

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	5
1.1	Der Glaskörper	5
1.1.1	Anatomie und Gestalt	5
1.1.2	Funktion	8
1.1.3	Indikationen zur Vitrektomie	9
1.1.4	Vitrektomie und seine Tamponaden (Glaskörperersatz)	10
1.2	Hyaluronsäure	11
1.2.1	Chemische Struktur und Eigenschaften	12
1.2.2	Hyaluronsäure im Gewebe und in der Zelle	14
1.2.3	Hyaluronsäure und das Auge	15
1.3	Der ideale Glaskörperersatz	16
1.4	Ziel der Arbeit	18
2	Material und Methoden	19
2.1	Material	19
2.1.1	Reagenzien und Verbrauchsmaterialien	19
2.1.2	Geräte	21
2.1.3	Nährmedien	22
2.1.3.1	ARPE19-Zellmedium	22
2.1.4	Lösungen	22
2.1.4.1	Lösungen nicht vernetzter Hyaluronsäure (HA) in H ₂ O bzw. ARPE19-Zellen-Medium	22
2.1.4.2	MTT-Test-Lösung Nr. 1	22
2.1.4.3	MTT-Test-Lösung Nr. 2	23
2.1.4.4	Herstellung der Pufferlösung PBS (Ca ²⁺ , Mg ²⁺ free) zur Dialyse	23
2.1.4.5	Viability/ Cytotoxicity Kit-Lösung für den Life/ Dead-Test	23
2.1.4.6	Carbazol-Lösung A	23
2.1.4.7	Carbazol-Lösung B	24

2.2	Methoden	24
2.2.1	Kultivierung von ARPE19-Zellen	24
2.2.2	MTT-Test	25
2.2.3	Toxizitätstest	26
2.2.4	Life/Dead-Test	27
2.2.5	BrdU-Test	28
2.2.6	Adhäsionstestung/ DAPI-Färbung mit nicht vernetzter Hyaluronsäure	29
2.2.7	AlamarBlue®Assay	30
2.2.8	Indirekte CD44-Antikörpertestung	31
2.2.9	Quervernetzung von Hyaluronsäure mittels Dihydraziden	33
2.2.10	Quervernetzung von Hyaluronsäure mittels UV-Strahlung und N-vinyl-pyrrolidinone	34
2.2.11	Quantifizierung von Hyaluronsäure mittels Carbazol	35
2.2.12	HE-Färbung von ARPE19-Zellen	36
3	Ergebnisse	38
3.1	Eigenschaften nicht vernetzter Hyaluronsäure	38
3.1.1	Toxizitäts-Test mit nicht vernetzter Hyaluronsäure	38
3.1.2	Life/Dead/Dapi-Fluoreszenzfärbung	39
3.1.3	BrdU-Test mit nicht vernetzter Hyaluronsäure	41
3.1.4	MTT-Test mit nicht vernetzter Hyaluronsäure	44
3.1.5	AlamarBlue®Assay mit nicht vernetzter Hyaluronsäure	46
3.1.6	Analyse des Adhäsionsverhaltens von ARPE19-Zellen in Gegenwart nicht vernetzter Hyaluronsäure	51
3.1.7	Expression des CD44-Rezeptor auf ARPE19-Zellen und unter Inkubation mit 1 %iger Hyaluronsäure	54
3.2	Quervernetzte Hyaluronsäure	55
3.2.1	Quervernetzung von Hyaluronsäure mittels Dihydraziden	56
3.2.1.1	Beurteilung der Gele hinsichtlich Formstabilität und Elastizität	60
3.2.1.2	Prüfung der pH-Stabilität und Verlauf des Hyaluronsäureabbaus der Gele	61

3.2.1.3	MTT-Test mit den PBS-Hyaluronsäureproben aus dem Hyaluronsäureabbau	66
3.2.1.4	Wirkung quervernetzter Hyaluronsäure auf ARPE19-Zellen	67
3.2.1.4.1	ARPE19-Zellen unter Inkubation mit quervernetzter Hyaluronsäure und anschließender HE-Färbung	68
3.2.1.4.2	Life/ Dead/ Dapi-Fluoreszenzfärbung	69
3.2.1.4.3	MTT-Test mit quervernetzter Hyaluronsäure	72
3.2.1.4.4	AlamarBlue® Assay mit quervernetzter Hyaluronsäure	74
3.2.2	Quervernetzung von Hyaluronsäure mittels UV-Strahlung und N-vinyl-pyrrolidinon	75
3.2.2.1	Herstellung des Hyaluronsäuregels	75
3.2.2.2	Abbau des quervernetzten Hyaluronsäuregeles	76
3.2.2.3	Wirkung quervernetzter Hyaluronsäure in vitro auf ARPE19-Zellen	77
3.2.2.3.1	Life/ Dead-Fluoreszenzfärbung	78
3.2.2.3.2	MTT-Test mit dem Photoinitiator Irgacure	80
3.2.2.3.3	MTT-Test mit quervernetzter HA mittels UV-Strahlung	81
3.2.2.3.475	AlamarBlue® Assay mit quervernetzter HA mittels UV-Strahlung	82
4	Diskussion	85
4.1	Diskussion der Ergebnisse der Versuche mit nicht vernetzter Hyaluronsäure	84
4.2	Diskussion der Ergebnisse der quervernetzten Hyaluronsäuregele mittels Dihydraziden und mittels UV-Strahlung und n-Vinyl pyrrolidinon	89
5	Zusammenfassung	95

Abkürzungsverzeichnis

µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
ADH	Adipinsäuredihydrazid 98%
ARPE-19-Zellen	Adulte retinale Pigmentepithel-19-Zellen
BrdU	Bromodeoxyuridine
BSA	Bovine serum albumin
CD44	Cluster of Differentiation 44
DAPI	4´6´-diamidino-2-phenylindole
D-MEM	Dulbecco`s Modified Eagle`s Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
GM	Glycidylmethacrylaten
GMHA-Konjugate	Glycidylmethacrylaten-Hyaluronsäure-Konjugate
EDCI	N´(3-Dimethylaminopropyl)-N´-ethylcarbodiimid Hydrochlorid
EthD-1	Ehtidium homodimer-1
FACS-Analyse	Fluorescence activated cell sorter-Analyse oder fluoreszenzaktivierte Zellanalyse
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
HA	Hyaluronsäure
HE-Färbung	Hämatoxylin-Eosin-Färbung
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium Bromid
NADPH	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
OD	Optische Dichte
PBS	Phosphate buffered saline
PBST	Phosphate buffered saline – TritonX-100
PFA	Paraformaldehyd
SDS	Sodium dodecyl sulphate
TBS	Tris buffered saline
UV	Ultraviolett

1 Einleitung

1.1 Der Glaskörper

1.1.1 Anatomie und Gestalt

Der Glaskörperraum nimmt ca. 2/3 des Gesamtvolumens des menschlichen Auges ein. Er wiegt mit einem Volumen um die 4 ml ungefähr 4 g, hat einen Refraktionsindex von 1,336 und eine Dichte von $1,0053 \text{ g/cm}^3$. Bei einer Wellenlänge zwischen 300 und 1400 nm beträgt die Lichtdurchlässigkeit etwa 90%.

Der pH-Wert im Glaskörper liegt in vitro ungefähr bei 7,5. Man geht allerdings in vivo von einem etwas niedrigeren pH-Wert von ca. 7,3 aus, da nach Isolation des Glaskörpers der pH-Wert infolge von CO_2 -Verlust ansteigt [Hockwin O, 1989].

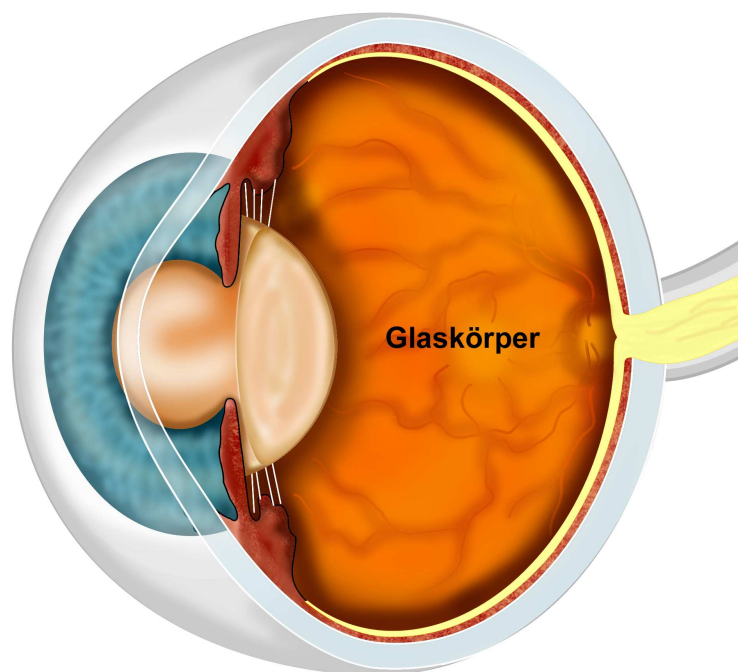


Abb. 1: Schematische Darstellung des Glaskörpers [Hofer R. UKT Augenklinik]

Aufgrund seiner Entwicklung lässt sich der Glaskörper in drei Zonen unterteilen. Membranellen (Tractus vitreales), die im vorderen Glaskörper gebildet werden und den primären vaskulären Glaskörper ersetzen, breiten sich im Laufe der Entwicklung zum hinteren Pol aus und unterteilen den Glaskörper in die präretinale Zone, die intermediäre Zone und die retrolentale Zone [Eisner G, 1975]. Bis heute steht nicht fest, ob für die Entwicklung des Glaskörpers Faktoren der aus dem Mesoderm entstehenden Glaskörpergefäße oder retinaler Elemente eine Rolle spielen.

Der Glaskörper haftet dabei an drei Stellen seiner Umgebung an. Im vorderen Bereich am Ligamentum hyaloideo-capsulare an der hinteren Linsenkapsel (Wiegersches Ligament) und im Bereich der Ora serrata. Die dritte Verbindung findet sich am peripapillär liegenden Martegiani-Ring [Lang GK, 2004]. Die Verbindungstelle an der Ora serrata ist dabei die innigste und bildet die Glaskörperbasis [Hockwin O, 1989].

Eine Besonderheit stellen die Rindenlücken des Glaskörpers dar. An den Stellen, an welchen die Netzhaut durch z.B. Papille, Fovea oder Gefäße unterbrochen wird, findet sich am Glaskörper als gegenüberliegendes Korrelat eine Lücke. Durch entzündliche Narben oder degenerative Läsionen an der Retina können ebenfalls sekundären Lücken entstehen [Eisner G, 1975]. Die Glaskörperrinde wird aus einer ca. 100-200 µm dicken Schicht von dicht aneinander gelagerten Kollagenfibrillen (früher als Hyaloidmembran bezeichnet) gebildet. Darüber folgt eine Basalmembran (Membrana limitans interna), die von den Müller-Zellen als Grenzschicht zwischen Retina und Glaskörper gebildet wird. Der Glaskörper selbst besitzt einzig im Bereich der Rindenzone (Glaskörperkortex), bevorzugt entlang retinaler Gefäße und im Pars-plana-Bereich eigene Zellen. Man vermutet als Vorläufer Fibroblasten oder hämatogene Makrophagen [Hockwin O, 1989].

Aus biochemischer Sicht ist der Glaskörper ein faserverstärktes Hydrogel, dessen strukturelle Integrität auf einem Kollagen Typ II Maschengitter basiert, in das polyanionische Hyaluronsäure eingebunden ist. Die polyanionische Hyaluronsäure selbst hat eine überragende Wasserbindungseigenschaft von 1:1000 und behält auch noch im Glaskörpergitter eingebunden eine

Wasserbindungseigenschaft im Verhältnis 1:10 zugunsten der Hyaluronsäure, so dass dadurch im Glaskörper ein entsprechender Quelldruck entsteht. Grob umrissen besteht er zu 98% aus Wasser und zu 2% aus den Makromolekülen Kollagen und Hyaluronsäure.

Die Hyaluronsäuremoleküle füllen das dreidimensionale kollagene Fasergerüst des Glaskörpers aus und stabilisieren es mechanisch durch ihr hohes negatives elektrostatisches Potential [Lang GK, 2004]. Jedoch ist das Verhältnis von Hyaluronsäuremolekülen zu den Kollagenfasern ungleichmäßig verteilt. Im hinteren Teil des Glaskörpers finden sich mehr Hyaluronsäuremoleküle als im vorderen Teil [Soman N., Banerjee R., 2003]. Zudem ändert sich im Verlauf des menschlichen Lebens das Verhältnis von Kollagen zu Hyaluronsäure. Im Gegensatz zu den Kollagenmolekülen nimmt die Konzentration der Hyaluronsäuremoleküle nach der Geburt bis in das hohe Alter stetig zu [Österlin S., 1975]. Eine Studie von Denlinger beschreibt einen kontinuierlichen Anstieg der Hyaluronsäurekonzentration von 55 µg/ ml (< 4 Jahre) über 110 µg/ ml (4-10 Jahre) auf 155 µg/ ml (20-70 Jahre) [Denlinger JL, Eisner G, Balazs EA, 1980].

Der Alterungsprozess des menschlichen Glaskörpers ist biomikroskopisch und histologisch gut dokumentiert [Eisner G, 1975]. Die biochemischen Veränderungen des Glaskörpers sind bis zum Erwachsenenalter nicht beendet, sondern setzen sich ständig fort [Balazs EA, Laurent TC, Laurent UB, Deroche MH, Bunney DM, 1959]. Die partielle Verflüssigung des Glaskörpers (Synchisis senilis) setzt schon beim Jugendlichen an Stellen mit höheren Hyaluronsäurekonzentrationen ein und nimmt im Laufe des Lebens unter Bildung von Flüssigkeitskavernen stetig zu. Der verflüssigte Glaskörper macht insbesondere die rotatorischen Bewegungen des Augapfels mit, was zu einem Zusammenfließen der zunächst getrennten einzelnen Lakunen führt. Außerdem bilden sich im Laufe des Lebens Kollagenstränge, welche von anterior nach posterior verlaufen und sich zu immer dicker werdenden Bündeln zusammenschließen bis der ganze Glaskörper durchzogen ist. Die zunehmende Strangbildung und Verflüssigung des Glaskörpers führt zu einer stetigen Schrumpfung des Glaskörpers [Sebag J, 1987]. Letztendlich kann es

meist ab dem 50. Lebensjahr – bzw. früher bei Myopen – zu einer hinteren Glaskörperabhebung kommen, deren Häufigkeit dann rasch zunimmt, so dass 2/3 aller 70-80 Jährigen betroffen sind. Eine weitere Alterserscheinung stellt die symptomlose, in 75 % der Fälle unilaterale asteroide Hyalose oder Scintillatio nivea dar, die bei 0,5 % der eine Augenklinik aufsuchenden Patienten mit einem Durchschnittsalter von 64 Jahren festgestellt wurde. Es handelt sich um glänzend weiße, diffus oder gehäuft im Glaskörper verteilte, bis zu 0,1 mm große rundliche Partikel, in denen Calcium, Phospholipide und Schwefel nachgewiesen wurden [Hockwin O, 1989, Foos RY et al 1982].

1.1.2 Funktion des Glaskörpers

Der Glaskörper ist vor allem während der Wachstumsphase des Auges als Form gebende Substanz unerlässlich.

Eine strukturunabhängige Eigenschaft ist die Rolle des Glaskörpers als extrazelluläres Medium für seine Nachbarorgane, wie z.B. die Netzhaut. Mittels Diffusion kann die Extrazellulärflüssigkeit der Retina frei mit der Glaskörperflüssigkeit kommunizieren. Der Glaskörper sorgt so für die Homöostase des retinalen Milieus, indem er Abfallstoffe wie Laktat aufnimmt und Metabolite wie Phosphat, Aminosäuren und Glukose bereitstellt, was besonders bei temporärer Ischämie von Bedeutung sein kann. Das Molekulargewicht spielt beim Übergang der Plasmaproteine aus dem Blut in den Glaskörper eine wichtige Rolle, da sie je nach Molekulargewicht durch die Blut-Retina-Schranke durchgelassen werden. Bei den niedermolekularen Stoffen ist deren Lipidlöslichkeit entscheidend [Hockwin O, 1989].

Hier übernimmt die im Glaskörper enthaltene Hyaluronsäure eine wichtige Funktion. Es wurde gezeigt, dass die Hyaluronsäuremoleküle den Transport, die Diffusionsrate und die Verteilung von anderen löslichen Stoffen im Glaskörper beeinflussen und auf diese Weise auch für den niedrigen Proteingehalt im Glaskörper verantwortlich sind [Swann DA, Constable IJ, 1972]. Der wichtigste Abflussweg für Albumin, Hyaluronsäure und Saccharose

aus dem Glaskörper ist der Abfluss in die Vorderkammer. Der Abfluss der Hyaluronsäure ist dabei von ihrem Molekulargewicht abhängig [Laurent UB, Fraser JR, 1983].

Für die andauernde optische Transparenz sorgen die Hyalozyten und hydrolytischen Enzyme des Glaskörpers, die kleine Trübungen, zum Teil mit Hilfe zusätzlich einwandernden Makrophagen, beseitigen. Nach Einblutung in den Glaskörper führen die Interaktion von Thrombozyten und Kollagen, sowie die Ausfällung von Fibrin zur Bildung von Membranen. Der glaskörpereigene Plasminogenaktivator leitet die Fibrinolyse ein. Die Spaltprodukte können genauso wie das Hämoglobin der lysierten Erythrozyten weiter abgebaut und/oder phagozytiert bzw. ausgeschieden werden. Das freigesetzte Eisen katalysiert die Entstehung von für Glaskörper und Netzhaut toxischen freien Radikalen und H_2O_2 , die jedoch von Superoxiddismutase und Katalase abgefangen werden können.

Zur Verhinderung einer Einsprossung von Gefäßen besitzt der Glaskörper einen anti-angiogenen Faktor, der möglicherweise auch die Regression des hyaloidalen Gefäßsystems einleitet und als Antagonist zu einem die Vaskularisation fördernden Agens der ischämischen Netzhaut wirkt [Hockwin O, 1989, Zhu M 1997].

1.1.3 Indikationen zur Vitrektomie

Zu einer Beeinträchtigung oder Verletzung des Glaskörpers kann es spontan, durch traumatische Einwirkungen, Netzhautablösungen, Erkrankungen mit retinalen oder choroidalen Neovaskularisationen, Degenerationen, Infektionen oder durch Tumoren kommen. Dies kann zu einer Eintrübung des Glaskörpers, Glaskörpereinblutungen (wie z.B. bei der diabetischen Retinopathie) - einer Zerstörung oder einer Abhebung des Glaskörpers führen, so dass als therapeutische Möglichkeit eine Vitrektomie durchgeführt wird [Soman N., Banerjee R., 2003]. Die häufigsten Gründe die jedoch zu einer Vitrektomie führen, sind operative Eingriffe an der Netzhaut wie z. B. ein Makulaforamen

oder eine epiretinale Gliose, für die eine Entfernung des Glaskörpers notwendig ist, um einen Zugang zu ermöglichen. Eine besonders schwerwiegende vitreoretinale Erkrankung stellt hierbei die proliferative Vitreoretinopathie (PVR) dar. Als PVR bezeichnet man Kontraktionen der Netzhautoberfläche, die durch vorangegangene Netzhautablösung entstehen. Durch Netzhautdefekte erhalten Zellen des retinalen Pigmentepithels Zugang zum Glaskörperraum. Die Pigmentepithelzellen wandern an der Netzhautoberfläche entlang und nehmen dabei myofibroblastoide Eigenschaften an und führen dadurch zur Ausbildung von sub- und epiretinalen Membranen und so zur Kontraktion der Netzhautoberfläche [Lang GK, 2004]. Bei dieser Erkrankung ist nach der Vitrektomie eine langwirkende Tamponade mit hoher Oberflächenspannung und Auftriebsvektor erwünscht, um ein Rezidiv zu vermeiden.

1.1.4 Vitrektomie und seine Tamponaden (Glaskörperersatz)

Das Prinzip der pars plana Vitrektomie wurde erstmals 1971 durch Machemer entwickelt. Hierbei handelt es sich um ein mikrochirurgisches Verfahren bei welchem mittels einer Schneid-/Saugtechnik der Glaskörper schrittweise zerkleinert und entfernt wird [Machemer R et al 1971,1972].

Die Entscheidung welche Tamponade nach Entfernung des Glaskörpers sinnvoll ist, richtet sich nach der Indikation für die Vitrektomie (s. Kap. 1.1.3). Prinzipiell muss der Glaskörper nicht durch eine Tamponade ersetzt werden, sondern es besteht die Möglichkeit eine reine Kochsalzlösung im Glaskörperraum zu belassen, welche in kurzer Zeit durch Kammerwasser ersetzt wird. In bestimmten Fällen ist jedoch eine Tamponade sinnvoll und notwendig um ein Rezidiv der Erkrankung zu vermeiden. Je schwieriger die Ausgangssituation wie z.B. bei der oben erwähnten PVR, desto länger und stabiler muss eine Tamponade sein. Anfang des 20. Jahrhunderts versuchte erstmals Olm eine Tamponadewirkung nach einer Netzhautablösung zu erreichen, indem er Luft in den Glaskörperraum injizierte [Olm et al 1911]. Heutzutage werden in der klinischen Anwendung neben Luft auch andere Gase

wie Schwefelhexafluorid (SF₆) oder Hexafluoropropylene (C₃F₆) als kurzzeitige Tamponaden eingesetzt. Der Nachteil dieser Gastamponaden besteht in der ungleichmäßigen Verteilung im Glaskörperraum, so dass der Patient eine bestimmte Kopfhaltung bzw. Position einnehmen muss, um eine Tamponadewirkung zu erreichen [Foster 2008]. Als langfristige Tamponade mit einer relativ hohen Oberflächenspannung werden bisher nur Silikonöle eingesetzt. Die Problematik bei Silikonöl besteht darin, dass es nach einem gewissen Zeitraum entfernt werden muss, da es im Verlauf zu einem Sekundärglaukom oder Hornhautdekomensation führen kann. Außerdem wird eine Retinotoxizität bei längerer Anwendung beschrieben [McCuen et al 1985, Ni C et al. 1986, Kirchhof B et al 1986]. Eine andere schwere Tamponade stellen fluorierte Alkane dar, die jedoch nur intraoperativ zum Einsatz kommen und sich nicht als Langzeittamponade durchsetzen konnten, da sie schwerer als Wasser sind und so einen freien Raum in dem oberen Teil des Glaskörpers lassen. Dort kann es dann zur wiederholten Netzhautablösung oder Reproliferationen kommen [Foster 2008].

Ein anderer langfristiger oder permanenter Glaskörperersatz konnte noch nicht gefunden werden. Die derzeit bei einer Vitrektomie am häufigsten eingesetzten Tamponaden sind die oben beschriebenen Silikonöle und Gase [Soman N., Banerjee R., 2003; Constable 1987].

1.2 Hyaluronsäure

Da Hyaluronsäure ein Teil des Grundgerüsts des natürlichen Glaskörpers ist, erscheint es sinnvoll Hyaluronsäure als Ausgangsprodukt für eine neue langfristige Tamponade auf Hydrogelbasis zu verwenden.

Hyaluronsäure (*hyaluronan*, HS) ist ein hochmolekulares Polysaccharid, welches 1923 von Meyer und Palmer im Glaskörper entdeckt wurde. Doch wird dieses Polysaccharid meist als „*hyaluronan*“ bezeichnet, da es nicht in der freien Säureform, sondern in der Polyanionform vorliegt. Der Ausdruck

Hyaluronsäure wird eher im pharmazeutischen Sprachgebrauch verwendet [Kakehi K, Kinoshita M, Yasueda S, 2003].

1.2.1 Chemische Struktur und Eigenschaften

Die Grundeinheit der Hyaluronsäure bildet ein Disaccharid (Glukosaminoglykan) aus D-Glukuronsäure und einem D-N-Acetylaminosamin. Diese sind alternierend über eine beta-1,4 und beta-1,3 Glykosidierung verbunden.

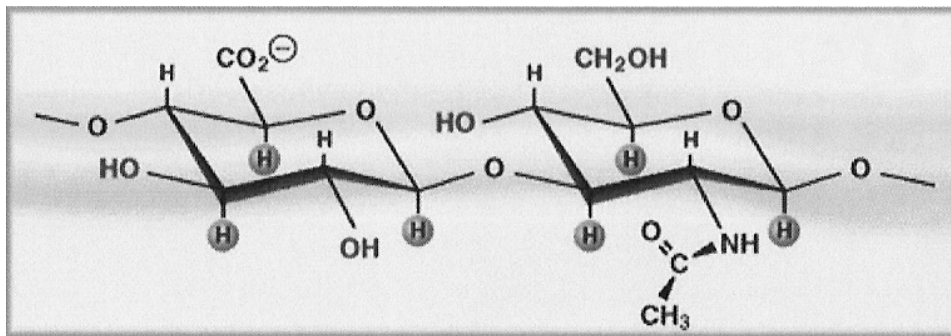


Abb.2: *Struktureller Aufbau von Hyaluronsäure. aus: Hascall V. and Laurent T.; Hyaluronan: Structure and Physical Properties; Science of Hyaluronan Today, Dec. 15, 1997*

Diese Disaccharide sind energetisch sehr stabil, da alle Nebengruppen (bulky groups) in der Äquatorialebene und die Wasserstoffatome in der Axialebene liegen. Hyaluronsäureenzyme (Hyaluronsäuresynthetasen) können große, lineare Hyaluronsäureketten herstellen, indem sie das Disaccharid wiederholt aneinanderbinden. Die Kettenlänge kann mehr als 10.000 Dimere umfassen und erreicht eine Molekularmasse von ca. 4 Mio. Daltons. (Jedes Disaccharid hat ungefähr eine Molekularmasse von ca. 400 Daltons). Eine Hyaluronsäurekette von 10.000 Wiederholungen hat gestreckt eine ungefähre Länge von 10 µm.

Die Eigenschaften der Hyaluronsäure in physiologischen Lösungen werden durch diese chemische Struktur, die inneren Wasserstoffbrücken und die Interaktionen mit der Lösung bestimmt. Das Hyaluronsäuremolekül ist amphiphil. Die axial liegenden Wasserstoffatome bilden eine nicht polare, relativ hydrophobe Seite, während die äquatorial liegenden Ketten eine polare, hydrophile Seite zeigen. So bilden die Hyaluronsäuremoleküle in physiologischen Lösungen eine willkürliche Spiralstruktur, die viel Platz einnimmt.

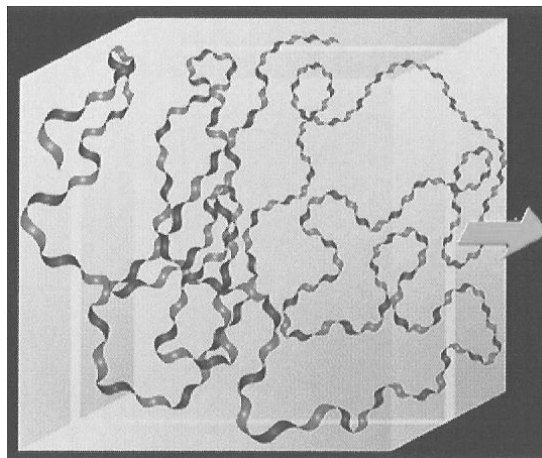


Abb.3: 3-D Struktur von Hyaluronan. aus: Hascall V. and Laurent T.; *Hyaluronan: Structure and Physical Properties; Science of Hyaluronan Today*, Dec. 15, 1997

Diese Kettenstruktur der Hyaluronsäure hat interessante und wichtige Eigenschaften. Kleine Moleküle wie Wasser, Elektrolyte und Nährstoffe können frei durch ihre Strukturen diffundieren. Große Moleküle, wie Proteine, hingegen werden aufgrund ihrer hydrodynamischen Größe ausgeschlossen. Die Hyaluronsäureketten bewegen sich jedoch in Lösungen fortwährend, so dass die „Porengrößen“ sich in ihrem Netzwerk ständig ändern. Das bedeutet wiederum, dass prinzipiell auch große Moleküle ein Hyaluronsäurenetzwerk passieren können.

Die Ausbildung von Hyaluronsäureketten und die möglichen Interaktionen über ihre Seitenketten mit anderen Makromolekülen, z.B. in der extrazellulären Matrix, erklären die viskoelastischen Eigenschaften der Hyaluronsäure.

Der pK-Wert der Carboxylgruppen der Glukuronsäure beträgt 3-4. Bei pH 7 sind beinahe alle diese Gruppen ionisiert und das Hyaluronsäuremolekül ist ein Polyanion mit hoher Wasserbindungseigenschaft [Hascal VC, Laurent TC, 1997].

1.2.2 Hyaluronsäure im Gewebe und in der Zelle

Hyaluronsäure findet sich in allen Wirbeltieren wieder. Sie ist eine wichtige Komponente der extrazellulären Matrix, vor allem im Glaskörper des Auges, der Synovialflüssigkeit, in der Entwicklung der Oocyte bis zur Ovulation, aber auch in der pathologischen Matrix bei der Entwicklung von arteriellen Restenosen. Weiter spielt Hyaluronsäure eine wichtige Rolle bei der Strukturhaltung, z.B. findet man Hyaluronsäure zu ca. 1mg/g im hyalinen Knorpel. Die größten Mengen an Hyaluronsäure findet man jedoch in der Haut, vor allem in der Dermis und Epidermis (7-8 g pro Erwachsener, ca. 50% der gesamten Hyaluronsäure im Körper) [Hascal VC, Laurent TC, 1997].

Die Hyaluronsäure wird an den Plasmamembranen synthetisiert und ist nicht assoziiert mit Kernproteinen. Außerhalb der Zelle kann Hyaluronsäure mit hyaluronsäurebindenden Proteinen Komplexe formen [Kakehi K, Kinoshita M, Yasueda S, 2003].

Der Metabolismus der Hyaluronsäure ist sehr dynamisch. Einige Zellen, wie die Chondrozyten, synthetisieren und katabolisieren Hyaluronsäure ihr Leben lang, so dass immer eine konstante Konzentration an Hyaluronsäure vorhanden ist. Die Halbwertszeit eines Hyaluronsäuremoleküls im Knorpel beträgt 2 bis 3 Wochen. Auch die Keratinozyten in der Epidermis synthetisieren und katabolisieren Hyaluronsäure. Dort beträgt die Halbwertszeit der Hyaluronsäure sogar nur ungefähr einen Tag [Hascal VC, Laurent TC, 1997].

Der Zelloberflächenrezeptor CD44 und Hyaluronsäure stehen bei der Zellmigration, -proliferation und -differenzierung in enger Beziehung zueinander. Der CD44-Rezeptor ist ein transmembranes Glykoprotein und wird auch als „der Hyaluronsäurerezeptor“ bezeichnet, obwohl er auch andere Moleküle bindet. Als transmembranes Glykoprotein spielt er eine wichtige Rolle in der Zell-Matrix-Kommunikation. Er wurde bereits auf der Oberfläche vieler Zelltypen wie z.B. Leukozyten, Fibroblasten und Epithelzellen nachgewiesen [Kakehi K, Kinoshita M, Yasueda S, 2003]. Eine Interaktion des CD44-Rezeptors und Hyaluronsäure ist u. a. im Epithel und Stroma der Kornea beschrieben. Während des Wundheilungsprozesses steigen die Anzahl der CD44-Rezeptoren und die Konzentration der Hyaluronsäure. Nach abgeschlossener Wundheilung nehmen beide Komponenten bis auf Normalniveau ab. Man geht davon aus, dass die Hyaluronsäurekonzentration im Korneaepithel und im Hornhautstroma durch die CD44-Rezeptoren beeinflusst wird. Asari et al. zeigten, dass die Zugabe von Natriumhyaluronat die Wundheilung der Kornea bei Hasen beschleunigt, indem es das Wachstum der Epithelzellen der Kornea fördert [Asari A, Miyauchi S, 2000]. Zudem vermuten Knudsen et al., dass eine Loslösung von Hyaluronsäure vom CD44-Rezeptor zur Apoptose der Zelle führt, so dass die Interaktion beider eine wichtige Rolle bei der Zellerhaltung und Sensitivität gegenüber der Apoptose spielen [Knudsen W, Knudsen CB, 1999].

1.2.3 Hyaluronsäure und das Auge

In der Ophthalmologie wird Hyaluronsäure bisher vielfältig eingesetzt. Die Firma Pharmacia & Upjohn Ltd. brachte als erstes ein chemisches Hyaluronsäureprodukt als Viskoelastikum (Healon®) auf den Markt. Anfangs wurde Healon vor allem in der Kataraktchirurgie zum Schutz des Endothels der Kornea eingesetzt. Mit der Entwicklung neuer Techniken wie der Phakoemulsifikation und Aspiration verschob sich das Einsatzgebiet von viskoelastischen Materialien in den Glaskörperraum des Auges [Asari A, Miyauchi S, 2000]. Auch hier kam Hyaluronsäure als Glaskörperersatz zur

Anwendung. Nachdem in einer Studie von R. Kostner et al. 1986 intraokuläre Druckanstiege festgestellt wurden, hatte man davon wieder Abstand genommen [Koster R, Stilma JS, 1986].

1.3 Der ideale Glaskörperersatz

Seit vor mehr als 100 Jahren 1895 erstmals eine Glaskörpertransplantation durch Deutschmann durchgeführt worden war, ist man auf der Suche nach einem optimalen Glaskörperersatz. Aus biochemischer Sicht handelt es sich beim natürlichen Glaskörper wie in Kap. 1.1.1. bereits beschrieben um nichts anderes als ein faserverstärktes Hydrogel, einem Gerüst aus einem Kollagenmaschengitter, welches durch die Einbindung polyanionischer Hyaluronsäure seine dreidimensionale Struktur erhält. Außerdem besteht der Glaskörper aufgrund der hohen Wasser bindenden Eigenschaft dieses Gerüsts zu 98% aus Wasser.

Bis heute konnte jedoch kein geeigneter Ersatz für den menschlichen Glaskörper gefunden werden. Es liegt wohl daran, dass trotz der scheinbar einfachen Struktur viele verschiedene Eigenschaften und die Praktikabilität für den operativen Einsatz erfüllt werden müssen. Ein perfekter Glaskörperersatz hätte folgende Eigenschaften: Erstens sollte er die optischen Eigenschaften wie Transparenz, Refraktionsstabilität und -neutralität erfüllen. Zudem sollte der Glaskörperersatz eine physikalische Tamponade darstellen. Hier spielen die Viskosität und Kohäsivität der Tamponade, sowie die Grenzflächenspannung und ein in alle Richtung gleichmäßiges Andrückverhalten eine wichtige Rolle. Auf diese Weise könnte die strukturgebende Aufgabe des Glaskörpers optimal ersetzt werden. Drittens sollte die Tamponade biologisch wirksame Eigenschaften erfüllen. Der Glaskörperersatz sollte ein eigenes Kompartiment mit antiproliferativen, antiadhäsiven und antimigrativen Eigenschaften darstellen und wie der ursprüngliche Glaskörper die Homöostase des retinalen Milieus aufrecht erhalten. So könnten die durch mikrochirurgische Eingriffe

entstehenden biochemischen Veränderungen, welche die Migration und Proliferation verschiedener nicht-neoplastischer Zelltypen in den subretinalen Spalt, auf die Netzhautoberfläche und den Glaskörperraum initiieren, verhindert werden. Außerdem sollte die ideale Tamponade neuroprotektiv wirken, biodegradabel und inert sein. Das bedeutete einen Schutz der neuronalen Zellen und die Vermeidung einer weiteren Operation zur Entfernung des Glaskörperersatzes. Zuletzt wäre eine therapeutische Funktion des Glaskörperersatzes als Medikamententräger mit allmählicher Medikamentenfreisetzung wünschenswert.

So war es bis jetzt schwierig ein Material zu finden, welches alle Anforderungen und Eigenschaften des natürlichen Glaskörpers erfüllt [Liesegang 1990, Chirila TV et al 1994]. Aufgrund seines natürlichen Vorkommens im menschlichen Auge und seiner vielfältigen, u. a. viskoelastischen Eigenschaften scheint sich Hyaluronsäure als Ausgangsmaterial zur Etablierung eines neuen dreidimensionalen Glaskörperersatzes zu eignen. In der Vergangenheit wurde bereits mehrfach hoffnungsvoll Hyaluronsäure als Material zur Herstellung künstlichen Gewebes eingesetzt [Caplan 2000; Collier JH et al 2000] und diente zwischenzeitlich in nicht vernetzter Form als Glaskörperersatz [Pruett et al 1979].

Am ehesten kommt man zudem einem Glaskörper durch Herstellung eines dreidimensionalen Konstruktes auf Hydrogel-Basis nahe. Der Gedanke der Quervernetzung zur Bildung eines dreidimensionalen Glaskörperersatzes ist nicht neu. Ye Hong et al. kreierten 1996 ein dreidimensionales Hydrogel aus dem Polymer Poly(1-vinyl-2-Pyrrolidinon). Das vernetzte Hydrogel enthielt beinahe 98% Wasser, war klar, transparent, autoklavierbar und konnte in kleinen Fragmenten durch eine Nadel injiziert werden, ohne dass es zu Verlusten der optischen Eigenschaften kam [Hong Y et al 1996]. Die Quervernetzung des Gels schien nach der Injektion jedoch ein wenig von der Elastizität einzubüßen. In vivo zeigte sich bei Kaninchen eine gute Toleranz und es schienen keine zytotoxischen Effekte von dem Hydrogel auszugehen. Allerdings wurde das Hydrogel sehr rasch nach der Injektion wieder abgebaut

[Hong Y et al 1998]. Diese Arbeit von Ye Hong zeigte, dass man mittels Quervernetzung näher an die Eigenschaften des ursprünglichen Glaskörpers herankommen könnte als mit den bisher eingesetzten nicht vernetzten Hydrogelen. Jedoch zeigte sich auch hier das Problem mit der Kurzlebigkeit des Hydrogels. Die bisher eingesetzten Materialien, die als Glaskörperersatz eingesetzt werden, sind nur für eine kurzzeitige Anwendung im Auge gedacht, wie auch eine Studie von Versura et al. mit Silikonöl, Fluorosilikonöl und Perfluorkarbon zeigte [Versura 2001].

1.4 Ziel der Arbeit

Ziel dieser Arbeit ist die Herstellung eines neuen dreidimensionalen Glaskörperersatzes auf Hyaluronsäure-Basis, welcher die o. g. Eigenschaften größtenteils erfüllt. Im ersten Teil der Arbeit wird die ursprüngliche, nicht vernetzte Hyaluronsäure auf ihre biologischen Eigenschaften hin untersucht. Anschließend wird im zweiten Teil die Herstellung eines dreidimensionalen Glaskörperersatzes aus Hyaluronsäure mittels zweier verschiedener Methoden versucht und dieser anschließend ebenfalls auf seine biologischen Eigenschaften hin getestet.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Reagenzien und Verbrauchsmaterialien

- 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium Bromid (MTT), Sigma # 5655
- 4',6'-diamidino-2-phenylindole (DAPI), Invitrogen # D1306
- 12, 24 u. 96 Well Platten, Costar
- Absolutes Ethanol, Merck # UN 1170
- Adipinsäuredihydrazid 98% (ADH), Aldrich # 217824-256
- AlamarBlue® Assay, Biosource # DAL1025
- Alexa Fluor 488 goat anti-rabbit IgG (H+L), Molecular Probes Inc. # A11008
- Adulte retinale Pigmentepithel-19-Zellen (ARPE19-Zellen), ATCC, Manassas, VA, USA
- Borax (Natriumtetraborat), Sigma, # B-9876
- BrdU Cell Proliferation Assay Kit, Calbiochem, # QIA58
- BSA (Albumine bovine fraction V, 1%), Serva # 11930
- Carbazol, Sigma, # C-5132
- CD44 Antikörper (Rabbit polyclonal to CD44), Biozol # ab24504
- Dulbecco's Modified Eagle's Medium (D-MEM), GIBCO # 31885-023
- D-PBS, GIBCO # 14190-094
- Di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat, Merck, # A414386
- Deckgläser (Ø 13 mm), Menzel, # 4714884
- Deckgläser (Ø 18 mm), Menzel, # 9161062, CB00180RA1
- DMSO, Merck, # 102950
- Eosinlösung, Merck # 109844
- Essigsäure (100%), Merck, # 100063

- Fluoreszent mounting medium, Dako Cytomation, # 05462
- Fötale Kälberserum (FCS), GIBCO, # 10270-106
- Glycidylmethacrylate, Sigma-Aldrich # 64161
- Hyaluronsäure (from Rooster comb), Sigma-Aldrich Chemie GmbH # H-5388
- Irgacure 2959®, Ciba # 029891301PS04
- Kaliumchlorid, Fluka # 60132
- Kaliumdihydrogenphosphat, Merck # A591973
- Konz. Schwefelsäure (98%), Fluka # 84727
- L-Glutamin, Roth, Karlsruhe, Germany # 3772
- N´(3-Dimethylaminopropyl)-N´-ethylcarbodiimid Hydrochlorid 98% (EDCI), Aldrich # 16,146-2
- Natriumchlorid zur Analyse, Merck, # 106404
- Millex GS 0,22 µm filter unit, Millipore, Billerica, MA, # SLGSO33SS
- Millex GS 0,45 µm filter unit, Millipore, Billerica, MA, #
- Mowiol, Hoechst, Frankfurt, Germany, # 4-80
- Paraformaldehyd (4%, PFA in PBS), Merck # 104005
- Penicillin/ Streptomycin, GIBCO # 15070-063
- Petrischale, Greiner bio-one
- Pippettenspitzen (20 µl, 100µl, 1000 µl), Greiner bio-one
- PP-Test tubes=Plastikröhrchen (15ml, steril), Greiner bio-one, Cat. No. 188271
- Propidium Iodide, Sigma
- Sodium dodecyl sulphate (SDS), Serva, # 20783
- Skalpell, Aesculap Division
- Spritzen (10 ml, 20 ml), Greiner bio-one
- Sterilband, Kendro
- Sterilfilter (0,22 µm; 0,45 µm), Millipore Corporation USA
- Tetrabutylammoniumbromid, Sigma-Aldrich # 193119
- Triethylamine, Sigma-Aldrich # 90335
- Tris base (MW:121.14), Sigma-Aldrich, # T1503

- Triton X-100 (0,1%, 025%), Serva # 37240
- Trypsin/ EDTA (0,05% Trypsin, 0,02% EDTA), GIBCO, # 25200-720
- Viability/ Cytotoxicity Kit, Invitrogen, Lot. 41599A, L3224
- Zellkultureinsätze (6 well), Porengröße 0,4 µm, Schubert und Weiss # 353090
- Zellkultureinsätze (12 well), Porengröße 0,4 µm, Schubert und Weiss # 353495
- Zellkulturflaschen Cellstar, Greiner bio-one

2.1.2 Geräte

- ELISA-Reader, SLT 400 ATX u.
- Magnetrührer, Heidolph; Reax 1R
- Mikroskope: 1. Nikon TMS
2. Zeiss Axiovert 135
- Zeiss Axioplan 2
- Multikanalpipetten, Eppendorf
- Neubauer-Zählkammer, Neubauer - Assistent
- pH-Meter, Hanna instruments; pH 211
- Pipetten, Eppendorf
- Photometer, Pharmacia Biotech; Ultrospec 1000
- Schüttelmaschine für die Mikrotiterplatten, CAT SH 26
- Waage, Sartorius LA 120 S
- Wasserbad, GFL
- Zellkulturschrank/ CO₂-Inkubator, Heraeus
- Zentrifuge, Heraeus Biofuge fresco

2.1.3 Nährmedien

2.1.3.1 ARPE19-Zellmedium

Das Kulturmedium für die ARPE19-Zellen, das zudem für einen Teil der Experimente eingesetzt wurde, wurde aus D-MEM und den Supplementen Penicillin (2,5 %), Streptomycin (2,5 %) und fötalem Kälberserum (15 %) hergestellt.

Für die Durchführung des Toxizitätstestes (siehe Kap. 2.2.3.) erfolgte zusätzlich die Herstellung eines ARPE19-Zellmediums ohne den Zusatz von fötalem Kälberserum.

2.1.4 Lösungen

2.1.4.1 Lösungen nicht vernetzter Hyaluronsäure (HA) in H₂O oder ARPE19-Zellmedium

Als Grundlösung wurde mit Hilfe eines Magnetrührers eine 1 %ige Lösung nicht vernetzter Hyaluronsäure (HA) in steril filtriertem H₂O oder in ARPE19-Zellmedium (0,01 g HA/ 1 ml H₂O bzw. 1 ml Medium) hergestellt. Die hergestellte Lösung wurde durch einen 0,45 µm Sterilfilter gepresst und für 24 Stunden bei 4° C zum Ausquellen ruhen gelassen, da bei der Herstellung der Lösung viele Luftblasen entstanden waren. Aus dieser Grundlösung 1 %iger Hyaluronsäure wurden nun weitere Verdünnungen von 0,02 %, 0,05 %, 0,1 %, 0,2 %, 0,4 %, 0,6 % und 0,8 % Hyaluronsäure in H₂O bzw. ARPE19-Zellmedium hergestellt.

2.1.4.2 MTT-Test-Lösung Nr. 1

100 mg des MTT-Pulvers wurden in 20 ml PBS gelöst und für zwei Stunden bis zur vollständigen Lösung auf einem Rad in Aluminiumfolie verhüllt gedreht.

Anschließend wurde die MTT-Test-Lösung durch einen 0,22 µm Sterilfilter filtriert.

2.1.4.3 MTT-Test-Lösung Nr. 2

In ein verschließbares Gefäß wurden 99,4 ml DMSO, 0,6 ml Essigsäure (100 %) und 10 g SDS gegeben und für zwei Stunden mit Hilfe eines Magnetrührers zu einer optisch klaren Lösung gerührt.

2.1.4.4 Herstellung der Pufferlösung PBS (Ca²⁺, Mg²⁺ frei) zur Dialyse

Zur PBS-Pufferherstellung wurden 80 g Natriumchlorid, 11,5 g Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat, 2 g Kaliumchlorid und 2 g Kaliumdihydrogenphosphat in 1 l destilliertes Wasser gegeben und mit einem Magnetrührer zu einer makroskopisch klaren Lösung durchmischt.

Dadurch entstand eine zehnfach konzentrierte PBS-Pufferlösung, welche durch Zugabe von ungefähr 9 l destilliertem H₂O auf einen pH-Wert von 7,4 eingestellt wurde.

2.1.4.5 Viability/ Cytotoxicity Kit-Lösung für den Life/ Dead-Test

6,5 µl EthD-1 und 3,25 µl Calcein AM wurden nach einander in 13 ml Medium gelöst. Die Einhaltung der Reihenfolge war besonders zu beachten.

2.1.4.6 Carbazoltest-Lösung A

191 mg Natriumtetraborat wurden in 20 ml konzentrierter Schwefelsäure (98 %) gelöst.

2.1.4.7 Carbazoltest-Lösung B

0,0125 g Carbazol wurden in 9,9875 g absolutem Ethanol gelöst.

2.2 Methoden

2.2.1 Kultivierung von ARPE19-Zellen

Die ARPE19-Zellen wurden in Zellkulturflaschen mit dem ARPE19-Zell-Medium (s. Kap.2.1.3.1) im Zellkulturschrank bei 37° C, 5 % CO₂, 95 % relativer Feuchte kultiviert.

Für das Passagieren der APRE19-Zellen wurde das alte Zellmedium abgesaugt und durch 10 ml D-PBS zum Spülen der Zelloberflächen bzw. zur Beseitigung von Zellmediumresten ersetzt. Dann wurde die Zellkulturflasche vorsichtig geschüttelt und das D-PBS wieder abgesaugt. Anschließend wurde zum Lösen der ARPE19-Zellen vom Flaschenboden 3 ml Trypsin/ EDTA zugegeben und für weitere 10-30 Minuten im Zellkulturschrank inkubiert. Mikroskopisch konnte die Zelllösung vom Untergrund beobachtet werden. Nach kompletter Zelllösung vom Untergrund wurde zur Deaktivierung des Trypsin/ EDTA 10 ml des ARPE19-Zell-Medium hinzu pipettiert. Um die ARPE19-Zellen von den restlichen Stoffen zu trennen, wurde die Zellsuspension für fünf Minuten bei 1000 U/min, 22 °C in 15 ml Falcons zentrifugiert.

Anschließend wurde der Überstand abgesaugt und zu den Zellen 5 ml frisches ARPE19-Zell-Medium zugegeben. Mittels Neubauerzählkammer wurde die Zellkonzentration bestimmt und je nach Zellzahlkonzentration 1-2,5 ml der Zellsuspension in eine Zellkulturflasche gegeben. Diese wurde bis zur 13 ml Marke mit ARPE19-Zell-Medium aufgefüllt und im Zellkulturschrank liegend inkubiert.

2.2.2 MTT-Test

Der MTT-Test diente zur Bestimmung der Vitalität von Zellen und wurde nach T. Lindl durchgeführt [Lindl T, 2002]. Der Test misst die Aktivität von mitochondrialen Dehydrogenasen in lebenden Zellen, und zwar unabhängig davon, ob diese zu diesem Zeitpunkt DNA synthetisierten oder nicht. Das schwach gelbe 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium Bromid (MTT) dringt in die Zellen ein, woraufhin die aktiven mitochondrialen Dehydrogenasen den Tetrazoliumring des MTT aufbrechen und so das alkohollösliche, dunkelblaue Formazan entsteht. (siehe Abb. 4).

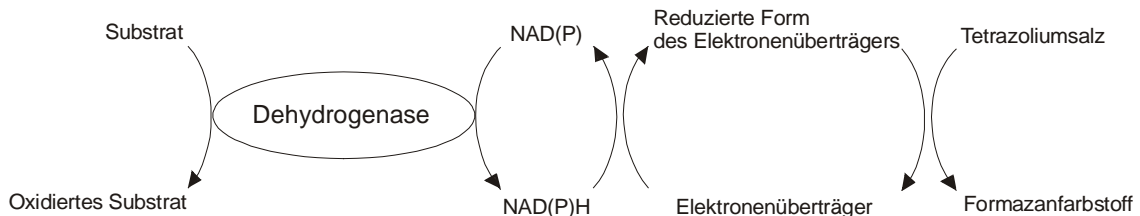


Abb.4: Stoffwechselweg des MTT (Substrat) zum Formazansalz (Oxidiertes Substrat). Modifiziert nach T. Lindl, 2002

Die Detergentien „Sodium dodecyl sulphate“ (SDS) und Dimethylsulfoxid (DMSO) wurden eingesetzt, um die Zellen zu lysieren und das Formazan frei zu setzen, sowie in gelöster Form zu halten. Die Intensität der alkoholischen Formazanlösung wurde photometrisch bestimmt (Testwellenlänge 570 nm, Referenzwellenlänge 630 nm).

Der MTT-Test wurde unter anderem in 96-Töpfchenplatten (96-well-Platten) durchgeführt. In diesen 96-well-Platten wurden ARPE19-Zellen in einer Zellkonzentration von 1×10^4 Zellen/ ml für 24 Stunden bei 37°C, 5 % CO₂, 95 % Luftfeuchte kultiviert. Um dies zu bewerkstelligen, wurde eine Zellsuspension von 1×10^4 Zellen/ ml Medium hergestellt und mit einer Multikanalpipette in

jedes Töpfchen (well) 100 µl der Zellsuspension pipettiert. Nach 24 Stunden Inkubationszeit wurde das ARPE19-Zellmedium abgesaugt und durch 200 µl frisches ARPE19-Zellmedium/ well bzw. Testmedium/ well ersetzt.

Je nach Testreihe wurden die 96-well-Platten für eine Zeitdauer von ein bis fünf Tagen inkubiert. Nach der jeweiligen Inkubationszeit wurden 20 µl der MTT-Test-Lösung 1 (37° C) in jedes well hinzugegeben und die 96-well-Platten für fünf Minuten auf einem Schüttler vorsichtig geschüttelt, um eine gleichmäßige Verteilung der MTT-Test-Lösung 1 in den wells zu erreichen. Anschließend wurden die 96-well-Platten für weitere 2 Stunden im Zellkulturschrank inkubiert. Danach wurde der Überstand abgesaugt und 100 µl der MTT-Test-Lösung 2 zur Herauslösung des Formazans in jedes well pipettiert.

Die 96-well-Platten wurden für fünf Minuten ruhen gelassen und dann für weitere fünf Minuten auf einem Schüttler leicht gerüttelt. Die entstandene lilablaue Formazanlösung konnte daraufhin photometrisch im ELISA-Reader gemessen werden (Testwellenlänge 570 nm, Referenzwellenlänge 630 nm).

Der MTT-Test wurde auch in 6, 12 und 24-well-Platten durchgeführt. Dementsprechend wurden die verschiedenen Reagenzien passend umgerechnet.

2.2.3 Toxizitätstest

Der Toxizitätstest stellt eine Variation des MTT-Testes dar, da dieser in einer proliferierenden Kultur nicht zwischen antiproliferativer und toxischer Wirkung unterscheiden kann. Die Unterschiede bestehen in der Ausgangszellzahl und dem verwendeten Nährmedium für die Zellen. Es wurde dafür das ARPE19-Zell-Medium ohne den Zusatz von fötalem Kälberserum verwendet. Durch den Einsatz von ARPE19-Zell-Medium ohne den Zusatz von Fötalem Kälberserum fehlten den ARPE19-Zellen zusätzlich die entsprechenden unterstützenden Wachstumsfaktoren. Da auf diese Weise keine starke proliferative Aktivität in den ARPE19-Zellen bestand, kamen die toxischen Eigenschaften der Testsubstanz besser zu tragen, so dass durch den Toxizitätstest eine toxische

Eigenschaft von einer antiproliferativen Eigenschaft einer Substanz besser abgegrenzt werden konnte. Die Ausgangszellzahl bei dem Toxizitätstest war erhöht auf 10^6 - 10^7 Zellen/ ml. Durch die hohe Zellzahlkonzentration in den Töpfchenplatten bildeten die Zellen sehr schnell einen konfluenten, den Boden bedeckenden Zellrasen und befanden sich so in einem Stadium mit niedriger Proliferationsrate.

Die Durchführung des Toxizitätstestes erfolgte entsprechend der des MTT-Testes wie in Kap. 2.2.2. beschrieben unter oben genannten geänderten Bedingungen und unter lediglich 24 Stunden Inkubation mit der Testsubstanz.

2.2.4 Life/ Dead-Test

Der Life/ Dead-Test ermöglicht es unter dem Fluoreszenzmikroskop einerseits durch die Esteraseaktivität, andererseits durch die Plasmamembranintegrität der ARPE19-Zellen gleichzeitig tote und lebende Zellen sichtbar zu machen und zu unterscheiden. Lebende Zellen zeigen eine überall gegenwärtige Anwesenheit von intrazellulärer Esteraseaktivität. Diese kann durch enzymatische Umwandlung sichtbar gemacht werden. Hierfür wird Calcein AM aus dem Viability/ Cytotoxicity Kit verwendet. Das nicht fluoreszierende Calcein AM wird durch die intrazelluläre Esterase in fluoreszierendes Calcein (grüne Fluoreszenzen bei ~ 495 nm/ ~ 515 nm) umgewandelt und auf diese Weise sichtbar gemacht. Für den Nachweis toter Zellen wird EthD-1 aus dem Viability/ Cytotoxicity Kit verwendet, welches optimal mit dem Calcein AM harmonisiert. EthD-1 kann in tote Zellen aufgrund der zerstörten Zellmembranen eindringen und bindet sich dort an die Nukleinsäuren, wodurch das EthD-1 sichtbar wird (rote Fluoreszenzen bei ~ 495 nm/ ~ 635 nm). Durch die intakten Zellmembranen vitaler Zellen kann EthD-1 nicht in diese eindringen.

Für die Testdurchführung wurden ARPE19-Zellen in einer Konzentration von 10^4 Zellen/ ml in 6-Töpfchenplatten (6-well Platten) ausgesät (2 ml Zellsuspension/ well) und für einen Tag bei 37°C , 5 % CO_2 , 95 % Luftfeuchte

im Zellkulturschrank inkubiert. Nach 24 Stunden wurde das ARPE19-Zellmedium gewechselt bzw. in die Hälfte der Töpfchen (wells) die Probesubstanz gegeben und die Zellkulturplatten weiter für einen gewählten Zeitraum bei 37° C, 5 % CO₂, 95 % Luftfeuchtigkeit im Zellkulturschrank inkubiert. Danach erfolgte die Fluoreszenzfärbung der ARPE19-Zellen. Dazu wurde das ARPE19-Zellmedium bzw. Probemedium abgesaugt und mehrmals mit PBS vorsichtig gespült. Als weitere Kontrollgruppe der Wirkung des EthD-1 wurden ARPE19-Zellen mit Ethanol abgetötet. Anschließend wurden 300 µl der Viability/Cytotoxicity-Kit-Lösung (siehe Kap.2.1.4.5.) in jedes Well pipettiert und die Zellkulturplatten für 15 Minuten im Zellkulturschrank inkubiert. Dann wurden die Wells nochmals vorsichtig mit PBS gespült und die Zellen durch Zugabe von 1 ml PFA/well fixiert. Durch das Fluoreszenzmikroskop konnten nun die lebenden bzw. toten Zellen visualisiert und fotografiert werden.

Für die Versuchsdurchführung mit quervernetzter Hyaluronsäure wurden Zellkultureinsätze für 6-well Zellkulturplatten verwendet, in denen die ARPE19-Zellen kultiviert wurden, damit eine ausreichende Nährstoffversorgung der ARPE19-Zellen gewährleistet werden konnte. Die Böden mit den ARPE19-Zellen wurden nach der Inkubation mit einem Skalpell herausgeschnitten. Das weitere Vorgehen erfolgte wie oben beschrieben.

2.2.5 BrdU-Test

Der BrdU-Test ist ein nicht-isotopisches Enzymimmunoassay zur Quantifizierung der Zellproliferation. Bei dieser Methode wird Thymidin durch das Thymidinanalog Bromodeoxyuridin (BrdU) ersetzt. BrdU wird dabei in neu synthetisierte DNA-Stränge aktiver, proliferierender Zellen eingebaut. Auf diese Weise kann durch die Messung mittels Antikörper gegen BrdU quantitativ die Zellproliferation dargestellt werden.

Für die Testdurchführung wurde ein BrdU-Test-Kit verwendet und es wurden 100 µl à 1x10⁵ Zellen/ ml in 96-Töpfchenplatten (96-well Platten) gesät. Die

Zellkulturplatten wurden anschließend für 24 Stunden bei 37°C, 5 % CO₂, 95 % rel. Feuchte inkubiert. Nach 24 Stunden Inkubation wurde das ARPE19-Zellmedium abgesaugt und durch 200 µl frisches ARPE19-Zellmedium/ well bzw. Testmedium/ well ersetzt.

Je nach Testreihe wurden die 96-well-Platten für eine Zeitdauer von ein und drei Tagen weiter inkubiert. Nach der jeweiligen Inkubationsdauer wurden 20 µl BrdU Label in jedes Well hinzu pipettiert und nochmals für zwei Stunden bei 37° C, 5 % CO₂, 95 % rel. Feuchte inkubiert. Der Inhalt der Platten wurde anschließend, indem man die Platten leicht gegen Papiertücher klopfte, entfernt und in jedes Well 200 µl der Fixative/Denaturing Solution gegeben. Die Platten wurden dann für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde der Inhalt wie zuvor auf Papiertüchern entleert und 100 µl des Anti-BrdU Antibody in jedes Well zugegeben. Die Platten wurden nochmals für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert und die 96-well-Platten dreimal mit dem Waschpuffer gewaschen. Anschließend wurden 100 µl der Peroxidase Goat Anti-Mouse IgG in jedes Well pipettiert und für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wurden die Platten wieder dreimal mit dem Waschpuffer gewaschen. Jede von ihnen wurde vollständig mit H₂O durchflutet und auf Papiertüchern ausgeklopft. In jedes Well wurden 100 µl Substrate Solution pipettiert und im Dunkeln für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

Zum Stoppen der Reaktion wurden 100 µl Stop Solution pipettiert und anschließend wurden die Platten photometrisch mit dem Elisa-Reader bei 450-540 nm Wellenlänge gemessen.

2.2.6 Adhäsionstestung/ DAPI-Färbung mit nicht vernetzter Hyaluronsäure

Der Test diente der Darstellung der Adhäsionsfähigkeit frisch passagierter ARPE19-Zellen. Er basiert auf einer Zellkernfärbung der ARPE19-Zellen und darauf, dass die Zellkernzahl der Anzahl der vorhandenen ARPE19-Zellen entsprechen. Das blau fluoreszierende 4'6'-diamidino-2-phenylindol (DAPI)

kann nach Fixierung der Zellen und nach Zerstörung der Zellmembranen in ARPE19-Zellen eindringen und daraufhin in Interaktion mit den Zellkernen treten, wodurch diese unter einem Fluoreszenzmikroskop gut dargestellt werden können. Auf diese Weise kann die durchschnittliche Zellkernzahl bestimmt und so die Zahl adhärierter ARPE19-Zellen unter verschiedenen Umgebungsbedingungen verglichen werden.

Für die Versuchsdurchführung wurden ARPE19-Zellen in einer Zellzahlkonzentration von 10^4 Zellen/ ml bzw. 10^5 Zellen/ ml zur Kontrolle in reinem ARPE19-Zellmedium und andererseits mit der Testsubstanz in 12- well-Platten ausplattiert (800 μ l Zellsuspension/ well) und für 24 Stunden bei 37° C, 5 % CO₂, 95 % rel. Feuchte im Zellkulturschrank inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Plättchen mit den darauf gewachsenen ARPE19-Zellen zweimal vorsichtig mit PBS gewaschen und für 30 Minuten bei Raumtemperatur in 4 % PFA fixiert. Anschließend wurden die Plättchen wieder dreimal mit PBS gewaschen und für zehn Minuten zur Permeabilisierung mit 0,1 % Triton X-100 inkubiert. Dann wurden die Plättchen nochmals dreimal mit PBS gewaschen und für weitere 10 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln in DAPI-Lösung eingelegt. Zum Schluss wurden die Plättchen zweimal mit PBS gewaschen und mit Fluoreszent mounting medium auf einem Objektträger eingebettet. Über Nacht trockneten die Objekte bei 4 C° und konnten am darauffolgenden Tag mikroskopiert und die ARPE19-Zellzahl der Plättchen bestimmt werden.

2.2.7 AlamarBlue® Assay

Der AlamarBlue® Assay ist dafür ausgelegt, quantitativ die Proliferation von verschiedenen humanen und tierischen Zelllinien, Bakterien und Pilzen zu messen. Dieser Assay kann zudem dazu verwendet werden, die Zytotoxizität von unterschiedlichen Chemikalien zu bestimmen. Der AlamarBlue® Assay basiert wie der MTT-Test (siehe Kap. 2.2.2.) auf einer Redoxreaktion in den Mitochondrien. Die zuerst vorhandene blaue oxidierte Form ist nicht

fluoreszierend, wohingegen die rote reduzierte Form fluoresziert (Exzitation 530-560 nm, Emission 590 nm). Eine Reduktion des AlamarBlue[®] erfolgt durch die mitochondrialen Dehydrogenasen FMNH₂, FADH_s, NADH, NADPH und zusätzlich durch Zytochrome. Letzteres ist beim MTT-Test im Gegensatz zu AlamarBlue[®] nicht der Fall. Ein weiterer wichtiger Unterschied zum MTT-Test ist, dass der fluoreszierende Farbstoff, der durch die mitochondrialen Dehydrogenasen umgebaut wurde, direkt mit der Hyaluronsäure zu den ARPE19-Zellen gegeben wurde. Dieser Versuchsablauf ermöglichte es eine Zellkulturplatte mehrmals unter vitalen Bedingungen, ohne eine zusätzliche Manipulation des Zellmilieus durch weitere nötige Versuchsschritte wie es bei der Durchführung des MTT-Testes der Fall war, in verschiedenen Zeitabständen zu messen. Auf diese Weise konnte ein möglicher Zellverlust durch mehrmaliges Pipettieren verhindert werden.

Die Versuchsdurchführung erfolgte ähnlich wie bei dem MTT-Test. Es wurden 96-well Platten mit unterschiedlichen ARPE19-Zellkonzentrationen besät und für 24 Stunden inkubiert. Anschließend wurden 200 µl Probe in ARPE19-Zellmedium/ well und 20 µl AlamarBlue/ well pipettiert und für unterschiedliche Inkubationszeiten inkubiert. Nach jeweils 24 Stunden Inkubation erfolgte eine Messung mit dem ELISA-Reader (Exzitation 530 nm und Emission 590 nm). Zu beachten bei der Messung war die Umgebungstemperatur, die stets gleich gehalten werden sollte.

Bei der Testung der quervernetzten Hyaluronsäuregele wurden größere Wells verwendet und die Menge der Reagenzien entsprechend umgerechnet.

2.2.8 Indirekte CD44-Antikörpertestung

Der CD44-Rezeptor wurde in der Literatur unter anderem als der Hyaluronsäurerezeptor beschrieben. An ihn kann sich die Hyaluronsäure binden und eine Signalkaskade in der Zelle auslösen. Über diesen Rezeptor nimmt Hyaluronsäure Einfluss auf den Zellmetabolismus und die

Zellproliferation einer Zelle. Für die Darstellung des Oberflächenproteins CD44 auf ARPE19-Zellen wurde eine indirekte Färbung über Antikörperkonjugate gewählt. Hierbei wurde zuerst ein polyklonaler CD44-Antikörper zur Bindung an das Oberflächenprotein CD44 eingesetzt, welcher sekundär durch den Einsatz eines fluoreszierenden Antikörpers (Alexa Fluor 488) unter einem Fluoreszenzmikroskop dargestellt werden konnte.

Zuerst erfolgte die Inkubation der ARPE19-Zellen in ARPE19-Zellmedium für 24 Stunden auf Plättchen in 12-Töpfchenplatten (12-well Platten). Anschließend wurde das ARPE19-Zellmedium gewechselt bzw. ein Versuchsmedium eingesetzt und es erfolgte eine weitere Inkubation für 24 Stunden. Die nächsten Schritte fanden bei Raumtemperatur statt. Die Plättchen wurden zweimal durch kurzes vorsichtiges Eintauchen in PBS gewaschen. Dann erfolgte die Fixation der ARPE19-Zellen in 4 %igem PFA in PBS für 15 Minuten. Danach wurden die Plättchen zweimal in PBS gewaschen. Die Permeabilisation der Zellen wurde durch Inkubation der Plättchen für 10 Minuten in 0,25 %igem Triton X-100 in PBS durchgeführt und die Plättchen vorsichtig dreimal für je fünf Minuten in PBS gespült. Anschließend wurden die ARPE-19-Zellen für 30 Minuten in 1 % BSA in PBST inkubiert, um eine unspezifische Antikörperbindung an die Zellen zu verhindern. Daraufhin erfolgte die Inkubation der APRE19-Zellen in gelöstem 1 % BSA in PBST gelöstem CD44-Antikörper für eine Stunde. Die Antikörperlösung wurde vorsichtig dekantiert und die Platten dreimal mit PBS für je fünf Minuten vorsichtig gewaschen. Für eine weitere Stunde erfolgte dann die Inkubation der ARPE19-Zellen mit dem zweiten Antikörper Alexa Fluor 488 - in 1 % BSA in PBST gelöst - in Dunkelheit. Danach wurde die Antikörperlösung wieder dekantiert und die Plättchen dreimal mit PBS für je fünf Minuten in Abdunklung gewaschen. Zum Schluss erfolgte eine ARPE19-Zellkernfärbung mit DAPI (s. Kap. 2.2.6.) durch Inkubation für fünf Minuten in 8 µg DAPI/ ml und anschließendes Waschen der Plättchen mit PBS. Für das Mikroskopieren wurden die Plättchen auf Deckgläser mit Mowiol eingebettet und über Nacht bei 4°C getrocknet. Am darauf folgenden Tag wurden die Plättchen mikroskopiert.

2.2.9 Quervernetzung der Hyaluronsäure mittels Dihydraziden

Diese Methode wurde modifiziert und angepasst nach Vercruysse KP und Prestwich GD (Vercruysse et al. 1997; Prestwich et al 1998/ 2001). Die Quervernetzung von Hyaluronsäure (HA) erfolgt bei dieser Methode durch das Adipic Dihydrazide (ADH). Die Hyaluronsäure liegt hier in der ursprünglichen Form als ein Salz vor. Um diese Säuregruppen der Hyaluronsäure zu lösen, wird N-(3-Dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimid Hydrochlorid 98 % (EDCI) zugegeben. Mit den nun freien Säuregruppen der Hyaluronsäure können nun jeweils beide Aminogruppen des ADH reagieren und es entsteht eine Folge von HA-ADH-HA-Ketten. Da die Quervernetzung auf den Säuregruppen der Hyaluronsäure beruht, spielen die Reaktionsbedingungen hierbei eine sehr wichtige Rolle und müssen streng eingehalten werden, d.h. ein pH-Wert von 3,5-4,7 und eine Temperatur von 4°C.

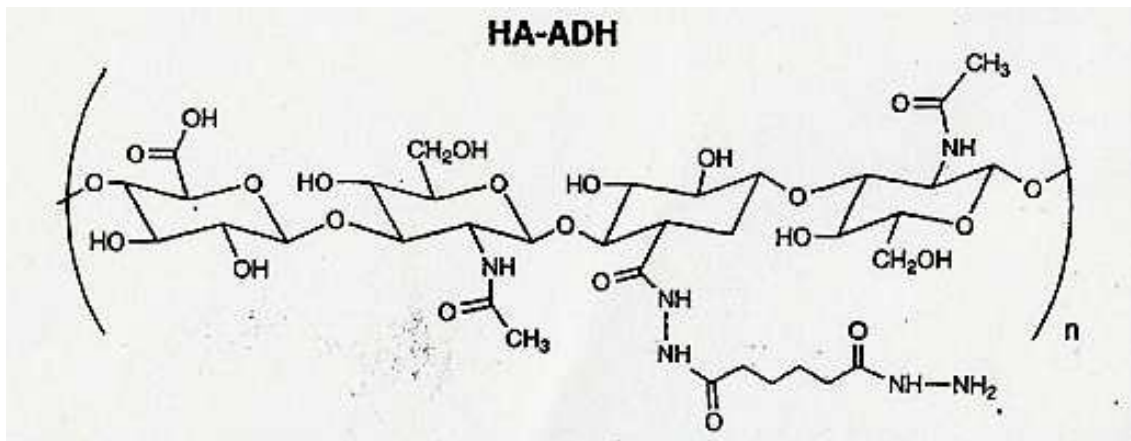


Abb. 5: Quervernetzte Hyaluronsäure. G.D. Prestwich et al./ *Journal of Controlled Release* 53 (1998) 93-103

Für die Quervernetzung wurden 0,08 g HA für 1 %ige quervernetzte HA, 0,064 g HA für 0,8 %ige quervernetzte HA, 0,048 g HA für 0,6 %ige quervernetzte HA und 0,016 g HA für 0,4 %ige quervernetzte HA in 8 ml destilliertem Wasser – das vorher durch einen 0,22 µm Millipore-Sterilfilter filtriert worden war, bei 4°

C gelöst. Währenddessen wurden die ADH- und EDCI-Lösungen hergestellt. Dafür wurden 250 mg ADH und 300 mg EDCI in jeweils 1 ml destilliertem Wasser gelöst. Die (ankonzentrierte) Hyaluronsäurelösung wurde je nach gewünschtem Verhältnis mit der ADH-Lösung zusammen durch eine Spritze in ein neues Gefäß gespritzt und kurz mit dem Magnetrührer durchmischt. Anschließend wurde die EDCI-Lösung zugegeben und die HA-Lösung für 2 Stunden bei 4°C mit dem Magnetrührer gerührt. Dann wurde die HA-Lösung für weitere 2 Stunden bei 4°C stehen gelassen, um die entstandenen Blasen ausquellen zu lassen. Um die Quervernetzung auszulösen, wurden 46 µl 1 N HCl zur pH-Senkung zugegeben, kurz durchmischt und die HA-Lösung in eine Form (inserts) gegossen.

Die Quervernetzung dauerte bei 4°C 24-48 Stunden.

2.2.10 Quervernetzung von Hyaluronsäure mittels UV-Strahlung und N-vinyl pyrrolidinone

Die Quervernetzung von Hyaluronsäure erfolgte modifiziert und angepasst nach der Methode von JB Leach [Leach JB, 2003/ 2004]. Als Ausgangsprodukt dieser Art der Quervernetzung wurden Glycidylmethacrylate (GM) verwendet. Mit Hilfe von Triethylamin und Tetrabutylammoniumbromid konnten aus diesen mit 1 %iger Hyaluronsäure Glycidylmethacrylaten-Hyaluronsäure-Konjugate (GMHA-Konjugate) hergestellt werden. Diese konnten dann in Anwesenheit von Irgacure 2959® als Photoinitiator und N-vinyl pyrrolidinone als Quervernetzer durch Exposition gegenüber ultravioletter Strahlung zu einem dreidimensionalen Hydrogel vernetzt werden.

Zur Herstellung der GMHA-Konjugate wurde zunächst 0,05 g Hyaluronsäure in 5 ml destilliertem H₂O gelöst, um 1 %ige Hyaluronsäure zu erhalten. Dann wurden in folgender Reihenfolge unter einem Abzug nach und nach 110 µl Triethylamin, 110 µl Methacrylsäureglycidylester und 110 mg Tetrabutylammoniumbromid zugegeben und mit Hilfe eines Magnetrührers

gemischt. Anschließend erfolgte eine Inkubation für 24-48 Stunden bei Raumtemperatur mit weiterer Inkubation für eine Stunde bei 60 °C im Wasserbad. Daraufhin wurde die Lösung in 100 ml Aceton ausgefällt. Die auf diese Weise entstandenen GMHA-Konjugate konnten bei 4 °C aufbewahrt werden.

Für die Quervernetzung der GMHA-Konjugate wurden diese in 5 ml PBS gelöst und 0,05 g Irgacure und 250 µl N-vinyl pyrrolidinone zugegeben und mit dem Magnetrührer gut vermengt. Anschließend wurde die Lösung für ca. 4-5 Minuten gegenüber UV-Strahlen exponiert (356 nm, ca. 22 mW/ cm²).

2.2.11 Quantifizierung von Hyaluronsäure durch Carbazol

Diese photometrische Methode ermöglicht eine quantitative Messung von Hyaluronsäure. Hyaluronsäure wird hierbei durch den Einsatz von konzentrierter Schwefelsäure zu Uronsäure abgebaut. Diese reagiert wiederum mit Carbazol, wobei eine violette Färbung entsteht, die bei 530 nm im ELISA-Reader detektierbar ist. Auf diese Weise kann die aus den quervernetzten Gelen frei werdende Hyaluronsäure gemessen werden (nach Bitter et Muir 1962, modifiziert von Alkrad JA 2003).

Bei jeder Testreihe wird eine kleine Eichreihe mit 0, 100, 250 und 500 µg Hyaluronsäure/ ml PBS mitgeführt.

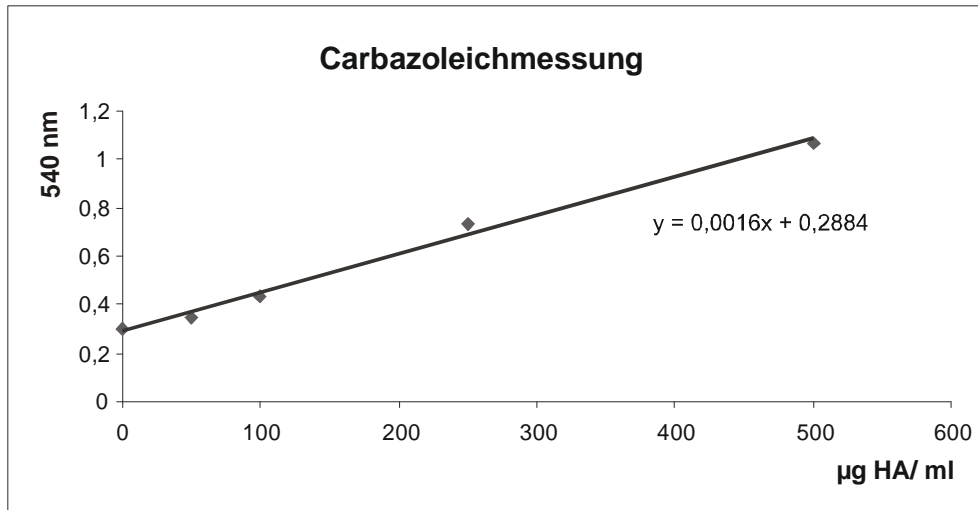


Abb. 6: Beispiel einer Eichgeraden mit gelöster Hyaluronsäure in PBS.

Pro Hyaluronsäureprobe wurden 3 ml der Carbazol-Testlösung 1 in einem 15 ml Plastikröhrchen mittels Eis gekühlt. Dann wurden 0,5 ml der zu messenden HA-Probe hinzugeben und die Lösung in den Plastikröhrchen nach Durchmischung auf einem Schüttler für 10 Minuten in ein kochendes Wasserbad gegeben. Anschließend wurden die Lösung in den Plastikröhrchen auf Raumtemperatur abgekühlt (Dauer ~ 15 Minuten). Daraufhin wurden je 0,1 ml der Carbazol-Testlösung 2 hinzu pipettiert, die Plastikröhrchen auf dem Schüttler gut durchmischt (Vorgang dauerte ca. 5 Minuten) und für weitere 15 Minuten in ein kochendes Wasserbad geben. Anschließend wurden die Plastikröhrchen auf Raumtemperatur abgekühlt. Nach eineinhalb Stunden Abkühlungsphase wurden die Proben bei 530 bzw. 540 nm gegen H₂O photometrisch gemessen und anhand der Eichproben eine Eichkurve erstellt, so dass die einzelnen Hyaluronsäureproben berechnet werden konnten.

2.2.12 Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung) von ARPE19-Zellen

Die ARPE19-Zellen wurden auf Deckgläsern in 12-well-Platten kultiviert. Dazu wurde in jedes Well (Töpfchen) ein Deckglas platziert und vorsichtig 1 ml

Zellsuspension über jedes Deckglas pipettiert. Die 12-well-Platten wurden für 24 Stunden im Zellkulturschrank inkubiert. Danach wurden auf die Hälfte der Deckgläser zusätzlich ein quervernetztes Hyaluronsäurestückchen (ca. 5 mm³) gesetzt. Anschließend wurden die 12-well Platten für einen Tag bzw. drei Tage im Zellkulturschrank inkubiert. Nach dem gewünschten Zeitraum wurden die Deckgläser herausgenommen und vorsichtig in TBS gewaschen. Die Fixierung der Zellen auf den Deckgläsern erfolgte durch die Inkubation der Deckgläser für fünf Minuten bei Raumtemperatur in 4,5 %iger Formaldehydlösung. Danach wurden die Deckgläser mit destilliertem Wasser gespült. Die Deckgläser wurden für weitere fünf Minuten in einer Hämatoxylin-Lösung gebadet. Anschließend wurden sie für zwei Sekunden in HCL gehalten und sofort mit destilliertem Wasser für fünf Minuten gewaschen. Dann wurden die Deckgläser für 20 Sekunden in eine Eosinlösung gehalten und durchliefen anschließend eine Alkoholreihe in abnehmender Konzentration. Zum Schluss wurden die Deckgläser kurz abgetropft und mit Aquatex® auf quadratischen Deckgläsern eingebettet. Nach weiteren 24 Stunden konnten die Präparate mikroskopiert werden.

3 Ergebnisse

3.1 Eigenschaften nicht vernetzter Hyaluronsäure

Ziel dieser Experimente war, nicht vernetzte Hyaluronsäure auf mögliche toxische und pro- bzw. antiproliferative Eigenschaften hin zu untersuchen und zu quantifizieren.

3.1.1 Toxizitäts-Test mit nicht vernetzter Hyaluronsäure

Der Toxizitäts-Test auf Basis des MTT-Tests wurde mit der in Kap. 2.1.4.1. hergestellten Verdünnungsreihe nicht vernetzter HA in ARPE19-Zellmedium durchgeführt, um Hyaluronsäure hinsichtlich toxischer Eigenschaften gegenüber ARPE19-Zellen zu untersuchen. Der Test wurde wie in Kap. 2.2.3. beschrieben durchgeführt. Zur besseren Veranschaulichung wurden hier zwei Testreihen zusammengefasst. Der Mittelwert der optischen Dichte (OD) der Kontrollreihe wurde als Referenzzahl auf 100 % umgerechnet und die Mittelwerte und Standardabweichungen der verschiedenen Hyaluronsäure-Konzentrationen im Verhältnis dazu ebenfalls in Prozent gesetzt. Die Standardabweichungen der gemessenen ODs waren ausgenommen der Standardabweichung der gemessenen ODs bei der 1%igen Hyaluronsäure zufriedenstellend. Die Prozentwerte der verwendeten Hyaluronsäure-Konzentrationen lagen bis auf einen Wert signifikant über dem 100 %-Wert der Kontrollreihe ($n=140$; $p<0,05$: T-Test und Mann-Whitney-Test). Zwischen den einzelnen Hyaluronsäurekonzentrationen zeigten sich nur geringe Unterschiede in den gemessenen ODs.

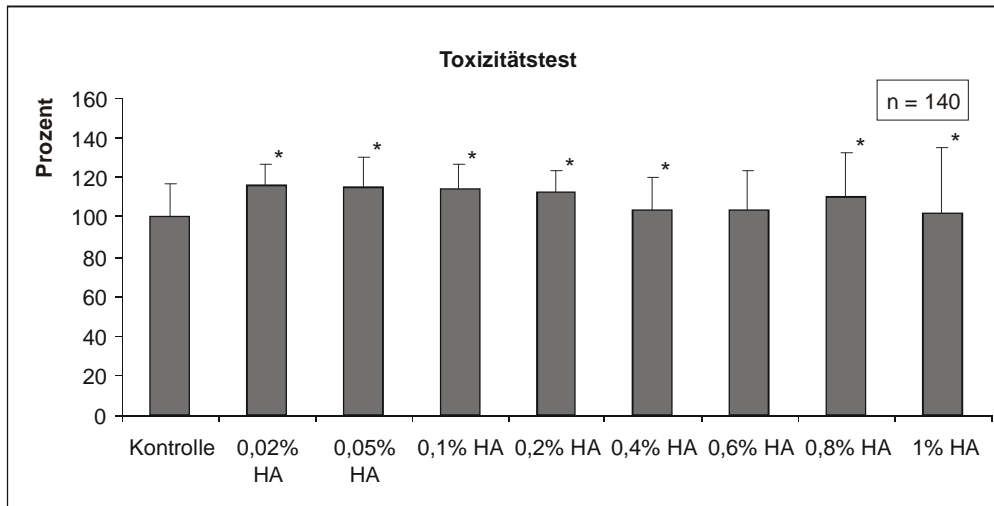


Abb. 7: *Toxizitätstest nach 24 Stunden Inkubation. Ausgangszellzahl 1×10^6 Zellen/ ml. Zwei Testreihen wurden in diesem Schaubild zusammengefasst. Die erzielte OD bei den verschiedenen Hyaluronsäurekonzentrationen zeigten signifikante Unterschiede und lagen etwas über dem 100 %-Wert der Kontrolle ($p < 0,05$; $n = 140$). Das war mit einer höheren mitochondrialen Aktivität gleichzusetzen und lies darauf schließen, dass keine Toxizität von der unvernetzten Hyaluronsäure auszugehen schien.*

Aufgrund des Ergebnisses des Toxizitätstestes war davon auszugehen, dass nicht vernetzte Hyaluronsäure nicht toxisch auf die ARPE19-Zellen zu wirken schien. Die gemessenen ODs und somit die mitochondriale Aktivität waren im Vergleich zur Kontrolle bis auf eine Ausnahme signifikant höher und wiesen damit auf eine Verstärkung der mitochondrialen Aktivitäten durch nicht vernetzte Hyaluronsäure hin.

3.1.2 Life/ Dead/ Dapi-Färbung

Mit der Life/ Dead-Färbung lassen sich lebende und tote Zellen mit Fluoreszenzfarbstoffen differentiell darstellen. Dieser Test sollte das Ergebnis

des Toxizitätstest bestätigen und zeigen, dass nicht vernetzte Hyaluronsäure nicht oder kaum toxisch ist. Als Probe wurde 1 %ige Hyaluronsäure eingesetzt und deren Einfluss auf ARPE19-Zellen im Vergleich zur Kontrolle betrachtet. Dazu wurde eine kombinierte Fluoreszenzfärbung mit dem Life/ Dead-Kit und einer anschließenden Dapi-Fluoreszenzfärbung der Zellkerne (zur besseren Darstellung der Zellen) wie in Kap. 2.2.4. und Kap. 2.2.6. beschrieben durchgeführt.

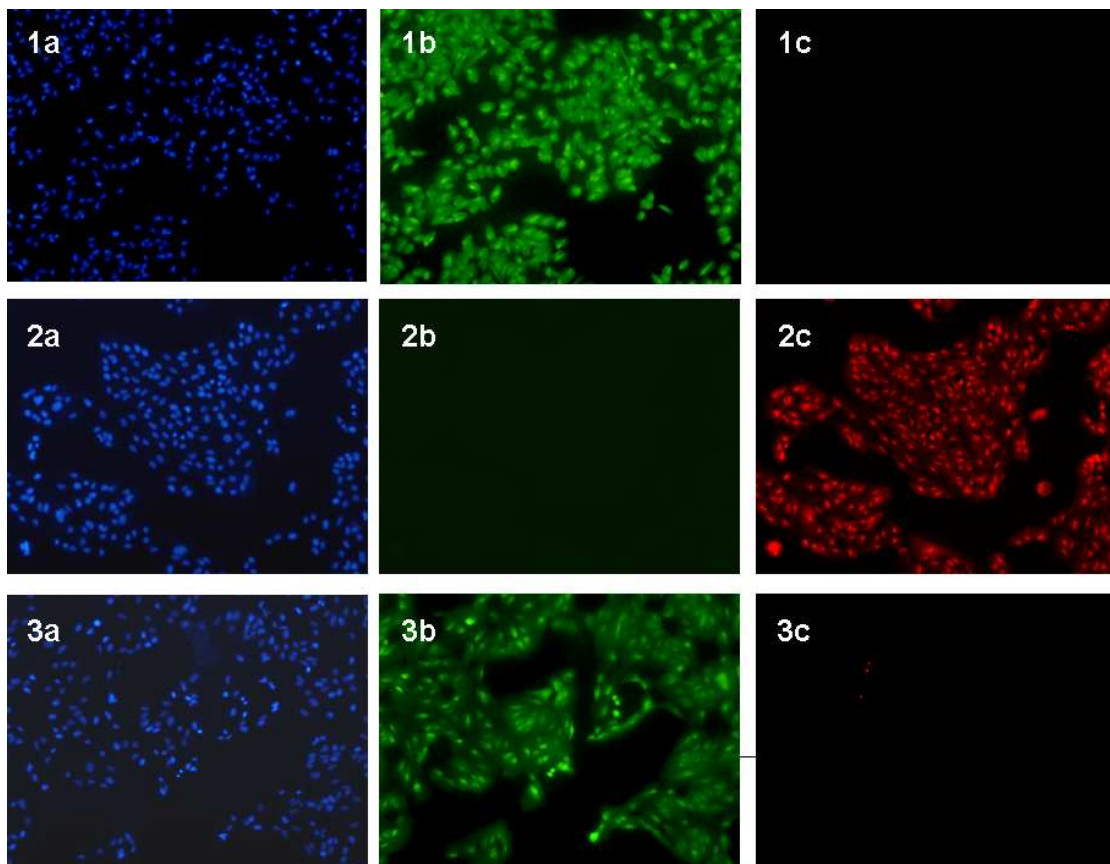


Abb. 8: Life/ Dead/ DAPI-Färbung (Zellkerne blau (a), vitale Zellen grün (b), tote Zellen rot (c)). Als Negativkontrolle diente eine Leerprobe ohne Hyaluronsäure (1 a-c). Für die Positivkontrolle wurden die Zellen mit 70%igem Ethanol abgetötet (2 a-c). Im Vergleich zeigten die Zellen unter Hyaluronsäure-Inkubation nur vereinzelte rote Fluoreszenzen (3 a-c). Die blaue Fluoreszenzfärbung diente der genauen Darstellung der Zellkerne und Ortung der ARPE19-Zellen.

In jeder der drei Gruppen konnten die ARPE19-Zellen durch die blaue Fluoreszenzfärbung der Zellkerne mit DAPI klar dargestellt werden. Die zweite Kontrollgruppe (2) mit vor der Fluoreszenzfärbung abgetöteten Zellen, zeigte dementsprechend zusätzlich rot fluoreszierende und somit tote Zellen (2c) bei fehlenden grünen Fluoreszenzen d. h. lebende Zellen (2b). Im Vergleich zur Kontrollgruppe (1) mit den lebenden Zellen (1b) fanden sich bei der mikroskopischen Betrachtung der angefärbten ARPE19-Zellen unter Inkubation mit 1 %iger HA und Zellkulturmedium für 24 Stunden (3) nur ganz vereinzelt mehr tote Zellen als in der Kontrollgruppe unter Inkubation mit reinem Zellkulturmedium. Die Fluoreszenzfärbung der ARPE19-Zellen zeigte, dass nicht vernetzte 1 %ige Hyaluronsäure die ARPE19-Zellen nicht toxisch zu beeinflusst.

3.1.3 BrdU-Test mit nicht vernetzter Hyaluronsäure

Dieser Test diente zur Quantifizierung der potentiellen pro- oder antiproliferativen Eigenschaften nicht vernetzter Hyaluronsäure. Er wurde wie in Kap. 2.2.5. beschrieben über 24 Stunden mit je einer Ausgangszellzahl von 1×10^4 Zellen/ ml und einer Ausgangszellzahl von 1×10^5 Zellen/ ml durchgeführt. Es wurde wie bei dem Toxizitätstest die in Kap. 3.1.1. hergestellte Verdünnungsreihe der nicht vernetzten Hyaluronsäure als Proben und ARPE19-Zellen eingesetzt.

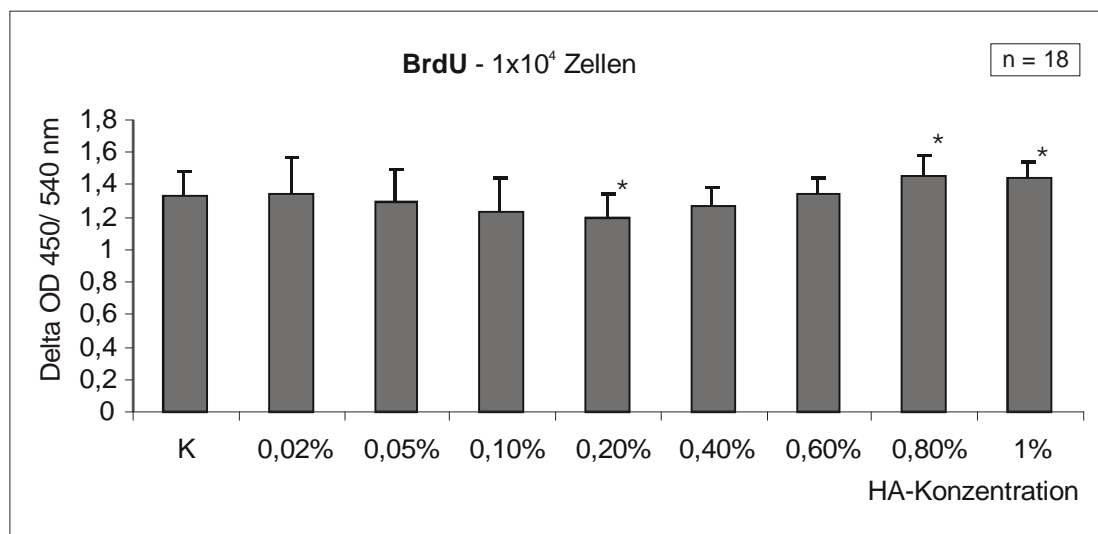


Abb. 9: *BrdU-Test nach 24 Stunden Inkubation mit BrdU-Label im Anschluss nach 24 Stunden Zellinkubation mit steigenden Hyaluronsäurekonzentrationen. Ausgangszellzahl 1×10^4 Zellen/ml. Es waren signifikante Unterschiede im Vergleich zur Kontrolle bei den Hyaluronsäurekonzentrationen 0,2 %, 0,8 % und 1 % Hyaluronsäure zu erkennen ($p < 0,05$; $n = 18$).*

Im BrdU-Test, der mit einer Ausgangszellzahl von 1×10^4 Zellen/ml durchgeführt worden war, zeigte sich ein relativ gleichmäßiges Ergebnis. Die gemessenen OD der steigenden Hyaluronsäurekonzentrationen wichen im Vergleich zur Kontrolle nicht signifikant von der OD der Kontrolle ab. Davon ausgenommen waren jedoch die OD bei der Hyaluronsäurekonzentration von 0,2 %, dessen OD signifikant niedriger war und bei den Hyaluronsäurekonzentrationen 0,8 und 1 %, deren ODs signifikant höher waren als die OD der Kontrolle ($n = 18$; $p < 0,05$: T-Test und Mann-Whitney).

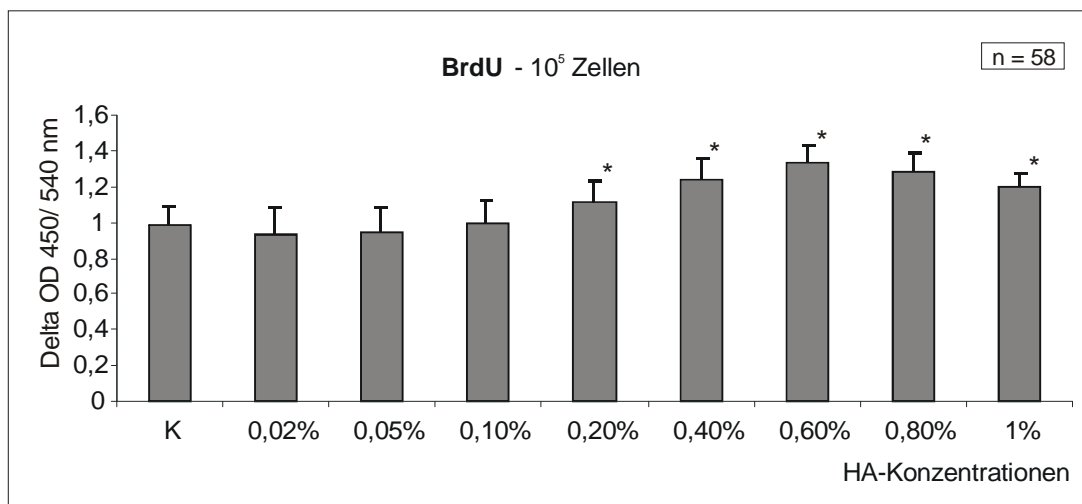


Abb. 10: *BrdU-Test nach 24 Stunden Inkubation mit BrdU-Label im Anschluss nach 24 Stunden Zellinkubation mit steigenden Hyaluronsäurekonzentrationen. Ausgangszellzahl 1×10^5 Zellen/ml. Mit steigender Hyaluronsäurekonzentration zeigte sich eine signifikant höhere proliferative Aktivität der ARPE19-Zellen ab der 0,2 %igen Hyaluronsäure ($p < 0,05$; $n = 58$).*

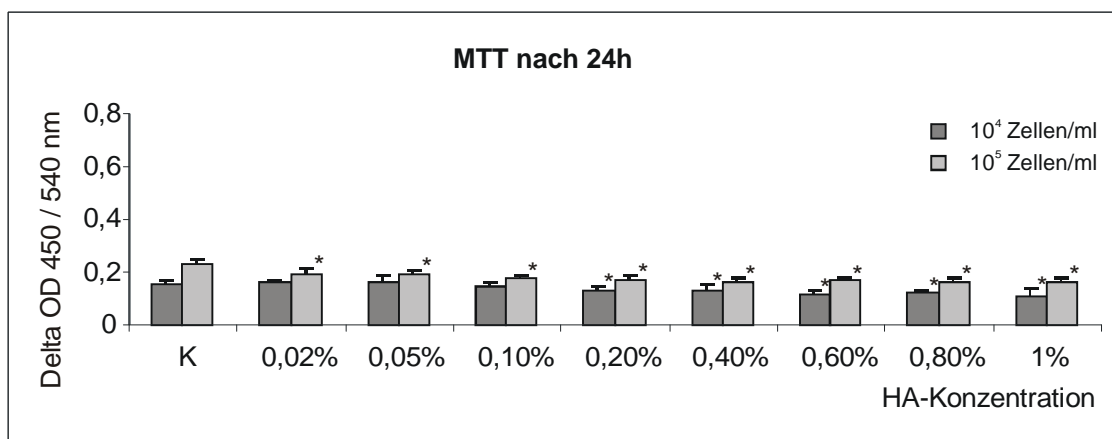
Bei der nochmaligen Testdurchführung mit einer höheren Ausgangszellzahl von 1×10^5 Zellen/ml, das entsprach einer niedrigeren Hyaluronsäuremenge pro Zelle, wurde bei steigender Hyaluronsäurekonzentration signifikant höhere OD gemessen. Die Proliferation der ARPE19-Zellen schien bei einer Hyaluronsäurekonzentration von 0,6 % fast um 40 % höher zu sein als in der Kontrolle. Mit weiter steigender Hyaluronsäurekonzentration schien die proliferative Aktivität jedoch wieder abzunehmen ($n = 18$; $p < 0,05$: T-Test und Mann-Whitney).

Als wichtiger Faktor stellte sich somit bei diesem Test die Ausgangszellzahl heraus. Bei einer Ausgangszellzahl von 1×10^4 Zellen/ml ließen sich zur Kontrolle nur vereinzelt signifikante Unterschiede in der proliferativen Aktivität der ARPE19-Zellen darstellen (Abb.9). Hingegen zeigten sich bei einer Ausgangszellzahl von 1×10^5 Zellen/ml ab einer Hyaluronsäurekonzentration von 0,2 % mit steigender Hyaluronsäurekonzentration signifikant höhere

optische Dichten (OD), welche dann bei 0,8 und 1 % Hyaluronsäure wieder leicht sanken, jedoch auch signifikant zur Kontrollgruppe erhöht waren (Abb. 10). Zusammengefasst schien besonders die Anzahl nicht vernetzter Hyaluronsäuremoleküle pro Zelle einen jeweils unterschiedlichen Einfluss auf die proliferativen Aktivitäten der ARPE19-Zellen zu haben.

3.1.4 MTT-Test mit nicht vernetzter Hyaluronsäure

Der MTT-Test, wie in Kap. 2.2.2. beschrieben, diente sowohl zur Beschreibung der Toxizität, als auch der Bestimmung der Auswirkung auf die Zellproliferation von nicht vernetzter Hyaluronsäure, indem er die mitochondriale Zellaktivität maß. Mit der in Kap. 3.1.1 hergestellten Verdünnungsreihe in ARPE19-Zellmedium wurde der MTT-Test über 1, 3 und 5 Tage einmal mit einer Ausgangszellzahl 1×10^4 Zellen/ ml (ARPE-19-Zellen, n=12) und mit einer Ausgangszellzahl 1×10^5 Zellen/ ml (n=90) durchgeführt. Die Auswertung des MTT-Tests zeigte, dass die mitochondriale Aktivität mit steigender Hyaluronsäurekonzentration im Vergleich zur Kontrolle in beiden Testdurchläufen signifikant niedriger war ($p < 0,05$: T-Test u. Mann-Whitney).



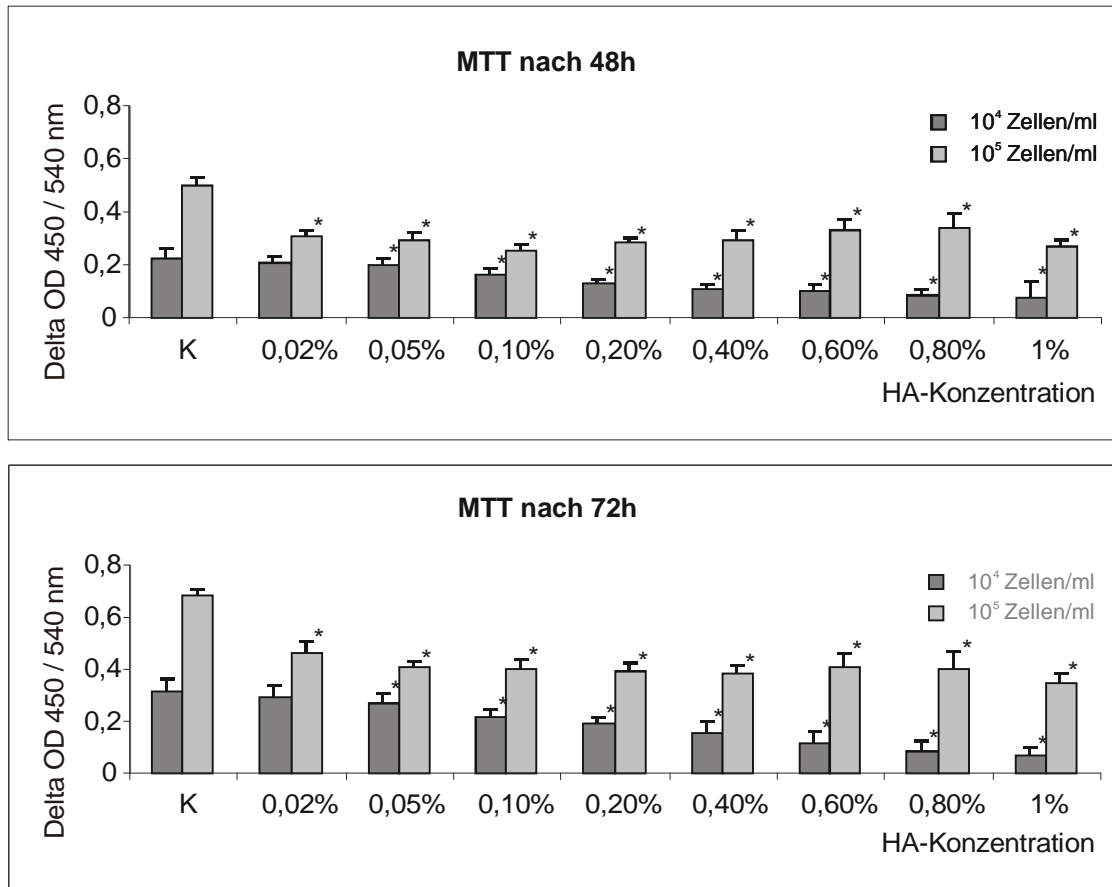


Abb. 11: MTT-Test im Zeitverlauf. Die mitochondriale Aktivität schien mit steigender Hyaluronsäurekonzentration signifikant nachzulassen. Dieser Effekt war prozentual stärker bei einer Ausgangszellzahl von 1×10^4 Zellen/ml als mit 1×10^5 Zellen/ml sichtbar ($p < 0,05$).

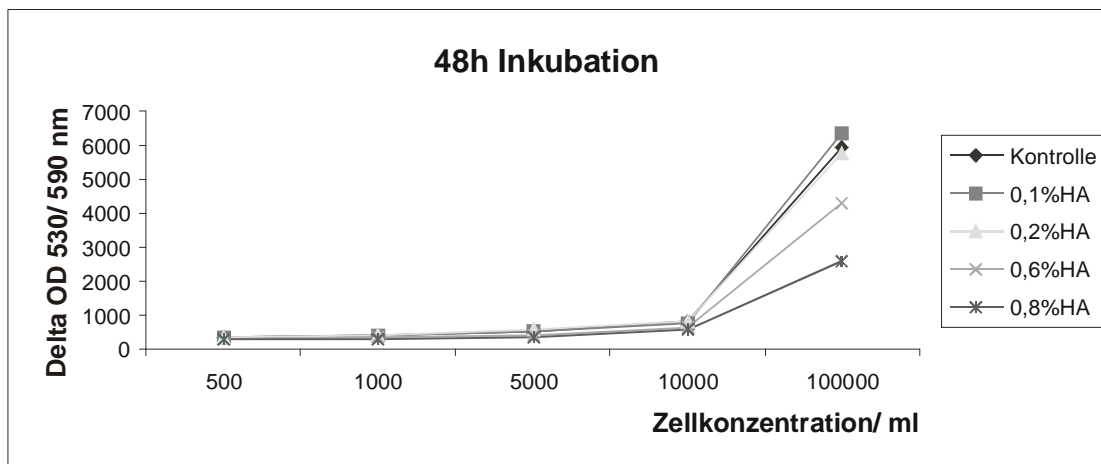
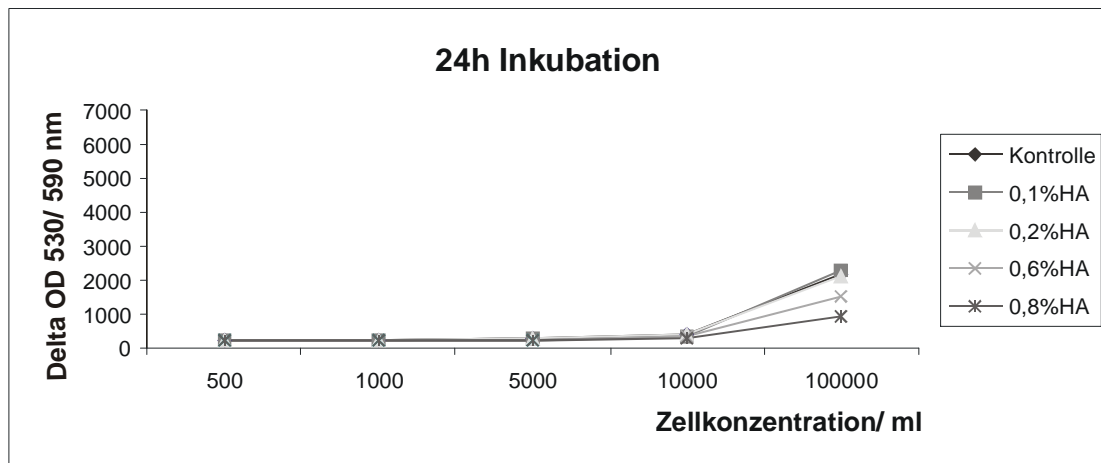
Beim Testdurchlauf mit einer Ausgangszellzahl von 1×10^4 Zellen/ml wurde im Verlauf mit steigender Hyaluronsäurekonzentration eine kontinuierlich fallende mitochondriale Aktivität gemessen. Dagegen blieb das Verhältnis der verschiedenen Hyaluronsäurekonzentration im Testdurchlauf mit einer Ausgangszellzahl von 1×10^5 Zellen/ml im Vergleich zur Kontrolle im Laufe der Tage konstant, doch waren die gemessenen OD der Hyaluronsäurekonzentrationen niedriger als der Mittelwert der Kontrolle. Interessant war, dass zwischen den steigenden Hyaluronsäurekonzentrationen

nur sehr geringe Unterschiede im Vergleich der gemessenen Wellenlängen bestanden.

3.1.5 AlamarBlue® Assay mit nicht vernetzter Hyaluronsäure

Zur Klärung der Frage, warum die mitochondriale Aktivität abnimmt (MTT, Abb. 11), gleichzeitig die proliferative Aktivität aber zunimmt (BrdU, Abb. 10), wurde eine weitere Versuchreihe durchgeführt. Der AlamarBlue® Assay misst ebenso wie der MTT-Test die mitochondriale Aktivität der Zellen mit dem Unterschied, dass der Farbstoff und die Hyaluronsäure von Anfang an zugegeben und die Zellkulturplatten fortlaufend gemessen wird. Auf diese Weise konnte ein Zellverlust von evtl. nicht adhären Zellen bei der Färbung verhindert und Fehler der Messergebnisse durch Unterschiede zwischen den Platten verringert werden. Um gleichzeitig auf die unterschiedliche proliferativen Wirkung von Hyaluronsäure auf ARPE19-Zellen in Abhängigkeit ihrer Menge je Zelle einzugehen, wurden zunächst Zellausgangskonzentrationen von 500-100000 Zellen/ ml unter jeweiliger Inkubation mit verschiedenen Hyaluronsäurekonzentrationen von (0,1 %, 0,2 %, 0,6 % und 0,8%), sowie mit einer Kontrollgruppe eingesetzt (n=2). Die mitochondriale Aktivität dieser Zellen wurde nach 24, 48 und 72 Stunden wie auch beim MTT-Test über die erzielten OD gemessen. Wenn man die einzelnen Gruppen betrachtete, zeigte sich dabei jeweils eine zu erwartende Steigerung der mitochondrialen Aktivität über 72 Stunden. Bei Betrachtung der Messungen einer Reihe mit gleicher Zellausgangszahlkonzentration, stellte man fest, dass sich im Verlauf die mitochondriale Aktivität der Zellen unter Inkubation mit höheren Hyaluronsäurekonzentrationen sich der mitochondrialen Aktivität der Kontrollegruppe stetig annäherten. Im Falle der höchsten Zellausgangskonzentration mit 1×10^5 Zellen/ ml hatte nach 24 Stunden Inkubation die mitochondriale Aktivität der Zellen unter 0,1 und 0,2 %iger Hyaluronsäure die Aktivität der Kontrolle erreicht. Die mitochondriale Aktivität der Zellen unter 0,6 %iger Hyaluronsäure erreichte die Aktivität der Kontrolle

nach 72 Stunden Inkubation. In den Messungen der niedrigeren Zellausgangskonzentrationen zeigten die Zellen unter Hyaluronsäure weniger mitochondriale Aktivität im Vergleich zur Kontrolle, aber auch sie stieg im Verlauf parallel an. Dieses Ergebnis stellt dar, dass unter Inkubation mit Hyaluronsäure die mitochondriale Aktivität der ARPE-Zellen zunächst niedriger ist, sich aber dann der Kontrollgruppe anzugleichen scheint.



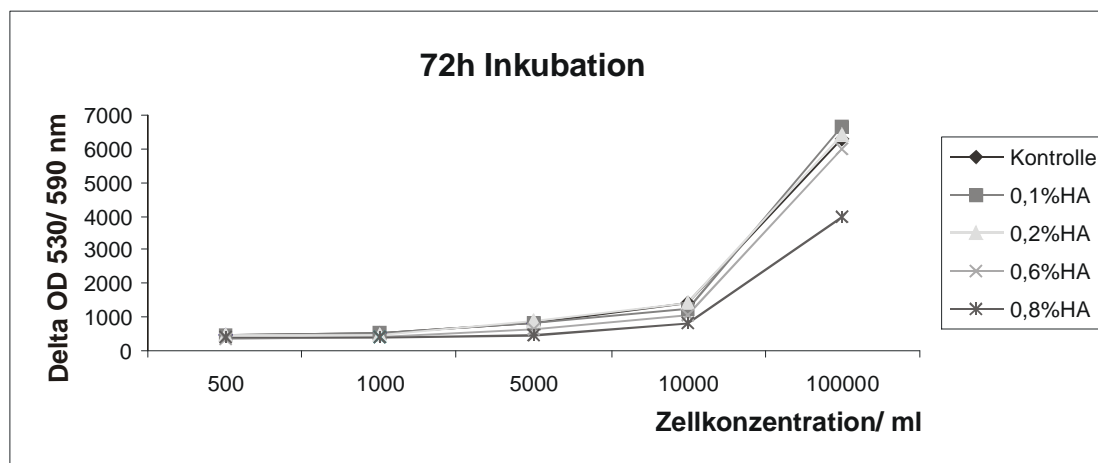


Abb. 12: Testdurchführung mit einer Kontrolle ohne Hyaluronsäure und den Hyaluronsäurekonzentrationen 0,1 %, 0,2 %, 0,6 % und 0,8 %, sowie den Zellausgangskonzentrationen 500 Zellen/ ml, 1000 Zellen/ ml, 5000 Zellen/ ml, 10000 Zellen/ ml und 100000 Zellen/ ml. Die 96-well-Platte wurde nach 24, 48 und 72 Stunden Inkubation im ELISA-Reader (530/ 590 nm) gemessen (n=2). Die mitochondriale Aktivitäten der einzelnen Messgruppen waren bei Betrachtung innerhalb der Zellkonzentrationen zunächst mit steigender Hyaluronsäurekonzentration niedriger als die Kontrolle, näherten sich jedoch im weiteren Verlauf an die mitochondriale Aktivität der Kontrolle an, so dass sich eine steigenden Hemmung bzw. Erniedrigung der mitochondrialen Aktivität unter Inkubation mit steigender Hyaluronsäurekonzentration zeigte. Diese Hemmung wird im Verlauf aufgehoben.

Um dieses Ergebnis besser beurteilen zu können, wurde ein weiterer Testlauf mit den Zellausgangskonzentrationen von 10000 und 100000 Zellen/ ml über fünf Tage durchgeführt, da sich bei diesen Zellkonzentrationen die größten Unterschiede in den mitochondrialen Aktivitäten zur Kontrolle gezeigt hatten (n=12).

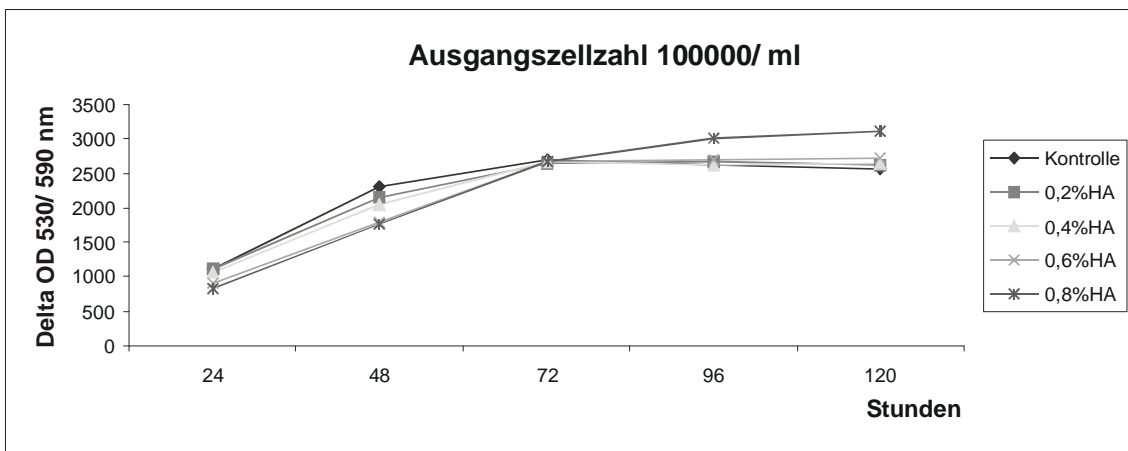
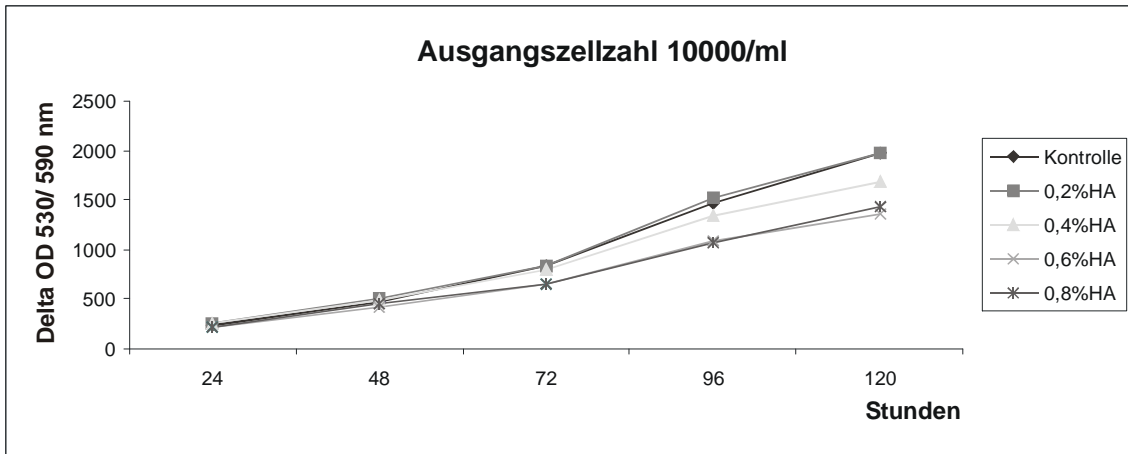


Abb. 13: Testdurchführung mit einer Kontrolle ohne Hyaluronsäure und den Hyaluronsäurekonzentrationen 0,2 %, 0,4 %, 0,6 % und 0,8 %, sowie den Zellausgangskonzentrationen 10000 Zellen/ ml und 100000 Zellen/ ml. Die 96-well-Platten wurde nach 24, 48, 72, 96 und 120 Stunden Inkubation im ELISA-Reader (530/ 590 nm) gemessen (n=12). Auch hier zeigte sich zunächst mit steigender Hyaluronsäurekonzentration eine niedrigere mitochondriale Aktivität, die sich jedoch im weiteren Verlauf an die mitochondriale Aktivität der Kontrolle annäherte so dass das Ergebnis der ersten Versuchsreihe bestätigt wurde. D. h. je höher die Hyaluronsäurekonzentration der die ARPE-Zellen ausgesetzt werden, desto stärker war die mitochondriale Aktivität am Anfang gehemmt. Im weiteren Verlauf verkleinert sich der Unterschied zur Kontrollegruppe.

Der Testlauf mit einer Zellausgangskonzentration von 10000 Zellen/ ml zeigte bei der ersten Messung nach 24 Stunden mit steigenden Hyaluronsäurekonzentrationen im Vergleich zur Kontrolle eine niedrigere mitochondriale Aktivität der Zellen. Im Verlauf der Messungen nach 48, 72, 96 und 120 Stunden nahm bei allen Zellen unter Inkubation mit Hyaluronsäure die mitochondriale Aktivität im Verlauf zu und näherten sich der mitochondrialen Aktivität der Kontrolle an.

Der Testlauf mit einer Zellausgangskonzentration von 100000 Zellen/ ml zeigte im Laufe der Tage ebenfalls bei zunächst niedriger mitochondrialer Aktivität im Vergleich zur Kontrolle mit steigender Hyaluronsäurekonzentration, eine stetige Annäherung der mitochondrialen Aktivität der Zellen unter Inkubation mit Hyaluronsäure an die mitochondriale Aktivität der Kontrolle. Nach 72 Stunden kam es weder bei den ARPE19-Zellen der Kontrollgruppe noch bei den ARPE19-Zellen unter Inkubation mit Hyaluronsäure zu einer Steigerung der mitochondrialen Aktivität, so dass anzunehmen war, dass zu diesem Zeitpunkt die ARPE19-Zellen nicht weiter proliferieren konnten.

Das Ergebnis dieses Versuchs lässt erstens annehmen, dass keine Toxizität von der Hyaluronsäure auszugehen scheint, da die mitochondriale Aktivität zwar zunächst im Vergleich zur Kontrollgruppe niedriger ist, im weiteren Verlauf dann aber steigt und die gleiche Höhe der mitochondrialen Aktivität der Kontrollgruppe erreicht. Der Versuch wirft jedoch die Frage auf, wie es zu dieser anfänglichen Differenz kommt. Eine Annahme wäre, dass die Hyaluronsäure antiadhäsiv wirkt und sich ARPE19-Zellen vom Untergrund lösen. Das würde zu einer Erniedrigung der gemessenen mitochondrialen Aktivität führen. Außerdem würde es das Ergebnis des MTT-Tests erklären, da bei diesem Test durch den Versuchsablauf nicht adhärente Zellen vermutlich abhanden kamen und so den Test verfälschten. Die zweite Annahme wäre eine von der Hyaluronsäure ausgehende proproliferative Wirkung, die zu einer stärkeren Proliferation der verbleibenden ARPE-Zellen und einer Angleichung der mitochondrialen Aktivität führt. Eine gewisse proproliferative Wirkung der Hyaluronsäure ließ auch schon der BrdU-Test vermuten (s. Kap. 3.1.3).

3.1.6 Analyse des Adhäsionsverhaltens von ARPE19-Zellen in Gegenwart nicht vernetzter Hyaluronsäure

Der vorangegangene Versuch ließ vermuten, dass Hyaluronsäure eine antiadhäsive Wirkung auf ARPE-19-Zellen besaß. Ziel dieses Versuches war festzustellen, ob das Adhäsionsverhalten frisch ausgesäter ARPE19-Zellen unter Einfluss von Hyaluronsäure verändert war und so das Ergebnis des AlamarBlue-Testes aus Kap. 3.1.5. unterstützte. Da Hyaluronsäure zudem leichte pro-proliferative Eigenschaften zu besitzen schien und sich proliferierende Zellen kurz von ihrer Umgebung lösen müssen, um proliferieren zu können, konnte es sein, dass ARPE19-Zellen in Anwesenheit nicht vernetzter Hyaluronsäure langsamer adhärten.

Die Adhäsionstestung wurde, wie in Kap. 2.2.6. beschrieben, einmal mit einer Ausgangszellzahl 1×10^4 Zellen/ ml und einer Ausgangszellzahl 1×10^5 Zellen/ ml durchgeführt. Es wurde dazu 0,2 %ige, 0,6 %ige und 1 %ige nicht vernetzte Hyaluronsäure (wie in Kap. 2.1.4.1. beschrieben hergestellt) eingesetzt und die ARPE19-Zellen wurden 24 Stunden ohne oder in Gegenwart der drei Hyaluronsäurekonzentrationen inkubiert. Anschließend wurden die Zellkerne der ARPE19-Zellen mit der DAPI-Fluoreszenzfärbung angefärbt und mikroskopiert.

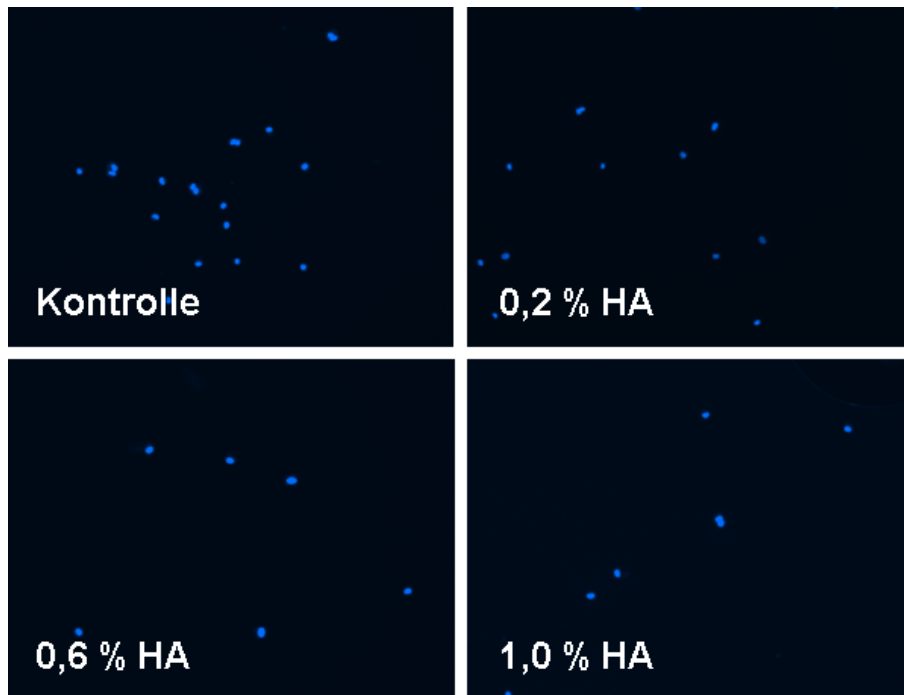


Abb. 14: DAPI-Adhäsionstest mit einer Ausgangszellzahl von 1×10^4 Zellen/ ml. Mit steigender Hyaluronsäurekonzentration zeigte sich eine Abnahme der anhaftenden ARPE19-Zellen auf dem Untergrund.

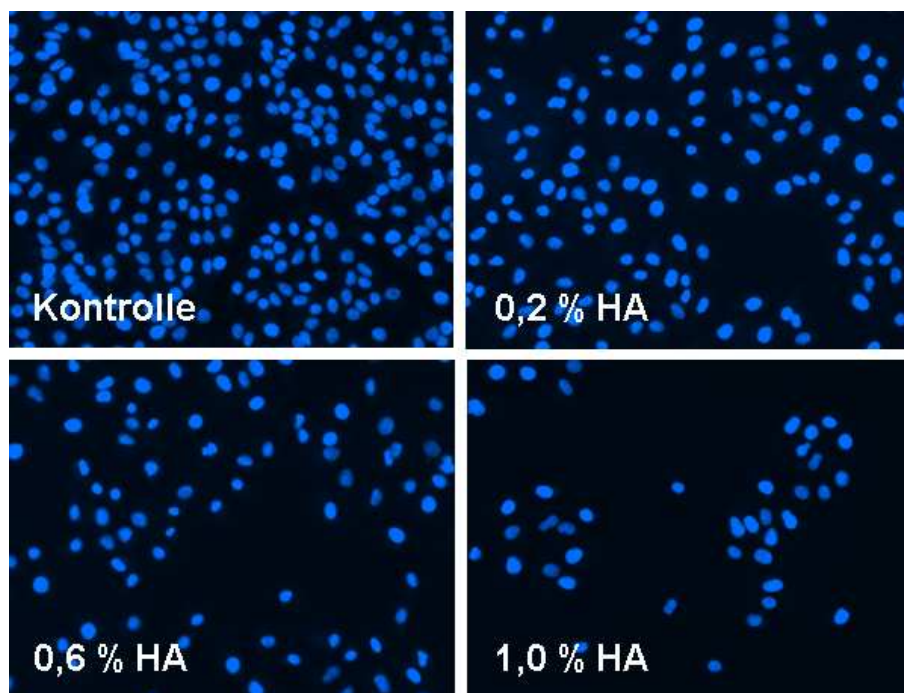


Abb. 15: DAPI-Adhäsionstest mit einer Ausgangszellzahl von 1×10^5 Zellen/ ml. Mit steigender Hyaluronsäurekonzentration zeigte sich eine Abnahme der anhaftenden ARPE19-Zellen auf dem Untergrund.

Sowohl bei einer Ausgangszellzahl von 1×10^4 Zellen/ ml als auch bei einer Ausgangszellzahl 1×10^5 Zellen/ ml zeigte sich mit steigender Hyaluronsäurekonzentration eine deutliche Abnahme der an der Oberfläche adhärenen ARPE19-Zellen. Die statistische Auswertung des Adhäsionstest konnte trotz großen Standardabweichungen dieses Ergebnis deutlich belegen. Die Differenz zwischen 1 %iger Hyaluronsäure und Kontrolle betrug sogar etwas mehr als 50 %, so dass nicht vernetzte Hyaluronsäure deutliche antiadhäsive Eigenschaften zu haben schien (n=9; p<0,05: T-Test).

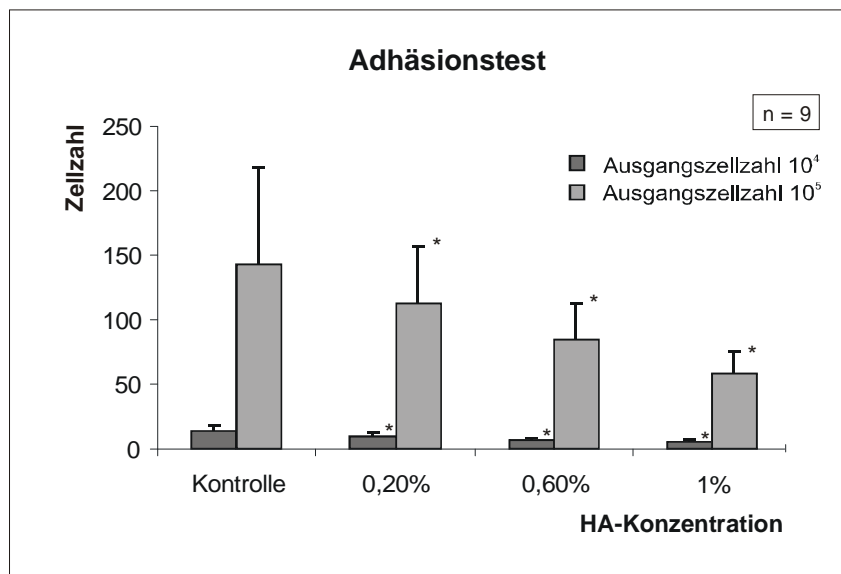


Abb. 16: Mit steigender Hyaluronsäurekonzentration zeigte sich nach 24 Stunden Inkubation sowohl bei einer Ausgangszellzahl von 1×10^4 Zellen/ ml als auch bei einer Ausgangszellzahl von 1×10^5 Zellen/ ml eine signifikante Abnahme der adhärenen Zellen an der Oberfläche nicht beschichteter Plättchen (p<0,05).

3.1.7 Expression des CD44-Rezeptor auf ARPE19-Zellen und unter Inkubation mit 1 %iger Hyaluronsäure

Die vorangegangenen Versuche hatten gezeigt, dass Hyaluronsäure scheinbar antiadhäsiv und proliferativ auf ARPE19-Zellen wirkte. CD44-Rezeptoren (wie auch schon in Kap. 1.2.2. beschrieben) gelten als Hyaluronsäurerezeptoren über welche Hyaluronsäure diesen Einfluss ausüben könnte. Dieser Versuch sollte zeigen, ob proliferierende ARPE19-Zellen CD44-Rezeptoren an ihrer Oberfläche aufweisen und so Hyaluronsäure in die Zelle aufgenommen wurde und dort den Zellmetabolismus beeinflussen konnte. Ein weiteres Ziel dieses Versuches war darzustellen, ob unter Anwesenheit von Hyaluronsäure die ARPE19-Zellen eine Hochregulation von CD44-Rezeptoren im Vergleich zu den Kontrollzellen stattfindet und so eine stärkere Fluoreszenz zu sehen ist.

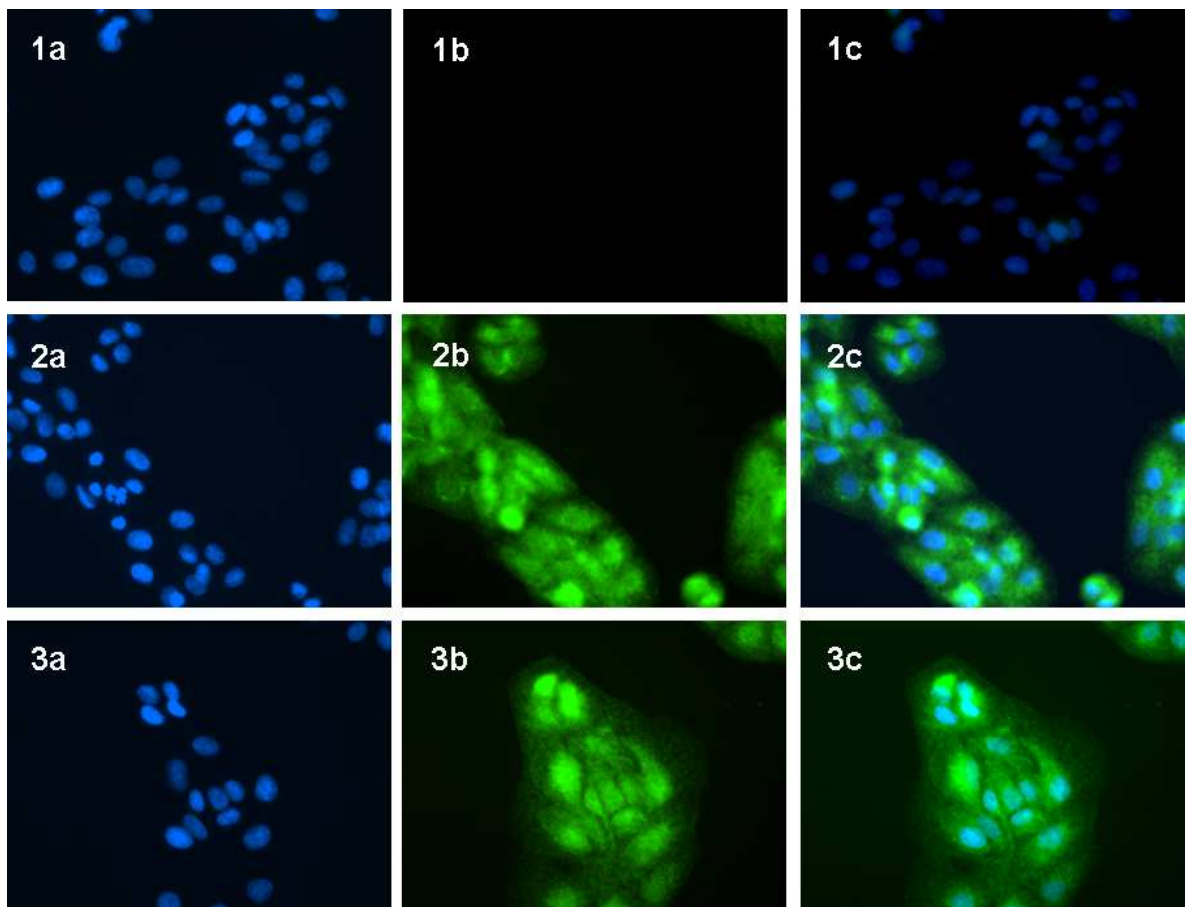


Abb. 17: *CD44-Rezeptor-Immunofärbung auf ARPE19-Zellen. 1 a-c (Negativkontrolle): ARPE19-Testung ohne CD44-Antikörper, mit sekundärem fluoreszierenden Antikörper und anschließender DAPI-Färbung der Zellkerne. 2 a-c (Positivkontrolle): ARPE19-Testung mit CD44- und sekundärem fluoreszierendem Antikörper und anschließender DAPI-Färbung der Zellkerne. 3 a-c: Inkubation von ARPE19-Zellen unter 1 %iger Hyaluronsäure und anschließender Testung mit CD44- und sekundärem fluoreszierendem Antikörper, sowie anschließender DAPI-Färbung. (a=DAPI-Färbung; b=sekundärer fluoreszierender Antikörper; c=Kombination von a&b).*

Im Vergleich zur Negativkontrolle ohne CD44-Antikörper zeigten die Zellfärbungen sowohl der Positivkontrolle als auch der Zellen nach Inkubation mit 1 %iger Hyaluronsäure (Gruppe Nr. 3) eindeutig grüne Fluoreszenzen des sekundären Antikörpers. Ein deutlicher Unterschied in dieser Fluoreszenzintensivität zwischen der Kontrollgruppe und der Zellen nach Inkubation mit 1 %iger Hyaluronsäure ließ sich nicht darstellen. Somit konnten CD44-Rezeptoren auf proliferierenden ARPE19-Zellen sowohl in der Kontrollgruppe als auch unter Inkubation mit Hyaluronsäure nachgewiesen werden. Es konnte jedoch nicht dargestellt werden, ob in Anwesenheit von nicht vernetzter Hyaluronsäure eine Hochregulation der CD44-Rezeptoren auf der Zelloberfläche von ARPE19-Zellen stattfand.

3.2 Quervernetzte Hyaluronsäure

Im zweiten Teil wurde die Herstellung von dreidimensionalen Hyaluronsäure-Hydrogelen aus der in den bisherigen Versuchen getesteten Hyaluronsäure erprobt. Die erste Methode war die Quervernetzung mittels Dihydraziden und

die zweite Methode die Quervernetzung mit Hilfe von N-vinyl-pyrrolidinon und UV-Strahlung. Nach Beurteilung der Gele auf ihre strukturellen Eigenschaften, erfolgte eine Biokompatibilitätstestung auf ARPE19-Zellen.

3.2.1 Quervernetzung von Hyaluronsäure mittels Dihydraziden

Mit dieser Methode konnte eine Quervernetzung von Hyaluronsäure durch den Einsatz von „Adipic dihydrazide 98 % (ADH)“ als Quervernetzer und „N´(3-Dimethylaminopropyl)-N´-ethylcarbodiimid Hydrochlorid 98 % (EDCI)“ als Vermittler der Quervernetzung erreicht werden. Wie in Kap. 2.2.9 beschrieben, wurden hierzu verschiedenen Hyaluronsäure-, ADH- und EDCI-Konzentrationen variiert, um wenn möglich dreidimensionale Gele mit unterschiedlichen Eigenschaften zu erhalten. Insgesamt wurden mit der in Kap. 2.2.9. beschriebenen Methode 12 verschiedene Arten von Hyaluronsäuregelen hergestellt und untersucht, wobei jeweils die ADH/ EDCI Lösungen (10, 20 oder 40 µl) und die Hyaluronsäurekonzentration (0,4 %, 0,6 %, 0,8 % oder 1 %) variiert wurden

Quervernetztes Hyaluronsäuregel	Hyaluronsäure	ADH	EDCI
Nr. 1	1%	10 µl	10 µl
Nr. 2	1%	20 µl	20 µl
Nr. 3	1%	40 µl	40 µl
Nr. 4	0,60%	10 µl	10 µl
Nr. 5	0,60%	20 µl	20 µl
Nr. 6	0,60%	40 µl	40 µl
Nr. 7	0,40%	10 µl	10 µl
Nr. 8	0,40%	20 µl	20 µl
Nr. 9	0,40%	40 µl	40 µl
Nr. 10	0,80%	10 µl	10 µl
Nr. 11	0,80%	20 µl	20 µl
Nr. 12	0,80%	40 µl	40 µl

Abb. 18: Herstellung der quervernetzten Hyaluronsäuregele nach der Dihydrazidmethode

Die Gele wurden jeweils nach der Quervernetzung aus der Form gelöst und in Petrischalen gesetzt, um sie photographisch zu dokumentieren und nach ihrer Formstabilität und Elastizität beurteilen zu können.



Abb. 19: Geltyp Nr. 8 (20 μ l ADH und 20 μ l EDCI/ 8 ml 0,4 %ige Hyaluronsäure)

Die Variationsmöglichkeiten der Parameter bei der Gelherstellungen waren insbesondere durch die Hyaluronsäurekonzentration limitiert. Eine Quervernetzung unter einer Hyaluronsäurekonzentration von 0,6 % führte bei dieser Quervernetzungsmethode zu keinem verwertbaren Ergebnis, da die Gele von sehr flüssiger Konsistenz waren und keine dreidimensionale Struktur bildeten. Ab einer Hyaluronsäurekonzentration von 0,6 % ließen sich die ersten dreidimensionalen Gele herstellen. Sie waren von fester Konsistenz, blieben an Oberflächen etwas haften und benötigten zur Quervernetzung 48 Stunden.



Abb. 20: *Auflicht-Fotographie von quervernetzten Hyaluronsäure-Gelen.
Dargestellt ist die gute optische Transparenz*

Mit den höheren Hyaluronsäurekonzentrationen von 0,8 und 1,0 % war eine Quervernetzung schon nach 24 Stunden möglich. Erstaunlich war, dass bei den Quervernetzungen der Gele vom Typ Nr. 3, Nr. 6 und Nr. 12, die mit je 60 μ l ADH und EDCI, also dem höchsten Gehalt an Quervernetzter produziert wurden, nur eine Teilquervernetzung stattfand. Aufgrund der nicht vollständigen bzw. unregelmäßigen Vernetzung fand man bei diesen Gelen einen flüssigen und einen sehr festen Teil. Die Durchsichtigkeit war bei praktisch allen Gelen gegeben und die entstandenen Gele schienen sich in ihren Eigenschaften sehr ähnlich.

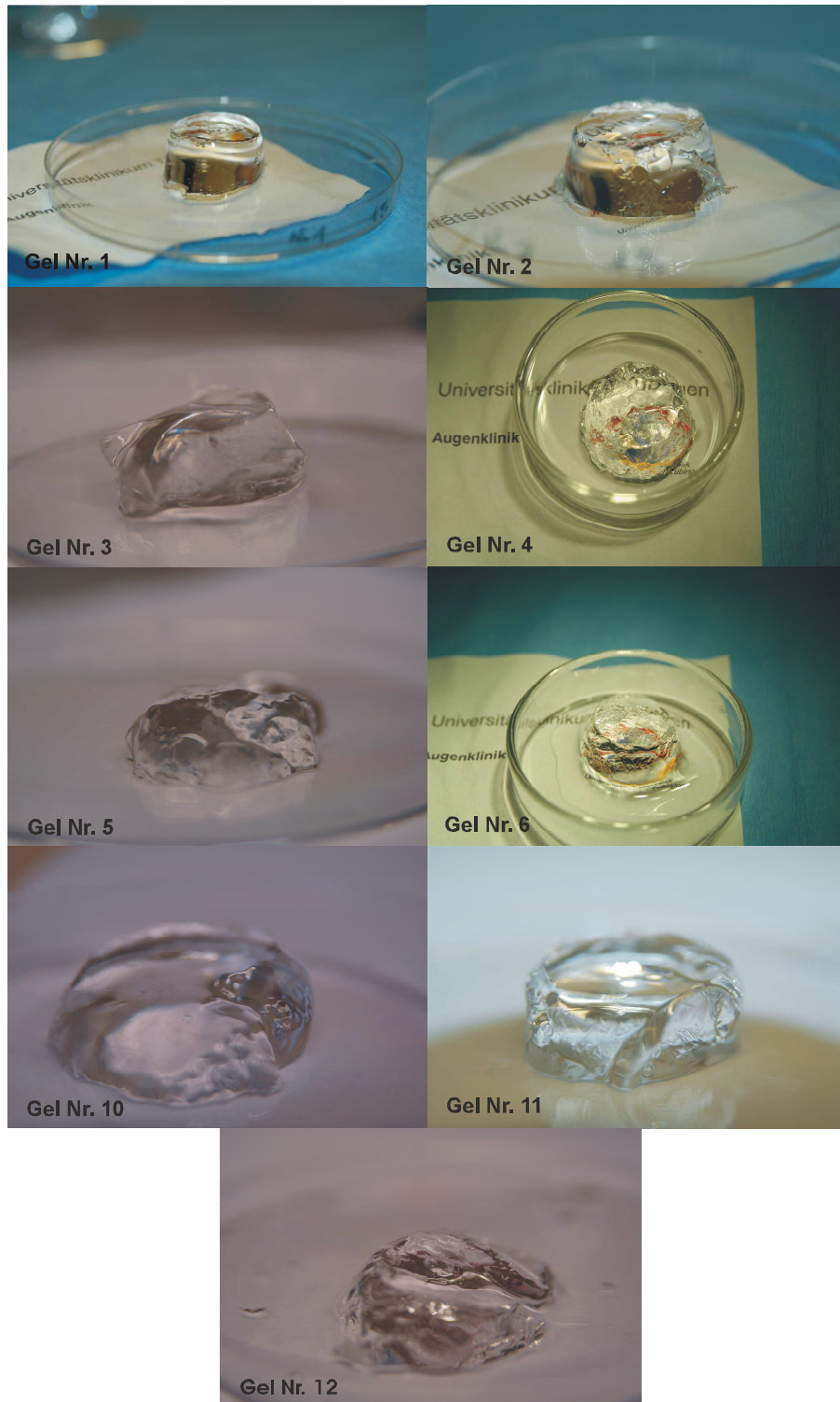


Abb. 21: Quervernetzte Hyaluronsäuregele nach der Dihydrizidmethode. Gele vom Typ Nr. 1-3 bestehend aus 1 %iger Hyaluronsäure, Gele vom Typ Nr. 4-6 aus 0,6 %iger Hyaluronsäure, Gele vom Typ Nr. 10-12 aus 0,8 %iger Hyaluronsäure.

3.2.1.1 Beurteilung der Gele hinsichtlich Formstabilität und Elastizität

Um die Gele untereinander besser vergleichen zu können, wurden zwei Skalen erstens zur Beurteilung der Druckfestigkeit und Elastizität der Gele und zweitens zur Beurteilung der Formstabilität erstellt. Die Skalen hatten die Bereiche 1-10, wobei bei der Skala Druckfestigkeit/ Elastizität der Wert 1 einem sehr harten, der Wert 10 einem sehr weichen und elastischen Gel entsprach. Der Wert 1 der Skala Formstabilität entsprach einer guten dreidimensionalen Form und Stabilität, dagegen der Wert 10 einer fast nicht erkennbaren Form des Gels. Den Gelen wurde jeweils nach subjektiven Empfinden ein entsprechender Wert zugeordnet. Zur Veranschaulichung und zum Vergleich wurden die Gele mit ihren Eigenschaften in Gruppen je nach ihrer Konzentration an ADH und EDCI zusammengefasst.

Dabei zeigte sich, dass in puncto Formstabilität Gele einer Hyaluronsäurekonzentration, abgesehen von den Gelen Nr. 3, 6 und 10 mit ihren Teilvernetzungen, meist gleich liegen. Je höher die Hyaluronsäurekonzentration, desto formstabiler waren die Gele, so dass die Hyaluronsäurekonzentration für die Eigenschaften der entstandenen Gele die größte Rolle zu spielen schien. Die Mengen an ADH und EDCI wirkten sich nur in Zusammenhang mit der direkten Quervernetzung aus, da jeweils eine gewisse Menge für die Quervernetzung der Hyaluronsäure notwendig ist. Ist zu wenig ADH und EDCI da, wird nur ein Teil der Hyaluronsäure quervernetzt. Ist dagegen mehr ADH und EDCI als für die Quervernetzung notwendig da, kommt es zu scheinbar nur zu einer geringfügig stabileren Quervernetzung. Die Komponenten ADH und EDCI stellten sich somit als reine Hilfsmittel zur Quervernetzung der Hyaluronsäure heraus.

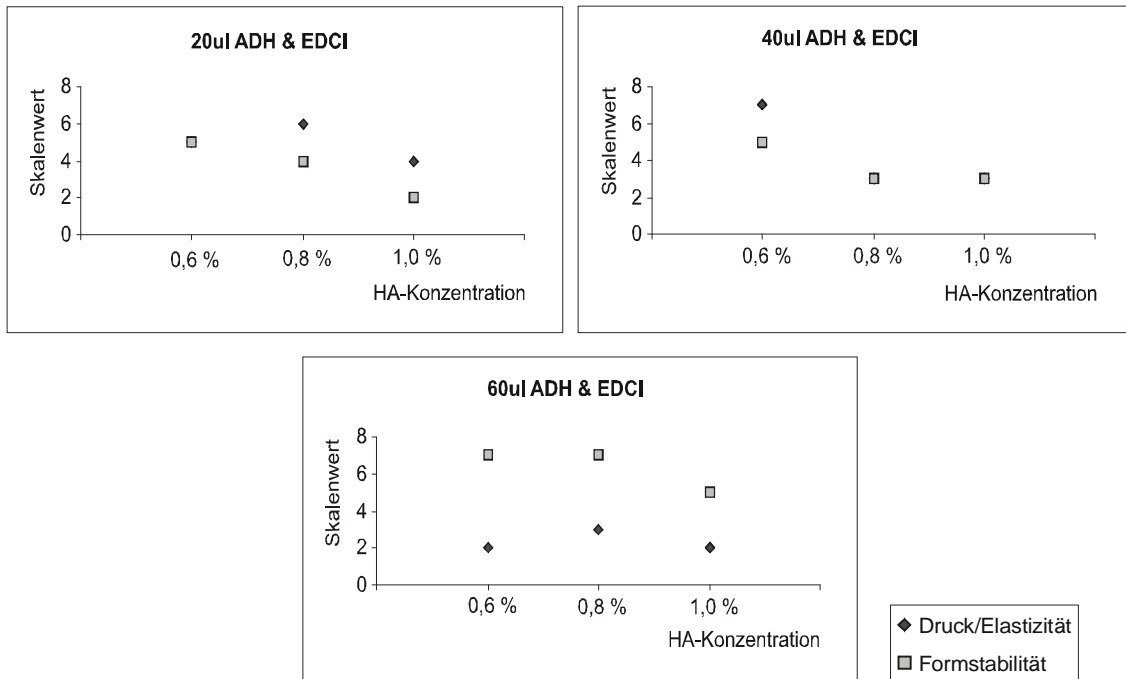


Abb.22: Die Gele wurden in Dreiergruppen nach Gehalt der quervernetzer ADH & EDCI zusammengefasst. Die Skalen hatten die Bereiche 1-10, wobei bei der Skala Druckfestigkeit/Elastizität der Wert 1 einem sehr harten, der Wert 10 einem sehr weichen und elastischen Gel entsprach. Der Wert 1 der Skala Formstabilität entsprach einer guten dreidimensionalen Form und Stabilität, dagegen der Wert 10 einer fast nicht erkennbaren Form des Gels. Die größte Rolle für diese Eigenschaften der Gele stellte sich die Hyaluronsäurekonzentration heraus. Die Komponenten ADH und EDCI dienten nur als Hilfsmittel für die Quervernetzung.

3.2.1.2 Prüfung der pH-Stabilität und Verlauf des Hyaluronsäureabbaus der Gele

Um die Stabilität und Lebensdauer der quervernetzten Gele zu beurteilen, wurde jedes Gel bei Raumtemperatur in 6 ml PBS eingelegt. Das entsprach einem $\frac{3}{4}$ ihres Gesamtvolumens. Um zu testen, ob es bei erhöhten Temperaturen zu einem verstärkten Abbau kommen würde, wurden die Gele in

den letzten zwei Wochen der Messungen im Zellkulturschrank gelagert. Alle ein bis drei Tage wurde das PBS, in das die Gele eingelegt waren, ausgetauscht und die gesammelten Proben ausgewertet. Zuerst wurde mit einem pH-Meter der pH-Wert jeder Probe ermittelt, um zu sehen, wie der pH-Wert durch die Anwesenheit der quervernetzten Hyaluronsäuregele und durch ihren Abbau beeinflusst wurde. Anschließend wurde wie in Kap. 2.2.11. beschrieben, nach der Carbazolmethode die Menge an Hyaluronsäure in den Proben bestimmt. Die abgebaute Menge an Hyaluronsäure wurde jeweils von der Gesamtmenge an Hyaluronsäure im Gel abgezogen. Der Abbau der quervernetzten Hyaluronsäuregele schien sehr langsam zu erfolgen, so dass die Gele für ca. 2,5 Monate beobachtet wurden.

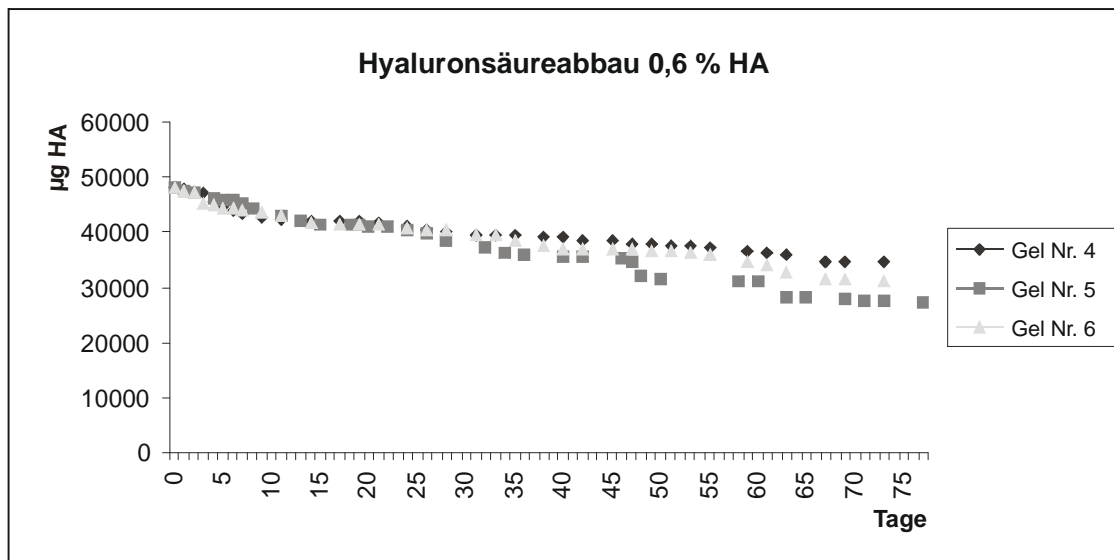


Abb. 23: *Hyaluronsäureverlust aus quervernetztem Hydrogel im Zeitverlauf. Es wurden drei unterschiedliche Quervernetzungen mit 0,6 %iger HA mittels ihres Hyaluronsäureabbaus verglichen. Der HA-Abbau dieser drei Gele war untereinander insgesamt ähnlich, jedoch gab es hier im Vergleich zu den Gelen aus den höheren HA-Konzentrationen stärkere Schwankungen beim HA-Abbau (Der Schnitt lag bei ca. 500 µg/ Probe). Zudem wurde hier insgesamt mehr Hyaluronsäure abgebaut als in den quervernetzten Gelen aus den höheren HA-Konzentrationen.*

Die Gesamtmenge an Hyaluronsäure betrug bei den Gelen aus 0,6 %iger Hyaluronsäure 48 000 µg. Der Hyaluronsäureabbau war unter den drei Gelen relativ ähnlich und betrug innerhalb der ersten zwei Monate ca. 1/3 des Gesamtvolumens. Im Vergleich zu den Gelen aus den höheren Hyaluronsäurekonzentrationen war bei diesen drei Gelen der Hyaluronsäureabbau in den Abgabemengen schwankender und zur Gesamtmenge an Hyaluronsäure wurde zudem am meisten abgebaut (ca. 1/3 der Gesamtmenge an Hyaluronsäure).

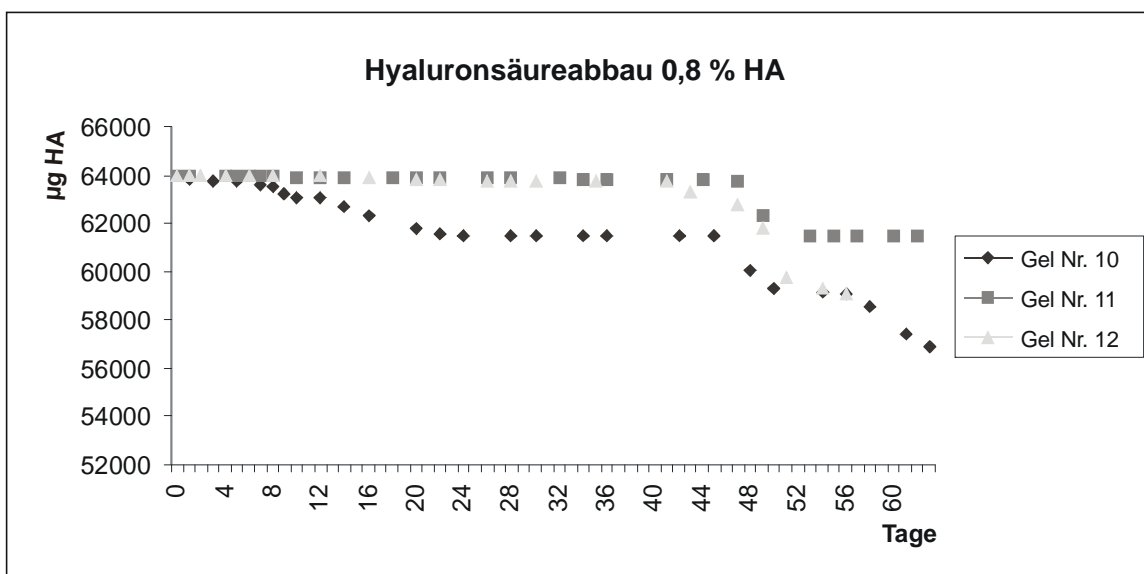


Abb. 24: *Hyaluronsäureverlust aus quervernetztem Hydrogel im Zeitverlauf. Die drei Hyaluronsäuregele aus 0,8 %iger HA wurden in ihrem Abbauverhalten verglichen. In den ersten 40 Tagen zeigte sich hier ein kontinuierlicher niedriger Hyaluronsäure-Abbau. Danach beschleunigte sich der Hyaluronsäure-Abbau etwas und die Hyaluronsäureabgaben waren schwankender. Der Abbau war unter den Gelen ähnlich und nach 60 Tagen waren ca. 10 % der Hyaluronsäure eines Geles abgebaut worden.*

Bei den Gelen aus 0,8 % iger Hyaluronsäure zeigte sich ein relativ gleichmäßiger Hyaluronsäureabbau mit niedrigen Hyaluronsäuremengen bei

einer Anfangs-Hyaluronsäuremenge von 64000 µg. Im weiteren Verlauf (u. a. Lagerung im Zellkulturschrank) kam es dann nach 40 Tagen zu stärkeren Schwankungen der Hyaluronsäureabgabe, wobei diese wiederum in niedrigen Mengen erfolgten. Insgesamt wurde hier ca. 10 % der Gesamthyaluronsäure in ca. 60 Tagen abgebaut.

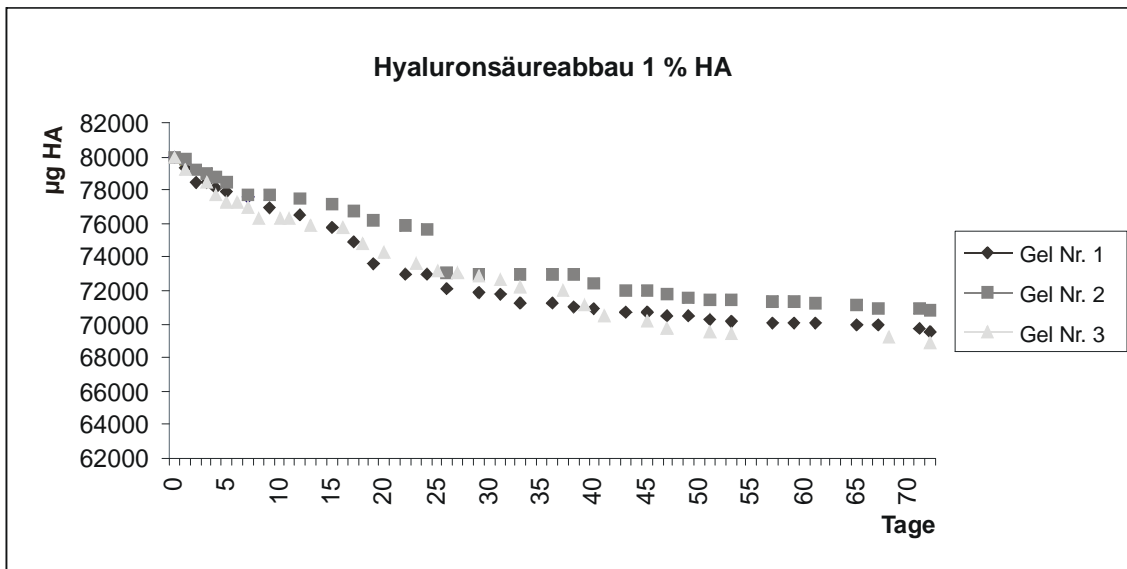


Abb. 25: *Hyaluronsäureverlust aus quervernetztem Hydrogel im Zeitverlauf. Die drei Hyaluronsäuregele aus 1,0 %iger Hyaluronsäure wurden in ihrem Abbauverhalten verglichen. In den ersten Tagen kam es teils zu stärkeren Schwankungen in der Hyaluronsäure-Abgabe, bis sich im weiteren Verlauf eine Abgabe von ca. 200 µg HA / Probe abzuzeichnen schien. Insgesamt wurde in ca. 70 Tagen ungefähr 15 % des Gesamtvolumens an Hyaluronsäure abgebaut.*

Die Gele aus 1 % iger Hyaluronsäure hatten am Anfang höhere Freisetzung von Hyaluronsäure. Hier fiel v. a. das Gel Nr. 1 mit einer durchschnittlichen Hyaluronsäureabgabe von 700 µg/ Probe auf. Im weiteren Verlauf pendelten sich die abgegebenen Hyaluronsäuremengen auf ca. 200 µg/ Probe auf einem niedrigen Niveau ein. Auch während der Zeit im Zellkulturschrank änderte sich diese Menge kaum. Insgesamt wurden bei einer Anfangsmenge von 80000 µg

Hyaluronsäure ca. 14 % in 72 Tagen abgegeben. Zusammengefasst schienen die Hyaluronsäuregele aus 1 %iger Hyaluronsäure den gleichmäßigsten Abbau mit konstant niedrigen Hyaluronsäureabgaben zu zeigen.

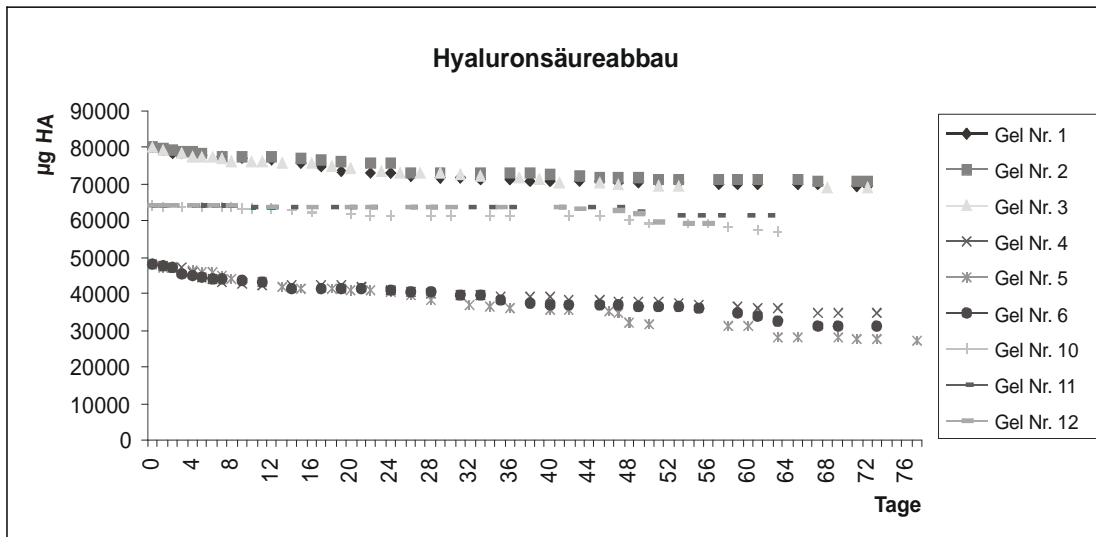


Abb. 26: Überblick über die Hyaluronsäureabgabe aller neun Gele. Die Gele aus 0,8 %iger und 1 %iger HA zeigten einen langsameren Abbau im Vergleich zu den Gelen aus 0,6 %iger HA. Insgesamt zeichnete sich ein konstanter Abbau der Gele ab.

Die pH-Werte der entnommenen Proben lagen zwischen pH 5,64-7,51. Es gab aber vereinzelt sehr niedrigere pH-Werte von einem pH 3-5, die v. a. bei den Gelen Nr. 3 und 10 zu finden waren. Ein Korrelat bei der Hyaluronsäureabgabe, um dies zu erklären, war nicht zu finden. Eine pH-Stabilität der Umgebung war somit nicht sicher gewährleistet.

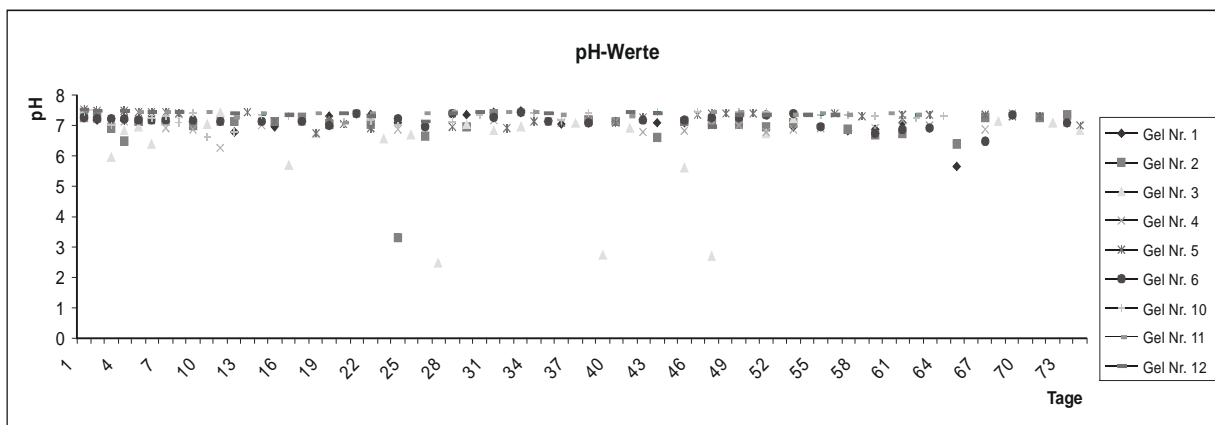


Abb. 27: Darstellung der pH-Werte aus den PBS-Proben der neun Gele. Die meisten Werte lagen um den pH 7. Bei den Gelen 3 und 10 wurden mehrmals niedrige pH-Werte gemessen. Es konnte hier jedoch kein Korrelat zu einer höheren Hyaluronsäureabgabe der Probe aufgezeigt werden.

3.1.2.3 MTT-Test mit den PBS-Hyaluronsäureproben aus dem Hyaluronsäureabbau

Die übrigen PBS-Hyaluronsäureproben aus dem Kap. 3.2.1.2. waren nach der Versuchsdurchführung wieder tiefgefroren worden. Von diesen eingelagerten Proben wurden vier PBS-Hyaluronsäureproben ausgewählt und über 24 Stunden der MTT -Test wie in Kap. 2.2.2. beschrieben durchgeführt. Dieser Versuch sollte zeigen, ob bei dem Abbau der quervernetzten Hyaluronsäure toxische Substanzen entstanden waren bzw. die mitochondriale Aktivität der ARPE19-Zellen beeinträchtigt wurde. Es wurden folgende vier Proben eingesetzt:

	ug HA/ ml	pH
Probe 1	127,92	7,51
Probe 2	123,56	5,95
Probe 3	127,78	6,81
Probe 4	70,04	6,97

Das Verhältnis der im MTT-Test eingesetzten PBS-Hyaluronsäureproben zum ARPE19-Zellmedium war 1:1. Aufgrund des insgesamt niedrigen ARPE19-Zellmediumsgehaltes in der Testdurchführung wurde der Test nur über 24 Stunden geführt.

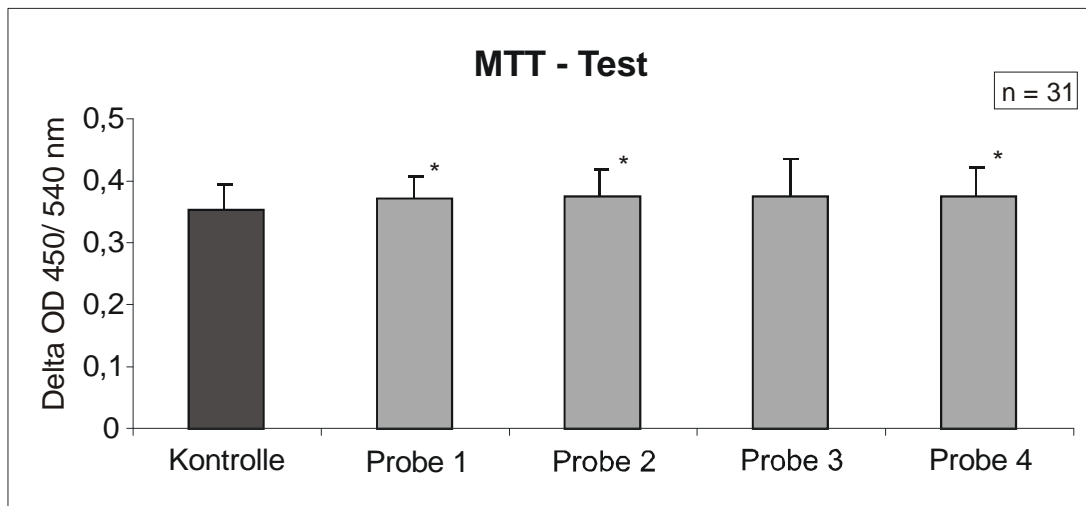


Abb. 28: MTT-Test mit PBS-Proben aus dem Hyaluronsäureabbau. Die mitochondriale Aktivität der Zellen zeigte sich im Vergleich zur Kontrolle durch die PBS-Proben signifikant gesteigert ($p < 0,05$).

Der MTT-Test mit den PBS-Hyaluronsäureproben zeigte, dass es unter Inkubation mit diesen im Vergleich zur Kontrolle zu einer gesteigerten mitochondrialen Aktivität der APRE19-Zellen kam ($p < 0,05$; T-Test; $n = 31$). Somit scheinen die Abbauprodukte der quervernetzten Hyaluronsäuregele auf jeden Fall nicht toxisch zu sein, sondern eher etwas pro proliferativ zu wirken.

3.2.1.4 Wirkung quervernetzter Hyaluronsäure auf ARPE19-Zellen

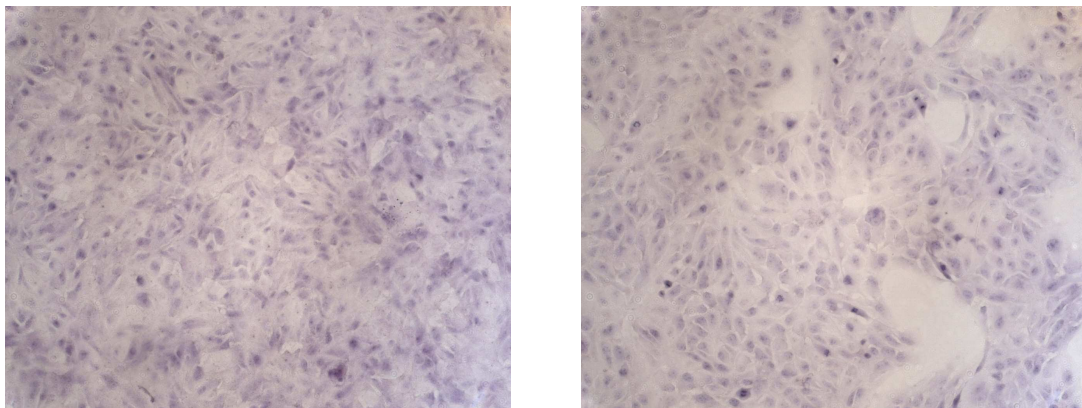
Die quervernetzten Gele aus 1 %iger Hyaluronsäure schienen aufgrund ihrer bisher getesteten Eigenschaften geeignet, um sie für weitere Versuche einzusetzen. Nach Herstellung der quervernetzten Hyaluronsäuregele wurden

diese für drei Tage gegen PBS (Herstellung s. Kap. 2.1.4.4.) vorsichtig dialysiert, um die restlichen toxischen EDCI-Moleküle zu lösen und aus den quervernetzten Hyaluronsäuregelen zu entfernen.

3.2.1.4.1 ARPE19-Zellen unter Inkubation mit quervernetzter Hyaluronsäure und anschließender HE-Färbung

Dieser Versuch sollte darstellen, ob quervernetzte Hyaluronsäure einen großen Einfluss auf ARPE19-Zellen hat. Dafür wurden ARPE19-Zellen mit quervernetzter Hyaluronsäure wie in Kap. 2.2.12. beschrieben für einen und für drei Tage inkubiert und anschließend mit HE-Lösung gefärbt.

Die HE-Färbungen nach einem und nach drei Tagen zeigten zwischen den ARPE19-Zellen unter Inkubation mit und ohne quervernetzter Hyaluronsäure nach einem Tag Inkubation noch keinen sichtbaren Unterschied. Die Zellgefüge schienen intakt und das Wachstum zeigte sich unter Inkubation mit quervernetzter Hyaluronsäure im Vergleich zur Kontrolle nicht gehemmt.



***Abb. 29:** ARPE19-Zellen nach einem Tag Inkubation: links ohne, rechts unter Inkubation mit einem quervernetzten Hyaluronsäuregel. Es zeigten sich keine großen Unterschiede.*

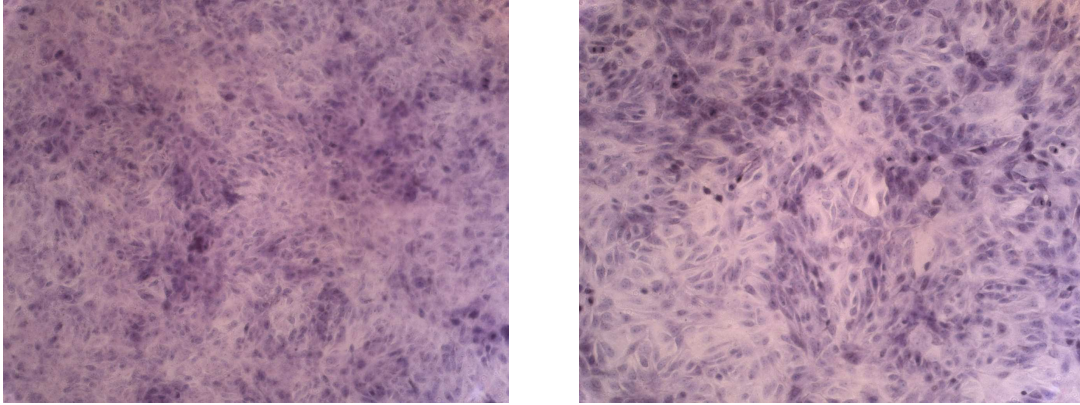


Abb. 30: ARPE19-Zellen nach drei Tagen Inkubation: links ohne, rechts unter Inkubation mit einem quervernetzten Hyaluronsäuregel. Die ARPE19-Zellen unter Inkubation mit dem quervernetzten Hyaluronsäuregel schienen in ihrem Zell-Zell-Kontakt nicht so dicht, sondern etwas aufgelockert.

Bei der HE-Färbung nach drei Tagen schien allerdings der Zellrasen unter Inkubation mit quervernetzter Hyaluronsäure intakt, aber leicht aufgelockert und nicht ganz so dicht wie in der Kontrollgruppe, so dass dies eventuell auf eine leichte antiproliferative, toxische oder antiadhäsive Wirkung schließen lassen konnte. Da durch diese Färbung keine Unterscheidung zwischen toten und lebenden ARPE19-Zellen getroffen werden konnte, wurden weitere Versuche angeschlossen.

3.2.1.4.2 Life/ Dead/ Dapi-Fluoreszenzfärbung

Wie zuvor mit der nicht vernetzten Hyaluronsäure (s. Kap. 3.1.3.) wurde mit dem quervernetzten Hyaluronsäuregel die Life/ Dead/ Dapi-Fluoreszenzfärbung wie in Kap. 2.2.4 und 2.2.6. beschrieben durchgeführt. Mit Hilfe der Life/ Dead/ Dapi -Fluoreszenzfärbung sollte die evtl. toxische Wirkung auf ARPE19-Zellen der quervernetzten Hyaluronsäure dargestellt werden.

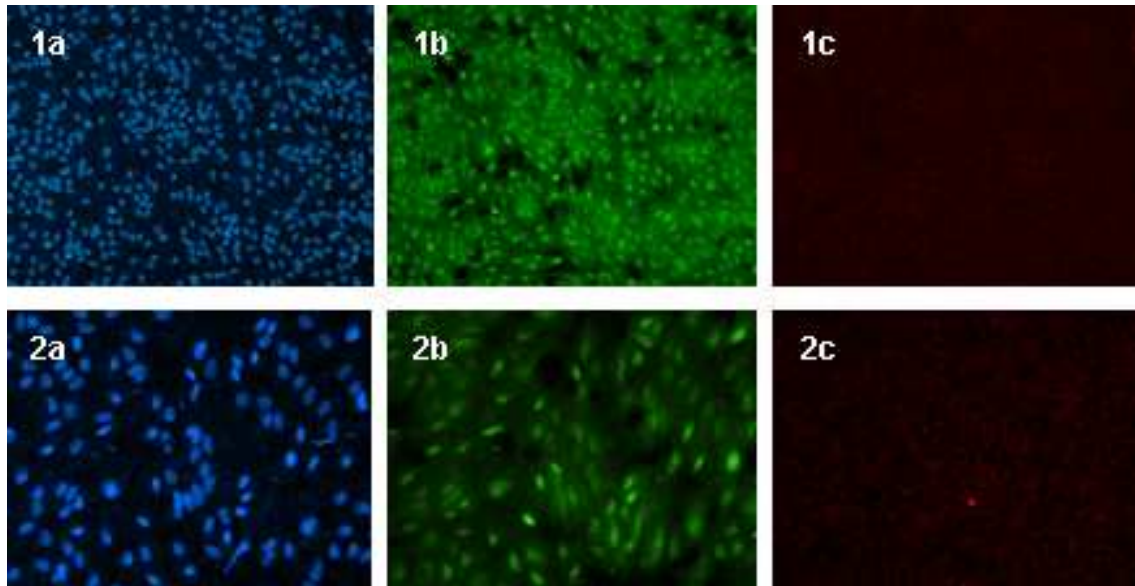


Abb. 31: *Negativkontrolle nach Life/ Dead/ Dapi-Fluoreszenzfärbung; Inkubation der ARPE19-Zellen ohne das Vorhandensein quervernetzter Hyaluronsäure. (a= blaue Zellkerne; b= grüne lebende Zellen; c= tote rote Zellen; Reihe 1: 20 fache- Reihe 2: 40fache Vergrößerung)*

Bei den ARPE19-Zellen, die als Kontrollgruppe nur mit ARPE19-Zellmedium inkubiert wurden, zeigten sich nach der Dreifachfärbung vereinzelt rote fluoreszierende Anteile, d. h. kaum tote Zellen. Auch zeigte sich eine homogene blaue Färbung der Zellkerne, so dass von einem gleichmäßigen Zellrasen, -wachstum auszugehen war.

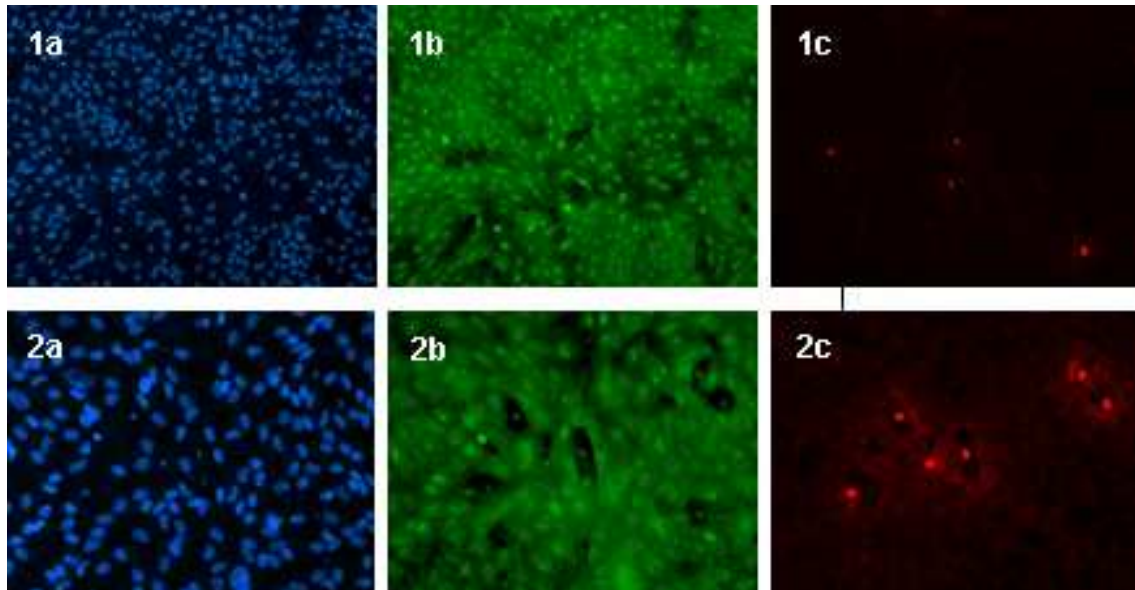


Abb. 32: Life/ Dead/ Dapi-Fluoreszenzfärbung von ARPE19-Zellen nach Inkubation mit einem quervernetzter Hyaluronsäuregel. (a= blaue Zellkerne; b= grüne lebende Zellen; c= tote rote Zellen; Reihe 1: 20 fache- Reihe 2: 40fache Vergrößerung)

Die anschließende Fluoreszenzfärbungen der ARPE19-Zellen, die mit dem quervernetzten Hyaluronsäuregel inkubiert worden waren, zeigten sich stellenweise homogene Zellrasen mit vereinzelt toten Zellen. Jedoch fanden sich bei der Übersichtsmikroskopierung auch teilweise aufgebrochene Zellrasen mit dort gruppierten mehreren roten Fluoreszenzen, also tote Zellen. Dies ließ darauf schließen, dass eine leichte antiadhäsive und eventuell auch toxische Wirkung von den quervernetzten Hyaluronsäuregelen ausging, da sich in der Kontrollgruppe der ARPE19-Zellen keine aufgebrochenen Zellrasen gezeigt hatten. Es schien teilweise keine feste Adhäsion zu bestehen, so dass es bei stärkeren mechanischen Kräften zu einer Lösung von ARPE19-Zellen kam.

3.2.1.4.3 MTT-Test mit quervernetzter Hyaluronsäure

Der MTT-Test wurde durchgeführt, um die Wirkung der quervernetzten Hyaluronsäure auf die mitochondriale Aktivität von ARPE19-Zellen zu analysieren. Wie schon mit der nicht vernetzten Hyaluronsäure wurde der MTT-Test einmal mit einer Ausgangszellzahl von 1×10^4 Zellen/ ml und mit einer Ausgangszellzahl von 1×10^5 Zellen/ ml durchgeführt und sollte dadurch einen Hinweis auf eventuelle toxische oder anti- bzw. pro proliferative Eigenschaften von quervernetzter Hyaluronsäure, auch im Vergleich zu nicht vernetzter Hyaluronsäure, geben. Die Inkubation der Kulturplatten erfolgte über 1, 3, 5 und 7 Tage (n=30).

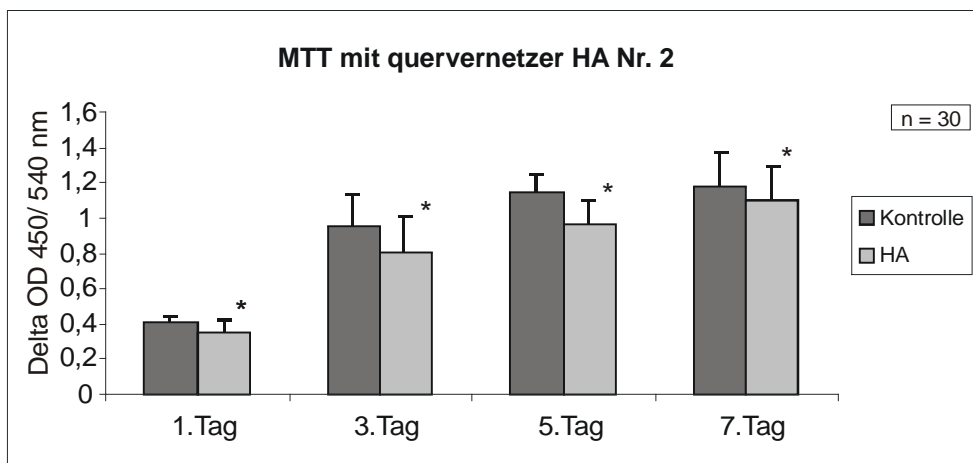
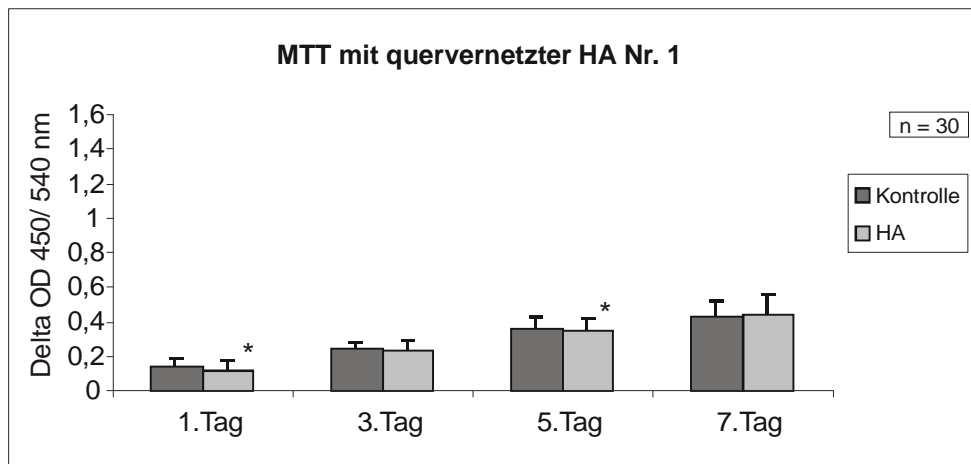


Abb. 33: *MTT-Test mit quervernetzter Hyaluronsäure nach 1, 3, 5 und 7 Tagen Inkubation. Der MTT-Test Nr. 1 wurde mit einer Ausgangszellzahl von 1×10^4 Zellen/ ml und der MTT-Test Nr. 2 mit einer Ausgangszellzahl von 1×10^5 durchgeführt. Im MTT-Test Nr.1 zeigten sich nach 1 und nach 5 Tagen signifikante Unterschiede in der mitochondrialen Aktivität im Vergleich zur Kontrolle - sie schien dort niedriger zu sein. Im MTT-Test Nr.2 zeigte sich deutlich jeweils ein signifikanter Unterschied der mitochondrialen Aktivität im Vergleich zur Kontrolle ($p < 0,05$). Bei beiden Versuchsreihen verringerte sich jedoch im Verlauf die Differenz zur mitochondrialen Aktivität der Kontrolle.*

Im MTT mit einer Ausgangszellzahl von 1×10^4 Zellen/ ml zeigten sich nach einem und nach fünf Tagen signifikante Unterschiede in der mitochondrialen Aktivität im Vergleich zur Kontrolle ($p < 0,05$; T-Test). Die mitochondriale Aktivität der ARPE19-Zellen schien unter quervernetzter Hyaluronsäure niedriger zu sein. Allerdings verringerte sich der Unterschied zur mitochondrialen Aktivität der Kontrolle im Verlauf. Im MTT mit einer höheren Ausgangszellzahl von 1×10^5 Zellen/ ml waren die Unterschiede zur Kontrolle deutlicher und es zeigten sich jeweils signifikante Unterschiede der mitochondrialen Aktivität im Vergleich zur Kontrolle ($p < 0,05$; T-Test). Im Versuchsverlauf verringerte sich die Differenz zur Kontrolle jedoch deutlich und die mitochondriale Aktivität der ARPE19-Zellen unter Inkubation mit den quervernetzten Hyaluronsäuregelen näherte sich denen der Kontrollgruppe an.

In beiden Testdurchführungen verringerte sich im Versuchsverlauf der Unterschied der mitochondrialen Aktivität unter Inkubation mit quervernetzter Hyaluronsäure im Vergleich zur Kontrollgruppe. Um auch hier eine genauere Aussage bezüglich des Ergebnisses treffen zu können und wie im Fall der nicht vernetzten Hyaluronsäure pro-proliferative bzw. antiadhäsive Eigenschaften zu berücksichtigen, wurde zusätzlich der AlamarBlue® Assay durchgeführt.

3.2.1.4.4 AlamarBlue® Assay mit quervernetzter Hyaluronsäure

Der AlamarBlue® Assay wurde mit quervernetzter Hyaluronsäure durchgeführt, da sich in den vorangegangenen Versuchen mit nicht vernetzter Hyaluronsäure eine antiadhäsive Eigenschaft von Hyaluronsäure herausgestellt hatte und dadurch das Ergebnis des MTT-Test`s beeinflusst werden könnte (s. Kap 3.2.1.4.3.). Aus diesem Grund wurde wie bei der nicht vernetzten Hyaluronsäure zusätzlich der AlamarBlue® Assay durchgeführt, der wie der MTT-Test die mitochondriale Aktivität von Zellen misst allerdings unter vitalen Bedingungen. Der AlamarBlue® Assay wurde über 24 und 48 Stunden mit einer Ausgangszellzahl von 1×10^5 Zellen/ ml (ARPE19-Zellen) durchgeführt.

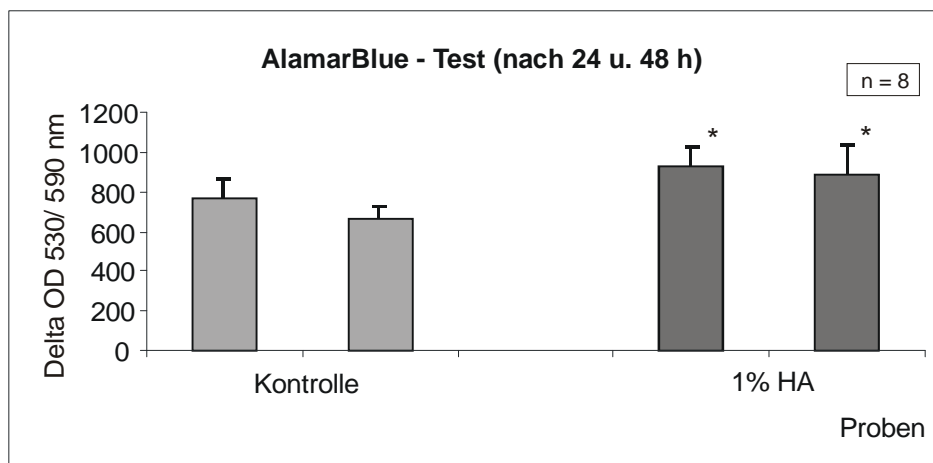


Abb. 34: *AlamarBlue® Assay wurde über 24 und 48 Stunden mit einer Ausgangszellzahl von 1×10^5 Zellen/ ml durchgeführt. Es zeigte sich jeweils eine signifikante Erhöhung der mitochondrialen Aktivität unter Inkubation mit quervernetzter Hyaluronsäure im Vergleich zur Kontrollgruppe ($p < 0,05$).*

Die Unterschiede der mitochondrialen Aktivität zwischen der Kontrollgruppe und den ARPE19-Zellen unter Inkubation mit dem quervernetzten Hyaluronsäuregel waren nach 24 und 48 Stunden Inkubationszeit signifikant. Die mitochondriale

Aktivität war im Vergleich zur Kontrollgruppe jeweils signifikant erhöht ($p < 0,05$: T-Test; $n=8$). Nach 48 Stunden schien das AlamarBlue® jedoch verbraucht, so dass es bei der zweiten Messung zu einem gleichmäßigen Abfall bei der Kontrollgruppe und den ARPE19-Zellen unter Inkubation mit dem quervernetzten Hyaluronsäuregel kam und das Ergebnis nach 48 Stunden nur bedingt zu deuten war.

Das Ergebnis des AlamarBlue® Assay wies nun auf pro-proliferative Eigenschaften der quervernetzten Hyaluronsäure hin. Dies würde zusammen mit der scheinbar leichten antiadhäsiven Wirkung der quervernetzten Hyaluronsäure das Ergebnis des MTT-Testes erklären.

3.2.2 Quervernetzung von Hyaluronsäure mittels UV-Strahlung und N-vinyl-pyrrolidinon

Eine Quervernetzung durch UV-Strahlen ist eine weitere Möglichkeit um dreidimensionale Hyaluronsäuregele herzustellen. Als Grundsubstanzen dienten bei dieser Methode Glycidylmethacrylate, welche mit Hyaluronsäure konjugiert wurden. Als Vermittler der Quervernetzung diente N-vinyl-pyrrolidinon.

3.2.2.1 Herstellung des Hyaluronsäuregels

Die Hyaluronsäuregele konnte wie in Kap. 2.2.10. beschrieben hergestellt werden. Die dabei entstandenen Gele hatten die gleichen Eigenschaften wie die bisherigen Gele, die mittels Dihydraziden als Quervernetzer entstanden waren. Die Gele waren durchsichtig, formstabil und dabei elastisch.

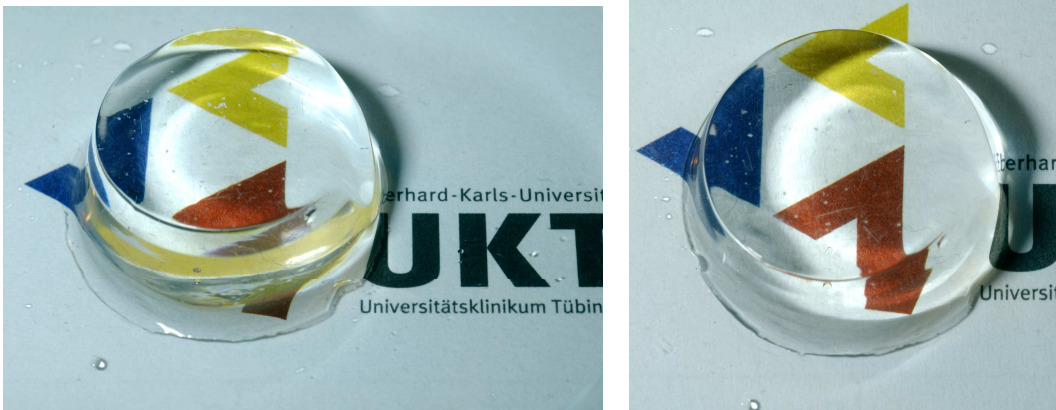


Abb 35: *Mittels UV-Licht quervernetzte Hyaluronsäure von der Seite und von oben. Das Gel war formstabil und transparent.*

3.2.2.2 **Abbau des quervernetzten Hyaluronsäuregels**

Durch die photometrische Messung des Abbauproduktes Uronsäure war es möglich den Abbau des Hyaluronsäuregels zu dokumentieren. Dafür wurden zwei quervernetzte Hyaluronsäuregele in 5 ml PBS eingelegt und dies wurden über gut vier Wochen alle zwei bis drei Tage gewechselt und die PBS-Proben gesammelt. Anschließend wurde der Gehalt an Hyaluronsäure und der pH-Wert der PBS-Proben gemessen (s. Kap. 2.2.11).

Innerhalb der ersten zwei Wochen wurden ungefähr 10 % der quervernetzten Hyaluronsäure wieder abgebaut. In den darauf folgenden zwei Wochen kam es lediglich zu einem sehr geringem bis keinem Abbau von Hyaluronsäure. Aus den einzelnen Werten konnte eine Regressionskurve berechnet werden, die den ungefähren weiteren Verlaufs des Hyaluronsäureabbaus beschrieb:

$$c(t) = c_{t=0} - k_1 \frac{t^{n_1}}{t^{n_1} + t_{50,1}^{n_1}} - k_2 \frac{t^{n_2}}{t^{n_2} + t_{50,2}^{n_2}}$$

Die Regressionskurve ließ darauf schließen, dass die Hyaluronsäuregele *in vitro* über mehrere Monate stabil sind.

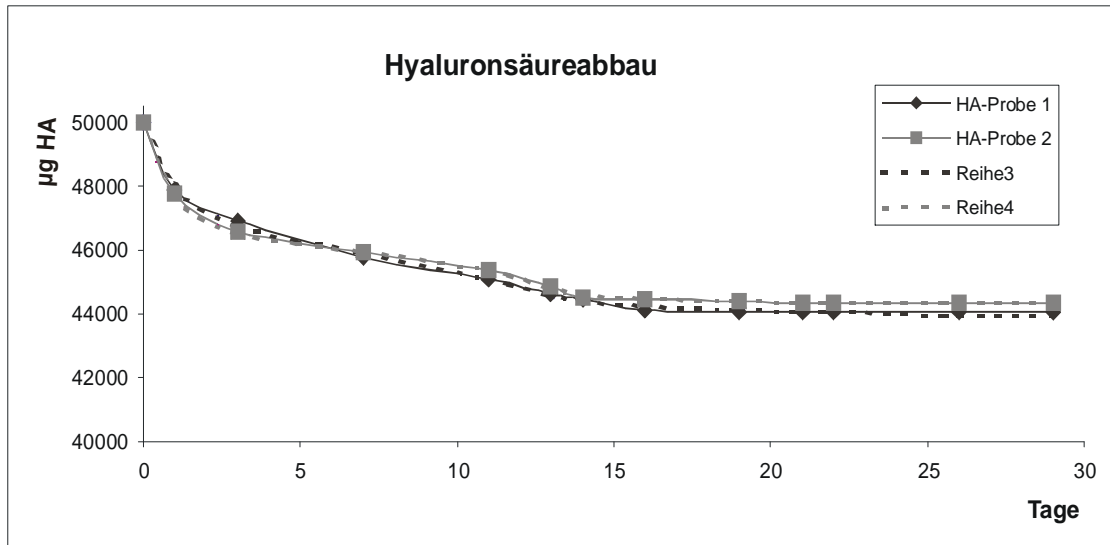


Abb. 36: *Hyaluronsäureabbau der mittels UV-Strahlung vernetzter Hyaluronsäuregele über ca. 30 Tage. Innerhalb der ersten zwei Wochen wurden ungefähr 10 % der Hyaluronsäure abgebaut. Anschließend nur noch wenige µg.*

Die parallel gemessenen pH-Werte der PBS-Hyaluronsäureproben lagen zwischen 6,89 und 7,12, so dass hier zudem eine pH-Stabilität gewährleistet schien.

3.2.2.3 Wirkung quervernetzter Hyaluronsäure in vitro auf ARPE19-Zellen

Um ihre Einsatzfähigkeit als Glaskörperersatz weiter zu testen, wurden auch diese Gele auf Toxizität geprüft. Hierfür wurden ein MTT-Test, AlamarBlue-Assay und eine Life/Dead-Fluoreszenzfärbung wie mit der mittels Dihydriziden quervernetzten Hyaluronsäure durchgeführt.

3.2.2.3.1 Life/ Dead-Fluoreszenzfärbung

Mittels der Life/ Dead-Färbung ließen sich fluoreszenzmikroskopisch tote und lebende Zellen darstellen. Außerdem konnte man darstellen, ob ein konfluenter Zellrasen bestand oder nur Zellinseln vorhanden waren.

Die Kontrollgruppe mit lebenden ARPE19-Zellen zeigte nur vereinzelte rote Anfärbungen von toten Zellen (1). In der Kontrollgruppe mit getöteten ARPE19-Zellen erschien eine flächige Rotfärbung unter dem Mikroskop als Zeichen der toten Zellen (2). Bei der weiteren Mikroskopie fanden sich bei der nicht dialysierten quervernetzten Hyaluronsäure keine konfluenten Zellrasen, sondern nur Zellgruppen, die nur in kleinen Zellverbänden vorlagen (3). In diesen Zellgruppen fanden sich vermehrt rote Fluoreszenzen, die die toten ARPE-19-Zellen darstellten. Dagegen zeigte sich bei der Mikroskopie der ARPE-19-Zellen nach Inkubation mit dialysierter quervernetzter Hyaluronsäuregele ein konfluenter Zellrasen mit vereinzelt nachweisbaren roten Fluoreszenzen, die vergleichbar mit denen in der Kontrollgruppe waren (4).

Die Life/ Dead-Fluoreszenzfärbung zeigte, dass die direkt nach der Polymerisation eingesetzte quervernetzte Hyaluronsäure toxisch auf ARPE19-Zellen wirkte. Nachdem die quervernetzten Hyaluronsäuregele jedoch über 48 Stunden gegen PBS dialysiert worden waren, zeigte sich im Vergleich zur Kontrolle kein Unterschied mehr in der Fluoreszenzfärbung. Es schien somit Substanzen zu geben, die bei der Quervernetzung entstanden oder übrig blieben und toxisch auf ARPE19-Zellen wirkten. Durch eine Dialyse der Hyaluronsäuregele konnten diese Substanzen jedoch ausgespült werden und die verbleibenden Hyaluronsäuregele waren nicht mehr toxisch. Am ehesten war von einer toxischen Wirkung der Substanz Irgacure® auszugehen, die als Photoinitiator bei der Quervernetzung diente.

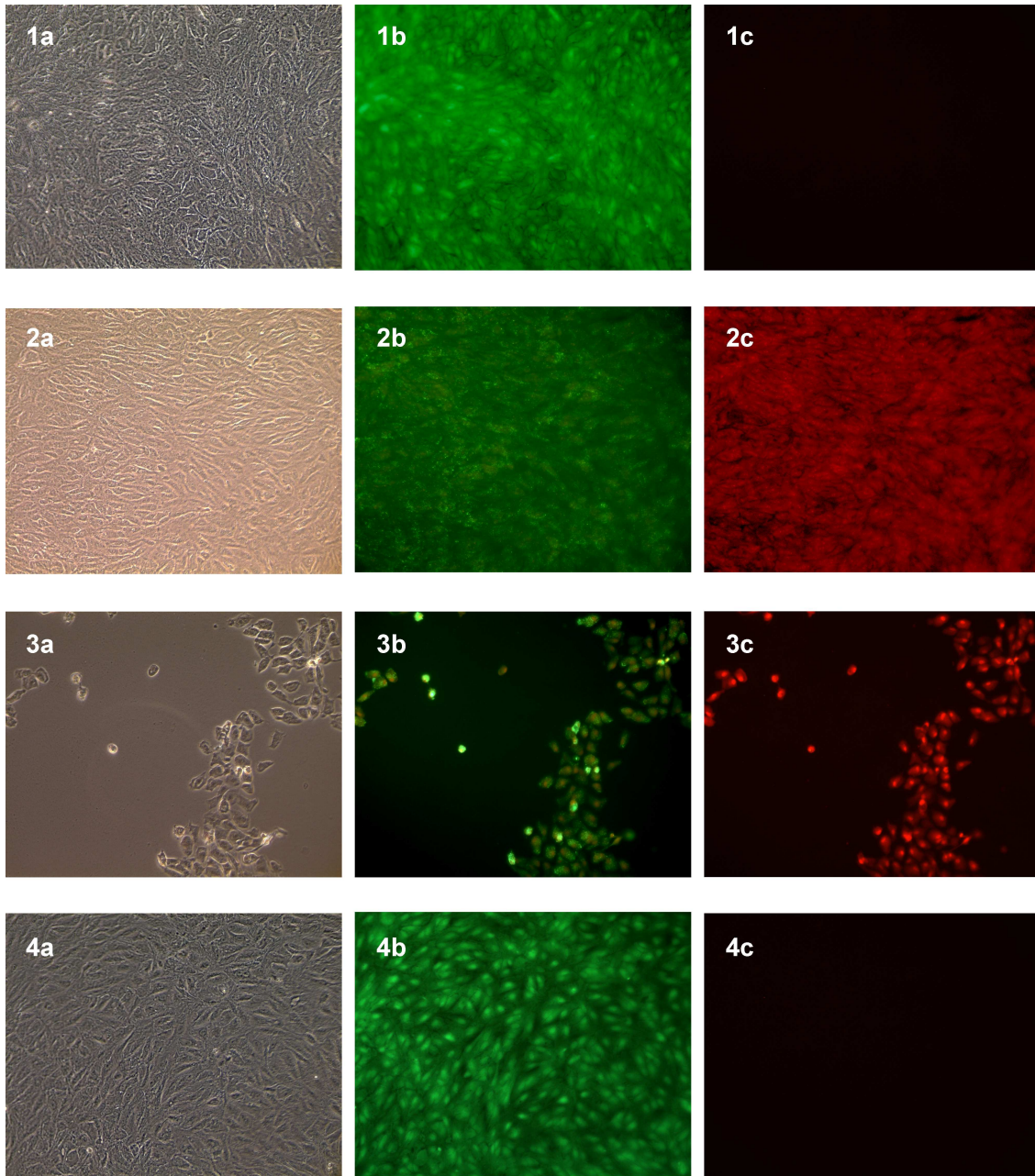


Abb. 37: *Life/ Dead-Fluoreszenzfärbung von ARPE19-Zellen. Negativkontrolle mit vitalen (Reihe1) und Negativkontrolle mit toten Zellen (Reihe2). Reihe 3 stellte die ARPE19-Zellen nach Inkubation mit nicht dialysierter quervernetzter Hyaluronsäure und Reihe 4 nach Inkubation mit dialysierter quervernetzter Hyaluronsäure gegen PBS dar. (a=natives Foto; b=lebende Zellen; c=tote Zellen)*

3.2.2.3.2 MTT-Test mit dem Photoinitiator Irgacure®

Da sich im vorangegangenen Versuch vor der Dialyse gegenüber PBS eine deutliche von der quervernetzten Hyaluronsäure ausgehende Toxizität gezeigt hatte, wurde zur Ursachensuche ein MTT-Test mit dem Photoinitiator Irgacure® der Quervernetzung durchgeführt.

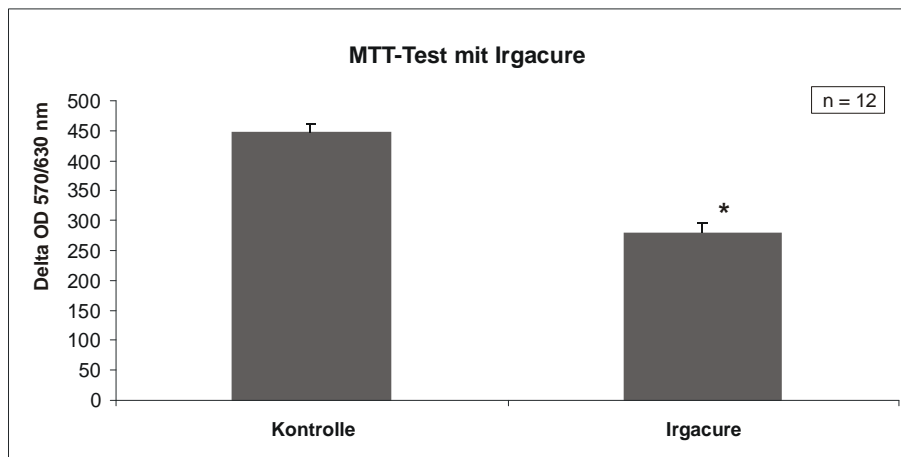


Abb. 38: Im MTT-Test zeigte sich nach 24 Stunden Inkubation eine signifikant niedrigere mitochondriale Aktivität der ARPE19-Zellen unter dem Photoinitiator Irgacure ($p < 0,05$).

Im MTT-Test zeigte sich daraufhin eine signifikant erniedrigte mitochondriale Aktivität der ARPE19-Zellen nach 24 Stunden Inkubation mit dem Photoinitiator Irgacure im Vergleich zur Kontrollgruppe ($p < 0,05$; T-Test; $n = 12$). Dies bestätigte die Vermutung, dass der Photoinitiator eine toxische Komponente der Quervernetzung darstellte und aufgrund dieses Ergebnisses wurden alle nachfolgenden Versuche mit dialysierter quervernetzter Hyaluronsäure durchgeführt.

3.2.2.3.3 MTT-Test mit quervernetzter HA mittels UV-Strahlung

Der MTT-Test diente dazu die Auswirkung von den quervernetzten Hyaluronsäuregelen auf die mitochondriale Aktivität von ARPE19-Zellen und somit auf ihre toxischen Eigenschaften hin und ihren Einfluss auf die Proliferation zu testen.

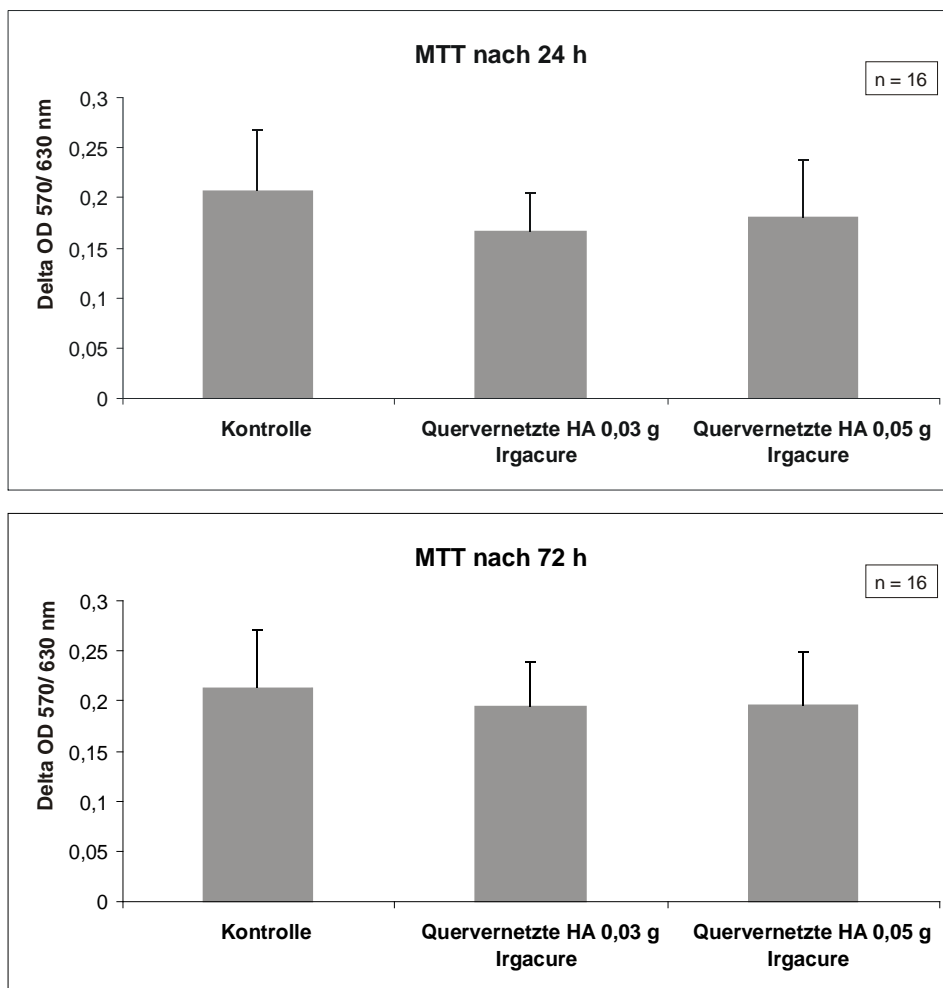


Abb. 39: *Im Vergleich zur Kontrolle zeigten sich sowohl nach 24 Stunden als auch nach 72 h Inkubation unter der quervernetzten Hyaluronsäure kein signifikanter Unterschied zur mitochondrialen Aktivität der Kontrollgruppe.*

Sowohl nach 24 und nach 72 Stunden Inkubation unter quervernetzter Hyaluronsäure zeigten sich keine Unterschiede zur mitochondrialen Aktivität der Kontrollgruppe ($p < 0,05$; $n=16$), so dass dieser Versuch das Ergebnis der Life/Dead-Färbung bestätigte und von der dialysierten quervernetzten Hyaluronsäure keine Toxizität auszugehen schien.

3.2.2.3.4 AlamarBlue® Assay mit quervernetzter HA mittels UV-Strahlung

Dieser Test wurde wieder durchgeführt, um das Ergebnis mit dem des vorangegangenen MTT-Testes zu vergleichen.

Die Zellen, welche unter quervernetzter Hyaluronsäure inkubiert worden waren, zeigten nach 24 Stunden im Vergleich zur Kontrolle keinen signifikanten Unterschied. Die mitochondriale Aktivität schien sogar etwas höher zu sein. Nach 72 Stunden Inkubation zeigte sich weiterhin eine leichte Erhöhung der mitochondrialen Aktivität. Bei den Zellen unter Inkubation mit quervernetzter Hyaluronsäure, die mit 0,05 g Irgacure produziert worden war, war dieser Unterschied signifikant ($p < 0,05$; $n=16$). Dieses Ergebnis bestätigte den MTT-Test, so dass von keiner Toxizität der quervernetzten Hyaluronsäuregele nach Dialyse auszugehen war. Ein pro- oder antiproliferativer Einfluss der quervernetzten Hyaluronsäuregele gegenüber den ARPE19-Zellen zeigte sich hier nicht.

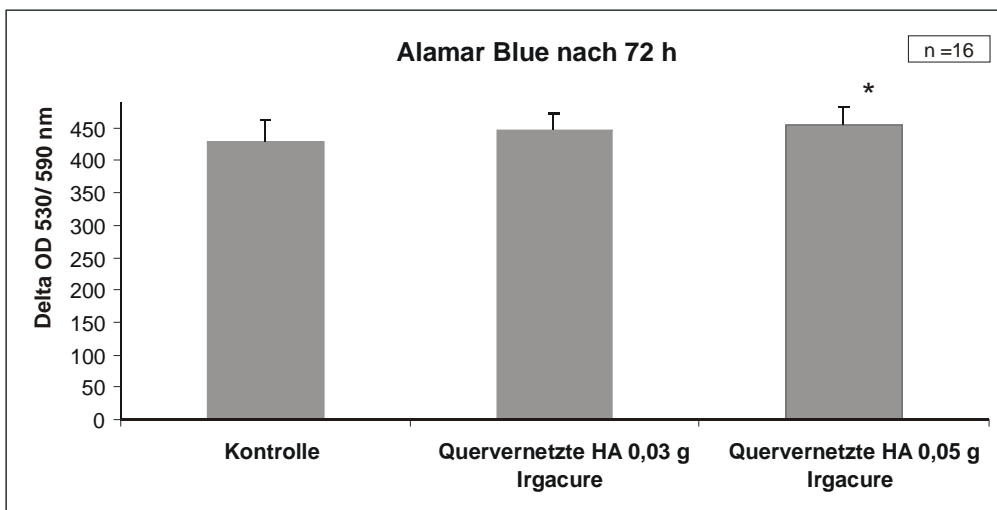
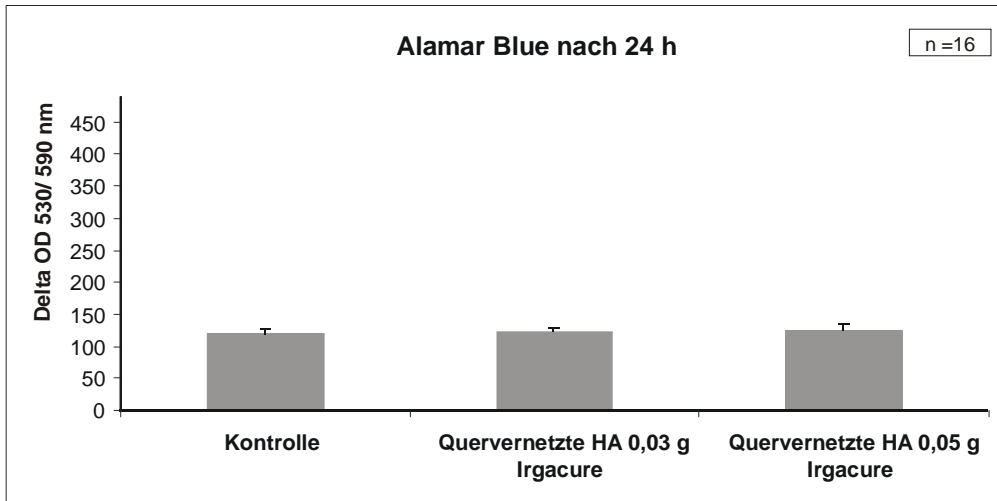


Abb.40: Nach 24 Stunden Inkubation unter quervernetzter Hyaluronsäure zeigte sich kein signifikanter Unterschied im Vergleich zur Kontrollgruppe. Nach 72 Stunden Inkubation zeichnete sich eine leichte Erhöhung der mitochondrialen Aktivität im Vergleich zur Kontrollgruppe. Allerdings war dies nur bei der quervernetzten Hyaluronsäure mit 0,05 g Irgacure signifikant ($p < 0,05$; $n=16$).

4 Diskussion der Ergebnisse

4.1 Diskussion der Ergebnisse der Versuche mit nicht vernetzter Hyaluronsäure

Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung und Untersuchung eines dreidimensionalen Glaskörperkonstruktes auf Basis von quervernetzter Hyaluronsäure. Hyaluronsäure bietet sich als Grundsubstanz für einen Glaskörperersatz aus mehrfacher Hinsicht an. Es findet sich bereits physiologisch in zahlreichen Körpergeweben des Menschen, u. a. auch im menschlichen Auge (siehe auch Kap. 1.1.). Zudem wird Hyaluronsäure in der Ophthalmologie bereits eingesetzt ohne dass dabei zytotoxische Effekte auftreten. Hyaluronsäure besitzt außerdem aufgrund seiner hohen Wasserbindungseigenschaft sehr gute optische Eigenschaften und behält diese auch nach Quervernetzung bei, so dass wir in der Hyaluronsäure ein geeignetes Ausgangsmaterial für einen dreidimensionalen Glaskörperersatz sahen.

Im ersten Teil dieser Arbeit wurde zunächst nicht vernetzte Hyaluronsäure auf ihre Eigenschaften gegenüber retinalen Zellen untersucht. Die ersten Versuchsreihen mit nicht vernetzter Hyaluronsäure in verschiedenen Konzentrationen von 0,02-1 % dienten dazu, toxische Eigenschaften auszuschließen und Hyaluronsäure zudem auf anti- bzw. pro proliferative Eigenschaften zu testen. Es wurden hierzu ARPE19-Zellen eingesetzt, da RPE-Zellen als retinale Zellen auch im Auge des Menschen einen der ersten Kontaktpunkte eines Glaskörperersatzes darstellen und wahrscheinlich eine Rolle bei der Entstehung der proliferativen Vitreoretinopathie spielen [Singh et al 2001]. Die ARPE19-Zellen entstammten jedoch aus einer käuflich erwerblichen Zelllinie und können daher in den Eigenschaften von anderen RPE-Zellen abweichen.

Die Testung auf schädliche toxische Eigenschaften von nicht vernetzter Hyaluronsäure erfolgte durch den Toxizitätstest und die Life/ Dead/ Dapi-Fluoreszenzfärbung. Das Ergebnis des Toxizitätstestes (Abb. 7) ergab im Vergleich zur Kontrolle mit Ausnahme der 0,6 %igen Hyaluronsäure signifikant höhere mitochondriale Aktivitäten, so dass sich hier kein toxischer Einfluss auf ARPE19-Zellen nachweisen lässt. Eine Schwierigkeit vor allem bei der Durchführung des Toxizitätstestes stellte aufgrund ihrer dickflüssigen und klebrigen Konsistenz die 1 %ige Hyaluronsäure dar, wodurch auch die höheren Standardabweichungen bei steigender Hyaluronsäurekonzentration zu erklären sind. Aufgrund dessen erfolgte eine weitere Toxizitätsmessung mittels der Life/ Dead/ Dapi-Fluoreszenzfärbung (Abb. 8). Hier konnte mittels der Fluoreszenzfärbung von toten und lebenden Zellen bildlich nachgewiesen werden, dass es zwischen den ARPE19-Zellen unter Inkubation mit der nicht vernetzten Hyaluronsäure im Vergleich zur Kontrollgruppe der ARPE19-Zellen keinen Unterschied gibt. Somit belegten die zwei Versuche, dass keine Toxizität von der nicht vernetzten Hyaluronsäure ausging. Mehreren Studien, in welchen Hyaluronsäure eingesetzt wurde, hatten bereits gezeigt, dass Hyaluronsäure nicht zytotoxisch ist und belegen diese Ergebnisse [Pruett RC et al. 1979; Suri S et al. 2006].

Zur Quantifizierung potentieller proliferativer Eigenschaften nicht vernetzter Hyaluronsäure wurde der BrdU-Test durchgeführt. Bei einer Ausgangszellzahl von 1×10^4 Zellen/ ml ließen sich zur Kontrolle nur vereinzelt signifikante Unterschiede in der proliferativen Aktivität der ARPE19-Zellen darstellen (Abb. 9). Hingegen zeigten sich bei einer Ausgangszellzahl von 1×10^5 Zellen/ ml mit steigender Hyaluronsäure-konzentration teils signifikant höhere optische Dichten (OD) (Abb. 10). Eine höhere OD war mit einer höheren proliferativen Aktivität der APRE19-Zellen gleich zu setzten. Das ließ darauf schließen, dass bis zu einer gewissen Menge an Hyaluronsäure pro ARPE19-Zelle ein proliferativer Einfluss auf diese bestand. Wurde jedoch eine bestimmte Menge an Hyaluronsäure pro ARPE19-Zelle überschritten, schien die proliferative Wirkung auf die Zelle wieder zurückzugehen. Auch bei diesem Test mussten im

Ergebnis Einschränkungen hinsichtlich der Validität aufgrund der dickflüssigen und klebrigen Eigenschaften der Hyaluronsäure bei höheren Konzentrationen hingenommen werden.

Um einen genaueren Überblick über die Wirkung der nicht vernetzten Hyaluronsäure auf ARPE19-Zellen zu gewinnen, entschieden wir uns für weiterführende Versuche. Eine Methode, um den Toxizitätstest und den BrdU-Test vereint darzustellen, war der MTT-Test durch den gleichzeitig die Toxizität bzw. die proliferativen Eigenschaften bestimmt werden konnte. Das Ergebnis dieses Tests ergab sowohl bei einer Ausgangszellzahl von 1×10^4 Zellen/ ml, als auch bei einer Ausgangszellzahl 1×10^5 Zellen/ ml, mit steigender Hyaluronsäurekonzentration eine stetige Abnahme der mitochondrialen Aktivität (Abb. 11). Daraus ließ sich entweder auf eine gewisse toxische oder antiproliferative Eigenschaft der Hyaluronsäure schließen. Da jedoch schon nachgewiesen worden war, dass nicht vernetzte Hyaluronsäure nicht toxisch war und nicht vernetzte Hyaluronsäure scheinbar konzentrationsabhängig pro- oder antiproliferativ zu wirken schien, ließ sich das Ergebnis des MTT-Testes mit den vorangegangenen Testergebnissen nicht vollständig in Einklang bringen, so dass wir uns zur Durchführung eines weiteren Versuches (AlamarBlue® Assay) entschlossen. Der AlamarBlue® Assay misst ebenso wie der MTT-Test die mitochondriale Aktivität von Zellen. Die mitochondrialen Aktivitäten unter Inkubation mit Hyaluronsäure zeigten sich im AlamarBlue® Assay nach 24 Stunden im Vergleich zur Kontrolle zunächst signifikant niedriger. Dies war auch beim MTT-Test der Fall. Im weiteren Zeitverlauf stiegen jedoch die mitochondriale Aktivität unter Inkubation mit Hyaluronsäure und es bestand kein Unterschied mehr zur mitochondrialen Aktivität der Kontrolle (Abb. 12 und 13).

Obwohl nun sowohl der MTT-Test, als auch der AlamarBlue® Assay die mitochondriale Aktivität der ARPE19-Zellen messen, kamen beide Tests zu unterschiedlichen Ergebnissen. Daraufhin stellte sich die Frage nach der Ursache und nach dem Grund für die anfänglich niedrigere mitochondriale Aktivität unter Hyaluronsäure. Beide Tests messen die mitochondriale Aktivität,

wobei der Fluoreszenzfarbstoff des AlamarBlue® Assay im Gegensatz zu dem Formazan des MTT-Testes nicht nur von den mitochondrialen Dehydrogenasen, sondern zusätzlich von den Zytochromen der Mitochondrien umgebaut wurde (s. Kap. 2.2.2 u. 2.2.7). Eine Interpretationsmöglichkeit für den Unterschied der Ergebnisse war eine vermehrte Aktivierung der Zytochrome durch Hyaluronsäure. Eine weitere Erklärung lag in der Möglichkeit eines pro-proliferativen Einflusses der Hyaluronsäure auf ARPE19-Zellen wie das Ergebnis des BrdU-Testes bereits schließen ließ. Proliferierende Zellen müssen sich teilweise von ihrer Umgebung lösen und reagieren in dieser Phase empfindlicher auf mechanische Störungen.

Möglich wäre zudem auch eine antiadhäsive Wirkung von Hyaluronsäure auf ARPE19-Zellen. Dies würde beim MTT-Test zu einer Verfälschung des Ergebnisses führen, da hier vor der Messung mehrere Pipettierschritte erfolgen und so nicht adhärente Zellen verloren gehen. Um diesen Punkt näher zu betrachten, wurde ein Adhäsionstest durchgeführt. Dieser Test sollte durch Anfärbung der Zellkerne eine Darstellung von adhären ARPE19-Zellen ermöglichen. Hierbei zeigte sich mit steigender Hyaluronsäuremenge unabhängig von der Ausgangszellkonzentration eine signifikante Zunahme der antiadhäsiven Wirkung auf ARPE19-Zellen (Abb. 15,16 und 17). Die antiadhäsive Wirkung von Hyaluronsäure scheint proliferierende Zellen an der Re-Adhäsion zu behindern und könnte so die vorausgegangen unterschiedlichen Ergebnisse im MTT-Test und AlamarBlue® Assay sowie das Ergebnis des BrdU-Testes zu einem gewissen Grad erklären.

Um diese Wirkung auf die ARPE19-Zellen ausüben zu können, muss Hyaluronsäure einen Kontakt zu ihnen herstellen können. Eine wichtige Rolle scheint dabei der CD44-Oberflächenrezeptor zu spielen [Culty M et al 1990; Peach RJ et al 1993]. Er gilt in der Literatur neben weiteren noch nicht genau identifizierten Hyaluronsäurerezeptoren wie RHAMM, IVD4 und Liver Endothelial Cell receptor (LEC-Rezeptor) als der Hyaluronsäurerezeptor [Entwistle J et al 1996, Sherman et al 1994]. Das CD44 ist ein transmembranes Glykoprotein mit vier funktionellen Domänen. An die distale extrazelluläre Domäne kann sich

Hyaluronsäure binden und kann dadurch verschiedene Reaktionskaskaden in einer Zelle auslösen [Knudson & Knudson 1999]. Unter anderem steht der CD44-Rezeptor mit dem Zytoskelett (ERM=Ezrin/ Radixin/ Moesin) in Kontakt. Je nach Phosphorylierung der ERM-Proteine bindet das Zytoskelett an CD44 oder nicht. Diese Interaktion zwischen CD44 und dem Zytoskelett könnte in Zusammenhang mit der Regulation der Zellproliferation stehen. Auf diese Weise steht auch die Hyaluronsäure über den CD44-Rezeptor in Beziehung mit der Zellproliferation [Knudson & Knudson 1999]. Dem CD44-Rezeptor wird zudem eine Rolle in der Zell-Matrix und Zell-Zell Interaktion, sowie Zellmigration zugeschrieben [Lokeshwar VB et al 1994, Sherman et al 1994, Thomas L et al 1992]]. Besonders interessant ist die Tatsache, dass der CD44-Rezeptor auch für die Aufnahme von Hyaluronsäure in die Zelle und ihren Abbau verantwortlich ist [Hua Q et al 1993]. Ein weiterer wichtiger Punkt ist, dass Hyaluronsäure nicht nur eine aktivierende Wirkung auf die Zelle ausübt, sondern bei Übersättigung der Rezeptoren auch die Zellaktivität, z. B. die Proliferation, hemmen kann [Knudson & Knudson 1999].

Diese Arbeiten zeigen die vielfältigen Wirkungen der Hyaluronsäure über den CD44-Rezeptor auf eine Zelle. Sie erklären die proliferativen und antiadhäsiven Wirkungen der Hyaluronsäure auf die Zelle und so die Ergebnisse des AlamarBlue® Assay, des BrdU- und des MTT-Testes mit nicht vernetzter Hyaluronsäure. Die Voraussetzung hierfür ist die Anwesenheit von CD44-Rezeptoren auf den ARPE19-Zellen, die für diese Versuche eingesetzt worden waren.

In der Literatur ist das Vorhandensein von CD44-Rezeptoren auf RPE19-Zellen von Liu et al. bereits beschrieben worden [Liu et al. 1997, Singh S et al 2001]. In Kap. 3.1.8. dieser Arbeit konnten mittels indirekter Fluoreszenzfärbung eindeutig CD44-Rezeptoren auch auf ARPE19-Zellen nachgewiesen werden. Somit wäre die oben beschriebene Interaktion zwischen ARPE19-Zelle und der Hyaluronsäure eine Erklärungsmöglichkeit (Abb. 18).

Der erste Teil dieser Arbeit konnte nochmals zeigen, dass nicht vernetzte Hyaluronsäure nicht toxisch gegenüber ARPE19-Zellen ist. Die Ergebnisse der

darauf folgenden Versuche wurden zunächst durch die antiadhäsiven und mengenabhängigen pro bzw. antiproliferativen Eigenschaften der Hyaluronsäure nicht richtig deutbar, bis weitere Versuche diese Eigenschaften aufdecken konnten. Unterstützt wurden die Interpretationen durch den Nachweis des CD44-Hyaluronsäurereceptors auf der verwendeten Zelllinie von ARPE19-Zellen.

4.2 Diskussion der Ergebnisse der quervernetzten Hyaluronsäuregele mittels Dihydraziden und mittels UV-Strahlung und n-Vinyl-Pyrrolidinon

Im zweiten Teil erfolgte die Herstellung eines dreidimensionalen Geles mit zwei unterschiedlichen Methoden und die Testung auf seine strukturellen Eigenschaften und hinsichtlich seiner Biokompatibilität als möglichen Glaskörperersatz.

Eine der Grundvoraussetzungen für einen dreidimensionalen Glaskörperersatz stellt eine stabile dreidimensionale durchsichtige Struktur dar. Diese ist neben der erhofften längeren Verweildauer im Glaskörperaum, auch zu der Verhinderung einer der unangenehmsten Folgeerscheinungen nach einer Vitrektomie erwünscht. In der Nachbehandlung der Vitrektomie ist die proliferative Vitreoretinopathie (PVR) eine der gefürchteten Komplikationen. Diese stellte einen Grund für den Einsatz von Silikonöl dar, da es durch seine hohe Viskosität zu einer besseren Netzhautanlage kommt und das Auftreten oder Wiederauftreten einer PVR teilweise verhindern kann [Chirila 1994; Constable 1987]. Durch die Quervernetzung von Hyaluronsäure zu einer dreidimensionalen Struktur sollte dies auch möglich sein, falls sie zudem eine lange Haltbarkeit im Glaskörperaum besitzen sollten. Die mechanische Hemmung könnte zudem im weiteren Verlauf durch den zusätzlichen Einbau eines antiproliferativ wirkenden Medikamentes in das quervernetzte

Hyaluronsäuregele weiter unterstützt werden, indem dieses als Medikamententräger dienen könnte. Durch die Mitvernetzung des Medikamentes ist davon auszugehen, dass es durch die dreidimensionale vernetzte Struktur zu einem langsamen Medikamentenrelease und nicht zu einer flush-artigen Ausschüttung kommen sollte. Die voraussichtliche allmähliche Medikamentenabgabe stellt unter anderem auch einen Vorteil gegenüber nicht vernetzten Hydrogelen dar. Es sind bereits Versuche beschrieben in denen sowohl unvernetzte als auch quervernetzte Hyaluronsäure als Medikamententräger erfolgreich getestet wurden [Cho KY et al. 2003; Kelly RM et al. 1999].

Die Herstellung von dreidimensionalen Hydrogelen aus Hyaluronsäure mittels Dihydriziden erfolgte nach Vercruyssen [Vercruyssen KP et al 1997]. Es konnte gezeigt werden, dass nach dieser Methode ab einer Hyaluronsäurekonzentration von 0,6 % quervernetzte Hyaluronsäuregele von ausreichender Stabilität hergestellt werden können (Abb. 21). Die entstandenen Gele waren alle durchsichtig und zeigten nur leichte Unterschiede in ihrer Formstabilität und Elastizität (Abb. 20 und 22). Die Hyaluronsäurekonzentration spielte hierbei die größte Rolle. Je höher die Hyaluronsäurekonzentration, desto stabiler waren die entstandenen Gele. Die Mengen an ADH und EDCI spielten eine untergeordnete Rolle, da sie nur als Hilfsmittel der Quervernetzung dienten. Insgesamt schienen die Hyaluronsäuregele aus 1 %iger Hyaluronsäure am stabilsten zu sein.

Die Herstellung quervernetzter Hyaluronsäuregele mit der in Kap. 2.2.10 beschriebenen Methode nach Leach [Leach JB et al. 2003] konnte bei Einhaltung der Versuchsabfolge ebenfalls beliebig reproduziert werden. Die entstandenen quervernetzten Hyaluronsäuregele waren durchsichtig, formstabil, etwas elastisch (Abb. 35) und ähnelten sich diesbezüglich stark den quervernetzten Hyaluronsäuregelen aus 1% iger Hyaluronsäure, die mittels der Dihydrizidmethode hergestellt worden waren.

Der Hyaluronsäureabbau der Gele wurde mittels der Carbazolmethode bestimmt. Diese Methode wurde erstmals 1968 von Bitter et Muir 1968 entdeckt

und seither unter anderem zur Bestimmung von Hyaluronsäure herangezogen [Bitter & Muir 1968]. Während des Beobachtungszeitraumes von ungefähr zwei Monaten wurden zwischen 10-30 % des Hyaluronsäureanteils der mit Hilfe von Dihydrziden hergestellten Gele abgebaut (Abb. 23-26). Dabei zeigten die Gele niedriger Hyaluronsäurekonzentration einen stärkeren Abbau von Hyaluronsäure als Gele höherer Hyaluronsäurekonzentrationen. Der unterschiedlich starke Abbau der Hyaluronsäuregele lässt vermuten, dass bei einer niedrigeren Hyaluronsäurekonzentration die Vernetzung insgesamt geringer ist, so dass eine stärkere Perfusion mit PBS ermöglicht wird. Dies scheint den Abbau der Hyaluronsäuregele zu beschleunigen. Bei den mittels UV-Strahlung hergestellten Hyaluronsäuregelen zeigte sich ein ähnliches Abbauverhalten von ca. 10% der Gesamthyaluronsäure in den ersten vier Wochen (Abb. 36). Anhand der versuchsweise angepassten Regressionsgeraden ist in vitro von einer Haltbarkeit der Hyaluronsäuregele über mehrere Monate auszugehen. Jedoch ist dabei zu bedenken, dass ein langsamer Abbau in vitro nicht mit einem in vivo Verhalten der Gele gleichzusetzen ist, wie z. B. die Versuche von Ye Hong mit quervernetztem Poly(1-vinyl-2-pyrrolidinone) zeigten [Hong Y 1997]. Über die nicht vernetzte Hyaluronsäure ist bereits bekannt, dass diese in vivo rasch abgebaut wird. Durch die Quervernetzung der Hyaluronsäure erhofft man sich jedoch eine längere Verweildauer wie z. B. der Versuch von Segura et al mit quervernetzter Hyaluronsäure bereits darstellte [Segura T 2005]. Die Haltbarkeit über einen langen Zeitraum ist jedoch von großer Bedeutung, da bisher die meisten als Glaskörperersatz eingesetzten Materialien nur für einen kurzen Zeitraum im Glaskörperraum erhalten bleiben. Sie werden innerhalb von Tagen bis Wochen entweder rasch absorbiert oder abgebaut und können so nur einen kurzfristigen Glaskörperersatz darstellen. Bei manchen Erkrankungen wie einer wiederholten Netzhautablösung oder der bereits o. g. PVR ist jedoch eine länger bestehende Tamponade erwünscht. Silikonöl, das als längerfristige Glaskörperersatz eingesetzt wird, sollte dagegen nicht für immer im Auge belassen werden, da hier sonst Nebenwirkungen wie Netzhautblutungen oder ein Sekundärglaukom auftreten können [Kirchhof B 1986, Soman N 2002].

Um weiter die Voraussetzungen für einen biokompatiblen Glaskörperersatz erfüllen zu können, sollte zudem eine pH-Stabilität im physiologischen Bereich (ca. pH=7,3) gegeben sein [Hockwin O 1989]. Ob der pH-Wert durch eine Substanz beeinflusst wird, hängt von ihrer Struktur ab. WTG-127, ein Industrieprodukt der Firma Wakamoto Pharmaceutical, Tokyo hat z. B. einen pH von 7,0 [Katagiri Y 2005]. Die Anwesenheit von Hyaluronsäure selbst ändert jedoch nicht den pH-Wert der Umgebung, sondern die Form in welcher die Hyaluronsäure vorliegt, wird durch den pH-Wert der Umgebung bestimmt [Hascal VC 1997]. Für die Quervernetzung mittels Dihydraziden ist aber zur Freilegung der Säuregruppen eine Absenkung des pH-Wertes auf ca. 4 notwendig. Hierdurch könnten Probleme nach der Quervernetzung entstehen. Die durchgeführten pH-Messungen der Umgebungsflüssigkeit zeigten pH-Werte um 7 mit einzelnen Werten bis zu pH=3, so dass eine konsequente pH-Stabilität durch die mittels Dihydraziden quervernetzten Hyaluronsäure nicht sicher gewährleistet scheint. Versuch von Vercryusse et al. beschreiben jedoch bei ähnlichen Hydrogelen eine pH-Stabilität [Vercryusse KP 1997], so dass hier vielleicht eine homogene Quervernetzung eine wichtige Rolle spielen könnte. Die pH-Werte der entnommenen Proben unter mittels UV-Strahlung quervernetzten Hyaluronsäure lagen konstant zwischen 6,89 – 7,12, so dass hier eine pH-Stabilität besteht.

Letztendlich muss ein Glaskörperersatz biokompatibel sein, um in vivo eingesetzt werden zu können. Nicht vernetzte Hyaluronsäure wurde wie bereits erwähnt als nicht toxisch beschrieben und wird in der Ophthalmologie bereits eingesetzt [Nakagawa M 1997, Silver FH 1992, Liesegang TJ 1990], so dass davon auszugehen war, dass auch quervernetzte Hyaluronsäure biokompatibel sein sollte. Versuche mit quervernetzter Hyaluronsäure haben bereits gezeigt, dass in vitro keine Toxizität von diesen Gelen ausging [Park SN 2001, Schmut O 1992, Shu XZ 2004].

Die Versuche mit mittels Dihydraziden quervernetzter Hyaluronsäure zeigten, dass von der quervernetzten Hyaluronsäure eine leicht antiadhäsive und proliferative Wirkung ausging (s. Kap. 3.2.1.4). Ein toxischer Effekt konnte

jedoch nicht ausgeschlossen werden, da sich in der Life/Dead-Fluoreszenzfärbung teils aufgebrochene Zellrasen mit toten Zellen gezeigt hatten (Abb. 32). Hier könnte ein eventuell mechanischer Einfluss auf die ARPE19-Zellen durch die dreidimensionale viskoelastische Struktur der quervernetzten Gele hinsichtlich dieses Ergebnisses berücksichtigt werden.

Dagegen zeigten die Biokompatibilitätsversuche, die mit mittels UV-Strahlung quervernetzten Hyaluronsäure durchgeführt worden waren, dass von diesen Gelen nach einer Dialyse keine Toxizität ausging. Ein pro- oder antiproliferativer Einfluss der quervernetzten Hyaluronsäuregele gegenüber den ARPE19-Zellen zeigte sich hier nicht.

Zu diskutieren ist bei diesen Ergebnissen ebenso wie bei der nicht vernetzten Hyaluronsäure die Rolle des CD44-Rezeptor. Bei der quervernetzten Hyaluronsäure steht im Gegensatz zur nicht vernetzten Hyaluronsäure zur Debatte, ob der CD44-Rezeptor mit Hyaluronsäure in quervernetzter Form überhaupt in Kontakt treten kann. Bisher ist diesbezüglich keine Literatur zu finden. Es ist am ehesten davon auszugehen, dass wieder gelöste Hyaluronsäure aus dem Abbau quervernetzter Hyaluronsäure mit den Rezeptoren interagieren und auf diese Weise u. a. einen antiadhäsiven bzw. pro-proliferativen Einfluss auf die ARPE19-Zellen ausüben könnte.

Somit konnten die hergestellten quervernetzten Hyaluronsäuregele viele Anforderungen eines künstlichen dreidimensionalen Glaskörperersatzes erfüllen. Im Gegensatz zu den mittels der Dihydrizidmethode quervernetzten Hyaluronsäuregelen fanden sich bei den mittels UV-Strahlung quervernetzten Hydrogelen in der Life-Dead-Färbung keine aufgebrochenen Zellrasen und eine Toxizität konnte ausgeschlossen werden. Außerdem zeigten sich bei diesen Hyaluronsäuregelen keine auffälligen pH-Werte in den Abbauproben, so dass die mittels UV-Strahlung und N-vinyl-pyrrolidinon hergestellten Hyaluronsäuregele etwas bessere Eigenschaften besitzen und die Vorteile hier überwiegen.

Das nächste Ziel wäre die in vivo-Testung der quervernetzten Hyaluronsäuregele und die Erprobung einer in situ-Polymerisation. Mittels der in vivo-Testung können histologische Veränderungen und Verhalten des quervernetzten Hyaluronsäuregels in einem Organismus weiter beurteilt werden. Die in situ Polymerisation direkt im Auge ist zwar prinzipiell wünschenswert, ist aber limitiert durch die Toxizität der Einzelkomponenten. Sowohl der Photoinitiator Irgacure® als auch die UVA-Strahlung selbst sind toxisch und können zur Schädigung der Netzhaut führen. Ähnliche toxische Effekte der Einzelkomponenten in nicht vernetzter Form wurden auch bei der Entwicklung von anderen Hydrogelen wie z. B. mit synthetischen Polymeren beschrieben. Chirila et al. zeigten, dass die Monomere der Polyacrylamide toxisch sind, wohingegen von der quervernetzten Form keine Toxizität ausgeht [Chirila TV 1994].

Eine Möglichkeit wäre, den Photoinitiator Irgacure® zumindest zu einem Teil durch eine verträglichere Substanz zu ersetzen und die UVA-Strahlung auf eine möglichst niedrige Dosis zu reduzieren. Eine ähnliche Methodik der Quervernetzung wird seit kurzer Zeit in der Behandlung von Hornhauterkrankungen erfolgreich angewandt, so dass eine Umsetzung in den hinteren Augenteil nicht ganz unmöglich scheint [Krüger et al. 2008]. Außerdem wurde beschrieben, dass Hyaluronsäure zumindest in der Haut einen gewissen Schutz gegenüber UVA- und UVB-Strahlung bildet [Wohlrab J 2004].

5 Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit befasste sich mit der Entwicklung eines neuen Glaskörperersatzes auf Basis quervernetzter Hyaluronsäure. Das Ziel war die Herstellung eines stabilen, dreidimensionalen, optisch klaren Hydrogels, das zudem biokompatibel ist.

Wir konnten zeigen, dass Hyaluronsäuremoleküle über den Hyaluronsäurerezeptor CD44 in verschiedene Zellmetabolismen von ARPE19-Zellen verwickelt sind und so u. a. Einfluss auf die Zellproliferation haben. Diesen biologischen Effekt von nicht-vernetzter HA haben wir zunächst qualitativ und quantitativ bestimmt. Wir konnten zeigen, dass Hyaluronsäure sowohl proproliferativ als auch antiproliferativ wirken kann. Zusätzlich wirkt HA antiadhäsiv auf proliferierende Zellen, vermutlich über den CD44-Rezeptor. Wir konnten damit zeigen dass die HA-Monomere nicht toxisch sind, jedoch eine komplexe biologische Aktivität haben. Dies muss bei der Verwendung von HA als Komponente eines Glaskörperersatzes berücksichtigt werden. Die Quervernetzung von HA führten wir mit zwei grundsätzlich verschiedenen Methoden durch. Zum einen mit einer katalytischen Methode, zum anderen photochemisch mit UV-Strahlung. Beide Methoden ergaben optisch klare und stabile Hyaluronsäuregele, wobei wir in einer Versuchsserie die Konzentration der Einzelkomponenten optimierten. Unabhängig von der verwendeten Methode scheinen Hyaluronsäuregele aus 1 %iger Hyaluronsäure die höchste Stabilität zu erreichen. Dies zeigt sich nicht nur in der biomechanischen Stabilität direkt nach der Synthese, sondern insbesondere im Langzeitversuch. Wir konnten zeigen, dass über einen Zeitraum von 2.5 Monaten nur 10 % der Gesamthyaluronsäure abgebaut wird. Damit könnte im Vergleich zu bisherigen Ansätzen ein ausreichender Quelldruck über Monate aufrecht erhalten werden. Während beide Methoden Gele mit guter Transparenz, ausreichender Formelastizität und hoher Langzeitstabilität hervorbringen, zeigten sich Unterschiede in der Biokompatibilität. Mit der Dihydrazidmethode hergestellte Gele zeigten eine geringfügige Toxizität bei direkter Zellinkubation, während

quervernetzten Hyaluronsäuregele mittels UV-Strahlung vollständig biokompatibel waren. Letztere waren nicht toxisch und zeigten sogar einen leicht pro-proliferativen Einfluss. Als weiterer Vorteil zeigte sich eine hohe pH-Stabilität im physiologischen Bereich. Mit unserer Arbeit konnten wir somit nicht nur zeigen, dass die Herstellung von Glaskörperkonstrukten auf Basis quervernetzter Hydrogele prinzipiell möglich ist. Zusätzlich konnten wir eine Methode identifizieren und weiterentwickeln, mit der eine hohe Stabilität und sehr gute Bioverträglichkeit dieser Hydrogele erzielt wird. Das nächste Ziel wird die in-vivo-Testung und die Umsetzung in eine in situ Polymerisation sein.

Literaturverzeichnis

Alkrad JA (2003)

Hyaluronsäurederivate: Strukturcharakterisierung, Bestimmung und Dermatologische Anwendung
Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades Dr. rer. Nat; Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

Asari A, Miyauchi S (2000)

Medical Applications of Hyaluronan
Glycoforum, Science of Hyaluronan; Mar. 7

Balazs EA, Laurent TC, Laurent UB, Deroche MH, Bunney DM (1959)

Studies on the structure of the vitreous body: VI. Biochemical changes during development
The Journal of Biological Chemistry Vol.234, No.2,422-430

Bitter T, Muir HM (1962)

A modified Uronic Acid Carbazole Reaction
Analytical Biochemistry 4, 330-334

Caplan AI (2000)

Tissue engineering designs for the future: new logics, old molecules.
Tissue Eng. 2000 Feb;6(1):1-8

Chirila TV, Tahija S, Hong Y, Vijayasekaran S, Constable IJ (1994)

Synthetic polymers as materials for artificial vitreous body: review and recent advances.
J Biomater Appl. Oct;9(2):121-37

Cho KY, Chung TW, Kim BC, Kim MK, Lee JH, Wee WR, Cho CS (2003)

Release of ciprofloxacin from poloxamer-graft-hyaluronic acid hydrogels in vitro
Int J Pharm. 2003 Jul 9;260(1):83-91

Collier JH, Camp JP, Hudson TW, Schmidt CE (2000)

Synthesis and characterization of polypyrrole-hyaluronic acid composite biomaterials for tissue engineering applications.
J Biomed Mater Res. 2000 Jun 15;50(4):574-84.

Constable I (1987)

Biological and therapeutic aspects of proliferative vitreoretinopathy
Jpn J Ophthalmol Vol 31:513-520

Culty M, Miyake K, Kincade PW, Sikorski E, Butcher EC, Underhill C (1990)

The hyaluronate receptor is a member of the CD44 (H-CAM) family of cell surface glycoproteins
J Cell Biol. 1990 Dec;111(6Pt1):2765-74

Denlinger JL, Eisner G., Balazs EA. (1980)

Age-related changes in the vitreous and lens of rhesus monkeys (*Macaca mulatta*)

Exp Eye Res. Jul;31(1):67-79

Eisner G. (1975)

Zur Anatomie des Glaskörpers

Graefes Arch. 193,33-56

Entwistle J, Hall CL and Turley EA (1996)

HA receptors: Regulators of signaling to the cytoskeleton

J Cell Biochem 61:596-577

Foos RY. Wheeler NC. (1982)

Vitreoretinal juncture. Synchysis senilis and posterior vitreous detachment

Ophthalmology Dec;89(12):1502-12

Foster WJ (2008)

Vitreous substitutes

Expert Rev Ophthalmol. 2008 April;3(2):211-218

Hascal VC, Laurent TC. (1997)

Hyaluronan : Structure and Physical Properties

Glycoforum, Science of Hyaluronan; Dec. 15

Hayen W, Goebeler M, Kumar S, Rießen R, Nehls V (1999)

Hyaluronan stimulates tumor cell migration by modulating the fibrin fiber architecture

Journal of Cell Science 112, 2241-2251

Hockwin O (1989)

Biochemie des Auges

Georg Thieme Verlag, Stuttgart

Hong Y, Chirila TV, Vijayasekaran S, Dalton PD, Tahija SG, Cuypers MJ, Constable IJ (1996)

Crosslinked poly(1-vinyl-2-pyrrolidinone) as a vitreous substitute.

J Biomed Mater Res. Apr;30(4):441-8

Hong Y, Chirila TV, Vijayasekaran S, Shen W, Lou X, Dalton PD (1998)

Biodegradation in vitro and retention in the rabbit eye of crosslinked poly(1-vinyl-2-pyrrolidinone) hydrogel as a vitreous substitute.

J Biomed Mater Res. Mar 15;39(4):650-9

Hua Q, Knudson CB, Knudson W (1993)

Internalization of hyaluronan by chondrocytes occurs via receptor-mediated endocytosis

J Cell Sci 1993;106:365-375

Takehi K., Kinoshita M., Yasueda S. (2003)

Hyaluronic acid: separation and biological implications
Journal of Chromatography B, 797:347-355

Katagiri Y, Iwasaki T, Ishikawa T, Yamakawa N, Suzuki H, Usui M (2005)

Application of thermo-setting gel as artificial vitreous
Jpn J Ophthalmol 2005;49:491-496

Kelly RM, Meyer JD, Matsuura JE, Shefter E, Hart MJ, Malone DJ, Manning MC (1999)

In vitro release kinetics of gentamycin from a sodium hyaluronate gel delivery system suitable for the treatment of peripheral vestibular disease
Drug Dev Ind Pharm.1999Jan;25(1):15-20

Kirchhof B, Tavakolian U, Paulmann H et al (1986)

Histopathological findings in eyes after silicon oil injection
Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol 1986,224:34-37

Knudsen W, Knudsen CB (1999)

The Hyaluronan Receptor, CD44
Glycoforum, Science of Hyaluronan; Mar. 15

Koster R, Stilma JS (1986)

Healon as intravitreal substitute in retinal detachment surgery in 40 patients
Doc Ophthalmol Dec 30;64(1):13-7

Krueger RR, Ramos-Esteban JC; Kanellopoulos AJ (2008)

Staged intrastromal delivery of riboflavin with UVA cross-linking in advanced bullous keratopathy: laboratory investigation and first clinical case
J Refract Surg.2008 Sep;24(7):S730-6

Lang GK (2004)

Augenheilkunde
Georg Thieme Verlag, Stuttgart

Laurent UB., Fraser JR. (1983)

Turnover of hyaluronate in the aqueous humor and vitreous body of the rabbit
Exp Eye Res. Apr;36(4):493-503

Leach JB, Bivens KA, Patrick CW Jr, Schmidt CE (2003)

Photocrosslinked hyaluronic acid hydrogels: natural, biodegradable tissue engineering scaffolds
Biotechnol Bioeng. 2003 Jun 5;82(5):578-89

Leach JB, Bivens KA, Collins CN, Schmidt CE (2004)

Development of photocrosslinkable hyaluronic acid-polyethylene glycol-peptide composite hydrogels for soft tissue engineering
J Biomed Mater Res A. 2004 Jul 1;70(1):74-82

Liesegang TJ (1990)

Viscoelastic Substances in Ophthalmology
Survey of Ophthalmology Vol. 34, Nr.4; 268-293

Lindl T (2002)

Zell-und Gewebekultur
Spektrum Akademischer Verlag; Auflage 5

Liu NP, Roberts WL, Hale LP, Levesque MC, Patel DD, Lu CL, Jaffe GJ (1997)

Expression of CD44 and Variant Isoforms in Cultured Human Retinal Pigment Epithelial Cells
Invest Ophthalmol Vis Sci. 1997 ;38 :2027-2037

Lokeshwar VB, Fregien N, Bourguignon LYW (1994)

Ankryin-binding domain of CD44(GP85) is required for the expression of hyaluronic acid-mediated adhesion function
J Cell Biol 1994;126:1099-1109

Machemer R, Buettner H, Norton EW, Parel JM (1971)

Vitrectomy, a pars plana approach
Trans AM Acad Ophthalmol Otolaryngol. 1971 Jul-Aug;75(4):813-20

Machemer R, Parel JM, Norton EW (1972)

Vitrectomy, a pars plana approach Technical improvements and further results
Trans AM Acad Ophthalmol Otolaryngol. 1972 Mar-Apr;76(2):462-6

McCuen BW II, Dejuan E jr, Landers MB III et al (1985)

Silicone oil in vitreoretinal surgery: II. Results and complications
Retina 1985;5:198-205

Nakagawa M, Tanaka M, Miyata T (1997)

Evaluation of collagen gel and hyaluronic acid as vitreous substitutes
Ophthalmic Res 1997;29:409-420

Ni C, Wang WJ, Albert DM et al (1986)

Intravitreal silicon injection: Histopathologic findings in a human eye after 12 years
Arch Ophthalmol 1986;101:1399-1401

Olm J (1911)

Über die Behandlung einer Netzhautablösung durch operative Entleerung des subretinalen Flüssigkeit und Einspritzung von Luft in den Glaskörper
Albrecht von Graefes Arch Ophthalmol 1911;79:442-465

Österlin S (1975)

Changes in the vitreous with age
Trans. Ophthal. Soc. UK 95,372-377

Peach RJ, Hollenbaugh D, Stamenkovic I, Aruffo A (1993)
Identification of hyaluronic acid binding sites in the extracellular domain of CD44
J Cell Biol 1993;122:257-264

Prestwich GD (2001)

Biomaterials from Chemically-Modified Hyaluronan
Glycoforum, Science of Hyaluronan; Feb.26

Prestwich GD, Marecak DM, Marecek JF, Vercruysse KP, Ziebell MR (1998)
Controlled chemical modification of hyaluronic acid: synthesis, applications, and biodegradation of hydrazide derivatives.
J Control Release. 1998 Apr 30;53(1-3):93-103

Pruett RC, Schepens CL, Swann DA (1979)

Hyaluronic acid vitreous substitute. A six-year clinical evaluation.
Arch Ophthalmol. 1979 Dec;97(12):2325-30

Schmut O, Hoffmann H (1982)

Preparation of gels from hyaluronate solutions
Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol (1982) 218:311-314

Scott JE (1998)

Secondary and Tertiary Structure of Hyaluronan in Aqueous Solution. Some Biological Consequences
Glycoforum, Science of Hyaluronan Mar. 15

Sebag J. (1987)

Age-related changes in human vitreous structure
Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol 225(2):89-93

Segura T, Anderson BC, Chung PH, Webber RE, Shull KR, Shea LD (2005)

Crosslinked hyaluronic acid hydrogels: a strategy to functionalize and pattern
Biomaterials 26 (2005) 359-371

Shu XZ, Liu Y, Palumbo FS, Luo Y, Prestwich GD (2004)

In situ crosslinkable hyaluronan hydrogels for tissue engineering
Biomaterials 25 (2004) 1339-1348

Silver FH, LiBrizzi Joseph , Benedetto D (1992)

Use of viscoelastic solutions in ophthalmology: a review of physical properties and long-term effects
Journal of long-term effects of medical implants 2(1):49-66 (1992)

Singh S, Zheng JJ, Peiper SC, Mclaughlin BJ (2001)

Gene expression profile of ARPE-19 during repair of the monolayer
Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol (2001) 239:946-951

Sherman L, Sleeman J, Herrlich P, Ponta H (1994)

Hyaluronate receptors; key players in growth, differentiation, migration and tumor progression

Curr Opin Cell Biol 1994;6:726-733

Soman N., Banerjee R. (2003)

Artificial vitreous replacements

Biomed Mater Eng.;13(1):59-74

Swann DA, Constable IJ (1972)

Vitreous structure: I. Distribution of hyaluronate and protein

Investigativ Ophthalmology March; Vol.11 Nr.3 159-163

Swann DA, Constable IJ (1972)

Vitreous structure: II. Role of hyaluronate

Investigativ Ophthalmology March; Vol.11 Nr.3 164-168

Thomas L, Byers HR, Vink J, Stamenkovich I (1992)

CD44H regulates tumor cell migration on hyaluronate-coated substrate

J Cell Biol 1992;118:971-977

Vercruyse KP, Marecak DM, Marecek JF, Prestwich GD (1997)

Synthesis and in vitro degradation of new polyvalent hydrazide cross-linked hydrogels of hyaluronic acid

Biokonjugate Chem. 1997, 8, 686-694

Versura P, Cellini M, Torreggiani A, Bernabini B, Rossi A, Moretti M, Caramazza R (2001)

The biocompatibility of silicone, fluorosilicone and perfluorocarbon liquids as vitreous tamponades - an ultrastructural and immunohistochemical study

Ophthalmologica. 2001 Jul-Aug;215(4):276-83

Wohlrab J (2004)

Hyaluronsäure und Haut – Trends in Clinical and Experimental Dermatology

Shaker-Verlag, Vol.3, Aachen

Zhu M, Penfold PL, Madigan MC, Billson FA (1997)

Effect of human vitreous and hyalocyte-derived factors on vascular endothelial cell growth

Aust NZ J Ophthalmol. 1997 May;25 Suppl1: (S57-60)