h 37 °C 0,82 mg/ml und 24h 37 °C > 30,0 mg/ml). Das bedeutet, dass die nach einer Stunde freigesetzte Arachidonsäure innerhalb von 24 Stunden wieder in die Membran eingebaut wird.

Werden die RC₅-Werte nach 24-stündiger Exposition vom niedrigsten zum höchsten Wert betrachtet, so ergibt sich für die Testsubstanzen folgende membrantoxische Rangfolge: THS-A1 > THS-A2 > S-Hya-15 > CMS-1 = CMS-2. THS-A1 mit dem kleinsten RC₅-Wert ist als am stärksten membrantoxisch zu bewerten.

Um den Cytotoxizitätstest mit dem Arachidonsäurefreisetzungstest nach 24 Stunden Exposition der Testsubstanzen vergleichen zu können, sind in Tabelle 12 die jeweils höchsten untersuchten Konzentrationen mit den entsprechenden Freisetzungs- bzw. Cytotoxizitätswerten dargestellt.

Tabelle 12: Testsubstanzen im Vergleich [³H]AA-Freisetzungstest und XTT-Tetrazoliumreduktionstest nach 24 h Exposition bei 37 °C

Substanz	höchste untersuchte Konzentration im [³H]AA-Test (mg/ml)	[³H]AA-Freisetzung (%)	XTT-Tetrazoliumreduktionstest CC₅₀ (mg/ml)
S-Hya-15	22	- 2,4 ± 1,4	20,1 (18,0 – 22,4)
CMS-1	30	2,2 ± 1,4	28,2 (23,4 – 34,1)
CMS-2	30	- 0,2 ± 2,5	10,3 (9,7 – 11,0)
THS-A1	3,12	6,3 ± 1,8	> 0,5
THS-A2	2,03	10,2 ± 2,2	> 0,5

Bei der höchsten untersuchten Konzentration von S-Hya-15 (22 mg/ml) beträgt die AA-Freisetzung maximal -2,4 % (nach 24 Stunden). Beim XTT-Tetrazoliumreduktionstest überleben bei derselben Konzentration nur 50 % aller Zellen (Tab. 12). Gleichermaßen verhält es sich bei CMS-1. Die Membrantoxizität steigt bis zur Konzentration von 30 mg/ml auf 2,2 % an. Im Cytotoxizitätstest XTT-Tetrazoliumreduktionstest sind bei dieser Konzentration bereits 50 % aller Zellen abgestorben. Die membrantoxische Wirkung der Testsubstanzen ist demnach geringer als ihre cytotoxische Wirkung.

Solch ein Ergebnis wurde auch schon in anderen Studien (Jelinek und Klöcking, 1998) erzielt. Zur Umwandlung des beim XTT-Tetrazoliumreduktionstest verwendeten Tetrazoliumsalzes in Formazan sind intakte Mitochondrien erforderlich, da das intrazelluläre Reduktionssystem (Succinat-Dehydrogenase) dort lokalisiert ist. Nach Eintritt des Zelltodes kommt es zur Inaktivierung der Mitochondrien, die metabolische Viabilität sinkt und die Reduktionsrate des Testsubstrates wird kleiner (Giersch, 1999). Um eine vollständige Lyse der Zellmembran zu erreichen, werden jedoch wesentlich höhere Substanzkonzentrationen als zur Inaktivierung der Mitochondrien benötigt. Je mehr Substanz zur Schädigung benötigt wird, desto geringer ist die Cytotoxizität.

6 Zusammenfassung

Gegenstand der vorliegenden Arbeit sind In-vitro-Untersuchungen zur Wirkung höhermolekularer polyanionischer Verbindungen auf die Blutgerinnung und auf die Vitalität von U937-Zellen.

Die verwendeten Testsubstanzen repräsentieren zwei Gruppen polyanionischer Verbindungen:

1. Sulfatierte Verbindungen (sulfatierte Hyaluronsäuren und carboxymethylierte sulfatierte Hyaluronsäuren)
2. Natürlich vorkommende Huminsäuren mit phenolischen Hydroxyl- und Carboxylgruppen

Ausgangssubstanz für die sulfatierten Verbindungen ist Hyaluronsäure bzw. ihr carboxymethyliertes Derivat. Durch Sulfatierung (mit SO_3/DMF -Komplex) entstehen die verwendeten sulfatierten Hyaluronsäureverbindungen. Die natürlichen Huminsäuren werden durch Alkaliextraktion und Säurefällung aus dem Altteicher Moor gewonnen.

Als Referenzsubstanzen für sulfatierte polyanionische Verbindungen dienen Heparin, Pentosanpolysulfat und Reviparin. Aldrich Huminsäure und Natriumhumat HD 80 werden als Vergleichspräparate für natürlich vorkommende Huminsäuren herangezogen.

Zur Ermittlung der **antikoagulierenden Aktivität** der Testsubstanzen werden die Thrombelastographie und die mittels Gerinnungsanalyse bestimmte Thrombinzeit (TZ) in Plasma und Fibrinogenlösung, die aktivierte partielle Thromboplastinzeit (aPTT) und die Prothrombinzeit (PT) herangezogen.

Mittels Thrombelastographie werden Veränderungen der Gerinnselfestigkeit in Abhängigkeit von der Zeit aufgezeichnet. Daraus lassen sich die Gerinnungszeit, die Dynamik der Gerinnselfestigkeit, die maximale Gerinnselfestigkeit sowie die Gerinnselfestigkeit-Stabilität bzw. Gerinnselfestigkeit-Auflösung ableiten. Als Parameter für eine gerinnungshemmende Wirkung wird die Reaktionszeit r herangezogen, die den Beginn der Gerinnung kennzeichnet. Eine Reaktionszeit größer als 60 min bedeutet, dass die Testsubstanz über mindestens 60 min die Gerinnselfestigkeit verhindert und somit antikoagulierend wirkt. Je niedriger die Konzentration der untersuchten Substanz ist,

mit der die Gerinnselbildung gehemmt wird, desto stärker ist ihre antikoagulierende Aktivität.

Folgende Rangordnung ergibt sich hinsichtlich der Wirkung:

S-Hya-15 > CMS-1 > CMS-2 > THS-A1 > THS-A2

Im Vergleich zum therapeutisch eingesetzten unfraktionierten Heparin (UFH) ist die antikoagulierende Wirkung der Testsubstanzen schwächer. Der Referenzsubstanz Pentosanpolysulfat (SP₅₄) ist die sulfatierte Hyaluronsäure in ihrer Wirkung überlegen.

Zur Verifizierung der in Humancitratplasma mittels Thrombelastographie gefundenen konzentrationsabhängigen Gerinnungsverzögerung dienen die Gruppentests TZ, aPTT und PT. Die **Thrombinzeit** gibt Aufschluss darüber, ob die Testsubstanz die Aktivität des Thrombins hemmt. Dazu werden die Substanzkonzentrationen bestimmt, die eine Verdopplung der TZ bewirken. Im Humancitratplasma führen 0,2 µg/ml UFH; 0,5 µg/ml S-Hya-15; 0,7 µg/ml CMS-1; 2,5 µg/ml CMS-2; 14,0 µg/ml SP₅₄; 19,5 µg/ml Ald-HS; 35,0 µg/ml NaHS; 121,9 µg/ml THS-A1 und 410,3 µg/ml THS-A2 zu einer Verdopplung der TZ gegenüber dem Leerwert.

Ein Vergleich mit den zur Verdopplung der TZ im plasmafreien System (in Fibrinogenlösung) erforderlichen Konzentrationen – ~ 2400 µg/ml UFH; 0,3 µg/ml S-Hya-15; 0,5 µg/ml CMS-1; 1,4 µg/ml CMS-2; ~ 2400 µg/ml SP₅₄; 28,9 µg/ml Ald-HS; 85,7 µg/ml NaHS; 382,9 µg/ml THS-A1 und 356,3 THS-A2 – macht deutlich, dass an der TZ-verlängernden Wirkung der Testsubstanzen Cofaktor wie AT III beteiligt ist. Eine Ausnahme bilden die beiden Referenzsubstanzen UFH und SP₅₄, deren Wirkung von der Anwesenheit eines Cofaktors abhängig ist.

Mit Hilfe der **aktivierten partiellen Thromboplastinzeit** ist eine Aussage über die Wirkung der Substanzen auf den endogenen Aktivierungsweg des plasmatischen Gerinnungssystems möglich. Die Untersuchungen ergeben folgende Rangfolge für die Wirksamkeit der Testsubstanzen:

UFH > SP₅₄ > CMS-1 > S-Hya-15 > CMS-2 > THS-A1 > THS-A2

Die stärkste Wirkung auf die Aktivität der Kontaktfaktoren Präkallikrein und hochmolekulares Kininogen sowie die Vorphasenfaktoren VIII, IX, XI und XII besitzen die beiden Vergleichssubstanzen UFH und SP₅₄. Den geringsten Einfluss haben die Vertreter der natürlichen Huminsäuren – THS-A1 und THS-A2.

Um den Einfluss der Testsubstanzen auf das exogene System zu überprüfen, wird die **Prothrombinzeit** bestimmt. Alle untersuchten Verbindungen verlängern konzentrationsabhängig die PT. Eine Verdopplung der Gerinnungszeit wird durch 8,6 µg/ml UFH; 13,8 µg/ml CMS-1; 13,9 µg/ml S-Hya-15; 28,2 µg/ml SP₅₄; 33,8 µg/ml CMS-2; 727,9 µg/ml THS-A2 und 2536,7 µg/ml THS-A1 bewirkt. Auf das exogene System wirkt Heparin stärker als alle getesteten Substanzen.

Die antikoagulierende Wirkung der polyanionischen Verbindungen kann durch Protaminsulfat im Verhältnis 1 : 2,2 CMS-1; 1 : 1,8 UFH; 1 : 1,2 SP₅₄; 1 : 1 S-Hya-15; 1 : 0,5 CMS-2; 1 : 0,4 Ald-HS; 1 : 0,3 NaHS neutralisiert werden. Die Wirkung der natürlichen Huminsäuren aus dem Alteicher Moor (THS-A1 und THS-A2) kann durch Protaminsulfat nicht vollständig aufgehoben werden.

Zur Beurteilung der **Zellverträglichkeit** der Prüfsubstanzen werden Untersuchungen zur Cytotoxizität, zur Proliferation und zur Membrantoxizität der Substanzen an U937-Zellen durchgeführt.

Als Kenngröße für die **Cytotoxizität** dient die mittels XTT-Tetrazoliumreduktionstest erhaltene halbmaximale cytotoxische Konzentration (CC₅₀). Nach einer Einwirkungszeit von 24 Stunden bei 37 °C zeigen die Testsubstanzen folgende Toxizitätsrangfolge: CMS-2 (CC₅₀ = 10,3 mg/ml) > S-Hya-15 > SP₅₄ > CMS-1 > UFH > Reviparin (CC₅₀ = 37,4 mg/ml). Die natürlichen Huminsäuren aus dem Alteicher Moor THS-A1 und THS-A2 wurden im gleichen Zellsystem untersucht und zeigten bis zur Konzentration von 0,5 mg/ml keine cytotoxische Wirkung.

Die stärkste **wachstumshemmende Wirkung** besitzen die sulfatierte Hyaluronsäure S-Hya-15 und die carboxymethylierte sulfatierte Hyaluronsäure CMS-1. Nach 96-stündiger Einwirkungszeit von 12,8 mg/ml sinkt die Anzahl der U937-Zellen im Vergleich zur Zellkontrolle um 97 % bzw. um 95 %. CMS-2 folgt mit 63 %. Im Gegensatz dazu ist UFH in der Lage, in den getesteten Konzentrationen 0,08 und 0,16 mg/ml das Wachstum der Zellen um 15 bis 30 % zu steigern.

Die **Membrantoxizität** der Verbindungen ist so gering, dass keine halbmaximalen [³H]AA-Freisetzungswerte bestimmt werden können. Als Kenngröße wird die RC₅ verwendet, um die Testsubstanzen untereinander vergleichen zu können. Es ergibt

sich folgende Rangfolge der getesteten Substanzen bei unterschiedlicher Temperatur und Einwirkungsdauer:

1h 4 °C: THS-A1 ($RC_5 = 0,92 \text{ mg/ml}$) > THS-A2 > S-Hya-15 > CMS-1 =
CMS-2 ($RC_5 > 30,0 \text{ mg/ml}$)

1h 37 °C: CMS-2 ($RC_5 = 0,82 \text{ mg/ml}$) > THS-A1 > THS-A2 > CMS-1 >
S-Hya-15 ($RC_5 > 22,0 \text{ mg/ml}$)

24h 37 °C: THS-A1 ($RC_5 = 1,49 \text{ mg/ml}$) > THS-A1 > S-Hya-15 > CMS-1 =
CMS-2 ($RC_5 > 30,0 \text{ mg/ml}$)

Die Verbindungen CMS-1 und CMS-2 sind bei 37 °C stärker membrantoxisch als bei 4 °C. Dies lässt auf einen enzymvermittelten Mechanismus schließen. Wird die Membrantoxizität in Abhängigkeit von der Einwirkungszeit betrachtet, ergibt sich die größte Toxizität für die natürlichen Huminsäuren aus dem Alteicher Moor THS-A1 und THS-A2 nach 24 Stunden. Die carboxymethylierten sulfatierte Hyaluronsäuren CMS-1 und CMS-2 ermöglichen als einzige getestete Substanzen den Wiedereinbau der freigesetzten Arachidonsäure in die Membran innerhalb von 24 Stunden. Der RC_5 -Wert ist nach 24-stündiger Einwirkungszeit 7 - 30fach größer als nach einer Stunde.

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass alle untersuchten Substanzen eine antikoagulierende Wirkung in vitro besitzen. Im Hinblick auf die geringe Cytotoxizität der sulfatierten und carboxymethylierten sulfatierten Hyaluronsäuren und auf die AT III-unabhängige antikoagulierende Aktivität könnten sie die herkömmliche Antikoagulantien-Therapie sinnvoll ergänzen, so z. B. bei Heparin-Resistenzen und AT III-Mangel. Auch für die Oberflächenbeschichtung von Membranen für die Hämodialyse bietet sich ihr Einsatz an. Ein besonderer Vorteil von S-Hya gegenüber Heparin besteht in der biotechnologischen Herstellung von Hyaluronsäure, so dass eine Kontaminierung mit Viren und pathogenen Keimen ausgeschlossen werden kann. Die Carboxymethylierung besitzt in chemischer Hinsicht den Vorteil, dass an die Carboxymethylgruppen andere Wirkstoffe gebunden werden können. Unter pharmakologischem Aspekt sind sie den sulfatierten Hyaluronsäuren gleichzustellen.

7 Literatur

Abatangelo G, Barbucci R, Brun P, Lamponi S (1997) Biocompatibility and enzymatic degradation studies on sulphated hyaluronic acid derivatives. *Biomaterials* 18: 1411-1415

Alban S (2003) Das Vorsichtsprinzip und seine Auswirkungen im Bereich der Medizin. *Krankenhauspharmazie* 24: 367-373

America Type Culture Collection (1992) Cell lines/Hybridomas. Catalogue Rockville MD USA 7th edition

Barbucci R, Benvenuti M, Casolaro M, Lamponi S, Magnani A (1994) Sulfated hyaluronic acid as heparin-like material: physicochemical and biological characterisation. *J Mater Sci Mater Med* 5: 830-833

Barbucci R, Lamponi S, Magnani A, Renier D (1998) The influence of molecular weight on the biological activity of heparin like sulphated hyaluronic acids. *Biomaterials* 19: 801-806

Barbucci R, Magnani A, Casolaro M, Marchettini N, Rossi C, Bosco M (1995) Modification of hyaluronic acid by insertion of sulphate groups to obtain a heparin like molecule. Part 1 Characterization and behaviour in aqueous solution towards H⁺ and Cu²⁺ ions. *Gac Chim Ital* 125: 169-180

Barbucci R, Magnani A, Lamponi S, Albanese A (1996) Chemistry and biology of glycosaminoglycans in blood coagulation. *Polym Adv Tech* 7: 675-685

Bloom E, Sznitowaska M, Polansky J, Ma ZD, Maibach HI (1994) Increased proliferation of skin cells sublethal doses of sodium dodecyl sulfate. *Dermatology* 188: 253-258

Bronstein IN, Semendjajew KA (1981) Taschenbuch der Mathematik. 20. Aufl. Grosche G und Ziegler V (Hrsg.) Teubner Verlagsgesellschaft Leipzig, S. 74-77, 724-727

Brosin A, Wolf V, Mattheus A, Heise H (1997) Use of XTT-assay to assess the cytotoxicity of different surfactants and metal salts in human keratinocytes (HaCaT). *Acta Derm Venereol (Stockh.)* 77: 26-28

Comley JC, Turner CH (1990) Potential of a soluble tetrazolium formazan assay for the evaluation of flarial viability. *Int J Parasitol* 20: 251-255

Cory AH, Owen TC, Barltrop JA, Cory JG (1991) Use of an aqueous soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth assay in culture. *Cancer commun* 3: 207-212

Cuming AM, Jones GR, Wensley RT, Cundall RB (1986) In vitro neutralization of heparin in plasma prior to the activated partial thromboplastin time test: an assessment of four heparin antagonists and two anion exchange resins. *Thromb Res* 41: 43-56

De Leo VA, Harber LC, Kong BM and De Salva SJ (1987) Surfactant induced alteration of arachidonic acid metabolism on mammalian cells in culture. *Proc Soc Exp Biol Med* 184: 477-482

Denizot F, Lang R (1986) Rapid colorimetric assay for cell growth survival. *J Immunol Methods* 89: 271

Fonteh AN, Bass DA, Marshall LA, Seeds M, Samet JM, Chilton FH (1994) Evidence that secretory phospholipase A2 plays a role in arachidonic acid release and eicosanic biosynthesis by mast cells. *J Immunol* 15: 45438-45446

Forth W, Henschler D, Rummel W, Förstermann U, Starke K (2001) *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie*. Urban & Fischer München, Jena, 8. vollständig überarbeitete Aufl., S. 564

Gettings SD, McEwen GN Jr (1990) Development of potential alternatives to the Draize eye test: The CTFA evaluation of alternatives program. *ATLA* 17: 317-324

Giersch S (1999) Untersuchungen zur Zytotoxizität von Antiseptika an U937- und HaCaT-Zellen mit dem XTT-Tetrazoliumreduktionstest. Diplomarbeit Halle/Erfurt

- Grant RL**, Yaa C, Gabaldon D, Acosta D (1992) Evaluation of surfactans cytotoxicity potential by primary cultures of ocular tissues: Characterization of rabbit corneal epithelial cells and initial injury and delayed toxicity studies. *Toxicol* 76: 153-176
- Groven MD** (2006) Peat Therapeutics and Balneotherapy. In: Pizzorno JE jr., Murray MT (Eds.) *Textbook of Natural Medicine*, 3rd Edition, Volume 1. Churchill Livingstone Elsevier, Amsterdam [et al.], pp. 475-486
- Guenicke A**, Ponec M (1993) Use of human skin cell cultures for the estimation of potential skin irritants. *Toxikol in Vitro* 7 (1): 15-24
- Haas S** (2004) Medikamentöse Thromboembolieprophylaxe und -therapie. *Pharm. Unserer Zeit* 33: 182-189
- Hansen MB**, Nielson SE, Berg K (1989) Re-examination and further development of a precise and rapid dye method for measuring cell growth/cell kill. *J Immunol Methods* 119: 203-210
- Harder S**, Breddin HK (2004) Antikoagulanzen im Überblick. *Pharm. Unserer Zeit* 33: 172-180
- Harder S**, Thurmann P (1996) Clinically important drug interactions with anticoagulants. An update. *Clin Pharmacokinet* 30: 416-444
- Hartert H** (1948) Blutgerinnungsstudien mit der Thrombelastographie, einem neuen Untersuchungsverfahren. *Klin Wschr* 26: 577-583
- Hartert H** (1952) Klinische Blutgerinnungsstudien mit der Thrombelastographie. *Dtsch Arch Klin Med* 199: 284-292, 293-311, 402-437
- Hartert H** (1955) Zur thrombelastographischen Kontrolle der Thromboembolieprophylaxe- und therapie. *Z Klin Med* 153: 423-437
- Helbig B**, Klöcking R, Hänninen K (1994) Phenolkörperpolymerisate als Modellsubstanzen für natürliche Huminsäuren: Darstellung und vorläufige Charakterisierung. *TELMA* 24: 131-142

Hiller E, Riess H (1988) Hämorrhagische Diathese und Thrombose.

Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart, S. 300-311

Hirsh J, Warkentin TE, Shaughnessy SG, Anand SS, Halperin JL, Raschke R,

Granger C, Ohman EM, Dalen JE (2001) Heparin and low-molecular-weight heparin: mechanism of action, pharmacokinetics, dosing, monitoring, efficacy and safety. *Chest* 119: 64-94

Höll (2004) „Große Peloidanalyse“ des Torfmaterials aus der Torflagerstätte „Altteicher Moor“. Bad Elster, Gutachten vom 14.12.2004

Hoffmann K (1995) Der [³H]Arachidonsäure-Freisetzungstest zur Bewertung der Zytomembrantoxizität von Kunststoffartikeln und Biomaterialien. Dissertation, Medizinische Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität Jena

Jaenecke J (1996) Antikoagulanzen- und Fibrinolysetherapie. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York, S. 53-75

Jelinek A (1996) Einfluss von profibrinolytisch wirksamen Substanzen auf die Proliferation und Vitalität von U937-Zellen. Diplomarbeit Greifswald/Erfurt

Jelinek A, Klöcking HP (1998) In vitro toxicity of surfactants in U937 cells: Cell membrane integrity and mitochondrial function. *Exp Toxic Pathol* 50: 472-476

Johann S, Zoller C, Haas S, Blümel G, Lipp M, Förster R (1995) Sulfated polysaccharide anticoagulants suppress natural killer cell activity in vitro. *Thromb Haemost* 74: 998-1002

Kanabar V, Hirst SJ, O'Connor BJ, Page CP (2005) Some structural determinants of the antiproliferative effect of heparin-like molecules on human airway smooth muscle. *Br J Pharmacol* 146: 370-377

Karen L, Benfield G, Benfield P (1994) Hyaluronic acid. Auckland, New Zealand, Adis International Limited, pp. 536-566

KeBler S (2000) Untersuchungen zum Einfluss von sulfatierten Hyaluronsäuren und biotechnologisch hergestellter Hyaluronsäure auf die Blutgerinnung in vitro sowie zur Zellverträglichkeit an U937- und HaCaT-Zellen. Diplomarbeit, Mathematisch-Naturwissenschaftlich-Technische Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

Kirsch F (2002) Verfahrenstechnische Untersuchungen zur Verarbeitung von Torfen. Diplomarbeit, Fachhochschule für Technik, Wirtschaft und Sozialwesen, Zittau/Görlitz, 73 S.

Kleinschmidt J (1988) Moorthherapie bei rheumatischen Erkrankungen. In: Flaig W, Goecke C, Kauffels W (Hrsg.) Moorthherapie: Grundlagen und Anwendungen. Ueberreuter-Wissenschaftliche-Verlagsgesellschaft mbH, Wien, Berlin, S. 216-224

Klöcking HP (1981) Erfassung von Hämostasestörungen durch Fremdstoffe. In: Klöcking HP (Hrsg.) Ergebnisse der experimentellen Medizin, Bd. 38, Toxische Beeinflussung der Hämostase. VEB Verlag Volk und Gesundheit, Berlin, S. 99-118

Klöcking HP (1990) Pharmacological stimulation of t-PA release in rats. Fibrinolysis 4 (2): 45-46

Klöcking HP (1991) Influence of natural humic acids and synthetic phenolic polymers on fibrinolysis. In: Allard B, Boren H, Grimvall A (Eds) Humic Substances in the Aquatic and Terrestrial Environment Springer, Berlin, Heidelberg, New York, London, Paris, Tokyo, Hongkong, Barcelona, pp. 423-428

Klöcking HP (1991a) Stimulation of t-PA release by polyanionic compounds in vivo. In: Nagy I, Losonczy H, Vinazzer H (Eds.) Thrombosis and Haemorrhagic Disorders. Schmitt & Meyer, Würzburg, pp. 355-358

Klöcking HP (1994) Arachidonic acid release as a measure of membrane toxicity. Invitox protocol Number 87, ERGATT/FRAME Data-Bank of In Vitro Techniques in Toxicology, Nottingham, registered June 1994

Klöcking HP (1994a) Influence of humic acids and humic acid-like polymers on fibrinolytic and coagulation system. In: Senesi N, Miano TM (Eds.) Humic Substances in the Global Environment and Implications on Human Health. Elsevier, Amsterdam, London, New York, Tokyo, pp. 1337-1340

Klöcking HP (2002) Pharmakologie des Blutes. In: Frey HH, Löscher W (Hrsg.) Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie für die Veterinärmedizin. Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart, 2. völlig neu bearbeitete Aufl., S. 199-217

Klöcking HP, Eigenwillig K, Klöcking R (1994) Studies on temperature dependence and reversibility of xenobiotic-induced membran lesions. Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol 349: R 112

Klöcking HP, Helbig B, Klöcking R (1994a) Einfluss von Stoffen vom Huminsäuretyp auf die Hämostase. TELMA 24: 153-156

Klöcking HP, Hoffmann K, Klöcking R (1994b) Studies on cell membrane toxicity of plastic labware. Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol, Suppl. to Volume 350: R 10

Klöcking R, Hoffmann R, Mücke D (1968) Tierexperimentelle Untersuchungen zur entzündungshemmenden Wirkung von Humaten. Arzneimittelforschung 18: 941-942

Klöcking HP, Hoffmann K, Reif S, Klöcking R (1995) Determination of the cell membrane toxicity of biomaterials using the [³H]arachidonic acid release in U937 cells. Eur J Cell Biol, Suppl. to Volume, p. 171

Klöcking HP, Hoffmann A, Reif S, Klöcking R (1998) Anwendung des [³H]Arachidonsäurefreisetzungstests für die Prüfung von Biomaterialien. In: Schöffl H, Spielmann H, Tritthart HA (Hrsg.) Ersatz- und Ergänzungsmethoden zu Tierversuchen. Springer, Wien, New York, Band 5, S. 114-122

Klöcking HP, Klöcking R (1986) Einfluss von Phenolkörperpolymerisaten auf das Gerinnungs- und Fibrinolyse-system. In: Werner E, Heinze W, Wilsdorf G (Eds.) 100 Jahre Veterinärpharmakologie. Berlin VEB Kongress- und Werbedruck, Oberlungwitz, S. 217-224

Klöcking HP, Klöcking R, Helbig B (1984) Effect of phenol polymers on the release of plasminogen activators. *Farmakol i Toksikol* 47: 93-95 [russ.]

Klöcking HP, Klöcking R, Helbig B (1992) Release of plasminogen activator by natural humic acids and synthetic phenolic polymers. *Int Peat J* 4: 105-109

Klöcking HP, Möller S, Müller PJ (1998a) Anticoagulant and profibrinolytic effects of high-sulphated hyaluronic acid. *Arch Pharm Pharm Med Chem* 331 Suppl 2: 68

Klöcking HP, Schlegelmilch U, Klöcking R (1994c) Assessment of membrane toxicity using [³H]-AA release in U937 cells. *Toxicol In Vitro* 8: 775-777

Klöcking HP, Schlegelmilch U, Klöcking R (1995) [³H]-arachidonic acid release as an alternative to the eye irritation test. In: Weisse I, Hockwin O, Green K, Tripathi RC (Eds.) *Ocular Toxicology* New York, Plenum Press, pp 225-261

Klöcking HP, Wangemann D, Klöcking R (1996) The influence of LMW heparins and heparinoids on cell membrane integrity. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 353: R 122

Kühn S (2005) Untersuchungen zum Mechanismus der UV-B-protektiven Wirkung von Huminsäuren in vitro. Dissertation, Mathematisch- Naturwissenschaftlich- Technische Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

Lachmann H (1964) Die Möglichkeiten der Heilmoor-Schwebstoff-Therapie. In: Bericht über den 8. Internationalen Kongress für universelle Moor- und Torfforschung, 5.-10. Oktober 1962 in Bremen, Länderverlag, Linz, S. 115-116

Magnani A, Albanese A, Lamponi S, Barbucci R (1996) Blood-interaction performance of differently sulphated hyaluronic acids. *Thromb Res* 81: 383-395

Mahr N (2003) Einfluss von sulfatierten Hyaluronsäuren, natürlichen Huminsäuren und synthetischen Huminsäure-ähnlichen Polymeren auf das Gerinnungssystem. Dissertation, Mathematisch-Naturwissenschaftlich-Technische Fakultät der Martin Luther-Universität Halle-Wittenberg

Möller S, Klöcking HP, Müller PJ, Ozegowski JH (1998) Verfahren zur Herstellung hochsulfatierter Hyaluronsäuren. Offenlegungsschrift DE 198 13 234 A1 vom 26.03.1998

Möller S, Schmidtke M, Schnabelrauch M, Wutzler P (2005) Antivirale Kombinationen sowie ihre Verwendung. Patent-Nr. DE 102005004643 A1, angemeldet am 28.01.2005, Offenlegung am 10.8.2006

Mosmann T (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assay. *J Immunol Methods* 65: 55-63

Müller-Decker K, Fürstenberger G, Marks F (1994) Keratinocyte-derived proinflammatory key mediators and cell viability as in vitro parameters of irritancy: a possible alternative to the Draize skin irritation test. *Toxicol Appl Pharmacol* 127, 99-108

Navara V (2001) Einfluss von natürlichen Huminsäuren und synthetischen huminsäureähnlichen Polymeren auf die Blutgerinnung. Dissertation, Medizinische Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität Jena

Oldenburg J (2006) Aktuelle und zukünftige Entwicklungen in der Hämostaseologie. *Hämostaseologie* 26: 13-21

Paull KD, Shoemaker RH, Boyd MR, Parson JL, Risbood PA, Barbera WA (1988) The synthesis of XTT: a new tetrazolium reagent bio-reducible to a water-soluble formazan. *J Heterocyclic Chem* 5: 911- 914

Pindur G, Pindur U (1991) Klinische Chemie und serologische Laboratoriumsdiagnostik für Pharmazeuten und Mediziner. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart

Priegnitz H (1986) Wasserkur und Badelust. Leipzig: Koehler & Amelang, S. 174-175

Quagliotto P, Montoneri E, Tambone F, Adani F, Gobetto R, Viscardi G (2006) Chemicals from wastes: compost-derived humic acid-like matter as surfactant. *Environ Sci Technol* 40(5): 1686-1692

Racanelli A, Fareed J, Walenga JM, Coyne E (1985) Biochemical and pharmacologic studies on the protamine interactions with heparin, its fractions and fragments. *Semin Thromb Haemost* 11: 176-189

Rappaport H (1966) Atlas of Tumor Pathology, section III. *Armed Forces Pathol* 6: 97-161

Reif S (2003) Optimierung des [³H]Arachidonsäure-Freisetzungstests in U937-Zellen und seine Anwendung zur Testung von Biomaterialien. Promotion Med. Fakultät Friedrich-Schiller-Universität Jena

Renzi D, Valtoloina M, Forster R (1993) The evaluation of a multi-endpoint cytotoxicity assay system. *ATLA* 21: 89-96

Resch KL, Dorer B (2005) Medizinisch-Balneologische Begutachtung des Badetorfs aus dem Vorkommen „Altteicher Moor“. Bad Elster

Rinne H, Ickler G (1986) Grundstudium Statistik. Verlag für Wirtschaftsskripten, München, S. 145

Salooja N, Perry DJ (2001) Thrombelastography. *Blood Coagul Fibrinol* 12: 327 – 337

Saurbier B, Bode C (2005) Antikoagulanzen und Thrombolytika beim akuten Koronarsyndrom. *Hämostaseologie* 25: 333-344

Schlegelmilch U (1993) Untersuchung der [³H]Arachidonsäure-Freisetzung von U937-Zellen zum Nachweis membrantoxischer Substanzen. Medizinische Dissertation, Medizinische Hochschule Erfurt

Schlegelmilch U, Klöcking R, Müller WEG, Klöcking HP (1993) Die [³H]Arachidonsäure-Freisetzung von U937-Zellen ist ein empfindlicher Bioindikator für die Membrantoxizität von Umweltchemikalien. *Acta Academiae Scientiarum* 2: 352-361

Scudiero D (1988) Evaluation of a soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth and drug sensitivity in culture using human and other tumor cell lines. *Cancer Res* 48: 4827

Scully MF, Ellis V, Kakkar VV (1987) Comparison of the molecular mass dependency of heparin stimulation of heparin cofactor II: thrombin interaction to antithrombin III: thrombin interaction. *Thromb Res* 46: 491-502

Shaw AJ (1994) Defining cell viability and cytotoxicity. *ATLA* 22: 124-126

Siedeck H, Hammerl H, Henk W (1960) Behandlungen von Erkrankungen des Magen-Darm-Traktes mit Trinkmoor. Bericht über den 7. Internationalen Kongress für universelle Moorforschung vom 15.-19. September 1960 in Frantiskoy Lazne, CSFR

Spannagl G, Moessmer G (2006) Hämostaseologische Globalteste. *Hämostaseologie* 26: 27-37

Spaethe R, Kolde HJ (1992) Hämostase - Physiologie, Pathophysiologie, Therapie, Diagnostik, Teil A u. B (Hrsg.: Baxter Deutschland GmbH) Kurt Fell GmbH, Grafischer Betrieb, Gräfelfing

Stark DM, Shopis C, Borenfreund E, Walberg J (1983) Alternative approaches to the Draize assay: Chemotaxis cytology, differentiation and membrane transport studies. In: Goldberg AM (Ed.) *Alternative methods in Toxicology 1: Product Safety Evaluation*. Liebert, New York, pp. 179-203

Sundstrom C, Nilson K (1974) Establishment and characteristics of two unique cell lines from patients with lymphosarcoma. *Int J Cancer* 13: 808-823

Tada HJ, Shiho O, Kuroshima K, Koyama M, Tsukamoto K (1986) An improved colorimetric assay for interleukin 2. *J Immunol Methods* 93: 157-165

Tan SW, Johns MR, Greenfield PF (1990) Hyaluronic acid – a versatile biopolymer. *Aust J Biotechnol* 4: 38-43

Ushijima H, Kunisada T, Ami Y, Tsuchi H, Takahashi J, Klöcking HP, Müller WEG (1992) Characterization of human immunodeficiency virus-1-infected cells of myeloid-monocytic lineage (ML-1, HL-60, THP-1, U937). *J Acquir Immune Defic Syndr* 5: 1001-1004

Valentini H (1998) Untersuchungen zur Bewertung potentieller Augenreizstoffe mit dem [³H]Arachidonsäure-Freisetzungstest an U937-Zellen. Dissertation, Biologisch-Pharmazeutische Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität Jena

Valentini H, Klöcking HP and Klöcking R (1996) Influence of eye irritating chemicals on the [³H]-arachidonic acid release in U937 cells. Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol 254: R 30

Villanueva GB (1984) Predictions of the secondary structure of antithrombin III and the location of the heparin-binding site. J Biol Chem: 2531-253

Vinazzer H (1972) Gerinnungsstörungen in der Praxis. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, S. 43

Wada T, Chirachanchai S, Izawa N, Inaki Y, Takemonto K (1994) Synthesis of sulfonated hyaluronan derivatives containing nucleic acid bases. Chem Lett: 2027-2030

Zsunshuj V, Tschén P, Njanzy L, Sjaona T (1981) Untersuchung des antiphlogistischen Effekts von Huminsäuren. In: Plötner G, Weber U (Hrsg.) Torf in der Medizin: Symposium der Kommission VI der IMTG, Bad Elster, S. 268-285

Danksagung

Ich möchte mich ganz besonders bei Herrn Prof. Dr. Dr. H.-P. Klöcking, Institut für Pharmakologie und Toxikologie/Bereich Erfurt der Friedrich-Schiller-Universität Jena, für die Überlassung des interessanten Themas, die intensive Betreuung und die anregenden Gedanken für die Diskussion bedanken. Frau Prof. Dr. R. Klöcking, Institut für Virologie und Antivirale Therapie der Friedrich-Schiller-Universität Jena, danke ich für die wissenschaftliche Beratung insbesondere zum Thema Humin-säuren.

Frau Dr. Möller und Herrn Schnabelrauch, Innovent e.V. Jena, danke ich für die Bereitstellung der Testsubstanzen einschließlich der physikalisch-chemischen Daten. Frau PD Dr. Krause, Naturwissenschaftliche Fakultät I (Biowissenschaften) Institut für Pharmazie, danke ich ebenfalls für die Betreuung der Dissertation.

Außerdem danke ich den Mitarbeitern des Blutgerinnungslabors Helios-Klinikum Erfurt unter der Leitung von Frau Lobers, die mir zuverlässig und schnell die Blutproben von Spendern lieferten. Für die Unterstützung bei der statistischen Auswertung möchte ich mich herzlich bei Herrn Rösiger bedanken.

Mein größter Dank gilt meiner Familie, insbesondere meinem Mann Christian. Er hat mir immer den Rücken freigehalten und mir Mut und Kraft zum Gelingen dieser Arbeit gegeben. Ohne die Unterstützung meiner Familie und meiner Freunde, ihre stetige Motivation und Geduld wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

Lebenslauf

Name: Susanne Kunze, geb. Keßler
Geburtstag: 31.03.1976
Geburtsort: Friedrichroda
Familienstand: verheiratet
Anschrift: Lauchgrundstraße 60
99891 Tabarz

09/1982 - 07/1990 Polytechnische Oberschule „Theodor Neubauer“ in Tabarz
09/1990 - 06/1994 Körnberg-Gymnasium in Friedrichroda
06/1994 Abitur
10/1994 - 04/1999 Studium der Pharmazie an der Friedrich-Schiller-Universität
(FSU) Jena
04/1999 II. Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung
04 - 09/1999 Anfertigung einer Diplomarbeit am Institut für Pharmakologie
und Toxikologie/Bereich Erfurt der Friedrich-Schiller-
Universität Jena unter Leitung von Herrn Prof. Dr. Dr. H.-P.
Klöcking
10/1999 – 03/2000 Praktikum in der Osswaldschen Apotheke in Arnstadt
02/2000 Abschluss der Diplomarbeit
05/2000 III. Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung und Erteilung der
Approbation als Apothekerin
05/2000 – 12/2004 Vertretungsapothekerin im gesamten Bundesgebiet
02/2005 – 09/2006 Lehrkraft am IFBE-Bildungszentrum Thüringen-Nordhessen
in Erfurt
seit 01/2005 stellvertretende Apothekenleiterin der Berg-Apotheke in
Tabarz
seit 09/2004 Referentin im Auftrag der Landesapothekerkammer Thüringen
seit 07/2006 Beratungsapothekerin im Rahmen qualifizierter Tests der
ZETA® Thüringen

09/2001 – 09/2006 Experimentelle Untersuchungen im Rahmen der
Promotionsarbeit am Institut für Pharmakologie und
Toxikologie/Bereich Erfurt der Friedrich-Schiller-Universität
Jena unter Leitung von Herrn Prof. Dr. Dr. H.-P. Klöcking

Tabarz, den 20. November 2006

Erklärung

Die hier vorliegende Arbeit wurde seit September 2001 von Frau PD Dr. E. Krause, Institut für Pharmakologie und Toxikologie für Naturwissenschaftler der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, als Mitglied der Naturwissenschaftlichen Fakultät I (Biowissenschaften) der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg betreut.

Tabarz, den 20. November 2006

Selbstständigkeitserklärung

Ich erkläre, dass ich die an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg zur Promotion eingereichte Dissertation mit dem Titel:

In-vitro-Untersuchungen zur Zellverträglichkeit und antikoagulierenden Wirkung von carboxymethylierten und nicht carboxymethylierten sulfatierten Hyaluronsäuren und natürlichen Huminsäuren

unter der Leitung von
Prof. Dr. med. habil. Dr. rer. nat. H.-P. Klöcking

selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst und andere als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt habe. Die in den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen wurden als solche kenntlich gemacht.

Tabarz, den 20. November 2006

Erklärung

Ich habe bisher an keiner in- oder ausländischen Fakultät ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht und die vorliegende Arbeit noch nicht als Dissertation vorgelegt.

Tabarz, den 20. November 2006