

**In-vitro-Toxizität grenzflächenaktiver Substanzen:
Wirkung auf Zellmembran, mitochondriale Funktion und
Apoptose**

Dissertation

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

vorgelegt der

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

von Frau Antje Jelinek

geb. am: 21.06.71 in: Arnstadt

Gutachterin bzw. Gutachter:

1. Prof. Dr. Dr. Hans-Peter Klöcking
2. Prof. Dr. Wolfgang Wohlrab
3. PD Dr. Eva Krause

Halle (Saale), den 08.10.2001

Inhaltsverzeichnis

| | |
|---|-----------|
| 1. Einleitung | 1 |
| 2. Materialien..... | 6 |
| 2.1. Zellen..... | 6 |
| 2.1.1. U937-Zellen | 6 |
| 2.1.2. HaCaT-Zellen..... | 7 |
| 2.2. Geräte und Hilfsmittel | 8 |
| 2.3. Chemikalien und Testkits..... | 9 |
| 2.4. Testsubstanzen | 9 |
| 3. Methoden | 11 |
| 3.1. Arachidonsäure-Freisetzungstest (AART) | 11 |
| 3.1.1. Allgemeines | 11 |
| 3.1.2. Testdurchführung..... | 13 |
| 3.1.3. Berechnungen..... | 14 |
| 3.2. Zytotoxizitätsbestimmung | 16 |
| 3.2.1. XTT-Test EZ4U..... | 16 |
| 3.2.1.1. Testdurchführung..... | 17 |
| 3.2.1.2. Berechnungen..... | 19 |
| 3.2.1.3. Untersuchungen zum XTT-Test | 20 |
| 3.2.2. Trypanblaufärbung..... | 22 |
| 3.3. Apoptoseuntersuchung..... | 23 |
| 3.3.1. Allgemeines | 23 |
| 3.3.2. Nachweis Histon-assoziiertes DNA-Fragmente mittels ELISA-Test .. | 25 |
| 3.3.2.1. Testdurchführung..... | 26 |
| 3.3.2.2. Auswertung | 27 |
| 3.3.3. Durchflusszytometrische Bestimmungen | 28 |
| 3.3.3.1. Testdurchführung..... | 28 |
| 3.3.3.2. Auswertung | 29 |
| 3.4. Weitere Methoden | 30 |
| 3.4.1. Vergleich von AART und Zytotoxizität..... | 30 |
| 3.4.1.1. Zytotoxizität bei der minimal toxischen Konzentration..... | 30 |
| 3.4.1.2. Zytotoxizität unter den Versuchsbedingungen des AART | 30 |

| | |
|--|------------|
| 3.4.1.3. Zytotoxizität nach Durchführung des AART | 31 |
| 3.4.2. Morphologische Beurteilung der Zellen | 32 |
| 3.4.3. Statistik | 32 |
| 4. Ergebnisse | 33 |
| 4.1. Nichtionische Tenside | 33 |
| 4.1.1. Macrogolcetylstearylether | 33 |
| 4.1.1.1. Brij [®] 78 | 33 |
| 4.1.1.2. Cremophor [®] A25 | 44 |
| 4.1.1.3. Romulgin [®] N..... | 48 |
| 4.1.2. Macrogol octylphenylether – Triton [®] X-100 | 49 |
| 4.1.3. Macrogolsorbitanfettsäureester - Polysorbat 80..... | 60 |
| 4.1.4. Macrogolglycerolricinoleat – Cremophor [®] EL | 71 |
| 4.1.5. Poloxamer [®] 188 | 93 |
| 4.1.6. Macrogol 6000 | 100 |
| 4.2. Anionische Tenside..... | 101 |
| 4.2.1. Alkylsulfate | 101 |
| 4.2.1.1. Natriumdodecylsulfat..... | 101 |
| 4.2.1.2. Natriumcetylstearylsulfat | 113 |
| 4.2.2. Alkylethersulfat – Natriumdodecylethersulfat | 118 |
| 4.3. Kationische Tenside..... | 129 |
| 4.3.1. Benzalkoniumchlorid | 129 |
| 4.4. Amphotere Tenside..... | 144 |
| 4.4.1. Cocamidopropylbetain | 144 |
| 4.4.2. Sojalecithin..... | 156 |
| 4.5. Gegenüberstellung der untersuchten Tenside | 160 |
| 4.5.1. Zytotoxizität | 160 |
| 4.5.2. Membrantoxizität..... | 165 |
| 4.5.3. Vergleich von Zytotoxizität und [³ H]Arachidonsäure-Freisetzung.. | 169 |
| 4.5.4. Apoptose und morphologische Zellveränderungen | 170 |
| 5. Diskussion | 171 |
| 6. Zusammenfassung..... | 212 |
| 7. Literatur | 215 |

Abbildungsverzeichnis

| | |
|---|----|
| Abb. 1: U937-Zellen, 360fach vergrößert..... | 6 |
| Abb. 2: HaCaT-Zellen sieben Tage nach Einsaat, 180fach vergrößert | 7 |
| Abb. 3: Fluid mosaic Modell der Zellmembran nach [21]..... | 11 |
| Abb. 4: Strukturformel eines Phosphoglycerides | 12 |
| Abb. 5: Strukturformel der Arachidonsäure..... | 12 |
| Abb. 6: Niedrig-Energie-Konformation der Arachidonsäure nach [184]..... | 12 |
| Abb. 7: Schema zum Einbau der Arachidonsäure in Phosphoglyceride nach [184]..... | 13 |
| Abb. 8: Strukturformel von XTT | 16 |
| Abb. 9: Umsetzung von Tetrazoliums Salzen zu Formazanen | 17 |
| Abb. 10: U937-Zellen nach 15 Minuten mit XTT-Substrat (200fach vergrößert) | 18 |
| Abb. 11: U937-Zellen nach 2 Stunden mit XTT-Substrat (lebend; 200fach vergrößert) | 18 |
| Abb. 12: U937-Zellen nach 2 Stunden mit XTT-Substrat (tot; 200fach vergrößert)..... | 18 |
| Abb. 13: Mikrotiterplatte mit U937-Zellen nach Testdurchführung..... | 19 |
| Abb. 14: Zytotoxizität von Cremophor [®] EL an HaCaT-Zellen – Einfluss der 2-stündigen Inkubation bei Test- durchführung (n = 5, p ≤ 0,05) | 20 |
| Abb. 15: HaCaT-Zellen; links unbehandelt; rechts nach 2-stündiger Exposition mit XTT-Substrat, 20 Stunden nach Entfernung des XTT-Substrates (100fach vergrößert) | 21 |
| Abb. 16: Zytotoxizität von Cremophor [®] EL und XTT-Substrat an HaCaT-Zellen (n = 5, p ≤ 0,05)..... | 21 |
| Abb. 17: U937-Zellen nach Trypanblaufärbung in der Bürker-Zählkammer (360fach vergrößert) | 22 |
| Abb. 18: Testprinzip des ELISA zur Bestimmung Histon-assoziiierter DNA-Fragmente | 27 |
| Abb. 19: Dotplot der Zellkontrolle b..... | 29 |
| Abb. 20: Zytotoxizität von Natriumdodecylsulfat unter den Versuchsbedingungen des AART (n = 6) und des Zytotoxizitätstests mit EZ4U (n = 14) | 31 |
| Abb. 21: Zytotoxizität von Triton [®] X-100 im Zytotoxizitätstest mit EZ4U (n = 14) und nach Durchführung des AART (n = 3) | 32 |
| Abb. 22: Strukturformel von Brij [®] 78 | 33 |
| Abb. 23: Zytotoxizität von Brij [®] 78 an HaCaT-Zellen (n = 13) und U937-Zellen (n = 15) nach 1 und 24 Stunden Exposition bei 37°C | 34 |
| Abb. 24: Zytotoxizität von Brij [®] 78 an U937- Zellen nach 1 und 24 Stunden Exposition bei 37°C – Trypanblau- färbung (n = 15) im Vergleich zum XTT-Test (n = 15) | 35 |
| Abb. 25: [³ H]Arachidonsäure-Freisetzung durch Brij [®] 78 an U937-Zellen nach 1 und 24 Stunden Exposition bei 4°C (n = 9) und 37°C (n = 12) | 36 |
| Abb. 26: Anreicherungsfaktor Histon-assoziiierter DNA-Fragmente in U937-Zellen nach 4-stündiger (links) und 20-stündiger (rechts) Exposition mit Brij [®] 78..... | 37 |
| Abb. 27: Dotplot der U937-Zellen nach 20-stündiger Exposition mit Brij [®] 78 pro ml und Annexin-V-Propidium- iodid-Färbung (von links nach rechts: 1 µg/ml, 2 µg/ml, 8 µg/ml) | 38 |
| Abb. 28: HaCaT-Zellen nach 1-stündiger Exposition mit Brij [®] 78 160fach vergrößert (oben links Zellkontrolle (0 µg/ml); oben rechts 32 µg/ml; unten links 64 µg/ml; unten rechts 128 µg/ml) | 40 |
| Abb. 29: HaCaT-Zellen nach 24-stündiger Exposition mit Brij [®] 78 160fach vergrößert (oben links 4 µg/ml; oben rechts 8 µg/ml; unten links 16 µg/ml; unten rechts 32 µg/ml)..... | 41 |
| Abb. 30: U937-Zellen nach 1-stündiger Exposition mit Brij [®] 78 160fach vergrößert (oben links 4 µg/ml; oben rechts 8 µg/ml; unten links 16 µg/ml; unten rechts 32 µg/ml)..... | 42 |

| | |
|--|----|
| Abb. 31: U937-Zellen nach 24-stündiger Exposition mit Brij [®] 78 40fach vergrößert (oben links 1 µg/ml; oben rechts 2 µg/ml; unten links 4 µg/ml; unten rechts 8 µg/ml)..... | 43 |
| Abb. 32: Strukturformel von Cremophor [®] A25 | 44 |
| Abb. 33: Zytotoxizität von Cremophor [®] A25 an HaCaT-Zellen (n =16) und U937-Zellen (n = 13) nach 1 und 24 Stunden Exposition bei 37°C | 45 |
| Abb. 34: [³ H]Arachidonsäure-Freisetzung durch Cremophor [®] A25 an U937-Zellen nach 1 und 24 Stunden Exposition bei 37°C (n = 12) | 46 |
| Abb. 35: HaCaT-Zellen nach 24-stündiger Exposition mit Cremophor [®] A25 160fach vergrößert (oben rechts 4 µg/ml; oben links 8 µg/ml; unten rechts 16 µg/ml; unten links 32 µg/ml) | 47 |
| Abb. 36: Strukturformel von Triton [®] X-100..... | 49 |
| Abb. 37: Zytotoxizität von Triton [®] X-100 an HaCaT-Zellen (n = 15) und U937-Zellen (n = 14) nach 1 und 24 Stunden Exposition bei 37°C | 49 |
| Abb. 38: [³ H]Arachidonsäure-Freisetzung durch Triton [®] X-100 an U937-Zellen nach 1 und 24 Stunden Exposition bei 4°C (n = 9) und 37°C (n = 12) | 51 |
| Abb. 39: Anreicherungsfaktor Histon-assoziiierter DNA-Fragmente in U937-Zellen nach 4-stündiger (links) und 20-stündiger (rechts) Exposition mit Triton [®] X-100 | 52 |
| Abb. 40: Dotplot der U937-Zellen nach 4-stündiger Exposition mit 5 µg Triton [®] X-100 pro ml und Annexin-V-Propidiumiodid-Färbung | 52 |
| Abb. 41: Dotplot der U937-Zellen nach 4-stündiger Exposition mit 40 µg Triton [®] X-100 pro ml und Annexin-V-Propidiumiodid-Färbung | 53 |
| Abb. 42: Dotplot der U937-Zellen nach 20-stündiger Exposition mit 40 µg Triton [®] X-100 pro ml und Annexin-V-Propidiumiodid-Färbung | 53 |
| Abb. 43: HaCaT-Zellen nach 1-stündiger Exposition mit Triton [®] X-100 160fach vergrößert (oben links 32 µg/ml; oben rechts 64 µg/ml; unten links 128 µg/ml; unten rechts 256 µg/ml)..... | 56 |
| Abb. 44: HaCaT-Zellen nach 24-stündiger Exposition mit Triton [®] X-100 160fach vergrößert (oben links 32 µg/ml; oben rechts 64 µg/ml; unten links 128 µg/ml; unten rechts 256 µg/ml)..... | 57 |
| Abb. 45: U937-Zellen nach 1-stündiger Exposition mit Triton [®] X-100 160fach vergrößert (Phasenkontrast; oben links 16 µg/ml; oben rechts 32 µg/ml; unten links 64 µg/ml; unten rechts 128 µg/ml) | 58 |
| Abb. 46: U937-Zellen nach 24-stündiger Exposition mit Triton [®] X-100 160fach vergrößert (Phasenkontrast; oben links 16 µg/ml; oben rechts 32 µg/ml; unten links 64 µg/ml; unten rechts 128 µg/ml) | 59 |
| Abb. 47: Strukturformel von Polysorbat 80 | 60 |
| Abb. 48: Zytotoxizität von Polysorbat 80 an U937-Zellen (n = 15) und HaCaT-Zellen (n = 15) nach 1 und 24-stündiger Exposition bei 37°C | 61 |
| Abb. 49: [³ H]Arachidonsäure-Freisetzung durch Polysorbat 80 an U937-Zellen nach 1- und 24-stündiger Exposition bei 4°C (n = 9) und 37°C (n = 12)..... | 62 |
| Abb. 50: Anreicherungsfaktor Histon-assoziiierter DNA-Fragmente in U937-Zellen nach 4-stündiger (links) und 20-stündiger (rechts) Exposition mit Polysorbat 80..... | 63 |
| Abb. 51: Dotplot der U937-Zellen nach 4-stündiger Exposition mit 64 µg Polysorbat 80 pro ml und Annexin-V-Propidiumiodid-Färbung | 64 |
| Abb. 52: Dotplot der U937-Zellen nach 4-stündiger Exposition mit 128 µg Polysorbat 80 pro ml und Annexin-V-Propidiumiodid-Färbung | 64 |
| Abb. 53: HaCaT-Zellen nach 1-stündiger Exposition mit Polysorbat 80 160fach vergrößert (oben links 256 µg/ml; oben rechts 512 µg/ml; unten links 1024 µg/ml; unten rechts 2048 µg/ml)..... | 67 |
| Abb. 54: HaCaT-Zellen nach 24-stündiger Exposition mit Polysorbat 80 160fach vergrößert (oben links 128 µg/ml; oben rechts 256 µg/ml; unten links 512 µg/ml; unten rechts 1024 µg/ml)..... | 68 |

| | |
|---|----|
| Abb. 55: U937-Zellen nach 1-stündiger Exposition mit Polysorbat 80 160fach vergrößert (oben links 128 µg/ml; oben rechts 256 µg/ml; unten links 512 µg/ml; unten rechts 1024 µg/ml)..... | 69 |
| Abb. 56: U937-Zellen nach 24-stündiger Exposition mit Polysorbat 80 160fach vergrößert (oben links 64 µg/ml; oben rechts 128 µg/ml; unten links 512 µg/ml; unten rechts 1024 µg/ml)..... | 70 |
| Abb. 57: Strukturformel des Hauptbestandteils von Cremophor® EL | 71 |
| Abb. 58: Zytotoxizität von Cremophor® EL an U937-Zellen (n = 15) und HaCaT-Zellen (n = 15) nach 1- und 24-stündiger Exposition bei 37°C..... | 73 |
| Abb. 59: Zytotoxizität der Cremophor® EL-Fraktionen (n = 16) im Vergleich zu unfraktioniertem Cremophor® EL an HaCaT-Zellen (n = 15) nach 24 Stunden Exposition bei 37°C..... | 74 |
| Abb. 60: Zytotoxizität der Cremophor® EL-Fraktionen (n = 14) im Vergleich zu unfraktioniertem Cremophor® EL an U937-Zellen (n = 15) nach 24 Stunden Exposition bei 37°C | 74 |
| Abb. 61: Zytotoxizität von Cremophor® EL an HaCaT-Zellen nach 1-stündiger Exposition und weiterer Inkubation für insgesamt 24 Stunden im Vergleich zur Zytotoxizität unmittelbar nach 1-stündiger Exposition (n = 5) ... | 75 |
| Abb. 62: [³ H]Arachidonsäure-Freisetzung durch Cremophor® EL an U937-Zellen nach 1 Stunde Exposition bei 4°C (n = 9) und 37°C (n = 12) | 76 |
| Abb. 63: [³ H]Arachidonsäure-Freisetzung durch Cremophor® EL und 2 Cremophor® EL-Fraktionen an U937-Zellen nach 24 Stunden Exposition bei 37°C (n = 12) | 77 |
| Abb. 64: Anreicherungsfaktor Histon-assoziiertes DNA-Fragmente in U937-Zellen nach 4-stündiger (links) und 20-stündiger (rechts) Exposition mit Cremophor® EL (unfraktioniert) | 78 |
| Abb. 65: Anreicherungsfaktor Histon-assoziiertes DNA-Fragmente in U937-Zellen nach 4-stündiger (links) und 20-stündiger (rechts) Exposition mit der Aqua-Fraktion des Cremophor® EL..... | 78 |
| Abb. 66: Anreicherungsfaktor Histon-assoziiertes DNA-Fragmente in U937-Zellen nach 4-stündiger (links) und 20-stündiger (rechts) Exposition mit der Methanol-Fraktion des Cremophor® EL | 79 |
| Abb. 67: Dotplot der U937-Zellen nach 44-stündiger Exposition mit 1,25 mg Cremophor® EL pro ml und Annexin-V-Propidiumiodid-Färbung | 80 |
| Abb. 68: Dotplot der U937-Zellen nach 20-stündiger Exposition mit 20 mg Cremophor® EL pro ml und Annexin-V-Propidiumiodid-Färbung | 80 |
| Abb. 69: Dotplot der U937-Zellen nach Exposition mit 5 mg Cremophor® EL pro ml und Annexin-V-Propidiumiodid-Färbung (links 4 Stunden, rechts 20 Stunden Exposition) | 80 |
| Abb. 70: Dotplot der U937-Zellen nach 4-stündiger Exposition mit den Fraktionen des Cremophor® EL (oben Aqua-Fraktion: links 0,375, rechts 1,5 mg/ml; unten Methanol-Fraktion: links 0,875, rechts 3,5 mg/ml)..... | 82 |
| Abb. 71: Dotplot der U937-Zellen nach 20-stündiger Exposition mit den Fraktionen des Cremophor® EL (oben Aqua-Fraktion: links 0,375, rechts 1,5 mg/ml; unten Methanol-Fraktion: links 0,875, rechts 3,5 mg/ml)..... | 83 |
| Abb. 72: HaCaT-Zellen nach 1-stündiger Exposition mit Cremophor® EL 160fach vergrößert (oben links 40 mg/ml; oben rechts 80 mg/ml; unten links 160 mg/ml; unten rechts 320 mg/ml)..... | 86 |
| Abb. 73: HaCaT-Zellen nach 24-stündiger Exposition mit Cremophor® EL 160fach vergrößert (oben links 128 µg/ml; oben rechts 256 µg/ml; unten links 512 µg/ml; unten rechts 1024 µg/ml)..... | 87 |
| Abb. 74: HaCaT-Zellen nach 24-stündiger Exposition mit den Cremophor® EL-Fraktionen 160fach vergrößert (oben Methanol-Fraktion: links 512 µg/ml; rechts 1024 µg/ml; unten Aqua-Fraktion: links 2048 µg/ml; rechts 4096 µg/ml) | 88 |
| Abb. 75: U937-Zellen nach 1-stündiger Exposition mit Cremophor® EL 160fach vergrößert (oben links 40 mg/ml; oben rechts 80 mg/ml; unten links 160 mg/ml; unten rechts 320 mg/ml)..... | 90 |
| Abb. 76: U937-Zellen nach 24-stündiger Exposition mit Cremophor® EL 160fach vergrößert (oben links 128 µg/ml; oben rechts 256 µg/ml; unten links 512 µg/ml; unten rechts 1024 µg/ml)..... | 91 |

| | |
|--|-----|
| Abb. 77: U937-Zellen nach 24-stündiger Exposition mit den Cremophor® EL-Fractionen 160fach vergrößert (oben Methanol-Fraktion: links 256 µg/ml; rechts 1024 µg/ml; unten Aqua-Fraktion: links 1024 µg/ml; rechts 2048 µg/ml) | 92 |
| Abb. 78: Strukturformel von Poloxamer® 188 | 93 |
| Abb. 79: Zytotoxizität von Poloxamer® 188 an U937-Zellen (n = 13) und HaCaT-Zellen (n = 15) nach 1 und 24 Stunden Exposition | 94 |
| Abb. 80: [³ H]Arachidonsäure-Freisetzung durch Poloxamer® 188 an U937-Zellen nach 1 und 24 Stunden Exposition bei 4°C (n = 9) und 37°C (n = 12)..... | 95 |
| Abb. 81: HaCaT-Zellen nach 1-stündiger Exposition mit Poloxamer® 188 160fach vergrößert (oben links 40 mg/ml; oben rechts 80 mg/ml; unten links 160 mg/ml; unten rechts 320 mg/ml)..... | 97 |
| Abb. 82: HaCaT-Zellen nach 24-stündiger Exposition mit Poloxamer® 188 160fach vergrößert (oben links 40 mg/ml; oben rechts 80 mg/ml; unten links 160 mg/ml; unten rechts 320 mg/ml)..... | 98 |
| Abb. 83: U937-Zellen nach Exposition mit Poloxamer® 188 (oben nach 1 Stunde 160fach vergrößert: links 160 mg/ml; rechts 320 mg/ml; unten nach 24 Stunden 180fach vergrößert: links 20 mg/ml; rechts 80 mg/ml) ... | 99 |
| Abb. 84: Strukturformel von Natriumdodecylsulfat..... | 101 |
| Abb. 85: Zytotoxizität von Natriumdodecylsulfat an U937-Zellen (n = 14) und HaCaT-Zellen (n = 14) nach 1 und 24 Stunden Exposition | 102 |
| Abb. 86: [³ H]Arachidonsäure-Freisetzung durch Natriumdodecylsulfat an U937-Zellen nach 1 und 24 Stunden Exposition bei 4°C (n = 9) und 37°C (n = 12)..... | 103 |
| Abb. 87: Anreicherungsfaktor Histon-assoziiierter DNA-Fragmente in U937-Zellen nach 4-stündiger (links) und 20-stündiger (rechts) Exposition mit Natriumdodecylsulfat..... | 104 |
| Abb. 88: Dotplot der U937-Zellen nach 4-stündiger Exposition mit Natriumdodecylsulfat und Annexin-V-Propidiumiodid-Färbung (von links nach rechts: 1, 2, 8 µg/ml)..... | 105 |
| Abb. 89: Dotplot der U937-Zellen nach 20-stündiger Exposition mit Natriumdodecylsulfat und Annexin-V-Propidiumiodid-Färbung (von links nach rechts: 1, 16, 32 µg/ml)..... | 106 |
| Abb. 90: HaCaT-Zellen nach 1-stündiger Exposition mit Natriumdodecylsulfat 160fach vergrößert (oben links 32 µg/ml; oben rechts 64 µg/ml; unten links 128 µg/ml; unten rechts 256 µg/ml)..... | 109 |
| Abb. 91: HaCaT-Zellen nach 24-stündiger Exposition mit Natriumdodecylsulfat 160fach vergrößert (oben links 16 µg/ml; oben rechts 32 µg/ml; unten links 64 µg/ml; unten rechts 128 µg/ml)..... | 110 |
| Abb. 92: U937-Zellen nach 1-stündiger Exposition mit Natriumdodecylsulfat 160fach vergrößert (Phasenkontrast; oben links 8 µg/ml; oben rechts 16 µg/ml; unten links 32 µg/ml; unten rechts 64 µg/ml)..... | 111 |
| Abb. 93: U937-Zellen nach 24-stündiger Exposition mit Natriumdodecylsulfat 160fach vergrößert (Phasenkontrast; oben links 8 µg/ml; oben rechts 16 µg/ml; unten links 32 µg/ml; unten rechts 64 µg/ml)..... | 112 |
| Abb. 94: Strukturformel von Natriumcetylstearylsulfat | 113 |
| Abb. 95: Zytotoxizität von Natriumcetylstearylsulfat an U937-Zellen (n = 13) und HaCaT-Zellen (n = 15) nach 1 und 24 Stunden Exposition | 114 |
| Abb. 96: [³ H]Arachidonsäure-Freisetzung durch Natriumcetylstearylsulfat an U937-Zellen nach 1 und 24 Stunden Exposition bei 37°C (n = 12)..... | 115 |
| Abb. 97: U937-Zellen nach 24-stündiger Exposition mit Natriumcetylstearylsulfat 180fach vergrößert (oben links 1 µg/ml; oben rechts 2 µg/ml; unten links 4 µg/ml; unten rechts 8 µg/ml) | 117 |
| Abb. 98: Strukturformel von Natriumdodecylethersulfat | 118 |
| Abb. 99: Zytotoxizität von Natriumdodecylethersulfat an U937-Zellen (n = 14) und HaCaT-Zellen (n = 17) nach 1 und 24 Stunden Exposition bei 37°C..... | 119 |
| Abb. 100: [³ H]Arachidonsäure-Freisetzung durch Natriumdodecylethersulfat an U937-Zellen nach 1 und 24 Stunden Exposition bei 4°C (n = 9) und 37°C (n = 12) | 120 |

| | |
|--|-----|
| Abb. 101: Anreicherungsfaktor Histon-assoziiertes DNA-Fragmente in U937-Zellen nach 4-stündiger (links) und 20-stündiger (rechts) Exposition mit Natriumdodecylethersulfat..... | 121 |
| Abb. 102: Dotplot der U937-Zellen nach Exposition mit 16 (4) µg Natriumdodecylethersulfat pro ml und Annexin-V-Propidiumiodid-Färbung (von links nach rechts: nach 4, 20, 44 Stunden)..... | 122 |
| Abb. 103: Dotplot der U937-Zellen nach Exposition mit 32 (8) µg Natriumdodecylethersulfat pro ml und Annexin-V-Propidiumiodid-Färbung (links nach 4, rechts nach 20 Stunden)..... | 122 |
| Abb. 104: HaCaT-Zellen nach 1-stündiger Exposition mit Natriumdodecylethersulfat 160fach vergrößert (oben links 128 (35) µg/ml; oben rechts 256 (70) µg/ml; unten links 512 (140) µg/ml; unten rechts 1024 (280) µg/ml)..... | 125 |
| Abb. 105: HaCaT-Zellen nach 24-stündiger Exposition mit Natriumdodecylethersulfat 160fach vergrößert (oben links 64 (17) µg/ml; oben rechts 128 (35) µg/ml; unten links 256 (70) µg/ml; unten rechts 512 (140) µg/ml)..... | 126 |
| Abb. 106: U937-Zellen nach 1-stündiger Exposition mit Natriumdodecylethersulfat 160fach vergrößert (oben links 16 (4,2) µg/ml; oben rechts 32 (8,5) µg/ml; unten links 64 (17) µg/ml; unten rechts 128 (35) µg/ml)..... | 127 |
| Abb. 107: U937-Zellen nach 24-stündiger Exposition mit Natriumdodecylethersulfat 40fach vergrößert (oben links 16 (4,2) µg/ml; oben rechts 32 (8,5) µg/ml; unten links 64 (17) µg/ml; unten rechts 128 (35) µg/ml)..... | 128 |
| Abb. 108: Strukturformel von Benzalkoniumchlorid..... | 129 |
| Abb. 109: Zytotoxizität von Benzalkoniumchlorid an U937- und HaCaT-Zellen nach 1 und 24 Stunden Exposition bei 37°C (n = 14)..... | 130 |
| Abb. 110: Zytotoxizität von Benzalkoniumchlorid an U937- Zellen nach 1 und 24 Stunden Exposition bei 37°C Trypanblaufärbung (n = 15) im Vergleich zum XTT-Test (n = 15)..... | 131 |
| Abb. 111: [³ H]Arachidonsäure-Freisetzung durch Benzalkoniumchlorid an U937-Zellen nach 1 und 24 Stunden Exposition bei 4°C (n = 9) und 37°C (n = 12)..... | 132 |
| Abb. 112: Anreicherungsfaktor Histon-assoziiertes DNA-Fragmente in U937-Zellen nach 4-stündiger (links) und 20-stündiger (rechts) Exposition mit Benzalkoniumchlorid..... | 133 |
| Abb. 113: Dotplot der U937-Zellen nach Exposition mit 1 µg Benzalkoniumchlorid pro ml und Annexin-V-Propidiumiodid-Färbung (von links nach rechts: nach 4, 20, 44 Stunden)..... | 134 |
| Abb. 114: Dotplot der U937-Zellen nach 20-stündiger Exposition mit Benzalkoniumchlorid und Annexin-V-Propidiumiodid-Färbung (von links nach rechts: 0,1, 2, 8 µg/ml)..... | 134 |
| Abb. 115: HaCaT-Zellen nach 1-stündiger Exposition mit Benzalkoniumchlorid 160fach vergrößert (oben links 4 µg/ml; oben rechts 8 µg/ml; unten links 16 µg/ml; unten rechts 32 µg/ml)..... | 137 |
| Abb. 116: HaCaT-Zellen nach 24-stündiger Exposition mit Benzalkoniumchlorid 160fach vergrößert (oben links 4 µg/ml; oben rechts 8 µg/ml; unten links 16 µg/ml; unten rechts 32 µg/ml)..... | 138 |
| Abb. 117: U937-Zellen nach 1-stündiger Exposition mit Benzalkoniumchlorid 160fach vergrößert (Phasenkontrast; oben links 0,25 µg/ml; oben rechts 0,5 µg/ml; unten links 1 µg/ml; unten rechts 2 µg/ml)..... | 140 |
| Abb. 118: U937-Zellen nach 1-stündiger Exposition mit Benzalkoniumchlorid 160fach vergrößert (oben links 8 µg/ml; oben rechts 16 µg/ml; unten links 32 µg/ml; unten rechts 64 µg/ml)..... | 141 |
| Abb. 119: U937-Zellen nach 24-stündiger Exposition mit Benzalkoniumchlorid 160fach vergrößert (Phasenkontrast; oben links 0,25 µg/ml; oben rechts 0,5 µg/ml; unten links 1 µg/ml; unten rechts 2 µg/ml)..... | 142 |
| Abb. 120: U937-Zellen nach 24-stündiger Exposition mit Benzalkoniumchlorid 40fach vergrößert (oben links 8 µg/ml; oben rechts 16 µg/ml; unten links 32 µg/ml; unten rechts 64 µg/ml)..... | 143 |
| Abb. 121: Strukturformel von Cocoamidopropylbetain..... | 144 |

| | |
|--|-----|
| Abb. 122: Zytotoxizität von TEGO-Betain® L7 an U937-Zellen (n = 14) und HaCaT-Zellen (n = 15) nach 1 und 24 Stunden Exposition bei 37°C | 145 |
| Abb. 123: [³ H]Arachidonsäure-Freisetzung durch TEGO-Betain® L7 an U937-Zellen nach 1 und 24 Stunden Exposition bei 4°C (n = 9) und 37°C (n = 12)..... | 147 |
| Abb. 124: Anreicherungsfaktor Histon-assoziiierter DNA-Fragmente in U937-Zellen nach 4-stündiger (links) und 20-stündiger (rechts) Exposition mit Cocamidopropylbetain | 149 |
| Abb. 125: Dotplots der U937-Zellen nach 4-stündiger Exposition Cocamidopropylbetain und Annexin-V-Propidiumiodid-Färbung (von links nach rechts: 2 (0,6), 8 (2,5) und 32 (10) µg/ml)..... | 149 |
| Abb. 126: HaCaT-Zellen nach 1-stündiger Exposition mit TEGO-Betain® L7 160fach vergrößert (oben links 32 (10) µg/ml; oben rechts 64 (20) µg/ml; unten links 128 (40) µg/ml; unten rechts 256 (80) µg/ml) | 152 |
| Abb. 127: HaCaT-Zellen nach 24-stündiger Exposition mit TEGO-Betain® L7 160fach vergrößert (oben links 32 (10) µg/ml; oben rechts 64 (20) µg/ml; unten links 128 (40) µg/ml; unten rechts 256 (80) µg/ml) | 153 |
| Abb. 128: U937-Zellen nach 1-stündiger Exposition mit TEGO-Betain® L7 160fach vergrößert (Phasenkontrast; oben links 16 (5) µg/ml; oben rechts 32 (10) µg/ml; unten links 64 (20) µg/ml; unten rechts 128 (40) µg/ml) | 154 |
| Abb. 129: U937-Zellen nach 24-stündiger Exposition mit TEGO-Betain® L7 160fach vergrößert (Phasenkontrast; oben links 16 (5) µg/ml; oben rechts 32 (10) µg/ml; unten links 64 (20) µg/ml; unten rechts 128 (40) µg/ml) | 155 |
| Abb. 130: Strukturformel von Phosphatidylcholin | 156 |
| Abb. 131: Zytotoxizität von Sojalecithin an U937-Zellen (n = 16) und HaCaT-Zellen (n = 15) nach 1 und 24 Stunden Exposition bei 37°C | 157 |
| Abb. 132: [³ H]Arachidonsäure-Freisetzung durch Sojalecithin an U937-Zellen nach 1 und 24 Stunden Exposition bei 4°C (n = 9) und 37°C (n = 12) | 158 |
| Abb. 133: Anreicherungsfaktor Histon-assoziiierter DNA-Fragmente in U937-Zellen nach 4-stündiger (links) und 20-stündiger (rechts) Exposition mit Sojalecithin | 159 |
| Abb. 134: Zytotoxizität von Tensiden an U937-Zellen nach 1 Stunde Exposition bei 37°C | 162 |
| Abb. 135: Zytotoxizität von Tensiden an U937-Zellen nach 24 Stunden Exposition bei 37°C | 162 |
| Abb. 136: Zytotoxizität von Tensiden an HaCaT-Zellen nach 1 Stunde Exposition bei 37°C..... | 163 |
| Abb. 137: Zytotoxizität von Tensiden an HaCaT-Zellen nach 24 Stunden Exposition bei 37°C..... | 163 |
| Abb. 138: Prozentuale [³ H]Arachidonsäure-Freisetzung von Tensiden nach 1 Stunde Exposition bei 37°C..... | 167 |
| Abb. 139: Prozentuale [³ H]Arachidonsäure-Freisetzung von Tensiden nach 24 Stunden Exposition bei 37°C... | 167 |

Tabellenverzeichnis

| | |
|---|----|
| Tabelle 1: Morphologische Veränderungen der Zelle bei Apoptose und Nekrose | 24 |
| Tabelle 2: Methoden zum Nachweis apoptotisch veränderter Zellen [53, 91]..... | 25 |
| Tabelle 3: Halbmaximale zytotoxische Konzentration (CC ₅₀) von Brij [®] 78 | 34 |
| Tabelle 4: Halbmaximale zytotoxische Konzentration (CC ₅₀) von Brij [®] 78 - Vergleich Trypanblaufärbung und XTT-Test..... | 35 |
| Tabelle 5: Minimal toxische Konzentration (MTK) und Zytotoxizität bei der MTK von Brij [®] 78..... | 36 |
| Tabelle 6: Prozentuale Verteilung der U937-Zellen auf die festgelegten Quadranten des Dotplots nach Exposition mit Brij [®] 78 im Vergleich zur Zellkontrolle b | 38 |
| Tabelle 7: Halbmaximale zytotoxische Konzentration (CC ₅₀) von Cremophor [®] A25 | 45 |
| Tabelle 8: Minimal toxische Konzentration (MTK) und Zytotoxizität bei der MTK von Cremophor [®] A25..... | 46 |
| Tabelle 9: Halbmaximale zytotoxische Konzentration (CC ₅₀) von Romulgin [®] N an U937- Zellen..... | 48 |
| Tabelle 10: Halbmaximale zytotoxische Konzentration (CC ₅₀) von Triton [®] X-100..... | 50 |
| Tabelle 11: Minimal toxische Konzentration (MTK) und Zytotoxizität bei der MTK von Triton [®] X-100..... | 51 |
| Tabelle 12: Prozentuale Verteilung der U937-Zellen auf die festgelegten Quadranten des Dotplots nach Exposition mit Triton [®] X-100 im Vergleich zur Zellkontrolle b..... | 54 |
| Tabelle 13: Halbmaximale zytotoxische Konzentration (CC ₅₀) von Polysorbat 80 | 61 |
| Tabelle 14: Minimal toxische Konzentration (MTK) und Zytotoxizität bei der MTK von Polysorbat 80 | 62 |
| Tabelle 15: Prozentuale Verteilung der U937-Zellen auf die festgelegten Quadranten des Dotplots nach 4-stündiger Exposition mit Polysorbat 80 im Vergleich zur Zellkon- trolle b..... | 65 |
| Tabelle 16: Zusammensetzung von Cremophor [®] EL [138, 163] | 71 |
| Tabelle 17: Halbmaximale zytotoxische Konzentration (CC ₅₀) von Cremophor [®] EL und seinen Fraktionen | 75 |
| Tabelle 18: Minimal toxische Konzentration (MTK) und Zytotoxizität bei der MTK von Cremophor [®] EL und seinen Fraktionen | 77 |
| Tabelle 19: Prozentuale Verteilung der U937-Zellen auf die festgelegten Quadranten des Dotplots nach Exposition mit Cremophor [®] EL im Vergleich zur Zellkontrolle b | 81 |
| Tabelle 20: Prozentuale Verteilung der U937-Zellen auf die festgelegten Quadranten des Dotplots nach Exposition mit Cremophor [®] EL-Fraktionen..... | 84 |

| | |
|--|-----|
| Tabelle 21: Halbmaximale zytotoxische Konzentration (CC_{50}) von Poloxamer [®] 188 an HaCaT- und U937-Zellen..... | 94 |
| Tabelle 22: Minimal toxische Konzentration (MTK) und Zytotoxizität bei der MTK von Poloxamer [®] 188..... | 95 |
| Tabelle 23: Halbmaximale zytotoxische Konzentration (CC_{50}) von Macrogol 6000 an U937-Zellen | 100 |
| Tabelle 24: Halbmaximale zytotoxische Konzentration (CC_{50}) von Natriumdodecylsulfat | 103 |
| Tabelle 25: Minimal toxische Konzentration (MTK) und Zytotoxizität bei der MTK von Natriumdodecylsulfat | 104 |
| Tabelle 26: Prozentuale Verteilung der U937-Zellen auf die festgelegten Quadranten des Dotplots nach Exposition mit Natriumdodecylsulfat im Vergleich zur Zellkontrolle b..... | 107 |
| Tabelle 27: Halbmaximale zytotoxische Konzentration (CC_{50}) von Natriumcetylstearylsulfat | 114 |
| Tabelle 28: Minimal toxische Konzentration (MTK) und Zytotoxizität bei der MTK von Natriumcetylstearylsulfat..... | 115 |
| Tabelle 29: Halbmaximale zytotoxische Konzentration (CC_{50}) von Natriumdodecylethersulfat | 119 |
| Tabelle 30: Minimal toxische Konzentration (MTK) und Zytotoxizität bei der MTK von Natriumdodecylethersulfat | 120 |
| Tabelle 31: Prozentuale Verteilung der U937-Zellen auf die festgelegten Quadranten des Dotplots nach Exposition mit Natriumdodecylethersulfat im Vergleich zur Zellkontrolle b | 123 |
| Tabelle 32: Halbmaximale zytotoxische Konzentration (CC_{50}) von Benzalkoniumchlorid | 130 |
| Tabelle 33: Halbmaximale zytotoxische Konzentration (CC_{50}) von Benzalkoniumchlorid - Vergleich Trypanblaufärbung und XTT-Test | 131 |
| Tabelle 34: Minimal toxische Konzentration (MTK) und Zytotoxizität bei der MTK von Benzalkoniumchlorid..... | 132 |
| Tabelle 35: Prozentuale Verteilung der U937-Zellen auf die festgelegten Quadranten des Dotplots nach Exposition mit Benzalkoniumchlorid im Vergleich zur Zellkontrolle b..... | 135 |
| Tabelle 36: Halbmaximale zytotoxische Konzentration (CC_{50}) von Cocamidopropylbetain..... | 146 |
| Tabelle 37: Minimal toxische Konzentration (MTK) und Zytotoxizität bei der MTK von Cocamidopropylbetain | 148 |

| | |
|---|-----|
| Tabelle 38: Prozentuale Verteilung der U937-Zellen auf die festgelegten Quadranten des Dotplots nach Exposition mit Cocamidopropylbetain im Vergleich zur Zellkontrolle b | 150 |
| Tabelle 39: Halbmaximale zytotoxische Konzentration (CC_{50}) von Sojalecithin..... | 157 |
| Tabelle 40: Minimal toxische Konzentration (MTK) und Zytotoxizität bei der MTK von Sojalecithin | 158 |
| Tabelle 41: Halbmaximale zytotoxische Konzentrationen (CC_{50}) der untersuchten Tenside in U937-Zellen (XTT-Test) | 160 |
| Tabelle 42: Halbmaximale zytotoxische Konzentrationen (CC_{50}) der untersuchten Tenside in HaCaT-Zellen (XTT-Test) | 161 |
| Tabelle 43: Relative Zytotoxizität (CC_{rel}) der untersuchten Tenside in U937- und HaCaT-Zellen..... | 164 |
| Tabelle 44: Minimal toxische Konzentrationen der untersuchten Tenside nach 1 und 24 Stunden bei 4°C und 37°C..... | 165 |
| Tabelle 45: Relative Membrantoxizität (MTK_{rel}) der untersuchten Tenside | 166 |
| Tabelle 46: Halbmaximale [3H]Arachidonsäure-Freisetzung (RC_{50}) der untersuchten Tenside..... | 168 |
| Tabelle 47: Gegenüberstellung von Zytotoxizität und Membrantoxizität nach 1-stündiger Exposition mit den untersuchten Tensiden | 169 |
| Tabelle 48: Gegenüberstellung von Zytotoxizität und Membrantoxizität nach 24-stündiger Exposition mit den untersuchten Tensiden | 170 |
| Tabelle 49: Einige gebräuchliche Methoden zur Ermittlung lokaler Irritationen in vivo | 172 |
| Tabelle 50: Einige gebräuchliche Methoden zur Ermittlung der Zytotoxizität..... | 174 |
| Tabelle 51: Weitere In-vitro-Methoden zur Bestimmung lokaler Irritationen..... | 179 |
| Tabelle 52: Halbmaximale zytotoxische Konzentrationen (CC_{50}) von Benzalkoniumchlorid | 182 |
| Tabelle 53: Halbmaximale zytotoxische Konzentrationen (CC_{50}) von Natriumdodecylsulfat | 184 |
| Tabelle 54: Halbmaximale zytotoxische Konzentrationen (CC_{50}) von Natriumdodecylethersulfat..... | 186 |
| Tabelle 55: Halbmaximale zytotoxische Konzentrationen (CC_{50}) von Cocamidopropylbetain..... | 189 |
| Tabelle 56: Halbmaximale zytotoxische Konzentrationen (CC_{50}) von Triton [®] X-100..... | 192 |
| Tabelle 57: Halbmaximale zytotoxische Konzentrationen (CC_{50}) von Polysorbat 80 | 195 |
| Tabelle 58: HLB-Werte von Tensiden im Vergleich mit MTK-Werten | 208 |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|---------------------|--|
| [³ H]AA | [³ H]Arachidonsäure |
| AART | [³ H]Arachidonsäure-Freisetzungstest |
| ABTS | 2,2'-Azido-di[3-ethylbenzthiazolin-sulfonat] |
| ADP | Adenosindiphosphat |
| AF | Anreicherungsfaktor |
| ATP | Adenosintriphosphat |
| Benz | Benzalkoniumchlorid |
| CC ₅₀ | halbmaximale zytotoxische Konzentration |
| CC _{rel} | relative Zytotoxizität |
| CrEL | Cremophor [®] EL |
| cmc | kritische Mizellbildungskonzentration |
| CoA | Coenzym A |
| Coc | Cocamidopropylbetain |
| CrA | Cremophor [®] A25 |
| CT | Zytotoxizität |
| DAB | Deutsches Arzneibuch |
| DAC | Deutscher Arzneimittelcodex |
| EZ4U | Zytotoxizitätstest Easy for you |
| ELISA | Enzymimmunoassay |
| FCS | foetales Kälberserum |
| FDA | Food and Drug Administration |
| FITC | Fluoresceinisothiocyanat |
| HaCaT | human adult low calcium temperature |
| HLB | hydrophilic lipophilic balance |
| LDH | Lactatdehydrogenase |
| Leci | Sojalecithin |
| MG | Molekulargewicht |
| MCSE | Macrogolcetylstearylether |
| MPT | Membranpermeabilitätsübergang |
| MTK | Minimal toxische Konzentration |
| MTK _{rel} | relative Membrantoxizität |
| MTT | 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid |
| n | Anzahl der Messwerte |
| O/W | Öl-in-Wasser |
| p | Irrtumswahrscheinlichkeit |

| | |
|------------------|--|
| PEG | Polyethylenglykol, Macrogol |
| Ph.Eur. | Europäisches Arzneibuch |
| POD | Peroxidase |
| Polox | Poloxamer [®] 188 |
| Polys | Polysorbat 80 |
| POST | Plastikkklusionsstresstest |
| RC | prozentuale [³ H]Arachidonsäure-Freisetzung |
| RC ₅₀ | 50%ige [³ H]Arachidonsäure-Freisetzung |
| rEGF | rekombinanter Wachstumsfaktor |
| RPMI | Roswell Park Memorial Institute |
| SCSS | Natriumcetylstearylsulfat |
| SD | Standardabweichung |
| SDES | Natriumdodecylethersulfat |
| SDS | Natriumdodecylsulfat |
| SFM | serumfreies Medium |
| SR90 | Standardrezepturen 90 |
| TEWL | transepidermaler Wasserverlust |
| TNF | Tumornekrosefaktor |
| TUNEL | Terminal deoxynucleotidyltransferase-mediated deoxyuridine 5'-triphosphate nick end labeling |
| W/O | Wasser-in-Öl |
| XTT | Na-3,3'-[1-(phenylamino)-carbonyl-3,4-tetrazolium]- bis(4-methoxy-6-nitro)-benzol-sulfonsäurehydrat |
| ZK | Zellkontrolle |

1. Einleitung

Tenside verfügen über die besondere Eigenschaft, die Spannung zwischen den Grenzflächen zweier Phasen herabzusetzen. Diese Eigenschaft, aktiv Grenzen zu überwinden, macht sie zu einer viel gefragten Stoffgruppe. Sie fungieren z.B. als Emulgatoren, indem sie die Grenzflächenspannung zwischen zwei flüssigen Phasen vermindern. Auch zwischen unterschiedlichen Aggregatzuständen können sie phasenvermittelnd wirken, so z.B. als Schaumbildner zwischen gasförmigen und flüssigen Stoffen, als Solubilisatoren oder Netzmittel zwischen Flüssigkeiten und Feststoffen. Das grenzflächenaktive Verhalten lässt sich auf den chemischen Bau dieser Stoffgruppe zurückführen. Sie bestehen aus einem hydrophilen sowie einem hydrophoben Teil und können aufgrund dieser Ambivalenz die Grenzflächenspannung herabsetzen und phasenvermittelnd wirken. Sowohl in Bereichen des täglichen Lebens, als auch in großem Maße in der Industrie finden sie deshalb häufig Verwendung [213].

In Arzneimitteln sind Tenside als Hilfsstoffe unentbehrlich. Von Hilfsstoffen werden neben konstanter Qualität, chemischer und physikalischer Inaktivität und mikrobiologischer Reinheit vor allem eine gute physiologische Verträglichkeit gefordert [20].

Obwohl ihre orale Toxizität in aller Regel als gering eingeschätzt worden ist, stehen Tenside immer wieder im Mittelpunkt toxikologischer Untersuchungen [25, 99, 168]. Bei solchen toxikologischen Tests werden Tenside vor allem auf ihre Unbedenklichkeit im Hinblick auf ihre lokale Anwendung hin untersucht [41, 144, 168].

Tenside sind bekannt dafür, dass sie Haut-, Schleimhaut- und Augenirritationen verursachen können [73, 113, 129, 203]. Natriumdodecylsulfat wird seit längerer Zeit als Standardirritans verwendet [74, 236].

Das Ausmaß lokaler Irritationen, die durch Tenside verursacht werden, ist von vielen Faktoren abhängig. Dazu gehören die physiko-chemischen Eigenschaften des Tensids, die Konzentration, die Einwirkzeit, die Temperatur, der Hauttyp der betroffenen Person und andere Begleitumstände [24, 140, 145, 174, 185].

Tenside verursachen zumeist lokale Irritationen, die nicht die Folge immunologischer Sensibilisierung sind. Eine Rolle bei der Entstehung von lokalen Irritationen durch Tenside spielen vor allem Interaktionen der Tenside mit Proteinen der Epidermis, die Ausmaß und Heftigkeit der Irritationen bestimmen. Eigenschaften der Tenside wie Lipophilie und die Stärke der oberflächenaktiven Wirkung sind hingegen für die

Irritationen nicht ursächlich [140, 185]. Für die Schäden an Haut und Schleimhaut werden verschiedene Mechanismen diskutiert. Dazu gehören unter anderem Zytotoxizität [136, 137] und Wechselwirkungen mit Membranen [160]. Durch Membranschäden ist die Barriere Haut nicht mehr vollständig intakt. Es kommt zu erhöhtem Wasserverlust und dadurch zu Spannungsgefühl, Juckreiz und Schuppung. Chemische Noxen wie Allergene und toxische Stoffe können leichter in die Haut eindringen. Des Weiteren werden wasserbindende Stoffe wie z.B. Harnstoff aus der Haut herausgelöst [185, 202].

Äußere Epidermisschichten bestehen aus toten Keratinozyten. Die Zytotoxizität spielt daher vor allem an den Schleimhäuten und an verletzter Haut eine Rolle. Insbesondere Zellnekrosen können Entzündungen verursachen und die Funktionstüchtigkeit des betroffenen Gewebes verringern und so zur Entstehung lokaler Irritationen beitragen [136, 171, 174, 202].

Es gibt sehr viele unterschiedliche Methoden zur Bestimmung des Irritationspotenzials, die sowohl In-vitro- als auch In-vivo-Methoden umfassen.

In-vivo-Methoden zur Untersuchung lokaler Irritationen können am Tier und an freiwilligen Probanden durchgeführt werden. Für Tierversuche werden vor allem Ratten und Kaninchen verwendet [105, 176]. Als Standardtest galt lange Zeit der 1944 eingeführte Draize-Test. Hier wird die zu untersuchende Substanz in den Konjunktivalsack des Auges oder auf die rasierte Haut des Kaninchen aufgetragen [67]. Die Reaktionen des Versuchstieres werden in der Regel nach einem Score-System beurteilt, dem subjektive Beobachtungen zu Grunde liegen. Untersuchungen an Freiwilligen sind auf Tests an der Haut oder an der Mundschleimhaut beschränkt. Auch bei diesen Tests wird meist ein Score verwendet, der die beobachteten Veränderungen erfasst. Objektive Parameter bei der Bestimmung von Hautirritationen in vivo sind der Transepidermale Wasserverlust (TEWL) und die Vermessung bestimmter Hautveränderungen wie z.B. Hydratation oder Erytheme [74, 185, 236].

Bei In-vitro-Methoden wird in verschiedenen Systemen die Zytotoxizität bestimmt. Dabei werden entweder die Membranintegrität der Zelle, Veränderungen der Zellmorphologie oder physiologische Leistungen, die die Zelle erbringen kann, untersucht. Es gibt auch spezielle In-vitro-Modelle, die für eine bestimmte Art lokaler Toxizität etabliert wurden, z.B. Tests an Hautexplantaten oder dreidimensionalen Hautgewebekulturen, Untersuchungen an isolierten Hornhäuten oder den HET-CAM-

Test, bei dem die Chorionallantoismembran der extraembryonalen Gefäßsysteme des Hühnerembryos verwendet wird [114, 119, 139].

Die erwähnten In-vitro-Methoden haben gegenüber den In-vivo-Methoden einige Vorteile. Sie sind wesentlich weniger aufwendig. Die erzielten Ergebnisse sind objektiv. Es können Konzentrations-Wirkungs-Beziehungen und konkrete Parameter, wie z.B. eine halbmaximale zytotoxische Konzentrationen (CC_{50}), bestimmt werden. Informationen zu den Mechanismen, die die Toxizität bedingen, können gewonnen werden. In-vitro-Versuche sind ethisch vertretbar, da sie keine Belastung für Versuchstiere oder freiwillige Probanden darstellen. Des Weiteren sind die erzielten Ergebnisse oft besser reproduzierbar [114, 174, 211].

Für Zytotoxizitätstests zur Bestimmung des Irritationspotenzials können verschiedene Zellsysteme verwendet werden. Sie sollten nach Möglichkeit von dem entsprechenden Gewebe abstammen, für das das Irritationspotenzial bestimmt werden soll, z.B. Keratinozyten oder Fibroblasten zur Bestimmung von Hautirritationen. Da permanente Zellkulturen sich besser handhaben lassen und in der Regel zu den gleichen Ergebnissen führen wie Primärkulturen, sind sie für solche Untersuchungen gut geeignet [27, 136].

Die Membranintegrität der Zelle kann durch Färbemethoden, Bestimmung freigesetzter Zellinhalte oder freigesetzte Membranbestandteile bestimmt werden. Eine Färbemethode ist z.B. die Trypanblaufärbung, bei der das Eindringen eines Farbstoffes in die Zelle erfasst wird. Ein Stoff aus dem Zellinneren, der sehr häufig als Maß für die gestörte Membranintegrität bestimmt wird, ist die Lactatdehydrogenase (LDH). Im [^3H]Arachidonsäure-Freisetzungstest (AART) wird die Herauslösung von Arachidonsäure aus der Zellmembran untersucht. Als Bestandteil der Membranphospholipide ist die Arachidonsäure fest in die Zellmembran integriert. Die Arachidonsäure-Freisetzung aus der Zellmembran stellt ein Maß für die Membrantoxizität einer Testsubstanz dar [123, 134].

Physiologische Leistungen der Zelle, die als Maß für ihre Vitalität bestimmt werden sind z.B. eine aktive Aufnahme von Stoffen in die Zelle, die beim Neutralrotaufnahme-Test bestimmt wird [137, 154]. Als Maß für die Zellzahl wird der DNA- oder Proteingehalt der Zelle ermittelt [102, 154]. Auch das Reduktionsvermögen ist eine solche physiologische Leistung. Es wird vor allem im MTT- oder XTT-Test ermittelt. Bei diesen Tests wird die Fähigkeit der Zelle bestimmt, mit Hilfe ihrer, in Mitochon-

drien lokalisierten Dehydrogenasen, Tetrazoliumsalze zu reduzieren [36, 135, 161, 199].

Es sind grundsätzlich zwei Arten des Zelltodes zu unterscheiden, die Zellnekrose und die Apoptose. Während die Apoptose einen physiologischen Prozess darstellt, bei dem die Zelle nach "programmiertem" Ablauf stirbt, wird die Nekrose ausschließlich durch äußere Noxen ausgelöst und verursacht im Gegensatz zur Apoptose Entzündungen [171]. Für Tenside werden überwiegend nekrotische Zellveränderungen angenommen, da sie meist stark hämolytisch wirken. Erythrozyten besitzen keinen Zellkern, sodass bei der Hämolyse von einem nekrotischen Prozess ausgegangen wird [187]. Spezielle Untersuchungen zur Art des durch Tenside verursachten Zellsterbens fehlen weitestgehend. Nur bei Triton[®] X-100 und Benzalkoniumchlorid sind apoptotische Zellveränderungen beobachtet worden [5, 31, 57, 58, 209].

In der vorliegenden Arbeit werden grenzflächenaktive Substanzen untersucht, die sehr häufig und mit unterschiedlicher Zweckbestimmung in der Pharmazie zum Einsatz kommen. Es wird die In-vitro-Toxizität von Tensiden untersucht, die im Europäischen Arzneibuch (Ph. Eur.), im Deutschen Arzneibuch (DAB) oder im Deutschen Arzneimittelcodex (DAC) offizinell sind. Es handelt sich dabei um 12 Tenside unterschiedlicher chemischer Struktur, die eine breite Verwendung als Hilfsstoffe in der Pharmazie finden. Es sind Tenside, die uns täglich im pharmazeutischen Alltag begegnen.

Tenside werden nach der Ladung ihrer hydrophilen Gruppe in anionische, kationische, nichtionische und amphotere Tenside eingeteilt [73]. Es finden sich bei den zu untersuchenden Verbindungen Vertreter aus allen vier Gruppen.

Zur Untersuchung der In-vitro-Toxizität der offizinellen Tenside werden zwei Testsysteme verwendet, bei denen wichtige Vitalitätsmerkmale der Zelle bestimmt werden, die essentiell für das Entstehen lokaler Irritationen sind. Im [³H]Arachidonsäure-Freisetzungstest (AART) wird die Interaktion der Tenside mit der Zellmembran untersucht. Um die Zytotoxizität zu ermitteln, wird der XTT-Tetrazoliumreduktionstest EZ4U verwendet. Zusätzlich werden Veränderungen der Zellmorphologie mikroskopisch beobachtet. Die Untersuchungen werden an der humanen promonozytären Zelllinie U937 sowie an humanen Keratinozyten (HaCaT) durchgeführt. Es soll ergänzend untersucht werden, ob das Zellsterben, das im Zytotoxizitätstest ermittelt wird, bei Tensiden auch auf apoptotischen Veränderungen in den Zellen beruhen

kann. Mit einem ELISA-Sandwich-Test sollen Histon-assoziierte DNA-Fragmente von mit Tensiden behandelten U937-Zellen bestimmt werden. Des Weiteren werden mittels Durchflusszytometrie nach Annexin-V-Propidiumiodid-Färbung durch Tenside induzierte nekrotische und apoptotische Zellveränderungen an U937-Zellen analysiert.

Neben der Suche nach ursächlichen Zusammenhängen ihrer lokalen Toxizität werden Konzentrations-Wirkungs-Beziehungen und Kenngrößen ermittelt, um das Irritationspotenzial der Tenside zu beurteilen. Außerdem sollen in der vorliegenden Arbeit die verwendeten Methoden verglichen und kritisch hinsichtlich ihrer Eignung als In-vitro-Tests zur Abschätzung von lokalen Irritationen bewertet werden.

2. Materialien

2.1. Zellen

2.1.1. U937-Zellen

Für den AART und die Zytotoxizitätsbestimmungen wurden U937-Zellen verwendet, die vom Institut für Physiologische Chemie der Universität Mainz, Abteilung angewandte Molekularbiologie (Leiter: Prof. Dr. W.E.G. Müller), übernommen wurden. Die 1974 von C. Sundstrom und K. Nilsson eingeführte Zelllinie entstammt einem Pleuraerguss eines 37-jährigen Mannes mit einem diffusen histiozytären Lymphom [210]. Sie ist eine von wenigen humanen Zelllinien, die noch über viele Monozyteneigenschaften entsprechend dem histiozytären Original verfügt [14, 221].

Die Anzucht der U937-Zellen erfolgte in 250 ml Schrähgalszellkulturflaschen. Als Anzuchtmedium wurde RPMI 1640 mit 10% hitzeinaktiviertem foetalem Kälberserum verwendet. Die Inkubation der Zellen erfolgte stationär in einer CO₂-Atmosphäre (5%) bei 37°C. Die Zellen wurden in der stationären Wachstumsphase umgesetzt, in der die Zellzahl etwa 10⁶ - 2•10⁶ Zellen/ml betrug. Die Zellsuspension wurde mit frischem RPMI-Medium und FCS in bestimmtem Verhältnis (z.B. 10 ml Zellsuspension mit 20 ml Anzuchtmedium für eine Verwendung nach 2 Tagen) verdünnt. Nachdem sie erneut die stationäre Wachstumsphase mit einer Zellzahl von mindestens 10⁶ Zellen/ml erreicht hatten, wurden sie für die Versuche verwendet.

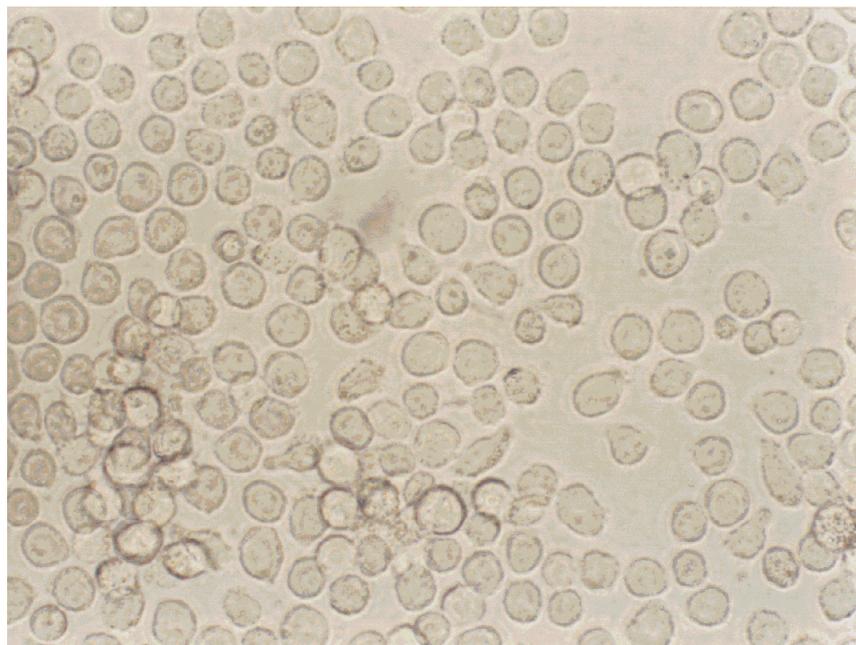


Abb. 1: U937-Zellen, 360fach vergrößert

2.1.2. HaCaT-Zellen

Bei der Zelllinie HaCaT (human adult low calcium temperature keratinocytes) handelt es sich um humane Keratinocyten. Sie wurden durch Dr. N. E. Fusenig, Deutsches Krebsforschungsinstitut, Heidelberg, bereitgestellt und von der Hautklinik der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg übernommen.

In ihrer Initialphase ist die Entwicklung der HaCaT-Zellen sehr stark von Calciumkonzentration und Temperatur abhängig, nach ca. zehn Passagen sind sie relativ unempfindlich gegenüber veränderten Wachstumsbedingungen. Die Zelllinie ist aus diesem Grund und wegen ihrer gleichbleibenden Replikations- und Proliferationsraten einfach zu handhaben [32, 36].

Für die Anzucht der HaCaT-Zellen wurde serumfreies Keratinocyten-SFM Medium, das mit rekombinatem Wachstumsfaktor (rEGF) und Rinderhypophysenextrakt ergänzt wurde, verwendet. Die Inkubation der HaCaT-Zellen erfolgte wie bei den U937-Zellen stationär in einer CO₂-Atmosphäre (5%) bei 37°C. Nach sieben Tagen, wenn sich am Boden des Kulturgefäßes ein kompletter Zellrasen ausgebildet hatte, wurden die Zellen jeweils umgesetzt. Zum Ablösen der Zellen wurde eine Trypsin-EDTA-Lösung verwendet. Für die Neuanzucht der Zellen wurden 20 ml Zellsuspension (Zellzahl: 50000 Zellen/ml) in ein Kulturgefäß ausgesät. Um die Zellen für die Versuche vorzubereiten, wurden sie in Mikrotiterplatten eingesät. Bei einer Ausgangszellzahl von 5000 Zellen/ml hatten die HaCaT-Zellen nach drei Tagen einen Monolayer ausgebildet und konnten für die Versuche verwendet werden.

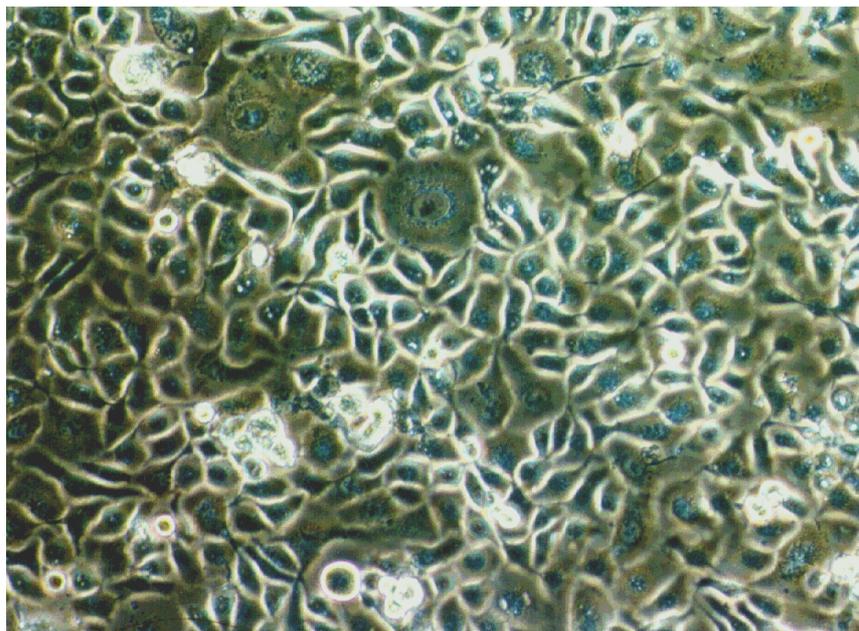


Abb. 2: HaCaT-Zellen sieben Tage nach Einsaat, 180fach vergrößert

2.2. Geräte und Hilfsmittel

- 96-Mikrowellplatten, steril : Nunc GmbH, Wiesbaden
- 96-Mikrowellplatten, unsteril: Greiner, Frickenhausen
- Analysenwaage AC210 S-OD1: Sartorius, Göttingen
- Auslaufpipetten wattiert, steril 1 ml, 5 ml, 10 ml: Nunc GmbH, Wiesbaden
- Begasungsbrutschrank BB 6060: Heraeus GmbH, Hanau
- Bürker-Zählkammer: Feinoptik GmbH, Bad Blankenburg / Thüringen
- Cytomorph-b-Platten: Fa. Nerbe plus, Winsen / L.
- Durchflusszytometer Fac scan: Beckton Dickinson, Heidelberg
- Fotoapparat Contax 167 MT: Carl-Zeiss-Jena, Jena
- Flüssigkeitsszintillationsmessgerät Liquid scintillation counter Wallac 1410, Wallac Oy, Turku, Finnland
- Kältebad: Haake, Berlin
- Megafuge 1,0 R: Heraeus GmbH, Hanau
- Mehrkanalpipette Transferpette-8 20-200 µl: Brand GmbH, Wertheim/Main
- Pipettierhilfe Sarpette: Sarstedt, Nürnbergrecht
- Pipettenspitzen 100 µl, 1000 µl 5000 µl: Eppendorf GmbH, Hamburg
- Plattenphotometer Easy Reader EAR 340 AT: SLT-Labinstruments GmbH, Crailsheim
- Reinraumwerkbank: Elektromat Dresden, Dresden
- Schräghalszellkulturflaschen aus Polystyren 250 ml und 50 ml: Nunc GmbH, Wiesbaden
- Schüttler Varishaker-Inkubator: Dynatech GmbH, Denkendorf
- Szintillatortröhrchen Mini Vials B: Sarstedt, Nürnbergrecht
- Umkehrmikroskop Telaval 31: Carl-Zeiss-Jena, Jena
- Varipette 100 µl, 500 µl, 1000 µl, 2500 µl: Eppendorf GmbH, Hamburg
- Zentrifugenröhrchen aus Polystyren 13 x 100 mm, 8 ml, Falcon® 2027: Beckton Dickinson, Heidelberg
- Zentrifugenröhrchen aus Polystyren 17 x 100 mm, 14 ml, Falcon® 2095: Beckton Dickinson, Heidelberg

2.3. Chemikalien und Testkits

- [³H]Arachidonsäure (radioaktive Konzentration: 37 MBq/ml, spezifische Aktivität: 23,8 GBq/mg): DuPont NEN Products Division, Bad Homburg
- Annexin-V-Propidiumiodid-Färbung Annexin V FITC Kit, Immunotech, Hamburg
- Foetales Kälberserum (FCS), hitzeinaktiviert: GIBCO BRL Life Technologies, Berlin
- Keratinocyten-Medium SFM, serumfrei, mit rekombinantem Wachstumsfaktor (rEGF) und Rinderhypophysenextrakt: GIBCO BRL Life Technologies, Berlin
- Medium RPMI 1640 mit Glutamin und Phenolrot: GIBCO BRL Life Technologies, Berlin
- Medium RPMI 1640 ohne Glutamin und Phenolrot: GIBCO BRL Life Technologies, Berlin
- Natriumdodecylsulfat (SDS): Ferak, Berlin
- Nichtradioaktiver Testkit zur Zellproliferations- und Zytotoxizitätsbestimmung EZ4U (gesprochen: easy for you): Biomedica GmbH, Wien (Vertrieb in Deutschland durch Biozol GmbH, Eching),
- Sandwich-ELISA zur Bestimmung Histon-assoziiertes DNA-Fragmente Cell Death Detection ELISA PLUS: Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim
- Szintillatorcocktail Rotiszint[®] 2200: Carl Roth GmbH & Co.KG: Karlsruhe
- Trypanblau: Serva, Heidelberg
- Trypsin-EDTA-Lösung: GIBCO BRL Life Technologies GmbH, Berlin

2.4. Testsubstanzen

Es wurden folgende Substanzen auf ihre Zytotoxizität an U937- und HaCaT-Zellen, auf ihre Membrantoxizität und auf morphologische Zellschädigung untersucht:

- **Benzalkoniumchlorid Ph. Eur. 97** (Caesar & Loretz GmbH, Hilden, Deutschland)
- **Cocamidopropylbetain-Lösung 30 Prozent DAC** (Fettsäureamidoalkylbetain, Cocamidopropyldimethylglycin, TEGO[®] Betain L7; TH. Goldschmidt AG, Essen, Deutschland)
 - **Cocamidopropylbetain, wasserfrei** (TEGO[®] CKD; TH. Goldschmidt AG, Essen, Deutschland)
 - **Cocamidopropylbetain-Lösung 30 Prozent, salzarm** (TEGO[®] E; TH. Goldschmidt AG, Essen, Deutschland)

- **Macrogolcetylstearylether Ph. Eur. 97**
 - **Brij[®]78** (Polyethylenglycol(20)stearylether, Firma ICC Speciality Chemicals, Essen, Deutschland)
 - **Cremophor[®] A25 "BASF"** (Polyethylenglycol(25)cetylstearylether, Macrogol-25-cetylstearylether, Cetareth-25, Cremophor O; Caesar & Loretz GmbH, Hilden, Deutschland)
- **Macrogolglycerolricinoleat Ph. Eur. 97**
 - **Cremophor[®] EL "BASF"** (Glycerin-Polyethylenglycolricinoleat, PEG 35 Rizinusöl, Macrogol 1500 glyceroltriricinoleat, Macrogol 35 glyceroltriricinoleat; Caesar & Loretz GmbH, Hilden, Deutschland)
 - **Fraktionen von Cremophor[®] EL** (hergestellt von Kunkel, M. et al. [138])
- **Natriumcetylstearylsulfat Ph. Eur. 97** (Lanette[®] E, Vaseline Fabrik E. Wasserfuhr GmbH, Bonn, Deutschland)
- **Natriumdodecylsulfat Ph. Eur. 97** (Natriumlaurylsulfat, Texapon K12, Firma Ferak, Berlin, Deutschland)
- **Natriumlaurylethersulfat-Lösung 27 Prozent DAC** (Natriumdodecylethersulfat, Texapon[®] NSO "Henkel"; Caesar & Loretz GmbH, Hilden, Deutschland)
- **Poloxamer[®] 188 DAC** (Lutrol[®] F 68; Synopharm GmbH, Barsbüttel, Deutschland)
- **Polysorbat 80 Ph. Eur. 97** (Tween[®] 80; Boehringer Ingelheim Bioproducts, Partnership, Heidelberg, Deutschland)
- **Entöltes Sojalecithin DAB** (Caesar & Loretz GmbH, Hilden, Deutschland)
- **Triton[®] X-100** (Firma Ferak, Berlin, Deutschland)

Benzalkoniumchlorid, Brij[®]78, Cremophor[®] EL, Cocamidopropylbetain (TEGO[®] Betain L7), Natriumdodecylsulfat, Natriumdodecylethersulfat, Polysorbat 80, Sojalecithin und Triton[®] X-100 wurden auf ihre apoptoseinduzierenden Eigenschaften hin untersucht.

Bei Benzalkoniumchlorid und Brij[®]78 wurde die Zytotoxizität zusätzlich mit Trypanblaufärbung bestimmt.

Zwei weitere Substanzen, Romulgin[®] N (Deutsche Hygienewerke GmbH Rodleben, Deutschland) und Macrogol 6000 (Polyethylenglycol 6000, Polyoxyethylen 6000, PEG 6000 Firma Ferak, Berlin, Deutschland) wurden ergänzend auf ihre Zytotoxizität im EZ4U an U937-Zellen untersucht.

3. Methoden

3.1. Arachidonsäure-Freisetzungstest (AART)

3.1.1. Allgemeines

Die Membrantoxizität der Testsubstanzen wurde im [^3H]Arachidonsäure-Freisetzungstest (AART) untersucht [133, 134].

Arachidonsäure ist essentieller Bestandteil der Phosphoglyceride (Phospholipide), die zu den Hauptbausteinen der Zellmembran gehören. Nach dem fluid mosaic model bestehen Membranen in Zellen aus Phosphoglyceriden, die in einer Bilayer angeordnet sind und so eine flüssig kristalline Matrix bilden. In diese Matrix sind Proteine eingelagert, die je nach ihrer Aminosäuresequenz mehr oder weniger tief in die Lipiddoppelschicht eindringen [147].

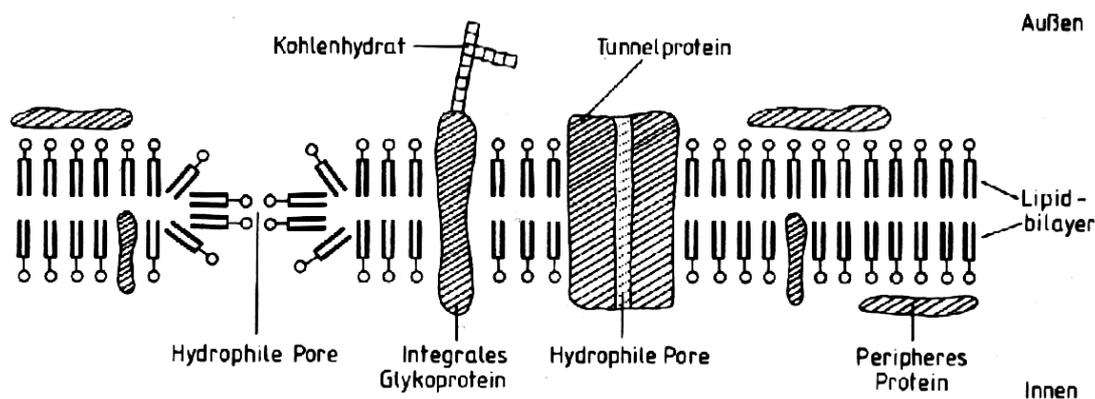


Abb. 3: Fluid mosaic Modell der Zellmembran nach [21]

Die Bilayer aus Phosphoglyceriden sind die Basis für eine Begrenzung der Zelle nach außen oder eine Abgrenzung von Zellorganellen und Kompartimenten in der Zelle, die relativ undurchlässig für polare Moleküle sind. Lipidmoleküle können sich jedoch lateral frei durch die Lipiddoppelschicht bewegen. Phosphoglyceride enthalten zwei Fettsäuren, die mit den beiden freien Hydroxylgruppen des Glycerin-3-phosphats verestert sind. Der Phosphorsäurerest ist außerdem mit einem Alkohol, z.B. Cholin oder Ethanolamin, verestert. Phosphoglyceride kommen fast ausschließlich in Membranen vor [147].

Phosphoglyceride können durch spezifische Phospholipasen gespalten werden. So hydrolysiert die Phospholipase 1 die Esterbindung in 1-Position und die Phospholipase 2 die Esterbindung in 2-Position. Dadurch können spezifisch bestimmte Fettsäuren aus den Phosphoglyceriden freigesetzt werden [147].

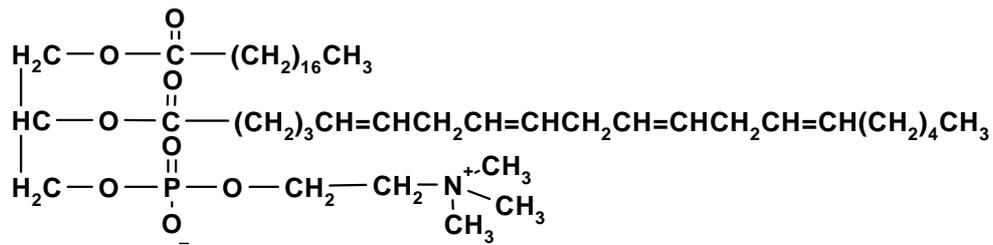


Abb. 4: Strukturformel eines Phosphoglycerides

Arachidonsäure wird hauptsächlich durch die Phospholipase A2 freigesetzt [85, 184]. Die Arachidonsäure ist eine mehrfach ungesättigte Fettsäure mit 20 Kohlenstoffatomen und 4 Doppelbindungen in Position 5, 8, 11 und 14 [184].



Abb. 5: Strukturformel der Arachidonsäure

Arachidonsäure ist nicht nur ein Bestandteil der Biomembranen in Zellen, nach ihrer Freisetzung aus den Membranphosphoglyceriden fungiert sie als Signalmolekül, das in Wechselwirkung mit Rezeptoren, Enzymen, Ionenkanälen und Transkriptionsfaktoren treten kann. In der Niedrig-Energie-Konformation ist sie in der Lage, sich Rezeptormolekülen anzupassen.

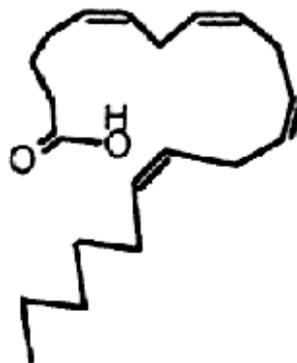


Abb. 6: Niedrig-Energie-Konformation der Arachidonsäure nach [184]

Außerdem wird die Arachidonsäure in der Arachidonsäurekaskade zu Prostaglandinen, Leukotrienen und Thromboxanen, die ihrerseits physiologisch aktiv sind, metabolisiert [184]. Arachidonsäure ist zum größten Teil in den Membranphosphoglyceriden gebunden. Der Einbau der Arachidonsäure in die Membranen wird durch die Enzymaktivität der Arachidonoyl-CoA-Synthetase und der Arachidonoyl-CoA:Lysophospholipidtransferase bestimmt, die bei Anwesenheit von reduziertem Coenzym A, ATP und Mg^{2+} aktiv ist [184].

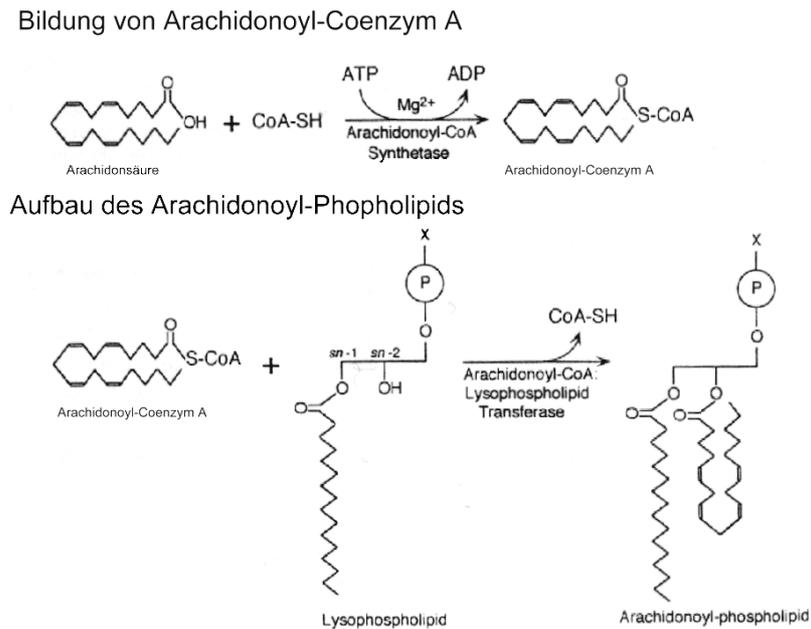


Abb. 7: Schema zum Einbau der Arachidonsäure in Phosphoglyceride nach [184]

Mit dem Arachidonsäure-Freisetzungstest (AART) wird [^3H]Arachidonsäure bestimmt, die nach aktivem Einbau in die Zellmembran durch Einwirkung von Testsubstanz aus der Zellmembran wieder herausgelöst bzw. freigesetzt wird [133, 134]. Für die Freisetzung von Arachidonsäure aus der Zellmembran ist zum einen die Phospholipase A2 verantwortlich, die die Esterbindung der Phosphoglyceride in 2-Position spaltet, zum anderen kann jedoch auch eine Herauslösung von Phosphoglyceriden aus der Zellmembran durch die Testsubstanz selbst erfolgen. Handelt es sich hierbei um einen nicht enzymatischen Prozess, müsste dieser auch in Kälte erfolgen. Außer [^3H]Arachidonsäure und Phosphoglyceriden, die [^3H]Arachidonsäure enthalten, werden auch aus [^3H]Arachidonsäure entstandene Metabolite (Entzündungsmediatoren) im AART erfasst.

3.1.2. Testdurchführung

Bei der Durchführung des AART wurden die U937-Zellen zunächst mit [^3H]Arachidonsäure inkubiert, damit diese in die Zellmembran eingebaut werden konnte. Dafür wurde eine Zellkulturflasche mit 30 ml Zellsuspension der U937-Zellen, die sich in der stationären Wachstumsphase befanden (Zellzahl $10^6 - 2 \cdot 10^6$ Zellen/ml), zentrifugiert ($270 \times g$, 4°C , 5min) und mit RPMI-Medium gewaschen. Die Zellsuspension wurde in 27 ml RPMI-Medium resuspendiert und auf eine Zellzahl eingestellt, die 10^6 Zellen/ml entsprachen, bezogen auf 30 ml Zellsuspension mit FCS. Die Zellen wurden zunächst ohne FCS für eine Stunde bei 37°C und 5% CO_2 Atmosphäre inkubiert. Danach wurden 3 ml FCS (entspricht 10%) und $15 \mu\text{l}$ [^3H]Arachidonsäure (37 MBq/ml) zugegeben.

Während der nun folgenden 24 Stunden Inkubationszeit (37°C, 5% CO₂) wurde die mit Tritium markierte Arachidonsäure in die Zellmembran eingebaut. Es stellte sich ein Gleichgewicht zwischen freier und eingebauter [³H]Arachidonsäure ein. Nach dem Einbau der Arachidonsäure wurden die Zellen zentrifugiert (270 x g, 4°C, 5 min) und die Einbaurrate bestimmt (siehe 3.1.3. Berechnungen). Die Einbaurrate sollte mindestens 65% betragen.

Nach 2-maligem Waschen der markierten Zellen mit RPMI-Medium, wurden sie mit 30 ml RPMI-Medium resuspendiert und konnten der Verdünnungsreihe zugegeben werden.

Es wurden jeweils 0,5 ml Substanzlösung in Polystyrenröhrchen vorbereitet. Dazu wurden 0,5 ml Zellsuspension pipettiert. Die Röhrchen wurden fest verschlossen für eine bzw. 24 Stunden bei 37°C inkubiert. Mit 30 ml Zellsuspension, die markierte U937-Zellen enthielt, konnten 8 Konzentrationen, ein Leerwert, und eine Positivkontrolle jeweils als Dreifachbestimmung bei ein- und 24-stündiger Exposition getestet werden.

Nach der Exposition wurden die Zellen zentrifugiert (270 x g, 4°C, 5 min) und 0,5 ml Überstand entnommen und mit Szintillatorcocktail gemischt. Nach der Homogenisierung mit dem Szintillatorcocktail wurde die Radioaktivität der Lösung im Flüssigkeitsszintillationsmessgerät bestimmt.

Um enzymatische Prozesse auszuschließen, wurden die Versuche auch bei 4°C durchgeführt. Nach dem Einbau der [³H]Arachidonsäure wurde mit gekühltem Medium und gekühlten Röhrchen unter Benutzung eines Kältebades gearbeitet.

Bei jedem Versuch wurde eine Zellkontrolle und eine Positivkontrolle mitbestimmt. Für die Zellkontrolle wurden die Zellen nur mit RPMI-Medium (ohne Testsubstanz) inkubiert.

Für die Positivkontrolle sind die Zellen mit 320 µg/ml Natriumdodecylsulfat inkubiert worden. In dieser Konzentration bewirkt Natriumdodecylsulfat eine komplette Lyse der U937-Zellen. Die Positivkontrolle steht demnach für die Maximalkonzentration von Arachidonsäure, die aus der Zellmembran freigesetzt werden kann.

3.1.3. Berechnungen

Einbaurrate (E):

Sie entspricht dem prozentualen Anteil zugesetzter [³H]Arachidonsäure, der aktiv in die Zellmembran eingebaut wurde.

$$E = \left(\frac{G - \ddot{U}}{G} \right) 100\%$$

G = Gesamtradioaktivität in der Zellsuspension vor dem Einbau (Gesamt-
[³H]Arachidonsäure in der Zellsuspension)

Ü = Radioaktivität im Überstand (nicht eingebaute [³H]Arachidonsäure)

Die Einbauratzen betragen im Durchschnitt 73,6 ± 6,6 % (n = 92).

Minimal toxische Konzentration (MTK):

Als Parameter für die Einschätzung der Membrantoxizität wurde die minimal toxische Konzentration (MTK) bestimmt, die die geringste Konzentration darstellt, die eine signifikante [³H]Arachidonsäure-Freisetzung im Vergleich zur Zellkontrolle bewirkt [222]. Es wurde ein Vertrauensintervall ($\Delta Xn(p,f)$) und eine Signifikanzgrenze (Xg) nach folgenden Gleichungen berechnet:

$$\Delta Xn(p,f) = \frac{SD \cdot t}{\sqrt{n}} \quad Xg = Xn + 2\Delta Xn(p,f)$$

| | | |
|----|---|-----------------------|
| SD | = | Standardabweichung |
| t | = | Wert der t-Verteilung |
| n | = | Anzahl der Messwerte |

Die MTK stellt den Schnittpunkt der Signifikanzgrenze mit der Konzentrations-Wirkungskurve dar. Zur Ermittlung der MTK wurden die Werte aus vier unabhängigen Versuchen herangezogen (n=12).

Prozentuale Arachidonsäure-Freisetzung:

Es wurde eine prozentuale Arachidonsäure-Freisetzung (RC) der Testsubstanzen bezogen auf die maximale Freisetzung durch SDS nach folgender Gleichung berechnet:

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

| | | |
|-------|---|---|
| X_0 | = | Mittelwert der freigesetzten [³ H]Arachidonsäure der Zellkontrolle (ohne Testsubstanz) |
| X_i | = | Mittelwert der freigesetzten [³ H]Arachidonsäure der Zellen mit Testsubstanz |
| X_p | = | Mittelwert der freigesetzten [³ H]Arachidonsäure der Zellen mit 320 µg/ml Natriumdodecylsulfat (Positivkontrolle) |

Aus der für jede Konzentration erhaltenen prozentualen Arachidonsäure-Freisetzung wurde die halbmaximale Arachidonsäure-Freisetzung (RC_{50}) mittels Regressionsanalyse nach der allgemeinen Gleichung der logarithmischen Funktion:

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

umgestellt nach x berechnet.

Zur Ermittlung des Endergebnisses wurden die Resultate aus 4 Versuchen herangezogen. Die für jeden Versuch ermittelte RC_{50} wurde logarithmiert (\ln). Aus diesen Werten wurden Mittelwert und Standardabweichung gebildet. Der Mittelwert und die Differenz bzw. die Summe aus Mittelwert und Standardabweichung wurden wieder potenziert und so die Werte für Mittelwert und die in Klammern angegebene obere und untere Grenze erhalten.

3.2. Zytotoxizitätsbestimmung

3.2.1. XTT-Test EZ4U

Für die Prüfung auf Zytotoxizität wurde der nichtradioaktive Testkit zur Zellproliferations- und Zytotoxizitätsbestimmung EZ4U verwendet. Bei dem Substrat handelt es sich nach Herstellerangaben um XTT (=Na-3,3'-[1-(phenylamino)-carbonyl-3,4-tetrazolium]-bis(4-methoxy-6-nitro)-benzol-sulfonsäurehydrat, $C_{22}H_{12}N_7O_{13}S_2Na$, relative Molekülmasse = 674,53).

Zum Testkit gehört weiterhin eine Aktivatorlösung, welche ein spezielles Puffergemisch enthält, das die erforderliche Substratstabilität gewährleistet und die Farbentwicklung im Vergleich zum herkömmlichen XTT-Test verbessert.

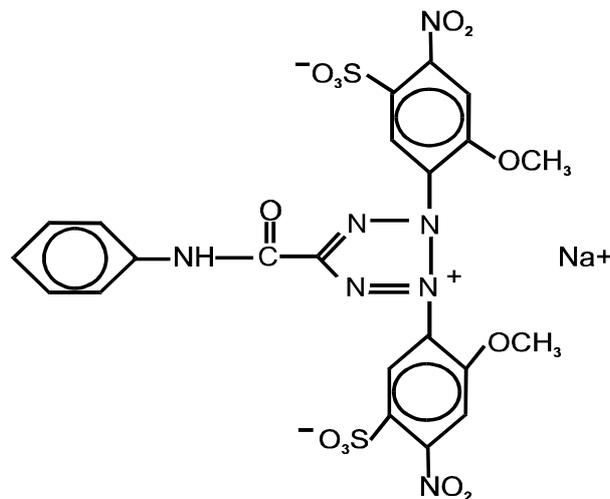


Abb. 8: Strukturformel von XTT

Lebende Zellen sind in der Lage, mit Hilfe ihrer mitochondrialen Dehydrogenasen Tetrazoliumsalze zu Formazanen umzusetzen (Abb. 9). Voraussetzung für diese Reduktion sind intakte Mitochondrien, die innerhalb weniger Minuten nach Absterben der Zellen inaktiv werden [161, 212].

Aufgrund dieser Tatsache wurden verschiedene Tests entwickelt, bei denen farblose bzw. wenig gefärbte Tetrazoliumsalze in stark gefärbte Formazanverbindungen umgesetzt werden. Die Vitalität der Zellen kann so relativ einfach bestimmt werden, denn die gemessene

Absorption des Formazans liefert ein Maß für die Stoffwechselaktivität der Zellen [61, 108, 161, 212].

Der häufig verwendete MTT-Test hat den Nachteil der Wasserunlöslichkeit des gebildeten Formazans [61, 161, 199, 212]. Das führte zur Entwicklung des XTT-Tests, dem ein Tetrazoliumsalz zugrunde liegt, das in ein lösliches Formazan umgewandelt wird.

Die Vorteile des XTT-Tests gegenüber dem MTT-Test bestehen zum einen in der einfacheren Handhabung, ein Lösungsschritt ist nicht mehr notwendig, zum anderen in der Möglichkeit, die Zellen nach Testdurchführung weiter zu verwenden, sowie im Wegfall der Verwendung toxischer Lösungsmittel.

Nachteilig sind jedoch die geringe Stabilität der Formazanprodukte sowie relativ niedrige Absorptionswerte [43, 108, 192, 235]. Durch das Puffergemisch im EZ4U-Testkit wurde der XTT-Test in dieser Hinsicht verbessert [36, 135].

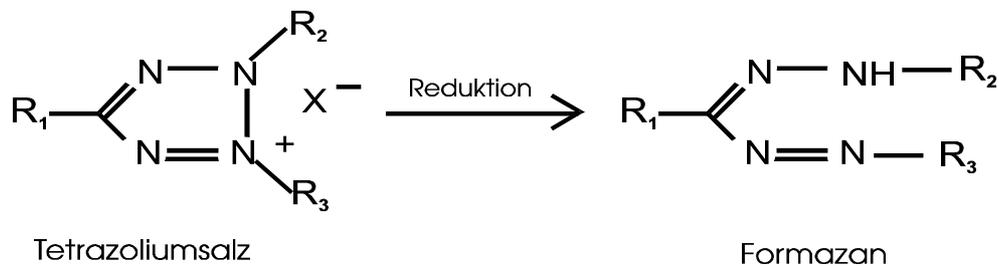


Abb. 9: Umsetzung von Tetrazoliumsalzen zu Formazanen

3.2.1.1. Testdurchführung

Vor Durchführung des Zytotoxizitätstests mit EZ4U wurden die Zellen zunächst zentrifugiert, gewaschen und auf eine Zellzahl von 10^6 Zellen/ml eingestellt. Die in farblosen RPMI (ohne Kälberserum) suspendierten Zellen wurden in Gegenwart ansteigender Konzentrationen der Testsubstanz 1 Stunde bzw. 24 Stunden bei 37°C und 5% CO_2 inkubiert. Für die Ansätze fanden Mikrotiterplatten mit 96 Kavitäten und 200 μl Zellsuspension pro Kavität Verwendung. Die Zellzahl in den Ansätzen betrug $5 \cdot 10^5$ Zellen/ml.

Nach der Inkubation wurden jeweils 20 μl der nach Testvorschrift hergestellten strohgelben Substratlösung in die jeweiligen Kavitäten gebracht und nach kurzem Durchmischen weitere 2 Stunden bei 37°C inkubiert. Es entstand das ziegelrot gefärbte Formazan. Die Absorption wurde bei einer Wellenlänge von 450 nm (Referenz 620 nm) im Plattenphotometer gemessen.

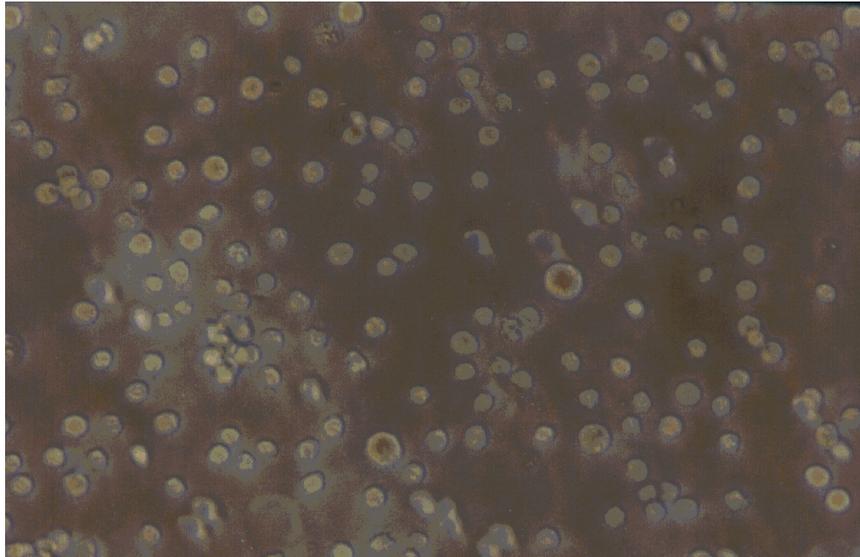


Abb. 10: U937-Zellen nach 15 Minuten mit XTT-Substrat (200fach vergrößert)

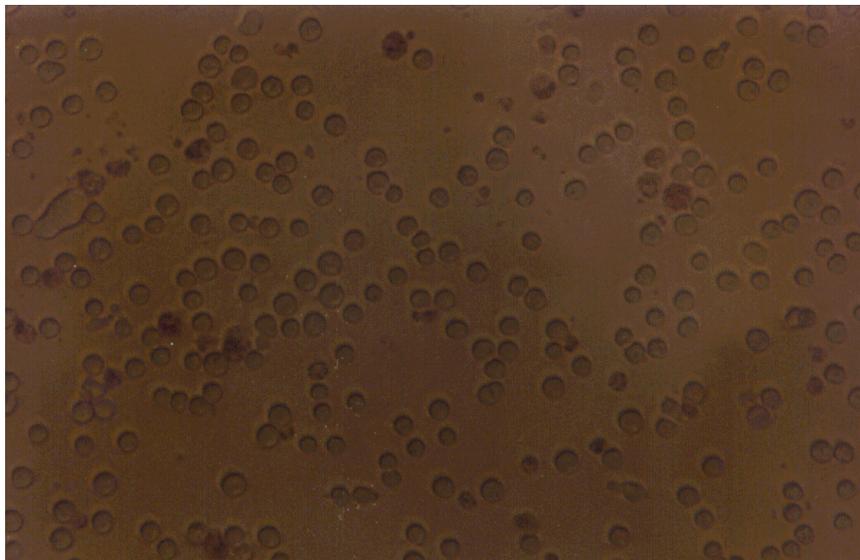


Abb. 11: U937-Zellen nach 2 Stunden mit XTT-Substrat (lebend; 200fach vergrößert)

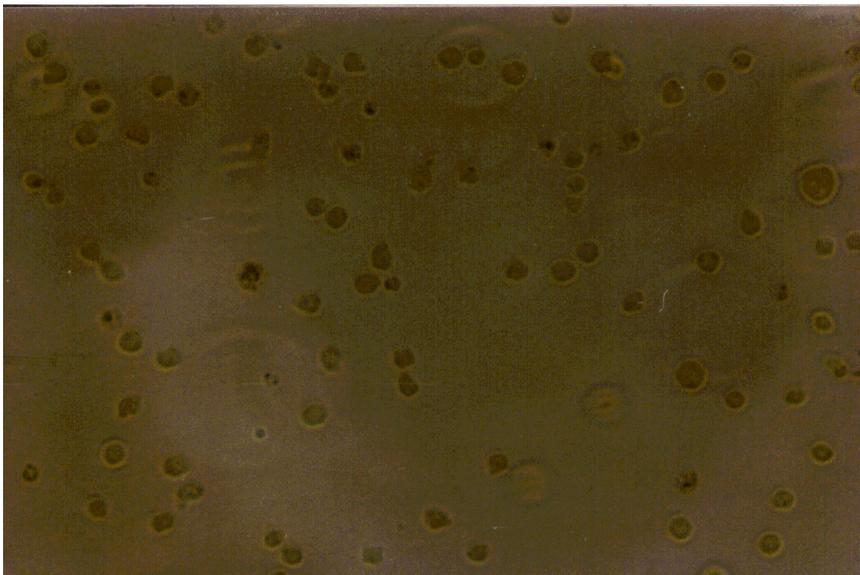


Abb. 12: U937-Zellen nach 2 Stunden mit XTT-Substrat (tot; 200fach vergrößert)

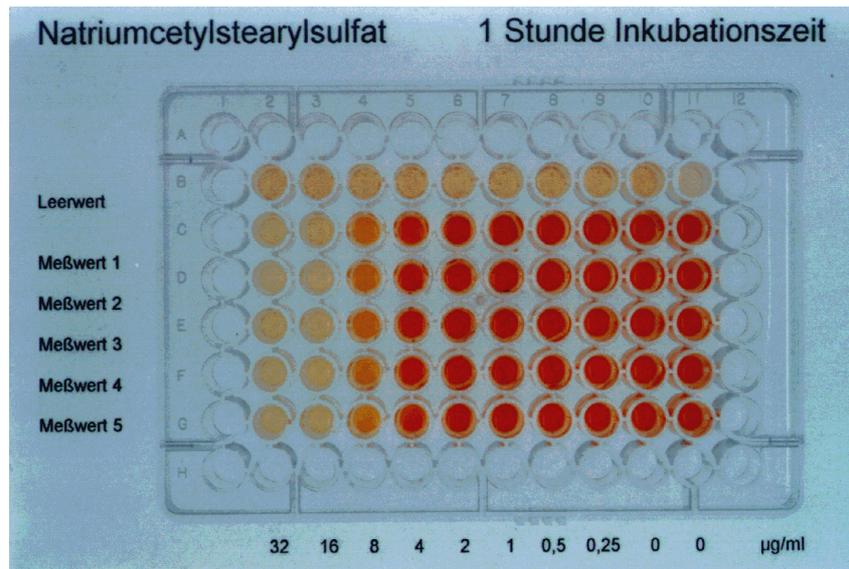


Abb. 13: Mikrotiterplatte mit U937-Zellen nach Testdurchführung

3.2.1.2. Berechnungen

Zu jeder Konzentration wurden 5 Absorptionswerte (Messwert, x_M) gemessen. Für die Zellkontrolle (ohne Testsubstanz) standen 10 Messwerte zur Verfügung. Die Zytotoxizität wurde wie folgt berechnet:

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

x_0 = Mittelwert der Absorptionswerte der Zellkontrolle (ohne Testsubstanz)

x_i = Mittelwert der Absorptionswerte der mit Testsubstanz behandelten Zellen (Messwert, x_m)

Aus den für jede Konzentration erhaltenen prozentualen Zytotoxizitätswerten wurde die halbmaximale Zytotoxizität (CC_{50}) mittels Regressionsanalyse nach der allgemeinen Gleichung der logarithmischen Funktion:

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

umgestellt nach x berechnet.

Zur Ermittlung des Endergebnisses wurden die Resultate aus 3 oder 4 Versuchen herangezogen. Es wurden Mittelwert und Standardabweichung für die jeweiligen CC_{50} -Werte ermittelt. Wie bei der Bestimmung der RC_{50} wurden sie logarithmiert (\ln) und entsprechend wieder potenziert, sodass die in Klammern angegebene obere und untere Grenze gebildet werden konnten.

3.2.1.3. Untersuchungen zum XTT-Test

Einfluss der Inkubationszeit bei Testdurchführung:

Der eigentlichen Expositionszeit (1 bzw. 24 Stunden) folgen bei Durchführung des XTT-Tests 2 weitere Stunden Inkubation mit dem EZ4U-Substrat. In diesen 2 Stunden wird das Substrat umgesetzt. Das stellt einen aktiven Prozess dar, der unmittelbar nach Aufbringen des Substrates beginnt und über die 2 Stunden Inkubationszeit kontinuierlich fortgesetzt wird. Da bei dem vorliegenden Versuchsansatz die Testsubstanz nicht entfernt wird, stellt sich die Frage nach dem Einfluss dieser zusätzlichen 2 Stunden Expositionszeit auf die Toxizität der Testsubstanz. Die Substanz, die die größte Zeitabhängigkeit in der Zytotoxizität aufwies, das Cremophor® EL, wurde ausgewählt, um an ihr exemplarisch diesen Einfluss nach 1-stündiger Exposition zu untersuchen. Hierfür wurden HaCaT-Zellen angezchtet und entsprechend dem Versuchsablauf behandelt. Zum Vergleich wurden die Zellen einer Mikrotiterplatte vor dem Aufbringen des EZ4U-Substrates zentrifugiert und gewaschen. Die Abbildung 14 zeigt die Ergebnisse des XTT-Tests nach 1-stündiger Exposition und anschließender Entfernung des Cremophor® EL und nach 1-stündiger Exposition ohne Entfernung des Cremophor® EL vor der 2-stündigen Inkubation mit dem Substrat.

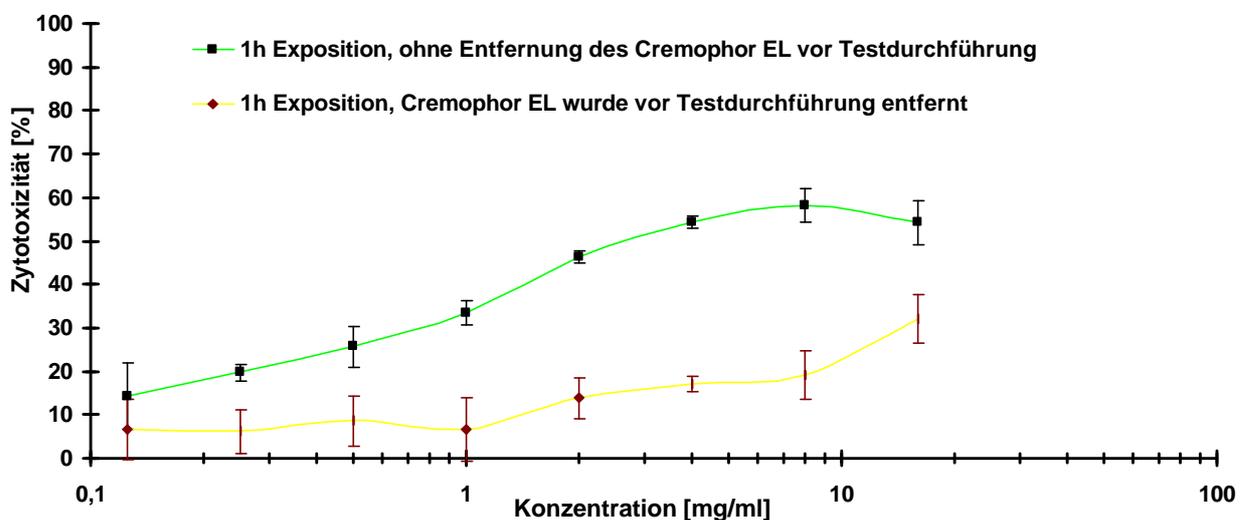


Abb. 14: Zytotoxizität von Cremophor® EL an HaCaT-Zellen – Einfluss der 2-stündigen Inkubation bei Testdurchführung (n = 5, $p \leq 0,05$)

Die Zytotoxizität des Cremophor® EL in Konzentrationen oberhalb 1 mg/ml ist signifikant größer, wenn sich bei der Testdurchführung noch Cremophor® EL an den Zellen befindet. Im Vergleich waren hier bei 10 mg/ml 60% Toxizität zu messen, während die Zellen, bei denen Cremophor® EL vor Testdurchführung entfernt wurde, nur 30% Toxizität aufweisen.

Zytotoxizität von XTT:

Laut Herstellerangaben ist das EZ4U-Substrat nicht zytotoxisch. Die Zellen wiesen jedoch erhebliche morphologische Veränderungen auf, wenn sie dem EZ4U-Substrat ausgesetzt waren.

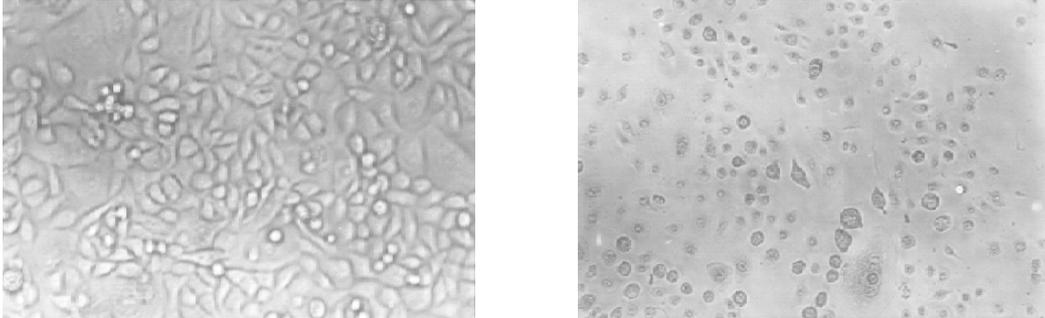


Abb. 15: HaCaT-Zellen; links unbehandelt; rechts nach 2-stündiger Exposition mit XTT-Substrat, 20 Stunden nach Entfernung des XTT-Substrates (100fach vergrößert)

HaCaT-Zellen wurden für 2 Stunden mit dem EZ4U-Substrat inkubiert. Nach einem Waschvorgang wurden sie für weitere 20 Stunden inkubiert und die Stoffwechselaktivität der Zellen im XTT-Test bestimmt. Zum Vergleich wurden Zellen, die nicht mit EZ4U behandelt, aber ebenfalls gewaschen und 20 Stunden inkubiert wurden, im XTT-Test untersucht. Die optische Dichte lag bei den mit EZ4U-Substrat behandelten Zellen nur bei 0,219 ($n = 10$). Nicht mit XTT behandelte Zellen wiesen unter gleichen Bedingungen eine optische Dichte von 1,397 ($n = 10$) auf. Die Zytotoxizität von XTT beträgt demnach 84 %.

Um den Einfluss des EZ4U-Substrates auf HaCaT-Zellen, die mit Testsubstanz behandelt wurden, zu untersuchen, ist Cremophor[®] EL verwendet worden.

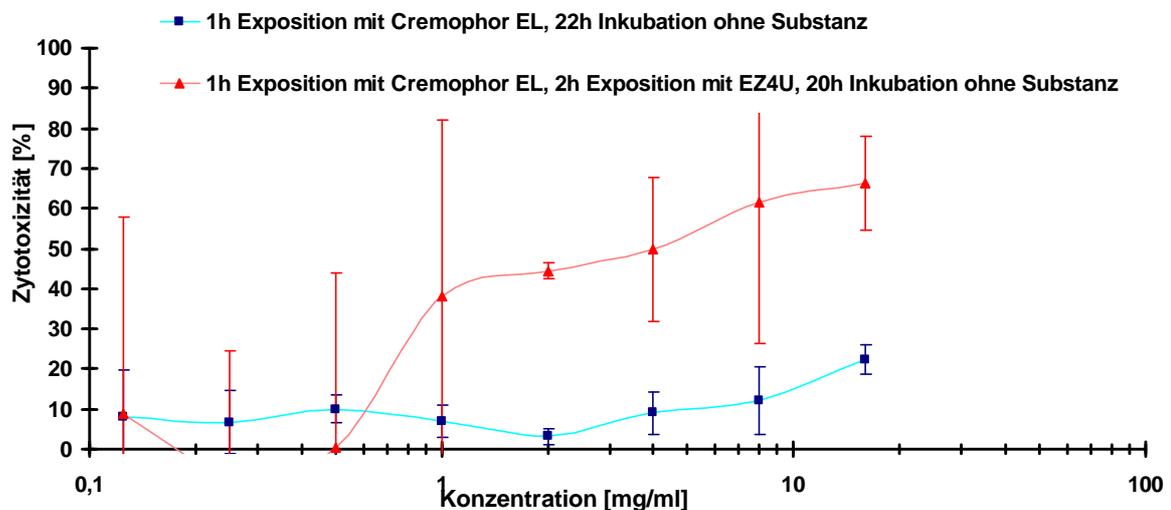


Abb. 16: Zytotoxizität von Cremophor[®] EL und XTT-Substrat an HaCaT-Zellen ($n = 5$, $p \leq 0,05$)

In der Abbildung 16 ist die Zytotoxizität von Cremophor® EL an HaCaT-Zellen mit und ohne XTT-Behandlung dargestellt. Die Zytotoxizität von Cremophor® EL wurde durch das XTT-Substrat oder das gebildete Formazan verstärkt. Ohne zusätzliche Einwirkung von EZ4U-Substrat ist die Zytotoxizität von Cremophor® EL relativ gering (10 bis 20%). Wirkte zusätzlich das Substrat bzw. das gebildete Formazan auf die Zellen ein, ist die Zytotoxizität bei Cremophor® EL-Konzentrationen über 1mg/ml signifikant auf 40 bis 70% erhöht. Durch die geringen Absorptionswerte, die nur erreicht wurden (16% im Vergleich zu nicht vorgeschädigten Zellen), sind die Standardabweichungen unverhältnismäßig groß.

3.2.2. Trypanblaufärbung

Zur Unterscheidung lebender und toter Zellen wurde eine 1%ige Trypanblaulösung benutzt. Trypanblau wurde dazu in 0,9%iger NaCl-Lösung gelöst. Bei Trypanblau handelt es sich um das Natriumsalz von 4,4'-Bis(8-amino-3,6-disulfo-1-hydroxy-2-naphthylazo)-3,3'-dimethylbiphenyl.

Die Zellen wurden für die Trypanblaufärbung entsprechend dem Versuchsansatz für den EZ4U-Test vorbereitet und ebenfalls mit ansteigenden Konzentrationen der Testsubstanz 1 Stunde bzw. 24 Stunden in Mikrotiterplatten bei 37°C inkubiert. Danach wurden jeweils 50 µl Zellsuspension mit 50 µl Trypanblaulösung gemischt. Nach 5 Minuten erfolgte die Zählung der Zellen in der Bürker-Zählkammer. Tote Zellen nehmen infolge der gestörten Zellmembranintegrität die Farbstoffmoleküle auf und erscheinen blau gefärbt, lebende Zellen sehen unverändert aus.



Abb. 17: U937-Zellen nach Trypanblaufärbung in der Bürker-Zählkammer (360fach vergrößert)

Abbildung 17 zeigt lebende und tote U937-Zellen. Die toten Zellen sind blau gefärbt und erscheinen im Vergleich zu den lebenden Zellen abgeflacht.

Zur Auswertung der Trypanblaufärbung wurden Zellen aus 3 Kavitäten verwendet. Aus jeder Kavität (200 µl) wurden insgesamt ca. 125 Zellen ausgezählt.

Die Zytotoxizität wurde wie folgt berechnet:

$$CT = \left(\frac{x_t}{x_t + x_u} \right) 100\%$$

x_t = Mittelwert der ausgezählten toten Zellen (blau)

x_u = Mittelwert der ausgezählten lebenden Zellen (unverändert)

Die Mittelwerte aus den 3 Ansätzen wurden für die Regressionsanalyse und die Berechnung der CC_{50} verwendet.

3.3. Apoptoseuntersuchung

3.3.1. Allgemeines

Die Apoptose, stellt einen aktiven, physiologischen Prozess im Zellstoffwechsel dar. Im Gegensatz zur Nekrose, bei der die Zelle äußeren Einflüssen erliegt, wird bei der Apoptose ein zelleigener Mechanismus in Gang gesetzt, der letztendlich zum Tod der Zelle, zum programmierten Zelltod, führt.

Morphologisch unterscheiden sich Apoptose und Nekrose deutlich voneinander. Bei der Nekrose bläht sich die Zelle auf, bis sie schließlich platzt. Durch äußere Einflüsse wie Sauerstoffmangel, extreme Temperaturveränderungen oder unphysiologische Agenzien kommt es zur Gerinnung oder zu Verflüssigungsprozessen in der Zelle. Die Plasmamembran wird stärker permeabel für Ionen, sodass Natrium- und Kalziumionen und mit ihnen Wasser ungehindert in die Zelle einströmen können. Der Flüssigkeits- und Elektrolythaushalt ist völlig gestört. Die Zelle lysiert binnen kurzer Zeit (Osmolyse). Zellorganellen, wie z.B. Mitochondrien, schwellen dabei stark an. Nach dem Bersten der Zellmembran dringen die Zellinhaltsstoffe in das umliegende Gewebe ein und verursachen dort Entzündungen. Bei der Zellnekrose finden keine typischen Kernveränderungen statt [69, 117, 186].

Bei der Apoptose kommt es im Gegensatz zur Nekrose zu charakteristischen Veränderungen im Zellkern. Das Chromatin kondensiert zu Klumpen und sammelt sich im Randbereich des Zellkerns. Später kommt es zum Kernzerfall und schließlich zum Zerfall der Zelle. Die Zelle schwillt dabei nicht an wie bei der Nekrose, sondern sie schrumpft. Es bilden sich Bläschen (Protrusionen), sodass die Zelle zu brodeln scheint (Zeiose). Die sich bildenden Bläschen sind membranumschlossene Teile der zerfallenden Zelle, die sogenannten apoptotischen Körperchen. Sie enthalten Zellinhaltsstoffe, darunter auch

3. Methoden

Kernbruchstücke. Immun- oder Nachbarzellen resorbieren die apoptotischen Körperchen und nutzen die Zellinhaltsstoffe für den eigenen Stoffwechsel. Durch den Einschluss der Stoffe in Membranen kommt es nicht zur Entzündung. Die Zellorganellen, ausgenommen der Zellkern, behalten ihre Struktur [53, 69, 70, 117, 186, 242]. Tabelle 1 fasst die Unterschiede zwischen den beiden Arten des Zelltodes zusammen.

Tabelle 1: Morphologische Veränderungen der Zelle bei Apoptose und Nekrose

| Nekrose | Apoptose |
|----------------------------------|---|
| Schwellung | Schrumpfung → Bildung von Protrusionen |
| Kern bleibt zunächst unverändert | Chromatin kondensiert frühzeitig zu Klumpen → Kernzerfall |
| Mitochondrien blähen sich auf | Organellen (außer Zellkern) erhalten ihre Struktur |
| Membranen bersten (Osmolyse) | Zeiose: membranumschlossene Teile (apoptotische Körperchen) freigesetzt |
| Entzündung | Nachbar- o. Immunzellen resorbieren Zellreste |

Apoptose kann sowohl durch Zugabe als auch durch Wegnahme extrazellulärer Substanzen induziert werden. Sie findet ständig im menschlichen Organismus statt und stellt einen physiologischen Prozess dar [69, 117].

Bekannte Induktoren der Apoptose sind Zytostatika und Gamma-Strahlung, die DNA-Schäden verursachen und über p53-Akkumulierung zur Apoptose führen können. Glukokortikoide sind in der Lage, in manchen Immunzellen Apoptose zu induzieren. Das Hydroxylradikal, das durch reaktive Sauerstoffspezies wie H₂O₂ und Lipidperoxide entsteht, induziert in geringen Konzentrationen Apoptose, in höheren Konzentrationen kommt es zur Nekrose. An- oder Abwesenheit von Wachstums- und Überlebensfaktoren können ebenfalls zur Apoptose führen. Es gibt auch Todesfaktoren, die gezielt über den FAS-Rezeptor Apoptose auslösen, z.B. bestimmte Zytokine, wie TNF-Alpha und der spezifische FAS-Ligand.

Letztendlich kommt es durch verschiedene Mechanismen zur Aktivierung von Caspasen. Caspasen sind Cysteinproteasen, die im aktiven Zentrum Cystein enthalten und Proteine spezifisch hinter einem Aspartatrest spalten. Sie aktivieren sich gegenseitig in einer komplexen Hierarchie. Sie zerlegen Zellgerüst und Enzyme. Diese Proteinspaltungen sind die ersten Schritte, die letztendlich zu den typischen Zellveränderungen der Apoptose führen [69, 70, 117, 186]. Tabelle 2 gibt eine Übersicht zu häufig gebrauchten Methoden der Apoptose-Detektion.

Tabelle 2: Methoden zum Nachweis apoptotisch veränderter Zellen [53, 91]

| Nachweis der DNA-Fragmentierung | Andere Methoden |
|---|--|
| DNA-Leiter: Extraktion und Auftrennung von DNA mittels Gelelektrophorese, typische Querbanden bei apoptotischen Zellen [70] | APO 2.7- Antikörper , der gegen ein für die Apoptose typisches mitochondriales Membranprotein gerichtet ist [29, 58] |
| TUNEL-Test: durch das Enzym Deoxynucleotidyltransferase (TdT) wird markiertes dUTP an die 3'Hydroxyl-Enden der DNA-Strangbrüche angefügt [148] | Anlagerung von Annexin V an Phosphatidylserin, das sich bei apoptotischen Zellen an der Außenseite der Zellmembran befindet [226] |
| ELISA zum Nachweis von Histon-assoziierten DNA-Fragmenten [153] | Nachweis der Aktivität von Caspasen , die beim apoptotischen Zerfall der Zelle eine Schlüsselfunktion ausüben [230, 243] |
| Sub-G1-Peak: Bestimmung des DNA-Gehaltes der Zelle, der bei apoptotischen Zellen geringer ist als in der G1-Phase [91] | |

3.3.2. Nachweis Histon-assoziiertes DNA-Fragmente mittels ELISA-Test

Für die Apoptose ist typisch, dass das Chromatin sich verdichtet und dann in Fragmente einer charakteristischen Größenverteilung zerbrochen wird. Dies geschieht durch Endonukleasen. Nach Aktivierung der endogenen Nukleasen spalten diese den DNA-Doppelstrang in den leicht zugängliche Linker-Regionen zwischen den Nukleosomen. Es entstehen Mono- u. Oligonukleosomen. Sie enthalten DNA-Fragmente mit ca. 180 Basenpaaren und Vielfachen davon. Die DNA in den Nukleosomen ist mit den Core-Histonen H2A, H2B, H3 u. H4 eng assoziiert und dadurch vor der Spaltung durch die Endonukleasen geschützt [38, 247].

Zu Beginn der Apoptose ist die Zellmembran noch erhalten und es kommt zur Anreicherung von Oligo- u. Mononukleosomen im Zellplasma. Das Auftreten Histon-assoziiertes DNA-Fragmente ist ein typisches Kennzeichen für apoptotische Prozesse. Sie können z.B. mit Gelelektrophorese nachgewiesen werden. Bei der Gelelektrophorese der extrahierten und separierten DNA sind typische Querbanden zu sehen. Bei nekrotischen Zellen ist eine Schmierspuren der DNA typisch, da ein unregelmäßiger Zerfall des Chromatins erfolgt [30, 68, 186, 208].

Der für diese Arbeit verwendete Test ist ein photometrischer Enzymimmunoassay zum In-vitro-Nachweis von zytoplasmatischen Histon-assoziierten DNA-Fragmenten. Es können

Mono- und Oligonukleosomen nach induziertem Zelltod spezifisch mit einem 1-Schritt Sandwich-ELISA nachgewiesen werden [153].

3.3.2.1. Testdurchführung

Vor Durchführung des Enzymimmunoassays wurden die U937-Zellen zunächst zentrifugiert, gewaschen und auf eine Zellzahl von 10^5 Zellen/ml eingestellt. Die in RPMI-Medium (ohne Kälberserum) suspendierten Zellen wurden in Gegenwart der Testsubstanz 4 Stunden bzw. 20 Stunden bei 37°C und 5% CO_2 inkubiert. Für die Ansätze fanden Mikrotiterplatten mit 96 Kavitäten und 200 μl Zellsuspension pro Kavität Verwendung. Die Zellzahl in den Ansätzen betrug $5 \cdot 10^4$ Zellen/ml.

Nach der Exposition wurde die Mikrotiterplatte zentrifugiert (10 min, 270 x g) und der Überstand abgetrennt. Mit diesem Überstand wurden Histon-assoziierte DNA-Fragmente von lysierten Zellen, also von spätapoptotischen und nekrotischen Zellen, entfernt.

Zu den Zellen wurden dann 200 μl Lysepuffer pipetiert und nach 30 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Mikrotiterplatte erneut zentrifugiert (10 min, 270 x g). Der Lysepuffer löste die Zellmembranen auf und die Nukleosomen aus dem Zytoplasma der apoptotischen Zellen wurden freigesetzt. Intakte Zellkerne blieben im Zentrifugat. Die freigesetzten Nukleosomen aus dem Überstand wurden nun in den ELISA überführt.

Für den eigentlichen ELISA wurden 80 μl Konjugat-Gebrauchslösung vorgelegt. Diese Lösung enthielt zwei monoklonale Antikörper gegen DNA und Histon. Der DNA-Antikörper war mit Peroxidase (POD) gekoppelt, der Histon-Antikörper mit Biotin. Die Lösung wurde auf eine Mikrotiterplatte aufgebracht, die mit Streptavidin vorbeschichtet war. Dazu wurden nun 20 μl Überstand mit den freigesetzten Nukleosomen der lysierten Zellen gegeben. Es folgte eine Inkubationszeit von 2 Stunden bei Raumtemperatur und gleichmäßigem Schütteln (500 Umdrehungen/min). Während dieser Inkubationszeit wurde der Biotinanteil des Anti-Histon-Antikörpers an die Streptavidinbeschichtung fixiert, der Antikörperteil band an den Histonanteil der Nukleosomen. Gleichzeitig band der Anti-DNA-Antikörper an den DNA-Anteil der Nukleosomen.

Nach der 2-stündigen Inkubation wurde die Lösung sorgfältig entfernt und nach dreimaligem Waschen wurden 100 μl Substratlösung aufgetragen. Sie enthielt ABTS (2,2'-Azido-di[3-ethylbenzthiazolin-sulfonat]). Durch das Waschen wurden ungebundene Antikörper und überschüssige Nukleosomen entfernt. Die an DNA-Antikörper gebundene POD setzte nun das Substrat ABTS zu einem grünen Farbstoff um, der nach 5 bis 10 Minuten photometrisch bei 405 nm (Referenz: 492 nm) im Easy Reader vermessen wurde.

Die Bildung des Farbstoffes kann also nur dann erfolgen, wenn sich Histon-assoziierte-DNA-Fragmente im Zytoplasma von Zellen, die noch intakt sind, befinden.

Abbildung 18 gibt das Testprinzip des Sandwich-ELISA wieder.

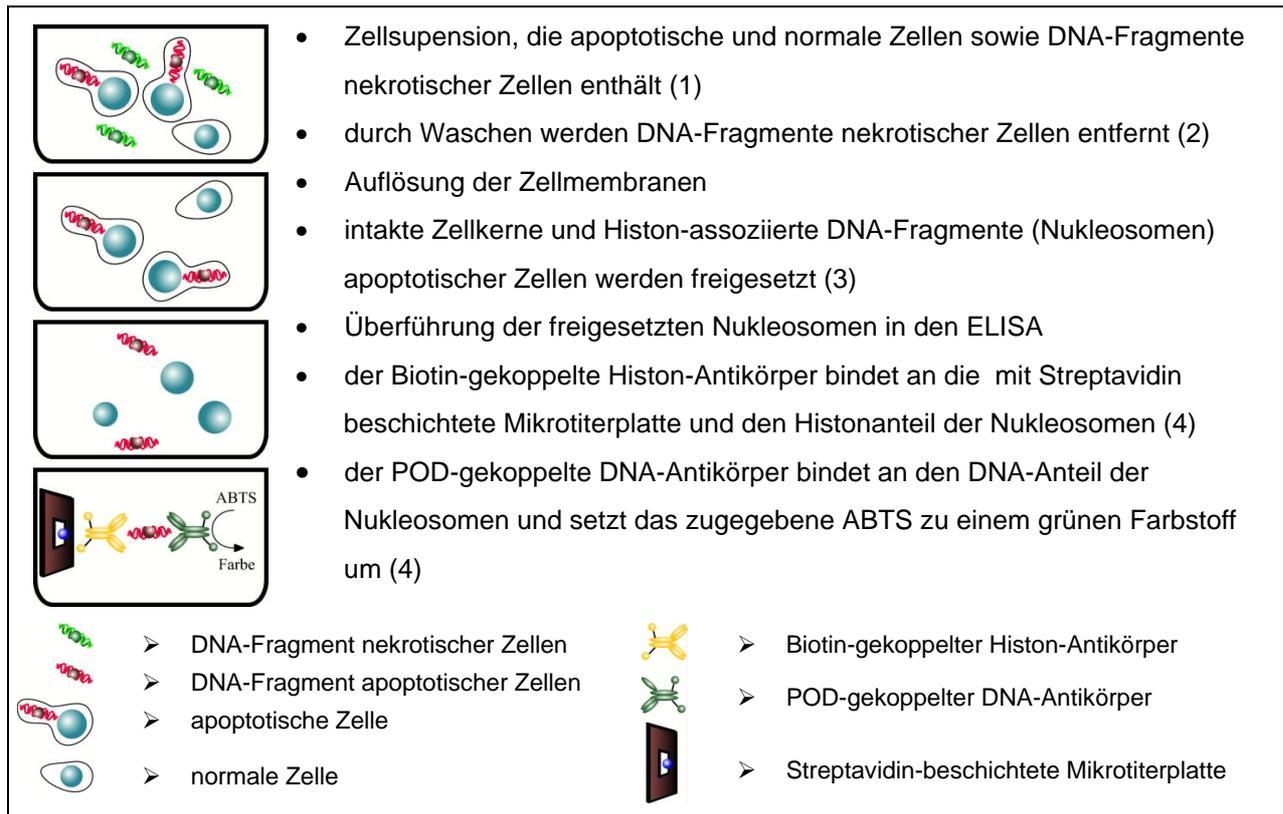


Abb. 18: Testprinzip des ELISA zur Bestimmung Histon-assoziiierter DNA-Fragmente

Bei allen Ansätzen wurde eine Zellkontrolle mitgeführt, die keine Testsubstanz enthielt. Im Test-Kit enthalten war auch ein DNA-Histon-Komplex, der für die Positiv-Kontrolle verwendet wurde. Zur Bestimmung des Hintergrundes wurde der zum Test gehörende Inkubationspuffer verwendet, in welchem auch der Antikörper und der DNA-Histon-Komplex für die Positivkontrolle gelöst wurden.

3.3.2.2. Auswertung

Für die Apoptoseuntersuchungen mit ELISA wurden zunächst Konzentrationen ausgewählt, die nur in geringem Maße zytotoxisch (ca. 1-30%) waren. Bei einigen Tensiden war es jedoch erforderlich auch stärker zytotoxische Konzentrationen (ca. 30-100%) zu untersuchen. Es wurden Doppelbestimmungen durchgeführt. Die Mittelwerte der Extinktionswerte wurden gebildet und der Hintergrund des Immunoassays subtrahiert.

Der Anreicherungsfaktor (AF) wurde wie folgt bestimmt:

$$AF = \left(\frac{x_a}{x_0} \right)$$

- x_a = Extinktion der Probe, die mit Testsubstanz behandelt wurde
 x_0 = Extinktion der unbehandelte Probe (Zellkontrolle)

3.3.3. Durchflusszytometrische Bestimmungen

Intakte Zellen zeigen eine ausgeprägte Polarität ihrer doppelschichtigen Zytoplasmamembran. Das Phosphoglycerid Phosphatidylserin befindet sich nahezu ausschließlich auf der Membraninnenseite. Relativ früh in der Apoptosekaskade kommt es zur Aufhebung dieses Gradienten und Phosphatidylserin befindet sich auch auf der Außenseite der Zelle.

Diese Umlagerung von Phosphatidylserin in der Zellmembran apoptotischer Zellen kann mit Annexin V nachgewiesen werden. Annexin V ist ein 35-36 kD großes Protein. In Gegenwart von ca. 2,5 mM Ca^{2+} bindet es mit hoher Affinität an Phosphatidylserin. Durch Kopplung mit einem Fluoreszenzfarbstoff kann Annexin V im Fluoreszenz-Mikroskop oder durchflusszytometrisch erfasst werden.

Doch auch durch eine Desintegration der Membran, die häufig bei der Nekrose erfolgt, können die Zellen angefärbt werden, da die Membran nun permeabel für Annexin V ist. Annexin V kann in die Zelle eindringen und dann an der Innenseite der Zytoplasmamembran binden. Zur Unterscheidung apoptotischer und nekrotischer Zellen sollte eine Gegenfärbung erfolgen. Nekrotische Zellen können zum Beispiel mit Propidiumiodid angefärbt werden. Propidiumiodid ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der die DNA von toten Zellen anzufärben vermag [225, 226].

3.3.3.1. Testdurchführung

Für die durchflusszytometrischen Bestimmungen wurden die U937-Zellen mit Fluorescein-isothiocyanat-konjugiertem Annexin V angefärbt. Es handelte sich um einen 1:1- Komplex von Annexin V und Fluorescein-isothiocyanat (FITC), der laut Herstellerangaben nicht die nativen phospholipidbindenden Eigenschaften von Annexin V ändert.

Vor Durchführung des Tests wurden die U937-Zellen zunächst zentrifugiert, gewaschen und auf eine Zellzahl von 10^6 Zellen/ml eingestellt. Die in RPMI-Medium (ohne Kälberserum) suspendierten Zellen wurden in Gegenwart der Testsubstanz 4 Stunden, 20 Stunden bzw. 44 Stunden bei 37°C und 5% CO_2 inkubiert. Für die Ansätze fanden 50 ml Schräghalszellkulturflaschen mit 5 ml Zellsuspension Verwendung. Die Zellzahl in den Ansätzen betrug $5 \cdot 10^5$ Zellen/ml.

Für den Test wurde die Annexin-V-Stammlösung mit dem Bindungspuffer des Testkits verdünnt. Diese Lösung wurde vor jeder Anwendung frisch hergestellt. Propidiumiodid wurde ebenfalls in Bindungspuffer gelöst.

Nach der Exposition wurden die Zellen zentrifugiert (5 min, 4°C, 500 x g), mit PBS-Puffer gewaschen und nach erneuter Zentrifugation mit 490 μl Bindungspuffer aufgenommen. Die Zellzahl betrug in den Ansätzen ca. 10^6 Zellen/ml. Dann erfolgte die Zugabe von 5 μl gebrauchsfertiger Annexin-V-Lösung und gründliche Durchmischung. Nach 10 Minuten wurden

3. Methoden

5 µl Propidiumiodidlösung (2 µg/ml) zugegeben und ebenfalls gründlich gemischt. Die Zellsuspension wurde nun mit Hilfe der Durchflusszytometrie ausgewertet. Die Lösungen und die Zellsuspension wurden bis zur Vermessung im Eiswasser aufbewahrt.

Es wurden zwei Zellkontrollen mit geführt, die nicht mit Substanz behandelt wurden. Eine Zellkontrolle wurde, wie die mit Substanzlösung inkubierten Proben, mit Annexin V und Propidiumiodid versetzt (Zellkontrolle b), die andere Zellkontrolle wurde ohne Farbstoff vermessen (Zellkontrolle a).

3.3.3.2. Auswertung

Für die Apoptoseuntersuchungen mit Annexin V wurden Konzentrationen ausgewählt, bei denen im ELISA Histon-assoziierte DNA-Fragmente nachgewiesen werden konnten. Da bei diesem Test sehr frühe Phasen der Apoptose nachgewiesen werden, erfolgte auch die Untersuchung von geringen Tensidkonzentrationen, die im EZ4U noch nicht toxisch waren. Die Exposition wurde in diesen Fällen auf 44 Stunden erhöht.

Die Auswertung der durchflusszytometrischen Analyse erfolgte mit WinMDI 2.8. Es wurde ein Dotplot erstellt und vier Quadranten festgelegt, sodass bei Zellkontrolle a 96 % der Zellen im Quadrant 3 (ungefärbte Zellen) zu vermessen waren. Die Grenzl意思ien x und y wurden um diese Bedingung zu erfüllen bei jeweils $2 \cdot 10^2$ festgelegt. Bei der Zellkontrolle b befanden sich im Mittel 79 %, mindestens aber 67 % der Zellen im Quadranten 3.

In der Abbildung 19 ist ein Dotplot der Zellkontrolle b mit der festgelegten Quadrantenaufteilung dargestellt. Im Quadrant 1 oben links befinden sich nur mit Propidiumiodid angefarbte, nekrotische Zellen (rot dargestellt), im Quadrant 2 oben rechts befinden sich mit Propidiumiodid und Annexin V gefärbte, nekrotische oder spätapoptotische Zellen (schwarz dargestellt), im Quadranten 3 unten links befinden sich ungefärbte, intakte Zellen (blau dargestellt) und im Quadrant 4 unten rechts befinden sich nur mit Annexin V gefärbte, frühapoptotische Zellen (grün dargestellt).

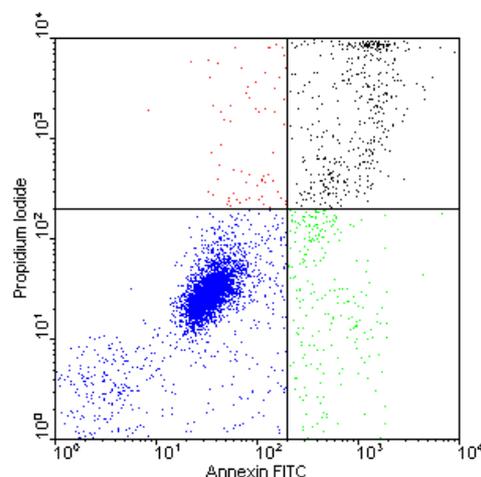


Abb. 19: Dotplot der Zellkontrolle b

3.4. Weitere Methoden

3.4.1. Vergleich von AART und Zytotoxizität

Um die Membrantoxizität und die Zytotoxizität zu vergleichen, wurde die Zytotoxizität bei der minimal toxischen Konzentration errechnet. Des Weiteren wurde in zwei unterschiedlichen Versuchsansätzen der Einfluss der Versuchsbedingungen auf das Testergebnis untersucht. Die Versuchsbedingungen des AART unterschieden sich von denen der Zytotoxizitätsbestimmung mit EZ4U durch:

- erhöhte Zellzahl beim AART, da vor der Exposition 24 Stunden mit FCS inkubiert wurde (Zellwachstum beim Einbau der [³H]Arachidonsäure)
- Exposition mit Testsubstanz in Röhrchen (AART) bzw. auf der Mikrotiterplatten (EZ4U)
- Fehlen von CO₂ bei Exposition im AART, da Röhrchen fest verschlossen waren

3.4.1.1. Zytotoxizität bei der minimal toxischen Konzentration (MTK)

Die Zytotoxizität bei der minimal toxischen Konzentration (MTK) wurde aus der Konzentrations-Wirkungs-Kurve der Zytotoxizitätsbestimmung mit EZ4U mittels Regressionsanalyse ermittelt. Der im AART bestimmte Wert der MTK wurde als x-Wert für die Konzentration in die Gleichung der Regressionsfunktion $y = a \cdot \ln(x) + b$ eingesetzt, und so die prozentuale Zytotoxizität (y-Wert) errechnet.

3.4.1.2. Zytotoxizität unter den Versuchsbedingungen des AART

Wie bei der Durchführung eines AART-Versuches wurde eine Zellkulturflasche mit 30 ml Zellsuspension mit U937-Zellen, die sich in der stationären Wachstumsphase befanden (Zellzahl $10^6 - 2 \cdot 10^6$ Zellen/ml) zentrifugiert (270 x g, 4°C, 5 min) und mit RPMI-Medium gewaschen. Die Zellsuspension wurde in 27 ml RPMI-Medium und 3 ml FCS resuspendiert und auf eine Zellzahl von 10^6 Zellen/ml eingestellt. Die Zellen wurden nun für 24 Stunden bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Das entsprach der Zeit, die beim AART für den Einbau der [³H]Arachidonsäure in die U937-Zellen benötigt wurde. Nach dieser Inkubation wurden die Zellen zentrifugiert (270 x g, 4°C, 5 min) und zweimal mit RPMI-Medium gewaschen. Dann wurden sie mit 30 ml RPMI-Medium resuspendiert und der Verdünnungsreihe zugegeben.

Es wurden jeweils 0,5 ml Substanzlösung in Polystyrenröhrchen (Falcon® 2027) vorgelegt. Dazu wurden 0,5 ml der Zellsuspension pipettiert. Die Röhrchen wurden fest verschlossen für 1 bzw. 24 Stunden bei 37°C inkubiert.

Nach der Exposition wurden jeweils 200 µl Zellsuspension aus dem Röhrchen auf eine Mikrotiterplatte überführt und 20 µl EZ4U-Substrat aufgebracht. Nach 2-stündiger Inkubation der Mikrotiterplatte bei 37°C wurde diese im Plattenphotometer vermessen.

3. Methoden

In Abbildung 20 ist die Zytotoxizität von Natriumdodecylsulfat dargestellt. Zum einen wurde sie, wie hier beschrieben, zum anderen nach Punkt 3.2.1.1. bestimmt.

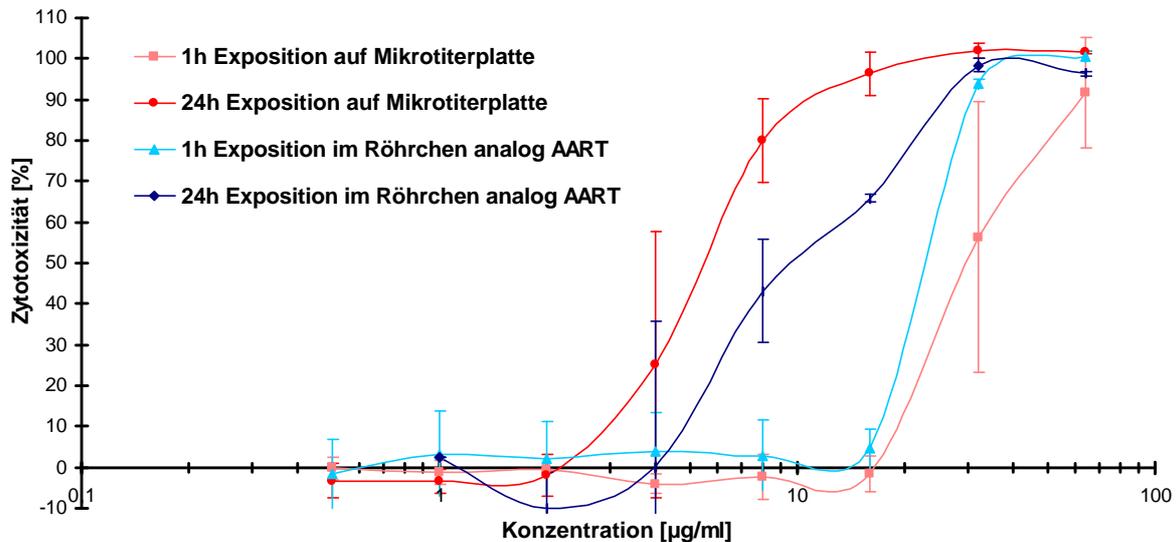


Abb. 20: Zytotoxizität von Natriumdodecylsulfat unter den Versuchsbedingungen des AART (n = 6) und des Zytotoxizitätstests mit EZ4U (n = 14)

Während sich nach 1-stündiger Exposition die Zytotoxizitätswerte nur geringfügig unterscheiden, ist nach 24-stündiger Exposition die Zytotoxizität, die unter AART-Bedingungen bestimmt wurde, deutlich geringer als die im Zytotoxizitätstest bestimmte Zytotoxizität. Es ist anzunehmen, dass die U937-Zellen nach 24 Stunden Exposition unter AART-Bedingungen weniger geschädigt werden, als bei der Zytotoxizitätsbestimmung nach Punkt 3.2.1.1..

3.4.1.3. Zytotoxizität nach Durchführung des AART

Bei diesem Versuch erfolgte eine Zytotoxizitätsbestimmung mit EZ4U im Anschluss an den AART. Nach dem die Zellen, wie im Punkt 3.1.2. beschrieben, zentrifugiert worden sind, um die Radioaktivität im Überstand zu bestimmen, wurden die Zellen mit farblosem RPMI resuspendiert und auf eine Mikrotiterplatte überführt. Danach wurde der EZ4U-Test durchgeführt: nach Aufbringen von 20 μl Substratlösung, weitere 2 Stunden Inkubation bei 37°C, Messung im Plattenphotometer.

In Abbildung 21 ist die Zytotoxizität von Triton[®] X-100 dargestellt. Sie wurde zum einen, wie im Punkt 3.2.1.1. beschrieben, bestimmt (Zytotoxizitätstest mit EZ4U), zum anderen wurde sie, in Anschluss an den AART, an den zu Ende des Versuches abzentrifugierten Zellen, bestimmt.

Wie im Versuchsansatz mit Natriumdodecylsulfat, unterscheiden sich nach 1-stündiger Exposition die Zytotoxizitätswerte nur geringfügig, während bei 24-stündiger Exposition die Zytotoxizität, die in Anschluss an den AART bestimmt wurde, deutlich geringer ist, als die im Zytotoxizitätstest mit EZ4U bestimmte Zytotoxizität. Es bestätigt sich, dass die U937-Zellen

3. Methoden

nach 24 Stunden Exposition unter AART-Bedingungen weniger geschädigt werden, als bei der Zytotoxizitätsbestimmung nach Punkt 3.2.1.1..

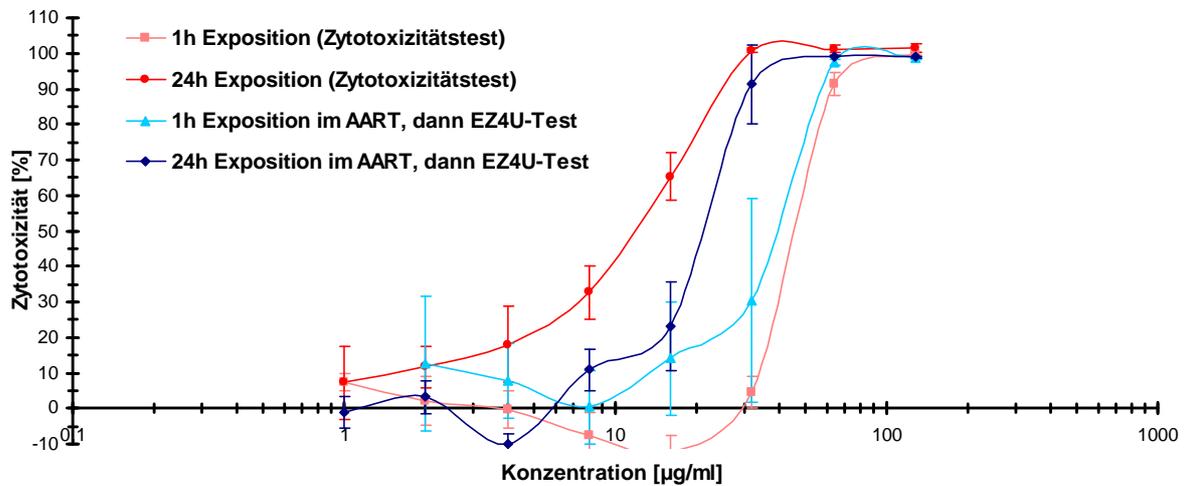


Abb. 21: Zytotoxizität von Triton[®] X-100 im Zytotoxizitätstest mit EZ4U (n = 14) und nach Durchführung des AART (n = 3)

3.4.2. Morphologische Beurteilung der Zellen

Die Zellen wurden nach 1- und 24-stündiger Exposition mit den Testsubstanzen vor der Durchführung des Zytotoxizitätstests beobachtet und Veränderungen ihrer Morphologie protokolliert. Die angeführten Stichpunkte im Ergebnisteil fassen diese Beobachtungen zusammen.

Für die im Ergebnisteil dargestellten Fotografien wurden die Zellen für 1 bzw. 24 Stunden Tensidkonzentrationen ausgesetzt, die im EZ4U-Test Zytotoxizitätswerte zwischen 0 und 100% verursachten. Die Exposition erfolgte in Cytomorph-b-Platten. Beim Fotografieren der HaCaT-Zellen, sowie bei einigen Aufnahmen der U937-Zellen wurde Phasenkontrast verwendet. Die entsprechende Vergrößerung ist bei den Abbildungen angegeben.

3.4.3. Statistik

Die Signifikanz wurde mit Hilfe des t-Testes errechnet. Normalverteilung und Gleichheit der Streuungen wurden vorausgesetzt. Für die Signifikanzentscheidung wurde eine Irrtumswahrscheinlichkeit von 0,05 zugrunde gelegt.

$$T = \frac{X - Y}{\sqrt{(n_1 - 1)SD_x^2 + (n_2 - 1)SD_y^2}} \sqrt{\frac{n_1 n_2 (n_1 + n_2 - 2)}{n_1 + n_2}}$$

X = Mittelwert 1

Y = Mittelwert 2

n₁ = Anzahl der Messwerte 1

n₂ = Anzahl der Messwerte 2

SD_x = Standardabweichung von X

SD_y = Standardabweichung von Y

4. Ergebnisse

4.1. Nichtionische Tenside

4.1.1. Macrogolcetylstearylether

Macrogolcetylstearylether (MCSE) sind neben Macrogollauryl- und Macrogololeylethern neu in das Europäische Arzneibuch (Ph. Eur.1997) aufgenommen worden. Die Monographie beschreibt eine Gruppe von Substanzen, die sich durch unterschiedliche Anzahl Ethylenoxid- bzw. Polyoxyethylen-Einheiten in physikalisch-chemischen und galenischen Eigenschaften unterscheiden.

Für ihre Darstellung wird 1 Mol Cetylstearylalkohol mit einer definierten Menge Ethylenoxid in Gegenwart von KOH umgesetzt.

Mit steigendem Ethylenoxidanteil steigt die Dispensierbarkeit der MCSE mit Wasser und der HLB-Wert. Im Gegensatz zu den Estern des Macrogols mit gesättigten höheren Fettsäuren sind die entsprechenden Ether weniger hydrolyseempfindlich. Es wurden zwei Vertreter der MCSE untersucht, Brij[®]78 und Cremophor[®] A25. Es handelt sich um Verbindungen mit relativ hohem Ethoxylierungsgrad, also eher hydrophile Verbindungen [109].

4.1.1.1. Brij[®]78

Bei Brij[®]78 handelt es sich um ein Gemisch von Polyethylenglycol-octadecylethern. Die Hauptkomponente stellt der Eicosaethylenglycol-octadecylether dar.

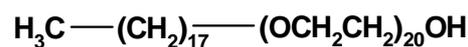


Abb. 22: Strukturformel von Brij[®]78

Der Wassergehalt beträgt maximal 3%, ein Antioxidans kann enthalten sein. Der HLB-Wert liegt bei 15,3. Brij[®]78 wird als Lösungsvermittler, O/W-Emulgator und Stabilisator für disperse Systeme eingesetzt. Es verbessert die Streichfähigkeit von Salben. Brij[®]78 ist als gut hautverträglich eingeschätzt worden. Jedoch kann es am Kaninchenauge gelegentlich zu Reizungen führen. Die orale Toxizität von Brij[®]78 beträgt 2,1 g/kg (LD₅₀, Ratte) [79].

| |
|---|
| Zytotoxizität von Brij[®]78 |
|---|

Die Abbildung 23 zeigt die Ergebnisse von Brij[®]78 im Zytotoxizitätstest mit EZ4U an HaCaT-Zellen und U937-Zellen.

4. Ergebnisse

Es ist eine deutliche Zunahme der Zytotoxizität mit der Zeit zu erkennen. Die Toxizität an U937-Zellen nimmt nach 24 Stunden in Vergleich zu 1 Stunde um das ca. 3fache, die Toxizität an HaCaT Zellen um das ca. 6fache zu.

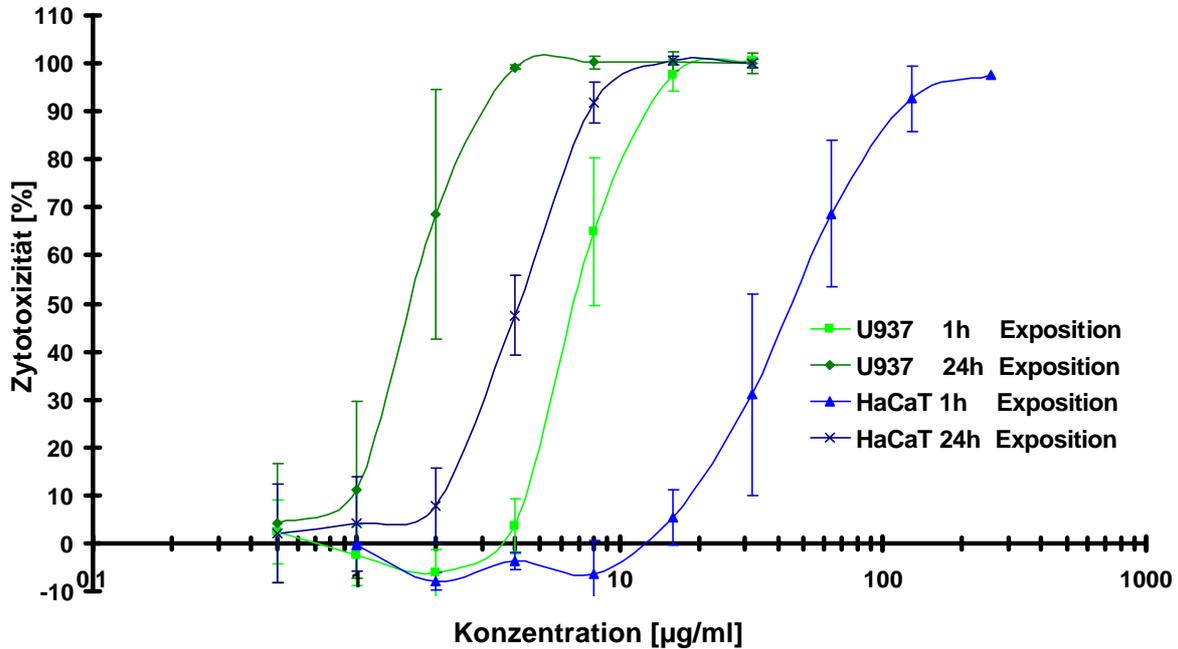


Abb. 23: Zytotoxizität von Brij®78 an HaCaT-Zellen (n = 13) und U937-Zellen (n = 15) nach 1 und 24 Stunden Exposition bei 37°C

In Konzentrationen unter 0,5 µg Brij®78 pro ml ist auch nach 24 Stunden noch keine Zytotoxizität zu erkennen. HaCaT-Zellen sind weniger empfindlich gegenüber Brij®78 als U937-Zellen. An U937-Zellen sind nach 24 Stunden bei einer Konzentration von ca. 3 µg/ml 100% Zytotoxizität erreicht. An HaCaT-Zellen beträgt die Zytotoxizität bei dieser Konzentrationen nur 50%. Erst bei 16 µg/ml sind 100% Zytotoxizität an HaCaT-Zellen erreicht. Nach 1-stündiger Exposition sind diese Unterschiede zwischen den Zellarten noch deutlicher zu erkennen. Während an HaCaT-Zellen bei einer Konzentration von 16 µg/ml lediglich 5% Zytotoxizität zu bestimmen waren, sind bei dieser Konzentration an U937-Zellen schon nahezu 100% Zytotoxizität erreicht. Tabelle 3 zeigt die halbmaximale zytotoxische Konzentration (CC₅₀) von Brij®78 an HaCaT- und U937-Zellen nach 1 und 24 Stunden.

Tabelle 3: Halbmaximale zytotoxische Konzentration (CC₅₀) von Brij®78

| Exposition | U937-Zellen [µg/ml] | HaCaT-Zellen [µg/ml] |
|------------|---------------------|----------------------|
| 1h | 7,00 (6,08-8,06) | 45,0 (33,7-59,9) |
| 24h | 1,63 (1,21-2,21) | 4,14 (4,00-4,29) |

4. Ergebnisse

Für Brij[®]78 wurde an den U937-Zellen auch eine Trypanblaufärbung durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 24 dargestellt.

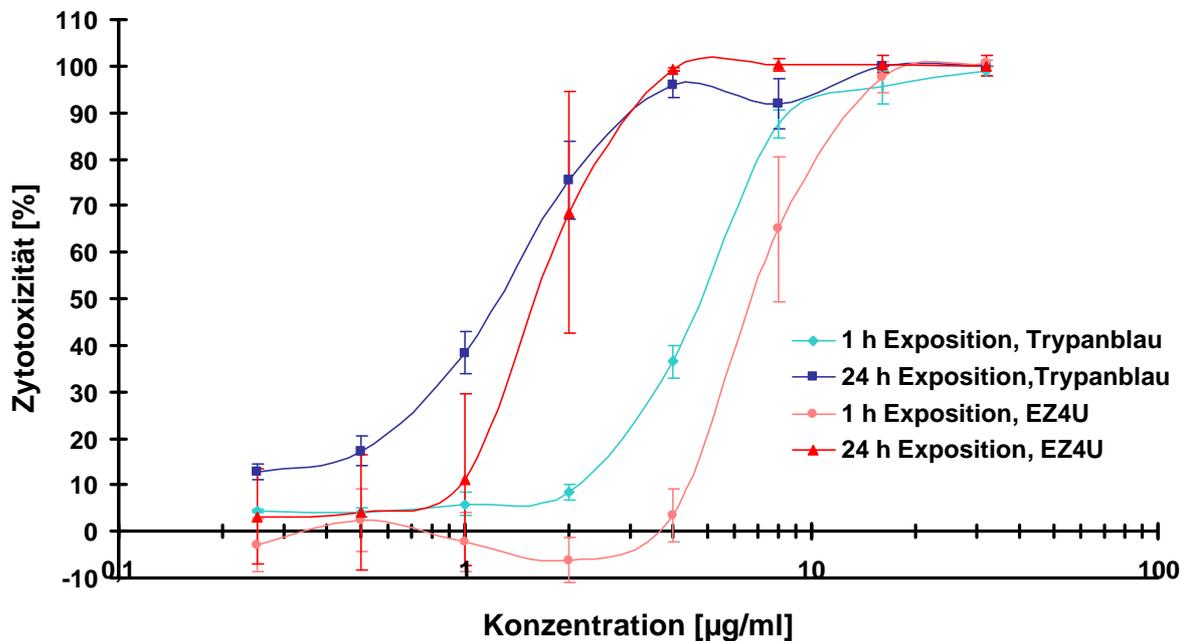


Abb. 24: Zytotoxizität von Brij[®]78 an U937- Zellen nach 1 und 24 Stunden Exposition bei 37°C – Trypanblaufärbung (n = 15) im Vergleich zum XTT-Test (n = 15)

Die Konzentrations-Wirkungs-Kurven der beiden Zytotoxizitätsuntersuchungen stimmen weitestgehend überein, jedoch sind mit der Trypanblaufärbung bei 1-stündiger Exposition etwas höhere Werte für die Zytotoxizität bestimmt worden. Bei 4 µg/ml sind die Unterschiede signifikant. Die CC_{50} -Werte bei 24-stündiger Exposition sind annähernd gleich, bei 1-stündiger Exposition ist die mit der Trypanblaufärbung bestimmte CC_{50} niedriger als die im EZ4U ermittelte (Tab. 4).

Tabelle 4: Halbmaximale zytotoxische Konzentration (CC_{50}) von Brij[®]78 - Vergleich Trypanblaufärbung und XTT-Test

| Exposition | EZ4U [µg/ml] | Trypanblaufärbung [µg/ml] |
|------------|------------------|---------------------------|
| 1h | 7,00 (6,08-8,06) | 4,37 (4,05-4,72) |
| 24h | 1,63 (1,21-2,21) | 1,07 (0,94-1,21) |

4. Ergebnisse

Membrantoxizität von Brij[®]78

Die durch Brij[®]78 induzierte Arachidonsäure-Freisetzung ist in der Abbildung 25 dargestellt.

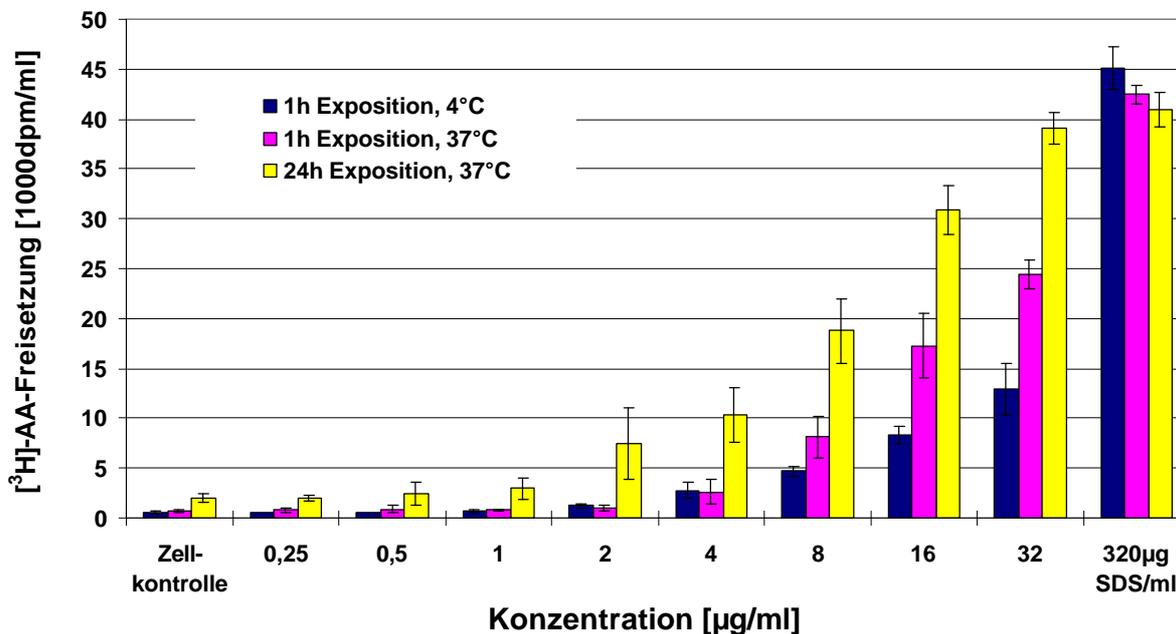


Abb. 25: [³H]Arachidonsäure-Freisetzung durch Brij[®]78 an U937-Zellen nach 1 und 24 Stunden Exposition bei 4°C (n = 9) und 37°C (n = 12)

Nach 24-stündiger Exposition ist bei 32 µg Brij[®]78 pro ml die maximale Arachidonsäure-Freisetzung im Vergleich zur Positivkontrolle erreicht. Bei 1-stündiger Exposition fand bei dieser Konzentration noch keine maximale Arachidonsäure-Freisetzung statt. Bei 4°C ist die erreichte Arachidonsäure-Freisetzung bei 32 µg/ml noch niedriger. Die MTK-Werte von Brij[®]78 und die entsprechende Zytotoxizität bei der MTK sind in Tabelle 5 dargestellt.

Tabelle 5: Minimal toxische Konzentration (MTK) und Zytotoxizität bei der MTK von Brij[®]78

| Exposition | MTK [µg/ml] | Zytotoxizität [%] |
|------------|-------------|-------------------|
| 1h, 37°C | 1,66 | 0 |
| 1h, 4°C | 1,59 | - |
| 24h, 37°C | 0,71 | 13,1 |

Bei der MTK ist an den Zellen nach einer Stunde keine Zytotoxizität im EZ4U nachzuweisen. Die Zytotoxizität nach 24 Stunden ist im Bereich der MTK gering.

Apoptose durch Brij[®]78

Bestimmung Histon-assoziiierter DNA-Fragmente mit ELISA

Brij[®]78 wurde in Konzentrationen von 0,25 bis 8 µg/ml durch Bestimmung intrazellulärer Histon-assoziiierter DNA-Fragmente auf seine Apoptose-induzierenden Eigenschaften hin untersucht. Die Abbildung 26 zeigt den Anreicherungsfaktor Histon-assoziiierter DNA-Fragmente in U937-Zellen nach 4- und 20-stündiger Exposition mit Brij[®]78.

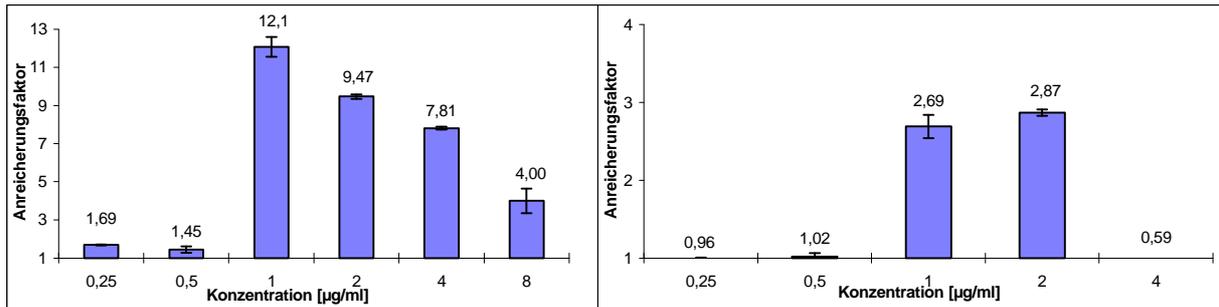


Abb. 26: Anreicherungsfaktor Histon-assoziiierter DNA-Fragmente in U937-Zellen nach 4-stündiger (links) und 20-stündiger (rechts) Exposition mit Brij[®]78

Bei Konzentrationen von 1 bis 8 µg/ Brij[®]78 pro ml konnte eine deutliche Erhöhung (AF: 2 bis 12) von intrazellulären Histon-assoziierten DNA-Fragmenten in U937-Zellen nachgewiesen werden. Nach 20-stündiger Exposition waren bei Konzentrationen von 4 bis 8 µg/ml jedoch keine Histon-assoziierten DNA-Fragmente mehr zu bestimmen.

Durchflusszytometrische Bestimmungen

Brij[®]78 wurde in den Konzentrationen 1, 2 und 8 µg/ml durchflusszytometrisch mit der Annexin-V-Propidiumiodid-Färbung auf apoptotische Zellen hin untersucht.

Brij[®]78 führte zur Entstehung einer neuen Zellpopulation. Es entstanden sowohl apoptotische als auch nekrotische Zellen, sowie Zellen in verschiedenen Übergangsstadien. Die Zellen wurden wenig bis deutlich mit Annexin V, Propidiumiodid oder beiden Farbstoffen gefärbt.

Die Abbildung 27 zeigt die Dotplots nach 20-stündiger Exposition mit Brij[®]78. Deutlich ist die konzentrationsabhängige Veränderung der Zellen zu erkennen. Bei 1 und 2 µg/ml ist noch die ursprüngliche Zellpopulation, die der der Zellkontrolle entspricht, vorhanden. Es ist jedoch auch eine neue Zellpopulation entstanden, die hauptsächlich im Quadranten oben rechts liegt. Besonders deutlich ist die neu entstandene Zellpopulation mit Übergangsstadien verschiedenartig angefärbter Zellen bei 8 µg Brij[®]78 pro ml zu beobachten. In diesem Fall existiert fast nur noch die neu entstandene Zellpopulation.

4. Ergebnisse

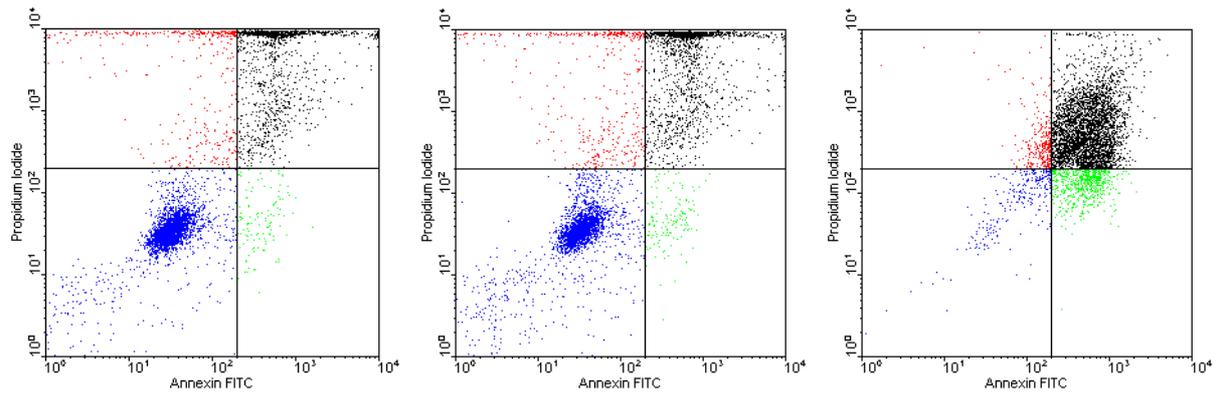


Abb. 27: Dotplot der U937-Zellen nach 20-stündiger Exposition mit Brij[®]78 pro ml und Annexin-V-Propidiumiodid-Färbung (von links nach rechts: 1 µg/ml, 2 µg/ml, 8 µg/ml)

In Tabelle 6 sind die Ergebnisse der durchflusszytometrischen Untersuchungen zusammengefasst. Bei allen getesteten Konzentrationen und Expositionszeiten sind im Vergleich zur Zellkontrolle b vermehrt Zellen in den oberen Quadranten zu finden gewesen. Daraus ist zu schließen, dass vor allem nekrotische Veränderungen an den Zellen stattfinden.

Tabelle 6: Prozentuale Verteilung der U937-Zellen auf die festgelegten Quadranten des Dotplots nach Exposition mit Brij[®]78 im Vergleich zur Zellkontrolle b

| Exposition | 4 h | | 20 h | | 44 h | |
|------------------------------|-----------------------------------|------|-------------|------|-------------|------|
| Konzentration | 1 µg/ml Brij[®]78 | | | | | |
| U937-Zellen [%] | | ZK b | | ZK b | | ZK b |
| primär nekrotisch | 12,1 | 19,9 | 8,24 | 1,24 | 6,48 | 3,74 |
| nekrotisch / spätapoptotisch | 57,7 | 4,24 | 28,1 | 11,3 | 33,6 | 14,5 |
| frühapoptotisch | 3,32 | 0,70 | 2,44 | 6,18 | 2,24 | 2,38 |
| unverändert | 26,9 | 75,2 | 61,2 | 81,3 | 57,5 | 79,4 |
| Konzentration | 2 µg/ml Brij[®]78 | | | | | |
| U937-Zellen [%] | | ZK b | | ZK b | | ZK b |
| primär nekrotisch | 9,02 | 19,9 | 9,22 | 1,24 | 14,2 | 3,74 |
| nekrotisch / spätapoptotisch | 55,4 | 4,24 | 35,6 | 11,3 | 40,6 | 14,5 |
| frühapoptotisch | 1,90 | 0,70 | 2,88 | 6,18 | 1,70 | 2,38 |
| unverändert | 33,7 | 75,2 | 52,3 | 81,3 | 43,5 | 79,4 |
| Konzentration | 8 µg/ml Brij[®]78 | | | | | |
| U937-Zellen [%] | | ZK b | | ZK b | | |
| primär nekrotisch | 42,1 | 19,9 | 5,54 | 1,24 | | |
| nekrotisch / spätapoptotisch | 52,2 | 4,24 | 75,7 | 11,3 | | |
| frühapoptotisch | 0,70 | 0,70 | 13,4 | 6,18 | | |
| unverändert | 5,00 | 75,2 | 5,38 | 81,3 | | |

4. Ergebnisse

Bei den Konzentrationen 1 µg/ml nach 4-stündiger und bei 8 µg/ml nach 20-stündiger Exposition wurde eine Erhöhung der nur mit Annexin V gefärbten Zellen im Vergleich zur Zellkontrolle festgestellt (fettgedruckt), sodass man in diesen Fällen auf frühapoptotische Prozesse schließen kann.

Bei Brij[®]78 finden wahrscheinlich apoptotische und nekrotische Prozesse nebeneinander statt. Dabei sind nekrotische und apoptotische Zellen nicht immer eindeutig voneinander zu unterscheiden.

Morphologische Veränderungen durch Brij[®]78

HaCaT-Zellen

An den HaCaT Zellen wurden nach der Exposition mit Brij[®]78 folgende Veränderungen festgestellt:

- Abrundung
- Ablösen der Zellen von der Oberfläche
- Schrumpfung

Die Abbildungen 28 und 29 zeigen die HaCaT-Zellen nach 1- und 24-stündiger Exposition mit Brij[®]78. Die Zellen ballen sich bei Exposition mit Brij[®]78 zusammen, sie lösen sich von der Oberfläche und erscheinen deutlich kleiner. Je höher die Konzentration und je länger die Expositionszeit ist, desto kleiner werden die Zellen. Die großen, bei den HaCaT-Zellen sehr gut zu erkennenden Zellkerne sind ebenfalls deutlich kleiner. Bei einigen Zellen ballt sich das Zytoplasma um den Kern zusammen, sodass die Zellmembran wie eine Blase aussieht.

U937-Zellen

An den U937 Zellen wurden nach der Exposition mit Brij[®]78 folgende Veränderungen beobachtet:

- Schrumpfung
- Zellen erscheinen flach und durchscheinend
- Zellen sind kleiner und weisen eine aufgerauhte Oberfläche auf

In den Abbildungen 30 und 31 sind die U937-Zellen nach 1- und 24-stündiger Exposition mit Brij[®]78 abgebildet. Bei 1-stündiger Exposition mit 8 µg/ml und bei 24-stündiger Exposition mit 4 µg/ml sind deutlich zwei Zellpopulationen zu erkennen. Einige Zellen erscheinen völlig unverändert, während die anderen Zellen deutlich die beschriebenen Veränderungen aufweisen. Das Auftreten zweier Zellpopulationen wurde auch bei den durchflusszytometrischen Untersuchungen nachgewiesen.

4. Ergebnisse

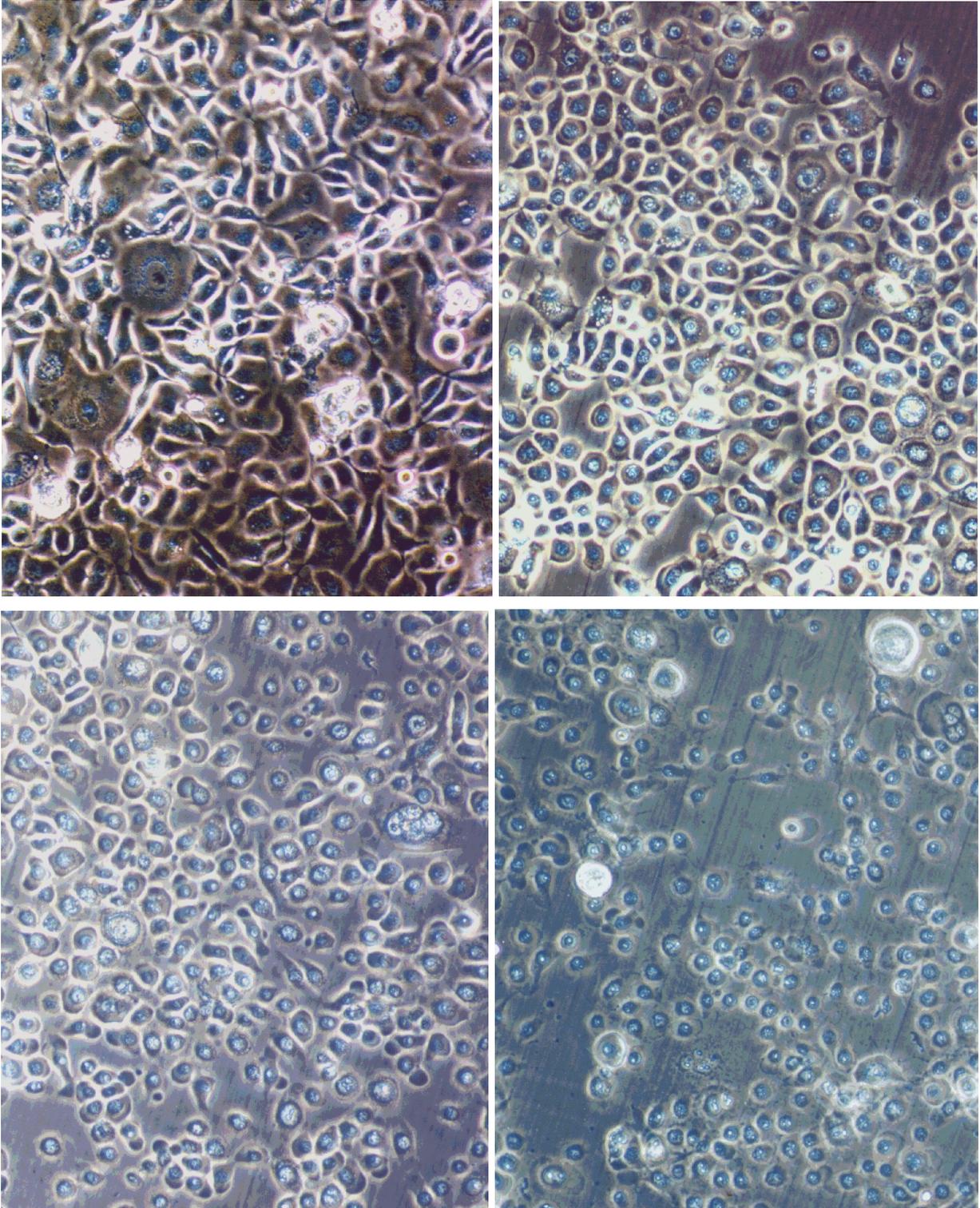


Abb. 28: HaCaT-Zellen nach 1-stündiger Exposition mit Brij[®]78 160fach vergrößert (oben links Zellkontrolle (0 µg/ml); oben rechts 32 µg/ml; unten links 64 µg/ml; unten rechts 128 µg/ml)

4. Ergebnisse

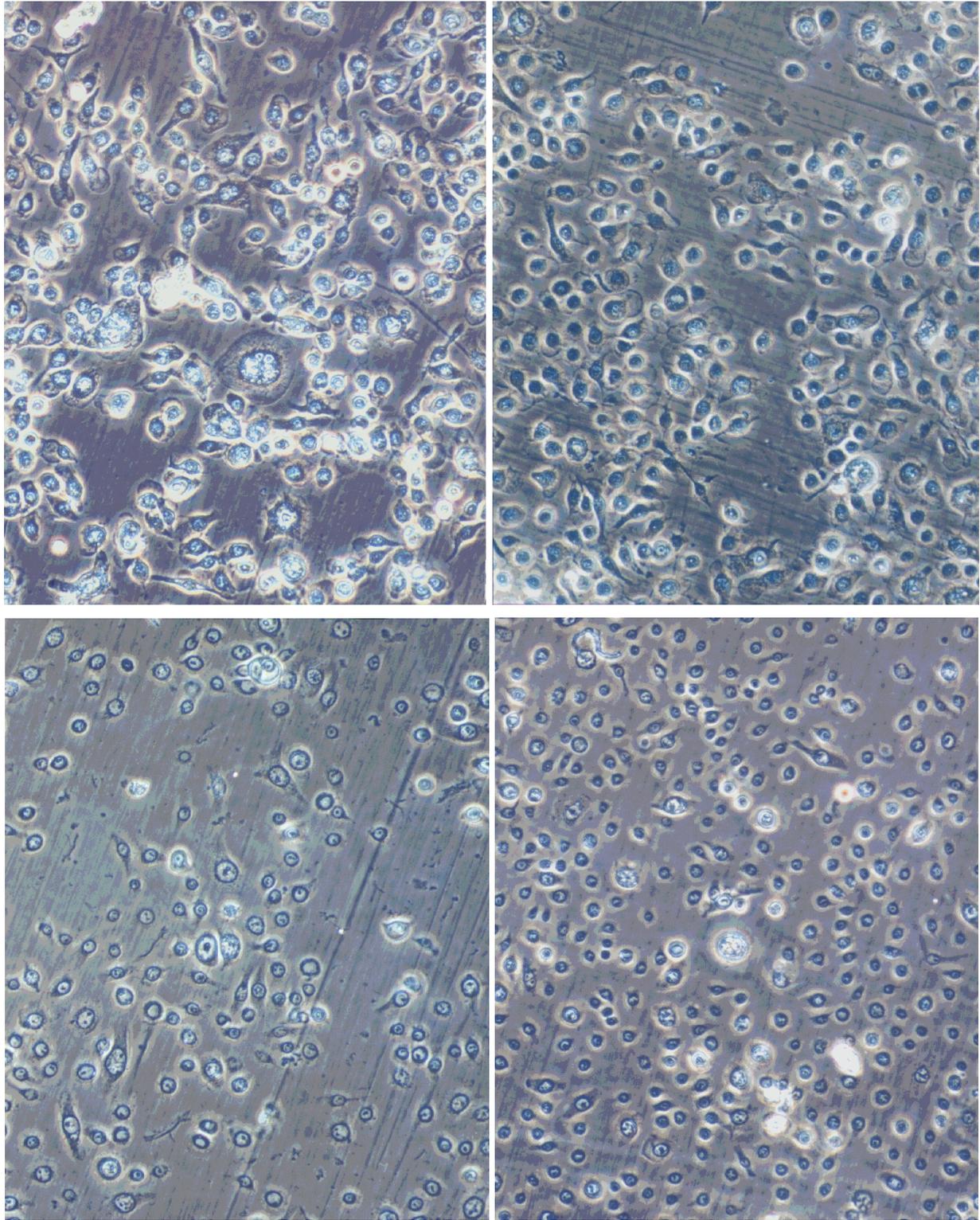


Abb. 29: HaCaT-Zellen nach 24-stündiger Exposition mit Brij[®]78 160fach vergrößert (oben links 4 µg/ml; oben rechts 8 µg/ml; unten links 16 µg/ml; unten rechts 32 µg/ml)

4. Ergebnisse

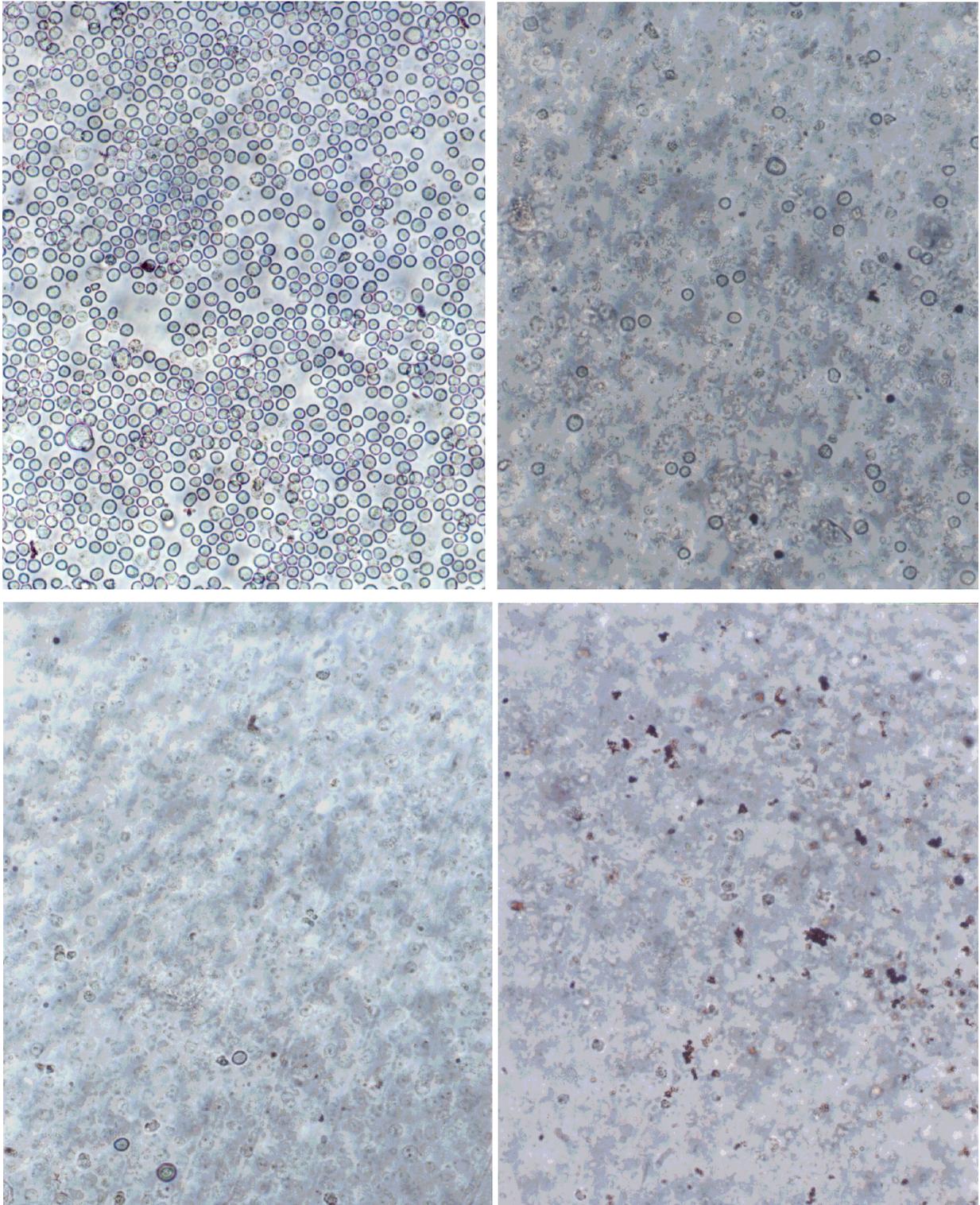


Abb. 30: U937-Zellen nach 1-stündiger Exposition mit Brij[®]78 160fach vergrößert (oben links 4 µg/ml; oben rechts 8 µg/ml; unten links 16 µg/ml; unten rechts 32 µg/ml)

4. Ergebnisse

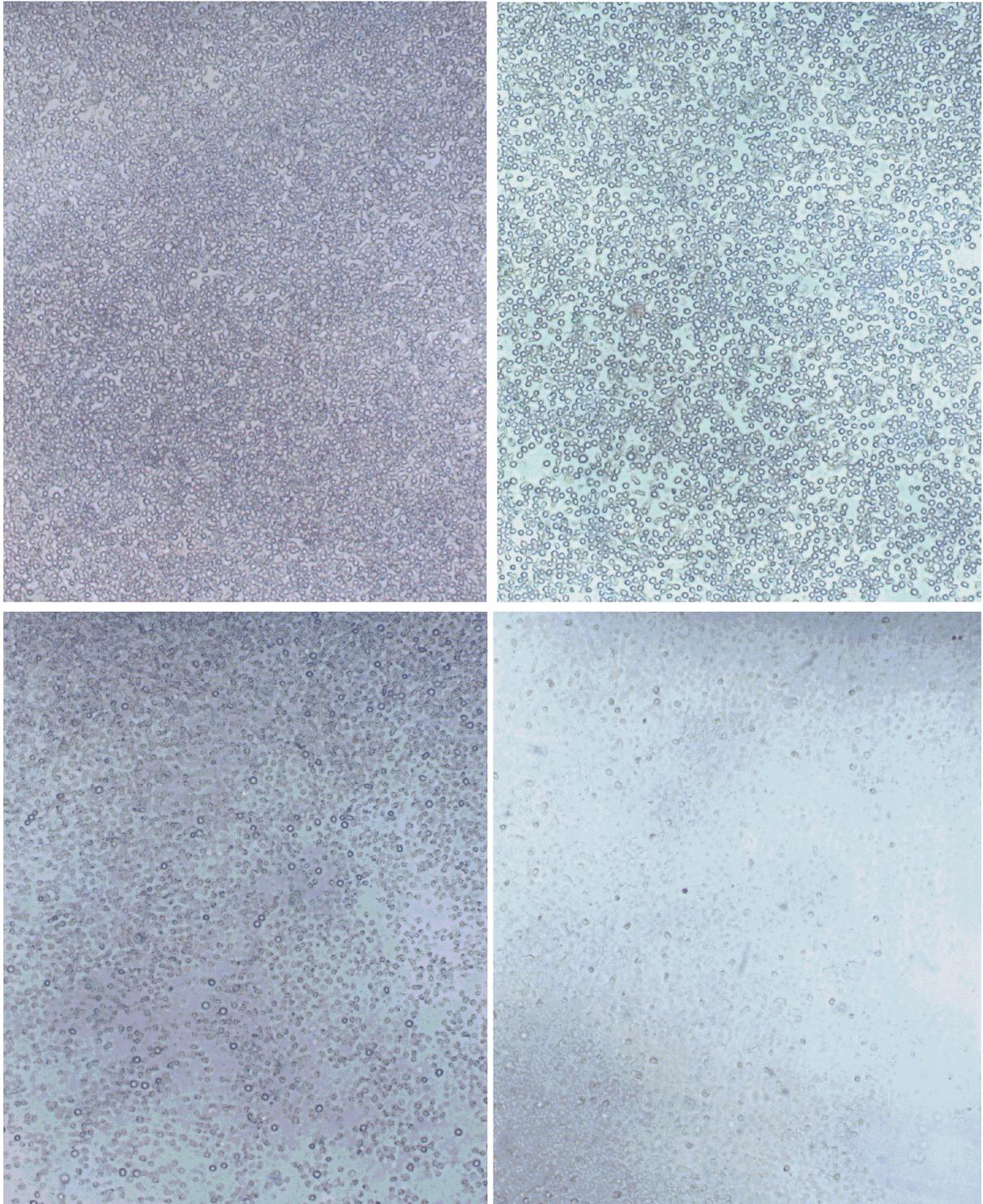


Abb. 31: U937-Zellen nach 24-stündiger Exposition mit Brij[®]78 40fach vergrößert (oben links 1 µg/ml; oben rechts 2 µg/ml; unten links 4 µg/ml; unten rechts 8 µg/ml)

4.1.1.2. Cremophor® A25

Cremophor® A25 ist ein MCSE bei dem 1 Mol Cetylstearylether mit 25 Mol Ethylenoxid umgesetzt wurde [79].



Abb. 32: Strukturformel von Cremophor® A25

Der Reinheitsgrad von Cremophor® A25 ist größer als 99%, der pH-Wert liegt bei 5-7, der HLB-Wert zwischen 15 und 17. Das Tensid wird als elektrolyt- und pH-unempfindlicher O/W-Emulgator in Salben und Grundlagen eingesetzt. In Konzentrationen von 1% wird Cremophor® A25 als Stabilisator für disperse Systeme, ca. 5%ig wird es als Emulgator verwendet. In Konzentrationen von 21-30% bildet Cremophor® A25 ein gelartiges, streichfähiges Hydrat [79]. Cremophor® A25 ist z.B. in Finalgon®-Creme, Inflamm®-Salbe und Mykontral®-Lotion enthalten [1].

Cremophor® A25 gilt als physiologisch indifferent sowie haut- und schleimhautverträglich, jedoch fördert es das Durchdringungsvermögen für andere Stoffe. Eine mutagene Wirkung wurde diskutiert. Die akute orale Toxizität an der Ratte beträgt 1,1 g/kg (LD₅₀) [79].

| |
|---|
| Zytotoxizität von Cremophor® A25 |
|---|

Die Abbildung 33 gibt die Zytotoxizität von Cremophor® A25 an HaCaT- und an U937-Zellen wieder.

Die Untersuchungen mit Cremophor® A25 lieferten ähnliche Ergebnisse wie die Untersuchungen mit Brij®78. Das Ausmaß der Zytotoxizität ist zeitabhängig. An U937-Zellen nimmt nach 24 Stunden im Vergleich zur 1-stündigen Exposition die Zytotoxizität um das ca. 3fache, die Zytotoxizität an HaCaT-Zellen um das ca. 6fache zu.

HaCaT-Zellen sind weniger empfindlich gegenüber Cremophor® A25 als U937-Zellen. Die Unterschiede der Zytotoxizitätsuntersuchungen an den beiden Zellarten entsprechen weitestgehend denen des Brij®78. Auch bei Cremophor® A25 sind nach 1-stündiger Exposition die Unterschiede zwischen U937- und HaCaT-Zellen noch deutlicher zu erkennen als nach 24 Stunden.

Tabelle 7 zeigt die halbmaximale zytotoxische Konzentration von Cremophor® A25 an HaCaT- und U937-Zellen nach 1- und 24-stündiger Exposition. Die CC₅₀-Werte von Cremophor® A25 unterscheiden sich nur geringfügig von denen des Brij®78.

4. Ergebnisse

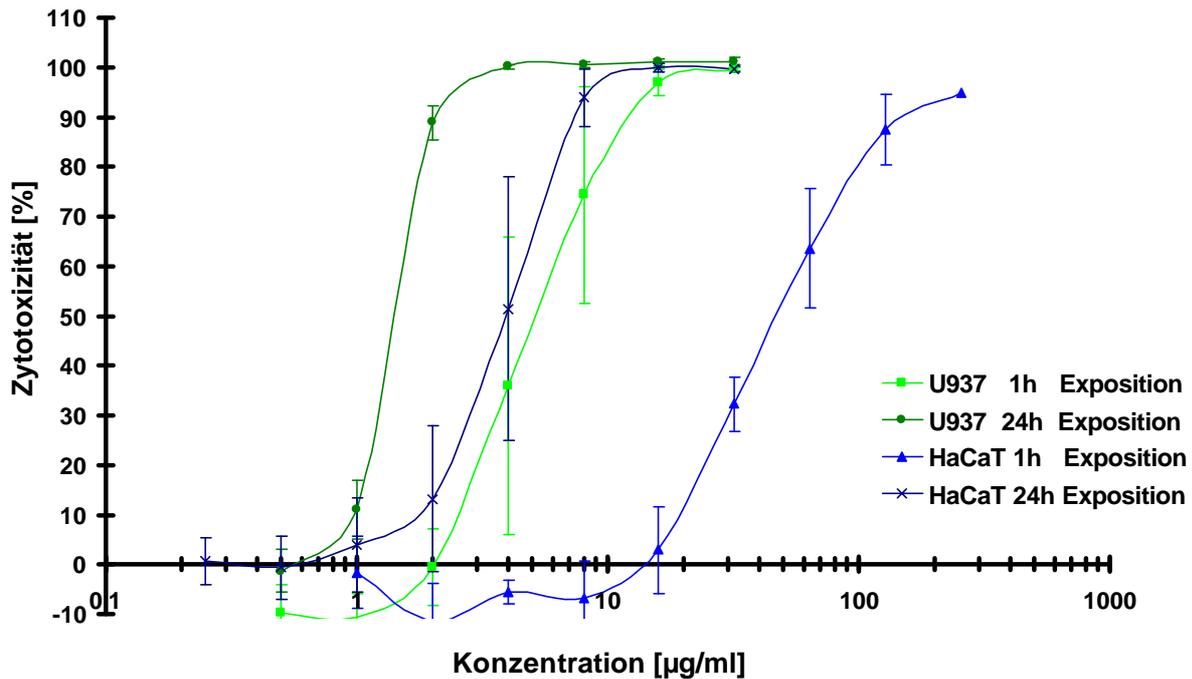


Abb. 33: Zytotoxizität von Cremophor® A25 an HaCaT-Zellen (n = 16) und U937-Zellen (n = 13) nach 1 und 24 Stunden Exposition bei 37°C

Tabelle 7: Halbmaximale zytotoxische Konzentration (CC₅₀) von Cremophor® A25

| Exposition | U937-Zellen [µg/ml] | HaCaT-Zellen [µg/ml] |
|------------|---------------------|----------------------|
| 1h | 5,66 (3,78-8,49) | 48,7 (37,5-63,2) |
| 24h | 1,42 (1,38-1,46) | 4,65 (3,42-6,32) |

Membrantoxizität von Cremophor® A25

Die Abbildung 34 zeigt die Membrantoxizität von Cremophor® A25 im AART. Wie bei Brij®78 bewirkt eine Konzentration von 32 µg/ml nach 24 Stunden eine maximale Arachidonsäure-Freisetzung entsprechend der Positivkontrolle, nach 1 Stunde liegt die Arachidonsäure-Freisetzung noch unterhalb von 50% der Positivkontrolle.

Die MTK-Werte von Cremophor® A25 bei 37°C sind in der Tabelle 8 dargestellt. Sie entsprechen denen des Brij®78. Bei der MTK nach 24 Stunden liegt eine geringe Zytotoxizität von 11,5% vor.

4. Ergebnisse

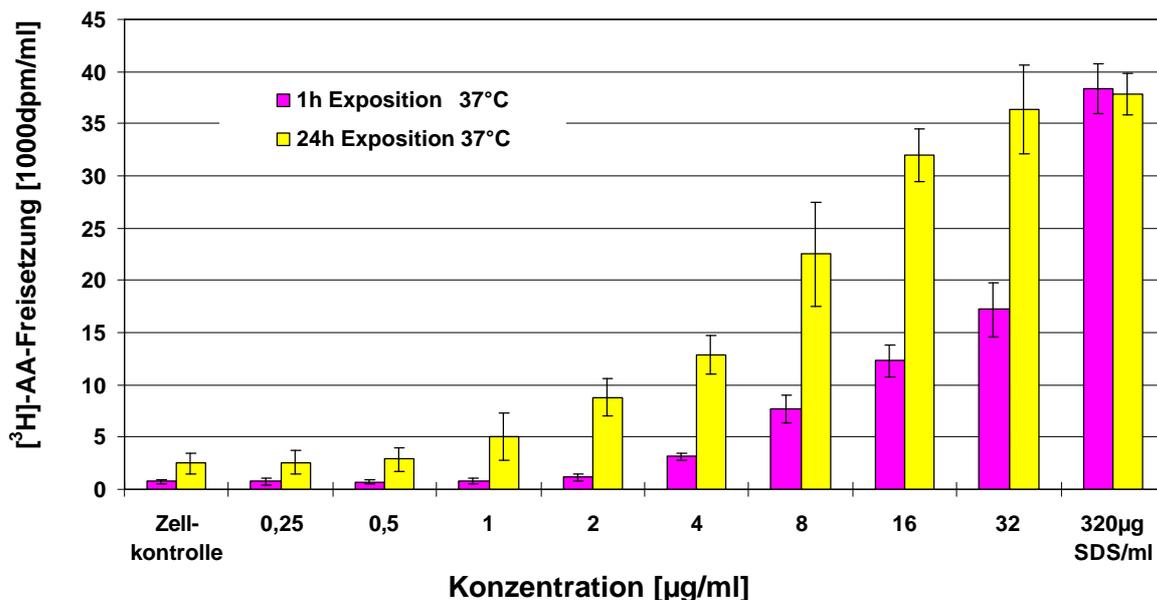


Abb. 34: [³H]Arachidonsäure-Freisetzung durch Cremophor[®] A25 an U937-Zellen nach 1 und 24 Stunden Exposition bei 37°C (n = 12)

Tabelle 8: Minimal toxische Konzentration (MTK) und Zytotoxizität bei der MTK von Cremophor[®] A25

| Exposition | MTK [µg/ml] | Zytotoxizität [%] |
|------------|-------------|-------------------|
| 1h | 1,64 | 0 |
| 24h | 0,71 | 11,5 |

Morphologische Veränderungen durch Cremophor[®] A25

Sowohl HaCaT- als auch U937-Zellen wiesen nach Behandlung mit Cremophor[®] A25 die gleichen morphologischen Veränderungen auf wie Zellen, die mit Brij[®]78 behandelt wurden. In der Abbildung 35 sind mit Cremophor[®] A25 behandelte HaCaT-Zellen dargestellt. Sehr deutlich zu erkennen ist die, auch bei Brij[®]78 beobachtete, Zusammenballung des Zytoplasmas um den Zellkern mit einem blasenartigen Aussehen der Zellmembran.

4. Ergebnisse

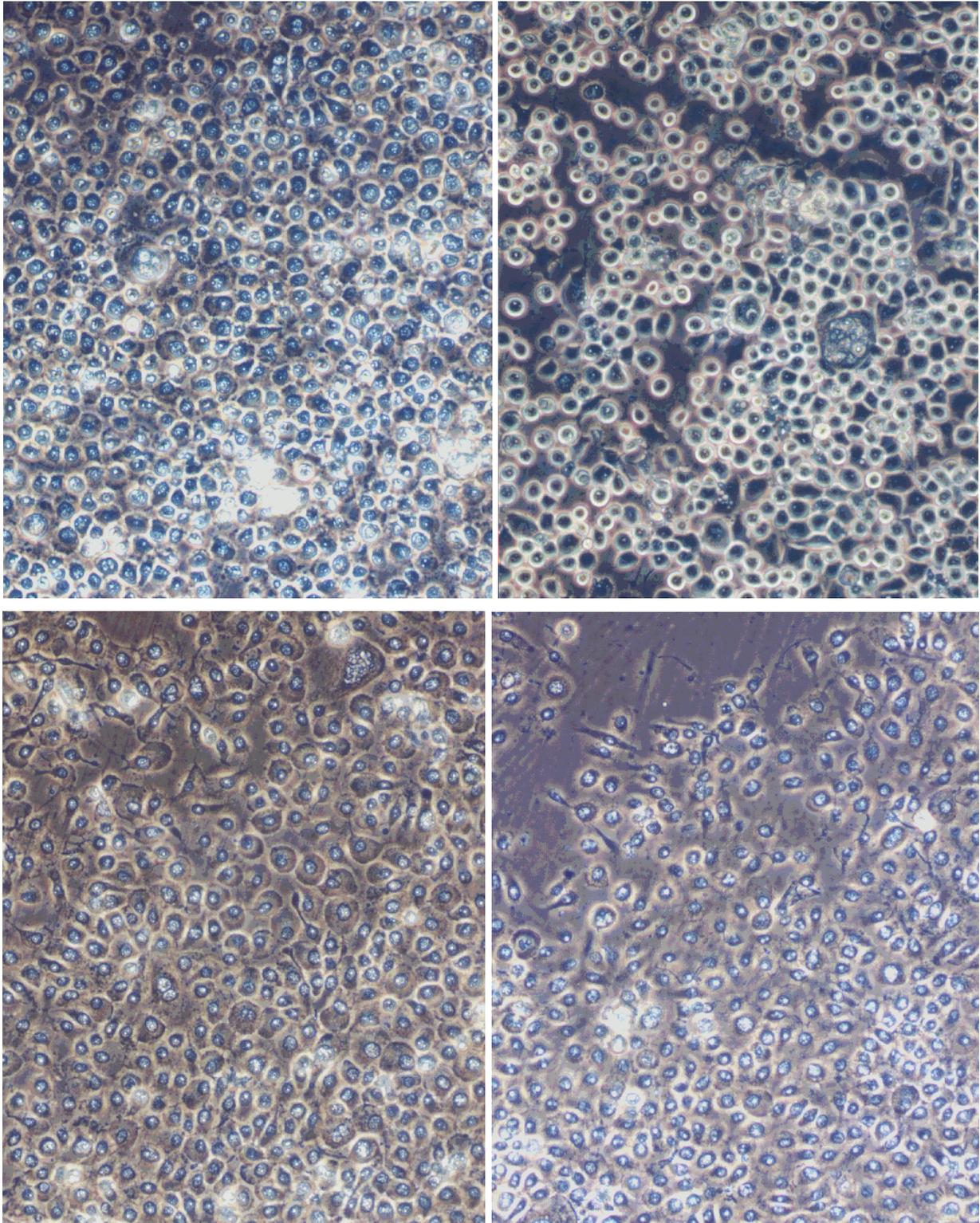


Abb. 35: HaCaT-Zellen nach 24-stündiger Exposition mit Cremophor® A25 160fach vergrößert (oben rechts 4 $\mu\text{g/ml}$; oben links 8 $\mu\text{g/ml}$; unten rechts 16 $\mu\text{g/ml}$; unten links 32 $\mu\text{g/ml}$)

4. Ergebnisse

4.1.1.3. Romulgin® N

Es handelt sich bei Romulgin® N um einen Komplexemulgator, der aus höhermolekularen Fettalkoholen, vorwiegend Stearylalkohol, deren Macrogolechtern und einem Partialester-gemisch hochmolekularer Fettsäuren, vorwiegend Stearinsäure, mit Glycerin besteht. Der Alkylpolyglykoethergehalt beträgt etwa 32 %.

Romulgin® N wird als O/W-Emulgator verwendet. Der Komplexemulgator ist z.B. ein Hauptbestandteil der Unguentum emulsificans aquosum N nach SR90.

Bei Romulgin® N wurde nur der EZ4U-Test an U937-Zellen, als Ergänzung zu den Zytotoxizitätsuntersuchungen an Brij®78 und Cremophor® A25, durchgeführt. Die Tabelle 9 gibt die CC₅₀ Werte (n = 15) von Romulgin® N wieder.

Tabelle 9: Halbmaximale zytotoxische Konzentration (CC₅₀) von Romulgin® N an U937-Zellen

| Exposition | CC₅₀ [µg/ml] | CC₅₀ [µg/ml] berechnet auf Macrogolechtergehalt |
|-------------------|--------------------------------|---|
| 1h | 219 (138-348) | 70,1 (44,2-111) |
| 24h | 45,2 (24,1-84,6) | 14,4 (7,71-27,7) |

Romulgin® N ist berechnet auf den Aktivgehalt deutlich weniger zytotoxisch als Brij®78 und Cremophor® A25. Die beiden reinen Macrogolecetylstearylether (MCSE) sind sowohl nach einer als auch nach 24 Stunden 10fach zytotoxischer als die in Romulgin® N enthaltenen Macrogolechter, bei denen es sich auch überwiegend um MCSE handelt.

4.1.2. Macrogloctylphenylether – Triton® X-100

Triton® X-100 ist ein Octylphenoether des Macrogols. Es enthält 9 bis 10 Ethoxygruppen und wird durch Reaktion von t-Octylphenol mit Ethylenoxid gewonnen. Der Aktivgehalt beträgt mindestens 99% [79].

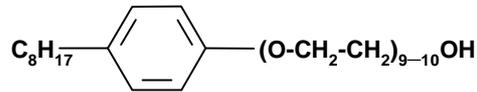


Abb. 36: Strukturformel von Triton® X-100

Triton® X-100 ist ein mit Wasser mischbarer Emulgator mit einem HLB-Wert von 13,4. Es findet Verwendung als Hilfsstoff in Arzneimitteln, es ist z.B. Bestandteil von Tissucol® Gewebekleber [1]. Triton® X-100 ist biologisch abbaubar und mit ionischen Stoffen kompatibel. Wegen einer möglichen Explosionsgefahr sollten keine Mischungen mit stark oxydierenden oder reduzierenden Substanzen hergestellt werden.

Triton® X-100 gilt als gut hautverträglich. Die orale Toxizität von Triton® X-100 beträgt 1,8 ml/kg (LD₅₀, Ratte) [79].

Zytotoxizität von Triton® X-100

In der Abbildung 37 sind die Ergebnisse des Zytotoxizitätstest mit Triton® X-100 an HaCaT- und U937-Zellen dargestellt.

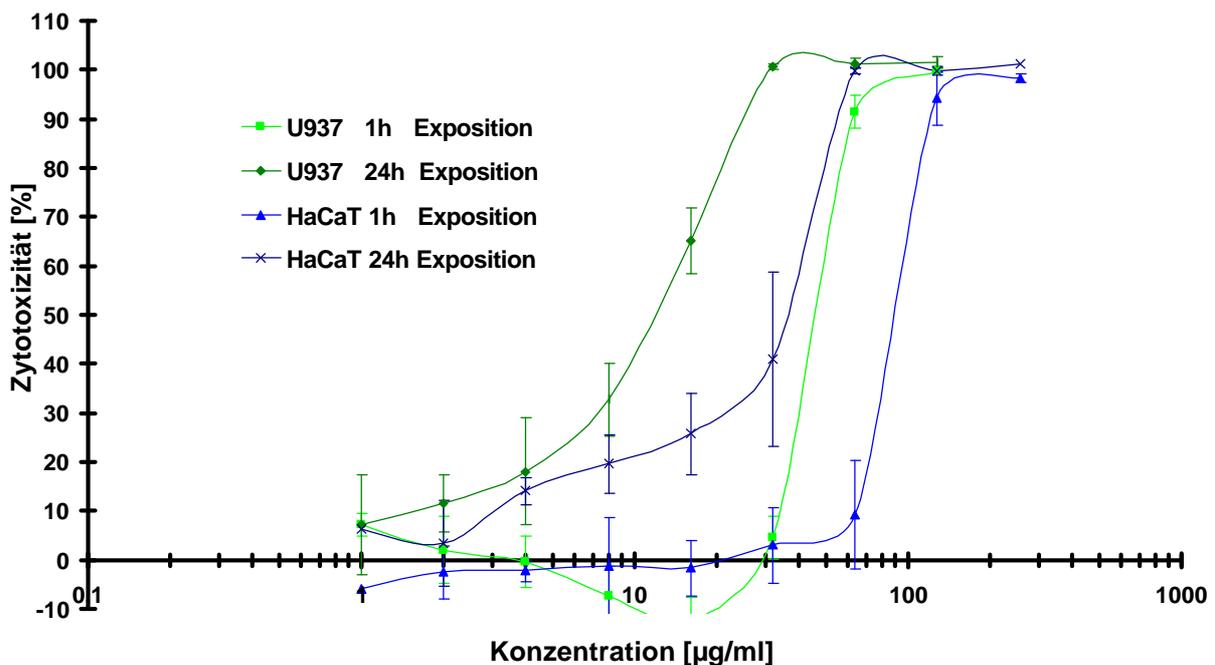


Abb. 37: Zytotoxizität von Triton® X-100 an HaCaT-Zellen (n = 15) und U937-Zellen (n = 14) nach 1 und 24 Stunden Exposition bei 37°C

4. Ergebnisse

Bei Triton® X-100 ist wie bei den Macrogolcetylstearylethern eine deutliche Zunahme der Zytotoxizität mit der Zeit zu erkennen. Die Zytotoxizität an U937-Zellen nimmt nach 24 Stunden im Vergleich zur 1-stündigen Exposition um das ca. 5fache, die Zytotoxizität an HaCaT-Zellen um das ca. 3fache zu.

In Konzentrationen geringer Zytotoxizität bis ca. 40% sind nach 24-stündiger Exposition nur geringe Unterschiede zwischen den beiden Zelllinien vorhanden. In höheren Konzentrationen wird Triton® X-100 von HaCaT-Zellen etwas besser toleriert. Während an U937-Zellen nach 24-stündiger Exposition schon bei ca. 30 µg Triton® X-100 pro ml 100% Zytotoxizität erreicht werden, ist dies für HaCaT-Zellen erst bei 60 µg/ml der Fall. Nach 1-stündiger Exposition sind die Unterschiede zwischen den Zelllinien ebenfalls erkennbar. In der Konzentration von 64 µg/ml waren bereits über 90% der U937-Zellen abgestorben, bei HaCaT-Zellen waren bei dieser Konzentration weniger als 10% der Zellen tot.

Die Tabelle 10 zeigt die halbmaximale zytotoxische Konzentration von Triton® X-100 an HaCaT- und U937-Zellen nach 1 und 24 Stunden.

Tabelle 10: Halbmaximale zytotoxische Konzentration (CC₅₀) von Triton® X-100

| Exposition | U937-Zellen [µg/ml] | HaCaT-Zellen [µg/ml] |
|-------------------|----------------------------|-----------------------------|
| 1h | 48,4 (46,9-50,0) | 84,9 (73,7-97,9) |
| 24h | 8,98 (6,90-11,7) | 26,0 (18,7-36,0) |

Membrantoxizität von Triton® X-100

Die Abbildung 38 gibt die durch Triton® X-100 induzierte Arachidonsäure-Freisetzung wieder. Bei Inkubation der U937-Zellen mit 256 µg Triton® X-100 pro ml ist bereits nach 1 Stunde sowohl bei 37°C als auch bei 4°C die maximale Arachidonsäure-Freisetzung im Vergleich zur Positivkontrolle erreicht. Bei einer Konzentration von 128 µg/ml ist die erreichte Arachidonsäure-Freisetzung nach 24 Stunden höher als die nach 1-stündiger Exposition. Außerdem ist die erreichte Arachidonsäure-Freisetzung bei dieser Konzentration bei 37°C höher als bei 4°C. Die MTK-Werte von Triton® X-100 und die entsprechende Zytoxizität bei der MTK sind in der Tabelle 11 dargestellt.

4. Ergebnisse

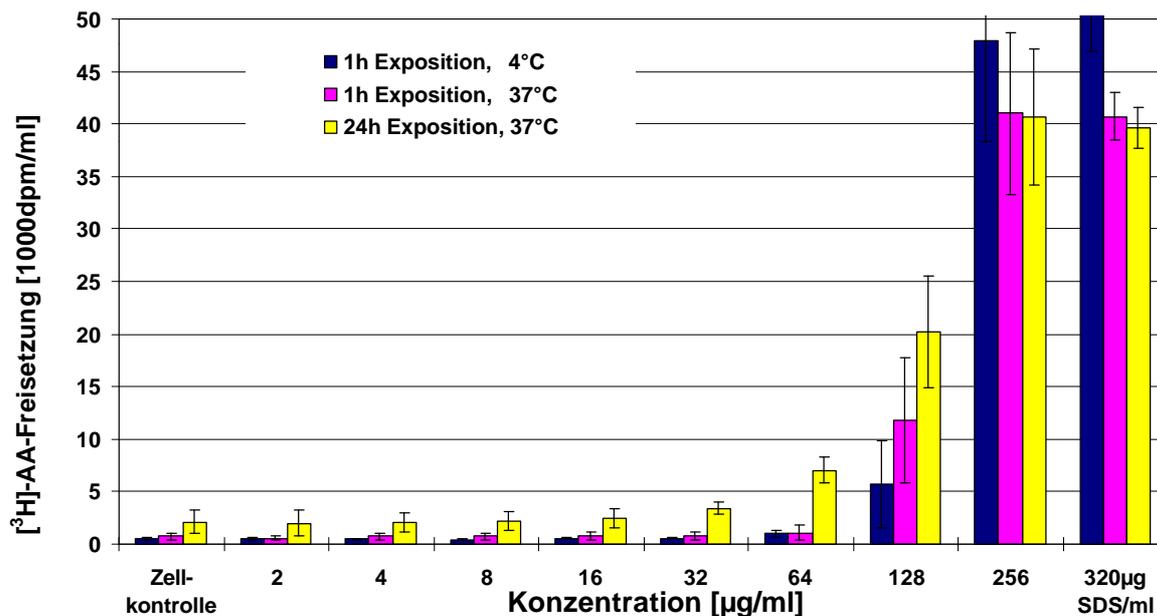


Abb. 38: [³H]Arachidonsäure-Freisetzung durch Triton[®] X-100 an U937-Zellen nach 1 und 24 Stunden Exposition bei 4°C (n = 9) und 37°C (n = 12)

Tabelle 11: Minimal toxische Konzentration (MTK) und Zytotoxizität bei der MTK von Triton[®] X-100

| Exposition | MTK [µg/ml] | Zytotoxizität [%] |
|------------|-------------|-------------------|
| 1h, 37°C | 41,1 | 39,9 |
| 1h, 4°C | 39,6 | - |
| 24h, 37°C | 15,8 | 67,4 |

Im Gegensatz zu den MCSE ist bei Triton[®] X-100 in den Konzentrationsbereichen der MTK sowohl nach 1 Stunde als auch nach 24 Stunden eine deutliche Zytotoxizität festzustellen.

Apoptose durch Triton[®] X-100

Bestimmung Histon-assoziiierter DNA-Fragmente mit ELISA

Triton[®] X-100 wurde in Konzentrationen von 0,3 bis 160 µg/ml auf seine Apoptose-induzierenden Eigenschaften hin untersucht. Die Abbildung 39 zeigt den Anreicherungsfaktor Histon-assoziiierter DNA-Fragmente in U937-Zellen nach 4- und 20-stündiger Exposition mit Triton[®] X-100.

Triton[®] X-100 führte in den Konzentrationen 20; 40 und 80 µg/ml nach 4 Stunden und in der Konzentration 5 µg/ml nach 20 Stunden zu einer deutlichen Erhöhung von intrazellulären Histon-assoziierten DNA-Fragmenten in U937-Zellen (AF: 3 bis 7). Im Konzentrations-

4. Ergebnisse

bereich von 2,5 bis 10 $\mu\text{g/ml}$ sowohl nach 4 als auch nach 20 Stunden und bei der Konzentration 1,25 $\mu\text{g/ml}$ nach 20 Stunden Exposition sind die Anreicherungsfaktoren ebenfalls größer 1.

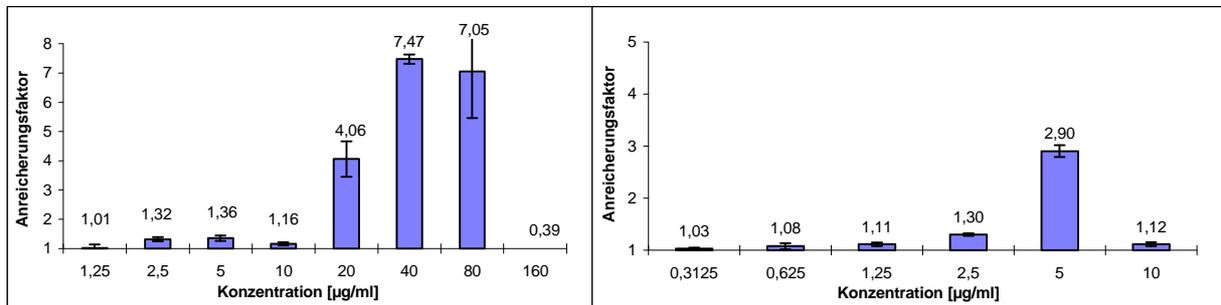


Abb. 39: Anreicherungsfaktor Histon-assoziiertes DNA-Fragmente in U937-Zellen nach 4-stündiger (links) und 20-stündiger (rechts) Exposition mit Triton[®] X-100

Durchflusszytometrische Bestimmungen

Triton[®] X-100 wurde in den Konzentrationen 2,5, 5 und 40 $\mu\text{g/ml}$ durchflusszytometrisch mit der Annexin-V-Propidiumiodid-Färbung auf apoptotische Zellen hin untersucht.

Bei 5 und 40 $\mu\text{g/ml}$ konnten nach 4-stündiger Exposition eine erhöhte Anzahl frühapoptotischer U937-Zellen nachgewiesen werden.

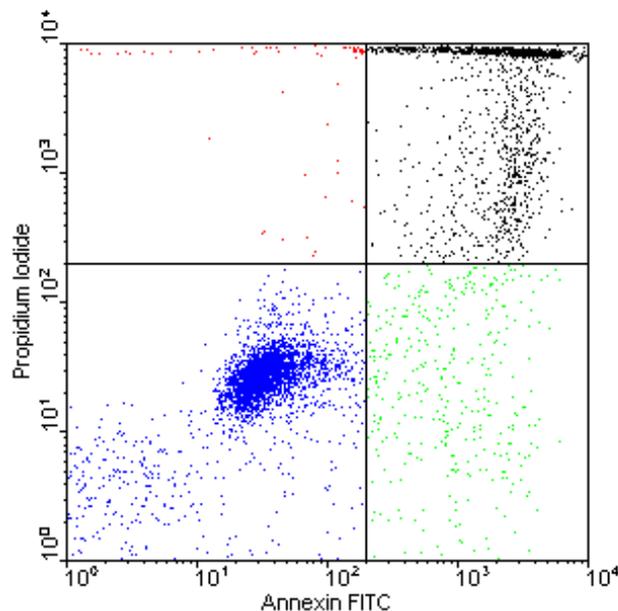


Abb. 40: Dotplot der U937-Zellen nach 4-stündiger Exposition mit 5 μg Triton[®] X-100 pro ml und Annexin-V-Propidiumiodid-Färbung

Triton[®] X-100 führte überwiegend zur Entstehung apoptotischer Zellen. Die veränderten Zellen befinden sich im Dotplot vorwiegend in den beiden rechten Quadranten. In dem unteren rechten Quadranten sind frühapoptotische, im oberen wahrscheinlich spätapoptotische (mit Annexin V und Propidiumiodid gefärbte) Zellen (Abb. 40 und 41).

4. Ergebnisse

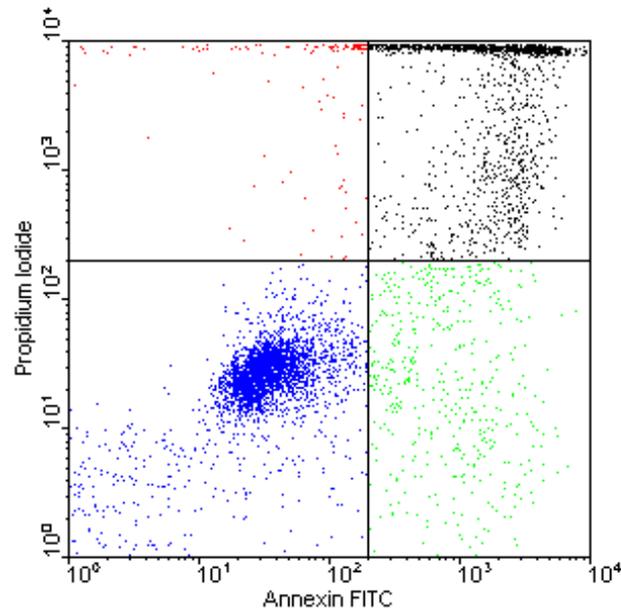


Abb. 41: Dotplot der U937-Zellen nach 4-stündiger Exposition mit 40 µg Triton[®] X-100 pro ml und Annexin-V-Propidiumiodid-Färbung

In höheren Konzentrationen und nach längerer Exposition sind überwiegend spätapoptische Zellen vorhanden (Abb. 42). Es könnte sich hierbei jedoch auch um nekrotische Zellen handeln.

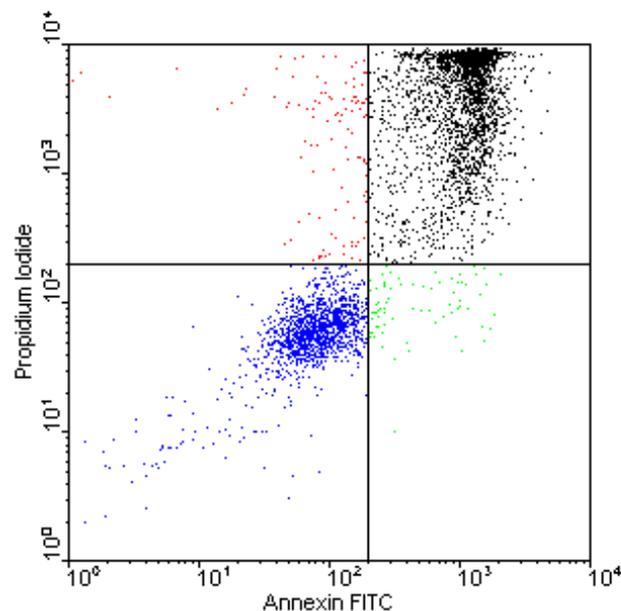


Abb. 42: Dotplot der U937-Zellen nach 20-stündiger Exposition mit 40 µg Triton[®] X-100 pro ml und Annexin-V-Propidiumiodid-Färbung

Nekrose durch Triton[®] X-100 ist bei höheren Konzentrationen und nach längerer Exposition anzunehmen, war allerdings nicht eindeutig nachzuweisen.

4. Ergebnisse

In der Tabelle 12 sind die Ergebnisse der durchflusszytometrischen Bestimmungen zusammengefasst. Im Vergleich zur Zellkontrolle b vermehrt vorkommende frühapoptotische Zellen sind fettgedruckt.

Tabelle 12: Prozentuale Verteilung der U937-Zellen auf die festgelegten Quadranten des Dotplots nach Exposition mit Triton[®] X-100 im Vergleich zur Zellkontrolle b

| Exposition | 4 h | | 20 h | |
|------------------------------|--|------|-------------|------|
| Konzentration | 5 µg/ml Triton[®] X-100 | | | |
| U937-Zellen [%] | | ZK b | | ZK b |
| primär nekrotisch | 1,24 | 1,42 | 1,84 | 1,20 |
| nekrotisch / spätapoptotisch | 27,9 | 8,78 | 16,6 | 11,3 |
| frühapoptotisch | 7,84 | 5,30 | 5,62 | 6,18 |
| unverändert | 63,1 | 84,5 | 75,0 | 81,3 |
| Konzentration | 40 µg/ml Triton[®] X-100 | | | |
| U937-Zellen [%] | | ZK b | | ZK b |
| primär nekrotisch | 2,72 | 1,42 | 2,24 | 0,9 |
| nekrotisch / spätapoptotisch | 27,9 | 8,78 | 68,2 | 22,1 |
| frühapoptotisch | 10,1 | 5,30 | 1,72 | 10,5 |
| unverändert | 59,3 | 84,5 | 27,9 | 66,5 |

Morphologische Veränderungen durch Triton[®] X-100

HaCaT-Zellen

An den HaCaT-Zellen wurden nach der Exposition mit Triton[®] X-100 folgende Veränderungen festgestellt:

- Abrundung
- Ablösen der Zellen von der Oberfläche
- Schrumpfung
- Lyse

In den Abbildungen 43 und 44 sind HaCaT-Zellen nach 1- und 24-stündiger Exposition mit Triton[®] X-100 abgebildet. Nach der Exposition mit Triton[®] X-100 ist neben dem Ablösen der Zellen von der Oberfläche vor allem die Schrumpfung des Zellkerns zu beobachten. Der sehr gut sichtbare Zellkern ist deutlich segmentiert. Die Zellmembran erscheint, wie auch bei mit Brij[®]78 inkubierten HaCaT-Zellen beobachtet, als Blase, die den geschrumpften Zellkern enthält. Nach 24-stündiger Exposition sind vermehrt Zellfragmente vorhanden, was auf Zelllyse hindeutet. Einige der Zellen weisen typische morphologische Veränderungen auf, die auf Apoptose hindeuten.

U937-Zellen

An den U937-Zellen wurden nach der Exposition mit Triton[®] X-100 folgende Veränderungen beobachtet:

- Schrumpfung
- Zellen erscheinen abgeflacht
- Lyse

U937-Zellen nach 1- und 24-stündiger Exposition mit Triton[®] X-100 zeigen die Abbildungen 45 und 46. Nach 24-stündiger Exposition sind, wie es auch bei den HaCaT-Zellen zu beobachten war, vermehrt Zellfragmente vorhanden, was auf Zelllyse hindeutet. An U937-Zellen sind die typischen morphologischen Veränderungen der Apoptose noch deutlicher sichtbar. Es sind vor allem bei 16 bis 64 µg/ml nach 1-stündiger und bei 16 bis 32 µg/ml nach 24-stündiger Exposition Ausstülpungen der Zellmembran zu erkennen, bei denen es sich um apoptotische Körperchen handeln könnte, die von der sterbenden Zelle gebildet werden. Eher nekrotisch verändert sehen die Zellen nach 1-stündiger Exposition mit 128 µg/ml Triton[®] X-100 aus. Hier erscheinen die Zellen im Durchmesser größer, also eher geschwollen und abgeflacht. Die morphologischen Beobachtungen stimmen mit den Ergebnissen der Apoptose-Untersuchungen überein.

4. Ergebnisse

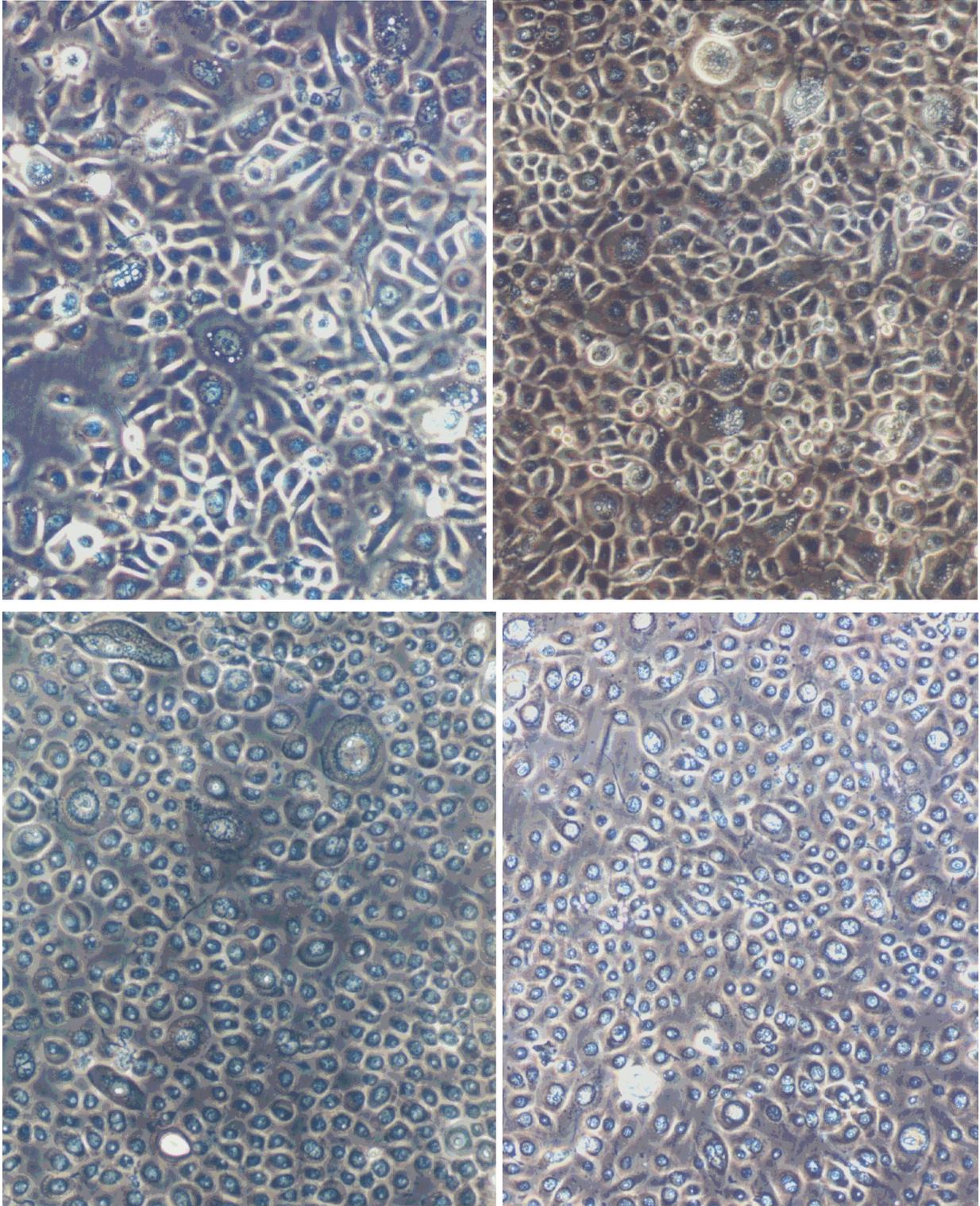


Abb. 43: HaCaT-Zellen nach 1-stündiger Exposition mit Triton[®] X-100 160fach vergrößert (oben links 32 µg/ml; oben rechts 64 µg/ml; unten links 128 µg/ml; unten rechts 256 µg/ml)

4. Ergebnisse

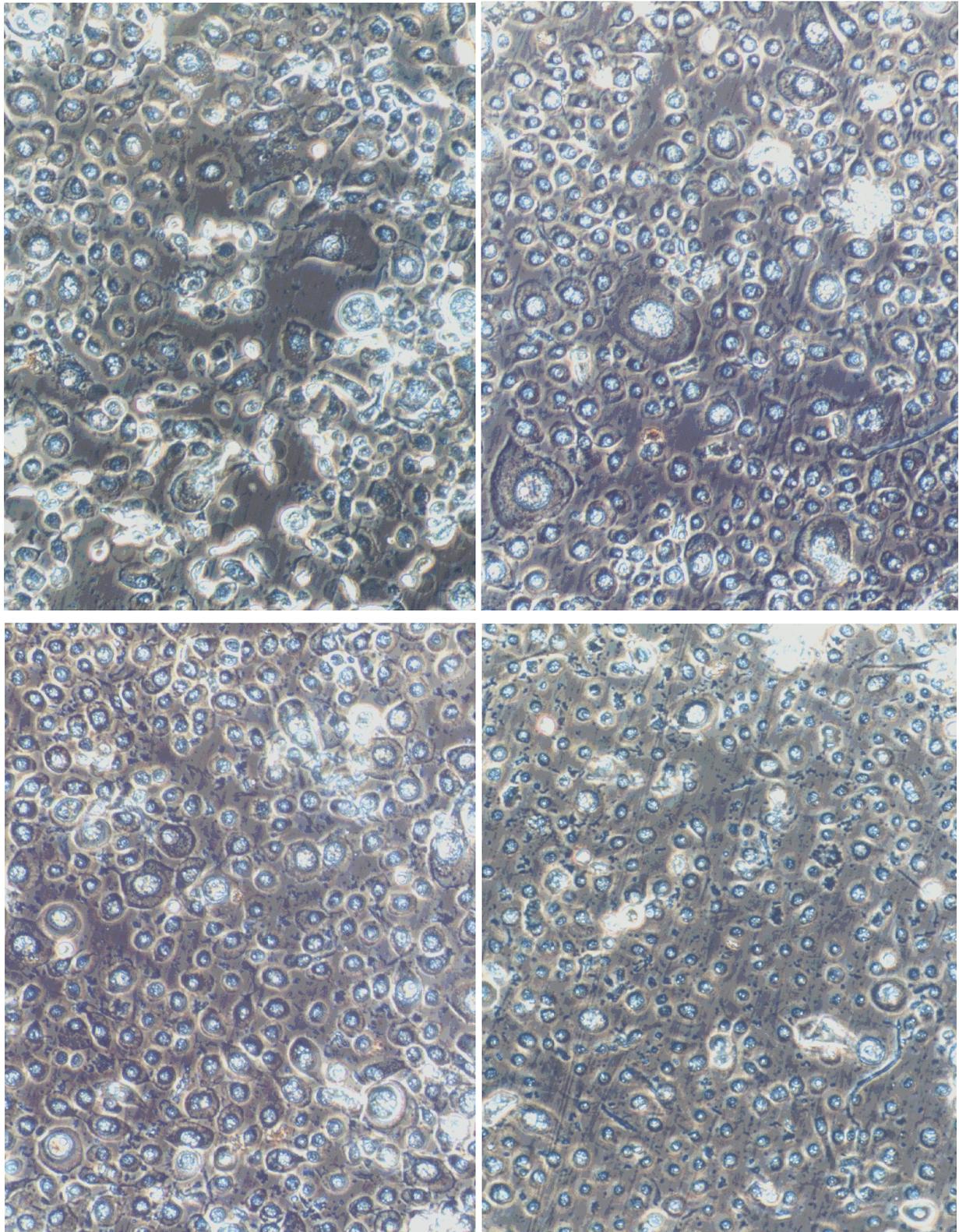


Abb. 44: HaCaT-Zellen nach 24-stündiger Exposition mit Triton[®] X-100 160fach vergrößert (oben links 32 µg/ml; oben rechts 64 µg/ml; unten links 128 µg/ml; unten rechts 256 µg/ml)

4. Ergebnisse

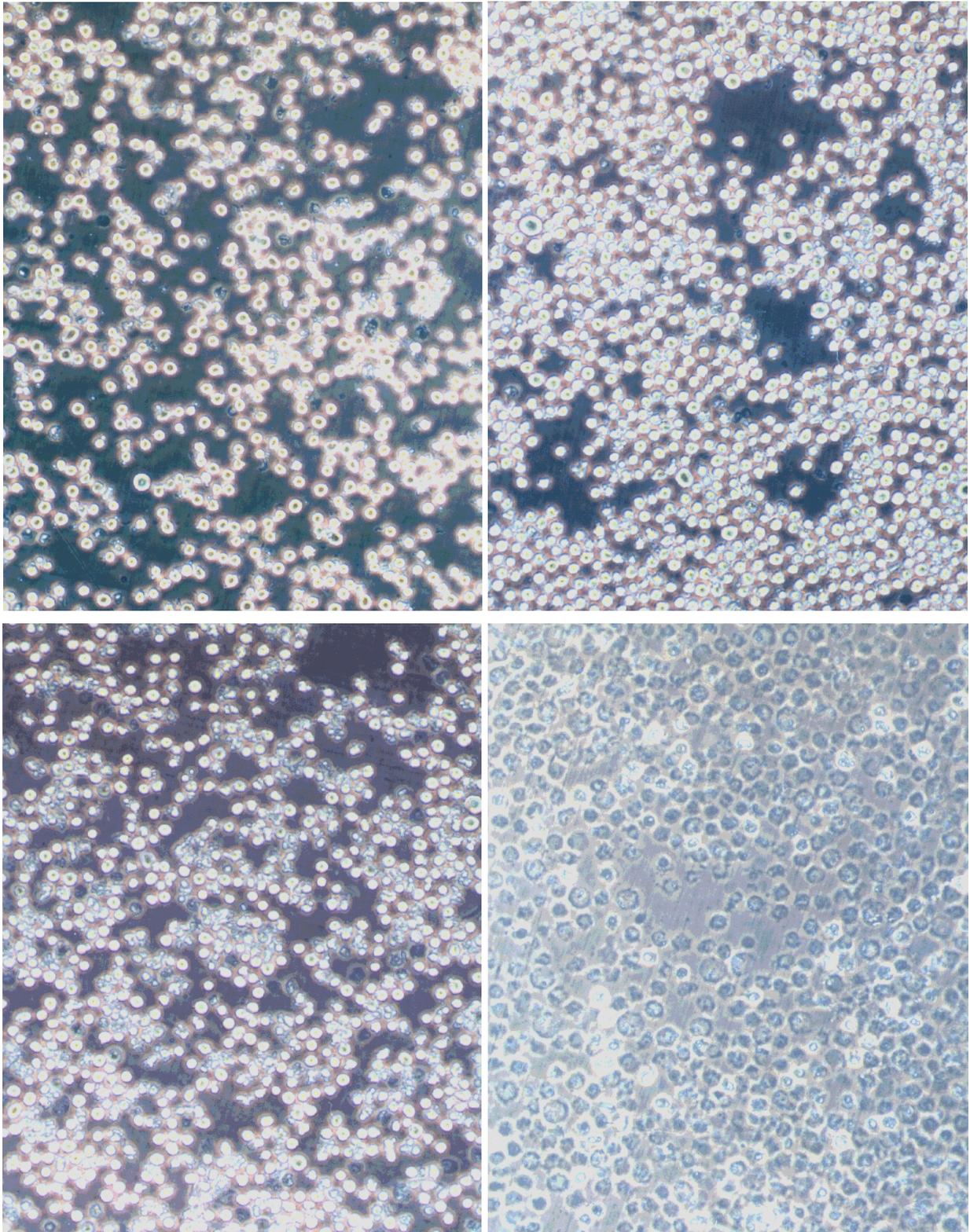


Abb. 45: U937-Zellen nach 1-stündiger Exposition mit Triton[®] X-100 160fach vergrößert (Phasenkontrast; oben links 16 µg/ml; oben rechts 32 µg/ml; unten links 64 µg/ml; unten rechts 128 µg/ml)

4. Ergebnisse

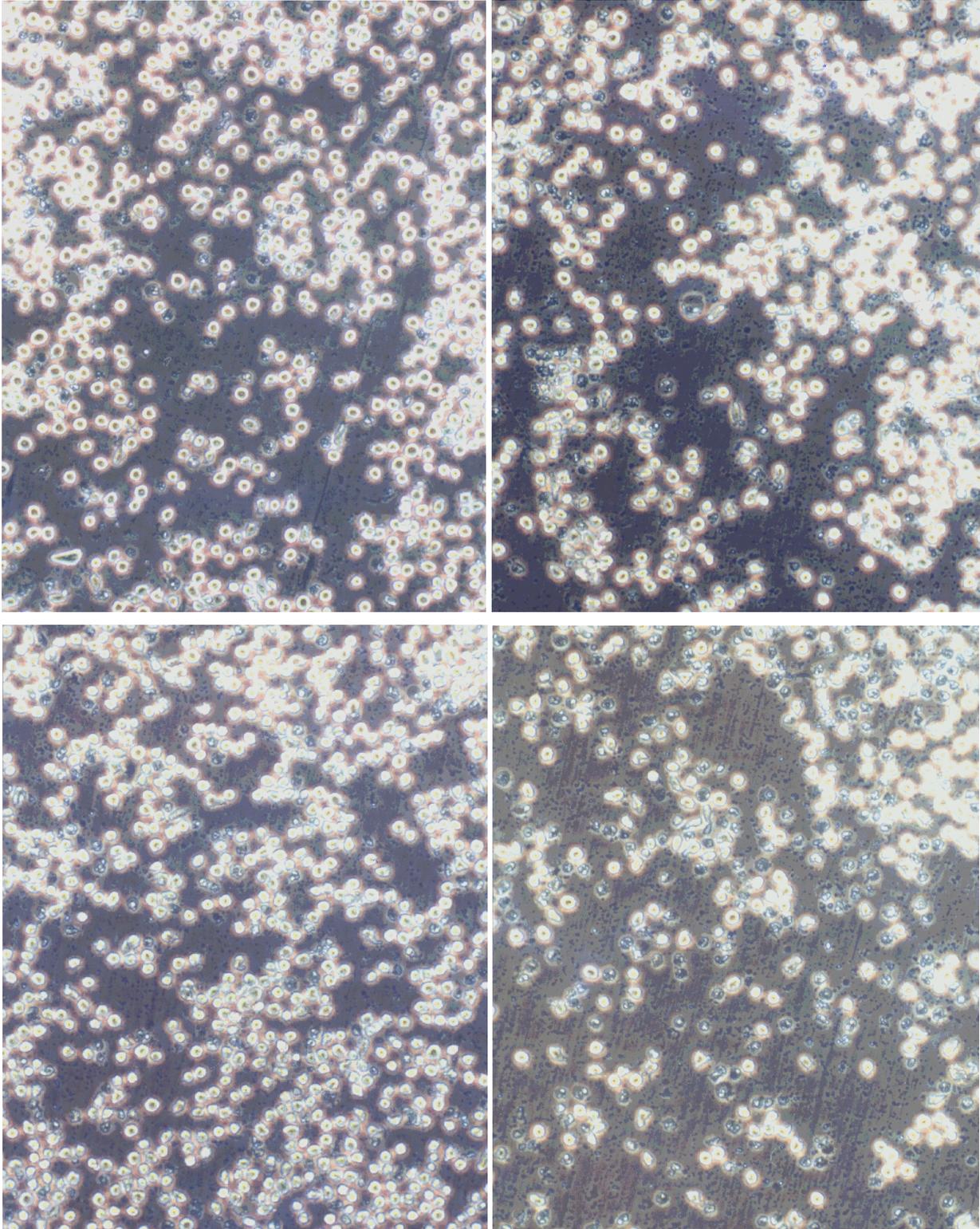


Abb. 46: U937-Zellen nach 24-stündiger Exposition mit Triton[®] X-100 160fach vergrößert (Phasenkontrast; oben links 16 µg/ml; oben rechts 32 µg/ml; unten links 64 µg/ml; unten rechts 128 µg/ml)

4.1.3. Macrogolsorbitanfettsäureester - Polysorbat 80

Polysorbate sind Gemische von Partialestern des Sorbitols und seiner Anhydride mit verschiedenen Fettsäuren, copolymerisiert mit Ethylenoxid. Durch die Ethoxylierung werden die Sorbitanfettsäureester (Spans) hydrophiler.

Polysorbat 80 ist der Ph. Eur.1997 offizinell. Die Darstellung erfolgt durch Veresterung von 1 mol Sorbitol mit 1 mol Ölsäure, wobei ein Gemisch von Sorbitanmonofettsäureestern entsteht, das mit etwa 20 mol Ethylenoxid pro mol Ester umgesetzt wird [109].

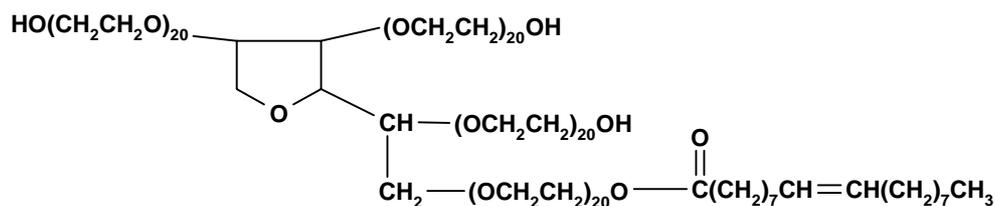


Abb. 47: Strukturformel von Polysorbat 80

Der HLB-Wert von Polysorbat 80 liegt bei 15,0. Die molare Masse beträgt ca. 1309,7. Der pH-Wert liegt zwischen 5 und 7. Polysorbat 80 ist sehr leicht wasserlöslich, löslich in fetten Ölen, jedoch unlöslich in Mineralölen. Polysorbate werden sehr vielfältig in der Pharmazie eingesetzt, z.B. als Netzmittel, O/W-Emulgator, Lösungsvermittler und zur Extraktion von pflanzlichen Drogen. Polysorbat 80 ist dabei stabil gegenüber Elektrolyten, mit starken Säuren und Basen erfolgt jedoch Verseifung. Polysorbate sind laut ABDA-Datenbank in über 1500 Arzneimitteln, als Hilfsstoffe enthalten. Darunter sind viele oral applizierbare Arzneiformen wie Tabletten, Dragees, Kapseln und Lösungen, jedoch auch lokal anzuwendende Arzneiformen wie Pflaster, Salben, Suppositorien, Gele, Vaginalcremes sowie Inhalationslösungen. Polysorbate sind in über 23 Augentropfen, z.B. Isoptomax[®] und Livocab[®], sowie in über 130 Nasentropfen, z.B. Otriven[®] und Vividrin[®] enthalten. Auch für Parenteralia finden Polysorbate Verwendung. Die ABDA-Datenbank nennt 75 Polysorbat-haltige Parenteralia, z. B. Twinrix[®] und Begrivac[®].

Die akute Toxizität von Polysorbat 80 liegt bei 39 g/kg (LD₅₀; Ratte, oral). Polysorbat 80 wird als gut verträglich für Haut und Auge eingeschätzt [1, 79, 109].

| |
|--|
| Zytotoxizität von Polysorbat 80 |
|--|

Die Ergebnisse von Polysorbat 80 im Zytotoxizitätstest mit EZ4U an HaCaT-Zellen und U937-Zellen sind in der Abbildung 48 dargestellt.

4. Ergebnisse

Die Zytotoxizität von Polysorbat 80 an U937-Zellen nimmt nach 24 Stunden im Vergleich zur 1-stündigen Exposition um das ca. 6fache zu. Gegenüber HaCaT-Zellen ist Polysorbat 80 nach 24 Stunden ca. 3fach toxischer als nach einer Stunde.

Nach 1-stündiger Exposition mit Polysorbat 80 sind noch keine Unterschiede zwischen den HaCaT- und den U937-Zellen festzustellen. Die Konzentrations-Wirkungs-Kurven verlaufen annähernd gleich. Nach 24 Stunden sind jedoch deutliche Unterschiede in der Empfindlichkeit der Zellen zu erkennen. Während 128 µg/ml an U937-Zellen schon 100% Zytotoxizität bewirkten, waren bei dieser Konzentration nur 60% der HaCaT-Zellen abgestorben. Bei 64 µg/ml waren über 70% der U937-Zellen, jedoch weniger als 30% der HaCaT-Zellen tot.

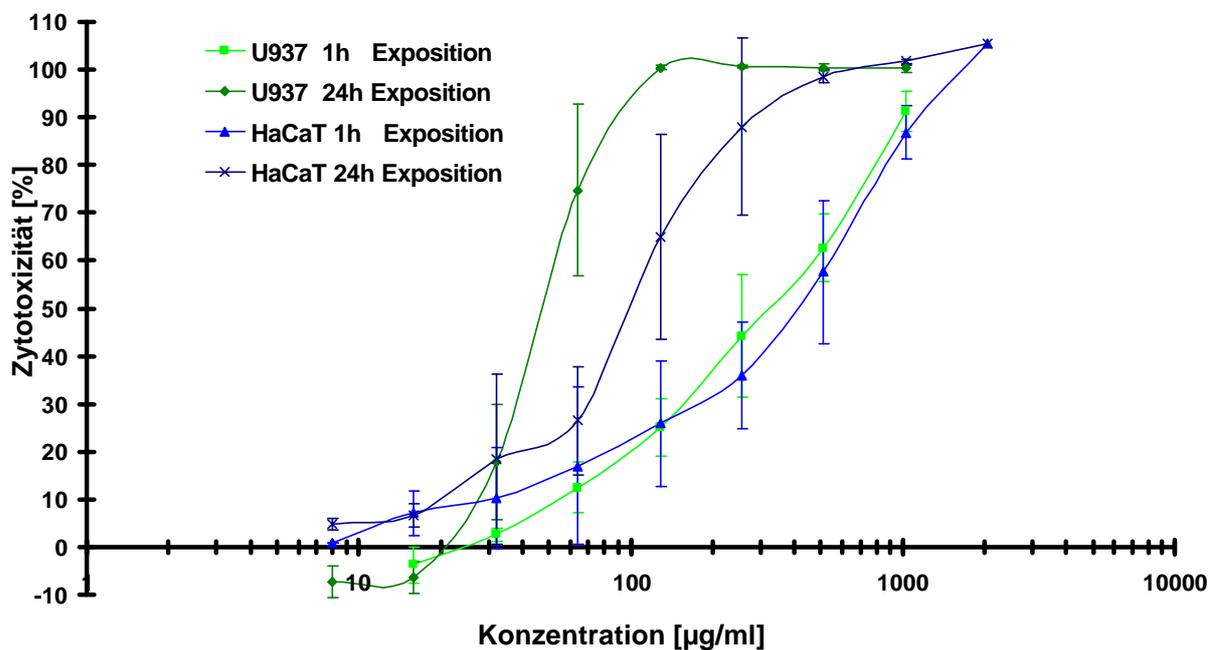


Abb. 48: Zytotoxizität von Polysorbat 80 an U937-Zellen (n = 15) und HaCaT-Zellen (n = 15) nach 1 und 24-stündiger Exposition bei 37°C

Tabelle 13 zeigt die halbmaximale zytotoxische Konzentration an HaCaT- und U937-Zellen nach 1- und 24-stündiger Exposition mit Polysorbat 80.

Tabelle 13: Halbmaximale zytotoxische Konzentration (CC₅₀) von Polysorbat 80

| Exposition | U937-Zellen [µg/ml] | HaCaT-Zellen [µg/ml] |
|------------|---------------------|----------------------|
| 1h | 279 (207-377) | 302 (182-503) |
| 24h | 48,1 (41,3-55,8) | 87,2 (58,9-129) |

4. Ergebnisse

Membrantoxizität von Polysorbat 80

Die Abbildung 49 zeigt die durch Polysorbat 80 induzierte Arachidonsäure-Freisetzung. Bei 24-stündiger Exposition der Zellen mit 2048 µg Polysorbat 80 pro ml wurde die maximale Arachidonsäuremenge im Vergleich zur Positivkontrolle freigesetzt. Nach 1-stündiger Exposition mit Polysorbat 80 wird keine maximale Arachidonsäure-Freisetzung erreicht. Bei 2048 µg/ml entspricht die Arachidonsäure-Freisetzung nur etwa 20% der Positivkontrolle.

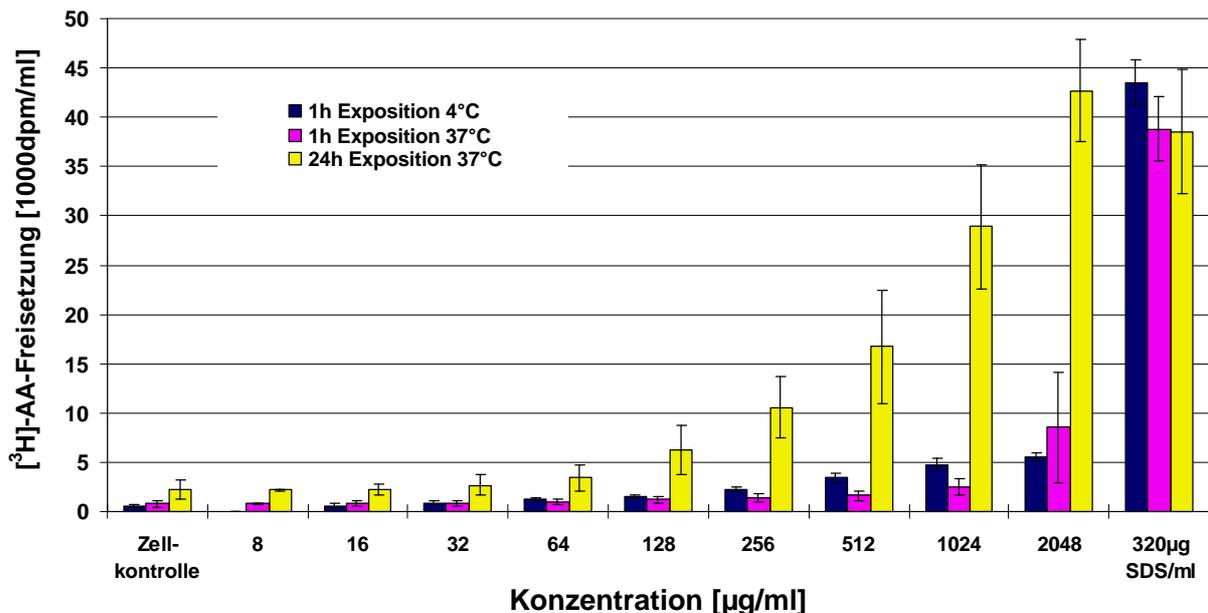


Abb. 49: [³H]Arachidonsäure-Freisetzung durch Polysorbat 80 an U937-Zellen nach 1- und 24-stündiger Exposition bei 4°C (n = 9) und 37°C (n = 12)

Die Arachidonsäure-Freisetzung bei 4°C entspricht derjenigen bei 37°C. Die MTK-Werte von Polysorbat 80 und die entsprechende Zytotoxizität bei der MTK sind in der Tabelle 14 dargestellt.

Tabelle 14: Minimal toxische Konzentration (MTK) und Zytotoxizität bei der MTK von Polysorbat 80

| Exposition | MTK [µg/ml] | Zytotoxizität [%] |
|------------|-------------|-------------------|
| 1h, 37°C | 80,0 | 17,6 |
| 1h, 4°C | 24,9 | - |
| 24h, 37°C | 44,4 | 45,7 |

Wie bei Triton[®] X-100 ist auch bei Polysorbat 80 im Konzentrationsbereich der MTK sowohl nach einer als auch nach 24 Stunden eine deutliche Zytotoxizität festzustellen.

4. Ergebnisse

Apoptose durch Polysorbat 80

Bestimmung Histon-assoziiierter DNA-Fragmente mit ELISA

Polysorbat 80 wurde in Konzentrationen von 2 bis 1024 $\mu\text{g/ml}$ auf seine Apoptose-induzierenden Eigenschaften hin untersucht. In der Abbildung 50 ist der Anreicherungsfaktor Histon-assoziiierter DNA-Fragmente in U937-Zellen nach 4- und 20-stündiger Exposition mit Polysorbat 80 dargestellt.

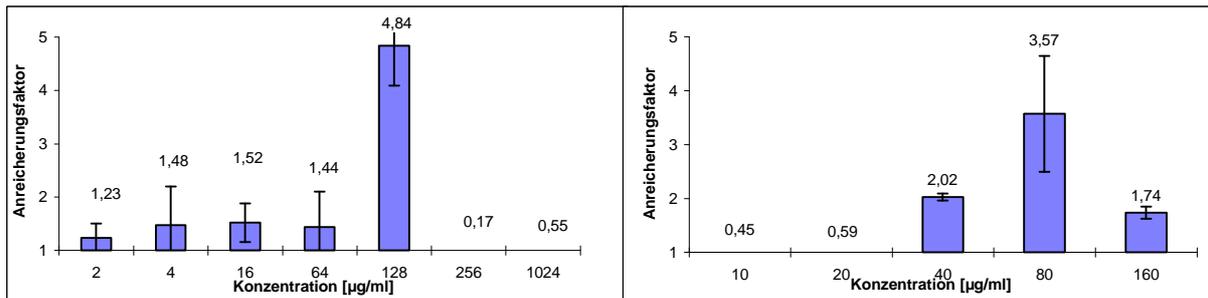


Abb. 50: Anreicherungsfaktor Histon-assoziiierter DNA-Fragmente in U937-Zellen nach 4-stündiger (links) und 20-stündiger (rechts) Exposition mit Polysorbat 80

Polysorbat 80 führte in der Konzentration 128 $\mu\text{g/ml}$ nach 4 Stunden und in den Konzentration 40 und 80 $\mu\text{g/ml}$ nach 20 Stunden zu einer deutlichen Erhöhung von intrazellulären Histon-assoziierten DNA-Fragmenten in U937-Zellen (AF: 2 bis 5). Im Konzentrationsbereich von 2 bis 128 $\mu\text{g/ml}$ nach 4 und bei der Konzentration 160 $\mu\text{g/ml}$ nach 20 Stunden Exposition sind die Anreicherungsfaktoren ebenfalls größer 1.

Durchflusszytometrische Bestimmungen

Polysorbat 80 wurde in den Konzentrationen 32, 64 und 128 $\mu\text{g/ml}$ durchflusszytometrisch nach Annexin-V-Propidiumiodid-Färbung auf apoptotische Zellen hin untersucht. Bei einer Konzentration von 64 $\mu\text{g/ml}$ führte Polysorbat 80 nach 4-stündiger Exposition zur Bildung apoptotischer U937-Zellen.

Es entstand eine Zellpopulation, die sich im Übergang von intakten zu frühapoptotischen Zellen befand, also mit Annexin V allein oder ungefärbt war. Diese Population wurde in sehr unterschiedlicher Weise angefärbt, sodass sie wie zerstoßen wirkt (Abb. 51). Eine zweite kleinere Zellpopulation befindet sich im Quadranten oben rechts. Es könnte sich demnach um spätapoptotische oder nekrotische Zellen handeln.

4. Ergebnisse

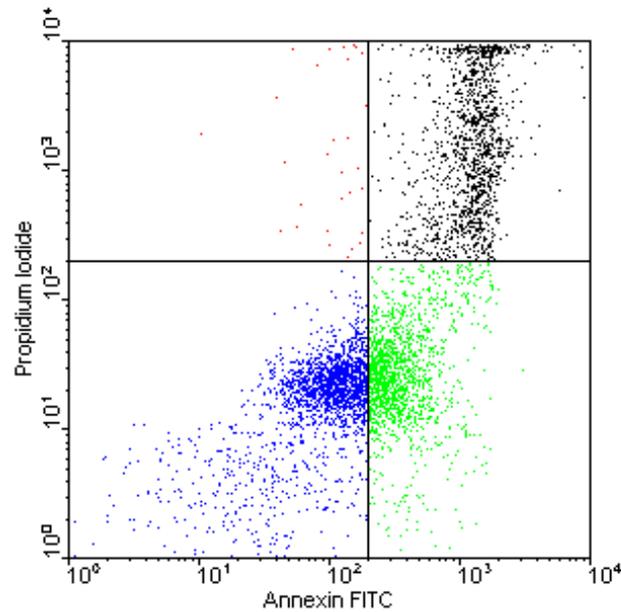


Abb. 51: Dotplot der U937-Zellen nach 4-stündiger Exposition mit 64 µg Polysorbat 80 pro ml und Annexin-V-Propidiumiodid-Färbung

Nach 4-stündiger Exposition mit 128 µg/ml entstand eine Zellpopulation, die zwischen den beiden linken Quadranten liegt, die Zellen wurden hier in unterschiedlichem Ausmaß mit Propidiumiodid, jedoch nur wenig mit Annexin V gefärbt. Es bildete sich eine Zellpopulation, bei der sich die Zellen im Übergang von intakten zu nekrotischen Zellen befanden. Bei dieser höheren Konzentration steht demnach als Art des Zelltodes die Nekrose im Vordergrund (Abb. 52).

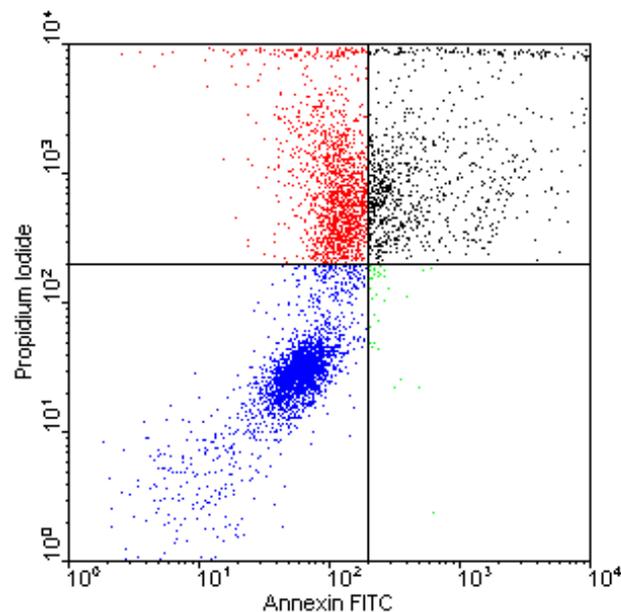


Abb. 52: Dotplot der U937-Zellen nach 4-stündiger Exposition mit 128 µg Polysorbat 80 pro ml und Annexin-V-Propidiumiodid-Färbung

4. Ergebnisse

Die Tabelle 15 fasst die Ergebnisse der durchflusszytometrischen Untersuchungen zusammen. Vermehrt vorkommende frühapoptotische Zellen sind fettgedruckt.

Tabelle 15: Prozentuale Verteilung der U937-Zellen auf die festgelegten Quadranten des Dotplots nach 4-stündiger Exposition mit Polysorbat 80 im Vergleich zur Zellkontrolle b

| Konzentration | 32 µg/ml Polysorbat 80 | |
|------------------------------|--------------------------------|------|
| U937-Zellen [%] | | ZK b |
| primär nekrotisch | 3,62 | 19,9 |
| nekrotisch / spätapoptotisch | 17,7 | 4,20 |
| frühapoptotisch | 1,96 | 0,70 |
| unverändert | 76,7 | 75,2 |
| Konzentration | 64 µg/ml Polysorbat 80 | |
| U937-Zellen [%] | | ZK b |
| primär nekrotisch | 0,60 | 19,9 |
| nekrotisch / spätapoptotisch | 28,1 | 4,20 |
| frühapoptotisch | 31,6 | 0,70 |
| unverändert | 39,7 | 75,2 |
| Konzentration | 128 µg/ml Polysorbat 80 | |
| U937-Zellen [%] | | ZK b |
| primär nekrotisch | 30,3 | 19,9 |
| nekrotisch / spätapoptotisch | 18,3 | 4,20 |
| frühapoptotisch | 0,76 | 0,70 |
| unverändert | 50,7 | 75,2 |

Morphologische Veränderungen durch Polysorbat 80

HaCaT-Zellen

Folgende Veränderungen an den HaCaT-Zellen wurden nach der Exposition mit Polysorbat 80 festgestellt:

- Abrundung
- Ablösen der Zellen von der Oberfläche
- Schrumpfung
- Lyse

In den Abbildungen 53 und 54 sind HaCaT-Zellen nach 1- und 24-stündiger Exposition mit Polysorbat 80 abgebildet. Auch bei Polysorbat 80 ist die deutliche Zellveränderung, wie sie bei Brij[®]78 und Triton[®] X-100 beobachtet wurde, zu erkennen. Nach 1-stündiger Exposition erscheint die Zellmembran als Blase, die den geschrumpften Zellkern enthält. Dies ist oberhalb 1024 µg/ml bei fast allen Zellen der Fall. Nach 24-stündiger Exposition mit 512 µg/ml wirkt der Zellinhalt wie granuliert. Bei den sehr gleichförmig beschaffenen Zellfragmenten könnte es sich um apoptotische Körperchen handeln. Bei 1024 µg/ml nach 24 Stunden scheint außerdem die Integrität der Zellwand nicht mehr gegeben zu sein. Die Zellen sehen aus, als ob sie ineinander fließen.

U937-Zellen

An den U937-Zellen wurden nach der Exposition mit Polysorbat 80 folgende Veränderungen beobachtet:

- Schrumpfung
- Zellen erscheinen abgeflacht
- Lyse

Die Abbildungen 55 und 56 zeigen U937-Zellen nach 1- und 24-stündiger Inkubation mit Polysorbat 80. Nach 1-stündiger Exposition sind an den U937-Zellen nur geringe Veränderungen zu erkennen. Nach 24 Stunden Exposition mit 64 und 128 µg/ml sind mehr Zellfragmente vorhanden als bei unbehandelten Zellen. Das deutet auf eine gering erhöhte Zelllyse hin, die eventuell durch Apoptose verursacht wurde. Die Zellveränderungen, die nach 24-stündiger Exposition mit Konzentrationen ab 512 µg/ml beobachtet wurden, ähneln mehr einer Nekrose. Bei 512 µg/ml sind zwei Zellpopulationen sichtbar. Ein Teil der Zellen ist geschrumpft und erscheint flachgedrückt, die andere Zellpopulation befindet sich im Übergang von äußerlich nahezu intakten Zellen zu geschrumpften Zellen. Bei 1024 µg/ml ist nur noch eine Zellpopulation mit völlig zerstörten Zellen vorhanden.

4. Ergebnisse

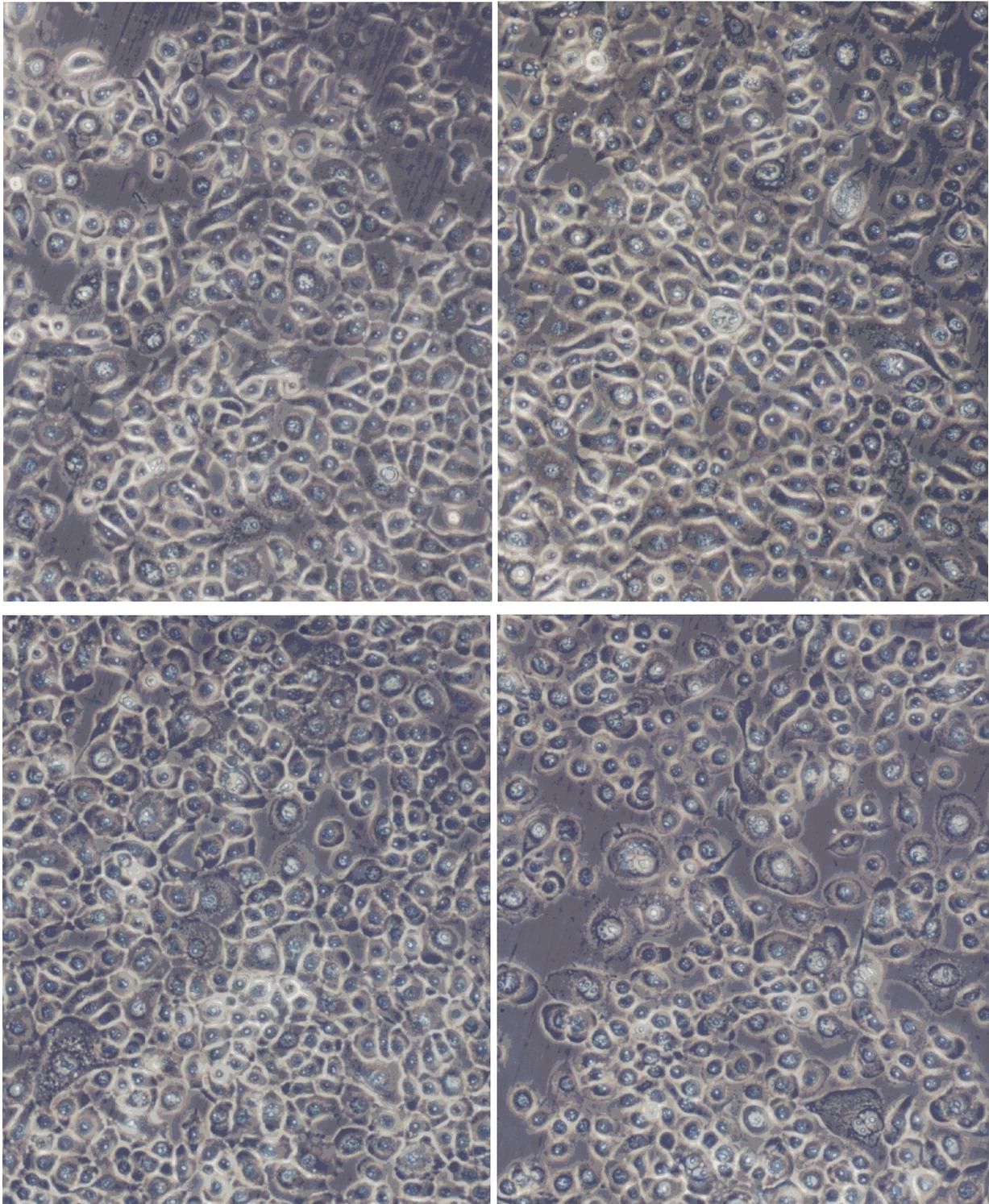


Abb. 53: HaCaT-Zellen nach 1-stündiger Exposition mit Polysorbat 80 160fach vergrößert (oben links 256 µg/ml; oben rechts 512 µg/ml; unten links 1024 µg/ml; unten rechts 2048 µg/ml)

4. Ergebnisse

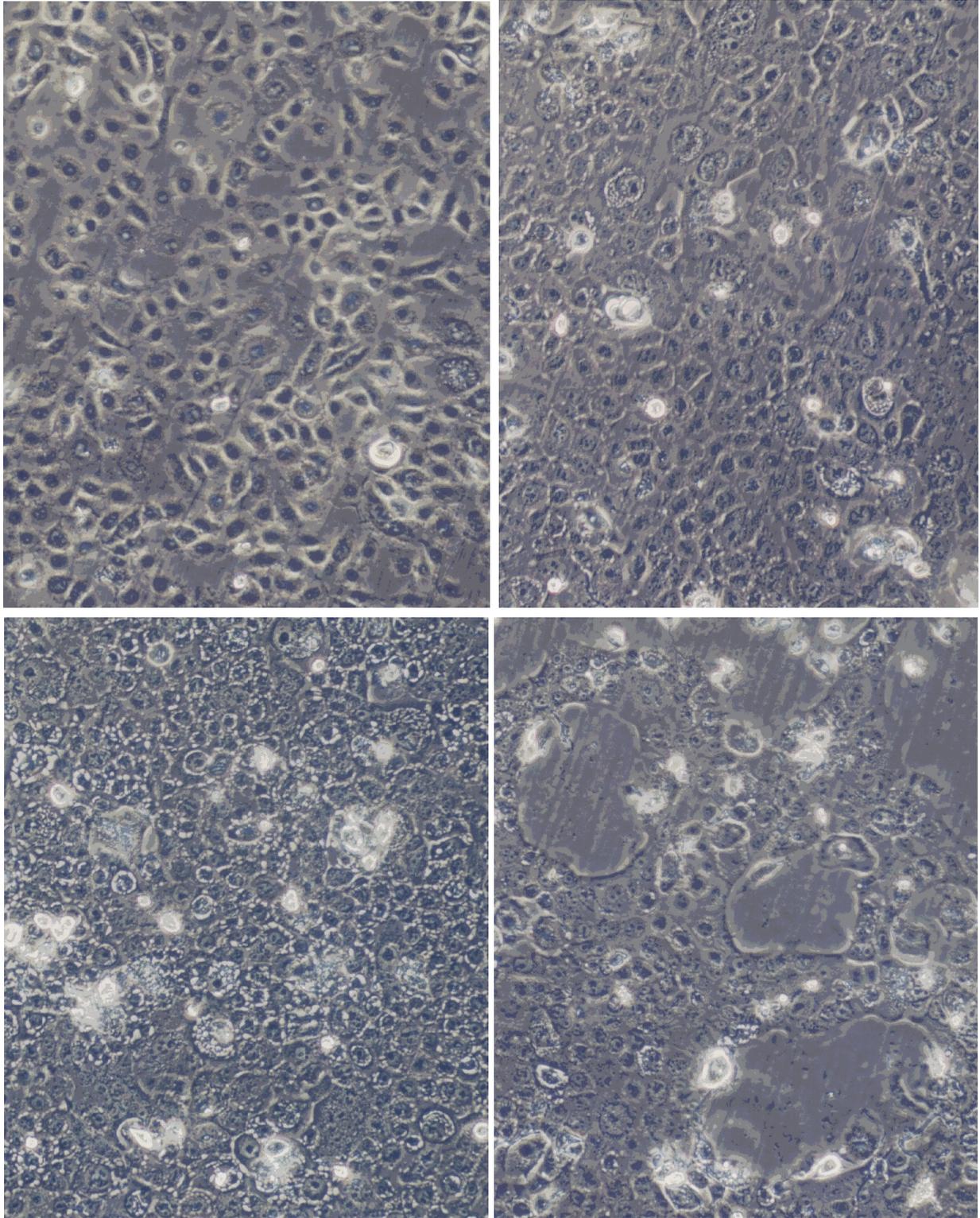


Abb. 54: HaCaT-Zellen nach 24-stündiger Exposition mit Polysorbat 80 160fach vergrößert (oben links 128 µg/ml; oben rechts 256 µg/ml; unten links 512 µg/ml; unten rechts 1024 µg/ml)

4. Ergebnisse

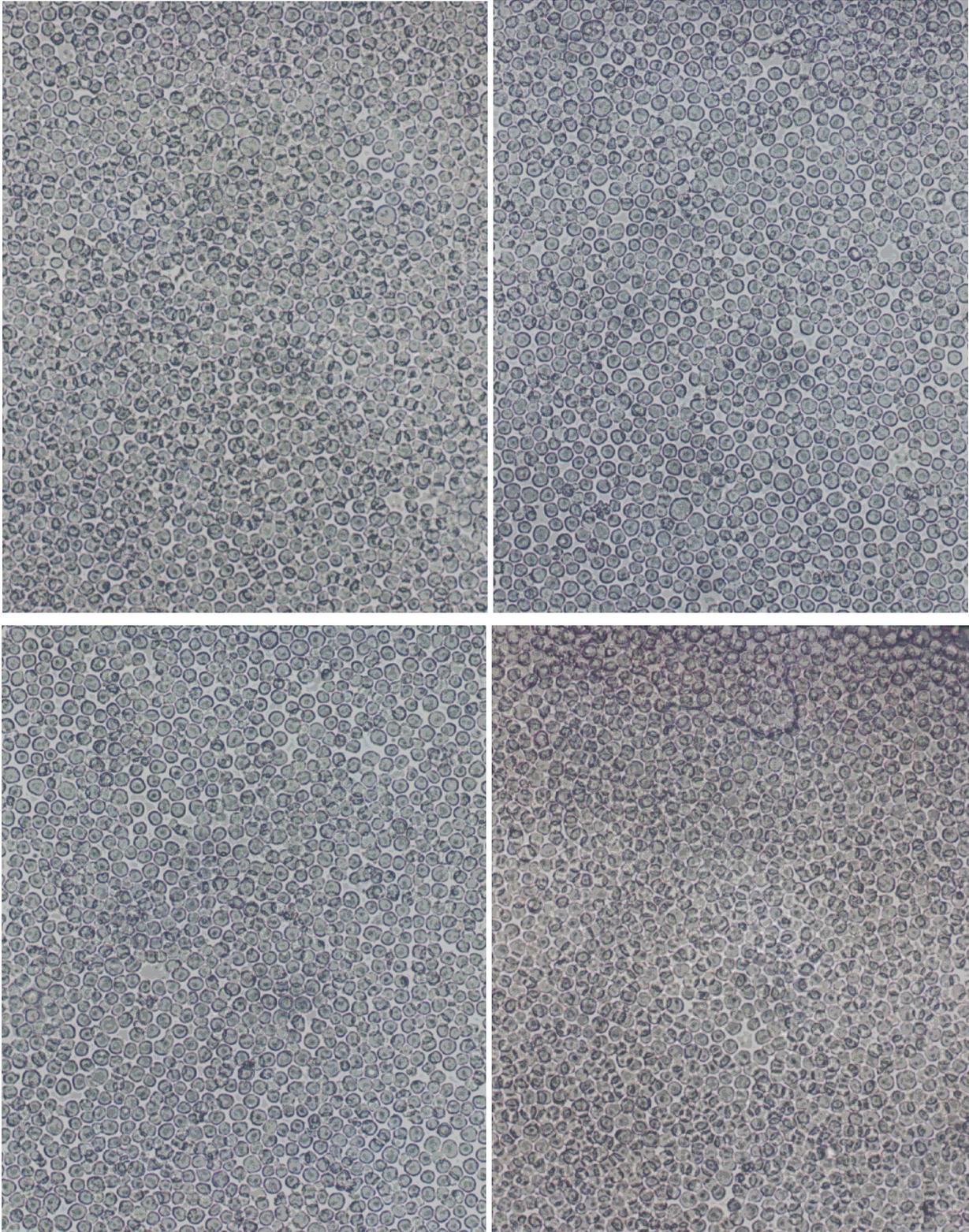


Abb. 55: U937-Zellen nach 1-stündiger Exposition mit Polysorbat 80 160fach vergrößert (oben links 128 µg/ml; oben rechts 256 µg/ml; unten links 512 µg/ml; unten rechts 1024 µg/ml)

4. Ergebnisse

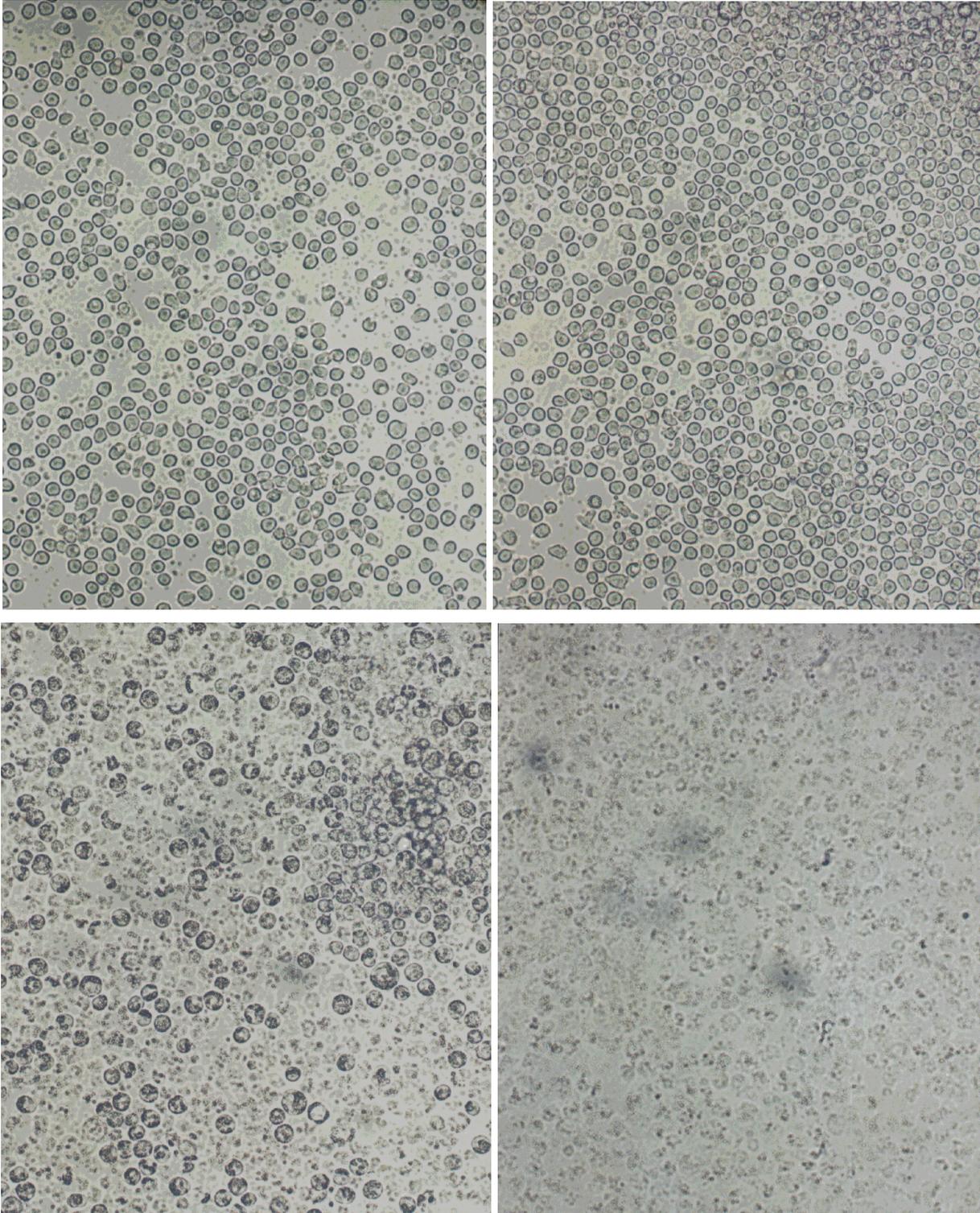


Abb. 56: U937-Zellen nach 24-stündiger Exposition mit Polysorbat 80 160fach vergrößert (oben links 64 µg/ml; oben rechts 128 µg/ml; unten links 512 µg/ml; unten rechts 1024 µg/ml)

4.1.4. Macroglycerolricinoleat – Cremophor® EL

Macroglycerolricinoleat ist im Europäischen Arzneibuch offizinell. Es ist unter dem Handelsnamen Cremophor® EL bekannt und stellt ein komplexes Reaktionsgemisch aus 1 Mol Rizinusöl und 35 Mol Ethylenoxid dar. Es enthält hauptsächlich ethoxyliertes Glycerolricinoleat. Außerdem sind Macroglycerolricinoleat und entsprechende freie Glykole enthalten [109]. Die einzelnen Bestandteile von Cremophor® EL sind in der Tabelle 16 aufgelistet [138, 163]. Die prozentualen Angaben gehen auf Müller zurück [163]. Sind keine prozentualen Angaben angegeben, ist der Anteil am Gesamtprodukt nicht bekannt.

Tabelle 16: Zusammensetzung von Cremophor® EL [138, 163]

| Hydrophobe Bestandteile (ca. 83%) | Hydrophile Bestandteile (ca. 17%) |
|---|-----------------------------------|
| Ester aus Rizinolsäure und Glycerolpolyoxyethylenethern (Hauptbestandteil; Abb. 57) | Glycerolpolyoxyethylenether (10%) |
| Ester aus Rizinolsäure und Polyoxyethylen | Polyoxyethylen (7%) |
| Rizinolsäurehaltige Verbindungen mit in geringem Umfang oxyethylierten sekundären Hydroxylgruppen | |
| Diester aus Ricinolsäure und Polyoxyethylen sowie höhere Ester, bei denen weitere Hydroxylgruppen mit Rizinolsäure verestert sind | |
| Ester aus Ölsäure und Polyoxyethylen (ca. 5%) | |
| Rizinusöl (ca. 3%) | |

Die Reinheit von Cremophor® EL wird mit 98% angegeben. Der pH-Wert der 10%igen Lösung liegt zwischen 6 und 8. Cremophor® EL ist leicht wasserlöslich und beständig gegen Elektrolyte, die in nicht zu hoher Konzentration vorliegen. Sein HLB-Wert liegt zwischen 12 und 14.

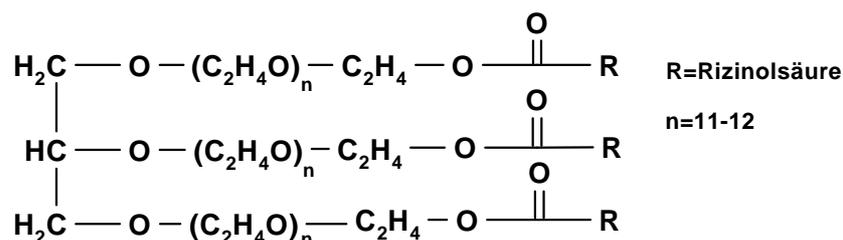


Abb. 57: Strukturformel des Hauptbestandteils von Cremophor® EL

4. Ergebnisse

Die Hautverträglichkeit von Cremophor® EL gilt als gut. Am Kaninchenauge werden 30%ige Lösungen reizlos vertragen. Die LD₅₀ wird mit >6,4 ml/kg (Ratte, oral) angegeben [79].

Cremophor® EL wird vielseitig in der Pharmazie eingesetzt, als Solubilisator und Emulgator, als Lösungsvermittler für ätherische Öle, fettlösliche Vitamine und andere hydrophobe Stoffe [79]. Da Cremophor® EL keine Hämolyse verursacht, ist es außer für oral und topisch zu applizierenden Arzneimittel, auch als Emulgator für parenterale Arzneiformen geeignet [172]. Parenteral eingesetzt kann es jedoch einige unerwünschte Wirkungen verursachen [66]. Bei längerer Infusion kann es z.B. zu einer Verschiebung des Lipoproteinmusters und zu einer Beeinträchtigung der Fließeigenschaften des Blutes kommen [10, 13]. Cremophor® EL weist spezielle hämodynamische Effekte auf, die einige unerwünschte Wirkungen wie z.B. die renale Toxizität erklären [33]. Auch sind bei parenteraler Applikation allergische Reaktionen beschrieben worden, die im Zusammenhang mit Cremophor® EL stehen, wie z.B. anaphylaktische Reaktionen [71, 115, 216] und Veränderungen der Komplementreaktionen [118].

Cremophor® EL ist in mindestens 70 deutschen Fertigarzneimitteln, z.B. in Bädern, Salben, Kapseln, Lösungen, Gels und Augentropfen, als Hilfsstoff enthalten [1]. Die ABDA Datenbank nennt 6 Parenteralia mit Cremophor® EL z.B. Taxol® Infusionslösungskonzentrat Ampullen, Phytomenadion-Rotexmedica® Ampullen, Trinitrosan® Ampullen.

Von Cremophor® EL wurden zusätzlich zu dem handelsüblichen Produkt zwei Fraktionen des komplexen Gemisches untersucht. Die Fraktionen wurden vom Institut für Pharmazeutische Chemie der Universität Freiburg i.Br. erhalten. Die Separation des Cremophor® EL erfolgte mit Amberlite IRC 50 (ICN Biomedicals GmbH, Eschwege, Deutschland), einem synthetischen Kationen-Austauscher-Harz. Es wurden 2 Fraktionen gewonnen, eine Aqua-Fraktion, die ca. 30%, und eine Methanol-Fraktion, die ca. 70% des Gesamtgemisches darstellen. Untersuchungen mit DE-MALDI-TOF-Massenspektroskopie ergaben, dass die Aqua-Fraktion hauptsächlich aus hydrophoben Bestandteilen besteht und die Methanol-Fraktion neben hydrophoben vor allem auch die hydrophilen Komponenten des Cremophor® EL umfasst.

Zytotoxizität von Cremophor® EL und seinen zwei Fraktionen

Die im Zytotoxizitätstest mit EZ4U erzielten Ergebnisse von Cremophor® EL an HaCaT- und U937-Zellen gibt die Abbildung 58 wieder.

Die Zytotoxizität von Cremophor® EL ist nach 1-stündiger Exposition noch sehr gering. Bei U937-Zellen sind 300 mg/ml nötig, um 90% Zytotoxizität zu erreichen. Auch bei HaCaT-Zellen waren nach 1-stündiger Exposition erst oberhalb 300 mg/ml 90% der Zellen tot. In einem Konzentrationsbereich zwischen 1 und 100 mg Cremophor® EL pro ml liegt die Zytotoxizität bei den HaCaT-Zellen zwischen 50 und 70%.

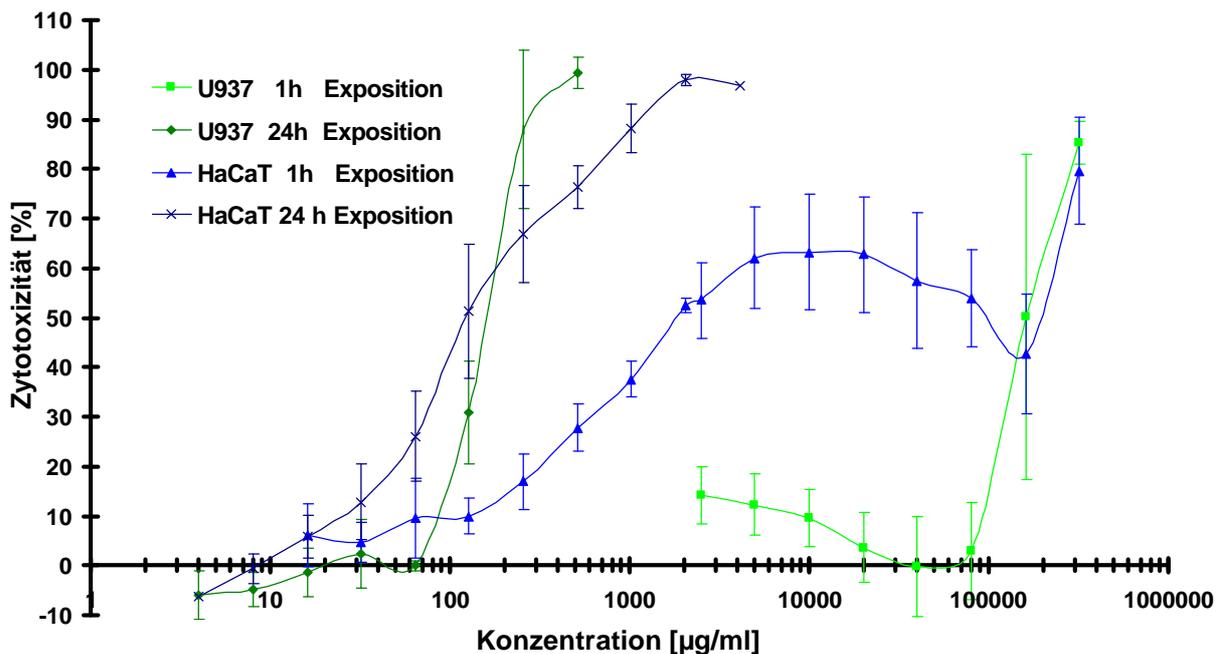


Abb. 58: Zytotoxizität von Cremophor® EL an U937-Zellen (n = 15) und HaCaT-Zellen (n = 15) nach 1- und 24-stündiger Exposition bei 37°C

Die Zunahme der Zytotoxizität mit der Expositionszeit ist bei keiner der getesteten Substanzen so deutlich wie bei Cremophor® EL. Nach 24 Stunden ist Cremophor® EL für U937-Zellen 1000mal toxischer als nach 1 Stunde. An HaCaT-Zellen nimmt die Zytotoxizität nach 24 Stunden Exposition um den Faktor 46 zu.

Im Gegensatz zu den meisten anderen Tensiden weist Cremophor® EL zumindest nach 1-stündiger Exposition gegenüber HaCaT-Zellen eine größere Zytotoxizität auf als gegenüber U937-Zellen. Nach 24 Stunden gleicht sich dieser Unterschied jedoch teilweise aus. Bei 24-stündiger Exposition verursacht Cremophor® EL in Konzentrationen über 30 µg/ml an HaCaT-Zellen bereits eine geringe Zytotoxizität (>10%), während U937-Zellen Cremophor® EL bis 80 µg/ml tolerierten. Eine 100%ige Zytotoxizität ist bei U937-Zellen bereits bei Konzentrationen ab 400 µg/ml, bei HaCaT Zellen erst ab 2000 µg/ml, festzustellen. Da sich die Konzentrations-Wirkungs-Kurven im Bereich der halbmaximalen zytotoxischen Konzentrationen (CC₅₀) schneiden, sind diese annähernd gleich. Die CC₅₀-Werte von Cremophor® EL an HaCaT- und U937-Zellen nach 1- und 24-stündiger Exposition sind in Tabelle 17 dargestellt.

In den Abbildungen 59 und 60 ist die Zytotoxizität der beiden Cremophor® EL-Fractionen der Zytotoxizität von unfraktioniertem Cremophor® EL an HaCaT-Zellen und an U937-Zellen nach 24-stündiger Exposition gegenübergestellt.

4. Ergebnisse

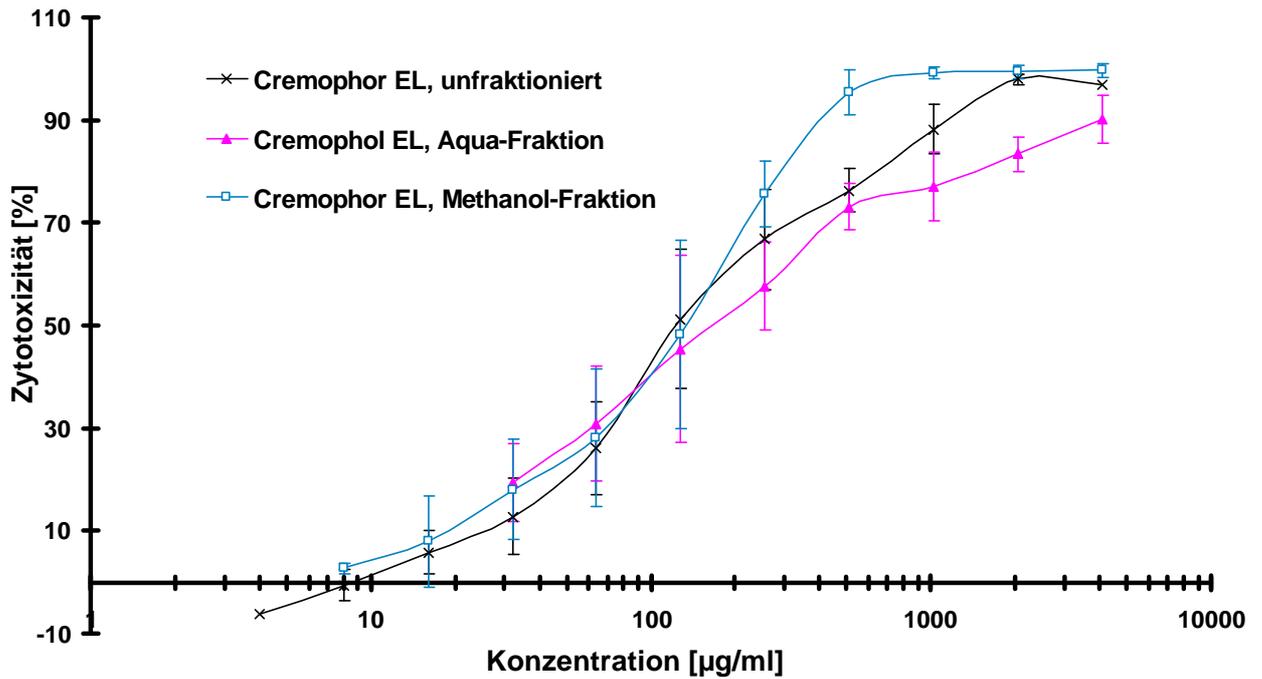


Abb. 59: Zytotoxizität der Cremophor[®] EL-Fractionen (n = 16) im Vergleich zu unfraktioniertem Cremophor[®] EL an HaCaT-Zellen (n = 15) nach 24 Stunden Exposition bei 37°C

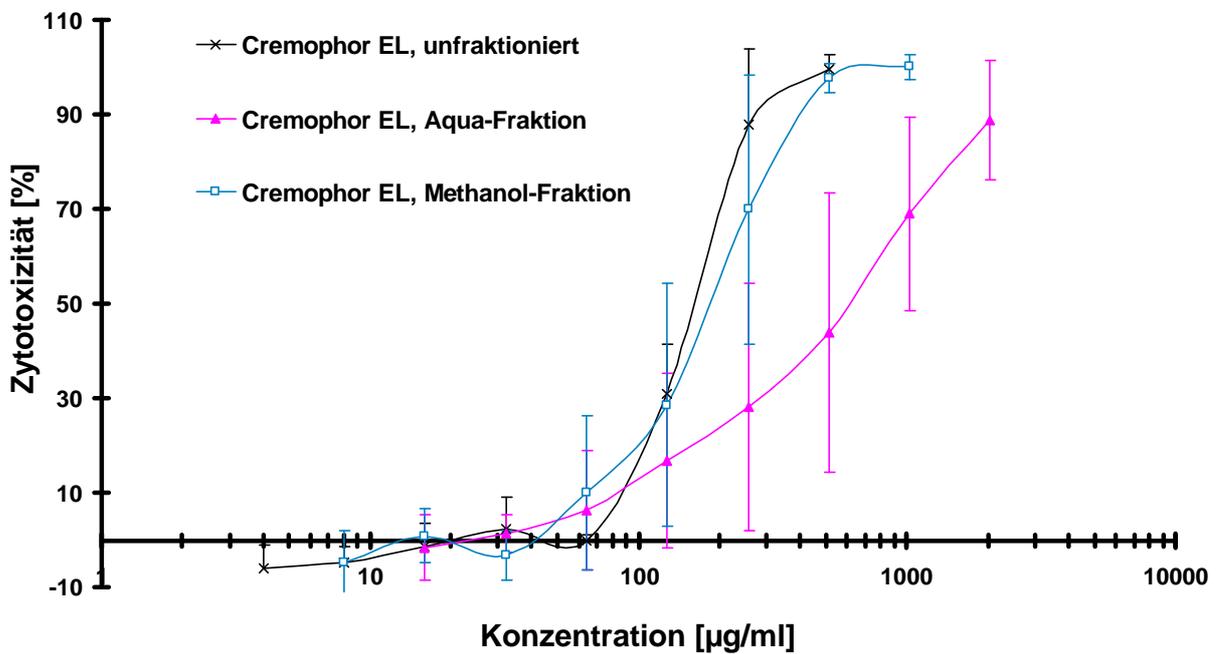


Abb. 60: Zytotoxizität der Cremophor[®] EL-Fractionen (n = 14) im Vergleich zu unfraktioniertem Cremophor[®] EL an U937-Zellen (n = 15) nach 24 Stunden Exposition bei 37°C

4. Ergebnisse

Die Aqua-Fraktion weist die geringste Zytotoxizität auf, sowohl gegenüber HaCaT- als auch gegenüber U937-Zellen. An HaCaT-Zellen ist die Aqua-Fraktion etwas weniger, die Methanol-Fraktion etwas stärker zytotoxisch als unfraktioniertes Cremophor® EL.

An U937-Zellen überschreitet die Zytotoxizität des unfraktionierten Cremophor® EL die Zytotoxizität der beiden Fraktionen. Dieser Effekt ist überadditiv. Die halbmaximale zytotoxische Konzentration enthält 48 µg Aqua-Fraktion und 112 µg Methanol-Fraktion pro ml. Bei diesen Konzentrationen weisen die entsprechenden Fraktionen 4,1% und 30,9% Zytotoxizität auf. In der Summe, was einem additiven Effekt entspräche, sind es also nur 35%, statt 50% Zytotoxizität. Die CC_{50} -Werte der Cremophor® EL-Fractionen sind ebenfalls in der Tabelle 17 aufgeführt.

Tabelle 17: Halbmaximale zytotoxische Konzentration (CC_{50}) von Cremophor® EL und seinen Fraktionen

| Exposition | U937-Zellen [µg/ml] | HaCaT-Zellen [µg/ml] |
|----------------------|------------------------|----------------------|
| 1h (unfraktioniert) | 159000 (116000-217000) | 7100 (4010-12600) |
| 24h (unfraktioniert) | 160 (135-191) | 153 (107-218) |
| 24h (Aqua-Fraktion) | 492 (213-1140) | 180 (109-296) |
| 24h (MeOH-Fraktion) | 172 (110-271) | 111 (78,5-157) |

Für einem Konzentrationsbereich, der nur relativ geringe zytotoxische Effekte verursachte, wurde untersucht, wie sich HaCaT-Zellen nach Entfernung des Cremophor® EL verhalten. Es wäre möglich, dass sich die Zellen wieder vollständig regenerieren, dass sich die Zellen nicht verändern oder, dass die toxische Wirkung des Cremophor® EL anhält.

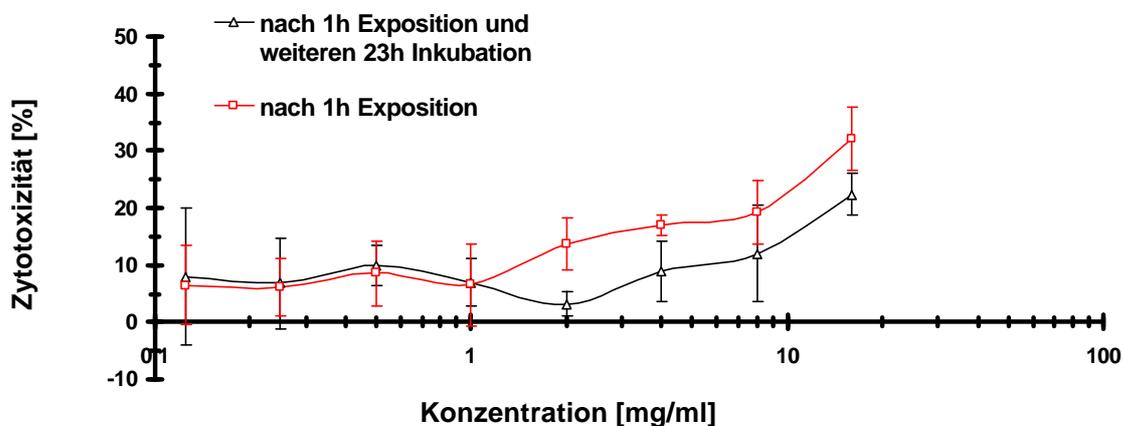


Abb. 61: Zytotoxizität von Cremophor® EL an HaCaT-Zellen nach 1-stündiger Exposition und weiterer Inkubation für insgesamt 24 Stunden im Vergleich zur Zytotoxizität unmittelbar nach 1-stündiger Exposition (n = 5)

4. Ergebnisse

Die Zellen wurden für diese Untersuchungen nach 1-stündiger Exposition mit Cremophor[®] EL gewaschen und für insgesamt 24 Stunden weiter inkubiert und schließlich mit EZ4U auf Zytotoxizität getestet.

Die Abbildung 61 zeigt die Zytotoxizität von Cremophor[®] EL an HaCaT-Zellen nach 1-stündiger Exposition und weiterer Inkubation der Zellen auf der Mikrotiterplatte über insgesamt 24 Stunden. Die Zytotoxizität von Cremophor[®] EL ist nach 24 Stunden etwas verringert. In der Konzentration von 16 mg/ml ist sie von 30% auf 20% gesunken. Die Zellen scheinen sich geringfügig zu regenerieren. Dieser Regenerationseffekt ist jedoch nicht für jede Konzentration signifikant. Eine anhaltende zytotoxische Wirkung des Cremophor[®] EL nach seiner Entfernung ist jedoch ausgeschlossen.

Membrantoxizität von Cremophor[®] EL und seinen zwei Fraktionen

Die durch Cremophor[®] EL ausgelöste Arachidonsäure-Freisetzung zeigen die Abbildungen 62 und 63.

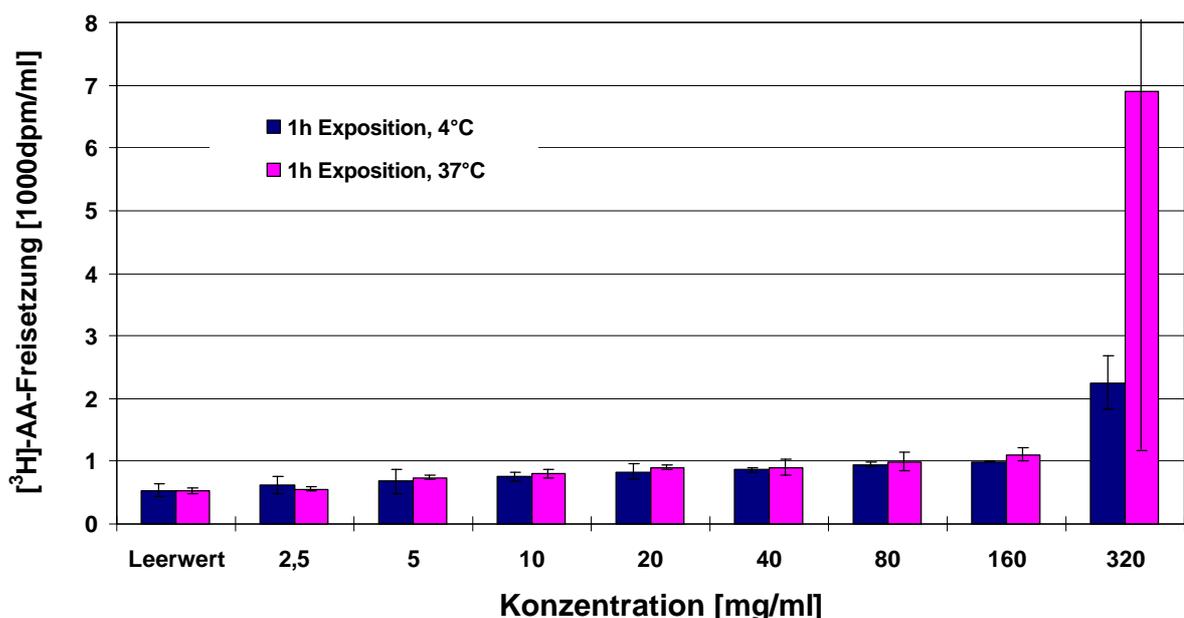


Abb. 62: [³H]Arachidonsäure-Freisetzung durch Cremophor[®] EL an U937-Zellen nach 1 Stunde Exposition bei 4°C (n = 9) und 37°C (n = 12)

Die Arachidonsäure-Freisetzung nach 1-stündiger Exposition ist sehr gering. Es wurden sehr hohe Konzentrationen (>10 mg/ml) an Cremophor[®] EL benötigt, um eine minimale Erhöhung der [³H]Arachidonsäure-Freisetzung gegenüber dem Leerwert zu erzielen. Die Arachidonsäure-Freisetzung bei 4°C ist geringer als bei 37°C, jedoch nicht signifikant (Abb. 62). Die MTK bei 4°C ist allerdings deutlich größer als bei 37°C (Tab. 18).

4. Ergebnisse

Nach 24 Stunden Exposition wurde eine höhere, jedoch in den getesteten Konzentrationen nicht maximale, Arachidonsäure-Freisetzung erreicht. Die höchste Arachidonsäure-Freisetzung, die erreicht wurde, entspricht nur etwa 1/3 der Positivkontrolle. Die Methanol-Fraktion bewirkt in etwa die gleiche Arachidonsäure-Freisetzung wie unfraktioniertes Cremophor® EL. Die Aqua-Fraktion hingegen ist weniger membrantoxisch (Abb.63). Dies ist auch an den MTK-Werten des Cremophor® EL und seiner beiden Fraktionen ersichtlich (Tab. 18).

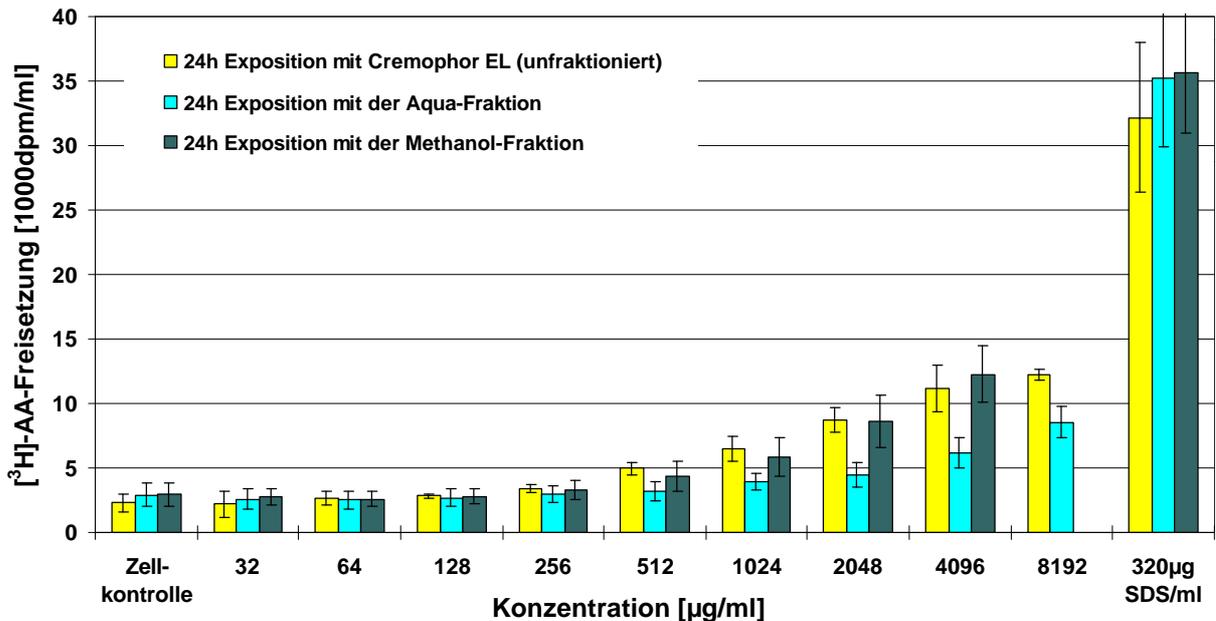


Abb. 63: [³H]Arachidonsäure-Freisetzung durch Cremophor® EL und 2 Cremophor® EL-Fractionen an U937-Zellen nach 24 Stunden Exposition bei 37°C (n = 12)

Tabelle 18: Minimal toxische Konzentration (MTK) und Zytotoxizität bei der MTK von Cremophor® EL und seinen Fraktionen

| Exposition | MTK [µg/ml] | Zytotoxizität [%] |
|---------------------------|-------------|-------------------|
| 1h, 37°C (unfraktioniert) | 20300 | 0 |
| 1h, 4°C (unfraktioniert) | 79200 | - |
| 24h (unfraktioniert) | 137 | 42,1 |
| 24h (Aqua-Fraktion) | 634 | 54,1 |
| 24h (MeOH-Fraktion) | 220 | 57,8 |

Während nach 1-stündiger Exposition im Konzentrationsbereich der MTK noch keine Zytotoxizität verursacht wird, ist nach 24 Stunden bei Cremophor® EL und seinen beiden Fraktionen deutliche Zytotoxizität festzustellen.

4. Ergebnisse

Apoptose durch Cremophor® EL und seine zwei Fraktionen

Bestimmung Histon-assoziiierter DNA-Fragmente mit ELISA

Cremophor® EL wurde in Konzentrationen von 0,001 bis 160 mg/ml auf seine Apoptose-induzierenden Eigenschaften hin untersucht. Die beiden Fraktionen wurden in einem Konzentrationsbereich von 0,016 bis 40 mg/ml getestet. Die Abbildungen 64 bis 66 geben den Anreicherungsfaktor Histon-assoziiierter DNA-Fragmente in U937-Zellen nach 4- und 20-stündiger Exposition mit Cremophor® EL und seinen beiden Fraktionen an.

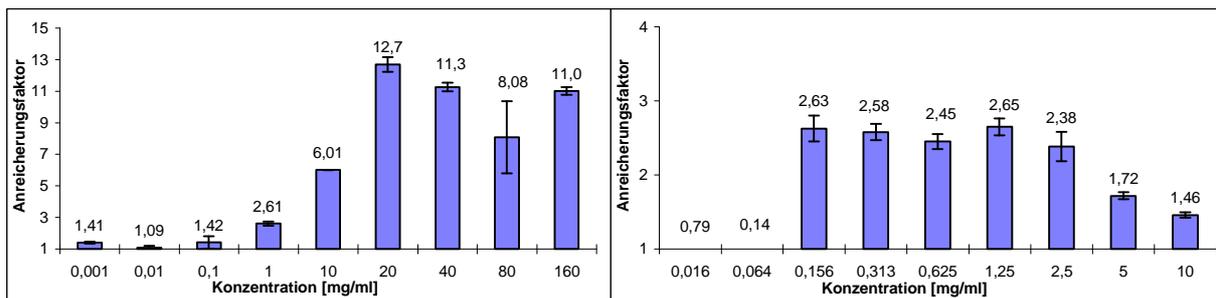


Abb. 64: Anreicherungsfaktor Histon-assoziiierter DNA-Fragmente in U937-Zellen nach 4-stündiger (links) und 20-stündiger (rechts) Exposition mit Cremophor® EL (unfraktioniert)

Bei unfraktioniertem Cremophor® EL konnte sowohl nach 4 als auch nach 20 Stunden eine deutliche Erhöhung von intrazellulären Histon-assoziierten DNA-Fragmenten in U937-Zellen nachgewiesen werden (nach 4 Stunden im Konzentrationsbereich von 1 bis 160 mg/ml AF: 3 bis 13; nach 20 Stunden im Konzentrationsbereich von 0,1 bis 5 mg/ml AF: 2 bis 3).

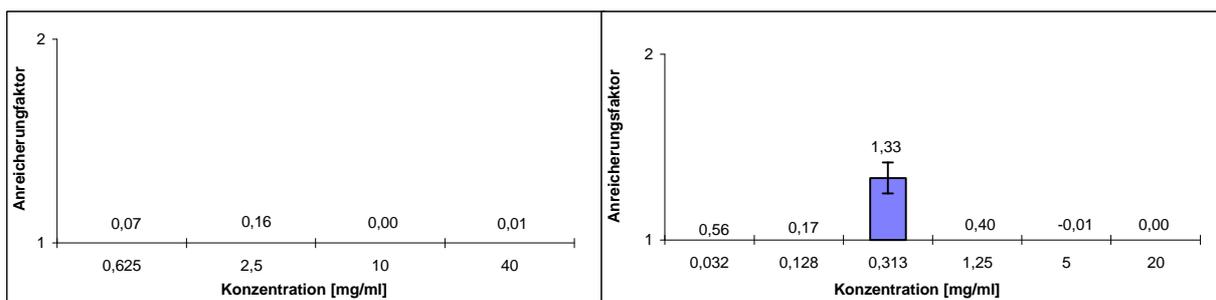


Abb. 65: Anreicherungsfaktor Histon-assoziiierter DNA-Fragmente in U937-Zellen nach 4-stündiger (links) und 20-stündiger (rechts) Exposition mit der Aqua-Fraktion des Cremophor® EL

Für die Aqua-Fraktion konnte in den getesteten Konzentrationen nach 4 Stunden keine und nach 20 Stunden nur bei 0,3 mg/ml eine leichte Erhöhung der Histon-assoziierten DNA-Fragmente (AF = 1,3) nachgewiesen werden.

4. Ergebnisse

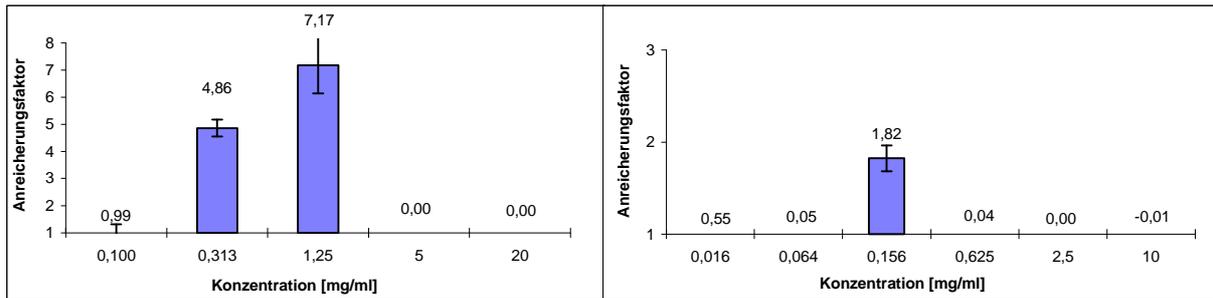


Abb. 66: Anreicherungs-faktor Histon-assoziiierter DNA-Fragmente in U937-Zellen nach 4-stündiger (links) und 20-stündiger (rechts) Exposition mit der Methanol-Fraktion des Cremophor[®] EL

Die Methanol-Fraktion verursachte nach 4 Stunden in den Konzentrationen 0,3 und 1,25 mg/ml eine deutliche (AF: 5 bis 7) nach 20 Stunden bei 0,16 mg/ml eine geringe (AF = 1,8) Erhöhung der intrazellulären Histon-assoziierten DNA-Fragmente.

Durchflusszytometrische Bestimmungen

Cremophor[®] EL wurde in seiner nativen, unfraktionierten Form in den Konzentrationen 0,125; 1,25; 5 und 20 mg/ml durchflusszytometrisch mit der Annexin-V-Propidiumiodid-Färbung auf apoptotische Zellen hin untersucht.

Die typische Art des Zelltodes, der durch Cremophor[®] EL ausgelöst wird, ist die Apoptose. Bei 5 und 20 mg/ml konnten nach 4 bzw. 20 Stunden Exposition erhöhte Mengen frühapoptotischer, nur mit Annexin V gefärbter Zellen nachgewiesen werden. Bei 1,25 µg/ml waren erst nach 44-stündiger Exposition frühapoptotische Zellen vorhanden, nach 20-stündiger Exposition sind überwiegend spätapoptotische Zellen bestimmt worden (Tab. 19).

In den Abbildungen 67 bis 69 ist deutlich zu erkennen, dass die Apoptose die hauptsächliche Ursache des Zellsterbens ist. In den Dotplots ist eine neu entstandene Zellpopulation zu sehen, die sich in den beiden rechten Quadranten befindet, also überwiegend mit Annexin V gefärbte Zellen umfasst. Es handelt sich um früh- und spätapoptotische Zellen. Lediglich bei 20-stündiger Exposition mit 20 mg/ml sind auch einige Zellen (<10%) mit Propidiumiodid allein gefärbt, also nekrotisch verändert.

In der Abbildung 69 sind die Dotplots nach Exposition mit 5 mg Cremophor[®] EL pro ml dargestellt. Typisch für die kürzere Expositionszeit (4 Stunden) ist, dass die Zellpopulation zerstoßen wirkt, die Zellen also in sehr unterschiedlichem Ausmaß angefärbt wurden. Nach 20 Stunden ist die Zellpopulation wieder relativ kompakt und liegt in den beiden rechten Quadranten.

4. Ergebnisse

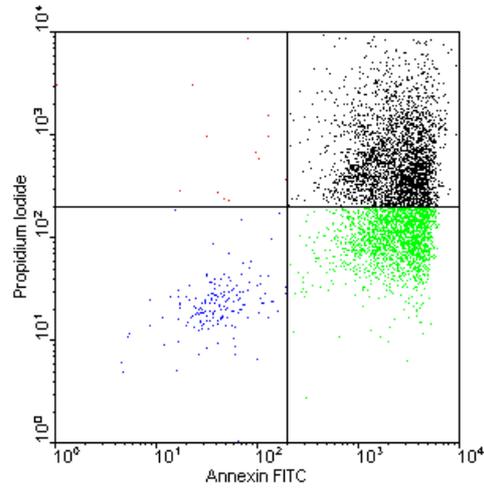


Abb. 67: Dotplot der U937-Zellen nach 44-stündiger Exposition mit 1,25 mg Cremophor[®] EL pro ml und Annexin-V-Propidiumiodid-Färbung

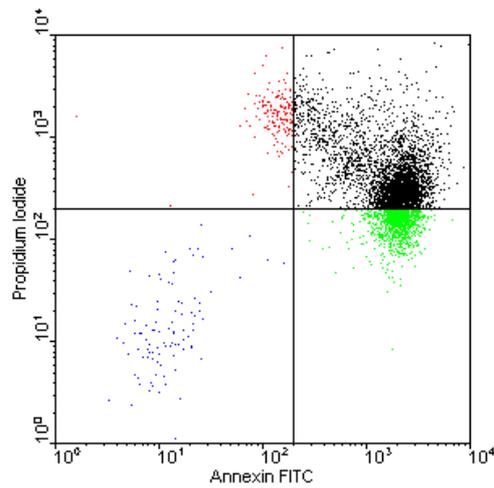


Abb. 68: Dotplot der U937-Zellen nach 20-stündiger Exposition mit 20 mg Cremophor[®] EL pro ml und Annexin-V-Propidiumiodid-Färbung

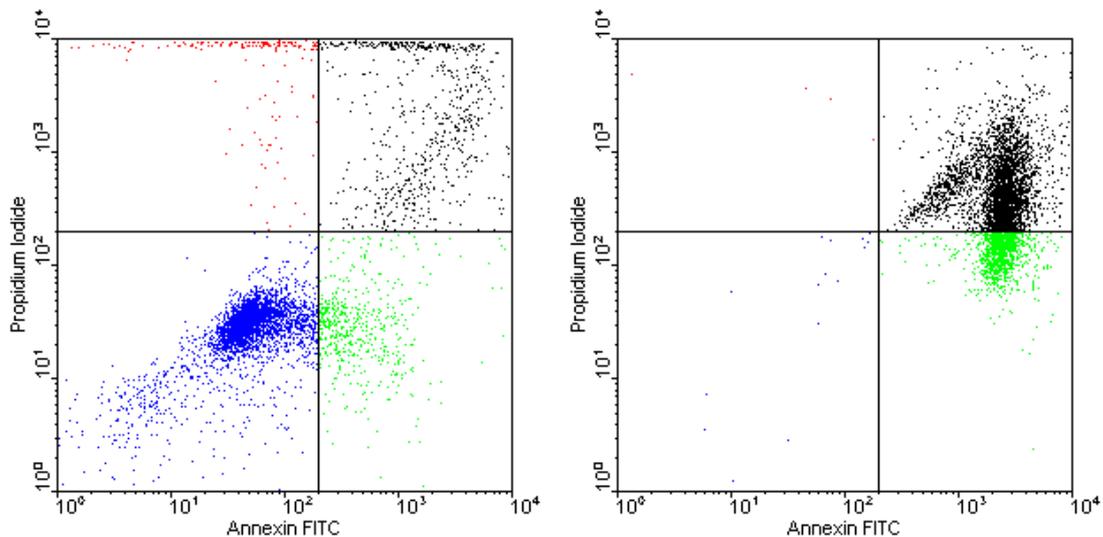


Abb. 69: Dotplot der U937-Zellen nach Exposition mit 5 mg Cremophor[®] EL pro ml und Annexin-V-Propidiumiodid-Färbung (links 4 Stunden, rechts 20 Stunden Exposition)

4. Ergebnisse

In der Tabelle 19 sind die Ergebnisse der Annexin-V-Propidiumiodid-Färbung zusammengefasst. Eine erhöhte Anzahl frühapoptotischer Zellen ist fett gedruckt.

Tabelle 19: Prozentuale Verteilung der U937-Zellen auf die festgelegten Quadranten des Dotplots nach Exposition mit Cremophor® EL im Vergleich zur Zellkontrolle b

| Exposition | 4 h | | 20 h | | 44 h | |
|------------------------------|---------------------------------|------|-------------|------|-------------|------|
| Konzentration | 1,25 mg/ml Cremophor® EL | | | | | |
| U937-Zellen [%] | | | | ZK b | | ZK b |
| primär nekrotisch | | | 0,44 | 0,24 | 0,26 | 0,58 |
| nekrotisch / spätapoptotisch | | | 91,9 | 7,14 | 58,6 | 9,08 |
| frühapoptotisch | | | 4,56 | 2,68 | 37,7 | 10,4 |
| unverändert | | | 3,06 | 89,9 | 3,38 | 80,2 |
| Konzentration | 5 mg/ml Cremophor® EL | | | | | |
| U937-Zellen [%] | | ZK b | | ZK b | | |
| primär nekrotisch | 3,48 | 1,42 | 0,10 | 0,24 | | |
| nekrotisch / spätapoptotisch | 13,2 | 8,78 | 75,5 | 7,14 | | |
| frühapoptotisch | 10,9 | 5,30 | 24,1 | 2,68 | | |
| unverändert | 72,4 | 84,5 | 0,30 | 89,9 | | |
| Konzentration | 20 mg/ml Cremophor® EL | | | | | |
| U937-Zellen [%] | | ZK b | | ZK b | | |
| primär nekrotisch | 7,70 | 0,28 | 3,34 | 0,24 | | |
| nekrotisch / spätapoptotisch | 26,2 | 14,7 | 73,6 | 7,14 | | |
| frühapoptotisch | 9,12 | 11,5 | 21,1 | 2,68 | | |
| unverändert | 57,0 | 73,5 | 2,02 | 89,9 | | |

Apoptose findet bei Cremophor® EL vor allem nach längerer Exposition, nach 20 Stunden, statt. Diese Ergebnisse stimmen mit denen des Zytotoxizitätstest mit EZ4U überein, bei dem auch eine sehr starke Zunahme der Zytotoxizität mit der Expositionszeit nachgewiesen wurde.

Es wurden die Konzentrationen 1,25 und 5 mg/ml Cremophor® EL ausgewählt, um die Wirkung der einzelnen Fraktionen auf die U937-Zellen zu untersuchen. In diesen Konzentrationen ist bei unfraktioniertem Cremophor® EL nur Apoptose, jedoch keine Nekrose beobachtet worden. Die Fraktionen des Cremophor® EL wurden in Konzentrationen getestet, die ihrem Anteil am Gesamtgemisch entsprachen. Von der Aqua-Fraktion wurden 30% und von der Methanol-Fraktion jeweils 70% der Konzentration des unfraktionierten Cremophor® EL untersucht.

4. Ergebnisse

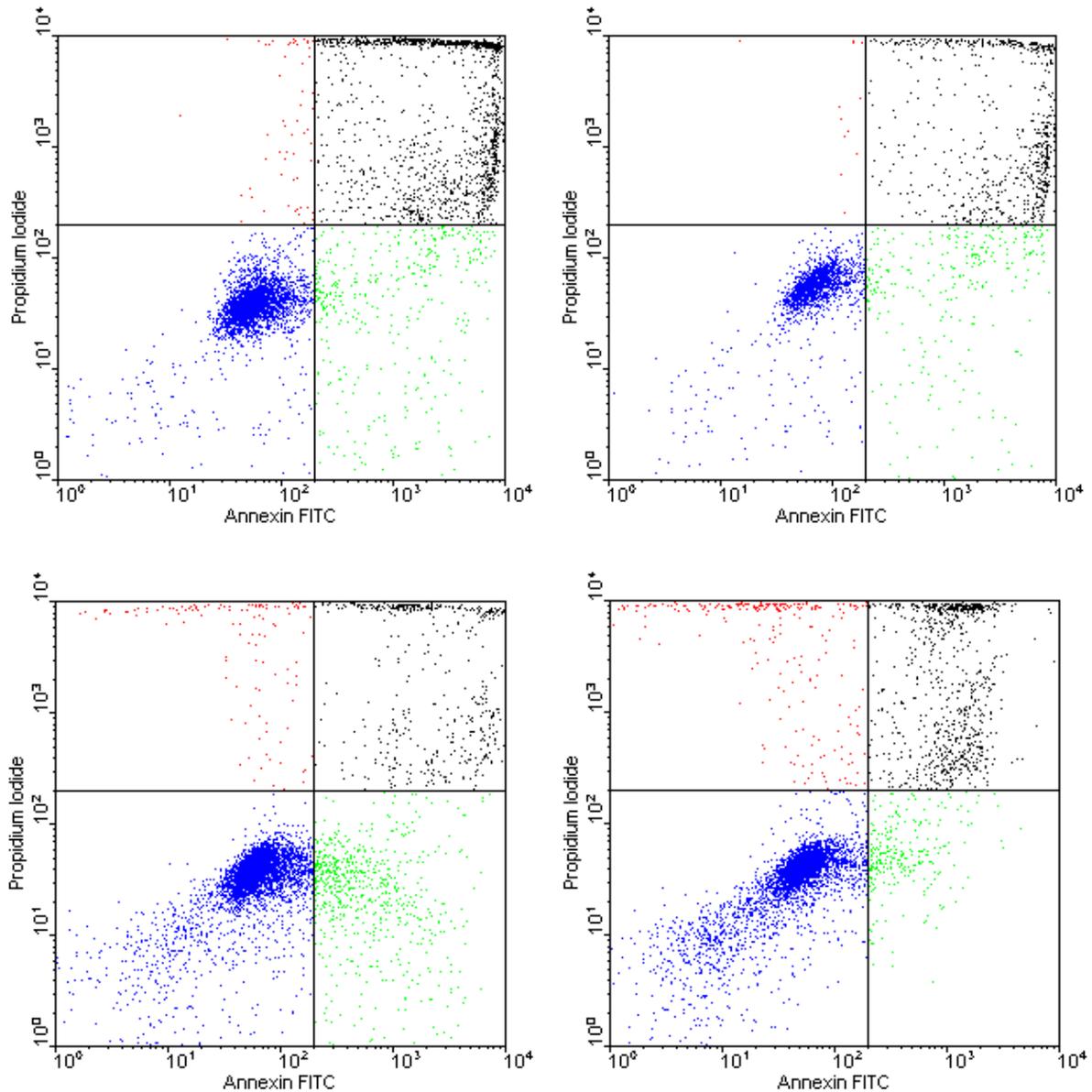


Abb. 70: Dotplot der U937-Zellen nach 4-stündiger Exposition mit den Fraktionen des Cremophor[®] EL (oben Aqua-Fraktion: links 0,375, rechts 1,5 mg/ml; unten Methanol-Fraktion: links 0,875, rechts 3,5 mg/ml)

Beide Fraktionen des Cremophor[®] EL verursachen Apoptose. Bei 4-stündiger Exposition sind für beide Fraktionen bereits frühapoptotische Zellen nachweisbar gewesen, was bei unfraktioniertem Cremophor[®] EL nicht der Fall war. Erst nach 20-stündiger Exposition entstanden durch das Gesamtgemisch eine höhere Anzahl apoptotischer Zellen (Tab. 19 und 20).

Wie aus der Abbildung 70 deutlich wird, wurde nach 4-stündiger Exposition mit beiden Fraktionen, wie auch bei unfraktioniertem Cremophor[®] EL, die Zellpopulation in sehr unterschiedlichem Ausmaß angefärbt, sodass sie wie zerstoßen wirkt. Es entstanden durch beide Fraktionen vermehrt sowohl früh- als auch spätapoptotische Zellen, die sich in den beiden rechten Quadranten des Dotplots befinden.

4. Ergebnisse

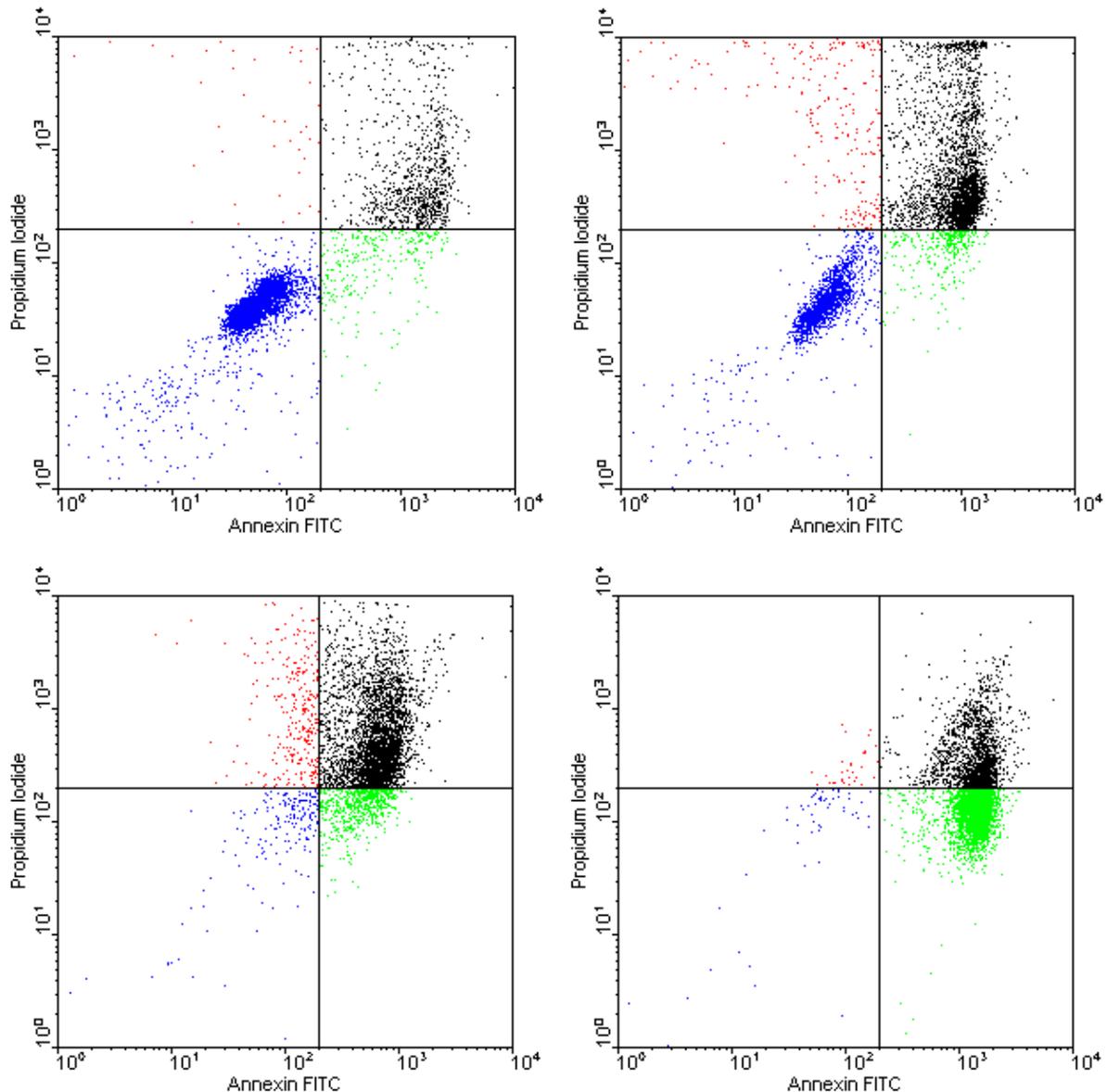


Abb. 71: Dotplot der U937-Zellen nach 20-stündiger Exposition mit den Fraktionen des Cremophor[®] EL (oben Aqua-Fraktion: links 0,375, rechts 1,5 mg/ml; unten Methanol-Fraktion: links 0,875, rechts 3,5 mg/ml)

Nach 20-stündiger Exposition verhalten sich die beiden Fraktionen ebenfalls wie das unfraktionierte Cremophor[®] EL. Die neuentstandene Zellpopulation ist kompakter als nach 4-stündiger Exposition und enthält früh- und spätapoptotische Zellen. Bei beiden untersuchten Konzentrationen umfasst diese Zellpopulation jedoch wesentlich weniger Zellen nach Exposition mit der Aqua-Fraktion. Das bestätigt die im Zytotoxizitätstest und im AART ermittelte verringerte Toxizität der Aqua-Fraktion gegenüber der Methanol-Fraktion.

Tabelle 20 fasst die Ergebnisse der Untersuchungen der Cremophor[®] EL-Fraktionen zusammen. Eine erhöhte Anzahl frühapoptotischer Zellen ist fettgedruckt.

4. Ergebnisse

Tabelle 20: Prozentuale Verteilung der U937-Zellen auf die festgelegten Quadranten des Dotplots nach Exposition mit Cremophor® EL-Fractionen

| Konzentration [mg/ml] | Aqua-Fraktion (0,375) | | Methanol-Fraktion (0,875) | |
|------------------------------|------------------------------|------|----------------------------------|------|
| Exposition | 4 h | | | |
| U937-Zellen [%] | | ZK b | | ZK b |
| primär nekrotisch | 1,14 | 1,42 | 2,42 | 1,42 |
| nekrotisch / spätapoptotisch | 29,9 | 8,78 | 9,50 | 8,78 |
| frühapoptotisch | 8,40 | 5,30 | 13,4 | 5,30 |
| unverändert | 60,5 | 84,5 | 74,7 | 84,5 |
| Exposition | 20 h | | | |
| U937-Zellen [%] | | ZK b | | ZK b |
| primär nekrotisch | 0,84 | 0,90 | 5,66 | 0,90 |
| nekrotisch / spätapoptotisch | 18,9 | 22,1 | 77,4 | 22,1 |
| frühapoptotisch | 5,4 | 10,5 | 13,2 | 10,5 |
| unverändert | 74,8 | 66,5 | 3,76 | 66,5 |
| Konzentration [mg/ml] | Aqua-Fraktion (1,5) | | Methanol-Fraktion (3,5) | |
| Exposition | 4 h | | | |
| U937-Zellen [%] | | ZK b | | ZK b |
| primär nekrotisch | 0,46 | 1,42 | 5,10 | 1,42 |
| nekrotisch / spätapoptotisch | 26,4 | 8,78 | 16,3 | 8,78 |
| frühapoptotisch | 11,3 | 5,30 | 5,62 | 5,30 |
| unverändert | 61,8 | 84,5 | 72,9 | 84,5 |
| Exposition | 20 h | | | |
| U937-Zellen [%] | | ZK b | | ZK b |
| primär nekrotisch | 4,88 | 0,90 | 0,40 | 0,90 |
| nekrotisch / spätapoptotisch | 55,2 | 22,1 | 41,9 | 22,1 |
| frühapoptotisch | 6,28 | 10,5 | 56,2 | 10,5 |
| unverändert | 33,6 | 66,5 | 1,20 | 66,5 |

Morphologische Veränderungen durch Cremophor® EL und seine zwei Fraktionen

HaCaT-Zellen

Folgende Veränderungen wurden an den HaCaT-Zellen nach der Exposition mit Cremophor® EL und seinen beiden Fraktionen festgestellt:

- Ablösen der Zellen von der Oberfläche
- Abrundung
- Schrumpfung

In den Abbildungen 72 und 73 sind HaCaT-Zellen nach 1- und 24-stündiger Exposition mit Cremophor® EL abgebildet. Bei 1-stündiger Exposition ist vor allem die Schrumpfung des Zytoplasmas zu beobachten, während die Zellmembran selbst eher anschwillt. Sie bleibt an der Plattenoberfläche haften. Bei 320 mg/ml löst sie sich auf. Bei 24-stündiger Exposition schrumpft die komplette Zelle. Sie ballt sich zusammen und erscheint kleiner und abgerundet. Die Zellmembran löst sich von der Oberfläche ab. Der Zellkern ist etwas segmentiert.

Die Abbildung 74 zeigt die Veränderungen der HaCaT-Zellen durch die Fraktionen des Cremophor® EL. Die Veränderungen durch die Methanol-Fraktion gleichen denen, die durch das Gesamtgemisch verursacht werden. Die Aqua-Fraktion bewirkt erst in höheren Konzentrationen morphologische Veränderungen an den HaCaT-Zellen. Diese unterscheiden sich jedoch von den durch die Methanol-Fraktion bzw. das Gesamtgemisch verursachten Zellveränderungen. Die Zellmembran erscheint, wie auch bei Triton® X-100 und anderen Tensiden beobachtet, als Blase, die den geschrumpften Zellkern enthält.

Zellyse wurde an den HaCaT-Zellen bei den untersuchten Konzentrationen des Cremophor® EL nicht beobachtet.

4. Ergebnisse

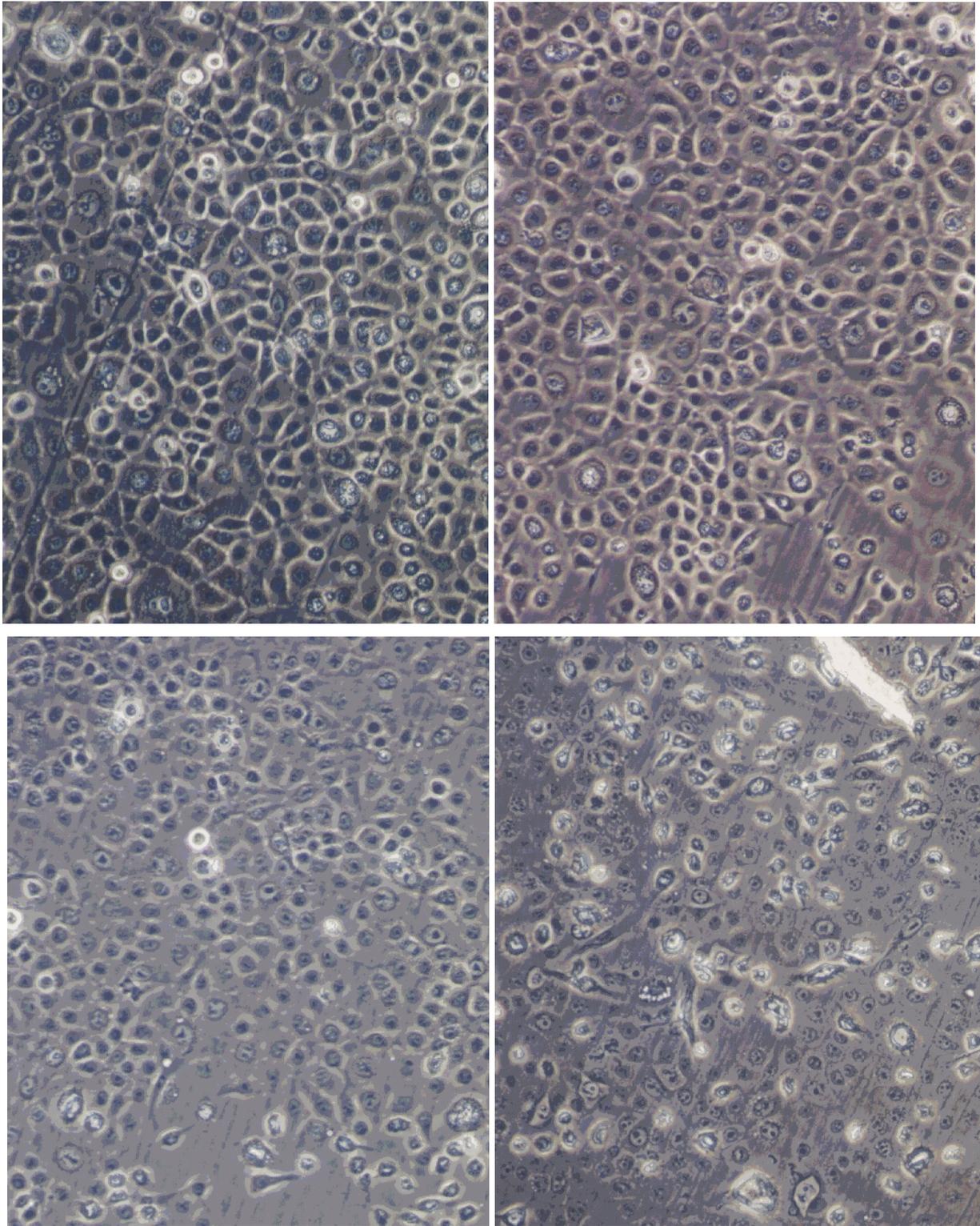


Abb. 72: HaCaT-Zellen nach 1-stündiger Exposition mit Cremophor[®] EL 160fach vergrößert (oben links 40 mg/ml; oben rechts 80 mg/ml; unten links 160 mg/ml; unten rechts 320 mg/ml)

4. Ergebnisse

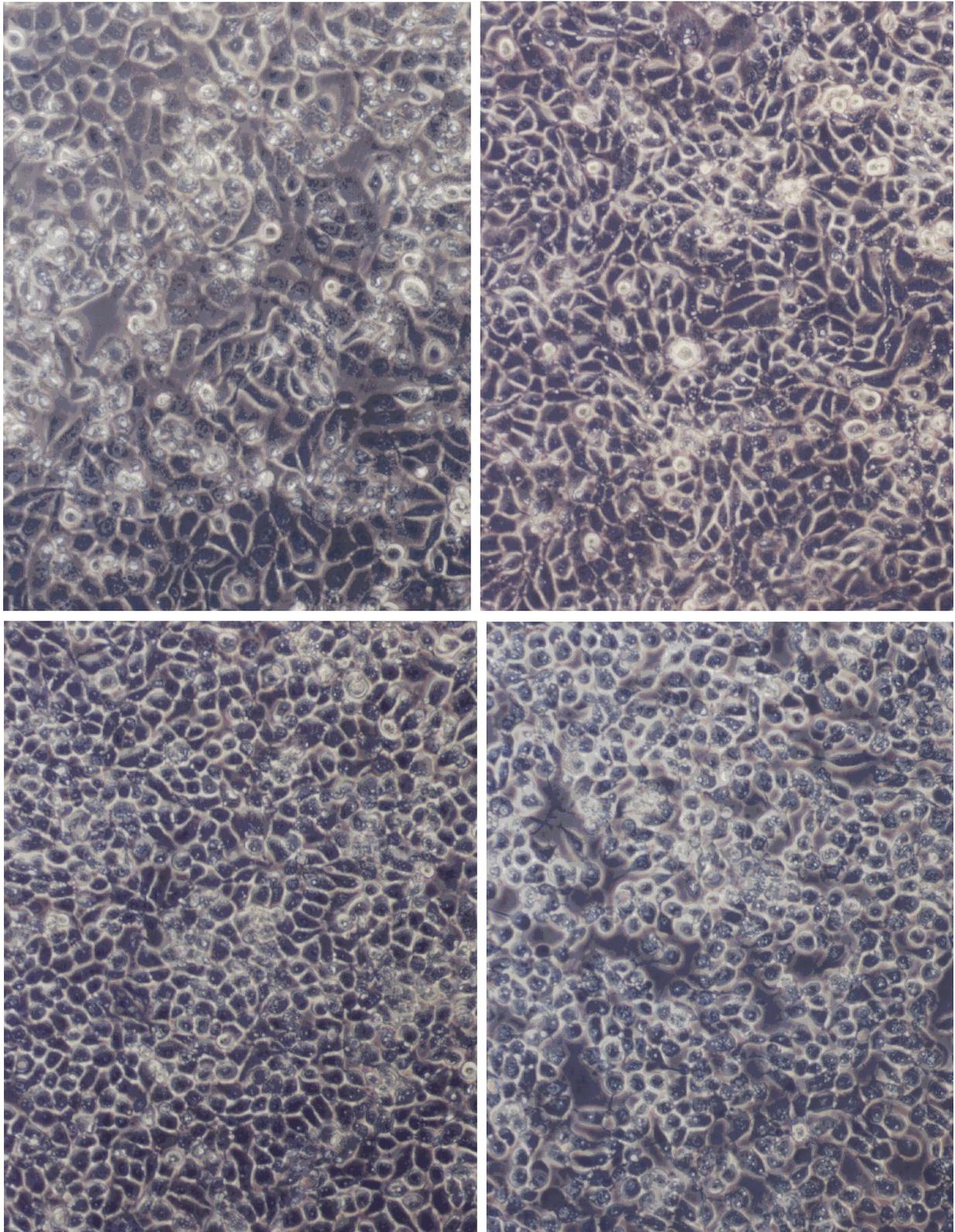


Abb. 73: HaCaT-Zellen nach 24-stündiger Exposition mit Cremophor® EL 160fach vergrößert (oben links 128 µg/ml; oben rechts 256 µg/ml; unten links 512 µg/ml; unten rechts 1024 µg/ml)

4. Ergebnisse

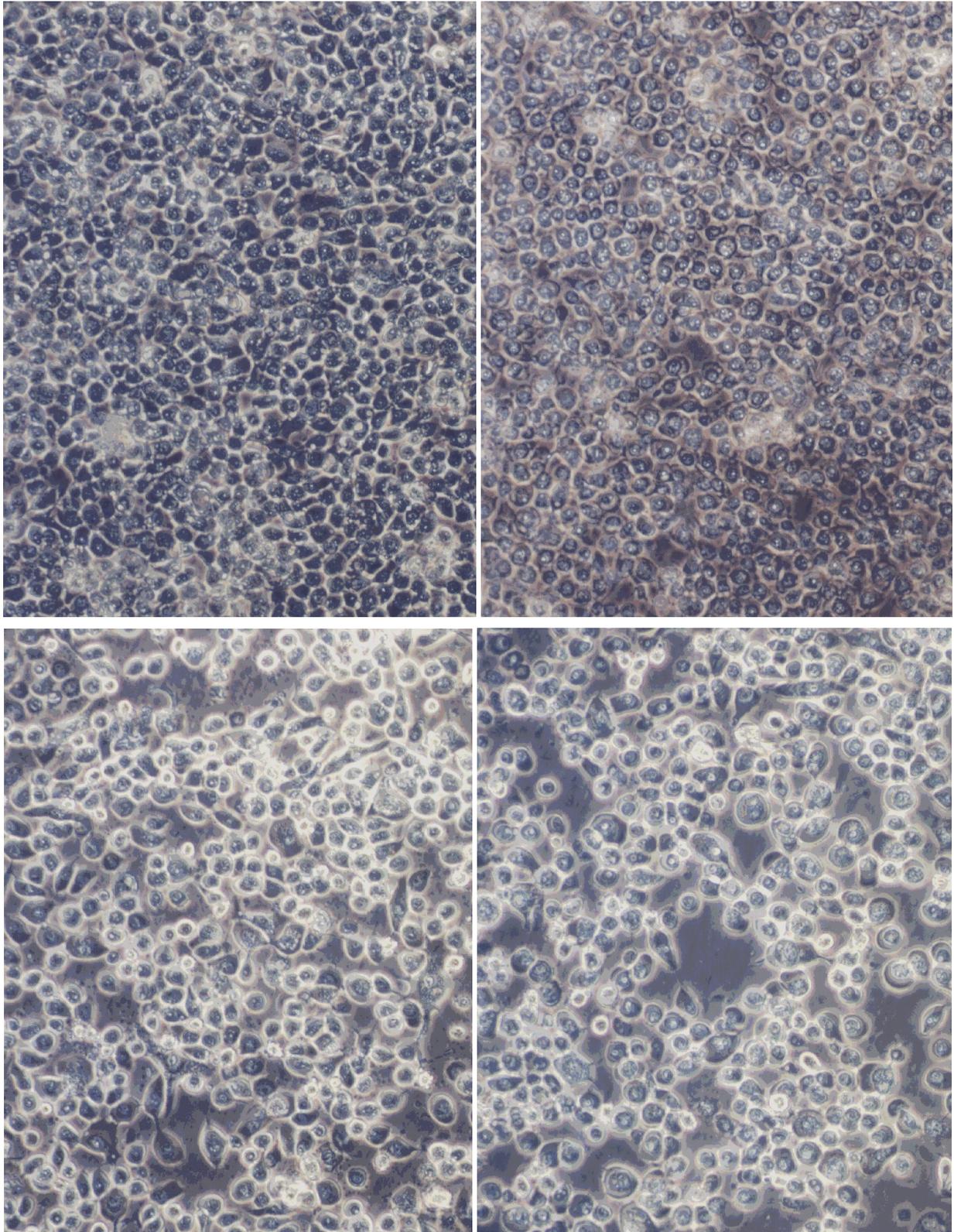


Abb. 74: HaCaT-Zellen nach 24-stündiger Exposition mit den Cremophor[®] EL-Fraktionen 160fach vergrößert (oben Methanol-Fraktion: links 512 µg/ml; rechts 1024 µg/ml; unten Aqua-Fraktion: links 2048 µg/ml; rechts 4096 µg/ml)

U937-Zellen

Nach 1-stündiger Exposition mit Cremophor[®] EL wurden folgende Veränderungen an den U937-Zellen registriert:

- Schrumpfung
- Zellen erscheinen kleiner, aber rund

Nach 24-stündiger Exposition waren an U937-Zellen folgende Veränderungen zu beobachten:

- Schrumpfung
- Lyse

Die Abbildungen 75 und 76 zeigen U937-Zellen nach 1- und 24-stündiger Exposition mit Cremophor[®] EL. Nach 1-stündiger Exposition erscheinen die Zellen in ihrer Form unverändert, jedoch bei 160 und 320 mg/ml stark verkleinert. Zelllyse ist nicht zu beobachten.

Im Gegensatz dazu sind nach 24 Stunden vermehrt Zellfragmente vorhanden. Bei 256 und 512 µg/ml sind deutlich zwei unterschiedliche Zellpopulationen zu erkennen. Eine umfasst unveränderte Zellen. Die andere Population enthält geschrumpfte Zellen, die typische Ausstülpungen der Zellmembran bilden, bei denen es sich wahrscheinlich um apoptotische Körperchen handelt. Bei 1024 µg/ml sind nur noch diese geschrumpften Zellen und Zellfragmente vorhanden. Die morphologischen Beobachtungen stimmen sehr gut mit denen der durchflusszytometrischen Untersuchungen überein. Hier waren nach 20-stündiger Exposition mit 1250 µg/ml 91% apoptotische Zellen vorhanden.

Die Abbildung 77 zeigt die Veränderungen der U937-Zellen durch die Fraktionen des Cremophor[®] EL. Die Veränderungen durch die Methanol-Fraktion und die Aqua-Fraktion gleichen denen, die durch das Gesamtgemisch verursacht werden. Die Aqua-Fraktion bewirkt jedoch erst in höheren Konzentrationen morphologische Veränderungen.

4. Ergebnisse

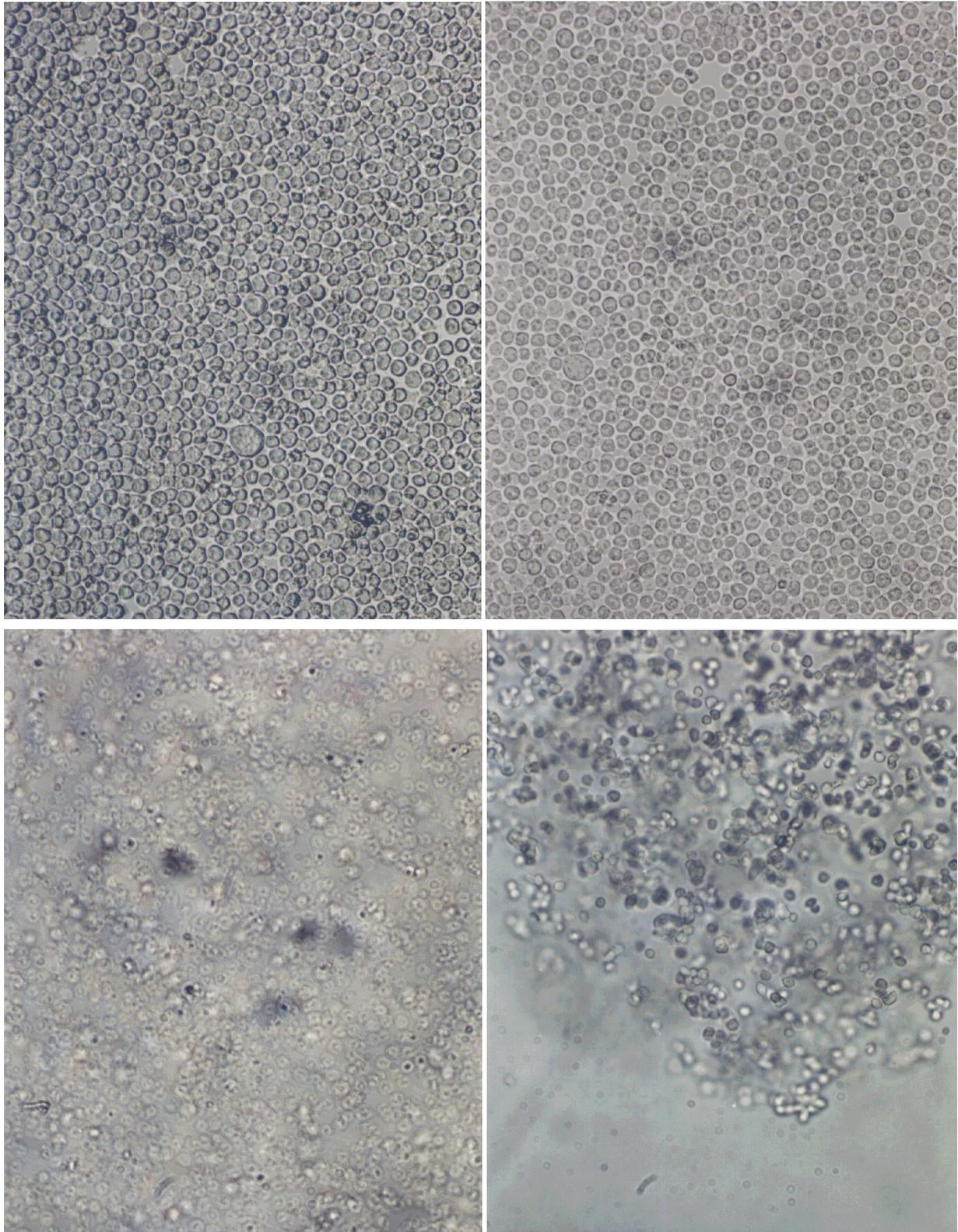


Abb. 75: U937-Zellen nach 1-stündiger Exposition mit Cremophor® EL 160fach vergrößert (oben links 40 mg/ml; oben rechts 80 mg/ml; unten links 160 mg/ml; unten rechts 320 mg/ml)

4. Ergebnisse

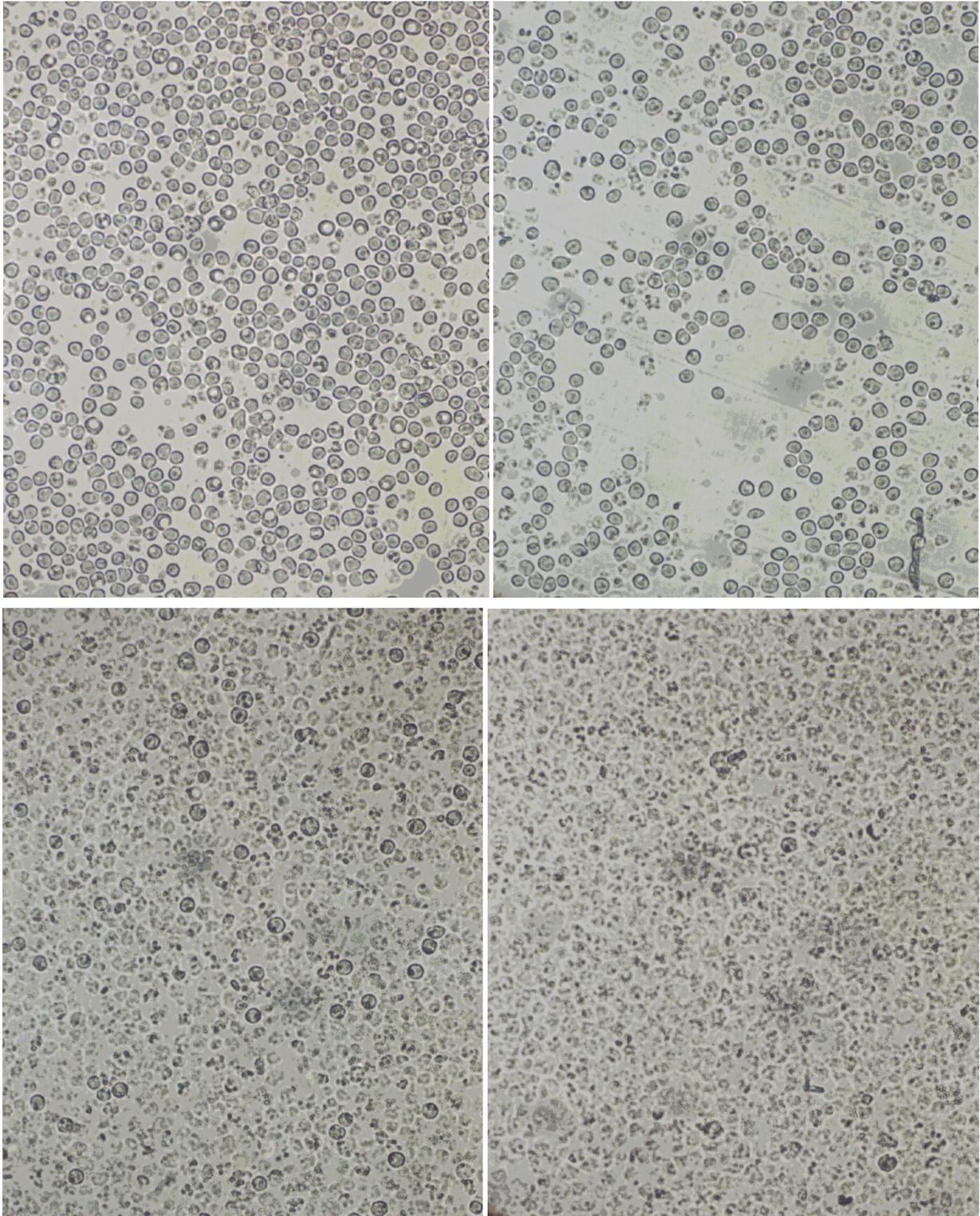


Abb. 76: U937-Zellen nach 24-stündiger Exposition mit Cremophor[®] EL 160fach vergrößert (oben links 128 µg/ml; oben rechts 256 µg/ml; unten links 512 µg/ml; unten rechts 1024 µg/ml)

4. Ergebnisse

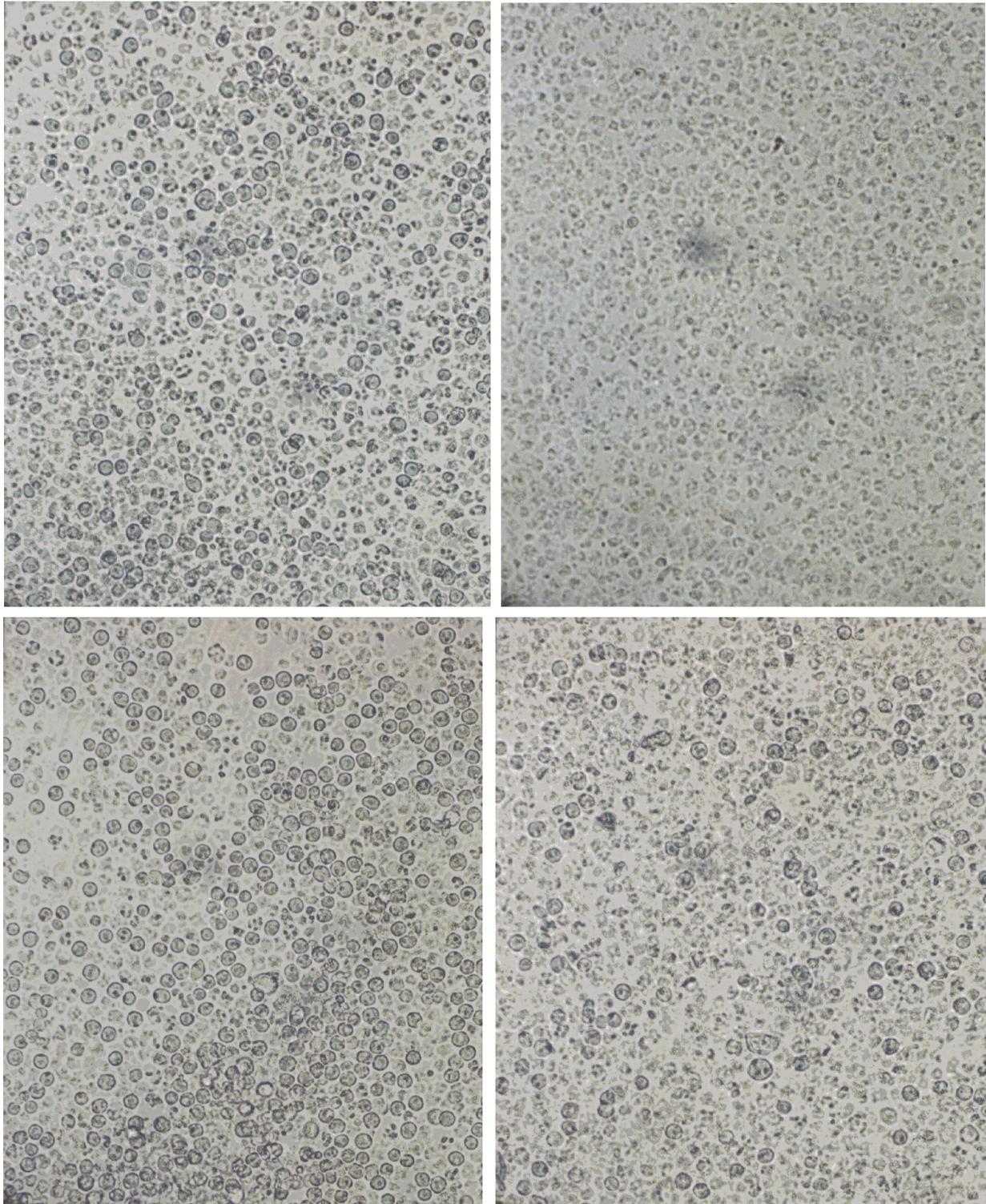


Abb. 77: U937-Zellen nach 24-stündiger Exposition mit den Cremophor[®] EL-Fraktionen 160fach vergrößert (oben Methanol-Fraktion: links 256 µg/ml; rechts 1024 µg/ml; unten Aqua-Fraktion: links 1024 µg/ml; rechts 2048 µg/ml)

4.1.5. Poloxamer[®] 188

Poloxamer[®] 188, das im DAC 97 offizinell ist, stellt ein Polyethylenglykol-Polypropylenglykol-Blockpolymer dar. Es handelt sich um ein Gemisch von Polymeren, dass durch Ethoxylierung von Polypropylenglykol mit einem durchschnittlichen Molekulargewicht von 1800 gewonnen wird. Der Polyethylenglycolanteil beträgt 81%, der Anteil an Polypropylenglykol 19%. Die relative Molekülmasse liegt zwischen 7500 und 10200 im Durchschnitt bei 8600.

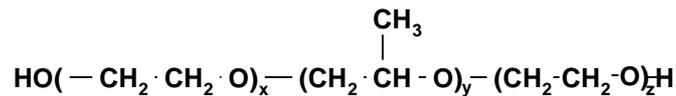


Abb. 78: Strukturformel von Poloxamer[®] 188

Poloxamer[®] 188 ist hygroskopisch und leicht wasserlöslich, der pH-Wert liegt zwischen 6,0 und 7,5 und der HLB-Wert beträgt 29.

Der nichtionogene Emulgator Poloxamer[®] 188 wird unter anderem zur Lösungsvermittlung hydrophober Stoffe und zur Stabilisierung von Suspensionen verwendet. Er ist für orale, topische und parenterale Arzneiformen geeignet. Poloxamer[®] 188 wird auch zur Verbesserung der Bioverfügbarkeit von flüssigen Zubereitungen eingesetzt.

Laut ABDA-Datenbank enthalten über 40 Fertigarzneimittel, vor allem Tabletten, Kapseln, Salben, Suspensionen und Gele, Poloxamer[®] 188. Es ist z.B. Bestandteil von Benzaknen[®] Gel, Roxigrün[®] Filmtabletten, Lariam[®] Tabletten und Aprove[®] Tabletten [1, 2, 20].

| |
|--|
| Zytotoxizität von Poloxamer[®] 188 |
|--|

Ergebnisse von Poloxamer[®] 188 im Zytotoxizitätstest mit EZ4U an HaCaT-Zellen und an U937-Zellen sind in der Abbildung 79 dargestellt.

Die durch Poloxamer[®]188 verursachte Zytotoxizität ist sehr gering, sie nimmt jedoch wie bei den anderen getesteten Tensiden mit der Expositionszeit zu. Nach 1-stündiger Exposition ist die Zytotoxizität bei Konzentrationen unterhalb 40 mg/ml nicht größer als 10%. Mehr als 10 mg/ml sind nötig um nach 24 Stunden eine Zytotoxizität (> 10%) festzustellen. Die Zunahme der Zytotoxizität von Poloxamer[®] 188 mit der Expositionszeit ist an U937-Zellen 4fach und an HaCaT-Zellen 3fach. In Gegensatz dazu war Cremophor[®] EL, obwohl nach 1 Stunde ebenso gering toxisch wie Poloxamer[®] 188, nach 24 Stunden 50 bis 1000 mal zytotoxischer. Bei 1-stündiger Exposition von HaCaT-Zellen waren etwas höhere Konzentrationen (>80 mg/ml) nötig um eine Zytotoxizität zu verursachen als bei U937-Zellen (>50 mg/ml). Oberhalb von 50% Zytotoxizität gleichen sich die Unterschiede in der Empfindlichkeit der beiden Zellarten jedoch aus. Bei 24-stündiger Exposition schneiden sich die Konzentrations-

4. Ergebnisse

Wirkungs-Kurven bei 20 mg/ml. Diese Konzentration verursachte an beiden Zelllinien eine Zytotoxizität von ca. 25%. Oberhalb dieser Konzentration sind die HaCaT-Zellen gegenüber Poloxamer®188 deutlich weniger empfindlich als die U937-Zellen.

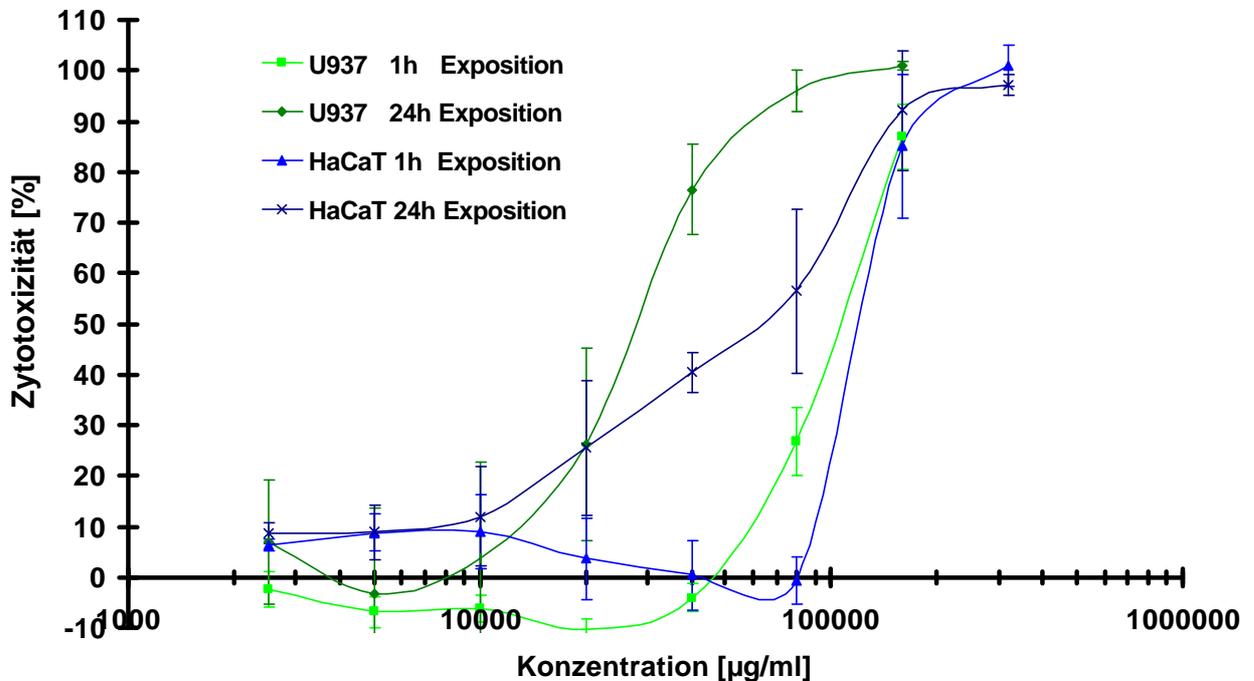


Abb. 79: Zytotoxizität von Poloxamer® 188 an U937-Zellen (n = 13) und HaCaT-Zellen (n = 15) nach 1 und 24 Stunden Exposition

In der Tabelle 21 sind die CC_{50} -Werte von Poloxamer® 188 nach 1 und 24 Stunden Exposition dargestellt.

Tabelle 21: Halbmaximale zytotoxische Konzentration (CC_{50}) von Poloxamer® 188 an HaCaT- und U937-Zellen

| Exposition | U937-Zellen [mg/ml] | HaCaT-Zellen [mg/ml] |
|------------|---------------------|----------------------|
| 1h | 98,4 (91,2-106) | 131 (117-148) |
| 24h | 26,1 (18,1-37,5) | 44,2 (33,9-57,7) |

Membrantoxizität von Poloxamer® 188

In der Abbildung 80 ist die durch Poloxamer® 188 ausgelöste Arachidonsäure-Freisetzung dargestellt.

4. Ergebnisse

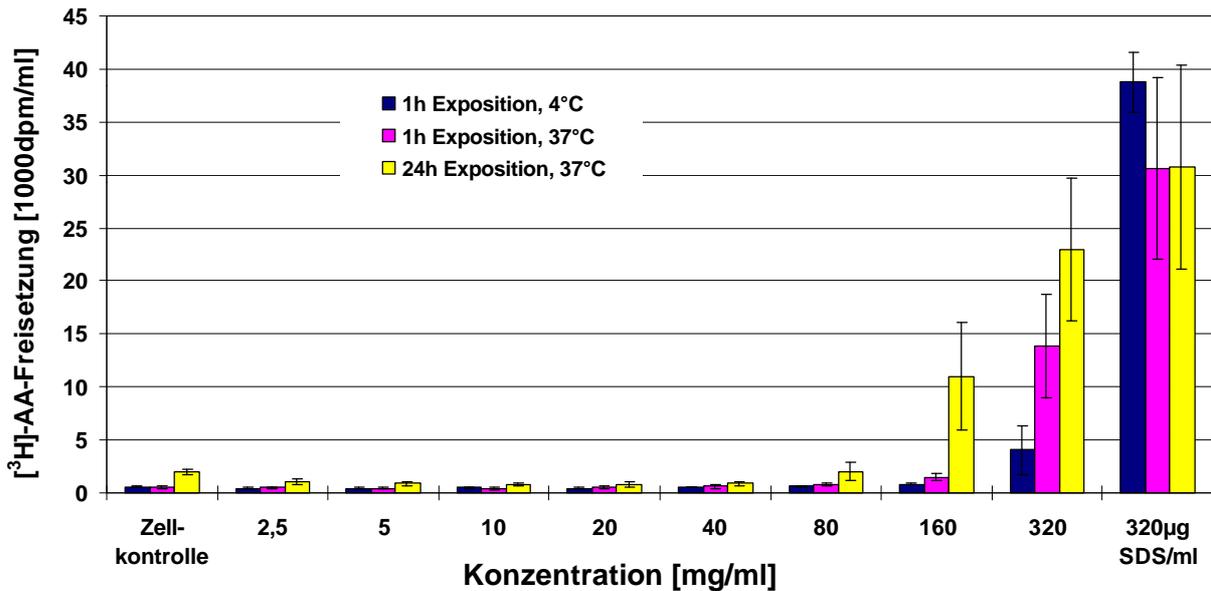


Abb. 80: [³H]Arachidonsäure-Freisetzung durch Poloxamer[®] 188 an U937-Zellen nach 1 und 24 Stunden Exposition bei 4°C (n = 9) und 37°C (n = 12)

Die maximale Arachidonsäure-Freisetzung im Vergleich zur Positivkontrolle wird durch Poloxamer[®] 188 nicht erreicht. Nach 24-stündiger Inkubation der U937-Zellen mit 320 mg/ml sind erst 70% der maximal freizusetzenden [³H]Arachidonsäure erreicht. Nach 1-stündiger Exposition mit dieser Konzentration Poloxamer[®] 188 wurden bei 37°C 50%, bei 4°C nur 10% der Positivkontrolle freigesetzt. Die MTK-Werte von Poloxamer[®] 188 und die entsprechende Zytotoxizität bei der MTK sind in der Tabelle 22 aufgeführt. Während sich die MTK-Werte bei 37°C nach 1 und 24 Stunden nur wenig unterscheiden, ist bei geringer Temperatur (4°C) eine wesentlich höhere MTK ermittelt worden.

Tabelle 22: Minimal toxische Konzentration (MTK) und Zytotoxizität bei der MTK von Poloxamer[®] 188

| Exposition | MTK [mg/ml] | Zytotoxizität [%] |
|------------|-------------|-------------------|
| 1h, 37°C | 59,6 | 17,2 |
| 1h, 4°C) | 80,7 | - |
| 24h, 37°C | 50,5 | 77,6 |

Wie bei Triton[®] X-100 und anderen Tensiden ist auch bei Poloxamer[®] 188 in den Konzentrationsbereichen der MTK sowohl nach 1 Stunde als auch nach 24 Stunden eine deutliche Zytotoxizität festzustellen.

4. Ergebnisse

Da sowohl beim Zytotoxizitätstest als auch im AART nur eine sehr geringe Toxizität durch Poloxamer® 188 festgestellt wurde, ist es nicht auf Apoptose hin untersucht worden.

Morphologische Veränderungen durch Poloxamer® 188

HaCaT-Zellen

An den HaCaT-Zellen wurden nach Exposition mit Poloxamer® 188 folgende Veränderungen festgestellt:

- Ablösen der Zellen von der Oberfläche
- Abrundung
- Schrumpfung

Die Abbildungen 81 und 82 zeigen HaCaT-Zellen nach 1- und 24-stündiger Exposition mit Poloxamer® 188. Nach 1-stündiger Exposition mit 80 bis 320 mg/ml löst sich die Zellmembran auf, sodass die Zellen ineinander zu fließen scheinen. Nach 24-stündiger Exposition sind die Veränderungen an den Zellen deutlicher zu erkennen. Hier ist neben dem Ablösen der Zellen von der Oberfläche vor allem eine Schrumpfung des Zellkerns zu beobachten. Der Zellkern ist deutlich segmentiert. Die Zellmembran erscheint, wie auch bei anderen Tensiden beobachtet, als Blase, die den Zellkern enthält. Bei höheren Konzentrationen (160 und 320 mg/ml) schrumpfen die HaCaT-Zellen jedoch und lösen sich teilweise auf. Das Zytotplasma scheint sich zu zersetzen.

U937-Zellen

Nach Exposition von U937-Zellen mit Poloxamer® 188 wurden folgende Veränderungen beobachtet:

- Schrumpfung
- Zellen erscheinen kleiner aber rund

U937-Zellen nach 1- und 24-stündiger Exposition mit Poloxamer® 188 sind in der Abbildung 83 dargestellt. An den U937-Zellen werden die morphologischen Veränderungen erst in den höheren Konzentrationen sichtbar. Bei 1-stündiger Exposition mit 160 mg/ml und bei 24-stündiger Exposition mit 20 mg/ml sind noch keine Zellveränderungen gegenüber unbehandelten U937-Zellen zu erkennen, obwohl bei diesen Expositionsbedingungen deutliche Zytotoxizität nachgewiesen werden konnte. Bei höheren Konzentrationen erscheinen die Zellen in ihrer Form unverändert, jedoch stark verkleinert. Ähnliche Veränderungen wurden auch nach 1-stündiger Exposition von U937-Zellen mit Cremophor® EL beobachtet.

4. Ergebnisse

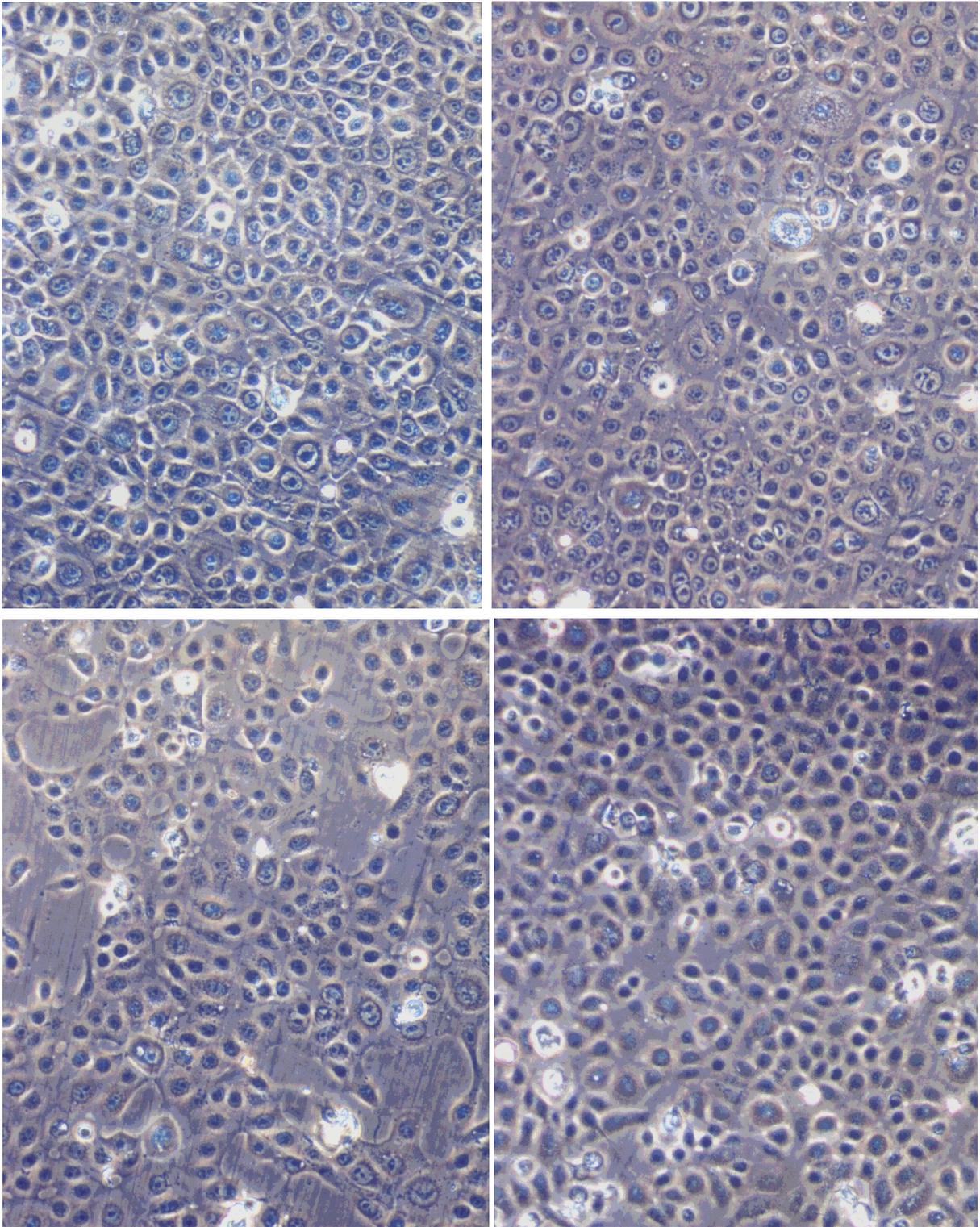


Abb. 81: HaCaT-Zellen nach 1-stündiger Exposition mit Poloxamer® 188 160fach vergrößert (oben links 40 mg/ml; oben rechts 80 mg/ml; unten links 160 mg/ml; unten rechts 320 mg/ml)

4. Ergebnisse

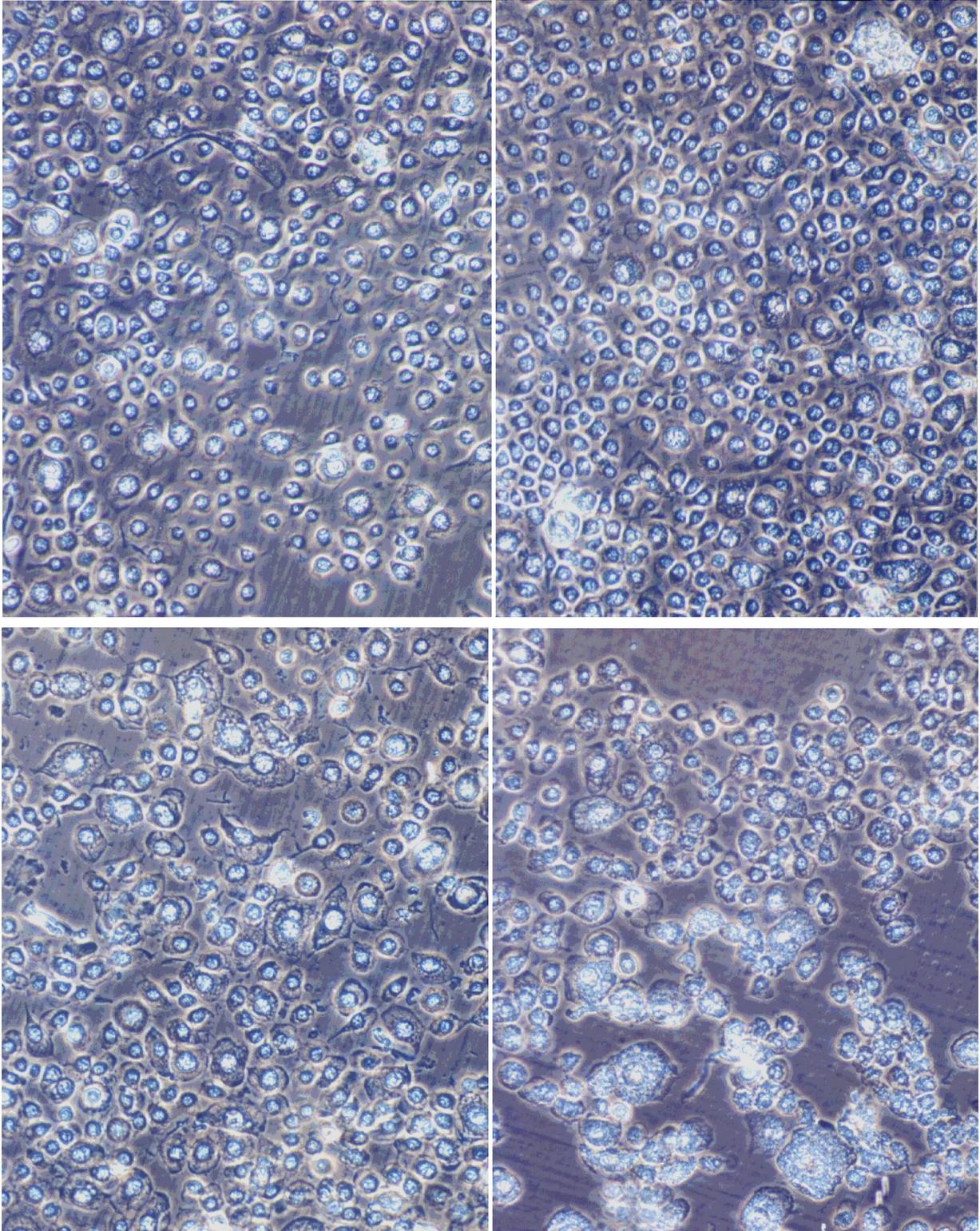


Abb. 82: HaCaT-Zellen nach 24-stündiger Exposition mit Poloxamer® 188 160fach vergrößert (oben links 40 mg/ml; oben rechts 80 mg/ml; unten links 160 mg/ml; unten rechts 320 mg/ml)

4. Ergebnisse

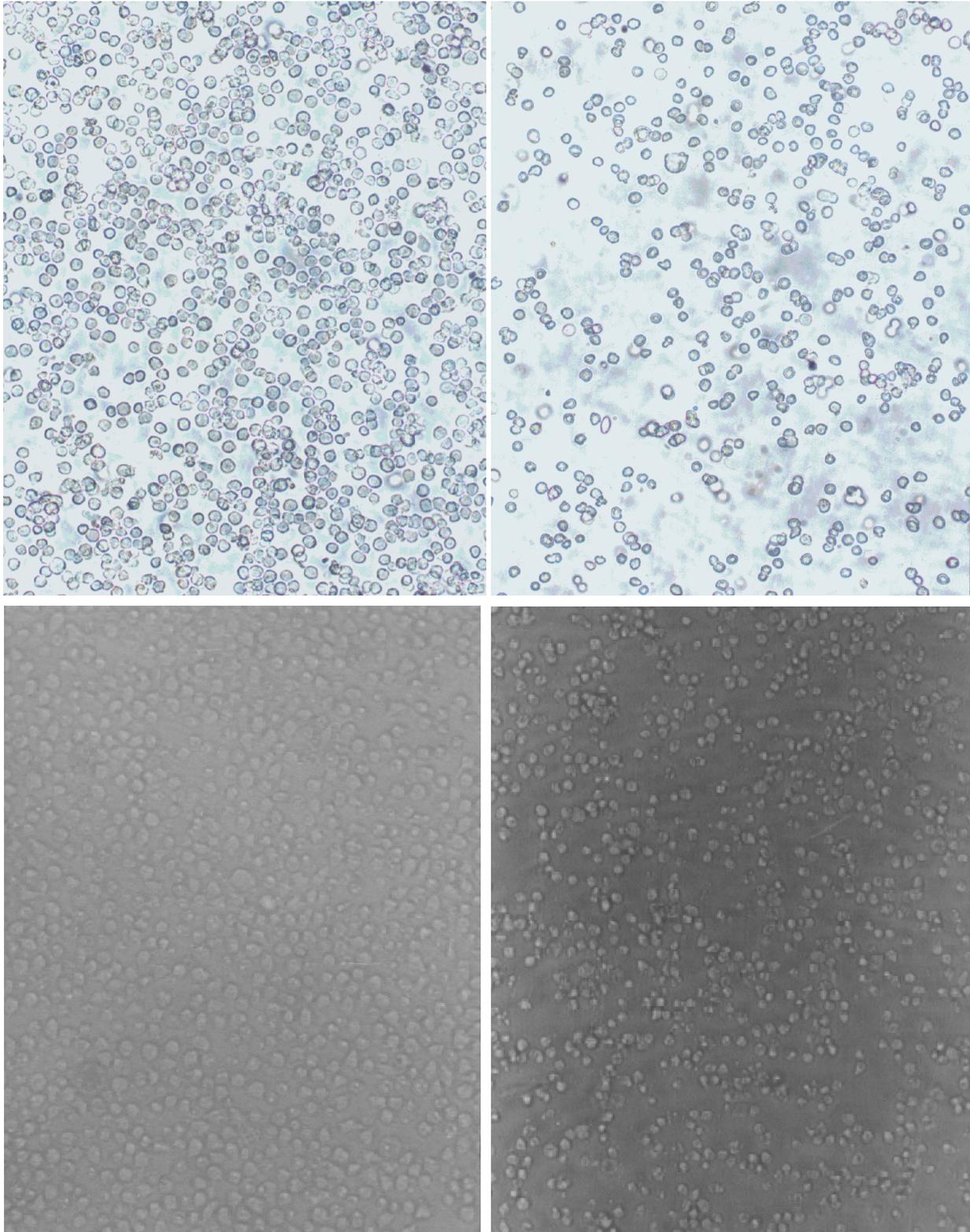


Abb. 83: U937-Zellen nach Exposition mit Poloxamer® 188 (oben nach 1 Stunde 160fach vergrößert: links 160 mg/ml; rechts 320 mg/ml; unten nach 24 Stunden 180fach vergrößert: links 20 mg/ml; rechts 80 mg/ml)

4.1.6. Macrogol 6000

Macrogol 6000, auch Polyethylenglykol 6000 oder Polyoxyethylen 6000 genannt, ist kein Tensid oder Emulgator. Es wurde ergänzend auf seine Zytotoxizität an U937-Zellen untersucht, da die untersuchten nichtionischen Tenside als Derivate des Macrogols aufgefasst werden können. Macrogole mit unterschiedlichem Molekulargewicht sind in der Ph. Eur. 97 offizinell und werden z.B. als Salbengrundlage oder Suppositorienmasse verwendet. Flüssige Macrogole können auch als Lösungsmittel verwendet werden. Es handelt sich bei Macrogolen um Gemische von Polymeren, die sehr leicht wasserlöslich sind. Ihre Darstellung erfolgt durch Polymerisation des Ethylenoxids. Das untersuchte Macrogol 6000 ist fest und hat ein relatives Molekulargewicht von ca. 6000-7500.

Die ermittelte Zytotoxizität ist sehr gering. In der Tabelle 23 sind die CC_{50} -Werte nach 1- und 24-stündiger Exposition aufgeführt.

Tabelle 23: Halbmaximale zytotoxische Konzentration (CC_{50}) von Macrogol 6000 an U937-Zellen

| Exposition | CC_{50} [mg/ml] |
|-------------------|-------------------------------------|
| 1h | 171 (155-190) |
| 24h | 90,9 (86,1-96,1) |

4.2. Anionische Tenside

4.2.1. Alkylsulfate

Durch Umsetzung von höheren Fettalkoholen mit Schwefelsäure entstehen Alkylsulfate, die als Natriumsalze vorliegen. Bei einer Kettenlänge von mehr als 8 C-Atomen sind sie oberflächenaktiv. Im Europäischen Arzneibuch sind Natriumdodecylsulfat und Natriumcetylstearylsulfat offizinell. Sie sind sehr wichtige Vertreter der anionischen Tenside, die eine große Rolle als Hilfsstoffe in der Kosmetik und Pharmazie spielen.

4.2.1.1. Natriumdodecylsulfat

Natriumdodecylsulfat ist auch unter Natriumlaurylsulfat und dem Handelsnamen Texapon® K12 bekannt. Es ist ein Gemisch von Natriumalkylsulfaten. Hauptbestandteil ist das Natriumsalz von Dodecylsulfat. Die Darstellung erfolgt durch Veresterung des Dodecylalkohols mit Schwefelsäure, Chlorsulfonsäure oder Schwefeltrioxid und nachfolgende Neutralisation. Der Dodecylalkohol seinerseits wird durch Hydrierung von Fetten oder synthetisch hergestellt. Durch die Sulfurierung entsteht eine sehr hydrophile Verbindung hoher Grenzflächenaktivität. Der HLB-Wert von Natriumdodecylsulfat ist mit 40 relativ hoch.

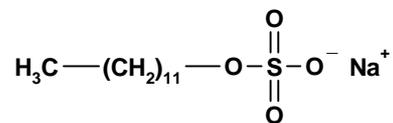


Abb. 84: Strukturformel von Natriumdodecylsulfat

Natriumdodecylsulfat ist leicht in Wasser löslich und ergibt eine neutrale Lösung. Das Molekulargewicht beträgt 288,4.

Da Natriumdodecylsulfat ein gutes Netz- und Schaummittel ist, wird es in großem Umfang mit unterschiedlicher Zweckbestimmung eingesetzt. Es ist unter anderem als Emulgator und waschaktive Substanz in Shampoos, Zahnpasten, Hautreinigungsmitteln, Hautcremes und anderen Kosmetika enthalten. In der Pharmazie ist es neben Cetyl- oder Cetylstearylalkohol ein Hauptbestandteil von Komplexemulgatoren, die zur Herstellung von hydrophilen Salben verwendet werden. So ist es auch in der im DAB offizinellen, wasserhaltigen hydrophilen Salbe enthalten. Natriumdodecylsulfat ist beständig gegen Säuren, Laugen und die meisten Elektrolyte [79, 109].

Die ABDA-Datenbank nennt 1260 Fertigarzneimittel, die Natriumdodecylsulfat als Hilfsstoff enthalten. Es handelt sich dabei um orale Arzneiformen wie Tabletten, Kapseln, Dragees oder Suspensionen sowie topisch anzuwendende Arzneiformen wie Gele, Salben oder Cremes. Es sind auch parenteral anzuwendende Fertigarzneimittel im Handel, die Natrium-

4. Ergebnisse

dodecylsulfat enthalten, z.B. Diabetosome[®] Ampullen und Membranosome[®] Ampullen von der Firma Vitorgan [1].

Die lokal irritierende Wirkung von Natriumdodecylsulfat ist seit längerer Zeit bekannt. Natriumdodecylsulfat wird aus diesem Grund auch als Standardirritans verwendet [74]. Die orale Toxizität von Natriumdodecylsulfat beträgt 1-2,7 g/kg (LD₅₀, Ratte) [79].

Zytotoxizität von Natriumdodecylsulfat

Die Abbildung 85 zeigt die Ergebnisse von Natriumdodecylsulfat im Zytotoxizitätstest mit EZ4U an HaCaT-Zellen und an U937-Zellen.

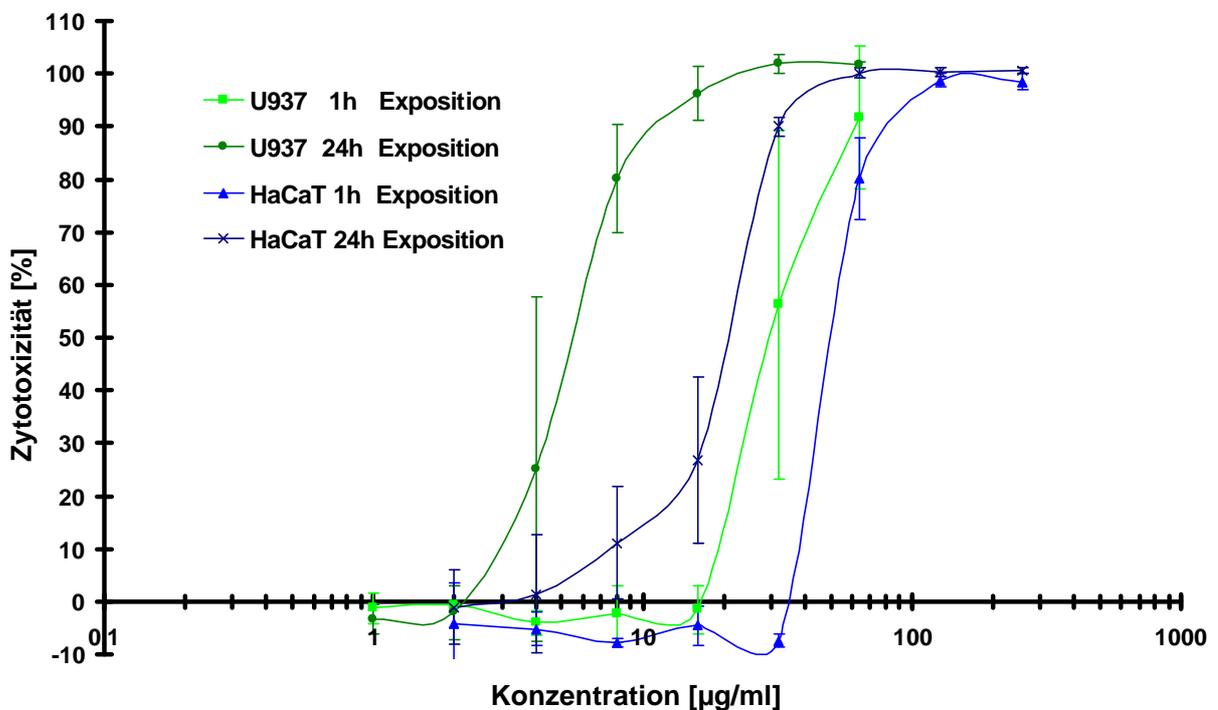


Abb. 85: Zytotoxizität von Natriumdodecylsulfat an U937-Zellen (n = 14) und HaCaT-Zellen (n = 14) nach 1 und 24 Stunden Exposition

Es ist eine deutliche Zunahme der Zytotoxizität mit der Zeit zu erkennen. Die Toxizität an U937-Zellen nimmt nach 24 Stunden im Vergleich zu 1 Stunde um das ca. 6fache, die Toxizität an HaCaT-Zellen um das ca. 3fache zu.

HaCaT-Zellen sind weniger empfindlich gegenüber Natriumdodecylsulfat als U937-Zellen. An U937-Zellen ist nach 24 Stunden ab einer Konzentration von 16 µg/ml mehr als 90% Zytotoxizität erreicht. An HaCaT-Zellen liegt die Zytotoxizität in dieser Konzentration nur bei ca. 30%. Erst ab 32 µg/ml wurden über 90% Zytotoxizität an HaCaT-Zellen bestimmt. Die CC₅₀ nach 24 Stunden ist für HaCaT-Zellen 3mal größer als für U937-Zellen (Tab. 24). Nach

4. Ergebnisse

1-stündiger Exposition sind diese Unterschiede zwischen den Zellarten noch nicht so deutlich zu erkennen. Natriumdodecylsulfat ist hier für U937-Zellen etwa doppelt so toxisch wie für HaCaT-Zellen.

In Konzentrationen unter 2 µg/ml war bei beiden Zellarten auch nach 24 Stunden noch keine Zytotoxizität zu beobachten. Tabelle 24 gibt die halbmaximale zytotoxische Konzentration von Natriumdodecylsulfat an HaCaT- und U937-Zellen nach 1- und 24-stündiger Exposition wieder.

Tabelle 24: Halbmaximale zytotoxische Konzentration (CC₅₀) von Natriumdodecylsulfat

| Exposition | U937-Zellen [µg/ml] | HaCaT-Zellen [µg/ml] |
|------------|---------------------|----------------------|
| 1h | 31,9 (23,2-44,0) | 56,4 (51,2-62,2) |
| 24h | 5,67 (4,06-7,92) | 17,9 (14,4-22,4) |

Membrantoxizität von Natriumdodecylsulfat

In Abbildung 86 ist die durch Natriumdodecylsulfat induzierte Arachidonsäure-Freisetzung dargestellt.

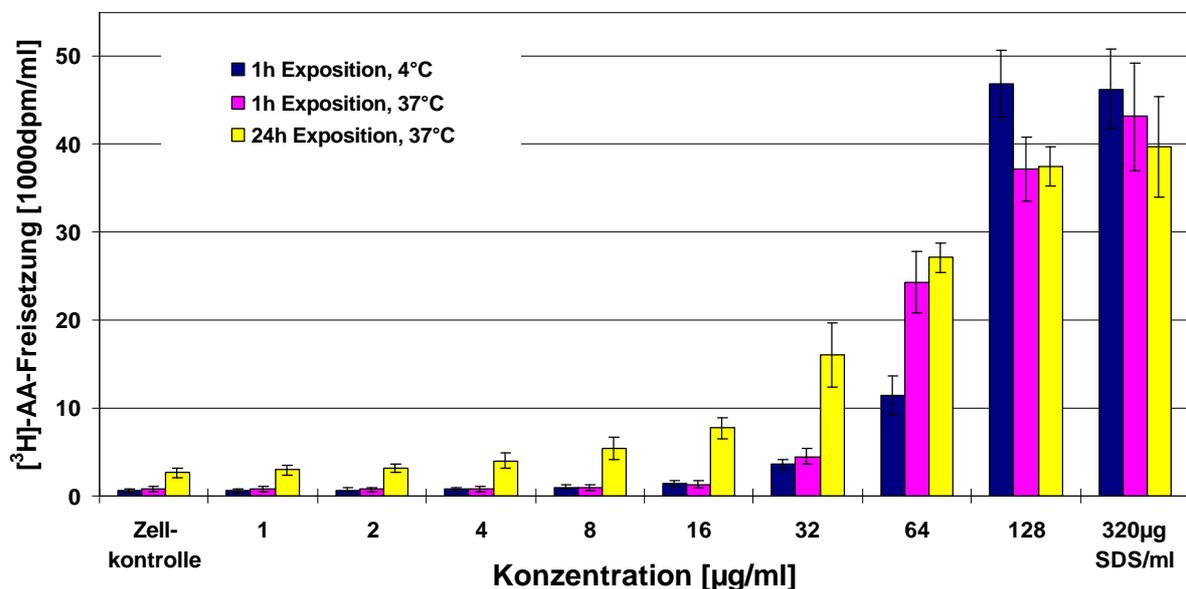


Abb. 86: [³H]Arachidonsäure-Freisetzung durch Natriumdodecylsulfat an U937-Zellen nach 1 und 24 Stunden Exposition bei 4°C (n = 9) und 37°C (n = 12)

Bereits bei 128 µg/ml wurden maximale Arachidonsäure-Konzentrationen, entsprechend der Positivkontrolle (2,5fache SDS-Konzentration), aus den U937-Zellen freigesetzt. Dies war bei allen Expositionsbedingungen der Fall.

4. Ergebnisse

Bei 64 µg/ml ist ein deutlicher Unterschied zwischen der Arachidonsäure-Freisetzung bei 4°C und der bei 37°C zu sehen. Bei 4°C werden nur ca. 25% der maximalen Arachidonsäure-Freisetzung erreicht, während bei 37°C über 50% der Arachidonsäure freigesetzt wurden. Der MTK-Wert nach 1-stündiger Exposition ist jedoch geringer bei 4°C als bei 37°C. Die MTK-Werte von Natriumdodecylsulfat und die entsprechende Zytotoxizität bei der MTK sind in Tabelle 25 dargestellt.

Tabelle 25: Minimal toxische Konzentration (MTK) und Zytotoxizität bei der MTK von Natriumdodecylsulfat

| Exposition | MTK [µg/ml] | Zytotoxizität [%] |
|------------|-------------|-------------------|
| 1h, 37°C | 6,76 | 0 |
| 1h, 4°C | 5,91 | - |
| 24h, 37°C | 1,65 | 0 |

Bei der MTK war an den Zellen nach 1 und 24 Stunden keine Zytotoxizität im EZ4U nachzuweisen.

Apoptose durch Natriumdodecylsulfat

Bestimmung Histon-assoziiierter DNA-Fragmente mit ELISA

Natriumdodecylsulfat wurde in Konzentrationen von 0,5 bis 64 µg/ml durch Bestimmung intrazellulärer Histon-assoziiierter DNA-Fragmente auf seine Apoptose-induzierenden Eigenschaften hin untersucht. Die Abbildung 87 gibt den Anreicherungsfaktor Histon-assoziiierter DNA-Fragmente in U937-Zellen nach 4- und 20-stündiger Exposition mit Natriumdodecylsulfat wieder.

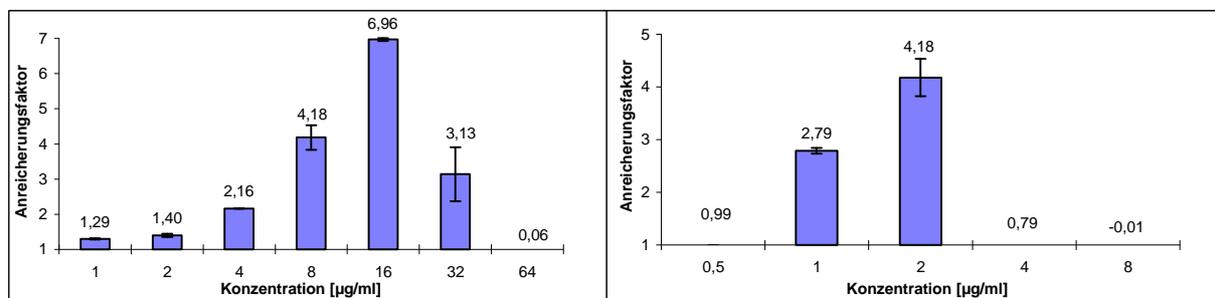


Abb. 87: Anreicherungsfaktor Histon-assoziiierter DNA-Fragmente in U937-Zellen nach 4-stündiger (links) und 20-stündiger (rechts) Exposition mit Natriumdodecylsulfat

4. Ergebnisse

Nach 4-stündiger Exposition mit Konzentrationen von 4 bis 32 μg Natriumdodecylsulfat pro ml konnte eine deutliche Erhöhung (AF: 2 bis 7) von intrazellulären Histon-assoziierten DNA-Fragmenten in U937-Zellen nachgewiesen werden. Bei 1 und 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ sind die Anreicherungsfaktoren ebenfalls größer 1, jedoch nur gering erhöht. Nach 20-stündiger Exposition wurden bei diesen Konzentrationen höhere Anreicherungsfaktoren (AF: 3 bis 4) bestimmt. Jedoch waren in höheren Konzentrationen keine Histon-assoziierten DNA-Fragmente mehr nachzuweisen.

Durchflusszytometrische Bestimmungen

Natriumdodecylsulfat wurde in den Konzentrationen 1, 2, 8, 16 und 32 $\mu\text{g}/\text{ml}$ durchflusszytometrisch mit der Annexin-V-Propidiumiodid-Färbung auf apoptotische Zellen hin untersucht. Bei den Konzentrationen 1, 2 und 16 $\mu\text{g}/\text{ml}$ konnte eine erhöhte Anzahl frühapoptotischer U937-Zellen nachgewiesen werden (Tab. 26). Bei Natriumdodecylsulfat kamen ähnlich wie bei Brij[®]78 beide Arten des Zelltodes, Apoptose und Nekrose, nebeneinander vor.

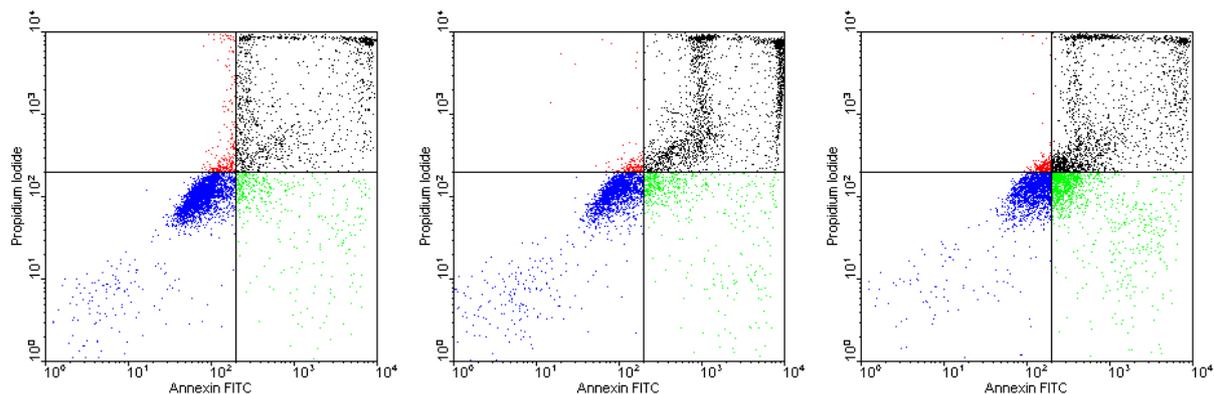


Abb. 88: Dotplot der U937-Zellen nach 4-stündiger Exposition mit Natriumdodecylsulfat und Annexin-V-Propidiumiodid-Färbung (von links nach rechts: 1, 2, 8 $\mu\text{g}/\text{ml}$)

Wie in der Abbildung 88 zu sehen, entsteht eine Zellpopulation, die überwiegend wenig gefärbt wurde, also intakte Zellen enthält. Ein Teil der Zellen befindet sich jedoch schon in den anderen Quadranten und wurde demnach in unterschiedlichem Ausmaß mit Annexin V, Propidiumiodid oder beiden Farbstoffen angefärbt. Die neu entstandene Zellpopulation enthält Übergangsstadien verschiedenartig veränderter Zellen, die entweder apoptotisch, nekrotisch oder noch intakt waren.

4. Ergebnisse

Nach 20-stündiger Exposition sind im Gegensatz zu den Ergebnissen nach 4-stündiger Exposition zwei Zellpopulationen vorhanden (Abb. 89). Eine der Populationen umfasst eine jeweils unterschiedliche Anzahl intakter Zellen. Bei 1 und 16 $\mu\text{g/ml}$ sind außerdem früh- und spätapoptotische Zellen vorhanden. Bei 16 $\mu\text{g/ml}$ sind in der Zellpopulation über 40% apoptotische Zellen.

Bei 32 $\mu\text{g/ml}$ findet hingegen überwiegend Nekrose statt. Im Dotplot ist eine Zellpopulation zu sehen, die sich im Übergang vom unveränderten zum nekrotischen Zustand befindet. Mehr als 75% der Zellen wurden mit Propidiumiodid angefärbt.

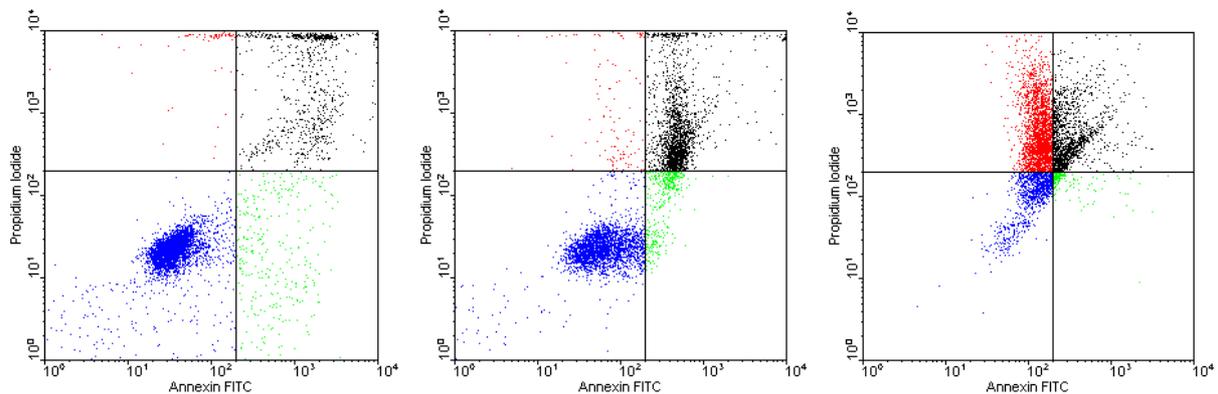


Abb. 89: Dotplot der U937-Zellen nach 20-stündiger Exposition mit Natriumdodecylsulfat und Annexin-V-Propidiumiodid-Färbung (von links nach rechts: 1, 16, 32 $\mu\text{g/ml}$)

In Tabelle 26 ist die prozentuale Verteilung der U937-Zellen auf die festgelegten Quadranten des Dotplots nach Exposition mit Natriumdodecylsulfat dargestellt. Erhöhte Mengen frühapoptotischer Zellen sind fettgedruckt.

4. Ergebnisse

Tabelle 26: Prozentuale Verteilung der U937-Zellen auf die festgelegten Quadranten des Dotplots nach Exposition mit Natriumdodecylsulfat im Vergleich zur Zellkontrolle b

| Exposition | 4 h | | 20 h | |
|------------------------------|--------------------------------------|------|-------------|------|
| Konzentration | 1 µg/ml Natriumdodecylsulfat | | | |
| U937-Zellen [%] | | ZK b | | ZK b |
| primär nekrotisch | 4,74 | 0,28 | 1,34 | 0,24 |
| nekrotisch / spätapoptotisch | 24,7 | 14,7 | 16,5 | 7,14 |
| frühapoptotisch | 8,52 | 11,5 | 6,58 | 2,68 |
| unverändert | 62,1 | 73,5 | 75,5 | 89,9 |
| Konzentration | 2 µg/ml Natriumdodecylsulfat | | | |
| U937-Zellen [%] | | ZK b | | ZK b |
| primär nekrotisch | 3,40 | 0,28 | 0,22 | 0,24 |
| nekrotisch / spätapoptotisch | 45,5 | 14,7 | 7,86 | 7,14 |
| frühapoptotisch | 11,5 | 11,5 | 5,14 | 2,68 |
| unverändert | 39,6 | 73,5 | 86,8 | 89,9 |
| Konzentration | 8 µg/ml Natriumdodecylsulfat | | | |
| U937-Zellen [%] | | ZK b | | ZK b |
| primär nekrotisch | 4,50 | 0,28 | 2,20 | 0,24 |
| nekrotisch / spätapoptotisch | 38,5 | 14,7 | 24,6 | 7,14 |
| frühapoptotisch | 23,1 | 11,5 | 2,30 | 2,68 |
| unverändert | 33,9 | 73,5 | 70,9 | 89,9 |
| Konzentration | 16 µg/ml Natriumdodecylsulfat | | | |
| U937-Zellen [%] | | | | ZK b |
| primär nekrotisch | | | 2,24 | 1,20 |
| nekrotisch / spätapoptotisch | | | 36,3 | 11,3 |
| frühapoptotisch | | | 8,10 | 6,18 |
| unverändert | | | 53,3 | 81,3 |
| Konzentration | 32 µg/ml Natriumdodecylsulfat | | | |
| U937-Zellen [%] | | | | ZK b |
| primär nekrotisch | | | 46,0 | 1,20 |
| nekrotisch / spätapoptotisch | | | 30,3 | 11,3 |
| frühapoptotisch | | | 3,34 | 6,18 |
| unverändert | | | 20,3 | 81,3 |

Morphologische Veränderungen durch Natriumdodecylsulfat

HaCaT-Zellen

An den HaCaT-Zellen wurden nach der Exposition mit Natriumdodecylsulfat folgende Veränderungen festgestellt:

- Ablösen der Zellen von der Oberfläche
- Abrundung
- Schrumpfung
- Lyse

In den Abbildungen 90 und 91 sind die HaCaT-Zellen nach 1- und 24-stündiger Exposition mit Natriumdodecylsulfat abgebildet. Die Zellen sind zusammengeballt, von der Oberfläche abgelöst und erscheinen deutlich kleiner. Je höher die Konzentration an Natriumdodecylsulfat ist, desto kleiner wirken die Zellen. Das Zellplasma mit dem Zellkern im Zentrum der veränderten Zelle wirkt kompakt, während die Zellmembran zu einer Blase angeschwollen ist. Bei höheren Konzentrationen löst sich die Zellmembran auf. Bei 24-stündiger Exposition kam es bei den höheren Konzentrationen zur Lyse der Zellen, da vermehrt Zellfragmente vorhanden sind.

U937-Zellen

An den U937-Zellen wurden nach der Exposition mit Natriumdodecylsulfat folgende Veränderungen beobachtet:

- Lyse
- Schrumpfung
- Zellen erscheinen abgeflacht mit rauher Oberfläche

Die Abbildungen 92 und 93 zeigen U937-Zellen nach 1- und 24-stündiger Exposition mit Natriumdodecylsulfat. Nach 24-stündiger Exposition sind, wie es auch bei den HaCaT-Zellen zu beobachten war, vermehrt Zellfragmente vorhanden, was auf Zellyse hindeutet. Bei 1-stündiger Exposition mit 64 µg/ml und bei 24-stündiger Exposition mit 8 bis 32 µg/ml sind deutlich zwei Zellpopulationen zu erkennen. Einige Zellen erscheinen völlig unverändert, während die anderen Zellen abgeflacht, verkleinert und zersetzt sind. Bei 24-stündiger Exposition mit 64 µg Natriumdodecylsulfat pro ml ist nur noch die veränderte Zellpopulation vorhanden. Während die Zellen nach 24-stündiger Exposition eher nekrotisch verändert aussehen, sind nach 1-stündiger Exposition an einigen U937-Zellen typische morphologische Veränderungen der Apoptose zu sehen. Vor allem bei 32 µg/ml sind Ausstülpungen der Zellmembran zu erkennen, bei denen es sich um apoptotische Körperchen handeln könnte.

4. Ergebnisse

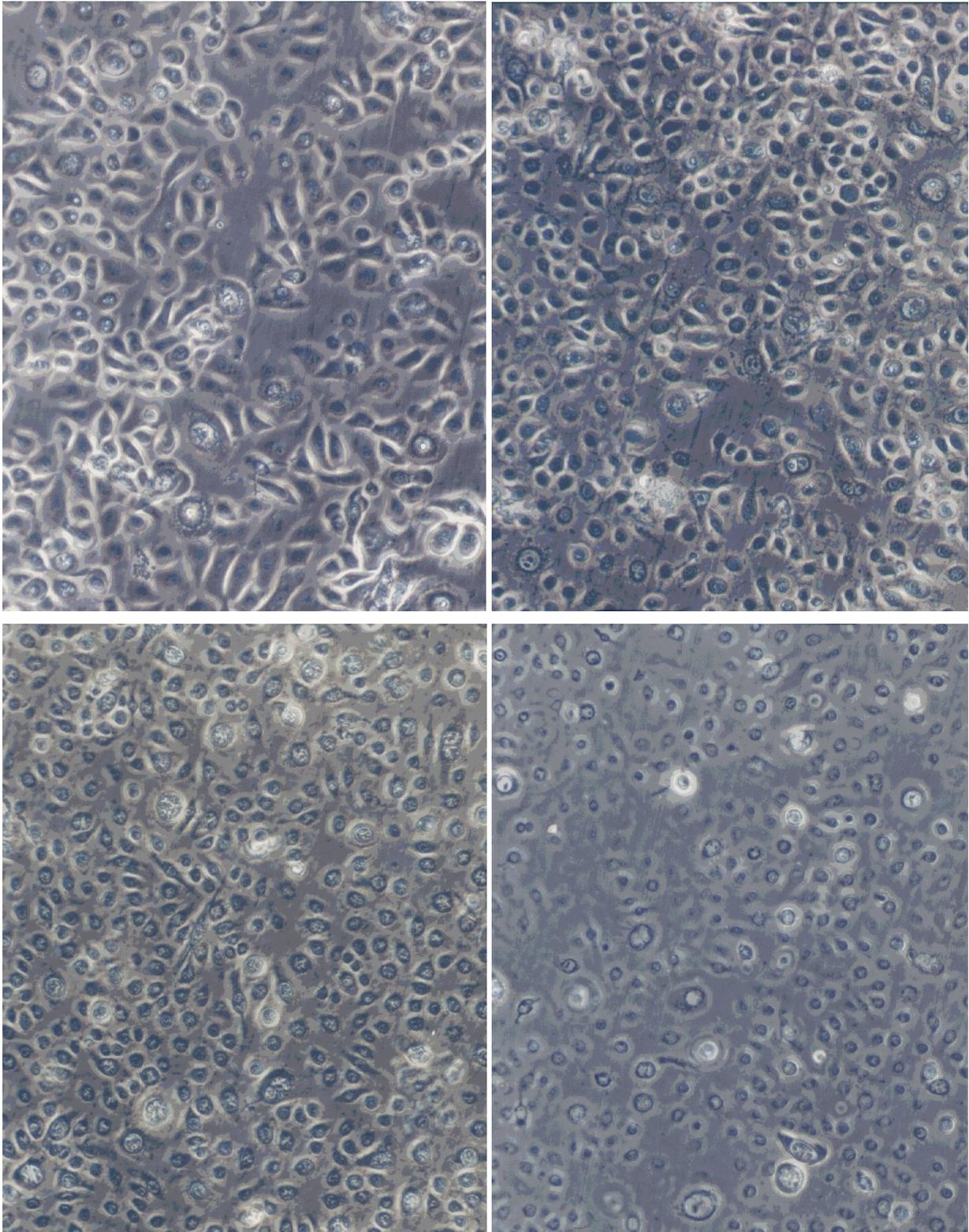


Abb. 90: HaCaT-Zellen nach 1-stündiger Exposition mit Natriumdodecylsulfat 160fach vergrößert (oben links 32 µg/ml; oben rechts 64 µg/ml; unten links 128 µg/ml; unten rechts 256 µg/ml)

4. Ergebnisse

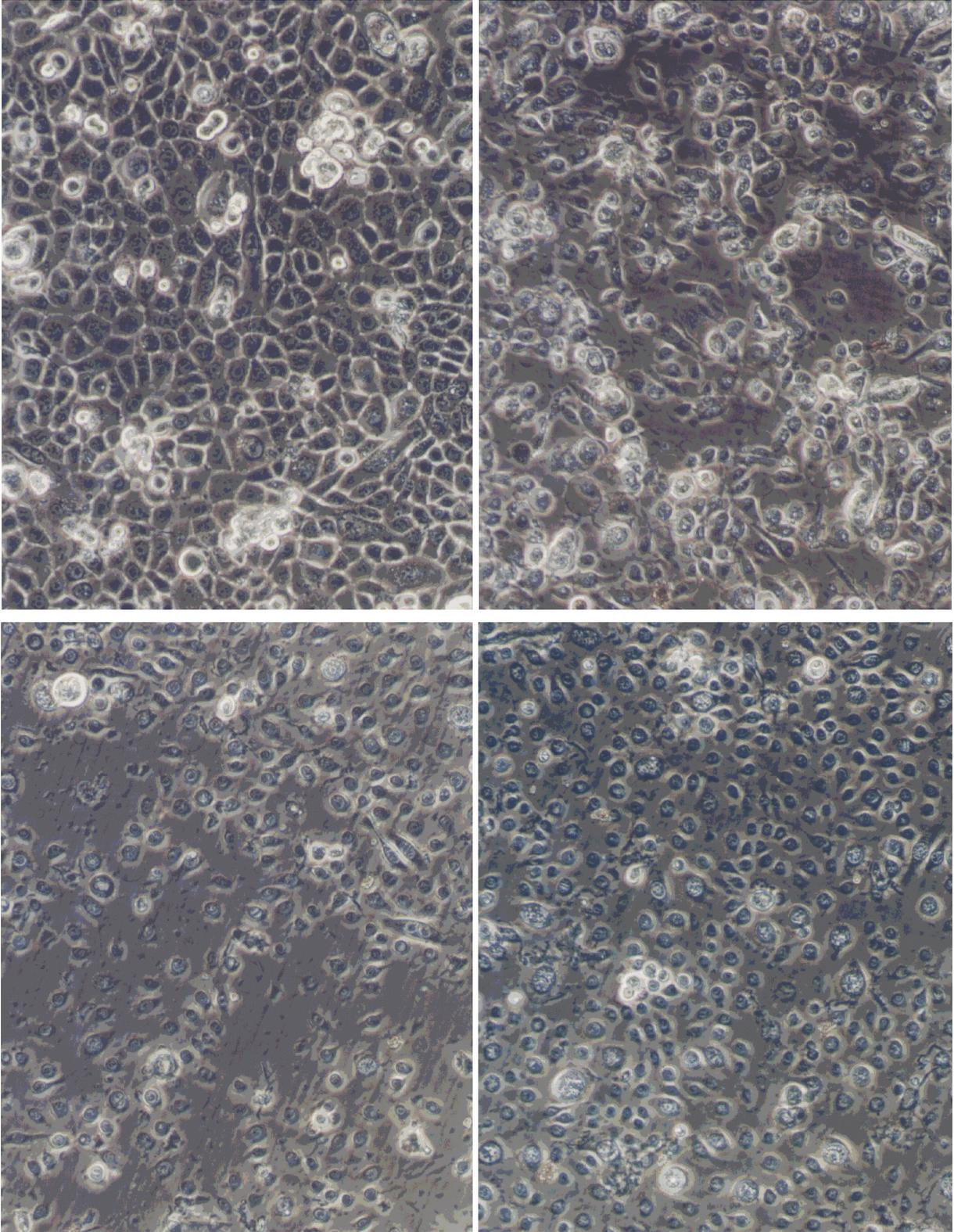


Abb. 91: HaCaT-Zellen nach 24-stündiger Exposition mit Natriumdodecylsulfat 160fach vergrößert (oben links 16 µg/ml; oben rechts 32 µg/ml; unten links 64 µg/ml; unten rechts 128 µg/ml)

4. Ergebnisse

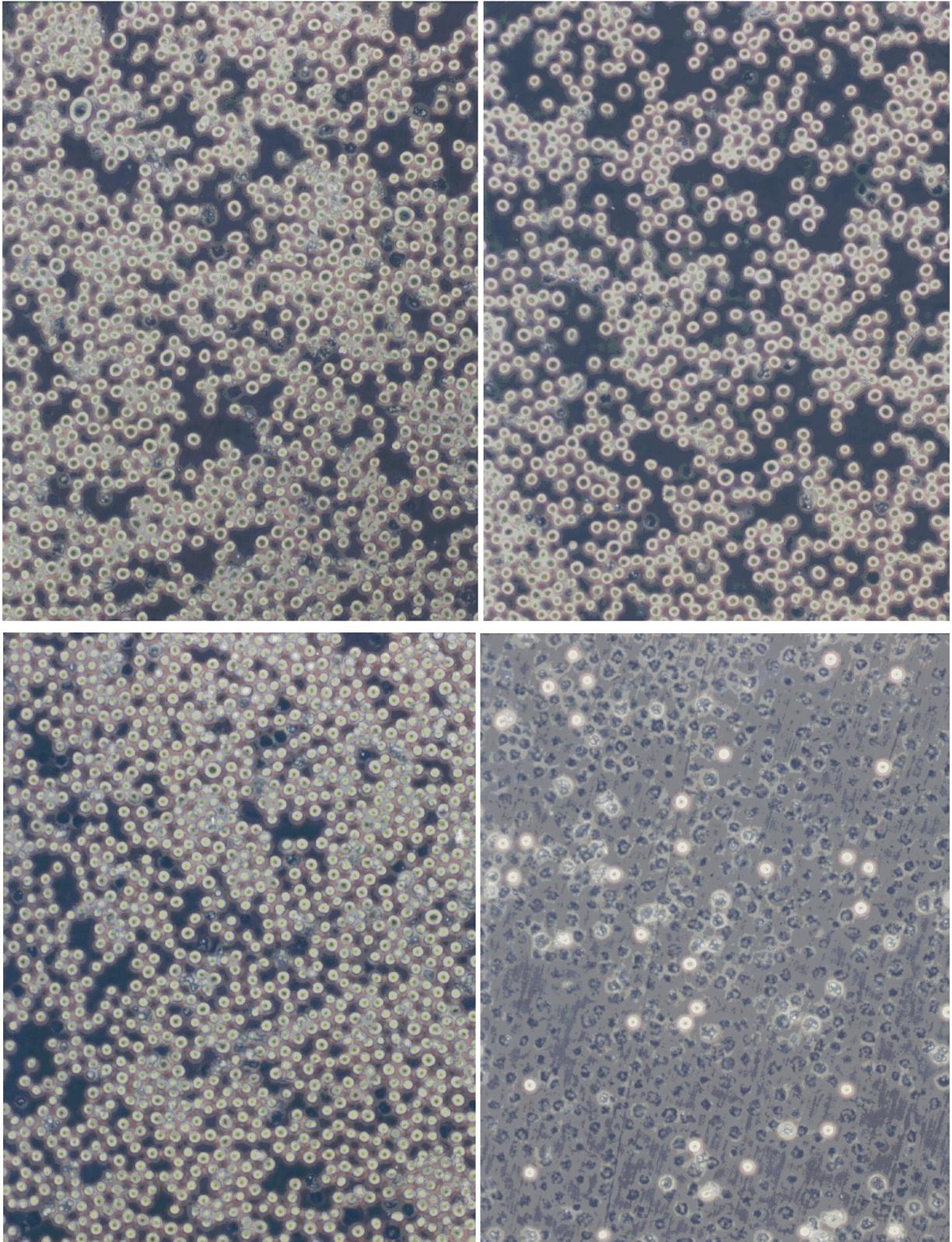


Abb. 92: U937-Zellen nach 1-stündiger Exposition mit Natriumdodecylsulfat 160fach vergrößert (Phasenkontrast; oben links 8 $\mu\text{g/ml}$; oben rechts 16 $\mu\text{g/ml}$; unten links 32 $\mu\text{g/ml}$; unten rechts 64 $\mu\text{g/ml}$)

4. Ergebnisse

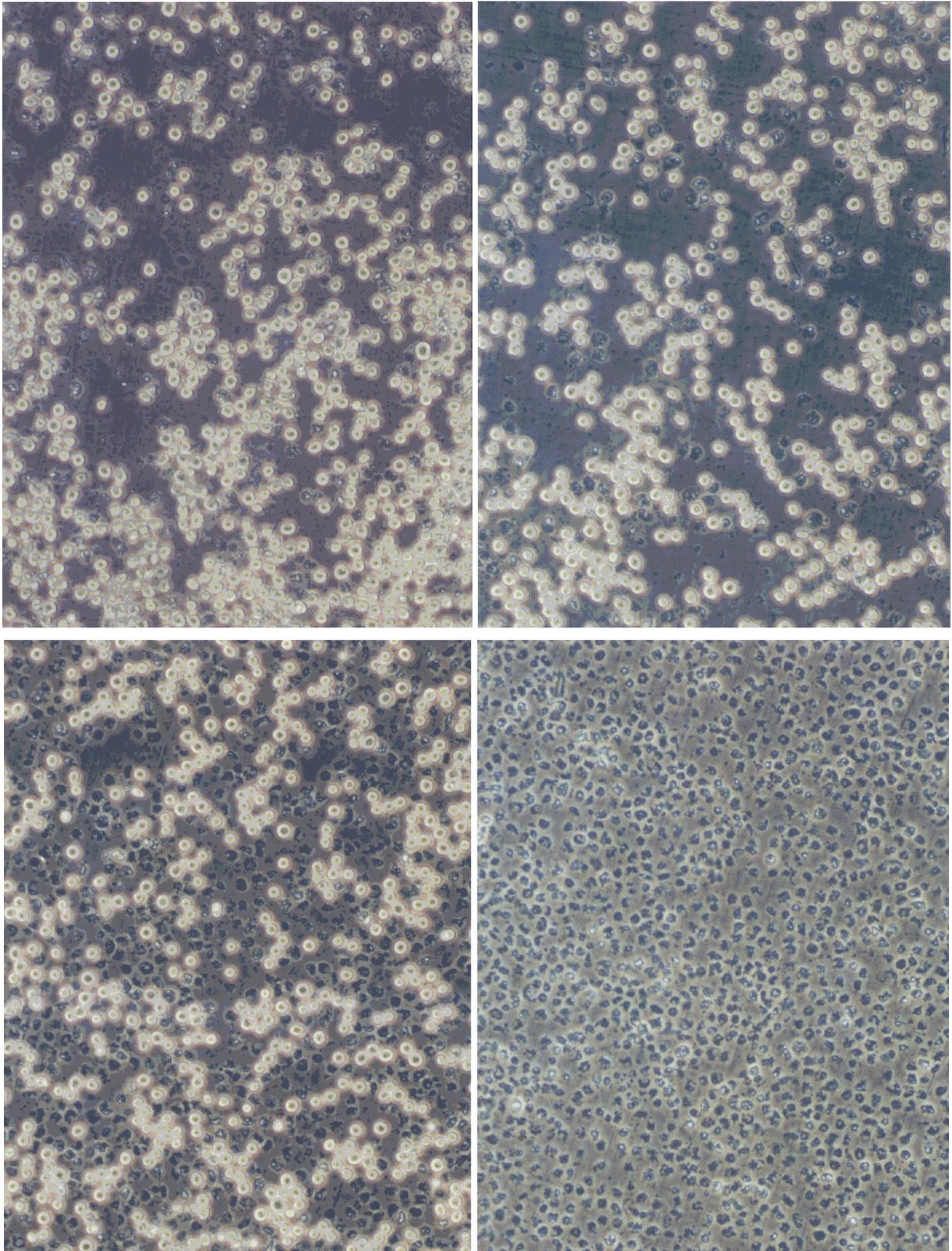


Abb. 93: U937-Zellen nach 24-stündiger Exposition mit Natriumdodecylsulfat 160fach vergrößert (Phasenkontrast; oben links 8 µg/ml; oben rechts 16 µg/ml; unten links 32 µg/ml; unten rechts 64 µg/ml)

4.2.1.2. Natriumcetylstearylsulfat

Natriumcetylstearylsulfat, bekannt unter dem Handelsnamen Lanette® E, ist eine Mischung aus Natriumcetylsulfat und Natriumstearylsulfat. Die beiden Hauptbestandteile sind Natriumsalze der Schwefelsäureester von Cetyl- bzw. Stearylalkohol. Sie machen 96% der Mischung aus. Die Darstellung erfolgt durch Veresterung gleicher Teile Cetyl- und Stearylalkohol mit Schwefelsäure, Chlorsulfonsäure oder Schwefeltrioxid und nachfolgende Neutralisation.

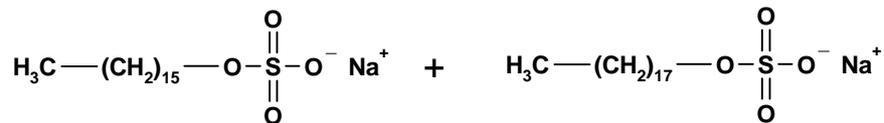


Abb. 94: Strukturformel von Natriumcetylstearylsulfat

Natriumcetylstearylsulfat ist löslich in Wasser unter Bildung einer schäumenden, trüben, neutralen Lösung. Die Löslichkeit nimmt mit der Temperatur zu. Das Molekulargewicht von Natriumcetylsulfat beträgt 344,5, das von Natriumstearylsulfat 372,5. Der HLB-Wert ist mit 37 etwas geringer als der von Natriumdodecylsulfat.

Natriumcetylstearylsulfat wird wie Natriumdodecylsulfat als Netzmittel, Schaummittel und Emulgator eingesetzt. In der Pharmazie ist Natriumcetylstearylsulfat ebenso Hauptbestandteil von Komplexemulgatoren zur Herstellung hydrophiler Salben. Es kann alternativ zu Natriumdodecylsulfat zur Herstellung in der im DAB offizinellen wasserhaltigen, hydrophilen Salbe verwendet werden. Die LD₅₀ liegt über 10 g/kg (Ratte, oral) [79, 109].

Die ABDA-Datenbank nennt 45 Fertigarzneimittel, die Natriumcetylstearylsulfat als Hilfsstoff enthalten. Es handelt sich dabei um topisch anzuwendende Arzneiformen wie Salben, Cremes und Emulsionen. So ist Natriumcetylstearylsulfat z.B. in Camphoderm® Emulsion, Kamillosan® Creme und Thrombareduct® Salbe enthalten [1].

Zytotoxizität von Natriumcetylstearylsulfat

Die Abbildung 95 gibt die Ergebnisse von Natriumcetylstearylsulfat im Zytotoxizitätstest mit EZ4U an HaCaT-Zellen und an U937-Zellen wieder.

Wie bei Natriumdodecylsulfat ist eine deutliche Zunahme der Zytotoxizität mit der Zeit zu erkennen. Die Toxizität an U937-Zellen nimmt nach 24 Stunden im Vergleich zu 1 Stunde um das ca. 4fache, die Toxizität an HaCaT-Zellen um das ca. 11fache zu.

Natriumcetylstearylsulfat ist deutlich zytotoxischer als Natriumdodecylsulfat. Das trifft für U937-Zellen, aber auch für HaCaT-Zellen nach 24-stündiger Exposition zu. Während bei Natriumdodecylsulfat unterhalb der Konzentration 2 µg/ml keine Zytotoxizität auftrat, ist Natriumcetylstearylsulfat in dieser Konzentration für U937-Zellen nach 24 Stunden deutlich

4. Ergebnisse

zytotoxisch (70%). Erst in Natriumcetylstearylsulfat-Konzentrationen unter 0,5 µg/ml ist keine Zytotoxizität bestimmt worden.

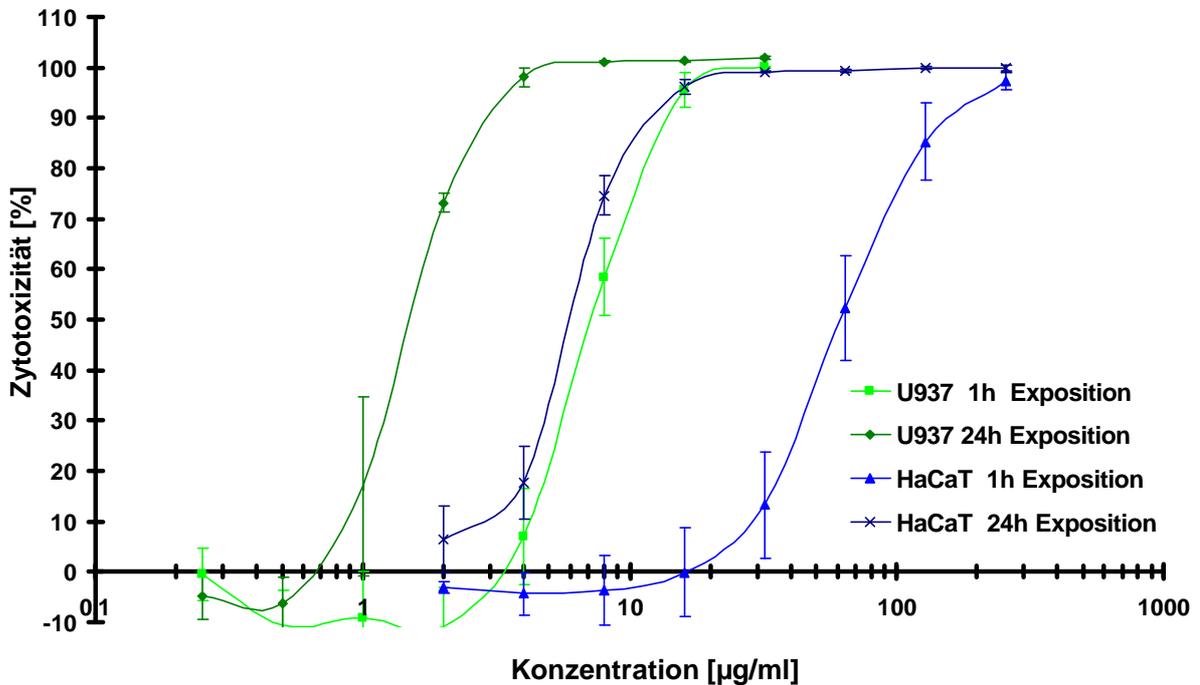


Abb. 95: Zytotoxizität von Natriumcetylstearylsulfat an U937-Zellen (n = 13) und HaCaT-Zellen (n = 15) nach 1 und 24 Stunden Exposition

HaCaT-Zellen sind wesentlich weniger empfindlich gegenüber U937-Zellen. Die CC_{50} für HaCaT-Zellen ist nach 1-stündiger Exposition 10mal und nach 24 Stunden 4mal größer als für U937-Zellen (Tab. 27). Die entsprechenden Konzentrations-Wirkungs-Kurven verlaufen parallel. Bei 1-stündiger Exposition der U937-Zellen entspricht die Konzentrations-Wirkungs-Kurve annähernd der Konzentrations-Wirkungs-Kurve bei 24-stündiger Exposition der HaCaT-Zellen.

In Tabelle 27 ist die halbmaximale zytotoxische Konzentration von Natriumcetylstearylsulfat an HaCaT- und U937-Zellen nach 1- und 24-stündiger Exposition aufgeführt.

Tabelle 27: Halbmaximale zytotoxische Konzentration (CC_{50}) von Natriumcetylstearylsulfat

| Exposition | U937-Zellen [µg/ml] | HaCaT-Zellen [µg/ml] |
|------------|---------------------|----------------------|
| 1h | 6,85 (5,93-7,92) | 66,8 (53,3-83,7) |
| 24h | 1,59 (1,33-1,91) | 6,28 (5,73-6,90) |

4. Ergebnisse

Membrantoxizität von Natriumcetylstearylsulfat

In Abbildung 96 ist die durch Natriumcetylstearylsulfat induzierte Arachidonsäure-Freisetzung dargestellt.

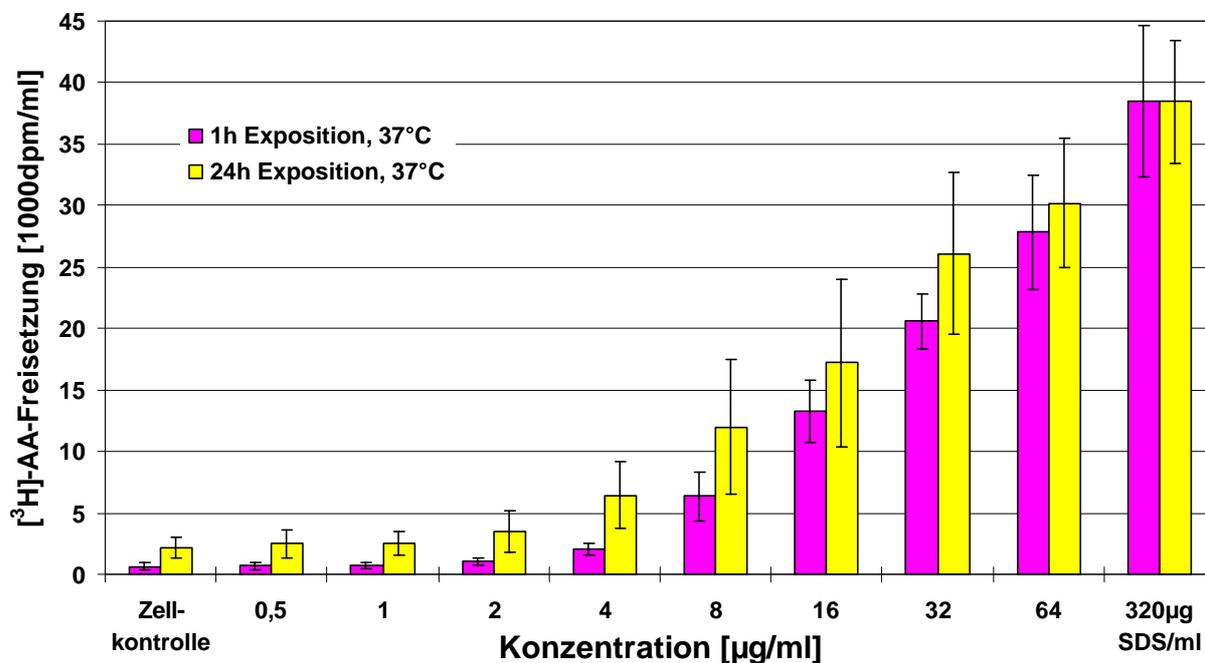


Abb. 96: [³H]Arachidonsäure-Freisetzung durch Natriumcetylstearylsulfat an U937-Zellen nach 1 und 24 Stunden Exposition bei 37°C (n = 12)

Bei den getesteten Konzentrationen wurde die maximale Arachidonsäure-Freisetzung, entsprechend der Positivkontrolle nicht erreicht. Da die Arachidonsäure-Freisetzung bei 64 µg/ml jedoch bereits 75 bis 80% der Positivkontrolle entspricht, ist anzunehmen, dass bei höheren Konzentrationen die maximale Arachidonsäure-Freisetzung erreicht werden kann. Es bestehen kaum Unterschiede zwischen der Arachidonsäure-Freisetzung nach 1 und 24 Stunden Exposition. Die MTK-Werte unterscheiden sich nur geringfügig. Sie sind in der Tabelle 28 mit der entsprechenden Zytotoxizität bei der MTK dargestellt. Während nach 1-stündiger Exposition keine Zytotoxizität bei der MTK nachzuweisen war, war nach 24 Stunden eine deutliche Zytotoxizität festzustellen.

Tabelle 28: Minimal toxische Konzentration (MTK) und Zytotoxizität bei der MTK von Natriumcetylstearylsulfat

| Exposition | MTK [µg/ml] | Zytotoxizität [%] |
|------------|-------------|-------------------|
| 1h, 37°C | 1,87 | 0 |
| 24h, 37°C | 1,48 | 46,4 |

Morphologische Veränderungen durch Natriumcetylstearylsulfat

An beiden Zellarten wurden nach Exposition mit Natriumcetylstearylsulfat die gleichen Veränderungen festgestellt wie bei Natriumdodecylsulfat.

HaCaT-Zellen

An den HaCaT-Zellen wurden folgende Veränderungen beobachtet:

- Ablösen der Zellen von der Oberfläche
- Abrundung
- Schrumpfung
- Lyse

U937-Zellen

An den U937-Zellen wurden folgende Veränderungen festgestellt:

- Lyse
- Schrumpfung
- Zellen erscheinen abgeflacht mit rauher Oberfläche

Abbildung 97 zeigt die U937-Zellen nach 24-stündiger Exposition mit Natriumcetylstearylsulfat. Wie bei Natriumdodecylsulfat sind vermehrt Zellfragmente vorhanden, was auf Zellyse hindeutet. Bei 2 und 4 µg/ml sind deutlich zwei Zellpopulationen zu erkennen. Einige Zellen erscheinen völlig unverändert, während die anderen Zellen abgeflacht, verkleinert und teilweise lysiert sind. Bei Exposition mit 8 µg Natriumcetylstearylsulfat pro ml ist nur noch die veränderte Zellpopulation vorhanden. Bei Exposition mit 1 µg/ml sind apoptotische Körperchen zu sehen.

4. Ergebnisse

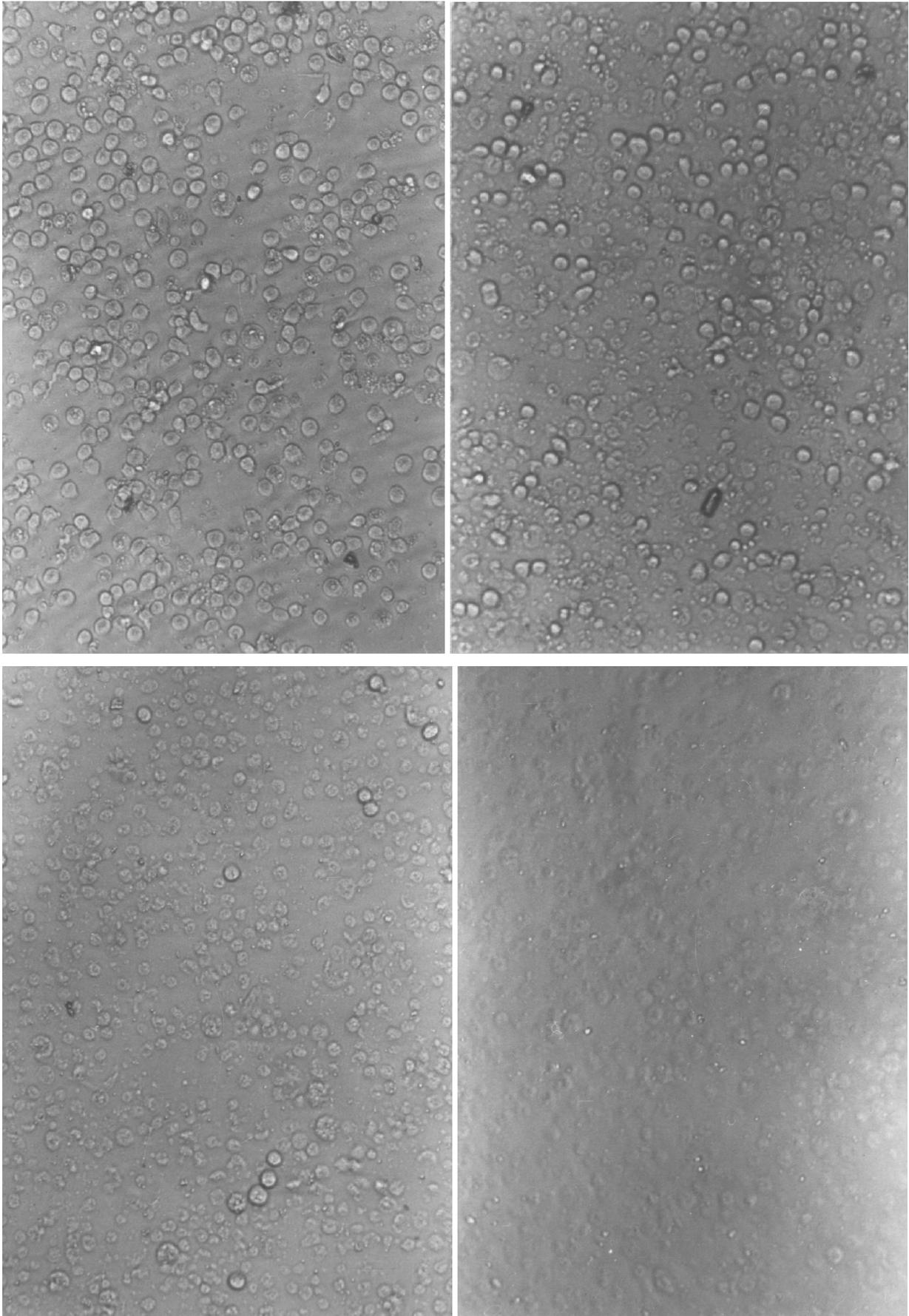


Abb. 97: U937-Zellen nach 24-stündiger Exposition mit Natriumcetylstearylsulfat 160fach vergrößert (oben links 1 µg/ml; oben rechts 2 µg/ml; unten links 4 µg/ml; unten rechts 8 µg/ml)

4.2.2. Alkylethersulfat – Natriumdodecylethersulfat

Es handelt sich bei Natriumdodecylethersulfat (Natriumlaurylethersulfat, Texapon® NSO) um ethoxyliertes Natriumdodecylsulfat. Die 27%ige Lösung von Natriumdodecylethersulfat ist im DAC 97 offizinell. Diese wässrige Lösung, in welcher das Tensid üblicher Weise verwendet wird, enthält ein Gemisch von Natriumalkylethersulfaten, hauptsächlich das Natriumsalz von Dodecyldiethylenglykoethersulfat. Der Ethoxylierungsgrad kann jedoch auch von 2 abweichen. Das mittlere Molekulargewicht von Natriumdodecylethersulfat beträgt 382. Die 27%ige Lösung kann mit geeigneten Konservierungsmitteln und Stabilisatoren versetzt sein. Der pH-Wert wird mit 7,1 angegeben [2].

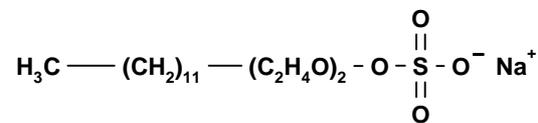


Abb. 98: Strukturformel von Natriumdodecylethersulfat

Natriumdodecylethersulfat ist ein Basistensid zur Herstellung von Shampoos und Waschlösungen. Es kommt sehr häufig in waschaktiven Kosmetika vor [2].

Da Natriumdodecylethersulfat als 27%ige Lösung, so wie es im DAC offizinell ist, untersucht worden ist, wurden die Endergebnisse auf den Aktivgehalt berechnet angegeben. Bei den Erläuterungen der Ergebnisse ist diese berechnete Konzentration in Klammern angegeben. Die in den Diagrammen angegebene Konzentrationen beziehen sich auf die 27%ige Lösung.

| |
|--|
| Zytotoxizität von Natriumdodecylethersulfat |
|--|

Die Abbildung 99 zeigt die Ergebnisse von Natriumdodecylethersulfat im Zytotoxizitätstest mit EZ4U an HaCaT-Zellen und U937-Zellen.

Die vier Konzentrations-Wirkungs-Kurven verlaufen parallel. Wie bei den anderen Tensiden ist auch bei Natriumdodecylethersulfat eine deutliche Zunahme der Zytotoxizität mit der Zeit zu erkennen. Die Zytotoxizität nimmt an beiden Zelllinien nach 24 Stunden im Vergleich zu 1 Stunde um das ca. 3fache zu. In Natriumdodecylethersulfat-Konzentrationen unter 10 (2,7) µg/ml ist auch nach 24 Stunden noch keine Zytotoxizität aufgetreten.

HaCaT-Zellen sind weniger empfindlich gegenüber Natriumdodecylethersulfat als U937-Zellen. Die CC₅₀ nach 1- und 24-stündiger Exposition ist für HaCaT-Zellen doppelt so groß wie für U937-Zellen. Tabelle 29 gibt die halbmaximale zytotoxische Konzentration von Natriumdodecylethersulfat an HaCaT- und U937-Zellen nach 1- und 24-stündiger Exposition wieder.

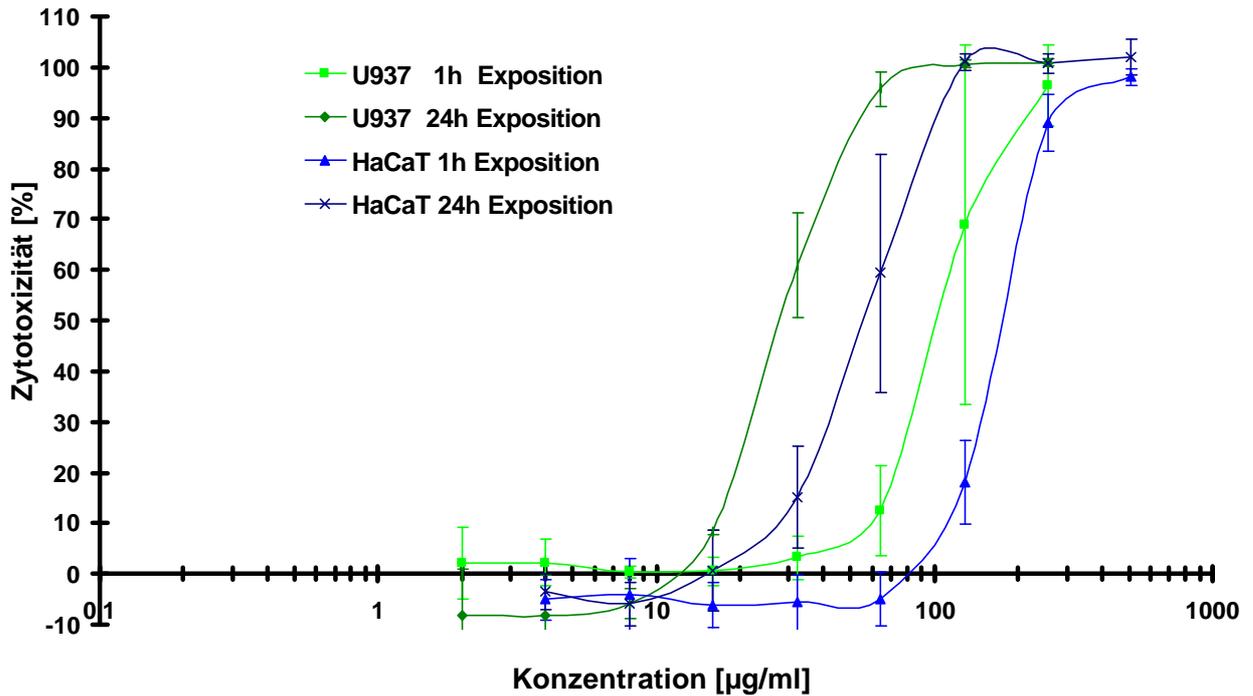


Abb. 99: Zytotoxizität von Natriumdodecylethersulfat an U937-Zellen (n = 14) und HaCaT-Zellen (n = 17) nach 1 und 24 Stunden Exposition bei 37°C

Tabelle 29: Halbmaximale zytotoxische Konzentration (CC₅₀) von Natriumdodecylethersulfat

| Exposition | U937-Zellen [µg/ml] | | HaCaT-Zellen [µg/ml] | |
|------------|---------------------|---------------------------|----------------------|---------------------------|
| | 27%ige Lösung | berechnet auf Aktivgehalt | 27%ige Lösung | berechnet auf Aktivgehalt |
| 1h | 104 (74,4-145) | 28,1 (20,1-39,2) | 176 (160-194) | 47,5 (43,1-52,4) |
| 24h | 28,9 (24,9-33,6) | 7,81 (6,71-9,08) | 52,0 (42,3-63,8) | 14,0 (11,4-17,2) |

Membrantoxizität von Natriumdodecylethersulfat

Die Abbildung 100 gibt die durch Natriumdodecylethersulfat induzierte Arachidonsäure-Freisetzung wieder.

Nach 24-stündiger Exposition ist bei 128 (35) µg Natriumdodecylethersulfat pro ml die maximale Arachidonsäure-Freisetzung im Vergleich zur Positivkontrolle erreicht. Nach 1-stündiger Exposition ist sie bei dieser Konzentration etwas niedriger (75% bei 37°C, 30% bei 4°C). Bei 256 (70) µg/ml konnte die maximale Arachidonsäure-Freisetzung bei allen Expositionsbedingungen erreicht werden. Die MTK-Werte von Natriumdodecylethersulfat und die entsprechende Zytoxizität bei der MTK sind in Tabelle 30 dargestellt.

4. Ergebnisse

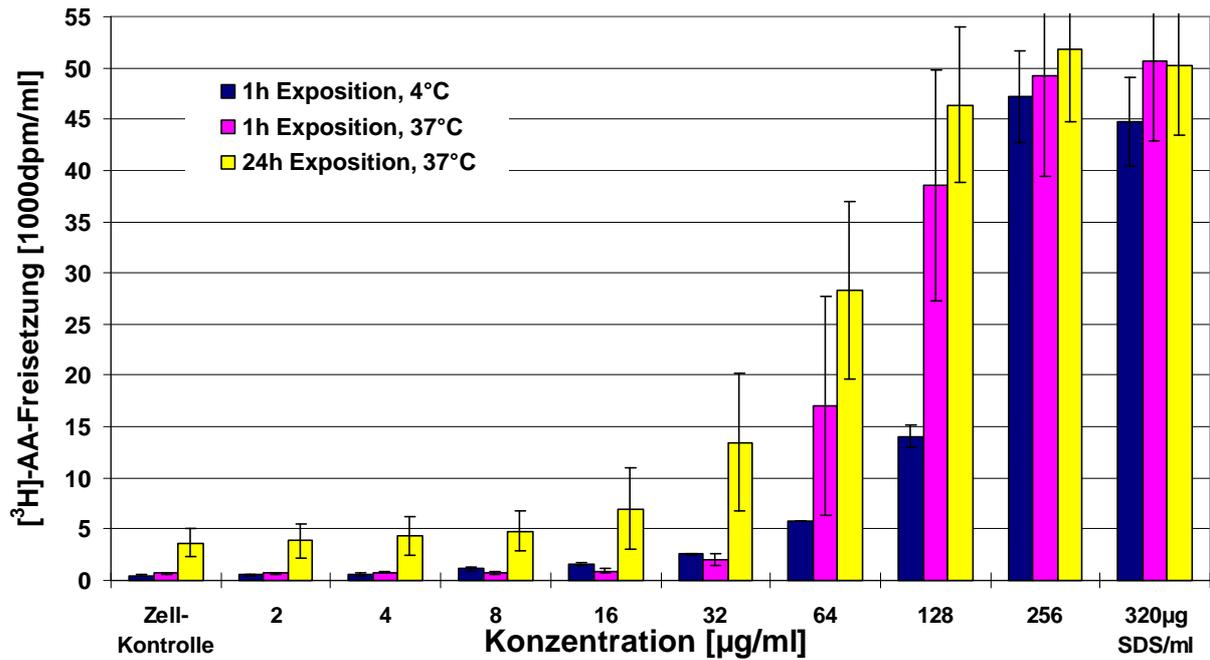


Abb. 100: [³H]Arachidonsäure-Freisetzung durch Natriumdodecylethersulfat an U937-Zellen nach 1 und 24 Stunden Exposition bei 4°C (n = 9) und 37°C (n = 12)

Tabelle 30: Minimal toxische Konzentration (MTK) und Zytotoxizität bei der MTK von Natriumdodecylethersulfat

| Exposition | MTK [µg/ml] | | Zytotoxizität [%] |
|------------|---------------|---------------------------|-------------------|
| | 27%ige Lösung | berechnet auf Aktivgehalt | |
| 1h, 37°C | 13,8 | 3,74 | 0 |
| 1h, 4°C | 7,07 | 1,91 | - |
| 24h, 37°C | 7,73 | 2,09 | 0 |

Bei der MTK war an den U937-Zellen wie bei Natriumdodecylsulfat nach 1 und 24 Stunden keine Zytotoxizität im EZ4U nachzuweisen.

Apoptose durch Natriumdodecylethersulfat

Bestimmung Histon-assoziiierter DNA-Fragmente mit ELISA

In Konzentrationen von 2 (0,5) bis 64 (17) µg/ml wurde Natriumdodecylethersulfat durch Bestimmung intrazellulärer Histon-assoziiierter DNA-Fragmente auf seine Apoptose-induzierenden Eigenschaften hin untersucht. In Abbildung 101 sind die Anreicherungsfaktoren

4. Ergebnisse

Histon-assoziiierter DNA-Fragmente in U937-Zellen nach 4- und 20-stündiger Exposition mit Natriumdodecylethersulfat dargestellt.

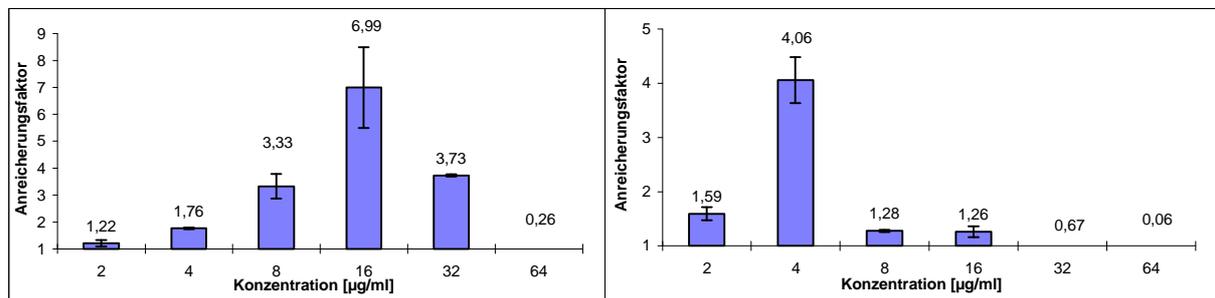


Abb. 101: Anreicherungsfaktor Histon-assoziiierter DNA-Fragmente in U937-Zellen nach 4-stündiger (links) und 20-stündiger (rechts) Exposition mit Natriumdodecylethersulfat

Nach 4-stündiger Exposition konnten bei Konzentrationen von 4 (1) bis 32 (8,5) µg Natriumdodecylethersulfat pro ml eine deutliche Erhöhung (AF: 2 bis 7) von intrazellulären Histon-assoziierten DNA-Fragmenten in U937-Zellen nachgewiesen werden. Eine geringe Erhöhung gegenüber der Zellkontrolle ist bei 2 (0,5) und 4 (1) µg/ml festzustellen. Nach 20-stündiger Exposition war bei 4 (1) µg/ml eine deutliche Erhöhung (AF = 4), bei 2, 8 und 16 (0,5-4) µg/ml nur eine geringe Erhöhung der Histon-assoziierten DNA-Fragmente nachweisbar. Bei 32 (8,5) µg/ml ließen sich keine Histon-assoziierten DNA-Fragmente mehr bestimmen.

Durchflusszytometrische Bestimmungen

Natriumdodecylethersulfat wurde durchflusszytometrisch nach Annexin-V-Propidiumiodid-Färbung in den Konzentrationen 2, 8, 16 und 32 (0,5-8,5) µg/ml auf apoptotische Zellen hin untersucht. Nach 4-stündiger Exposition sind bei allen Konzentrationen eine erhöhte Anzahl frühapoptotischer U937-Zellen nachgewiesen worden (Tab. 31). Bei 20-stündiger Exposition ist dies jedoch nicht der Fall. Hier sind im Vergleich zur Zellkontrolle b mehr Zellen im Quadranten rechts oben, also Annexin und Propidiumiodid gefärbt. Es könnte sich um spätapoptotische Zellen handeln. Nach 44 Stunden ist die Anzahl frühapoptotischer U937-Zellen wieder erhöht.

Stellvertretend für die Konzentrationen 2, 4 und 16 (0,5-4) µg/ml sind in der Abbildung 102 drei Dotplots bei der Konzentration 16 µg/ml nach den 3 verschiedenen Expositionszeiten dargestellt.

4. Ergebnisse

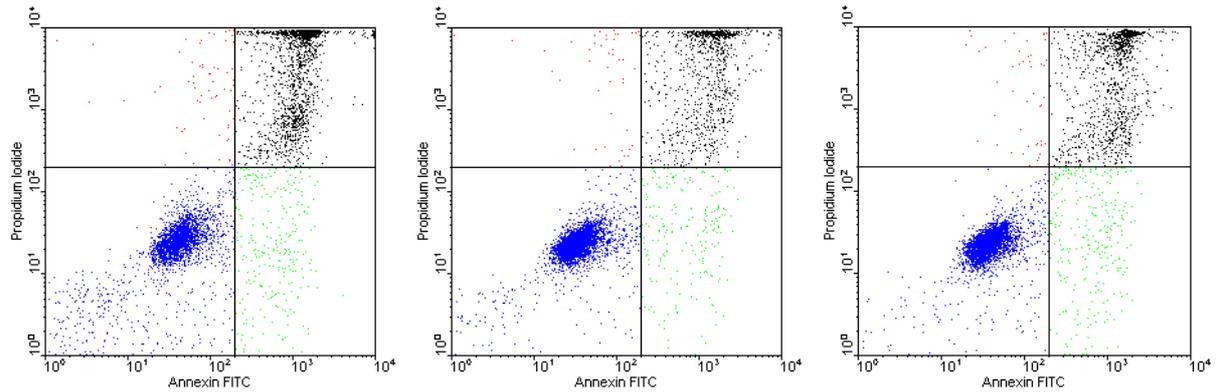


Abb. 102: Dotplot der U937-Zellen nach Exposition mit 16 (4) μg Natriumdodecylethersulfat pro ml und Annexin-V-Propidiumiodid-Färbung (von links nach rechts: nach 4, 20, 44 Stunden)

Bei 32 $\mu\text{g}/\text{ml}$ steht nach 4 Stunden Exposition die Apoptose im Vordergrund, 20% der Zellen waren nur mit Annexin V gefärbt also frühapoptotisch. Nach 20-stündiger Exposition könnten auch nekrotische Prozesse eine Rolle spielen, ein Teil der Zellen ist nur mit Propidiumiodid gefärbt (Abb. 103).

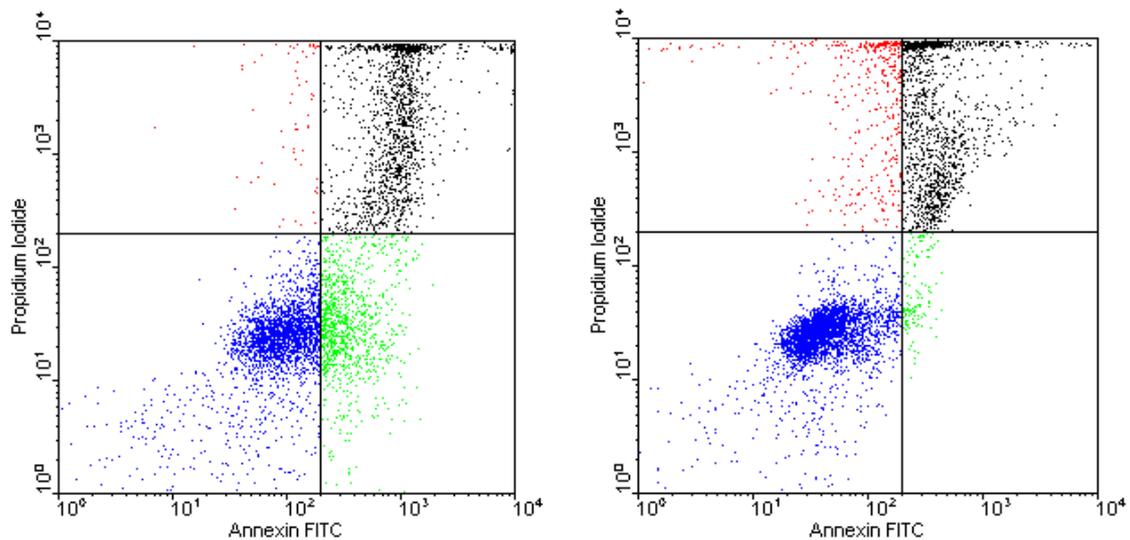


Abb. 103: Dotplot der U937-Zellen nach Exposition mit 32 (8) μg Natriumdodecylethersulfat pro ml und Annexin-V-Propidiumiodid-Färbung (links nach 4, rechts nach 20 Stunden)

In der Tabelle 31 sind die Ergebnisse der durchflusszytometrischen Bestimmungen zusammengefasst. Vermehrt vorkommende frühapoptotische Zellen sind fettgedruckt.

4. Ergebnisse

Tabelle 31: Prozentuale Verteilung der U937-Zellen auf die festgelegten Quadranten des Dotplots nach Exposition mit Natriumdodecylethersulfat im Vergleich zur Zellkontrolle b

| Exposition | 4 h | | 20 h | | 44 h | |
|------------------------------|---|------|-------------|------|-------------|------|
| Konzentration | 2 (0,5) µg/ml Natriumdodecylethersulfat | | | | | |
| U937-Zellen [%] | | ZK b | | ZK b | | ZK b |
| primär nekrotisch | 1,70 | 19,9 | 1,42 | 1,20 | 3,10 | 3,74 |
| nekrotisch / spätapoptotisch | 42,1 | 4,2 | 19,3 | 11,3 | 17,4 | 14,5 |
| frühapoptotisch | 3,38 | 0,7 | 5,58 | 6,18 | 3,72 | 2,38 |
| unverändert | 52,8 | 75,2 | 73,7 | 81,3 | 75,8 | 79,4 |
| Konzentration | 4 (1) µg/ml Natriumdodecylethersulfat | | | | | |
| U937-Zellen [%] | | ZK b | | ZK b | | ZK b |
| Primär nekrotisch | 1,94 | 19,9 | 1,12 | 1,20 | 1,02 | 3,74 |
| nekrotisch / spätapoptotisch | 42,3 | 4,2 | 19,0 | 11,3 | 15,8 | 14,5 |
| frühapoptotisch | 4,22 | 0,7 | 4,84 | 6,18 | 5,16 | 2,38 |
| unverändert | 51,5 | 75,2 | 75,0 | 81,3 | 78,0 | 79,4 |
| Konzentration | 16 (4) µg/ml Natriumdodecylethersulfat | | | | | |
| U937-Zellen [%] | | ZK b | | ZK b | | ZK b |
| primär nekrotisch | 1,24 | 19,9 | 1,04 | 1,20 | 0,98 | 3,74 |
| nekrotisch / spätapoptotisch | 39,7 | 4,2 | 21,4 | 11,3 | 23,6 | 14,5 |
| frühapoptotisch | 5,90 | 0,7 | 4,52 | 6,18 | 5,90 | 2,38 |
| unverändert | 53,2 | 75,2 | 73,1 | 81,3 | 69,5 | 79,4 |
| Konzentration | 32 (8,5) µg/ml Natriumdodecylethersulfat | | | | | |
| U937-Zellen [%] | | ZK b | | ZK b | | |
| primär nekrotisch | 1,28 | 19,9 | 8,08 | 1,20 | | |
| nekrotisch / spätapoptotisch | 31,5 | 4,2 | 28,3 | 11,3 | | |
| frühapoptotisch | 20,3 | 0,7 | 2,66 | 6,18 | | |
| unverändert | 46,9 | 75,2 | 61,0 | 81,3 | | |

Morphologische Veränderungen durch Natriumdodecylethersulfat

HaCaT-Zellen

Folgende Veränderungen an den HaCaT-Zellen wurden nach der Exposition mit Natriumdodecylethersulfat festgestellt:

- Ablösen der Zellen von der Oberfläche
- Abrundung
- Schrumpfung
- Lyse

Die Abbildungen 104 und 105 zeigen die HaCaT-Zellen nach 1- und 24-stündiger Exposition mit Natriumdodecylethersulfat. Die Zellen ballen sich bei Exposition mit Natriumdodecylethersulfat zusammen und lösen sich von der Oberfläche. Auch bei Natriumdodecylethersulfat ballt sich das Zellplasma mit dem Zellkern zusammen und die Zellmembran schwillt zu einer Blase an. Bei 1-stündiger Exposition löst sich die Zellmembran in Abhängigkeit von der Konzentration auf, bei 512 (140) und 1024 (280) $\mu\text{g/ml}$ ist sie nicht mehr vorhanden. Nach 24 Stunden Exposition kommt es bei 256 (70) und 512 (140) $\mu\text{g/ml}$ zur Lyse der HaCaT-Zellen. Zellfragmente sind vorhanden. Bei 512 (140) $\mu\text{g/ml}$ ist eine nahezu vollständige Lyse der Zellen zu sehen. Es finden sich nur wenige kompakte Zellen.

U937-Zellen

An den U937-Zellen wurden nach der Exposition mit Natriumdodecylethersulfat folgende Veränderungen beobachtet:

- Lyse
- Schrumpfung
- Zellen erscheinen abgeflacht mit rauher Oberfläche

Die Abbildungen 106 und 107 zeigen die U937-Zellen nach 1- und 24-stündiger Exposition mit Natriumdodecylethersulfat. Auch bei den U937-Zellen kommt es zur nahezu vollständigen Lyse der Zellen. Bei 1- und 24-stündiger Exposition mit 128 (35) $\mu\text{g/ml}$ sind nur noch Zellfragmente zu sehen. Bei 1-stündiger Exposition mit 64 (17) $\mu\text{g/ml}$ und bei 24-stündiger Exposition mit 32 (8,5) und 64 (17) $\mu\text{g/ml}$ sind deutlich zwei Zellpopulationen zu erkennen. Einige Zellen erscheinen völlig unverändert, während die anderen Zellen abgeflacht, verkleinert und zersetzt sind.

4. Ergebnisse

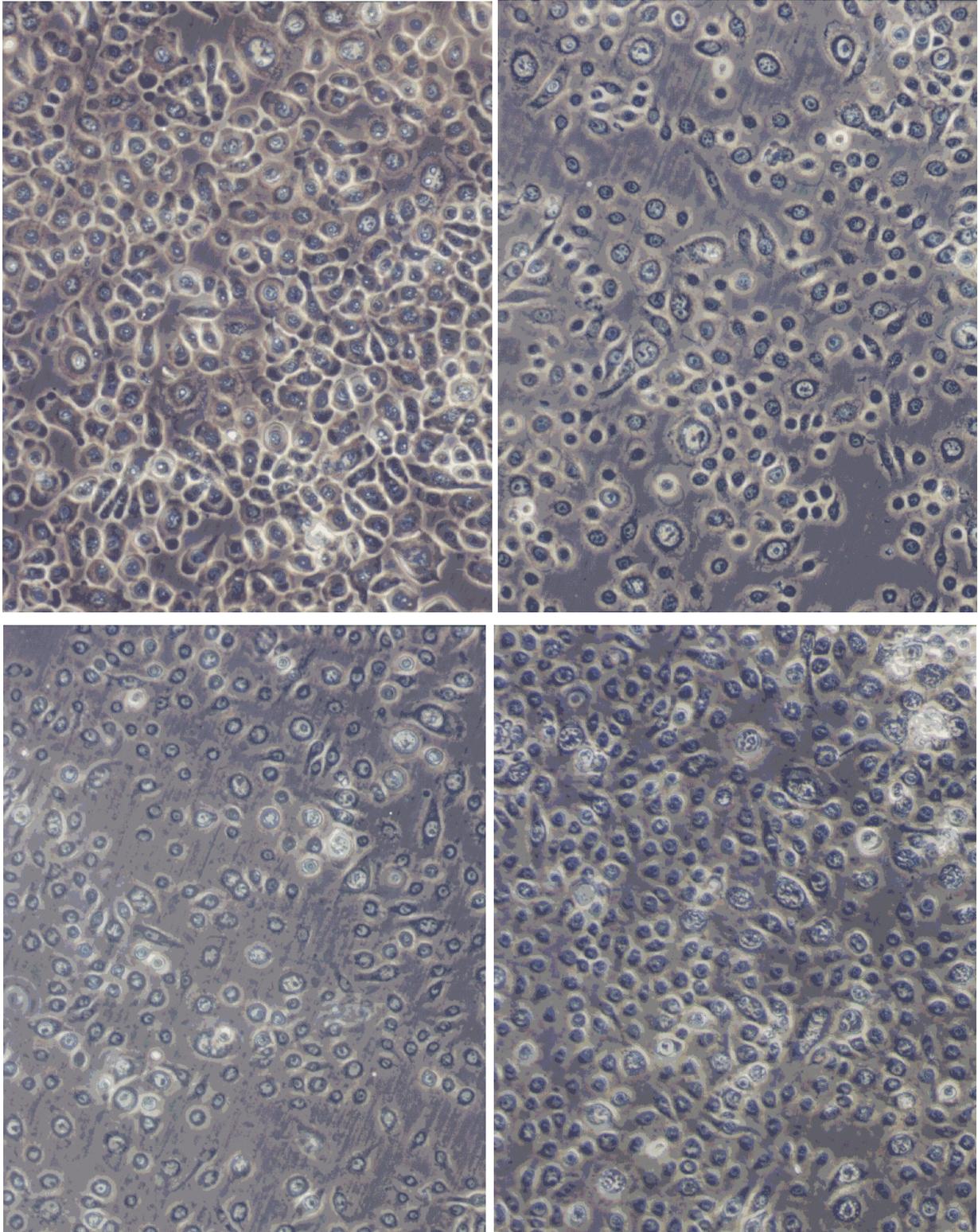


Abb. 104: HaCaT-Zellen nach 1-stündiger Exposition mit Natriumdodecylethersulfat 160fach vergrößert (oben links 128 (35) µg/ml; oben rechts 256 (70) µg/ml; unten links 512 (140) µg/ml; unten rechts 1024 (280) µg/ml)

4. Ergebnisse

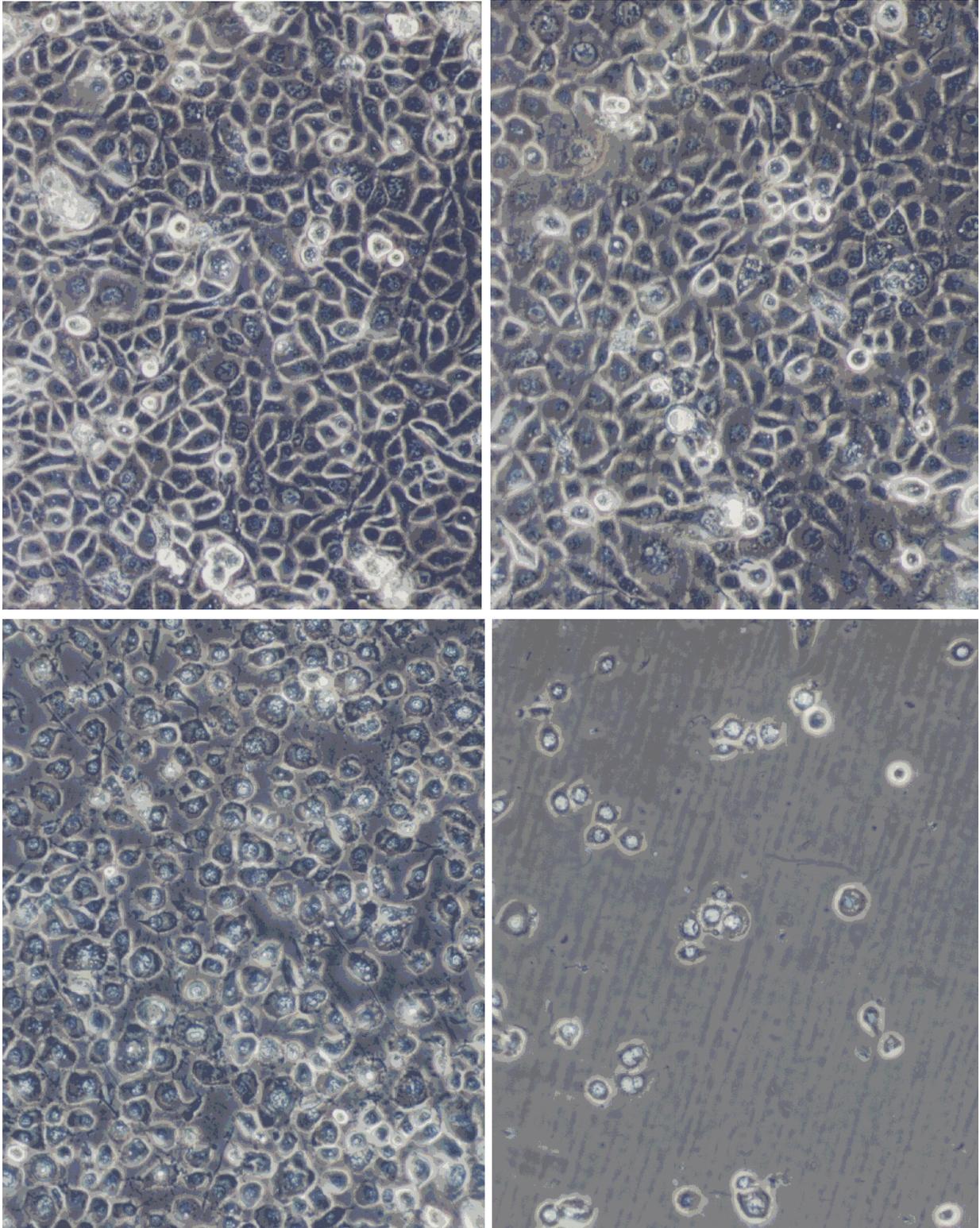


Abb. 105: HaCaT-Zellen nach 24-stündiger Exposition mit Natriumdodecylethersulfat 160fach vergrößert (oben links 64 (17) $\mu\text{g/ml}$; oben rechts 128 (35) $\mu\text{g/ml}$; unten links 256 (70) $\mu\text{g/ml}$; unten rechts 512 (140) $\mu\text{g/ml}$)

4. Ergebnisse

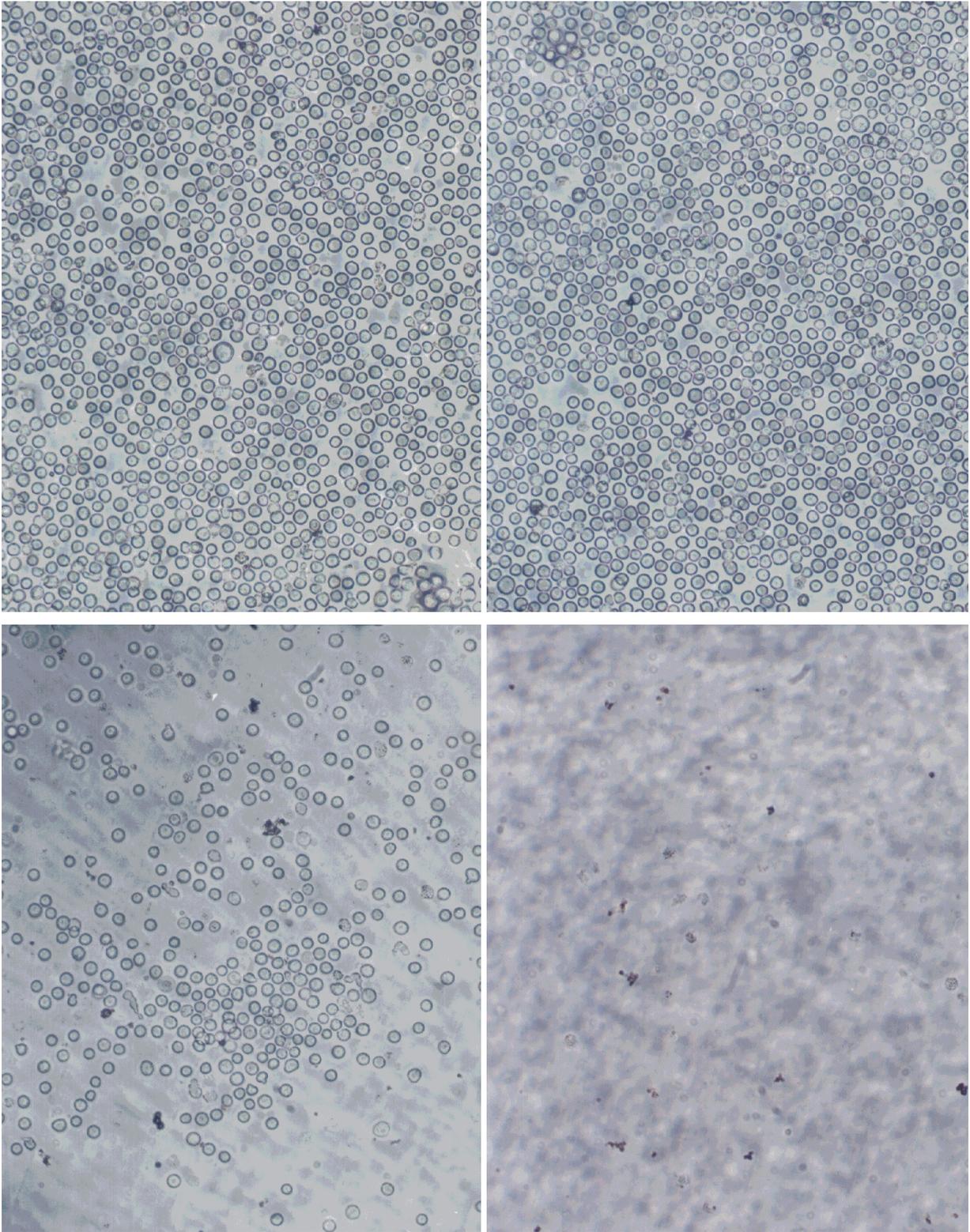


Abb. 106: U937-Zellen nach 1-stündiger Exposition mit Natriumdodecylethersulfat 160fach vergrößert (oben links 16 (4,2) µg/ml; oben rechts 32 (8,5) µg/ml; unten links 64 (17) µg/ml; unten rechts 128 (35) µg/ml)

4. Ergebnisse

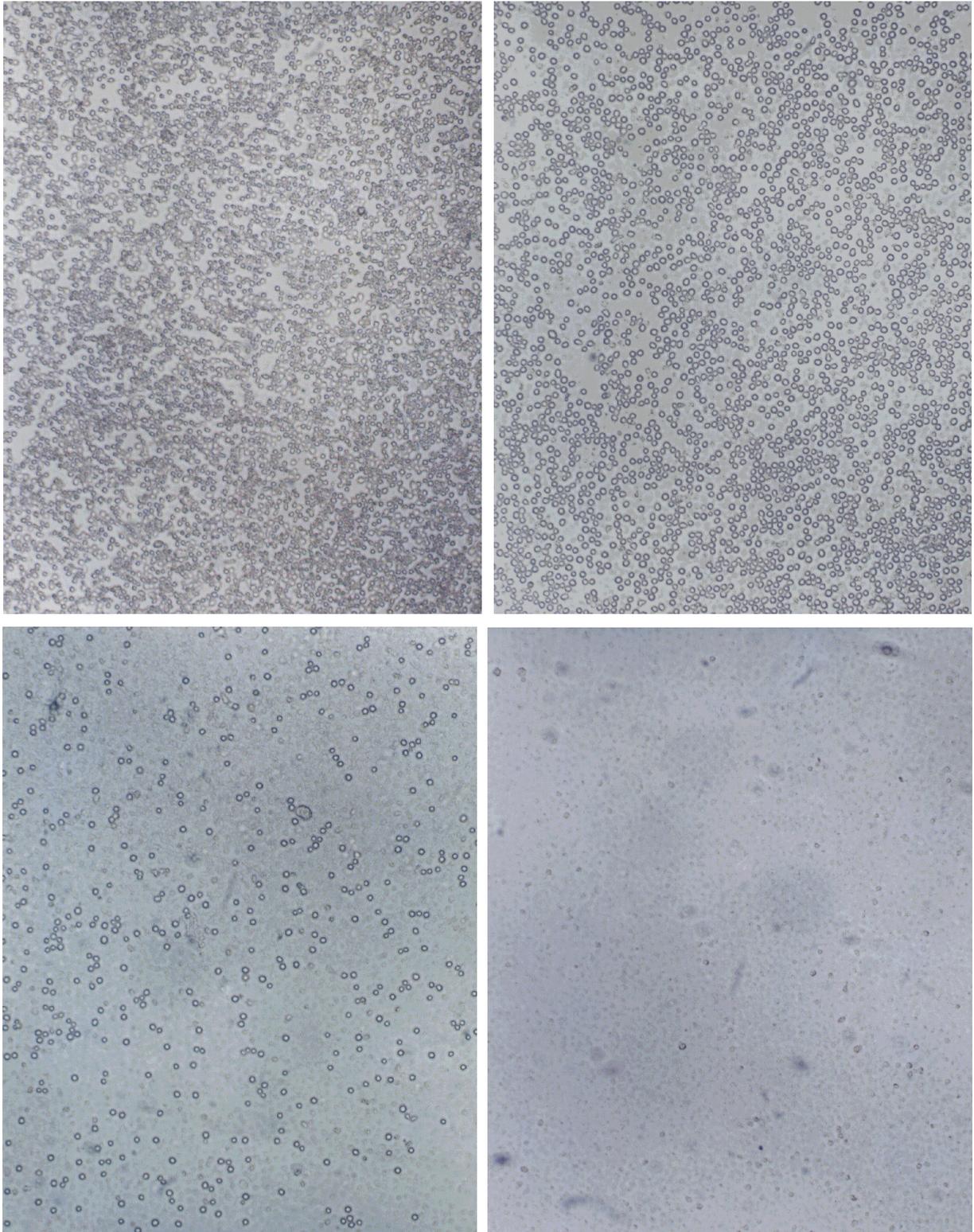


Abb. 107: U937-Zellen nach 24-stündiger Exposition mit Natriumdodecylethersulfat 40fach vergrößert (oben links 16 (4,2) µg/ml; oben rechts 32 (8,5) µg/ml; unten links 64 (17) µg/ml; unten rechts 128 (35) µg/ml)

4.3. Kationische Tenside

4.3.1. Benzalkoniumchlorid

Benzalkoniumchlorid ist im Europäischen Arzneibuch offizinell und einer der wichtigsten Vertreter der kationischen Tenside. Es handelt sich um eine quartäre Stickstoffverbindung, genauer um ein Gemisch von Alkylbenzoldimethylammoniumchloriden mit Kettenlängen von 8 bis 18 Kohlenstoffatomen. Die hydrophile Gruppe des Benzalkoniumchlorids ist ein positiv geladener Stickstoff. Die Darstellung erfolgt durch Benzilyerung von Dimethylalkylaminen. Zur Gewinnung der Dimethylalkylamine wird ein Gemisch höherer Fettsäuren zu den entsprechenden Alkoholen hydriert und in Alkylchloride überführt. Diese werden anschließend mit Dimethylamin in Gegenwart von NaOH zu Dimethylalkylaminen umgesetzt [79, 109].

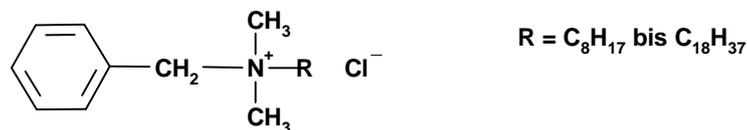


Abb. 108: Strukturformel von Benzalkoniumchlorid

Benzalkoniumchlorid ist sehr leicht löslich in Wasser und hygroskopisch. Das durchschnittliche Molekulargewicht beträgt 354.

Benzalkoniumchlorid wird nicht wie andere Tenside als waschaktive Substanz oder Emulgator eingesetzt. Es wird viel mehr wegen seiner mikrobiziden Wirkung zur Desinfektion und Konservierung verwendet. So gehört es zu den wichtigsten Konservierungsmitteln für Augen- und Nasentropfen. Die desinfizierende Wirkung nimmt jedoch mit pH-Werten unter 5 und in Gegenwart verschiedener nichtionischer Tenside ab.

Benzalkoniumchlorid ist laut ABDA-Datenbank in 535 Fertigarzneimitteln als Hilfsstoff enthalten. Es werden 272 Ophthalmika und 185 Rhinologika genannt. Auch orale Arzneiformen, wie Tropfen, werden mit Benzalkoniumchlorid konserviert, z.B. Mucosolvan® Tropfen. Des Weiteren wird Benzalkoniumchlorid als Wirkstoff zur Desinfektion von Haut und Schleimhaut verwendet, z.B. in Dorithricin® Lutschtabletten und Cutasept® Lösung.

In höheren Konzentrationen gilt Benzalkoniumchlorid als haut- und schleimhautreizend. Es ist oral mäßig giftig. Die LD₅₀ (Ratte, oral) liegt bei 400 mg/kg [79].

Zur Desinfektion der Haut wird Benzalkoniumchlorid 0,1-0,2%ig, zur Schleimhautdesinfektion und Säuberung von Wunden und Verbrennungen in Konzentrationen von 0,1%, zur Konservierung von Augentropfen 0,01%ig und in Lutschtabletten zur Hals- und Rachendesinfektion zu 1,2 mg als Einzeldosis eingesetzt. Die Höchstkonzentration in Kosmetika ist mit 0,1% festgelegt [79, 80, 109].

4. Ergebnisse

Zytotoxizität von Benzalkoniumchlorid

Die Ergebnisse von Benzalkoniumchlorid im Zytotoxizitätstest mit EZ4U an HaCaT-Zellen und U937-Zellen sind in der Abbildung 109 dargestellt.

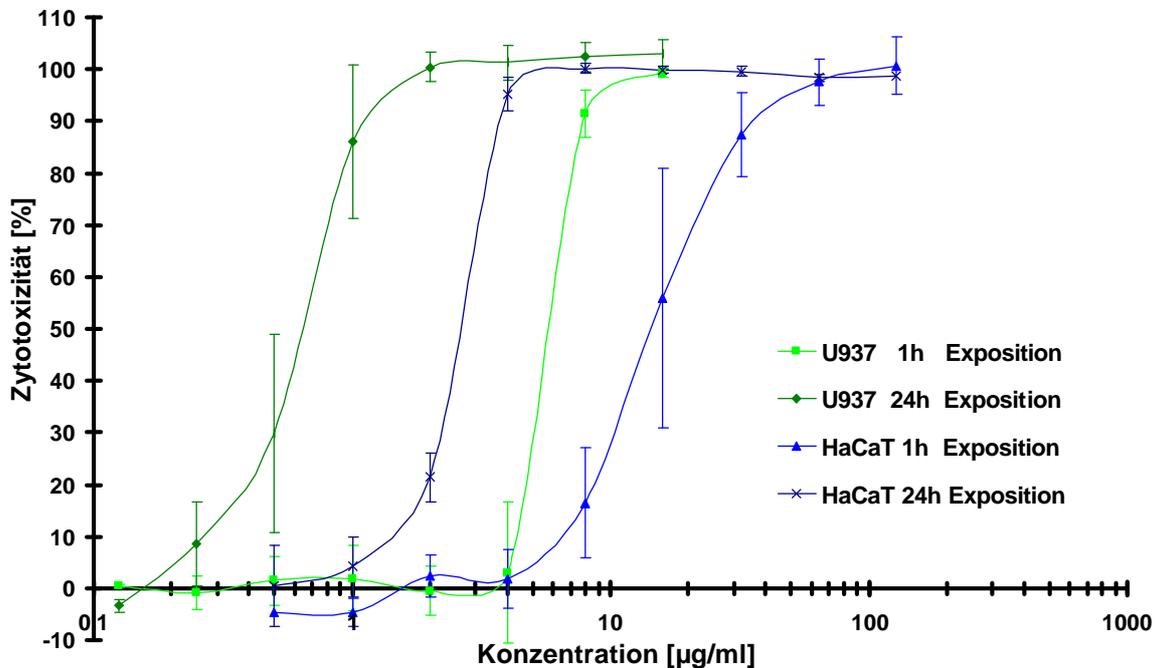


Abb. 109: Zytotoxizität von Benzalkoniumchlorid an U937- und HaCaT-Zellen nach 1 und 24 Stunden Exposition bei 37°C (n = 14)

Benzalkoniumchlorid ist von den untersuchten Tensiden am meisten zytotoxisch. Erst in Konzentrationen unter 0,1 µg Benzalkoniumchlorid pro ml war keine Zytotoxizität mehr nachzuweisen. Wie bei den anderen Tensiden ist auch bei Benzalkoniumchlorid eine deutliche Zunahme der Zytotoxizität mit der Zeit zu erkennen. Die Toxizität für HaCaT-Zellen nimmt nach 24 Stunden in Vergleich zu 1 Stunde um das ca. 6fache, die Toxizität für U937-Zellen um das 10fache zu. Tabelle 32 zeigt die halbmaximale zytotoxische Konzentration von Benzalkoniumchlorid an HaCaT- und U937-Zellen nach 1- und 24-stündiger Exposition.

Tabelle 32: Halbmaximale zytotoxische Konzentration (CC₅₀) von Benzalkoniumchlorid

| Exposition | U937-Zellen [µg/ml] | HaCaT-Zellen [µg/ml] |
|------------|---------------------|----------------------|
| 1h | 6,05 (5,21-7,03) | 15,2 (10,8-21,4) |
| 24h | 0,60 (0,47-0,78) | 2,46 (2,30-2,63) |

HaCaT-Zellen sind weniger empfindlich gegenüber Benzalkoniumchlorid als U937-Zellen. An U937-Zellen ist nach 24 Stunden ab einer Konzentration von ca. 2 µg/ml 100% Zytotoxizität

4. Ergebnisse

erreicht. Bei HaCaT-Zellen liegt die Zytotoxizität bei dieser Konzentration nur bei 20%. Erst ab 8 µg/ml waren 100% der HaCaT-Zellen abgestorben. Auch nach 1-stündiger Exposition sind diese Unterschiede in der Empfindlichkeit der beiden Zellarten schon zu erkennen. An U937-Zellen führt die Konzentrationen 16 µg/ml zu 100%, an HaCaT-Zellen lediglich zu 55% Zytotoxizität.

Für Benzalkoniumchlorid wurde an U937-Zellen auch die Trypanblaufärbung durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 110 dargestellt.

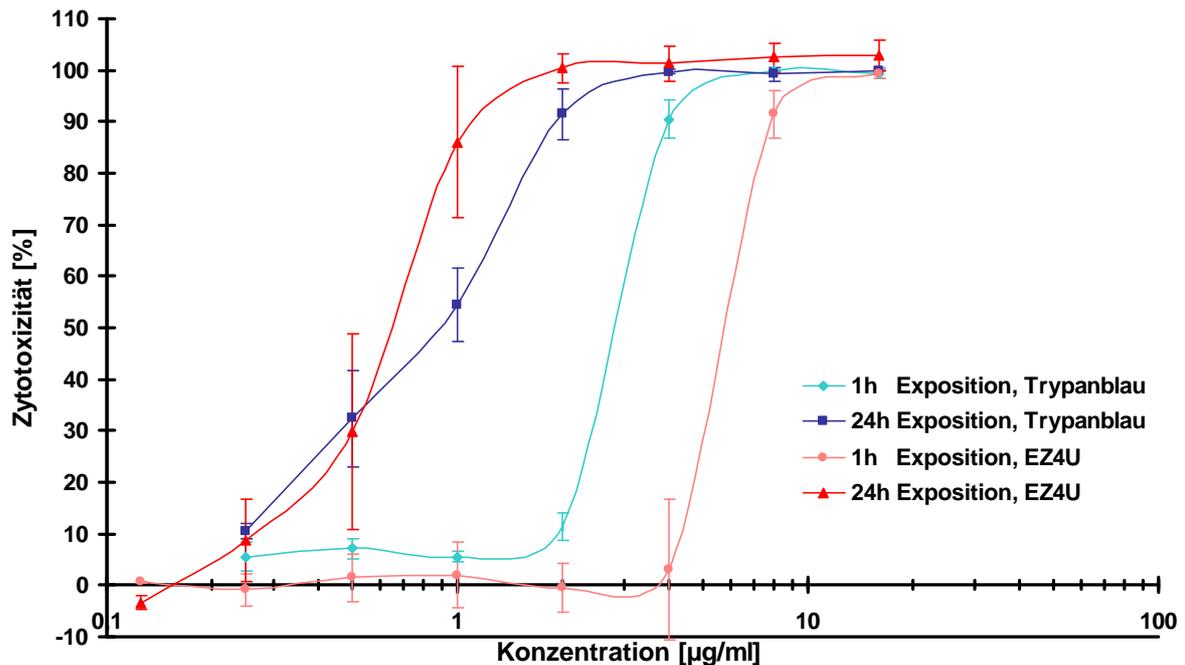


Abb. 110: Zytotoxizität von Benzalkoniumchlorid an U937- Zellen nach 1 und 24 Stunden Exposition bei 37°C Trypanblaufärbung (n = 15) im Vergleich zum XTT-Test (n = 15)

Nach 24-stündiger Exposition stimmen die Ergebnisse der Zytotoxizitätsuntersuchungen, abgesehen von der im EZ4U etwas höher bestimmten Zytotoxizität bei 1 µg/ml, überein. Nach 1 Stunde sind deutliche Unterschiede in der ermittelten Zytotoxizität vorhanden. Die Konzentrations-Wirkungs-Kurven verlaufen parallel, jedoch sind mit der Trypanblaufärbung wesentlich höhere Werte für die Zytotoxizität bestimmt worden. Die mittels EZ4U bestimmte CC_{50} ist doppelt so hoch wie die nach Trypanblaufärbung (Tab. 33).

Tabelle 33: Halbmaximale zytotoxische Konzentration (CC_{50}) von Benzalkoniumchlorid - Vergleich Trypanblaufärbung und XTT-Test

| Exposition | EZ4U [µg/ml] | Trypanblaufärbung [µg/ml] |
|------------|------------------|---------------------------|
| 1h | 6,05 (5,21-7,03) | 2,73 (2,63-2,83) |
| 24h | 0,60 (0,47-0,78) | 0,80 (0,69-0,92) |

4. Ergebnisse

Membrantoxizität von Benzalkoniumchlorid

Abbildung 111 zeigt die durch Benzalkoniumchlorid induzierte Arachidonsäure-Freisetzung.

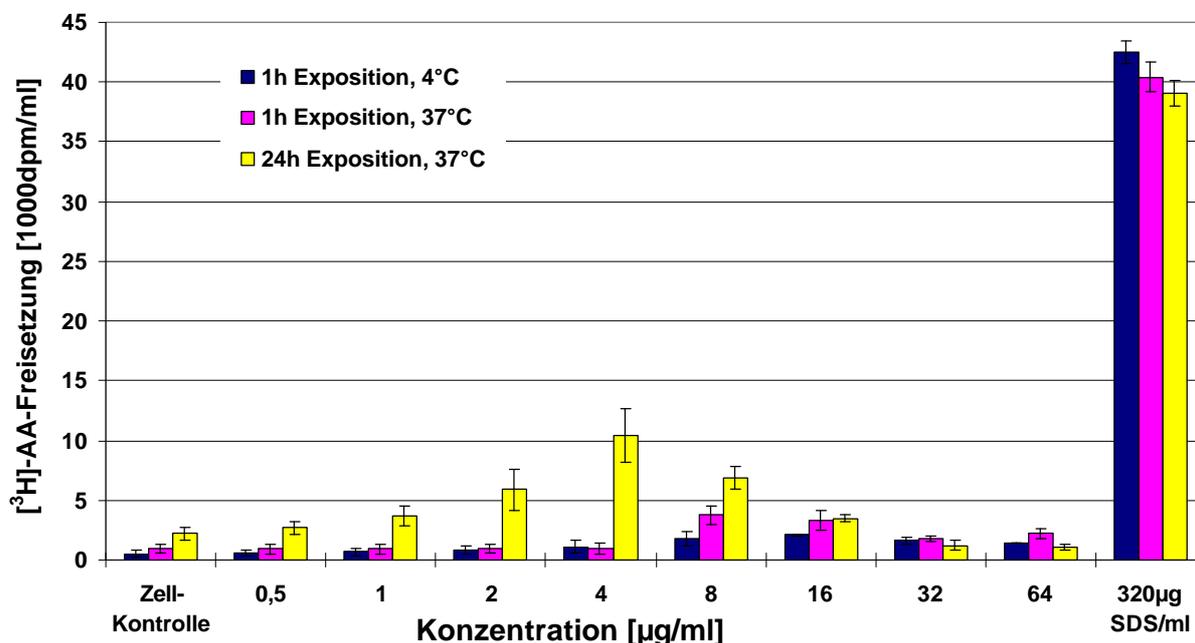


Abb. 111: [³H]Arachidonsäure-Freisetzung durch Benzalkoniumchlorid an U937-Zellen nach 1 und 24 Stunden Exposition bei 4°C (n = 9) und 37°C (n = 12)

Benzalkoniumchlorid führt weder nach 1- noch nach 24-stündiger Exposition zur maximalen Arachidonsäure-Freisetzung entsprechend der Positivkontrolle. Es ist jedoch ein konzentrationsabhängiger Anstieg der Arachidonsäure-Freisetzung im Vergleich zum Leerwert festzustellen, der nach einem Maximum jedoch wieder abfällt. Ein Maximum ist bei allen Expositionsbedingungen beobachtet worden, bei 1-stündiger Exposition liegt es bei 8 µg/ml, nach 24-stündiger Exposition befindet es sich bei 4 µg/ml. Die MTK-Werte von Benzalkoniumchlorid und die entsprechende Zytotoxizität bei der MTK sind in Tabelle 34 dargestellt.

Tabelle 34: Minimal toxische Konzentration (MTK) und Zytotoxizität bei der MTK von Benzalkoniumchlorid

| Exposition | MTK [µg/ml] | Zytotoxizität [%] |
|------------|-------------|-------------------|
| 1h, 37°C | 2,93 | 8,92 |
| 1h, 4°C | 1,56 | - |
| 24h, 37°C | 0,63 | 51,2 |

4. Ergebnisse

Im Konzentrationsbereich der MTK ist an den Zellen eine deutliche Zytotoxizität nachzuweisen. Nach 24 Stunden ist bei der MTK eine Zytotoxizität von über 50% bestimmt worden.

Apoptose durch Benzalkoniumchlorid

Bestimmung Histon-assoziiierter DNA-Fragmente mit ELISA

In Konzentrationen von 0,25 bis 64 $\mu\text{g/ml}$ wurde Benzalkoniumchlorid durch Bestimmung intrazellulärer Histon-assoziiierter DNA-Fragmente auf seine Apoptose-induzierenden Eigenschaften hin untersucht. Die Abbildung 112 gibt den Anreicherungsfaktor Histon-assoziiierter DNA-Fragmente in U937-Zellen nach 4- und 20-stündiger Exposition mit Benzalkoniumchlorid wieder.

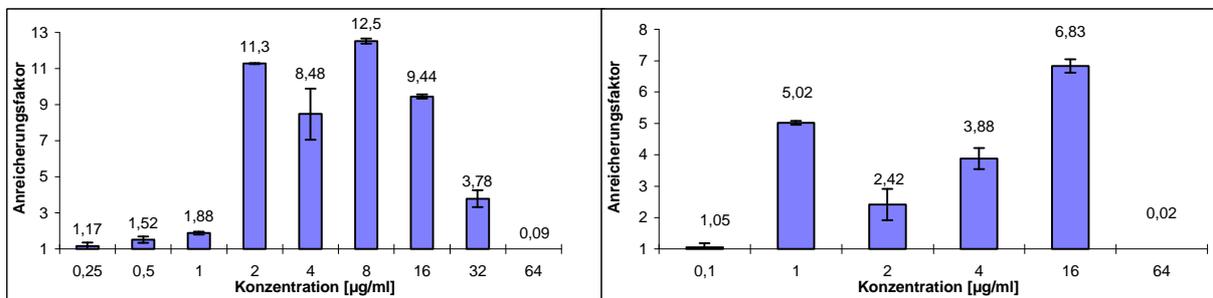


Abb. 112: Anreicherungsfaktor Histon-assoziiierter DNA-Fragmente in U937-Zellen nach 4-stündiger (links) und 20-stündiger (rechts) Exposition mit Benzalkoniumchlorid

Bei Konzentrationen von 1 bis 32 μg Benzalkoniumchlorid pro ml konnte eine deutliche Erhöhung (AF: 2 bis 12) von intrazellulären Histon-assoziierten DNA-Fragmenten in U937-Zellen nachgewiesen werden. Nach 4-stündiger Exposition sind zusätzlich bei 0,25 und 5 $\mu\text{g/ml}$ gering erhöhte Anreicherungsfaktoren ermittelt worden.

Durchflusszytometrische Bestimmungen

Benzalkoniumchlorid wurde in den Konzentrationen 0,1, 1, 2 und 8 $\mu\text{g/ml}$ durchflusszytometrisch mit der Annexin-V-Propidiumiodid-Färbung auf apoptotische Zellen hin untersucht. In den Konzentrationen 0,1, 1 und 8 $\mu\text{g/ml}$ konnte eine erhöhte Anzahl von frühapoptotischen Zellen nachgewiesen werden (Tab. 35).

Die Abbildung 113 gibt drei Dotplots wieder, die nach verschiedenen Expositionszeiten bei der Konzentration 1 $\mu\text{g/ml}$ ermittelt wurden. Bei dieser Konzentration war die Apoptose hauptsächliche Ursache des Zellsterbens. Je länger die U937-Zellen dem Benzalkoniumchlorid ausgesetzt waren, desto höher war die Anzahl frühapoptotischer und spätapoptotischer Zellen.

4. Ergebnisse

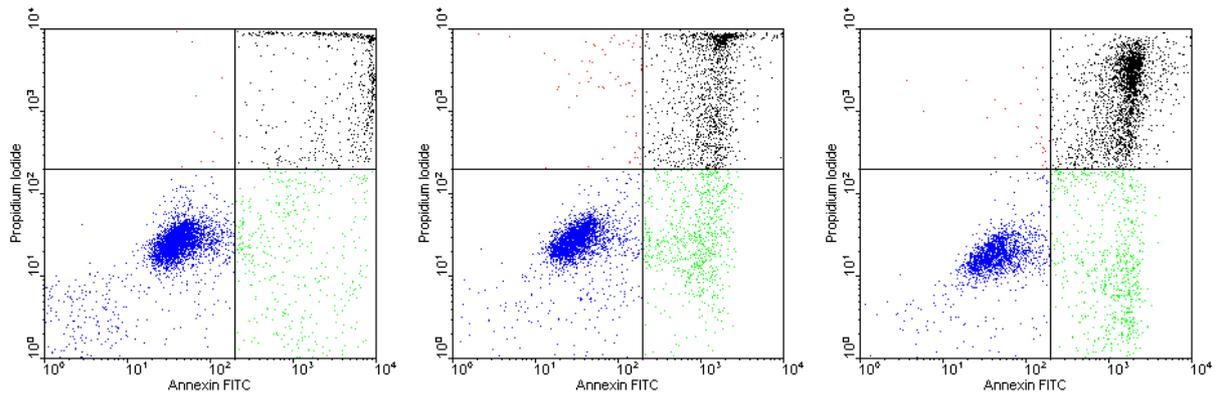


Abb. 113: Dotplot der U937-Zellen nach Exposition mit 1 µg Benzalkoniumchlorid pro ml und Annexin-V-Propidiumiodid-Färbung (von links nach rechts: nach 4, 20, 44 Stunden)

Die Abbildung 114 zeigt die Dotplots nach 20-stündiger Exposition mit verschiedenen Benzalkoniumchlorid-Konzentrationen. Bei 0,1 µg/ml stand wie bei 1 µg/ml die Apoptose im Vordergrund, bei 8 µg/ml waren die meisten Zellen mit Propidiumiodid gefärbt, also nekrotisch verändert. Bei 2 µg/ml befinden sich die meisten Zellen im Quadranten oben rechts. Eine eindeutige Zuordnung dieser Zellen zu spätapoptischen oder nekrotischen Zellen kann nicht getroffen werden.

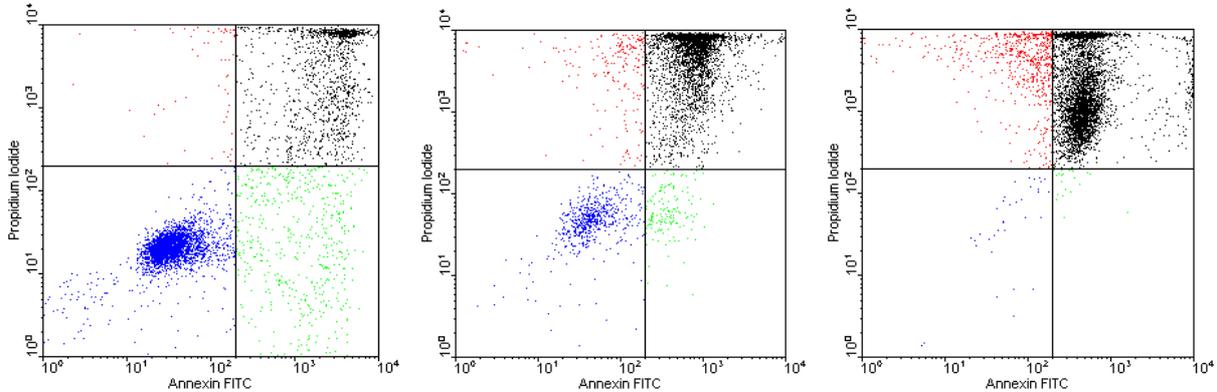


Abb. 114: Dotplot der U937-Zellen nach 20-stündiger Exposition mit Benzalkoniumchlorid und Annexin-V-Propidiumiodid-Färbung (von links nach rechts: 0,1, 2, 8 µg/ml)

Ob bei Benzalkoniumchlorid Apoptose oder Nekrose als Formen des Zelltodes auftreten, hängt sowohl von der Konzentration als auch von der Expositionszeit ab.

In Tabelle 35 sind die Ergebnisse der durchflusszytometrischen Untersuchungen zusammengefasst. Erhöhte Werte frühapoptischer Zellen sind fettgedruckt.

4. Ergebnisse

Tabelle 35: Prozentuale Verteilung der U937-Zellen auf die festgelegten Quadranten des Dotplots nach Exposition mit Benzalkoniumchlorid im Vergleich zur Zellkontrolle b

| Exposition | 4 h | | 20 h | | 44 h | |
|------------------------------|--------------------------------------|------|-------------|------|-------------|------|
| Konzentration | 0,1 µg/ml Benzalkoniumchlorid | | | | | |
| U937-Zellen [%] | | ZK b | | ZK b | | ZK b |
| primär nekrotisch | 0,40 | 1,42 | 1,22 | 0,90 | 0,76 | 0,78 |
| nekrotisch / spätapoptotisch | 7,10 | 8,78 | 26,0 | 22,1 | 17,6 | 14,0 |
| frühapoptotisch | 7,98 | 5,30 | 10,7 | 10,5 | 5,68 | 5,34 |
| unverändert | 84,5 | 84,5 | 62,0 | 66,5 | 75,9 | 79,9 |
| Konzentration | 1 µg/ml Benzalkoniumchlorid | | | | | |
| U937-Zellen [%] | | ZK b | | ZK b | | ZK b |
| primär nekrotisch | 0,18 | 1,42 | 1,36 | 0,90 | 0,66 | 0,78 |
| nekrotisch / spätapoptotisch | 12,1 | 8,78 | 29,0 | 22,1 | 48,6 | 14,0 |
| frühapoptotisch | 9,06 | 5,30 | 14,4 | 10,5 | 14,9 | 5,34 |
| unverändert | 78,7 | 84,5 | 55,2 | 66,5 | 35,9 | 79,9 |
| Konzentration | 2 µg/ml Benzalkoniumchlorid | | | | | |
| U937-Zellen [%] | | ZK b | | ZK b | | |
| primär nekrotisch | 1,54 | 1,42 | 4,12 | 0,90 | | |
| nekrotisch / spätapoptotisch | 24,6 | 8,78 | 80,7 | 22,1 | | |
| frühapoptotisch | 5,24 | 5,30 | 3,06 | 10,5 | | |
| unverändert | 68,6 | 84,5 | 12,1 | 66,5 | | |
| Konzentration | 8 µg/ml Benzalkoniumchlorid | | | | | |
| U937-Zellen [%] | | ZK b | | ZK b | | |
| primär nekrotisch | 2,86 | 1,42 | 12,4 | 0,90 | | |
| nekrotisch / spätapoptotisch | 71,9 | 8,78 | 86,5 | 22,1 | | |
| frühapoptotisch | 12,3 | 5,30 | 0,44 | 10,5 | | |
| unverändert | 12,9 | 84,5 | 0,70 | 66,5 | | |

Morphologische Veränderungen durch Benzalkoniumchlorid

HaCaT-Zellen

Nach der Exposition mit Benzalkoniumchlorid wurden folgende Veränderungen an den HaCaT-Zellen festgestellt:

- Abrundung
- Ablösen der Zellen von der Oberfläche
- Schrumpfung
- Lyse

HaCaT-Zellen nach 1- und 24-stündiger Exposition mit Benzalkoniumchlorid sind in den Abbildungen 115 und 116 dargestellt. Die HaCaT-Zellen lösen sich bei Exposition mit Benzalkoniumchlorid von der Oberfläche ab. Nach 1-stündiger Exposition ballen sich einige Zellen zusammen, andere Zellen schwellen an. Bei 32 µg/ml und nach 24-stündiger Exposition ist die auch bei anderen Tensiden beobachtete Zellveränderung mit Zusammenballung des Zytoplasma um den Kern und blasenartigem Aussehen der Zellmembran zu beobachten. Nach 24-stündiger Exposition sind bei allen Konzentrationen vermehrt Zellfragmente vorhanden, was auf Zellyse hindeutet. Bei 8 bis 32 µg/ml sind die Zellen überwiegend geschrumpft. Apoptotische Zellen sind zu beobachten.

4. Ergebnisse

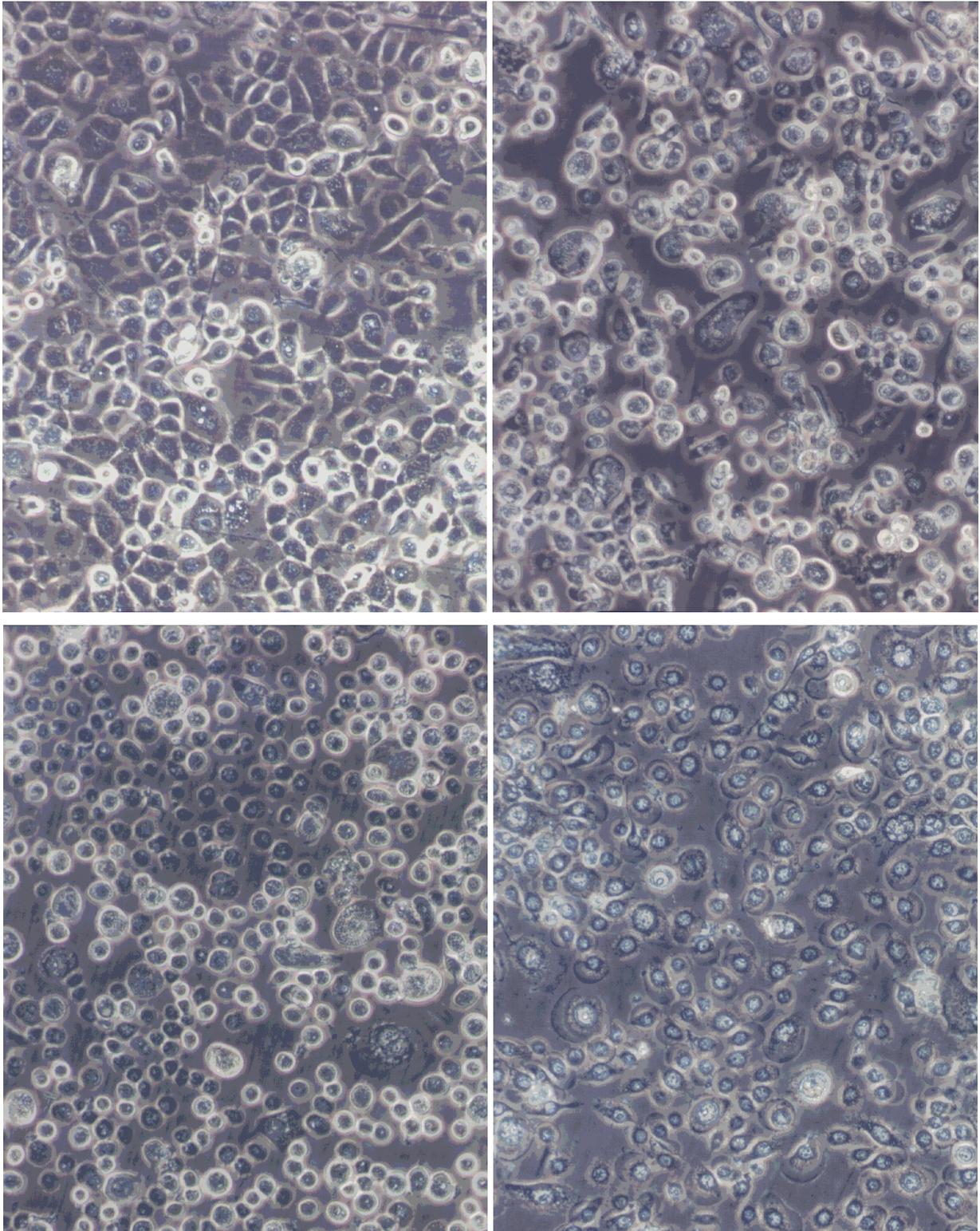


Abb. 115: HaCaT-Zellen nach 1-stündiger Exposition mit Benzalkoniumchlorid 160fach vergrößert (oben links 4 $\mu\text{g/ml}$; oben rechts 8 $\mu\text{g/ml}$; unten links 16 $\mu\text{g/ml}$; unten rechts 32 $\mu\text{g/ml}$)

4. Ergebnisse

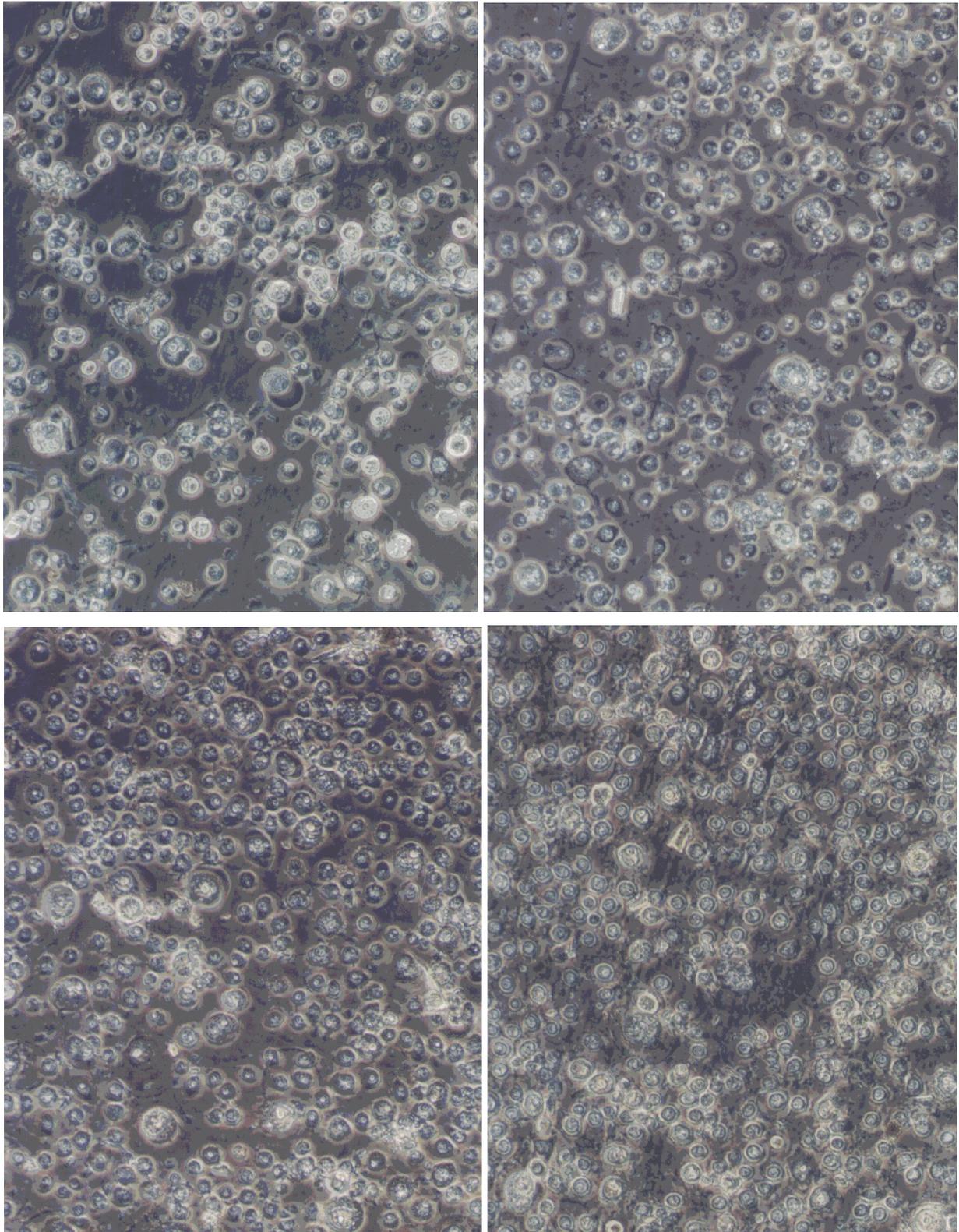


Abb. 116: HaCaT-Zellen nach 24-stündiger Exposition mit Benzalkoniumchlorid 160fach vergrößert (oben links 4 µg/ml; oben rechts 8 µg/ml; unten links 16 µg/ml; unten rechts 32 µg/ml)

U937-Zellen

An den U937 Zellen wurden folgende Veränderungen nach der Exposition mit Benzalkoniumchlorid beobachtet:

- Schrumpfung
- Zellen erscheinen flach und durchscheinend
- Zellen sind kleiner und weisen eine aufgeraute Oberfläche auf

In den Abbildungen 117 bis 120 sind die U937-Zellen nach 1- und 24-stündiger Exposition mit Benzalkoniumchlorid abgebildet.

Bei den Konzentrationen 0,25 bis 16 µg/ml sind vor allem nach 24-stündiger Exposition, wie es auch bei den HaCaT-Zellen zu beobachten war, vermehrt Zellfragmente vorhanden, was auf Zellyse hindeutet (Abb. 117 bis 120). In höheren Konzentrationen (32 und 64 µg/ml) verursacht Benzalkoniumchlorid jedoch keine Lyse. Die Zellen gleichen teilweise ihrem Aussehen nach lebenden Zellen. Sie sind jedoch laut EZ4U nicht mehr lebensfähig. Es scheint als wären die Zellen in ihrer Form fixiert (Abb. 118 u. 120). Bei 1-stündiger Exposition mit 64 µg/ml erscheinen die Zellen lediglich stark verkleinert. Sie behalten aber eine glatte Oberfläche (Abb. 118). Die geringen Zellveränderungen bei Exposition mit höheren Benzalkoniumchlorid-Konzentrationen deuten auf eine intakt gebliebene Zellmembran hin. Dies und die fehlende Lyse oberhalb einer bestimmten Konzentration könnten Erklärungsmöglichkeiten für die im AART beobachteten Maxima sein.

Geringere Benzalkoniumchlorid-Konzentrationen führen bei den U937-Zellen zu den typischen morphologischen Veränderungen der Apoptose. Es sind vor allem bei 0,25 und 0,5 µg/ml nach 1-stündiger und bei 0,25 bis 1- µg/ml nach 24-stündiger Exposition Ausstülpungen der Zellmembran, apoptotische Körperchen, zu erkennen (Abb. 117 u. 119). Bei 1-stündiger Exposition mit 1 µg Benzalkoniumchlorid pro ml sind deutlich zwei Zellpopulationen zu erkennen (Abb. 117). Bei Exposition mit Konzentrationen über 1 µg/ml sehen die Zellen eher nekrotisch verändert aus. Hier erscheinen die Zellen im Durchmesser größer, also eher geschwollen und abgeflacht (Abb. 117 u. 118). Die morphologischen Beobachtungen stimmen mit den Ergebnissen der Apoptose-Untersuchungen überein.

4. Ergebnisse

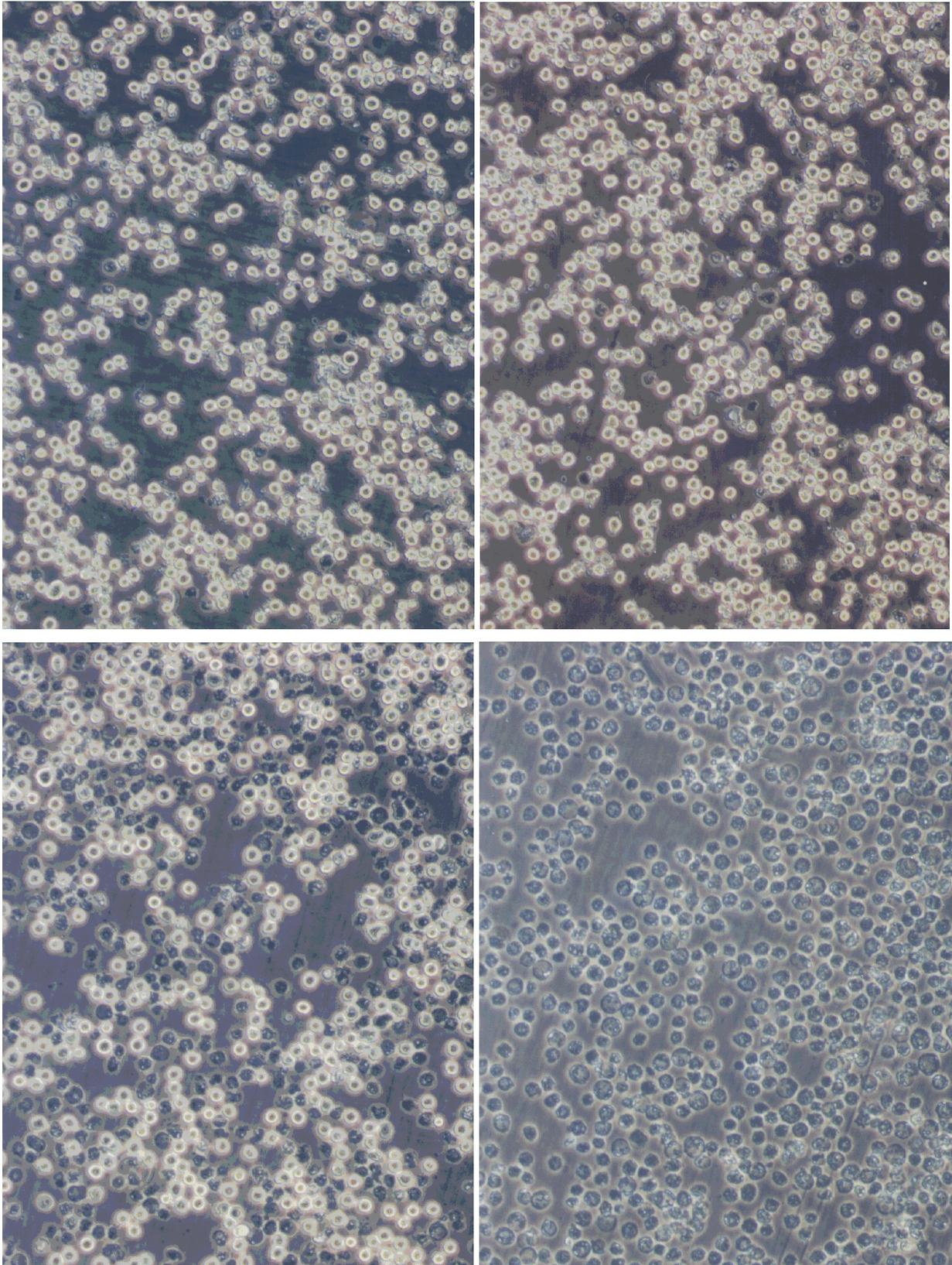


Abb. 117: U937-Zellen nach 1-stündiger Exposition mit Benzalkoniumchlorid 160fach vergrößert (Phasenkontrast; oben links 0,25 µg/ml; oben rechts 0,5 µg/ml; unten links 1 µg/ml; unten rechts 2 µg/ml)

4. Ergebnisse

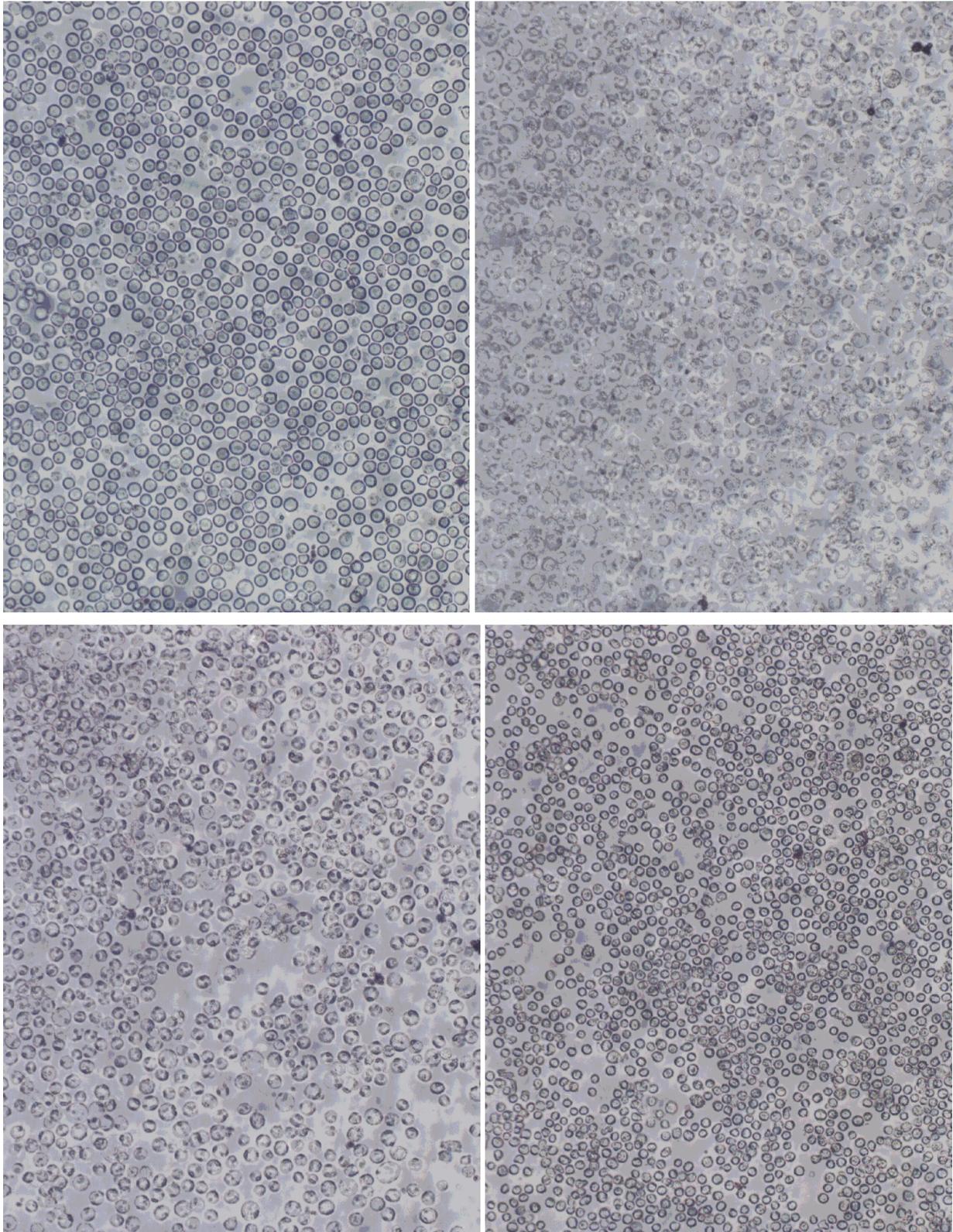


Abb. 118: U937-Zellen nach 1-stündiger Exposition mit Benzalkoniumchlorid 160fach vergrößert (oben links 8 µg/ml; oben rechts 16 µg/ml; unten links 32 µg/ml; unten rechts 64 µg/ml)

4. Ergebnisse

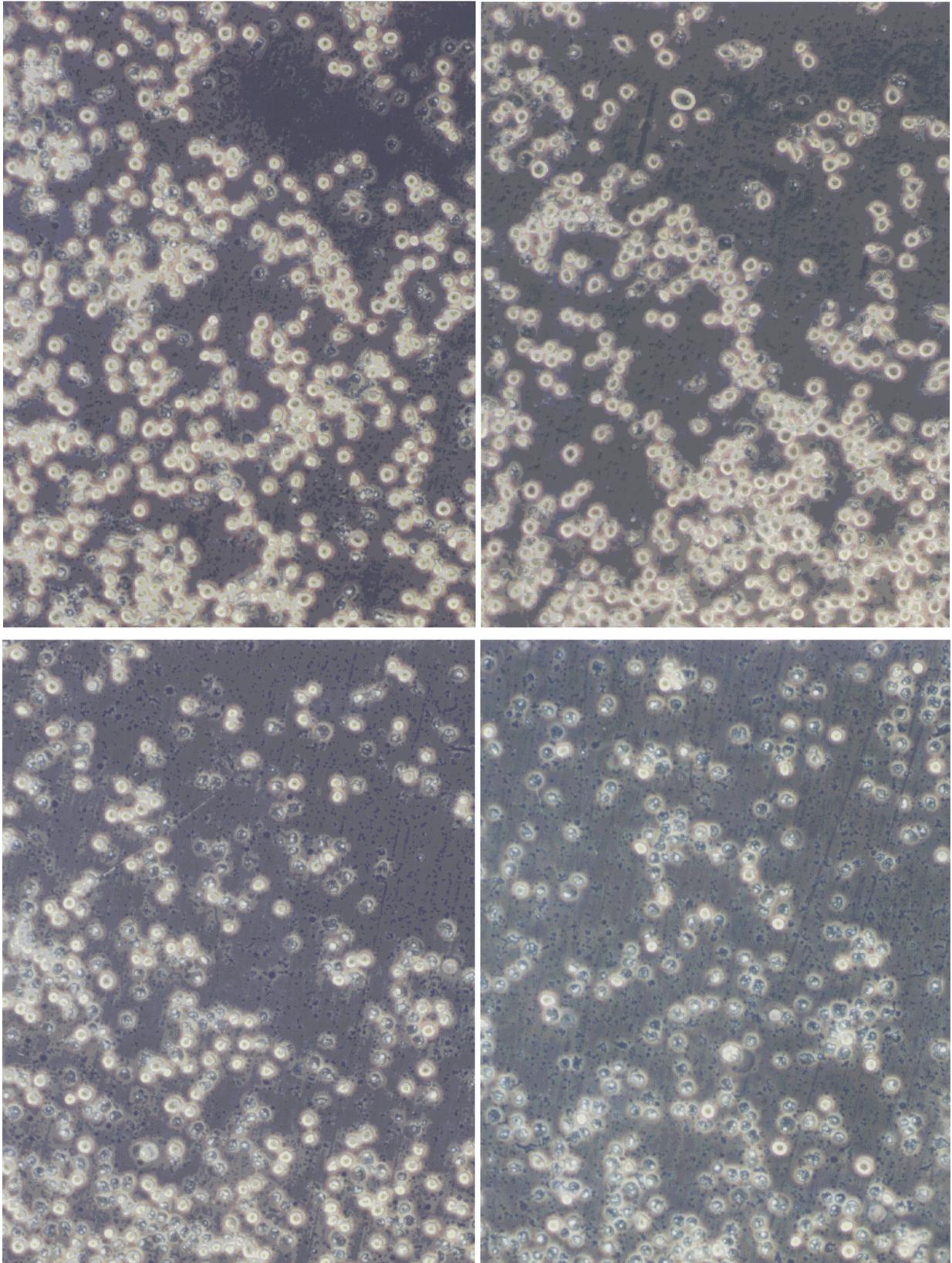


Abb. 119: U937-Zellen nach 24-stündiger Exposition mit Benzalkoniumchlorid 160fach vergrößert (Phasenkontrast; oben links 0,25 µg/ml; oben rechts 0,5 µg/ml; unten links 1 µg/ml; unten rechts 2 µg/ml)

4. Ergebnisse

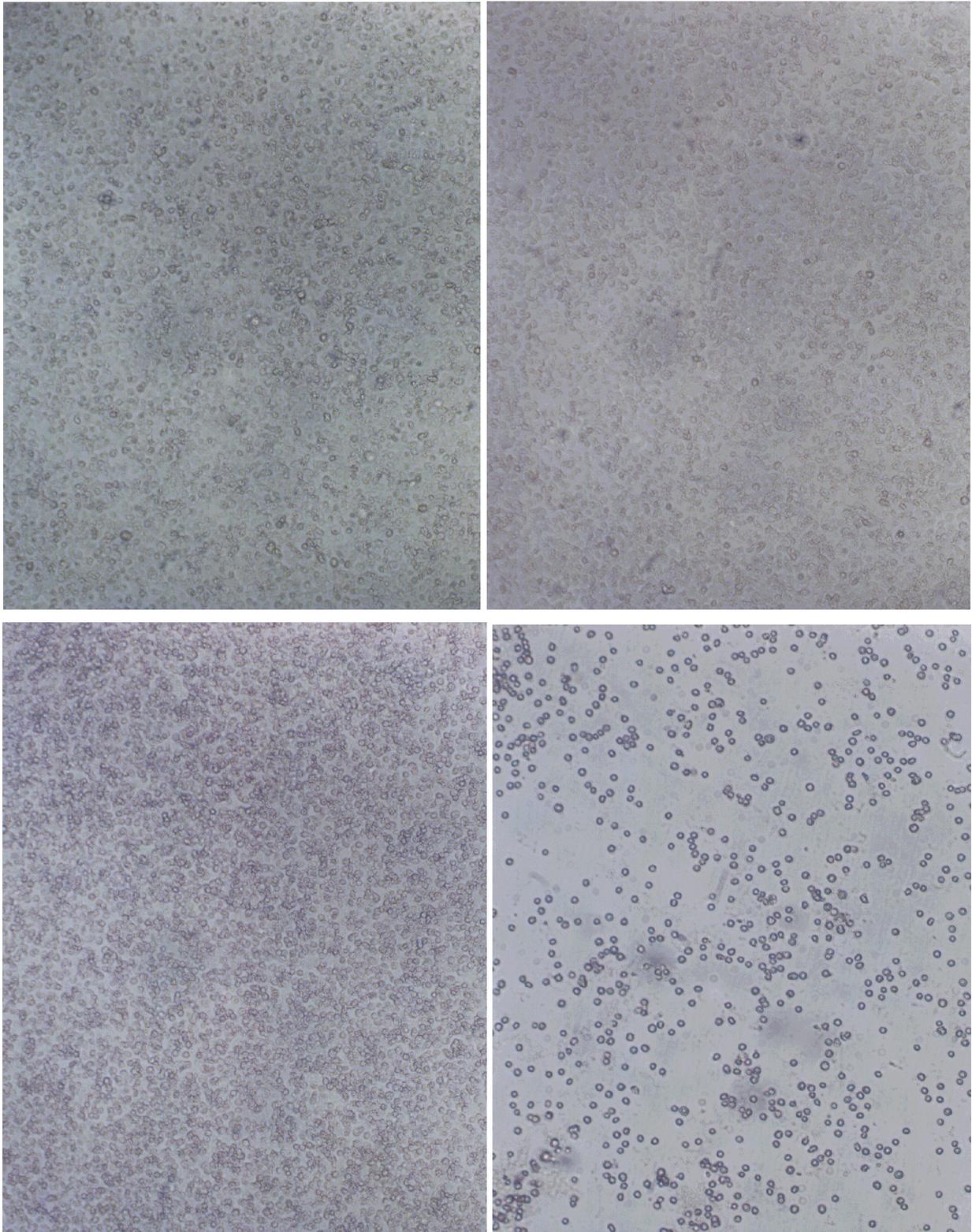


Abb. 120: U937-Zellen nach 24-stündiger Exposition mit Benzalkoniumchlorid 40fach vergrößert (oben links 8 µg/ml; oben rechts 16 µg/ml; unten links 32 µg/ml; unten rechts 64 µg/ml)

4.4. Amphotere Tenside

4.4.1. Cocamidopropylbetain

Cocamidopropylbetain ist ein amphoterer Tensid mit sowohl anionischen als auch kationischen hydrophilen Gruppen im Molekül. Die im DAC 97 offizielle Standardzubereitung ist eine 30%ige Lösung von Fettsäureamidopropyldimethylaminoessigsäurebetain. Sie enthält 4,5-5,5% Natriumchlorid. Sie ist mit Wasser mischbar, Konservierungsmittel und Stabilisatoren können zugesetzt sein. Der pH-Wert liegt zwischen 4,5 und 5,5 [2].

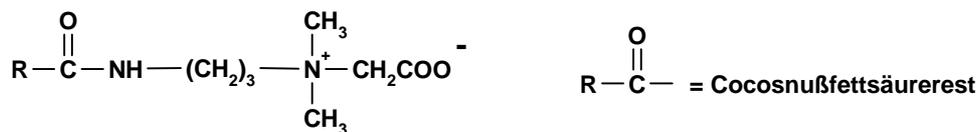


Abb. 121: Strukturformel von Cocoamidopropylbetain

Cocamidopropylbetain ist ein Cotensid zur Herstellung von Shampoos und Waschlösungen. Es ist verträglich und kalt mischbar mit den meisten anderen Tensiden. Ein Cocoamidopropylbetainzusatz verbessert die Hautverträglichkeit von anionischen Tensiden [64, 65]. Es wirkt konditionierend, viskositätserhöhend, haut- und haarpflegend und ist beständig in einem pH-Bereich von 2-11 [79].

Cocamidopropylbetain ist laut ABDA-Datenbank in 36 Fertigarzneimitteln als Hilfsstoff enthalten. Vor allem in Shampoos und Bädern, z.B. Berniter[®]-Kopfhautgel, Cloderm[®] Lösung, Thymian Li II[®] Erkältungsbad, ist Cocamidopropylbetain zu finden [1]. Cocamidopropylbetain gilt als nicht irritierend auf der Haut. Es ist jedoch stark augenreizend. Nach längerem und wiederholtem Kontakt sind Reizungen an Haut und Schleimhaut nicht auszuschließen [215]. Des Weiteren sind Kontaktallergien durch Cocamidopropylbetain beschrieben worden [34, 54], die wahrscheinlich auf enthaltenes 3-Dimethylaminopropylamine zurückzuführen sind [8, 9].

Es wurden drei Handelsprodukte von Cocamidopropylbetain, das Standardprodukt TEGO-Betain[®] L7, das wasserfreie Produkt TEGO-Betain[®] CKD und das salzarme Produkt TEGO-Betain[®] E, untersucht. Das Standardprodukt Tego-Betain[®] L7 entspricht dem DAC 97. Mit einem Aktivgehalt von 31% besitzt es ein gutes Schaumvermögen mit einem Schaum guter Qualität. Seine Tensid- und Schaumbildungseigenschaften sind nicht von der Wasserhärte abhängig. Die LD₅₀ (Ratte, oral) liegt bei 8,1 ml/kg [215].

TEGO-Betain[®] CKD liegt praktisch wasserfrei als Pulver vor. Der Aktivgehalt beträgt 85%. Der Natriumchloridgehalt liegt bei 13-16,5%. Der Wassergehalt ist mit maximal 3% begrenzt. Die 10%ige Lösung weist einen pH-Wert von 4,5-5,5 auf. TEGO-Betain[®] CKD wird wegen

4. Ergebnisse

seines neutralen Geschmacks besonders für die Verwendung in Zahnpasten und Mundwässern empfohlen. Weiterhin ist es, da es wasserfrei vorliegt, zur Herstellung von Seifen- und Waschsyndetstücken geeignet. Es kann allein oder in Kombination verwendet werden. Die LD₅₀ (Ratte, oral) der 30%igen Lösung liegt bei 5 g/kg [215].

TEGO-Betain® E mit dem gleichen Aktivgehalt wie das Standardprodukt (31%) ist eine salzarme Zubereitung. Der Kochsalzgehalt liegt bei 0,44 %. Es ist besonders für Aerosole und elektrolytempfindliche Formulierungen, z.B. Farbsampoos, geeignet. Die LD₅₀ (Ratte, oral) liegt bei 5 g/kg [215].

Da Cocamidopropylbetain als 31%ige Lösung bzw. als Pulver mit 85% Aktivgehalt untersucht worden ist, wurden die Endergebnisse auf den Aktivgehalt berechnet. Bei den Erläuterungen der Ergebnisse ist diese berechnete Konzentration in Klammern angegeben. Die in den Diagrammen angegebenen Konzentrationen beziehen sich auf die 31%ige Lösung bzw. auf das 85%ige Pulver.

Zytotoxizität von Cocamidopropylbetain

In der Abbildung 122 sind die Ergebnisse von TEGO-Betain® L7 im Zytotoxizitätstest mit EZ4U an HaCaT-Zellen und U937-Zellen dargestellt. In Cocamidopropylbetain-Konzentrationen unter 2 (0,6) µg/ml war auch nach 24 Stunden noch keine Zytotoxizität zu erkennen.

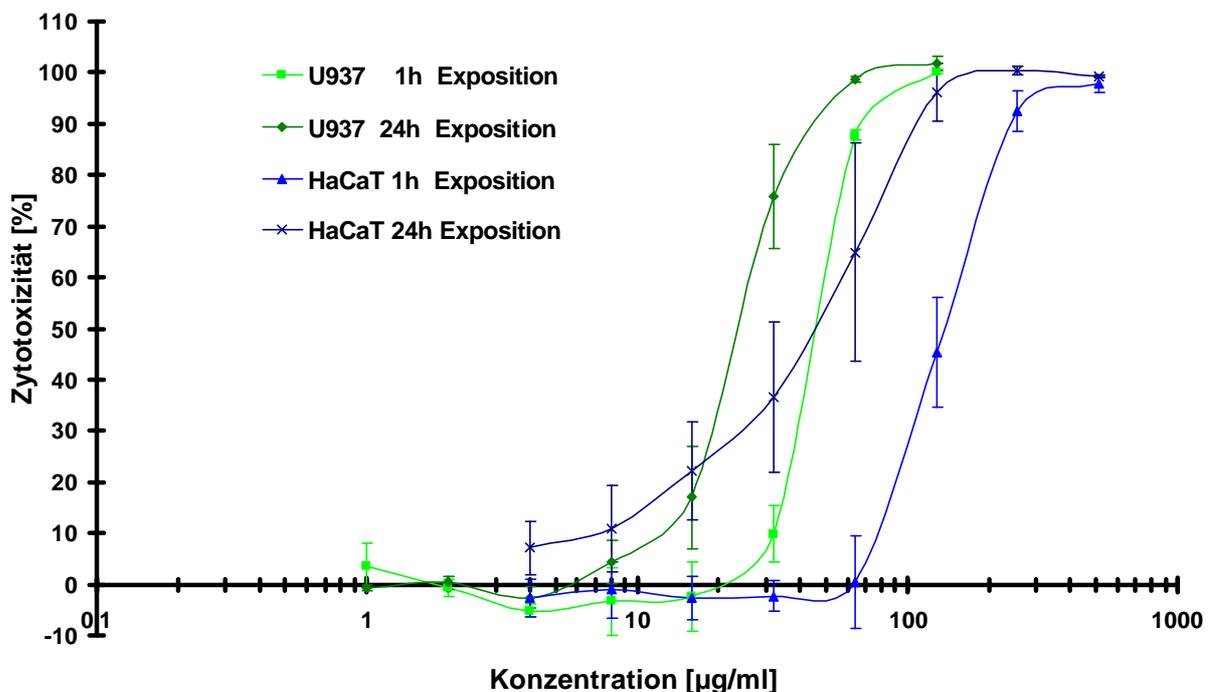


Abb. 122: Zytotoxizität von TEGO-Betain® L7 an U937-Zellen (n = 14) und HaCaT-Zellen (n = 15) nach 1 und 24 Stunden Exposition bei 37°C

4. Ergebnisse

Es ist wie bei den anderen Tensiden eine deutliche Zunahme der Zytotoxizität mit der Zeit zu erkennen. Die Zytotoxizität nach 24-stündiger Exposition im Vergleich zur 1-stündigen Exposition ist an U937-Zellen um das ca. 2fache, an HaCaT-Zellen um das ca. 4fache erhöht.

HaCaT-Zellen sind weniger empfindlich gegenüber Cocamidopropylbetain als U937-Zellen. An U937-Zellen sind nach 24 Stunden ab einer Konzentration von ca. 64 (20) µg/ml 100% Zytotoxizität erreicht. An HaCaT-Zellen liegt nach 24 Stunden die Zytotoxizität bei dieser Konzentrationen nur bei 60%. Erst ab 150 (45) µg/ml sind 100% Zytotoxizität an HaCaT-Zellen erreicht. Nach 1-stündiger Exposition sind die Unterschiede in der Empfindlichkeit der beiden Zelllinien noch deutlicher. Bei 130 (40) µg/ml waren 100% der U937-Zellen tot, während an HaCaT-Zellen bei dieser Konzentration lediglich 40% Zytotoxizität zu bestimmen waren.

An HaCaT-Zellen sind keine Unterschiede in der Zytotoxizität der drei verschiedenen Handelsprodukte des Cocamidopropylbetains zu erkennen. An U937-Zellen ist TEGO-Betain® E sowohl nach einer als auch nach 24 Stunden zytotoxischer als TEGO-Betain® L7. Diese Unterschiede sind jedoch nicht signifikant.

Tabelle 36 fasst die CC₅₀-Werte von TEGO-Betain® L7, TEGO-Betain® CKD und TEGO-Betain® E an HaCaT- und U937-Zellen nach 1- und 24-stündiger Exposition zusammen.

Tabelle 36: Halbmaximale zytotoxische Konzentration (CC₅₀) von Cocamidopropylbetain

| Exposition | U937-Zellen [µg/ml] | | HaCaT-Zellen [µg/ml] | |
|------------|---------------------|---------------------------|----------------------|---------------------------|
| | TEGO-Betain® L7 | | | |
| | 31%ige Lösung | berechnet auf Aktivgehalt | 31%ige Lösung | berechnet auf Aktivgehalt |
| 1h | 43,2 (38,7-48,2) | 13,4 (12,0-14,9) | 142 (120-168) | 44,1 (37,2-52,2) |
| 24h | 24,1 (20,3-28,6) | 7,47 (6,29-8,86) | 35,2 (22,5-55,2) | 10,9 (6,97-17,1) |
| | TEGO-Betain® CKD | | | |
| | Pulver (85%) | berechnet auf Aktivgehalt | Pulver (85%) | berechnet auf Aktivgehalt |
| | 1h | 17,8 (12,6-25,2) | 15,1 (10,7-21,4) | 45,2 (39,6-51,6) |
| 24h | 5,06 (2,84-9,02) | 4,30 (2,41-7,67) | 13,0 (11,1-15,3) | 11,1 (9,44-13,0) |
| | TEGO-Betain® E | | | |
| | 31%ige Lösung | berechnet auf Aktivgehalt | 31%ige Lösung | berechnet auf Aktivgehalt |
| | 1h | 27,1 (17,9-41,1) | 8,39 (5,53-12,7) | 134 (120-149) |
| 24h | 9,74 (5,41-17,5) | 3,02 (1,68-5,43) | 41,1 (32,1-52,8) | 12,7 (9,94-16,4) |

4. Ergebnisse

Cocamidopropylbetain wurde auch in Kombination mit Natriumdodecylsulfat auf die Zytotoxizität im EZ4U an U937-Zellen untersucht. Die Zytotoxizität des Gemisches entspricht nach einer Stunde Exposition den Zytotoxizitätswerten der einzelnen Tenside. Nach 24-stündiger Exposition ist das Gemisch signifikant weniger toxisch als Natriumdodecylsulfat allein. Nach 24-stündiger Exposition beträgt die CC_{50} für das 1:1-Gemisch aus Natriumdodecylsulfat und TEGO-Betain® L7 10,1 (8,46-12,1) $\mu\text{g/ml}$.

Membrantoxizität von Cocamidopropylbetain

Abbildung 123 zeigt die durch Cocamidopropylbetain induzierte Arachidonsäure-Freisetzung.

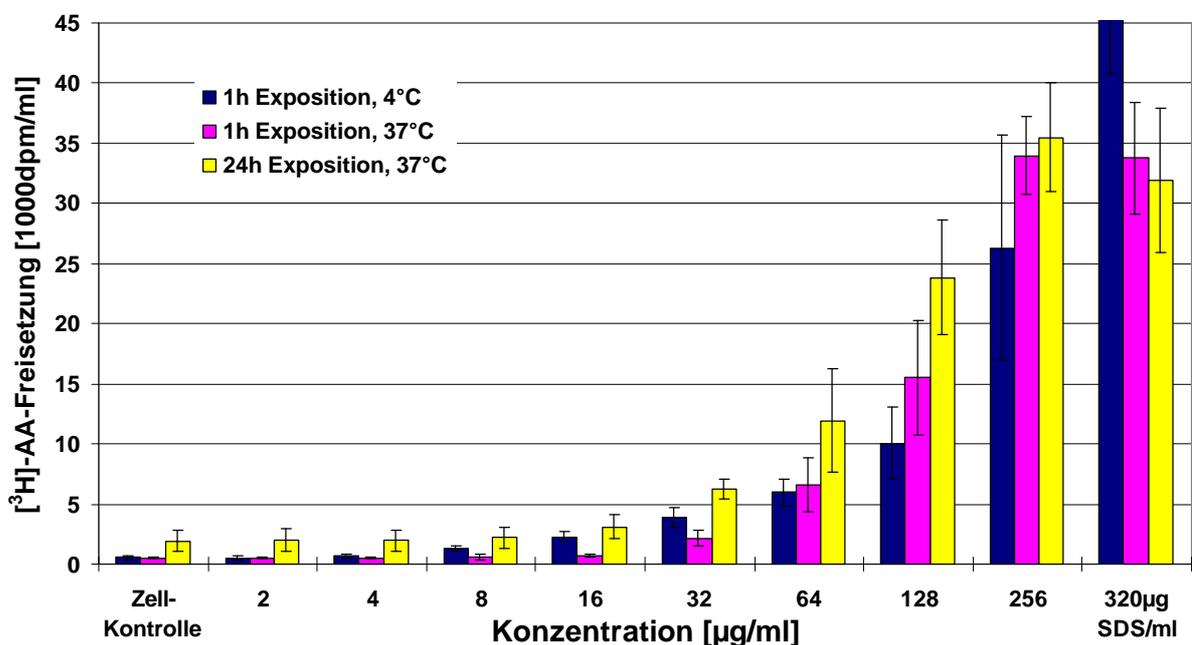


Abb. 123: [^3H]Arachidonsäure-Freisetzung durch TEGO-Betain® L7 an U937-Zellen nach 1 und 24 Stunden Exposition bei 4°C (n = 9) und 37°C (n = 12)

Bei 256 (80) μg TEGO-Betain® L7 pro ml ist sowohl nach einer als auch nach 24 Stunden Exposition die maximale Arachidonsäure-Freisetzung im Vergleich zur Positivkontrolle erreicht. Bei 4°C ist die Arachidonsäure-Freisetzung bei dieser Konzentration geringer (60%).

TEGO-Betain® CKD und TEGO-Betain® E zeigen ähnliche Membrantoxizitätswerte wie das Standard-Cocamidopropylbetain. Die MTK-Werte von TEGO-Betain® L7, TEGO-Betain® CKD und TEGO-Betain® E und die entsprechende Zytotoxizität bei der MTK im EZ4U sind in Tabelle 37 dargestellt.

Nach 1-stündiger Exposition liegt bei der MTK keine Zytotoxizität vor. Nach 24 Stunden ist jedoch eine geringe Zytotoxizität im Konzentrationsbereich der MTK festzustellen gewesen.

4. Ergebnisse

Tabelle 37: Minimal toxische Konzentration (MTK) und Zytotoxizität bei der MTK von Cocamidopropylbetain

| Exposition | MTK [$\mu\text{g/ml}$] | | Zytotoxizität [%] |
|------------|------------------------------|---------------------------|-------------------|
| | TEGO-Betain [®] L7 | | |
| | 31%ige Lösung | berechnet auf Aktivgehalt | |
| 1h, 37°C | 8,64 | 2,68 | 0 |
| 1h, 4°C | 5,53 | 1,71 | - |
| 24h, 37°C | 6,33 | 1,96 | 4,8 |
| | TEGO-Betain [®] CKD | | |
| | 85%ige Lösung | berechnet auf Aktivgehalt | |
| 1h, 37°C | 3,60 | 3,06 | 0 |
| 24h, 37°C | 2,10 | 1,79 | 21 |
| | TEGO-Betain [®] E | | |
| | 31%ige Lösung | berechnet auf Aktivgehalt | |
| 1h, 37°C | 7,30 | 2,26 | 0 |
| 24h, 37°C | 5,72 | 1,77 | 28 |

Apoptose durch Cocamidopropylbetain

Bestimmung Histon-assoziiertes DNA-Fragmente mit ELISA

Auf seine Apoptose-induzierenden Eigenschaften hin wurde Cocamidopropylbetain (TEGO-Betain[®] L7) in Konzentrationen von 2 (0,6) bis 128 (40) $\mu\text{g/ml}$ durch Bestimmung intrazellulärer Histon-assoziiertes DNA-Fragmente untersucht. Den Anreicherungsfaktor Histon-assoziiertes DNA-Fragmente nach 4- und 20-stündiger Exposition mit Cocamidopropylbetain in U937-Zellen gibt die Abbildung 124 wieder.

Nach 4-stündiger Exposition konnte bei Konzentrationen von 8 (2,5) bis 32 (10) $\mu\text{g/ml}$ Cocamidopropylbetain pro ml eine deutliche Erhöhung (AF: 2 bis 5) von intrazellulären Histon-assoziiertes DNA-Fragmenten in U937-Zellen nachgewiesen werden. Eine geringe Erhöhung gegenüber der Zellkontrolle ist bei 2 (0,6) $\mu\text{g/ml}$ festzustellen. Nach 20-stündiger Exposition war bei 16 (5) bis 64 (20) $\mu\text{g/ml}$ eine deutliche Erhöhung (AF = 2), bei 4 (1,2) und 8 (2,5) $\mu\text{g/ml}$ eine geringe Erhöhung Histon-assoziiertes DNA-Fragmente zu bestimmen.

4. Ergebnisse

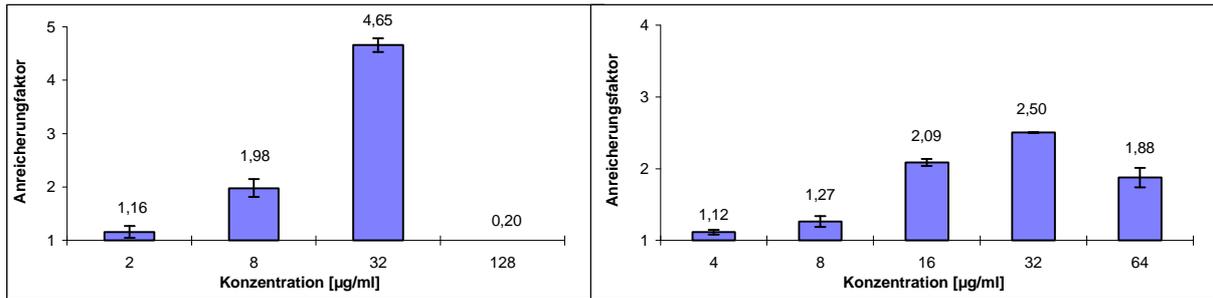


Abb. 124: Anreicherungsfaktor Histon-assoziiertes DNA-Fragmente in U937-Zellen nach 4-stündiger (links) und 20-stündiger (rechts) Exposition mit Cocamidopropylbetain

Durchflusszytometrische Bestimmungen

Mit der Annexin-V-Propidiumiodid-Färbung wurde Cocamidopropylbetain in den Konzentrationen 2, 8 und 32 (0,6, 2,5, 10) µg/ml auf apoptotische Zellen hin untersucht. Bei allen Konzentrationen konnte eine erhöhte Anzahl frühapoptotischer U937-Zellen nach 4-stündiger Exposition nachgewiesen werden (Tab. 38). Vor allem bei 8 (2,5) und 32 (10) µg/ml entstand eine neue Zellpopulation, die sich mit Annexin V anfärben ließ.

Im Dotplot liegt sie im Übergang vom rechten oberen zum rechten unteren Quadranten, so dass angenommen werden kann, dass es sich um früh- und spätapoptotische Zellen handelt.

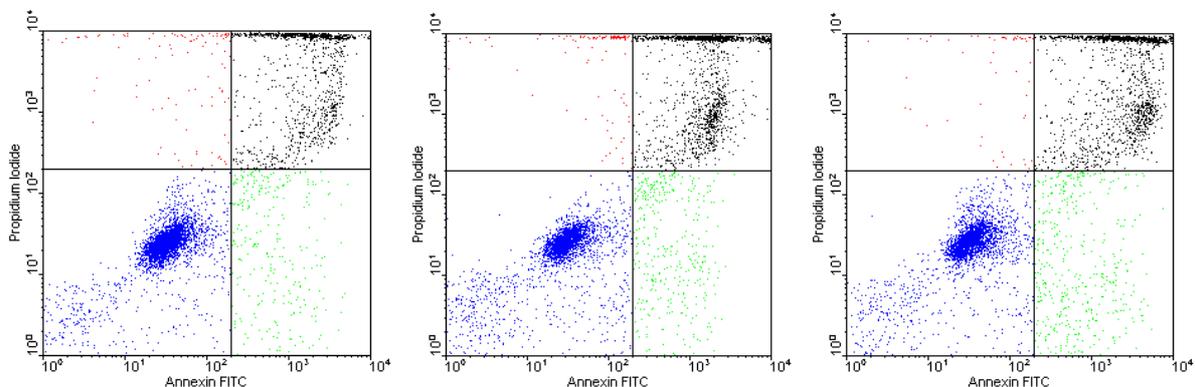


Abb. 125: Dotplots der U937-Zellen nach 4-stündiger Exposition Cocamidopropylbetain und Annexin-V-Propidiumiodid-Färbung (von links nach rechts: 2 (0,6), 8 (2,5) und 32 (10) µg/ml)

Abbildung 125 gibt die entsprechenden Dotplots nach 4-stündiger Exposition wieder. Bei 20-stündiger Exposition entsprechen die Dotplots fast wieder denen der Zellkontrolle. Auch bei 44-stündiger Exposition mit 2 µg/ml entspricht das Dotplot dem der Zellkontrolle, bei 8 (2,5) µg/ml sind jedoch mehr Zellen im Quadranten rechts oben, also Annexin und Propidiumiodid gefärbt. Es könnte sich dabei um spätapoptotische Zellen handeln. In der Tabelle 38 sind die Ergebnisse der durchflusszytometrischen Bestimmungen zusammengefasst. Vermehrt vorkommende frühapoptotische Zellen sind fettgedruckt.

4. Ergebnisse

Tabelle 38: Prozentuale Verteilung der U937-Zellen auf die festgelegten Quadranten des Dotplots nach Exposition mit Cocamidopropylbetain im Vergleich zur Zellkontrolle b

| Exposition | 4 h | | 20 h | | 44 h | |
|------------------------------|---|------|-------------|------|-------------|------|
| Konzentration | 2 (0,6) µg/ml Cocamidopropylbetain | | | | | |
| U937-Zellen [%] | | ZK b | | ZK b | | ZK b |
| primär nekrotisch | 2,20 | 1,42 | 0,92 | 0,90 | 0,74 | 0,78 |
| nekrotisch / spätapoptotisch | 23,1 | 8,78 | 16,7 | 22,1 | 17,5 | 14,0 |
| frühapoptotisch | 6,44 | 5,30 | 10,42 | 10,5 | 7,02 | 5,34 |
| unverändert | 68,2 | 84,5 | 71,9 | 66,5 | 74,8 | 79,9 |
| Konzentration | 8 (2,5) µg/ml Cocamidopropylbetain | | | | | |
| U937-Zellen [%] | | ZK b | | ZK b | | ZK b |
| primär nekrotisch | 2,28 | 1,42 | 1,84 | 1,20 | 1,04 | 0,78 |
| nekrotisch / spätapoptotisch | 37,1 | 8,78 | 16,6 | 11,3 | 27,5 | 14,0 |
| frühapoptotisch | 7,98 | 5,30 | 5,62 | 6,18 | 6,28 | 5,34 |
| unverändert | 52,7 | 84,5 | 75,0 | 81,3 | 65,2 | 79,9 |
| Konzentration | 32 (10) µg/ml Cocamidopropylbetain | | | | | |
| U937-Zellen [%] | | ZK b | | ZK b | | |
| primär nekrotisch | 1,26 | 1,42 | 0,76 | 0,90 | | |
| nekrotisch / spätapoptotisch | 34,0 | 8,78 | 25,4 | 22,1 | | |
| frühapoptotisch | 10,26 | 5,30 | 13,5 | 10,5 | | |
| unverändert | 55,4 | 84,5 | 60,3 | 66,5 | | |

Morphologische Veränderungen durch Cocamidopropylbetain

HaCaT-Zellen

An den HaCaT-Zellen wurden nach der Exposition mit Cocamidopropylbetain (TEGO-Betain® L7, TEGO-Betain® CKD, TEGO-Betain® E) folgende Veränderungen beobachtet:

- Ablösen der Zellen von der Oberfläche
- Abrundung
- Schrumpfung, Zellen erscheinen stark verkleinert
- Lyse

In den Abbildungen 126 und 127 sind die HaCaT-Zellen nach 1- und 24-stündiger Exposition mit TEGO-Betain® L7 abgebildet. Die Zellen lösen sich bei Exposition mit Cocamidopropylbetain von der Oberfläche ab. Sie verkleinern sich und nehmen eine kugelförmige Gestalt mit glatter Oberfläche an. Besonders bei 1-stündiger Inkubation mit 256 (80) µg Cocamidopropylbetain pro ml weist der größte Teil der Zellen solche Veränderungen auf.

4. Ergebnisse

Größere Zellen sehen wie apoptotische Zellen vor dem Zerfall aus. Es zeichnen sich innerhalb der Zelle apoptotische Körperchen ab. Die Zellmembran bleibt bei 1-stündiger Exposition erhalten. Nach 24-stündiger Exposition schrumpfen die Zellen noch mehr, sie sind kleiner als nach 1-stündiger Exposition, die Zellmembran löst sich teilweise auf. Außerdem sind vermehrt Zell-Fragmente vorhanden. Es kommt vor allem bei 128 (40) und 256 (80) µg/ml zur Zellyse.

U937-Zellen

An den U937 Zellen verursachte Cocamidopropylbetain (TEGO-Betain[®] L7, TEGO-Betain[®] CKD, TEGO-Betain[®] E) folgende Veränderungen:

- Lyse
- Schrumpfung
- Zellen erscheinen abgeflacht mit rauher Oberfläche

In den Abbildungen 128 und 129 sind die U937-Zellen nach Exposition mit TEGO-Betain[®] L7 abgebildet. Auch bei den U937-Zellen kommt es nach 24-stündiger Exposition zur Lyse der Zellen. Neben kompakten U937-Zellen, die mehr oder weniger verändert aussehen, sind bei allen Konzentrationen vermehrt Zellfragmente vorhanden. Bei 1-stündiger Exposition mit 64 (20) µg/ml sind deutlich zwei Zellpopulationen zu erkennen. Einige Zellen erscheinen völlig unverändert, während die anderen Zellen nekrotisch verändert erscheinen. Sie sind im Durchmesser größer, geschwollen und abgeflacht. Nach 1-stündiger Exposition mit 128 (40) µg/ml sind nur noch diese nekrotischen Zellen vorhanden.

Bei 1-stündiger Exposition mit niedrigeren Konzentrationen (16 (5) und 32 (10) µg/ml) sind die typischen morphologischen Veränderungen der Apoptose noch deutlicher als an den HaCaT-Zellen zu sehen. An den Zellen sind Ausstülpungen der Zellmembran, apoptotische Körperchen, zu erkennen.

4. Ergebnisse

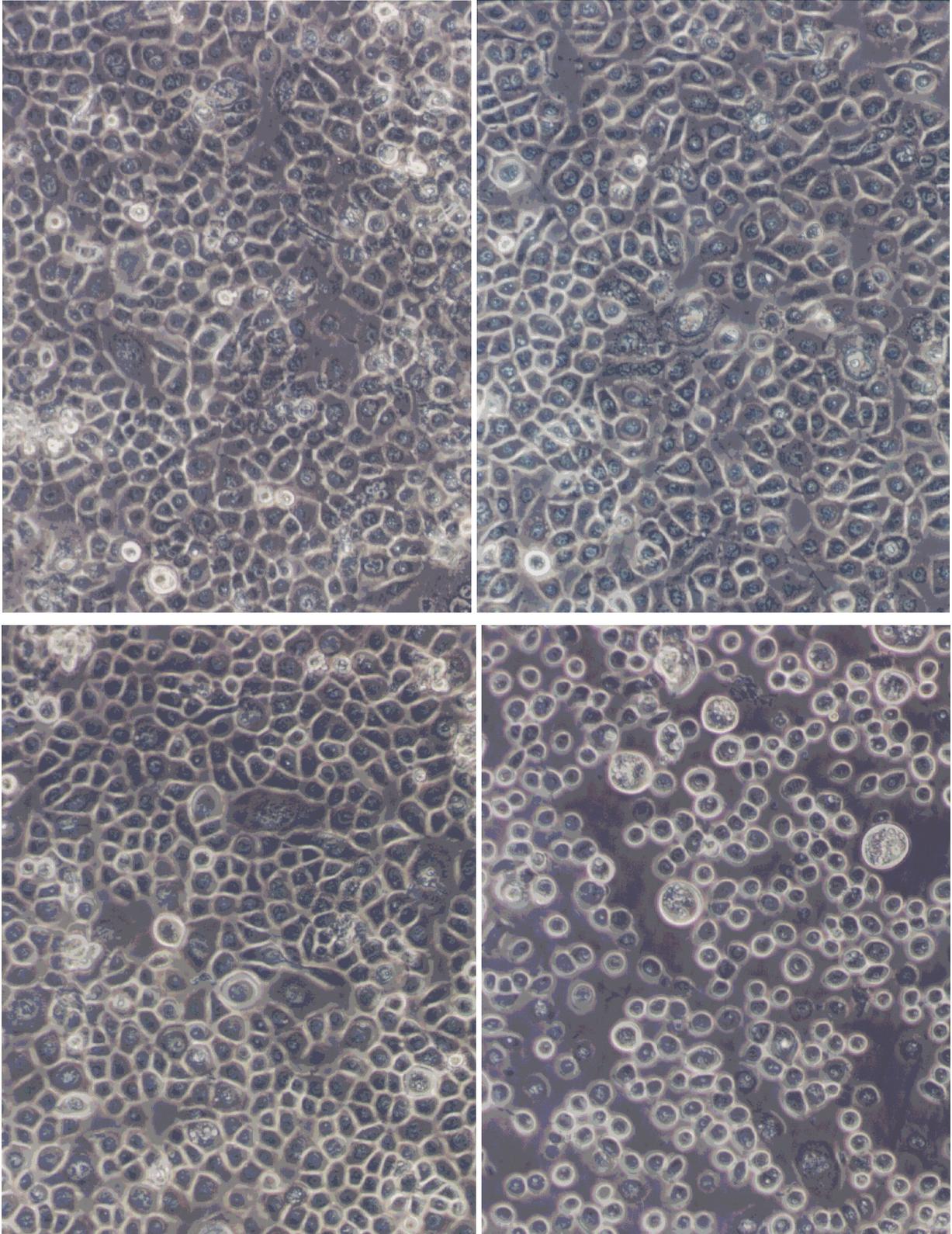


Abb. 126: HaCaT-Zellen nach 1-stündiger Exposition mit TEGO-Betain[®] L7 160fach vergrößert (oben links 32 (10) µg/ml; oben rechts 64 (20) µg/ml; unten links 128 (40) µg/ml; unten rechts 256 (80) µg/ml)

4. Ergebnisse

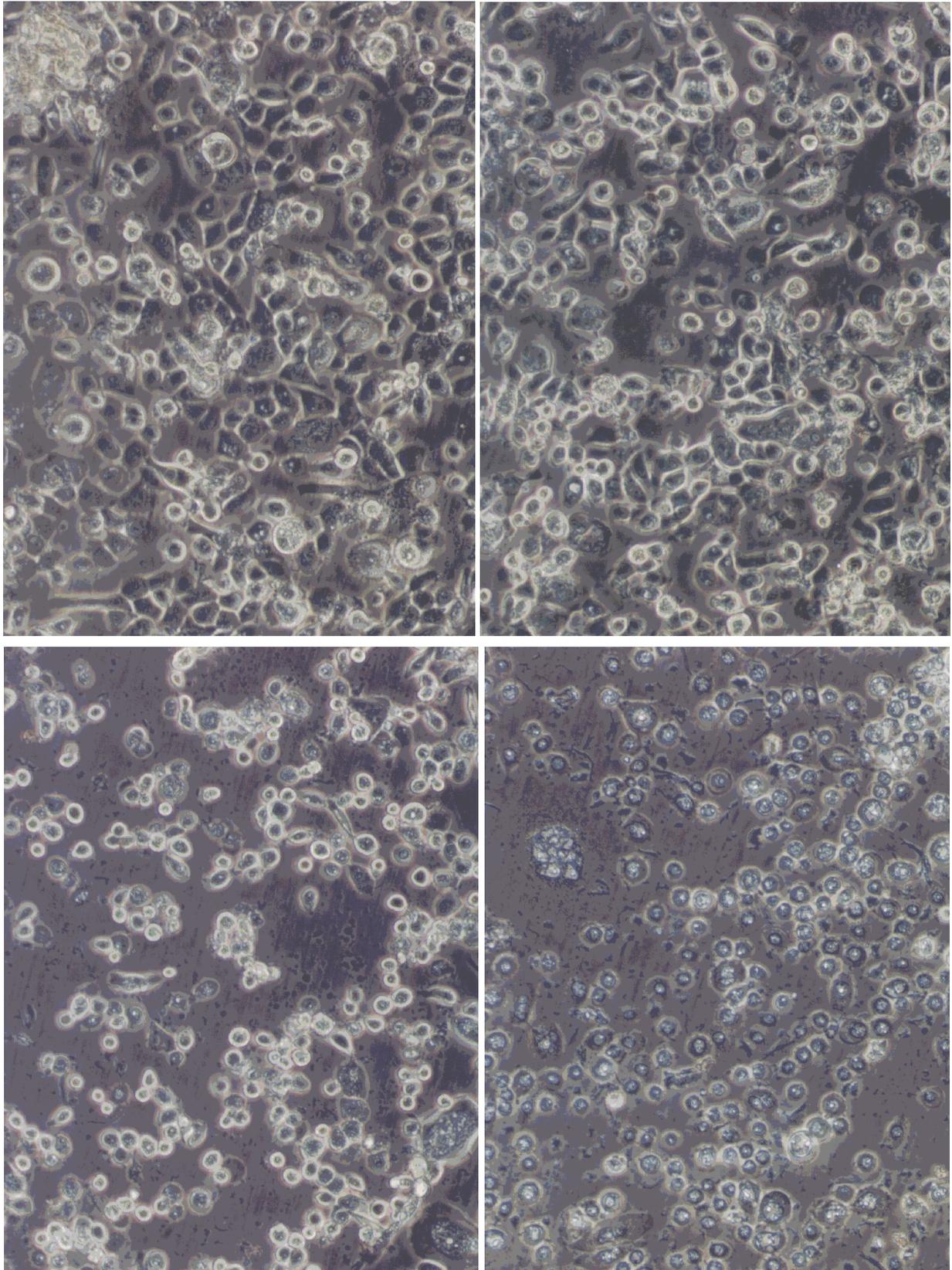


Abb. 127: HaCaT-Zellen nach 24-stündiger Exposition mit TEGO-Betain[®] L7 160fach vergrößert (oben links 32 (10) µg/ml; oben rechts 64 (20) µg/ml; unten links 128 (40) µg/ml; unten rechts 256 (80) µg/ml)

4. Ergebnisse

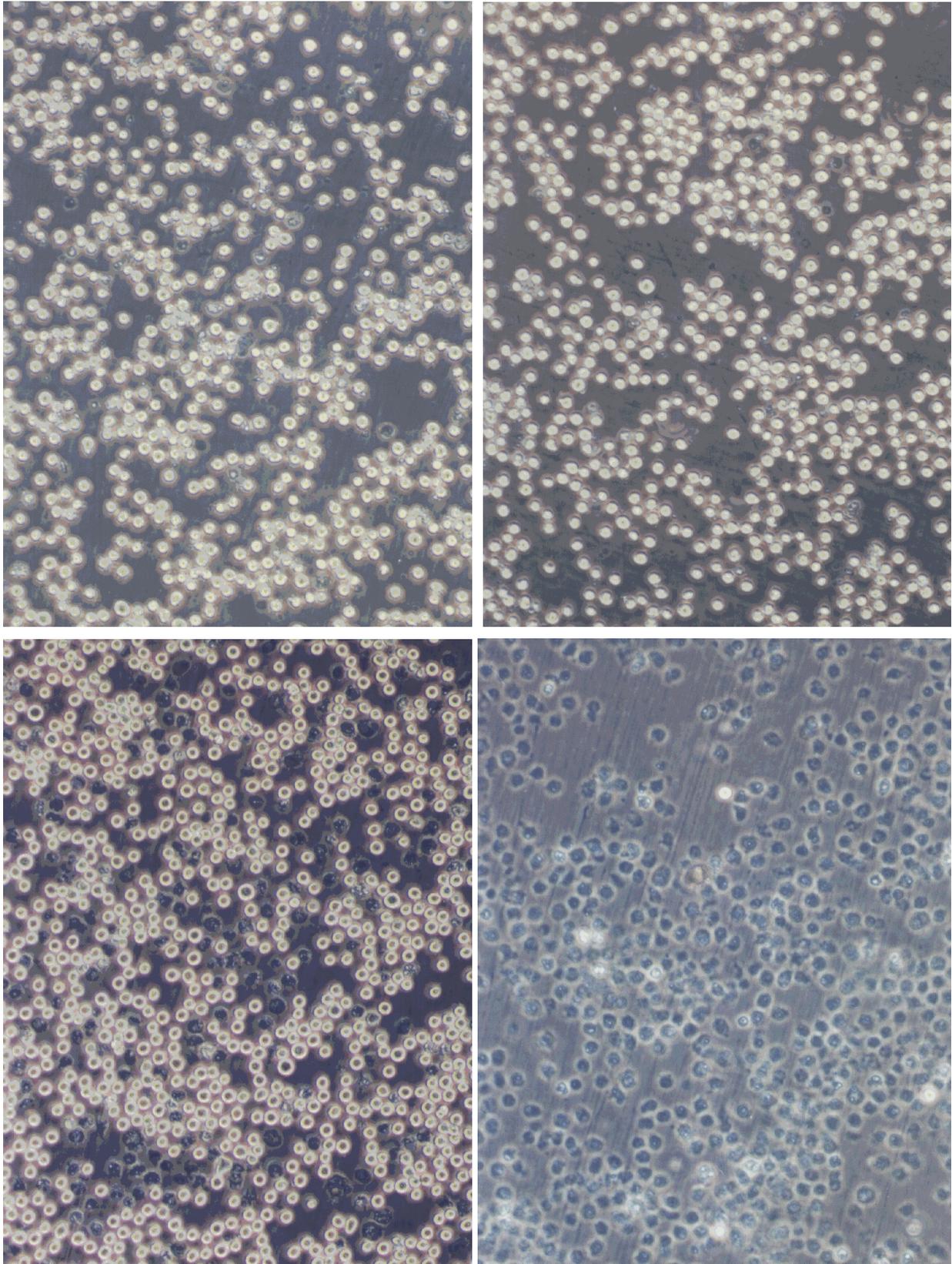


Abb. 128: U937-Zellen nach 1-stündiger Exposition mit TEGO-Betain® L7 160fach vergrößert (Phasenkontrast; oben links 16 (5) µg/ml; oben rechts 32 (10) µg/ml; unten links 64 (20) µg/ml; unten rechts 128 (40) µg/ml)

4. Ergebnisse

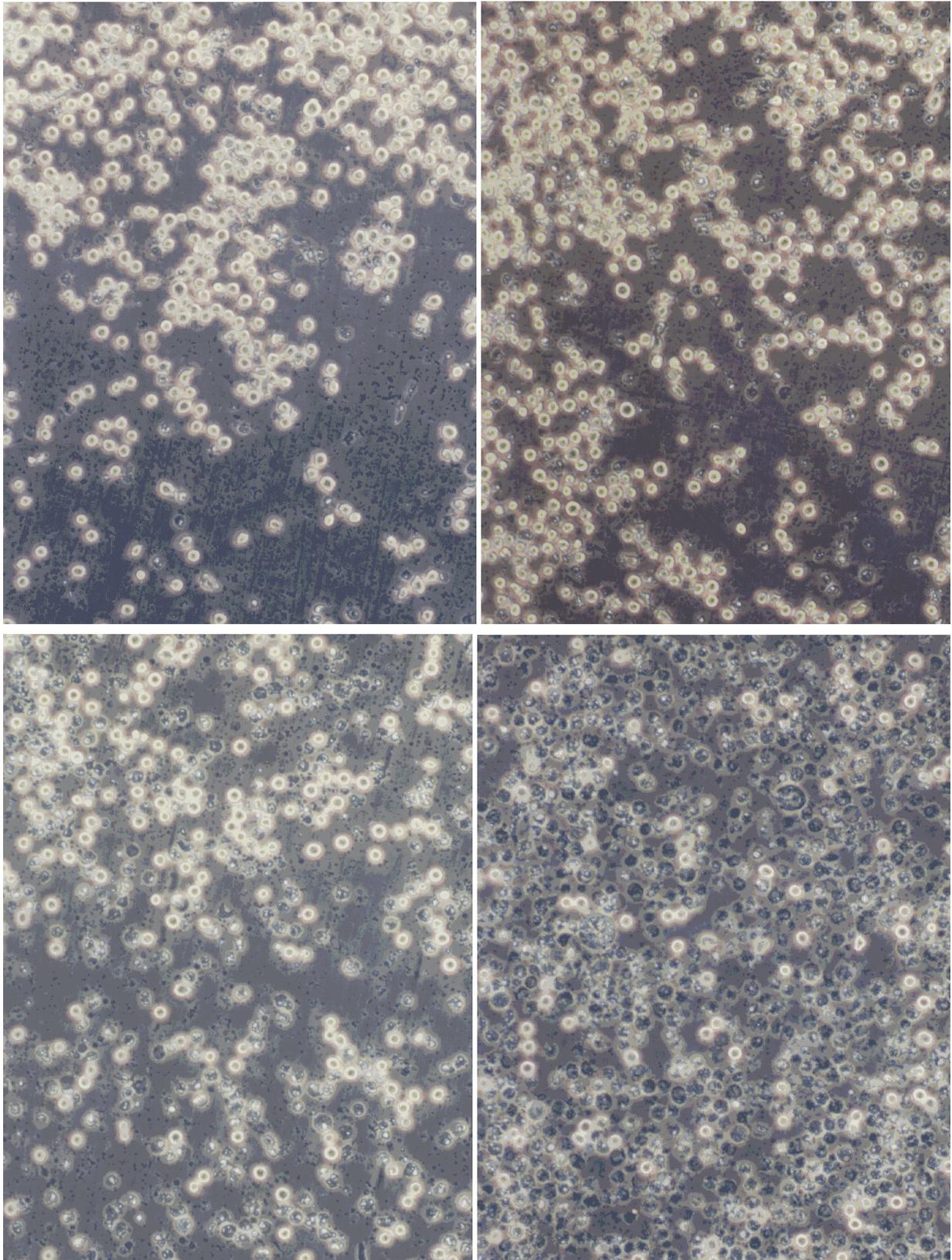


Abb. 129: U937-Zellen nach 24-stündiger Exposition mit TEGO-Betain[®] L7 160fach vergrößert (Phasenkontrast; oben links 16 (5) µg/ml; oben rechts 32 (10) µg/ml; unten links 64 (20) µg/ml; unten rechts 128 (40) µg/ml)

4.4.2. Sojalecithin

Sojalecithin ist unter der Monographie entöltes Sojalecithin im DAB 1999 offizinell. Es handelt sich um das komplexe Gemisch von verschiedenen Phospholipiden, hauptsächlich Phosphatidylcholin, Phosphatidylethanolamin, Phosphatidylserin und Phosphatidylinositol. Der Gehalt an Phospholipiden beträgt ca. 95%. Außerdem können Triglyceride (Restöl), Fettsäuren, Kohlenhydrate, das hämolytisch wirkende Lysolecithin und Wasser, jedoch jeweils maximal 3%, enthalten sein. Sojalecithin enthält im Gegensatz zu Eilecithin keine Arachidonsäure. Sojalecithin stellt ein Naturprodukt dar. Es wird aus der Sojabohne (*Glycine max*) gewonnen. Sojalecithin ist nicht in Wasser löslich. Es bildet jedoch eine homogene, kolloidale Lösung mit leichter Trübung, die über mindestens 24 Stunden stabil ist.

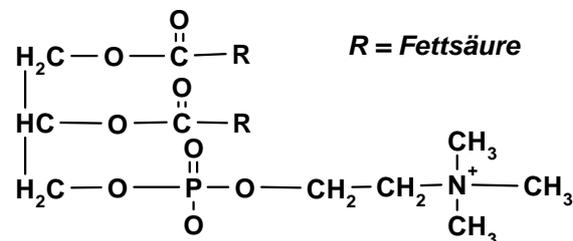


Abb. 130: Strukturformel von Phosphatidylcholin

Sojalecithin ist in der Pharmazie ein wichtiger technologischer Hilfsstoff. Es dient zur Stabilisierung von verschiedenen Formulierungen, als Dispergiermittel in Suspensionen und Weichgelainekapseln sowie als Emulgator für O/W- und W/O-Emulsionen. Sojalecithin ist der Hauptbestandteil in Liposomen und wird als Emulgator für parenteral applizierbare Fettemulsionen empfohlen. Es besitzt mit Indikationen wie Lebererkrankungen, Hypercholesterinämie und Arteriosklerose auch therapeutische Bedeutung.

Sojalecithin wird in großem Umfang in der Kosmetik, z.B. als Pflegemittel in Salben, Bädern und Cremes oder als Schaumverbesserer für Seifen, Shampoos, Lotionen und Lippenstifte verwendet [1, 109]. Laut ABDA-Datenbank ist Sojalecithin in 316 Arzneimitteln als Hilfsstoff und in 44 Arzneimitteln als Wirkstoff enthalten. Bei diesen Arzneimitteln handelt es sich unter anderem um Suppositorien, Kapseln, Dosieraerosole und Infusionslösungen [1].

Sojalecithin ist sehr häufig als Emulgator in Lebensmitteln enthalten. Von der FDA wurde es als nicht toxisch eingestuft [109].

Zytotoxizität von Sojalecithin

In der Abbildung 131 sind die Ergebnisse von Sojalecithin im Zytotoxizitätstest mit EZ4U an HaCaT-Zellen und U937-Zellen dargestellt.

4. Ergebnisse

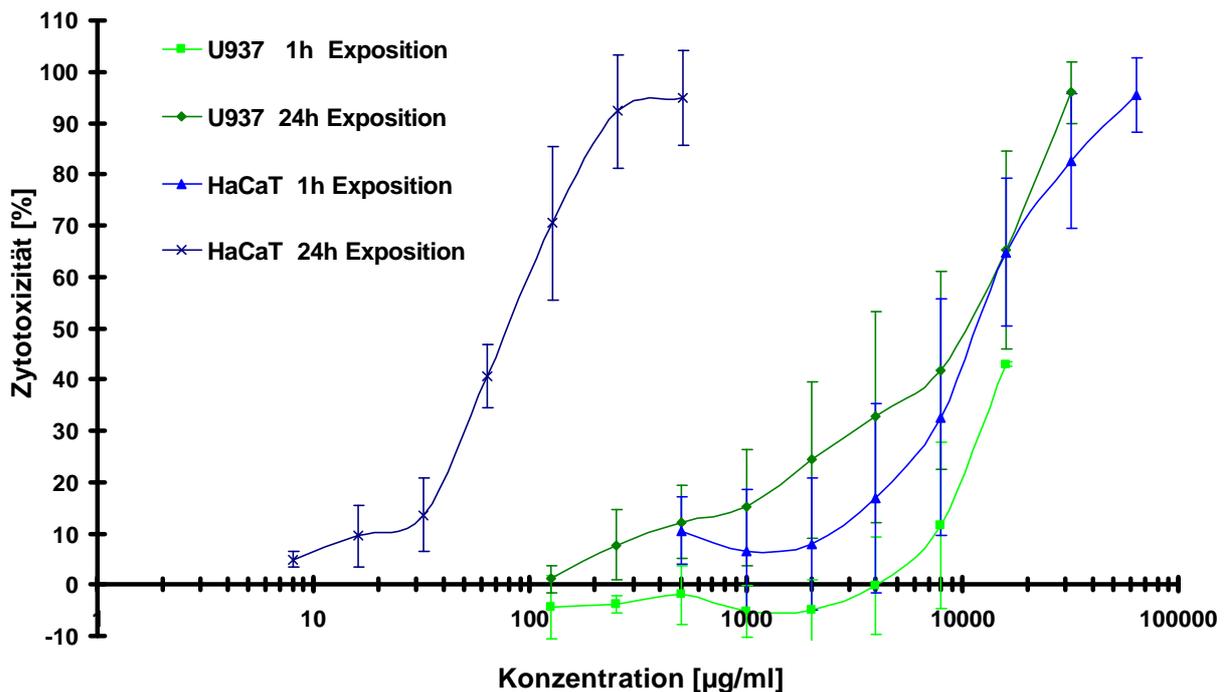


Abb. 131: Zytotoxizität von Sojalecithin an U937-Zellen (n = 16) und HaCaT-Zellen (n = 15) nach 1 und 24 Stunden Exposition bei 37°C

Die Zytotoxizität von Sojalecithin nimmt an HaCaT-Zellen mit der Expositionszeit sehr stark zu. Nach 24 Stunden ist sie 120mal größer als nach einer Stunde. Gegenüber U937-Zellen ist Sojalecithin nach 24 Stunden nur ca. 4fach toxischer als nach 1 Stunde.

Die HaCaT-Zellen sind gegenüber Sojalecithin deutlich empfindlicher als die U937-Zellen sowohl nach einer als auch nach 24 Stunden. Dies unterscheidet Sojalecithin von allen anderen getesteten Tensiden. Nach 1-stündiger Exposition sind die Unterschiede zwischen den Zelllinien noch nicht so deutlich, nach 24-stündiger Exposition ist die Zytotoxizität an HaCaT-Zellen allerdings 100mal höher als an U937-Zellen.

Bei 1-stündiger Exposition der U937-Zellen konnten wegen starker Schaumbildung von höheren Konzentrationen des Sojalecithins im RPMI-Medium nur Zytotoxizitätswerte um ca. 50% bestimmt werden. Die CC_{50} konnte infolgedessen nur abgeschätzt werden.

Tabelle 39 zeigt die halbmaximale zytotoxische Konzentration an HaCaT- und U937-Zellen nach 1- und 24-stündiger Exposition mit Sojalecithin.

Tabelle 39: Halbmaximale zytotoxische Konzentration (CC_{50}) von Sojalecithin

| Exposition | U937-Zellen [µg/ml] | HaCaT-Zellen [µg/ml] |
|------------|----------------------------|--------------------------|
| 1h | 31900 (13400-75700) | 9610 (5120-18000) |
| 24h | 7920 (3220-19500) | 81,6 (64,3-104) |

4. Ergebnisse

Membrantoxizität von Sojalecithin

Die Abbildung 132 zeigt die durch Sojalecithin induzierte Arachidonsäure-Freisetzung. Bei 1-stündiger Exposition der Zellen mit 64 µg Sojalecithin pro ml ist die maximale Arachidonsäure-Freisetzung im Vergleich zur Positivkontrolle erreicht. Bei 24-stündiger Exposition mit Sojalecithin konnte die maximale Arachidonsäure-Menge nicht mehr freigesetzt werden.

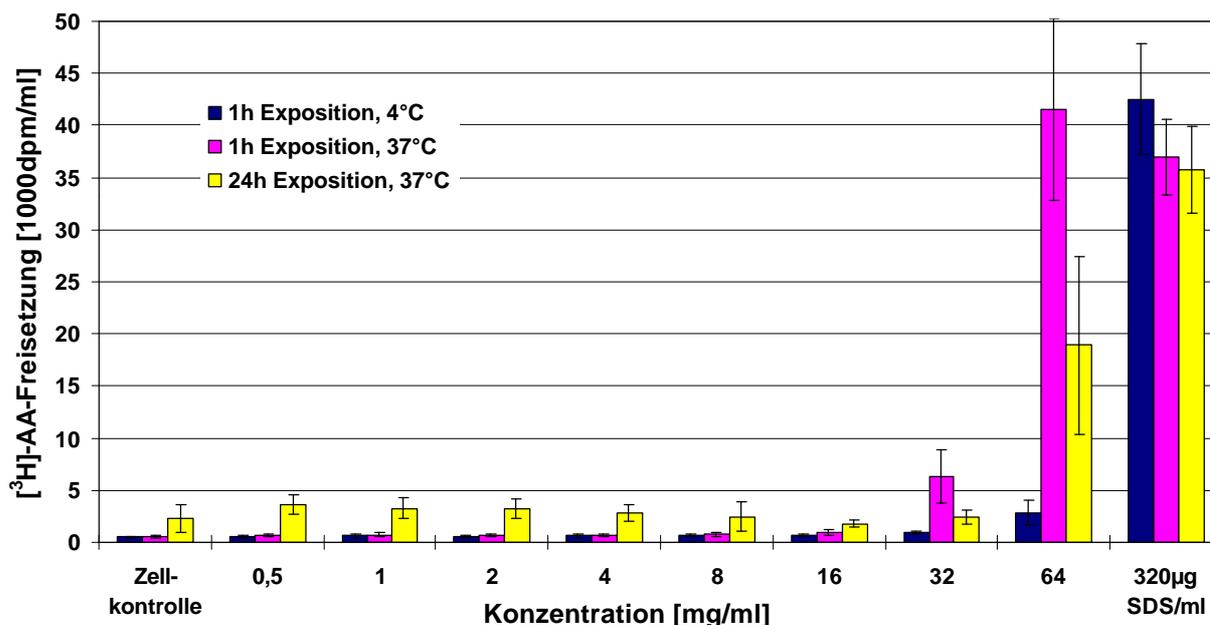


Abb. 132: [³H]Arachidonsäure-Freisetzung durch Sojalecithin an U937-Zellen nach 1 und 24 Stunden Exposition bei 4°C (n = 9) und 37°C (n = 12)

Die Arachidonsäure-Freisetzung bei 4°C ist sehr gering. Die MTK-Werte von Sojalecithin und die entsprechende Zytotoxizität bei der MTK sind in der Tabelle 40 dargestellt.

Bei Sojalecithin ist nach 1-stündiger Exposition bei der MTK keine Zytotoxizität festzustellen, nach 24 Stunden ist die Zytotoxizität bei der MTK gering.

Tabelle 40: Minimal toxische Konzentration (MTK) und Zytotoxizität bei der MTK von Sojalecithin

| Exposition | MTK [µg/ml] | Zytotoxizität [%] |
|------------------|-------------|-------------------|
| 1h, 37°C | 948 | 0 |
| 1h, 4°C | 1690 | - |
| 24h, 37°C | 179 | 3,56 |

4. Ergebnisse

Apoptose durch Sojalecithin

Bestimmung Histon-assoziiierter DNA-Fragmente mit ELISA

Sojalecithin wurde in Konzentrationen von 0,625 bis 80 mg/ml auf seine Apoptose-induzierenden Eigenschaften hin untersucht. Abbildung 133 gibt die Anreicherungsfaktoren Histon-assoziiierter DNA-Fragmente in U937-Zellen nach 4- und 20-stündiger Exposition mit Sojalecithin wieder.

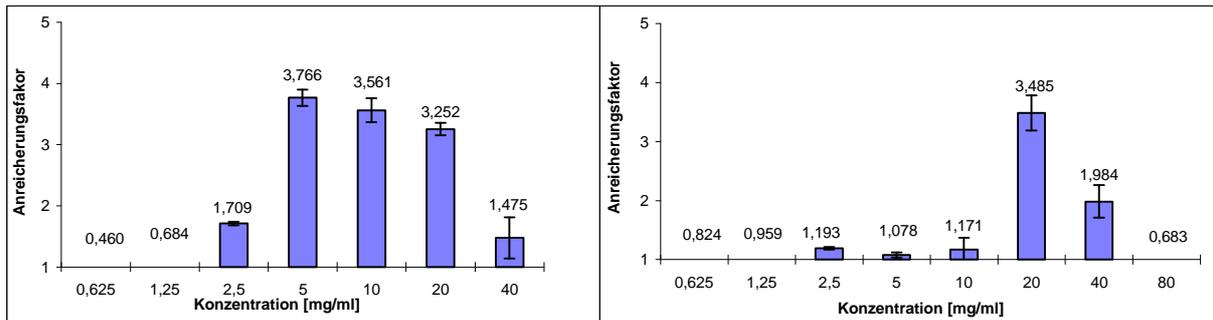


Abb. 133: Anreicherungsfaktor Histon-assoziiierter DNA-Fragmente in U937-Zellen nach 4-stündiger (links) und 20-stündiger (rechts) Exposition mit Sojalecithin

Sojalecithin führte in der Konzentration 2,5 bis 20 mg/ml nach 4 Stunden und in den Konzentration 20 und 40 mg/ml nach 20 Stunden zu einer deutlichen Erhöhung von intrazellulären Histon-assoziierten DNA-Fragmenten in U937-Zellen (AF: 2 bis 4). Bei 2,5 und 40 mg/ml nach 4 Stunden und bei 2,5 bis 10 mg/ml nach 20 Stunden Exposition sind die Anreicherungsfaktoren ebenfalls größer 1.

4.5. Gegenüberstellung der untersuchten Tenside

4.5.1. Zytotoxizität

Die halbmaximalen zytotoxischen Konzentrationen als Maß für die im XTT-Test ermittelte Zytotoxizität an U937- und HaCaT-Zellen sind in den Tabellen 41 und 42 dargestellt.

Tabelle 41: Halbmaximale zytotoxische Konzentrationen (CC₅₀) der untersuchten Tenside in U937-Zellen (XTT-Test)

| Substanzen | Exposition: 1h CC ₅₀ [µg/ml] | Exposition: 24h CC ₅₀ [µg/ml] |
|----------------------------------|--|---|
| Benzalkoniumchlorid | 6,05 (5,21-7,03) | 0,60 (0,47-0,78) |
| Natriumcetylstearylsulfat | 6,85 (5,93-7,92) | 1,59 (1,33-1,91) |
| Natriumdodecylsulfat | 31,9 (23,2-44,0) | 5,67 (4,06-7,92) |
| Natriumdodecylethersulfat | 28,1 (20,1-39,2) | 7,81 (6,71-9,08) |
| Cocamidopropylbetain | 13,4 (12,0-14,9) | 7,47 (6,29-8,86) |
| Sojalecithin | 31900 (13400-75700) | 7920 (3220-19500) |
| Cremophor® A25 | 5,66 (3,78-8,49) | 1,42 (1,38-1,46) |
| Brij® 78 | 7,00 (6,08-8,06) | 1,63 (1,21-2,21) |
| Triton® X-100 | 48,4 (46,9-50,0) | 8,98 (6,91-11,7) |
| Polysorbat 80 | 279 (207-378) | 48,1 (41,4-55,8) |
| Cremophor® EL | 159000 (116000-217400) | 160 (135-191) |
| Poloxamer® 188 | 98400 (91200-106000) | 26000 (18100-37500) |

Bei allen Substanzen nimmt die In-vitro-Toxizität in unterschiedlichem Ausmaß mit der Zeit zu. Entsprechend sind die CC₅₀-Werte sowohl bei HaCaT- als auch bei U937-Zellen nach 24 Stunden geringer als nach 1 Stunde. Besonders ausgeprägt ist die zeitabhängige Zunahme der Zytotoxizität bei Exposition der U937-Zellen mit dem Polyethylenglycolrizinusöl Cremophor® EL. Die Zytotoxizität der Substanz in U937-Zellen ist hier nach 24-stündiger Exposition 1000fach höher als nach 1-stündiger Exposition.

Die U937-Zellen sind gegenüber den Testsubstanzen im allgemeinen empfindlicher als die Keratinozyten. Die Zytotoxizität ist hier im Vergleich zu den HaCaT Zellen nach 24 Stunden um den Faktor 2 bis 10 erhöht. Auffällig ist, dass Sojalecithin im Gegensatz zu allen anderen getesteten Substanzen wesentlich toxischer für die Keratinozyten als für die U937-Zellen ist (100fach). Cremophor® EL weist nach 24 Stunden gegenüber beiden Zellarten die gleiche Zytotoxizität auf, obwohl Cremophor® EL nach 1 Stunde gegenüber den HaCaT-Zellen noch 20fach toxischer als gegenüber den U937-Zellen ist.

4. Ergebnisse

Tabelle 42: Halbmaximale zytotoxische Konzentrationen (CC₅₀) der untersuchten Tenside in HaCaT-Zellen (XTT-Test)

| Substanzen | Exposition: 1h CC ₅₀ [µg/ml] | Exposition: 24h CC ₅₀ [µg/ml] |
|----------------------------------|--|---|
| Benzalkoniumchlorid | 15,2 (10,8-21,4) | 2,46 (2,30-2,63) |
| Natriumcetylstearylsulfat | 66,8 (53,3-83,7) | 6,28 (5,73-6,90) |
| Natriumdodecylsulfat | 56,4 (51,2-62,2) | 17,9 (14,4-22,4) |
| Natriumdodecylethersulfat | 47,5 (43,1-52,4) | 14,0 (11,4-17,2) |
| Cocamidopropylbetain | 44,1 (37,2-52,2) | 10,9 (6,97-17,1) |
| Sojalecithin | 9610 (5120-18000) | 81,6 (64,3-104) |
| Cremophor® A25 | 48,7 (37,5-63,1) | 4,65 (3,42-6,32) |
| Brij®78 | 45,0 (33,7-59,9) | 4,14 (4,00-4,29) |
| Triton® X-100 | 84,9 (73,7-98,0) | 26,0 (18,7-36,0) |
| Polysorbat 80 | 302 (182-503) | 87,2 (58,9-129) |
| Cremophor® EL | 7100 (4010-12600) | 153 (107-218) |
| Poloxamer® 188 | 131000 (117000-148000) | 44200 (33900-57700) |

In den Abbildungen 134 bis 137 sind die Zytotoxizitäten der untersuchten Tenside an U937- und HaCaT-Zellen nach 1 und 24 Stunden Exposition als Konzentrations-Wirkungs-Kurven dargestellt. Folgende Abkürzungen wurden verwendet: Polox = Poloxamer® 188, CrEL = Cremophor® EL, Leci = Sojalecithin, Polys = Polysorbat 80, Triton = Triton® X-100, SDS = Natriumdodecylsulfat, SDES = Natriumdodecylethersulfat, Coc = Cocamidopropylbetain, SCSS = Natriumcetylstearylsulfat, Brij = Brij®78, CrA = Cremophor® A25, Benz = Benzalkoniumchlorid.

Die Zytotoxizität der untersuchten Tenside nimmt unabhängig von der verwendeten Zelllinie in folgender Reihenfolge zu (24 Stunden Exposition): Poloxamer® 188 < Cremophor® EL < Sojalecithin < Polysorbat 80 < Triton® X-100 < Natriumdodecylsulfat = Natriumdodecylethersulfat = Cocamidopropylbetain < Natriumcetylstearylsulfat = Brij®78 = Cremophor® A25 < Benzalkoniumchlorid. Die Einordnung von Sojalecithin in diese Reihe erfolgte im Gegensatz zu den anderen Tensiden relativ willkürlich. Die Zytotoxizitätswerte liegen hier zwischen denen von Poloxamer® 188 und Triton® X-100.

Abgesehen davon, dass das kationische Tensid Benzalkoniumchlorid die höchste Zytotoxizität aufweist, ist kein Zusammenhang zwischen der Ladung der hydrophilen Gruppen und der Zytotoxizität der Tenside zu erkennen.

4. Ergebnisse

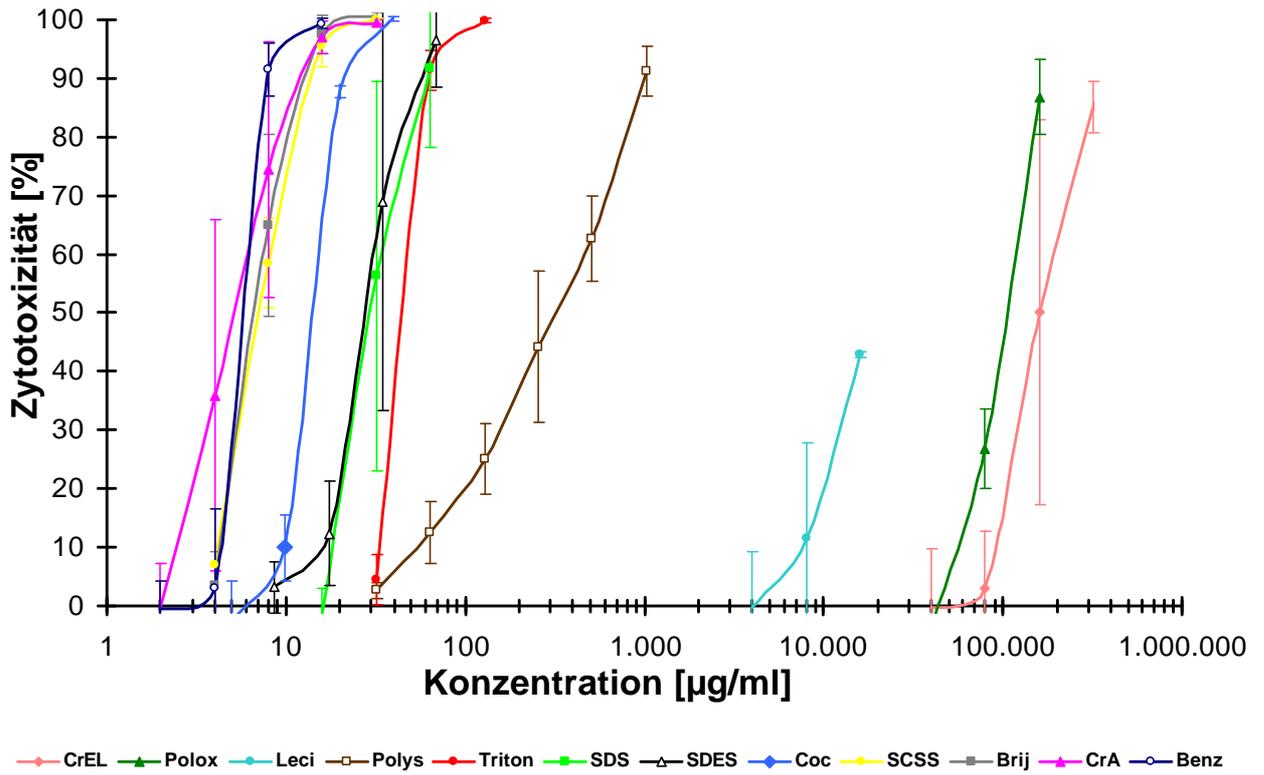


Abb. 134: Ytotoxizität von Tensiden an U937-Zellen nach 1 Stunde Exposition bei 37°C

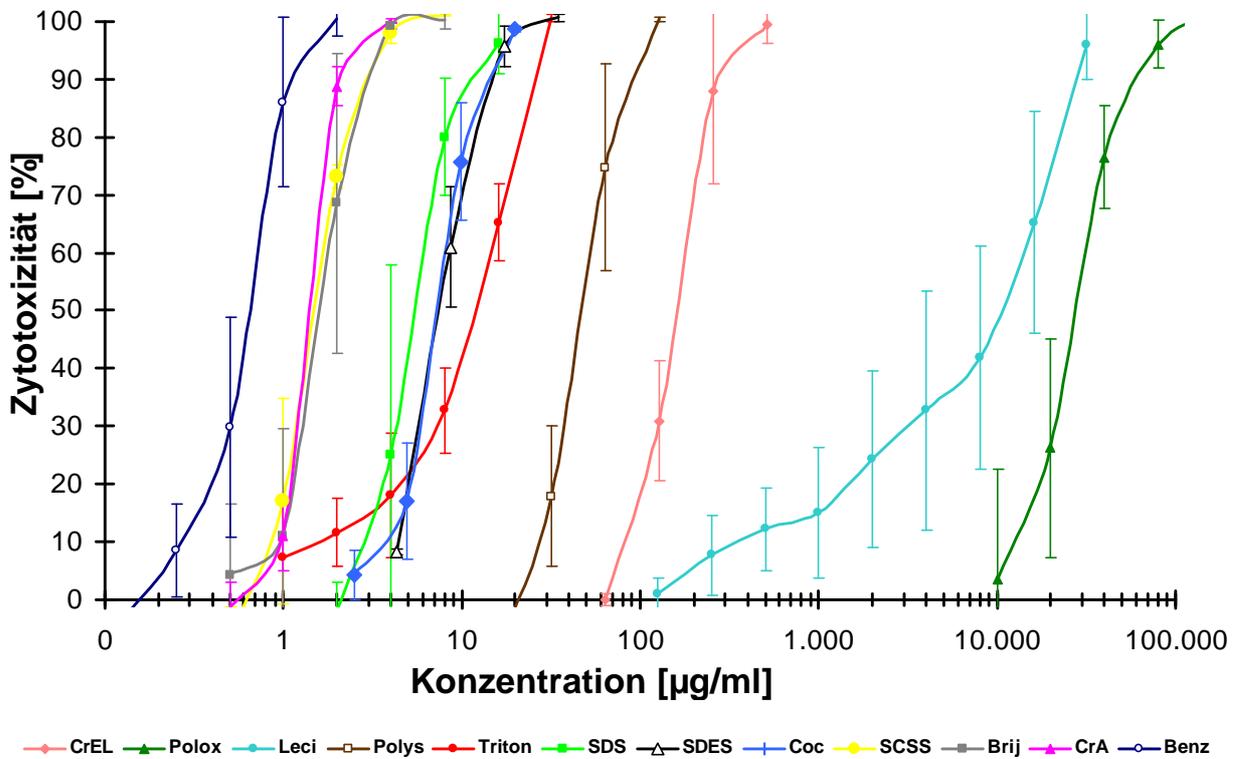


Abb. 135: Ytotoxizität von Tensiden an U937-Zellen nach 24 Stunden Exposition bei 37°C

4. Ergebnisse

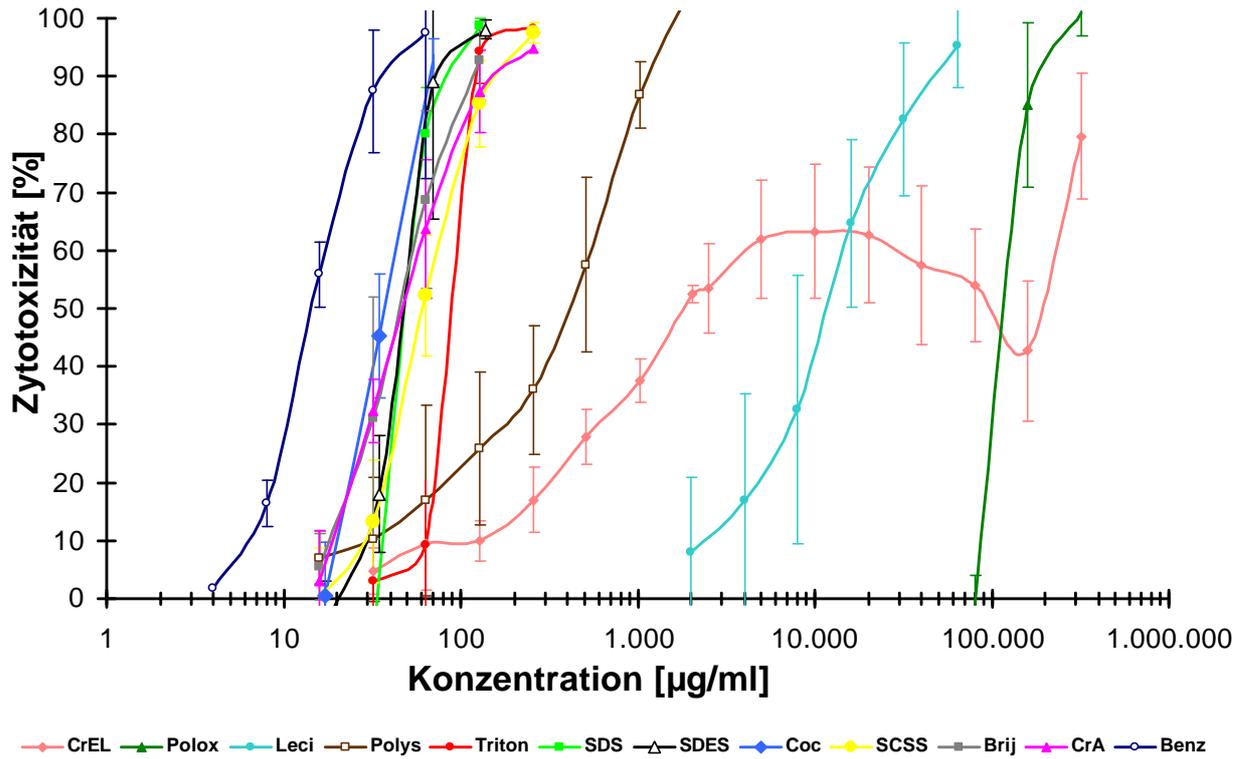


Abb. 136: Zytotoxizität von Tensiden an HaCaT-Zellen nach 1 Stunde Exposition bei 37°C

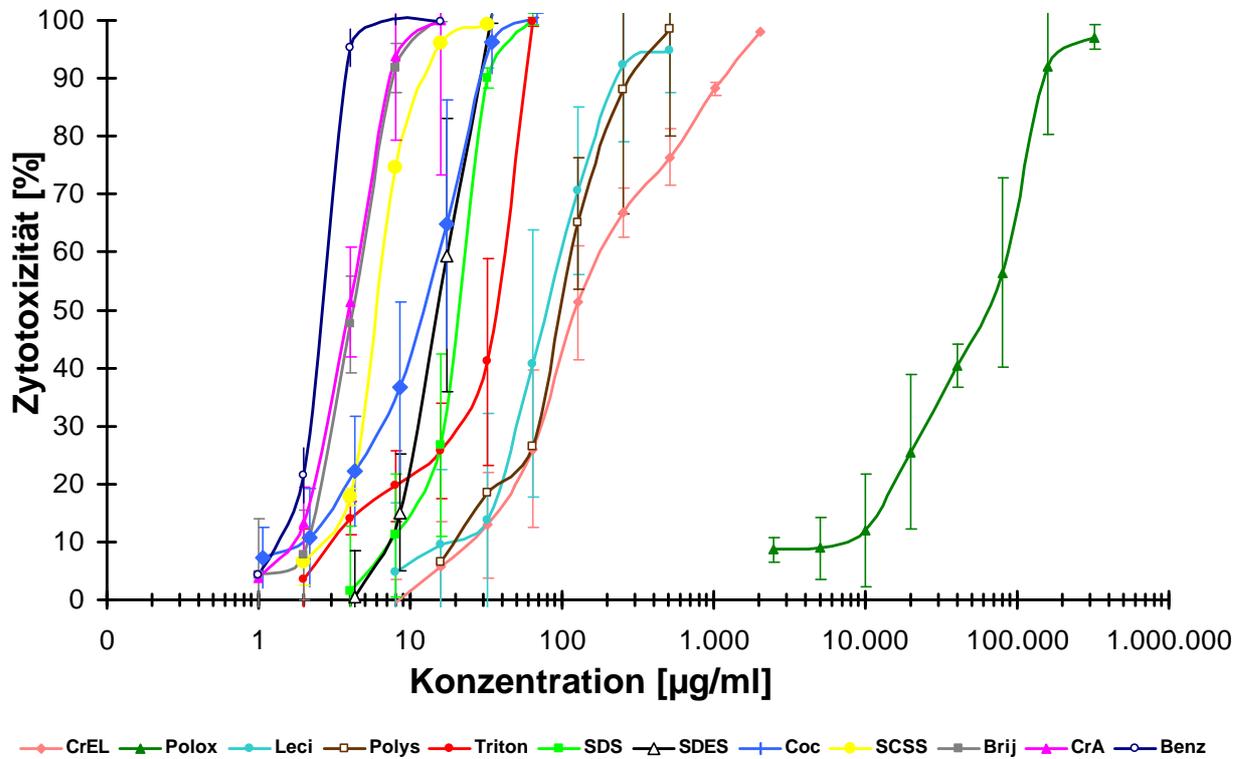


Abb. 137: Zytotoxizität von Tensiden an HaCaT-Zellen nach 24 Stunden Exposition bei 37°C

4. Ergebnisse

Um die Zytotoxizität der Tenside zu vergleichen, wurde die relative Zytotoxizität (CC_{rel}) bestimmt. Als Vergleichssubstanz ist Natriumdodecylsulfat, das oft benutzte Standardirritans, verwendet worden. In Tabelle 43 sind die relativen Zytotoxizitätswerte der Tenside an U937- und HaCaT- Zellen dargestellt.

Die höchste Zytotoxizität zeigt die kationische Substanz Benzalkoniumchlorid. Deutlich toxischer (ca. 3-4fach) als das anionische Natriumdodecylsulfat (SDS) erweisen sich auch die beiden Polyethylenglycolfettalkoholether Brij[®]78 und Cremophor[®] A25 sowie die SDS-analoge Substanz Natriumcetylstearylsulfat. Lediglich an HaCaT-Zellen nach 1-stündiger Exposition ist die Zytotoxizität von Natriumcetylstearylsulfat, Cremophor[®] A25 und Brij[®]78 mit Natriumdodecylsulfat vergleichbar. Das anionische Natriumdodecylethersulfat und die amphotere Substanz Cocamidopropylbetain zeigen eine ähnliche Zytotoxizität wie Natriumdodecylsulfat.

Tabelle 43: Relative Zytotoxizität (CC_{rel}) der untersuchten Tenside in U937- und HaCaT-Zellen

| Substanzen | Exposition: 1h CC_{rel} [%] | | Exposition: 24h CC_{rel} [%] | |
|----------------------------------|----------------------------------|--------------|-----------------------------------|--------------|
| | U937-Zellen | HaCaT-Zellen | U937-Zellen | HaCaT-Zellen |
| Benzalkoniumchlorid | 527 | 371 | 945 | 728 |
| Natriumcetylstearylsulfat | 466 | 84 | 357 | 285 |
| Natriumdodecylsulfat | 100 | 100 | 100 | 100 |
| Natriumdodecylethersulfat | 113 | 119 | 73 | 128 |
| Cocamidopropylbetain | 238 | 128 | 76 | 164 |
| Sojalecithin | 0,1 | 0,6 | 0,07 | 22 |
| Cremophor[®] A25 | 564 | 116 | 399 | 385 |
| Brij[®]78 | 456 | 125 | 348 | 432 |
| Triton[®] X-100 | 66 | 66 | 63 | 69 |
| Polysorbat 80 | 11 | 19 | 12 | 20 |
| Cremophor[®] EL | 0,02 | 0,8 | 3 | 12 |
| Poloxamer[®] 188 | 0,03 | 0,04 | 0,02 | 0,04 |

Das nichtionische Octylphenoxypolyethylenglycol Triton[®] X-100 ist an beiden Zellarten sowohl nach 1 als auch nach 24 Stunden weniger toxisch als Natriumdodecylsulfat, jedoch deutlich toxischer als der Spanfettsäureester Polysorbat 80. Natriumdodecylsulfat ist ca. 1,5fach toxischer als Triton[®] X-100 und 7fach toxischer als Polysorbat 80. Zu den weniger toxischen Substanzen gehören mit relativen Zytotoxizitäten zwischen 10 und 0,02 Polysorbat 80, Sojalecithin, Cremophor[®] EL und Poloxamer[®] 188.

4.5.2. Membrantoxizität

Die Tabelle 44 gibt die MTK-Werte der untersuchten Tenside nach 1 und 24 Stunden Exposition bei 37°C und nach 1 Stunde bei 4°C wieder. Die Ergebnisse zeigen, dass die Membrantoxizität bei allen Stoffen nach 24 Stunden zunimmt. Sie steigt bei den meisten Stoffen um den Faktor 2. Bei Sojalecithin ist die Membrantoxizität um den Faktor 5 erhöht. Besonders auffällig ist die zeitabhängige Zunahme der Membrantoxizität bei Cremophor® EL, hier ist die MTK nach 24 Stunden 150mal kleiner als nach 1-stündiger Exposition.

Die am wenigsten membranschädigende Substanz ist Poloxamer® 188, bei der die MTK über 50 mg/ml liegt. Die höchste Membrantoxizität nach 24-stündiger Exposition weist Benzalkoniumchlorid mit einer MTK von 0,63 µg/ml auf.

Tabelle 44: Minimal toxische Konzentrationen der untersuchten Tenside nach 1 und 24 Stunden bei 4°C und 37°C

| Substanzen | Exposition: 1h, 4°C MTK [µg/ml] | Exposition: 1h, 37°C MTK [µg/ml] | Exposition: 24h, 37°C MTK [µg/ml] |
|---------------------------|---------------------------------------|--|---|
| Benzalkoniumchlorid | 1,56 | 2,93 | 0,63 |
| Natriumcetylstearylsulfat | - | 1,87 | 1,48 |
| Natriumdodecylsulfat | 5,91 | 6,76 | 1,65 |
| Natriumdodecylethersulfat | 1,91 | 3,74 | 2,09 |
| Cocamidopropylbetain | 1,71 | 2,68 | 1,96 |
| Sojalecithin | 1690 | 948 | 179 |
| Cremophor® A25 | - | 1,64 | 0,71 |
| Brij® 78 | 1,59 | 1,66 | 0,71 |
| Triton® X-100 | 39,6 | 41,1 | 15,8 |
| Polysorbat 80 | 24,9 | 80,0 | 44,4 |
| Cremophor® EL | 79200 | 20300 | 137 |
| Poloxamer® 188 | 80700 | 59600 | 50500 |

Bei Sojalecithin, Cremophor® EL und Poloxamer® 188 ist die MTK bei 4°C deutlich größer als bei 37°C, sodass in dem Konzentrationsbereich zwischen den MTK-Werten bei 4°C und bei 37°C ein enzymatischer Mechanismus denkbar wäre. In den Konzentrationen oberhalb der MTK bei 4°C ist allerdings wieder die unspezifische Membranschädigung durch die oberflächenaktiven Eigenschaften der Tenside anzunehmen. Bei allen anderen untersuchten Tensiden ist die MTK bei 4°C kleiner als bei 37°C. Die [³H]Arachidonsäure-Freisetzung erfolgte

4. Ergebnisse

demnach in Kälte ebenso wie in Wärme. Enzymatische Abläufe können somit ausgeschlossen werden.

Für den Vergleich der Substanzen wurde die relative Membrantoxizität (MTK_{rel}) bestimmt. Als Vergleichssubstanz ist das Standardirritans Natriumdodecylsulfat verwendet worden. In Tabelle 45 sind die Werte der relativen Membrantoxizität der Tenside dargestellt.

Tabelle 45: Relative Membrantoxizität (MTK_{rel}) der untersuchten Tenside

| Substanzen | Exposition: 1h MTK_{rel} [%] | Exposition: 24h MTK_{rel} [%] |
|----------------------------------|-----------------------------------|------------------------------------|
| Benzalkoniumchlorid | 230 | 262 |
| Natriumcetylstearylsulfat | 361 | 111 |
| Natriumdodecylsulfat | 100 | 100 |
| Natriumdodecylethersulfat | 181 | 79 |
| Cocamidopropylbetain | 236 | 84 |
| Sojalecithin | | 0,9 |
| Cremophor[®] A25 | 412 | 232 |
| Brij[®]78 | 407 | 232 |
| Triton[®] X-100 | 16 | 10 |
| Polysorbat 80 | 8 | 4 |
| Cremophor[®] EL | 0,03 | 1 |
| Poloxamer[®] 188 | 0,01 | |

Die Polyethylenglycolfettalkoholether Brij[®]78 und Cremophor[®] A25, typische Vertreter der nichtionischen Tenside, sind mit MTK-Werten von 0,71 µg/ml nach 24 Stunden ebenso stark membrantoxisch wie Benzalkoniumchlorid. Das Standardirritans Natriumdodecylsulfat ist im Vergleich dazu deutlich weniger toxisch, die MTK ist mit 1,65 µg/ml mehr als doppelt so groß. Eine etwa gleiche Membrantoxizität weisen die drei untersuchten anionischen Tenside und das amphotere Cocamidopropylbetain nach 24-stündiger Exposition auf. Deutlich weniger membranschädigend als Natriumdodecylsulfat sind Triton[®] X-100 und Polysorbat 80. Natriumdodecylsulfat ist im Vergleich zu Triton[®] X-100 und Polysorbat 80 nach 24 Stunden 10 bis 25mal stärker membrantoxisch.

Sojalecithin, Cremophor[®] EL und Poloxamer[®] 188 sind mit MTK-Werten über 100 µg/ml vergleichsweise gering membrantoxisch. Da bei Cremophor[®] EL die Membrantoxizität mit der Zeit stark zunimmt, ist hier nach 24 Stunden die relative Membrantoxizität 1%, nach 1-stündiger Exposition liegt sie bei 0,03%. Die am geringsten membrantoxische Substanz ist das nichtionische Block-Polymer Poloxamer[®] 188. Nach 24-stündiger Exposition liegt die relative Membrantoxizität bei 0,003%.

4. Ergebnisse

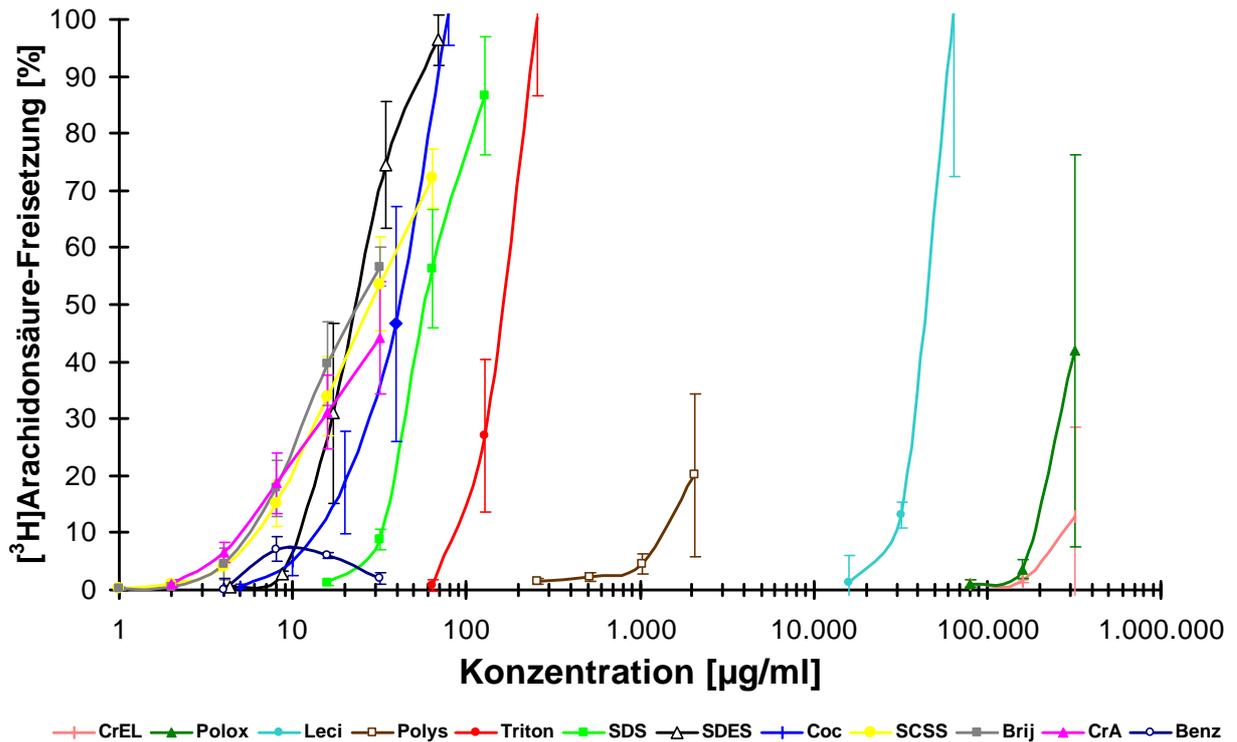


Abb. 138: Prozentuale [³H]Arachidonsäure-Freisetzung von Tensiden nach 1 Stunde Exposition bei 37°C

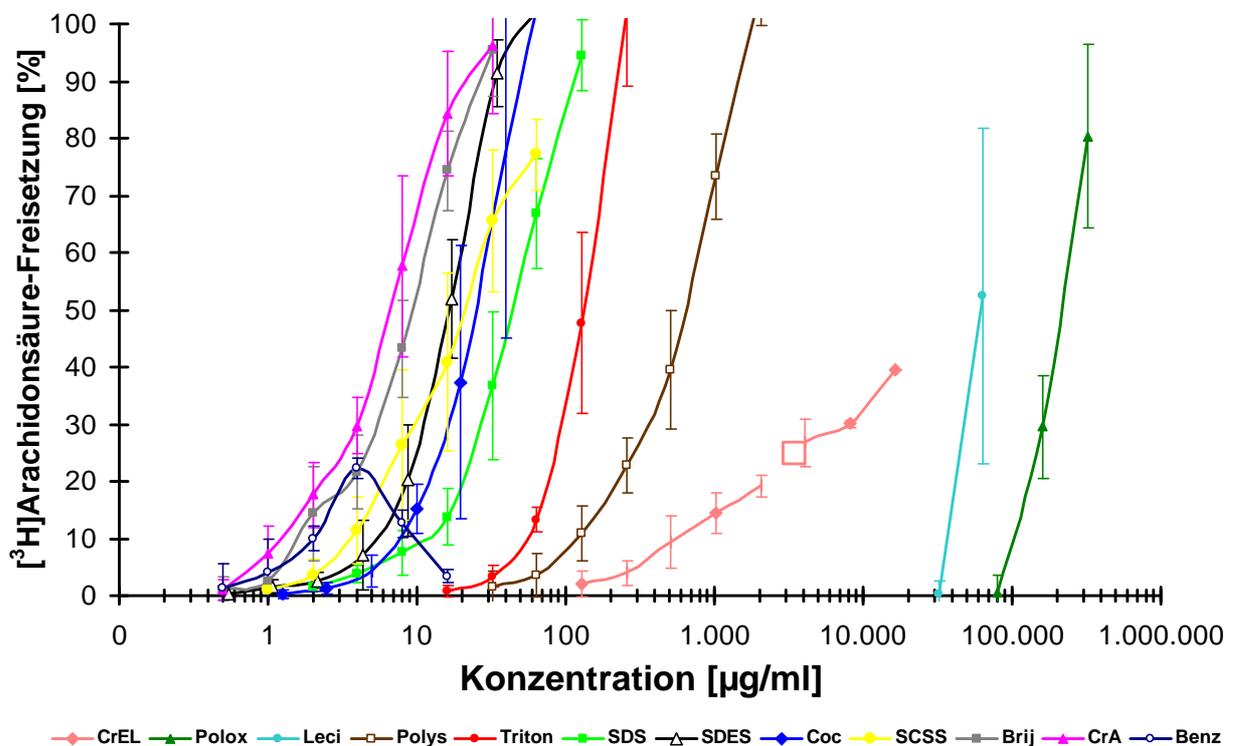


Abb. 139: Prozentuale [³H]Arachidonsäure-Freisetzung von Tensiden nach 24 Stunden Exposition bei 37°C

Zum Vergleich der Konzentrations-Wirkungs-Beziehungen der [³H]Arachidonsäure-Freisetzung der untersuchten Tenside ist in den Abbildungen 138 und 139 die prozentuale

4. Ergebnisse

[³H]Arachidonsäure-Freisetzung der Tenside im Vergleich zur Positivkontrolle mit 320 µg/ml Natriumdodecylsulfat dargestellt.

Nach 24-stündiger Exposition verlaufen die Konzentrations-Wirkungs-Kurven der untersuchten Tenside mit Ausnahme von Cremophor[®] EL annähernd parallel. Bei Benzalkoniumchlorid verläuft die Konzentrations-Wirkungs-Kurve bis zum Maximum parallel. Die Konzentrations-Wirkungs-Kurve von Cremophor[®] EL ist nicht so steil wie die der anderen Tenside.

Ergänzend zu Konzentrations-Wirkungs-Kurven sind in der Tabelle 46 die Werte für die halbmaximale [³H]Arachidonsäure-Freisetzung (RC₅₀) der Tenside aufgeführt.

Bei Benzalkoniumchlorid war ein Maximum im Bereich von 10 bis 20% [³H]Arachidonsäure-Freisetzung zu beobachten. Infolge dessen konnte eine RC₅₀ nicht bestimmt werden. Auch bei 1-stündiger Exposition mit Polysorbat 80 und Poloxamer[®] 188, bei 24-stündiger Exposition mit Sojalecithin und bei Cremophor[®] EL konnte keine halbmaximale [³H]Arachidonsäure-Freisetzung bestimmt werden.

Tabelle 46: Halbmaximale [³H]Arachidonsäure-Freisetzung (RC₅₀) der untersuchten Tenside

| Substanzen | Exposition: 1h, 37°C RC ₅₀ [µg/ml] | Exposition: 24h, 37°C RC ₅₀ [µg/ml] |
|----------------------------|--|---|
| Benzalkoniumchlorid | nicht bestimmbar | nicht bestimmbar |
| Natriumcetylstearylsulfat | 28,3 (23,7-33,9) | 19,9 (13,8-28,8) |
| Natriumdodecylsulfat | 61,6 (52,0-72,9) | 38,0 (29,4-49,2) |
| Natriumdodecylethersulfat | 23,9 (20,2-28,3) | 14,2 (12,0-16,9) |
| Cocamidopropylbetain | 33,7 (25,7-44,3) | 21,1 (14,8-30,0) |
| Sojalecithin | 43900 (35400-54500) | nicht bestimmbar |
| Cremophor [®] A25 | 57,4 (28,8-115) | 5,91 (4,33-8,07) |
| Brij [®] 78 | 26,5 (22,2-31,6) | 7,71 (6,15-9,66) |
| Triton [®] X-100 | 144 (125-165) | 110 (90,2-134) |
| Polysorbat 80 | nicht bestimmbar | 490 (429-561) |
| Cremophor [®] EL | nicht bestimmbar | nicht bestimmbar |
| Poloxamer [®] 188 | nicht bestimmbar | 449000 (183000-1100000) |

Die Membrantoxizität der untersuchten Tenside nimmt in folgender Reihenfolge zu (24 Stunden Exposition): Poloxamer[®] 188 < Cremophor[®] EL = Sojalecithin < Polysorbat 80 < Triton[®] X-100 < Natriumdodecylsulfat = Natriumdodecylethersulfat = Natriumcetylstearylsulfat = Cocamidopropylbetain < Brij[®] 78 = Cremophor[®] A25 = Benzalkoniumchlorid. Auch bei der Membrantoxizität ist kein Zusammenhang mit der Ladung der hydrophilen Gruppe der oberflächenaktiven Substanzen nachzuweisen.

4.5.3. Vergleich von Zytotoxizität und [³H]Arachidonsäure-Freisetzung

In den Tabellen 47 und 48 sind die halbmaximalen zytotoxischen Konzentrationen (CC₅₀) der MTK gegenübergestellt. Zusätzlich ist die bei der MTK bestimmte Zytotoxizität in den Tabellen enthalten.

Tabelle 47: Gegenüberstellung von Zytotoxizität und Membrantoxizität nach 1-stündiger Exposition mit den untersuchten Tensiden

| Substanzen | CC ₅₀ bei 37°C, 1h [µg/ml] | MTK (37°C, 1h) [µg/ml] | Zytotoxizität bei MTK [%] |
|----------------------------|--|---------------------------|------------------------------|
| Benzalkoniumchlorid | 6,05 (5,21-7,03) | 2,93 | 8,92 |
| Natriumcetylstearylsulfat | 6,85 (5,93-7,92) | 1,87 | 0 |
| Natriumdodecylsulfat | 31,9 (23,2-44,0) | 6,76 | 0 |
| Natriumdodecylethersulfat | 28,1 (20,1-39,2) | 3,74 | 0 |
| Cocamidopropylbetain | 13,4 (12,0-14,9) | 2,86 | 0 |
| Sojalecithin | 31900 (13400-75700) | 948 | 0 |
| Cremophor [®] A25 | 5,66 (3,78-8,49) | 1,64 | 0 |
| Brij [®] 78 | 7,00 (6,08-8,06) | 1,66 | 0 |
| Triton [®] X-100 | 48,4 (46,9-50,0) | 41,1 | 39,9 |
| Polysorbat 80 | 279 (207-378) | 80,0 | 17,6 |
| Cremophor [®] EL | 159000 (116000-217400) | 20300 | 0 |
| Poloxamer [®] 188 | 98400 (91200-106000) | 59600 | 17,2 |

Bei 1-stündiger Exposition ist nur bei vier der elf untersuchten Tenside eine Zytotoxizität bei der MTK (10 bis 40%) nachweisbar. Nach 24 Stunden hingegen ist bei fast allen untersuchten Tensiden außer bei Natriumdodecylsulfat und Natriumdodecylethersulfat eine deutliche Zytotoxizität bei der MTK (5 bis 75%) nachzuweisen.

Nach 24-stündiger Exposition stimmt die Rangfolge der Membrantoxizität der Tenside weitestgehend mit der ihrer Zytotoxizität überein. Die In-vitro-Toxizität der Tenside nimmt in folgender Reihenfolge zu: Poloxamer[®] 188 < Cremophor[®] EL < Sojalecithin < Polysorbat 80 < Triton[®] X-100 < Natriumdodecylsulfat = Natriumdodecylethersulfat = Cocamidopropylbetain < Natriumcetylstearylsulfat < Brij[®]78 = Cremophor[®] A25 = Benzalkoniumchlorid.

Nach 1-stündiger Exposition ist die Übereinstimmung der beiden Methoden ebenfalls gut, jedoch ist Benzalkoniumchlorid hier weniger membrantoxisch.

Tabelle 48: Gegenüberstellung von Zytotoxizität und Membrantoxizität nach 24-stündiger Exposition mit den untersuchten Tensiden

| Substanzen | CC ₅₀ bei 37°C, 24h [µg/ml] | MTK (37°C, 24h) [µg/ml] | Zytotoxizität bei MTK [%] |
|----------------------------------|---|----------------------------|------------------------------|
| Benzalkoniumchlorid | 0,60 (0,47-0,78) | 0,63 | 51,2 |
| Natriumcetylstearylsulfat | 1,59 (1,33-1,91) | 1,48 | 46,4 |
| Natriumdodecylsulfat | 5,67 (4,06-7,92) | 1,65 | 0 |
| Natriumdodecylethersulfat | 7,81 (6,71-9,08) | 2,09 | 0 |
| Cocamidopropylbetain | 7,47 (6,29-8,86) | 1,96 | 4,80 |
| Sojalecithin | 7920 (3220-19500) | 179 | 3,56 |
| Cremophor® A25 | 1,42 (1,38-1,46) | 0,71 | 11,5 |
| Brij®78 | 1,63 (1,21-2,21) | 0,71 | 13,1 |
| Triton® X-100 | 8,98 (6,91-11,7) | 15,8 | 67,4 |
| Polysorbat 80 | 48,1 (41,4-55,8) | 44,4 | 45,7 |
| Cremophor® EL | 160 (135-191) | 137 | 42,1 |
| Poloxamer® 188 | 26000 (18100-37500) | 50500 | 77,6 |

4.5.4. Apoptose und morphologische Zellveränderungen

Bei allen untersuchten Tensiden waren erhöhte Mengen Histon-assoziiierter-DNA-Fragmente nachzuweisen. Auch die durchflusszytometrischen Bestimmungen bestätigen, dass alle Tenside in unterschiedlichem Ausmaß Apoptose induzieren. Vor allem bei geringen Konzentrationen konnte Apoptose beobachtet werden. Höhere Konzentrationen führen jedoch vorrangig zu Nekrose. Das ist aus den Dotplots und den morphologischen Veränderungen ersichtlich.

Bei U937-Zellen konnten apoptotische Körperchen nach Inkubation mit Triton® X-100, Polysorbat 80, Cremophor® EL, Natriumdodecylsulfat, Natriumcetylstearylsulfat, Benzalkoniumchlorid und Cocamidopropylbetain beobachtet werden. HaCaT-Zellen zeigen nach Inkubation mit Triton® X-100, Polysorbat 80, Benzalkoniumchlorid und Cocamidopropylbetain Veränderungen, die auf Apoptose schließen lassen.

Zur kompletten Lyse der U937- und der HaCaT-Zellen führten alle Tenside außer Cremophor® A25, Brij®78, Poloxamer® 188 und Sojalecithin. Cremophor® EL führte nur nach 24 Stunden Exposition zur kompletten Lyse der U937-Zellen.

5. Diskussion

Tenside sind Substanzen mit grenzflächenaktiven Eigenschaften, die in großem Umfang als Hilfsstoffe in der Pharmazie eingesetzt werden. Sie müssen neben den gewünschten pharmazeutisch-technologischen Eigenschaften vor allem eine gute physiologische Verträglichkeit aufweisen. Mit Hilfe mehrerer In-vitro-Testsysteme und an zwei Zellkulturen wurden wichtige Vitalitätsmerkmale der Zelle, wie die Integrität der Zellmembran, die Stoffwechselaktivität sowie morphologische Zellveränderungen und der Mechanismus des Zellsterbens untersucht. Die ermittelten Konzentrations-Wirkungs-Beziehungen und die errechneten Kenngrößen sollen dazu dienen, das Irritationspotenzial von 12 offizinellen Tensiden, die eine große Rolle in unserem täglichen Leben und in der pharmazeutischen Praxis spielen, und die die wichtigsten Gruppen der Tenside vertreten, zu beurteilen.

Methoden zur Bestimmung des Irritationspotenzials

Zur Bestimmung des Irritationspotenzials von Tensiden sind verschiedene Testansätze möglich. Grundsätzlich muss zwischen In-vivo- und In-vitro-Methoden unterschieden werden. In der Tabelle 49 sind einige In-vivo-Methoden zur Ermittlung lokaler Irritationen aufgeführt. Bei den angegebenen Literaturstellen wurden die Methoden vor allem zur Untersuchung von Tensiden verwendet.

Das Irritationspotenzial an der Haut kann in vivo an freiwilligen Probanden oder Patienten bestimmt werden. Es gibt daneben auch Methoden zur Bestimmung von Hautirritationen am Tier, die jedoch sehr schlecht reproduzierbar und invasiv sind [81]. Auch steht der Aufwand derartiger Tierversuche nicht im Verhältnis zu deren Nutzen. So wurde z.B. Nacktmäusen menschliche Haut auf den Rücken transplantiert, um Untersuchungen an der menschlichen Haut durchzuführen [227].

Die Ergebnisse von Tierversuchen zur Bestimmung einer Hautirritation variieren sehr stark, da die Unterschiede zwischen den Spezies wie z.B. Mensch, Meerschweinchen und Kaninchen sehr groß sind [97]. Das Kaninchen reagiert wesentlich empfindlicher als der Mensch [97]. Da die Tiere rasiert werden müssen, reagiert die Haut deutlich stärker [81, 97, 105]. Reproduzierbarkeit, Zulänglichkeit und Voraussagemöglichkeit des Patchtests am rasierten Kaninchen und anderen Tieren werden immer mehr in Frage gestellt [97].

Auf solche Tierversuche kann durchaus verzichtet werden, zumal die gewonnenen Aussagen höchstens denen eines Screening entsprechen [170]. Wegen des hohen Versuchsaufwandes, der starken Belastung des Versuchstieres und der erwähnten Unzuverlässigkeit sollten derartige Versuche der Vergangenheit angehören. Wesentlich besser geeignete Screening-Methoden zur Abschätzung des Hautirritationspotenzials sind Zytotoxizitätsuntersuchungen, wie sie auch in der vorliegenden Arbeit durchgeführt wurden.

Tabelle 49: Einige gebräuchliche Methoden zur Ermittlung lokaler Irritationen in vivo

| Haut | | Auge | | Weitere Methoden | |
|--|---|---|---|--|--|
| <i>T i e r v e r s u c h e</i> | | | | | |
| Tiere | Nachweis- methoden | Tiere | Nachweis- methoden | Tiere | Nachweis- methoden |
| <ul style="list-style-type: none"> ➤ Ratte [81, 176, 185] ➤ Kaninchen [67, 81, 105, 170] ➤ Meerschweinchen [81, 170, 185] ➤ Maus [140] | <ul style="list-style-type: none"> ➤ Morphologie von Gewebeschnitten evtl. nach Trypanblaufärbung [81, 140] ➤ Visueller Score [67, 105, 170, 185] | <ul style="list-style-type: none"> ➤ Kaninchen [124, 129] ➤ Ratte [157] | <ul style="list-style-type: none"> ➤ Vermessung der Hornhautdicke [124, 129] ➤ Untersuchung morphologischer Hornhautveränderungen [124, 157] ➤ Visueller Score [67, 129] | <ul style="list-style-type: none"> ➤ Maus [41] | <ul style="list-style-type: none"> ➤ Atemfrequenz als Maß für Irritationen im oberen Respirationstrakt [41] |
| <i>T e s t s a n P r o b a n d e n u n d P a t i e n t e n</i> | | | | | |
| <ul style="list-style-type: none"> ➤ Patch-Test mit und ohne Okklusion [6, 7, 24, 74, 81, 145, 146, 185, 236] | <ul style="list-style-type: none"> ➤ Visueller Score [6, 7, 81, 185] ➤ TEWL [6, 7, 74, 145] ➤ Vermessung v. Erythemen, Desquamation, Hydratation [6, 7, 24, 74, 236] | | | <ul style="list-style-type: none"> ➤ Untersuchungen an der Mundschleimhaut [112, 113] | <ul style="list-style-type: none"> ➤ Visueller Score [112] |

Hautirritationen sind vor allem mit Entzündungsreaktionen wie Rötung, Ödemen und Schmerz sowie mit mehr oder weniger starker Zytotoxizität verbunden. Dabei ist es durchaus von Interesse, ob der Zelltod nekrotischer oder apoptotischer Art ist. Denn nekrotische Zellveränderungen führen in der Regel auch zur Beeinträchtigung des umgebenden Gewebes [97, 171], was bei der Apoptose nicht der Fall ist [69, 70].

Nach umfassenden Zytotoxizitätsuntersuchungen sind die erwähnten In-vivo-Tests an Freiwilligen am besten zur Bestimmung von Irritationen an der Haut geeignet. Bei solchen Tests sind auch gute Korrelationen von subjektivem Score und objektiven Parametern, wie z.B. dem transepidermalen Wasserverlust (TEWL), gefunden worden [6, 7, 72]. Objektive Daten sind jedoch in jedem Fall zuverlässiger [72, 145].

Irritationen am Auge können aus ethischen Gründen in vivo nur am Tier untersucht werden. Als Standardtest galt hier lange Zeit der Draize-Test am Kaninchen-Auge. Dieser Test ist

jedoch sehr invasiv und oft nicht reproduzierbar [67, 129, 211]. Bei Untersuchungen am Auge sind signifikante Interspeziesvariationen zwischen Hund, Schwein und Kaninchen gefunden worden [97]. Auch gilt zu bedenken, dass sich das menschliche Auge vor allem durch die Hornhautdicke, die fehlende Nickhaut, die Pufferkapazität der Tränenflüssigkeit sowie dem Blinzelreflex vom Kaninchenauge unterscheidet [114, 211].

Der Draize-Test gerät wegen ethischer Aspekte und der mangelhaften Aussagekraft und Reproduzierbarkeit immer mehr in die Kritik [114, 211]. In Ringversuchen wurden Substanzen von den einzelnen Labors teilweise sehr unterschiedlich bewertet. Ein und dieselbe Substanz wurde von verschiedenen Arbeitsgruppen als nicht bzw. stark irritierend eingestuft [114]. Ursache hierfür ist die subjektive Einschätzung beim Ablesen der Reaktionen und beim Ablesen der Bewertungsskala [129, 211]. Alternativ werden objektive Parameter wie Hornhautdicke und -veränderung gemessen [124, 129].

Da bei Augenirritationen der Zelltod eine Schlüsselrolle spielt und derzeit keine zuverlässige In-vivo-Methode zur Verfügung steht, kommt hier den spezifischen Untersuchungen an Zellen große Bedeutung zu [124, 157].

In der vorliegenden Arbeit wurden mehrere Methoden verwendet, mit denen spezifische Funktionen der Zelle und Zellstrukturen analysiert wurden, um so eine Toxizität an der Zelle nachzuweisen.

Eine Zytotoxizität kann durch verschiedene Mechanismen ausgelöst werden. Wichtige Angriffspunkte für toxische Substanzen sind dabei die Störung der Membranfunktion, der Redoxhomöostase, der ATP- und Makromolekülsynthese sowie eine Schädigung des Erbguts [198]. Toxische Zellveränderungen können dabei reversibel sein, wie z.B. eine Bindung an Rezeptoren, die Komplexbildung mit Enzymen oder Permeabilitätsveränderungen von Membranen. Einige Zellveränderungen sind jedoch irreversibel, z.B. Reaktionen wie Oxidation, Hydrolyse oder Bildung kovalenter Bindungen sowie eine massive Störung der Membranfunktion [198]. Dabei gilt immer, dass Wirkungen, die über einen physiologischen Schwankungsbereich hinausgehen, zum Tod der Zelle führen. Dieser kann nekrotisch oder apoptotisch sein [198].

Es gibt sehr viele unterschiedliche Methoden um den Zelltod zu bestimmen. Bei den meisten Methoden wird zu einem festgelegten Zeitpunkt (Endpunkt) ein spezieller Parameter ermittelt, der eine typische Funktion der Zelle kennzeichnet, die bestimmend für deren Vitalität ist. In der Tabelle 50 sind einige gebräuchliche Methoden zur Ermittlung der Zytotoxizität aufgelistet. Bei den angegebenen Literaturstellen wurden die Tests vor allem zur Untersuchung von Tensiden oder als Ersatzmethode zur Bestimmung lokaler Irritationen verwendet.

Tabelle 50: Einige gebräuchliche Methoden zur Ermittlung der Zytotoxizität

| Prinzip | | Methode | | Literatur |
|---------------------------------------|---|--|---|---|
| Bestimmung physiologischer Leistungen | Aktive Aufnahme von Stoffen durch die Zelle als Maß für ihre Vitalität | Neutralrot-Aufnahme-Test | nach Aufnahme des Farbstoffes bzw. des Nukleosides photometrische bzw. radiographische Messung | [17, 22, 47, 62, 87, 90, 101, 126, 139, 141, 142, 143, 146, 154, 162, 174, 188, 194, 207, 237, 244] |
| | | [³ H]Uridin-Aufnahme-Test | | [139] |
| | Reduktionsvermögen lebender Zellen | XTT-Test MTT-Test | nach Reduktion der Tetrazoliumsalze zu farbigen Formazanen bzw. der BG-Leukobase zu grünem Farbstoff photometrische Messung | [36, 188] [12, 22, 26, 47, 52, 56, 60, 76, 90, 92, 93, 94, 101, 126, 137, 154, 161, 164, 174, 177, 180, 224, 234, 245] |
| | | Bindschedler's Grün-Leukobase-Test (BG) | | [244] |
| | DNA- o. Proteingehalt als Maß für die Zellzahl | [³ H]Thymidin-Test | fluorimetrische bzw. autoradiographische Bestimmung der DNA-Menge | [22, 102] |
| | | Färbung mit Hoechst 33258 | | [26] |
| | | Kenacidblau-Färbung | photometrische bzw. radiographische Bestimmung | [42, 87, 154, 182, 197] |
| | | [³ H]Prolin-Test | des Gesamtproteingehaltes der Zelle | [19] |
| | | Bio-Rad-Färbung | | [136, 154, 188, 194] |
| | Enzyme u. Substrate als Maß für den Stoffwechsel lebender Zellen | Intrazelluläres ATP | luminometrische Best. | [37] |
| | | Lactatproduktion | photometrische Best. | [182] |
| | | Glukoseverbrauch | Best. im Autoanalyser | [174] |
| Bestimmung der Membranintegrität | Freisetzung v. intrazellulären Stoffen, Farbstoffen bzw. Membranbestandteilen | LDH-Freisetzung | Best. im Autoanalyser | [12, 76, 90, 101, 126, 154, 160, 174, 194, 219] |
| | | β-NAG-Freisetzung | Best. im Autoanalyser | [160, 174] |
| | | Hämolyse | photometrische Messung | [25, 156, 169, 187, 175] |
| | | Neutralrot-Freisetzung | photometrische Messung | [136, 137, 154] |
| | | [³ H]Arachidonsäure | radiographische Messung | [39, 133, 134, 164, 222] |
| | Aufnahme des Farbstoffes durch tote Zellen | Trypanblaufärbung | Auszählung der Zellen | [56, 179, 188] |
| | | Janus-Grünfärbung | photometrische Bestimmung | [180] |
| Beobachtungen | Kenntlichmachen morphologischer Zellveränderungen | Agar-Overlay-Test | Sichtbarmachen der Zelllyse (Lysehöfe) | [154, 194] |
| | | Licht- u. Elektronen-Mikroskop | | [17, 27, 94, 104, 153, 177, 178, 237, 190, 200, 218, 224] |
| | Färbemethoden | Durchflusszytometrie, Mikroskop | [126, 153, 186, 229] | |
| | Zellzahl | Kristallviolett-Färbung, Durchflusszytometrie, Zählkammer, Counter | [98, 104] | |
| | Zelladhäsion | | [102, 154] | |
| | Zellvolumen | | [98, 238] | |

Es werden bei den aufgeführten Methoden entweder spezielle physiologische Leistungen, die nur von der lebenden Zelle erbracht werden können, untersucht oder es wird mit unterschiedlichen Methoden die Membranintegrität bestimmt. Doch auch morphologische Veränderungen an der Zelle spielen eine große Rolle bei zytotoxikologischen Untersuchungen. In der vorliegenden Arbeit wurden mehrere Methoden verwendet, bei denen alle drei Nachweis-Prinzipien zur Bestimmung der Toxizität an der Zelle genutzt wurden.

Das Vitalitätsmerkmal Reduktionsvermögen wurde mit einem XTT-Test bestimmt. Bei diesem Test wird wie beim MTT-Test das Reduktionsvermögen mitochondrialer Dehydrogenasen lebender Zellen bestimmt.

Eine gute Übereinstimmung des MTT-Tests mit In-vivo-Studien wurde für Tenside in zahlreichen Arbeiten nachgewiesen. Gut korrelierten die Ergebnisse des MTT-Tests mit dem Augenirritationstest am Kaninchen nach Draize [101, 177]. Die In-vitro-Versuche wurden an Cornea-Zellen vom Kaninchen [101] oder rekonstruiertem Cornea-Epithel vom Rind [177] durchgeführt. Bei den Versuchen an den Kaninchen-Cornea-Zellen wurde das gleiche Ranking wie in der vorliegenden Arbeit (Benzalkoniumchlorid > Natriumdodecylsulfat > Triton® X-100) ermittelt [101].

Gut korrelierten Ergebnisse des MTT-Tests an primären und permanenten Keratinozyten mit der in vivo bestimmten Hautirritation am rasierten Kaninchen. In dieser Studie wurde ebenfalls das gleiche Ranking wie in der vorliegenden Arbeit (Benzalkoniumchlorid > Natriumdodecylsulfat = Cocamidopropylbetain) gefunden [234].

Auch Tests am Menschen, wie der Patch-Test an der Haut, zeigten eine gute Übereinstimmung mit dem MTT-Test [60, 137, 174]. Die Untersuchungen wurden an primären Keratinozyten [137, 174] oder am humanen Hautmodell [60, 174] durchgeführt. Auch bei einer solchen Studie wurde das gleiche Ranking wie in der vorliegenden Arbeit (Benzalkoniumchlorid > Natriumdodecylsulfat > Polysorbat 80) festgestellt [174].

In einer weiteren Studie wurde wie in der vorliegenden Arbeit der XTT-Test an HaCaT-Zellen durchgeführt. Beim Vergleich der Ergebnisse des XTT-Tests mit den Ergebnissen eines Patch-Tests wurde eine sehr gute Übereinstimmung gefunden. Die Ergebnisse des XTT-Tests entsprachen denen der vorliegenden Arbeit (Benzalkoniumchlorid > Natriumdodecylsulfat > Polysorbat 80) [36].

Der häufig verwendete MTT-Test hat den Nachteil der Wasserunlöslichkeit des gebildeten Formazans [199]. Die Vorteile des XTT-Tests gegenüber dem MTT-Test bestehen vor allem in der einfacheren Handhabung sowie im Wegfall der Verwendung toxischer Lösungsmittel [36, 135]. Außerdem sind nach Durchführung des MTT-Tests die Zellen durch die Kristalle des wasserunlöslichen Formazans zerstört [121].

Zu bedenken ist jedoch, dass auch das Substrat XTT gewisse toxische Eigenschaften hat. Wie in der vorliegende Arbeit nachgewiesen werden konnte, beträgt die Zytotoxizität von XTT 84%. XTT verursachte deutliche morphologische Veränderungen an den HaCaT-Zellen. Des Weiteren wurde durch das Substrat die Zytotoxizität von Cremophor® EL verstärkt. Wird der Test wie beschrieben durchgeführt, ist nicht auszuschließen, dass bei der 2-stündigen Inkubation mit dem Substrat weitere Schäden an den Zellen auftreten, vor allem dann, wenn Stoffe untersucht werden, deren Zytotoxizität mit der Zeit stark zu nimmt.

Um Störungen der Membranintegrität der Zelle zu untersuchen, wurde der AART verwendet, da bei diesem Test nicht die Freisetzung eines intrazellulären Stoffes, sondern die Herauslösung eines Bestandteils der Zellmembran bestimmt wird.

Auch die Freisetzung der Arachidonsäure aus der Zellmembran wurde in einigen Arbeiten mit unterschiedlichen Tests untersucht. Dabei wurde für Tenside eine gute Übereinstimmung mit In-vivo-Tests nachgewiesen [39, 56, 164]. In einer der Studien wurden mehrere Tenside, die auch in der vorliegenden Arbeit untersucht wurden, getestet. Ein gleiches Ranking (Benzalkoniumchlorid > Natriumdodecylsulfat > Polysorbat 80) wurde festgestellt [164].

Die Arachidonsäure kann dabei wie im AART als [³H]Arachidonsäure radiographisch oder mit HPLC direkt bestimmt werden. Die Vorteile der Bestimmung der [³H]Arachidonsäure sind zum einen eine wesentlich einfachere Handhabung zum anderen die Erfassung aller Arachidonsäurederivate, wie Metabolite der Arachidonsäure und in Phosphoglyceride eingebaute Arachidonsäure.

Auch mit der Trypanblaufärbung kann eine gestörte Membranintegrität der Zelle nachgewiesen werden. Nachteile der Trypanblaufärbung sind die Toxizität des Farbstoffs sowie die Tatsache, dass die Zellen ausgezählt werden müssen und nicht photometrisch vermessen werden können. Außerdem können lysierte Zellen nicht erfasst werden. Zudem ist die Methode relativ aufwendig. Es muss wegen der Toxizität des Trypanblaus sehr zügig gearbeitet werden. Wegen dieser Nachteile wurde die Trypanblaufärbung nur bei zwei Tensiden durchgeführt.

Als drittes Nachweis-Prinzip zur Bestimmung der Zytotoxizität wurden in der vorliegenden Arbeit morphologische Veränderungen an den Zellen beobachtet. Auch morphologische Zellveränderungen korrelierten in mehreren Studien gut mit In-vivo-Daten [27, 101, 104, 167, 237].

Bei der Verwendung verschiedener Methoden spielen jedoch auch die Versuchsbedingungen eine Rolle. Wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden konnte, wurden zumindest nach 24-stündiger Exposition unter AART-Bedingungen die Zellen etwas weniger geschädigt

als bei der Zytotoxizitätsbestimmung. Ursache hierfür ist wahrscheinlich, dass für eine Suspensionszellkultur die Inkubation in Röhren günstiger ist als auf der Mikrotiterplatte. Außerdem verringert die Verwendung von FCS die Zytotoxizität, wie in einer Studie festgestellt wurde [47]. Die Reihenfolge der Toxizität der untersuchten Substanzen wurde in dieser Studie jedoch nicht beeinflusst [47].

Unabhängig von diesen auf die Versuchsbedingungen zurückzuführenden Unterschieden in der Toxizität, waren in der vorliegenden Arbeit die Mitochondrien nach kürzerer Exposition und bei geringeren Tensid-Konzentrationen bereits beeinträchtigt. Die Membran wurde erst nach längerer Exposition und bei höheren Konzentrationen so geschädigt, dass Arachidonsäure freigesetzt wurde. Ähnliche Ergebnisse bei Tensiden sind auch von einer anderen Arbeitsgruppe gefunden worden, die MTT-Test und LDH-Freisetzung als Methoden nutzte. Auch hier fand die LDH-Freisetzung im Vergleich zum MTT-Test später und bei höheren Konzentrationen statt [76].

Bei allen Methoden zur Bestimmung der Zytotoxizität werden einzelne Vitalitätsmerkmale der Zelle untersucht. Es ist möglich, dass die Ergebnisse verschiedener Methoden voneinander abweichen [154, 188]. Deshalb ist es wichtig, mehrere unterschiedliche Methoden zur Ermittlung der Zytotoxizität zu verwenden. Um zuverlässige Vorhersagen zum Irritationspotenzial einer Substanz zu treffen, sind unbedingt mehrere Endpunkte zu verschiedenen Zeitpunkten nötig. Auch andere Autoren fordern Endpunkte, die durch unterschiedliche Methoden bestimmt werden [101, 188, 194, 224]. Durch die Ergebnisse der verschiedenen Methoden sind auch Rückschlüsse auf den toxischen Mechanismus einer Substanz möglich [188].

In der vorliegenden Arbeit wurden deshalb drei unterschiedliche Methoden zur Zytotoxizitätsbestimmung sowie zwei Zelltypen verwendet. Auf die Verwendung von primären Zellkulturen wurde verzichtet, da die Übereinstimmung der Zytotoxizitätsergebnisse bei primären und permanenten Kulturen sehr gut bewertet wurde [104].

Bei den Untersuchungen zur Art des Zelltodes wurden in dieser Arbeit ebenfalls verschiedene Methoden verwendet. Zwei typische Merkmale der Apoptose, Histon-assoziierte DNA-Fragmente in den Zellen und die Aufhebung des Phosphatidylserin-Gradienten an der Zellmembran, wurden dabei untersucht [70, 226].

Zur Bestimmung der Art des Zelltodes waren die Beobachtungen der morphologischen Zellveränderungen ebenfalls sehr hilfreich. Bei der Bewertung der mikroskopischen Bilder der U937-Zellen konnte auf andere Studien zurückgegriffen werden [59, 96, 125, 128, 195, 196, 223, 239]. Die Abbildungen der apoptotischen U937-Zellen der aufgeführten Studien

glichen denen in der vorliegenden Arbeit. Auch für apoptotische HaCaT-Zellen standen in der Literatur Abbildungen zum Vergleich zur Verfügung [11, 111].

Zur Ermittlung von unbekanntem lokalen Irritationen sind im Vorfeld durchgeführte Untersuchungen zur Zytotoxizität mit verschiedenen Endpunkten unerlässlich. Es können neben einer Voreinstufung zur Gefährlichkeit der Substanzen auch wichtige Informationen zum Mechanismus der Toxizität der Substanzen gewonnen werden [90, 139].

Diesen zytotoxikologischen Untersuchungen sollten ganz spezifische In-vitro-Tests folgen, die den spezifischen Mechanismus der Testsubstanzen und die entsprechenden Eigenschaften des betroffenen Organs berücksichtigen [141].

Es wird kritisiert, dass für Haut- und Augenirritationen das gleiche Modell verwendet wird. Bei zytotoxikologischen Untersuchungen, die immer nur Voruntersuchungen darstellen, bei denen wichtige Informationen zu einem komplexen Mechanismus an der Zelle gewonnen werden, kann dies noch toleriert werden. Gänzlich abzulehnen sind Untersuchungen für die Abschätzung von Augenirritationen an Hautmodellen bzw. Untersuchungen für die Abschätzung von Hautirritationen an Augenmodellen. Oft werden bei einer nachgewiesenen Oculotoxizität auch entsprechende Interaktionen mit der Haut angenommen und umgekehrt. Diese hypothetische Korrelation wurde inzwischen widerlegt [114].

Für spezifischere Untersuchungen lokaler Irritationen sind Methoden notwendig, bei denen nicht allein die Zytotoxizität untersucht wird, sondern spezielle Parameter zur Charakterisierung von Toxizitätsmechanismen der Testsubstanzen unter Berücksichtigung der betroffenen Organe bestimmt werden können. In Tabelle 51 sind einige solcher spezifischen Methoden aufgeführt. Die genannten Methoden finden insbesondere bei der Untersuchung von Tensiden Verwendung.

Erst nach zytotoxikologischen und spezifischen In-vitro-Tests sollten In-vivo-Untersuchungen durchgeführt werden, die so auf einen sehr geringen Umfang begrenzt bleiben können. Auch Erfahrungswerte aus der Praxis spielen eine Rolle. Nach ihrer Freigabe sollten Substanzen weiterkontrolliert und eventuell auftretende toxische Wirkungen erfasst werden [97].

Zur Beurteilung des Irritationspotenzials einer bestimmten Stoffgruppe sollten möglichst viele Vertreter dieser Stoffgruppe mit unterschiedlichen Eigenschaften untersucht werden. Zu allen in der vorliegenden Arbeit untersuchten Tensiden gibt es Literaturangaben zu deren Toxizität. Jedoch ist die Zahl der untersuchten Tenside in den einzelnen Studien in der Regel auf ein bis drei Vertreter begrenzt. In der vorliegenden Arbeit sind alle offizinellen, das heißt alle wichtigen Tenside aus der pharmazeutischen Praxis, an den gleichen Modellen untersucht worden.

Tabelle 51: Weitere In-vitro-Methoden zur Bestimmung lokaler Irritationen

| Haut | | Auge | | Gefäße |
|---|--|--|--|---|
| Model | Bestimmung von: | Model | Bestimmung von: | |
| <ul style="list-style-type: none"> ➤ dreidimensionale Hautepithelzellkulturen, Hautmodelle [37, 84, 92, 183, 193, 224, 245] | <ul style="list-style-type: none"> ➤ Zytotoxizität [92, 193, 224, 245] ➤ Penetration [37, 193] ➤ genetischen Markern [233] ➤ Entzündungsmediatoren [92, 183, 224] ➤ morphologischen Veränderungen [183] | <ul style="list-style-type: none"> ➤ isolierte Hornhäute [100, 119] | <ul style="list-style-type: none"> ➤ Hornhauttrübung [119] ➤ Hornhautpassage [119] ➤ Hornhautdicke [100, 129] | <ul style="list-style-type: none"> ➤ Hyperämie, Haemorrhagie, Koagulation an d. Chorionallantoismembran des bebrüteten Hühnerreis (HET-CAM-Test) [139, 156, 194] |
| <ul style="list-style-type: none"> ➤ Keratinozytenkulturen [141, 143] | <ul style="list-style-type: none"> ➤ Entzündungsmediatoren [141, 143] ➤ genetischen Markern [104, 228] | <ul style="list-style-type: none"> ➤ isoliertes Rinderauge [194] | <ul style="list-style-type: none"> ➤ Hornhauttrübung und Hornhautpassage [194] | |
| <ul style="list-style-type: none"> ➤ humane Echthaut [200] ➤ Tierhautexplantate [139] ➤ Saugbläschenflüssigkeit der Haut [176] | <ul style="list-style-type: none"> ➤ morphologischen Veränderungen [200] ➤ Entzündungsmediatoren [166] ➤ Entzündungsmediatoren [176] | | | |

Benzalkoniumchlorid

Aus der Gruppe der kationischen Tenside wurde das Benzalkoniumchlorid untersucht. Kationische Tenside führen im Gegensatz zu anderen Tensiden gelegentlich zu oralen Vergiftungen [99], die unter Umständen auch tödlich enden können [217]. Intravasal verabreicht verursachen kationische Tenside curareartige Wirkungen [217].

Im Vergleich zu den anderen untersuchten Tensiden weist Benzalkoniumchlorid die höchste Zytotoxizität auf. Es ist auch, zumindest nach 24-stündiger Exposition, das am stärksten membrantoxische Tensid.

Benzalkoniumchlorid ist das einzige untersuchte Tensid, das im AART ein Maximum aufweist. Es wäre falsch daraus zu schließen, dass es bei höheren Konzentrationen zu einer Verringerung der Membrantoxizität von Benzalkoniumchlorid kommt. Obwohl die Zellen bei höheren Konzentrationen, z.B. bei 32 µg/ml, weniger oder keine Arachidonsäure mehr freisetzen, ist die Membran permeabel für Trypanblau, also keineswegs intakt. Auch im XTT-Test sind bei diesen Konzentrationen 100% Zytotoxizität bestimmt worden.

Da die Arachidonsäure-Freisetzung auch in Kälte, also nicht enzymatisch, erfolgt, kann man die verringerten Werte freigesetzter Arachidonsäure bei höheren Konzentrationen nicht auf eine Enzymhemmung zurückführen.

Aus den mikroskopischen Beobachtungen der Zellen nach Exposition mit zytotoxischen Konzentrationen geht hervor, dass bei höheren Konzentrationen im Gegensatz zur Exposition mit geringeren Konzentrationen keine Lyse der Zellen erfolgt. Die Zellen erscheinen lediglich verkleinert und behalten eine glatte Oberfläche. Die toten Zellen werden in ihrer Form fixiert. Möglicherweise verursachen höhere Konzentrationen von Benzalkoniumchlorid eine so starke Denaturierung der Membran-Proteine, dass eine kompakte Struktur der ursprünglichen Membran erhalten bleibt.

Bei der MTK sind bereits deutliche Zytotoxizitätswerte im XTT-Test bestimmt worden. Jedoch wurden mit der Trypanblaufärbung nach 1-stündiger Exposition wesentlich höhere Werte für die Zytotoxizität ermittelt, als im XTT-Test. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Membran vor der Schädigung der Mitochondrien bereits durchlässiger ist. Sie ist jedoch nicht so massiv geschädigt, dass Arachidonsäure freigesetzt wird.

Von anderen Arbeitsgruppen wurden zahlreiche Zytotoxizitätsuntersuchungen mit Benzalkoniumchlorid durchgeführt. So z.B. an primären Hornhautepithelzellen, die über 24 Stunden mit Phasenkontrastmikroskopie beobachtet wurden. Morphologische Veränderungen wie Einstellung der normalen Zytokinese, der Zellbewegung, der mitotischen Aktivität, sowie Zelldegeneration und Zellschrumpfung wurden beobachtet. Benzalkoniumchlorid wurde dabei nur in der Konzentration von 0,01% untersucht [218]. Des Weiteren wurden Mausfibroblasten mittels Fluoreszenzmikroskopie und Lebend-Tot-Färbung mit Acridinorange und Propidiumiodid untersucht. Die 0,01%ige Lösung führte nach 25 Minuten zu 90% und nach 40 Minuten zu 100% Zytotoxizität [229]. Ein Vorteil dieser Methoden gegenüber den Methoden, die in dieser Arbeit verwendet wurden, ist die Erfassung zeitlicher Abläufe im zytotoxischen Geschehen ohne einen fixen Endpunkt, der willkürlich festgelegt wird. Nachteilig ist, dass keine Konzentrations-Wirkungs-Kurven erstellt werden können.

Benzalkoniumchlorid bewirkt in geringen Konzentrationen zunächst Apoptose, bei höheren Konzentrationen jedoch vor allem Nekrose. Dies wurde im Zusammenhang mit den Zytotoxizitätstests durch Bestimmung Histon-assoziiierter DNA-Fragmente, Annexin-V-Färbung und morphologische Beobachtungen ermittelt.

Apoptose-induzierende Eigenschaften konnten für Benzalkoniumchlorid auch an einer konjunktivalen humanen Zelllinie nachgewiesen werden [57, 58]. Die Zellen wurden hier mit 0,1 bis 0,0001% Benzalkoniumchlorid 10 Minuten lang inkubiert und nach Reexposition von 3, 24, 48 und 72 Stunden wurde die Zellzahl, die Zytotoxizität mit Kristallviolett, die Expression von Apo 2.7, p53, Fas und Fas-Ligand sowie der DNA-Gehalt und die DNA-Fragmentierung bestimmt. Morphologische Aspekte wurden mit Kernfärbung analysiert.

Benzalkoniumchlorid-Konzentrationen von 0,1 und 0,05% führten unmittelbar zur Zelllyse. Bei 0,01% Benzalkoniumchlorid starben die Zellen nach 24 Stunden hauptsächlich apoptotisch. Geringe Konzentrationen (0,005 bis 0,0001%) führten dosisabhängig nach 24 bis 72 Stunden zu Wachstumshemmung und Apoptose. Fas und p53 wurden durch Benzalkoniumchlorid nicht beeinflusst. Der Fas-Ligand war immer negativ. Wie bei den hier vorliegenden Ergebnissen führten hohe Konzentrationen von Benzalkoniumchlorid zu Nekrose, während Apoptose bei niedrigen Konzentrationen beobachtet wurde [57, 58].

Nach den vorliegenden Ergebnissen ist folgender Ablauf bei den Zellveränderungen durch Benzalkoniumchlorid wahrscheinlich: konzentrationsabhängig findet an den Zellen zunächst eine Permeabilitätserhöhung der Zellmembran, anschließend eine Reduktion der mitochondrialen Aktivität und dann eine apoptotische Veränderung statt. Bei höheren Konzentrationen kommt es zur nachhaltigen Schädigung der Zellmembran und zur Nekrose, schließlich zur Zelllyse, während sehr hohe Konzentrationen zu einer Zellmembranfixierung ohne Lyse der Zelle führen. Dieser Mechanismus ist typisch für Benzalkoniumchlorid. Er wurde bei keinem anderen Tensid beobachtet.

Benzalkoniumchlorid wurde hinlänglich auf seine Zytotoxizität untersucht. In der Tabelle 52 sind die halbmaximalen Zytotoxizitätswerte von Benzalkoniumchlorid aus der Literatur zusammengefasst und den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit gegenübergestellt.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit stimmen bei Benzalkoniumchlorid mit denen aus der Literatur gut überein. Abgesehen von den Ergebnissen des Neutralrot-Freisetzungstests, bei dem eine sehr kurzzeitige Exposition (1min) erfolgte, und den Ergebnissen der Totalproteingehaltsbestimmung, einer Methode, die generell sehr großen Schwankungen in den Ergebnissen unterliegt, befinden sich die halbmaximalen Zytotoxizitätswerte von Benzalkoniumchlorid in einem Konzentrationsbereich von 0,5 bis 20 µg/ml.

In einer vergleichenden Studie zur Zytotoxizität von Antiseptika und Antibiotika wurde festgestellt, dass viele Antiseptika, darunter auch Benzalkoniumchlorid, in klinisch verwendeten Konzentrationen bereits zytotoxisch waren. Die Untersuchungen wurden an primären Fibroblasten und Keratinozyten mit dem MTT-Test durchgeführt. Die Autoren kamen zu dem Schluss, dass Antibiotika besser zur lokalen Behandlung und Prophylaxe von Infektionen geeignet wären als Antiseptika [52]. Mit Benzalkoniumchlorid wurden auch spezifische Untersuchungen an isolierten Hornhäuten durchgeführt. Dabei wurden Hornhauttrübungen und ein Eindringen von Benzalkoniumchlorid in tiefere Schichten festgestellt. Außerdem wurde die Passage von Pilocarpin durch die Hornhaut erhöht [119].

Die in der vorliegenden Arbeit und in vielen anderen Untersuchungen ermittelten Zytotoxizitätswerte von Benzalkoniumchlorid liegen fast immer in einem Konzentrationsbereich, in dem es therapeutisch oder als Hilfsstoff eingesetzt wird. Benzalkoniumchlorid ist in Deutschland das am häufigsten verwendete Konservierungsmittel in Augen- und Nasentropfen. Bei

der bekannten Problematik der Schleimhautschädigung durch längere Anwendung solcher Arzneiformen sind alternative Konservierungsmittel oder konservierungsmittelfreie Systeme dringend notwendig, um Benzalkoniumchlorid zu ersetzen. Eine so breite und unkritische Anwendung, wie sie derzeit mit Benzalkoniumchlorid erfolgt, ist nach diesen und anderen Ergebnissen zytotoxischer Untersuchungen nicht mehr zu befürworten.

Tabelle 52: Halbmaximale zytotoxische Konzentrationen (CC₅₀) von Benzalkoniumchlorid

| CC ₅₀ [µg/ml] | Endpunkt (Methode) | Exposition [h] | Zellen | Lit. |
|-----------------------------|----------------------------------|----------------|--|--------------------|
| 9,2 | MTT | 15 min | primäre humane Keratinozyten | [52] |
| 6,68 | MTT | 15 min | primäre humane Vorhaut-Fibroblasten | [52] |
| 5,1 | MTT | 1 | prim. Kaninchen-Hornhaut-Epithelzellen | [101] |
| 8,3 | Neutralrotaufnahme | 1 | prim. Kaninchen-Hornhaut-Epithelzellen | [101] |
| 22,9 | MTT | 24 | primäre Hornhautzellen vom Rind | [177] |
| 11,0 | MTT | 24 | primäre Epithelzellen vom Rinderauge | [177] |
| 12,4 | MTT | 24 | rekonstruierte Hornhaut | [177] |
| 32 | Phosphataseaktivität | 3 | primäre humane Keratinozyten | [62/143] |
| 3,3 | Neutralrotaufnahme | 3 | primäre humane Keratinozyten | [62/143] |
| 5,1 | MTT | 24 | rekonstruierte humane Epidermis | [178] |
| 1,4 | Hemmung Ca ²⁺ -ATPase | - | Erythrozytenmembranen | [120] |
| 5,8-15 | Neutralrotaufnahme | 24 | verschiedene Biosysteme | [154] |
| 4,7 | MTT | 12 | HDF-Biosystem | [154] |
| 1,1-94 | Totalproteingehalt | 24 | verschiedene Biosysteme | [154] |
| 440-1700 | Neutralrotfreisetzung | 1min | verschiedene Biosysteme | [154] |
| 6,05 | XTT | 1 | promonozytäre Zelllinie U937 | d.A. ¹⁾ |
| 0,6 | XTT | 24 | promonozytäre Zelllinie U937 | d.A. ¹⁾ |
| 2,73 | Trypanblaufärbung | 1 | promonozytäre Zelllinie U937 | d.A. ¹⁾ |
| 0,8 | Trypanblaufärbung | 24 | promonozytäre Zelllinie U937 | d.A. ¹⁾ |
| 15,2 | XTT | 1 | Keratinozytenzelllinie HaCaT | d.A. ¹⁾ |
| 2,46 | XTT | 24 | Keratinozytenzelllinie HaCaT | d.A. ¹⁾ |

¹⁾ diese Arbeit

Anionische Tenside

Aus der Gruppe der anionischen Tenside wurden drei Verbindungen untersucht, zwei Alkylsulfate, das Natriumdodecylsulfat und das Natriumcetylstearylsulfat, sowie ein ethoxyliertes Alkylsulfat, das Natriumdodecylethersulfat. Natriumdodecylsulfat wurde sehr häufig und an unterschiedlichen Modellen sowohl in vivo als auch in vitro auf seine lokalirritierenden Eigen-

schaften hin untersucht. Es wird seit längerem als Standardirritans verwendet [27, 73, 236]. Die starken Wechselwirkungen, die Natriumdodecylsulfat mit der Haut zeigt, und die Tatsache, dass die von Natriumdodecylsulfat ausgelösten toxischen Wirkungen schnell, gleichmäßig und vor allem nicht allergisch verursacht sind, stellen Gründe für diese Verwendung dar [73].

Viele Aspekte der Wirkung von Natriumdodecylsulfat auf die Haut sind wegen der Verwendung als Standardirritans bereits untersucht worden. Natriumdodecylsulfat bewirkt starke Barriereveränderungen, es führt zur Schwellung und Zerstörung des Stratum corneum. Dabei tritt es sowohl mit Lipid- als auch mit Proteinstrukturen in Wechselwirkung [73]. Schon seit langem ist bekannt, dass Alkylsulfate stark an dermales Keratin binden [99]. Verschiedene genetische Marker, die bei entzündlichen Dermatosen überexprimiert werden, wie Integrine und ICAM-1, werden durch Natriumdodecylsulfat vermehrt produziert, wie in vivo nachgewiesen werden konnte [233].

Am haarlosen Rattenmodell wurde die Penetration von Natriumdodecylsulfat in die Haut und in darunterliegende Gewebe sowie die dadurch verursachte systemische Exposition untersucht. Natriumdodecylsulfat dringt relativ tief in die Haut ein, auch unter der Haut liegende Schichten werden gut erreicht. Bei kumulativer Behandlung ist eine deutliche Erhöhung der Natriumdodecylsulfat-Konzentrationen in den unteren Schichten bestimmt worden. Die im Blut zu findende Konzentration ist jedoch nicht in der Lage, systemische Effekte zu verursachen [176].

Die Veränderungen in der Haut, die durch Natriumdodecylsulfat verursacht werden, finden vor allem in den tieferen Teilen des Stratum corneum statt. Höhere Schichten des Stratum corneum zeigen intakte Lipidschichten, während Teile der Epidermis, die aus kernhaltigen, also lebenden Zellen bestehen, deutliche morphologische Veränderungen aufweisen [78]. Zytotoxikologische Untersuchungen von Natriumdodecylsulfat haben demnach auch für die Einschätzung des Irritationspotenzials an der Haut eine große Relevanz.

Natriumdodecylsulfat wurde in mehreren Studien auf seine Zytotoxizität hin untersucht. Die Ergebnisse aus der Literatur sind in Tabelle 53 den Ergebnissen dieser Arbeit gegenübergestellt. Bei Betrachtung der verschiedenen halbmaximalen Zytotoxizitätswerte von Natriumdodecylsulfat sind erhebliche Unterschiede in den Ergebnissen der einzelnen Arbeitsgruppen festzustellen. Der Konzentrationbereich, in dem die CC_{50} -Werte von Natriumdodecylsulfat liegen können, ist aufgrund dessen sehr groß. Bei 24-stündiger Exposition reicht er nach diesen Literaturangaben von 5 µg/ml bis 2,2 mg/ml. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit stimmen mit einzelnen Daten aus der Literatur sehr gut überein [47, 101, 207, 237]. Diese Zytotoxizitätswerte wurden an primären und permanenten Zellen, die von Haut bzw. Auge abstammten, ermittelt. Der Endpunkt der Zytotoxizität wurde dabei mit Neutralrot-Aufnahme, MTT-Test bzw. LDH-Freisetzung bestimmt.

5. Diskussion

Tabelle 53: Halbmaximale zytotoxische Konzentrationen (CC₅₀) von Natriumdodecylsulfat

| CC ₅₀ [µg/ml] | Endpunkt (Methode) | Exposition [h] | Zellen | Lit. |
|-----------------------------|----------------------------------|----------------|--|--------------------|
| 35,6 | Neutralrotaufnahme | 24 | Fibroblastenzelllinie (3T3) | [207] |
| 8,2 | Neutralrotaufnahme | 2 | primäre humane Hautfibroblasten | [47] |
| 10,6 | Neutralrotaufnahme | 2 | primäre humane Keratinozyten | [47] |
| 13,4 | MTT | 2 | primäre humane Hautfibroblasten | [47] |
| 16,7 | MTT | 2 | primäre humane Keratinozyten | [47] |
| 57 | LDH-Freisetzung | 1 | primäre Kaninichenorneazellen | [101] |
| 50 | MTT | 1 | primäre Kaninichenorneazellen | [101] |
| 15 | Neutralrotaufnahme | 1 | primäre Kaninichenorneazellen | [101] |
| 790 | Stoffwechselrate | 400sec | Mausfibroblastenzelllinie | [194] |
| 83 | Neutralrotaufnahme | 24 | Kaninichenorneazelllinie | [194] |
| 87 | Proteingehalt | 24 | Lungenfibroblastenlinie v. chin. Hamster | [194] |
| 145 | MTT | 24 | rekonstruierte Hornhaut | [177] |
| 77,8 | Zellvolumenänderung | 14 | humane H7-B-Lymphozytenlinie | [238] |
| 160 | Phosphataseaktivität | 3 | primäre humane Keratinozyten | [62/143] |
| 80 | Neutralrotaufnahme | 3 | primäre humane Keratinozyten | [62/143] |
| 500 | Phosphataseaktivität | 4 | Keratinozytenzelllinie (Ratte, sublingual) | [87] |
| 73 | Neutralrotaufnahme | 3d | Keratinozytenzelllinie (Ratte, sublingual) | [87] |
| 88 | Proteingehalt | 3d | Keratinozytenzelllinie (Ratte, sublingual) | [87] |
| 61 | Neutralrotaufnahme | 3d | Fibroblastenzelllinie (3T3) | [88] |
| 65 | Proteingehalt | 3d | Fibroblastenzelllinie (3T3) | [88] |
| 10,6 | Neutralrotaufnahme | 3d | primäre humane Keratinozyten (SVK14) | [104] |
| 4090 | Neutralrotfreisetzung | 1min | primäre humane Keratinozyten | [136] |
| 7260 | Neutralrotfreisetzung | 1min | Keratinozytenzelllinie HaCaT | [136] |
| 1890 | Neutralrotfreisetzung | 1min | permanente Mausfibroblasten | [136] |
| 131 | MTT | 24 | rekonstruierte humane Epidermis | [178] |
| 43,3 | Neutralrotaufnahme | 24 | Keratinozytenzelllinie HaCaT | [237] |
| 2198-39 | Neutralrotaufnahme | 24 | verschiedene Biosysteme | [154] |
| 76,2 | MTT | 12 | HDF-Biosystem | [154] |
| 90-5,2 | Totalproteingehalt | 24 | verschiedene Biosysteme | [154] |
| 1600-1000 | Neutralrotfreisetzung | 1min | verschiedene Biosysteme | [154] |
| 17,0 | LDH-Freisetzung | 2 | HDF-Biosystem | [154] |
| 447 | Proteingehalt | 4 | Lungenfibroblastenlinie chin. Hamster V79 | [89] |
| 2,3 | Hemmung Ca ²⁺ -ATPase | - | Erythrozytenmembranen | [120] |
| 31,9 | XTT | 1 | promonozytäre Zelllinie U937 | d.A. ¹⁾ |
| 5,67 | XTT | 24 | promonozytäre Zelllinie U937 | d.A. ¹⁾ |
| 56,4 | XTT | 1 | Keratinozytenzelllinie HaCaT | d.A. ¹⁾ |
| 17,9 | XTT | 24 | Keratinozytenzelllinie HaCaT | d.A. ¹⁾ |

¹⁾ diese Arbeit

Zu den anderen beiden anionischen Tensiden, Natriumcetylstearylsulfat und Natriumdodecylethersulfat, die in der vorliegenden Arbeit untersucht wurden, sind nicht annähernd so viele Daten in der Literatur zu finden wie zu Natriumdodecylsulfat.

Natriumdodecylsulfat wird im allgemeinen stärker irritierend eingeschätzt als andere anionische Tenside. So sollen z.B. anionische Tenside mit der Kettenlänge C12 mehr Unverträglichkeiten verursachen als die entsprechenden Tenside mit kürzerer oder längerer Kohlenstoffkette [99]. An Kaninchenhaut wurde der Einfluss der Kettenlänge von Alkylethersulfaten auf das Ausmaß der Hautirritationen untersucht. Hier sind keine signifikanten Unterschiede zwischen Tensiden unterschiedlicher Kettenlänge festgestellt worden. Alle untersuchten Tenside verursachten konzentrationsabhängig eine in Ausmaß und Form ähnliche Hautirritation [181].

Obwohl Natriumcetylstearylsulfat als verträglicher gilt [99, 151], ist es nach den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit deutlich zytotoxischer und membrantoxischer als Natriumdodecylsulfat. Danach ist Natriumdodecylsulfat besser verträglich als Natriumcetylstearylsulfat.

Natriumdodecylethersulfat weist an beiden Zelllinien in etwa die gleiche Zytotoxizität wie Natriumdodecylsulfat auf. Es ist außerdem etwas stärker membrantoxisch als das Standardirritans. Dabei gilt auch dieses Tensid als besser verträglich im Vergleich zu Natriumdodecylsulfat. So ist z.B. die LD₅₀ des ethoxylierten Derivates von Natriumdodecylsulfat geringer [99]. Bei Tierversuchen am oberen Respirationstrakt der Maus und im Krümmungstest war Natriumdodecylethersulfat weniger toxisch als Natriumdodecylsulfat [41]. An der Haut verursacht Natriumdodecylsulfat im Vergleich zu Natriumdodecylethersulfat einen höheren transepidermalen Wasserverlust und mehr Erytheme [137]. An primären Keratinozyten weist Natriumdodecylethersulfat im MTT-Test die gleiche und im Neutralrot-Freisetzungstest eine geringere Zytotoxizität als Natriumdodecylsulfat auf [137].

In der Tabelle 54 sind halbmaximale Zytotoxizitätswerte von Natriumdodecylethersulfat aus der Literatur den Ergebnissen dieser Arbeit gegenübergestellt.

Die in der Literatur gefundenen halbmaximalen zytotoxischen Konzentrationen sind bei Natriumdodecylethersulfat teils größer (Kurzzeitexposition: Neutralrot-Freisetzung, Stoffwechselrate), teils geringer (nach 24h: Neutralrot-Aufnahme, Proteingehalt) als die entsprechenden Werte von Natriumdodecylsulfat. Die CC₅₀-Werte der vorliegenden Arbeit sind deutlich geringer als die in der Literatur gefundenen. In Bezug auf die Zytotoxizität und die Membrantoxizität ist Natriumdodecylethersulfat nicht verträglicher einzuschätzen als Natriumdodecylsulfat.

Tabelle 54: Halbmaximale zytotoxische Konzentrationen (CC₅₀) von Natriumdodecylethersulfat

| CC ₅₀ [µg/ml] | Endpunkt (Methode) | Exposition [h] | Zellen | Lit. |
|-----------------------------|-----------------------|----------------|--|--------------------|
| 6060 | Neutralrotfreisetzung | 1min | primäre humane Keratinozyten | [136] |
| 9560 | Neutralrotfreisetzung | 1min | Keratinozytenzelllinie HaCaT | [136] |
| 4770 | Neutralrotfreisetzung | 1min | permanente Mausfibroblasten | [136] |
| 1260 | Stoffwechselrate | 400sec | Mausfibroblastenzelllinie | [194] |
| 73 | Neutralrotaufnahme | 24 | Kaninchencorneazelllinie | [194] |
| 62 | Proteingehalt | 24 | Lungenfibroblastenlinie v. chin. Hamster | [194] |
| 28,1 | XTT | 1 | promonozytäre Zelllinie U937 | d.A. ¹⁾ |
| 7,81 | XTT | 24 | promonozytäre Zelllinie U937 | d.A. ¹⁾ |
| 47,5 | XTT | 1 | Keratinozytenzelllinie HaCaT | d.A. ¹⁾ |
| 14,0 | XTT | 24 | Keratinozytenzelllinie HaCaT | d.A. ¹⁾ |

¹⁾ diese Arbeit

Alle drei untersuchten anionischen Tenside führen zu gleichen morphologischen Veränderungen sowohl an den U937- als auch an den HaCaT-Zellen. Dazu gehören vor allem Schrumpfung und Lyse der Zelle.

Schon bei frühen Untersuchungen (1967) an Ciliatenzellen wurden nach Exposition mit Natriumdodecylsulfat Veränderungen wie Aufblähung und Abrundung der Zelle, Vergrößerung des Zellkerns sowie Schwellung der Mitochondrien festgestellt [190]. Dass anionische Tenside zur Zelllyse führen, ist auch seit längerem bekannt [99]. Hämoglobinfreie "ghosts"-Zellen zeigen nach Exposition mit Natriumdodecylsulfat ähnliche morphologische Veränderungen wie die U937-Zellen [99]. An primären humanen Keratinozyten wurden nach Exposition mit Natriumdodecylsulfat Abrundung, Schrumpfung und Lyse der Zellen, also die gleichen morphologischen Veränderungen wie an den HaCaT-Zellen, festgestellt [27].

Zum Mechanismus, den Natriumdodecylsulfat in Gang setzt, der letztendlich zum Zelltod führt, wurden verschiedene Untersuchungen durchgeführt. Natriumdodecylsulfat greift direkt an der Membran an und hat eine hohe Sensitivität für lysosomale Membranen [160]. Es führt zur Erhöhung des mitochondrialen Membranpotenzials und zur Abnahme des ATP/ADP-Verhältnisses durch Wechselwirkung mit der Mitochondrienmembran [246].

Bei anionischen Tensiden kommt es wahrscheinlich primär zu einem Membranschaden, sowohl an der Zellmembran als auch an lysosomalem Membranen. Dass bei Natriumdodecylsulfat und Natriumdodecylethersulfat die MTK keine nachweisbare Zytotoxizität verursacht, spricht auch für diesen Ablauf. Zunächst kommt es konzentrations- und

zeitabhängig zur Membranschädigung und dadurch zur Arachidonsäure-Freisetzung, bei höheren Konzentrationen und nach längerer Exposition werden die Mitochondrien in ihrer Funktion beeinträchtigt, was im XTT-Test nachgewiesen wurde.

Sowohl Natriumdodecylsulfat als auch Natriumdodecylethersulfat besitzen Apoptose-induzierende Eigenschaften. Histon-assoziierte DNA-Fragmente und apoptotische Zellen konnten bereits vor der Beeinträchtigung der Mitochondrienfunktion nachgewiesen werden. Apoptose-Induktion durch Natriumdodecylsulfat konnte auch an primären Keratinozyten, nicht jedoch an Langerhanszellen, nachgewiesen werden [86]. In höheren Konzentrationen führen anionische Tenside überwiegend zu nekrotischen Zellveränderungen, wie durch die zytometrischen und morphologischen Untersuchungen in dieser Arbeit gezeigt werden konnten.

Natriumdodecylsulfat beeinflusst auch die Proliferation verschiedener Zelltypen. So wird durch subletale Dosen von Natriumdodecylsulfat die Proliferation von primären Keratinozyten und Fibroblasten erhöht [28, 96]. Typische Marker für die hyperproliferative Epidermis werden durch Natriumdodecylsulfat vermehrt exprimiert [228].

Obwohl es geringe quantitative Unterschiede bei der Toxizität der drei untersuchten anionischen Tenside gibt, scheinen grundsätzlich bei allen drei Tensiden die gleichen Mechanismen abzulaufen, die zum Zelltod führen.

Die untersuchten anionischen Tenside führen nach den vorliegenden Ergebnissen wahrscheinlich zu folgenden Zellveränderungen: konzentrations- und zeitabhängig werden primär Lysosomen- und Zellmembran in ihrer Struktur und Funktion beeinträchtigt. Bei einem Teil der Zellen wird Apoptose induziert. Später findet an den Zellen eine Reduktion der mitochondrialen Aktivität statt. Diese Funktionsbeeinträchtigung der Mitochondrien wird wahrscheinlich auch primär durch die Interaktionen mit der Mitochondrienmembran verursacht. Bei höheren Konzentrationen kommt es bei den Zellen zur Nekrose und schließlich zur kompletten Lyse der Zelle.

Amphotere Tenside

Es wurden zwei amphotere Tenside, die sich jedoch sehr in ihren Eigenschaften unterscheiden, untersucht. Während Sojalecithin ein Naturprodukt und komplexes Gemisch von verschiedenen Phospholipiden darstellt, ist Cocamidopropylbetain ein einzelnes aktives Tensid in wässriger Lösung.

Da Sojalecithin im allgemeinen als nicht toxisch eingeschätzt wird, und sogar in parenteralen Arzneiformen Verwendung findet, ist es nicht erstaunlich, dass bei ihm eine relativ geringe Zytotoxizität und Membrantoxizität ermittelt wurde. An den U937-Zellen, die ursprünglich aus dem Blut stammen, ist Sojalecithin nur in sehr hohen Konzentrationen überhaupt toxisch. Jedoch ist die Zytotoxizität an den HaCaT-Zellen aus der Haut deutlich größer. Nach 24-stündiger Exposition sind die Zytotoxizitätswerte an HaCaT-Zellen ca. 100mal höher als an

U937-Zellen. Bezüglich dieser deutlich erhöhten Empfindlichkeit der HaCaT-Zellen gegenüber U937-Zellen bildet Sojalecithin eine Ausnahme. Die anderen untersuchten Tenside waren für U937-Zellen toxischer als für HaCaT-Zellen.

Im Konzentrationsbereich von ca. 0,2 bis 10 mg/ml, in dem nach 24 Stunden eine Freisetzung von Arachidonsäure durch Sojalecithin induziert wurde, war die im XTT-Test ermittelte Zytotoxizität nur gering. Auch bei der MTK sind keine oder nur sehr geringe Zytotoxizitätswerte bestimmt worden. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Veränderungen der Membran bereits vor der Beeinträchtigung der Mitochondrienfunktion erfolgt.

Da die Arachidonsäure-Freisetzung bei 4°C sehr gering, und die MTK bei 4°C wesentlich größer war als bei 37°C, sind enzymatische Prozesse, die die Arachidonsäure-Freisetzung mitbedingen, im Konzentrationsbereich zwischen den MTK-Werten bei 4 und 37°C anzunehmen. Zu bedenken wäre, dass die Phospholipide des Sojalecithins denen der Membranen sehr ähnlich sind, und mit diesen in Wechselwirkung treten könnten, sodass eine Verfälschung des Ergebnisses der Membrantoxizität nicht auszuschließen ist. Mit einer solchen Wechselwirkung könnte man auch die verringerte Arachidonsäure-Freisetzung nach 24 Stunden im Vergleich zur 1-stündigen Exposition mit 64 mg/ml erklären. Des Weiteren könnte ein geringer Gehalt an hämolytisch wirkendem Lysolecithin für eine membrantoxische Wirkung mitverantwortlich sein.

Sojalecithin erhöht deutlich die Histon-assoziierten DNA-Fragmente in den U937-Zellen. Zytometrische Untersuchungen konnten zwar nicht durchgeführt werden, jedoch ist die Apoptose als typische Art des Zelltodes durch Sojalecithin anzunehmen. Eine DNA-Fragmentierung durch Sojalecithin selbst, ohne aktive Beteiligung des Zellstoffwechsels ist sehr unwahrscheinlich, da Phospholipide ubiquitär in der Zelle vorkommen. Außerdem konnten Histon-assoziierte DNA-Fragmente nahezu für jede der zytotoxischen Konzentrationen nachgewiesen werden. Sojalecithin führt vermutlich überwiegend zu einem apoptotischen Zelltod infolge einer Membranveränderung, die teilweise enzymatisch verursacht ist. Die Mitochondrien werden wahrscheinlich sekundär geschädigt.

Außer Sojalecithin wurde Cocamidopropylbetain als ein weiteres amphoterer Tensid untersucht. Obwohl Cocamidopropylbetain stark augenreizend ist, gilt es als nicht irritierend an der Haut [215]. Des Weiteren soll ein Cocoamidopropylbetainzusatz die Hautverträglichkeit von anionischen Tensiden verbessern [64, 65]. Dennoch waren die Zyto- und Membrantoxizitäten des Cocamidopropylbetains mit denen des Natriumdodecylsulfates vergleichbar.

Die Ergebnisse von In-vivo-Untersuchungen weisen Cocamidopropylbetain als weniger irritierend als Natriumdodecylsulfat aus. In einer Studie wurde ein geringerer transepidermaler Wasserverlust und weniger klinische Hautirritationen im Vergleich zu Natriumdodecylsulfat ermittelt [136]. In einem In-vivo-Plastikkokklusionsstresstest (POST)

verursachte Natriumdodecylsulfat einen stärkeren Oberflächenwasserverlust als Cocamidopropylbetain [23]. Zahnpasten mit Natriumdodecylsulfat führen zu signifikant stärkeren Mundschleimhautdesquamationen als Cocamidopropylbetainhaltige Zahnpasten [112].

In Untersuchungen zur Zytotoxizität war Cocamidopropylbetain hingegen vergleichsweise stark zytotoxisch [73, 136]. An primären Keratinozyten im MTT-Test und im Neutralrot-Freisetzungstest war Cocamidopropylbetain ebenso zytotoxisch wie Natriumdodecylsulfat [137]. An primären humanen Keratinozyten, einer humanen Keratinozytenlinie und an einer Nierenepithelzelllinie vom Kaninchen wurde im MTT-Test ebenfalls eine mit Natriumdodecylsulfat vergleichbare Zytotoxizität von Cocamidopropylbetain festgestellt [234]. Cocamidopropylbetain ist sogar stärker hämolytisch als Natriumdodecylsulfat [175]. In der Tabelle 55 sind einige Ergebnisse von Cocamidopropylbetain aus der Literatur den CC_{50} -Werten dieser Arbeit gegenübergestellt.

Tabelle 55: Halbmaximale zytotoxische Konzentrationen (CC_{50}) von Cocamidopropylbetain

| CC_{50} [$\mu\text{g/ml}$] | Endpunkt (Methode) | Exposition [h] | Zellen | Lit. |
|-----------------------------------|-----------------------|----------------|--|--------------------|
| 4380 | Neutralrotfreisetzung | 1 min | primäre humane Keratinozyten | [136] |
| 5140 | Neutralrotfreisetzung | 1 min | Keratinozytenzelllinie HaCaT | [136] |
| 1600 | Neutralrotfreisetzung | 1 min | permanente Mausfibroblasten | [136] |
| 2630 | Stoffwechselrate | 400sec | Mausfibroblastenzelllinie | [194] |
| 77 | Neutralrotaufnahme | 24 | Kaninchencorneazelllinie | [194] |
| 62 | Proteingehalt | 24 | Lungenfibroblastenlinie v. chin. Hamster | [194] |
| 13,4 | XTT | 1 | promonozytäre Zelllinie U937 | d.A. ¹⁾ |
| 7,47 | XTT | 24 | promonozytäre Zelllinie U937 | d.A. ¹⁾ |
| 44,1 | XTT | 1 | Keratinozytenzelllinie HaCaT | d.A. ¹⁾ |
| 10,9 | XTT | 24 | Keratinozytenzelllinie HaCaT | d.A. ¹⁾ |

¹⁾ diese Arbeit

Auch bei den in den Tabellen 53 und 55 gelisteten Werten zeigt Cocamidopropylbetain eine mit Natriumdodecylsulfat vergleichbare Zytotoxizität. Im Neutralrot-Freisetzungstest war Cocamidopropylbetain im Vergleich zu Natriumdodecylsulfat toxischer. Die CC_{50} -Werte der vorliegenden Arbeit sind im Vergleich zu den gefundenen Literaturdaten deutlich geringer, entsprechen dabei jedoch denen des Natriumdodecylsulfats.

Auch der Mechanismus der toxischen Zellveränderungen ähnelt dem der anionischen Tenside. Bei Cocamidopropylbetain ist bei der MTK keine oder eine nur geringe Zytotoxizität nachzuweisen. Auch Cocamidopropylbetain induziert Apoptose. Wie bei den anionischen

Tensiden findet konzentrations- und zeitabhängig primär eine Membranveränderung statt, dem folgt eine Reduktion der mitochondrialen Aktivität. Die durchflusszytometrischen Untersuchungen zeigen, dass geringe Konzentrationen Apoptose induzieren, während bei höheren Konzentrationen Nekrose stattfindet. Auch Cocamidopropylbetain führt schließlich zur Lyse der Zelle. Jedoch verursachen anionische Tenside sowohl an HaCaT- als auch an U937-Zellen andere sichtbare morphologische Veränderungen als Cocamidopropylbetain.

Da keine signifikanten Unterschiede in der Toxizität der verschiedenen kommerziellen Produkte von Cocamidopropylbetain festzustellen waren, können Einflüsse von eventuellen Zusätzen (Konservierungsmittel, Stabilisatoren, unterschiedlicher Salzgehalt) wahrscheinlich vernachlässigt werden.

Macrogolcetylstearylether

Bei den nichtionischen Tensiden handelt es sich um eine sehr heterogene Gruppe. Auch die untersuchten Stoffe dieser Gruppe unterscheiden sich sehr in ihren Eigenschaften und differieren stark in ihrer Toxizität. Alle untersuchten nichtionischen Tenside leiten sich jedoch vom Macrogol ab und haben demzufolge die gleichen hydrophilen Gruppen. Die verschiedenen lipophilen Gruppen hingegen bestimmen die Heterogenität der nichtionischen Tenside.

Die Macrogolcetylstearylether Brij[®]78 und Cremophor[®] A25 waren deutlich stärker zytotoxisch als Natriumdodecylsulfat. Sie waren zusammen mit Benzalkoniumchlorid am stärksten membrantoxisch.

Auch in anderen Studien sind Macrogolfettalkoholether vom Typ des Brij[®] als stark zytotoxisch und stark hämolytisch eingeschätzt worden [44, 47]. Macrogolfettalkoholether wurden am Rattenauge getestet und als moderat irritierend eingestuft [157]. Laut Draize-Test sind sie nicht augenirritierend [157]. Bei In-vivo-In-vitro-Vergleichstudien mit prinzipiell guter Korrelation von In-vivo- und In-vitro-Daten konnte Brij[®] meist nicht in die Analyse mit einbezogen werden [47, 157].

Brij[®]78 wurde im MTT-Test und im Neutralrot-Aufnahmetest untersucht. Bei 2-stündiger Exposition wies es eine halbmaximale zytotoxische Konzentration von 4,6 bzw. 4,2 µg/ml an Hautfibroblasten und von 8,6 bzw. 6,2 µg/ml an Keratinozyten auf [47]. Diese Werte stimmen ausgezeichnet mit den in dieser Arbeit ermittelten Werten von Brij[®]78 und Cremophor[®] A25 überein. Da Brij[®]78 und Cremophor[®] A25 sich chemisch sehr ähnlich sind und auch in ihren Eigenschaften weitestgehend übereinstimmen, ist es nicht erstaunlich, dass sie sich in ihrer Toxizität nicht unterscheiden.

Die In-vivo-Daten zur Verträglichkeit von Macrogolcetylstearylethern variieren von nicht bis moderat irritierend. Obwohl sie immer besser verträglich als Natriumdodecylsulfat eingeschätzt wurden, sollten diese Substanzen nicht unkritisch eingesetzt werden. Denn sie sind

zum einen sehr deutlich zytotoxisch und zum anderen auch sehr gute Enhancer. Brij[®]78 war im Gegensatz zu Natriumdodecylsulfat in der Lage die nasale Absorption von einem Wachstumsfaktor deutlich zu verbessern [155]. Es ist nicht auszuschließen, dass Macrogolfettalkoholether erst in tieferen Haut- bzw. Schleimhautschichten Schäden anrichten, die in einem visuellem Score nicht erfasst werden können.

Bei den Macrogolfettalkoholethern laufen zunächst ähnliche toxische Veränderungen ab wie bei Cocamidopropylbetain und den anionischen Tensiden.

Bei der MTK war keine oder nur geringe Zytotoxizität nachzuweisen. Wie bei den anionischen Tensiden und Cocamidopropylbetain findet bei Macrogolfettalkoholethern konzentrations- und zeitabhängig primär eine Membranveränderung statt. Dies zeigt auch der Vergleich der Trypanblaufärbung mit dem XTT-Test. Zunächst sind die Zellen mit Trypanblau anfärbbar, erst danach folgt eine Reduktion der mitochondrialen Aktivität.

Die durchgeführten Untersuchungen zeigen, dass bei den Macrogolfettalkoholethern Apoptose und Nekrose nebeneinander ablaufen. Hohe Konzentrationen verursachen vor allem Nekrose. Allerdings führen Macrogolfettalkoholether nicht unmittelbar zur Lyse der Zelle. Des Weiteren bewirken Macrogolfettalkoholether im Vergleich zu anionischen Tensiden und Cocamidopropylbetain teilweise andere sichtbare morphologische Veränderungen sowohl an HaCaT- als auch an U937-Zellen.

Zusätzlich zu Brij[®]78 und Cremophor[®] A25 wurde auch der Komplexemulgator Romulgin[®] N untersucht. Er enthält etwa 32% Alkylpolyglykolether, die denen des Brij[®]78 und Cremophor[®] A25 ähneln. Die bestimmte und auf den Aktivgehalt berechnete halbmaximale zytotoxische Konzentration des Romulgin[®] N war wesentlich höher als die von Brij[®]78 und Cremophor[®] A25. Nach 1-stündiger Exposition waren sie über 100mal zytotoxischer, nach 24 Stunden immerhin noch 10fach so toxisch wie die Alkylpolyglykolether in Romulgin[®] N. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Zusätze in Komplexemulgatoren wie höhermolekulare Fettalkohole und hochmolekulare Fettsäuren die Zytotoxizität der Tenside verringern.

Die anderen untersuchten nichtionischen Tenside waren alle geringer zytotoxisch und membrantoxisch als Natriumdodecylsulfat.

Triton[®] X-100

Triton[®] X-100 weist 60% relative Zytotoxizität und 10% relative Membrantoxizität im Vergleich zu Natriumdodecylsulfat auf. Triton[®] X-100 gilt als gut hautverträglich und wurde am Rattenauge untersucht und als mild irritierend eingestuft [79, 157]. Jedoch ist Triton[®] X-100 wie Natriumdodecylsulfat stark hämolytisch [187]. Triton[®] X-100 wurde in mehreren Studien auf seine Zytotoxizität hin untersucht. Die Ergebnisse sind in Tabelle 56 den Ergebnissen dieser Arbeit gegenübergestellt.

5. Diskussion

Nach den verschiedenen Untersuchungen ist Triton® X-100 in einem Konzentrationsbereich von 10 bis 100 µg/ml zytotoxisch. Die ermittelten CC₅₀-Werte der vorliegenden Arbeit liegen in diesem Bereich. Die halbmaximale zytotoxische Konzentration an U937-Zellen nach 24-stündiger Exposition stellt jedoch den geringsten Wert dar.

Tabelle 56: Halbmaximale zytotoxische Konzentrationen (CC₅₀) von Triton® X-100

| CC ₅₀ [µg/ml] | Endpunkt (Methode) | Exposition [h] | Zellen | Lit. |
|-----------------------------|--------------------|----------------|---|--------------------|
| 85 | MTT | 1 | primäre Kaninchen-Hornhaut-Epithelzellen | [101] |
| 66 | Neutralrotaufnahme | 1 | primäre Kaninchen-Hornhaut-Epithelzellen | [101] |
| 91 | LDH-Freisetzung | 1 | primäre Kaninchen-Hornhaut-Epithelzellen | [101] |
| 111 | MTT | 24 | primäre Hornhautzellen vom Rind | [177] |
| 76,3 | MTT | 24 | primäre Epithelzellen vom Rinderauge | [177] |
| 82,7 | MTT | 24 | rekonstruierte Hornhaut | [177] |
| 82,5 | MTT | 24 | rekonstruierte humane Epidermis | [178] |
| 38,2 | Neutralrotaufnahme | 2 | primäre humane Hautfibroblasten | [47] |
| 71,9 | Neutralrotaufnahme | 2 | primäre humane Keratinozyten | [47] |
| 39,9 | MTT | 2 | primäre humane Hautfibroblasten | [47] |
| 69,2 | MTT | 2 | primäre humane Keratinozyten | [47] |
| 54 | Neutralrotaufnahme | 24 | Kaninchencorneazelllinie | [194] |
| 24 | Proteingehalt | 24 | Lungenfibroblastenlinie v. chin. Hamster | [194] |
| 36,2 | XTT | 24 | Lungenfibroblastenlinie chin. Hamster V79 | [188] |
| 49,8 | Neutralrotaufnahme | 24 | Lungenfibroblastenlinie chin. Hamster V79 | [188] |
| 38,8 | Proteingehalt | 24 | Lungenfibroblastenlinie chin. Hamster V79 | [188] |
| 15,5 | Trypanblaufärbung | 24 | Lungenfibroblastenlinie chin. Hamster V79 | [188] |
| 48,4 | XTT | 1 | promonozytäre Zelllinie U937 | d.A. ¹⁾ |
| 8,98 | XTT | 24 | promonozytäre Zelllinie U937 | d.A. ¹⁾ |
| 84,9 | XTT | 1 | Keratinozytenzelllinie HaCaT | d.A. ¹⁾ |
| 26,0 | XTT | 24 | Keratinozytenzelllinie HaCaT | d.A. ¹⁾ |

¹⁾ diese Arbeit

Die morphologischen Veränderungen an den Zellen, die Triton® X-100 verursacht, waren von den durch Natriumdodecylsulfat ausgelösten verschieden. Das trifft sowohl für HaCaT- als auch für U937-Zellen zu. In einer anderen Studie wurden diesbezüglich auch Unterschiede zwischen Triton® X-100 und Natriumdodecylsulfat festgestellt. Die morphologischen Veränderungen an primären Keratinozyten wie Abrundung, Schrumpfung und Lyse durch Triton® X-100 und Natriumdodecylsulfat waren ähnlich jedoch nicht identisch [27]. Triton® X-100

bewirkte in dieser Untersuchung Veränderungen in der Morphologie der primären Keratinozyten, die denen an HaCaT-Zellen entsprachen [27].

Bei Triton[®] X-100 war bei der MTK sowohl nach 1 Stunde als auch nach 24 Stunden eine deutliche Zytotoxizität festzustellen. Das deutet darauf hin, dass Triton[®] X-100 zunächst die Mitochondrien beeinträchtigt und erst dann die Membran nachhaltig schädigt. Dieser Ablauf weicht also auch von dem des Natriumdodecylsulfats ab.

Die durch Triton[®] X-100 induzierte Apoptose konnte durchflusszytometrisch und durch Bestimmung vermehrt gebildeter Histon-assoziiierter DNA-Fragmente nachgewiesen werden. Sowohl an U937-Zellen als auch an HaCaT-Zellen waren die typischen morphologischen Veränderungen der Apoptose zu beobachten.

Zu Triton[®] X-100 sind mehrere Untersuchungen angestellt worden, in denen die Apoptose-induzierenden Eigenschaften analysiert wurden. Zur Etablierung eines Nekrosemodells in Prostata- und Kolonkrebszelllinien wurde Triton[®] X-100 verwendet. Es wurde jedoch festgestellt, dass es neben Nekrose auch Apoptose induziert. Typische morphologische Merkmale und eine internukleosomale DNA-Fragmentierung (DNA-Leiter bei Gelelektrophorese) wurden nachgewiesen. Ein rapider Ausbruch der Apoptose erfolgte innerhalb von 60 Minuten. Die Apoptose war nicht abhängig von Genexpression und Proteinsynthese. Sie konnte nicht mit Cycloheximid gehemmt werden. Als Mechanismus wurde eine Erhöhung der Membranpermeabilität mit der Folge, dass toxische Metaboliten aus dem Zellkulturmedium in die Zelle eindringen und Apoptose induzieren, diskutiert, weil Apoptose auch durch suboptimale Kulturbedingungen ausgelöst wurde. Eventuell soll eine Denaturierung eines zell-eigenen Apoptosehemmers ursächlich sein [31].

Auch in einer humanen Leberkrebszelllinie induzierte Triton[®] X-100 Apoptose. Eine 0,01%ige Lösung erzeugte innerhalb weniger als 60 Minuten Apoptose. Nachgewiesen wurde die DNA-Leiter mit Gelelektrophorese. Außerdem erfolgte eine TUNEL-Färbung. In mehr als 90% der Zellen war nach 150 Minuten Apoptose zu beobachten. Auch deutliche morphologische Veränderungen an den Zellen traten neben der für die Apoptose typischen internukleosomalen DNA-Fragmentierung auf [5].

Es gibt Hinweise darauf, dass Triton[®] X-100 Konformationsveränderungen der DNA induziert. In höheren Konzentrationen (50 bis 90%) kommt es zum Kollaps der DNA [158]. Eine weitere Ursache für die Induktion der Apoptose könnte auch sein, dass durch Triton[®] X-100 das Bax-Molekül aus der Bcl-Familie hetero- und homodimerisiert wird. Dadurch werden bestimmte Regionen dieser membrangebundenen Bcl-Moleküle freigelegt. Bcl-Moleküle spielen eine wichtige Rolle bei der Apoptose [116].

In Konzentrationen, die unterhalb der kritischen Mizellbildungskonzentration und unterhalb der Lysekonzentration liegen, führte Triton[®] X-100 zur Aktivierung von Caspasen und typischen apoptotischen Veränderungen an mehreren Zelllinien [209].

In einer Studie wurde diskutiert, dass Triton[®] X-100 keine Apoptose, sondern nur DNA-Doppelstrangbrüche auslöst. Es konnten hier an der humanen Lungenepithelzelllinie im Mikroskop keine apoptotischen Körperchen nachgewiesen werden, obwohl die DNA die typische Fragmentierung der Apoptose aufwies [231, 232]. In der vorliegenden Arbeit waren im Gegensatz dazu deutliche apoptotische Merkmale an HaCaT- und an U937-Zellen zu beobachten, die durch Triton[®] X-100 induziert wurden.

Höhere Konzentrationen von Triton[®] X-100 führen zur Nekrose und schließlich zur Lyse der Zellen.

Nach den vorliegenden Ergebnissen ist folgender Ablauf bei den Zellveränderungen durch Triton[®] X-100 wahrscheinlich: konzentrations- und zeitabhängig findet an den Zellen zunächst eine Reduktion der mitochondrialen Aktivität und dann apoptotische Veränderungen statt. Bei höheren Konzentrationen kommt es zur Zerstörung der Membran, zur Nekrose und schließlich zur kompletten Lyse der Zellen. Wahrscheinlich ist die Membran zunächst nur permeabel für Triton[®] X-100, aber Arachidonsäure wird nicht freigesetzt. Dafür spricht auch, dass schon bei einer Konzentration von 0,1 µg/ml nach 1 Stunde 100% der Zellen einer Prostata- und einer Kolonkrebszelllinie mit Trypanblau anfärbbar waren [31].

Des Weiteren wird Triton[®] X-100 bereits unterhalb der kritischen Mizellbildungskonzentration in Phospholipidbilayer aufgenommen [51], kann also in die Zelle eindringen. Die komplette Auflösung des Bilayers erfolgt jedoch erst oberhalb der kritischen Mizellbildungskonzentration [51]. Die Zellyse, die bei höheren Triton[®] X-100-Konzentrationen erfolgt, beruht wahrscheinlich vor allem auf Hydrolyse von Proteinen und Phospholipiden [219].

Polysorbat 80

Polysorbat 80 wird als gut verträglich für Haut und Auge eingeschätzt [1, 79, 109]. Es ist nicht hämolytisch und reagiert nicht mit Keratin [99]. Polysorbat 80 weist 20% relative Zytotoxizität und 5% relative Membrantoxizität im Vergleich zu Natriumdodecylsulfat auf, was diese allgemeine Einschätzung unterstützt.

Die Zytotoxizität von Polysorbat 80 wurde an verschiedenen Modellen untersucht. In einer Untersuchung an HaCaT-Zellen mit dem XTT-Test war Polysorbat 80 wie in der vorliegenden Arbeit wesentlich weniger toxisch als Natriumdodecylsulfat und Benzalkoniumchlorid [36]. Die Ergebnisse aus den Literaturquellen sind in Tabelle 57 den Ergebnissen dieser Arbeit gegenübergestellt.

Die in dieser Arbeit ermittelten Werte sind deutlich geringer als die der Literatur. Trotzdem ist Polysorbat 80 insgesamt als gering toxisch einzuschätzen, vor allem bei lokaler Applikation.

Polysorbat 80 führt wie andere Tenside konzentrations- und zeitabhängig zunächst zur Apoptose, dann zur Nekrose und schließlich zur Lyse der Zellen. Wie bei Triton[®] X-100 ist auch bei Polysorbat 80 eine deutliche Zytotoxizität bei der MTK nachgewiesen worden. Der

5. Diskussion

Mechanismus der Toxizität entspricht allem Anschein nach dem des Triton® X-100. Auch die morphologischen Veränderungen an beiden Zellarten sind bei Triton® X-100 und Polysorbat 80 gleich.

Tabelle 57: Halbmaximale zytotoxische Konzentrationen (CC₅₀) von Polysorbat 80

| CC ₅₀ [µg/ml] | Endpunkt (Methode) | Exposition [h] | Zellen | Lit. |
|-----------------------------|--------------------|----------------|--|--------------------|
| 2270 | Neutralrotaufnahme | 2 | primäre humane Hautfibroblasten | [47] |
| 880 | Neutralrotaufnahme | 2 | primäre humane Keratinozyten | [47] |
| 2600 | MTT | 2 | primäre humane Hautfibroblasten | [47] |
| 750 | MTT | 2 | primäre humane Keratinozyten | [47] |
| 2700000 | Stoffwechselrate | 400 sec | Mausfibroblastenzelllinie | [194] |
| 1909 | Neutralrotaufnahme | 24 | Kaninchencorneazelllinie | [194] |
| 590 | Proteingehalt | 24 | Lungenfibroblastenlinie v. chin. Hamster | [194] |
| 1000 | Neutralrotaufnahme | 3d | Keratinozytenzelllinie (Ratte, sublingual) | [87] |
| 890 | Proteingehalt | 3d | Keratinozytenzelllinie (Ratte, sublingual) | [87] |
| 619 | Proteingehalt | 3d | Fibroblastenzelllinie (3T3) | [88] |
| 279 | XTT | 1 | promonozytäre Zelllinie U937 | d.A. ¹⁾ |
| 48,1 | XTT | 24 | promonozytäre Zelllinie U937 | d.A. ¹⁾ |
| 302 | XTT | 1 | Keratinozytenzelllinie HaCaT | d.A. ¹⁾ |
| 87,2 | XTT | 24 | Keratinozytenzelllinie HaCaT | d.A. ¹⁾ |

¹⁾ diese Arbeit

Cremophor® EL

Die Verträglichkeit von Cremophor® EL an der Haut und am Auge gilt als gut [79]. Da Cremophor® EL keine Hämolyse verursacht, wird es auch für parenterale Arzneiformen verwendet [172, 187]. Nach 1-stündiger Exposition ist die Membrantoxizität und die Zytotoxizität bei beiden Zellarten noch sehr gering. Bei U937-Zellen beträgt die relative Zytotoxizität 0,02%, bei HaCaT-Zellen liegt sie bei 0,8%, die relative Membrantoxizität beträgt 0,03%. Dies würde eine gute Verträglichkeit begründen und könnte eine Rechtfertigung für die parenterale Anwendung sein.

Die Zunahme der Zytotoxizität mit der Expositionszeit ist jedoch bei keiner der getesteten Substanzen so ausgeprägt wie bei Cremophor® EL. Nach 24 Stunden ist Cremophor® EL für U937-Zellen 1000mal toxischer als nach 1 Stunde. Es wäre also zu überprüfen, ob durch Cremophor® EL nicht nach länger dauernder oder wiederholter Applikation eine Hämolyse eintreten kann bzw. Schäden an anderen Zellen entstehen könnten.

Obwohl Cremophor[®] EL sogar antihämolytische Eigenschaften haben soll [99], ist es in mehreren Studien als zytotoxisch eingeschätzt worden. Es könnte neurotoxisch sein, da es die Funktionstüchtigkeit von differenzierten Neuroblastom-Zellen beeinträchtigt. Bei Langzeitanwendung kann eine Nervenschädigung nicht ausgeschlossen werden [35].

Des Weiteren verursacht es direkte Zellschäden an Rattennierenzellen, was mit mehreren Testsystemen (LDH-Freisetzung, MTT-Test, Neutralrot-Aufnahme, Propidiumiodid-Färbung) und morphologischen Untersuchungen nachgewiesen wurde. Auch hier war eine lange Expositionszeit nötig um die Veränderungen zu bewirken [126]. Weiterhin hemmt Cremophor[®] EL die Proteinkinaseaktivität und das Wachstum von humanen myeloblastischen Leukämiezellen [40]. Auch die Lebensfähigkeit von murinen Leukämiezellen wird verringert [130].

Eine Erklärungsmöglichkeit für die gefundene verzögerte Toxizität bei fehlenden hämolytischen Eigenschaften könnte die Tatsache sein, dass bei Cremophor[®] EL der Hauptmechanismus des Zellsterbens die Apoptose ist. Die kernlosen Erythrozyten gehen in der Regel nicht apoptotisch zu Grunde.

Die parenterale Anwendung von Cremophor[®] EL ist abgesehen von der eventuellen Zytotoxizität mit weiteren Risiken behaftet. Bei dieser Applikationsform kann als Nebenwirkung von Cremophor[®] EL eine Hyperlipidämie auftreten [66, 77, 106]. Bei Beageln führte dies zu Fettablagerungen in Milz, Lymphknoten, Leber und Niere. Es kann zu Blutbildveränderungen wie Verringerung der Plättchenzahl und Neutropenie kommen [66, 106, 159]. Cremophor[®] EL verursacht besonders heftige anaphylaktische Reaktionen. Sie sind z.B. bei 1-5% der Kinder aufgetreten, die wegen eines Neuroblastoms oder lymphoidem Krebs mit Taxol[®] behandelt wurden [66]. Hierbei können Vasodilatation, Dyspnoe, Flush, Brustschmerzen, Pruritus, Urticaria, Kopfschmerz und Hypotension auftreten [66, 159]. Auch an Beageln konnten Flush, Hautveränderungen und Kopfschütteln nachgewiesen werden [106].

Des Weiteren verursacht Cremophor[®] EL eine Nephrotoxizität [33, 103, 205]. Als Ursachen für diese werden vor allem eine Minderdurchblutung des Nierengewebes, [3, 206] aber auch eine Zytotoxizität [126] diskutiert. Weiterhin wird durch Cremophor[®] EL die Durchblutung der Leber verringert [33]. Eine Neurotoxizität wird diskutiert [35].

Die erwähnten Nebenwirkungen durch den Hilfsstoff Cremophor[®] EL sind bei verschiedenen parenteralen Arzneimitteln beobachtet worden. Zu diesen gehören Cremophor[®] EL-Kombinationen mit Zink(II)-octapentyl-phthalocyanin, Doxorubicin, Teniposid, Paclitaxel, Cyclosporin, Diazepam, Athesin und Propanidid [66, 71, 77, 103, 106, 115, 118, 159, 205, 216].

Den unerwünschten Wirkungen des Cremophor[®] EL stehen jedoch auch Vorteile solcher Cremophor[®] EL-Kombinationen gegenüber. Bei Zytostatika wie Paclitaxel und Doxorubicin verhindert Cremophor[®] EL die Multidrug Resistance [66, 159, 240]. Als Ursache für die Verringerung der Multidrug Resistance werden eine pharmakokinetische Wechselwirkung mit

Erhöhung der Bioverfügbarkeit des Zytostatikums, Enhancer-Effekte bei den Arzneimittel-sensitiven Tumoren sowie die Verstärkung der Zytotoxizität des Zytostatikums diskutiert [126, 159, 204].

Eine Verstärkung der Zytotoxizität von Paclitaxel durch Cremophor[®] EL wurde in mehreren Studien an verschiedenen Krebszelllinien und Tumorproben nachgewiesen [39, 45, 46, 50, 82, 83]. Taxol[®], eine Kombination von Paclitaxel mit Cremophor[®] EL, war in jedem Fall mehr aktiv als Paclitaxel allein. Cremophor[®] EL selbst wird in diesen Studien als sehr gering zytotoxisch eingeschätzt. Der additive Effekt von Paclitaxel und Cremophor[®] EL wird durch die Überwindung der P-glykoprotein vermittelten und tubulin-assoziierten Drug Resistance erklärt [45, 50, 173]. Auch bei Cyclosporin verstärkt Cremophor[®] EL die Zytotoxizität [126]. Ebenso wurde eine Wirkungsverstärkung des Zytostatikums Cisplatin durch Cremophor[®] EL in einer Studie nachgewiesen, in der Cremophor[®] EL deshalb als Hilfsstoff für Cisplatin vorgeschlagen wurde [18].

Es gibt jedoch auch In-vitro-Studien, in denen kein Effekt zur Wirkungsverstärkung durch Cremophor[®] EL nachgewiesen werden konnte [75, 93, 214]. In einer Untersuchung wurde sogar ein antagonisierender Effekt des Cremophor[®] EL auf die Wirkung des Paclitaxel festgestellt [150].

Durch die Erkenntnis, dass Cremophor[®] EL selbst einen Zelltod durch Apoptose bewirkt, eröffnet sich eine neue Erklärungsmöglichkeit für die Verhinderung der Multidrug Resistance bzw. für die Wirkungsverstärkung durch das Vehikel. Durch die Apoptoseinduktion des Cremophor[®] EL werden zusätzlich Tumorzellen beseitigt.

Trotz der Vorteile zur Wirkungsverbesserung bzw. Wirkungsverstärkung durch Cremophor[®] EL sollte eine sorgsame Nutzen-Risiko-Abwägung bei Verwendung dieses Vehikels für Parenteralia erfolgen. Eine topische Anwendung ist sicher in jedem Fall vertretbar, da die relative Toxizität gegenüber Natriumdodecylsulfat nach 24 Stunden nur bei maximal 12% liegt.

Als Ersatz für Cremophor[®] EL als Vehikel zur parenteralen Applikation werden vor allem Liposomen empfohlen [49, 103, 149, 201, 205]. Auch eine polymere Poly(DL-Lactid)-block-methoxy-polyethylenglykol-Mizelle, die den Mizellen aus Poloxamer[®] 188 ähnelt, wurde für tauglich und günstiger als Cremophor[®] EL befunden [250]. Nach den Untersuchungen der vorliegenden Arbeit, kann ein Austausch von Cremophor[®] EL gegen Poloxamer[®] 188 befürwortet und empfohlen werden. Auch Emulsionen mit Polysorbat 80 werden als Ersatz für Cremophor[®] EL in Parenteralia empfohlen [127]. Polysorbat 80 kann ebenso wie Cremophor[®] EL die zytotoxischen Effekte von Zytostatika verstärken [220]. Jedoch ist Polysorbat 80 nach 24 Stunden an U937-Zellen 4mal so toxisch wie Cremophor[®] EL und deshalb als Hilfsstoff für Parenteralia ungeeignet.

Bei den U937-Zellen ist die Hauptursache des Zellsterbens durch Cremophor[®] EL die Apoptose. Sie wird erst nach längerer Exposition, nach 20 Stunden induziert. Diese Ergebnisse stimmen mit denen des Zytotoxizitätstest mit EZ4U überein. Der Verlust der mitochondrialen Reduktaseaktivität stellt ein wichtiges Merkmal der frühen Apoptose dar. Diese Dysregulation der Mitochondrienfunktion geht der Zellschrumpfung und der Kernfragmentierung und schließlich der Lyse der Zelle voraus [248]. Die Ergebnisse bei Cremophor[®] EL entsprechen einem solchen Ablauf.

Auch die morphologischen Beobachtungen an U937-Zellen bestätigen, dass überwiegend Apoptose durch Cremophor[®] EL induziert wird. Die Zellveränderungen nach 1-stündiger Exposition mit sehr hohen Cremophor[®] EL-Konzentrationen sind dabei völlig verschieden von denen, die nach längerer Expositionszeit mit geringeren Konzentrationen beobachtet wurden. Während nach 24-stündiger Exposition die Zellen apoptotisch und lysiert sind, erscheinen die Zellen nach 1 Stunde im Durchmesser kleiner aber rund. Bei diesen extrem hohen Konzentrationen könnte das Zellsterben allein durch die hohe Osmolarität verursacht, also nekrotisch, sein.

Ganz anders waren die morphologischen Veränderungen an den HaCaT-Zellen. Es konnten weder Hinweise auf eine Apoptose, noch eine Zelllyse beobachtet werden. Nach einer Stunde ist Cremophor[®] EL toxischer für HaCaT-Zellen als für U937-Zellen. In einem größeren Konzentrationsbereich (0,5-100 mg/ml) liegt bei HaCaT-Zellen die Zytotoxizität bei 30-70%. Es scheint in diesem Konzentrationsbereich nur ein Teil der HaCaT-Zellen geschädigt zu werden. Wie gezeigt werden konnte, können sich die HaCaT-Zellen in diesem Konzentrationsbereich nach Entfernung des Cremophor[®] EL wieder etwas regenerieren. Eine anhaltende zytotoxische Wirkung des Cremophor[®] EL nach seiner Entfernung ist an HaCaT-Zellen ausgeschlossen.

Die Membrantoxizität des Cremophor[®] EL ist wie die Zytotoxizität gering, nimmt jedoch ebenfalls mit der Expositionszeit stark zu. Da die Arachidonsäure-Freisetzung bei 4°C sehr niedrig ist, und die MTK bei 4°C wesentlich größer ist als die bei 37°C, sind enzymatische Prozesse, die die Arachidonsäure-Freisetzung mitbedingen, im Konzentrationsbereich zwischen den MTK-Werten anzunehmen.

Die beiden untersuchten Fraktionen des Cremophor[®] EL weisen Unterschiede in ihrer Toxizität auf. Dabei ist die Aqua-Fraktion, die vor allem hydrophobere Bestandteile enthält, in jedem Fall weniger toxisch als Cremophor[®] EL selbst. An den HaCaT-Zellen ist nur ein additiver Effekt der beiden Cremophor[®] EL-Fraktionen nachgewiesen worden. Der Effekt an den U937-Zellen ist jedoch überadditiv.

Auch die Effekte der beiden Fraktionen auf die Zellmembran waren überadditiv. Die Methanol-Fraktion bewirkt in etwa die gleiche Arachidonsäure-Freisetzung wie unfraktioniertes Cremophor[®] EL. Die Aqua-Fraktion hingegen ist weniger membrantoxisch.

Beide Fraktionen des Cremophor® EL verursachen Apoptose. Der Anteil der Aqua-Fraktion am Gesamtgemisch verursacht jedoch weniger Zellveränderungen.

Beide Fraktionen bewirken an den U937-Zellen die gleichen morphologischen Veränderungen wie das Gesamtgemisch. Auch an HaCaT-Zellen führte zumindest die Methanol-Fraktion zu den gleichen Veränderungen an den Zellen. Die Aqua-Fraktion verursachte bei den HaCaT-Zellen andere sichtbare Zellveränderungen als die Methanol-Fraktion und das Gesamtgemisch. Cremophor® EL könnte durch Entfernung der hydrophilen Komponenten hinsichtlich seiner Zytotoxizität verbessert werden.

Bei Untersuchungen von Cremophor® EL-Fraktionen durch eine andere Arbeitsgruppe wurde festgestellt, dass vor allem Komponenten mittlerer Hydrophobie die Lipoproteinverschiebung und die Aminosäure-Transport-Hemmung vermitteln sowie die Lebensfähigkeit von murinen Leukämiezellen verringern. Die Multidrug Resistance wird im Gegensatz dazu durch die hydrophoberen Komponenten verhindert. So wird von den Autoren vorgeschlagen, durch Entfernung der Komponenten, die das Lipoproteinmuster verschieben, Cremophor® EL zu verbessern. Die allergischen Nebenwirkungen und die Zytotoxizitäts-vermittelnden Komponenten sind jedoch dann immer noch enthalten [130].

Der Vorschlag Cremophor® EL zu fragmentieren und so das Wirkungs-Nebenwirkungs-Profil zu verbessern scheint jedoch sehr sinnvoll, wie auch die vorliegende Arbeit bestätigt. Es müsste allerdings auch gewährleistet sein, dass die gewünschten Hilfsstoffeigenschaften und die wirkungsverstärkenden Qualitäten bei Entfernung der unerwünschten Komponenten erhalten bleiben.

Poloxamer® 188

Poloxamer® 188 wird am Auge sehr gut toleriert. Fünf Tage nach einer Applikation von 1 und 2%iger Lösung waren weder toxische noch entzündliche Reaktionen festzustellen. Auch an der Cornea gab es keine Veränderungen. Poloxamer® 188 ist weder hepato- noch nephrotoxisch und wirkt nicht hämolytisch. Aufgrund dieser geringen Toxizität wird Poloxamer® 188 für die Anwendung am Auge und die parenterale Applikation empfohlen [131].

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit bestätigen diese geringen toxischen Eigenschaften. Poloxamer® 188 ist die am wenigsten toxische Substanz, bezogen sowohl auf die Zytotoxizität als auch auf die Membrantoxizität. Es weist 0,03% relative Zytotoxizität und 0,01% relative Membrantoxizität im Vergleich zu Natriumdodecylsulfat auf. Wie bei Cremophor® EL nach 1-stündiger Exposition entstehen Zellen, die im Durchmesser kleiner aber rund sind. Bei den extrem hohen Konzentrationen, in denen Poloxamer® 188 toxisch ist, könnte das Zellsterben allein durch die hohe Osmolarität verursacht sein. Auch für Poloxamer® 188 sind enzymatische Effekte, die zu Membranschäden führen, anzunehmen. Die MTK bei 4°C ist deutlich größer als die bei 37°C.

Da sich alle nichtionischen Tenside vom Macrogol ableiten, wurde auch Macrogol 6000 an U937-Zellen auf Zytotoxizität untersucht. Es ist jedoch noch geringer zytotoxisch als Poloxamer[®] 188. Die CC_{50} nach 24 Stunden war 3mal so groß. Auch hier wurde das Zellsterben wahrscheinlich durch die hohe Osmolarität verursacht.

Gegenüberstellung der untersuchten Tenside

Die untersuchten offizinellen Tenside weisen deutliche Unterschiede in ihrer In-vitro-Toxizität auf. Während einige schon in Konzentrationen von wenigen $\mu\text{g/ml}$ zytotoxisch und membran-toxisch sind, gibt es Tenside die erst im Milligrammbereich überhaupt toxische Erscheinungen an den Zellen verursachen. Die relative Toxizität im Vergleich zu Natriumdodecylsulfat reicht aufgrund dessen von 900 bis 0,01%.

Die Rangfolge in der Toxizität bei den verwendeten Methoden war für die untersuchten Tenside weitestgehend übereinstimmend. In zahlreichen Studien wurde das gleiche Ranking in der Toxizität der Tenside ermittelt. Eine stärkere Zytotoxizität von Benzalkoniumchlorid im Vergleich zu Natriumdodecylsulfat wurde an verschiedenen Testsystemen zur Zytotoxizität, wie Neutralrotaufnahme, MTT-Test, Totalproteingehalt, Neutralrot-Freisetzung, LDH-Freisetzung an primären und permanenten Zellkulturen unter anderem von Haut und Mundschleimhaut sowie an Hautorgankulturen festgestellt [62, 76, 120, 143, 154, 224].

An einer Zelllinie von Rattensublingualzellen sowie an einer Fibroblastenzelllinie wurde mit Neutralrot-Aufnahme, Proteingehalt-Messung sowie Aktivitätsbestimmung der sauren Phosphatase eine stärkere Toxizität von Natriumdodecylsulfat im Vergleich zu Polysorbat 80 bestimmt [87, 88].

Die Toxizitätsrangfolge Benzalkoniumchlorid > Natriumdodecylsulfat > Polysorbat 80 wurde an HaCaT-Zellen mit XTT-Test sowie an primären humanen Keratinozyten und zwei teilweise bzw. ganz verhornten Keratinozyten-Hautfibroblasten-Cokulturen mit Neutralrot-Aufnahme, MTT-Test, LDH-Freisetzung, β -N-Acetyl-Glucosamidase-Freisetzung, Glucoseverbrauch und Prostaglandinfreisetzung ermittelt [36, 174]. Sie stimmt auch mit In-vivo-Daten von Patchtests überein [36, 174].

Eine stärkere Toxizität von Benzalkoniumchlorid gegenüber Natriumdodecylsulfat und Cocamidopropylbetain wurde an primären humanen Keratinozyten, einer humanen Keratinozytenlinie, an einer Kaninchennierenepithelzelllinie im MTT-Test sowie in vivo an rasierter Kaninchenhaut festgestellt. Die Toxizität des Natriumdodecylsulfats entsprach dabei der des Cocamidopropylbetains [234].

An primären Keratinozyten, HaCaT-Zellen und einer permanenten Mausfibroblastenlinie hatten Natriumdodecylsulfat, Natriumdodecylethersulfat und Cocamidopropylbetain bei der Neutralrot-Freisetzung, in Proliferationsuntersuchungen, im MTT-Test und bei der Proteingehaltsbestimmung wie in der vorliegende Arbeit eine gleiche Toxizität [136, 137]. Diese

Übereinstimmung in der Toxizität wurde auch bei einem okklusiven Patchtest mittels Seifenkammer in vivo bestimmt [136, 137].

Die in der vorliegenden Arbeit ermittelte Rangfolge Benzalkoniumchlorid > Natriumdodecylsulfat > Triton[®] X-100 wurde mit LDH-Freisetzung, MTT-Test, Neutralrot-Aufnahme an primären Kaninchencorneazellen und in vivo im Draize-Test bestätigt [101].

In einer Studie wurde die gleiche Rangfolge in der Toxizität von vier der getesteten Tensiden (Brij[®]78 > Natriumdodecylsulfat > Triton[®] X-100 > Polysorbat 80) gefunden. Die Untersuchungen wurden an humanen Haut-Fibroblasten und Keratinozyten mit MTT-Test und Neutralrot-Aufnahme durchgeführt [47].

Ähnliche Ergebnisse wie in der vorliegenden Arbeit wurden bei zwei weiteren Studien ermittelt. Natriumdodecylsulfat und Triton[®] X-100 waren stark hämolytisch, während Cremophor[®] EL nicht hämolytisch war [187]. Bei einer In-vivo-Studie am Rattenauge war Triton[®] X-100 weniger reizend als Brij[®]78 [157].

Auch in anderen In-vitro-Tests, die die Freisetzung von Arachidonsäure bestimmen, wurden Tenside untersucht. Dabei wurde das gleiche Ranking der Membrantoxizität (Benzalkoniumchlorid > Natriumdodecylsulfat > Polysorbat 80) wie bei der vorliegenden Arbeit bestimmt [164, 165].

Es wurde jedoch auch in mehreren Untersuchungen ein von den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit abweichendes Ranking gefunden. So wurde am humanen Hautmodell Skin2 mit MTT-Test und vergleichenden In-vivo-Tests an der humanen Haut folgende Reihenfolge festgestellt: Benzalkoniumchlorid > Natriumdodecylsulfat = Triton[®] X-100 > Natriumdodecylethersulfat = Cocamidopropylbetain [60]. An normalen humanen Fibroblasten wurde im Neutralrottest, LDH-Freisetzungstest und MTT-Test folgendes Ranking gefunden: Triton[®] X-100 > Natriumdodecylsulfat > Natriumdodecylethersulfat > Polysorbat 80 [12].

Ein völlig anderes Ranking als in der vorliegenden Arbeit wurde bei einem Hämolysetest ermittelt: Cocamidopropylbetain = Benzalkoniumchlorid > Natriumdodecylsulfat = Natriumdodecylethersulfat [175]. Auch hier wurde eine gute Korrelation mit In-vivo-Daten aus dem Draize-Test errechnet [175].

Bei einem Plastik-Okklusions-Stress-Test wurde auch eine von der in der vorliegenden Arbeit abweichende Reihenfolge der Toxizität festgestellt. Der gemessene Oberflächenwasserverlust war bei Natriumdodecylsulfat am stärksten, das Ranking war wie folgt: Natriumdodecylsulfat > Gemisch aus amphoteren und nichionischen Tensiden > Coamidopropylbetain > Benzalkoniumchlorid > Sorbitanalkylether [23].

In anderen Untersuchungen war nur jeweils ein Tensid abweichend vom Ranking der vorliegenden Arbeit.

Cocamidopropylbetain, dass in der vorliegenden Arbeit die gleiche Toxizität wie Natriumdodecylsulfat aufweist, zeigte sich in einer Untersuchung an normalen humanen

Keratinocyten im MTT- und im Neutralrot-Aufnahmetest zytotoxischer als Natriumdodecylsulfat [22]. Bei parallel durchgeführten In-vivo-Studien war jedoch Natriumdodecylsulfat stärker irritierend als Cocamidopropylbetain [22]. Polysorbat 80 war in dieser Studie entsprechend den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit weniger toxisch als Cocamidopropylbetain und Natriumdodecylsulfat [22].

In einer anderen Studie war Triton[®] X-100 zytotoxischer als Natriumdodecylsulfat, Natriumdodecylethersulfat und Coamidopropylbetain, die wie in der vorliegenden Arbeit die gleiche Toxizität aufwiesen. Polysorbat 80 war entsprechend weniger toxisch als die anderen Tenside. Die Untersuchungen umfassten die Ermittlung der Stoffwechselrate einer Mausfibroblastenzelllinie, den Neutralrot-Aufnahmetest an einer Kaninchencorneazelllinie sowie die Proteingehaltsbestimmung an einer Lungenfibroblastenlinie von chinesischen Hamstern [194].

Eine mit Natriumdodecylsulfat vergleichbare Zytotoxizität von Triton[®] X-100 wurde an primären Hornhautzellen im MTT-Test ermittelt. Übereinstimmend war Benzalkoniumchlorid am meisten und Polysorbat 20 am wenigsten toxisch [177].

An rekonstruierter Haut war die Zytotoxizität von Triton[®] X-100 größer als die des Natriumdodecylsulfats, während Benzalkoniumchlorid und Polysorbat 80 wie in der vorher erwähnten Studie dem Ranking der vorliegenden Arbeit entsprachen [178]. Eine gute Korrelation mit den augenreizenden Eigenschaften der Tenside wurde überdies für dieses Ranking festgestellt [178].

Cocamidopropylbetain, Natriumdodecylethersulfat und Natriumdodecylsulfat besitzen nach der vorliegenden Arbeit die gleiche Toxizität. Cocamidopropylbetain wurde auf Grund von Untersuchungen mit MTT-Test und Proteingehaltsbestimmung an einer Fibroblastenlinie sowie durch In-vivo-Untersuchungen, bei denen die Desquamation der Mundschleimhaut bestimmt wurde, als signifikant besser verträglich als Natriumdodecylsulfat eingestuft [94]. Auch der Einfluss von Natriumdodecylsulfat auf wiederkehrende Aphthengeschwüre war signifikant größer als der von Cocamidopropylbetain [113]. Bei Tierversuchen an der Maus war Natriumdodecylethersulfat im Krümmungstest besser verträglich und im oberen Respirationstrakt weniger irritierend als Natriumdodecylsulfat [41].

Abweichungen vom Ranking der vorliegenden Arbeit sind vor allem bei In-vivo-Daten aufgetreten, jedoch gibt es auch gute Übereinstimmungen mit In-vivo-Untersuchungen. Es gilt zu bedenken, dass In-vivo-Daten an sich schon stark variieren. Besonders der Widerspruch zwischen der starken Zytotoxizität von Brij[®]s und ihren scheinbar geringen irritierenden Eigenschaften wurde mehrmals diskutiert [47, 157]. Eine gute Korrelation von Zytotoxizitätswerten und Draize-Test konnte so z.B. nur ohne Einbeziehung des Brij[®] ermittelt werden [47]. Auch beim Vergleich von Hämolyse, Draize-Test und Zytotoxizität an der Kaninchen-

cornea konnte Brij® nicht in die Korrelationsrechnung einbezogen werden. Es ist stark zytotoxisch, verursacht jedoch keine Augenreizung im Draize-Test [44].

Toxische Mechanismen der Tenside

Alle getesteten Tenside zeigen eine deutliche Zunahme ihrer In-vitro-Toxizität mit der Expositionszeit. Dies ist nicht für jede Substanzgruppe gesetzmäßig, bei Heparinoiden ist z.B. bei ähnlichen Versuchen mit dem XTT-Test keine Änderung der CC_{50} -Werte nach 24 Stunden im Vergleich zur 1-stündigen Expositionszeit festgestellt worden [132].

Diese zeitabhängige Zunahme der Toxizität ist bei Tensiden vor allem dann von Bedeutung, wenn es sich um wiederholte Applikationen oder eine Daueranwendung von Tensiden handelt. Eine Zunahme der In-vivo-Toxizität mit der Zeit wurde mit Tandemmodellen an der humanen Haut mehrfach untersucht und bestätigt [6, 74, 145, 235].

Bei wiederholter Applikation und nach längerer Exposition mit geringen Tensidkonzentrationen wurden auch völlig andere Veränderungen an den Epidermiszellen nachgewiesen. Es kam zu einer Verdickung des Stratum spinosum, zu Hyperkeratose und Zellkerntümmer wurden gebildet. Bei kurzzeitiger Exposition mit höheren Dosen waren solche Veränderungen nicht zu beobachten [140]. In einer Übersichtsarbeit wurde geschlossen, dass die Einwirkdauer der Tenside auch das Ranking ihrer Toxizität entscheidend mitbestimmt [185].

Tenside sind seit längerer Zeit bekannt dafür, dass sie Membranschäden verursachen [190]. Bereits 1967 wurde diese Eigenschaft des Natriumdodecylsulfats an Ziliatzellen untersucht [190].

Im Testsystem der vorliegenden Arbeit war für alle getesteten Tenside eine Membranschädigung nachzuweisen. Alle Substanzen, die untersucht wurden, erhöhten die Arachidonsäure-Freisetzung zeit- und konzentrationsabhängig. Das Ausmaß der Membrantoxizität der untersuchten Tenside war jedoch sehr unterschiedlich.

Die Temperatur hatte bei den meisten Tensiden keinen Einfluss auf die Desintegration der Membran, sodass für diese Tenside ein enzymatischer Mechanismus ausgeschlossen werden konnte. Wahrscheinlich wird die Arachidonsäure bzw. die Phosphoglyceride durch die oberflächenaktiven Eigenschaften der Testsubstanzen aus der Membran herausgelöst. Es handelt sich also um eine unspezifische Membranschädigung ohne Phospholipase A2-Aktivierung. Lediglich bei den gering toxischen Tensiden, Cremophor® EL, Poloxamer® 188 und Sojalecithin, sind enzymatische Prozesse an der Membranschädigung mitbeteiligt.

An Keratinozyten der Sublingualschleimhaut wurde festgestellt, dass eine Prostaglandin E2-Freisetzung durch Natriumdodecylsulfat nur in zytotoxischen Konzentrationen erfolgt. Andere untersuchte Substanzen waren in der Lage Prostaglandin E2 auch in Abwesenheit von Zytotoxizität freizusetzen. Die Autoren schlussfolgerten daraus einen nicht enzymatischen

Mechanismus für Natriumdodecylsulfat [142]. Was mit den Untersuchungen der vorliegenden Arbeit übereinstimmen würde.

Beim Vergleich der Ergebnisse der Trypanblaufärbung mit den Ergebnissen des AART ist festzustellen, dass bei der MTK bereits 10-30% (Brij[®]78) bzw. 30-50% (Benzalkoniumchlorid) der Zellen mit Trypanblau anfärbbar waren. Das spricht für eine Permeabilitätserhöhung der Membran vor der Zerstörung der Membran. Diese Permeabilitätserhöhung erfolgt auch vor der Beeinträchtigung der Mitochondrien. Ein solcher Mechanismus tritt jedoch nicht immer auf. Er scheint vielmehr typisch zu sein für stark zytotoxische Tenside. Bei ähnlichen Untersuchungen an Heparinoiden, die nur sehr gering toxisch waren, wurden Mitochondrien in ihrer Funktion gestört, ohne dass sich die Zellen mit Trypanblau anfärben ließen [132].

Außer bei Benzalkoniumchlorid und Cremophor[®] EL konnte durch alle Tenside eine der Positivkontrolle entsprechende maximale Arachidonsäure-Menge freigesetzt werden. Das Erreichen der maximalen Arachidonsäure-Freisetzung, aber auch die morphologischen Untersuchungen sprechen für eine Lyse der Zellen durch hohe Tensidkonzentrationen bzw. nach längerer Expositionszeit. Auch dieser Umstand scheint für Tenside typisch zu sein. Benzalkoniumchlorid führt zwar ebenfalls zur Lyse der Zellen, höhere Konzentrationen fixieren jedoch die Zellen und die Membran bleibt in ihrer Form erhalten. Cremophor[®] EL scheint bezüglich des Mechanismus der Membrantoxizität von den anderen Tensiden abzuweichen, das Zellsterben ist hier vor allem apoptotisch verursacht. Eine Lyse der Zellen erfolgt nicht primär durch Desintegration der Membran, sondern nur im Anschluss an die Apoptose.

Die durchgeführten Untersuchungen legen folgenden Ablauf der Membrantoxizität nahe: konzentrations- und zeitabhängig erfolgt primär eine Erhöhung der Membranpermeabilität, dann eine Desintegration der Membran und schließlich die völlige Auflösung der Membran. Dieser beschriebene Mechanismus wurde von mehreren Autoren vertreten.

Natriumdodecylsulfat und Triton[®] X-100 bewirkten unterhalb der kritischen Mizellbildungskonzentration (cmc) eine Zytotoxizität bei B16-Melanomzellen, die mit Trypanblaufärbung nachgewiesen wurde. In der Nähe der cmc kam es zur Zelllyse, die als Zellverflüssigung photometrisch ermittelt wurde. In dieser Arbeit wurde die Membranschädigung als primäre Schlüsselstelle der Zytotoxizität bezeichnet [179].

An C3H-Zellen (embryonale Mausfibroblasten), normalen humanen Epidermiskeratinocyten und am Hautmodell wurden bei geringen Tensidkonzentrationen zunächst Effekte wie eine Bindung an die Membran und feine Änderungen in der Membranpermeabilität festgestellt. Untersucht wurden bei dieser Studie ebenfalls Natriumdodecylsulfat und Triton[®] X-100. In höheren Konzentrationen führten diese dann zur Membranlyse und Membranfusion. Schließlich kam es zur Zerstörung der Membran. Es bildeten sich gemischte Mizellen, Proteine und Lipoproteinkomplexe [39].

Der gleiche Ablauf der Membrantoxizität, dass Tenside an dermales Keratin binden und die Löslichkeit für Proteine erhöhen, Cholesterol, Phospholipide und Proteine aus der Membran herausgelöst werden und schließlich Zytolyse folgt, wurde schon 1974 diskutiert [99].

In einer weiteren Studie konnte gezeigt werden, dass Triton[®] X-100 unterhalb der cmc in Phospholipid Bilayer aufgenommen wird. In höheren Konzentrationen kam es zur teilweisen Auflösung des Bilayers, oberhalb der cmc erfolgte dann die komplette Auflösung des Bilayers [51].

In einer Übersichtsarbeit werden die Zusammenhänge der Wechselwirkung von Tensiden mit Zellmembranen genauer analysiert. Unterhalb der cmc haben Tenside eine hohe Bindungsaffinität zu den Membranproteinen. Diese werden durch Tenside verändert. Die Membranfläche wird vergrößert, sodass es zunächst zur Stabilisierung der Membran gegen osmotische Einflüsse kommt. In diesen Konzentrationen schützen Natriumdodecylsulfat und Triton[®] X-100 Erythrozyten gegen osmotischen Schock. In höheren Konzentrationen erfolgt die Lyse¹ der Zellen. Sie beginnt, wenn Proteine und Makromoleküle durch die Membran gelangen. Die Lyse der Membran steht mit einer massiven Erhöhung der Bindung der Tenside an die Membran in Zusammenhang. Eine Hämolyse bedeutet aber nicht die komplette Zerstörung der lamellaren Membran. Die Tensid-Monomere werden bei der Hämolyse adsorbiert, penetrieren durch die Membran, induzieren Änderungen in der molekularen Organisation und Permeabilität der Membran. So verschiebt sich das osmotische Gleichgewicht, es kommt zur Hämoglobin-Freisetzung. Der Prozess des völligen Zusammenbruchs der lamellaren Struktur der Membran wird in dieser Arbeit als Solubilisation der Membran bezeichnet. Es entstehen Lipoproteine, Proteine und gemischte Mizellen. Bei maximaler [³H]Arachidonsäure-Freisetzung müsste eine derartige Solubilisation der Zellmembran eingetreten sein. Zudem verändern Tenside membrangebundene Enzymaktivitäten. Sie können dabei Enzyme aktivieren, hemmen oder modifizieren [110].

Da alle untersuchten Tenside eine Arachidonsäure-Freisetzung bewirken, ist bei Tensiden auch mit verstärkter Bildung von Entzündungsmediatoren zu rechnen.

So konnten für Natriumdodecylsulfat und Benzalkoniumchlorid auch eine Prostaglandin E₂-Freisetzung sowohl in vivo an Ratten als auch an humanen Keratinozyten festgestellt werden. Diese stand dabei wie die Arachidonsäure-Freisetzung in enger Beziehung zur Zytotoxizität [141]. Auch an primären Keratinozyten von der Sublingualschleimhaut verursachte Natriumdodecylsulfat eine Prostaglandin E₂-Freisetzung [142].

An humaner Haut wurden aus der Flüssigkeit von Saugbläschen nach Exposition mit Tensiden Entzündungsmediatoren wie Arachidonsäure, Eicosanoide, Interleukin-1 alpha gaschromatografisch und mit ELISA bestimmt. Benzalkoniumchlorid, Natriumdodecylsulfat

¹ mit Lyse ist in diesem Zusammenhang nicht die komplette Auflösung der Zelle gemeint

und Polysorbat 80 führten zur signifikanten Erhöhungen dieser Entzündungsmediatoren [166]. An Mastzellen konnte des Weiteren durch Tenside Histamin freigesetzt werden. Natriumdodecylsulfat und Natriumdodecylethersulfat führten zur Lyse der Mastzellen [185].

Die Schädigung der Mitochondrien scheint auch im Zusammenhang mit der Membrantoxizität der Tenside zu stehen. Durch die Tenside werden die Mitochondrien in ihrer Funktion nachhaltig beeinträchtigt. In der vorliegenden Arbeit war der XTT-Test bei allen Tensiden sehr empfindlich. Durch Tenside verursachte Schwellungen der Mitochondrien wurden bereits 1967 an Ziliatzellen festgestellt [190].

Eine Veränderung membrangebundener Enzymaktivitäten findet auch an der Mitochondrienmembran statt. Eine Erhöhung der Phosphorylierungsrate in den Mitochondrien wurde nachgewiesen [110]. Außerdem werden Protein-Protein-Wechselwirkungen im Mitochondrium durch Tenside gestört [110].

An einer Primärkultur von Kaninchenorneaepithelzellen wurde der Einfluss von Natriumdodecylsulfat auf die Mitochondrien untersucht. Natriumdodecylsulfat schädigte diese nachhaltig. Es kam zur Erhöhung des mitochondrialen Membranpotenzials und zur Abnahme des ATP/ADP-Verhältnisses in den Mitochondrien. Eine Wechselwirkung des Tensides mit der Mitochondrienmembran wurde geschlussfolgert [246].

Alle untersuchten Tenside führen in geringen Konzentrationen zu apoptotischen Veränderungen an den Zellen. Jedoch ist in höheren Konzentrationen die Nekrose dominierend. Lediglich Cremophor[®] EL und wahrscheinlich auch Sojalecithin führen überwiegend zu Apoptose.

Bei Triton[®] X-100 und Benzalkoniumchlorid ist Apoptose auch von anderen Arbeitsgruppen nachgewiesen worden. Auch hier war in geringen Konzentrationen Apoptose und in höheren Nekrose festgestellt worden [31, 57]. Die Ursachen für die Apoptoseinduktion stehen nach den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit wahrscheinlich auch im Zusammenhang mit den membrantoxischen Eigenschaften der Tenside. Die Theorie, dass eine Erhöhung der Membranpermeabilität mit der Folge, dass toxische Metaboliten aus dem Zellkulturmedium in die Zelle eindringen und Apoptose induzieren, könnte zwar eine Rolle spielen, die Übereinstimmung der Konzentrations-Wirkungs-Kurven von AART und XTT-Test mit dem Vorkommen von Histon-assoziierten DNA-Fragmenten deutet jedoch auf eine direkte Apoptose-Induktion durch die Tenside hin [31].

Einen Zusammenhang von Membrantoxizität und Apoptose machen folgende Befunde aus der Literatur wahrscheinlich.

Der Tumornekrosefaktor induziert sowohl Apoptose als auch eine Arachidonsäure-Freisetzung [241].

Eine Fas-vermittelte Apoptose wird von einer Erhöhung der Arachidonsäure-Freisetzung aus der Membran von U937-Zellen begleitet. Die Spaltung der zytosolischen Phospholipase A2 korreliert dabei mit der Erhöhung der Caspase-3-artigen Proteaseaktivität in apoptotischen Zellen. Die durch die Ca^{2+} -unabhängige Phospholipase A2 vermittelte Fettsäure-Freisetzung ist in den FAS-stimulierten Zellen erleichtert. Die freigesetzte Arachidonsäure scheint eine modifizierende, nicht aber essentielle Rolle im apoptotischen Prozess des Zelltodes zu spielen [15].

Eine Phospholipaseaktivierung löste in Mauslymphomzellen Apoptose aus, während die Hemmung der Phospholipase A2 die DNA-Fragmentierung blockierte [4].

Die Membran von apoptotischen Zellen ist hochempfindlich für Phospholipase A2 Typ II. In U937-Zellen war die Arachidonsäure-Freisetzung signifikant beschleunigt in Verbindung mit dem Fortschreiten der Apoptose. Die apoptotische Zellmembran stellt einen potenziellen Angriffspunkt für extrazelluläre Typ-II-Phospholipase A2 dar. Die Arachidonsäure-Freisetzung war durch eine bevorzugte Hydrolyse von Phosphatidylserin, dem Phospholipid, das eine Schlüsselrolle bei der Apoptose spielt, begleitet [16].

Eine Phospholipase-A2-Aktivierung ist jedoch für die Apoptose nicht erforderlich, wie an einer Rinderaortenendothelzelllinie festgestellt wurde. An diesen Zellen modifiziert die Menge freigesetzter Arachidonsäure die TNF-induzierte DNA-Fragmentierung nicht [189].

Auch die Beeinträchtigung der Mitochondrien, die bei einigen der untersuchten Tenside aus der Membranschädigung resultiert, könnte in Beziehung zur Apoptose stehen.

So spielt der mitochondriale Membranpermeabilitätsübergang (MPT) eine zentrale Rolle bei der Modulation der apoptotischen Schwelle. Durch Hemmung des MPT kann Apoptose verhindert werden [191].

Die Veränderungen der Mitochondrienfunktion, genauer der Verlust der mitochondrialen Reduktaseaktivität, wie er mittels XTT-Test bestimmt wurde, stellt ein wichtiges Merkmal bei der frühen Apoptose dar. Die Dysregulation der Mitochondrienfunktion geht der Zellschrumpfung und der Kernfragmentierung voraus. Derartige Veränderungen werden auch für die zytoplasmatische Apoptosekontrolle in kernlosen Zellen, die apoptotisch sterben, verantwortlich gemacht [248].

Die Aufrechterhaltung des mitochondrialen Membranpotenzials geht möglicherweise parallel mit einer Erhöhung der Membranstabilität und dem Mechanismus der Apoptoseinduktion [48].

Die untersuchten Tenside scheinen durch vergleichbare Mechanismen die Membran und das Mitochondrium zu schädigen. Auch bei Induktion des programmierten Zelltodes scheinen sie ähnliche Mechanismen in Gang zu setzen. Dennoch weisen sie deutliche Unterschiede im

Mechanismus ihrer Toxizität auf, besonders die beobachteten morphologischen Zellveränderungen durch die einzelnen Tenside weichen sehr voneinander ab. Auch andere Arbeitsgruppen konnten diesbezüglich Unterschiede zwischen den Tensiden erkennen. An primären humanen Keratinozyten konnte bei Natriumdodecylsulfat im Gegensatz zu Triton® X-100 eine langsame Progression der morphologischen Änderungen an den Zellen beobachtet werden. Diese Progression der Zellveränderungen war bei Triton® X-100 etwas stärker als bei Natriumdodecylsulfat. Für die beiden Tenside wurden ähnliche, aber nicht identische morphologische Zellveränderungen festgestellt [27].

Auch bei Polysorbat 20 wurden an primären Kaninchenhornhautzellen andere morphologische Veränderungen als bei Tensiden wie Triton® X-100, Benzalkoniumchlorid und Natriumdodecylsulfat beobachtet [101].

Bei grenzflächenaktiven Substanzen stellt sich die Frage nach dem Zusammenhang zwischen ihrer Membrantoxizität und ihren physiko-chemischen Eigenschaften.

Über einen Zusammenhang zwischen Membranveränderungen, den Wechselwirkungen von Tensiden mit Phospholipiden und ihrem HLB-Wert bzw. ihrer kritischen Mizellbildungskonzentration wurde mehrfach berichtet [51, 55, 99, 110, 179]. Allerdings wurden bei diesen Arbeiten immer nur einige wenige Tenside untersucht.

Tabelle 58: HLB-Werte von Tensiden im Vergleich mit MTK-Werten

| Substanzen | MTK [$\mu\text{g/ml}$]; 1h Exposition | HLB-Wert | [Literatur] |
|----------------------------------|---|-------------|-------------|
| Benzalkoniumchlorid | 2,93 | 34,6 | [249] |
| Natriumcetylstearylsulfat | 1,87 | 37 | [20] |
| Natriumdodecylsulfat | 6,76 | 40 | [251] |
| Cremophor® A25 | 1,64 | 16 | [79] |
| Brij®78 | 1,66 | 15,3 | [79] |
| Triton® X-100 | 41,1 | 13,4 | [249] |
| Polysorbat 80 | 80,0 | 15 | [79] |
| Cremophor® EL | 20300 | 13 | [79] |
| Poloxamer® 188 | 59600 | 29 | [20] |

In der vorliegenden Arbeit war kein Zusammenhang zwischen HLB-Wert und Membrantoxizität zu erkennen. In der Tabelle 58 sind die HLB-Werte einiger untersuchter Tenside den MTK-Werten gegenübergestellt.

Es besteht ebenso kein Zusammenhang zwischen kritischer Mizellbildungskonzentration und den hämolytischen Eigenschaften von Tensiden [187]. Des Weiteren scheint auch der HLB-Wert nicht bestimmend für das Ausmaß lokaler Irritationen sein. Vielmehr ist die Bindungsfähigkeit der Tenside an Proteine ein entscheidender Faktor für das Auftreten lokaler Irritationen, wie bei In-vivo-Versuchen an der Haut der Maus gezeigt werden konnte [140].

In einigen Arbeiten wurde eine pauschale Einstufung der Toxizitätsrangfolge nach der hydrophilen Gruppe der Tenside unternommen. Es wurden z.B. folgende Rankings angegeben: kationische > anionische = amphotere > nicht ionische Tenside [101]; kationische > anionische > nicht ionische Tenside [73]. Da jedoch immer nur eine kleine Auswahl von Tensiden untersucht wurde, ist eine solche Verallgemeinerung abzulehnen. Sie wird auch durch die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit widerlegt. Es besteht kein Zusammenhang zwischen der Ladung der hydrophilen Gruppe der Tenside und ihrer Zyto- bzw. Membrantoxizität.

Die in der Literatur teilweise postulierte Annahme, dass anionische Tenside generell toxischer sind als nichtionische, konnte auch nicht bestätigt werden, da die nichtionischen Polyethylenglycolfettalkoholether deutlich toxischer waren als das anionische Natriumdodecylsulfat [73, 144, 185].

Jedes einzelne Tensid scheint sehr spezifische und komplizierte Abläufe in Zellen und Geweben auszulösen. Die Toxizität der Tenside wird nicht allein durch die simple Auflösung der Zellmembran in Folge der grenzflächenaktiven Eigenschaften verursacht. Viele unterschiedliche Faktoren tragen zu ihrer Wirkung bei. Die grenzflächenaktive Eigenschaft von Tensiden ist nur eine von vielen Ursachen, die die Art und das Ausmaß ihrer Toxizität bestimmen. Aus diesem Grund ist es immer problematisch, von der Toxizität einzelner Tenside auf andere zu schließen.

Auch bei In-vivo-Versuchen wurde festgestellt, dass es keinen einheitlichen Mechanismus der Toxizität von Tensiden gibt. Die einzelnen Tenside lösen durch unterschiedliche Mechanismen lokale Irritationen aus [6, 74].

Die durch Tenside verursachte Zytotoxizität, unabhängig davon welcher Mechanismus sie verursacht hat, ist von großer Bedeutung bei der Entstehung lokaler Irritationen. Am Kanichenaugen wurden Natriumdodecylsulfat und Brij[®] untersucht. Hier waren neben Fläche und Tiefe der Verletzung spezifisch der Umfang des Zelltodes ein wichtiger und prinzipieller Faktor für das Auftreten von Augenirritationen [124].

An der Haut der Maus kam es durch Tenside zur Zelldegeneration, zu fokalen Nekrosen mit entzündlicher Zellinfiltration und bei wiederholter Applikation zu Akanthose und Hyperkera-

tose. Dabei waren Zellkerntrümmer zu beobachten, die von apoptotischen Zellen stammen könnten [140]. In vivo bestimmte lokale Irritationen korrelierten mit der Zytotoxizität der Tenside [185].

In der Haut provozieren Tenside vor allem Schäden in den kernhaltigen, also lebenden, Teilen der Epidermis und bewirken Veränderungen in tieferen Teilen des Stratum corneum. Höhere Schichten des Stratum corneum zeigen dagegen intakte Lipidschichten. Dies widerspricht der alten These: Tenside schädigen allein durch Entfettung der Haut [78]. Auch die Barrierezerstörung durch Tenside an der Haut erfolgt überwiegend durch Zytotoxizität [228].

Außer der Zytotoxizität spielen bei lokalen Irritationen durch Tenside vor allem die Penetration der Tenside in Haut und Schleimhaut, die Bindung der Tenside an Proteine, insbesondere an Keratin und an der Haut auch die Lipidentfernung eine Rolle [140, 185].

Es ist bekannt, dass durch die Kombination unterschiedlicher Tenside die Toxizität der einzelnen Komponenten der Tensidmischung herabgesetzt wird. Üblich ist es deshalb Co-Tenside zu verwenden. Cocamidopropylbetain ist ein bekanntes Co-Tensid zur Verbesserung der Hautverträglichkeit [64, 65]. Es wird häufig zusammen mit Natriumdodecylsulfat und Natriumdodecylethersulfat eingesetzt. Die Zytotoxizität des Gemisches von Cocamidopropylbetain ist nach 24-stündiger Exposition signifikant weniger toxisch als Natriumdodecylsulfat allein.

Auch Kombinationen von nichtionischen Tensiden mit anionischen Tensiden und Kombinationen von verschiedenen anionischen Tensiden verursachen weniger Irritationen als die einzelnen Tenside. So wurden verschiedene Kombinationen von Tensiden z.B. Natriumdodecylsulfat mit Cocamidopropylbetain und Natriumdodecylsulfat mit Natriumdodecylethersulfat in vivo im Patchtest getestet. Die Gemische verursachten immer eine deutlich geringere Irritation als die Tensidkomponenten allein [63].

Als Ursachen für die verringerte Toxizität werden unter andern eine Verringerung der Monomer-Konzentration durch Bildung gemischter Mizellen diskutiert. Das Monomer wird hier für die irritierenden Wirkungen verantwortlich gemacht [152]. Gegen diese These sprechen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit, bei der eine Verringerung der Toxizität bereits in sehr geringen Konzentrationen deutlich unterhalb der kritischen Mizellbildungskonzentration erreicht wurde. Andere Autoren sind ebenfalls der Meinung, dass die Reduktion der kritischen Mizellbildungskonzentration als Erklärung nicht genügt. Hier wird auch die Fähigkeit zur Proteinbindung, die in den Kombinationen geringer ist, als wichtiger Faktor für die Toxizitätsverringering bezeichnet [107]. Gegen die Hypothese, dass Wechselwirkungen zwischen anionischen und kationischen Gruppen zur Toxizitätsverringering

beitragen, spricht, dass auch nichtionische Tenside in Kombination die Toxizität herabsetzen [63].

Beurteilung der Toxizität der Tenside und der verwendeten Methoden

In der vorliegenden Arbeit wurden 12 Tenside, die im Europäischen Arzneibuch, im Deutschen Arzneibuch oder im Deutschen Arzneimittelcodex offizinell sind, auf ihre In-vitro-Toxizität untersucht. Dabei wurden für alle Tenside die gleichen Testsysteme verwendet. Zwischen den In-vitro-Toxizitäten der einzelnen Vertreter der untersuchten Tenside bestehen deutliche Unterschiede. Da Natriumdodecylsulfat, Benzalkoniumchlorid, Polysorbat 80 und Triton[®] X-100 schon hinlänglich untersucht wurden, sind Vergleiche der Tenside untereinander gut möglich.

Nach den aus Konzentrations-Wirkungs-Kurven ermittelten Parametern MTK und CC_{50} wurden die Tenside in stark reizende, schwach reizende und nicht reizende Tenside eingeteilt [122]. Stark reizende Tenside sind dabei mit relativen Toxizitätswerten von 75 bis 900: Benzalkoniumchlorid, Cremophor[®] A25, Brij[®]78, Natriumcetylstearylsulfat, Natriumdodecylsulfat, Natriumdodecylethersulfat und Cocamidopropylbetain. Ein schwach reizendes Tensid war mit relativen Toxizitätswerten von 65 bis 10 Triton[®] X-100. Polysorbat 80, Sojalecithin, Poloxamer[®] 188 und Cremophor[®] EL wurden mit relativen Toxizitätswerten von 30 bis 0,003 als nicht reizend eingeschätzt.

Da mit den in der vorliegenden Arbeit verwendeten Methoden wichtige Vitalitätsmerkmale der Zelle bestimmt werden, die essentiell für das Entstehen lokaler Irritationen sind, und die verwendeten Methoden in vielen Studien mit In-vivo-Daten korrelieren, sind sie zur Beurteilung des Irritationspotenzials von Tensiden geeignet. Die Ergebnisse der verschiedenen in der vorliegenden Arbeit verwendeten Methoden stimmten sehr gut überein. Aus ihnen kann sowohl auf das Irritationspotenzial der Tenside als auch auf deren toxische Mechanismen geschlossen werden. Auf der Basis der gefundenen Ergebnisse können weitere spezifische In-vitro-Versuche bzw. In-vivo-Studien durchgeführt werden.

6. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden mehrere in Deutschland offizinelle Tenside auf ihre In-vitro-Toxizität zur Abschätzung ihres Irritationspotenzials getestet. Es handelt sich dabei um anionische, kationische, nichtionische und amphotere Tenside unterschiedlicher chemischer Struktur, die eine breite Verwendung als Hilfsstoffe in der Pharmazie finden. In anderen Studien ist die Zahl der untersuchten Tenside in der Regel auf ein bis drei Vertreter begrenzt. In der vorliegenden Arbeit sind die offizinellen, das heißt alle wichtigen Tenside aus der pharmazeutischen Praxis an den gleichen Modellen untersucht worden.

Die untersuchten Tenside weisen deutliche Unterschiede in ihrer In-vitro-Toxizität auf. Während einige schon in Konzentrationen von wenigen Mikrogramm pro Milliliter zytotoxisch und membrantoxisch sind, gibt es Tenside die erst im Milligrammbereich toxische Erscheinungen an den Zellen verursachen. Nach 24-stündiger Exposition stimmt die Rangfolge in der Membrantoxizität der Tenside weitestgehend mit der ihrer Zytotoxizität überein. Die In-vitro-Toxizität der Tenside nimmt in folgender Reihenfolge zu: Poloxamer[®] 188 < Cremophor[®] EL < Sojalecithin < Polysorbat 80 < Triton[®] X-100 < Natriumdodecylsulfat = Natriumdodecylethersulfat = Cocamidopropylbetain < Natriumcetylstearylsulfat < Brij[®]78 = Cremophor[®] A25 = Benzalkoniumchlorid.

Die In-vitro-Toxizität der Tenside steht weder mit der Ladung der hydrophilen Gruppe noch mit den grenzflächenaktiven Eigenschaften in direktem Zusammenhang. Nicht alle Tenside führen zur unmittelbaren Lyse bzw. Solubilisation der Zelle. Nekrose ist nicht der Hauptmechanismus, der zum Tod der Zelle durch Tenside führt. Alle untersuchten Tenside verursachen in geringen Konzentrationen Apoptose. Erst höhere Tensidkonzentrationen verursachen Nekrose. Es gibt keinen einheitlichen Weg auf dem Tenside zytotoxisch wirken. Vielmehr gibt es für jedes Tensid einen ganz spezifischen Mechanismus, der zur Zerstörung der Zelle führt.

Allen Tensiden gemeinsam ist dabei, die Zunahme der In-vitro-Toxizität mit der Expositionszeit, die Schädigung von Membranen und das Vorkommen von sowohl Apoptose als auch Nekrose. Mit Ausnahme der gering toxischen Tenside entstehen die Membranschäden durch Tenside nicht auf enzymatischem Wege. Primär erfolgt eine Erhöhung der Membranpermeabilität, dann eine Desintegration der Membran und schließlich die völlige Auflösung der Membran.

Benzalkoniumchlorid ist am stärksten zytotoxisch. Im Mechanismus seiner Toxizität sind folgende Besonderheiten zu finden. Die Veränderungen an den Membranen finden parallel zur Reduktion der mitochondrialen Aktivität und den apoptotischen Veränderungen statt. Benzalkoniumchlorid führt in höheren Konzentrationen zur Nekrose und Lyse der Zelle. Oberhalb dieser lytischen Konzentrationen kommt es jedoch zur Zellmembranfixierung ohne Zelllyse.

Alle drei anionischen Tenside weisen den gleichen Toxizitäts-Mechanismus mit folgenden Charakteristika auf. Die Beeinträchtigung von Membranen findet merklich vor den apoptotischen Veränderungen und der Reduktion der mitochondrialen Aktivität statt. Hohe Konzentrationen führen zur Nekrose und kompletten Lyse der Zelle.

Cocamidopropylbetain zeigt einen ähnlichen Mechanismus wie die anionischen Tenside, an den Zellen sind jedoch andere morphologische Veränderungen zu beobachten.

Auch die Macrogolfettalkoholether führen wie die anionischen Tenside primär zu Membranveränderungen. Bemerkenswert ist, dass bei ihnen Apoptose und Nekrose nebeneinander ablaufen. Des Weiteren bewirken Macrogolfettalkoholether im Vergleich zu anionischen Tensiden und Cocamidopropylbetain andere sichtbare morphologische Veränderungen an den Zellen. Sie bewirken keine sichtbare Zelllyse.

Triton[®] X-100 und Polysorbat 80 bewirken primär die Reduktion der mitochondrialen Aktivität und dann apoptotische Veränderungen. Erst nach längerer Exposition und bei höheren Konzentrationen kommt es zur Zerstörung der Membran, zur Nekrose und schließlich zur kompletten Lyse der Zellen.

Der toxische Mechanismus der drei Tenside, Cremophor[®] EL, Poloxamer[®] 188 und Sojalecithin, die nur eine äußerst geringe Toxizität aufweisen, unterscheidet sich in folgenden Besonderheiten von dem der anderen, stärker toxischen Tenside. Die gefundene Membranschädigung ist teilweise enzymatisch bedingt. Bei Cremophor[®] EL und Sojalecithin ist Apoptose der Hauptmechanismus des Zellsterbens. Die Mitochondrien werden sekundär geschädigt. Beide Tenside sind im Gegensatz zu den anderen Tensiden für HaCaT-Zellen toxischer als für U937-Zellen. Bei Cremophor[®] EL ist die Zytotoxizität nach 24 Stunden jedoch für beide Zellarten gleich. Bei Cremophor[®] EL und Poloxamer[®] 188 tritt in extrem hohen Konzentrationen eine allein durch osmotische Effekte bedingte Nekrose auf.

Nach den ermittelten Parametern MTK und CC_{50} wurden die Tenside in stark reizende (Benzalkoniumchlorid, Cremophor[®] A25, Brij[®]78, Natriumcetylstearylsulfat, Natriumdodecylsulfat, Natriumdodecylethersulfat und Cocamidopropylbetain), schwach reizende (Triton[®] X-100) und nicht reizende (Polysorbat 80, Sojalecithin, Poloxamer[®] 188 und Cremophor[®] EL) Tenside eingeteilt.

Das Standardirritans Natriumdodecylsulfat ist weniger toxisch als das analoge Natriumcetylstearylsulfat mit einer längeren Kohlenstoffkette. Es weist eine vergleichbare Toxizität wie das ethoxylierte Derivat Natriumdodecylethersulfat und das amphotere Tensid Cocamidopropylbetain auf.

Benzalkoniumchlorid ist von den untersuchten Tensiden am meisten toxisch. Seine breite und unkritische Anwendung ist nach den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit und Ergebnissen anderer Untersucher nicht mehr zu befürworten.

Bei parenteraler Applikation kann Cremophor[®] EL die Wirkung von Zytostatika verstärken, jedoch auch zu unerwünschten Wirkungen führen. Bei länger dauernder Anwendung ist nach den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit eine zytotoxische Wirkung nicht ausgeschlossen. Es sollte in jedem Fall bei Verwendung dieses Hilfsstoffes für parenterale Arzneiformen eine sorgsame Nutzen-Risiko-Abwägung erfolgen. Eine Verbesserung des Vehikels durch seine Fraktionierung ist nach den vorliegenden Ergebnissen theoretisch möglich und wäre zu überprüfen.

Die mit den in der vorliegenden Arbeit verwendeten Methoden erzielten Ergebnisse sind zur Beurteilung des Irritationspotenzials von Tensiden geeignet. Die Resultate der verschiedenen in dieser Arbeit verwendeten Methoden stimmten sehr gut überein. Ebenso gibt es eine große Anzahl von Übereinstimmungen mit Literaturdaten für einzelne der untersuchten Tenside. Aus den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit kann sowohl auf das Irritationspotenzial der Tenside als auch auf deren toxische Mechanismen geschlossen werden. Die verwendeten Methoden führen zu objektiven Ergebnissen, auf deren Basis Konzentrations-Wirkungs-Kurven erstellt und konkrete Kenngrößen ermittelt werden können. Ihre Durchführung ist zudem wenig aufwendig und mit geringem Substanzverbrauch verbunden. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit sollen eine Grundlage für weitere spezifische In-vitro-Versuche und für In-vivo-Studien zum Irritationspotenzial offizineller Tenside sein.

7. Literatur

- [1] ABDA – Bundesvereinigung Deutscher Apothekerverbände (Hrsg.): ABDA-Datenbank, Monographien und Stoffliste (2000)
- [2] ABDA – Bundesvereinigung Deutscher Apothekerverbände (Hrsg.): Deutscher Arzneimittel-Codex Ergänzungsbuch zum Arzneibuch. Govi-Verlag Pharmazeutischer Verlag GmbH Eschborn, Deutscher Apotheker-Verlag Stuttgart (2000)
- [3] Abraham, J., S.; Bentley, F., R.; Garrison, R., N.; Cryer, H., M.: The influence of the cyclosporine vehicle, Cremophor EL, on renal microvascular blood flow in the rat. Transplantation, 52 (1), 101-105 (1991)
- [4] Agarwal, M., L.; Larkin, H., E.; Zaidi, S., I., A.; Mukthar, H.; Oleinick, N., L.: Phospholipase activation triggers apoptosis in photosensitized mouse lymphoma cells. Cancer Res. 53, 5897-5902 (1993)
- [5] Ahn, J., M.; Kim, S., J.; Kim, H.; Park, C.; Kim, W., H.; Park, J., H.: Triton X-100 induces apoptosis in human hepatoma cell lines. Yonsei Med. J. 38, 52-59 (1997)
- [6] Ale, S., I.; Laugier, J.-P., K.; Maibach, H., I.: Differential irritant skin responses to tandem application of topical retinoic acid and sodium lauryl sulphate: II. Effect of time between first and second exposure. Br. J. Dermatol. 137, 226-233 (1997)
- [7] Andersen, P., H.; Maibach, H., I.: Skin irritation in man: a comparative bioengineering study using improved reflectance spectroscopy. Contact Dermatitis 33, 315-322 (1995)
- [8] Angelini, G.; Foti, C.; Rigano, L.; Vena, G., A.: 3-Dimethylaminopropylamine: a key substance in contact allergy to cocamidopropylbetaine? Contact Dermatitis 32, 96-99 (1995)
- [9] Angelini, G.; Rigano, L.; Foti, C.; Vena, G., A.; Grandolfo, M.: Contact allergy to impurities in surfactants: amount, chemical structure and carrier effect in reactions to 3-dimethylaminopropylamine. Contact Dermatitis 34, 248-252 (1996)
- [10] Anrade, R., J.; Lucena, M., I.; Gonzalez-Correa, J., A.; Garcia-Arias, C.; Gonzales-Santos, P.: Short-term effect of various doses of cyclosporine A on plasma lipoproteins and its distribution in blood: an experimental study. Hum. Exp. Toxicol. 12, 141-146 (1993)
- [11] Aragane, Y.; Kulms, D.; Metze, D.; Wilkes, G.; Pöppelmann, B.; Luger, T., A.; Schwarz, T.: Ultraviolet light induces apoptosis via direct activation of CD95 (Fas/APO-1) independently of its ligand CD95L. J. Cell Biol. 140 (1), 171-182 (1998)
- [12] Arechabala, B.; Coiffard, C.; Rivalland, P.; Coiffard, L., J.; de Roeck-Holtzhauer, Y., J.: Comparison of cytotoxicity of various surfactants tested on normal human fibroblast cultures using the neutral red test, MTT assay and LDH release. Appl. Toxicol. 19 (3), 163-5 (1999)
- [13] Arzneimittelkommission der deutschen Ärzteschaft: Deutsche Apothekerzeitung 15, 769 (1985)
- [14] ATCC - American Type Culture Collection: Cell lines, Hybridomas. Catalogue, Rockville, MD, USA, 7th edition (1992)
- [15] Atsumi, G.; Tajima, M.; Hadano, A.; Nakatani, Y.; Murakami, M.; Kudo, I.: Fas-induced arachidonic acid release is mediated by Ca²⁺-independent phospholipase A2 but not cytosolic

- phospholipase A2 which undergoes proteolytic inactivation. *J. Biol. Chem.* **273** (22), 13870-13877 (1998)
- [16] Atsumi, G.; Murakami, M.; Tajima, M.; Shimbara, S.; Iara, N.: The perturbed membrane of cells undergoing apoptosis is susceptible to type II secretory phospholipase A2 to liberate arachidonic acid. *Biochim. Biophys. Acta* **1349**, 43-54 (1997)
- [17] Babich, H.; Babich, J., P.: Sodium lauryl sulfate and triclosan: in vitro cytotoxicity studies with gingival cells. *Toxicol. Lett.* **91**, 189-196 (1997)
- [18] Badary, O., A.; Abdel-Naim, A., B.; Khalifa, A., E.; Hamada, F., M.: Differential alteration of cisplatin cytotoxicity and myelotoxicity by the paclitaxel vehicle cremophor EL. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* **361** (3), 339-44 (2000)
- [19] Barile, F., A.; Dierickx, P., J.; Kristen, U.: In vitro cytotoxicity testing for prediction of acute human toxicity. *Cell Biol. Toxicol.* **10**, 155-162 (1994)
- [20] Bauer, K., H.; Frömming, K.-H.; Führer, C.: *Pharmazeutische Technologie*. Stuttgart, New York: Georg Thieme Verlag, 3. Aufl. 1991
- [21] Becker, H.; Reichling, J.: *Grundlagen der pharmazeutischen Biologie*. Stuttgart: Wiss. Verl.-Ges. 3. Auflage (1989)
- [22] Benassi, L.; Bertazzoni, G.; Seidenari, S.: In vitro testing of tensides employing monolayer cultures: a comparison with results of patch tests on human volunteers. *Contact Dermatitis* **40** (1), 38-44 (1999)
- [23] Berardesca, E.; Fideli, D.; Gabba, P.; Cespa, M.; Rabbiosi, G.; Maibach, H., I.: Ranking of surfactants skin irritancy in vivo in man using the plastic occlusion stress test (POST). *Contact Dermatitis* **23**, 1-5 (1990)
- [24] Berardesca, E.; Vignoli, G., P.; Distante, F.; Brizzi, P.; Rabbiosi, G.: Effectes of water temperature on surfactant-induced skin irritation. *Contact Dermatitis* **32**, 83-87 (1995)
- [25] Bettley, F.R.: The toxicity of soaps and detergents. *Br. J. Derm.* **80**, 635-642 (1968)
- [26] Bigliardi, P., L.; Herron, M., J.; Nelson, R., D.; Dahl, M., V.: Effects of detergents on proliferation and metabolism of human keratinocytes. *Exp. Dermatol.* **3**, 89-94 (1994)
- [27] Bloom, E.; Sznitowaska, M.; Polansky, J.; Ma, Z., D.; Maibach, H., I.: Increased Proliferation of skin cells sublethal doses of sodium dodecyl sulfate. *Dermatology*, **188**, 263-258 (1994)
- [28] Bloom, E.; Sznitowska, M.; Polansky, J., R.; Maibach, H., I.: In vitro tests for irritants: qualitative differences in biological properties. *In Vitro Toxicol.* **6** (3) 171-185 (1993)
- [29] Bolton, W., E.: Detection of apoptotic cells by flow cytometry: monoclonal antibody APO 2.7.. ISAC Congress XVIII April 1996, Rimini, Italien, 3
- [30] Bonfoco, E.; Krainc, D.; Ankarcona, M.; Nicotera, P.; Lipton, S., A: Apoptosis and necrosis: two distinct events induced, respectively, by mild and intense insults with N-methyl-D-aspartate or nitric oxide / superoxide in cortical cell cultures. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **92**, 7162-7166 (1995)
- [31] Borner, M., M.; Schneider, E.; Pirnia, F.; Sartor, O.; Trepel, J., B.; Myers, C., E.: The detergent Triton X-100 induces a death pattern in human carcinoma cell lines that resembles cytotoxic lymphocyte-induced apoptosis. *FEBS Lett.* **353**, 129-132 (1994)

- [32] Boukamp, P.; Petrussevska, R.; Breitkreutz, D.; Hornung, J.; Markham, A.; Fusenig, N., E.: Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line. *J. Cell Biol.* 106, 761-771(1988)
- [33] Bowers, V., D.; Locker, S.; Ames, S.; Jennings, W.; Corry, R., J.: The hemodynamic effects of Cremophor EL. *Transplantation* 51 (4), 847-850 (1991)
- [34] Brand, R.; Delaney, T., A.: Allergic contact dermatitis to cocamidopropylbetaine in hair shampoo. *Austr. J. Dermatol.* 39, 121-122 (1998)
- [35] Brat, D., J.; Windebank, A., J.; Brimijoin, S.: Emulsifier for intravenous cyclosporin inhibits neurite outgrowth, causes deficits in rapid axonal transport and leads to structural abnormalities in differentiating N1E.115 neuroblastoma. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 261 (2), 803-810 (1992)
- [36] Brosin, A.; Wolf, V.; Mattheus, A.; Heise, H.: Use of XTT-assay to assess the cytotoxicity of different surfactants and metal salt in human keratinocytes (HaCaT). *Acta Derm. Venereol. Suppl. (Stockh.)* 77, 26-28 (1997)
- [37] Buche, P.; Violin, L.; Girard, P.: Evaluation of the effects of cosmetic or dermopharmaceutical products on cutaneous energy metabolism using the episkin model of reconstructed epidermis. *Cell Biol. Toxicol.* 10, 381-385 (1994)
- [38] Burgoyne, L., A.; Hewish, D., R.; Mobbs, J.: Mammalian chromatin substructure studies with the calcium-magnesium endonuclease and two-dimensional polyacrylamidegel electrophoresis. *Biochem. J.* 143, 67-72 (1974)
- [39] Carver, M., P.; Reigle, R.; De Salva, S., J.: Arachidonic acid release from three skin culture models in response to surfactant-based irritants. In: Goldberg, A., M.: *Alternative Methods in Toxicology: In Vitro Toxicol. Vol. 3 - Mechanisms and New Technology* 9, 277-284, Mary Ann Liebert, New York (1991)
- [40] Chuang, L., F.; Isreal, M.; Chuang, R., Y.: Cremophor EL inhibits 12-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA)-induced protein phosphorylation in human myeloblastic leukaemia ML-1 cells. *Anticancer Res.* 11, 1517-1522 (1991)
- [41] Ciuchta, H., P.; Dodd, K., T.: The determination of the irritancy potential of surfactants using various methods of assessment. *Drug Chem. Toxicol.* 1 (3), 305-324 (1978)
- [42] Clothier, R., H.; Hulme, L., M.; Smith, M.; Balls, M.: Comparison of the in vitro cytotoxicities and acute in vivo toxicities of 59 chemicals. *Mol. Toxicol.* 1, 571-577 (1987)
- [43] Comley, J., C., W.; Turner, C., H.: Potential of a soluble tetrazolium/formazan assay for the evaluation of filarial viability. *Int. J. Parasitol.* 20, 251-255 (1990)
- [44] Conduzorgues, J., P.; Hagege, M.; Dumas, M.; Meybeck, A.: Participation of the membrane effect to the cytotoxicity of tensio-active agents comparison with ocular irritation in vivo. *Lens Eye Toxic. Res.* 6, (1&2), 375-378 (1989)
- [45] Cordes, N.; Plasswilm, L.: Cell line and schedule-dependent cytotoxicity of Paclitaxel (Taxol): Role of the solvent Cremophor EL/Ethanol. *Anticancer Res.* 18, 1849-1856 (1998)
- [46] Cordes, N.; Plasswilm, L.; Sauer, R.: Interaction of paclitaxel (Taxol) and irradiation. In-vitro differences between tumor and fibroblastic cells. *Strahlenther. Onkol.* 175 (4) 175-81 (1999)

- [47] Cornelis, M.; Dupont, C.; Wepierre, J.: Prediction of eye irritancy potential of surfactants by cytotoxicity tests in vitro on cultures of human skin fibroblasts and keratinocytes. *Toxic. In Vitro* **6** (2) 119-128 (1992)
- [48] Cossarizza, A.; Franceschi, C.; Monti, D.; Salvioli, S.; Bellesia, E.; Rivabene, R.; Biondo, L.; Rainaldi, G.; Tinari, A.; Malorni, W.: Protective effect of N-acetylcysteine in tumor necrosis factor-alpha-induced apoptosis in U937 cells: role of mitochondria. *Exp. Cell Res.* **220**, 232-240 (1995)
- [49] Crosasso, P.; Ceruti, M.; Brusa, P.; Arpicco, S.; Dosio, F.; Cattel, L.: Preparation, characterization and properties of sterically stabilized paclitaxel-containing liposomes. *J. Control. Release* **3**, 63 (1-2) 19-30 (2000)
- [50] Csoka, K.; Sumeer, D.; Fridborg, H.; Larsson, R.; Nygren, P.: Differential activity of Cremophor EL and Paclitaxel in patients' tumor cells and human carcinoma cell lines in vitro. *Cancer* **79** (6), 1225-1233 (1997)
- [51] Csúcs, G.; Ramsden, J., J.: Solubilization of planar bilayers with detergent. *Biochimica et Biophysica Acta* **1369**, 304-308 (1998)
- [52] Damour, O.; Hua, S., Z.; Lanse, F.; Villain, M.; Rouselle, P.; Collombel, C.: Cytotoxicity evaluation of antiseptics and antibiotics on cultured human fibroblasts and keratinocytes. *Burns* **18**, (6), 479-485 (1992)
- [53] Darzynkiewicz, Z.; Juan, G.; Li, X.; Gorczyca, W.; Murakami, T.; Traganos, F.: Cytometry in Cell Necrobiology: Analysis of Apoptosis and Accidental Cell Death (Necrosis). *Cytometry* **27**, 1-20 (1997)
- [54] De Groot, A., C.; van de Walle, H., B.; Weyland, J., W.: Contact allergy to cocamidopropyl betaine. *Contact Dermatitis* **33**, 419-422 (1995)
- [55] De la Maza, A.; Parra, J., L.: Alterations in phospholipid belayers caused by oxyethylenated nonylphenol surfactants. *Arch. Biochem. Biophys.* Vol. 329, No. 1, 1-8 (1996)
- [56] De Leo, V., A.; Carver, M., P.; Hong, J.; Fung, K.; Kong, B.; De Salva, S.: Arachidonic acid release: an in vitro alternative for dermal irritancy testing. *Food Chem. Toxicol.* **34**, (2) 167-176 (1996)
- [57] De Saint Jean, M.; Brignole, F.; Bringuier, A.-F.; Bauchet, A.; Feldmann, G.; Baudouin, C.: Effects of benzalkonium chloride on growth and survival of chang conjunctival cells. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **40**, (3) 619-630 (1999)
- [58] De Saint Jean, M.; Debbasch, C.; Brignole, F.; Rat, P.; Warnet, J., M.; Baudouin, C.: Toxicity of preserved and unpreserved antiglaucoma topical drugs in an in vitro model of conjunctival cells. *Curr. Eye Res.* **20** (2), 85-94 (2000)
- [59] De Vente, J.; Kiley, S.; Garris, T.; Bryant, W.; Hooker, J.; Posekany, K.; Parker, P.; Cook, P.; Fletcher, D.; Ways, D., K.: Phorbol ester treatment of U937 Cells with altered protein kinase C content and distribution induces cell death rather than differentiation. *Cell Growth Differ.* **6**, 371-382 (1995)

- [60] Demetrulias, J.; Donnelly, T.; Morhenn, V.; Jessee, B.; Hainsworth, S.; Casterton, P.; Bernhofer, L.; Martin, K.; Decker, D.: Skin2 – an in vitro human skin model: the correlation between in vivo and in vitro testing of surfactants. *Exp. Dermatol.* 7, 18-26 (1998)
- [61] Denizot, F.; Lang, R.: Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. *J. Immunol. Methods* 89, 271 (1986)
- [62] Dickson, F., M.; Lawrence, J., N.; Benford, D. J.: Cytotoxicity of 12 chemicals of known human and animal skin irritation potential in human keratinocyte cultures. *Toxicol. in Vitro* 8, (4) 661-663 (1994)
- [63] Dillarstone, A.; Paye, M.: Antagonism in concentrated surfactant systems. *Contact Dermatitis* 28, 198 (1993)
- [64] Dominguez, J., G.; Balaguer, F.; Parra, J., L.; Pelejero, C., M.: The inhibitory effect of some amphoteric surfactants on the irritation potential of alkylsulphates. *Int. J. Cosmet. Sci.* 3, 57-68 (1981)
- [65] Dominguez, J., G.; Balaguer, F.; Parra, J., L.; Pelejero, C., M.: l'effet inhibiteur de certains surfactifs amphotères sur le potentiel d'irritation des alkylsulfates. *Parfums, Cosmét. Aromes* 39, 53-60 (1981)
- [66] Dorr, R., T.: Pharmacology and toxicology of Cremophor EL diluent. *Ann. Pharmacother.* 28, 11-14 (1994)
- [67] Draize, J., H.; Woodward, D.; Calvery, H., O.: Methods for study of irritation and toxicity of substances applied topically to the skin and mucous membranes. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 82, 377-390 (1944)
- [68] Duke, R., C.; Cohen, J., J.: IL-2 addiction: withdrawal of growth factor activates a suicide program in dependent T cells. *Lymphokine Res.* 5, 289-299 (1986)
- [69] Duke, R., C.; Ojcius, D., M.; Young, J., D.: Die Apoptose – Regeln und Fehler beim Zellselbstmord. *Spektrum der Wissenschaft* 2, 26-35 (1997)
- [70] Duvall, E.; Wyllie, A.H.: Death and the cell. *Immunol. Today* 7, 115-119 (1986)
- [71] Dye, D.; Watkins, J.: Suspected anaphylactic reaction to Cremophor EL. *Br. Med J.* 7, 1353 (1980)
- [72] Dykes, P., J.; Black, D., R.; York, M.; Dickens, A., D.; Marks, R.: A stepwise procedure for evaluating irritant materials in normal volunteer subjects. *Hum. Exp. Toxicol.* 14, 204-211 (1995)
- [73] Effendy, I.; Maibach, H.I.: Surfactants and experimental irritant contact dermatitis. *Contact Dermatitis* 33, 217-225 (1995)
- [74] Effendy, I.; Weltfriend, S.; Patil, S.; Maibach, H., I.: Differential irritant skin response to topical retinoic acid and sodium lauryl sulphate: alone and in crossover design. *Br. J. Dermatol.* 134, 424-430 (1996)
- [75] Engblom, P.; Pulkkinen, J., O.; Rantanen, V.; Hirvonen, H.; Kulmala, J.; Grenman, R.; Grenman, S.: Effects of paclitaxel with or without cremophor EL on cellular clonogenic survival and apoptosis. *Eur. J. Cancer* 35 (2), 284-288 (1999)

- [76] Eun, H., C.; Chung, J., H.; Jung, S., Y.; Cho, K., H.; Kim, K., H.: A comparative study of the cytotoxicity of skin irritants on cultured human oral and skin keratinocytes. *Br. J. Dermatol.* 130, 24-28 (1994)
- [77] Fabris, C.; Ometto, C.; Milanesi, C.; Jori, G.; Cook, M., J.; Russell, D., A.: Tumour-localizing and tumor-photosensitizing properties of zinc(II)-octapentyl-phthalocyanine. *J. Photochem. Photobiol. B* 39, 279-284 (1997)
- [78] Fartasch, M.; Schnetz, E.; Diepgen, T., L.: Characterization of detergent-induced barrier alterations – effect of barrier cream on irritation. *J. Invest. Dermatol.* 3, 121-127 (1998)
- [79] Fiedler, H.P.: *Lexikon der Hilfsstoffe für Pharmazie, Kosmetik und angrenzende Gebiete*. Aulend: Editio Cantor, 1996
- [80] Fiedler, H., P.; Ippen, H.; Kemper, F., H.; Lüpke, N., P.; Schulz, K., H.; Umbach, W.: (Hrsg.): *Blaue Liste. Inhaltsstoffe kosmetischer Mittel*. 2. Aufl., Editio Cantor Verlag, Aulendorf (1993)
- [81] Finkelstein, P.; Laden, K.; Miechowski, W.: Laboratory Methods for Evaluating Skin Irritancy. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 7, 74-78 (1965)
- [82] Fjällskog, M.-L.; Frii, L.; Bergh, J.: Paclitaxel-induced cytotoxicity – the effects of Cremophor EL (Castor oil) on two human breast cancer cell lines with acquired multidrug resistance phenotype and induced expression of the permeability glycoprotein. *Eur. J. Cancer* 30A, (5), 687-690 (1994)
- [83] Fjällskog, M.-L.; Frii, L.; Bergh, J.: Is Cremophor EL, solvent for paclitaxel, cytotoxic? *Lancet* 342, 873 (1993)
- [84] Font, J.; Braut-Boucher, F.; Pichon, J.; Noel-Hudson, M., S.; Muriel, M., P.; Bonnet, M.; Wepierre, J.; Aubery, M.: A new three-dimensional culture of human keratinocytes: optimization of differentiation. *Cell Biol. Toxicol.* 10, 353-359 (1994)
- [85] Fonteh, A., N.; Bass, D., A.; Marshall, L., A.; Seeds, M.; Samet, J., M.; Chilton, F., H.: Evidence that secretory phospholipase A2 plays a role in arachidonic acid release and eicosanoid biosynthesis by mast cells. *J. Immunol.* 15, 45438-5446 (1994)
- [86] Forsey, R., J.; Shahidullah, H.; Sands, C.; McVittie, E.; Aldridge, R., D.; Hunter, J., A., A.; Howie, S., E., M.: Epidermal Langerhans cell apoptosis is induced in vivo by nonanoic acid but not by sodium lauryl sulphate. *Br. J. Dermatol.* 139, 453-461 (1998)
- [87] Gajjar, L.; Benford, D., J.: Irritancy testing in cultured keratinocytes. *Mol. Toxicol.* 1, 513-523 (1987)
- [88] Gajjar, L.; Benford, D., J.: Comparison of cultured keratinocytes and fibroblasts as models for irritancy testing in vitro. *Toxicol. in Vitro* 4 (4/5), 280-283 (1990)
- [89] Garle, M.; Hammond, A., H.; Fry, J., R.: The cytotoxicity of 27 chemicals to V79 chinese hamster cells. *ATLA* 15, 30-32 (1987)
- [90] Garle, M., J.; Fentem, J., H.; Fry, J., R.: In vitro cytotoxicity tests for the prediction of acute toxicity in vivo. *Toxicol. in Vitro* 8, (6), 1303-1312 (1994)
- [91] Gavrieli, Y.; Sherman, Y.; Ben-Sasson, S., A.: Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J. Cell Biol.* 119, 493-501 (1992)

- [92] Gay, R.; Swinderek, M.; Nelson, D.; Ernesti, A.: The living skin equivalent as a model in vitro for ranking the toxic potential of dermal irritants. *Toxicol. in Vitro* **6**, (4), 303-315 (1992)
- [93] Georgiadis, M., S.; Russel, E., K.; Gazdar, A., F.; Johnson, B., E.: Paclitaxel cytotoxicity against human lung cancer cell lines increases with prolonged exposure durations. *Clin. Cancer Res.* **3**, 449-454 (1997)
- [94] Gerckens, B.; Eisinger, G.; Krüger, W.: Vergleichende Untersuchungen von Zahnpasten und Zahnpasten-Bestandteilen in biologischen Systemen. *Oralprophylaxe* **13**, 94-99 (1991)
- [95] Gfeller, W.; Kobel, W.; Seifert, G.: Overview of animal test methods for skin irritation. *Fd. Chem. Toxic.* **23**, (2), 165-168 (1985)
- [96] Ghibelli, L.; Coppola, S.; Nosseri, C.; Bergamini, A.; Beninati, S.: A protein produced by monocytic human cell line can induce apoptosis on tumor cells. *FEBS Lett.* **344**, 35-40 (1994)
- [97] Gilman, M., R.: Skin and Eye Testing in Animals. 209-222 In: Wallace Hayes, A.: Principles and Methods of Toxicology. New York: Raven Press, pp. 209-222, 1982
- [98] Glauner, B.: Cytotoxicity quantification with a cell counter and analyzer system. Application note cont. April, 24-25 (1996)
- [99] Gloxhuber Ch.: Toxicological properties of surfactants. *Arch. Toxicol.* **32**, 245-270 (1974)
- [100] Goffin, V.; Paye, M.; Pierard, P.: Comparison of in vitro predictive tests for irritation induced by anionic surfactants. *Contact Dermatitis* **33**, 38-41 (1995)
- [101] Grant, R., L.; Yao, C.; Gabaldon, D.; Acosta, D.: Evaluation of surfactants cytotoxicity potential by primary cultures of ocular tissues: I Characterization of rabbit corneal epithelial cells and initial injury and delayed toxicity studies. *Toxicol.* **76**, 153-176 (1992)
- [102] Groth, T.; Falck, P.; Miethke, R.-R.: Cytotoxicity of biomaterials – basic mechanisms and in vitro test methods: a review. *ATLA* **23**, 790-799 (1995)
- [103] Gruber, S., A.; Venkataram, S.; Canafax, D., M.; Cipolle, R., J.; Bowers, L.; Elsberry, D.; McGuiggan, M.; Hynes, P., E.; Ritz, J., A.; Gould, F., H.; Matas, A.; Hrushesky, W., J., M.; Rahman, Y.: Liposomal formulation eliminates acute toxicity and pump incompatibility of parenteral cyclosporine. *Pharmacol. Res.* **6**, (7) 601-607 (1989)
- [104] Gueniche, A.; Ponc, M.: Use of human skin cell cultures for the estimation of potential skin irritants. *Toxicol. in Vitro* **7**, (1), 15-24 (1993)
- [105] Guillot, J., P.; Gonnet, J., F.; Clement, C.; Caillard, L.; Truhaut, R.: Evaluation of the cutaneous-irritation potential of 56 compounds. *Food. Chem. Toxicol.* **20**, 563-572 (1982)
- [106] Hacker, M.; Koefler, M.; Hong, C., B.; Fagan, M., A.: Cremophor and Emulphor induced alterations of serum lipids and lipoprotein electrophoretic patterns of dog. *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.* **31**, (1) 119-128 (1981)
- [107] Hall-Manning, T., J.; Holland, G., H.; Rennie, G.; Revell, P.; Hines, J.; Barratt, M., D.; Basketter, D., A.: Skin irritation potential of mixed surfactant systems. *Food Chem. Toxicol.* **36**, 233-238 (1998)
- [108] Hansen, M., B.; Nielsen, S., E.; Berg, K.: Re-examination and further development of a precise and rapid dye method for measuring cell growth/cell kill. *J. Immunol. Methods* **119**, 203-210 (1989)

- [109] Hartke, K.; Hartke, H.; Mutschler, E.; Rücker, G.; Wichtl, M.: Kommentar zum Arzneibuch. Eschborn: Govi-Verlag Pharmazeutischer Verlag GmbH, Stuttgart: Deutscher Apotheker-Verlag, 2000
- [110] Helenius, A.; Simons, K.: Solubilisation of membranes by detergents. *Biochim. Biophys. Acta* **415**, 29-79 (1975)
- [111] Henseleit, U.; Rosenbach, T.; Kolde, G.: Induction of apoptosis in human HaCaT keratinocytes. *Arch. Dermatol. Res.* **288**, 676-683 (1996)
- [112] Herlofson, B., B.; Barkvoll, P.: Oral mucosal desquamation caused by two toothpaste detergents in an experimental model. *Eur. J. Oral Sci.* **104**, 21-25 (1996)
- [113] Herlofson, B., B.; Barkvoll, P.: The effects of two toothpaste detergents on the frequency of recurrent aphthous ulcers. *Acta Odontol. Scand.* **54** 150-153 (1996)
- [114] Herzinger, T.; Korting, H., C.: In-vitro-Verfahren zur Bewertung der Hautverträglichkeit von Chemikalien – speziell Detergentien. *Dermatosen* **39**, (4), 117-123 (1991)
- [115] Howrie, D., L.; Ptachcinski, R., J.; Griffith, B., P.; Hardesty, R., J.; Rosenthal, J., T.; Burckart, G., J.; Venkataramanan, R.: Anaphylactoid reactions associated with parenteral cyclosporine use: possible role of Cremophor EL. *Drug Intell. Clin. Pharm.* **19**, 425-427 (1985)
- [116] Hsu, Y.; Youle, R., J.: Bax in murine thymus is a soluble monomeric protein that displays differential detergent-induced conformations. *J. Biol. Chem.* **273**, (17), 10777-10783 (1998)
- [117] Hug, H.: Programmierter Zelltod. *DAZ* **8**, 44-49 (1998)
- [118] Hüttel, M., S.; Olesen, A., S.; Stofferson, E.: Complement-mediated reactions to diazepam with Cremophor as solvent (stesolid mr). *Br. J. Anaesth.* **52**, 77-79 (1980)
- [119] Igarashi, H.; Katsuta, Y.; Sawa, K.; Chiba, Y.; Kozima, M.; Ogawa, K.; Nakazato, Y.; Kawasaki, T.: Effects of Benzalkoniumchloride on Pilocarpin-induced opacity in porcine isolated corneas. *ATLA* **21**, 372-383 (1993)
- [120] Janik, F.; Wolf, H., U.: The Ca²⁺-Transport-ATPase of human erythrocytes as an in vitro toxicity test system – acute effects of some chlorinated compounds. *J. Appl. Toxicol.* **12** (5) 351-358 (1992)
- [121] Jelinek, A.: Einfluß von profibrinolytisch wirksamen Substanzen auf Proliferation und Vitalität von U937-Zellen. Diplomarbeit am Fachbereich Pharmazie der Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald, 1996
- [122] Jelinek, A.; Grabs, S.; Kühn, S.; Klöcking, H.-P.: Zur Verträglichkeit von Tensiden. *Acta Academiae Scientiarum* (2000) im Druck
- [123] Jelinek, A.; Klöcking, H.-P.: In vitro toxicity of surfactants in U937 cells: Cell membrane integrity and mitochondrial function. *Exp. Toxic. Pathol.* **50**, 472-476 (1998)
- [124] Jester, J., V.; Petroll, W., M.; Bean, J.; Parker, R., D.; Carr, G., J.; Cavanagh, H., D.; Maurer, J., K.: Area and depth of surfactant-induced corneal injury predicts extent of subsequent ocular responses. *Invest. Ophthalmol.* **39**, (13), 2610-2625 (1998)
- [125] Ji, Li.; Zhang, G.; Hirabayashi, Y.: Inhibition of tumor necrosis factor α - and ceramide-induced internucleosomal DNA Fragmentation by Herbimycin A in U937 cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **212**, (2), 640-647 (1995)

- [126] Jiang, T.; Acosta, D.: An in vitro model of cyclosporine-induced nephrotoxicity. *Fund. Appl. Toxicol.* **20**, 486-495 (1993)
- [127] Kann, P.; Chen, Z., B.; Lee, C., J.; Chu, I., M.: Development of nonionic surfactant / phospholipid o/w emulsion as a paclitaxel delivery system. *J. Control. Release* **58** (3), 271-8 (1999)
- [128] Kataoka, S.; Naito, M.; Tomida, A.; Tsuruo, T.: Resistance to antitumor agent-induced apoptosis in a mutant of human myeloid leukemia U937 Cells. *Exp. Cell Res.* **215**, 199-205 (1994)
- [129] Kennah, H., E.; Hignet, H., S.; Laux, P., E.; Dorko, J., D.; Barrow, C., S.: An objective procedure for quantitating eye irritation based upon changes of corneal thickness. *Fundam. Appl. Toxicol.* **12**, 258-268 (1989)
- [130] Kessel, D.; Woodburn, K.; Decker, D.; Sykes, E.: Fractionation of Cremophor EL delineates components responsible for plasma lipoprotein alterations and multidrug resistance reversal. *Oncol. Res.* **7**, (5), 207-212 (1995)
- [131] Klang, S., H.; Frucht-Pery, J.; Hoffman, A.; Benita, S.: Physicochemical characterization and acute toxicity evaluation of a positively-charged submicron emulsion vehicle. *J. Pharm. Pharmacol.* **46** (12), 986-993, (1994)
- [132] Klöcking, H.-P., Jelinek, A.; Klöcking, R.: The cytotoxicity of sulfated carbohydrates with anticoagulant and profibrinolytic properties. *Pharm. Pharmacol. Lett.*, **8**, (2), 72-74 (1998).
- [133] Klöcking, H.-P.; Schlegelmilch, U.; Klöcking, R.: [³H]arachidonic acid release as an alternative to the eye irritation test. In: *Ocular Toxicology* (Eds.: Weisse I, Hockwin O, Green K, Tripathi RC) New York, London: Plenum Press, pp. 255-261. (1995)
- [134] Klöcking, H.-P.; Schlegelmilch, U.; Klöcking, R.: Assessment of membrane toxicity using [³H]arachidonic acid release in U937 cells. *Toxicol. in Vitro* **8**: 775-777 (1994)
- [135] Klöcking, R.; Schacke, M.; Wutzler, P.: Primärscreening antiherpetischer Verbindungen mit EZ4U. *Chemotherapie Journal* **4**, (3) 141-147 (1995)
- [136] Korting, H., C.; Herzinger, T.; Hartinger, A.; Kerscher, M.; Angerpointer, T.; Maibach, H., I.: Discrimination of the irritancy potential of surfactants in vitro by two cytotoxicity assays using normal human keratinocytes, HaCaT cells and 3T3 mouse fibroblasts: correlation with in vivo data from a soap chamber assay. *J. Dermatol. Sci.* **7**, 119-129 (1994)
- [137] Korting, H., C.; Schindler, S.; Hartinger, A.; Kerscher, M.; Angerpointer, T.; Maibach, H., I.: MTT-assay and neutral red release (NRR)-assay: Relative role in the prediction of the irritancy potential of surfactants. *Life Sci.* **55**, 533-540 (1994)
- [138] Kunkel, M.; Böhrer, J.; Keller, E.; Frahm, A.W.: Kapillarelektrophoretische Methoden zur Trennung von Cremophor EL. *Pharmazie* **52**, 109-121 (1997)
- [139] Künstler, K.: Alternative Methoden in der Industrie am Beispiel der Haut- und Schleimhautverträglichkeitsprüfung. In: *Stuttgart, New York: Tierschutz durch Alternativen* (Hrsg.: Schuppan/Hardegg) Gustav Fischer Verlag, 1988
- [140] Lansdown, A., B., G.; Grasso, P.: Physiko-chemical factors influencing epidermal damage by surface active agents. *Br. J. Dermatol.* **86**, 361-373 (1972)

- [141] Lawrence, J., N.; Benford, D., J.: Comparison of tumor promotor-induced prostaglandin E2 release in human and rat keratinocytes. *Carcinogenesis* **16**, (5), 1247-1251 (1995)
- [142] Lawrence, J., N.; Dally, J., J., P.; Benford, D., J.: Measurement of eicosamoid release in keratinocyte cultures to investigate skin irritation and tumor promoting activity. *Toxicol. in Vitro* **9**, (3), 285-290 (1995)
- [143] Lawrence, J., N.; Starkey, S.; Dickson, F., M.; Benford, D. J.: Use of human and rat keratinocyte cultures to assess skin irritation potential. *Toxicol. in Vitro* **10**, 331-340 (1996)
- [144] Lawrence, R., A.; Haggerty, R., J.: Household Agents and their potential toxicity. Modern treatment, New York **8** (3) 511-527 (1971)
- [145] Lee, C., H.; Maibach, H., I.: Study of cumulative irritant contact dermatitis in man utilizing open application on subclinically irritated skin. *Contact Dermatitis* **30**, 271-275 (1994)
- [146] Lee, J., K.; Kim, D., B.; Kim, J., I.; Kim, P., Y.: In vitro cytotoxicity tests on cultured human skin fibroblasts to predict skin irritation potential of surfactants. *Toxicol. in Vitro* **14** (4), 345-349 (2000)
- [147] Lehninger, A., L.: Biochemie. Weinheim: VCH Verlagsgesellschaft mbH, 2. Auflage (1987)
- [148] Leist, M.; Ganter, F.; Bohlinger, I.; Germann, P., G.; Tiegs, G.; Wendel, A.: Murine hepathocyte apoptosis induced in vitro and in vivo by TNF-alpha requires transcriptional arrest. *J. Immunol.* **153**, 1778-1786 (1994)
- [149] Leung, S., Y.; Jackson, J.; Miyake, H.; Burt, H.; Gleave, M., E.: Polymeric micellar paclitaxel phosphorylates Bcl-2 and induces apoptotic regression of androgen-independent LNCaP prostate tumors. *Prostate* **44** (2) 156-63 (2000)
- [150] Liebmann, J.; Cook, J., A.; Lipschultz, C.; Teague, D.; Fisher, J.; Mitchel, J., B.: The influence of Cremophor EL on the cell cycle effects of paclitaxel (Taxol) in human tumor cell lines. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **33**, 331-339 (1994)
- [151] Loebich, F.: Chemie und Eigenschaften von Emulgatoren. In: Externe Therapie von Hautkrankheiten. (Hrsg.: Hornstein/Nürnberg), Stuttgart, Thieme: S. 60-70, 1985
- [152] Lomax, E.: Making the best use of surfactant interaction, *Speciality Chemicals*, **13**, (4), 223-227 (1993)
- [153] Loo, D., C.; Rillema, J., R: Measurement of cell death. *Meth. Cell Biol.* **57**, 251-264 (1998)
- [154] Loprieno, N.; Boncristiani, G.; Bosco, E.; Nieri, M.; Loprieno, G.: The Galileo data bank on toxicity testing with in vitro alternative methods. II. Toxicology profiles of 20 chemicals. *ATLA* **22**, 82-114 (1994)
- [155] Machida, M.; Sano, K.; Arakawa, M.; Hayashi, M.; Awazu, S.: Effects of surfactants and proteinase inhibitors on nasal absorption of recombinant human granulocyte colony-stimulation factor (rhG-CSF) in rats. *Biol. Pharm. Bull.* **17** (10), 1375-1378 (1994)
- [156] Macian, M.; Seguer, J.; Infante, M., R.; Selve, C.; Vinardell, M., P.: Preliminary studies of the toxic effects of non-ionic surfactants derived from lysine. *Toxicology* **106**, 1-9 (1996)
- [157] Maurer, J., K.; Parker, R., D.; Carr, G., J.: Ocular irritation: Pathological changes occurring in the rat with surfactants of unknown irritancy. *Toxicol. Pathol.* **26**, 226-233 (1998)

- [158] Mel'nikow, S., M.; Yoshikawa, K.: First-order phase transition in large single duplex DNA induced by a nonionic surfactant. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 230, 514-517 (1997)
- [159] Millward, M., J.; Webster, L., K.; Rischin, D.; Stokes, K., H.; Toner, G., C.; Bishop, J., F.; Olver, I., N.; Linahan, B., M.; Linsenmeyer, M., E.; Woodcock, D., M.: Phase I trial of Cremophor EL with bolus doxorubicin. *Clin. Cancer Res.* 4, 2321-2329 (1998)
- [160] Mol, M., A., E.; Genderen, J.; Wolthuis, O., L.: Cultured human epidermal cells as a tool in skin toxicology *Food. Chem. Toxicol.* 24 6/7, 519-520 (1986)
- [161] Mosmann, T.: Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assay. *J. Immunol. Methods* 65, 55-63 (1983)
- [162] Müllbacher, A.; Parish, C., R.; Mundy, J., P.: An improved colorimetric assay for T cell cytotoxicity in vitro. *J. Immunol. Methods* 68, 205-215 (1984)
- [163] Müller, K.: Untersuchungen über Cremophor EL. *Tenside* 2, 37-45 (1966)
- [164] Müller-Decker, K.; Fürstenberger, G.; Marks, F.: Development of an in vitro alternative assay to the Draize skin irritancy test using human keratinocyte-derived proinflammatory key mediators and cell viability as test parameters. *In Vitro Toxicol.* 5, (4), 191-209 (1992)
- [165] Müller-Decker, K.; Fürstenberger, G.; Marks, F.: 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 (1994)
- [166] Müller-Decker, K.; Heinzelmann, T.; Fürstenberger, G.; Kecskes, A.; Lehmann, W.-D.; Marks, F.: Arachidonic acid metabolism in primary irritant dermatitis produced by patch testing of human skin with surfactants. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 153, 59-67 (1998)
- [167] Nangia, A.; Bloom, E.; Berner, B.; Maibach, H.: Human keratinocytes cell culture for studying skin irritation in man? *Int. J. Pharm.* 99, 67-72 (1993)
- [168] Ness, L.: The safety-in-use of cosmetics and toiletries. *Hum. Toxicol.* 7, 449-453 (1988)
- [169] Nivet, J., B.; Bernelin, R.; Le Blanc, M.; Riess, J., G.: Synthesis and bioacceptability of flourinated surfactants derived from F-alkylated tertiary amines. *Eur. J. Med. Chem.* 27, 891-898 (1992)
- [170] Nixon, G., A.; Tyson, C., A.; Wertz, W., C.: Interspecies comparisons of skin irritancy. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 31, 481-490 (1975)
- [171] Noll, M.: Apoptose: Mord und Selbstmord im menschlichen Organismus. *Pharm. Zeitung* 23, 11-17 (1997)
- [172] Nürnberg, E.; Surmann, P.(Hrsg.): *Hagers Handbuch der pharmazeutischen Praxis.* Berlin/Heidelberg/New York: Springer Verlag, 5. Aufl. S. 767, 1991
- [173] Nygren, P.; Csoka, K.; Jonsson, B.; Fridborg, H.; Bergh, J.; Hagberg, H.; Glimelius, B.; Brodin, O.; Tholander, B.; Kreuger, A.; Lönnerholm, G.; Jakobsson, A.; Olsen, L.; Kristensen, J.; Larsson, R.: The cytotoxic activity of Taxol in primary cultures of tumor cells from patients is partly mediated by Cremophor EL. *Br. J. Cancer* 71, 478-481 (1995)
- [174] Osborne, R.; Perkins, M., A.: An approach for development of alternative test methods based on mechanisms of skin irritation. *Food Chem. Toxicol.* 32, 133-142 (1994)

- [175] Pape, W., J.; Pfannenbecker, U; Hoppe, U.: Validation of the red blood cell test system as in vitro assay for the rapid screening of irritation potential of surfactants. *Mol. Toxicol.* 1, 525-536 (1987)
- [176] Patil, S.; Singh, P.; Sarasour, K.; Maibach, H.: Quantification of Sodium lauryl sulfate penetration into the skin and underlying tissues after topical application – pharmacological and toxicological implications. *J. Pharm. Sci.* 84, (10), 1240-1244 (1995)
- [177] Parnigotto, P.; Bassani, V.; Montesi, F.; Conconi, M., T.: Bovine corneal stroma and epithelium reconstructed in vitro: characterisation and response to surfactants. *Eye* 12, 304-310 (1998)
- [178] Parnigotto, P.; Bernuzzo, S.; Bruno, P.; Conconi, M., T.; Montesi, F.: Characterization and applications of human epidermis reconstructed in vitro on de-epidermized derma. *Il Farmaco* 53, 125-131 (1998)
- [179] Partearroyo, M., A.; Ostolaza, H.; Goni, F., M.; Barbera-Guillem, E.: Surfactant-induced cell toxicity and cell lysis. A study using B16 melanom cells. *Biochem. Pharmacol.* 40, (6), 1323-1328 (1990)
- [180] Pels, E.; Nuyts, R., M., M., A.; Breebaart, A., C.; Hartmann, C.: Rapid quantitative assays for corneal endothelial cell viability in vitro. *Cornea* 12 (4), 289-294 (1993)
- [181] Pemberton, M., A.; Rhodes, C.: Skin irritancy of commercially available alkyl ether sulphate surfactants: is there a difference between those with alkyl chains consisting of even or odd numbers of carbon atoms? *Toxicol. Lett.* 44, 85-90 (1988)
- [182] Pham, X., T.; Huff, J., W.: Cytotoxicity evaluation of multipurpose contact lens solutions using an in vitro test battery. *CLAO J.* 25 (1), 28-35 (1999)
- [183] Picarles, V.; Chibout, S.; Kolopp, M.; Medina, J.; Burtin, P.; Ebelin, M., E.; Osborne, S.; Mayer, F., K.; Spake, A.; Rosdy, M.; De Wever, B., E.; Ettl, R., A.; Cordier, A.: Predictivity of an in vitro model for acute and chronic skin irritation (SkinEthic) applied to the testing of topical vehicles. *Cell. Biol. Toxicol.* 15 (2), 121-35 (1999)
- [184] Piomelli, D.: Arachidonic acid in cell signaling. R. G. Landes Company (1988)
- [185] Prottey, C.; Ferguson, T.: Factors which determine the skin irritation potential of soaps and detergents. *J. Soc. Cosmet. Chem.* 26, 29-46 (1975)
- [186] Ramachandra, S.; Studzinski, G., P.: Morphological and biochemical criteria of apoptosis. In: *Cell Growth and Apoptosis a practical approach* (Ed.: G. P. Studzinski) Oxford, New York, Tokyo: IRL Press et Oxford University Press, 1995
- [187] Reinhart, T.; Bauer, K., H.: Untersuchungen zum Hämolyse- und Solubilisationsverhalten einiger nichtionischer polymerer Tenside. *Pharmazie* 50, 403-407 (1995)
- [188] Renzi, D.; Valtolina, M.; Forster, R.: The evaluation of a multi-endpoint cytotoxicity assay system. *ATLA* 21, 89-96 (1993)
- [189] Robaye, B.; Dumont, J., E.: Phospholipase A2 activity is not involved in the tumor necrosis factor-triggered apoptotic DNA fragmentation in bovine aortic endothelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 188, (3), 1312-1317 (1992)
- [190] Rockstroh, T.; Zapf, K.: Schädigung cytoplasmatischer Membranen durch Tenside. *Naturwissenschaften* 54, 568 (1967)

- [191] Rodrigues, C., M., P.; Fan, G.; Ma, X.; Kren, B., T.; Steer, C., J.: A novel role for ursodeoxycholsäure acid in inhibiting apoptosis by modulation mitochondrial membrane perturbation. *J. Clin. Invest.* 101, (12), 2790-2799 (1998)
- [192] Roehm, N., W.; Rodgers, G., H.; Hatfield, S., M.; Glasebrook, A., L.: An improved colorimetric assay for cell proliferation and viability utilizing the tetrazolium salt XTT. *J. Immunol. Methods* 142, 257 (1991)
- [193] Roguet, R.; Regnier, M.; Cohen, C.; Dossou, K., G.; Rogier, A.: The use of in vitro reconstituted human skin in dermatotoxicity testing. *Toxicol. in Vitro* 8, (4), 635-639 (1994)
- [194] Rougier, A.; Cottin, M.; de Silva, O.; Roguet, R.; Catroux, P.; Toufic, A.; Dossou, K.: In vitro methods: their relevance and complementarity in ocular safety assessment. *Lens and eye Toxicol. Res.* 9, 229-245 (1992)
- [195] Salcedo, T., W.; Fleit, H., B.: Detection of tumor necrosis factor induced nuclear damage with p-phenylenediamine. *J. Immunol. Methods* 148, 209-216 (1992)
- [196] Samali, A.; Cotter, T., G.: Heat shock proteins increase resistance to apoptosis. *Exp. Cell Res.* 223, 163-170 (1996)
- [197] Santa Maria, A.; Pozuelo, J., M.; Lopez, A.; Sanz, F.: Toxicity potential irritants in mammalian cells in vitro. *Ecotoxicol. Environmental Saf.* 34, 56-58 (1996)
- [198] Schwarz, L., R.: Cytotoxizität. In: *Toxikologie* (Hrsg.: Greim/Demel), Weinheim: VCH Verlagsgesellschaft mbH, S. 117-134, 1996
- [199] Scudiero, D., A.: 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 (1988)
- [200] Shukuwa, T.; Klingman, A., M.; Stoudemayer, T. J.: A new model for assessing the damaging effects of soaps and surfactants on human stratum corneum. *Acta Derm. Venereol.* 77, 29-34 (1997)
- [201] Sharma, A.; Straubinger, R., M.: Novel Taxol formulations: Preparation and characterisation of Taxol-containing liposomes. *Pharm. Res.* 11, (6), 889-896 (1994)
- [202] Singer, E., J.; Pittz, E., P.: Interaction of surfactants with epidermal tissues: Biochemical and toxicological aspects. In: *Surfactants in cosmetics* (Ed.: Rieger, M.M.) New Jersey, New York, Basel: Warner Lambert Company Morris Planes, 1997
- [203] Skaare, A.; Kjaerheim, V.; Barkvoll, P.; Rolla, G.: Skin reaction and irritation potential of four commercial toothpastes. *Acta Odontol. Scand.* 55 (1997)
- [204] Slater, L.; Sweet, P.; Wetzell, M.; Stupecky, M.; Osann, K.: Comparison of Cyclosporine A, Verampamil, PSC-833 and Cremophor EL as enhancing agents of VP-16 in murine lymphoid leukemias. *Leukemia Res.* 19, (8), 543-548 (1995)
- [205] Smeesters, C.; Giroux, L.; Vinet, B.; Arnoux, R.; Chaland, P.; Corman, J.; St-Louis, G.; Dalozé, P.: Efficacy of incorporating cyclosporine into liposomes to reduce its nephrotoxicity. *Can. J. Surg.* 31, (1), 34-36 (1988)
- [206] Sokol, P., P.; Capodagli, L., C.; Dixon, M.; Holohan, P., D.; Ross, C., R.; Coulson, R.; Jones, D., B.: Cyclosporin A and vehicle toxicity in primary cultures of rabbit renal proximal tubule cells. *Cell Physiol.* 28 C897-C903 (1990)

- [207] Spielmann, H.; Balls, M.; Döring, B.; Holzhütter, H., G.; Kalweit, S.; Klecak, G.; Eplattenier, H., L.; Liebsch, M.; Lovell, W., W.; Maurer, T.; Moldenhauer, F.; Moore, L.; Pape, W., J., W.; Pfanenbecker, U.; Potthast, J.; De Silva, O.; Steiling, W.; Willshaw, A.: EEC/Colipa project on in vitro phototoxicity testing: first results obtained with a balb/c 3T3 cell phototoxicity assay. *Toxicol. in vitro* 8, (4) 793-796 (1994)
- [208] Stach, R., W.; Garian, N.; Olender, E., J.: Biological activity of the β nerve growth factor: The effect of various added proteins. *J. Neurochem.* 33, 257-261 (1979)
- [209] Strupp, W.; Weidinger, G.; Scheller, C.; Ehret, R.; Ohnimus, H.; Girschick, H.; Tas, P.; Flory, E.; Heinkelein, M.; Jassoy, C.: Treatment of cells with detergent activates caspases and induces apoptotic cell death. *J. Membr. Biol.* 1, 175 (3) 181-9 (2000)
- [210] Sunstrom, C.; Nilson, K.: Establishment and characteristics of two unique cell lines from patients with lymphosarcoma. *Int. J. Cancer* 13, 808-823 (1974)
- [211] Swanston, D.; W.: Assessment of the validity of animal techniques in eye-irritation testing. *Food. Chem. Toxicol.* 23, 169-173 (1985)
- [212] Tada, H.; Shiho, O.; Kuroshima, K.; Koyama, M.; Tsukamoto, K.: An improved colorimetric assay for interleukin 2. *J. Immunol. Methods* 93, 157-165 (1986)
- [213] TEGEWA (Hrsg.): Die fleißigen Verbindungen. TEGEWA-Frankfurt, (1996)
- [214] Terzis, A.-J.; Thorsen, F.; Heese, O.; Visted, T.; Bjerkvig, R.; Dahl, O.; Arnold, H.; Gunderson, G.: Proliferation, migration and invasion of human glioma cells exposed to paclitaxel (Taxol) in vitro. *Br. J. Cancer*, 75 (12), 1744-1753 (1997)
- [215] Th. Goldschmidt AG: Sicherheitdatenblatt 91/155/EWG von TEGO-Betain® L7, TEGO-Betain® CKD und TEGO-Betain® E
- [216] Theis, J., G., W.; Liau-Chu, M.; Chan, H., S., L.; Doyle, J.; Greenberg, M., L.; Koren, G.: Anaphylactoid reactions in children receiving high-dose intravenous cyclosporine for reversal of tumor resistance: the caustive role of improver dissolution of Cremophor EL. *J Clin. Oncol.* 13 (10), 2508-2516 (1995)
- [217] Tiess, D.; Nagel, K.-H.: Beitrag zur Morphologie und Analytik der Invertseifenintoxikation. *Arch. Toxikol.* 22, 333-348 (1967)
- [218] Tripathi, B., J.; Tripathi, C.; Kolli, P.: Cytotoxicity of ophthalmic preservatives on human corneal epithelium. *Lens Eye Toxic. Res.* 9, 361-375 (1992)
- [219] Ts'ao, C.; Molteni, A.; Taylor, J., M.: Injury-spezifische cytotoxicity response of tumor cells and endothelial cells. *Pathol. Res. Pract.* 192, 1-9 (1996)
- [220] Tsujino, I.; Yamazaki, T.; Masutani, M.; Sawada, U.; Horie, T.: Effect of Tween-80 on cell killing by etoposide in human lung adenocarcinoma cells. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 43 (1), 29-34 (1999)
- [221] Ushima, H.; Kunisada, T.; Ami, Y.; Tsuchie, H.; Takahashi, J.; Klöcking, H.-P.; Müller, W., E., G.: Characterisation of human immunodeficiency virus -1- infected cells of myeloid-monocytic lineage (ML-1, HL-60, THP-1, U-937). *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* 5, 1001-1004 (1992)

- [222] Valentini, H.: Untersuchungen zur Bewertung potentieller Augenreizstoffe mit dem [³H]Arachidonsäurefreisetzungstest an U937-Zellen. Dissertation an der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät der Universität Jena, 1998
- [223] Van de Loosdrecht, A., A.; Ossenkoppele, G., J.; Beelen, R., H., J.; Broekhoven, M., G.; Dräger, A., M.; Langenhuijsen, M., M., A., C.: Apoptosis in tumor necrosis factor- α -dependent, monocyte-mediated leukemic cell death: A funktional, morphologic, and flow-cytometric analysis. *Exp. Hematol.* 21, 1628-1639 (1993)
- [224] Van de Sandt, J., J., M.; Rutten, A., A., J., J., L.: Differential effects of chemical irritants in rabbit and human skin organ cultures. *Toxicol. in Vitro*, 9, (2), 157-168 (1995)
- [225] Van England, M.; Nieland, L., J., W.; Ramaekers, F., C., S.; Schutte, B.; Reutlingsperger, C., P., M.: Annexin V-affinity assay: A review on an apoptosis detection system based on phosphatidylserine exposure. *Cytometry* 13, 1-9 (1998)
- [226] Van England, M.; Ramaekers, F., C., S.; Schutte, B.; Reutlingsperger, C., P., M.: A novel assay to measure loss of plasma membrane asymmetry during apoptosis of adherent cells in culture. *Cytometry* 24, 131-139 (1996)
- [227] Van Genderen, J.; Mol, M., A., E.; Wolthuis, L.: On the development of skin models for toxicity testing. *Fundam. Appl. Toxicol.* 5, 98-111 (1985)
- [228] Van Ruissen, F.; Le, M.; Carroll, J., M.; Van der Valk, P., G., M.; Schalkwijk, J.: Differential effects of detergents on keratinocyte gene expression. *J. Invest. Dermatol.* 110, 358-363 (1998)
- [229] Vaughan, J., S.; Porter, D., A.: A new in vitro method for assessing the potential toxicity of soft contact lens care solutions. *CLAO J.* 19 (1), 54-57 (1993)
- [230] Vaux, D.L.; Haeccker, G.; Strasser, A.: An evolutionary perspective on apoptosis. *Cell* 76, 777-779, (1994)
- [231] Vock, E., H.; Lutz, W., K.; Hormes, P.; Hoffmann, H.; D.; Vamvakas, S.: Discrimination between genotoxicity and cytotoxicity in the induction of DNA double-strand breaks in cells treated with etoposide, melphalan, cisplatin, potassium cyanide, Triton X-100, and γ -irradiation. *Mutat. Res.* 413, 83-94 (1998)
- [232] Vock, E., H.; Vamvakas, S.; Gahlmann, R.; Lutz, W., K.: Investigations of the induction of DNA double-strand breaks by Methylenediphenyl-4,4'-diisocyanate in cultured lung epithel cells. *Toxicol. Sci.* 46, 83-89 (1998)
- [233] Von den Driesch, P.; Fartasch, M.; Hüner, A.; Poniec.: Expression of integrin receptors and ICAM-1 on keratinocytes in vivo and in an in vitro reconstructed epidermis: effect of Sodium dodecylsulphate. *Arch. Dermatol. Res.* 287, 249-253 (1995)
- [234] Ward, R., K.; Agrawalla, S.; Clothier, R. H.; Investigation of an in vitro cytotoxicity assay for prediction of skin irritation. *Toxicol. in Vitro* 8, (4), 659-660 (1994)
- [235] Weislow, O.S.; Kiser, R.; Fine, D.L.; Bader, J.; Shoemaker, R.H.; Boyd, M.R.: New soluble-formazan assay for HIV-1 cytopathic effects: application to high-flux screening of synthetic and natural products for AIDS-antiviral activity. *J. Natl. Cancer Inst.* 81, 577-586 (1989)

- [236] Wilhelm, K.-P.; Freitag, G.; Wolff, H., H: Surfactant-induced skin irritation and skin repair: Evaluation of a cumulative human irritation model by noninvasive techniques. *J. Am. Acad. Dermatol.* **31** (6) 981-987 (1994)
- [237] Wilhelm, K.-P.; Samblebe, M.; Siegers, C.-P.: Quantitative in vitro assessment of N-alkyl sulphate-induced cytotoxicity in human keratinocytes (HaCaT). Comparison with in vivo human irritation tests. *Brit. J. Dermatol.* **130**, 18-23 (1994)
- [238] Winkelmeier, P.; Glauner, B.; Lindl, T.: Quantification of cytotoxicity by cell volume and cell proliferation. *ATLA* **21**, 269-280 (1993)
- [239] Wright, S., C.; Kumar, P.; Tam, A., W.; Shen, N.; Varma, M.; Larrick, J., W.: Apoptosis and DNA-fragmentation precede TNF-induced cytolysis in U937 Cells. *J. Cell. Biochem.* **48**, 344-355 (1992)
- [240] Woodcock, D., M.; Linsenmeyer, M., E.; Chojnowski, G.; Kriegler, A., B.; Nink, V.; Webster, L., K.; Sawyer, W., H.: Reversal of multidrug resistance by surfactants. *Br. J. Cancer*, **66**, 62-68 (1992)
- [241] Wu, Y.; Tewari, M.; Cui, S.; Rubin, R.: Activation of the insulin-like growth factor-I receptor inhibits tumor necrosis factor-induced cell death. *J. Cell. Physiol.* **168**, 499-509 (1996)
- [242] Wyllie, A., H.; Kerr, J., F., R.; Currie, A., R.: Cell death: the significans of apoptosis. *Int. Rev. Cytol.* **68**, 251-306 (1980)
- [243] Wyllie, A., H.: Apoptosis – Death gets a brake. *Nature* **369**, 272-273 (1994)
- [244] Yamashoji, S.: A cytotoxicity assay with Bindschedler's Green Leuco Base. *Anal. Biochem.* **240**, 310-312 (1996)
- [245] Yang, E., K.; Yoon, H., H.; Lee, D., H.; Park, J., K.: Assessment of toxic potential of industrial chemicals using a cultured human bioartificial skin model: production of interleukin 1 alpha and hydroxyeicosatetraenoic acids. *Skin Pharmacol. Appl. Skin Physiol.* **13** (5), 246-257 (2000)
- [246] Yang, W.; Acosta, D.: A digitized fluorescence imaging study of intracellular Ca²⁺, pH and mitochondrial function in primary cultures of rabbit corneal epithelial cells exposed to sodium dodecyl sulfate. *In Vitro Cell. Dev. Biol. – Animal* **31**, 499-507 (1995)
- [247] Yonehara, S.; Ishii, A.; Yonehara, M.: A cell-killing monoclonal antibody (Anti-Fas) to a cell surface antigen co-downregulated with the receptor of tumor necrosis factor. *J. Exp. Med.* **169** (5), 1747-1756 (1989)
- [248] Zamzami, N.; Marchetti, P.; Castedo, M.; Decaudin, D.; Macho, A.; Hirsch, T.; Susin, S., A.; Petit, P., X.; Mignotte, B.; Kroemer, G.: Sequential reduction of mitochondrial transmembrane potential and generation of reactive oxygen species in early programmed cell death. *J. Exp. Med.*, **182**, 367-377 (1995)
- [249] Zawadzka, E.; Stefanski, P.; Zgoda, M., M.: Some physico-chemical properties micelle – benzalkonium chloride (BAC) adduct on interface in selected eye drops. *Acta Pol. Pharm. – Drug Res.* **52**, (4), 275-279 (1995)

7. Literatur

- [250] Zhang, X.; Burt, H., M.; Von Hoff, D.; Dexter, D.; Mangold, G.; Degen, D.; Oktaba, A., M.; Hunter, W., L.: An investigation of the antitumor activity and biodistribution of polymeric micellar paclitaxel. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 40 (1), 81-86 (1997)
- [251] Zhang, X.; Jackson, J., K.; Burt, H., M.: Determination of surfactant critical micelle concentration by a novel fluorescence depolarization technique. *J. Biochem. Biophys. Methods* 31, 145-150 (1996)

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Besonders Herrn Prof. Dr. Dr. H.-P. Klöcking, Klinikum der Friedrich-Schiller-Universität Jena, Institut für Pharmakologie und Toxikologie/Bereich Erfurt, danke ich für die Überlassung des interessanten Themas und seine intensive Betreuung. Frau Prof. Dr. R. Klöcking, Institut für Antivirale Chemotherapie der Friedrich-Schiller-Universität Jena/Bereich Erfurt, gilt mein Dank vor allem für ihre hilfreiche Kritik und wissenschaftliche Beratung. Frau PD Dr. E. Krause, Institut für Pharmakologie und Toxikologie für Naturwissenschaftler der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, danke ich ebenfalls für die Betreuung der Arbeit. Frau C. Rothmann, Medizinisch-technische Assistentin im Institut für Antivirale Chemotherapie der FSU Jena, danke ich für viele praktische Hinweise vor allem bei der Einarbeitung in die Zellzucht.

Für viele gute Ratschläge und einen konstruktiven Erfahrungsaustausch möchte ich mich bei Frau Dr. H. Heinrich-Valentini, Frau S. Grabs und Frau S. Kühn, die im Institut für Pharmakologie und Toxikologie/Bereich Erfurt der FSU-Jena ihre Doktor- bzw. Diplomarbeit anfertigten, bedanken. Herrn A. Graichen danke ich in erster Linie für seine Unterstützung bei Problemen mit der elektronischen Datenverarbeitung.

Herrn Dr. M. Kunkel und Herrn T. Meyer vom Institut für Pharmazeutische Chemie der Universität Freiburg danke ich für gute Zusammenarbeit und die Bereitstellung der Cremophor EL-Fraktionen. Herrn D. Neidel, der im Institut für Pharmakologie und Toxikologie/Bereich Erfurt der FSU Jena seine Diplomarbeit anfertigte, gilt ebenfalls mein Dank für produktive Zusammenarbeit. Für ihre Hilfe bei meinen Literaturrecherchen danke ich Frau B. Thiele, Bibliothekarin in der Universitäts- und Landesbibliothek der FSU Jena, Außenstelle Erfurt.

Für Rückhalt im privaten Bereich sorgten bei Anfertigung der Arbeit vor allem meine Eltern und Familie Graichen. Dafür bedanke ich mich recht herzlich. Bei meinen ehemaligen Kollegen aus der Theater-Apotheke Erfurt Frau C. Retzsch, Frau A. Burghardt und Frau M. Franke sowie bei der Geschäftsführerin des Thüringer Bildungsvereins für Gesundheit und Soziales, Frau Dr. E. Miel, möchte ich mich ebenfalls für ihre Hilfsbereitschaft und Unterstützung bedanken.

Nützliche Tipps und fachliche Anregungen bekam ich außerdem von Frau I. Wagner (FSU Jena, Institut für Pharmakologie und Toxikologie, Frau Dr. H. Bunjes (FSU Jena, Lehrstuhl Pharmazeutische Technologie), Herrn R. Steinmetz (Institut für Pharmazeutische Chemie der Universität Frankfurt/Main) sowie Herrn Prof. Dr. M. Lehr (Inst. für Pharmazeutische Chemie der Universität Münster), wofür ich ebenfalls herzlichen Dank sagen möchte.

Die Arbeit wurde durch die Zentrale Erfassungs- und Beratungsstelle für Ersatz- und Ergänzungsmethoden, BgVV, Berlin, Direktor Prof. Dr. H. Spielmann, gefördert (ProjektNr. 1328/148).

Angaben zur Person

| | |
|--------------------------------|---|
| Name: | Antje Jelinek |
| geboren am: | 21.06.1971 |
| Geburtsort: | Arnstadt |
| Wohnort: | Ried 19 99310 Arnstadt |
| Familienstand: | ledig |
| Schulausbildung: | |
| 09.1978 bis 08.1988 | Besuch der Polytechnischen Oberschule in Arnstadt |
| 09.1980 bis 08.1990 | Erweiterter Russischunterricht |
| 09.1988 bis 08.1990 | Erwerb der allgemeinen Hochschulreife an der Erweiterten Oberschule in Arnstadt |
| Tätigkeit in Apotheken: | |
| 09.1990 bis 12.1990 | Vorpraktikum in der Waldapotheke in Gräfenroda |
| 01.1991 bis 06.1991 | Tätigkeit als Hilfskraft in der Nordapotheke in Weimar |
| Studium: | |
| 09.1991 bis 05.1996 | Studium der Pharmazie an der Ernst-Moritz-Arndt-Universität in Greifswald |
| 09.1993 | 1. Abschnitt der pharmazeutischen Prüfung bestanden |
| 1.-31.12. 1993 | Tätigkeit als studentische Hilfskraft am Institut für Pharmazeutische Biologie der Ernst-Moritz-Arndt-Universität in Greifswald |
| 10.1995 | 2. Abschnitt der pharmazeutischen Prüfung bestanden |
| 10.1995 bis 05.1996 | Tätigkeit am Klinikum der Friedrich-Schiller-Universität Institut für Pharmakologie und Toxikologie / Bereich Erfurt Pharmazeutische Pharmakologie und Toxikologie (Anfertigung einer Diplomarbeit) |
| 22.05.1996 | erfolgreiche Verteidigung der Diplomarbeit in Greifswald |

| | |
|-----------------|--|
| 05. bis 10.1996 | Tätigkeit als Pharmaziepraktikantin in der Marien-Apotheke in Arnstadt |
| 14.11.1996 | 3. Abschnitt der pharmazeutischen Prüfung bestanden |
| 15.11.1996 | Approbation als Apothekerin |

Tätigkeiten als Apothekerin und Diplompharmazeutin:

| | |
|---------------------------|---|
| 18.11.1996 bis 30.09.2000 | Tätigkeit als Offizin-Apothekerin in der Theater-Apotheke Erfurt (20 Std. pro Woche) |
| 12.1996 bis 04.2001 | Tätigkeit am Klinikum der Friedrich-Schiller-Universität Institut für Pharmakologie und Toxikologie / Bereich Erfurt Pharmazeutische Pharmakologie und Toxikologie (Anfertigung der vorliegenden Dissertation) |
| 02.1997 bis 12.1998 | befristete Tätigkeit als wissenschaftliche Hilfskraft am oben genannten Institut; Tätigkeit umfaßte sowohl Forschung als auch Lehre |
| 01.1998 bis 30.09.2000 | freie Mitarbeiterin an der Privaten Höheren Berufsfachschule für PTA des im Thüringer Bildungsverein für Gesundheit und Soziales – Unterricht in Botanik und Drogenkunde, Arzneimittelkunde sowie Gesetzeskunde |
| 05.1999 bis 06.2000 | freie Mitarbeit für die Knoll Deutschland GmbH als Referentin bei Fortbildungsveranstaltungen zum Thema "Ernährungsberatung bei Übergewicht" |
| seit 1.10.2000 | Lehrerin an der Privaten Höheren Berufsfachschule für PTA des Thüringer Bildungsvereins für Gesundheit und Soziales Unterricht in Botanik und Drogenkunde, Gesetzeskunde, Arzneimittelkunde sowie Galenik |

Arnstadt, den 05.05.01

Erklärung

Die hier vorliegende Dissertation wurde von mir selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst. Andere als die von mir angegebene Quellen und Hilfsmittel wurden nicht benutzt. Wörtlich oder inhaltlich anderen Werken entnommene Stellen sind als solche kenntlich gemacht worden und im Literaturverzeichnis aufgeführt.

Arnstadt, den 05.05.01

Erklärung

Die hier vorliegende Dissertation wurde seit 15.04.99 von Frau PD Dr. rer. nat. E. Krause, Institut für Pharmakologie und Toxikologie für Naturwissenschaftler der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, als Mitglied der Mathematisch-Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg betreut.

Arnstadt, den 05.05.01

Erklärung

Ein Antrag auf Zulassung zur Promotion wurde von mir bisher weder an dieser noch an einer anderen Universität oder Hochschule gestellt. Ich habe mich noch nie vorher um einen Doktorgrad beworben.

Arnstadt, den 05.05.01