



Hochschule für Angewandte
Wissenschaften Hamburg
Hamburg University of Applied Sciences



Hochschule für angewandte Wissenschaften Hamburg
Fakultät Life Sciences

Etablierung von *Assay Ready Frozen Cells* für den Einsatz im zellbasierten Biokompatibilitätsnachweis bei der Prüfung von Medizinprodukten

Masterarbeit

im Studienfach Pharmaceutical Biotechnology

vorgelegt von

Lukas Focke

Matr.Nr.: [REDACTED]

am: 23.07.2018

1. Betreuer: Prof. Dr. Oliver Ullrich (HAW-Hamburg)
2. Betreuer: Dr. Alexander Loa (acCELLerate GmbH)

Diese Arbeit wurde im Labor der acCELLerate GmbH in Hamburg erstellt.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen Beteiligten bedanken, die mich während dieser Arbeit begleitet haben.

Ich bedanke mich ganz besonders bei Dr. Alexander Loa und Dr. Oliver Wehmeier, die es mir ermöglicht haben diese Arbeit bei der acCELLerate GmbH anzufertigen. Für die Betreuung und fachliche Beratung bedanke ich mich ebenfalls sehr herzlich.

Ein besonderer Dank geht auch an Prof. Dr. Oliver Ullrich, der diese Arbeit von Seiten der HAW Hamburg als Erstgutachter betreut.

Ebenfalls möchte ich mich bei Henne, Christina, Verena, Maren, Ronja, und Johannes für die Unterstützung im Labor und die Beantwortung all meiner Fragen danken. War eine echt gute Zeit mit euch in dem kleinen und zum Schluss sehr heißen Labor.

Zum Schluss möchte ich ausdrücklich Dr. Karen Hinsch für die Übernahme der Betreuung meiner Arbeit danken. Du hattest immer ein offenes Ohr und einen Rat wie das Projekt weiter verlaufen könnte. Vielen Dank.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	4
1.1	Kryokonservierung	5
1.2	Vitalitätsbestimmung	7
1.2.1	Resazurin	7
1.2.2	XTT	9
1.3	Die verwendeten Zelllinien	11
1.3.1	L-929	11
1.3.2	NFS-60	12
1.3.3	V-79 Zellen	13
1.4	Die verwendeten Referenzmaterialien	14
1.5	Ziel der Arbeit	15
2	Material und Methoden	16
2.1	Zellkultur	18
2.1.1	Auftauen von Zellen	18
2.1.2	Erhaltung und Aussäen von Zellen	19
2.1.3	Einfrieren von Zellen	21
2.1.4	Auftaukontrolle	22
2.1.5	<i>Proliferative Capacity Assay</i>	23
2.2	Biokompatibilitäts-Assay	25
2.2.1	Zytotox-Assay	25
2.2.2	Extraktion des Referenzmaterials	26
2.2.3	Erstellen der Verdünnungsreihe und Start des Assays	27
2.3	Statistische Auswertung	31
3	Ergebnisse	32
3.1	Etablierung der Referenzmaterialien	32
3.2	Optimierung der Adhärierungszeit von L-929 Zellen	35

3.3	Direkter Kontakt der Zellen mit 100 % Extrakt.....	38
3.3.1	Einfluss einer Sterilfiltration auf den Extrakt.....	41
3.3.2	Einfluss eines serumfreien Extraktionsmedium.....	42
3.3.3	Optimierung der Verdünnungsreihe von RM-B	44
3.4	Etablierung des XTT-Assay.....	45
3.4.1	XTT-Assay ohne PMS Einsatz.....	47
3.5	Stabilitätsprüfung der Referenzmaterialextrakte.....	48
3.6	Vergleich frischer Zellen mit <i>Assay Ready Cells</i>	52
3.7	Etablierung eines optimierten Pipettierschemas.....	54
3.8	Optimierung des Einfrierens von Zellen	57
3.8.1	Optimierung des Einfrierprofils.....	57
3.8.2	Herstellung von Cryo-Platten	59
3.8.3	Einfrieren von Zellen in reduziertem Volumen	62
4	Diskussion	67
5	Zusammenfassung	72
6	Literaturverzeichnis.....	73
7	Anhang	76
7.1	Abbildungsverzeichnis	76
7.2	Tabellenverzeichnis	77
7.3	Abkürzungsverzeichnis	78

1 Einleitung

Das Ziel von *in vitro* Testverfahren ist die Simulation von biologischen Reaktionen, wie sie im Körper stattfinden, außerhalb dessen durchzuführen. Der große Vorteil von zellbasierten Nachweisverfahren ist, dass durch diese Tests Tierversuche um ein Vielfaches reduziert werden können. Ein weiterer Vorteil ist neben der ethischen Komponente der häufig geringere Kosten- und Zeitaufwand von *in vitro* Verfahren. Daher ist die Entwicklung von *in vitro* Verfahren in den letzten Jahren stetig verbessert und ausgeweitet worden.

Für die Etablierung solcher Testverfahren gibt die Internationale Standard Organisation (ISO) Richtlinien vor. Für die Beurteilung von Medizinprodukten gilt die ISO 10993. Das Dokument behandelt die Ermittlung der biologischen Reaktion auf Medizinprodukte in erster Linie allgemein und weniger auf eine konkrete Anwendung eines Medizinprodukts bezogen. Deshalb werden für eine vollständige biologische Beurteilung die Medizinprodukte nach der Art und Dauer ihres voraussichtlichen Kontakts mit menschlichem Gewebe beim Gebrauch eingeteilt (DIN-EN-ISO 10993).

Medizinprodukte werden nach zwei Aspekten überprüft. Zum einen wird die eigentliche Funktion des Produkts überprüft, zum anderen die Verträglichkeit des Produkts mit dem umliegenden Gewebe im Körper (Cahn und Haasen 1992). Die Nachweisverfahren sollten dabei die Effekte, die von dem Material auf das Gewebe ausgehen sowie die Effekte, welche das Gewebe auf das Material haben umfassen. Der erste Schritt dabei ist die Überprüfung der Zytotoxizität mit immortalisierten Zellen z.B. L-929 Zellen. Dabei wird häufig auch eine qualitative Analyse basierend auf der Morphologie, dem Zellschaden und dem Wachstum der Zellen getätigt (Kirkpatrick *et al.* 1998). Mit diesen Punkt der biologischen Bewertung befasst sich die DIN-EN-ISO 10993-5. Dieser Teil der Richtlinie gibt vor, dass ein direkter Kontakt mit den Zellen bestehen muss. Entweder durch direkten Kontakt mit dem Medizinprodukt selbst oder durch einen Extrakt des Medizinprodukts (DIN-EN-ISO 10993).

Für den Einsatz in einem zellbasierten Nachweisverfahren bieten sich sogenannte *Assay Ready Frozen Cells* (ARC) an. Dabei handelt es sich um tiefgefrorene Zellen, welche nach dem Auftauen direkt im Nachweisverfahren eingesetzt werden können. Dies ist ein herausragender Zeitvorteil, da auf eine zeitintensive Kultivierung der Zellen bis zur Verwendung verzichtet werden kann (Cawkill und

Eaglestone 2007). Des Weiteren können so ebenfalls Fehler, die während der Kultivierung entstehen können, vermieden werden und eine Seneszenz der Zellen ist ebenfalls ausgeschlossen.

1.1 Kryokonservierung

Die Kryokonservierung bietet eine gute Alternative zur einfachen Erhaltungstechnik. Durch die Kryokonservierung sind Zellkulturen und auch ganze Gewebe für eine Langzeitlagerung vor Veränderungen geschützt. Die einfache Erhaltung hat dahingegen deutliche Grenzen durch den natürlichen Alterungsprozess. Ab einer bestimmten Passagenzahl entspricht die Kultur nicht mehr ihrem Ursprung, da natürliche Mutationen stattfinden und sich so die Kultur im Laufe der Zeit verändert, es entstehen Subpopulationen (Gstraunthaler und Lindl 2013). Bei der Kryokonservierung werden Zellen mit einer geringen Passagenzahl bei -196 °C in der Gasphase von flüssigem Stickstoff eingefroren. Bereits ab einer Temperatur von -130 °C sind jegliche biochemische Aktivitäten unterbunden (Mazur 1984). Dadurch können reproduzierbare Ergebnisse über einen langen Zeitraum erzielt werden.

Während des langsamen Gefrierens von Wasser kommt es häufig zu einer Unterkühlung des Wassers. Eiskristalle benötigen zum Wachsen Kristallisationskeime z.B. Staub, Eiskristalle oder ähnliches. Fehlen diese kühlt das Wasser unterhalb seines normalen Gefrierpunktes von 0 °C ab und die Kristallisation erfolgt schlagartig. Die Bildung von Eiskristallen ist ein exothermer Vorgang, das heißt bei Einsetzen der Kristallisation wird Wärme schlagartig frei und die Temperatur steigt auf die normale Gefriertemperatur an. Dieser Temperaturanstieg ist schädlich für die Zellen. Daher wird während des Einfrierprozesses mit einer Temperaturregelung gegen die Entstehung von Kristallisationswärme gegengesteuert. Im optimalen Fall gelingt dabei ein linearer Verlauf der Einfrierkurve. Für eine hohe Vitalität und Funktionalität der Zellen nach dem Auftauen werden langsame Kühlraten von $1\frac{\text{°C}}{\text{min}}$ empfohlen (Mazur 1963).

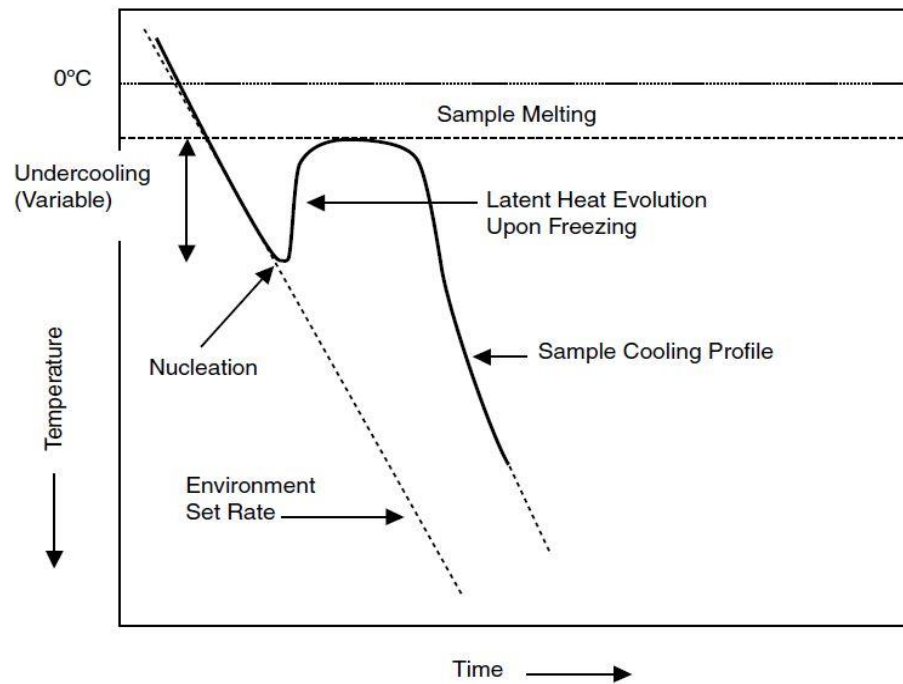


Abbildung 1.1 Schematische Darstellung einer Einfrierkurve mit auftretender Kristallisationswärme

Die Abbildung zeigt eine schematische Einfrierkurve. Es ist zu erkennen, wie die Proben temperatur unterhalb des eigentlichen Gefrierpunktes sinkt und somit unterkühlt. Mit Erreichen der Kristallisationstemperatur wird schlagartig Wärme freigesetzt und die Temperatur steigt auf die eigentliche Gefriertemperatur an. Diese wird für eine Zeit konstant gehalten, da Wärme an das weiter flüssige, kältere Wasser abgegeben wird. Danach sinkt die Temperatur erneut parallel zum eingestellten Temperaturprofil (Bild: Brockbank *et al.* 2007).

Während des Einfrierens können die Zellen bis zu 95 % ihres Volumens verlieren. Durch die Bildung von Eiskristallen steigt die Konzentration von gelösten Stoffen in der verbleibenden Flüssigkeit außerhalb der Zellen. Dies führt dazu, dass interzelluläres Wasser durch die Zellmembran nach außen diffundiert. Zu hohe Salzkonzentrationen innerhalb der Zelle können diese schädigen (Acker und McGann 2003).

Zum Schutz der Zellen während des Einfrierens werden Kryoprotektiva zu den Einfriermedien gegeben. Ihre Aufgabe ist es die Membran zu stabilisieren, die Osmolarität zu steuern, die Vitrifikation zu fördern und somit die Zellen vor Gefrierschäden zu schützen. Ohne Gefrierschutzmittel im Medium ist ein Einfrieren von Zellen mit hoher Qualität nicht möglich. Zu diesem Zweck stehen diverse

Substanzen zur Verfügung z.B. DMSO, Glycerin, diverse Zucker und PVP-Varianten.

Es wird zwischen penetrierenden und nicht penetrierenden Gefrierschutzmitteln unterscheiden. Die penetrierenden Kryoprotektiva dringen in die Zellen ein und verhindern eine zu starke osmotische Dehydrierung der Zelle. Des Weiteren werden so das Schrumpfen der Zelle und die Bildung von interzellulärem Eis reduziert. Eines der am häufigsten eingesetzten penetrierenden Gefrierschutzmittel ist DMSO. Es ist ein organisches Lösungsmittel, welches leicht und schnell die Zellmembran passieren kann. In zu hohen Konzentrationen wirkt es allerdings toxisch, was ein direktes Entfernen bzw. Verdünnen nach dem Auftauen erforderlich macht (Best 2015).

Die Kryokonservierung wird seit der Entdeckung der kryoprotektiven Eigenschaften von Glycerin 1949 immer bedeutender (Amann und Pickett 1987). Die Nachfrage an kryokonservierten Zellen in großen Stückzahlen wächst stetig, da sie optimal für Wirkstoffscreenings in der Pharmaindustrie geeignet sind (Tominaga *et al.* 1999). Die Kryokonservierung ist bereits für viele Zelllinien ein etablierter Prozess. Die ARC werden unter bestmöglichen Bedingungen eingefroren und besitzen dadurch nach dem Auftauen direkt ihre volle Funktionalität und Vitalität.

1.2 Vitalitätsbestimmung

Für die Vitalitätsbestimmung von Zellen stehen mehrere Verfahren zur Verfügung. Für diese Arbeit wurden die Substanzen Resazurin und XTT genutzt. Bei der Variante mit Resazurin wird die Fluoreszenz des Reduktionsprodukts gemessen, bei XTT die Absorption des durch Reduktion entstehenden Formazansalzes.

1.2.1 Resazurin

Resazurin wurde von Weselsky 1871 entdeckt und zum ersten Mal zur Überprüfung des Bakteriengehalts in Milch 1929 eingesetzt (Twigg 1945); (Weselsky 1871). Resazurin ist ein schwach fluoreszierender Farbstoff, welcher durch Metabolisierung innerhalb der Zelle zu dem stark fluoreszierenden Farbstoff Resorufin reduziert wird (McKenzie 1962). Bis heute ist nicht endgültig geklärt, wo das Resazurin in der Zelle umgesetzt wird. Es wird vermutet, dass Resazurin in die

Zelle diffundieren kann und dort durch verschiedene Reduktionsenzyme in den Mitochondrien, Zytosol und Mikrosom zu Resorufin reduziert wird (Chen *et al.* 2018).

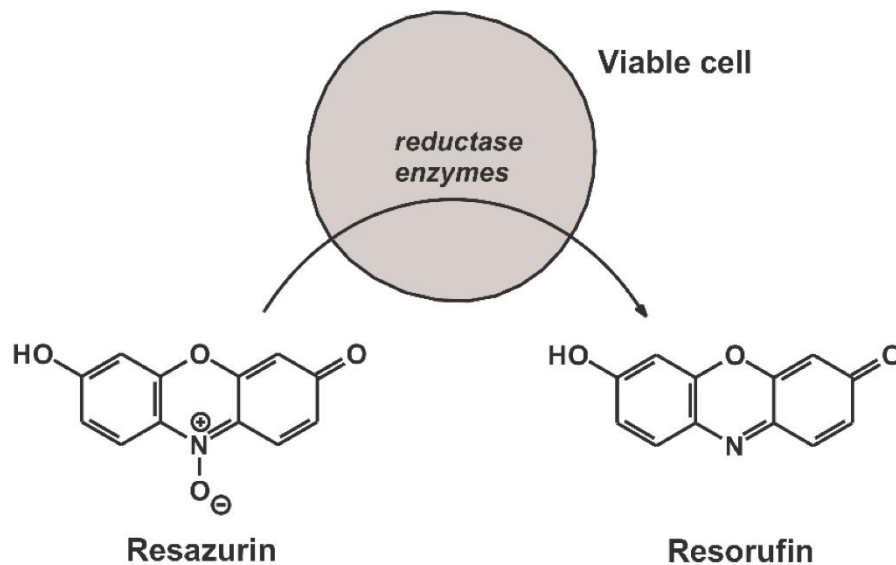


Abbildung 1.2 Schematische Darstellung der Reduktion von Resazurin zu Resorufin

Die Abbildung zeigt die Strukturformeln von Resazurin und Resorufin. Resazurin ist die oxidierte Form und ist blau gefärbt. Das Resorufin ist die reduzierte Form, ist stark fluoreszierend und pink gefärbt. Das Emissionsmaximum von Resorufin liegt bei 590 nm. Durch die in der Mitte dargestellte Zelle werden die Reduktionsprozesse, welche in der Zelle ablaufen, schematisch dargestellt. (Bild Csepregi *et al.* 2018)

Resorufin ist im Gegensatz zu Resazurin ein stark pink leuchtender Farbstoff. Sein Absorptionsmaximum liegt bei 573 nm. Durch eine Anregung mit einer Wellenlänge von 540 nm verschiebt sich das Emissionsmaximum auf 590 nm. Es wird in zellbasierten Assays eingesetzt, um die Zellviabilität zu überprüfen, da nur vitale Zellen in der Lage sind Resazurin zu reduzieren.

1.2.2 XTT

Tetrazoliumsalze sind häufig eingesetzte Nachweisreagenzien in der Zellbiologie um die metabolische Aktivität von Zellen zu messen (Wang *et al.* 2011). Die erste Generation von Tetrazoliumsalzen war nicht wasserlöslich was ihre Anwendung deutlich umständlicher machte. Es wurden im weiteren Verlauf der Entwicklung Monotetrazoliumsalze wie MTT eingesetzt, welche einfacher in Lösung zu bringen waren. So konnte 1983 der erste kolorimetrische Mikroplatten Assay zur Bestimmung der Proliferation und der Zytotoxizität entwickelt werden (Mosmann 1983). Für eine spektrophotometrische Bestimmung in einem Mikroplattenreader war die Entwicklung von wasserlöslichen Formazansalzen notwendig. Dies führte zu der Entwicklung der zweiten Generation von Tetrazoliumsalzen, den Tetrazoliumanalogi wie z.B. XTT.



Abbildung 1.3 Reduktion von XTT zu seinem Formazansalz

In der Abbildung sind die Strukturformeln von XTT, oxidierte Form, und seines Formazansalzes, reduzierte Form, dargestellt. Während der Reduktion von XTT wird der Tetrazoliumring aufgebrochen und das Formazan entsteht. XTT selbst ist schwer wasserlöslich und schwach gelblich das Formazan hingegen leuchtet stark orange und löst sich gut in Wasser. (Bild: ATCC 20.07.2018)

XTT ist eine farblose, leicht gelbliche Substanz, welche durch Reduktion zu einem stark orange leuchtenden Formazansalz wird. Bei der Reduktion von XTT wird der positiv geladene Tetrazolring aufgebrochen und es kommt zum Farbumschlag (Paull *et al.* 1988). Das entstandene Formazansalz ist wasserlöslich und kann somit direkt im Mikroplattenreader bestimmt werden. Die Umsetzung von XTT zu seinem Formazan findet an der Zellmembran statt. Über innerzelluläre Transportwege werden Elektronen an die Zellmembran transportiert. Außerhalb der

Zelle wird die Reaktion durch Phenazinmethosulfat (PMS) unterstützt. PMS dient hier als Elektronentransporter. Es nimmt Elektronen an der Zelloberfläche auf, wird so oxidiert und zu einem reaktiven Zwischenprodukt, welches das XTT reduziert. Das nach der Reduktion von XTT ebenfalls reduziert vorliegende PMS steht erneut zur Verfügung und die Reaktion beginnt von neuem (Berridge *et al.* 2005).

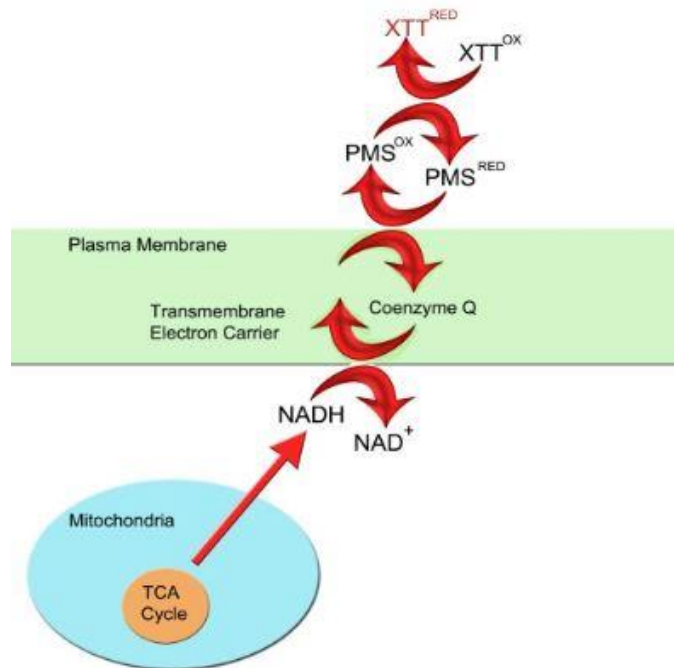


Abbildung 1.4 Elektronentransport zur Reduktion von XTT

In der Abbildung ist schematisch dargestellt, wie die Reduktion von XTT zu seinem Formazan abläuft. XTT kann aufgrund seiner negativen Ladung die Zellmembran nicht passieren. Daher findet die eigentliche Reaktion außerhalb der Zelle statt. Über innerzellulare Transportwege werden Elektronen an die Zellmembran transportiert. PMS nimmt diese Elektronen auf und wird so zu einem reaktiven Zwischenprodukt, welches das XTT zu seinem Formazan reduziert. (Bild: ATCC 20.07.2018)

1.3 Die verwendeten Zelllinien

1.3.1 L-929

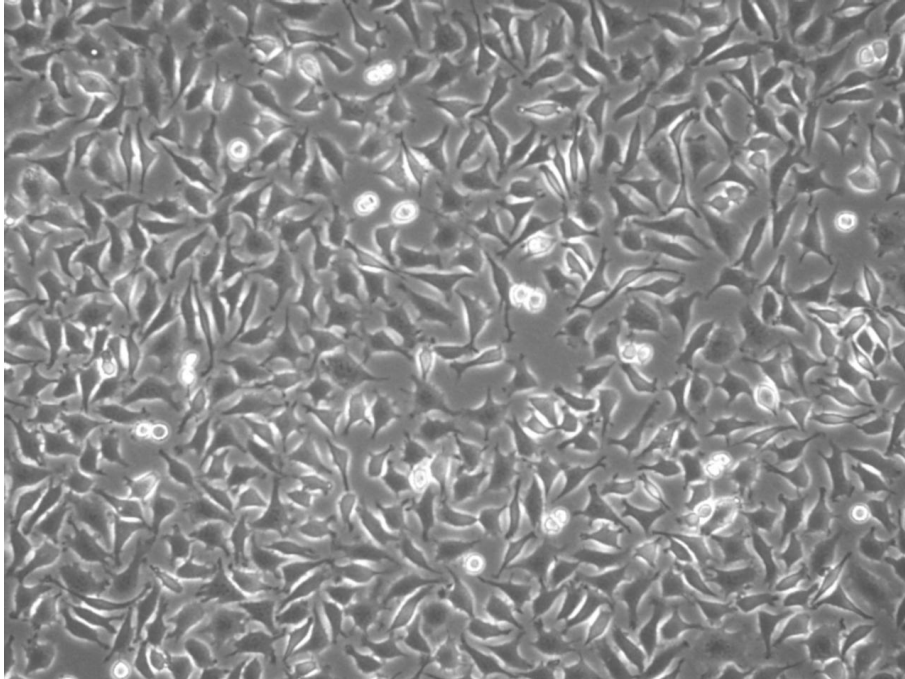


Abbildung 1.5 L-929 Zellen

Die Abbildung zeigt L-929 Zellen vor der Ernte in einer Zellkulturflasche. Es handelt sich um Fibroblasten, die eine adhärenente Zelllinie bilden. Auf dem Bild ist ihre typische Morphologie gut zu erkennen. Das Bild wurde mit einer 100-fachen Vergrößerung und Phasenkontrast aufgenommen. (Bild: Focke L. 2018)

Bei L-929 Zellen handelt es sich um Fibroblasten, welche eine adhärenente Zelllinie bilden. Der Elternstamm dieser Zelllinie stammt aus dem Fettgewebe und dem Unterhautgewebe einer 100 Tage alten männlichen Maus (Earle und Chief 1938). Der *National Collection of Type Cultures* (NTCT) Klon 929 wurde im Jahr 1948 entwickelt. Dieser Klon war einer der ersten Stämme, die in kontinuierlicher Kultur etabliert wurden. Der Klon 929 wurde aus der 95sten Passage etabliert (Public Health England 20.07.2018).

1.3.2 NFS-60

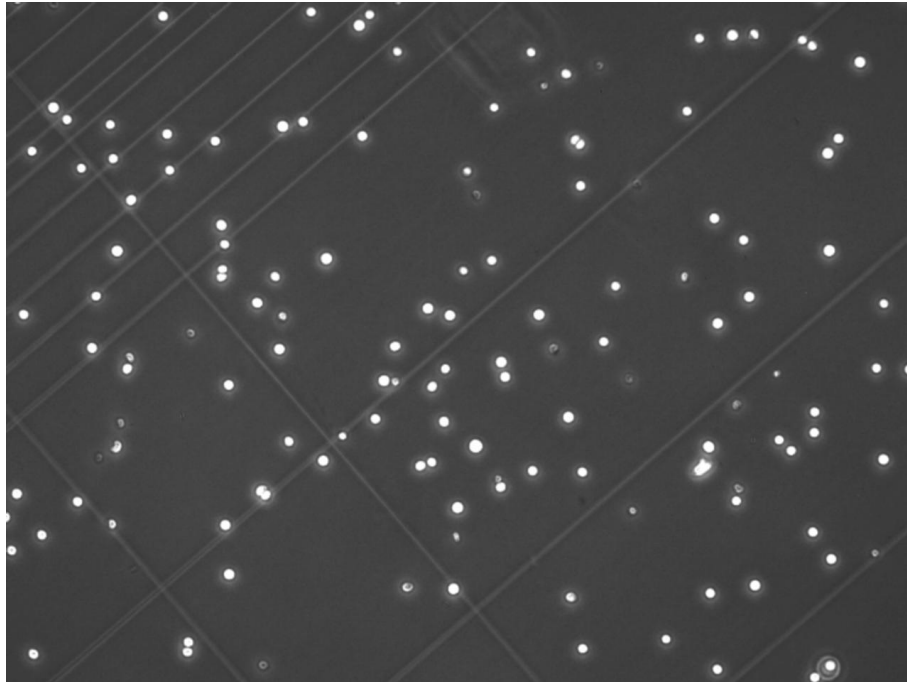


Abbildung 1.6 NFS-60 Zellen

Die Abbildung zeigt NFS-60 Zellen vor der Subkultivierung. Es handelt sich um Lymphoblasten, die eine Suspensionszelllinie bilden. Die Zellen zeigen die für Suspensionszellen typische runde Morphologie. Die Zellen sind deutlich kleiner als die Zellen einer adhärennten Zelllinie, wie in Abbildung 1.5. Das Bild wurde mit einer 100-fachen Vergrößerung und Phasenkontrast aufgenommen. (Bild: Focke L. 2018)

Bei NFS-60 Zellen handelt es sich um Lymphoblasten, welche eine Suspensionszelllinie darstellen. Die Zellen wurden durch die Infektion einer F1 Maus mit dem Virus Cas Br-M aus ihrem Blut erhalten. NFS-60 Zellen sind für ihr Wachstum von Interleukin 3 abhängig, welches dem Wachstumsmedium zugesetzt werden muss. Diese Zellen werden für die Überprüfung des humanen sowie murinen Wachstumsfaktors G-CSF eingesetzt. Die Zellen sind außerdem responsiv auf die Wachstumsfaktoren GM-CSF und Erythropoetin (Nakoinz *et al.* 1990).

1.3.3 V-79 Zellen

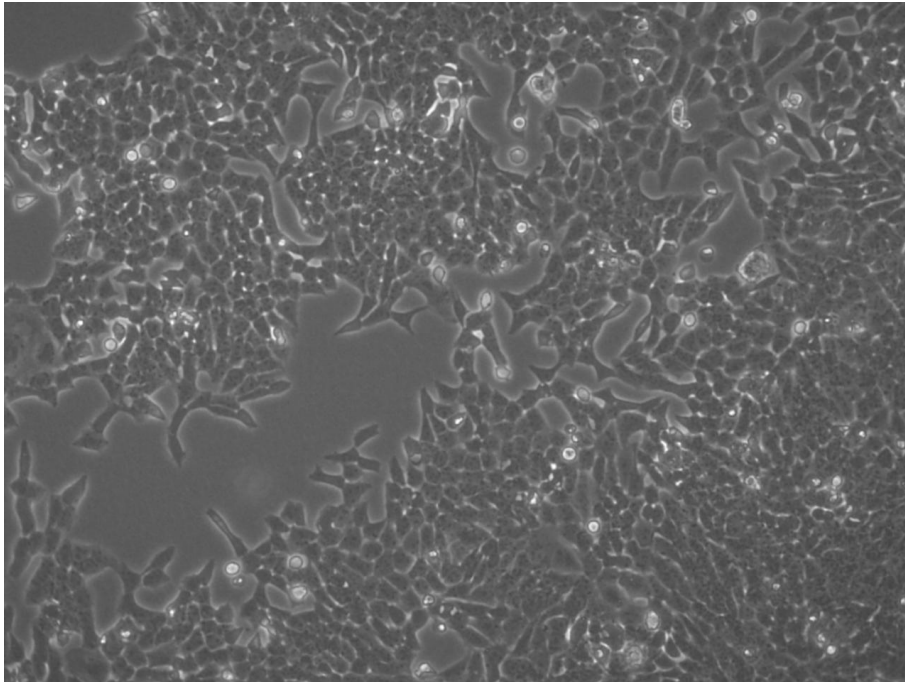


Abbildung 1.7 V-79 Zellen

Die Abbildung zeigt V-79 Zellen vor der Ernte in einer Zellkulturflasche. Es handelt sich um Fibroblasten, die eine adhärenente Zelllinie bilden. Auf dem Bild ist die typische netzartige Morphologie der V-79 Zellen gut zu erkennen. Das Bild wurde mit einer 100-fachen Vergrößerung und Phasenkontrast aufgenommen. (Bild: Focke L. 2018)

Die Zelllinie V-79 wurde aus dem Lungengewebe eines gesunden chinesischen Hamsters generiert. Es handelt sich um adhärenent wachsende Fibroblasten bei denen die G1-Phase nicht vorhanden bzw. sehr kurz ist. V-79 Zellen weisen eine hohe karyotypische sowie morphologische Stabilität auf, wodurch sie für genotoxische Experimente sehr gut geeignet sind (Public Health England 20.07.2018).

1.4 Die verwendeten Referenzmaterialien

Für den Biokompatibilitätsnachweis werden drei Referenzmaterialien verwendet: RM-A, RM-B und RM-C. Hierbei handelt es sich um Material des Hatano Research Institute, welches als offizielles Referenzmaterial von der ISO 10993 vorgeschlagen wird (DIN-EN-ISO 10993). RM-A und RM-B bestehen aus Polyurethan, welches für RM-A mit 0,1 % Zink-Diethyldithiocarbamat und für RM-B mit 0,25 % Zink-Dibutyldithiocarbamat beschichtet ist. Die Materialien RM-A und RM-B dienen im Biokompatibilitätsnachweis als Positivkontrollen, wobei RM-A eine stärker toxische Wirkung als RM-B besitzt. RM-C ist ein hoch verdichtetes Polyethylen, welches als Negativkontrolle dient.

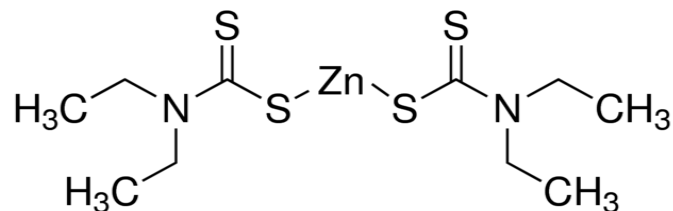


Abbildung 1.8 Strukturformel von Zink-Diethyldithiocarbamat

Zink-Diethyldithiocarbamat (RM-A) ist ein Standardreferenzmaterial für den Einsatz im Biokompatibilitätsnachweis (Bild: Sigma-Aldrich 20.07.2018)

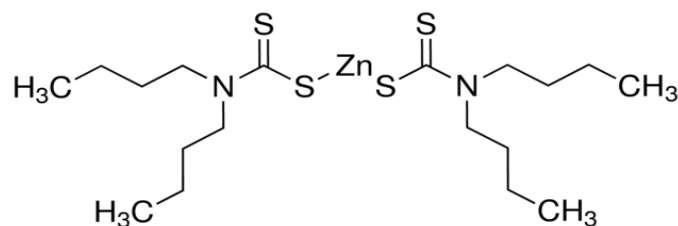


Abbildung 1.9 Strukturformel von Zink-Dibutyldithiocarbamat

Zink-Dibutyldithiocarbamat (RM-B) ist ein Standardreferenzmaterial für den Einsatz im Biokompatibilitätsnachweis (Bild: Sigma-Aldrich 20.07.2018)

Die toxische Wirkung der Materialien RM-A und RM-B entsteht durch das zentrale Zinkatom. Zink ist ein essentielles Metall für die Funktion von vielen Enzymen in großen Teilen des Metabolismus. Im Vergleich zu anderen Spurenelementen ist Zink *in vivo* relativ ungiftig. Dies ist auf eine Kombination aus homöostatischen

Mechanismen, die die Aufnahme und Ausscheidung von Zink regulieren zurückzuführen (Prasad 1979). Diese Mechanismen liegen *in vitro* nicht vor, wodurch Zink bereits ab einer Konzentration von $10^{-4} \frac{\text{mol}}{\text{l}}$ toxisch wirkt. Zink konkurriert in der Zelle mit anderen Spurenelementen um ähnliche Bindungsstellen. Dieser Ausschluss von anderen Spurenelementen führt dann zum Zelltod. (Borovanský und Riley 1989).

1.5 Ziel der Arbeit

Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Etablierung eines Biokompatibilitätsnachweises mit *Assay Ready Frozen Cells*, als neues Produkt in der Firma acCELLerate GmbH. Zu diesem Zweck wird auf dem bereits entwickelten und vermarkteten Zytotox-Assay aufgebaut. Für die Entwicklung des Biokompatibilitätsnachweises wird sich an der ISO 10993 orientiert. Diese gibt die Rahmenbedingungen für die Testung von Medizinprodukten vor.

Für den Biokompatibilitätsnachweis werden drei Referenzmaterialien von der ISO empfohlen, welche unterschiedliche Toxizitätsniveaus besitzen. Bei dem Material handelt es sich um Polyurethan, welches mit einer Zinkverbindung beschichtet ist. Es werden zwei Varianten des Referenzmaterials etabliert. Zum einem liegt das Material in Plattenform zum anderen als bereits vorgeschchnittene Stifte vor. Der Test wird mit L-929 Zellen etabliert.

Ein weiteres Ziel der Arbeit ist es, das Einfrieren von Zelllinien zu optimieren. Dazu werden Versuche mit einem reduzierten Einfriervolumen bei gleicher Zellzahl durchgeführt. Für diesen Zweck werden die V-79 und NFS-60 Zellen genutzt. Sie dienen dazu, die Änderung der Einfrieremethode auf eine Allgemeingültigkeit zu überprüfen. Hierbei stehen die NFS-60 Zellen im Vordergrund, da diese sehr empfindlich auf das Einfrieren reagieren und somit als Indikator für eine stabile Methode dienen. Außerdem wird überprüft, ob es möglich ist L-929 Zellen direkt in einer 96-well Platte einzufrieren und dadurch den Biokompatibilitätsnachweis weiter zu optimieren. Zusätzlich dazu wird ebenfalls das Einfrierprotokoll optimiert, um einen linearen Verlauf der Einfrierkurve zu gewährleisten und so den kritischen Punkt der Erstarrungswärme zu eliminieren.

2 Material und Methoden

Für diese Arbeit wurden folgende Zelllinien und die zugehörigen Kulturmedien und Kryomedien verwendet:

- L-929 (adhärente Zelllinie)
- NFS-60 (Suspensionszellen)
- V-79 (adhärente Zelllinie)

Tabelle 2.1 Kulturmedium für L-929 Zellen

Chemikalie	Konzentration
RPMI 1640 (Sigma Aldrich)	500 ml
L-Glutamine (PAN-Biotech)	2 mM
FBS Standard (Corning)	10 % (v/v)

Tabelle 2.2 Kulturmedium für NFS-60 Zellen

Chemikalie	Konzentration
RPMI 1640 (Sigma Aldrich)	500 ml
L-Glutamine (PAN-Biotech)	2 mM
FBS Standard (Corning)	10 % (v/v)
Natriumpyruvat (Sigma Aldrich)	1 mM
Interleukin 3 (Sigma Aldrich)	33 U/ml

Tabelle 2.3 Kulturmedium für V-79 Zellen

Chemikalie	Konzentration
DMEM <i>high glucose</i> (Sigma Aldrich)	500 ml
L-Glutamine (PAN-Biotech)	2 mM
FBS Standard (Corning)	10 % (v/v)

Tabelle 2.4 Kryomedium für L-929 Zellen

Chemikalie	Mengenanteil
Kulturmedium L-929	85 %
FBS Standard (Corning)	10 %
DMSO (Sigma Aldrich)	5 %

Tabelle 2.5 Kryomedium für NFS-60 Zellen

Chemikalie	Mengenanteil
FBS Standard (Corning)	95 %
DMSO (Sigma Aldrich)	5 %

Tabelle 2.6 Kryomedium für V-79 Zellen

Chemikalie	Mengenanteil
Kulturmedium V-79	85 %
FBS Standard (Corning)	10 %
DMSO (Sigma Aldrich)	5 %

2.1 Zellkultur

2.1.1 Auftauen von Zellen

2.1.1.1 Geräte

- Inkubator 37 °C mit 5 % CO₂ (Thermo Scientific)
- Sterilwerkbank (Hera Safe)
- Stickstofftank Chronos (Messer)
- Wasserbad (GFL)

2.1.1.2 Verbrauchsmaterialien und Chemikalien

- *Cryovials* 1,8 ml (Thermo Scientific)
- Serologische Pipetten (Sarstedt)

2.1.1.3 Durchführung

Zum Auftauen werden kryokonservierte Zellen dem Stickstofftank entnommen. Die Zellen sind in der Gasphase gelagert. Das *Cryovial* wird zum Auftauen in einen Schwimmer eingesetzt und dieser in ein 37 °C warmes Wasserbad für 2 min überführt. Währenddessen werden 8 ml auf 37 °C vorgewärmtes Kulturmedium in einem 15 ml *Tube* vorgelegt. Die aufgetaute Zellsuspension wird zum Waschen der Zellen in das *Tube* überführt. Anschließend wird die Suspension bei 80 x g für 4 min zentrifugiert. Der Überstand wird abgenommen und verworfen. Das Zellpellet wird in 5 ml Kulturmedium resuspendiert.

Die Cryo-Platten werden in einem anderen Verfahren aufgetaut. Hierbei handelt es sich um 96-*well* Platten in denen L-929 Zellen direkt eingefroren werden (siehe Abschnitt 2.1.3). Die Platte wird aus dem -80 °C Eisschrank entnommen und unter die Sterilwerkbank gebracht. Der Transport und die Lagerung bis zur Verwendung erfolgen auf Trockeneis. Dabei ist es wichtig die Platte nicht von unten zu berühren, um ein lokales Auftauen durch Körperwärme zu vermeiden. Es werden 70 µl vorgewärmtes Kulturmedium in jedes *well* pipettiert und die Platte anschließend für 5 min bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Nach den fünf Minuten wird die Platte aus dem Inkubator entnommen und kurz auf einen Mikroplattenschüttler gestellt, um die Zellen im Medium zu verteilen. Nachfolgend wird die Platte für 2 h unter vorherigen Bedingungen inkubiert. In dieser Zeit können die Zellen im *well* adhären.

Für die Versuche mit einem reduzierten Einfriervolumen auf 200 µl verläuft der Auftauprozess ebenfalls abweichend. Die *Cryovials* werden aus dem -80 °C entnommen und unter der Sterilwerkbank mit 1,6 ml vorgewärmten Kulturmedium

versehen. Anschließend kommen die *Vials* für 5 min bei 37 °C und 5 % CO₂ in den Inkubator. Nach Ablauf der Zeit kann das Zellpellet am Boden des *Vials* durch vorsichtiges auf- und abpipettieren im Medium resuspendiert werden.

2.1.2 Erhaltung und Aussäen von Zellen

- CASY TT (Schärfe-System)
- Inkubator 37 °C mit 5 % CO₂ (Thermo Scientific)
- Sterilwerkbank (Hera Safe)
- Zentrifuge (Beckmann)

2.1.2.1 Verbrauchsmaterialien und Chemikalien

- *Accutase* (Sigma Aldrich)
- *Cryovials* 1,8 ml (Thermo Scientific)
- *Dulbecco's Phosphate Buffered Saline* (Sigma Aldrich)
- Serologische Pipetten (Sarstedt)
- Reaktionsgefäße 1,5 ml (Sarstedt)
- TC-Flaschen steril (Sarstedt)
- *Tubes* 15 ml (Sarstedt)

2.1.2.2 Durchführung

Für das Passagieren von Zelllinien gibt es für adhärente Zellen und Suspensionszellen unterschiedliche Vorgehensweisen. Adhärente Zellen werden zunächst mit einem Phosphatpuffer (PBS) gewaschen. Das PBS wird nur einmal kurz über den Zellrasen geschwenkt und direkt wieder verworfen. Im Anschluss wird *Accutase*, ein Enzym zum Abbau von Zellverbindungen, zu den Zellen gegeben um diese vom Boden der Zellkulturflasche abzulösen. Die Zellkulturflasche wird für 3 min bei 37 °C und 5 % CO₂-Gehalt inkubiert. Die Zellen erhalten durch die Behandlung mit *Accutase* eine kugelförmige Gestalt. Durch leichtes klopfen der Zellkulturflasche kann das Ablösen der Zellen verbessert werden. Um die *Accutase* zu inhibieren wird Kulturmedium hinzugegeben. Die Zellsuspension wird in ein 15 ml *Tube* überführt und bei 80 x g für 3 min zentrifugiert. Der Überstand wird abgenommen und verworfen. Das Zellpellet wird in 5 ml Kulturmedium resuspendiert. Für die Zellzählung mittels CASY TT werden 70 µl der Zellsuspension verwendet. Dabei wird sowohl die Gesamtzellzahl als auch der Anteil an lebenden und toten Zellen sowie der Anteil an Zelldebris

ermittelt. Für die Aussaat in der nächsten Passage kann folgende Formel herangezogen werden:

$$V_{\text{Zellsuspension}} = \frac{\text{benötigte Zellzahl}}{\text{Gesamtzellzahl}} * \text{benötigte(s) Volumen/Fläche}$$

Für adhärenente Zellen ist die Fläche, auf der die Zellen wachsen können der limitierende Faktor. Das Volumen an Kulturmedium ist somit nicht festgelegt, es wird sich dabei an den Werten aus Tabelle 2.7 orientiert. Das gewählte Volumen wird in der Kulturflasche vorgelegt und das ermittelte Volumen an Zellsuspension hinzugegeben. Die Kulturflaschen inkubieren bis zur nächsten Passage bei 37 °C und 5 % CO₂-Gehalt. Die Aussaatdichte ist abhängig von dem jeweiligen Zelltyp und dem Zeitraum bis zur nächsten Passagierung bzw. zur Ernte der Zellen. Die Zellen werden in T25, T75 oder T175 Kulturflaschen ausgesät.

Tabelle 2.7 Übersicht der zu verwendenden Volumina in den T-Kulturflaschen

Die nachfolgende Tabelle zeigt die Volumina für PBS und *Accutase* sowie das benötigte Volumen an Kulturmedium um die *Accutase* zu inhibieren. Des Weiteren kann das Volumen des Kulturmediums für die Aussaat der Zellen entnommen werden. Die Volumina sind für T25, T75 und T175 Kulturgefäße dargestellt.

Gefäß \ Schritt	Waschen	Ablösen	Inhibieren bzw. Aufnehmen	Aussat
	PBS [ml]	<i>Accutase</i> [ml]	Kulturmedium [ml]	Kulturmedium
T25	3	1	5	5-8
T75	5	2	7-8	12-18
T175	10	3	10	25-40

Für Suspensionszellen ist das Passagieren weit weniger aufwändig. Es können direkt aus der laufenden Kultur 70 µl Zellsuspension entnommen werden und damit die Zellzählung am CASY TT durchgeführt werden. Dabei wird nach demselben Prozedere wie bei adhärenenten Zellen vorgegangen. Für Suspensionszellen ist das Volumen an Kulturmedium entscheidend und nicht die Fläche des Kulturgefäßes. Nach der Zellzählung wird das für die Aussaat ermittelte Volumen vorgelegt und das nötige Volumen an Zellsuspension hinzugegeben. Es ist keine Zentrifugation der Zellen nötig, da es sogar von Vorteil ist einen Teil des alten Mediums

mitzuführen. Dieses enthält bereits von den Zellen abgesonderte Botenstoffe, welche das Wachstum der Zellen verbessert.

2.1.3 Einfrieren von Zellen

2.1.3.1 Geräte

- -80 °C *Freezer* (Hera Safe)
- CASY TT (Schärfe System)
- CryoMed (Thermo Fischer Scientific)
- Mikroplatten Schüttler (Heidolph)
- Mr. Frosty (Thermo Fischer Scientific)
- Sterilwerkbank (Hera Safe)
- Stickstofftank Chronos (Messer)
- Zentrifuge (Beckmann)

2.1.3.2 Verbrauchsmaterialien und Chemikalien

- *Cryovials* 1,8 ml (Thermo Scientific)
- Kryomedien (siehe Tabelle 2.4 -2.6)
- Reaktionsgefäße 1,5 ml (Sarstedt)
- Serologische Pipetten (Sarstedt)
- *Tubes* 15 ml (Sarstedt)

2.1.3.3 Durchführung

Für das Einfrieren und die spätere Langezeitlagerung von Zellen, sollten sich diese zum Zeitpunkt des Einfrierens in einer exponentiellen Wachstumsphase befinden. Die Zellen werden zunächst ebenso behandelt wie in Kapitel 2.1.2 beschrieben. Nach dem Zählen der Zellen mittels CASY TT wird die benötigte Menge an Medium, FBS und DMSO berechnet. Üblicherweise werden $1\text{E}+07 \frac{\text{c}}{\text{vial}}$ in 1,8 ml eingefroren. Bei der Zugabe von DMSO zu den anderen beiden Komponenten entsteht Wärme. Daher werden die Zellen erst zum Schluss hinzugegeben um zellschädigende Effekte zu vermeiden. Das DMSO wirkt als Gefrierschutzmittel indem es in die Zellen diffundiert und dort die Bildung von großen Eiskristallen verhindert. Während des Einfrierprozesses wird die Temperatur kontrolliert mit $1 \frac{^{\circ}\text{C}}{\text{min}}$ im CryoMed reduziert.

Für die Versuche mit einem reduzierten Volumen wird vom üblichen Prozedere abgewichen und die Zellen in einem Volumen von 200 μl eingefroren. Es werden

auch hier $1E+07 \frac{c}{vial}$ eingefroren. Als Einfriermethode dient hier Mr. Frosty®. Hierbei handelt es sich um einen Kunststoffbehälter, welcher einen mit Isopropan befüllten Mantel besitzt. In einem Behälter können bis zu 18 *Cryovials* gleichzeitig eingefroren werden. Ein Mr. Frosty® Gefrierbehälter lässt die *Vials* mit einer Kühlrate von $1 \frac{°C}{min}$ abkühlen. Die abgefüllten *Cryovials* werden in den Behälter und dieser für mindestens 4 h in den -80 °C Eisschrank gestellt. Die *Vials* werden bis zu ihrer weiteren Verwendung im -80 °C Eisschrank gelagert.

Eine weitere Einfriervariante stellen die Cryo-Platten (CP) dar. Bei dieser Variante werden die Zellen direkt in einer 96-well Platte eingefroren. Die Zellsuspension wird so mit Kryomedium angesetzt, dass 10 µl der Suspension $7E+04$ Zellen entsprechen. Dies entspricht der im Biokompatibilitätsnachweis verwendeten Einsaatdichte. Die Zellsuspension wird in die *wells* pipettiert und die Platten im Anschluss kurz auf einem Mikroplatten Schüttler gestellt. Zum Einfrieren werden die Platten für mindestens 4 h in einen -80 °C Eisschrank auf ein von Eis befreites Regalblech gestellt. Die Platten verbleiben zur weiteren Lagerung im -80 °C Eisschrank.

2.1.4 Auftaukontrolle

2.1.4.1 Geräte

- CASY TT (Schärfe System)
- Stickstofftank Chronos (Messer)
- Wasserbad (GFL)
- Sterilwerkbank (Hera Safe)

2.1.4.2 Verbrauchsmaterialien und Chemikalien

- *Cryovials* 1,8 ml (Thermo Scientific)
- Reaktionsgefäße 1,5 ml (Sarstedt)
- Serologische Pipetten (Sarstedt)
- TC-Flache steril (Sarstedt)

2.1.4.3 Durchführung

Die Auftaukontrolle dient zur Qualitätsüberprüfung der produzierten Zellcharge. Zu diesem Zweck wird ein *Cryovial* aus dem Lagertank entnommen und für 2 min im 37 °C Wasserbad aufgetaut. Das *Vial* wird aus dem Wasserbad entnommen,

trockengewischt, mit 70 % Ethanol besprüht und unter die Sterilwerkbank gebracht. Ein Aliquot von ca. 70 µl wird aus dem *Vial* entnommen und die Zellzahl mit dem CASY TT bestimmt. Es werden 2E+06 Zellen aus dem *Cryovial* entnommen und in eine T25 Flasche mit 5 ml Kulturmedium überführt. Die T-Flasche wird für 24 h bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert.

Nach Ablauf der 24 h wird die T25-Flasche mikroskopisch auf Sterilität überprüft und ein Foto der Zellen gemacht. Die T-Flasche wird für weitere 72 h unter gleichen Bedingungen inkubiert. Anschließend wird erneut auf Sterilität geprüft und ein Foto der Zellen gemacht.

2.1.5 Proliferative Capacity Assay

2.1.5.1 Geräte

- CASY TT (Schärfe-System)
- Inkubator 37 °C mit 5 % CO₂ (Thermo Scientific)
- Mikroplattenreader Safire 2 (Tecan)
- Sterilwerkbank (Hera Safe)
- Stickstofftank Chronos (Messer)
- Mikroplatten Schüttler (Heidolph)
- Wasserbad (GFL)

2.1.5.2 Verbrauchsmaterialien und Chemikalien

- 96-well Platte (Eppendorf)
- *Cryovials* 1,8 ml (Thermo Scientific)
- *Dulbecco's Phosphate Buffered Saline* (Sigma Aldrich)
- Reaktionsgefäße 1,5 ml (Sarstedt)
- Resazurinlösung 400 µM (Sigma Aldrich)
- Serologische Pipetten (Sarstedt)
- TC-Flasche steril (Sarstedt)

2.1.5.3 Durchführung

Der *Proliferative Capacity Assay* (PCA) ist eine Analyse, um die Qualität von eingefrorenen Zellen hinsichtlich ihrer Proliferationskapazität nach dem Auftauen zu kontrollieren. Während der Zellernte werden Zellen in eine T75 Flasche ausgesät, welche im PCA später als Kontrolle dient. Es können auch Zellen aus

einer laufenden Kultur als Kontrolle genutzt werden. Die Zellen dürfen maximal eine Konfluenz von 90 % aufweisen. Bei Zeiträumen von mehr als 72 h wird ein Medienwechsel durchgeführt. Ein Passagieren zwischen Einfrieren und Start des PCA sollte vermieden werden.

Der PCA-Assay wird in einer 96-*well* Platte durchgeführt. Die Platte besitzt einen befüllbaren Rand. Dieser wird mit PBS befüllt, um Verdunstungseffekte zu vermeiden. Zum Start des PCA werden die Kontrollzellen wie in Abschnitt 2.1.2 beschrieben abgelöst und mit dem CASY TT gezählt. Adhärenz Zellen werden mit $1\text{E}+04 \frac{\text{c}}{\text{well}}$ und Suspensionszellen mit $1\text{E}+05 \frac{\text{c}}{\text{well}}$ eingesät. Es werden je *well* 200 μl der Suspension eingesät. Je Assay wird eine Spalte (8-fach Bestimmung) mit den Kontrollzellen ausgesät.

Ein *Vial* der kryokonservierten Zellen wird im 37 °C Wasserbad aufgetaut und mit Kulturmedium auf $1\text{E}+05 \frac{\text{c}}{\text{ml}}$ für adhärenz Zellen bzw. $1\text{E}+06 \frac{\text{c}}{\text{ml}}$ für Suspensionszellen eingestellt. Die dafür erforderliche Zellzahl wird aus der Auftaukontrolle (Abschnitt 2.1.4) übernommen. Es wird für jede Probe eine 8-fach Bestimmung durchgeführt. Es werden je *well* 200 μl der Zellsuspension eingesät. Die Platte wird für 72 h bei 37 °C und 5 % CO₂ im Zellinkubator inkubiert.

Stichprobenartig werden einige *wells* mikroskopisch kontrolliert. Die Zellen sollten die für sie typische Morphologie aufweisen und noch nicht konfluent sein. Es darf keine Kontamination vorliegen. Zu jedem *well* werden 20 μl Resazurinlösung pipettiert. Die Platte wird für 4 h bei 37 °C und 5 % CO₂ im Zellinkubator inkubiert.

Die Aktivitätsbestimmung erfolgt über die Fluoreszenz (540_{Ex}/590_{Em}).

Für die Auswertung wird der Mittelwert aus der 8-fach Bestimmung berechnet und die *Proliferative Capacity* (PC) wie folgt berechnet:

$$PC = \frac{MW_{\text{Probe}}}{MW_{\text{Kontrolle}}} \cdot 100 \%$$

2.2 Biokompatibilitäts-Assay

2.2.1 Zytotox-Assay

2.2.1.1 Geräte

- Inkubator 37 °C mit 5 % CO₂ (Thermo Scientific)
- Lichtmikroskop (Leica)
- Mehrkanalpipette (Eppendorf)
- Mikroplattenreader Safire 2 (Tecan)
- Mikroplatten Schüttler (Heidolph)
- Stickstofftank Chronos (Messer)
- Wasserbad (GFL)
- Zentrifuge (Beckmann)

2.2.1.2 Verbrauchsmaterialien und Chemikalien

- 400 µM Resazurinlösung
- 96-*well* Platten
- *Cryovials* 1,8 ml (Thermo Scientific)
- L-929 Kulturmedium (siehe Tabelle 2.1)
- Reaktionsgefäße 1,5 ml (Sarstedt)
- Serologische Pipetten (Sarstedt)
- *Tube* 15 ml (Sarstedt)

2.2.1.3 Durchführung

Es wird ein *Cryovial* L-929 Zellen aus dem Stickstofftank entnommen und für 2 min bei 37 °C im Wasserbad aufgetaut. In dieser Zeit werden in ein 15 ml *Tube* 8 ml vorgewärmtes L-929 Kulturmedium vorgelegt. Die aufgetaute Zellsuspension wird zum Waschen in das *Tube* überführt und anschließend bei 80 x g für vier Minuten zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das Zellpellet in 13 ml Kulturmedium resuspendiert. Dies entspricht bei einem Aussaatvolumen von 80 µl und einer Aussaatdichte von $7E+04 \frac{c}{well}$.

Der Assay wird auf einer 96-*well* Platte durchgeführt. Die Lösung der Referenzsubstanz wird 1:1 mit der Zellsuspension im *well* gemischt. Für die Durchführung wurden 80 µl Zellsuspension mit 7E+04 Zellen pro *well* vorgelegt und im Anschluss 80 µl der Verdünnungen wie in Abbildung 2.1 (Seite 28)

hinzugegeben. Um den Verdünnungseffekt auszugleichen werden die Referenzlösungen zweifach konzentriert angesetzt. Zur Bestimmung der Zellvitalität werden nach 24 h Inkubation bei 37 °C und 5 % CO₂, 20 µl einer 400 µM Resazurinlösung zu den Zellen gegeben. Die Platte wird erneut für 4 h inkubiert und anschließend in einem Mikroplattenreader vermessen (560_{Ex}/ 590_{Em}).

2.2.2 Extraktion des Referenzmaterials

2.2.2.1 Geräte

- Analysenwaage (Satorius)
- Büroscheren (Staples)
- Inova 4000 Inkubationsschüttler (New Brunswick Scientific)

2.2.2.2 Verbrauchsmaterialien und Chemikalien

- L-929 Kulturmedium (siehe Tabelle 2.1)
- Penicillin/Streptomycin (Sigma Aldrich)
- RM-A ZDEC Polyurethane Film (Hatano Research Institute)
 - Lot. A-162K
 - Lot. A-173K
- RM-B ZDBC Polyurethane Film (Hatano Research Institute)
 - Lot. B-171K
 - Lot. B-172K
- RM-C High Density Polyethylene Film (Hatano Research Institute)
 - Lot. C-141
 - Lot. C-161
- Serologische Pipetten (Sarstedt)
- *Tubes* 50 ml (Sarstedt)

2.2.2.3 Durchführung

Für diese Arbeit werden zwei verschiedene Varianten des Referenzmaterials (RM) verwendet. Bei den Lot.-Nummern A-162K, B171K und C-141 ist das Material bereits in 2x15 mm große Stifte vorgeschnitten. Für die weiteren Lot.-Nummern liegt das Referenzmaterial als eine 10x15 cm Platte (RM-A/RM-B) bzw. als fünf 3x10 cm Platten (RM-C) vor. Dies führt zu unterschiedlichen Vorbereitungen des Materials.

Die DIN-ISO 10993-12 sieht vor, dass die Extrakte des Referenzmaterials eine Konzentration von 3 cm²/ml aufweisen. Das bedeutet für die in stiftform vorliegenden RM, dass 5 Stifte einer Fläche von 3 cm² entsprechen, da sowohl die Vorderseite als auch Rückseite des Materials in die Gesamtfläche eingehen. Um den Extraktansatz zu vereinfachen werden jeweils 20 Stifte abgezählt und gewogen. Basierend auf diesem Gewicht wird die Einwaage hochgerechnet. Die abgewogenen Stücke werden in ein 50 ml *Tube* gegeben und mit der entsprechenden Menge an Kulturmedium inkl. 1 % Penicillin/Streptomycin versehen.

Das Material in Plattenform wird auf kariertes Papier gelegt und das entsprechende Stück mit Hilfe eines Skalpell angegritzt. Entlang dieser Markierung wird das Stück ausgeschnitten. Das herausgeschnittene Stück RM wird anschließend in kleinere Stücke zerschnitten und in einem 50 ml *Tube* mit der entsprechenden Menge an Kulturmedium inkl. 1 % Penicillin/Streptomycin versehen.

Die so präparierten RM werden für 24 h ± 2 h bei 37 °C in einem Inkubationsschüttler mit Kippgestell bei 200 rpm inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wird das Medium vom Referenzmaterial getrennt und für die weitere Verwendung genutzt bzw. bei -20 °C gelagert.

2.2.3 Erstellen der Verdünnungsreihe und Start des Assays

2.2.3.1 Geräte

- Inkubator 37 °C mit 5 % CO₂ (Thermo Scientific)
- Lichtmikroskop (Leica)
- Mehrkanalpipette (Eppendorf)
- Mikroplattenreader Safire 2 (Tecan)
- Mikroplatten Schüttler (Heidolph)
- Stickstofftank Chronos (Messer)
- Wasserbad (GFL)
- Zentrifuge (Beckmann)

2.2.3.2 Verbrauchsmaterialien und Chemikalien

- 96-well Platten
- *Cryovials* 1,8 ml (Thermo Scientific)
- L-929 Kulturmedium (siehe Tabelle 2.1)

- Penicillin/Streptomycin (Sigma Aldrich)
- Phenazinmethosulfat-Lösung 10 mM (Sigma Aldrich)
- Reaktionsgefäße 1,5 ml (Sarstedt)
- Serologische Pipetten (Sarstedt)
- *Tube* 15 ml (Sarstedt)
- XTT- Lösung $1 \frac{\text{mg}}{\text{ml}}$ (Sigma Aldrich)

2.2.3.3 Durchführung

Zu Beginn werden die 96-*well* Platten vorbereitet. Die Platten besitzen einen befüllbaren Rand, welcher mit 5 ml PBS zum Schutz vor Verdunstungseffekten befüllt wird. Das Kulturmedium wird mit 1 % Penicillin/Streptomycin versehen, um den Assay auch unter nicht sterilen Bedingungen durchführen zu können.

Im Anschluss wird ein *Cryovial* L-929 Zellen aus dem Stickstofftank entnommen und für 2 min bei 37 °C im Wasserbad aufgetaut. In dieser Zeit werden in ein 15 ml *Tube* 8 ml vorgewärmtes L-929 Kulturmedium vorgelegt. Die aufgetaute Zellsuspension wird zum Waschen in das *Tube* überführt und anschließend bei 80 x g für vier Minuten zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das Zellpellt in 13 ml Kulturmedium resuspendiert. Dies entspricht bei einem Aussaatvolumen von 80 µl und einer Aussaatdichte von $7E+04 \frac{\text{c}}{\text{well}}$. Die Zellen werden nach folgendem Pipettierschema auf die Platte gebracht:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A		C10	C9	C8	C7	C6	C5	C4	C3	C2	C1	
B		C10	C9	C8	C7	C6	C5	C4	C3	C2	C1	
C		C10	C9	C8	C7	C6	C5	C4	C3	C2	C1	
D		C10	C9	C8	C7	C6	C5	C4	C3	C2	C1	
E		C10	C9	C8	C7	C6	C5	C4	C3	C2	C1	
F		C10	C9	C8	C7	C6	C5	C4	C3	C2	C1	
G		C10	C9	C8	C7	C6	C5	C4	C3	C2	C1	
H		C10	C9	C8	C7	C6	C5	C4	C3	C2	C1	

Abbildung 2.1 Pipettierschema für den Biokompatibilitäts-Assay

In die Reihen B-G werden je *well* 80 µl der Zellsuspension pipettiert. Dies entspricht einer Zelldichte von $7E+04 \frac{\text{c}}{\text{well}}$. Die Reihen A und H werden nicht mit Zellen versehen, sie dienen als Nullwerte der Referenzmaterialextrakte. Die Spalten 1 und 12 werden lediglich mit Medium versehen und dienen als Referenz zu den Extrakten. Die Extrakte werden in den Spalten 2-11 von C10 (geringste Konzentration) bis C1 (höchste Konzentration) aufgetragen.

Auf einer Platte werden zwei Substanzen bestimmt. Die erste Substanz in den Reihen A-D und die zweite in den Reihen E-H. Für drei Substanzen werden zwei Platten benötigt, hier Platte A und Platte B. Es werden je 80 µl der Zellsuspension in die *wells* der Reihen B-G von Platte A sowie in die Reihen B-D von Platte B pipettiert. Die Reihen A und H bleiben zellfrei und dienen als Nullwert für die Extraktlösungen. Jede Verdünnung wird als Triplikat auf die Platte gebracht. Zur Auswertung wird der Mittelwert des Triplikats gebildet. Die Platte B wird nur zur Hälfte genutzt, da die untere Hälfte im späteren Produkt für die Testsubstanz vorgesehen ist. Daher werden die *wells* der Reihen E-H der Platte B mit 80 µl PBS gefüllt. Die mit der Zellsuspension versehenen Platten kommen für 1 h bei 37 °C und 5 % CO₂ in den Inkubator um zu adhären.

In dieser Zeit werden die Verdünnungsreihen für die drei Referenzmaterialien angesetzt. Für RM-A und RM-C wird eine 1:1,5 und für RM-B eine 1:1,25 Verdünnungsreihe angesetzt.

Tabelle 2.8 Verdünnungsreihen für die Referenzmaterialien

Die nachfolgende Tabelle zeigt die Verdünnungsreihen der Referenzmaterialien RM-A, RM-B und RM-C sowie sie nach der Optimierung des Assays angesetzt werden. Die Konzentration jeder Verdünnung ist in $\frac{\text{cm}^2}{\text{ml}}$ dargestellt.

	Konzentration in $\frac{\text{cm}^2}{\text{ml}}$		
Verdünnung	RM-A	RM-B	RM-C
C1	3,00E+00	3,00E+00	3,00E+00
C2	2,00E+00	2,40E+00	2,00E+00
C3	1,33E+00	1,92E+00	1,33E+00
C4	8,89E-01	1,54E+00	8,89E-01
C5	5,93E-01	1,23E+00	5,93E-01
C6	3,95E-01	9,83E-01	3,95E-01
C7	2,63E-01	7,86E-01	2,63E-01
C8	1,76E-01	6,29E-01	1,76E-01
C9	1,17E-01	5,03E-01	1,17E-01
C10	7,80E-02	4,03E-01	7,80E-02

Nach der Inkubationszeit wird unter dem Lichtmikroskop geprüft, ob die Zellen ausreichend adhären sind. Im Anschluss wird das Medium von den adhären Zellen abgenommen und verworfen. Es werden wie in Abbildung 2.1 je 80 µl der Extraktverdünnungen auf die Zellen gegeben. Die Platten werden für 24 h bei 37 °C und 5 % CO₂ im Inkubationsschrank inkubiert.

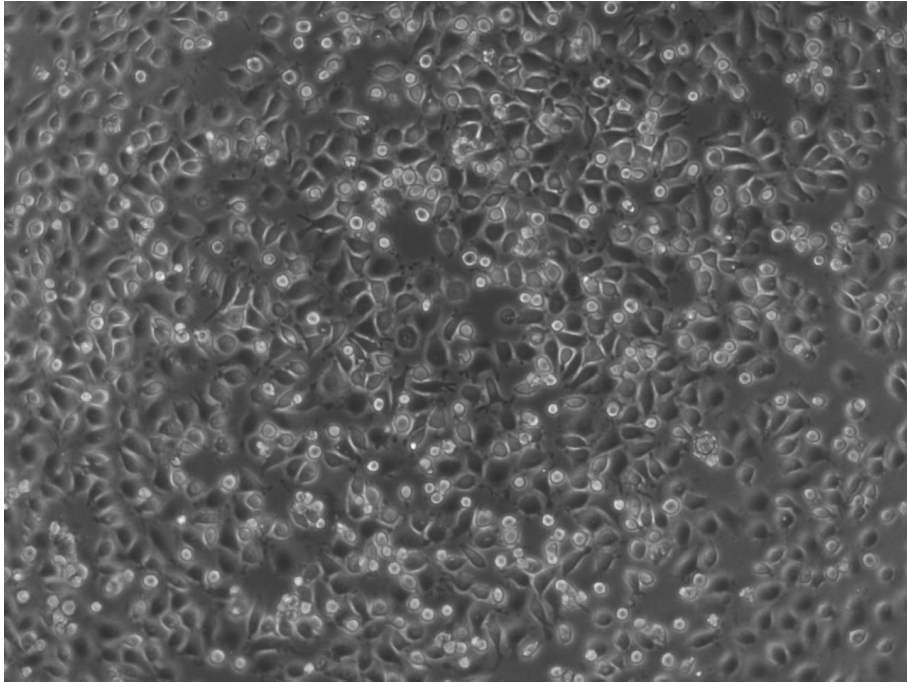


Abbildung 2.2 L-929 Zellen nach einer Stunde Inkubationszeit im well

Der Ausschnitt zeigt den mittlere Bereich eines *well*s mit L-929 Zellen nach einer Stunde Inkubationszeit. Es ist zu erkennen, dass die Zellen bereits an den Boden des *well*s angewachsen sind und anfangen ihre typische Morphologie auszubilden. Das Bild wurde mit einer 100-fachen Vergrößerung und Phasenkontrast aufgenommen (Bild: Focke L. 2018).

4 ml XTT-Lösung werden mit 10 μ l PMS-Lösung versetzt. Nach Ablauf der Inkubationszeit werden zu jedem *well* 20 μ l der XTT-Lösung direkt in den Extrakt gegeben. Die Platte wird kurz auf einen Mikroplattenschüttler gestellt um die Lösung optimal im *well* zu verteilen. Die so präparierten Platten werden erneut für 4 h bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert.

Zur Auswertung des Assays werden die Platten fotometrisch vermessen. Das XTT wird während der 4 h Inkubation, von den lebenden Zellen, zu einem stark orange leuchtenden Formazansalz umgesetzt. Es wird die optische Dichte (OD) bei 480 nm ermittelt, zeitgleich wird ebenfalls bei einer Referenzwelllänge von 690 nm gemessen. Zur Unterdrückung des Untergrunds der Messung, wird dieser Wert von der OD bei 480 nm abgezogen. Die weitere Auswertung der Messwerte wird mit dem Programm *Prism 7* der Firma *GraphPad* durchgeführt. Mit diesem Programm kann eine nicht lineare Regression erstellt und so der IC₅₀-Wert für die RM bestimmt werden.

2.3 Statistische Auswertung

Für die Auswertung eines Bioassays bedarf es reproduzierbarer Ergebnisse. Mit den Verdünnungsreihen für RM-A und RM-B werden die Zellen stimuliert. Das konzentrationsabhängige Antwortsignal wird über eine nicht lineare Regression ausgewertet. Mit Hilfe der Regression kann der IC50-Wert berechnet werden. Der IC50-Wert gibt die mittlere inhibitorische Konzentration an, das heißt ab welcher Konzentration eines Stoffes eine Inhibition von 50 % erreicht wird.

Als weiteres Kriterium der Güte eines Assays wird der Z-Faktor ermittelt.

$$Z = 1 - \frac{3\sigma_P + 3\sigma_K}{|\mu_P - \mu_K|}$$

- σ_P = Standardabweichung der Probe
- σ_K = Standardabweichung der Kontrolle
- μ_P = Mittelwert der Probe
- μ_K = Mittelwert der Kontrolle

Der Z-Faktor verdeutlicht wie gut die Werte innerhalb eines Assays voneinander getrennt sind. Der Z-Faktor nimmt einen Wert zwischen 0 und 1 an. Ein Z-Faktor von 1 ist das ideale Ergebnis. Je näher der Wert an 1 liegt, desto höher ist die Güte des durchgeführten Assays. Für alle Werte $Z > 0,5$ gilt das Ergebnis als exzellent (Zhang *et al.* 1999).

3 Ergebnisse

3.1 Etablierung der Referenzmaterialien

Für diese Arbeit wurde auf dem bereits etablierten Zytotox-Assay der Firma acCELLerate GmbH aufgebaut. Der Zytotox-Assay verwendet die Substanzen Glycerol, Antipyrin und Natriumselenit als Referenzsubstanzen. Gemäß der ISO-Norm 10993 werden für den Biokompatibilitäts-Assay die Referenzmaterialien RM-A, RM-B und RM-C vorgeschrieben. Die Versuche werden mit *Assay Ready Cells* (ARC) durchgeführt.

Zur Etablierung der Referenzmaterialien RM-A, RM-B und RM-C wurde daher zunächst ein zweifach konzentrierter Extrakt mit einer Konzentration von $6 \frac{\text{cm}^2}{\text{ml}}$ hergestellt. Aus diesen Extrakten wurde jeweils eine 1:2 Verdünnungsreihe angesetzt.

Tabelle 3.1 Verdünnungsreihe zur Etablierung der Referenzmaterialien

Die nachfolgende Tabelle zeigt die Verdünnungsreihe für die Etablierung der Referenzmaterialien RM-A, RM-B und RM-C. Die Konzentration jeder Verdünnung ist in $\frac{\text{cm}^2}{\text{ml}}$ dargestellt.

	Konzentration in $\frac{\text{cm}^2}{\text{ml}}$		
Verdünnung	RM-A	RM-B	RM-C
C1	6,00E+00	6,00E+00	6,00E+00
C2	3,00E+00	3,00E+00	3,00E+00
C3	1,50E+00	1,50E+00	1,50E+00
C4	7,50E-01	7,50E-01	7,50E-01
C5	3,75E-01	3,75E-01	3,75E-01
C6	1,88E-01	1,88E-01	1,88E-01
C7	9,38E-02	9,38E-02	9,38E-02
C8	4,69E-02	4,69E-02	4,69E-02
C9	2,34E-02	2,34E-02	2,34E-02
C10	1,17E-02	1,17E-02	1,17E-02

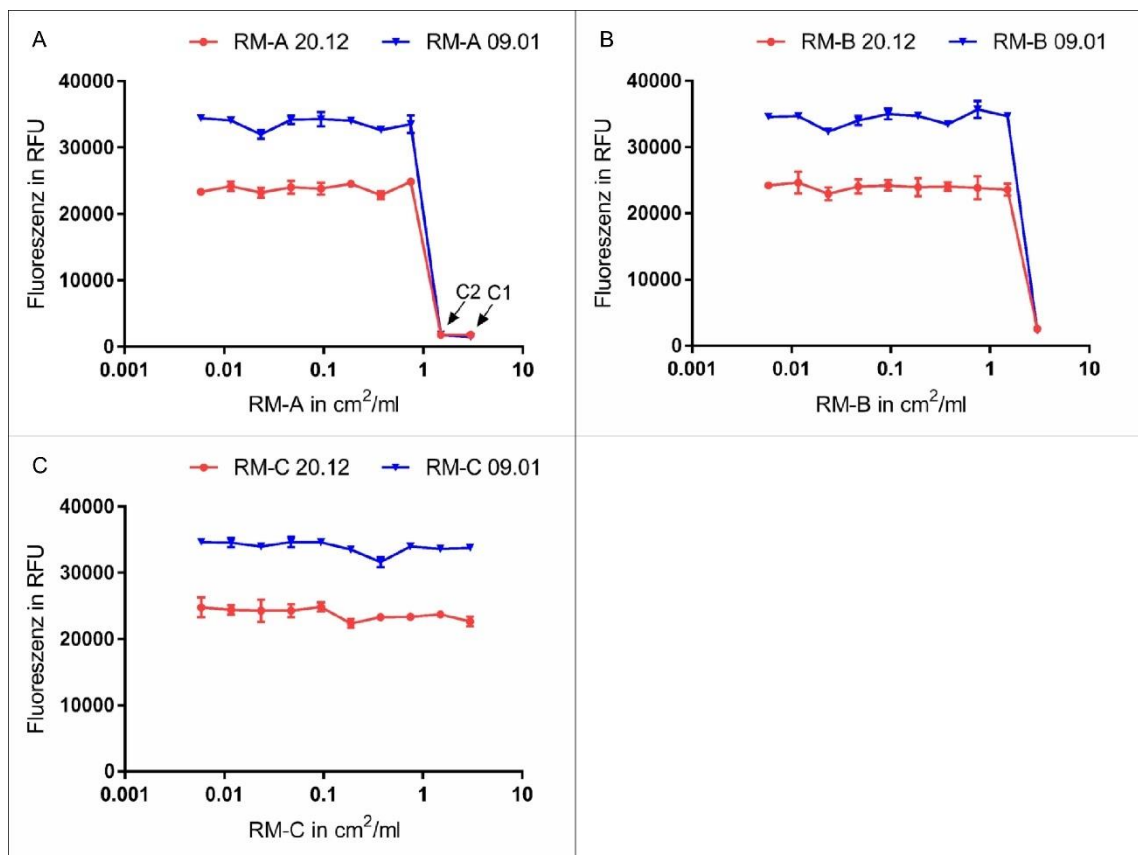


Abbildung 3.1 Doppelbestimmung zur Etablierung der Referenzmaterialien

Die Abbildung zeigt die Verläufe der Verdünnungsreihen für die Referenzmaterialien RM-A, RM-B und RM-C. Es sind zwei unabhängige Experimente dargestellt. RM-A zeigt in C1 und C2 (schräger Pfeil) einen toxischen Effekt auf die ARC, RM-B nur in C1. RM-C ist die Negativkontrolle und zeigt keinen toxischen Effekt. Zwischen den Experimenten ist ein deutlicher Unterschied in der maximalen Fluoreszenz zu erkennen.

In Abbildung 3.1 sind zwei unabhängige Experimente dargestellt. Es wurde für jedes RM eine Kurve der Verdünnungsreihe aufgenommen. In Bild A ist der Verlauf der Verdünnungsreihe von RM-A dargestellt. Es ist zu erkennen, dass sich in beiden Experimenten die Verdünnungen C1 und C2 auf demselben niedrigen Niveau befinden. In diesen beiden *wells* konnten keine lebenden Zellen mehr ermittelt werden (stark toxischer Bereich). Die Verdünnungen C3 -C10 befinden sich alle auf einem ähnlichen Niveau. Hier konnte kein toxischer Effekt des RM-Extraktes auf die Zellen mehr festgestellt werden.

Bild B zeigt den Verlauf der Verdünnungsreihe von RM-B. Hier zeigt lediglich C1 in beiden Experimenten einen stark toxischen Effekt auf die Zellen. Die

Verdünnungen C2-C10 liegen für beide Experimente auf einem ähnlichen Niveau, es konnte keine toxische Wirkung des Extraktes festgestellt werden. Bild C zeigt den Verlauf der Verdünnungsreihe von RM-C. Da es sich bei RM-C um die Negativkontrolle handelt liegen alle Verdünnungen auf demselben Niveau, im nicht toxischen Bereich.

Zwischen den beiden Experimenten ist ein deutlicher Unterschied in den Fluoreszenzmaxima zu erkennen. Das Experiment 20.12 zeigt ein deutlich geringeres Signal im Vergleich zu dem Experiment 09.01. Für das Experiment 09.01 liegt das Maximum bei ca. 34000 RFU, bei dem Experiment 20.12 liegt das Maximum lediglich bei ca. 25000 RFU. Diese Schwankungen in der maximalen Absorption sollen vermieden werden, um vergleichbare Ergebnisse zu erzielen.

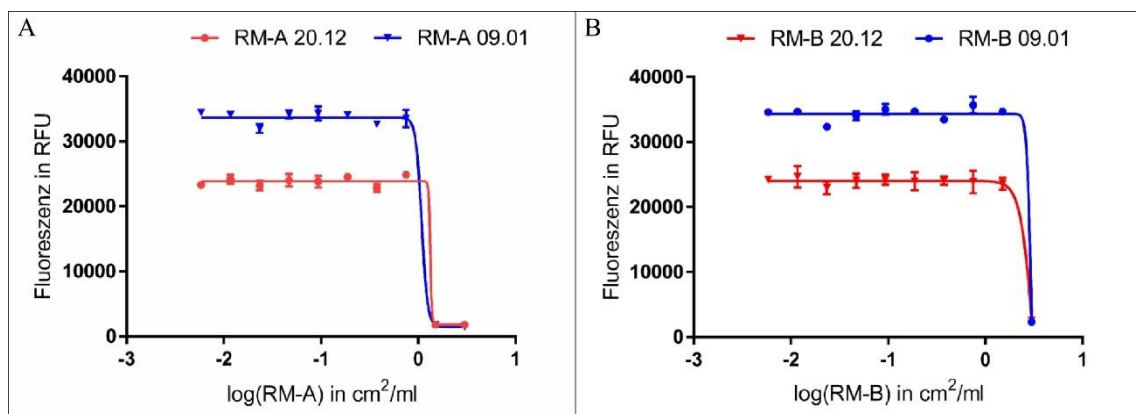


Abbildung 3.2 Etablierung der Referenzmaterialien: Bestimmung des IC50-Werts

Die Abbildung zeigt die nicht lineare Regression für die Verdünnungsreihen von RM-A und RM-B. Es wurde die Fluoreszenz in RFU gegen den dekadischen Logarithmus der Konzentration in $\frac{\text{cm}^2}{\text{ml}}$ aufgetragen. Für beide Substanzen ist in beiden Experimenten ein steiler Abfall vom nicht-toxischen zum toxischen Bereich zu erkennen. Im Bereich zwischen stark toxisch und nicht-toxisch befinden sich keine Punkte.

Tabelle 3.2 Etablierung der Referenzmaterialien: IC50-Wert und Z-Faktor

In der nachfolgenden Tabelle sind die IC50-Werte in $\frac{\text{cm}^2}{\text{ml}}$ für die nicht lineare Regression.

Experiment	IC50-Wert in $\frac{\text{cm}^2}{\text{ml}}$	
	RM-A	RM-B
20.12	1,332	3,220
09.01	1,085	2,937

Die IC50-Werte liegen für die beiden Experimente deutlich auseinander. Für RM-A ist eine Differenz von ca. $0,3 \frac{\text{cm}^2}{\text{ml}}$ zu erkennen. Bei RM-B übersteigt der IC50-Wert für das Experiment 20.12 sogar den Wert des höchsten Standards. Für das Experiment 09.01 ist der IC50-Wert nahezu identisch mit dem höchsten Standard. Da es sich hierbei um ein ungewünschtes Ergebnis handelt, wurde zunächst die Adhärierungszeit der L-929 Zellen optimiert, um dadurch einen direkten Kontakt des Extraktes mit den Zellen zu ermöglichen und eventuell die Testzeit zu verkürzen. Des Weiteren ist es nötig eine andere Verdünnungsstrategie zu wählen, um die Regression für RM-B besser durchführen zu können. Mit nur einem Punkt im stark toxischen Bereich ist es nicht möglich die Regression exakt durchzuführen.

3.2 Optimierung der Adhärierungszeit von L-929 Zellen

Nach der ISO Norm 10993 ist ein direkter Kontakt der Zellen mit dem Medizinprodukt oder einem Extrakt des Medizinproduktes vorgeschrieben. Zu diesem Zweck wurde überprüft wie lange die L-929 Zellen benötigen, um auf einer 96-well Platte anzuwachsen.

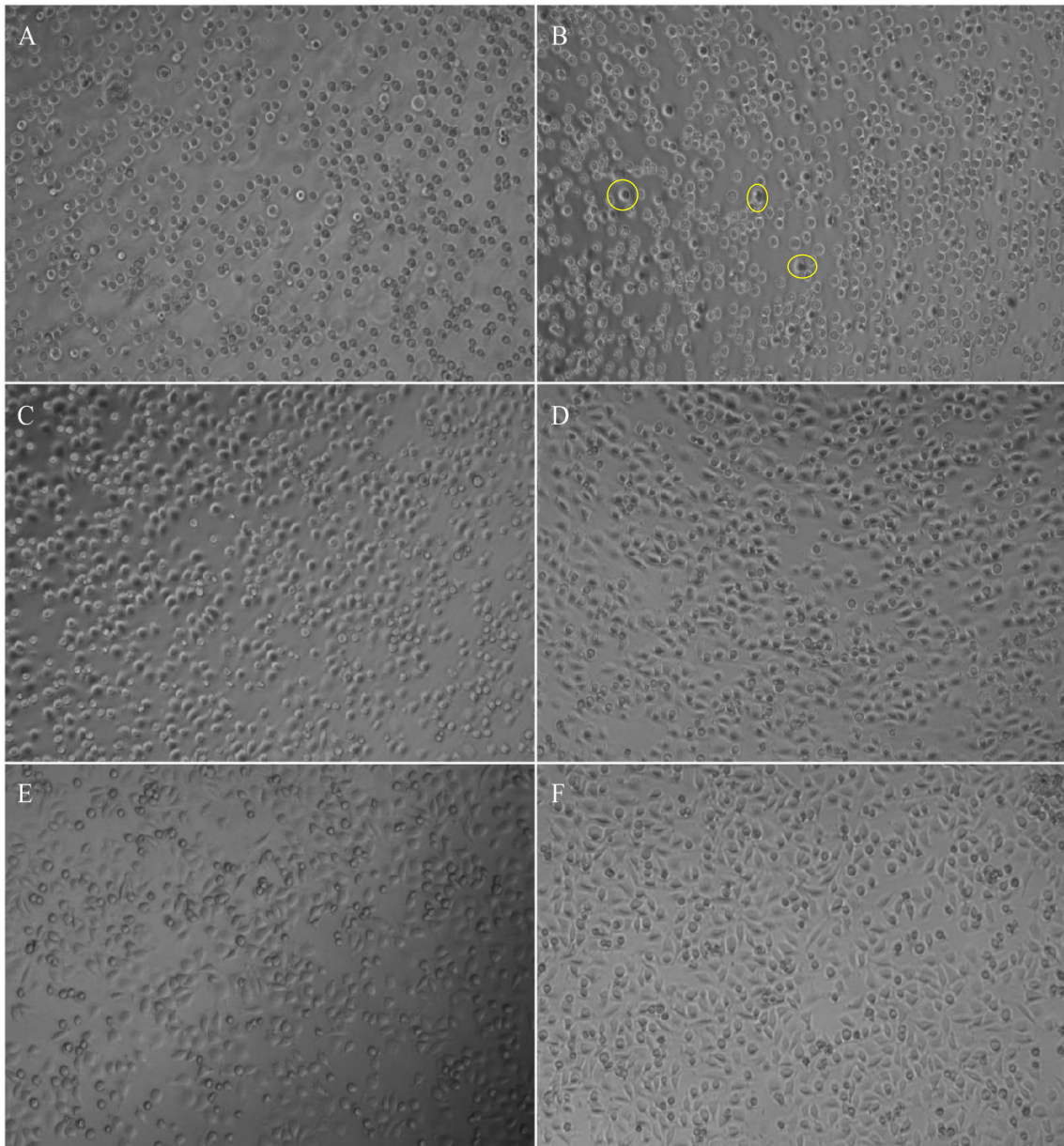


Abbildung 3.3 Bestimmung der Adhärungszeit von L-929 Zellen

Die Abbildung zeigt den Verlauf der Adhärerung von L-929 Zellen in Abständen von 15 min. Bild A zeigt die Zellen zum Start des Versuchs. Die Zellen zeigen durchweg eine rundliche Morphologie. In Bild B beginnen bereits vereinzelt Zellen (gelber Kreis) an den Boden des *well*s anzuwachsen. Auf Bild C ist deutlich zu erkennen, dass fast die gesamten Zellen angefangen haben sich an den Boden des *well*s anzuheften. Bild D zeigt wie die Zellen bereits nach 45 min anfangen ihre typische Morphologie auszubilden. In Bild E und F schreitet diese Entwicklung weiter voran. Die Bilder wurden mit einer 100-fachen Vergrößerung und Phasenkontrast aufgenommen (Bild: Focke L. 2018)

Es wurden Zellen wie in Abschnitt 2.2.3 beschrieben auf die Platte ausgebracht. Für die Kontrolle der Adhäsion wurde in Abständen von 15 min ein Foto von drei *wells* in unterschiedlichen Positionen auf der Platte angefertigt. Bei den Positionen handelt es sich um die *wells* B2, D6 und G10. Es wurde in allen drei *wells* dieselbe Entwicklung festgestellt. Die Abbildung 3.3 zeigt die Adhärerung der Zellen in Abständen von 15 min. Zum Start des Experiments liegen die Zellen alle noch in Suspension vor und haben eine rundliche Morphologie. Bereits nach 15 min fangen vereinzelt Zellen an sich an den Boden des *wells* anzuheften (Bild B). Nach weiteren 15 min ist deutlich zu erkennen, dass fast die gesamten Zellen damit beginnen im *well* anzuwachsen. Nach 45 min beginnen die Zellen mit der Ausbildung der für sie typischen Morphologie (Bild D). In Bild E und F wachsen keine weiteren Zellen mehr an, allerdings wird die Morphologie der adhärenen L-929 Zellen weiter ausgebildet.

Um einen direkten Kontakt der Zellen mit dem Extrakt der Referenzmaterialien zu ermöglichen, wurden zwei Methoden zum Entfernen des Mediums über den Zellen getestet. Zum einen wurde das Medium aus den *wells* ausgeschlagen, zum anderen wurde das Medium mit einer Mehrkanalpipette aus den *wells* abgezogen. Für das Ausschlagen wurde die Platte mit Schwung auf einen Stapel Papiertücher umgedreht und kurz zum Leerlaufen in der Position belassen. Für das Abziehen des Mediums mit der Mehrkanalpipette wurde die Pipette auf 100 µl eingestellt und die Spitzen vorsichtig in eine Ecke des *wells* positioniert, um das Medium langsam abzusaugen.

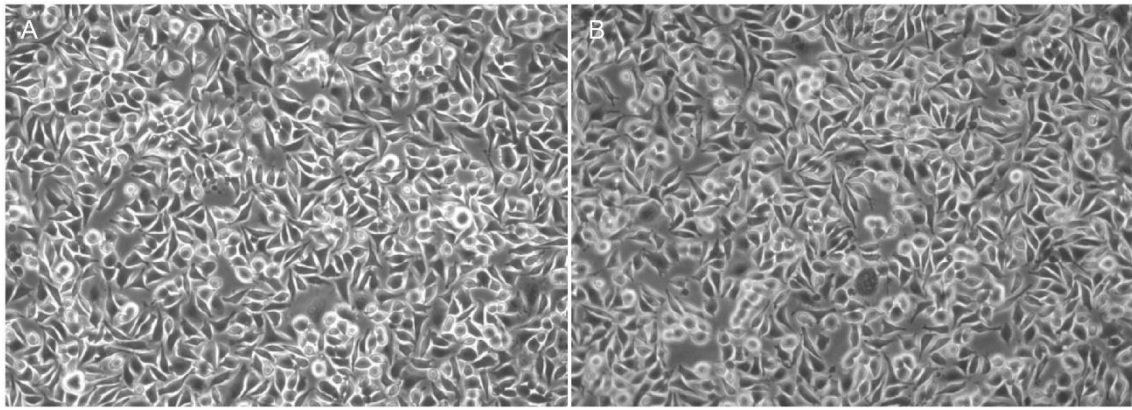


Abbildung 3.4 Vergleich Ausschlagen gegen Abpipettieren des Mediums

Die Abbildung vergleicht die beiden gewählten Methoden zur Entfernung des Mediums über den Zellen. Bild A zeigt Zellen nach dem Abpipettieren des Mediums und Bild B Zellen nach dem Ausschlagen des Mediums. Die Zellen zeigen in beiden Bildern ihre typische Morphologie. Es ist in keinem der Bilder ein Zellverlust oder eine Zellschädigung zu erkennen. Die Bilder wurden mit einer 100-fachen Vergrößerung und Phasenkontrast aufgenommen (Bild: Focke L. 2018).

Die Zellen zeigten nach beiden Methoden dasselbe Bild. Wie in Abbildung 3.4 zu erkennen ist, zeigen die Zellen ihre typische Morphologie und weisen keine Beschädigungen auf. Es ist ebenfalls keine Beschädigung des Zellrasens durch die Pipettenspitzen zu erkennen. Für alle weiteren Versuche wird die Methode des Abpipettierens mit einer Mehrkanalpipette durchgeführt.

3.3 Direkter Kontakt der Zellen mit 100 % Extrakt

Für diese Versuchsreihe wurde für jedes RM gemäß ISO 10993 ein Extrakt mit der Konzentration $3 \frac{\text{cm}^2}{\text{ml}}$ hergestellt. Zudem wurde die Verdünnungsreihe angepasst. Es wurde für jedes RM eine 1:1,5 Verdünnungsreihe hergestellt, um die Verdünnungen besser über den toxischen Bereich zu verteilen und somit eine optimale Regression durchführen zu können.

Tabelle 3.3 Verdünnungsreihe für direkten Zellkontakt mit dem RM-Extrakt

Die nachfolgende Tabelle zeigt die Verdünnungsreihe für den direkten Kontakt der Referenzmaterialien RM-A, RM-B und RM-C mit den Zellen. Die Konzentration ist in $\frac{\text{cm}^2}{\text{ml}}$ angegeben.

	Konzentration in $\frac{\text{cm}^2}{\text{ml}}$		
Verdünnung	RM-A	RM-B	RM-C
C1	3,00E+00	3,00E+00	3,00E+00
C2	2,00E+00	2,00E+00	2,00E+00
C3	1,33E+00	1,33E+00	1,33E+00
C4	8,89E-01	8,89E-01	8,89E-01
C5	5,93E-01	5,93E-01	5,93E-01
C6	3,95E-01	3,95E-01	3,95E-01
C7	2,63E-01	2,63E-01	2,63E-01
C8	1,76E-01	1,76E-01	1,76E-01
C9	1,17E-01	1,17E-01	1,17E-01
C10	7,80E-02	7,80E-02	7,80E-02

Die Zellen wurden wie in Abbildung 2.1 auf die Platte aufgebracht. Nach 1 h Inkubationszeit wurde das Medium über den Zellen abgenommen und die Verdünnungsreihe ebenfalls wie in Abbildung 2.1 hinzugegeben. Zur Auswertung des Versuchs wurden nach 24 h Inkubation zu jedem *well* 20 μl einer 400 μM Resazurinlösung pipettiert. Nach vier weiteren Stunden Inkubation wurde die Platte im Mikroplattenreader vermessen.

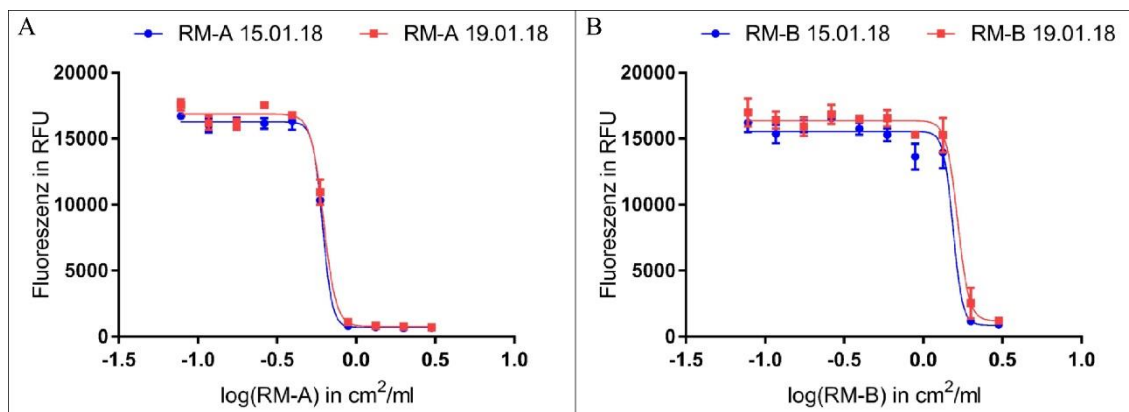


Abbildung 3.5 Direkter Kontakt der Zellen mit 100 % Extrakt

Die Abbildung zeigt die nicht lineare Regression von zwei voneinander unabhängigen Experimenten. Es wurde die Fluoreszenz in RFU gegen den dekadischen Logarithmus der Konzentration in $\frac{\text{cm}^2}{\text{ml}}$ aufgetragen. Bild A zeigt die Verdünnungsreihe für RM-A und Bild B für RM-B. Der Verlauf der Ausgleichsgeraden ist für beide Substanzen nahezu identisch. Durch die angepasste Verdünnungsreihe liegen für RM-A die Verdünnungen C1-C4 im stark toxischen Bereich, C5 liegt im mittleren und die übrigen im nicht toxischen Bereich. Für RM-B liegen die Verdünnungen C1 und C2 im stark toxischen Bereich. Die übrigen Verdünnungen liegen im nicht toxischen Bereich.

Tabelle 3.4 Direkter Extraktkontakt: IC50-Wert und Z-Faktor

In der nachfolgenden Tabelle sind die IC50-Werte in $\frac{\text{cm}^2}{\text{ml}}$ für die nicht lineare Regression sowie die Z-Faktoren dargestellt.

Experiment	IC50-Wert in $\frac{\text{cm}^2}{\text{ml}}$		Z-Faktor	
	RM-A	RM-B	RM-A	RM-B
15.01	0,6136	1,542	0,97	0,88
19.01	0,6226	1,649	0,93	0,83

Für dieses Experiment wurde eine Doppelbestimmung durchgeführt. In Abbildung 3.5 sind die Regressionsverläufe für die beiden unabhängigen Experimente dargestellt. Es ist zu erkennen, dass der Verlauf der Ausgleichsgeraden für beide Experimente nahezu identisch ist. Die IC50-Werte von RM-A und RM-B liegen auf einem ähnlichen Niveau. Für RM-A wurden IC50-Werte

von $0,614 \frac{\text{cm}^2}{\text{ml}}$ und $0,623 \frac{\text{cm}^2}{\text{ml}}$ ermittelt. Für RM-B liegen die Werte bei $1,542 \frac{\text{cm}^2}{\text{ml}}$ und $1,649 \frac{\text{cm}^2}{\text{ml}}$. Die Z-Faktoren der Experimente befinden sich im exzellenten Bereich.

3.3.1 Einfluss einer Sterilfiltration auf den Extrakt

Das Referenzmaterial liegt nicht steril vor. Zur Vermeidung einer Kontamination wurde dem Assaymedium, welches auch zur Extraktion genutzt wurde, zusätzlich 1 % Penicillin/Streptomycin hinzugegeben. Mit diesem Experiment sollte überprüft werden, ob es möglich ist durch eine Sterilfiltration auf den Einsatz von Antibiotikum zu verzichten. Hierfür wurde das Material zunächst wie in Abschnitt 2.2.2 beschrieben extrahiert. Nach der Extraktion wurde der Extrakt durch einen $0,2 \mu\text{m}$ Sterilfilter filtriert und mit diesem Extrakt der Assay durchgeführt. Es wurde für jedes der drei RM eine 1:1,5 Verdünnungsreihe hergestellt.

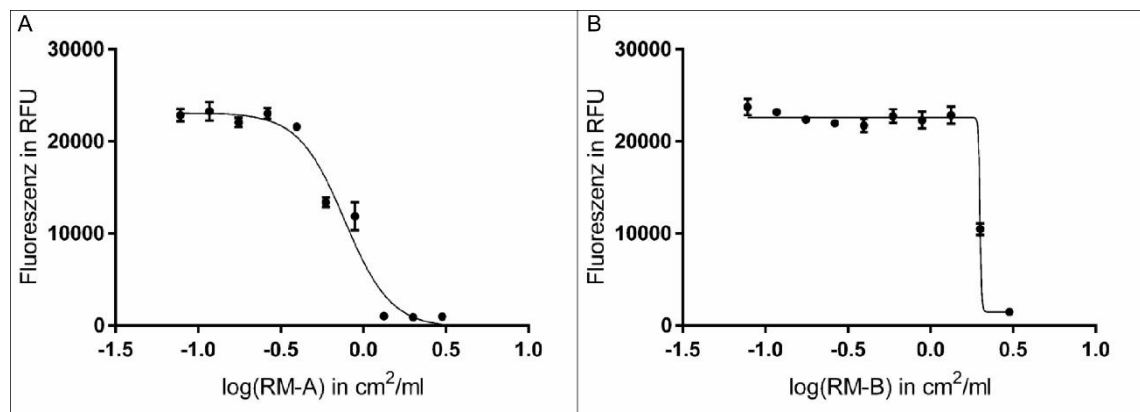


Abbildung 3.6 Einfluss einer Sterilfiltration auf den Extrakt

Die Abbildung zeigt die Regression der Verdünnungsreihen für RM-A und RM-B mit einem sterilfiltrierten Extrakt. Es wurde die Fluoreszenz in RFU gegen den dekadischen Logarithmus der Konzentration in $\frac{\text{cm}^2}{\text{ml}}$ aufgetragen. Für RM-A liegen die Verdünnungen C1-C3 im stark toxischen Bereich. Die Verdünnungen C4 und C5 liegen im mittleren und C6-C10 im nicht toxischen Bereich. Für RM-B liegt C1 im stark toxischen Bereich, C2 im mittleren und C3-C10 im nicht toxischen Bereich.

In Abbildung 3.6 sind die Ausgleichsgeraden von RM-A und RM-B dargestellt. Für RM-A ist zu erkennen, dass sich die Verdünnungen C1-C3 im stark toxischen Bereich befinden. Die Verdünnungen C4 und C5 liegen auf einem ähnlichen

Niveau im mittleren Toxizitätsbereich. Die Verdünnungen C6-C10 liegen alle im nicht toxischen Bereich. Für RM-B liegt lediglich der Originalextrakt C1 im toxischen Bereich. Mit C2 liegt eine Verdünnung im mittleren Bereich und die Verdünnungen C3-C10 liegen im nicht toxischen Bereich.

Tabelle 3.5 Sterilfiltrierter Extrakt: IC50-Wert und Z-Faktor

In der nachfolgenden Tabelle sind die IC50-Werte in $\frac{\text{cm}^2}{\text{ml}}$ für die nicht lineare Regression sowie die Z-Faktoren dargestellt.

IC50-Wert in $\frac{\text{cm}^2}{\text{ml}}$		Z-Faktor	
RM-A	RM-B	RM-A	RM-B
0,7701	1,993	0,91	0,89

Im Vergleich zu dem Experiment aus Abschnitt 3.3 liegt eine Verschiebung der Toxizität vor. Für RM-A als auch RM-B hat sich eine Verdünnung aus dem stark toxischen Bereich in den mittleren Bereich verschoben. Die IC50-Werte liegen für RM-A mit $0,7701 \frac{\text{cm}^2}{\text{ml}}$ und RM-B mit $1,993 \frac{\text{cm}^2}{\text{ml}}$ ebenfalls im weniger toxischen Bereich. Die Z-Faktoren liegen für RM-A mit 0,91 und für RM-B mit 0,89 weiter im exzellenten Bereich.

Im Folgenden wurde auf die Sterilfiltration verzichtet und weiter 1 % Penicillin/Streptomycin dem Medium zugesetzt.

3.3.2 Einfluss eines serumfreien Extraktionsmedium

Für die *in vitro* Zellkultur ist es notwendig die *in vivo* Bedingungen so gut wie möglich nachzuahmen. Zu diesem Zweck wird Serum unterschiedlichster Herkunft zu den klassischen Kulturmedien hinzugegeben. Das Serum enthält Wachstumsfaktoren, Hormone, Lipide und Mineralien. Der Einsatz von Serum bringt daher nicht nur Vorteile mit sich. Neben dem hohen finanziellen Aufwand, der mit hochwertigen Seren einhergeht, ist auch die Zusammensetzung nicht genau definiert.

Zu diesem Zweck sollte mit diesem Experiment ermittelt werden, ob es möglich ist bei der Extraktion und im späteren Assay auf den Einsatz von Serum im Kulturmedium zu verzichten. Die RM wurden in serumfreien Assaymedium

extrahiert und auch die 1:1,5 Verdünnungsreihe wurde in serumfreien Medium angesetzt. Der weitere Ablauf des Assays verlief wie in Abschnitt 3.3 beschrieben.

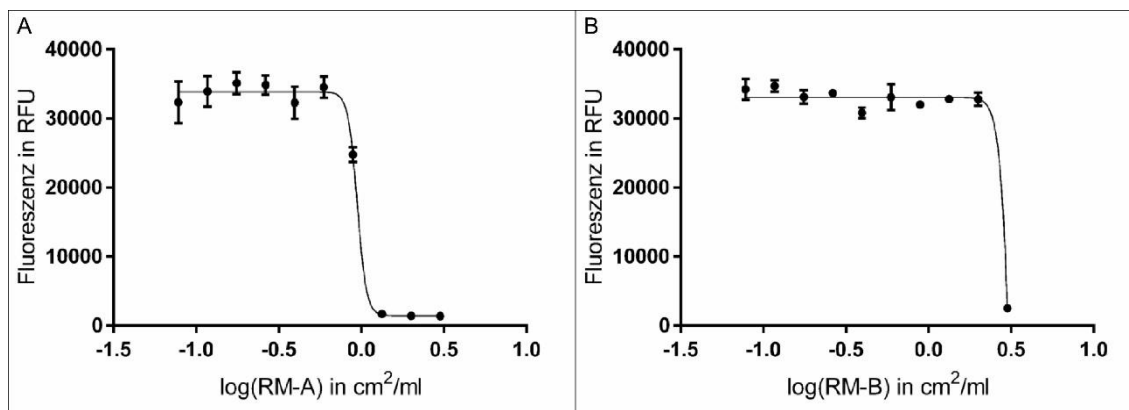


Abbildung 3.7 Einfluss eines serumfreien Extraktionsmedium

Die Abbildung zeigt die Regression der Verdünnungsreihen für RM-A und RM-B mit einem serumfreien Extrakt. Es wurde die Fluoreszenz in RFU gegen den dekadischen Logarithmus der Konzentration in $\frac{\text{cm}^2}{\text{ml}}$ aufgetragen. RM-A zeigt für die Verdünnungen C1-C3 ein stark toxisches Verhalten. Die Verdünnung C4 liegt im oberen, mittleren Toxizitätsbereich. Die Verdünnungen C5-C10 befinden sich im nicht toxischen Bereich. Für RM-B zeigt lediglich der Originalextrakt eine toxische Wirkung. Die übrigen Verdünnungen liegen alle im nicht toxischen Bereich.

Tabelle 3.6 Serumfreier Extrakt: IC50-Wert und Z-Faktor

In der nachfolgenden Tabelle sind die IC50-Werte in $\frac{\text{cm}^2}{\text{ml}}$ für die nicht lineare Regression sowie die Z-Faktoren dargestellt.

IC50-Wert in $\frac{\text{cm}^2}{\text{ml}}$		Z-Faktor	
RM-A	RM-B	RM-A	RM-B
0,9441	3,285	0,76	0,88

Ähnlich zu den Ergebnissen aus Abschnitt 3.3.1 konnte hier ebenfalls eine Verschiebung der Toxizität festgestellt werden. RM-A zeigt nur in den Verdünnungen C1-C3 eine stark toxische Wirkung. Die Verdünnung C4 liegt bereits im oberen, mittleren Bereich. Für RM-B zeigt lediglich C1 eine stark toxische Wirkung, alle weiteren Verdünnungen liegen im nicht toxischen Bereich. Die IC50-Werte für RM-A mit $0,9441 \frac{\text{cm}^2}{\text{ml}}$ und RM-B mit $3,285 \frac{\text{cm}^2}{\text{ml}}$ weichen ebenfalls stark von

denen aus Abschnitt 3.3 ab. Die Z-Faktoren mit 0,76 für RM-A und 0,88 für RM-B liegen ebenfalls unterhalb der Ergebnisse aus Abschnitt 3.3, allerdings nach wie vor im exzellenten Bereich.

Da auch hier ein negativer Effekt auf den Assay zu erkennen war, wurden alle weiteren Versuche mit serumhaltigem Medium durchgeführt.

3.3.3 Optimierung der Verdünnungsreihe von RM-B

Für RM-A war es bereits gelungen mit einer 1:1,5 Verdünnung eine gute Verteilung der einzelnen Messpunkte über den gesamten Toxizitätsbereich zu erhalten. Für RM-B lagen lediglich die Verdünnungen C1 und C2 im stark toxischen Bereich und die übrigen Verdünnungen im nicht toxischen Bereich. Um eine bessere Verteilung der Messpunkte zu erhalten wurde für RM-B die Verdünnungsstufe von einer 1:1,5 Verdünnung auf eine 1:1,25 Verdünnung geändert.

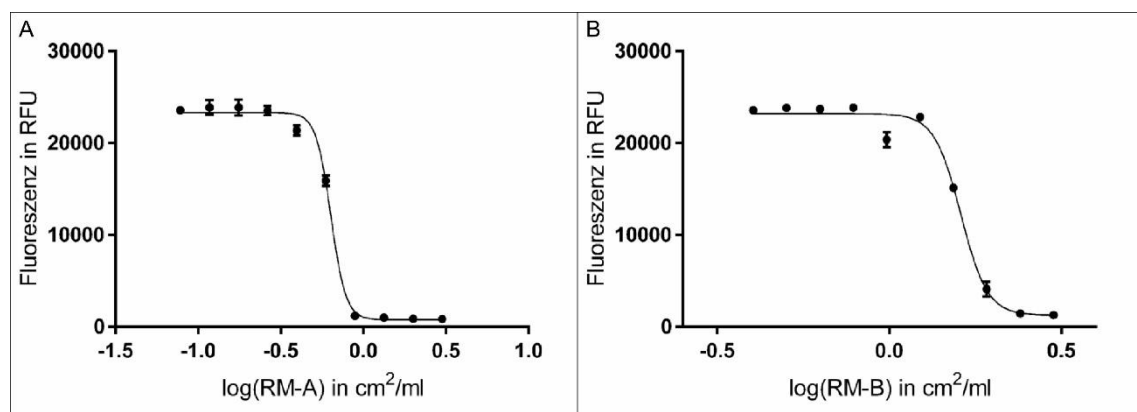


Abbildung 3.8 Optimierung der Verdünnungsreihe für RM-B

Die Abbildung zeigt die Regression der Verdünnungsreihen für RM-A und RM-B. Es wurde die Fluoreszenz in RFU gegen den dekadischen Logarithmus der Konzentration in $\frac{\text{cm}^2}{\text{ml}}$ aufgetragen. RM-A zeigt das aus Abschnitt 3.3 erwartete Bild mit C1-C4 im stark toxischen Bereich und C5 im mittleren Bereich. Für RM-B zeigt sich, dass neben C1 und C2 im stark toxischen Bereich sich die Verdünnungen C3 und C4 in den mittleren toxischen Bereich verschoben haben.

Die veränderte Verdünnungsstrategie für RM-B liefert eine bessere Verteilung der Messpunkte über den Toxizitätsbereich. In Bild B der Abbildung 3.8 ist deutlich zu erkennen, dass sich die Verdünnungen C1 und C2 im stark toxischen Bereich

befinden. Die Verdünnung C3 ist im Vergleich zu Abbildung 3.5 aus dem nicht toxischen Bereich in den unteren, mittleren Toxizitätsbereich verschoben worden. Die Verdünnung C4 ist ebenfalls aus dem nicht toxischen Bereich in den mittleren Toxizitätsbereich verschoben worden, befindet sich allerdings im oberen Teil dieses Bereichs. RM-A zeigt dasselbe Bild wie in Abbildung 3.5 und bestätigt somit den erwarteten Verlauf.

Tabelle 3.7 Neue Verdünnungsreihe RM-B: IC50-Wert und Z-Faktor

In der nachfolgenden Tabelle sind die IC50-Werte in $\frac{\text{cm}^2}{\text{ml}}$ für die nicht lineare Regression sowie die Z-Faktoren dargestellt.

IC50-Wert in $\frac{\text{cm}^2}{\text{ml}}$		Z-Faktor	
RM-A	RM-B	RM-A	RM-B
0,6362	1,615	0,98	0,97

Die IC50-Werte liegen auf demselben Niveau wie in Abschnitt 3.3. Für RM-A liegt der Wert bei $0,6362 \frac{\text{cm}^2}{\text{ml}}$ und für RM-B bei $1,615 \frac{\text{cm}^2}{\text{ml}}$. Die Z-Faktoren liegen erneut im exzellenten Bereich. Für RM-A mit 0,98 und RM-B mit 0,97 sind die Werte ansatzweise ideal.

3.4 Etablierung des XTT-Assay

Die ISO 10993 gibt vor, dass die Zytotoxizitätsprüfung mit einem Formazanbildner durchgeführt werden muss. Für diese Arbeit wurde XTT gewählt, da es ein wasserlösliches Formazan bildet und somit besser handhabbar ist. Für dieses Experiment wurde eine $1 \frac{\text{mg}}{\text{ml}}$ XTT-Lösung hergestellt. Für eine bessere Umsetzung des XTT wurde eine 10 mM PMS-Lösung benötigt. Vor dem Gebrauch wurden zu 4 ml der XTT-Lösung 10 μl der PMS-Lösung gegeben. Der Assay wurde wie in Abschnitt 3.3 durchgeführt, allerdings wurde das Resazurin durch XTT ersetzt. Das Volumen von 20 μl bleibt identisch. Das Experiment wurde in einer Doppelbestimmung durchgeführt.

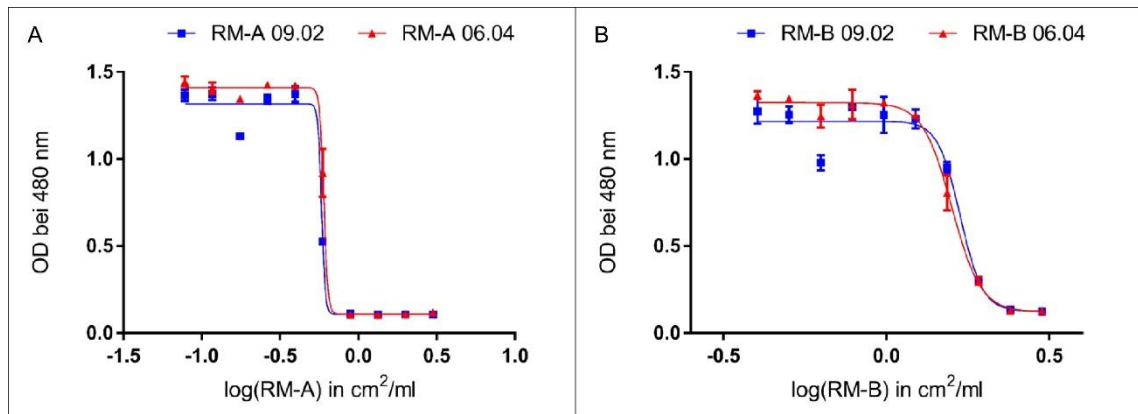


Abbildung 3.9 Etablierung des XTT-Assay

Die Abbildung zeigt die Regression der Verdünnungsreihen für RM-A und RM-B. Es wurde die optische Dichte bei 480 nm gegen den dekadischen Logarithmus der Konzentration in $\frac{\text{cm}^2}{\text{ml}}$ aufgetragen. Die Abbildung zeigt zwei voneinander unabhängige Experimente. Für RM-A liegen die Verdünnungen C1-C4 im stark toxischen, C5 im mittleren und C6-10 im nicht toxischen Bereich. Für RM-B liegen C1 und C2 im stark toxischen, C3 und C4 im mittleren und C5-C10 im nicht toxischen Bereich.

Die Ergebnisse aus Abbildung 3.9 zeigen denselben Verlauf wie der Versuch mit Resazurin aus Abschnitt 3.3.3. Für RM-A liegen die Verdünnungen C1-C4 im stark toxischen, C5 im mittleren und C6-C10 im nicht toxischen Bereich. Für RM-B zeigt sich ebenfalls dasselbe Bild wie in Abschnitt 3.3.3 mit C1 und C2 im stark toxischen, C3 und C4 im mittleren und C5-C10 im nicht toxischen Bereich.

Tabelle 3.8 Etablierung des XTT-Assay: IC50-Wert und Z-Faktor

In der nachfolgenden Tabelle sind die IC50-Werte in $\frac{\text{cm}^2}{\text{ml}}$ für die nicht lineare Regression sowie die Z-Faktoren dargestellt. Die Tabelle vergleicht die Werte für den Assay mit XTT (09.02 und 06.04) mit den Werten des Assays mit Resazurin (15.01 und 19.01).

Experiment	IC50-Wert in $\frac{\text{cm}^2}{\text{ml}}$		Z-Faktor	
	RM-A	RM-B	RM-A	RM-B
09.02	0,5831	1,685	0,93	0,85
06.04	0,6021	1,587	0,94	0,96
15.01	0,6136	1,542	0,97	0,88
19.01	0,6226	1,649	0,93	0,83

Die IC50-Werte liegen für RM-A bei $0,6021 \frac{\text{cm}^2}{\text{ml}}$ und $0,5831 \frac{\text{cm}^2}{\text{ml}}$. Für RM-B liegen die Werte bei $1,587 \frac{\text{cm}^2}{\text{ml}}$ und $1,685 \frac{\text{cm}^2}{\text{ml}}$. Damit liegen die Werte auf demselben Niveau wie in Abschnitt 3.3. Die Werte aus Abschnitt 3.3 sind vergleichend erneut in Tabelle 3.8 aufgeführt. Die Z-Faktoren liegen für RM-A bei 0,94 und 0,93. Für RM-B liegen die Werte bei 0,96 und 0,85. Damit sind alle Z-Faktoren im exzellenten Bereich.

Durch das übereinstimmende Ergebnis von Abschnitt 3.3 und Abschnitt 3.4 wird in allen folgenden Experimenten XTT zur Zytotoxizitätsbestimmung benutzt.

3.4.1 XTT-Assay ohne PMS Einsatz

Mit diesem Experiment soll überprüft werden, wie groß der Effekt des PMS auf den Read-Out ist und ob ggf. auf das PMS im Assay verzichtet werden kann. Der Assay wird wie in Abschnitt 3.4 beschrieben durchgeführt, allerdings wird auf die Zugabe der PMS-Lösung zur XTT-Lösung verzichtet.

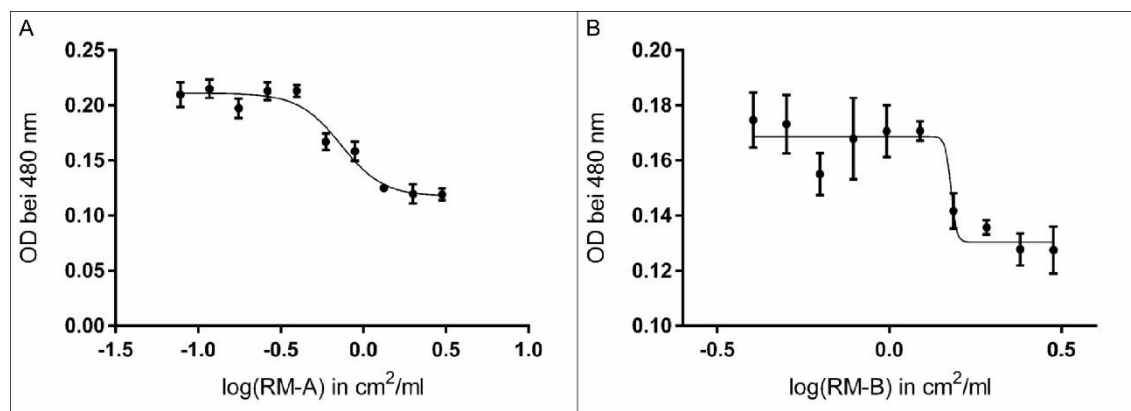


Abbildung 3.10 XTT-Assay ohne PMS Einsatz

Die Abbildung zeigt die Regression der Verdünnungsreihen für RM-A und RM-B. Es wurde die optische Dichte bei 480 nm gegen den dekadischen Logarithmus der Konzentration in $\frac{\text{cm}^2}{\text{ml}}$ aufgetragen. Für RM-A und RM-B ist die gemessene OD sehr gering. Der Unterschied in der OD zwischen dem stark toxischen Bereich und dem nicht toxischen Bereich ist nur sehr gering. Für RM-B sind die Abweichungen innerhalb eines Triplikats sehr hoch.

Durch den Verzicht von PMS liegt die OD in Abbildung 3.10 deutlich unter der aus Abbildung 3.9. Des Weiteren ist der Unterscheid in der OD zwischen dem stark toxischen und dem nicht toxischen Bereich nur sehr gering. Die Fehlerbreite innerhalb der Triplikate ist für beide Substanzen erhöht, allerdings für RM-B deutlich stärker ausgebildet.

Tabelle 3.9 XTT-Assay ohne PMS Einsatz: IC50-Wert und Z-Faktor

In der nachfolgenden Tabelle sind die IC50-Werte in $\frac{\text{cm}^2}{\text{ml}}$ für die nicht lineare Regression sowie die Z-Faktoren dargestellt.

IC50-Wert in $\frac{\text{cm}^2}{\text{ml}}$		Z-Faktor	
RM-A	RM-B	RM-A	RM-B
0,7322	1,511	0,55	0,04

Für RM-A liegt der IC50-Wert bei $0,7322 \frac{\text{cm}^2}{\text{ml}}$ und für RM-B bei $1,511 \frac{\text{cm}^2}{\text{ml}}$. Damit liegt der Wert für RM-A über den bisherigen IC50-Werten und für RM-B unter den bisherigen Werten. Die Z-Faktoren unterscheiden sich deutlich voneinander. Für RM-A liegt der Wert bei 0,55 und ist damit an der unteren Grenze des exzellenten Bereichs. Für RM-B liegt der Wert bei 0,04 und ist damit in einem Bereich, indem der Assay nicht mehr durchführbar ist.

3.5 Stabilitätsprüfung der Referenzmaterialextrakte

Für die Handhabung des Assays wäre es Vorteil, wenn die Extrakte der RM nicht für jeden Versuch frisch angesetzt werden müssten, sondern stabil als Extrakt gelagert werden könnten. Zu diesem Zweck wurde Referenzmaterial extrahiert und bei drei unterschiedlichen Temperaturen für sechs Wochen gelagert. Der Extrakt wurde bei -20 °C , 4 °C und Raumtemperatur (RT) gelagert. Nach Ablauf wurde der XTT-Assay wie in Abschnitt 3.4 durchgeführt.

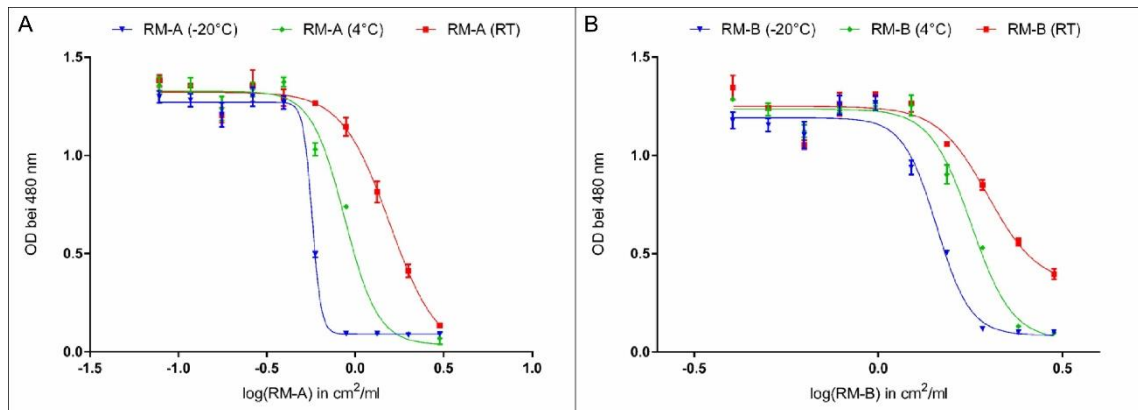


Abbildung 3.11 Stabilitätsprüfung der Referenzmaterialien

Die Abbildung zeigt die Regression der Verdünnungsreihen für RM-A und RM-B. Es wurde die optische Dichte bei 480 nm gegen den dekadischen Logarithmus der Konzentration in $\frac{\text{cm}^2}{\text{ml}}$ aufgetragen. Bild A zeigt den Verlauf von RM-A für die Temperaturen -20 °C (blau), 4 °C (grün) und RT (rot). Es ist deutlich eine Abnahme der Toxizität von -20 °C zu RT zu erkennen. Für RM-B zeigt sich in Bild B dasselbe Verhalten. Es ist eine deutliche Abnahme der Toxizität von -20 °C zu RT zu erkennen.

In der Abbildung 3.11 ist für beide Substanzen eine deutliche Abnahme in der Toxizität von -20 °C zu RT zu erkennen. Bild A zeigt die Verläufe für RM-A. Für eine Lagertemperatur von -20 °C entspricht die Regression dem erwarteten Verlauf. C1-C4 befinden sich im stark toxischen Bereich, C5 im mittleren und C6-C10 im nicht toxischen Bereich. Für die Kurve bei 4 °C liegen lediglich C1-C3 im stark toxischen, C4 und C5 im mittleren und C6-C10 im nicht toxischen Bereich. Für eine Lagerung bei RT ist der Effekt am deutlichsten zu erkennen. Hier liegt nur der Originalextrakt C1 im stark toxischen, C2-C4 im mittleren und C5-C10 im nicht toxischen Bereich.

In Bild B sind die Verläufe für RM-B dargestellt. Hier entspricht der Verlauf der Regression bei -20 °C nicht eindeutig den Erwartungen. Es ist eine leichte Verschiebung in den toxischen Bereich erkennbar. Die Verdünnung C3 liegt ebenfalls wie C1 und C2 im stark toxischen, C4 und C5 im mittleren und C6-C10 in nicht toxischen Bereich. Für 4 °C befindet ist der Verlauf der Regression näher an dem erwarteten Verlauf. Auch hier ist die Regression allerdings ein wenig in den nicht toxischen Bereich verschoben, da C3 und C4 auf einem höheren Niveau im mittleren Bereich liegen. Für RT liegt keine Verdünnung im stark toxischen Bereich.

Parallel zu RM-A ist die Verschiebung hier am deutlichsten zu erkennen. C1-C5 liegen im mittleren und C6-C10 im nicht toxischen Bereich.

Tabelle 3.10 Stabilitätsprüfung der RM: IC50-Wert und Z-Faktor

In der nachfolgenden Tabelle sind die IC50-Werte in $\frac{\text{cm}^2}{\text{ml}}$ für die nicht lineare Regression sowie die Z-Faktoren dargestellt.

Experiment	IC50-Wert in $\frac{\text{cm}^2}{\text{ml}}$		Z-Faktor	
	RM-A	RM-B	RM-A	RM-B
RT	1,562	1,985	0,93	0,77
4 °C	0,8711	1,789	0,86	0,96
-20 °C	0,5710	1,441	0,93	0,89

Die Verschiebung der Toxizität lässt sich ebenfalls im IC50-Wert erkennen. Für -20 °C liegt der Wert bei $0,571 \frac{\text{cm}^2}{\text{ml}}$ und damit auf dem Niveau wie in Abschnitt 3.4. Bei 4 °C hat sich der Wert bereits auf $0,8711 \frac{\text{cm}^2}{\text{ml}}$ verschoben. Für RT liegt der IC50-Wert bei $1,562 \frac{\text{cm}^2}{\text{ml}}$. Von -20 °C auf RT findet eine Verschiebung von fast $1 \frac{\text{cm}^2}{\text{ml}}$ statt. Für RM-B ist ebenfalls eine Verschiebung in der Toxizität zu erkennen. Der IC50-Wert befindet sich leicht unter dem Niveau des Experiments aus Abschnitt 3.4. Für die Lagertemperatur von -20 °C liegt der IC50-Wert bei $1,441 \frac{\text{cm}^2}{\text{ml}}$ und verschiebt sich für eine Lagerung bei RT auf $1,985 \frac{\text{cm}^2}{\text{ml}}$. Die Verschiebung stellt sich mit einer Differenz von ca. $0,5 \frac{\text{cm}^2}{\text{ml}}$ nicht so drastisch dar wie bei RM-A. Die Z-Faktoren liegen für alle drei Lagertemperaturen im exzellenten Bereich.

Das Experiment wurde mit einem acht Wochen, bei -20 °C gelagerten Extrakt wiederholt. Zum Vergleich wurde ein frischer Extrakt angesetzt.

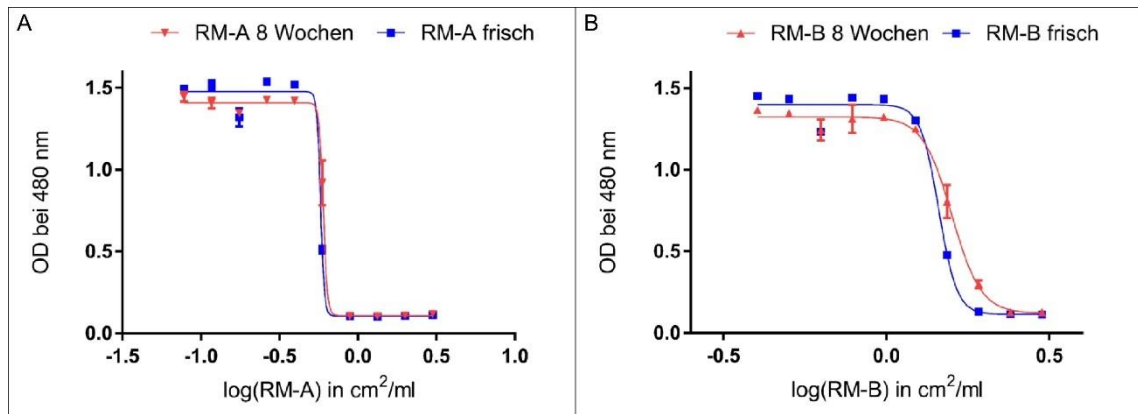


Abbildung 3.12 Vergleich von acht Wochen altem mit frisch angesetztm Extrakt

Die Abbildung zeigt die Regression der Verdünnungsreihen für RM-A und RM-B. Es wurde die optische Dichte bei 480 nm gegen den dekadischen Logarithmus der Konzentration in $\frac{\text{cm}^2}{\text{ml}}$ aufgetragen. In der Abbildung wird ein acht Wochen, bei -20 °C gelagerter Extrakt mit einem frisch angesetzten Extrakt verglichen. Für RM-A zeigen beide Extrakte den erwarteten Verlauf mit C1-C4 im stark toxischen, C5 im mittleren und C6-C10 im nicht toxischen Bereich. Für RM-B ist der Verlauf der beiden Kurven nicht exakt identisch. Der frische Extrakt zeigt einen leicht toxischeren Verlauf als der acht Wochen alte Extrakt.

Tabelle 3.11 Vergleich von acht Wochen altem mit frisch angesetztm Extrakt

In der nachfolgenden Tabelle sind die IC₅₀-Werte in $\frac{\text{cm}^2}{\text{ml}}$ für die nicht lineare Regression sowie die Z-Faktoren dargestellt.

Experiment	IC ₅₀ -Wert in $\frac{\text{cm}^2}{\text{ml}}$		Z-Faktor	
	RM-A	RM-B	RM-A	RM-B
8 Wochen	0,6021	1,587	0,94	0,96
frisch	0,5792	1,447	0,97	0,98

In dem Vergleichsexperiment zeigt sich, dass auch nach acht Wochen Lagerung bei -20 °C die Extrakte von RM-A und RM-B weiterhin stabil bleiben. In Abbildung 3.12 zeigen beide Substanzen den erwarteten Verlauf. RM-A zeigt in den Verdünnungen C1-C4 einen stark toxischen Effekt. Die Verdünnung C5 liegt im mittleren und C6-C10 im nicht toxischen Bereich. Auch die IC₅₀-Werte bleiben auf einem stabilen Niveau. Der frische Extrakt besitzt einen Wert von $0,5792 \frac{\text{cm}^2}{\text{ml}}$ und der acht Wochen gelagerte einen Wert von $0,6021 \frac{\text{cm}^2}{\text{ml}}$. Für RM-B liegt der Wert für

den frischen Extrakt bei $1,447 \frac{\text{cm}^2}{\text{ml}}$ und für den acht Wochen gelagerten Extrakt bei $1,587 \frac{\text{cm}^2}{\text{ml}}$. Die Z-Faktoren liegen ebenfalls im exzellenten Bereich und sind ansatzweise ideal. Eine Lagerung bei $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ für acht Wochen scheint möglich zu sein.

3.6 Vergleich frischer Zellen mit *Assay Ready Cells*

Bei *Assay Ready Cells* (ARC) handelt es sich um kryokonservierte Zellen, welche unter bestmöglichen Bedingungen eingefroren wurden. Dadurch stehen die Zellen nach dem Auftauen direkt mit einer hohen Vitalität und voller Funktionalität für den Einsatz im Assay zur Verfügung.

Für die Etablierung des Assays mit ARC ist es von großer Bedeutung, dass sich diese im Assay genauso gut oder besser verhalten als Zellen aus einer laufenden Kultur. Für dieses Experiment wurden L-929 Zellen in Kultur gebracht. Es wurde dasselbe Batch wie für die bisherigen und folgenden Versuche genutzt. Die Zellen wurden vor dem Einsatz in diesem Experiment mindestens dreimal passagiert um sicherzustellen, dass sie ihre volle Vitalität und Funktionalität aufgebaut haben. Die Zellen aus der laufenden Kultur wurden wie in Abschnitt 2.1.2 aus dem Kulturgefäß geerntet und gezählt. Für einen idealen Vergleich wurde die Zellsuspension der frischen Zellen ebenfalls so eingestellt, dass $80 \mu\text{l}$ der Suspension $7\text{E}+04$ Zellen entsprechen. Es wurden sowohl die frischen, als auch die ARC wie in Abschnitt 3.4 behandelt. Das Experiment wurde in einer Doppelbestimmung durchgeführt.

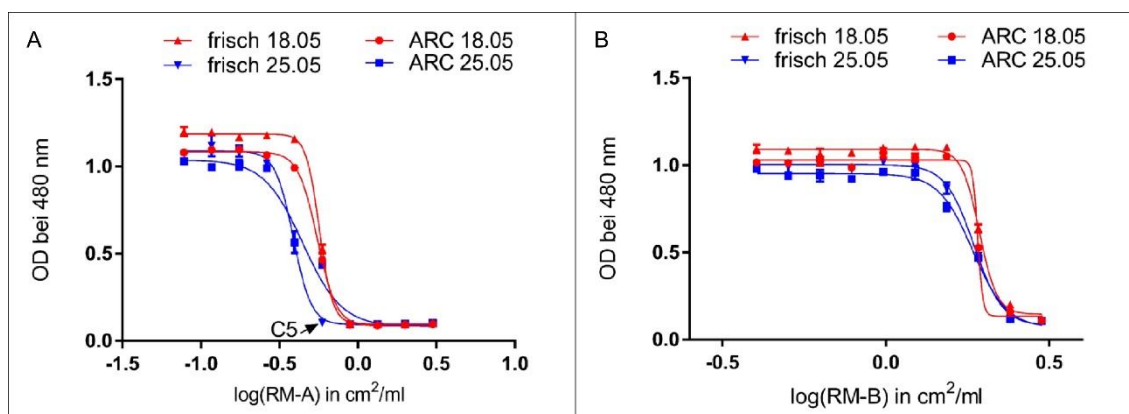


Abbildung 3.13 Vergleich von frischen Zellen und ARC

Die Abbildung zeigt die Regression der Verdünnungsreihen für RM-A und RM-B. Es wurde die optische Dichte bei 480 nm gegen den dekadischen Logarithmus der Konzentration in $\frac{\text{cm}^2}{\text{ml}}$ aufgetragen. Für die Doppelbestimmung wurde jeweils der Lauf mit frischen Zellen und ARC in derselben Farbe dargestellt: 18.05 (rot) und 25.05 (blau). Für RM-A zeigt das Experiment 25.05 für die frischen Zellen einen leicht toxischeren Verlauf im Vergleich zu den ARC, da die Verdünnung C5 in den stark toxischen Bereich verschoben ist. Das Experiment 18.05 zeigt einen nahezu identischen Verlauf. Für RM-B zeigen frische Zellen und ARC einen ähnlichen Verlauf der Regression in beiden Experimenten.

In Abbildung 3.13 ist zu erkennen, dass es zwischen den parallelen Läufen von frischen Zellen und ARC für die Substanz RM-A größere Unterschiede gibt als für RM-B. Dies bestätigen auch die Werte des IC50-Wertes aus Tabelle 3.12. Für RM-A liegen die Werte für das Experiment 18.05 mit $0,5688 \frac{\text{cm}^2}{\text{ml}}$ (frisch) und $0,5517 \frac{\text{cm}^2}{\text{ml}}$ (ARC) auf demselben Niveau. Für das Experiment 25.05 zeigen die eine Differenz von 13 % mit $0,3882 \frac{\text{cm}^2}{\text{ml}}$ (frisch) und $0,4458 \frac{\text{cm}^2}{\text{ml}}$ (ARC).

Tabelle 3.12 Vergleich von frischen Zellen mit ARC

In der nachfolgenden Tabelle sind die IC50-Werte in $\frac{\text{cm}^2}{\text{ml}}$ für die nicht lineare Regression sowie die Z-Faktoren dargestellt.

Experiment	IC50-Wert in $\frac{\text{cm}^2}{\text{ml}}$				Z-Faktor			
	RM-A		RM-B		RM-A		RM-B	
	frisch	ARC	frisch	ARC	frisch	ARC	frisch	ARC
18.05	0,5688	0,5517	1,933	1,912	0,93	0,94	0,94	0,94
25.05	0,3882	0,4458	1,860	1,846	0,96	0,93	0,95	0,93

Für RM-B liegen die Werte in beiden Experimenten auf demselben Niveau auch zwischen den Experimenten ist die Differenz des IC50-Werts mit 3,6 % nur sehr gering. Für das Experiment 18.05 liegen die IC50-Werte bei $1,933 \frac{\text{cm}^2}{\text{ml}}$ (frisch) und $1,912 \frac{\text{cm}^2}{\text{ml}}$ (ARC). Das Experiment 25.05 zeigt Werte von $1,860 \frac{\text{cm}^2}{\text{ml}}$ (frisch) und $1,846 \frac{\text{cm}^2}{\text{ml}}$ (ARC).

Die Z-Faktoren liegen in allen Experimenten für beide Substanzen im exzellenten nahezu idealen Bereich.

3.7 Etablierung eines optimierten Pipettierschemas

Für eine leichtere Handhabung wurde das Pipettierschema optimiert. Mit diesem Schema ist es möglich, den gesamten Assay mit einer Testsubstanz, auf einer einzigen 96-well Platte durchzuführen. Bisher wurde die Negativkontrolle (RM-C) ebenfalls in einer Verdünnungsreihe mit zehn Verdünnungen auf einer zweiten Platte mitgeführt. Diese zweite Platte wurde auch für die Testsubstanz vorgesehen. Für das optimierte Pipettierschema (siehe Abbildung 3.14) wurde die Negativkontrolle lediglich als Originalextrakt mitgeführt. Für die Substanzen RM-A und RM-B wurde die Verdünnungsreihe von zehn Verdünnungen auf fünf reduziert. Um weiterhin eine optimale Verteilung der Messpunkte über den gesamten Toxizitätsbereich zu gewährleisten, wurden ebenfalls die Verdünnungsstufen für RM-A und RM-B angepasst. Der Extrakt von RM-A wurde 1:2 und der von RM-B 1:1,33 verdünnt.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	M	C1	C2	C3	C4	C5	M	C1	C3	C4	C5	M
B	M	C1	C2	C3	C4	C5	C1	C2	C3	C4	C5	M
C	M	C1	C2	C3	C4	C5	C1	C2	C3	C4	C5	M
D	M	C1	C2	C3	C4	C5	C1	C2	C3	C4	C5	M
E	M	C1	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9	M
F	M	C1	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9	M
G	M	C1	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9	M
H	M	C1	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9	M

Abbildung 3.14 Etablierung eines optimierten Pipettierschemas

In die Reihen B-G wurden je *well* 80 μl der Zellsuspension pipettiert. Dies entspricht einer Zelldichte von $7\text{E}+04 \frac{\text{c}}{\text{well}}$. Die Reihen A und H wurden nicht mit Zellen versehen. Sie dienen als Nullwerte der Referenzmaterialextrakte und der Testsubstanz. Die Spalten 1 und 12 wurden lediglich mit Medium versehen und dienen als Referenz zu den Extrakten. Die Extrakte wurden in den Spalten 2-11 von C1 (höchste Konzentration) bis C5 (geringste Konzentration) aufgetragen: RM-A (gelb), RM-B (blau), RM-C (rot) und die Testsubstanz (weiß). Für die Testsubstanz können bis zu neun Verdünnungen hergestellt werden.

Die Zellen werden wie in Abschnitt 2.2.3 auf die Platte aufgebracht. In den ersten Quadranten der Platte wird die Verdünnungsreihe von RM-A aufgetragen. Im zweiten Quadranten befindet sich die Verdünnungsreihe von RM-B. Für die Testsubstanz sind insgesamt neun Verdünnungsstufen vorgesehen. Das Experiment zur Etablierung des Pipettierschemas wurde in einer Doppelbestimmung durchgeführt.

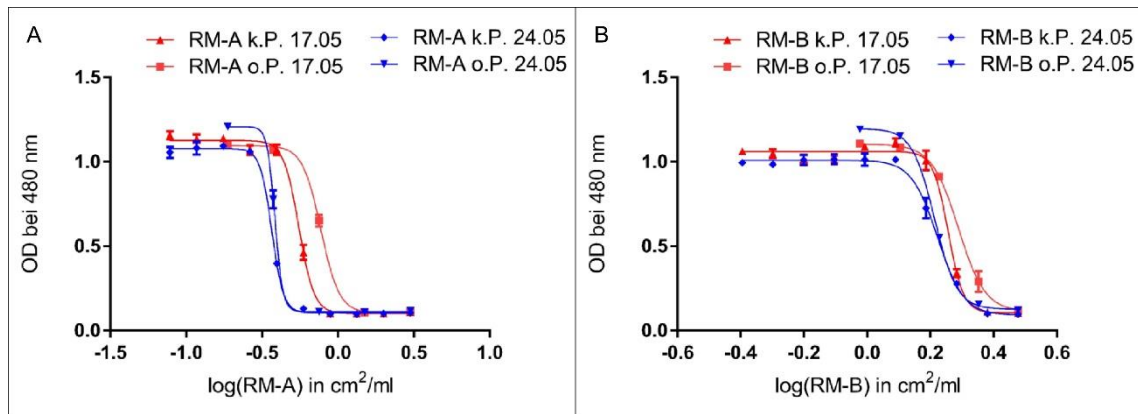


Abbildung 3.15 Vergleich optimiertes gegen klassisches Pipettierschema

Die Abbildung zeigt die Regression der Verdünnungsreihen für RM-A und RM-B. Es wurde die optische Dichte bei 480 nm gegen den dekadischen Logarithmus der Konzentration in $\frac{\text{cm}^2}{\text{ml}}$ aufgetragen. In der Abbildung wird jeweils ein Lauf des optimierten Pipettierschemas (o.P.) mit einem parallelen Lauf des klassischen Pipettierschemas (k.P.) verglichen. Für das Experiment 24.05 (blau) zeigen sowohl o.P. als auch k.P. einen ähnlichen Verlauf unterscheiden sich lediglich in ihrer maximalen Absorption. Für das Experiment 17.05 (rot) zeigt das klassische Pipettierschema einen toxischeren Verlauf als die optimierte Variante.

Die Abbildung 3.15 zeigt den Vergleich von optimiertem Pipettierschema (o.P.) und klassischem Pipettierschema (k.P.). In den beiden dargestellten Experimenten sind o.P. und k.P. parallel am selben Tag gelaufen. Für das Experiment 17.05 kann für RM-A ein deutlich toxischerer Verlauf der Regression des klassischen im Vergleich zum optimierten Pipettierschemas erkannt werden. Für RM-B ist dieser Unterschied nicht so stark ausgeprägt. Für das Experiment 24.05 zeigen sowohl RM-A als auch RM-B für das optimierte und klassische Pipettierschema denselben Verlauf. Sie unterscheiden sich lediglich in der maximalen Absorption voneinander. Hier zeigt die optimierte Variante ein deutlich höheres Maximum als die klassische Variante.

Tabelle 3.13 Vergleich klassisches gegen optimiertes Pipettierschema: IC50-Wert und Z-Faktor

In der nachfolgenden Tabelle sind die IC50-Werte in $\frac{\text{cm}^2}{\text{ml}}$ für die nicht lineare Regression sowie die Z-Faktoren dargestellt.

Experiment	IC50-Wert in $\frac{\text{cm}^2}{\text{ml}}$				Z-Faktor			
	RM-A		RM-B		RM-A		RM-B	
	o.P.	k.P.	o.P.	k.P.	o.P.	k.P.	o.P.	k.P.
17.05	0,7715	0,5525	1,942	1,805	0,94	0,93	0,98	0,97
24.05	0,3848	0,3665	1,634	1,670	0,94	0,90	0,96	0,95

Der Unterscheid in der maximalen Absorption hat keine Auswirkungen auf den IC50-Wert. Für das Experiment 24.05 liegen die IC50-Werte von RM-A mit $0,3848 \frac{\text{cm}^2}{\text{ml}}$ und $0,3665 \frac{\text{cm}^2}{\text{ml}}$ sowie RM-B mit $1,634 \frac{\text{cm}^2}{\text{ml}}$ und $1,670 \frac{\text{cm}^2}{\text{ml}}$ für das optimierte und klassische Schema auf demselben Niveau. Bei dem Experiment 17.05 ist für RM-A eine deutliche Differenz von 28 % zwischen den IC50-Werten mit $0,7715 \frac{\text{cm}^2}{\text{ml}}$ und $0,5525 \frac{\text{cm}^2}{\text{ml}}$ zu erkennen. Für RM-B zeigt sich diese Differenz nicht so extrem, die IC50-Werte von $1,942 \frac{\text{cm}^2}{\text{ml}}$ und $1,805 \frac{\text{cm}^2}{\text{ml}}$ weisen eine Differenz von 7 % auf. Die Z-Faktoren befinden sich für alle Versuchsläufe im exzellenten Bereich.

3.8 Optimierung des Einfrierens von Zellen

3.8.1 Optimierung des Einfrierprofils

Für die Optimierung des Einfrierprotokolls soll die Proben temperatur während des Einfrierens einen linearen Verlauf haben. Die Wärmeentwicklung bei der Kristallisation soll durch ein optimal gesteuertes Temperaturprofil vermieden werden. Die freiwerdende Wärme und damit verbundene Rekristallisation schaden den Zellen während des Einfrierens, wodurch sie nach dem Auftauen nicht direkt mit optimaler Vitalität und Funktionalität zur Verfügung stehen. Die Experimente wurden lediglich mit zellfreiem Medium durchgeführt.

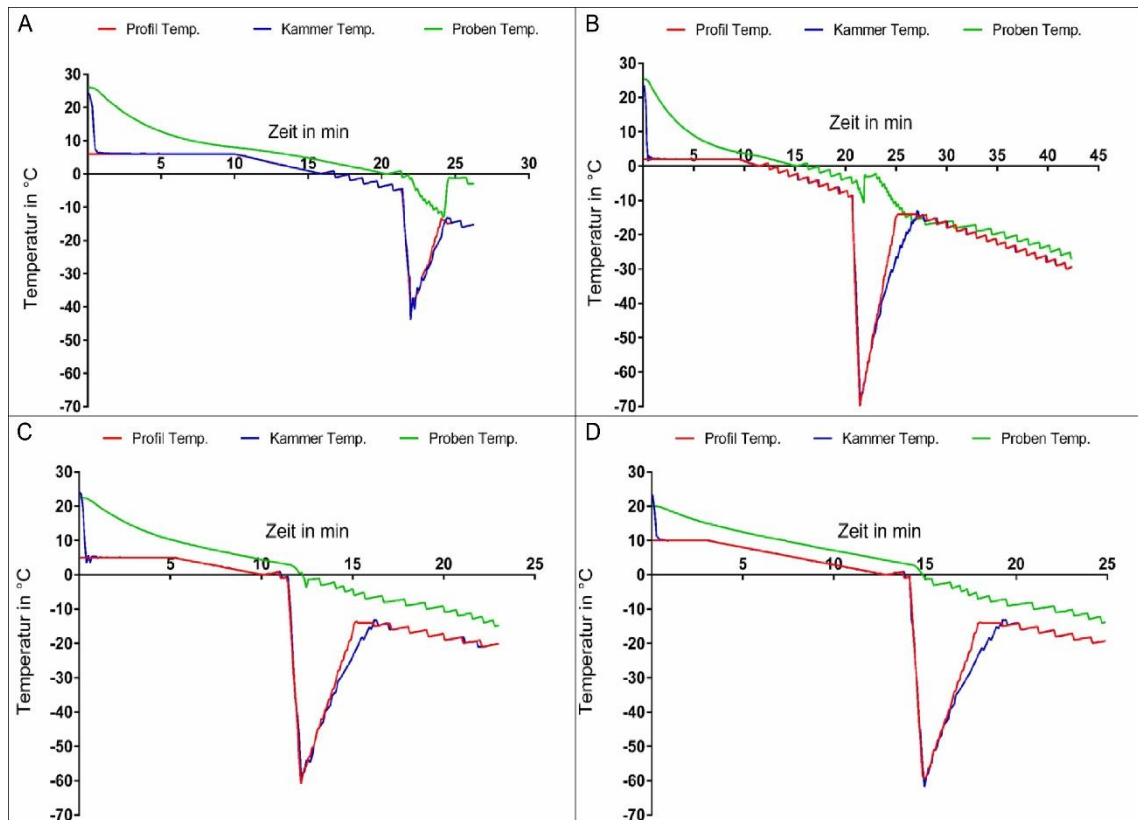


Abbildung 3.16 Verlauf der Optimierung des Einfrierprofils

Die Abbildung zeigt exemplarisch vier Läufe der Optimierung mit den größten Einflüssen auf die Optimierung. Bild A zeigt die Anfangsbedingungen. Es ist deutlich ein großer Temperatursprung in der Proben temperatur (grün) über einen Zeitraum von ca. 3 min zu erkennen. In Bild B fällt der Temperatursprung deutlich geringer aus durch Anpassungen der Profilttemperaturen (rot). In Bild C ist der Temperatursprung nur noch gering ausgeprägt und der gesamte Verlauf wurde so angepasst, dass sich ein linearer Verlauf ergibt. In Bild D ist das Endergebnis dargestellt. Der vordere Bereich des Profils wurde weiter angepasst, um einen noch lineareren Verlauf der Proben temperatur zu gewährleisten.

Für die Optimierung des Einfrierprofils wurden mehrere Durchläufe mit verschiedenen Einstellungen gefahren. Die Abbildung 3.16 zeigt exemplarisch den Verlauf der Optimierung und die vorhandenen Probleme. Es ist in jedem Bild die Profiltemperatur (rot), die Temperatur der Kühlkammer (blau) und die tatsächliche Proben temperatur (grün) dargestellt. In Bild A wurde die Probe schnell auf 8°C heruntergekühlt und im Anschluss kontinuierlich mit $1 \frac{^{\circ}\text{C}}{\text{min}}$ auf -1°C abgekühlt. Ab ca. 21 min wird die Kammertemperatur stark abgesenkt, um die Kristallisationswärme zu kompensieren. Dadurch sinkt ebenfalls die

Probentemperatur und steigt nach ca. 24 min um 10 °C an. Die Aufgabe war es diesen Temperatursprung so klein wie möglich zu gestalten.

Zu diesem Zweck wurde die Temperatur während der Kristallisation von -50 °C auf -70 °C gesenkt (Bild B). Des Weiteren wurde die Probe schnell auf 4 °C abgekühlt und dann kontinuierlich mit $1 \frac{^{\circ}\text{C}}{\text{min}}$ auf -5 °C abgekühlt. In Bild B ist zu erkennen, dass der Temperatursprung deutlich geringer ausfällt. Die Zeitspanne zwischen dem Absinken der Probentemperatur und der Kristallisation ist mit ca. 1 min deutlich geringer als in Bild A. Nach dem Temperatursprung ist zu erkennen, dass die Probentemperatur schneller als $1 \frac{^{\circ}\text{C}}{\text{min}}$ sinkt. Dies ist ebenfalls ein nicht erwünschtes Verhalten.

Um einen lineareren Verlauf im vorderen und hinteren Teil des Prozesses zu erreichen, wurde die Probe in der Folge schnell auf 10 °C abgekühlt und dann kontinuierlich mit $1 \frac{^{\circ}\text{C}}{\text{min}}$ auf 3 °C weiter gekühlt. Mit Erreichen der Temperatur wurde die Kammer auf -60 °C runtergekühlt. Es ist zu erkennen, dass sich nur ein sehr kleiner Temperatursprung von ca. 2 °C einstellt. Im weiteren Verlauf nimmt die Probentemperatur mit $1 \frac{^{\circ}\text{C}}{\text{min}}$ weiter ab.

Um einen noch lineareren Verlauf des Probenprofils zu erreichen wurde die Probe lediglich auf 15 °C schnell abgekühlt und anschließend mit $1 \frac{^{\circ}\text{C}}{\text{min}}$ kontinuierlich auf 3 °C weiter gekühlt. Es ist deutlich zu erkennen, dass sich das Probenprofil nahezu linear verhält. Auch während der Kristallisation ist nur ein geringer Temperaturanstieg von 1 °C zu erkennen.

3.8.2 Herstellung von Cryo-Platten

Bei Cryo-Platten (CP) handelt sich um 96-well Platten auf denen Zellen direkt eingefroren werden. Das Prinzip der CP wurde bereits mit dem EROD-Assay der Firma acCELLerate GmbH für H4IIE Zellen etabliert. Dieses Prinzip wurde hier auf L-929 Zellen übertragen. Für die Herstellung und das Auftauen von CP siehe Abschnitt 2.1.1 bzw. Abschnitt 2.1.3. Mit den so hergestellten Platten wurde der Biokompatibilitätsnachweis wie in Abschnitt 3.7 durchgeführt.

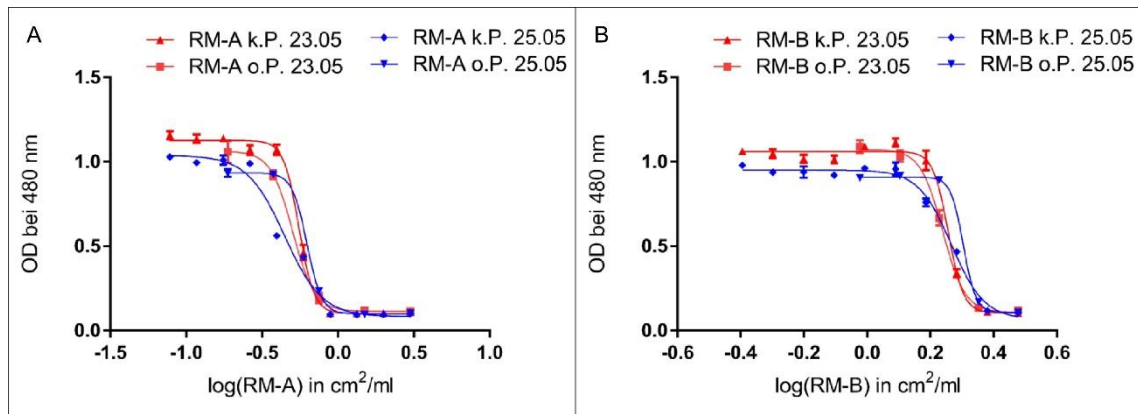


Abbildung 3.17 Vergleich von Cryo-Platte mit neuem Pipettierschema gegen parallel gelaufenes altes Pipettierschema

Die Abbildung zeigt die Regression der Verdünnungsreihen für RM-A und RM-B. Es wurde die optische Dichte bei 480 nm gegen den dekadischen Logarithmus der Konzentration in $\frac{\text{cm}^2}{\text{ml}}$ aufgetragen. Für die CP wurde das optimierte Pipettierschema verwendet. Zum Vergleich zeigt die Abbildung für beide Versuche einen parallel gelaufenen Versuch mit dem klassischen Pipettierschema. Für den Versuch 23.05 (rot) zeigen die Verläufe sowohl für RM-A als auch RM-B einen nahezu identischen Verlauf. Für den Versuch 25.05 (blau) ist ein deutlicherer Unterschied zwischen dem optimierten und klassischen Pipettierschema zu erkennen. Die Regression des optimierten Pipettierschemas zeigt einen steileren Verlauf.

In Abbildung 3.17 ist ein Vergleich von klassischem Pipettierschema zu optimiertem Pipettierschema dargestellt. Für das optimierte Pipettierschema wurden Cryo-Platten verwendet. Der Versuch 23.05 zeigt für beide Referenzmaterialien einen nahezu identischen Verlauf für das klassische, wie das optimierte Pipettierschema. Der Versuch 25.05 zeigt für beide RM einen deutlichen Unterschied zwischen dem optimierten und klassischen Pipettierschema. Die optimierte Variante weist einen steileren Verlauf im Vergleich zum klassischen Schema auf.

Tabelle 3.14 Vergleich von Cryo-Platte mit neuem Pipettierschema gegen parallel gelaufenes klassisches Pipettierschema mit Zellen aus *Cryovial*

In der nachfolgenden Tabelle sind die IC50-Werte in $\frac{\text{cm}^2}{\text{ml}}$ für die nicht lineare Regression sowie die Z-Faktoren dargestellt.

Experiment	IC50-Wert in $\frac{\text{cm}^2}{\text{ml}}$				Z-Faktor			
	RM-A		RM-B		RM-A		RM-B	
	o.P.	k.P.	o.P.	k.P.	o.P.	k.P.	o.P.	k.P.
23.05	0,5028	0,5525	1,732	1,805	0,82	0,90	0,83	0,95
25.05	0,6241	0,4458	2,012	1,846	0,92	0,93	0,94	0,96

Dieses Verhalten ist ebenfalls in den IC50-Werten für die Versuche zu erkennen. Für den Versuch 23.05 liegen die IC50-Werte der beiden Experimente für beide RM auf einem ähnlichen Niveau. Für RM-A liegen die Werte bei $0,5028 \frac{\text{cm}^2}{\text{ml}}$ und $0,5525 \frac{\text{cm}^2}{\text{ml}}$. RM-B weist Werte von $1,732 \frac{\text{cm}^2}{\text{ml}}$ mit dem optimierten Schema und $1,805 \frac{\text{cm}^2}{\text{ml}}$ für das klassische Schema auf. Im Versuch 25.05 kann der Unterschied der Verläufe auch im IC50-Wert deutlich erkannt werden. RM-A weist Werte von $0,6241 \frac{\text{cm}^2}{\text{ml}}$ und $0,4458 \frac{\text{cm}^2}{\text{ml}}$ für das optimierte und klassische Schema auf. Für RM-B ist eine ähnlich starke Abweichung zwischen den beiden Schemen zu erkennen mit Werten von $2,012 \frac{\text{cm}^2}{\text{ml}}$ und $1,846 \frac{\text{cm}^2}{\text{ml}}$. Die Z-Werte liegen für alle Versuche im exzellenten Bereich. Für das Experiment 23.05 sind die Z-Faktoren für das optimierte Schema minimal schlechter, verglichen mit den übrigen Werten.

3.8.3 Einfrieren von Zellen in reduziertem Volumen

Diese Experimentreihe wurde mit L-929, V79 und NFS-60 Zellen durchgeführt. Die Zellen wurden wie in Abschnitt 2.1.3 eingefroren. Für die Experimente wurden die Zellen wie in Abschnitt 2.1.1 aufgetaut. Um die Vitalität und Sterilität zu überprüfen wurden für alle Zellen sowohl Auftaukontrollen (Abschnitt 2.1.4) als auch ein PCA wie in Abschnitt 2.1.5 durchgeführt. Eine *Proliferative Capacity* (PC) zwischen 115 % und 85 % sind als gut zu bewerten.

3.8.3.1 L-929 Zellen

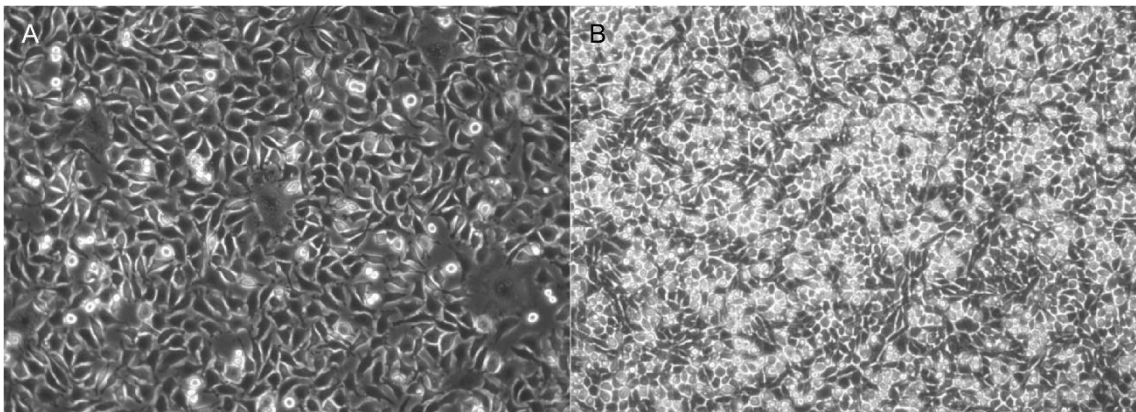


Abbildung 3.18 Beispiel einer Auftaukontrolle von L-929 Zellen

Die Abbildung zeigt beispielhaft eine Auftaukontrolle von L-929 Zellen. Bild A zeigt die Zellen nach 24 h und Bild B nach 96 h. Das Bild A zeigt, dass die Zellen äußerst vital sind und ihre typische Morphologie ausgebildet haben. Es liegt eine sterile Probe vor. In Bild B ist zu erkennen, dass die Zellen einen sehr dicht gepackten Zellrasen gebildet haben und die Probe weiterhin steril ist. Die Bilder wurden mit einer 100-fachen Vergrößerung und Phasenkontrast aufgenommen (Bild: Focke L. 2018).

Die Abbildung 3.18 zeigt die Auftaukontrolle der L-929 Zellen. In Bild A sind die Zellen nach einer Inkubation von 24 h zu sehen. Die Zellen sind vital und haben ihre typische Morphologie ausgebildet. Des Weiteren ist keine Kontamination zu diesem Zeitpunkt zu erkennen. Nach 96 h liegt weiterhin keine Kontamination in dem Kulturgefäß vor. Die Zellen haben nach vier Tagen einen sehr dichten Zellrasen gebildet.

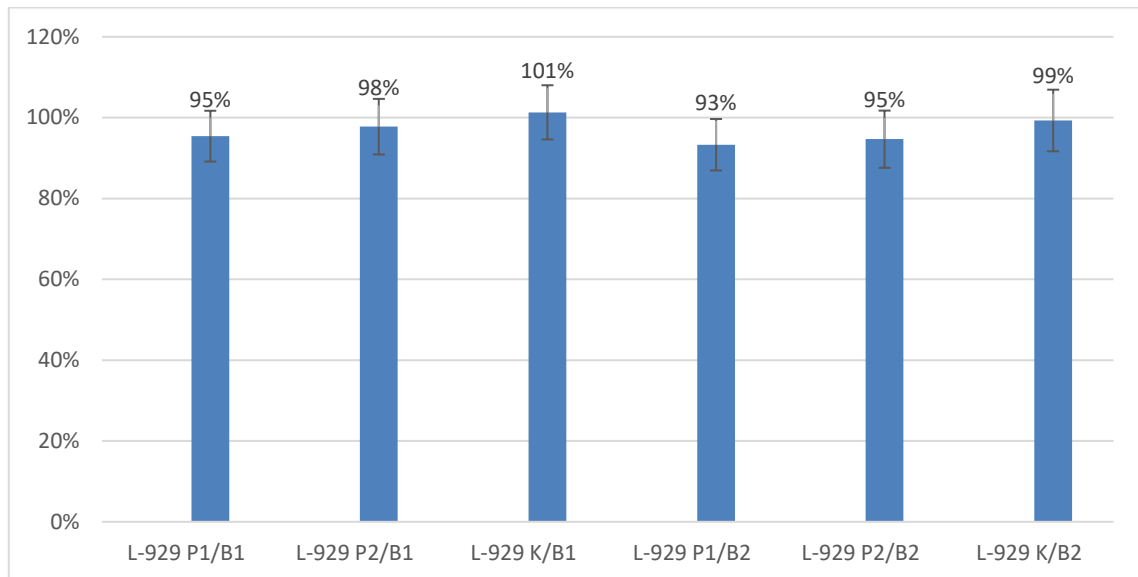


Abbildung 3.19 PCA der L-929 Zellen

Die Abbildung zeigt den PCA von L-929 Zellen. Dargestellt ist der PC-Wert in Prozent. Es wurden zwei unabhängige Einfrierexperimente B1 und B2 durchgeführt. Es wurden jeweils zwei Proben (P1, P2) mit reduziertem Einfriervolumen (200 µl) und eine Kontrolle (K) mit 1,8 ml Einfriervolumen dargestellt. Es ist zu erkennen, dass die Kontrollen in beiden Fällen einen PC-Wert von 101 % und 99 % aufweisen. Die Proben mit reduziertem Volumen liegen mit ihren PC-Werten nur minimal unter dem Wert von 100 %. Die Fehlerbreite ist für alle Proben sowie Kontrollen mit $\pm 6-7$ % konstant.

Der PCA wurde für zwei unabhängige Einfrierbatches durchgeführt. Für beide Batches wurden zwei Proben mit 200 µl und eine Kontrolle mit 1,8 ml Einfriermedium hergestellt. In Abbildung 3.18 ist das Ergebnis des PCA dargestellt. Es ist zu erkennen, dass die Kontrollen einen optimalen PC-Wert von 99 % bzw. 101 % aufweisen. Die Proben mit reduziertem Volumen weisen PC-Werte zwischen 93 % und 98 % auf. Die Fehlerbreite ist für alle Proben sowie für die Kontrollen mit $\pm 6-7$ % konstant.

3.8.3.2 V-79 Zellen

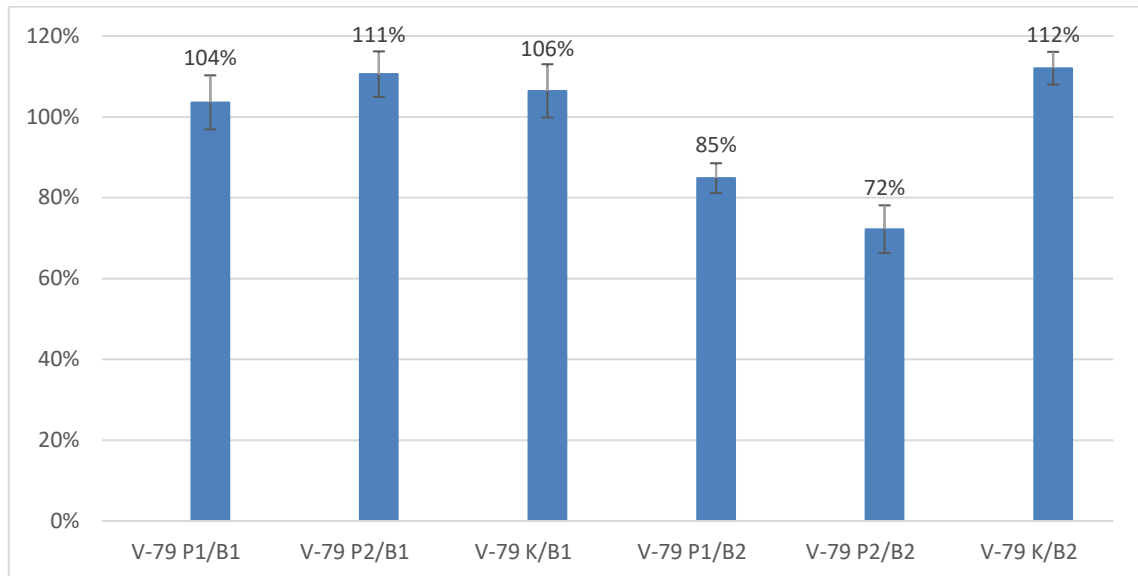


Abbildung 3.20 PCA der V-79 Zellen

Die Abbildung zeigt den PCA von V-79 Zellen. Dargestellt ist der PC-Wert in Prozent. Es wurden zwei unabhängige Einfrierexperimente B1 und B2 durchgeführt. Es wurden jeweils zwei Proben (P1, P2) mit reduziertem Einfriervolumen (200 µl) und eine Kontrolle (K) mit 1,8 ml Einfriervolumen dargestellt. Zwischen Batch 1 und Batch 2 ist für die Proben mit reduziertem Volumen ein deutlicher Unterscheid zwischen den PC-Werten zu erkennen. Das erste Batch liegt im Vergleich zu der Kontrolle in einem guten Bereich, während das zweite Batch mit PC-Werten von 85 % und 72 % deutlich schlechter ist als die zugehörige Kontrolle mit 112 %.

Der PCA wurde für zwei unabhängige Einfrierbatches durchgeführt. Für beide Batches wurden zwei Proben mit 200 µl und eine Kontrolle mit 1,8 ml Einfriermedium hergestellt. In Abbildung 3.20 ist das Ergebnis des PCA dargestellt. Es ist zu erkennen, dass sich im ersten Batch die Proben mit reduziertem Volumen identisch zu der Kontrolle mit 1,8 ml Einfriervolumen verhalten. Die Probe P1 weist einen PC-Wert von 104 % und P2 von 111 % auf. Die Kontrolle liegt mit 106 % zwischen den beiden Werten. Das zweite Batch zeigt deutliche Abweichungen. Die Proben P1 mit 85 % und P2 mit 72 % liegen deutlich unterhalb des Wertes der Kontrolle mit 112 %. Die Kontrollen liegen für beide Einfrierversuche auf fast demselben Niveau. Die Fehlerbreite ist für das erste Batch ein wenig größer mit $\pm 6-7\%$ im Vergleich zum zweiten Batch mit $\pm 4-6\%$.

3.8.3.3 NFS-60 Zellen

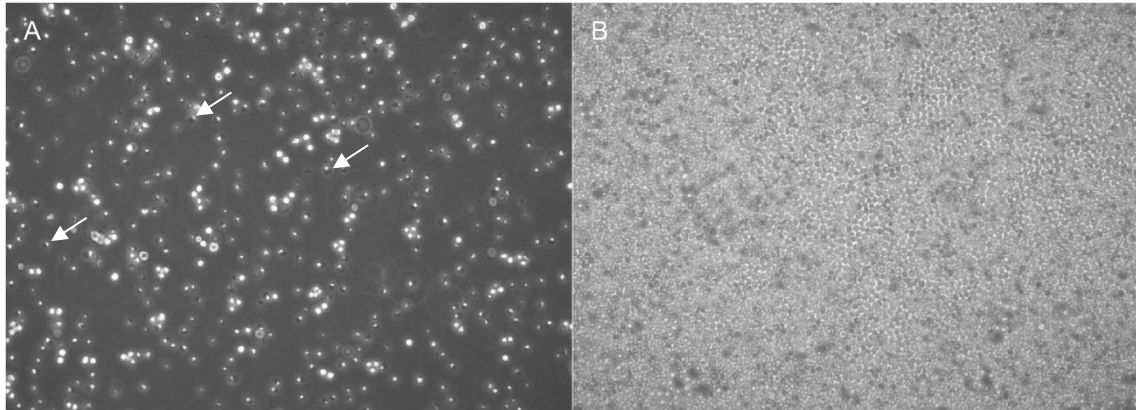


Abbildung 3.21 Beispiel einer Auftaukontrolle von NFS-60 Zellen

Die Abbildung zeigt beispielhaft eine Auftaukontrolle von NFS-60 Zellen. In Bild A sind die Zellen nach 24 h Inkubation zu sehen. Es ist zu erkennen, dass ein Großteil der Zellen deutlich gestresst vorliegt (weiße Pfeile). Nur wenige Zellen zeigen die typische kreisrunde hell leuchtende Morphologie. Bild B zeigt die Zellen nach 96 h Inkubation. Es ist eine sehr hohe Zelldichte zu erkennen, es liegen keine Zwischenräume mehr vor. In beiden Bildern ist keine Kontamination zu erkennen. Die Bilder wurden mit einer 100-fachen Vergrößerung und Phasenkontrast aufgenommen (Bild: Focke L. 2018).

Die Abbildung 3.21 zeigt die Auftaukontrolle nach 24 h (Bild A) und 96 h (Bild B) Inkubation. In Bild A ist zu erkennen, dass sich ein Großteil der Zellen nach 24 h in einem gestressten Zustand befindet. Das Zellinnere ist auf eine Seite der Zelle verlagert. Nur ein geringer Teil scheint komplett vital zu sein. Nach 96 h (Bild B) ist ein starkes Zellwachstum zu erkennen. Die Zellen liegen dicht gepackt in der Kulturflasche vor. Des Weiteren ist auch nach 96 h keine Kontamination im Kulturgefäß zu erkennen.

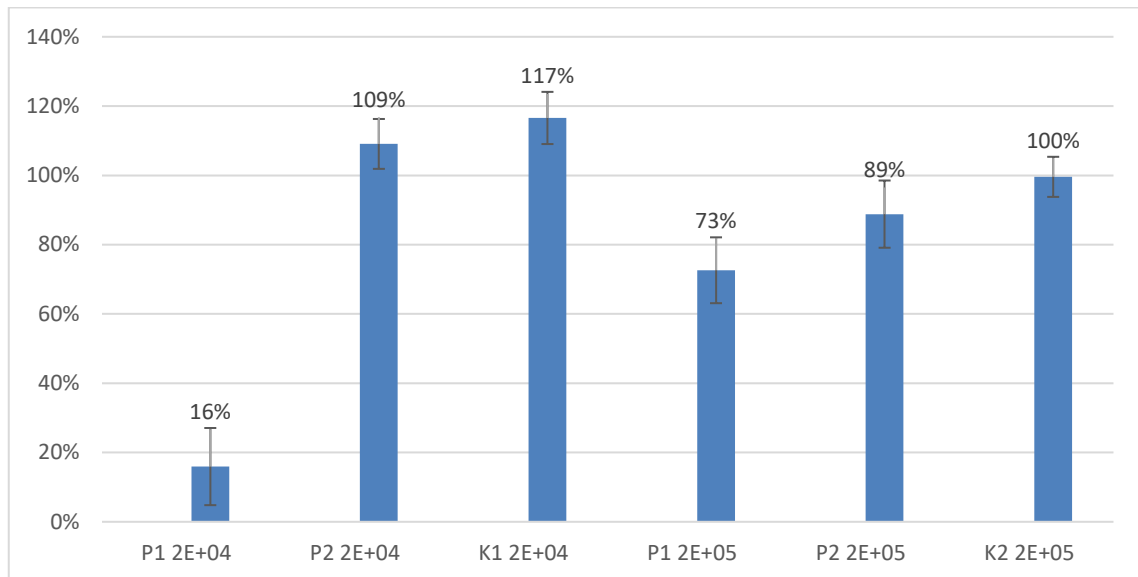


Abbildung 3.22 PCA der NFS-60 Zellen

Die Abbildung zeigt den PCA von NFS-60 Zellen. Dargestellt ist der PC-Wert in Prozent. Es wurden jeweils zwei Proben (P1, P2) mit reduziertem Einfriervolumen (200 μ l) und eine Kontrolle (K) mit 1,8 ml Einfriervolumen dargestellt. Es wurden je 200 μ l mit $2E+04 \frac{c}{well}$ und mit $2E+05 \frac{c}{well}$ eingesät und verglichen. Für die Kontrolle wurde ebenso verfahren. Es ist zu erkennen, dass zwischen den beiden Einsaatdichten deutliche Unterschiede vorliegen. Die Kontrolle weicht ebenfalls um fast 20 % ab.

Für die Suspensionszelllinie NFS-60 zeigt der PCA stark schwankende PC-Werte. Es wurden zwei Einsaatdichten miteinander verglichen. Es wurden je 200 μ l mit $2E+04 \frac{c}{well}$ und mit $2E+05 \frac{c}{well}$ eingesät. Für P1 liegt der PC-Wert bei 16 % für einer Einsaatdichte von $2E+04 \frac{c}{well}$ und bei 73 % für eine Einsaatdichte von $2E+05 \frac{c}{well}$. Beide Einsaatdichten zeigen im Vergleich zur Kontrolle einen deutlich schlechteren Wert. Für P2 liegen die PC-Werte mit 109 % bei einer Einsaatdichte von $2E+04 \frac{c}{well}$ und 89 % bei einer Einsaatdichte von $2E+05 \frac{c}{well}$ in einem deutlich besseren Bereich. Die zugehörigen Kontrollen zeigen für $2E+04 \frac{c}{well}$ einen PC-Wert von 117 % und für $2E+05 \frac{c}{well}$ einen Wert von 100 %.

4 Diskussion

Im Rahmen dieser Arbeit sollte ein Biokompatibilitäts-Assay für die Testung von Medizinprodukten entwickelt werden. Zu diesem Zweck wurden zunächst drei, von der ISO 10993 vorgegebene, Referenzmaterialien auf der Grundlage des bereits vermarkteten Zytotox-Assays der Firma acCELLerate etabliert. Das Ergebnis in Abbildung 3.1 zeigt zum Teil das erwartete Ergebnis. Das Material RM-A weist den stärksten toxischen Effekt, RM-B einen weniger toxischen Effekt und RM-C keinen Effekt mehr auf. Für RM-A konnte eine Regression aufgrund der Verdünnungen C1 und C2 im stark toxischen Bereich durchgeführt werden. Für RM-B war dies nicht der Fall. Mit nur einem Messpunkt im stark toxischen Bereich liefert die Regression unzuverlässige und falsche Werte. Der IC-Wert von $3,220 \frac{\text{cm}^2}{\text{ml}}$ liegt oberhalb der höchsten Konzentration, welche in dem Experiment eingesetzt wurde. Daher wurde in der Folge die Verdünnungsstrategie von einer 1:2 Verdünnung auf eine 1:1,5 Verdünnung umgestellt.

Zwischen den beiden Ergebnissen ist ebenfalls ein Unterschied von ca. 10.000 RFU in der maximalen Absorption zu erkennen. Dies ist höchstwahrscheinlich auf einen Wechsel der Resazurinlösung zurückzuführen. Zwischen den beiden Experimenten wurde die Lösung aufgrund von Verbrauch frisch angesetzt. Ein Wechsel des Resazurinbatches sollte daher vermieden werden. Ebenfalls muss darauf geachtet werden, dass die Lösung nicht zu häufig auf- und abgetaut wird, da auch dies einen negativen Einfluss auf die Stabilität der Lösung haben kann.

Um die Vorgaben der ISO 10993 umzusetzen und einen direkten Kontakt der Zellen mit dem Materialextrakt zu ermöglichen, wurde die Adhärenzzeit der L-929 Zellen überprüft. Die Abbildung 3.3 zeigt den Verlauf der Adhärenz. Es wurde festgestellt, dass die Zellen bereits nach 45 min adhären sind. Um eine gewisse Sicherheit zu generieren, wurde eine Adhärenzzeit von 60 min festgelegt. Nach dieser Zeit kann das Medium über den Zellen problemlos mit einer Pipette abgenommen werden. Durch dieses Vorgehen konnte die Assayzeit erheblich verkürzt werden. Hier weicht das Vorgehen von dem in der ISO-Norm empfohlenen Vorgehensweise ab. In Anhang D der Norm wird empfohlen die Zellen für 24 h in der 96-well Platte zu inkubieren, bevor der Prüfmusterextrakt hinzugegeben wird (DIN-EN-ISO 10993).

Im nächsten Schritt wurde der Extrakt während des Assays direkt auf die Zellen aufgebracht. Die Abbildung 3.5 zeigt den Effekt der veränderten Verdünnungsstrategie. Für RM-A sind die Verdünnungen nun optimal über den gesamten Toxizitätsbereich verteilt. Für RM-B ist so ebenfalls gelungen, dass die Verdünnung C2 im stark toxischen Bereich liegt und somit eine Regression durchführbar ist. Die Doppelbestimmung liefert ein nahezu identisches Ergebnis, was auf eine gute Reproduzierbarkeit der Ergebnisse hindeutet. Dies ist in den IC50-Werten ebenfalls zu erkennen (siehe Tabelle 3.4). Um für RM-B ebenfalls eine bessere Verteilung über den Toxizitätsbereich zu erlangen, wurde die Verdünnungsstrategie erneut von einer 1:1,5 Verdünnungsreihe auf eine 1:1,25 Verdünnungsreihe geändert. Die Abbildung 3.8 zeigt das Ergebnis der Änderung. Die Steigung der Regression ist deutlich flacher als in Abbildung 3.5. Damit ist eine genauere Bestimmung des IC50-Wertes möglich.

In der Folge wurden der Effekt einer Sterilfiltration und der Effekt einer serumfreien Extraktion des RM auf das Testergebnis überprüft. Durch die Sterilfiltration in Abschnitt 3.3.1 konnte gezeigt werden, dass sich für beide RM die Toxizität in den weniger toxischen Bereich verschiebt. Die ermittelten IC50-Werte aus Tabelle 3.5 liegen deutlich unter den zuvor bestimmten Werten aus Abschnitt 3.3. Die ISO 10993 gibt vor, dass sich durch die Sterilisation des Prüfmusters die Eigenschaften des Prüfmaterials nicht ändern dürfen (DIN-EN-ISO 10993). Aus diesem Grund ist eine Sterilfiltration des Extraktes keine zur Verfügung stehende Sterilisationsmethode. Daher wurde weiter auf den Einsatz von Penicillin/Streptomycin für einen sterilen Extrakt gesetzt.

Da die Zusammensetzung von Kulturseren häufig nicht genau definiert ist und diese auch einen hohen Kostenfaktor darstellen, wurde untersucht, ob der Einsatz von Serum im Medium während der Extraktion und somit auch im Assay vermieden werden kann. Die Ergebnisse aus Abschnitt 3.3.2 zeigen allerdings, dass der Verzicht von Serum im Assay-/Extraktionsmedium zu einer unerwünschten Verschiebung der Toxizität in den nicht toxischen Bereich führt. Die ISO 10993 bevorzugt den Einsatz von Kulturmedium mit Serum für die Extraktion, da dieses Medium in der Lage ist polare sowie unpolare Substanzen zu extrahieren und zusätzlich das Zellwachstum fördert (DIN-EN-ISO 10993). Daher wurde entschieden, Serum für die weitere Entwicklung des Assays zum Kulturmedium hinzuzugeben.

Um den Assay weiter an die ISO Norm anzupassen wurde im nächsten Schritt das Resazurin durch XTT zur Ermittlung der Zytotoxizität ersetzt. Die Tabelle 3.8 zeigt das die IC50-Werte für die Versuche mit XTT mit den zuvor ermittelten Werten mit Resazurin korrelieren. In den Protokollen für den XTT-Assay wird empfohlen der XTT-Lösung die Substanz PMS zuzusetzen, um einen besseren Umsatz des XTT zu gewährleisten. Der Effekt des PMS auf die Reaktion wurde in Abschnitt 3.4.1 untersucht. Die Abbildung 3.10 zeigt deutlich, dass auf PMS in der Lösung nicht verzichtet werden kann. Die maximale Absorption für RM-A und RM-B beträgt lediglich ca. 15 % des Wertes aus Abschnitt 3.4. Auch innerhalb der Triplikate treten deutliche Abweichungen auf (RM-B). Für einen reproduzierbaren Verlauf der Regression ist der Zusatz von PMS somit unerlässlich.

Für eine Vermarktung der Assays ist die Stabilität der Extraktlösungen von entscheidender Bedeutung. Zu diesem Zweck wurde ein Extraktansatz aliquotiert und bei unterschiedlichen Temperaturen gelagert. Die Abbildung 3.11 zeigt den Verlauf der Regression für die unterschiedlichen Temperaturniveaus nach sechs Wochen. Es ist zu erkennen, dass der Extrakt nur bei -20 °C den erwarteten Verlauf aufweist. Dies wird ebenfalls in den IC50-Werten (Tabelle 3.10) bestätigt. Die Werte liegen für beide RM zwar ein wenig unter dem erwarteten Wert, weichen allerdings für RM-A lediglich um ca. 2 % und für RM-B um ca. 6 % vom Methodenmittelwert ab. Der Wiederholungsversuch nach acht Wochen (Abbildung 3.12) stützt die Annahme, dass die Extrakte für mindestens acht Wochen bei -20 °C ohne Qualitätsverlust gelagert werden können. Da auch hier für beide RM die Abweichung zum Methodenmittelwert unter 4 % liegt.

In Abschnitt 3.6 wurde überprüft, ob sich ARC genauso gut bzw. besser im Assay verhalten als frische Zellen aus einer laufenden Kultur. Dieser Nachweis ist für die spätere Vermarktung des Kits von herausragender Bedeutung. Die Abbildung 3.13 zeigt, dass sich die ARC verglichen mit den frischen Zellen im Assay gleich verhalten. Für RM-A liegt bei den frischen Zellen ein Ausreißer in der Verdünnung C5 vor, daher wird der IC50-Wert deutlich in den toxischen Bereich verschoben (Tabelle 3.12). In dieser Doppelbestimmung konnte gezeigt werden, dass sich ARC im Assay mindestens genauso gut verhalten wie frische Zellen aus einer laufenden Kultur.

Für ein besseres Handling des Assays wurde das Pipettierschema optimiert. Die Abbildung 3.15 vergleicht dazu optimiertes und klassisches Pipettierschema. Die

ISO Norm verlangt für die Verdünnungsreihe der Extrakte lediglich vier Messpunkte, dies ist mit fünf Punkten hier mehr als erfüllt (DIN-EN-ISO 10993). Es konnte in einer Doppelbestimmung gezeigt werden, dass das optimierte Pipettierschema prinzipiell die gleichen IC50-Werte liefert wie ein parallel gelaufenes klassisches Schema. Allerdings sollten vor einer endgültigen Umstellung noch weitere Versuche erfolgen inwieweit diese Ergebnisse reproduzierbar sind, da sich durch die angepasste Verdünnungsreihe auch die Schrittbreite zwischen den Messpunkten erhöht hat. Dies kann zu einer ungenaueren Bestimmung des IC50-Wertes beitragen. Eine weitere Möglichkeit der Optimierung des Handlings stellen die Cryo-Platten aus Abschnitt 3.8.2 dar. Es konnte gezeigt werden, dass sich L-929 Zellen ebenfalls in einem kleinen Volumen direkt in einer 96-well Platte einfrieren lassen und sich diese nach dem Auftauen im Assay genauso verhalten wie herkömmliche ARC (siehe Abbildung 3.17).

In den Abschnitten 3.6, 3.7 und 3.8.2 fällt auf, dass die IC50-Werte stark schwanken. Dies ist wahrscheinlich auf die Einführung eines neuen Referenzmaterials zurückzuführen. In den vorherigen Experimenten lag das Referenzmaterial als in 2x15 mm vorgeschchnittene Stifte vor. Ab Abschnitt 3.6 wurde Material in einer 10x15 mm (RM-A und RM-B) bzw. 3x10 mm (RM-C) Platte benutzt. Die schwankenden IC50-Werte werden möglicherweise durch Inhomogenitäten innerhalb des Materials hervorgerufen oder durch Abweichungen in der Dicke der Platte. Die Schwankungen können ebenfalls durch Anwenderfehler beim Ausschneiden des Materials zu erklären sein. Bei dem Ausmaß der Schwankungen ist dies allerdings eher unwahrscheinlich. Um eine Reproduzierbarkeit der Ergebnisse zu generieren sollte eine Stabilitätskontrolle der Extrakte über einen Zeitraum von zwei Jahren durchgeführt werden. Sollte die Stabilität gewährleistet sein, wäre es sinnvoll das gesamte Material zeitgleich zu extrahieren und aliquotiert zu lagern.

In Abschnitt 3.8 konnte gezeigt werden, dass sich durch die ideale Wahl des Kammertemperaturprofils die Linearität der Einfrierkurve der Probe optimieren lässt. Um die Kristallisation der Zellsuspension auszulösen und gleichzeitig die entstehende, für die Zellen schädliche, Kristallisationswärme abzufangen, war es günstig ein starkes Abkühlen der Kammer bei einer Proben temperatur von 3 °C einzuführen. Es zeigte sich, dass durch dieses Vorgehen kaum noch Kristallisationswärme entsteht und sich die Temperatur der Zellsuspension auch

während des Gegenkühlens nur mit $1 \frac{^{\circ}\text{C}}{\text{min}}$ weiter abkühlt. Diese Abkühlrate wird als ideal angesehen und das Profil daher bis $-40 \text{ }^{\circ}\text{C}$ weiter mit $1 \frac{^{\circ}\text{C}}{\text{min}}$ gefahren.

Um das allgemeine Handling mit ARC zu optimieren, wurde in Abschnitt 3.8.3 überprüft, wie sich neben den verwendeten L-929 Zellen auch empfindliche Zellen wie NFS-60 oder gängige Linien wie die V-79 bezüglich ihrer Proliferationskapazität verhalten, wenn das Einfriervolumen von 1,8 ml auf 200 μl reduziert wird. Es konnte gezeigt werden, dass sich eine Reduktion des Volumens für L-929 nicht negativ auf ihre Proliferation auswirkt. Die Proben mit reduziertem Volumen weisen alle eine PC-Wert von über 90 % auf und sind damit als sehr gut zu bewerten. Für die V-79 Zellen konnte kein eindeutiges Ergebnis ermittelt werden, die Zellen aus Batch 1 zeigen ein sehr positives Ergebnis wohingegen die Zellen aus Batch 2 den PCA Assay nicht bestanden haben. Für die NFS-60 Zellen zeigt sich ein noch schlechteres Bild. Es scheint als liefere eine Einsaatdichte von $2\text{E}+05 \frac{\text{c}}{\text{well}}$ konstantere Ergebnisse, allerdings liegen auch hier die PC-Werte nicht im optimalen Bereich. Für diesen Zelltyp konnte bereits in der Auftaukontrolle erkannt werden, dass das Einfrieren in einem reduzierten Volumen zu erhöhtem Stress für die Zellen führt (siehe Abbildung 3.21). Insgesamt lässt sich sagen, dass es für robuste Zellen wie L-929 möglich scheint das Volumen zu reduzieren ohne einen Qualitätsverlust zu erhalten. Allerdings zeigen die Ergebnisse von V-79 und NFS-60, dass dies nicht für alle Zellen gilt. Hier wäre es sinnvoll die Experimente mit weiteren Zelllinien zu wiederholen und evtl. Prozessschritte wie das Auftauen der Zellen zu optimieren.

5 Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein Biokompatibilitäts-Assay für die Testung von Medizinprodukten bis zur Marktreife entwickelt. Zu diesem Zweck wurde auf einem bereits bestehenden Assay aufgebaut und dieser an die ISO Norm 10993 angepasst. Dafür wurden die Referenzmaterialien RM-A, RM-B und RM-C etabliert und die Ermittlung der Zytotoxizität von Resazurin auf XTT umgestellt. Durch die Optimierung der Adhärierungszeit von L-929 Zellen konnte die Assayzeit um 24 h verkürzt werden. Dies stellt einen erheblichen Vorteil gegenüber dem von der ISO Norm vorgeschlagenem Protokoll dar. Für den später vermarkteten Kit werden Assay Ready Cells (ARC) genutzt. Es konnte gezeigt werden, dass sich diese im Assay genauso verhalten wie frische Zellen aus einer laufenden Kultur. Des Weiteren wurde das vorher gängige Pipettierschema optimiert, um eine effizientere Nutzung der 96-well Platten zu ermöglichen.

Für die generelle Verbesserung in der Herstellung von ARC wurde das Einfrierprotokoll optimiert. Hierbei lag der Fokus auf der Eliminierung des Auftretens von Kristallisationswärme und somit einem linearen Verlauf der Einfrierkurve der Probenlösung. Dies konnte durch ein früheres Herbeiführen der Kristallisation umgesetzt werden. Des Weiteren wurde überprüft, ob es möglich ist die Zellen in einem reduzierten Volumen einzufrieren und somit den DMSO Verdünnungsschritt direkt im *Cryovial* und ohne Zentrifugation zu ermöglichen. Dies ist nur bedingt gelungen. Es konnte gezeigt werden, dass es für robuste Zelllinien wie L-929 möglich ist, allerdings wurden die Ergebnisse mit V-79 und NFS-60 Zellen nicht bestätigt.

6 Literaturverzeichnis

- Acker, J. P.; McGann, L. E.** (2003): Protective effect of intracellular ice during freezing? In: *Cryobiology* 46 (2), S. 197–202.
- Amann, R. P.; Pickett, B. W.** (1987): Principles of cryopreservation and a review of cryopreservation of stallion spermatozoa. In: *Journal of Equine Veterinary Science* 7 (3), S. 145–173.
- ATCC:** XTT Cell Proliferation Assay Kit. Online verfügbar unter <https://www.atcc.org/~media/56374CEEC36C47159D2040410828B969.ashx>, zuletzt geprüft am 20.07.2018.
- Berridge, M. V.; Herst, P. M.; Tan, A. S.** (2005): Tetrazolium dyes as tools in cell biology. New insights into their cellular reduction. In: *Biotechnology annual review* (11), S. 127–152.
- Best, B. P.** (2015): Cryoprotectant Toxicity. Facts, Issues, and Questions. In: *Rejuvenation research* 18 (5), S. 422–436.
- Borovanský, J.; Riley, P. A.** (1989): Cytotoxicity of zinc in vitro. In: *Chemico-biological interactions* 69 (2-3), S. 279–291.
- Brockbank, K.G.M.; Convault, J. C.; Taylor, M. J.** (2007): Cryopreservation Guide. Hg. v. Thermo Fischer. Online verfügbar unter <https://www.thermofisher.co.nz/Uploads/file/Scientific/Applications/Equipment-Furniture/Cryopreservation-Guide.PDF>, zuletzt geprüft am 20.07.2018.
- Cahn, R. W.; Haasen, P.** (1992): Medical and dental materials. Weinheim (Materials science and technology, 14).
- Cawkill, D.; Eaglestone, S. S.** (2007): Evolution of cell-based reagent provision. In: *Drug discovery today* 12 (19-20), S. 820–825.
- Chen, J. L.; Steele, T. W. J.; Stuckey, D. C.** (2018): Metabolic reduction of resazurin; location within the cell for cytotoxicity assays. In: *Biotechnology and bioengineering* 115 (2), S. 351–358.
- Csepregi, R.; Lemli, B.; Kunsági-Máté, S.; Szente, L.; Kőszegi, T.; Németi, B.; Poór, M.** (2018): Complex Formation of Resorufin and Resazurin with B-Cyclodextrins. Can Cyclodextrins Interfere with a Resazurin Cell Viability Assay? In: *Molecules (Basel, Switzerland)* 23 (2).
- DIN-EN-ISO 10993**, 24.03.2017: Biologische Beurteilung von Medizinprodukten.

- Earle, W. R.; Chief, C. V.** (1938): The Mode of Action of Methylcholanthrene on Cultures of Normal Tissues. In: *The American Journal of Cancer November* 34 (3), S. 373–390.
- Gstraunthaler, G.; Lindl, T.** (2013): Zell- und Gewebekultur. 7. Aufl. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- Kirkpatrick, C. J.; Bittinger, F.; Wagner, M.; Köhler, H.; van Kooten, T. G.; Klein, C. L.; Otto, M.** (1998): Current trends in biocompatibility testing. In: *Proceedings of the Institution of Mechanical Engineers. Part H, Journal of engineering in medicine* 212 (2), S. 75–84.
- Mazur, P.** (1963): Kinetics of Water Loss from Cells at Subzero Temperatures and the Likelihood of Intracellular Freezing. In: *The Journal of General Physiology* 47 (2), S. 347–369.
- Mazur, P.** (1984): Freezing of living cells. Mechanisms and implications. In: *The American journal of physiology* 247 (3 Pt 1), C125-42.
- McKenzie, D. A.** (1962): Milk Testing - A forward Look. In: *Int J Dairy Tech* 15 (4), S. 207–212.
- Mosmann, T.** (1983): Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival. Application to proliferation and cytotoxicity assays. In: *Journal of immunological methods* 65 (1-2), S. 55–63.
- Nakoinz, I.; Lee, M. T.; Weaver, J. F.; Ralph, P.** (1990): Differentiation of the IL-3-dependent NFS-60 cell line and adaption to growth in macrophage colony-stimulating factor. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 145 (3), S. 860–864.
- Paull, K. D.; Shoemaker, R. H.; Boyd, M. R.; Parsons, J. L.; Risbood, P. A.; Barbera, W. A.; Sharma, M. N.; Baker, D. C.; Hand, E.; Scudiero, D. A.; Monks, A.; Alley, M. C.; Grote, M.** (1988): The synthesis of XTT. A new tetrazolium reagent that is bioreducible to a water-soluble formazan. In: *Journal of Heterocyclic Chemistry* 25 (3), S. 911–914.
- Prasad, A. S.** (1979): Clinical, biochemical, and pharmacological role of zinc. In: *Annual review of pharmacology and toxicology* 19, S. 393–426.
- Public Health England.** Online verfügbar unter <https://www.phe-culturecollections.org.uk/>, zuletzt geprüft am 20.07.2018.

Sigma-Aldrich: Zink-Dibutyldithiocarbamat. Online verfügbar unter <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/cds000589?lang=de®ion=DE>, zuletzt geprüft am 20.07.2018.

Sigma-Aldrich: Zink-Diethyldithiocarbamat. Online verfügbar unter <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/329703?lang=de®ion=DE>, zuletzt geprüft am 20.07.2018.

Tominaga, H.; Ishiyama, M.; Ohseto, F.; Sasamoto, K.; Hamamoto, T.; Suzuki, K.; Watanabe, M. (1999): A water-soluble tetrazolium salt useful for colorimetric cell viability assay. In: *Anal. Commun.* 36 (2), S. 47–50.

Twigg, R. S. (1945): Oxidation-Reduction Aspects of Resazurin. In: *Nature* 155 (3935), S. 401–402.

Wang, S.; Yu, H.; Wickliffe, J. K. (2011): Limitation of the MTT and XTT assays for measuring cell viability due to superoxide formation induced by nano-scale TiO₂. In: *Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA* 25 (8), S. 2147–2151.

Weselsky, P. (1871): Ueber die Azoverbindungen des Resorcins. In: *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* 4 (2), S. 613–619.

Zhang, J. H.; Chung, T. D.; Oldenburg, K. R. (1999): A Simple Statistical Parameter for Use in Evaluation and Validation of High Throughput Screening Assays. In: *Journal of biomolecular screening* 4 (2), S. 67–73.

7 Anhang

7.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1 Schematische Darstellung einer Einfrierkurve mit auftretender Kristallisationswärme.....	6
Abbildung 1.2 Schematische Darstellung der Reduktion von Resazurin zu Resorufin.....	8
Abbildung 1.3 Reduktion von XTT zu seinem Formazansalz	9
Abbildung 1.4 Elektronentransport zur Reduktion von XTT	10
Abbildung 1.5 L-929 Zellen	11
Abbildung 1.6 NFS-60 Zellen	12
Abbildung 1.7 V-79 Zellen	13
Abbildung 1.8 Strukturformel von Zink-Diethyldithiocarbamat	14
Abbildung 1.9 Strukturformel von Zink-Dibutyldithiocarbamat	14
Abbildung 2.1 Pipettierschema für den Biokompatibilitäts-Assay	28
Abbildung 2.2 L-929 Zellen nach einer Stunde Inkubationszeit im <i>well</i>	30
Abbildung 3.1 Doppelbestimmung zur Etablierung der Referenzmaterialien	33
Abbildung 3.2 Etablierung der Referenzmaterialien: Bestimmung des IC50-Werts	34
Abbildung 3.3 Bestimmung der Adhärenzzeit von L-929 Zellen	36
Abbildung 3.4 Vergleich Ausschlagen gegen Abpipettieren des Mediums	38
Abbildung 3.5 Direkter Kontakt der Zellen mit 100 % Extrakt	40
Abbildung 3.6 Einfluss einer Sterilfiltration auf den Extrakt.....	41
Abbildung 3.7 Einfluss eines serumfreien Extraktionsmedium	43
Abbildung 3.8 Optimierung der Verdünnungsreihe für RM-B.....	44
Abbildung 3.9 Etablierung des XTT-Assay	46
Abbildung 3.10 XTT-Assay ohne PMS Einsatz	47
Abbildung 3.11 Stabilitätsprüfung der Referenzmaterialien	49
Abbildung 3.12 Vergleich von acht Wochen altem mit frisch angesetztem Extrakt	51
Abbildung 3.13 Vergleich von frischen Zellen und ARC	53
Abbildung 3.14 Etablierung eines optimierten Pipettierschemas	55
Abbildung 3.15 Vergleich optimiertes gegen klassisches Pipettierschema.....	56
Abbildung 3.16 Verlauf der Optimierung des Einfrierprofils	58
Abbildung 3.17 Vergleich von Cryo-Platte mit neuem Pipettierschema gegen parallel gelaufenes altes Pipettierschema	60
Abbildung 3.18 Beispiel einer Auftaukontrolle von L-929 Zellen.....	62
Abbildung 3.19 PCA der L-929 Zellen	63

Abbildung 3.20 PCA der V-79 Zellen.....	64
Abbildung 3.21 Beispiel einer Auftaukontrolle von NFS-60 Zellen.....	65
Abbildung 3.22 PCA der NFS-60 Zellen.....	66

7.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 2.1 Kulturmedium für L-929 Zellen.....	16
Tabelle 2.2 Kulturmedium für NFS-60 Zellen	16
Tabelle 2.3 Kulturmedium für V-79 Zellen	16
Tabelle 2.4 Kryomedium für L-929 Zellen.....	17
Tabelle 2.5 Kryomedium für NFS-60 Zellen	17
Tabelle 2.6 Kryomedium für V-79 Zellen	17
Tabelle 2.7 Übersicht der zu verwendenden Volumina in den T-Kulturflaschen	20
Tabelle 2.8 Verdünnungsreihen für die Referenzmaterialien.....	29
Tabelle 3.1 Verdünnungsreihe zur Etablierung der Referenzmaterialien.....	32
Tabelle 3.2 Etablierung der Referenzmaterialien: IC50-Wert und Z-Faktor	35
Tabelle 3.3 Verdünnungsreihe für direkten Zellkontakt mit dem RM-Extrakt	39
Tabelle 3.4 Direkter Extraktkontakt: IC50-Wert und Z-Faktor	40
Tabelle 3.5 Sterilfiltrierter Extrakt: IC50-Wert und Z-Faktor	42
Tabelle 3.6 Serumfreier Extrakt: IC50-Wert und Z-Faktor	43
Tabelle 3.7 Neue Verdünnungsreihe RM-B: IC50-Wert und Z-Faktor	45
Tabelle 3.8 Etablierung des XTT-Assay: IC50-Wert und Z-Faktor.....	46
Tabelle 3.9 XTT-Assay ohne PMS Einsatz: IC50-Wert und Z-Faktor	48
Tabelle 3.10 Stabilitätsprüfung der RM: IC50-Wert und Z-Faktor.....	50
Tabelle 3.11 Vergleich von acht Wochen altem mit frisch angesetztem Extrakt	51
Tabelle 3.12 Vergleich von frischen Zellen mit ARC.....	53
Tabelle 3.13 Vergleich klassisches gegen optimiertes Pipettierschema: IC50-Wert und Z-Faktor.....	57
Tabelle 3.14 Vergleich von Cryo-Platte mit neuem Pipettierschema gegen parallel gelaufenes klassisches Pipettierschema mit Zellen aus <i>Cryovial</i>	61

7.3 Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
°C	Grad Celsius
μl	Mikroliter
μM	Mikromolar
μ _K	Mittelwert der Kontrolle
μ _P	Mittelwert der Probe
σ _K	Standardabweichung der Kontrolle
σ _P	Standardabweichung der Probe
ARC	<i>Assay Ready Frozen Cells</i>
c	<i>cells</i> (Zellen)
cm ²	Quadratcentimeter
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
DMSO	Dimethylsulfoxid
Em	Emission
Ex	Extinktion
FBS	fetales Rinderserum
h	Stunde
ISO	Internationale Standard Organisation
k.P.	klassisches Pipettierschema
L	Liter
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolar

mol	SI-Einheit der Stoffmenge
MTT	<i>Thiazolyl blue formazan</i>
MW	Mittelwert
nm	Nanometer
NTCT	<i>National Collection of Type Cultures</i>
OD	optische Dichte
o.p.	optimiertes Pipettierschema
PBS	Phosphatpuffer
PC	<i>Proliferative Capacity</i>
PMS	Phenazinmethosulfat
PVP	Polyvinylpyrrolidon
RM-A	Referenzmaterial A
RM-B	Referenzmaterial B
RM-C	Referenzmaterial C
rpm	rounds per minute (Umdrehung pro Minute)
U	<i>Unit</i>
v/v	Volumen/Volumen
x g	x-fache Erdbeschleunigung
XTT	2,3-Bis-(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilid - Natriumsalz