

Aus dem Institut für Arbeits- und Sozialmedizin der Universität Tübingen

Abteilung Arbeits- und Sozialmedizin

Direktor: Professor Dr. F. W. Schmahl

**In vitro-Untersuchungen zur Beeinflussung der
Migration glatter Gefäßwandmuskelzellen durch
bakterielle Hyaluronatlyase**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Karsten Heinrich Gesellmann
aus
Dresden

2003

Dekan: Professor Dr. C.D. Claussen

1. Berichterstatter: Professor Dr. P.C. Dartsch

2. Berichterstatter: Professor Dr. H. Heinle

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	3
1.1	Hyaluronsäure.....	4
1.2	Hyaluronidasen.....	5
1.2.1	Entdeckung der Hyaluronidasen / Historisches.....	5
1.2.2	Charakterisierung der verschiedenen Hyaluronidasen.....	5
1.2.2.1	Blutegeltyp.....	6
1.2.2.2	Testikulärtyp.....	6
1.2.2.3	Hyaluronatlyasen.....	8
1.2.3	Allgemeine Eigenschaften und Wirkungen der Hyaluronidasen.....	8
1.2.4	Möglichkeiten zur Regulierung der Hyaluronidaseaktivität.....	9
1.2.5	Anwendungsmöglichkeiten der Hyaluronidasen.....	9
1.3	Testikuläre Hyaluronidase vs. Bakterielle Hyaluronatlyase.....	10
1.4	Magnesium und seine Kombination mit Hyaluronidase.....	11
1.5	Thema der Arbeit.....	12
2	Material und Methoden	13
2.1	Gewinnung der Gefäßwandmuskelzellen.....	13
2.2	Testsubstanzen.....	13
2.3	Zellkultur.....	15
2.3.1	Kulturmedien und Kulturbedingungen.....	15
2.3.2	Routinekultivierung.....	15
2.4	Zellmigrationstest.....	16
2.4.1	Zellaussaat.....	16
2.4.2	Mediumwechsel.....	16
2.4.3	Startlinienschnitt und Testsubstanzzugabe.....	18
2.4.4	Fixierung und Färbung der ausgewanderten Zellen.....	18
2.5	Mikrofotografische Dokumentation.....	20
2.6	Datenverarbeitung.....	20
2.7	Statistische Auswertung.....	21

3	Ergebnisse	22
3.1	MgCl ₂	22
3.2	Bakterielle Hyaluronatlyase.....	24
3.3	Bakterielle Hyaluronatlyase und 1 µg/ml MgCl ₂	26
3.4	Bakterielle Hyaluronatlyase und 100 µg/ml MgCl ₂	28
3.5	HA.....	30
3.6	HA und 1.000 IU/ml bakterielle Hyaluronatlyase.....	32
3.7	HA, 100 µg/ml MgCl ₂ und 1.000 IU/ml bakterielle Hyaluronatlyase..	34
3.8	Beispiele mikrofotografischer Aufnahmen.....	36
4	Diskussion	39
4.1	Bakterielle Hyaluronatlyase und HA.....	39
4.1.1	Beeinflusst HA bei alleiniger Zugabe die Zellmigration?.....	39
4.1.2	Wie wirkt sich die HA-Spaltung durch bakterielle Hyaluronatlyase auf die Migration aus?.....	41
4.2	Bakterielle Hyaluronatlyase und MgCl ₂	42
4.2.1	Magnesiumwirkungen.....	42
4.2.2	Wie interagieren bakterielle Hyaluronatlyase und MgCl ₂ ?.....	44
4.3	Bakterielle Hyaluronatlyase, HA und MgCl ₂	46
5	Zusammenfassung	47
6	Literaturverzeichnis	49
7	Abkürzungsverzeichnis	53

1 Einleitung

Die Bedeutung der stoffwechselbedingten Gefäßerkrankungen in den Industriegesellschaften nimmt ständig zu; außer den Folgen für den Kranken selbst mit noch nicht absehbaren volkswirtschaftlichen Problemen. Eine große Bedeutung hat hier die Atherosklerose, deren Risikofaktoren neben genetischer Disposition und männlichem Geschlecht vor allem Hypercholesterinämie, arterielle Hypertonie und Nikotinabusus sind.

Die WHO definiert Atherosklerose als „variable Kombination von Intimaveränderungen, bestehend aus herdförmigen Ansammlungen von Lipiden, komplexen Kohlenhydraten, Blut- und Blutbestandteilen, Bindegewebe und Kalziumablagerungen, verbunden mit Veränderungen der Media“ (Riede und Schaefer, 1993).

Diese Strukturveränderungen der Gefäßwand spielen nicht nur bei der metabolisch ausgelösten Atherosklerose eine Rolle. Ähnliche Mechanismen treten auch bei der Restenosierung ballondilatierter Gefäßstenosen oder nach Angioplastie auf.

Bei Gefäßverschlusserkrankungen ist nach Großhennig (1966) die Ernährungssituation der Gefäßwand entscheidend (Linzbach, 1959). Die „innere Ernährung“ erfolgt über das Gefäßlumen, die „äußere“ über die Vasa vasorum. Die „innere Ernährung“ ist für das innere Drittel der Gefäßwand verantwortlich, wobei dem von Warburg und Minami (1923) geprägten Begriff der „kritischen Gewebsdicke“ eine besondere Bedeutung zukommt.

Die Blutgefäßwände des Menschen sind wie die anderer Säugetiere dreischichtig aus Intima, Media und Adventitia aufgebaut. Die wesentlichen zellulären Komponenten sind die glatten Muskelzellen und die Endothelzellen. Beide interagieren durch Signalstoffe. So produzieren zum Beispiel die Endothelzellen Faktoren, durch welche die Mediamyozyten unter physiologischen Bedingungen an der Proliferation in der Gefäßwand gehindert werden.

Die Gefäßwandmuskelzellen können in zwei Formen vorkommen: in der kontraktilen Form (= k-Phänotyp) und der metabolisch aktiven Form (= m-Phänotyp) (Übersicht bei Dartsch, 1985). Unter physiologischen Bedingungen

kommen diese Myozyten vor allem als k-Form in Gefäßwänden vor. Bei chronischer Endothelschädigung verringert sich die Mitosehemmung mangels endothelialer Faktoren. Die ruhenden Myozyten (k-Form) des subendothelialen Mesenchyms und der Media können sich in die metabolisch aktive Form (= m-Form) mit ausgeprägtem Proliferationsverhalten und hoher Stoffwechselaktivität umwandeln. Dabei produzieren sie große Mengen faserhaltiger Grundsubstanz (Riede und Schaefer, 1993). Es kommt zu einem fibrotischen Umbau, der zu Verdickung, Verhärtung und Elastizitätsverlust der Gefäßwand führt. Mediamyozyten können bei diesem Vorgang durch Migration in den subendothelialen Raum gelangen.

Die Gefäßwände enthalten neben den zellulären Komponenten noch die im Organismus ubiquitär vorkommende extrazelluläre Matrix, bestehend aus kollagenen und elastischen Fasern sowie Proteoglykanen (frühere Bezeichnung = Mukopolysaccharide). Ihre Funktion erstreckt sich von der Regulation der Gewebefestigkeit und –verformbarkeit über den Stofftransport bis hin zur Differenzierungsregulation der in ihr befindlichen oder an sie angrenzenden Zellen (z.B. Mediamyozyten). Damit können Gewebsstrukturen gesteuert werden (Riede und Schaefer, 1993). Für migrierende Zellen stellt die extrazelluläre Matrix eine Leitstruktur dar (Herman und Castellot, 1987).

1.1 Hyaluronsäure

Ein wichtiger Bestandteil der extrazellulären Matrix ist die Hyaluronsäure (HA). HA ist ein Polysaccharid aus der Gruppe der Glukosaminoglykane und besteht aus Glucuronsäure-N-Acetylglukosamin-Grundeinheiten. HA kommt chemisch identisch im menschlichen und tierischen Organismus vor (Farr et al., 1997). HA wird auch als die „Kittsubstanz der extrazellulären Matrix“ beschrieben (Pschyrembel Klinisches Wörterbuch, 1998). HA ist ein wichtiger Faktor bei Vorgängen wie Regeneration, Entzündung und Immunantwort oder Tumorgenese. Ihre Wirkung entfaltet sie über verschiedene Gewebsbindeproteine, vor allem das Zelloberflächenbindeprotein CD 44. CD 44-vermittelt sind zum Beispiel die Haftung von Zellen an der extrazellulären Matrix, die metastatische

Ausbreitung von Tumorzellen oder auch die durch HA vermittelte Signaltransduktion (Menzel und Farr, 1998).

Während der Embryonalentwicklung, bei Verletzungen, Immunreaktionen, Entzündungen und auch bei der Tumorgenese kommt es nach Fraser et al. (1997) zur Expansion der extrazellulären Matrix und deren Anreicherung mit HA. Die damit verbundenen Syntheseveränderungen der HA werden wahrscheinlich über Wachstumsfaktoren, Zytokine und andere Mediatoren gesteuert. Zytokine und einige Wachstumsfaktoren steuern auch die Zellfortbewegung (Migration und Direktion) durch Veränderung der interzellulären Adhäsionsmoleküle oder der Extrazellulärmatrix (Riede und Schaefer, 1993).

Verschiedene Autoren diskutieren einen Zusammenhang zwischen der Intimahyperplasie nach Endothelschädigung durch Proliferation und Migration glatter Gefäßwandmuskelzellen, und dem HA-Gehalt der extrazellulären Matrix. Tanaka et al. (2000) berichteten über eine verstärkte Proliferation glatter Gefäßwandmuskelzellen bei geringerem Molekulargewicht der verwendeten HA (HA-Oligosaccharide = oHA). West und Kumar (1989) beschrieben für oHA mit 3-10 Sacchariden keinen und Evanko et al. (1999) für oHA mit 4-6 Sacchariden sogar einen proliferationshemmenden Effekt.

1.2 Hyaluronidasen

1.2.1 Entdeckung der Hyaluronidasen / Historisches

Der Begriff Hyaluronidase wurde von Meyer et al. (1940) als Bezeichnung für HA-spaltende Enzyme eingeführt. Diese Enzyme stammen aus Mikroorganismen und Tiergeweben.

1928 beschrieb Duran-Reynals den diffusionbeschleunigenden Effekt von Stierhodenextrakt. Der wirksame Faktor wurde in der Folge als „Reynalscher Diffusionsfaktor“ oder „spreading factor“ bezeichnet. Chain und Duthie erkannten 1940 seinen Enzymcharakter und identifizierten ihn als die bereits von Meyer beschriebene Hyaluronidase (Bergenstal und Scott, 1948).

1.2.2 Charakterisierung der verschiedenen Hyaluronidasen

Eine Übersicht über die Einteilung der Hyaluronidasen gibt Abb. 1.

1.2.2.1 Blutegeltyp

Die Blutegeltyp-Hyaluronidase ist im Gegensatz zu allen anderen Hyaluronidasen, die Endohexosaminidasen sind, eine Hyaluronat-Endo- β -Glucuronidase. Gewonnen wird sie aus den Speicheldrüsen des *Hirudo medicinalis*. Das pH-Optimum ihrer Wirksamkeit beträgt 6,0. Substrate sind zum einen HA und abstammende Oligosaccharide, die zu Tetrasacchariden mit Glucuronsäure am reduzierenden Ende umgesetzt werden. Zum anderen verstoffwechselt sie auch Tetrasaccharidprodukte des Testikulärtyps zu Trisacchariden.

1.2.2.2 Testikulärtyp

Die Testikulärtyp-Hyaluronidasen werden, wie aus Abb. 1 ersichtlich, nach ihrer Herkunft unterteilt.

a) testikulär

Die testikuläre Hyaluronidase wird aus Spermatozoen von Säugetierhoden, vor allem des Stierhodens, gewonnen. Das pH-Optimum liegt zwischen 4 und 5. Die spezifische Aktivität liegt bei ca. 45.000 IU/ml. Das Molekulargewicht beträgt 43,2 kDa. Das Aktivitätsoptimum liegt bei 50°C. Substrate und Produkte sind in der Tabelle 1 aufgeführt.

b) lysosomal

Die lysosomale Hyaluronidase vom Testikulärtyp wird aus Lysosomen der Ratteleber oder –kalotte gewonnen. Das pH-Optimum ist 3,7. Die spezifische Aktivität liegt bei 4.300 IU/ml. Das Molekulargewicht beträgt ca. 85 kDa. Substrate und Produkte entsprechen denen der testikulären Hyaluronidase.

c) submandibulär

Die submandibuläre Hyaluronidase vom Testikulärtyp entstammt der Glandula submandibularis des Kaninchens oder Bienen- und Schlangengift. pH-Optimum, spezifische Aktivität, Molekulargewicht sowie Substrat- und Produktspezifitäten entsprechen denen des lysosomalen Typs.

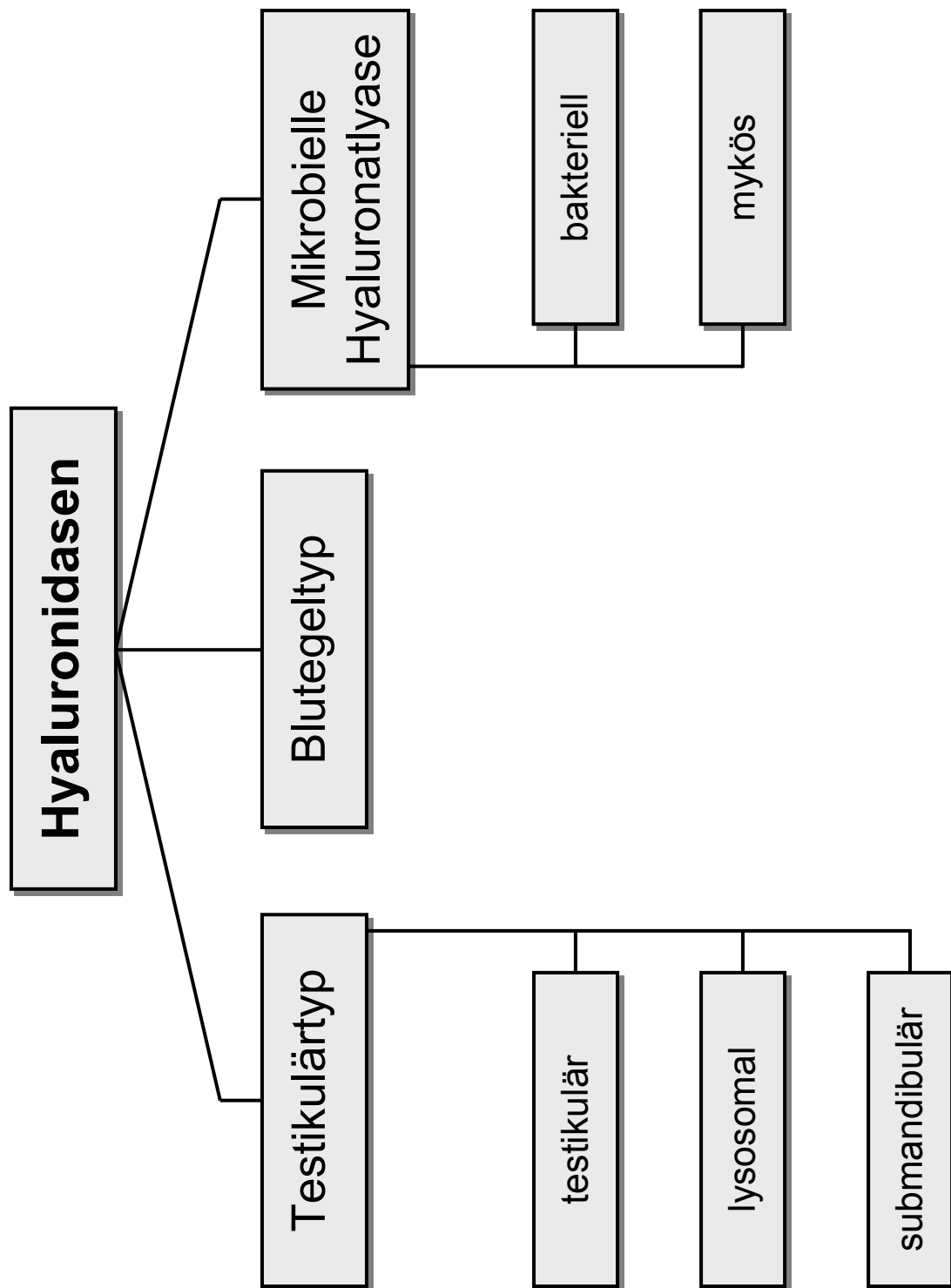


Abb. 1: Übersichtsdarstellung der verschiedenen Hyaluronidasen nach Meyer (1971).

1.2.2.3 Hyaluronatlyasen (mikrobielle Hyaluronidasen)

Mikrobielle Hyaluronidasen sind wie die Hyaluronidasen vom Testikulärtyp Endohexosaminidasen. Nach ihrer Herkunft werden sie in bakteriell und mykös unterteilt.

a) bakterielle Hyaluronatlyase

Da die bakterielle Hyaluronatlyase den Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit bildet, findet sich eine detaillierte Charakterisierung im Kapitel 1.3.

b) myköse Hyaluronatlyase

Die myköse Hyaluronatlyase wird von Streptomyzeten gewonnen. pH-Optimum, spezifische Aktivität und Molekulargewicht sind nicht bekannt. Die Substrate entsprechen denen des Testikulärtyps. Produkte sind Tetra- und Hexasaccharide mit zweifach ungesättigtem Disaccharid am reduzierenden Ende, verbunden mit normalem Di- oder Tetrasaccharid. Im Gegensatz zur bakteriellen Hyaluronatlyase entstehen keine ungesättigten Disaccharide (Meyer et al., 1940) an sich.

1.2.3 Allgemeine Eigenschaften und pharmakologische Wirkungen der Hyaluronidasen

Hyaluronidasewirkungen nach Großhennig (1966) sind Permeabilitätssteigerung von Membranen, Auflockerung der Intima für die Sauerstoffversorgung, Viskositätsverminderung der intimalen und subintimalen Gewebsflüssigkeiten und damit Verbesserung des Gefäßwandstoffwechsels, muzinolytische Wirkung durch Hydrolyse der HA-haltigen Substanzen. Durch die Hemmung der Muzingerinnselbildung kommt es zur Hemmung der Sklerosebildung sowie Auflockerung der Binde- und Stützgewebe und damit auch der elastischen Fasern der Gefäßwand, die nach Bergenstal und Scott (1948) sowie Gibian (1959) einen besonders hohen HA-Anteil enthalten. Daraus resultiert nach Hoffmann-Ostenhof (1958) eine bessere Elastizität der elastischen Fasern der Gefäßwand. Die Kombination von Zytostatika mit Hyaluronidase führt nach Baumgartner (1987) zur Reduzierung der Rezidivrate bei Krebserkrankungen.

Thurnherr und Koch (1962) wiesen darauf hin, daß die Gewebeauflockerung durch Hyaluronidase die Magnesiumeinwirkung verbessert und Magnesium die Wirkung der Hyaluronidase verlängert. Damit verstärken sich Hyaluronidase und Magnesium gegenseitig in ihren Wirkungen.

1.2.4 Möglichkeiten zur Regulierung der Hyaluronidaseaktivität

Aktiviert werden können Hyaluronidasen nach Menzel und Farr (1998) durch Adrenalin, Histamin und saure Phosphatase. Inhibitorisch wirken Antihistaminika, Salizylsäure, Heparin, Dicumarin, Ascorbinsäure und Flavonoide. Bei Linker (1974) sind als Hemmstoffe der Hyaluronidase Schwermetalle und starke Polyanionen angeführt. Thurnherr und Koch (1962) beschrieben, daß Magnesium die Hyaluronidasewirkung durch Aktivierung von Inhibitoren im Serum verlängert. Magnesium wird auch als Hyaluronidase-Inhibitor bezeichnet (Farr et al., 1997).

1.2.5 Anwendungsmöglichkeiten der Hyaluronidasen

Thurnherr und Koch führten 1962 eine i.v.-Mischinjektion aus testikulärer Hyaluronidase und Magnesium in die Therapie peripherer Durchblutungsstörungen ein. Es wurde von einer Reduktion ischämiebedingter Myokardnekrosen nach Koronararterienverschluß in Tierversuchen (Maroko et al., 1972; Premaratne et al., 1995) und bei Patienten mit akutem Myokardinfarkt (Maroko et al., 1975) berichtet. Der Zusatz von Hyaluronidase zu Lokalanästhetika verbessert nach Clark und Mellette (1994) deren Verteilung und Wirksamkeit. Daher findet Hyaluronidase beispielsweise auch Anwendung in der Augenheilkunde, Chirurgie und Gynäkologie (Menzel und Farr, 1998). Petter und Bellmann (1971) beschrieben gute Therapieerfolge mit Hyaluronidase bei Sklerodermie mit kurzer Krankheitsdauer. Bei protrahierten Verläufen gab es keine vergleichbar guten Ergebnisse, was auf das veränderte chemische Strukturgefüge der geweblichen Kalziumablagerungen zurückgeführt wurde. Die Kollagenfibrillenbildung und deren Abbau wird charakteristisch durch saure Proteoglykane wie HA und Chondroitinsulfate und demzufolge auch durch deren Spaltung durch Hyaluronidase beeinflusst (Kühn et al., 1959).

1.3 Testikuläre Hyaluronidase vs. Bakterielle Hyaluronatlyase

In Tabelle 1 werden die Eigenschaften der noch nicht klinisch erprobten bakteriellen Hyaluronatlyase denen der bereits seit Jahrzehnten in therapeutischem Gebrauch befindlichen testikulären Hyaluronidase gegenübergestellt.

Bakterielle Hyaluronatlyase wird von Bakterien gebildet, um wie z.B. bei Streptokokken als ein Pathogenitätsfaktor das Eindringen ins Gewebe zu erleichtern. Im Bindegewebe von Säugetieren leitet sie die Proteoglykanolyse ein, die zur Zerstörung der Ausbreitungsbarriere aus Fibrinexsudat, HA und Proteoglykanen führt. Dadurch wird die Ausbreitung der Bakterien im Gewebe begünstigt. (Riede und Schaefer, 1993).

Wie aus der Tabelle 1 ersichtlich ist, unterscheiden sich testikuläre Hyaluronidase und bakterielle Hyaluronatlyase in einigen wichtigen Eigenschaften.

Während testikuläre Hyaluronidase hauptsächlich im sauren pH-Bereich wirkt, entfaltet bakterielle Hyaluronatlyase ihre um ein Mehrfaches höhere spezifische Aktivität im basischen pH-Bereich. Unter der Voraussetzung gleicher Wirkungsweise würde für die gleiche Enzymwirkung eine wesentlich geringere Enzymmenge bakterieller Hyaluronatlyase ausreichen. Das pH-Optimum der bakteriellen Hyaluronatlyase im neutralen bis basischen Bereich käme der Anwendung über den menschlichen Blutkreislauf mit pH 7,4 entgegen.

Die Produkte der HA-Spaltung durch bakterielle Hyaluronatlyase sind zweifach ungesättigte Disaccharide. Da die Wirkung von HA auf die Proliferation und Migration glatter Gefäßwandmuskelzellen vom Molekulargewicht abhängig ist, könnten auch hier unterschiedliche Wirkungen bestehen (Tanaka et al., 2000).

	Bovine testikuläre Hyaluronidase	Bakterielle Hyaluronatlyase
Herkunft	Spermatozoen von Rindertestes	Streptokokken, Staphylokokken, Pneumokokken, Clostridien, Proteus, Flavobakterium
pH-Optimum	saurer pH-Bereich, pH 4 - 7	basischer pH-Bereich, pH 6 - 9
spezifische Aktivität	ca. 45.000 IU/ml	ca. 200.000 IU/ml
Molekulargewicht	ca. 60 kDa	ca. 100 kDa
Hitzestabilität	hoch	unbekannt
Temperaturoptimum	50 °C	unbekannt
Enzymart	Endohexosaminidase, Hydrolase und Transglykosylase	Endohexosaminidase, Eliminase
Substrate	HA, Chondroitin, Chondroitin- 4- und 6-sulfat, Dermatansulfat	Tetrasaccharide, Substratspektrum der testikulären Hyaluronidase
Produkte	Tetrasaccharide	zweifach ungesättigte Disaccharide

Tabelle 1: Vergleich der bakteriellen Hyaluronatlyase mit der testikulären Hyaluronidase nach Meyer (1971).

1.4 Magnesium und seine Kombination mit Hyaluronidase

Magnesium ist ein physiologischer Kalzium-Antagonist und Aktivator von ATP-abhängigen Reaktionen (Pschyrembel Klinisches Wörterbuch, 1998). Von Thurnherr und Koch (1962) wurden dem Magnesium antisklerotische Wirkungen zugeschrieben. Dazu zählt die Aktivierung von natürlicher Resistenz und unspezifischer Abwehr, der Anstieg der Phosphatide und damit des cholesteri-

nolytischen Vermögens des Blutes sowie die Magnesiumfunktion als Zell- und Fettstoffwechselkatalysator. Außerdem habe Magnesium antithrombotische, sedative, infarktprophylaktische und in Bezug auf glatte Muskulatur spasmolytische Eigenschaften. Bei Großhennig (1966), Kugiyama et al. (1988), Dickens et al. (1992) und Pearson et al. (1998) wurden gute Behandlungsergebnisse mit Magnesium bei degenerativen Gefäßerkrankungen vorgestellt. Shechter et al. (2000) beschrieben eine verbesserte Endothelzellfunktion der Arterien und eine verbesserte Belastungstoleranz bei Patienten mit koronarer Herzkrankheit nach einer 6-monatigen oralen Magnesiumtherapie. Als Parameter für die Endothelzellfunktion diente die endothelabhängige, flußvermittelte Vasodilatation.

Magnesium ist nach Farr et al. (1997) ein Hyaluronidase-Inhibitor. Auch Thurnherr und Koch (1962) beschrieben, daß Magnesium die Hyaluronidasewirkung durch Aktivierung von Seruminhibitoren verlängert.

1.5 Thema der Arbeit

Die bakterielle Hyaluronatlyase könnte eine Alternative zu der in breitgefächelter Anwendung befindlichen testikulären Hyaluronidase darstellen. Da die bakterielle Hyaluronatlyase bisher nur ansatzweise erforscht ist, sollte in vorliegender Arbeit untersucht werden, ob sie in vitro eine antimigratorische Wirkung auf glatte Gefäßwandmuskelzellen ausübt.

Um eine mögliche Wechselwirkung mit Magnesium wie bei der testikulären Hyaluronidase zu testen, wurde die bakterielle Hyaluronatlyase in Kombination mit $MgCl_2$ geprüft. Auch die HA als Substrat der bakteriellen Hyaluronatlyase wurde auf ihren Einfluß auf die Zellmigration und die Wirkung der bakteriellen Hyaluronatlyase hin untersucht.

Die Testsubstanzen $MgCl_2$, HA und bakterielle Hyaluronatlyase wurden allein und in verschiedenen Kombinationen den Testkulturen zugegeben.

2 Material und Methoden

2.1 Gewinnung der Gefäßwandmuskelzellen

Die Gewinnung der Gefäßwandmuskelzellen aus der Aorta thoracalis und abdominalis vom männlichen Weißen Neuseelandkaninchen erfolgte mittels der Explantat-Technik (Dartsch, 1990). Nach Auswachsen der Zellen aus den Explantaten wurden die Zellen mit Trypsin/EDTA subkultiviert und in den Passagen P5 – P14 für die Untersuchungen verwendet. Die Zellidentifizierung erfolgte anhand des charakteristischen Wachstumsmusters („hill and valley“) sowie der positiven Reaktion mit Antikörpern gegen glattmuskuläres α -Aktin.

2.2 Testsubstanzen

Folgende Testsubstanzen wurden allein oder in Kombination verwendet:

- $\text{MgCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ (Magnesiumchlorid-Hexahydrat; Merck, Darmstadt), getestet im Konzentrationsbereich von 100 ng/ml bis 100 $\mu\text{g/ml}$.
- HA (Hyaluronic Acid Potassium Salt; Sigma, Taufkirchen), getestet im Konzentrationsbereich von 1 ng/ml bis 100 $\mu\text{g/ml}$.
- Bakterielle Hyaluronatlyase (Hyaluronatlyase, lyophilisiert), getestet im Konzentrationsbereich von 5 IU/ml bis 10.000 IU/ml.

Die bakterielle Hyaluronatlyase wurde für die Untersuchungen freundlicherweise von der Firma id pharma GmbH, Jena, zur Verfügung gestellt.

Herstellung der Stammlösungen und Pipettierschemata:

1. Bakterielle Hyaluronatlyase

1 Ampulle \triangleq 200.000 IU

- a) 1 Ampulle in 4 ml eiskaltem H_2O bidest. gelöst, sofort sterilfiltriert
 \triangleq 50.000 IU/ml
- b) 3 Ampullen in je 2 ml eiskaltem H_2O bidest. gelöst, sofort sterilfiltriert
 \triangleq 100.000 IU/ml
- c) 6 Ampullen in je 1 ml eiskaltem H_2O bidest. gelöst, sofort sterilfiltriert
 \triangleq 200.000 IU/ml

Pipettierschema für 2 ml Kulturmedium:

Stammlösung [IU/ml]	Zugabe [µl]	Konzentration im Test [IU/ml]
250	40	5
500	40	10
2.500	40	50
5.000	40	100
25.000	40	500
50.000	40	1.000
100.000	100	5.000
200.000	100	10.000

2. HA

Einwaage: 51,2 mg in 10,24 ml H₂O bidest. \triangleq 5 mg/ml, sterilfiltriert

Pipettierschema für 2 ml Kulturmedium:

Stammlösung [µg/ml]	Zugabe [µl]	Konzentration im Test [µg/ml]
0,05	40	0,001
0,5	40	0,01
5	40	0,1
50	40	1
500	40	10
5.000	40	100

3. $MgCl_2 \cdot 6 H_2O$

Einwaage: 64,8 mg in 12,96 ml H_2O bidest. \triangleq 5 mg/ml, sterilfiltriert

Pipettierschema für 2 ml Kulturmedium:

Stammlösung [$\mu\text{g/ml}$]	Zugabe [μl]	Konzentration im Test [$\mu\text{g/ml}$]
5	40	0,1
25	40	0,5
50	40	1
250	40	5
500	40	10
2.500	40	50
5.000	40	100

2.3 Zellkultur

2.3.1 Kulturmedien und Kulturbedingungen

- Proliferationsmedium bestehend aus DMEM (flüssig, mit L-Glutamin, 1000 mg/l D-Glukose) und F12 (flüssig, mit L-Glutamin) im Volumenverhältnis 1:1, 10% FCS (hitzeinaktiviert) und 2% PS (100 IU/ml Penicillin und 100 $\mu\text{g/ml}$ Streptomycin).
- Hungermedium für die Zellmigration bestehend aus DMEM und F12 im Volumenverhältnis 1:1, 0,1% FCS und 2% PS.

Alle Zellreagenzien wurden von Gibco, Life Technologies GmbH, Karlsruhe, bezogen.

Durch das FCS erhalten die Zellen die für Stoffwechsel und Wachstum erforderlichen Substrate. Zur Vermeidung möglicher bakterieller Kontaminationen wurden Antibiotika zugegeben.

Die Inkubation der Zellkulturen erfolgte im Brutschrank bei 37°C in einer wasserdampfgesättigten Atmosphäre aus 94% Luft und 6% CO_2 . Der CO_2 -Partialdruck ermöglicht über das CO_2 /Bicarbonat-Puffersystem der Kulturmedien die Aufrechterhaltung eines konstanten pH-Bereichs von 7,2-7,4.

Beide Medien enthalten 200 $\mu\text{g/ml}$ $\text{MgSO}_4 \times 6 H_2O$.

2.3.2 Routinekultivierung

Die Zellen wurden routinemäßig in Kulturflaschen (75 cm²; Greiner GmbH, Frickenhausen bzw. Integra Biosciences GmbH, Fernwald) mit 20 ml Proliferationsmedium im Brutschrank (Jouan IG 150; Jouan, Unterhaching) inkubiert. Nach der Neuaussaat der Zellen wurde zunächst nach 24 h und danach in 3-tägigem Rhythmus ein Mediumwechsel durchgeführt. Eine Woche nach der Aussaat wurden die Zellen mit steriler, phosphatgepufferter Saline ohne Kalzium und Magnesium (PBS; Gibco, Life Technologies GmbH, Karlsruhe) gewaschen, mit einer sterilen Trypsin/EDTA-Lösung (0,5 g/l Schweinetrypsin und 0,2 g/l EDTA; Gibco, Life Technologies GmbH, Karlsruhe) abgelöst und nach Verdünnung auf die gewünschte Zelldichte in die Testkulturplatten respektive die neuen Kulturflaschen ausgesät (siehe Abb. 2, Kultivierungsschema).

2.4 Zellmigrationstest

2.4.1 Zellaussaat

Während der einwöchigen Inkubation mit Proliferationsmedium in Kulturflaschen (siehe 2.3.1) bildeten die Zellen als Zeichen der Konfluenz das typische „hill and valley“-Wachstumsmuster aus. Dies wurde jeweils zu Beginn unter dem Inversmikroskop (Nikon TMS-F; Nikon, Düsseldorf) geprüft. Nach dem Absaugen des Proliferationsmediums wurde der Zellrasen mit 10 ml temperierter PBS gespült und danach 4 ml Trypsin/EDTA-Lösung zur Ablösung der Zellen zugegeben. Nach fünfminütiger Inkubation im Brutschrank bei 37°C und der mikroskopischen Kontrolle der vollständigen Zellablösung erfolgte die Zugabe von 16 ml Proliferationsmedium. Durch mehrmaliges Pipettieren wurde eine homogene Zellsuspension hergestellt. Nach Bestimmung der Zellzahl mittels Neubauer-Zählkammer (improved) wurden 150.000 Zellen/Vertiefung (= 15.000 Zellen/cm² Wachstumsfläche) in 6-Loch-Platten (Greiner GmbH, Frickenhausen) ausgesät. Abschließend wurden in zwei neue Kulturflaschen je 5 ml (= ca. 20.000 Zellen/cm²) der für den aktuellen Test nicht benötigten Zellsuspension sowie 15 ml Proliferationsmedium pipettiert. Sämtliche Pipetten sowie Glasflaschen wurden vor Gebrauch abgeflammt, die gesamte Bearbeitung der Zellen erfolgte in einer Sterilwerkbank Klasse II (BDK, Sonnenbühl-Genkingen).

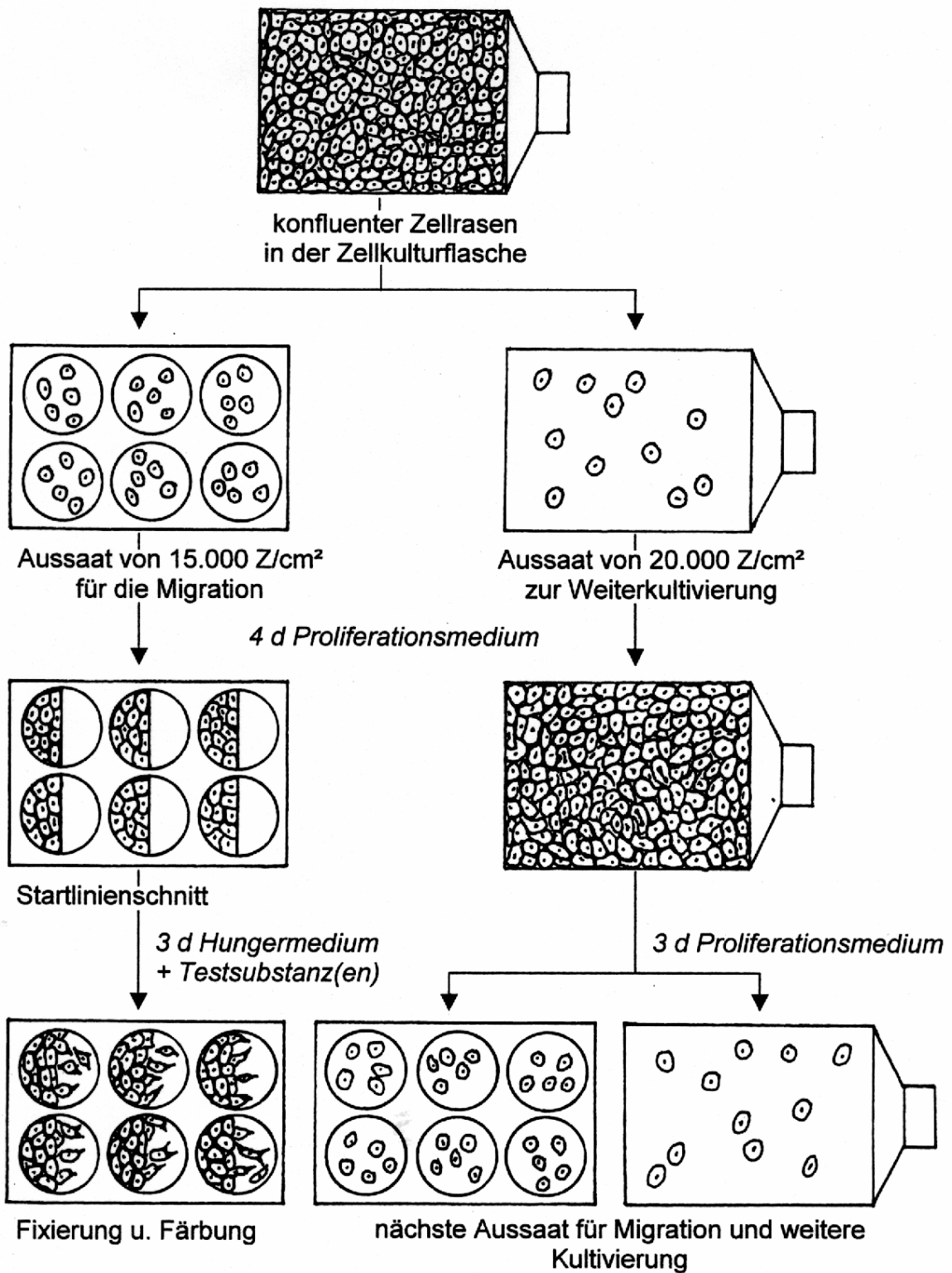


Abb. 2: Kultivierungsschema

2.4.2 Mediumwechsel

Der erste Mediumwechsel erfolgte 24 h nach der Zellaussaat mit Proliferationsmedium. Nach weiteren 72 h kontinuierlicher Inkubation der Kulturen wurden die Startlinienschnitte für die Migration angelegt.

2.4.3 Startlinienschnitt und Testsubstanzzugabe

Innerhalb der 96 h nach Aussaat der Zellen in die 6-Loch-Platten hatte sich ein konfluenter Zellrasen gebildet. Die Schnitte erfolgten mit autoklavierten Hornhauthobelklingen (Nippes, Solingen). Zur Ablösung des Zellrasens im Migrationsbereich wurden autoklavierte Wattestäbchen (\varnothing 2 mm, 15 cm; Hartmann AG, Heidenheim) verwendet. Die Hornhautklinge wurde mit der linken Hand in der Mitte einer Vertiefung aufgesetzt und so gehalten, bis der Zellrasen im Migrationsbereich mit dem Wattestäbchen in der rechten Hand entfernt worden war (siehe Abb. 3, Versuchsschema). Durch moderates Anpressen der Klinge an den Kulturschalenboden aus Kunststoff wurde dabei eine vor allem an den Klingenenenden zustandekommende Einkerbung als Markierung des Startlinienschnitts angebracht. Aus Verschleißgründen wurde nach jeder 6-Loch-Platte das Wattestäbchen und nach drei 6-Loch-Platten die Hornhautklinge gewechselt. Anschließend wurde das Proliferationsmedium mit den abgelösten Zellen abgesaugt sowie das Hungermedium auf der rechten, zellfreien Seite der 6-Loch-Platten-Vertiefungen zugegeben.

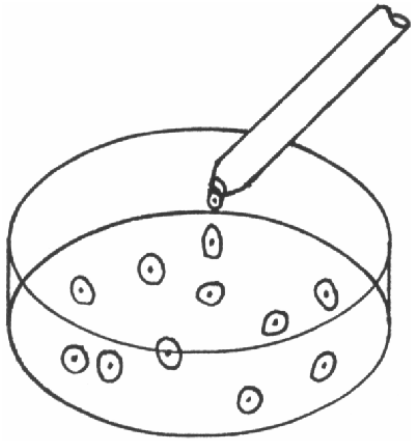
Nach Anbringen des Startlinienschnitts und anschließendem Mediumwechsel erfolgte die Zugabe der Testsubstanzen (siehe 2.2, Pipettierschemata) mittels Eppendorf-Pipette.

2.4.4 Fixierung und Färbung der ausgewanderten Zellen

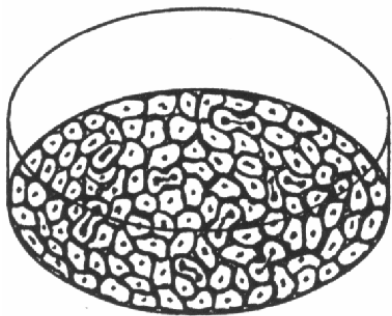
72 h nach der Testsubstanzzugabe wurden die Zellen mit der Romanowsky-Giemsa-Methode (Azur B – Eosin Stammlösung-Kit; SERVA, Heidelberg) gefärbt.

Herstellung der Lösungen:

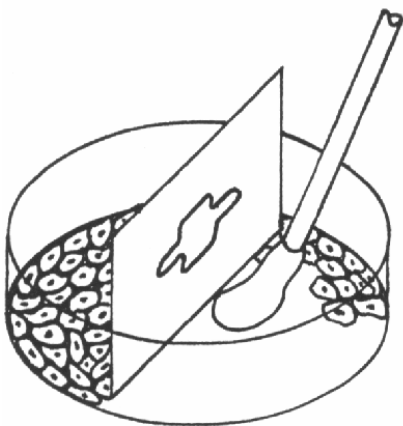
- Fixierung: 15 ml Methanol p.a. + jeweils 500 μ l Azur B SCN- und Eosin Y-Farblösung, Fixierzeit: 3 min bei Raumtemperatur.



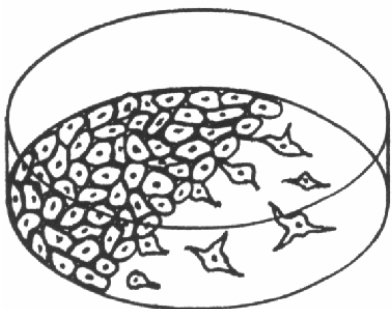
a) Aussaat von 15.000 Zellen/cm²



b) Proliferation der Zellen zu einem konfluenten Zellrasen



c) Startlinienschnitt und Zellentfernung im Migrationsbereich, danach Zugabe der jeweiligen Testsubstanz(en)



d) Fixierung und Färbung der ausgewanderten Zellen

Abb. 3: Versuchsschema

- Färbung: 50 ml 0,03M HEPES-Puffer pH 6,5 + jeweils 500 µl Azur B SCN- und Eosin Y-Farblösung, Färbezeit: 30 min bei Raumtemperatur.
- Herstellung des HEPES-Puffer pH 6,5: 1 ml HEPES-Lösung (1M; SERVA) + 32 ml H₂O bidest., Einstellung des pH-Werts auf 6,5 mit 1M HCl.

Zur Fixierung und Färbung wurde das Medium abgesaugt und 2 ml PBS zum Spülen pro Vertiefung zugegeben. Nach dem Absaugen der PBS erfolgte die Zugabe von 2 ml Fixierlösung pro Vertiefung. Nach 3 min Einwirkzeit wurde mit Leitungswasser gespült, danach mit 2 ml PBS. Nach Zugabe von 2 ml Färbelösung pro Vertiefung und der Einwirkzeit von 30 min mit mikroskopischer Verlaufskontrolle wurde mit Leitungswasser gespült, anschließend mit H₂O bidest.. Die fixierten und gefärbten Zellen wurden luftgetrocknet.

2.5 Mikrofotografische Dokumentation

Sie erfolgte mittels einer auf das Lichtmikroskop aufgeschraubten Digitalkamera (Fujix Digital Camera HC-300 Z, AVT Horn; Aalen) und Bilddatenspeicherung im Computer, wofür das Programm Jasc Paint Shop Pro 5,0 Verwendung fand. Für das Lichtmikroskop wurde ein Plan-4x-Objektiv (PhL-Objektiv Plan 4/0,13; Nikon, Düsseldorf) gewählt. Zur Standardisierung der Größenverhältnisse wurde das Raster einer Zählkammer mit bekannter Seitenlänge der Quadrate aufgenommen. Die Einstellung von Bildausschnitt und -schärfe wurde mit einem zusätzlichen Monitor (Trinitron Color Video Monitor PVM-14N5MDE; Sony) vorgenommen.

Von jeder Vertiefung einer 6-Loch-Platte wurden zwei Mikrofotos aufgenommen, so daß für die Auswertung jeder Versuchsbedingung wegen der Doppelbestimmung in zwei 6-Loch-Platten-Vertiefungen stets vier Aufnahmen zur Verfügung standen.

2.6 Datenverarbeitung

Die elektronisch gespeicherten Mikroaufnahmen wurden in MS-Power Point 95 (Microsoft Corporation) auf 36% verkleinert, wodurch alle vier von einer Versuchsbedingung angefertigten Aufnahmen auf einer DIN A4-Seite angeordnet

werden konnten. Der Ausdruck der Seiten für die Zellzahlbestimmung erfolgte mit einem Farbdrucker (HP Color Laser Jet 4500-HP; Hewlett Packard).

Die Bestimmung der Zahl der migrierten Zellen wurde mit einer aus Klarsichtfolie angefertigten Schablone durchgeführt, die entsprechend der von der Zählkammer angefertigten Mikroaufnahme maßstabsgerecht vertikal auf 1 mm Schnittkantenlänge sowie horizontal auf die Migrationsstreckenbereiche 0-250, 251-500, 501-750, 751-1000 und 1001-1250 μm normiert worden war.

Dabei wurden diejenigen Schnittkantenabschnitte ausgewertet, an denen kein durch Aufsetzen der Klinge (siehe 2.4.3) verursachter Einschnitt in den Kunststoffboden der 6-Loch-Platten-Vertiefung sichtbar war, der das Auswandern der Zellen hätte behindern können. Die Zellen rechts von der Schnittkante waren auch in diesen Bereichen vollständig entfernt, was stets mit dem Mikroskop nach Anbringung des Startlinienschnitts kontrolliert worden war.

Es wurden jeweils die nach Färbung eindeutig erkennbaren Zellkerne (siehe Abb. 11 bis 14, Beispiele mikrofotografischer Aufnahmen) gezählt, wobei die genau in der Mitte des Begrenzungsstrichs eines Migrationsstreckenbereichs der Schablone befindlichen Zellen dem niedrigeren Bereich zugeordnet wurden.

2.7 Statistische Auswertung

Die Ergebnisse der Zellzahlbestimmung sind als Mittelwerte \pm Standardfehler des Mittelwerts (SEM) angegeben. Die Signifikanzberechnungen erfolgten nach dem Bonferroni-Holm-Verfahren.

Für die Varianzanalyse wurde aus dem Datenmaterial, das den Diagrammen der graphischen Ergebnisdarstellung zugrundeliegt, in Sigma Plot 2000 die Regressionsgerade errechnet. Das Bestimmtheitsmaß (Quadrat des Korrelationskoeffizienten) wurde als Maß dafür verwendet, wieviel Prozent der Varianz der Anzahl migrierter Zellen durch die Abhängigkeit der Zellmigration von der Konzentration der Testsubstanz erklärt werden können.

3 Ergebnisse

3.1 MgCl_2

Als erstes wurde eine Testreihe mit ansteigenden Konzentrationen von MgCl_2 durchgeführt, um zu prüfen, ob die Migration glatter Gefäßwandmuskelzellen bereits allein durch die zusätzliche Zugabe von MgCl_2 zum MgSO_4 -haltigen Kulturmedium beeinflussbar ist. In 3 unabhängigen Versuchen wurde MgCl_2 im Konzentrationsbereich von 100 ng/ml bis 100 $\mu\text{g/ml}$ zugegeben. Die statistische Auswertung ergab keine signifikante Beeinflussung der Zellmigration durch die alleinige Zugabe von MgCl_2 im gewählten Konzentrationsbereich. Vergleichswert war dabei jeweils die Anzahl migrierter Zellen des Versuchsansatzes, dem ausschließlich Kulturmedium zugegeben worden war.

Abb. 4 zeigt die entsprechende graphische Darstellung der Versuchsergebnisse. Aus der Anzahl migrierter Zellen in Abhängigkeit von der Konzentration der zugegebenen Substanzen wurde in Sigma Plot 2000 die Regressionsgerade errechnet. Das Bestimmtheitsmaß wurde als Quadrat des Korrelationskoeffizienten mit $r^2 = 0,29$ ermittelt. Daraus ergibt sich, daß lediglich 29 % der Varianz der migrierten Zellen durch die Abhängigkeit von der MgCl_2 -Zugabe erklärt werden können. Die Verringerung der Migrationsrate erreicht bei 1 $\mu\text{g/ml}$ MgCl_2 einen Maximalwert auf 67% im Vergleich zur Kontrolle.

Besonderheiten bei diesem Versuchsteil

Hier müssen die gegenüber den anderen Graphiken abweichende Skalierung der Anzahl migrierter Zellen und die vergleichsweise hohen SEM-Werte Berücksichtigung finden. Durchschnittlich wanderten mehr Zellen aus als bei den Versuchsansätzen der Abb. 5 bis 10.

Bei zwei der drei unabhängigen Versuche, die der Graphik von Abb. 4 zugrundeliegen, wurde bei der Auswertung beobachtet, daß bei der Doppelbestimmung (Siehe 2.5, eine Versuchsanordnung wurde jeweils in zwei übereinanderliegenden 6-Loch-Platten-Vertiefungen angesetzt. Von jeder Vertiefung wurden zwei Mikroaufnahmen gemacht.) stets wesentlich mehr Zellen in der unteren

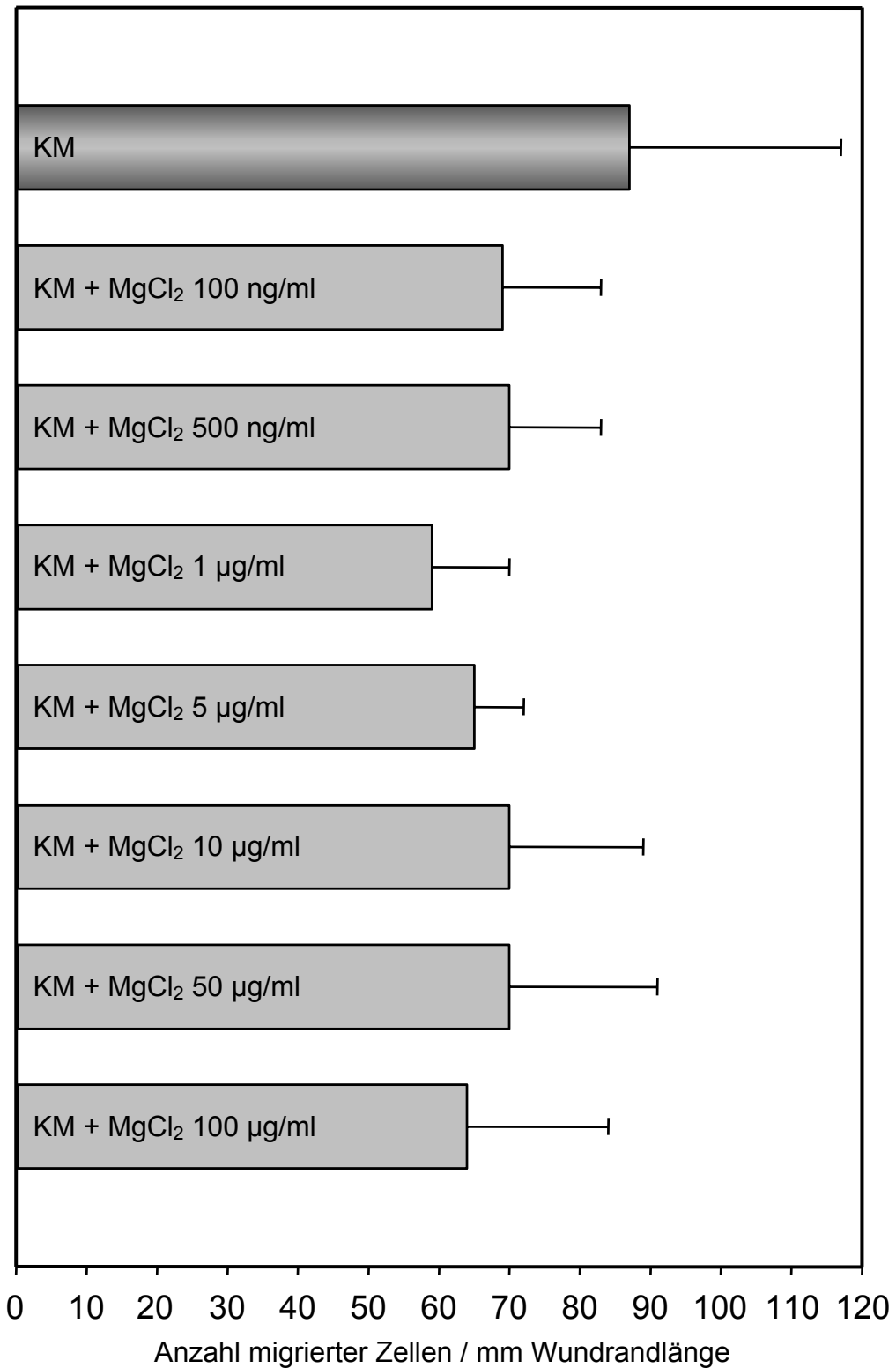


Abb. 4: Migration glatter Gefäßwandmuskelzellen unter dem Einfluß von MgCl₂ [100 ng/ml bis 100 µg/ml] nach 3 Tagen. Angegeben ist der Mittelwert ± SEM (n=3).

Vertiefung ausgewandert waren. Die Ursache könnte ein verfahrenstechnisches Problem sein. Bei diesen beiden Versuchen wurde die die Hornhauthobelklinge haltende Hand noch nicht an der Außenkante der 6-Loch-Platte abgestützt, so daß der im Migrationsbereich rechts der Schnittkante befindliche Zellrasen nur sehr vorsichtig und mit geringem Aufpreßdruck mit dem Wattestäbchen entfernt werden konnte. Dieser Arbeitsgang stellte in den unteren Vertiefungen eine größere Schwierigkeit als in den oberen dar. Die Vollständigkeit der Zellentfernung war bei diesen beiden Versuchen noch nicht routinemäßig mit dem Mikroskop kontrolliert worden, so daß bei diesen beiden Versuchen Zellrückstände als Ursache der innerhalb einer Doppelbestimmung stark variierenden Migrationsrate in Frage kommen. Handabstützen und routinemäßige mikroskopische Kontrolle verhinderten dieses Problem in Folge.

3.2 Bakterielle Hyaluronatlyase

Als zweites wurde untersucht, ob die bakterielle Hyaluronatlyase bei alleiniger Zugabe eine Auswirkung auf die Zellmigrationsrate hat und ob allein ein konzentrationsabhängiger Einfluß der bakteriellen Hyaluronatlyase auf die von den glatten Gefäßwandmuskelzellen produzierte HA zu einer Verringerung der Zellmigrationsrate führt.

In 3 unabhängigen Versuchen wurde bakterielle Hyaluronatlyase im Konzentrationsbereich von 5 IU/ml bis 10.000 IU/ml zugegeben. Die statistische Auswertung ergab keine signifikante Beeinflussung der Zellmigration durch die alleinige Zugabe von bakterieller Hyaluronatlyase im gewählten Konzentrationsbereich. Vergleichswert war dabei jeweils die Migrationsrate des Versuchsansatzes, dem ausschließlich Kulturmedium zugegeben worden war.

Abb. 5 zeigt die entsprechende graphische Darstellung der Versuchsergebnisse. Die Berechnung der Regressionsgeraden führte zu einem Bestimmtheitsmaß von $r^2 = 0,28$. Mit 28 % von der Konzentration der bakteriellen Hyaluronatlyase abhängiger Varianz der Zellmigration korreliert die Konzentration bakterieller Hyaluronatlyase geringfügig mit verringertem Migrationsverhalten der Zellen.

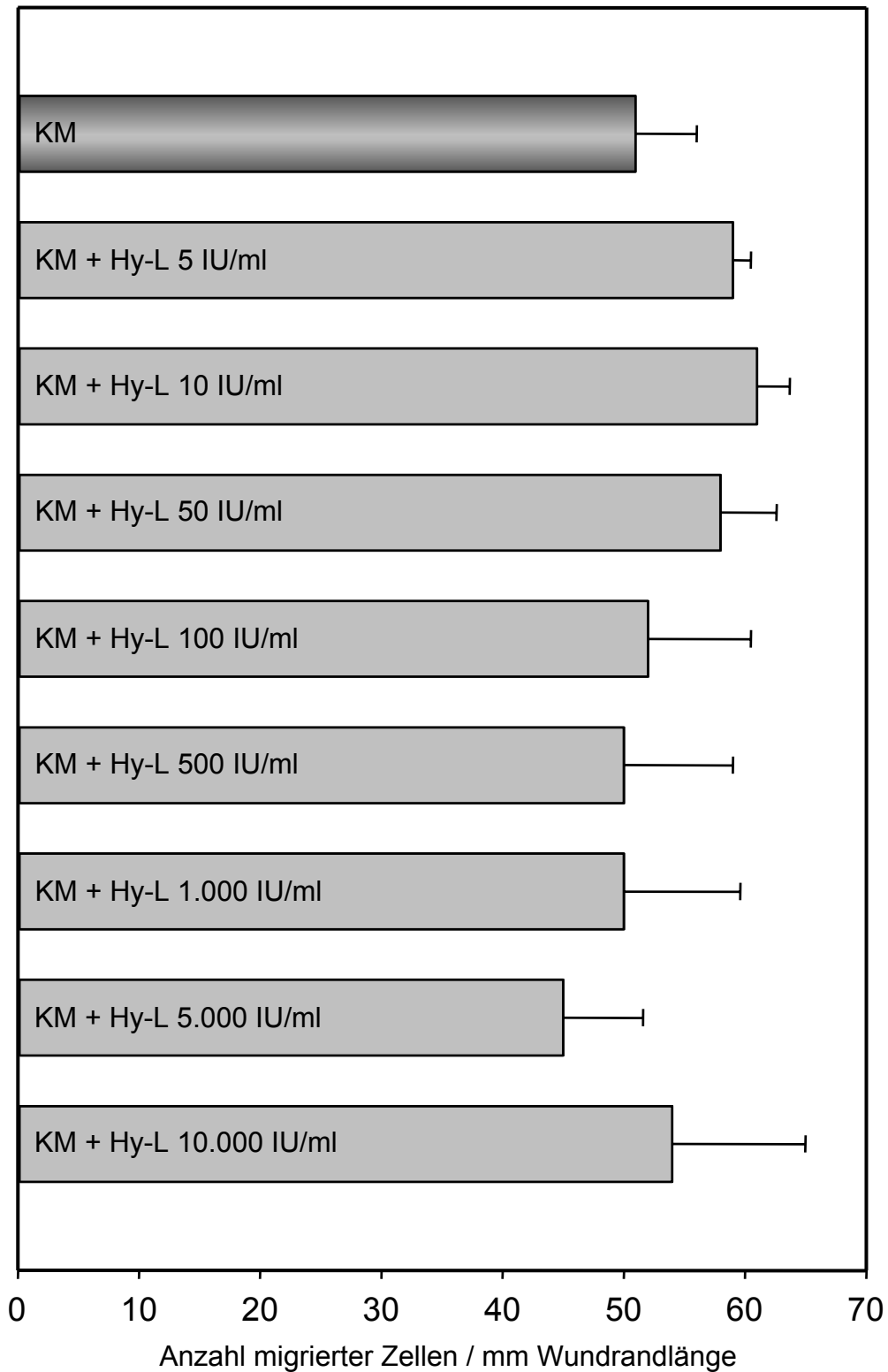


Abb. 5: Migration glatter Gefäßwandmuskelzellen unter dem Einfluß von bakterieller Hyaluronatlyase (Hy-L) [5 IU/ml bis 10.000 IU/ml] nach 3 Tagen. Angegeben ist der Mittelwert \pm SEM (n=3).

3.3 Bakterielle Hyaluronatlyase und 1 µg/ml MgCl₂

Weder die alleinige Zugabe von MgCl₂ noch die bakterieller Hyaluronatlyase hatten eine signifikante Änderung der Migrationsrate hervorgerufen. Deshalb wurde nun die Kombination von variierten Konzentrationen bakterieller Hyaluronatlyase einerseits und geringer (3.3) beziehungsweise hoher (3.4) MgCl₂-Konzentration andererseits geprüft.

In 3 unabhängigen Versuchen wurden gleichzeitig sowohl bakterielle Hyaluronatlyase im Konzentrationsbereich von 5 IU/ml bis 10.000 IU/ml als auch jeweils 1 µg/ml MgCl₂ zugegeben. Es ergab sich keine statistisch signifikante Beeinflussung der Zellmigration. Vergleichswert war dabei jeweils die Migrationsrate des Versuchsansatzes, dem ausschließlich Kulturmedium zugegeben worden war.

Abb. 6 zeigt die entsprechende graphische Darstellung der Versuchsergebnisse. Die Verringerung der Anzahl migrierter Zellen bei der zweithöchsten Konzentration der bakteriellen Hyaluronatlyase von 5.000 IU/ml und 1 µg/ml MgCl₂ auf 55% der Kontrollmigrationsrate könnte zusammen mit dem Bestimmtheitsmaß von $r^2 = 0,72$ darauf hinweisen, daß die Kombination von MgCl₂ und bakterieller Hyaluronatlyase im Vergleich zur alleinigen Gabe der Einzelsubstanzen migrationshemmend wirkt. Die Graphik zeigt eine Korrelation zwischen dem Konzentrationsanstieg der bakteriellen Hyaluronatlyase und dem Rückgang der Zellmigrationsrate.

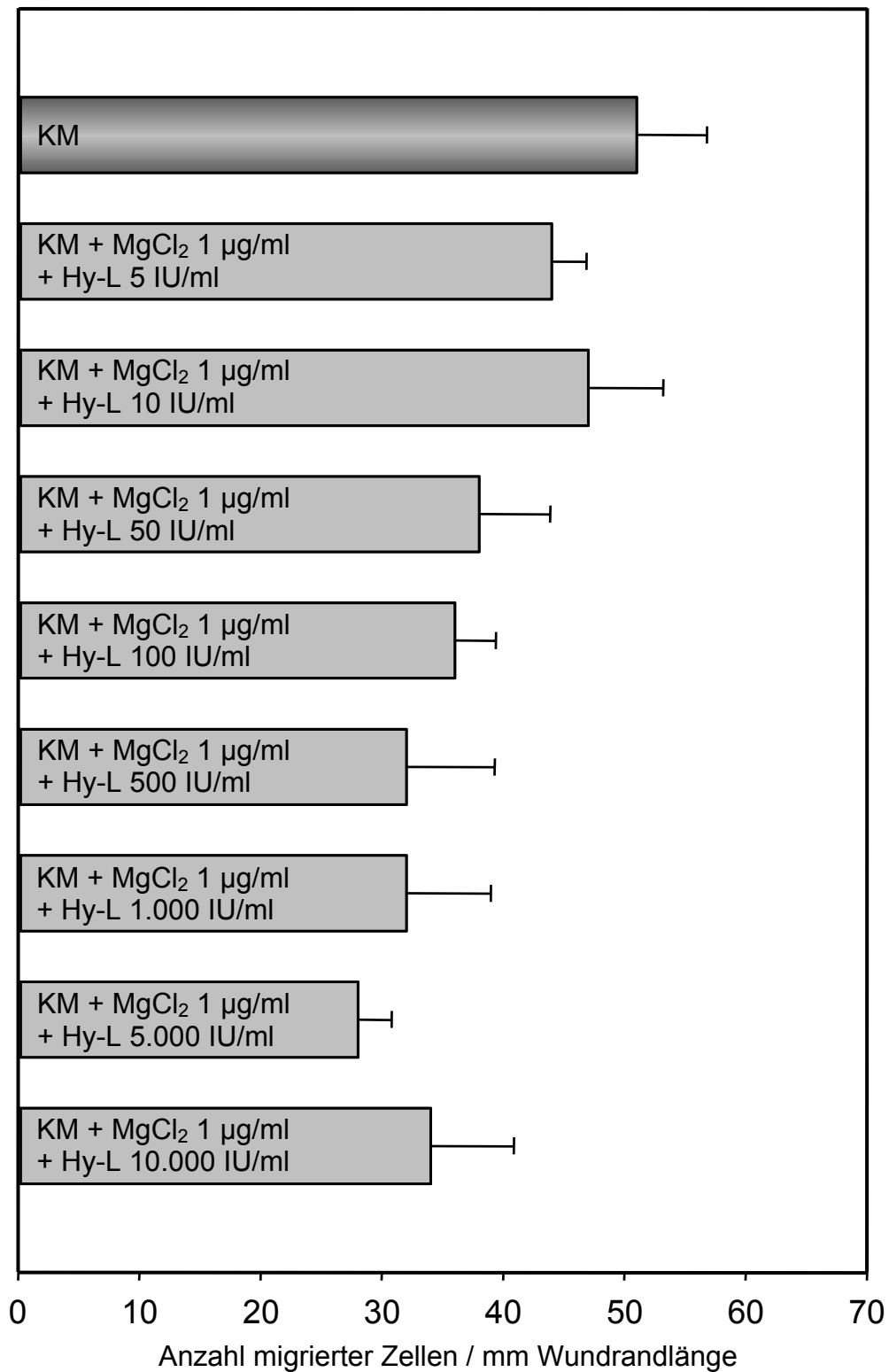


Abb. 6: Migration glatter Gefäßwandmuskelzellen unter dem Einfluß von MgCl₂ [1 µg/ml]=const. und bakterieller Hyaluronatlyase (Hy-L) [5 IU/ml bis 10.000 IU/ml] nach 3 Tagen. Angegeben ist der Mittelwert ± SEM (n=3).

3.4 Bakterielle Hyaluronatlyase und 100 µg/ml MgCl₂

Nachdem die gemeinsame Zugabe von bakterieller Hyaluronatlyase und 1 µg/ml MgCl₂ einen hemmenden Einfluß auf die Zellmigration vermuten ließ, war für die höhere Konzentration von MgCl₂ in Kombination mit bakterieller Hyaluronatlyase eine eher geringere Hemmung der Zellmigration zu erwarten (vgl. Abb. 4).

In 3 unabhängigen Versuchen wurden gleichzeitig sowohl bakterielle Hyaluronatlyase im Konzentrationsbereich von 5 IU/ml bis 10.000 IU/ml als auch jeweils 100 µg/ml MgCl₂ zugegeben. Eine nach dem Bonferroni-Holm-Verfahren statistisch signifikante Beeinflussung der Zellmigration zeigte sich bei folgender Versuchsbedingung:

- Kulturmedium + 100 µg/ml MgCl₂ + 100 IU/ml bakterielle Hyaluronatlyase; $p = 0,004$ und $p^* = 0,05 / 8-1+1 = 0,006$.

Vergleichswert war dabei jeweils die Migrationsrate des Versuchsansatzes, dem ausschließlich Kulturmedium zugegeben worden war.

Abb. 7 zeigt die entsprechende graphische Darstellung der Versuchsergebnisse. Das Bestimmtheitsmaß errechnete sich zu $r^2 = 0,48$. Es besteht eine geringgradige Korrelation zwischen steigender Konzentration bakterieller Hyaluronatlyase und rückläufiger Zellmigration.

Beim Vergleich der Graphiken von Abb. 6 und 7 ist ersichtlich, daß in Abb. 7 mit der höheren MgCl₂-Konzentration von 100 µg/ml durchschnittlich mehr Zellen migrierten als in Abb. 6 mit 1 µg/ml MgCl₂. Dieser Effekt ist signifikant bei den Versuchsansätzen mit zusätzlich bakterieller Hyaluronatlyase der Konzentrationen 5 IU/ml ($p = 0,021$) und 1.000 IU/ml ($p = 0,041$) und hochsignifikant bei 5.000 IU/ml ($p = 0,004$). Abb. 4 läßt beim Vergleich der Anzahl migrierter Zellen bei den Versuchsbedingungen mit MgCl₂-Konzentrationen von 1 µg/ml und 100 µg/ml ebenfalls diese Beziehung vermuten.

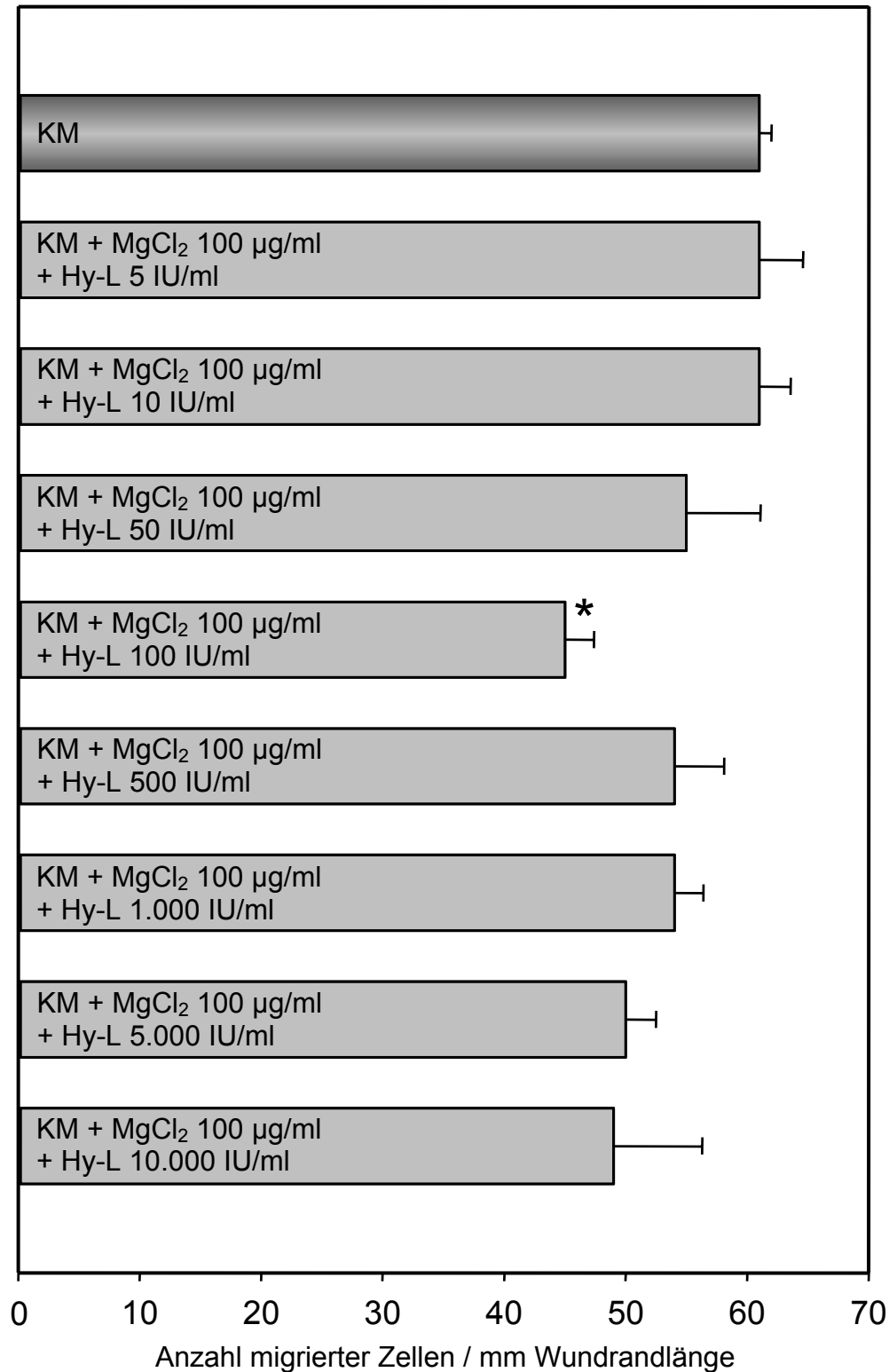


Abb. 7: Migration glatter Gefäßwandmuskelzellen unter dem Einfluß von MgCl₂ [100 µg/ml]=const. und bakterieller Hyaluronatlyase (Hy-L) [5 IU/ml bis 10.000 IU/ml] nach 3 Tagen. Angegeben ist der Mittelwert ± SEM (n=3). * p<0,05 und p*>p; Bonferroni-Holm-Verfahren.

3.5 HA

Die alleinige Zugabe bakterieller Hyaluronatlyase führte zu keinem statistisch signifikanten Einfluß auf die Zellmigration. HA ist ein Substrat der bakteriellen Hyaluronatlyase. Es bestand die Möglichkeit, daß erst bei ausreichend hoher HA-Konzentration die in größerer Menge entstehenden Spaltprodukte des enzymatischen HA-Abbaus (oHA) eine deutliche Wirkung auf die Zellmigration ausübten. Daraus ergab sich die Frage, ob die von den glatten Gefäßwandmuskelzellen gebildete Menge an HA ausreichte, um die Wirkung der bakteriellen Hyaluronatlyase zur Entfaltung zu bringen. Deshalb wurde die Zugabe von HA zusätzlich zu der von den Gefäßwandmuskelzellen selbst gebildeten erwogen.

Zunächst wurde aus dieser Überlegung heraus die Abhängigkeit der Zellmigration von unterschiedlichen HA-Konzentrationen (3.5) getestet, um im Anschluß die Auswirkung der Kombination von ansteigender HA-Konzentration und einer mittleren Konzentration bakterieller Hyaluronatlyase (3.6) zu prüfen.

In einem einzelnen Versuch wurde HA im Konzentrationsbereich von 1 ng/ml bis 100 µg/ml zugegeben. Die statistische Auswertung ergab keine signifikante Beeinflussung der Zellmigration durch die alleinige Zugabe von HA im gewählten Konzentrationsbereich. Vergleichswert war dabei jeweils die Migrationsrate des Versuchsansatzes, dem ausschließlich Kulturmedium zugegeben worden war.

Abb. 8 zeigt die entsprechende graphische Darstellung der Versuchsergebnisse. Die Migrationsrate verringerte sich maximal auf 67% im Vergleich zur Kontrolle bei 1 und 10 µg/ml HA. Das Bestimmtheitsmaß errechnete sich zu $r^2 = 0,74$. Demzufolge besteht ein deutlicher Zusammenhang zwischen steigender HA-Konzentration und verringerter Zellmigration.

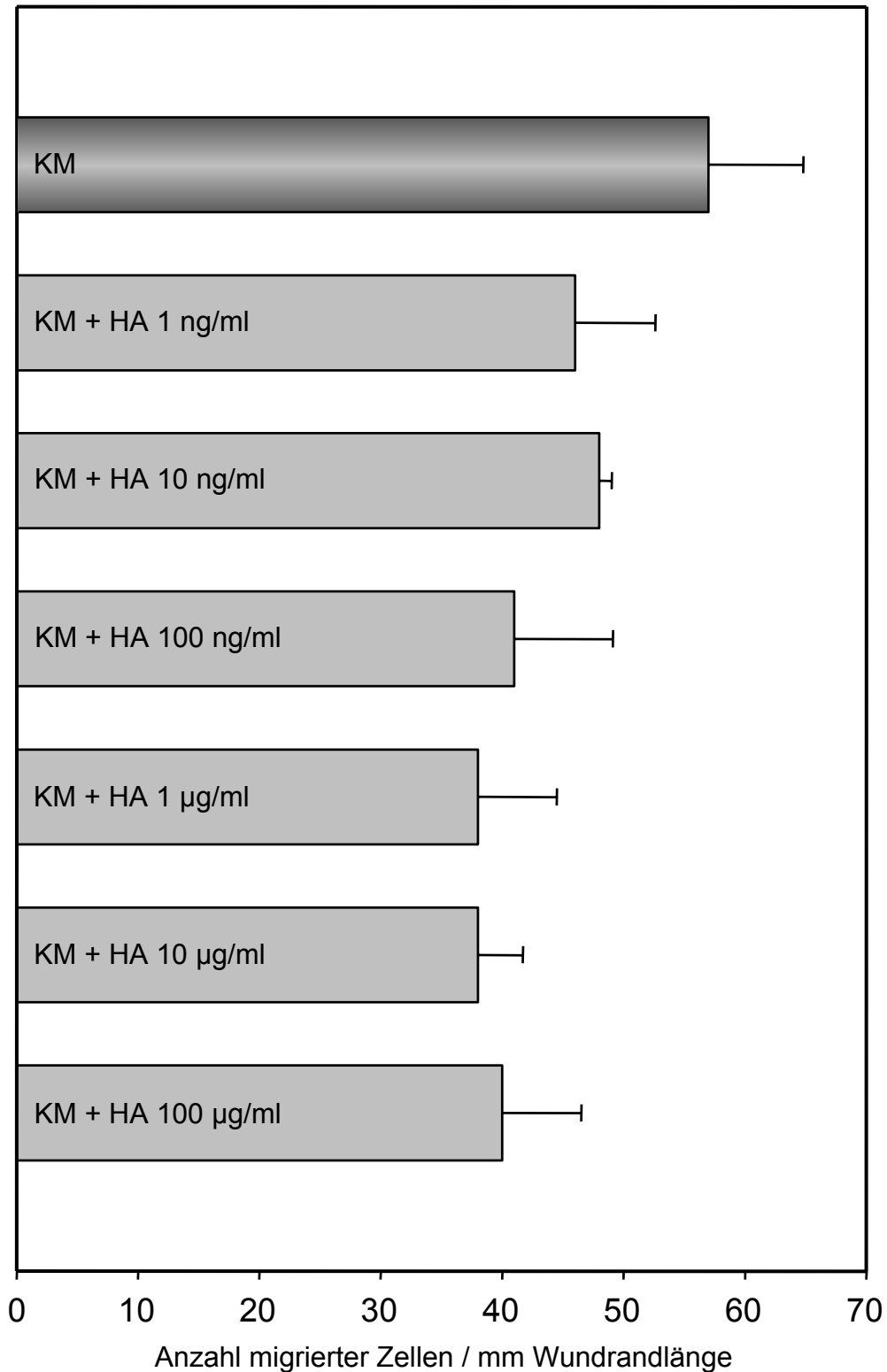


Abb. 8: Migration glatter Gefäßwandmuskelzellen unter dem Einfluß von HA [1 ng/ml bis 100 µg/ml] nach 3 Tagen. Angegeben ist der Mittelwert \pm SD (n=1).

3.6 HA und 1.000 IU/ml bakterielle Hyaluronatlyase

Bakterielle Hyaluronatlyase (3.2) und HA (3.5) hatten, jeweils allein zugegeben, keinen signifikanten Einfluß auf die Zellmigration. Es wurde nun geprüft, ob die Spaltprodukte (oHA) des HA-Abbaus durch bakterielle Hyaluronatlyase nach dem unter 3.5 geschilderten Mechanismus die Zellmigration stärker hemmen würden.

In 2 unabhängigen Versuchen wurden gleichzeitig sowohl HA im Konzentrationsbereich von 1 ng/ml bis 100 µg/ml als auch jeweils 1.000 IU/ml bakterielle Hyaluronatlyase zugegeben. Die statistische Auswertung ergab keine signifikante Beeinflussung der Zellmigration in den gewählten Konzentrationsbereichen. Vergleichswerte waren dabei jeweils die Migrationsraten der Versuchsansätze, denen ausschließlich Kulturmedium bzw. nur Kulturmedium und 1.000 IU/ml bakterielle Hyaluronatlyase zugegeben worden war.

Abb. 9 zeigt die entsprechende graphische Darstellung der Versuchsergebnisse. Vor allem bei höheren HA-Konzentrationen in Verbindung mit 1.000 IU/ml bakterieller Hyaluronatlyase deutet die Graphik auf einen stärkeren Rückgang der Migrationsrate hin. Maximal geht die Migrationsrate bei 100 µg/ml HA und 1.000 IU/ml bakterielle Hyaluronatlyase auf 65% des Kontrollansatzes mit ausschließlich Kulturmedium zurück. Das Signifikanzniveau bleibt jedoch bei dem im vorliegenden Versuch verwendeten Konzentrationsbereich unerreicht.

Dieses Ergebnis bekräftigt die Vermutung, daß oHA als das Spaltprodukt des HA-Abbaus durch die bakterielle Hyaluronatlyase die Migration glatter Gefäßwandmuskelzellen hemmt. Bei ausreichender Menge bakterieller Hyaluronatlyase besteht eine deutlicher ausgeprägte Korrelation der verringerten Migrationsrate zur HA-Konzentration als bei alleiniger Zugabe von HA (siehe 3.5). Das Bestimmtheitsmaß aus der Regressionsgeraden ergab sich für den Bezug zum Versuchsansatz mit ausschließlich Kulturmedium zu $r^2 = 0,93$, für den Bezug zum Versuchsansatz mit Kulturmedium und 1.000 IU/ml bakterieller Hyaluronatlyase zu $r^2 = 0,88$.

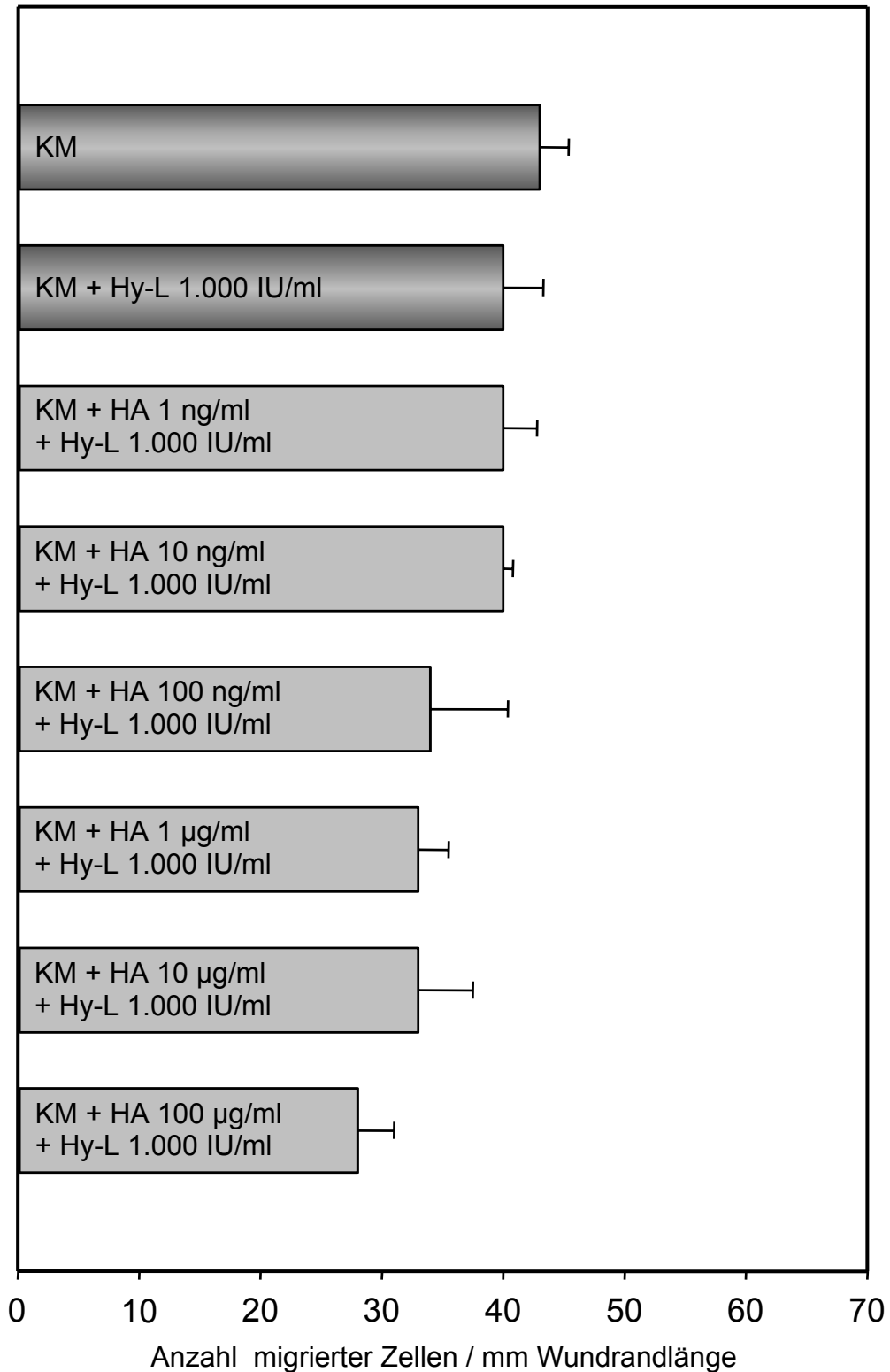


Abb. 9: Migration glatter Gefäßwandmuskelzellen unter dem Einfluß von HA [1 ng/ml bis 100 µg/ml] und bakterieller Hyaluronatlyase (Hy-L) [1.000 IU/ml]=const. nach 3 Tagen. Angegeben ist der Mittelwert ± SEM (n=2).

3.7 HA, 100 µg/ml MgCl₂ und 1.000 IU/ml bakterielle Hyaluronatlyase

Wie unter 3.5 und 3.6 ersichtlich, führte weder die alleinige Zugabe von HA unterschiedlicher Konzentration noch deren Kombination mit 1.000 IU/ml bakterieller Hyaluronatlyase zu einem signifikanten Ergebnis.

Wegen der vermuteten gegenseitigen Wirkungsverstärkung von bakterieller Hyaluronatlyase und MgCl₂ wurde im letzten Versuchsansatz so verfahren wie unter 3.6, aber zusätzlich jeweils mit 100 µg/ml MgCl₂.

In 2 unabhängigen Versuchen wurden gleichzeitig sowohl HA im Konzentrationsbereich von 1 ng/ml bis 100 µg/ml als auch jeweils 100 µg/ml MgCl₂ und 1.000 IU/ml bakterielle Hyaluronatlyase zugegeben. Nach dem Bonferroni-Holm-Verfahren zeigte sich eine statistisch signifikante Beeinflussung der Zellmigration bei folgenden Versuchsbedingungen:

- Kulturmedium + 10 ng/ml HA + 100 µg/ml MgCl₂ + 1.000 IU/ml bakterielle Hyaluronatlyase; $p = 0,010$ (Vergleichswert = Kulturmedium + 1.000 IU/ml bakterielle Hyaluronatlyase) und $p^* = 0,05 / 6-3+1 = 0,013$.
- Kulturmedium + 1 µg/ml HA + 100 µg/ml MgCl₂ + 1.000 IU/ml bakterielle Hyaluronatlyase; $p = 0,008$ (Vergleichswert = Kulturmedium + 1.000 IU/ml bakterielle Hyaluronatlyase) und $p^* = 0,05 / 6-2+1 = 0,010$.
- Kulturmedium + 10 µg/ml HA + 100 µg/ml MgCl₂ + 1.000 IU/ml bakterielle Hyaluronatlyase; $p = 0,004$ (Vergleichswert = Kulturmedium + 1.000 IU/ml bakterielle Hyaluronatlyase) und $p^* = 0,05 / 6-1+1 = 0,008$.
- Kulturmedium + 100 µg/ml HA + 100 µg/ml MgCl₂ + 1.000 IU/ml bakterielle Hyaluronatlyase; $p = 0,014$ (Vergleichswert = Kulturmedium + 1.000 IU/ml bakterielle Hyaluronatlyase) und $p^* = 0,05 / 6-4+1 = 0,017$.

Abb. 10 zeigt eine deutliche Verringerung der Zellmigrationsrate bei fast allen kombinierten Testsubstanzzugaben. Maximal verringerte sich die Migrationsrate auf 56% bei 10 ng/ml HA, 100 µg/ml MgCl₂ und 1.000 IU/ml bakterielle Hyaluronatlyase und durchschnittlich auf 60% im Vergleich zum Kontrollansatz mit ausschließlich Kulturmedium.

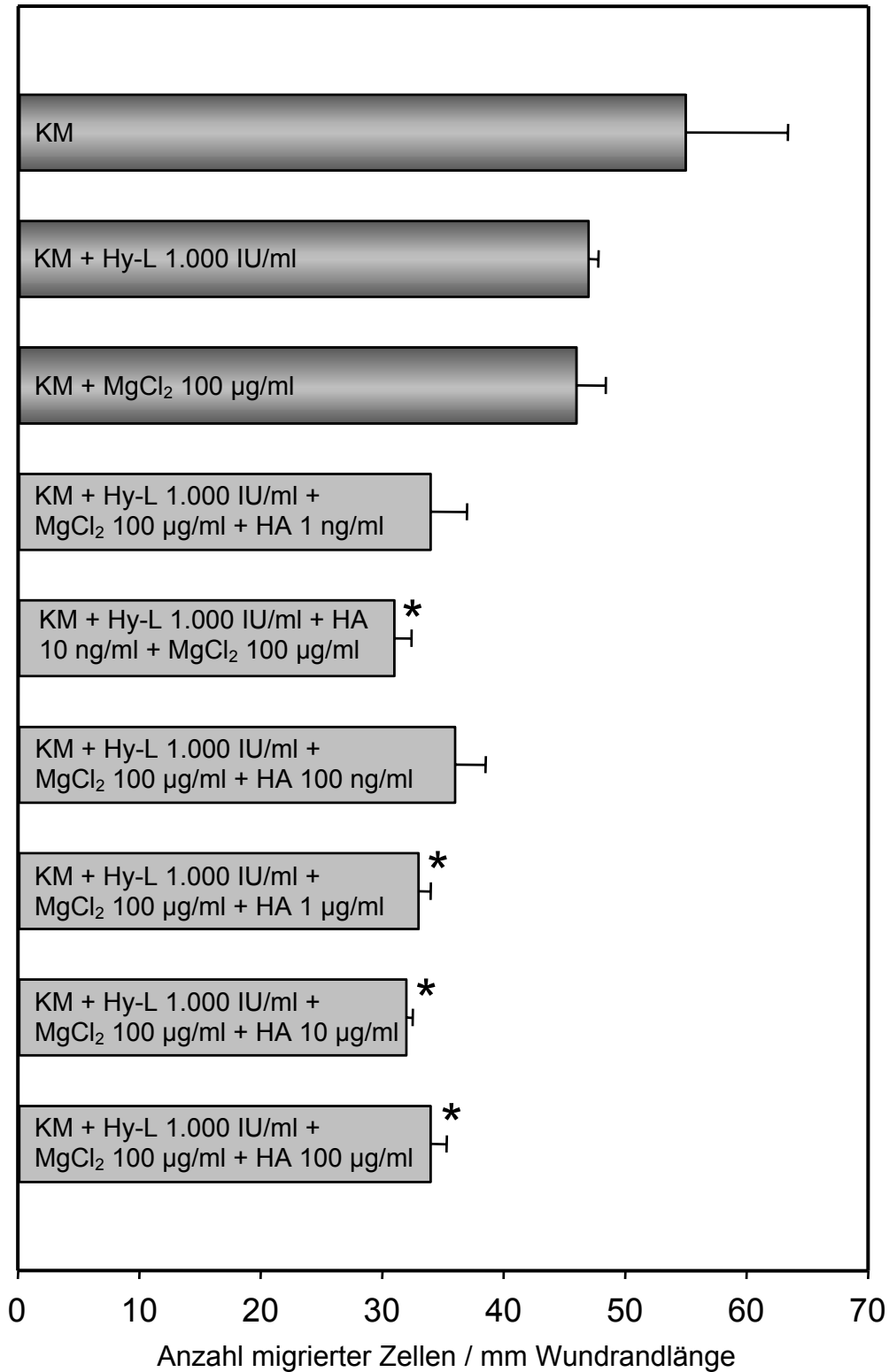


Abb. 10: Migration glatter Gefäßwandmuskelzellen unter dem Einfluß von MgCl₂ [100 µg/ml]=const., HA [1 ng/ml bis 100 µg/ml] und bakterieller Hyaluronatlyase (Hy-L) [1.000 IU/ml]=const. nach 3 Tagen. Angegeben ist der Mittelwert ± SEM (n=2). * p<0,05 und p*>p in Bezug zu KM + Hy-L 1.000 IU/ml; Bonferroni-Holm-Verfahren.

In Bezug zu dem Versuch, dem nur 1.000 IU/ml bakterielle Hyaluronatlyase als Testsubstanz zugegeben worden war, waren nach dem Bonferroni-Holm-Verfahren vier Ergebnisse signifikant. In Bezug zum Versuchsansatz mit nur 100 µg/ml MgCl₂ als Testsubstanz gab es keine signifikanten Ergebnisse. Die feste Kombination von 1.000 IU/ml bakterieller Hyaluronatlyase und 100 µg/ml MgCl₂ (zusammen mit dem im Kulturmedium enthaltenen MgSO₄) wird als entscheidend für dieses Resultat betrachtet, während die Variation der HA-Konzentration bei diesem Versuch keinen ausschlaggebenden Einfluß auf die Migrationsrate auszuüben scheint.

Das Bestimmtheitsmaß errechnete sich für den Bezug zum Versuchsansatz mit ausschließlich Kulturmedium zu $r^2 = 0,36$, für den Bezug zum Versuchsansatz mit Kulturmedium und 1.000 IU/ml bakterieller Hyaluronatlyase zu $r^2 = 0,34$ und für den Bezug zum Versuchsansatz mit Kulturmedium und 100 µg/ml MgCl₂ zu $r^2 = 0,34$.

3.8 Beispiele mikrofotografischer Aufnahmen

In Abb. 11 bis 14 sind Beispiele der Mikroaufnahmen dargestellt. Durch die Anfärbung mit der Romanowsky-Giemsa-Methode stellten sich die Zellkerne gut abgrenzbar dar. Die Lage des Zellkerns war das entscheidende Kriterium für die eindeutige Zuordnung einer Zelle zu einem Migrationsstreckenbereich bei der Bestimmung der Zellmigrationsrate. Senkrecht verlaufend sind die Ausläufer der Einkerbungen im Kunststoffboden zu erkennen, die durch das Aufsetzen der Klinge beim Anbringen des Startlinienschnittes verursacht wurden und der Orientierung beim Auflegen der Schablone dienten, mit deren Hilfe die Zellzahlbestimmung in den einzelnen Migrationsstreckenbereichen erfolgte. Diese Einkerbungen behinderten die Zellen bei der Migration in den freigewischten Bereich des Kulturschalenbodens. Durch moderates Aufpressen der Klinge wurde erreicht, daß die Einkerbung entlang einer Schnittlinie Unterbrechungen aufwies. Diese Stellen ermöglichten eine ungehinderte Zellmigration und wurden deshalb auch zur Bestimmung der Migrationsrate herangezogen.

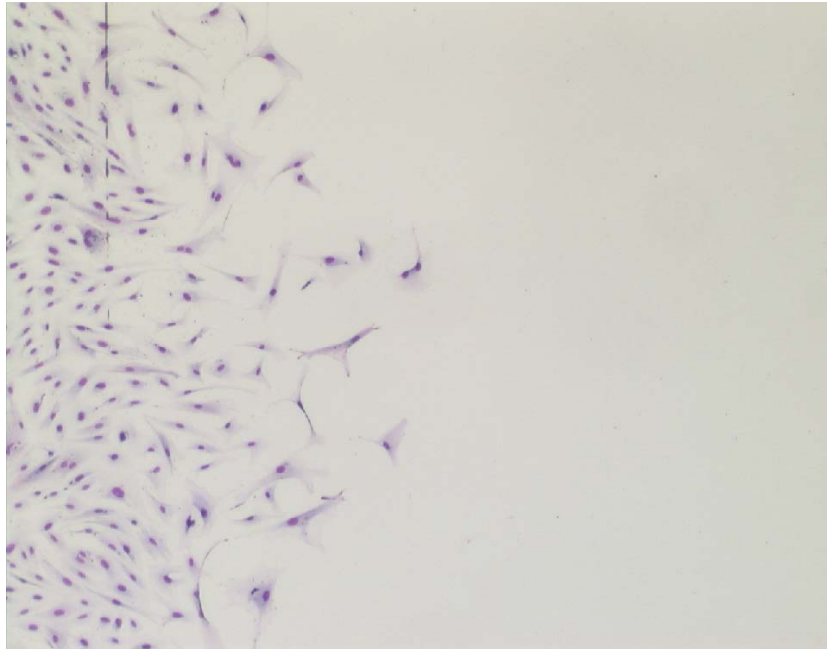


Abb. 11: Mikroaufnahme aus einem fixierten und gefärbten Kontrollansatz nach 3 Tagen, dem nur Kulturmedium zugegeben wurde.



Abb. 12: Mikroaufnahme aus einem fixierten und gefärbten Migrationsversuch drei Tage nach Zugabe von 1 $\mu\text{g/ml}$ MgCl_2 und 5.000 IU/ml bakterielle Hyaluronatlyase.

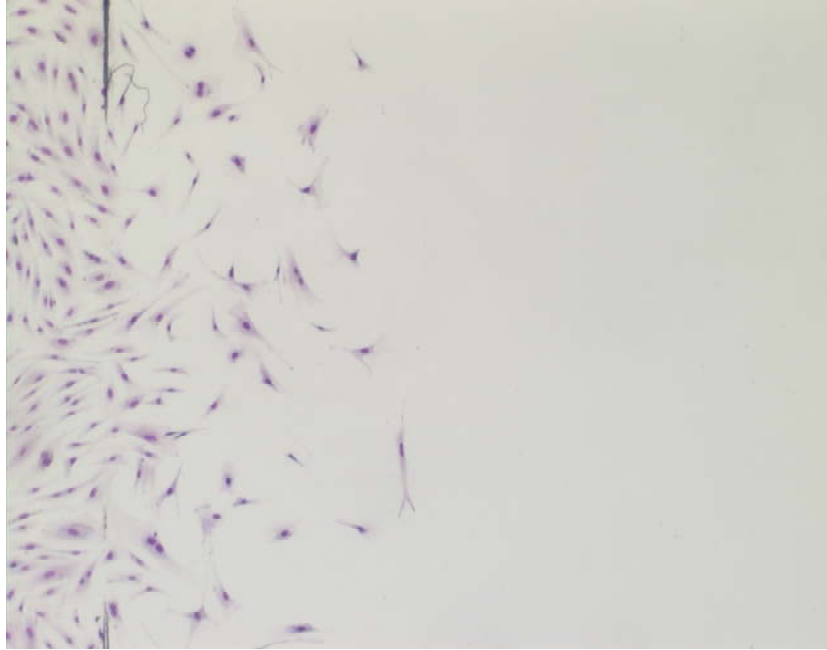


Abb. 13: Mikroaufnahme aus einem fixierten und gefärbten Migrationsversuch drei Tage nach Zugabe von 100 µg/ml HA.

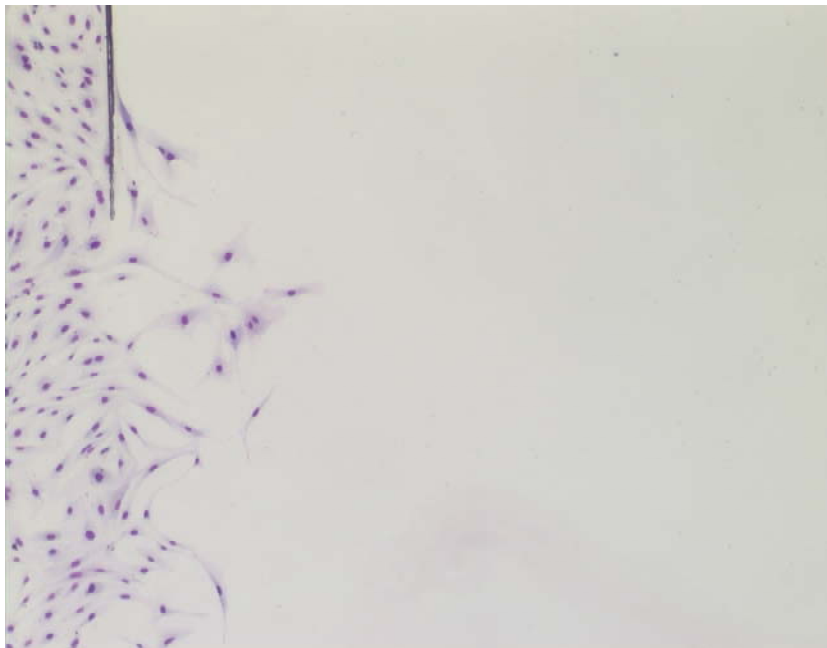


Abb. 14: Mikroaufnahme aus einem fixierten und gefärbten Migrationsversuch drei Tage nach Zugabe von 100 µg/ml HA und 1.000 IU/ml bakterieller Hyaluronatlyase.

4 Diskussion

4.1 Bakterielle Hyaluronatlyase und HA

4.1.1 Beeinflußt HA bei alleiniger Zugabe die Zellmigration?

Im Versuch korrelierte die HA-Zugabe eng mit einem verringerten Migrationsverhalten der Zellen um maximal 33% bei 10 µg/ml HA. Eine migrationsfördernde Wirkung der HA konnte nicht gezeigt werden.

Das Molekulargewicht scheint dafür entscheidend zu sein, ob und wie sich HA auf die Zellmigration auswirkt. Die Wirkung von HA auf das Zusammenspiel von Zellmigration und –proliferation wird unterschiedlich diskutiert (siehe 4.1.2). Tanaka et al. (2000) berichteten in ihren Ergebnissen aus Versuchen mit fotochemisch induzierter Endothelverletzung bei Mäusen und folgender Neointimabildung über eine molekulargewichtabhängige Wirkung der HA auf die Proliferation glatter Gefäßwandmuskelzellen. Unterschieden wurde nach geringem (oHA = HA-Oligosaccharide [4-16 Saccharide], ca. 4 kDa), mittlerem (40-80 kDa) und hohem (800-1200 kDa) Molekulargewicht. Geringe Konzentrationen oHA zeigten die gleiche proliferationsstimulierende Wirkung wie höhere Konzentrationen von HA mit mittlerem Molekulargewicht. Hochmolekulare HA zeigte dagegen keine proliferationsstimulierende Wirkung. Die von Tanaka et al. (2000) verwendete oHA bestand aus 10-12 Sacchariden, während West und Kumar (1989) für oHA mit 3-10 Sacchariden keinen und Evanko et al. (1999) für oHA mit 4-6 Sacchariden sogar einen proliferationshemmenden Effekt beschreiben.

Die bisherigen Forschungsergebnisse zum Einfluß der HA auf die Zellmigration müssen auch ungeachtet des Molekulargewichts der verwendeten HA differenziert betrachtet werden. Zum einen ist hier von Bedeutung, daß verschiedene Zelltypen verschiedener Organismen Verwendung fanden, andererseits können *in vitro*-Versuche nicht ohne weiteres mit *in vivo*-Bedingungen verglichen werden (Dartsch, 1992). Zu dem Einfluß der HA auf das Proliferations- und Migrationsverhalten von verschiedenen Zelltypen werden in der Literatur folgende zwei gegensätzliche Ansichten vertreten:

1. Der höhermolekularen HA wird im Gegensatz zu ihren niedermolekularen Spaltprodukten (oHA) von mehreren Autoren eine migrationsfördernde Wirkung sowohl *in vitro* als auch *in vivo* zugeschrieben. Bei Säugetieren bilden sich nach Fraser und Laurent (1997) über Hyaladherine und ähnliche Proteine Verbindungen zwischen HA einerseits und Proteoglykanen andererseits aus, wodurch die migrationserleichternde Matrixstruktur stabilisiert wird. Verbindungen der HA mit Zelloberflächen führen zur Modifizierung des Zellverhaltens. Die extrazelluläre Matrix expandiert und reichert sich mit HA bei Vorgängen wie Embryonalentwicklung, Wundheilung, Immunreaktionen, Entzündungen und Tumorgenese an. Diesen Vorgängen ist gemeinsam, daß es zu Veränderungen in der Zusammensetzung von Geweben kommt. Einer der zugrundeliegenden Prozesse ist dabei die Zellmigration. Riessen et al. (1996) schlußfolgerten aus Untersuchungen von Atherektomiepräparaten beim Menschen und Neointimabildungen in ballonverletzten Karotiden der Ratte, daß HA Prozesse wie die Zellmigration ermöglichen könnte. Chajara et al. (2000) beschrieben, daß HA eine entscheidende Rolle bei der Proliferation und Migration von glatten Gefäßwandmuskelzellen spielt.

Turley et al. (1985) beobachteten an embryonalen Hühnerherzfibroblasten, daß deren Motilität nicht durch HA allein, aber durch deren Kombination mit HABP (HA-Bindeprotein) gesteigert werden konnte. Auch Knudson und Knudson (1993) beschrieben die direkte Auslösung der Zellmigration durch HA über spezifische Zelloberflächenrezeptoren (Hyaladherine) als besonders ausgeprägt bei Tumorzellen, bei denen die Hyaladherinexpression mit dem metastatischen Potential korrelierte. Nach Laurent und Fraser (1992) steigt die HA-Produktion in proliferierenden Zellen. Zellen proliferieren in sich entwickelnden Geweben, beim Zellumsatz besonders ausgeprägt in Wechselgeweben, bei neoplastischen Veränderungen oder im Rahmen von Reparationsvorgängen nach Verletzung. Papakonstantinou et al. (1998) verwendeten menschliche glatte Gefäßwandmuskelzellen und HA-340 mit einem durchschnittlichen MG von 340 kDa (250-380 kDa). Es wurde eine

signifikante Erhöhung der PDGF-abhängigen Migration durch eine künstliche Basalmembran durch HA-340 beschrieben.

2. Es gibt Ergebnisse, die auf eine Zellmigrationshemmung durch HA hinweisen. Ferns et al. (1995) untersuchten die neointimale Läsionsentwicklung nach Ballonkatheterverletzung unter HA-Zugabe beim Weißen Neuseelandkaninchen. Den beobachteten Rückgang der Neointimadicke führten sie unter anderem auf eine Hemmung der Monozyten- und Makrophageneinwanderung durch die zugegebene HA zurück. In vorliegender Arbeit mit Gefäßwandmuskelzellen vom Weißen Neuseelandkaninchen war die alleinige Zugabe von HA deutlich mit verringertem Migrationsverhalten dieser Zellen verbunden.

4.1.2. Wie wirkt sich die HA-Spaltung durch bakterielle Hyaluronatlyase auf die Migration aus?

Die alleinige Zugabe bakterieller Hyaluronatlyase zum Kulturmedium zeigte eine nur geringgradige Verringerung der Anzahl migrierter Zellen mit zunehmender Konzentration. Bestätigt durch die Varianzanalyse muß davon ausgegangen werden, daß im gewählten Konzentrationsbereich keine wesentliche Beeinflussung der Zellmigration durch bakterielle Hyaluronatlyase bei alleiniger Zugabe erfolgte. Die Kombination von 1.000 IU/ml bakterieller Hyaluronatlyase und aufsteigenden HA-Konzentrationen korrelierte dagegen sehr eng mit rückläufiger Migration, jedoch ohne das Signifikanzniveau zu erreichen.

Die sehr enge Korrelation von steigender HA-Konzentration und verringerter Anzahl migrierter Zellen bei konstanter Konzentration bakterieller Hyaluronatlyase von 1.000 IU/ml könnte bedeuten, daß diese Enzymmenge ausreichte, um entsprechend der steigenden HA-Konzentration mehr oHA (bei bakterieller Hyaluronatlyase = zweifach ungesättigte Disaccharide) bei der HA-Spaltung zu bilden, durch die eine zunehmende Hemmung der Zellmigration erfolgte. Die Extrapolation der graphisch dargestellten Ergebnisse läßt vermuten, daß eine weitere Erhöhung der HA-Konzentration zu signifikanten Ergebnissen führen könn-

te. Eine mögliche Erklärung wäre, daß bei dem Versuch mit alleiniger Zugabe von bakterieller Hyaluronatlyase die vorhandene HA-Menge nicht für eine ausgeprägte Wirkung der bakteriellen Hyaluronatlyase ausreichte.

Bakterielle Hyaluronatlyase ist nach Baker und Pritchard (2000) eine Eliminase, die Hyaluronsäure spaltet. Evanko et al. (1999) beschrieben für arterielle glatte Muskelzellen beim menschlichen Neugeborenen, daß oHA die Bindung von HA an Zelloberflächen hemmt und sowohl die Proliferation als auch die Migration signifikant reduziert. Diese Effekte traten bei größeren HA-Fragmenten oder höhermolekularer HA nicht auf. Höhermolekulare HA wurde als migrationsfördernd beschrieben. Die Ansicht, daß oHA neben der Migration auch die Proliferation hemmen würde, wird jedoch in folgenden Veröffentlichungen nicht geteilt. Chajara et al. (1998) zeigten, daß der HA-Gehalt und die Hyaluronidaseaktivität in verletzungsinduzierter Neointima erhöht sind. Nach Tanaka et al. (2000) wird die akkumulierte HA durch Hyaluronidase zu oHA gespalten, was zur Wachstumsstimulation der glatten Muskelzellen in der Neointima führt. Auch Papaconstantinou et al. (1998) beschrieben, daß höhermolekulare HA migrationsfördernd und proliferationshemmend wirkt, während die niedermolekularen Spaltprodukte (oHA) des enzymatischen Abbaus durch Hyaluronidasen migrationshemmend und proliferationsfördernd wirken.

4.2 Bakterielle Hyaluronatlyase und MgCl₂

4.2.1 Magnesiumwirkungen

Die alleinige Zugabe von MgCl₂ zu den im Medium enthaltenen 200 µg/ml MgSO₄ x 6 H₂O führte zu einer geringgradig verringerten Anzahl migrierter Zellen. Im gewählten Konzentrationsbereich von 100 ng/ml bis 100 µg/ml migrierten bei 1 µg/ml MgCl₂ mit 67% im Vergleich zur Kontrolle am wenigsten Zellen. Höhere Konzentrationen waren wieder mit stärkerer Migration verbunden, maximal bei 10 und 50 µg/ml MgCl₂ mit jeweils 79% im Vergleich zur Kontrolle. Vorliegende Versuchsbedingungen konnten keinen migrationsfördernden Effekt für die MgCl₂-Zugabe aufzeigen. Zwar zeigten höhere Konzentrationen einen leichten Anstieg der Anzahl migrierter Zellen, jedoch legen der Bezug zum Kon-

trollwert ohne MgCl_2 -Zugabe sowie die Betrachtung des gesamten Konzentrationsbereiches eher den Schluß nahe, daß die Zugabe von MgCl_2 im durchgeführten Versuch keinen Einfluß auf das Migrationsverhalten hatte. Zu beachten ist dabei, wie unter 3.1 ausführlich beschrieben wurde, daß die bei diesem Versuchsansatz durchgehend erhöhte Anzahl migrierter Zellen eher auf verfahrenstechnische Abweichungen als auf eine migrationsbeeinflussende Wirkung von MgCl_2 zurückzuführen ist.

Auf Muskelzellen übt Magnesium verschiedene Einflüsse aus. Intrazellulär wird es für die Relativbewegung der Filamente benötigt, bei der es mit dem an der elektromechanischen Koppelung beteiligten Kalzium synergistisch wirkt. Magnesium kann aber auch die intrazelluläre Kalziumfreisetzung hemmen (Herold, 2001). Extrazellulär hemmt es den Kalziumeinstrom in die Zelle sowie die Transmitterfreisetzung an der motorischen Endplatte und wirkt dadurch membranstabilisierend, wodurch die Erregbarkeit der Muskelzellen herabgesetzt wird (Buchta und Höper, 1998).

Magnesium wird nach Shechter et al. (2000) als Kofaktor von ATP betrachtet, der die intrazelluläre ATP-Synthese und Glukoseverwertung verbessert. Nach Kreuzig (1997) gehört Magnesium zu den essentiellen Bestandteilen von Geweben und Körperflüssigkeiten und bildet mit Polyphosphaten Komplexe, wodurch es bei ATP-, UTP- und GTP-abhängigen Reaktionen sowie Phosphatase-Reaktionen als Enzymaktivator wirkt. Insofern müßte sich MgCl_2 auf energieabhängige Zellaktivitäten wie auch die Migration fördernd auswirken.

Folgende Betrachtung dient der Frage, wie der verwendete Konzentrationsbereich für MgCl_2 hinsichtlich seiner Wirksamkeit zu bewerten ist:

Das für vorliegende Arbeit verfügbare Kulturmedium enthielt $200 \mu\text{g/ml MgSO}_4 \times 6 \text{H}_2\text{O}$, entsprechend $19,1 \mu\text{g/ml}$ Magnesium. Bei Kaninchen beträgt der physiologische Konzentrationsbereich für Magnesium im Blut $0,9 - 1,6 \text{ mmol/l}$, entsprechend $26 - 35 \mu\text{g/ml}$, und liegt damit höher als beim Menschen (Veterinärmedizinisches Zentrallabor Ludwigsburg, 2002). Die Zugabe von 100 ng/ml –

100 µg/ml MgCl₂ bedeutet eine Erhöhung der Magnesiumkonzentration im Kulturmedium um 4,1 ng/ml – 4,1 µg/ml, was einer Konzentrationserhöhung um ca. 0 – 21 % entspricht.

Beim Menschen macht der Magnesium-Plasmaspiegel ca. 1% des Gesamtbestands an Magnesium im Körper von ca. 300 mg/kg KG aus. 67 % befinden sich im Knochen und 32 % in der Skelettmuskulatur. Der normale Magnesiumplasmaspiegel des Menschen liegt bei 1,6-2,6 mg/dl (0,65-1,05 mmol/l), wobei davon 1/3 an Albumin gebunden ist (MG von Magnesium = 24,305 g/mol). Im Plasma frei verfügbar sind demzufolge ca. 1,1-1,7 mg/dl (2/3), entsprechend ca. 11-17 µg/ml.

Eine Ampulle Diasporal 2 mmol enthält ca. 50 mg Magnesium. Von Thurnherr und Koch (1962) wurden insgesamt 6 - 60 Injektionen im Abstand von 1 bis 7 Tagen verabreicht. Die i.v.-Gabe einer Ampulle bedeutet eine Zufuhr von 50 mg Magnesium an einem Tag. Verteilt in einem angenommenen Verteilungsvolumen von 5 Litern und ungeachtet der Elimination führt die Zugabe von 50 mg Magnesium/d (1 Amp.) zu einem Konzentrationsanstieg von 1 mg/dl/d, entsprechend 10 µg/ml/d. Das entspräche im genannten Beispiel einer Konzentrationserhöhung um 59 – 91 %.

Der in vorliegender Arbeit verfügbare Konzentrationsbereich für MgCl₂ blieb somit weit unterhalb des Konzentrationsbereiches, in dem Thurnherr und Koch (1962) ihre Erfolge in der Therapie peripherer Durchblutungsstörungen erzielten.

4.2.2 Wie interagieren bakterielle Hyaluronatlyase und MgCl₂?

Für bakterielle Hyaluronatlyase in Kombination mit jeweils 1 µg/ml MgCl₂ ergab sich eine Verringerung der Anzahl migrierter Zellen, die deutlich mit der Konzentration der bakteriellen Hyaluronatlyase korrelierte. Die Erhöhung der MgCl₂-Zugabe auf 100 µg/ml führte zu einer signifikanten Verringerung der Anzahl migrierter Zellen. Jedoch wanderten bei gleichen Konzentrationen an bakterieller Hyaluronatlyase und hoher MgCl₂-Konzentration (100 µg/ml) wesentlich mehr Zellen aus als bei niedrigerer (1 µg/ml). Dieser Unterschied ist bei 5 und 1.000 IU/ml bakterieller Hyaluronatlyase signifikant sowie bei 5.000 IU/ml hoch-

signifikant (vgl. Abb. 6 und 7). Bei hoher Konzentration bakterieller Hyaluronatlyase in Verbindung mit geringer $MgCl_2$ -Konzentration migrierten am wenigsten Zellen, während bei der Kombination von niedriger Konzentration bakterieller Hyaluronatlyase mit hoher $MgCl_2$ -Konzentration am meisten Zellen migrierten. Im Gegensatz zu Teilergebnissen, die bei der Verwendung als einziger Testsubstanz bei $MgCl_2$ eine Verringerung der Migrationsrate und bei bakterieller Hyaluronatlyase keine Beeinflussung der Zellmigration aufzeigten, scheint dieses Ergebnis eine Zellmigrationsförderung durch $MgCl_2$ sowie eine Migrationshemmung durch bakterielle Hyaluronatlyase aufzuzeigen.

Bei der Kombination von bakterieller Hyaluronatlyase mit $MgCl_2$ sind schließlich zwei Punkte zu beachten:

1. Magnesium zeigte in den durchgeführten Versuchen sowohl migrationsbegünstigende als auch –hemmende Auswirkungen auf kontraktionsfähige Zellen in Abhängigkeit von der Konzentration (vgl. 3.3 und 3.4).
2. Magnesium verbessert die migrationshemmende Wirkung von bakterieller Hyaluronatlyase durch seine Wirkung als Hyaluronidaseinhibitor (Farr et al., 1997).

Es hängt nun vom Verhältnis dieser verschiedenen Wirkungen ab, ob bei der Kombination von bakterieller Hyaluronatlyase mit $MgCl_2$ dessen migrationsfördernder oder –hemmender Effekt überwiegt.

Thurnherr und Koch führten 1962 die intravenöse Mischinjektion aus Hyaluronidase vom Testikulartyp und Magnesium erfolgreich in die Therapie peripherer Durchblutungsstörungen ein. Die Mischinjektion wurde als vorteilhaft wegen der gegenseitigen Wirkungsverstärkung beschrieben. Dieser gegenseitigen Wirkungsverstärkung liegt folgendes Prinzip zugrunde: Hyaluronidase begünstigt die Einwirkung von Magnesium durch den von Duran-Reynals 1928 beschriebenen diffusionsbeschleunigenden Effekt, bei dem durch Gewebeauflösung Permeabilitätsbarrieren beseitigt werden. Farr et al. (1997) zufolge wirkt Magnesium als Hyaluronidase-Inhibitor. Das heißt, Magnesium bremst die Hyaluronidase in ihrer enzymatischen Aktivität. Nach Thurnherr und Koch (1962) ver-

längert Magnesium die Hyaluronidasewirkung. Vor dem Hintergrund dieser von Thurnherr und Koch (1962) beschriebenen gegenseitigen Wirkungsverstärkung von Hyaluronidase und Magnesium folgt daraus, daß Magnesium die Hyaluronidasewirkung hinauszögert und dadurch verbessert.

4.3 Bakterielle Hyaluronatlyase, HA und MgCl₂

Im Versuch mit jeweils konstant hohen Konzentrationen von MgCl₂ (100 µg/ml) und bakterieller Hyaluronatlyase (1.000 IU/ml) und zunehmender HA-Konzentration wurden signifikante Verringerungen der Anzahl migrierter Zellen auf durchschnittlich 60% im Vergleich zur Kontrolle beobachtet, die jedoch nicht mit der Veränderung der HA-Konzentration korrelierten. Hier könnten sich ein migrationsfördernder Effekt von MgCl₂ und die Verringerung der Migrationsrate durch die Kombination aus bakterieller Hyaluronatlyase und HA überschneiden. Andererseits könnte die bei den unterschiedlichen HA-Konzentrationen weitgehend konstant verminderte Migrationsrate auch auf eine Abhängigkeit von der festen Kombination aus 100 µg/ml MgCl₂ und 1.000 IU/ml bakterieller Hyaluronatlyase hinweisen.

5 Zusammenfassung

Viele Eigenschaften der bakteriellen Hyaluronatlyase wurden bisher erst ansatzweise erforscht. Bakterielle Hyaluronatlyase könnte jedoch eine Alternative zu der klinisch angewendeten testikulären Hyaluronidase darstellen. Eines der Anwendungsgebiete der testikulären Hyaluronidase sind degenerative, stoffwechsel- oder verletzungsbedingte Gefäßerkrankungen. Bei diesen Gefäßwandveränderungen spielt das Proliferations- und Migrationsverhalten von Gefäßwandmuskelzellen eine wichtige Rolle.

In vorliegender Arbeit wurde *in vitro* neben HA und $MgCl_2$ der Einfluß der bakteriellen Hyaluronatlyase auf das Migrationsverhalten glatter Gefäßwandmuskelzellen des männlichen Weißen Neuseelandkaninchens getestet. Die Gewinnung der Gefäßwandmuskelzellen aus der Aorta thoracalis und abdominalis erfolgte mittels der Explantat-Technik. Nach Auswachsen der Zellen aus den Explantaten wurden die Zellen mit Trypsin/EDTA subkultiviert und in den Passagen P5 – P14 für die Untersuchungen verwendet. Zur statistischen Auswertung wurden das Bonferroni-Holm-Verfahren und die Varianzanalyse herangezogen.

Die durchgeführten Migrationsversuche ergaben eine deutliche Korrelation zwischen einer steigenden HA-Konzentration und einer verringerten Zellmigrationsrate. Desweiteren konnte gezeigt werden, daß die Kombination von bakterieller Hyaluronatlyase mit HA als entsprechendem Substrat sehr eng mit einer verminderten Migrationsrate korrelierte. Das Ergebnis scheint die Theorie zu bestätigen, daß die Migration am effektivsten von kleinen (niedermolekularen) HA-Fragmenten (oHA) gehemmt wird. Für den alleinigen Einfluß von $MgCl_2$ konnten keine eindeutigen Ergebnisse erzielt werden. Es gibt Anhaltspunkte sowohl für eine migrationshemmende als auch für eine migrationsfördernde Wirkung von $MgCl_2$ in Abhängigkeit von der Konzentration. Die gleichzeitige Gabe von bakterieller Hyaluronatlyase und $MgCl_2$ korrelierte - teilweise signifikant - mit einer verringerten Migrationsrate. Die postulierte gegenseitige Wirkungsverstär-

kung von bakterieller Hyaluronatlyase und $MgCl_2$ zeigte keine Abhängigkeit von der in steigenden Konzentrationen ebenfalls zugegebenen HA.

Insgesamt konnte in vitro gezeigt werden, daß die Zugabe von bakterieller Hyaluronatlyase sowohl in Kombination mit HA als auch zusammen mit $MgCl_2$ mit einer deutlichen Verringerung der Zellmigrationsrate verbunden ist. Diese Ergebnisse legen unter Berücksichtigung der sonstigen, im Vergleich zur testikulären Hyaluronidase günstigen Eigenschaften der bakteriellen Hyaluronatlyase nahe, daß die bakterielle Hyaluronatlyase in Zukunft eine Option in der Therapie von Gefäßerkrankungen darstellen könnte.

6 Literaturverzeichnis

Baker JR, Pritchard DG. Action pattern and substrate specificity of the hyaluronan lyase from group B streptococci. *Biochem J* 348: 2465-2471 (2000).

Baumgartner G. Hyaluronidase in der Therapie maligner Erkrankungen. *Wien Klin Wochenschr Suppl* 174: 1-22 (1987).

Bergental DM, Scott WW. Studies on hyaluronidase. *JAMA* 137: 1507-1511 (1948).

Buchta M, Höper DW. *Das Erste*. Verlag Urban & Fischer. München-Jena (1999).

Chain E, Duthie ES. Identity of hyaluronidase and spreading factor. *Brit J Exper Path* 21: 324-338 (1940).

Chajara A, Delpech B, Courel MN, Leroy M, Basuyau JP, Levesque H. Effect of aging on neointima formation and hyaluronan, hyaluronidase and hyaluronectin production in injured rat aorta. *Atherosclerosis* 138: 53-64 (1998).

Chajara A, Raoudi M, Delpech B, Leroy M, Basuyau JP, Levesque H. Increased hyaluronan and hyaluronidase production and hyaluronan degradation in injured aorta of insulin-resistant rats. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20(6): 1480-1487 (2000).

Clark LE, Mellette JR. The use of hyaluronidase as an adjunct to surgical procedures. *J Dermatol Surg Oncol* 20(12): 842-844 (1994).

Dartsch PC. Kultivierung von arteriellen glatten Gefäßmuskelzellen. Diplomarbeit der Fakultät für Chemie und Pharmazie der Universität Tübingen (1985).

Dartsch PC. Untersuchung glatter Muskelzellen normaler und atherosklerotischer Gefäßwände des Menschen. Dissertation der Fakultät für Chemie und Pharmazie der Universität Tübingen (1990).

Dartsch PC. Möglichkeiten und Grenzen von Zellkulturen der Gefäßwand zur Erforschung der Atherosklerose. *Med Welt* 43: 718-26 (1992).

Dickens BF, Weglicki WB, Li YS. Magnesium deficiency in vitro enhances free radical-induced intracellular oxidation and cytotoxicity in endothelial cells. *FEBS Lett* 311: 187-191 (1992).

Duran-Reynals F. Exaltation de l'activité du virus vaccinal par les extraits de certains organs. *Comp Rend Soc De Biol* 99: 6-7 (1928).

Evanko SP, Angello JC, Wight TN. Formation of hyaluronan- and versican-rich pericellular matrix is required for proliferation and migration of vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 19: 1004-1013 (1999).

Farr C, Menzel J, Seeberger J, Schweigle B. Klinische Pharmakologie und Anwendungsmöglichkeiten von Hyaluronidase unter Berücksichtigung von Hylase „Dessau“. *Wien Med Wschr* 147: 1-8 (1997).

Ferns GAA, Konneh M, Rutherford C, Woolaghan E, Anggard E. Hyaluronan (HYAL-BV 5200) inhibits neo-intimal macrophage influx after balloon-catheter induced injury in the cholesterol-fed rabbit. *Atherosclerosis* 114: 157-164 (1995).

Fraser JRE, Laurent TC, Laurent UBG. Hyaluronan: its nature, distribution, functions and turnover. *J Intern Med* 242: 27-33 (1997).

Gibian H. Mucopolysaccharide und Mucopolysaccharidasen. Verlag F Deuticke. Wien (1959).

Großhennig F. Ergebnisse der Behandlung degenerativer arterieller Gefäßkrankungen der unteren Extremitäten mit intravenösen Gaben von Magnesium compositum „Scharffenberg“ und Hyaluronidase. *Dtsch Gesundheitsw* 21: 869-872 (1966).

Herman IM, Castellot JJ. Regulation of vascular smooth muscle cell growth by endothelial-synthesized extracellular matrices. *Arteriosclerosis* 7(5): 463-469 (1987).

Herold G. Innere Medizin. Köln (2001).

Hoffmann-Ostenhof. Enzymologie. Springer-Verlag Berlin (1958).

Knudson CB, Knudson W. Hyaluronan-binding proteins in development, tissue homeostasis, and disease. *FASEB J* 7: 1233-1241 (1993).

Kühn K, Grassmann W, Hofmann U. On the formation of collagen fibrils from dissolved collagen and the function of the concomitant carbohydrate-containing components. *Zschr Naturforsch* 14b: 436-443 (1959).

Kugiyama K, Yasue H, Okumara K. Suppression of exercise-induced angina by magnesium sulfate in patients with variant angina. *J Am Coll Cardiol* 12: 1177-1183 (1988).

Kreuzig T. Biochemie. 9. Auflage. Gustav Fischer-Verlag Lübeck-Stuttgart-Jena-Ulm (1997).

Laurent TC, Fraser JRF. Hyaluronan. *FASEB J* 6: 2397-2404 (1992).

Linker A. Hyaluronidase. In: Bergmeyer HU (Hrsg.): Methoden der enzymatischen Analyse. Verlag Chemie Weinheim (1974).

Linzbach AJ. Die funktionelle Anatomie der Blutgefäße. Deut med J 10(2): 25-29 (1959).

Maroko PR, Libby P, Bloor CM, Sobel BE, Braunwald E. Reduction by hyaluronidase of myocardial necrosis following coronary artery occlusion. Circulation 46: 430-437 (1972).

Maroko PR, Davidson DM, Libby P, Hagan AD, Braunwald E. Effects of hyaluronidase administration on myocardial ischemic injury in acute infarction. A preliminary study in 24 patients. Ann Intern Med 82(4): 516-520 (1975).

Menzel EJ, Farr C. Hyaluronidase and its substrate hyaluronan: biochemistry, biological activity and therapeutic uses. Cancer Letters 131: 3-11 (1998).

Meyer K, Hobby GL, Chaffee E, Dawson MH. Hydrolysis of hyaluronic acid by bacterial enzymes. J Exper Med 71: 137-146 (1940).

Meyer K. Hyaluronidases. In Boyer PD (8ed): The Enzymes. Vol 5. New York-London 307-320 (1971).

Papakonstantinou E, Karakiulakis G, Eickelberg O, Perruchoud AP, Block LH, Roth M. A 340 kDa hyaluronic acid secreted by human vascular smooth muscle cells regulates their proliferation and migration. Glycobiology 8: 821-830 (1998).

Pearson PJ, Evora PR, Seccombe JF. Hypomagnesemia inhibits nitric oxide release from coronary endothelium: protective role of magnesium infusion after cardiac operations. Ann Thorac Surg 65: 967-972 (1998).

Petter O, Bellmann H. Theoretische Aspekte zu neuen Anwendungsmöglichkeiten der Hyaluronidase. Z Inn Med 26: 171-174 (1971).

Premaratne S, Watanabe BI, LaPenna WF, McNamara JJ. Effects of hyaluronidase on reducing myocardial infarct size in a baboon model of ischemia-reperfusion injury. Journal Of Surgical Research 58: 205-210 (1995).

Pschyrembel Klinisches Wörterbuch. 258. Auflage. Walter de Gruyter-Verlag Berlin-New York (1998).

Riede UN, Schaefer HE. Allgemeine und spezielle Pathologie. 3. Auflage. Georg Thieme Verlag Stuttgart-New York (1993).

Riessen R, Wight TN, Pastore C, Henley C, Isner JM. Distribution of hyaluronan during extracellular matrix remodeling in human restenotic arteries and balloon-injured rat carotid arteries. Circulation 93: 1141-1147 (1996).

Shechter M, Sharir M, Paul-Labrador MJ, Forrester J, Silver B, Bairey Merz CN. Oral magnesium therapy improves endothelial function in patients with coronary artery disease. *Circulation* 102: 2353-2358 (2000).

Tanaka Y, Makiyama Y, Mitsui Y. Endothelin-1 is involved in the growth of vascular smooth muscle cells by hyaluronic acid. *International Journal of Cardiology* 76: 39-47 (2000).

Thurnherr A, Koch J. Versuch einer Kausaltherapie der Arteriosklerose mit einer Kombination von Hyaluronidase und Magnesium. *Schweiz Med Wschr Basel* 92: 949-956 (1962).

Turley EA, Bowman P, Kytryk MA. Effects of hyaluronate and hyaluronate binding proteins on cell motile and contact behaviour. *J Cell Sci* 78: 133-145 (1985).

Veterinärmedizinisches Zentrallabor Ludwigsburg. (Persönliche Mitteilung) (2002).

Warburg O, Minami S. Versuche an überlebendem Carcinomgewebe. *Klin Wchnschr Berlin* 776 (1923).

West DC, Kumar S. The effect of hyaluronate and its oligosaccharides on endothelial cell proliferation and monolayer integrity. *Exp Cell Res* 183: 179-196 (1989).