

W.-D. Jülich\*, R. Hanschke und N. Alhitari

## Schonende Sterilisation von biologisch aktiven Implantaten

Teil IV: Vergleichende elektronenmikroskopische Beobachtungen zum Einfluß von Wasserstoffperoxid und Wasserstoffperoxid-Tensid-Harnstoffeinschlußverbindungen auf humane Amnionepithelzellen in einer Perfusionszellkultur

### Gentle Sterilisation of Biologically Active Implants

Part IV: Comparative Electron Microscope Observations on the Influence of Hydrogen Peroxide and Hydrogen Peroxide/Surfactant Urea Inclusion Compounds on Human Amnion Epithelial Cells in a Perfusion Cell Culture

The use of physiological substances such as  $H_2O_2$  as a component of a multiple stage sterilisation process for biologically active implants is advantageous because the expected toxicity is low. Border surface active, ordered structures with anionic, amphiphilic, cationic, nonionic, or multifunctional surfactants and  $H_2O_2$  in the form of inclusion compounds in urea significantly enlarges the range of applications for  $H_2O_2$ . Of the many possible variations, the  $H_2O_2$  laurylsorbitan urea ester inclusion compound was selected for examination in perfusion cell cultures. This inclusion compound with a near-natural surfactant is characterised by a balanced antibacterial efficacy range coupled with lower toxicity to mammal cell than that of hydrogen peroxide.

When a substance acts on a living structure, prior to reaching the stage at which irreversible damage occurs, one would expect to see toxic reactions that are dependent on concentration and time and reversible on discontinuing the substance. Until now it has hardly been possible to examine these microtoxic changes. To document this reversible damage, we developed a test model, the perfusion cell culture with continuous biosensor measurements of metabolic products. In perfusion cell cultures, the cells float in a continuously refreshed nutrient solution, and all metabolic products are continuously removed. Since these conditions result in an equilibrium, the cell metabolism remains relatively constant for a sufficiently long observation period (up to 7 days). Cells react to specific input signals, such as toxins in the surrounding medium, by varying characteristic

output signals. One parameter that is suitable for examining reversible toxic reactions is glucose metabolism. It can be continuously measured over prolonged observation periods using enzyme biosensors. More detailed characterisation of any changes in cell morphology within the perfusion cell culture with or without the influence of the toxin is possible using scanning or transmission electron microscopy. It could be shown by transmission electron microscopy that there are no changes in cell ultrastructure under the conditions prevailing in perfusion cell cultures. By using a scanning electron microscope it is possible to observe changes in the amount of microvilli. Microvilli occur on absorptive epithelia and may increase the cell surface to a multiple of its original size. They are responsible for the exchange of substances with the surrounding medium. Their number and length can vary greatly, depending on cell activity. In the perfusion cell culture the number of microvilli decreases significantly with increasing cell age even in the absence of toxins.

Perfusion cell cultures permit a realistic assessment of the effects of  $H_2O_2$  at physiologically relevant concentrations on mammal cells.  $H_2O_2$  at concentrations like those that may occur during phagocytosis has no significant influence on the creation of microvilli. No changes in the organelles under the influence of  $H_2O_2$  are discernible by transmission electron microscopy. The metabolism of glucose is significantly reduced under the influence of  $H_2O_2$ . This influence on glucose metabolism precedes any morphological changes and is fully reversible. This testing arrangement is therefore suitable for early detection of toxic reactions.

The sensitive, well-differentiated cellular surface structures exhibit significant differences between the influence of  $H_2O_2$  and the corresponding inclusion compound. By contrast with  $H_2O_2$  the formation of a microvilli-rich fraction is significantly promoted by the  $H_2O_2$  laurylsorbitan urea ester inclusion compound during the entire 24 h exposure time. Even 24 h after exposure has ended, it is still possible to detect a larger number of microvilli. The reduction in the microvilli-rich fraction associated with the ageing process is significantly retarded under the influence of the inclusion compound. No changes in cellular ultrastructure were observed under the influence of the inclusion com-

Doz. Dr. Wolf-Dieter Jülich und Nasser Alhitari, Landeshygieneinstitut Mecklenburg-Vorpommern, Außenstelle Greifswald, Lange Reihe 2, 17489 Greifswald

Dr. rer. nat. Renate Hanschke, Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald, FR Biologie, Institut für Mikrobiologie und Molekularbiologie, Laboratorium für Elektronenmikroskopie, Jahnstr. 15a, 17487 Greifswald

pound. The glucose metabolism of the cell is reversibly reduced.

Following the proposal for sterilisation of enzymatic glucose sensors in a two-level process as described in earlier parts of this report, the sensor is stored in a solution containing 3% inclusion compound until used. One has to assume that the inclusion compound is partially adsorbed to the surface of the sensor. Available studies further demonstrate that adsorbed portions of the inclusion compound that might have been transmitted during sensor implantation are toxicologically innocuous. Unless this adsorbed compound is removed by repeated washing, a reduction in cellular adherence to the surface of the sensor is obtained as a desirable effect.

The combination of high antibacterial efficacy and low toxicity afforded by the inclusion compounds, with the concomitant cellular adherence of the treated surfaces, is remarkable and recommends these antibacterial components of a multilevel sterilisation process for other biologically active implants as well.

**Keywords:** *multiple stage sterilisation processes, hydrogen peroxide, inclusion compound, perfusion cell culture, cytotoxicity, cellular adherence*

## Zusammenfassung

Der Einsatz physiologischer Wirkstoffe wie  $H_2O_2$  als Komponente in einem mehrstufigen Sterilisationsverfahren für biologisch aktive Implantate ist auf Grund der zu erwartenden geringen Toxizität vorteilhaft. Eine wesentliche Erweiterung der Anwendungsmöglichkeiten von  $H_2O_2$  wird durch grenzflächenaktive geordnete Strukturen mit anionischen, zwitterionischen, kationischen, nichtionischen oder polyfunktionellen Tensiden und  $H_2O_2$  in Form von Einschlußverbindungen in Harnstoff erreicht. Aus der Vielzahl der möglichen Varianten wurde für die Untersuchung in der Perfusionzellkultur die  $H_2O_2$ -Laurylsorbitanester-Harnstoffeinschlußverbindung ausgewählt, die sich durch ein ausgeglichenes antimikrobielles Wirkungsspektrum bei einer im Vergleich zum Wasserstoffperoxid geringen Toxizität auf Säugertierzellen auszeichnet.

Bevor bei der Einwirkung eines Wirkstoffs auf eine lebende Struktur irreversible Schädigungen eintreten, ist Konzentrations- und zeitabhängig mit mikrotoxischen Schäden zu rechnen, die nach Absetzen des Wirkstoffs reversibel sind. Zur Erfassung solcher reversibler Schädigungen haben wir mit der Perfusionzellkultur mit kontinuierlicher biosensorischer Erfassung von Stoffwechselprodukten ein Versuchsmodell entwickelt, bei dem eine Gleichgewichtslage erreicht wird, so daß der Zellstoffwechsel für eine ausreichend lange Beobachtungszeit (bis zu 7 d) relativ konstant ist.

Die Perfusionzellkultur gestattet eine realistische Einschätzung der Auswirkungen von  $H_2O_2$  in physiologisch relevanten Konzentrationen auf Säugertierzellen. Die an Amnionepithelzellen auftretenden Veränderungen wurden mit der Elektronenmikroskopie sowie durch Messung des Glukosestoffwechsels untersucht. Die Zahl der Mikrovilli nimmt bei den Kontrollen in Abhängigkeit vom Alter der Perfusion-

zellkultur ab. Durch  $H_2O_2$  wird dieser Prozeß nicht signifikant beeinflusst. Veränderungen der Zellorganellen sind mit der Transmissionselektronenmikroskopie nicht erkennbar. Der Glukoseverbrauch wird unter Einwirkung von  $H_2O_2$  signifikant vermindert. Diese toxische Wirkung von  $H_2O_2$  ist reversibel. Unter dem Einfluß der Einschlußverbindung wird die Ausbildung von Mikrovilli im Vergleich zur Kontrolle ohne Wirkstoff und zu Zellen während der  $H_2O_2$ -Einwirkung verstärkt. Dieser Effekt ist während der gesamten Einwirkungszeit (4–24 h) signifikant. Auch 24 h nach Beendigung der Einwirkungszeit ist noch eine größere Zahl von Mikrovilli nachweisbar. Veränderungen der Ultrastruktur der Zellen wurden unter dem Einfluß der Einschlußverbindung nicht beobachtet. Der Glukoseverbrauch der Zellen wird reversibel herabgesetzt. Die Verbindung von hoher antimikrobieller Wirksamkeit und geringer Toxizität der Einschlußverbindungen mit verminderter Zytotoxizität der damit behandelten Oberflächen ist bemerkenswert und läßt diese als antimikrobielle Komponenten in mehrstufigen Sterilisationsverfahren auch für andere biologisch aktive Implantate interessant erscheinen.

**Schlüsselwörter:** *mehrstufige Sterilisationsverfahren, Wasserstoffperoxid, Einschlußverbindung, Perfusionzellkultur, Zytotoxizität, Zytotoxizität, Zytotoxizität, Zytotoxizität, Zytotoxizität*

## 1 Einleitung

Insbesondere für die Sterilisation biologisch aktiver Implantate ist es wünschenswert, über antimikrobielle Wirkstoffe zu verfügen, die nur aus naturidentischen oder naturnahen Komponenten bestehen. Kramer et al. (1) haben die Vorteile beschrieben, die durch Bildung supramolekularer Strukturen aus naturnahen Komponenten erreicht werden können. Am Beispiel von Einschlußverbindungen aus Tensiden und  $H_2O_2$  in Harnstoff haben wir gezeigt, daß derartige Verbindungen in einem Zweistufenverfahren zur Sterilisation enzymatischer Biosensoren vorteilhaft eingesetzt werden können (2). Im Gegensatz zur Verwendung von  $H_2O_2$  wird dabei die Funktionalität von enzymatischen Glukosesensoren auch nach längerer Lagerung nicht eingeschränkt (3). Auch im Hinblick auf die Biokompatibilität der sterilisierten Sensoren ergeben sich Vorteile beim Einsatz der Einschlußverbindungen (4). Bei toxikologischen Untersuchungen solcher Einschlußverbindungen waren im Vergleich mit  $H_2O_2$  überraschend günstige Ergebnisse erhalten worden (5). In Fortsetzung dieser Untersuchungen erfolgte daher eine vergleichende elektronenmikroskopische Untersuchung an Amnionepithelzellen (FL-Zellen) in einer Perfusionzellkultur vor, während und nach der Einwirkung von  $H_2O_2$  und einer Einschlußverbindung. Ergänzend dazu wurde der Glukosestoffwechsel der Zellen gemessen.

## 2 Methodik

### 2.1 Synthese der $H_2O_2$ -Laurylsorbitanester-Harnstoffeinschlußverbindung (EO 210)

5 g einer Laurylsorbitanester-Harnstoffeinschlußverbindung wurden mit 5 g 30%igem Percarbamid unter ständigem Durchmischen erwärmt (6). Zwischen 100–120 °C beginnt ein Sinterungsprozeß, der zur weitgehenden Verflüssigung und Homogenisierung des Produkts führt. Die

nach Abkühlung erhaltenen Kristalle enthalten, wie durch iodometrische Titration bestätigt wurde, 15%  $H_2O_2$ .

## 2.2 Prüfkonzentrationen

$H_2O_2$  wurde in einer Konzentration von 0,003% untersucht. Diese Konzentration entspricht einer Konzentration, die in der Umgebung phagozytierender Zellen maximal erreicht werden kann (1). Bei der Phagozytose kann durch Wechselwirkung mit anderen reaktiven Sauerstoffmetaboliten bereits bei so niedrigen Konzentrationen eine antibakterielle Wirksamkeit erwartet werden (7). In vitro ist erst eine Konzentration von 0,0125% bakteriostatisch gegen *S. aureus* wirksam (1). Vergleichend wurde die Einschlußverbindung 0,02%ig, d. h. mit dem gleichen effektiven  $H_2O_2$ -Gehalt (0,003%) untersucht. Bei der In-vitro-Testung der Einschlußverbindung wird bereits durch eine effektive  $H_2O_2$ -Konzentration von 0,003% eine absolute Wachstumshemmung von *S. aureus* beobachtet (1).

## 2.3 Perfusionszellkultur

Für die Perfusionszellkultur nach Minuth (8, 9) wurden FL-Zellen trypsinisiert. 100 ml einer Zellsuspension ( $3 \times 10^6$  Zellen/ml) in Wachstumsmedium (Dulbecco modifiziertes Eagle-Medium mit 10% neonatalem Kälberserum, 1% Natriumhydrogencarbonat und 1% Penicillin/Streptomycin) werden auf einen Zellträger (Thermanox Nunc Inc) gebracht. Nach 24 h Bebrütung bei 37 °C und 5%  $CO_2$ -Gehalt wird der bewachsene Zellträger in den Perfusionsträger (Minucells and Minutissue Vertriebs-GmbH, Bad Abbach) überführt. In das Kulturmedium (MEM Dulbecco mit 1% HEPES und 0,1% Natriumhydrogencarbonat und 1% N-Acetyl-L-Alanyl-L-Glutamin) wird die Prüfsubstanz bzw. bei der Kontrolle steriles destilliertes Wasser gegeben. Die Lösung wird bei 37 °C mit einer Geschwindigkeit von 1 ml/h über den Träger gepumpt, so daß die Zellen ständig mit frischen Nährstoffen versorgt und die Stoffwechselprodukte ständig abgeführt werden. Hinter der Zellkultur wurde im Flußsystem ein enzymatischer Glukosesensor angeordnet (10). Dieser ermöglicht die kontinuierliche Messung des Glukoseverbrauchs der Zellen während des Versuchs.

## 2.4 Transmissionselektronenmikroskopie

Nach 4, 8, 12, 24 und 48 h wurde jeweils ein Zellträger mit den anhaftenden FL-Zellen aus dem Perfusionsträger entnommen, kurz bei 37 °C in Hanks' physiologischer Lösung (Sigma, mit 25 mM  $NaN_3$ ) gewaschen und in Glutaraldehyd (Fluka, 3% im gleichen Puffer, 90 min) von anfangs 37 °C und später 20 °C gelegt und dann 12 bis 24 h bei 4 °C gelagert. Nach gründlichem Waschen in Waschpuffer ( $6 \times 5$  min, 0,1 M Cacodylatpuffer, pH 7,4 mit 0,5 mM  $CaCl_2$ ) wurden die Proben in Osmiumtetroxid (Roth) nachfixiert (90 min, 2% in Waschpuffer), in 0,9% NaCl gewaschen ( $7 \times 5$  min), für 90 min in Uranylazetat (Merck) überführt (2% in 0,9% NaCl) und dreimal kurz in Aqua bidest. gewaschen. Die Entwässerung der Zellen erfolgte in Stufen mit 30, 50, 70, 90 und 96% Ethanol (je 10 min) und 3maligem Wechsel von wasserfreiem Ethanol (je 15 min). Die Proben wurden stufenweise (1:1, 1:3 je 10 min) in Propylenoxid (SERVA) und weiter in das Einbettungsmittel Glycidether 100 (Roth) je 60 min 25, 50, 75, 100% überführt und die Ein-

bettungsmischung nach 12 und 6 h erneuert. Die Zellträger wurden dann mit den Zellen nach unten auf die geglättete Seite von fertigen Harzblöckchen gelegt und nach Vorschrift des Herstellers polymerisiert. Anschließend wurde der Zellträger abgezogen und nach Trimmen eines schmalen Steges Ultradünnschnitte angefertigt (Ultracut S, Leica), die 4 min mit 4% Uranylazetat und 1 min mit Blei nach Hanaichi (11) nachkontrastiert wurden. Die Auswertung der Präparate erfolgte bei 60 kV mit einem Zeiss Transmissionselektronenmikroskop EM 906. Es wurde der Einfluß der untersuchten Verbindungen auf die Ultrastruktur der FL-Zellen untersucht und die Durchmesser der Mitochondrien ausgemessen. Die Signifikanzprüfung erfolgte im Rangsummentest nach Wilcoxon für unverbundene Stichproben.

## 2.5 Rasterelektronenmikroskopie

Für die Präparation der Proben wurde eine von Wollweber et al. (12) sowie Hanschke und Schauer (13) eingesetzte Methode modifiziert, um die während der Entwässerung und Trocknung auftretenden Schrumpfungen einzuschränken, die insbesondere bei den auf einer Unterlage haftenden Gewebekulturzellen erhebliche Präparationsartefakte verursachen können. Alle Präparationschritte mit Ausnahme der Lagerung über Nacht in 70% Ethanol erfolgten bei Raumtemperatur. Nach gründlichem Waschen in Waschpuffer ( $6 \times 5$  min, 0,1 M Cacodylatpuffer, pH 7,4 mit 0,5 mM  $CaCl_2$ ) wurden die Proben in frisch filtriertes Tannin (Mallinckrodt Inc, USA, Nr. LOT1764, 2% in Waschpuffer, 90 min) überführt und erneut 6 mal 5 min in Waschpuffer gespült. Anschließend folgte eine Nachfixierung in Osmiumtetroxid (2% in Waschpuffer, 90 min) und nach gründlichem Waschen mit 0,9% NaCl eine Fixierung in Uranylazetat (2% in 0,9% NaCl, 90 min). Nach zweimaligem Waschen in Aqua bidest. wurden die Proben in einer aufsteigenden Ethanolreihe entwässert,  $3 \times 20$  min in 100% Ethanol gelegt und dann über Mischstufen (25, 50, 75%) in Essigsäure-iso-amylester (Riedel-de Haen) überführt. Die Trocknung der Proben erfolgte durch Kritische-Punkt-Trocknung (Polaron CPC7501, VG Microtech, U. K.) unter Verwendung von  $CO_2$ . Die Proben wurden auf Objektträger aufgeklebt, mit Leitsilber versehen und in einem Sputter-Coater (Polaron SC7640, VG Microtech, U. K.) mit 5 nm Gold beschichtet. Die Auswertung erfolgte mit einem Zeiss Rasterelektronenmikroskop DSM 940 A bei 10 kV Beschleunigungsspannung und einer Vergrößerung von 1000 $\times$ .

Der Einfluß der untersuchten Verbindungen auf die Zellmorphologie und auf den Besatz der Zelloberfläche mit Mikrovilli wurde in den gleichen Zeitintervallen wie bei 2.4 untersucht. Es wurden die Bilder von 1397 Zellen (Kontrollen), 1343 Zellen ( $H_2O_2$ ) bzw. 1274 Zellen (EO 210) ausgewertet und von 2 unabhängigen Personen Klassen mit hohem (+++), mittlerem (++) und geringem (+) Mikrovillibesatz zugeordnet. Zur Signifikanzberechnung wurde der  $\chi^2$ -Test eingesetzt.

## 3 Ergebnisse

Nach etwa 15 h haben die Zellen unter Bedingungen der Perfusionszellkultur einen stabilen stationären Zustand

erreicht, bei dem nur noch geringe Änderungen der Stoffwechselaktivität zu beobachten sind (Abb. 1). In dieser Phase werden etwa 15–20% der dem Nährmedium zugesetzten Glukose verbraucht. Durch das Weglassen mitotisch wirksamer Stimuli werden die Zellen in der Perfusionszellkultur in einer organtypischen Interphase gehalten. Dieser physiologische Zustand ist durch eine Gleichgewichtslage der Zellen mit bis zu 7 Tagen annähernd konstanten Stoffwechselleistungen gekennzeichnet (10). Ausgangspunkt der nachfolgenden Untersuchungen war eine 18stündige Zellkultur, bei der die Plateauphase sicher erreicht wurde.

Unter den Bedingungen der Perfusionszellkultur ließen sich in der stationären Phase (22–66 h) mit der Transmissionselektronenmikroskopie keine Veränderungen der Ultrastruktur der Kontrollzellen erkennen. Zum Beispiel war der Durchmesser der Mitochondrien während dieser Zeit konstant (0,45 + 0,16 µm).

Auch ohne Anwesenheit eines Wirkstoffes wurde ein sehr langsam abnehmender Glukoseverbrauch in Abhängigkeit von der Versuchsdauer (Korrelationskoeffizient: 0,946,  $P \leq 0,05$ ) beobachtet (Tab 1).

Während der Beobachtungszeit kam es in allen Versuchsgruppen zu deutlichen Veränderungen des Besatzes der Zelloberfläche mit Mikrovilli (Abb. 2). Die Ergebnisse der beiden unabhängigen Untersucher unterschieden sich dabei nicht signifikant voneinander.

Auch ohne Wirkstoffeinfluß nahm der Anteil der mikrovillireichen Fraktion mit zunehmenden Alter der Zellkul-

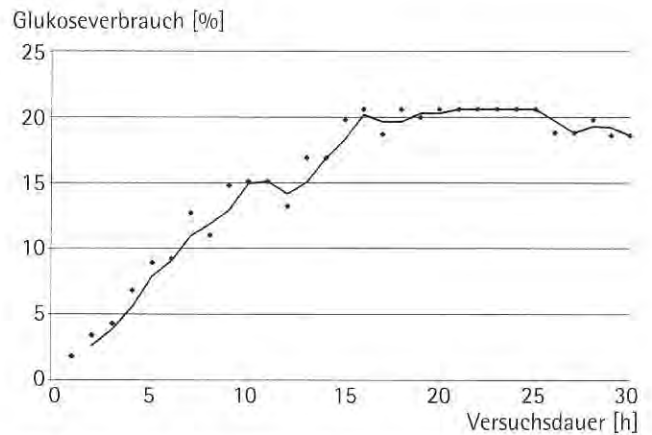


Abbildung 1: Glukoseverbrauch von humanen Amnionepithelzellen in einer Perfusionszellkultur bis zur Ausbildung einer Plateauphase, bezogen auf die mit dem Nährmedium angebotene Glukose.

Tabelle 1: Biosensorisch ermittelter Glukoseverbrauch in einer Perfusionszellkultur.

Versuchsgruppe	Glukoseverbrauch im Vergleich zum Ausgangswert nach 18 h in %				
	22 h	26 h	30 h	42 h	66 h
Kontrolle	99	96,7	97,8	96,7	89,1
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (18–42 h)	90,4	73,6	67,7	67,7	90,4
Einschlußverbindung (18–42 h)	98	88	65	68,8	91,5

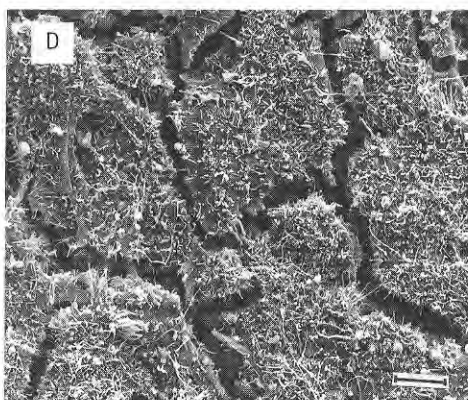
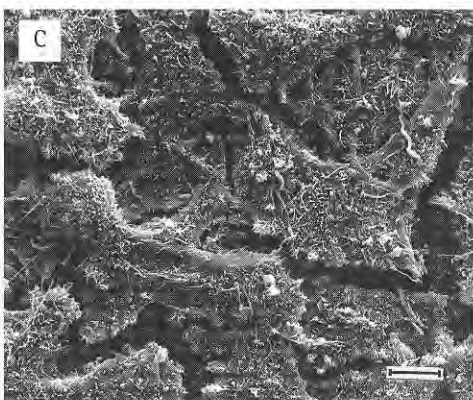
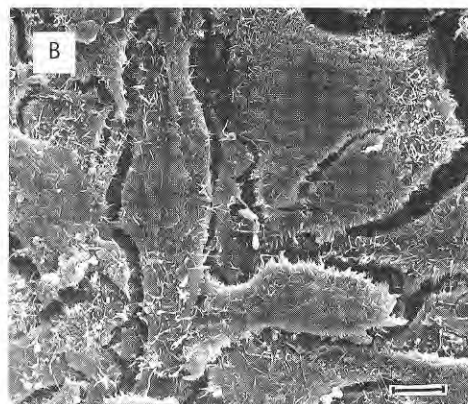
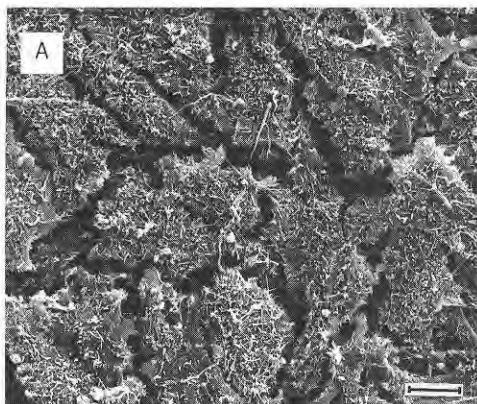


Abbildung 2: Einfluß von Wasserstoffperoxid und einer Wasserstoffperoxid-Laurylsorbitanester-Harnstoffeinschlußverbindung (EO 210) auf die Ausbildung von Mikrovilli auf FL-Zellen. 24 h nach Absetzen der Wirkstoffzufuhr ist bei H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-behandelten Zellen die Zahl der Mikrovilli stark reduziert, während die mit EO 210 behandelten Zellen eine hohe Anzahl von Mikrovilli ausweisen.

A: FL-Zellen vor Beginn und B: 24 h nach Absetzen der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Zugabe.

C: FL-Zellen vor Beginn und D: 24 h nach Absetzen der Zufuhr von EO 210.

Maßstab = 10 µm.

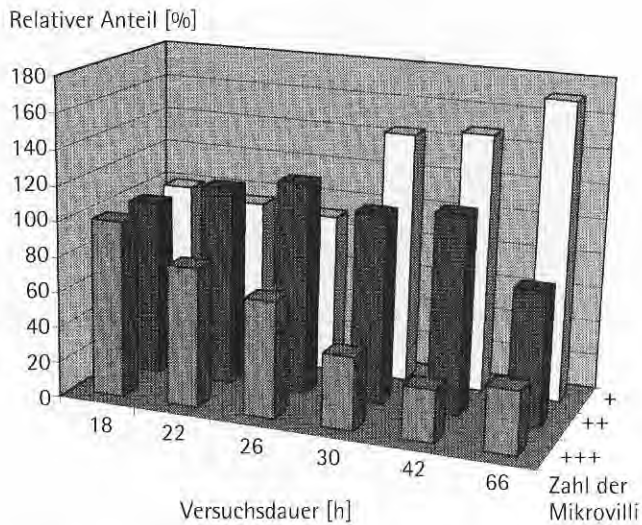


Abbildung 3: Relative Anteile von Zellen mit unterschiedlichem Mikrovillibesatz bei unbehandelten Kontrollen. Mikrovillibesatz: hoch +++, mittel ++, gering +

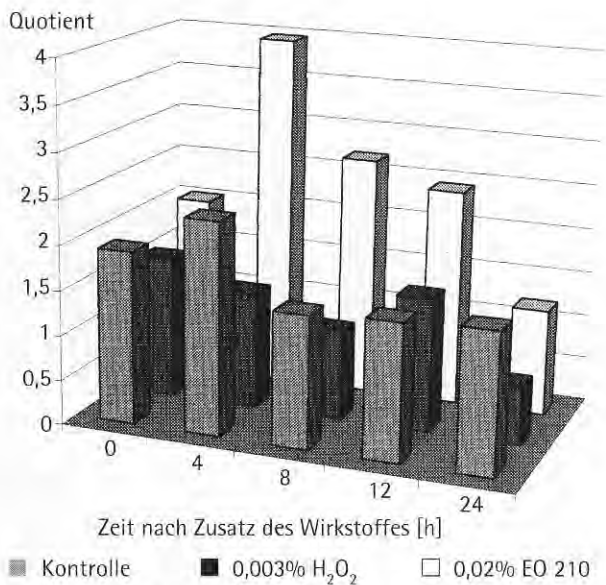


Abbildung 5: Verschiebung des Verhältnisses von Zellen mit mittlerem und geringem Mikrovillibesatz bei unterschiedlicher Behandlung.

tur kontinuierlich ab (Abb. 3). Dagegen stieg der Anteil der Zellen mit einem mittleren oder niedrigen Mikrovilli-Besatz. Die Verschiebungen der mikrovillireichen Fraktion zur Fraktion mit einem mittleren Besatz an Mikrovilli gegenüber dem Ausgangswert sind von 26 h bis zum Beobachtungsende nach 66 h signifikant. 30 h nach Versuchsbeginn begann auch eine Verschiebung zur mikrovilliarmen Fraktion, dieser Prozeß ist gegenüber dem Ausgangswert jedoch erst nach 42 h signifikant. Andere morphologische Veränderungen waren bei den Kontrollen während der Beobachtungszeit nicht erkennbar.

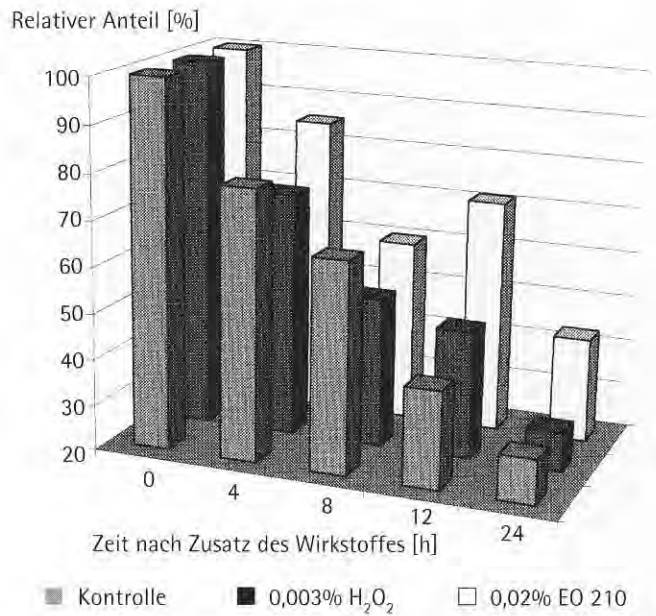


Abbildung 4: Veränderungen der mikrovillireichen Fraktion in Abhängigkeit von der Einwirkungszeit bei unterschiedlicher Behandlung.

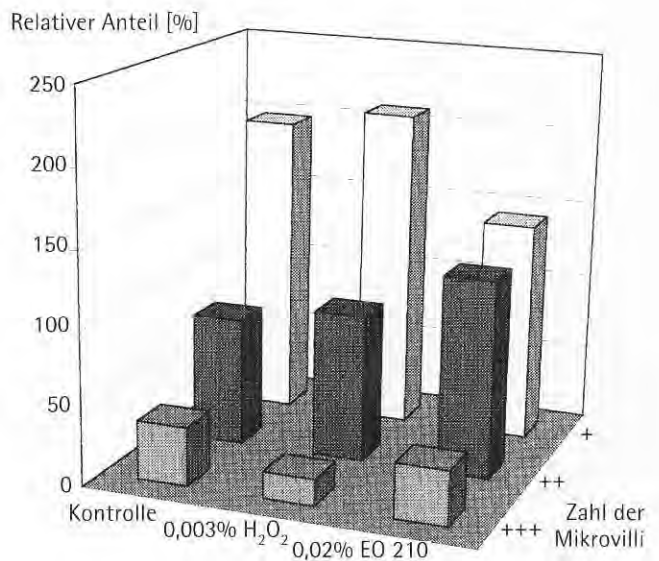


Abbildung 6: Relative Anteile der Zellen mit unterschiedlichem Mikrovillibesatz 24 h nach Absetzen des Wirkstoffes. Mikrovillibesatz: hoch +++, mittel ++, gering +

Wenn dem Nährmedium H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> zugesetzt wird, kommt es zu keinen erkennbaren Veränderungen der Ultrastruktur der Zellen. Der mittlere Durchmesser der Mitochondrien lag während der Einwirkungszeit zwischen 0,37 und 0,47 mm und wich zu keinem Zeitpunkt signifikant vom mittleren Durchmesser der Kontrollen (0,45 ± 0,16 mm) ab. Dagegen kam es zu einer signifikanten Verminderung des Glukoseverbrauchs der Zellen, der nach Absetzen des Wirkstoffes vollständig reversibel ist (Tab. 1). Trotz dieser biochemisch meßbaren Einschränkung der Stoffwechselaktivität der Zellen in dem für sie ungünstigeren Milieu

unterschied sich der Besatz der Zellen mit Mikrovilli nur wenig von dem der Kontrollen (Abb. 4).

Während der Einwirkung der Einschlußverbindung ließen sich keine Veränderungen der Zellultrastruktur erkennen. Die Durchmesser der Mitochondrien lagen zwischen 0,35 und 0,45  $\mu\text{m}$  und wichen nicht signifikant von der Kontrolle und von denen in Zellen unter  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Einwirkung ab. Es kommt zu einer Herabsetzung des Glukoseverbrauchs der Zellen, der im Vergleich zu  $\text{H}_2\text{O}_2$  in den ersten Stunden der Einwirkungszeit etwas verzögert eintritt (Tab. 1). Der Einfluß auf den Glukoseverbrauch ist vollständig reversibel.

Unter dem Einfluß der Einschlußverbindungen war der Anteil der Zellen mit einem reichen Mikrovillibesatz im Vergleich zu den beiden anderen Versuchsgruppen erhöht (Abb. 2). Der physiologische Prozeß der Verminderung der Ausbildung von Mikrovilli, den wir bei den Kontrollen beobachtet haben, wurde unter dem Einfluß der Harnstoffeinschlußverbindung verlangsamt. (Abb. 4). Das gilt auch im Vergleich zur  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Einwirkung. Die Verschiebung zu einer Fraktion mit einem mittleren Gehalt an Mikrovilli und auch zu der Fraktion mit einem hohen Anteil an Mikrovilli ist während der Einwirkung der Einschlußverbindung EO 210 signifikant von der während der Einwirkung von  $\text{H}_2\text{O}_2$  verschieden ( $\chi^2$ -Test,  $P < 0,05$ ) (Abb. 5). Der Einfluß auf die Ausbildung von Mikrovilli war auch 24 h nach Absetzen des Wirkstoffes deutlich erkennbar (Abb. 6).

#### 4 Diskussion

$\text{H}_2\text{O}_2$  ist ein physiologischer Wirkstoff, der im Säugetierorganismus als Mediator zytotoxischer und immunregulatorischer Wirkungen bei der Infektabwehr eine große Rolle spielt (7). Das Konzept einer essentiellen Beteiligung sauerstoffabhängiger Mechanismen an der bakteriziden Wirkung von Phagozyten ist heute allgemein akzeptiert. Blut-Monozyten bilden nach Stimulierung innerhalb von 15 min 0,5 nmol  $\text{H}_2\text{O}_2/10^6$  Zellen, Alveolarmakrophagen 1,2 nmol/ $10^6$  Zellen und polymorphkernige Granulozyten sogar  $4,7 + 0,3$  nmol/ $10^6$  Zellen (7). Eine  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Konzentration von 0,003%, wie sie bei unseren Versuchen eingesetzt wurde, bewirkt eine Hemmung der zytolytischen Aktivität von Killerzellen ohne diese abzutöten (14). Bakterien und Säugetierzellen verfügen in unterschiedlichem Ausmaß über Mechanismen zur Reparatur der durch  $\text{H}_2\text{O}_2$  bewirkten Läsionen (15). Die Wirkung von  $\text{H}_2\text{O}_2$  ist abhängig von den Schutzmechanismen, die die meisten Zellen gegenüber der toxischen Wirkung reaktiver Sauerstoffverbindungen ausgebildet haben (16). Säugetierzellen sind gegen solche  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Konzentrationen, wie sie bei der Phagozytose entstehen, geschützt. Der Säugetierorganismus besitzt außerdem Möglichkeiten zum raschen Abbau von  $\text{H}_2\text{O}_2$ , so daß eine Anhäufung toxischer Konzentrationen nicht eintreten kann. Bei einem im Stoffwechsel der Säugetiere ständig gebildeten Wirkstoff ist keine Sensibilisierung zu erwarten. Diese Vorteile eines physiologischen Wirkstoffes werden bei einem Kombinationsverfahren zur Sterilisation biologisch aktiver Implantate genutzt, bei dem nach Behandlung mit niedrig dosierter Gammastrahlung eine La-

gerung in einer  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Lösung erfolgt (17). Bei Untersuchungen mit einem Glukosesensor zeigte sich aber, daß insbesondere bei längerer Einwirkung Schädigungen des Meßsystems nicht auszuschließen sind (3).

Wenn  $\text{H}_2\text{O}_2$  zusammen mit naturnahen Tensiden in Harnstoff eingelagert wird, werden geordnete grenzflächenaktive Strukturen gebildet, die eine höhere antimikrobielle Wirksamkeit als die Einzelkomponenten aufweisen (1, 2). Obwohl unsere Kenntnisse über solche Strukturen noch sehr gering sind, werden funktionale supramolekulare Strukturen schon in verschiedenen Bereichen der Technik eingesetzt (18). Durch grenzflächenaktive geordnete Strukturen werden die Möglichkeiten zum Einsatz des  $\text{H}_2\text{O}_2$  erweitert. Da eine Beeinträchtigung der Funktionalität von Glukosesensoren auch nach längerer Lagerung in 3%iger Lösung der Einschlußverbindung nicht auftritt, wird der oben genannte Nachteil bei der Anwendung von  $\text{H}_2\text{O}_2$  vermieden (3). Für einen Einsatz bei der Sterilisation empfindlicher Güter spricht vor allem die sporozide und antivirale Wirkung dieser Einschlußverbindungen, da Sporen und Viren Problemkeime bei der Sterilisation darstellen. Im experimentell überprüfbareren Bereich kann eine Sporenreduktion um 6 log-Stufen nachgewiesen werden. (2).

Gleichzeitig wird eine Verminderung der Toxizität erreicht. Besonders auffällig wird dies bei der zytotoxischen Wirkung in vitro.  $\text{H}_2\text{O}_2$  entfaltet auf humane Amnionepithelzellen in Monolayerkultur eine starke zytotoxische Wirkung (19). Bei Einwirkung der Einschlußverbindungen mit vergleichbarem  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Anteil wird kein zytotoxischer Effekt beobachtet. Bei einigen Verbindungen ist in Abhängigkeit von den eingesetzten Tensiden die Zellzahl nach einer Einwirkungszeit von 24 h sogar erhöht (5). Auch die Phytotoxizität ist stark vermindert (5). Die kumulative Hautreizung bei mit Einschlußverbindungen konservierten Tensiden ist gleich oder sogar geringer als die der unkonservierten Tenside (1).

Um diese unerwarteten Effekte näher zu untersuchen und auch eventuelle mikrotoxische und reversible Schädigungen zu erkennen, haben wir vergleichend die Einwirkung von  $\text{H}_2\text{O}_2$  und Einschlußverbindungen auf humane Amnionepithelzellen in einer Perfusionszellkultur geprüft. Bei diesen Untersuchungen haben wir eine Konzentration gewählt, wie sie in der Umgebung phagozytierender Zellen auftreten kann. Solche Konzentrationen von  $\text{H}_2\text{O}_2$  können nur mit der Perfusionszellkultur untersucht werden, da bei der Monolayerkultur schon viel geringere Konzentrationen zu einem Absterben der Zellen führen. Die Perfusionszellkultur nach Minuth (8) spiegelt die Verhältnisse in vivo, bei denen Säugetierzellen vor  $\text{H}_2\text{O}_2$  in antibakteriell wirksamen Konzentration weitgehend geschützt sind, besser wider als die Monolayerkultur. Der Übergang zur Perfusionszellkultur ist deshalb ein wesentlicher Fortschritt bei der toxikologischen Charakterisierung eines Wirkstoffes. Als sehr empfindlicher Indikator einer Veränderung der Zelle erwies sich die Messung des Glukosestoffwechsels, die mit Hilfe von Biosensoren sehr elegant möglich ist (10). Damit werden reversible Veränderungen des Zellstoffwechsels erfaßt, bevor morphologisch erkennbare Schädigungen eintreten. Die bei zeitweiliger Einwirkung von  $\text{H}_2\text{O}_2$  bzw. der Ein-

schlußverbindung beobachtete Verminderung des Glukosestoffwechsels ist vollständig reversibel. Bei einer Fortführung der Versuche konnte gezeigt werden, daß der Stoffwechsel selbst bei einer Einwirkung von 0,003%  $H_2O_2$  über 4 d während der gesamten Beobachtungszeit auf leicht reduziertem Niveau erhalten bleibt.

Lichtmikroskopisch waren in der Perfusionszellkultur im Gegensatz zur Monolayerkultur keine Veränderungen der Zellen unter dem Einfluß von  $H_2O_2$  in einer Konzentration von 0,003% zu erkennen. Mit der Transmissions-elektronenmikroskopie konnte gezeigt werden, daß unter den Bedingungen der Perfusionszellkultur auch alle ausgewerteten Zellorganellen in ihrer Morphologie unbeeinflusst bleiben.

Die vielfältigen Beziehungen einer Zelle mit ihrer Umwelt kommen in einer Reihe morphologischer Differenzierungen der Zelloberfläche zum Ausdruck. Mikrovilli kommen vor allem an resorbierenden Epithelien vor und können die Oberfläche der Zellen um ein mehrfaches vergrößern. Sie dienen dem Stoffaustausch mit dem umgebenden Medium. Ihre Anzahl und Länge kann in Abhängigkeit vom Aktivitätszustand der Zelle stark schwanken. Die Ausbildung der Mikrovilli ist ein aktiver Stoffwechselprozeß, der in einem ungünstigen Milieu bzw. bei Alterung der Zellkultur eingeschränkt wird. Die Zahl der Mikrovilli ändert sich in der Perfusionszellkultur mit dem Alter der Zellen. Auch bei diesen empfindlichen differenzierten Oberflächenstrukturen der Zelle und den mit dem Alterungsprozeß verbundenen Vorgängen zeigen sich signifikante Unterschiede zwischen der Einwirkung von  $H_2O_2$  und der entsprechenden Einschlußverbindung. Im Gegensatz zu  $H_2O_2$  wird die Ausbildung der mikrovillireichen Fraktion durch die  $H_2O_2$ -Laurylsorbitanester-Harnstoffeinschlußverbindung während der gesamten Einwirkungszeit von 24 h begünstigt.

Die in dieser Studie vorgelegten elektronenmikroskopischen Befunde sowie die Beobachtungen zur reversiblen Beeinflussung des Glukosestoffwechsels ordnen sich in Hinweise für eine geringe Toxizität der Einschlußverbindungen ein. Das gilt selbst im Vergleich zum physiologischen Wirkstoff  $H_2O_2$ , gegen den Säugetierzellen in vivo weitgehend geschützt sind.

Nach dem in den vorangegangenen Mitteilungen dieses Beitrages beschriebenen Vorschlag zur Sterilisation von enzymatischen Glukosesensoren in einem zweistufigen Verfahren wird der Sensor bis zur Anwendung in einer Lösung gelagert, die 3% der Einschlußverbindung EO 210 enthält (3). Dabei ist davon auszugehen, daß die Einschlußverbindung teilweise an der Oberfläche des Sensors adsorbiert wird. Die vorliegenden Untersuchungen sind weitere Belege dafür, daß adsorbierte Anteile der Einschlußverbindung, die evtl. bei der Implantation des Sensors übertragen werden, toxikologisch unbedenklich sind. Wenn dieser adsorbierte Anteil nicht durch mehrmaliges Waschen entfernt wird, kommt es zu einer erwünschten Verminderung der Zytoadhärenz an der Sensoroberfläche (4).

Die Verbindung von hoher antimikrobieller Wirksamkeit und geringer Toxizität der Einschlußverbindungen mit

verminderter Zytoadhärenz der damit behandelten Oberflächen ist bemerkenswert und läßt diese als antimikrobielle Komponenten in mehrstufigen Sterilisationsverfahren auch für andere biologisch aktive Implantate interessant erscheinen.

## Danksagung

Das Projekt wurde unterstützt durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft Projekt Jü 334. Wir danken Frau Anette Meuche und Herrn Hartmut Fischer für die technische Assistenz. ■

## Literatur

1. Kramer A, Jülich WD, Ohme R: Neue funktionale Supramolekulare Strukturen von Harnstoff, Wasserstoffperoxid und Tensiden mit Eignung zur Konservierung. 1. Mitteilung: Arbeitshypothese, bakteriostatische Wirksamkeit und Hautverträglichkeit. Hyg Med 1995; 20: 330–343.
2. Jülich, WD, von Woedtke Th, Kindel E, Conrads J, Pfeiffer M: Schonende Sterilisation von biologisch aktiven Implantaten. I. Anwendungsmöglichkeiten der von einem Niederdruckentladungsstrahler generierten UV-Resonanzstrahlung bei der Keimreduzierung. Hyg Med 1998; 23: 338–344.
3. von Woedtke Th, Jülich WD, Abel P, Kindel E, Schröder LW: Schonende Sterilisation von biologisch aktiven Implantaten II. Sterilisation von enzymatischen Glukose-Biosensoren durch Kombination von plasmagestützter allseitig homogener ultravioletter Bestrahlung und Wasserstoffperoxid-Einschlußverbindungen. Hyg Med 1998; 23: 346–352.
4. Urban G, Schlosser M, Jülich WD, von Woedtke Th, Krowas D, Lange J, Ziegler B: Schonende Sterilisation von biologisch aktiven Implantaten III. Einfluß unterschiedlicher Sterilisationsverfahren auf die Biokompatibilität von Glukosesensormembranen. Hyg Med 1998; 23 (11): 459–464.
5. Jülich, WD, Kramer A, Ohme R, von Woedtke Th, Abel P: Synthese, antimikrobielle Wirksamkeit und Verträglichkeit neuer funktionaler Strukturen von Harnstoff, Wasserstoffperoxid und Tensiden. Pharmazie (im Druck).
6. Ohme R, Ballschuh D, Jülich WD, Kramer A: Neue Wirkstoffkombination auf der Basis von Harnstoffeinschlußverbindungen, Verfahren zu ihrer Herstellung und ihre Verwendung für Konservierung, Desinfektion und Sterilisation. Europapatent 94112805.0, US-Patent 08327189, Japanisches Patent 273851/94.
7. Kramer A, Hetmanek R, Weuffen W, Ludewig R, Wagner R, Jülich WD, Jahr H, Manigk W, Berling H, Pohl U, Adrian V, Hübner G, Paetzelt, H: Wasserstoffperoxid. In: Weuffen W, Berencsi G, Gröschel D, Kemter B, Kramer A, Krasilnikow AP: Handbuch der Antiseptik, Bd. II/3, Antibakterielle, antifungielle und antivirale Antiseptik – ausgewählte Antiseptika (Hrsg. Kramer A, Weuffen W, Krasilnikow AP, Gröschel D, Bulka E, Rehn D), Berlin: Verlag Volk u. Gesundheit, 1986; 447–491.
8. Minuth WW: Vorrichtung für die Kultivierung von Zellen DE 3923279 (1991).
9. Minuth, WW: Apparatus for cultivating cells, US-Pat. Nr. 5 190, 878 (1993).
10. Jülich WD, von Woedtke Th, Abel P: Meßanordnung zur Erfassung von toxischen, subtoxischen, chronisch toxischen und/oder stimulierenden Effekten von Wirk- und Schadstoffen mit Hilfe von Perfusionszellkulturen. DP 197 09 649.2, 7.3.97.

11. Hanaichi T, Sato T, Iwamoto T, Malavasi-Yamashiro J, Hoshino M, Mizuno N: A stable lead by modification of Sato's method. *J Electron Microsc (Tokyo)* 1986; 35 (3): 304-306.
12. Wollweber L, Stracke R, Gothe U: The use of a simple method to avoid shrinkage during SEM preparation. *J Microsc* 1981; 121: 185-189.
13. Hanschke R, Schauer F: Improved ultrastructural preservation of yeast cells for scanning electron microscopy. *J Microsc* 1996; 184: 81-87.
14. El-Hag A, Clark RA: Down regulation of human natural killer activity against tumors by the neutrophil myeloperoxidase system and hydrogen peroxide. *J Immunol* 1984; 133: 391-397.
15. Hånström L, Johansson A, Carlson J: Lactoperoxidase and thiocyanate protect cultured mamalian cells against hydrogen peroxide toxicity. *Med Biol* 1983; 61: 268-274.
16. Nathan CF: Secretion of oxygen intermediates: role in effector functions of activated macrophages. *Fed Proc* 1982; 41: 2206-2211.
17. Von Woedtke Th, Jülich WD, Kramer A, Nieber D, Pfeiffer M: Untersuchungen zur kombinierten Wirkung von ionisierender Strahlung und Wasserstoffperoxid im Hinblick auf die Sterilisation enzymatischer Biosensoren. *Hyg Med* 1994; 19: 646-656.
18. NN: Funktionale Supramolekulare Systeme. Positionspapier der Deutschen Gesellschaft für chemisches Apparatewesen, Chemische Technik und Biotechnologie e.V. (DE-CHEMA) im Auftrag BMBF, Frankfurt/Main, 1994.
19. Adrian V, Jülich WD, Kramer A, Alhitari N, von Woedtke Th, Abel P: Einfluß von antimikrobiell wirksamen Einschlußverbindungen des Wasserstoffperoxids auf humane Amnionepithelzellen. *Hyg Med* 1998; 23 (Suppl. 2): 94.