



zu der Überlegung führen, ob die Politik, nach einem gesetzlichen Verbot zu trachten, nicht doch zuviel Zeit kostet. UCSF (University of California at San Francisco) schreibt zum Beispiel: „In order to eliminate the use of mice and to avoid pain, discomfort, or distress to animals from the production of monoclonal antibodies using mouse ascites, both OPRR (Office for Protection from Research Risks) and USDA (US Department of Agriculture) encourage the use of al-

ternative methods to produce monoclonal antibodies in vitro, without compromising the aims of the study. Institutional Animal Care User Committees are now expected to critically evaluate all protocols which propose using the mouse ascites method, and only allow in vivo production on the basis of strong scientific justification. UCSF has responded to this by setting up a core laboratory within the Cell Culture Facility to produce in vitro antibodies for UCSF investigators.“ Auch in Kanada

kommt der Forscher, der weiterhin mit der Aszitesmaus arbeiten will, in einen Rechtfertigungsnotstand. Der Canadian Council on Animal Care (CCAC) schreibt in einem Entwurf: „Every attempt should be made to use an in vitro method for production of mAbs. Therefore, any proposed production of monoclonal antibodies using the ascites method requires justification by the investigator to the animal care committee.“

fpg



Poster

Das Neurofibrom-HET-CAM-Modell als Methode der Wahl zur Untersuchung der Pathogenese und pharmakologischen Intervention des Neurofibromwachstums

Sabine Hüske, Bernd Algermissen, Agnes Großewinkelmann, Basil Jamil, Uwe Müller und Hans-Peter Berlien

Abt. für Lasermedizin, Krankenhaus Neukölln, D-Berlin, lasermed@knk-berlin.de

Einleitung

Die Pathogenese der Induktion und des Wachstums eines Neurofibroms ist unbekannt. Bis zum heutigen Tage existiert kein aussagekräftiges Tier- oder *in vitro* Modell, mit dem diese Fragestellungen oder gezielte pharmakologische Testungen untersucht werden können. Im NF/HET-CAM-Modell ließen sich jedoch Vaskularisierung und Wachstum, sowie Infiltrationsverhalten der Schwannzellen in vorangegangenen Untersuchungen nachweisen. Bei histologischen Untersuchungen zum Wachstumsverhalten von Neurofibromen (NF) auf der CAM zeigte sich in der frühen Phase, d.h. vor Beginn der Vaskularisierung der NF-Probe, eine vollständige Mastzelldegranulation innerhalb der Grenzzone zwischen CAM und NF-Probe. Somit könnten die Mastzellen, die eine Vielfalt von Mediatoren (bFGF, TNF- α , VEGF) und Substanzen (Histamin, Heparin) enthalten, die direkt oder indirekt eine Induktion der Angiogenese auslösen können, für die erste Phase des Neurofibromwachstums von Bedeutung sein. Ziel dieser Arbeit war es daher, anhand des Neurofibrom-CAM-Modells durch pharmakologische Blockade der Degranulation der Mastzellen einen direkten Einfluß der Mastzellmediatoren auf die

Neovaskularisation des Tumors zu bestätigen. Hierzu wurden die beiden klinisch verwendeten „Mastzellstabilisatoren“ Ketotifen und Cromoglicinsäure eingesetzt.

Material und Methode

1. Zunächst wurden die direkten Effekte im Bereich von 10nM - 100mM von Ketotifen und Cromoglicinsäure auf der CAM getestet. Die einmalige Applikation erfolgte am 6. Bebrütungstag der SPF-Eier (38,7°C, Luftfeuchtigkeit 60%). Morphologische Veränderungen über einen Zeitraum von 6 Tagen wurden dokumentiert.
2. Frisch entnommene Neurofibromproben (pro Konzentration n=5) wurden zusammen mit je 50ml der mit NaCl verdünnten Substanzen Ketotifen (1mM-10nM) und Cromoglicinsäure (100mM bis 10nM) auf die CAM transplantiert. In den Kontrollgruppen wurde lediglich 50 μ l NaCl appliziert. Makroskopische Veränderungen wurden über 6 Tage dokumentiert.

Ergebnisse

Die Substanzen bewirkten unter 10mM für Ketotifen und 100mM für Cromoglicinsäure keine makroskopischen Veränderungen an der CAM. In der Versuchsreihe mit

Ketotifen (10nM-1000nM) sowie Cromoglicinsäure (10-100nM) zeigten die Neurofibromproben auf der CAM eine unbeeinflusste Neovaskularisation und Größenzunahme. Im Gegensatz dazu kam es nach der Applikation von 10mM Cromoglicinsäure zu einer vollständigen Blockade des Anwachsens des Tumors mit ausbleiben der Neovaskularisation und damit zur Tumornekrose bei erhaltener vitaler CAM.

Diskussion/Zusammenfassung

Cromoglicinsäure im Gegensatz zum Ketotifen blockiert nach der Applikation von einer 10mM-Lösung (100mM Lösung wird klinisch zur Behandlung der allergischen Konjunktivitis eingesetzt) die Induktion der Neovaskularisation der NF-Proben. Ketotifen gilt als sehr schwacher Mastzellstabilisator und erreicht klinisch eher Antihistaminika-Effekte. In weiteren Untersuchungen müssen die Effekte der Cromoglicinsäure sicherlich analysiert werden. Diese Untersuchungen verdeutlichen aber, daß das NF/HET-CAM-Modell als zur Zeit einziges *in vivo* Modell zur Anzüchtung von Neurofibromen ermöglicht, einzelne Teilschritte der Pathogenese zu analysieren und mit diesem Wissen gezielt pharmakologische Interventionen am gleichen Modell zu untersuchen und zu entwickeln.





wie durch Validierungsstudien auf nationaler und europäischer Ebene (Doehmer et al., 1999). Auf nationaler Ebene wurde die V79-Zellbatterie im Rahmen eines bis Februar 2001 durch das BMBF geförderten Verbundvorhabens „Die Nutzung hepatischer Funktionen für *in vitro* Verfahren zur Prüfung von Stoffen mit dem Ziel der Einsparung von Tierversuchen“, Teilprojekt 4, Förderkennzeichen 0311259 geprüft, dessen Phase III zur Zeit unter massgeblicher Beteiligung von Johannes Döhmer als einem der drei Koordinatoren vorbereitet wird. Auf europäischer Ebene erfolgte die Prüfung durch das *European Centre for the Validation of Alternative Methods* (ECVAM) am *Joint Research Centre* der EU in I-Ispra im Rah-

men eines Prävalidierungsabkommens „*Performance Evaluation of an In Vitro Cytochrome P450 mediated Toxicity Screening System in View of the Prevalidation Phase*“, Contract No. 13508-97-12-10, das erst kürzlich im Dezember 1999 erfolgreich beendet wurde. Die kooperative und strategische Verbindung zu ECVAM (Michael Balls und Sandra Coecke) bleibt nach außerordentlich positiver Erfahrung und Interesse an weiteren Entwicklungen bei beiden Partnern bestehen.

Literatur

Doehmer, J., Buters, J. T. M., Luch, A., Soballa, V., Baird, W. M., Morrisson, H., Stegeman, J. J., Townsend, A. J., Green-

lee, W. F., Glatt, H. R., Seidel, A., Jacob, J., and Greim, H. (1999). Molecular studies on the toxicifying effects by genetically engineered cytochromes P450. *Drug Metabolism Reviews* 31, 423-435.

Seidel, A., Döhmer, J. und Jacob, J. (2000). Spezies-abhängiger Metabolismus von PAKs. *Bioforum* 23, 490-494.

Korrespondenzadresse

Prof. Dr. Johannes Döhmer
GenPharmTox BioTech AG
Fraunhofer Str. 9
D-82152 Martinsried
Tel. +49-173-386 41 45
Fax: +49-89-89 52 18 18
E-mail: doehmer@lrz.tum.de



Poster

Einfluß der Mastzelle in der frühen Phase des Neurofibromwachstums

Bernd Algermissen, Sabine Hüske, Agnes Großwinkelmann, Basil Jamil, Uwe Müller und Hans-Peter Berlien

Abt. für Lasermedizin, Krankenhaus Neukölln, D-Berlin, lasermed@knk-berlin.de

Einleitung

Die Neurofibromatose Typ 1 (NF1) mit einer Prävalenz von 1:3500-1:4000 ist die häufigste hereditäre Systemerkrankung. Typisch ist die Entwicklung von bis zu mehreren tausend Neurofibromen (NF). Die Pathogenese der Neurofibromentstehung und das rasche Wachstum nach mechanischen Traumen oder Rezidiventwicklung nach incompletter chirurgischer Entfernung ist unbekannt. Neben Schwannzellen, Perizyten und Fibroblasten-ähnlichen Zellen findet sich im Neurofibrom eine deutliche Vermehrung von Gefäßen und Mastzellen, die eine wesentliche Rolle bei der Neurofibromentstehung spielen sollen. Gegenstand der Arbeit war, die frühen Veränderungen in traumatisierten NF aufzuzeichnen und die Befunde im HET-CAM Modell nachvollziehen.

Material und Methoden

I. 4 kutane Neurofibrome wurden alle am vierten Tag nach zufälliger, mechanischer Traumatisierung laserchirurgisch entfernt und formalinfixierte Gewebeschnitte der NF histologisch (HE/Giemsa) und immuno-

histochemisch (ABC-System, DAKO) angefärbt.

II. Fragmente von Neurofibromen (n=20) wurden auf die Chorioallantoismembran (CAM) von Hühnereiern (5. Bebrütungstag) transplantiert und die Veränderungen der CAM und des NF-Fragmentes zeitabhängig histologisch und immunhistologisch untersucht

Ergebnisse

Traumatisierte Neurofibrome:

Im Bereich der Traumatisierungen fanden sich eine Hyperämie, degranulierte Mastzellen sowie eine Induktion der Angiogenese bei ansonsten unauffälligem histologischem Befund.

NF/HET-CAM-Modell:

Bereits 6 Stunden nach Transplantation bestand eine starke Adhäsion der NF-Fragmente mit der CAM sowie degranulierte Mastzellen im Bereich der Kontaktstelle zwischen CAM und NF. Nach 24 Stunden bildete sich eine Hyperplasie des meso- und ektodermalen Anteils der CAM und eine deutliche Gefäßvermehrung innerhalb der CAM aus. Die Mastzellen sind im Bereich

der Kontaktstelle fast vollständig degranuliert. Am 3.-4. Tag infiltrieren CAM-Gefäße das Neurofibromfragment und erste zarte Gefäße sind makroskopisch erkennbar. Am 5.-6. Tag infiltrieren S100-pos. Zellen (Schwannzellen) die CAM und multiple, teils großvolumige Gefäße mit kernhaltigen Erythrozyten durchziehen das NF.

Diskussion/Zusammenfassung

Traumatisierte NF weisen eine erhöhte Proliferationstendenz auf. Der Mechanismus dieses plötzlichen Wachstums ist ungeklärt. Bereits Riccardi vermutete, daß die Mastzelle eine Rolle spielen könnte und untersuchte die Wirkung von Ketotifen als „Mastzellstabilisator“ auf das Wachstumsverhalten der NF, konnte aber in kontrollierten Studien außer typischen Nebenwirkungen eines Antihistaminikums keine signifikanten Effekte auf das Wachstum der NF belegen. Aufgrund fehlender Tiermodelle können andere Substanzen, wie z.B. die Cromoglicinsäure, bisher nur „am Patienten“ evaluiert werden. Das hier vorgestellte NF/HET-CAM Modell spiegelt nicht nur die analogen Veränderungen von traumatisierten NF wider, sondern ermöglicht einerseits die Analyse von Mechanismen und Mediatoren, die in der frühen Phase der Wachstumsinduktion eine Rolle spielen, und andererseits können die Effekte einer gezielten pharmakologischen Blockade von Mediatoren oder deren Freisetzung auf das Wachstumsverhalten von Neurofibromen getestet werden.



im Sinne des Tierschutzes geprüft und die Bestimmungen im Bedarfsfall geändert werden.

Die Kommission begründet die ständigen Verzögerungen des Vermarktungsverbotes auch damit, dass die Sicherheit des Verbrauchers gewährleistet werden muss. Die Sicherheit des Verbrauchers wird jedoch durch ein Vermarktungsverbot nicht gefährdet. Grundsätzlich darf ein Hersteller nur Kosmetika auf den Markt bringen, die für den Verbraucher unbedenklich sind. Alle Produkte, die in der EU verkauft werden, müssen bestimmte Sicherheitsanforderungen erfüllen. Mit den derzeit verfügbaren, toxikologisch charakterisierten 8000 Inhaltsstoffen kann die In-

dustrie gesundheitlich unbedenkliche und innovative Kosmetika herstellen, bis in allen Bereichen der Sicherheitsprüfung tierversuchsfreie Methoden anerkannt sind.

Der Deutsche Tierschutzbund hält daher ein Vermarktungsverbot für durchsetzbar und wird daher zusammen mit seinen europäischen Partnerorganisationen dieses auch weiterhin einfordern.

Literatur

Balls, M., Corcelle, G. (1998). Statement of the scientific validity of the 3T3 NRU PT Test (an In Vitro Test for Phototoxic Potential). *ATLA* 26, 7-8.

Balls, M., Corcelle, G. (1998). Statement on the scientific validity of the Rat Skin Transcutaneous Electrical Resistance (TER) (an In Vitro Test for skin Corrosivity). *ATLA* 26, 275-280.

Heinen, M. (2000). Safe and Sound. Eurogroup for Animal Welfare.

Ruhdel, I. (1999). Tierversuchsverbot für Kosmetika in der EU - Quo vadis? *ALTEX* 16, 298-301.

Korrespondenzadresse

Dr. Irmela Ruhdel
Akademie für Tierschutz
Spechtstr. 1
D-85579 Neubiberg
E-mail: akademie@tierschutzbund.de



Poster

Nachweis von S100 β im peripheren Blut bei humanen Melanom-Xenotransplantaten im Hühnereimodell

Karin Kunzi-Rapp^{1,2}, P. Kaskel², R.U. Peter² und G. Krähn²

¹ Institut für Lasertechnologien in der Medizin und Messtechnik an der Universität D-Ulm, E-mail: karin.rapp@ilm.uni-ulm.de

² Abteilung Dermatologie der Universität D-Ulm

Die Chorioallantoismembran des befruchteten Hühnereies (CAM) bietet ein ausgezeichnetes Modellsystem zur Kultivierung humanen Tumorgewebes und eignet sich für Untersuchungen des Metastasierungsverhaltens. Bereits nach 2 bis 3 Tagen werden die Transplantate vom Blutssystem des Wirtsorganismus versorgt, und es können Tumorzellen im Wirtsgewebe nachgewiesen werden. Die Transplantat-Wirt-Interaktion bleibt bislang jedoch noch weitgehend unklar.

S100 β , ein dimeres Protein mit einem Molekulargewicht von 21 kDa, wird seit langem als diagnostischer Marker bei der immunhistopathologischen Diagnose des Melanoms eingesetzt. Darüber hinaus

wird seit einiger Zeit S100 β im peripheren Blut als humaner Metastasen-Tumormarker eingesetzt.

S100 β -positive Metastasenproben von Patienten mit erhöhten S100-Werten im peripheren Blut wurden auf 20 Eier transplantiert. Das Kontrollkollektiv umfasste nicht transplantierte Eier und solche mit Bindegewebsstransplantaten (Negativkontrollen) sowie Eier mit aufgesäten humanen Melanomzellen (Positivkontrollen). Nach einem Wachstum von 5 Tagen wurde jeweils vor Entnahme der Transplantate Blut aus einem der größeren Gefäße der Wirtsmembran entnommen und auf den Gehalt an S100 β untersucht.

In Blutproben nicht transplantierte Eier konnte S100 β nicht nachgewiesen werden. Negativkontrollen mit humanem Bindegewebe lagen unter dem Grenzwert von 0.12 $\mu\text{g/l}$, der für humane Blutproben angenommen wird. Die Positivkontrollen mit Melanomzellen zeigten hoch positive Werte bis 1.19 $\mu\text{g/l}$. Blutproben aus dem Hühnerei mit humanen Melanom-Xenotransplantaten lagen zu 80% über dem Grenzwert mit Spitzenwerten bis zu 32 $\mu\text{g/ml}$. Diese Ergebnisse stimmten mit den Beobachtungen der S100 β -Werten im peripheren Blut bei Patienten mit neu aufgetretenen Melanommetastasen überein.

Der Nachweis von humanem S100 β im peripheren Blut der xenotransplantierten CAM weist darauf hin, dass zwischen humanen Transplantaten und der Wirtsmembran eine Interaktion stattfindet. Weitergehende Untersuchungen müssen zeigen, wie sich dieses System zur Erforschung der Einwirkung exogener Stimuli auf die Xenotransplantate einsetzen lässt.

Poster

Die Umsetzung der 3R bei der Sicherheitsprüfung von Medizinprodukten

Ursula G. Sauer

Akademie für Tierschutz, D-Neubiberg, E-mail: akademie@tierschutzbund.de

Verfahren zur Biokompatibilitätsprüfung von medizinischen und zahnmedizinischen Produkten sind in ISO-Norm 10993 veran-

kert. Dieser Normtext umfasst 18 Teile: Teil 1 enthält allgemeine Grundlagen. In Teil 2 wird auf Tierschutzaspekte der Si-

cherheitsprüfung eingegangen. Tierversuchsfreie Verfahren sind in den Teilen 3 bis 5 aufgeführt, in denen die Prüfung der Genotoxizität, der Hämokompatibilität und Zytotoxizität beschrieben wird. Tierversuche sind außer in den Teilen 3 und 4 (Karzinogenität und Reproduktionstoxizität sowie Hämokompatibilität) in den Teilen 6, 10, 11 und 16 enthalten, in denen die Gebiete der Implantationseffekte, Irritation,

Sensibilisierung, systemischen Toxizität und Toxikokinetik vorgestellt werden.

Aus der Sicht des Tierschutzes ist es erfreulich, dass *in vitro* Verfahren Eingang in die Sicherheitsprüfstrategien für Medizinprodukte gefunden haben. In Paragraph 4.9 des Tierschutzteils der Norm ist sogar verankert: „Das Endziel von ISO 10993 ist es, auf Tierversuche verzichten zu können.“ Vertreter des Tierschutzes arbeiten in den zuständigen Normen-Arbeitsausschüssen mit, um einen Beitrag dazu zu leisten, dass dieses Ziel kontinuierlich verfolgt wird. So muss immer wieder überprüft werden, welche Tierversuche ersatzlos gestrichen werden können, da mit ihnen keine relevanten Aussagen gewonnen werden (z.B. die Untersuchung der anomalen Toxizität, die noch in verschiedenen produktspezifischen DIN-Normen vorgeschrieben wird (Svendsen et al., 1996)). Weiterhin wird verfolgt, in welchen Gebieten tierversuchsfreie Verfahren bestimmte Tierver-

suche ersetzen können (z.B. Pyrogentest mit *Limulus*-Amöbozyten-Lysat oder humanem Vollblut anstelle des Kaninchen-Pyrogentests). Und es wird hinterfragt, für welche Produkte oder Substanzklassen auf bestimmte oder gar alle Tierversuche verzichtet werden kann. (So sollte ein Intrakutantest nur dann durchgeführt werden, wenn das betreffende Material auch mit der Haut in Kontakt kommen wird (Svendsen et al., 1996); und Kjellstrand et al. postulierten bereits 1994, dass zur Sicherheitsprüfung von Polymeren alle für die Sicherheitsprüfung relevanten Informationen mit *in vitro* Verfahren gewonnen werden können.) Im Hinblick auf diese Fragestellungen müssen die Normenkapitel immer wieder dem Stand der Forschung angepasst werden. Sollte für ein bestimmtes Untersuchungsgebiet ein aussagekräftiger, aber nicht validierter *in vitro* Test vorhanden sein (so wie der *in vitro* Test zur Untersuchung der Schleimhautverträglichkeit von Dentalprodukten

(Schmalz et al., 1995)), ist aus der Sicht des Tierschutzes zu fordern, dass dessen Validierung eingeleitet und zügig vorangetrieben wird. Bei positivem Ausgang der Validierungsstudien müssen die entsprechenden Tierversuche schnell und unbürokratisch ersetzt werden.

Literatur

- Kjellstrand, P., Lilliehorn, P. and Rydhög, G. (1994): Toxicity testing of polymer materials for dialysis equipment: is there a need for *in vivo* testing? *Cell Biology and Toxicology* 10, 137-142.
- Schmalz, G., Arenholt-Bindslev, D. and Schweikl, H. (1995). An epithelium-fibroblast coculture for testing the irritancy of dental alloys. *Journal of Dentistry Research* 74, 540.
- Svendsen, O., Garthoff, B., Spielmann, H. et al. (1996). Alternatives to animal testing of medical devices. The report and recommendations of ECVAM workshop 17. *ATLA* 24/5, 659-669.

Poster

ZEBET Datenbank über Alternativen zu Tierversuchen im Internet

Barbara Grune, Antje Dörendahl, Susanne Skolik, Silke Behnck-Knoblau, Rainer Box und Horst Spielmann

Zebet (BgVV), D-Berlin, E-mail: zebet@bgvv.de

Das BgVV stellt seit Februar 2000 die Datenbank der ZEBET über Alternativmethoden zu Tierversuchen in englischer Sprache bei DIMDI online zur Verfügung. Die ZEBET Datenbank ist lizenzfrei unter der Adresse <http://gripsdb.dimdi.de/germ/gui.html> erreichbar. Recherchen in der ZEBET Datenbank sind mit Free grips-WebSearch oder mit dem grips-Kommandomodus möglich. Online-Besuchern der ZEBET Datenbank stehen alle Leistungen des DIMDI-Benutzerservices zur Verfügung.

Die 1989 gegründete Zentralstelle zur Erfassung und Bewertung von Ersatz- und Ergänzungsmethoden zum Tierversuch (ZEBET) im BgVV hat die behördliche Aufgabe, Ersatz- und Ergänzungsmethoden zu Tierversuchen zu dokumentieren, ihre Einsatzmöglichkeiten für die Praxis zu bewerten und, wenn nötig, auch ihre Anerkennung durchzusetzen. Ziel der Arbeit der ZEBET ist es, dazu beizutragen,

vor allem behördlich vorgeschriebene Tierversuche soweit wie möglich zu ersetzen. Dazu stellt ZEBET Wissenschaftlern aus der Industrie, Universitäten und Behörden Informationen über Alternativmethoden in einer Datenbank zur Verfügung. ZEBET führt außerdem eigene Forschung durch und vergibt Forschungsprojekte an andere Institutionen, um neue Methoden zu entwickeln, die Tierversuche verringern oder ersetzen können.

Das deutsche Tierschutzgesetz und auch die übergeordnete EU-Richtlinie 86/609/EEC zum Schutz von Versuchstieren schreiben vor, dass bei der Vorbereitung von Versuchsvorhaben zu prüfen ist, ob der verfolgte Zweck nicht durch andere Methoden oder Verfahren als den Tierversuch erreicht werden kann (§ 7, Abs. 2, Satz 2 Tierschutzgesetz). Die ZEBET Datenbank hat die Aufgabe, Alternativmethoden für die Prüfung der Unerlässlichkeit von Tierversuchen bereitzustellen.

Aufgrund der wissenschaftlichen Bewertung durch Mitarbeiter der ZEBET werden in der ZEBET Datenbank ausschließlich Methoden dokumentiert, die eine der drei folgenden Anforderungen erfüllen:

- ▶ *Refinement* das Leiden und die Schmerzen der Versuchstiere werden vermindert;
- ▶ *Reduction* die Zahl der Versuchstiere wird reduziert;
- ▶ *Replacement* durch die Anwendung der Methode werden Tierversuche ersetzt.

Diese Kriterien entsprechen dem wissenschaftlichen Prinzip der „3R“ zur Entwicklung von Alternativmethoden zu Tierversuchen, das von Bill Russel und Rex Burch 1959 entwickelt und in ihrem Buch „*The Principles of Humane Experimental Techniques*“ veröffentlicht wurde.

Die Dokumente in der ZEBET Datenbank enthalten folgende Inhalte: Bezeichnung der Methode, Schlagwörter, Bewertung, Zusammenfassung und bibliographische Angaben. ZEBET hat gegenwärtig für 110 Alternativmethoden Dokumente erarbeitet, von denen jetzt 50 über DIMDI abrufbar sind. ZEBET ist für die Aktualisierung der bereits vorhandenen Dokumente und die Anfertigung neuer Dokumente verantwortlich.

Poster

Vergleichende Untersuchungen zur *in situ*-Vitalitätsbestimmung von transplantierten soliden Tumoren im HET-CAM-Modell

Sabine Hüske, Bernd Algermissen, Agnes Großwinkelmann, Dagmar Schar Schmidt und Hans-Peter Berlien

Abt. für Lasermedizin Krankenhaus Neukölln, D-Berlin, lasermed@knk-berlin.de

Einleitung

Die Chorioallantoismembran des bebrüteten Hühneris ist ein seit langem etabliertes *in vivo* Modell in der Tumorforschung und erfährt in letzter Zeit als Tierversuch-Ersatzmodell eine Renaissance. Mit Anwachsraten von 40-100% wurden Tumoren und Tumorzellen bereits in den fünfziger Jahren transplantiert. Entscheidend für die Aussagekraft der Ergebnisse als Testmodell ist die Einschätzung der Vitalität eines transplantierten Tumors vor Versuchsbeginn, wenn Nekrose oder Apoptose induzierende Verfahren erprobt werden sollen. Da die makroskopische Einschätzung der Vitalität z.B. bei pigmentierten Tumoren wie Melanomen oder Glioblastomen schwerfällt, ist ein Verfahren zur objektiven Testung der Vitalität der Tumoren unabdingbar.

Ziel dieser Arbeit war, unterschiedliche Methoden zur *in situ* Vitalitätsbestimmung von transplantierten Tumoren der CAM auf ihre Aussagekraft zu prüfen. Dabei sollen die Verfahren ohne Schädigung der Tumorseite oder der CAM, sowie topischer/systemischer Applikation von Precursorsubstanzen, wie z.B. 5-Aminolävulinsäure oder Methylenblau, eine objektivierbare Aussage über die Vitalität des transplantierten Tumors liefern.

Material und Methoden

HET-CAM-Modell: Auf die CAM von Hühneriern (5. Bebrütungstag) wurden frisch entnommene Proben von 30 unterschiedlichen soliden Tumoren und Neurofibromen transplantiert und für max. 6 Tage kultiviert. Vitalitätsmessungen und makro-

skopische Befunddokumentationen wurden täglich durchgeführt. Entsprechend der Versuchsplanung wurden die Tumorproben mit der CAM in Formalin fixiert und der Vitalitätsgrad der Tumorzellen sowie der Vaskularisierungsgrad im HE-Präparat bestimmt. I. LenA-System (Laserinduzierte endoskopische Autofluoreszenz, LMTB GmbH, D-Berlin): Nach Anregung mittels Stickstofflaser wird semi-quantitativ NADH in nmol/g fluoreszenzspektroskopisch detektiert. Insgesamt wurden die NADH-Konzentrationen von 26 unterschiedlichen soliden Tumoren nach Transplantation auf der CAM mehrmals an einem Tag und im Verlauf der Kultivierung (>600 Messungen) ermittelt und der makroskopische Befund dokumentiert und histologische Untersuchungen der Transplantate auf Vitalität und Vaskularisation vorgenommen.

II. Infrarot-Thermographie (Varioscan 2011, Jenoptik): Detektion erfolgte im spektralen Bereich von 8-12 μm mit einer Auflösung von 1,5 mrad, einem Bildfeld von 30°Hx20°V und 300 Pixel/Zeile und einem Bildaufbau von 1,2 Bildern pro Sekunde. Die Temperaturunterschiede wurden farb-kodiert dargestellt. Messungen an insgesamt 3 Transplantationsserien am 2. und 5.Tag wurden durchgeführt.

III. Laser-Doppler-Flowmetrie: Verwendet wurde der Laser-Doppler-Imager der Firma Moor-Instruments Ltd (UK), der über einen HeNe-Laser mit 633nm und einen Infrarotlaser mit 780/830nm Lichtemission verfügt. Aus den reflektierten Lichtanteilen konnten relative Fluxraten pro Einzelpunkt zeitaufgelöst oder als relative Fluxraten eines gesamteten Feldes dargestellt werden.

Messungen wurden an 10 transplantierten Neurofibromen direkt und am 5. Tag nach Transplantation durchgeführt.

Ergebnisse

Die Methoden I und II zeigten sich als ungeeignet. Bei den NADH Messungen kam es zu deutlich differierenden Werten der NADH-Messungen am gleichen Tag und im Verlauf von Tag zu Tag. Ferner fanden sich nur geringe Korrelationen mit makroskopischen und histologischen Befunden. Bei der Untersuchung mittels Infrarot-Thermographie kam es zu vollständiger Überstrahlung der Tumorfläche durch die CAM. Die Messungen von Fluxraten mittels Laser-Doppler-Flowmetrie stellte sich als aussagekräftigste Methode dar. Während der Tumor direkt nach Transplantation keine Pulsation in der Einzelpunktmessung aufwies, konnten im Tumor am 5. Transplantationstag Pulsationen wie in vergleichbaren kleinen Gefäßen der CAM dargestellt werden. Diese Pulsationen entsprachen dem Pulsrhythmus der CAM-Gefäße. Auch im Scanmodus ließ sich der Tumor anhand des höheren Fluxes im Vergleich zur CAM darstellen, jedoch kam es zu Überlagerungen durch Spiegelung von Artefakten, so daß sich der Tumor ohne Kenntnis der Position nicht eindeutig abgrenzen ließ.

Diskussion/Zusammenfassung

Im Vergleich zu den anderen Verfahren erwies sich die Laser-Doppler-Flowmetrie als einzige Methode zur objektiven *in situ* Vitalitätseinschätzung von transplantierten Tumoren auf der CAM ohne Schädigung des Tumors oder Applikation von Substanzen, wie z.B. Methylenblau. Somit können vor jedem Versuchsansatz gezielt angezüchtete Tumorproben mit gleichem Vaskularisierungsgrad ausgewählt und eingesetzt werden. Damit können z.B. PDT-Effekte an Tumormaterial (Nekrose/Apoptose/Thrombosierung von Gefäßen) oder pharmakologische Testungen präziser gedeutet und analysiert werden.



5.4 Wirksamkeitsprüfung von Anti-Lymphozyten Seren

Wirksamkeitsprüfung von Anti-Lymphozyten Seren: Entwicklung und Validierung von *in vitro* Methoden als Ersatz des Affenhauttransplantationstests Paul-Ehrlich-Institut (Prof. Dr. Kabelitz), Projekt 0311238, 01.07.1996 – 30.06.2000

Ziel des Vorhabens ist es, immunbiologische *in vitro* Methoden zur Wirksamkeitsprüfung von Anti-Lymphozyten-Seren (ALS) zu entwickeln und zu validieren, um den Tierversuch (Affenhauttransplantationstest) abzulösen.

Derzeit werden zwei im Projekt entwickelte *in vitro* Methoden zum Ersatz des Affenhaut-Transplantationstests unter Federführung des Paul-Ehrlich-Instituts in einem Ringversuch der Europäischen Pharmakopöe auf die praktische Relevanz hin überprüft. Die Resultate dieser Validierung werden in den Vorschlag für eine entsprechende Arzneibuchmonographie

der Europäischen Pharmakopöe eingebracht werden.

6 Schlußbemerkung

Abschließend soll darauf hingewiesen werden, daß es hinsichtlich der Umsetzung von Projektergebnissen in die Praxis stets des Zusammenwirkens der verschiedensten Partner bedarf:

Das BMBF fördert aufbauend auf den Ergebnissen der Grundlagenforschung (für die in Deutschland im wesentlichen die DFG zuständig ist) FuE-Vorhaben, die diesen Weg bis hin zur Anwendung bereiten sollen, ohne daß das BMBF aufgrund seiner Ressortzuständigkeit für deren weitere Umsetzung in die Praxis und die regulatorischen Bestimmungen primär verantwortlich sein kann. Hierfür sind andere Ressorts und ggf. deren nachgeordnete Behörden zuständig bzw. die Unternehmen der gewerblichen Wirtschaft gefordert.

Entsprechend dieser Gegebenheit können das BMBF und BEO die praktische Anwendung von Ergebnissen des Förderschwerpunktes im Rahmen ihrer Tätigkeiten nur begrenzt, so z.B. durch begleitende Maßnahmen wie Workshops, Kolloquien u. a. m., unterstützen.

Kontaktadressen

Dr. Wilfried Diekmann
BMBF
Heinemannstr. 2
D-53170 Bonn
Tel.: +49-228-57 36 73
Fax: +49-228-57 36 01

Dr. Manfred Hansper
Forschungszentrum Jülich GmbH
Projektträger Biologie, Energie, Umwelt
Bereich 31
D-52425 Jülich
Tel.: +49-2461-61 55 66
Fax: +49-2461-61 26 90



Poster

Ex vivo model to investigate the effect of 17 β -Estradiol and of the phytoestrogens Genistein and Daidzein on post injury neointima formation in non-toxic concentrations

Gerald Finking, Christina Lenz and Hartmut Hanke

University of Ulm, Department of Internal Medicine, Division of Cardiology, D-Ulm,
E-mail: hartmut.hanke@medizin.uni-ulm.de

Animal experiments are widely accepted in arteriosclerosis research. The aim of the present study was to establish an organ culture model (rings of rabbit aortic vessels) to investigate inhibitory estrogen effects on post injury neointima formation in the vessel wall and to examine whether these effects are cytotoxic. Estrogens are used for secondary prevention of atherosclerosis in postmenopausal women (estrogen replacement therapy/ERT). Phytoestrogens as well as the ovarian 17 β -estradiol have been demonstrated to inhibit proliferation and migration of vascular smooth muscle cells which are key events in atherogenesis and restenosis after coronary angioplasty.

In situ endothelial denudation of the thoracic and abdominal aorta was performed in female rabbits by a 3F Fogarty catheter. Segments of 5 mm were randomised in groups of n=12 and held in culture. 17 β -estradiol, Genistein and Daidzein were applied in concentrations of 20 μ M, 30 μ M, and 40 μ M. Groups without estrogen treatment served as controls. The segments were investigated after 21 days. Afterwards, 3 further groups (n=12) were held with the lowest concentrations of 17 β -estradiol or the two phytoestrogens having been evaluated to inhibit the neointima formation significantly. After 21 days of treatment these sections were held in medium only for another 7 days to proof

whether these segments were still able to proliferate. A denuded control group was held in medium only over 28 days. Compared to controls, 30 μ M 17 β -estradiol, 20 μ M Genistein and 40 μ M Daidzein inhibited neointima formation significantly over 21 days. After another 7 days of cultivation in medium only the amount of neointima formation was comparable to that of not estrogen-treated controls after 21 days. We therefore suggest that the demonstrated inhibitory effect is not explained by toxicity. In conclusion, by the use of this organ culture model it was possible to demonstrate non-toxic post injury effects of different estrogens in the vasculature. Because 24 aortic segments could be taken from one aortic vessel, the number of animals that would have been necessary for an *in vivo* experiment (8 to 10 per group for statistical reasons) could be markedly reduced. The results are of clinical interest because phytoestrogens and 17 β -estradiol may offer therapeutic options for patients after coronary angioplasty regarding the process of restenosis. Because phytoestrogens do not affect the reproductive system they can also be used in men.

Frau Ina Seuffert und Stefanie Schindler. Ihnen sei hier ausdrücklich gedankt!

Literatur

- Baenkler, H. W., Fritze, D., Fießl, H. S. et al. (Hrsg.) (1999). Erkrankungen der Atmungsorgane. In *Innere Medizin* (562). Stuttgart: Hippokrates-Verlag im Thieme-Verlag (Duale Reihe).
- Bethge, P. (2000). Müll: Giftregen aus dem Bottich. *DER SPIEGEL* 14, 222.
- Böge, Klaus Peter (Ambulanz für Gesundheit und Umwelt, 23568 Lübeck) (1998). Aktuelle Ergebnisse neuer Methoden zur Ermittlung und Beurteilung mikrobieller Belastungen in Innenräumen. *Zeitschrift für Umweltmedizin, Umweltmedizin.de*.
- Drexler, D. und Fechner, B (1997). Schadstoffemissionen in Innenräumen. *GIT-Spezial "Sicherheit und Management"* 2, 91-100.
- Exner, M. (1993). Raumluftechnische Anlagen und ihre medizinische Relevanz: Sick Building Syndrom ist keine Massenpsychose. *Krankenhaus Arzt* 66, 12, 586-592.
- Fennrich, S., Fischer, M., Hartung, T. et al. (1999). Detection of endotoxins and other pyrogens using human whole blood. In F. Brown, C. Hendriksen and D. Sesardic (eds.), *Alternatives to Animals in the Development and Control of Biological Products for Human and Veterinary Use*. Dev Biol Stand, vol 101 (131-139). Basel: Karger.
- Fennrich, S., Fischer, M., Hartung, T. et al. (1998). Entwicklung und Evaluierung eines Pyrogentests mit menschlichem Blut. *ALTEX* 15, 123-128.
- Fennrich, S., Wendel, A. and Hartung, T. (1999). New applications of the human whole blood pyrogen assay (PyroCheck). *ALTEX* 16, 146-149.
- Hartung, T. and Wendel, A. (1996). Detection of Pyrogens Using Human Whole Blood. *In Vitro Toxicology* 9, 353-359.
- Hartung, T. und Wendel, A., (1995). Die Erfassung von Pyrogenen in einem humanen Vollblutmodell. *ALTEX* 12, 70-75.
- Nowak, D. (1998). Die Wirkung von Stallluftbestandteilen, insbesondere Schweineställen, aus arbeitsmedizinischer Sicht. *DTW-Deutsche Tierärztliche Wochenschrift*, 105, 225-234.
- Teeuw, K. B., Vandenbroucke-Grauls, C. M. J. E. and Verhoef, J. (1994). Airborne Gram-negative bacteria and endotoxin in Sick-Building Syndrome: A study in Dutch Governmental Office Buildings. *Arch Intern Med*, vol 154, Oct 24, 2339-2345.
- Zucker, B. A., Draz, A. M. and Müller, W. (2000). Comparison of filtration and impingement for sampling airborne endotoxin. *J. Aerosol Sci*, 751-755.

Korrespondenzadresse

PD Dr. Dr. Thomas Hartung
 Universität Konstanz
 Fachbereich Biologie, Fach M655
 D-78457 Konstanz
 Tel. +49-75 31-88 41 16
 E-mail: Thomas.Hartung@uni-konstanz.de



Poster

In vitro Modell zur Angiogenese und Antiangiogenese

Johanna Plendl und Stefanie Schuster

Freie Universität Berlin, Institut für Veterinär Anatomie, D-Berlin,
 E-mail: plendl@zedat.fu-berlin.de

Angiogenese, die Neubildung von Blutgefäßen, kommt physiologischerweise nur im Embryo und Fetus sowie in der Plazenta, im Zuge der zyklischen Tätigkeit im Ovar und bei der Entwicklung der Milchdrüse vor. Alle anderen Formen der Angiogenese sind mit krankhaften Prozessen verbunden, wie beispielsweise die Angiogenese beim Wachstum von Tumoren. Angiogenese zu stimulieren, würde bedeuten, die Ausbildung von Kapillaren in einem ischämischen Gebiet anzuregen, umgekehrt würde die Inhibierung der Angiogenese abnormes Wachstum durch Ausschalten der Blutzufuhr beenden.

In jüngster Zeit wurden zahlreiche Stimulatoren und Inhibitoren der Angiogenese identifiziert und isoliert. Die Wirkungsmechanismen dieser Substanzen sind sehr vielschichtig, und ihre Untersuchung befindet sich meist noch in frühen experimentellen Stadien.

Im Bereich der Angiogeneseforschung werden zahlreiche Tierversuche durchgeführt, von denen die meisten, da sie am Auge vorgenommen werden, sehr umstritten sind. Für die Untersuchung der Wirkung potentieller Angiogenese-Stimulatoren oder -Inhibitoren werden daher neue *in vitro* Systeme benötigt. Von zahlreichen Forschungsgruppen werden zwar angiogene Endothelzellkulturen vorgestellt, jedoch findet in diesen lediglich eine zweidimensionale Umgruppierung statt, nicht aber Angiogenese, also die Bildung gefäßähnlicher Strukturen, die ein Lumen aufweisen.

Unser Ziel ist die Etablierung eines realitätsnahen Modells der Angiogenese *in vitro*, das die Untersuchung und Quantifizierung der angiogenen bzw. antiangiogenen Wirkung von Angiogenese- und Antiangiogenesefaktoren erlaubt und durch das Tierversuche ersetzt werden können.

In ersten Versuchen gelang es, mikrovaskuläre Endothelzellen aus dem *Corpus luteum* von Schlachtrindern zu isolieren, welche Angiogenese in einem bisher noch nicht beschriebenen Ausmaß zeigen. Die Zellen migrieren und proliferieren, sie richten sich dreidimensional aus und bilden echte Zellverbindungen im Sinne von *gap* und *tight junctions*. Dadurch entsteht ein komplexes, weitverzweigtes, kapillarähnliches Netz mit kontinuierlichem Lumen, und es wird ein Pendant der Basalmembran gebildet. Mittels immunhistochemischer sowie molekularbiologischer Methoden werden die Zellen weiter charakterisiert. Sie produzieren selbst den wahrscheinlich wichtigsten Angiogenesefaktor, den *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF) und sie exprimieren auch seinen Rezeptor.

Eine Quantifizierung der Angiogenese (Gefäßlänge, -areal, -verzweigung) sowie der Veränderung des Gefäßnetzes (zuzubzw. abnehmende Ausbildung bzw. Verschwinden) mittels *Image analysis* nach Inkubation in Angiogenesefaktoren bzw. Antiangiogenesefaktoren ist angestrebt.



- (Vero) derived Candidate influenza virus vaccine. *Vaccine* 16, 960-968.
- Kistner, O., Barrett, P. N., Mundt, W. et al. (1999). A novel mammalian cell (Vero) derived influenza virus vaccine: development, characterization and industrial scale production. *Wien. Klin. Wochenschr.* 115/5, 207-214.
- Lau, S. C. and Scholtissek, C. (1995). Abortive infection of Vero cells by an influenza A virus (FPV). *Virology* 212, 225-231.
- Montagnon, B. J., Fanget, B. and Nicholas, A. J. (1981). The large-scale cultivation of Vero cells in microcarrier culture for virus vaccine production. Preliminary results for killed poliovirus -vaccine. *Dev. Biol. Stand.* 47, 55-64.
- Nakamura, K. and Homma, M. (1981). Protein synthesis in Vero cells abortively infected with Influenza B virus. *J. Gen. Virol.* 56, 199-202.
- Petricciani, J. C. (1991). Regulatory philosophy and acceptability of cells for the production of biologicals. *Dev. Biol. Stand* 75, 9-15.
- Pharmacopoeia European (1997). 0159, 1-3.
- Rowe, P. M. (1995). Pandemic influenza (un)preparedness described. *Lancet* 346, 1699.
- Vidor, E., Meschievitz, C. and Plotkin, S. (1997). Fifteen years of experience with Vero-produced enhanced potency inactivated poliovirus vaccine. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 16, 312-322.
- WHO (1995). Cell culture as a substrate for the production of influenza vaccines: memorandum from a WHO meeting. *Bull. WHO* 73, 431-435.
- WHO (1998). Requirements for the use of animal cells as in vitro substrates for the production of biologicals. *WHO Technical Report Series* 878, 19-56.
- Wood, J. M., Schild, G. C., Newman, R. W. et al. (1977). An improved single-radial-immunodiffusion technique for the assay of influenza haemagglutinin antigen: application for potency determinations of inactivated whole virus and subunit vaccines. *J. Biol. Stand.* 5, 237-247.

Korrespondenzadresse

Dr. Otfried Kistner
 Director Virology
 Biomedical Research Center
 Baxter Hyland Immuno
 Uferstr. 15
 2304 Orth/Donau
 Tel: +43-1-20100 4314
 Fax: +43-1-20100 4000
 E-mail: Otfried_Kistner@baxter.com



Poster

Alternative IgY Eidotterantikörper-Technologie vom SPF-Huhn – eine Chance für Gegenwart und Zukunft

Hartmut Kobilke

Egg Immun DAMSDORF GmbH i.G., D-Damsdorf,
 E-mail: office@egg-yolk-antibodies.de

Die IgY-Antikörper (=IgG im Serum) stellen eine erfreuliche und segensreiche Alternative zu den bisher jährlich zu mehreren Millionen getöteten Labor- und Kleinsäugetieren dar, die zur Gewinnung poly- und monoklonaler Antikörper verwendet wurden. Im Sinne der „3R“ (Russel and Burch, 1959) leistet diese innovative Methode der jüngsten Branche der Biotechnologie/Biomedizin einen gewichtigen Beitrag im Sinne des praktizierten Tierschutzes als Tierversuchs-Ersatzmethode.

Die IgY-Technologie beinhaltet als Gesamtsystem folgende Teilgebiete, deren Beherrschung eine mehrjährige Erfahrung, tierphysiologisches und immunologisches, biochemisches Denken und Wissen, ein bewußtes Engagement für Tierschutz, Ausdauer und Optimismus wie auch eine glückliche Hand voraussetzt. Nicht zuletzt deshalb dauerte es seit Klemperer (1893!), bis diese Technologie ihren Siegeszug anzutreten begann (1996), so viele Jahre. Teilgebiete:

► Auswahl und Vorbereitung der Junghennen (SPF- oder Vorzugshühner) einschließlich ihrer tierartgerechten Haltung und Fütterung,

► Präparation und Applikation der Immunisierungsantigene beim Huhn, Antigenauswahl (Viren, Bakterien, Protozoen, Prionen, Toxine, Endoparasiten, Allergene, Hormone, Enzyme, Vitamine sowie synthetische Peptide),

► Auswahl und Prüfung verschiedener und geeigneter (alternativer) Adjuvantien zur Steigerung der Immunleistung, Applikationsart,

► Antigenaufbereitung (pH, Mol.-gewicht, Dosis) und geeigneter Immunisierungsablauf (Methode) zur Erzielung lang anhaltender, maximaler Antikörperproduktion mit spezifischer Wirkung,

► Aufbereitung, Reinigung, Mengenbestimmung der spezifischen IgY-Antikörper,

► Anwendungs- und Applikationsstrategien für diese IgY-Antikörper in Human- und Veterinärmedizin und im Umweltschutz für Diagnostik und Therapie inkl. klinischer Erprobung und praktischer Anwendung,

► Aufbau eines Qualitätssicherungssystems (Öko-Audit, ISO 9001, GLP) sowie von Produktions-, Konfektionierungs- und Vertriebsstrukturen und -netzen,

► Erforderliche Aus- und Fortbildung des Personals, Aufklärung und Werbung,
 ► Ausrichtung sowie Förderung von Forschung und Entwicklung auf dieses neue Gebiet (insbesondere größere Unterstützung für kleinere und mittlere Unternehmen!).

Aus bisher realisierten 40 Forschungs- und Entwicklungsprojekten und bereits laufenden klinischen Erprobungen und praktischen Anwendungen, gekrönt durch bisher 3 Patente und die z.Zt. laufende Gründung der Produktions-, Verarbeitungs-, Konfektionierungs- und Vertriebs-GmbH Egg-Immun sowie der Med.-Immun Rastatt AG ergeben sich weitreichende Chancen mit positiven ethischen, sozialen, human- und tiergesundheitlichen sowie ökologischen Folgen und Nutzwendungen der IGY auf den Gebieten:

1. Veterinär- und humanmedizinische sowie ökotoxikologische Diagnostik (z.B. infektionsmedizinische, kostengünstige ELISA-Kits, Frühdiagnostik von Polytrauma, Sepsis und Schock in der Unfallmedizin, Frühwarnsysteme u.a. „Waldsterben“)

2. Ungeahnte Möglichkeiten zur oralen oder parenteralen passiven Immuntherapie bei Mensch und Tier z.B. gegen HIV-Infektionen (AIDS, ARC) und Virusinfektionen und gegen faktorensuchenhafte infektiöse Durchfallerkrankungen oder lokale Anwendung als Spezialwundsalbe gegen hartnäckig nässende eiternde abszedierende oder nekrotisierende Wunden der Haut und kutanen Schleimhaut.

Poster

Establishment and Characterisation of an Immortalised Human Sebaceous Gland Cell Line (SZ95)*

Holger Seltmann, Heidemarie Neitzel*, Constantin E. Orfanos and Christos C. Zouboulis
Department of Dermatology, University Medical Center Benjamin Franklin, The Free University of D-Berlin,

*Institute of Human Genetics, Virchow Clinic, Humboldt University, D-Berlin
E-mail: seltmann@cipmail.ukbf.fu-berlin.de

There is increasing evidence that sebocytes may play critical roles in the pathophysiologic processes and disorders of the pilosebaceous unit, especially in acne. To date, much of our understanding of the physiology and pathophysiology of the sebaceous gland stems from experimental animal models but no animal model was found predictive in assessing the effects of anti-acne drugs in human beings. The facts that acne is an exclusively human disease and that the secretory activity of the sebaceous gland is remarkably species-specific led to the search for human models.

Therefore, human facial sebaceous gland cells were transfected with a PBR-322-based plasmid containing the coding region for the Simian virus-40 large T antigen. The resulting proliferating cell cultures have been passaged over 100 times to date, have been cloned, and show no signs of senescence after 5 years in vitro, whereas normal human sebocytes can only be grown for three to 6 passages. The immortalised transfected cells, termed SZ95, expressed the Simian virus-40 large T antigen and exhibited epithelial, polymorphous characteristics with different cell sizes of up to 3-fold during proliferation and 6-fold at confluence, show-

ing numerous cytoplasmic lipid droplets. The cells showed large cytoplasm profiles with abundant organelles, including vacuoles and myelin figures which indicated lipid synthesis. Lack of or only few desmosomal areas were observed. SZ95 cells expressed molecules typically associated with human sebocytes, such as keratins 7, 13, 19, and several proteins of the polymorphous epithelial mucin family. Functional studies revealed synthesis of the sebaceous lipids squalene and wax esters as well as of triglycerides and free fatty acids, even after 25 to 40 passages; active lipid secretion; population doubling times of 52.4 ± 1.6 h; reduced growth but maintenance of lipid synthesis under serum-free conditions; and retrieval of cell proliferation after addition of 5α -dihydrotestosterone. Retinoids significantly inhibited proliferation of certain SZ95 cell clones in the expected magnitude 13-*cis* retinoic acid > all-*trans* retinoic acid >> acitretin.

Thus SZ95 is an immortalised human sebaceous gland cell line that shows the morphologic, phenotypic and functional characteristics of normal human sebocytes.

Poster

Etablierung eines *in vitro* Modells für die Rheumatoide Arthritis als Testsystem für therapeutisch relevante Wirkstoffe*

Heike Smolian, Olaf Schultz, Gerd R. Burmester, Josef Zacher und Michael Sittlinger
Charité – Universitätsklinikum, Medizinische Klinik III: Schwerpunkt Immunologie und Rheumatologie, Labor für Tissue Engineering der Humboldt-Universität zu D-Berlin, E-mail: heike.smolian@charite.de

Die Rheumatoide Arthritis (RA) ist gekennzeichnet durch eine entzündlich veränderte Synovialmembran. Es kommt zur Bildung des sog. Pannusgewebes, welches in Knorpel und Knochen eindringt und diese beiden Strukturen zerstört. Das in der AG Tissue Engineering etablierte 3-dimensionale *in vitro* Modell für die Rheumatoide Arthritis (*in vitro* Pannus) bildet die Grundlage für die Entwicklung eines standardisierten *in vitro* Testsystems zur Analyse der Wirkung von Pharmaka und verschiedenen biologischen Wirkstoffen bei entzündlichen rheumatischen Erkrankungen wie der RA. Bedingungen für ein solches Testsystem sind Co-Kulturen de-

finierter und identischer Zellzahl, Größe und funktioneller Eigenschaften. Die Weiterentwicklung des *in vitro* Pannus resultierte in einer interaktiven Co-Kultur aus *high density* Chondrozyten-Pelletkulturen mit humanen RA-Synovialzellen.

Die *high density* Pelletkulturen aus artikulären Chondrozyten wurden über einen Zeitraum von 6 Wochen in 48- und 96-Lochplatten kultiviert und anhand histologischer und immunhistochemischer Färbungen von Gewebefrierschnitten die nach 2 Tagen beginnende Matrixbildung verfolgt. Die Ergebnisse der Färbungen mit Alcianblau und Azan sowie der immunhistochemische Nachweis von Kollagen Typ II zeigten deutlich die Neusynthese von Proteoglykanen und Kollagen

bei zunehmender Strukturierung der Chondrozytenmatrix. Die Charakterisierung der isolierten adhärennten RA-Synovialzellen erfolgte immunhistochemisch und ergab, daß diese Populationen hauptsächlich aus fibroblasten-ähnlichen und makrophagen-ähnlichen Zellen zusammengesetzt sind. Für die Standardisierung dieser Komponente des *in vitro* Testsystems wurden ein Zell-Pool nach den Kriterien Alter und Geschlecht des Patienten sowie Gewebeareal aufgebaut, und die gewonnenen RA-Zellen bei -196°C bis zum weiteren Einsatz gelagert.

Die interaktiven Co-Kulturen wurden basierend auf einer unkomplizierten Handhabung beider Komponenten des Systems hergestellt. Dafür wurden die RA-Synovialzellen in Suspension durch Aufzentrifugieren auf die Chondrozyten-Pelletkulturen in den 48- bzw. 96-Loch-Vertiefungen in direkten Kontakt mit diesen gebracht, anschließend co-kultiviert und anhand histologischer Färbungen untersucht. Bei Vergleich der Co-Kulturansätze mit einem parallel unter den gleichen Bedingungen kultivierten Knorpelzellpellet konnte bei Co-Kultivierung der Chondrozyten-Pelletkulturen mit syno-

* This posters got a prize at the alternatives congress Linz 2000

vialen RA-Zellen deutlich eine Invasion dieser Populationen in die Matrix der Pelletkulturen beobachtet werden, wodurch die Struktur teilweise verändert wurde.

Die vorgestellten Ergebnisse demonstrieren, daß die entwickelten Zell- und Gewebekulturtechniken geeignet sind, den Prozeß der Invasion und Zerstörung der Knorpelmatrix als charakteristischem Merkmal

der RA-Pathogenese unter *in vitro* Bedingungen zu simulieren. Insbesondere die etablierten interaktiven 3-dimensionalen Kulturen ermöglichen die Untersuchung der Rolle einzelner Zellpopulationen und ihrer Wechselwirkungen in diesem System. Das etablierte Kulturmodell eröffnet zahlreiche Möglichkeiten, die Daten aus den Tiermodellen für die RA zu ergänzen, und

eignet sich als ein *in vitro* Testsystem für die Untersuchung neuer therapeutischer Strategien in einem experimentellen System, das wesentlichen Gesichtspunkten der humanen Pathologie Rechnung trägt.

Förderung: SET – Stiftung zur Förderung der Erforschung von Ersatz- und Ergänzungsmethoden zur Einschränkung von Tierversuchen, D-Mainz.

Poster

Echtzeitverfolgung von Arzneistoff/Rezeptor Wechselwirkungen an künstlichen Zelloberflächen auf fluoreszenzverstärkenden Silberkolloidschichten*

Christina Lobmaier, Regina Grünstäudl, Christine Köberl, Nina Lochner, Michael Wirth und Franz Gabor

Institut für Pharmazeutische Technologie und Biopharmazie, Universität A-Wien,
E-mail: franz.gabor@univie.ac.at

Eine der Grundlagen für das Design neuer Arzneistoffe stellt die genaue Kenntnis von biorekognitiven Wechselwirkungen dar - z.B. zwischen einem Wirkstoff und seinem in der Zellmembran verankerten Rezeptor.

Screening Assays potentieller Arzneistoffe, in denen Affinität, Spezifität und Bindungskinetik der Substanzen an ihre Zielstruktur untersucht werden, ermöglichen eine Vorauswahl, aufgrund der weniger aktive Substanzen bereits im *in vitro* Teststadium ausgeschieden werden können. So läßt sich die Zahl der im Tiermodell zu testenden Arzneistoffe deutlich reduzieren.

Bindungskinetiken werden derzeit meist durch *surface plasmon resonance* erfasst. Diese Methode bietet zwar den Vorteil, daß eine Markierung der zu untersuchenden Komponenten nicht nötig ist; allerdings ist ihre Anwendbarkeit oft durch den kostenintensiven apparativen Aufwand eingeschränkt.

Das von uns präsentierte einfache und kostengünstige System zur Echtzeitverfolgung von Bindungskinetiken beruht auf der Erhöhung der Quantenausbeute fluoreszierender Moleküle bei der Annäherung an Silberkolloidschichten.

An Mikrotiterplatten gebundene Silberkolloide verstärken die Fluoreszenz von Molekülen in ihrer unmittelbaren Nähe, wodurch zwischen in Lösung befindlichen und oberflächengebundenen Molekülen unterschieden werden kann. Der Versuchsablauf erfolgt als „ein Schritt“-Reaktion ohne Waschschritte im Mikrotiterplattenformat, wobei ein handelsüblicher Fluoreszenzmikrotiterplattenreader als Meßgerät eingesetzt wird. Mit diesem System können bei einer Meßdauer von 3-10 Minuten Detektionsgrenzen erreicht werden, die mit ELISA Techniken vergleichbar sind.

Auf den kolloidbeschichteten Mikrotiterplatten können verschiedene Testober-

flächen zur Untersuchung der Arzneistoffbindung aufgebracht werden - einerseits durch direkte adsorptive Bindung gereinigter Rezeptoren, andererseits durch Aufbau „künstlicher Tumorzelloberflächen“.

Diese nativen Zelloberflächen entsprechenden Strukturen entstehen durch Fusion gereinigter Plasmamembranvesikeln mit einem Lipidmonolayer, der als SAM („*self assembled monolayer*“) auf die Kolloidschicht aufgebracht wird. An diesen Membranen kann selektiv die Bindung von Arzneistoffen an die Zelloberfläche untersucht werden, da eine Internalisation nicht erfolgen kann. Darüberhinaus können derartige Oberflächen auch im „*high throughput screening*“ von Arzneistoffen eingesetzt werden. Dabei sollte der Assayaufbau kompetitiv erfolgen, um eine Fluoreszenzmarkierung der einzelnen Testsubstanzen zu umgehen.

Wir präsentieren den Einsatz des beschriebenen Systems zur Untersuchung der Wechselwirkung zwischen Weizenlektin, einem zur Darstellung zielgerichteter Arzneiformen geeigneten Lektin, und Caco-2 Zellen. Die Herstellung künstlicher Caco-2 Zelloberflächen an kolloidbeschichteten Mikrotiterplatten und die Bindungskinetik und -spezifität von mit Fluorescein markiertem Weizenlektin an diesen Oberflächen werden vorgestellt.

Diese Arbeit wurde durch den FWF unterstützt (Projekt Nummer P13513).

Poster

Zellkulturen in der pharmazeutisch-technologischen Entwicklung

Michael Wirth, Elisabeth Bogner, Margit Kreutzer, Christina Lobmaier und Franz Gabor
Institut für Pharmazeutische Technologie und Biopharmazie, Universität A-Wien,
E-mail: michael.wirth@univie.ac.at

Der Einsatz von Zellkultur-Modellen bei der Entwicklung neuer Arzneiformen hat

in den letzten Jahren zunehmende Bedeutung erlangt. Zellkultur-Systeme bieten die Möglichkeit, molekulare Mechanismen von Wirkstofftransport und -metabolisierung genau aufzuklären. Das daraus resul-

tierende bessere Verständnis ermöglicht die Entwicklung neuer, aber auch die Optimierung etablierter Formulierungsstrategien. Der vorliegende Beitrag zeigt Möglichkeiten auf, inwieweit die humane Coloncarcinom-Zelllinie Caco-2 beim Design von Arzneiformen mit verbesserter peroraler Verfügbarkeit eingesetzt werden kann.

Eine der Grundvoraussetzungen für eine verbesserte Resorption ist die Interaktion der Arzneiform mit der Zielzelle am Absorptionsort. Gelingt es, die Adhäsion der Arzneiform an der Zelle zu erhöhen - z.B.

* This poster got a prize at the alternatives congress Linz 2000



durch zuckerbindende Proteine (Lektine) -, kann die Wirkstoffabsorption verbessert werden. Durch den Einsatz von Zellkulturen in Kombination mit flow-cytometrischer Analyse kann sowohl die Bindungsaffinität als auch -spezifität untersucht werden, um geeignete Bioadhäsiva zu selektieren. Dabei wird entweder der *targeter* allein oder aber die funktionalisierte Arzneiform eingesetzt. Darüberhinaus kann der Einfluss dieser Substanzen auf die Viabilität der Zellen charakterisiert werden.

Nicht nur die Adhäsion der Arzneiform an der Zelloberfläche, sondern auch die Aufnahme in die Zelle stellt einen wichtigen Parameter für die Resorptionsverbesserung dar. Für diese Internalisationsstudien werden vor allem konfokalmikroskopische, aber auch flow-cytometrische Untersuchungen an den Zellen durchgeführt.

Damit kann festgestellt werden, ob ein cytoadhäsiver *targeter* auch cytoinvasiv ist und eine Internalisation der Arzneiform vermitteln kann. Darüberhinaus bietet der Einsatz von Immunfluoreszenzfärbetechniken oder Monensin Hinweise auf die intrazelluläre Verteilung.

Adhäsion und Internalisation können im Bereich der artifiziellen Dünndarm-Modelle aber nicht nur an Einzelzellen, sondern auch am Gewebe-Modell untersucht werden, wobei in diesem Fall Zell-Monolayer eingesetzt werden. Dabei ist auf ausreichende Polarisierung und Differenzierung zu achten.

Mit Hilfe der Gewebe-Modelle kann auch der Weg, auf dem die Arzneiform die biologische Barriere durchdringt, erfasst werden. Untersuchungen an ausdifferenzierten Monolayern bieten die Möglich-

keit, den Wirkstofftransport über intakte biologische Barrieren zu simulieren. Dabei kann die Permeabilität von *targeter*, Wirkstoff und funktionalisierter Arzneiform miteinander verglichen werden. Durch die Wahl geeigneter Versuchsparameter (4°C/37°C, Glukosezusatz, spezifische Inhibitoren) ist es möglich, den jeweiligen Transportweg aufzuklären.

Insgesamt bietet der Einsatz von Zellkulturen im Bereich der Entwicklung neuer Arzneiformen die Möglichkeit, neue Strategien zur Absorptionsverbesserung von Wirkstoffen rasch und relativ einfach zu bewerten, um so zu Arzneiformen mit erhöhter biologischer Verfügbarkeit zu gelangen. Dadurch kann auf komplexe Tierversuche mit teilweise kontroversen Ergebnissen in frühen Entwicklungsstadien vollkommen verzichtet werden.

Poster

Comparative Evaluation of *in vitro* Test Systems for Pulmonary Drug Delivery Based on Airway Epithelial Cell Lines and Human Alveolar Epithelial Cells (HAEC) in Primary Culture

Carsten Ehrhardt, Sabine Fuchs, Ulrich Friedrich Schäfer and Claus-Michael Lehr
Department of Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology, Saarland University, D-Saarbrücken, E-mail: lehr@rz.uni-sb.de

Introduction

Inhalation is an increasingly important route for drug delivery. Pharmaceutical aerosols are a well established means for either direct targeting to the lung, which results in an immediate onset of drug action and reduced side effects and furthermore the lung offers an elegant pathway for the systemic administration of orally non-deliverable drugs like peptides and proteins. Unfortunately there are no well developed *in vitro* test systems for the acquisition of drug permeability like for the gastro-intestinal tract.

Primary Cells

Human alveolar epithelial type II cells cultured on permeable filter supports (Transwell) are able to differentiate to type I-like cells which form a confluent monolayer with transepithelial electrical resistance (TEER) values higher than 2000 Ωcm^2 . The cells were derived from biopsies of bronchial adenocarcinoma. They were isolated as described earlier (Elbert et al., 1999) and cultured either at the air interface (AIC) or under liquid covered

conditions. Since there are no published data about drug transport across the blood-air-barrier we tested the permeability of very lipophilic (verapamil) and very hydrophilic (FITC-dextran) marker compounds.

Cell lines

Two cell lines have shown promise as *in vitro* absorption models of the airway epithelium: *16HBE14o-* and *Calu-3*. They both form polarized monolayers and express the proteins of the major intercellular junctions (functional tight junctions, desmosomes and *zonulae adherentes*). *16HBE14o-* cells, kindly donated by Dieter C. Gruenert, Cardiovascular Research Institute at the University of California, San Francisco, USA, are normal human airway epithelial cells, obtained from a one-year-old heart lung patient, transformed with SV₄₀. The TEER values vary between 150 Ωcm^2 (AIC) and 600 Ωcm^2 (LCC). The *Calu-3* cell line (ATCC HTB-55) was isolated from a bronchial adenocarcinoma in a 25-years-old male.

Results

The permeability coefficient (P_{app}) of verapamil was found $1,895 \pm 0,37 \cdot 10^{-5}$ cm/sec compared to $8,75 \pm 0,15 \cdot 10^{-8}$ cm/sec for FD-4 dextran. Immunofluorescence of ZO-1 in HAEC and *16HBE14o-* using a polyclonal antibody revealed clear expression of *zonulae occludentes* in both cell types and under both culture conditions (AIC and LCC). *Caveolae* which seem to be important in macromolecule trafficking and potocytosis are found in HAEC by TEM and their main structural protein caveolin was identified by western blotting.

Conclusion

The cellular *in vitro* models are a promising approach for the further study and characterisation of the airways and the blood-air-barrier. They allow the closer examination of drug transport processes as well as of metabolic activities.

Acknowledgements

The Heart Centre Völklingen (Dr. H. Isringhaus) and the Department of Thoracic Surgery, Saarland University, Homburg (Prof. Dr. H-J Schäfers) are being thanked for their regular supply with biopsy material. The ZEBET (BgVV, Berlin) is being thanked for the financial support.

References

Elbert, K. et al. (1999). Monolayers of human alveolar epithelial cells in primary culture for pulmonary drug delivery and transport studies. *Pharmaceutical Research* 16, 601-609.

Poster

The Use of Reconstructed Skin Equivalents in Permeation Studies with Pharmaceutical Dosage Forms

Nadia Zghoul, Heike Wagner, Claus-Michael Lehr and Ulrich Schäfer
Dept. of Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology, Saarland University,
D-Saarbrücken, E-mail: lehr@rz.uni-sb.de

Introduction

Over the past years the skin has become an increasingly important route of drug administration for local, but also for systemic treatment. Transdermal drug delivery is an attractive alternative to the oral route for drugs with high first-pass effects and adverse side-effects. Up to now, mostly animal skin has been used to determine the most suitable formulation during the development of the drug formulation. Nowadays, reconstructed skin equivalents are commercially available. Therefore we tested the suitability of Epiderm® (MatTek Corp., USA-Ashland, MA 01721) for use in permeation experiments as an alternative test system.

Methods

The lipophilic model drug flufenamic acid was applied in two pharmaceutical

formulations i) dissolved in wool alcohols ointment (0.1125%, 0.225%, 0.45% and 0.9%) and ii) dissolved in Soerensen phosphate buffer solution pH 7.4 (0.1125%) to different batches of Epiderm® mounted on Franz diffusion cells. The receptor fluid was sampled at predetermined time intervals and analyzed for drug content by RP-HPLC. To check the barrier function of the reconstructed skin equivalents, diffusion experiments with cell free inserts were carried out as control experiments. For the 0.9% ointment, additional experiments were performed with separated human *Stratum corneum*.

Results

In comparison to cell free inserts a barrier function of Epiderm® could clearly be detected. The flux of flufenamic acid

was 45 times higher when using the 0.1125% solution as donor compared with the 0.1125% ointment. For the 0.1125% ointment, no differences in permeation could be detected for two batches of Epiderm®. Further, there was a linear correlation between the concentration of the drug in the ointment and the flux values obtained. Additionally, for the 0.9% ointment a 10 fold higher flux could be detected for the Epiderm® model in comparison to separated human *Stratum corneum*.

Conclusions

Our results suggest that reconstructed human skin equivalents have barrier properties with respect to drug transport and therefore may become useful tools in the optimisation of drug preparations for dermal drug delivery. Hopefully, the use of these models will considerably reduce experiments with animal skin in this field of research. Future experiments will show whether these experiments can also be used as a surrogate for clinical *in vivo* studies in humans.

Acknowledgements

The ZEBET (BgVV, D-Berlin) is being thanked for financial support.



Poster

Permeabilitäts-Messungen an Haut-Analoga zur Bestimmung der Barrierefunktion bei der perkutanen Absorption im CUTEOPERM-Verfahren

Hanna M. Brodowsky, Johannes Schmitt und Joachim Nöller
Nimbus Biotechnology GmbH, D-Leipzig
E-mail: hbrodowsky@nimbus-biotech.com

Dreidimensionale ausdifferenzierte Kulturen menschlicher Hautzellen können als Modell für die menschliche Epidermis verwendet werden. Die Hornschicht der Epidermis stellt die wesentliche Barriere für die Permeation von Wirkstoffen oder Giften durch die Haut dar. Das CUTEOPERM-Verfahren nutzt dieses Modellsystem, um die Permeation durch Haut zu simulieren.

Für dieses Modell gibt es ein breites Spektrum von Anwendungen. In der Pharmaforschung ist eine hohe Permeabilität wünschenswert, damit ein Medikament über die Haut appliziert werden kann. In der Textilforschung werden Imprägniermittel gesucht, für die die Haut undurchlässig ist. In der kosmetischen Forschung wünscht man eine gezielte Verteilung von Pflegestoffen oder Pig-

menten in den einzelnen Hautschichten, die über die Formulierung gesteuert werden soll.

Im CUTEOPERM-Verfahren ist es möglich, die einzelnen Zellkulturen durch eine vorhergehende Messung zu „kalibrieren“. Vergleichende Messungen der perkutanen Absorption sind dann mit einer hohen Genauigkeit möglich. Dies ist eine wesentliche Verbesserung gegenüber Spalthaut. Außerdem ist das Modellsystem der menschlichen Haut ähnlicher als Tierhaut. Das CUTEOPERM-Verfahren verbindet also eine hohe Prädiktivität mit der Möglichkeit, Tierversuche zu vermeiden.



Poster

Regulation of Components of the Fibrinolytic System in Human Adult Cardiac Myocytes (HACM)

Karin Macfelda, Christoph Kaun, Gerlinde Zorn, Ulrich Oberndorfer, Philipp Holzmann, Barbara Kapeller, Margit Vögele-Kadletz, Udo M. Losert, Gerald Maurer, Kurt Huber and Johann Wojta
University of A-Vienna, E-mail: karin.roschal-macfelda@univie.ac.at

The expression of components of the fibrinolytic system in vasculature is well studied. Not much, however, is known about the expression of plasminogen activators (PAs) and PA inhibitors (PAIs) in the human heart. It was therefore the aim of this study to investigate the fibrinolytic system of human adult cardiac myocytes (HACM) *in vitro*. Adult human cardiac myocytes were isolated by mechanical treatment and characterised by specific markers. The myocytes stained positive for actin (HHF35) and were negative for two different fibroblast-specific monoclonal antibodies (5B5, 1B10). Fur-

thermore, these cells were negative for desmin and vWF indicating the absence of smooth muscle cells or endothelial cells in our preparation. Such characterised cells were treated with interleukin (IL)-1 α (0.2-

200 U/ml) or LPS (1 μ g/ml) for 24 hours. Conditioned media of such treated cells and of untreated control cells were collected and PAI-1, tissue-type PA (t-PA) and urokinase-type PA (u-PA) were determined by specific ELISAs. As can be seen from the table below IL-1 α and LPS increased the production of PAI-1 in these cells. t-PA expression was decreased by IL-1 whereas LPS slightly increased it. Results are given in ng/10⁴ cells.

Thus we provide evidence that HACM produce t-PA and PAI-1 and that inflammatory mediators such as IL-1 α and LPS are involved in the regulation of their expression in cardiac myocytes.

	t-PA	PAI-1
Control	12.03 \pm 1.2	46.4 \pm 4.3
IL-1 (200 U/ml)	6.9 \pm 0.5	101.1 \pm 15.3
IL-1 (20 U/ml)	8.0 \pm 0.7	92.6 \pm 12.5
IL-1 (2 U/ml)	7.3 \pm 0.8	77.3 \pm 8.1
IL-1 (0.2 U/ml)	10.8 \pm 1.1	59.9 \pm 8.7
LPS (1 μ g/ml)	15.7 \pm 0.5	95.3 \pm 12.1

Poster

Three-dimensional culture of human articular chondrocytes in rotating-wall vessels

Stefan Marlovits, Vilmos Vécsei, Michaela Truppe, Mmarkus Dezfulian, and Brigitte Tichy

Ludwig Boltzmann Institute for Biomechanics and Cell Biology, Trauma Research Laboratories, Clinic for Traumasurgery
University of A-Vienna, E-mail: Stefan.Marlovits@akh-wien.ac.at

Introduction

This study describes the culture and three-dimensional assembly of human articular chondrocytes under controlled oxygenation and low shear stress in the NASA-designed rotating-wall vessel (RWV). The bioreactor is a cell culture device that is able to integrate three-dimensional interactions with low-shear mass transfer of nutrients and wastes. Designed with no internal moving parts, the vessel operates in an unusually low shear regimen (0.2 dyn/cm²).

Methods

Chondrocyte monolayer cultures were established from small cartilage samples from the macroscopic unchanged areas of

femoral heads of patients after femoral neck fracture and implantation of hip hemiprosthesis. After serial subculture chondrocytes from the monolayer cultures were released and placed without any scaffold as a single cell suspension in the rotating-wall vessel.

The seeded cells showed a spontaneous aggregation and formation of a solid tissue during the culture time of 10 weeks. In histologic sections a cartilage-like formation with dense extracellular matrix is observed. Immunocytochemical analysis reveals differentiated chondrocytes similar to fresh tissue. The phenotype of the cultivated chondrocytes was determined with immunocytochemical techniques using specific monoclonal antibodies against

human collagen type I and type II, protein S-100, keratansulfat and vimentin. The staining of sulfated proteoglycans was performed with alcian blue and safranin O.

Results

The conditions provided by the RWV promotes the differentiation of articular chondrocytes as well as the production of cartilage specific extracellular matrix. This culture model may be useful for the study of cartilage matrix metabolism, and may be a useful tool in understanding the process of matrix degradation during aging and osteoarthritis. The *in vitro* bioreactor may also provide useful, complementary information regarding the effect of specific growth factors and chemical substances on the process of cartilage regeneration in higher age.



Poster

Kultivierung und Charakterisierung humaner artikulärer Chondrozyten hohen biologischen Alters

Stefan Marlovits, Karin Macfelda, Thomas Marlovits, Doris Moser, Michael Grass-
 lober, Daniela Gruber, Friedrich Kutscha-Lissberg und Vilmos Vécsei
 Universität A-Wien, E-mail: Stefan.Marlovits@akh-wien.ac.at

Ziel unserer Experimente ist die Isolierung, Kultivierung und Charakterisierung humaner artikulärer Chondrozyten (HACs) hohen biologischen Alters.

Das Knorpelgewebe wurde aus den makroskopisch unveränderten Anteilen humaner Hüftköpfe - unmittelbar nach der operativen Versorgung medialer Schenkelhalsfrakturen mittels Hemiprothese - gewonnen. Das Durchschnittsalter der 60 Patienten betrug 84 Jahre. Nach der enzymatischen Isolierung erfolgte die Kultivierung von Einzelzellen als Monolayerkultur.

Frisch isolierte Zellen und Zellen in niedriger Passagezahl weisen in der Licht- und Elektronenmikroskopie eine runde

oder polygonale Zellform auf. Im Zytoplasma dieser Zellen findet sich eine große Anzahl von elektronendichten membranumgebenen Zellorganellen, die sekundäre Lysosomen darstellen. Sie werden, bedingt durch das hohe biologische Alter der kultivierten Zellen, als Residualkörper interpretiert. In der Immunzytochemie zeigen diese Zellen eine positive Reaktion mit dem knorpelspezifischen Kollagen Typ II.

Die humanen artikulären Knorpelzellen bieten bei längerer Kultivierung in der Monolayerkultur das Phänomen der Dedifferenzierung - den Verlust ihrer morphologischen, biochemischen und physio-

logischen Eigenschaften. Dabei nehmen die Zellen fibroblastenförmige Gestalt an und weisen einen weitgehenden Verlust der sekundären Lysosomen auf. Das knorpelspezifische Kollagen Typ II wird durch das knorpeluntypische Kollagen Typ I ersetzt.

In dreidimensionalen Kultursystemen, wie der Agarose-Suspensionskultur, kann die Dedifferenzierung rückgängig gemacht werden. Dabei reexprimieren die Zellen ihren differenzierten Phänotyp, sie weisen abermals eine polygonale Zellform auf und produzieren eine knorpelspezifische Grundsubstanz mit knorpelspezifischem Kollagen Typ II.

Die Kultivierung humaner Chondrozyten mit höheren Passagezahlen gelingt auch aus Knorpelgewebe hohen biologischen Alters. Der Phänotyp der Chondrozyten bleibt in der Monolayerkultur in den ersten Wochen erhalten. Das Phänomen der Dedifferenzierung kann durch die Verwendung von dreidimensionalen Kultursystemen rückgängig gemacht werden.

Poster

Dedifferentiation of aged human articular chondrocytes in monolayer culture

Michaela Truppe, Stefan Marlovits, Brigitte Tichy, and Vilmos Vécsei
 Ludwig Boltzmann Institute for Biomechanics and Cell Biology, Trauma Research
 Laboratories, Clinic for Traumasurgery,
 University of A-Vienna, E-mail: Michaela.Truppe@akh-wien.ac.at

Introduction

Articular chondrocytes cultured in monolayer are used for the treatment of cartilage defects in human joints. In monolayer culture the cells dedifferentiate and the synthesis of cartilage specific matrix proteins gets lost.

Methods

Chondrocyte monolayer cultures were established from small cartilage samples from the macroscopic unchanged areas of femoral heads of ten patients with an average age of 87 years (range 73 to 99) after femoral neck fracture and implantation of hip hemiprosthesis. The phenotype of the cultivated chondrocytes was determined with immune histochemical

stainings using monoclonal antibodies against human collagen type I and type II, protein S-100, keratansulfate and vimentin. Collagen I and Collagen II synthesis was proved by Western Blot analysis.

Equal amounts of pepsin digested protein extracts of chondrocytes cultured for different time periods were separated on 6% PAA gels. One gel was stained with Coomassie Brilliant Blue the other was blotted on nitrocellulose. Purified Collagen I and Collagen extract of cartilage were used as controls. Collagen specific bands detected with Collagen I and Collagen II specific antibodies in Western Blot were visualised by a horseradish peroxidase chemiluminescence system on X-ray film.

Results

Western blot analysis with Collagen type II specific antibody shows a synthesis of Collagen type II until day 27 in monolayer culture. Detection with Collagen type I specific antibody indicates the beginning of Collagen I synthesis around day 21 in monolayer culture. At day 7 and day 14 only Collagen II specific bands appear, chondrocytes at day 37 and 44 produce only Collagen I.

These data are in accordance with the data shown by immunocytochemical staining.

Conclusion

Freshly isolated human articular chondrocytes express cartilage-specific Collagen type II and continue to do so for several days in primary monolayer culture. The "switch" from Collagen type II to Collagen type I synthesis during monolayer culture of these aged cells was found around day 25 (range 21 to 30).

This loss of phenotype in monolayer culture is reversible if the cells are placed in suspension cultures such as agarose or alginate.

Poster

Adaptation der humanen Leberzelllinie Hep-G2 an ein kontinuierliches Wachstum in Suspension zur Produktion eines *in vitro* S9-Mix

Martin Kohlpoth

Akademie für Tierschutz, D-Neubiberg, E-mail: akademie@tierschutzbund.de

Die humane Leberzelllinie Hep-G2 wurde 1979 aus dem Biopsiegewebe eines Lebertumors isoliert und seitdem ausführlich charakterisiert, da sie trotz der Transformation weiterhin einen Großteil der leberspezifischen Enzyme synthetisiert, die für die Metabolisierung von Fremdstoffen im Organismus verantwortlich sind.

Mehrere Studien bestätigen die Möglichkeit, mit Hilfe dieser Zellen einen *in vitro* S9-Mix zu produzieren, der den etablierten S9-Mix, der aus einem Leberhomogenat von Labornagern hergestellt wird, ersetzen kann. Eine Massenkultivierung von Hep-G2 Zellen als Voraussetzung für eine *in vitro* Produktion größerer Mengen eines S9-Mix ist mit der konven-

tionellen Monolayerkultur nicht möglich. Aus diesem Grund wurde versucht, diese Zellen an ein kontinuierliches Wachstum in Suspension zu adaptieren.

Die Adaptation erfolgte zunächst in Schüttelkulturen und anschließend in Spinner-Kulturen. Dabei wurden jeweils die überlebenden Zellen als Monolayer weiterkultiviert, bis wieder eine genügend hohe Zellzahl für den Start der folgenden Kultur mit 5×10^5 Zellen/mL zur Verfügung stand. Der Zeitraum für die Entnahme der überlebenden Zellen wurde von zunächst drei Tagen bei der ersten Schüttelkultur kontinuierlich auf zwei Wochen bei der sechsten Spinnerkultur verlängert. Weitere Optimierungen des Mediums führten zu einem kon-

tinuierlichen Wachstum der Zellen in der Spinnerkultur von bis zu drei Wochen.

Der Verlauf dieser Adaptation wird anhand von Zellzyklusverteilungen, sowie Wachstums- und Vitalitätsraten der Hep-G2 Zellen in den verschiedenen Kulturen dargestellt.

Bei der vergleichenden Charakterisierung der an ein Wachstum in Suspension adaptierten Hep-G2 Zellen mit den Zellen, die weiterhin in Monolayerkulturen kultiviert wurden, wurde eine Kontinuität in der Enzymaktivität bei einer gleichzeitigen Beschleunigung des Zellwachstums festgestellt.

Darüber hinaus eröffnet sich durch das kontinuierliche Wachstum der Zellen in der Suspensionskultur über einen Zeitraum von mehreren Wochen unter Beibehaltung der Enzymaktivitäten die Einsatzmöglichkeit, mit dieser Langzeitkultur die chronische Wirkung von Chemikalien in niedrigen Konzentrationsbereichen zu prüfen. Erste Ergebnisse der Prüfung von Chemikalien in subakut toxischen Konzentrationen werden vorgestellt.

Poster

Primäre Humanhepatozyten – ein Modell zur Beurteilung des Metabolismus von Arzneimitteln als eine Alternative zu Tierversuchen

Judith Fischer, Wolfgang Albrecht*, Eda Tüzüner, Liegang Liu, Jan M. Langrehr, Sven Jonas, T. Steinmüller, Jorg Gerlach, Peter Neuhaus und Andreas K. Nüssler
Humboldt-Universität zu Berlin, Campus Virchow Klinikum, Abt. f. Allgemein-, Viszeral- und Transplantationschirurgie, D-Berlin; *Pharmakin GmbH, D-Ulm
E-mail: andreas.nuessler@charite.de

Wir konnten kürzlich zeigen, dass Rattenhepatozyten, die in Kollagen eingebettet sind oder in einem 3D-Hybridreaktorsystem kultiviert werden, über 14 Tage ihre metabolische Aktivität (CYP 3A1/2, CYP 2C9, CYP 3A4) erhalten, sowie Albumin und Harnstoff synthetisieren. Ferner zeigen wir, dass beide Kultursysteme der primären Monokultur überlegen sind.

In der vorliegenden Arbeit untersuchen wir, inwiefern isolierte Humanhepatozyten im Vergleich zu Rattenhepatozyten ähnliche Resultate liefern können. Ratten- und Humanhepatozyten wurden mittels eines standardisierten Kollagenaseverfahren aus dem Gewebe isoliert und auf Kollagen beschichtete Kulturplatten oder direkt im Kollagen eingebettet und in Wil-

liams Medium kultiviert. Das Medium wurde täglich gewechselt und die Sezernierung von LDH, GOT und Albumin mittels Routinemessungen bestimmt. Die basale metabolische Kapazität der Zellen wurde durch die Umsetzung von Ethoxyresorufin und Ethoxycoumarin zu Resorufin bzw. 7-Hydroxycoumarin bestimmt. Die Induzierbarkeit verschiedener Zytochrome in Hepatozyten wurde durch die Inkubation von Omeprazol (CYP 1A1/2), Phenobarbital (CYP 3A4) oder 3-Methylcholantren über 14 Tage zu verschiedenen Zeitpunkten gemessen. Zusätzlich wurde die Metabolisierung von Diclofenac in die Metabolite 4'-Hydroxydiclofenac sowie 5-Hydroxydiclofenac in Abhängigkeit von der Kultivierungszeit untersucht.

Unsere Arbeit zeigt eindeutig, dass beide Spezies über einen Zeitraum von 14 Tagen im Kollagensandwich sowohl metabolisch aktiv sind als auch die Testsubstanz Diclofenac in die korrespondierenden Metabolite umsetzen. Ferner fanden wir, dass die jeweiligen korrespondierenden Monokulturen in ihrer metabolischen Kapazität, in der Induktion verschiedener Zytochrome und auch in der Umsetzung von Diclofenac sich in den ersten 5 Tagen ähnlich verhalten wie Sandwichkulturen. Ab Tag 6 wurde jedoch in Monokulturen eine verringerte basale und induzierte Zytochromaktivität beobachtet. Der markanteste Unterschied zwischen den beiden Hepatozytenspezies liegt in der Metabolisierung der Testsubstanz Diclofenac. Die Umsetzung von Diclofenac durch Rattenhepatozyten erreichte am Tag 2 ihr Maximum, dann nahm die Metabolisierungskapazität jedoch rasch ab. Im Vergleich dazu metabolisieren Humanhepatozyten Diclofenac über die ersten 8 Tage kontinuierlich. Die Induzierbarkeit für verschiedene CYP 450 Enzyme ist in beiden Spezies vergleichbar, obwohl Humanhepatozyten in der Sandwichkultur eine erhöhte Metabolisierungskapazität aufweisen ($p < 0.05$).

Die vorliegende Studie zeigt eindeutig zwei wesentliche Dinge, die für die Entwicklung neuer Arzneimittel im Vordergrund stehen könnten: 1) die Kultivierung von Humanhepatozyten ist über einen längeren Zeitraum möglich, ohne dass die Metabolisierungskapazität verloren geht; 2)

humane Leberzellen, die aus Operationsmaterial gewonnen werden, sind eine Alternative für *in vitro* Versuche mit Zellen verschiedener Tierspezies. Darüber hinaus werden durch die Anwendung von humanen Leberzellen, „falsch“- positive Ergebnisse, die aus Tierzellen gewonnen werden,

minimiert. Dies ist für die Sicherheit und Weiterentwicklung einer neuen Substanz von großer Bedeutung und könnte für die raschere Markteinführung eines Produktes entscheidend sein.

Die vorliegende Arbeit wurde durch die ZEBET/BgVV (Z.5.1-1328-154) unterstützt.

Poster

Vergleich zweier *in vitro* Modelle zur Bewertung von Entzündungen und Zellschädigungen

Tanja Grobuschek¹, Astrid Walch¹, Klaudia Hummer¹, Helga Lampert¹, Martina Buter¹, Wolfgang Sametz¹, Reinhold Wintersteiger² und Heinz Juan¹

¹Institut für Biomedizinische Forschung und ²Institut für Pharmazeutische Chemie, Universität A-Graz, E-mail: heinz.juan@kfunigraz.ac.at

Für die Messung verschiedener Entzündungsmediatoren, wie z.B. Prostaglandine (PG) und Phospholipide (PL), entwickelten Juan et al. (1980, 1986) zwei *in vitro* Modelle.

Als Grundlage für unsere Untersuchungen diente das mittlerweile langbewährte, isoliert perfundierte Kaninchenohr (Juan und Sametz, 1986) und als Vertreter menschlichen Gewebes die isoliert perfundierte Nabelschnurvene (Hammer et al., 1996). Letztere könnte eine neue, vielversprechende Ersatzmethode zum Tierversuch darstellen.

Daher sollte im Rahmen dieser Arbeit die Vergleichbarkeit beider Modelle untersucht werden, mit dem Endziel, Toxizitätstests am Tier durch aussagekräftige Alternativen zu ersetzen.

Um die Freisetzung der PG und PL bestimmen zu können, wurden beide *in vitro* Systeme mittels eines Recycling-Verfahrens mit ¹⁴C-Arachidonsäure (¹⁴C-AA) beladen. Hierbei wird die ¹⁴C-AA in die Doppellipidschicht der Zellmembran eingebaut. Die Applikation diverser Stimuli, wie Bradykinin (BK), Histamin (His) oder Calcium-Ionophor A23187, führt zu einer Aktivierung der Phospholipase A₂ (PLA₂), wodurch ¹⁴C-AA aus der Phospholipidmembran wieder freigesetzt und enzymatisch zu PG u.a. Eicosanoiden umgewandelt wird.

Aus dem Nabelschnur- bzw. Ohr-Perfusat wurden die freigesetzten ¹⁴C-PL, ¹⁴C-PG und die ¹⁴C-AA extrahiert, mittels DC aufgetrennt und mit einem Szintillationszähler vermessen (Juan und Sametz, 1980). Anhand der erhaltenen Freiset-

zungsmuster der ¹⁴C-AA-Metabolite und ¹⁴C-PL konnten nun beide *in vitro* Modelle verglichen werden.

Um eine Hemmung der durch die oben genannten Stimuli induzierten Freisetzung von PG und PL zu erreichen, wurde die Wirkung eines Ca²⁺-Entzuges mittels EGTA und der Einfluß des Cyclooxygenase-Hemmers Indometacin untersucht.

Erste Ergebnisse am isoliert perfundierten Kaninchenohr zeigen, daß unter Ca²⁺-Entzug sowohl die His- als auch die BK-induzierte Freisetzung von PL und der AA-Metabolite massiv zurückgedrängt wurde. Die Freisetzung der AA blieb nahezu unbeeinflusst. Vergleichende Untersuchungen an der Nabelschnur sind noch nicht abgeschlossen.

Am Modell der perfundierten Nabelschnurvene konnten, unter Ca²⁺-Entzug mittels EGTA und dem stärkeren Stimulator A23187, vielversprechende Daten erhalten werden. Die stimulierte Freisetzung von PL, PGI₂, PGE₂ und der AA wurde durch den Ca²⁺-Entzug signifikant gehemmt. Die gewonnenen Ergebnisse demonstrieren, daß die Nabelschnurvene mit dem Modell des Kaninchenohres verglichen werden kann.

Der Einfluß der in Fisch und Fischölen enthaltenen, mehrfach ungesättigten Fettsäuren Eicosapentaensäure (EPA) und Docosahexaensäure (DHA), führte zu einer Hemmung der A23187 induzierten PL-Freisetzung an der Nabelschnurvene (Socini et al., 1983). EPA zeigte hierbei eine stärkere Wirkung als DHA. Es könnte sich dabei um eine zellprotektive Wirkung handeln. Dies veranlaßte uns, auch

den Effekt der 9-cis,11-trans Linolsäure („rumenic acid“) in unsere Untersuchungen einzuschließen. Erstaunlicherweise führte eine Perfusion mit dieser konjugierten Fettsäure zu einem Anstieg der PL-Freisetzung. Um dies zu erklären sind noch weiterführende Untersuchungen notwendig, v.a. auch im Hinblick auf ein eventuell vorhandenes antikarzinogenes Potential.

Eine weitere Art der mechanischen Schädigung der Endothelzellen von Blutgefäßen des Kaninchenohres, nämlich das Durchpressen von Luft, wurde auch untersucht: Eine vor der Schädigung verabreichte Indometacinperfusion konnte die Biosynthese der PG signifikant erniedrigen. Die stimulierte Freisetzung der PL und der AA blieb, wie erwartet, unbeeinflusst.

Zusammenfassend zeigen unsere Ergebnisse, daß die Vene der isolierten Nabelschnur des Menschen ein erfolgversprechendes, geeignetes *in vitro* Modell für Entzündungen und Zellschädigungen darstellt. Trotz der unterschiedlichen Beschaffenheit der Gefäßstrukturen beider Systeme finden sich vergleichbare Parallelen. Eine Eignung als aussagekräftige Ersatzmethode zu Toxizitätstests am Tier könnte durchaus gegeben sein.

Literatur

- Hammer, S., Diethart, S., Sametz, W. et al. (1998). Neue *in vitro*-Modelle für Entzündung, Zellschädigung und Entzündungshemmung (266-267). Poster. In Schöffel et al. (Hrsg.), *Forschung ohne Tierversuche 1997*. Wien: Springer.
- Juan, H. und Sametz, W. (1980). *Naunyn-Schmiedeberg, s Arch. Pharmacol.* 314, 183.
- Juan, H. und Sametz, W. (1986). *Naunyn-Schmiedeberg, s Arch. Pharmacol.* 332, 288-292.
- Socini et al. (1983). *Prostaglandins* 25, 693-710.

Poster

Freisetzung von Isoprostanen aus der menschlichen Nabelschnurvene

Martina Butter¹, Klaudia Hummer¹, Helga Lampert¹, Wolfgang Sametz¹, Reinhold Wintersteiger² und Heinz Juan¹

¹Institut für Biomedizinische Forschung und ²Institut für Pharmazeutische Chemie, Universität A-Graz, E-mail: heinz.juan@kfunigraz.ac.at

Bei den Isoprostanen handelt es sich um eine erst kürzlich entdeckte Substanzklasse, die durch radikalische, nicht enzymatische Oxidation von Arachidonsäure gebildet wird (Morrow et al., 1990). Das Ausmaß ihrer Entstehung kann deshalb als Indikator für oxidativen Streß und für freie Radikale herangezogen werden. Phospholipase A₂ (PLA₂)-Aktivatoren, wie Bradykinin (BK), Histamin (His), Noradrenalin (NA) und A23187 (Kalzium-Ionophor), induzieren eine verstärkte Freisetzung von Eicosanoiden.

In dieser Arbeit sollte nun untersucht werden, ob diese Substanzen neben der vermehrten Prostaglandin-Freisetzung auch eine Stimulierung der Isoprostanbildung bewirken.

Als *in vitro* Zellschädigungsmodell diente - alternativ zum früher verwendeten isoliert perfundierten Kaninchenohr - die menschliche Nabelschnurvene. Die Quantifizierung der freigesetzten Isoprostane erfolgte nach Extraktion aus dem Nabelschnurperfusat mittels ELISA (*En-*

zyme Linked Immuno Sorbent Assay). Vermessen wurde sowohl die Gesamtkonzentration an 8-iso-PGF_{2α} (frei und verestert) als auch die Konzentration an freiem 8-iso-PGF_{2α} allein.

Der vasokonstriktorische Effekt der Isoprostane wird über Thromboxanrezeptoren vermittelt (Sametz et al., 1999). Deshalb wurde auch die Konzentration von TXA₂ in Form seines stabilen Metaboliten TXB₂ untersucht.

Die oben genannten PLA₂-Aktivatoren wurden jeweils als Bolus verabreicht.

Die Ergebnisse zeigen, daß sowohl A23187, als auch His, H₂O₂, BK und NA eine signifikant vermehrte Freisetzung von 8-iso-PGF_{2α tot} verursachen. Unter H₂O₂-Einfluß erfolgt die Isoprostanbildung am schnellsten. Ein signifikanter Anstieg an freiem 8-iso-PGF_{2α} konnte hingegen nur nach A23187- und H₂O₂-Gabe beobachtet werden. Die vermehrte Bildung von TXB₂ wurde durch A23187, His und BK induziert, jedoch in geringerem Ausmaß als 8-iso-PGF_{2α}. H₂O₂ setzte kein TXA₂ frei.

Das Ergebnis unserer Studie unterstreicht die Hypothese, daß endogene Substanzen wie BK, His und NA, die bei kardiovaskulären Krankheiten und entzündlichen Prozessen vermehrt auftreten, eine Freisetzung von 8-iso-PGF_{2α} bewirken.

Von besonderer Bedeutung ist, daß sich die Resultate, die wir an der menschlichen Nabelschnur erhalten haben, im wesentlichen mit denen am isoliert perfundierten Kaninchenohr (Sametz et al., 2000) decken. Die Nabelschnur hat sich somit als geeignete Ersatzmethode zum Tierversuch erwiesen. Sie ermöglicht Untersuchungen von toxischen und entzündungsfördernden Substanzen an einem menschlichen Organ.

Literatur

- Morrow, J. D., Hill, K. E., Burk, R.F. et al. (1990). A series of prostaglandin F₂-like compounds are produced *in vivo* in humans by a non-cyclooxygenase, free radical-catalyzed mechanism. *Proc Natl Acad Sci USA* 87, 9383-9387.
- Sametz, W., Prasthofer, S., Wintersteiger, R. und Juan, H. (1999). Vascular effects of isoprostanes after endothelial damage. *Prostaglandins, Leukotriens and Essential Fatty Acids* 61(6), 369-372.
- Sametz, W., Hummer, K., Butter, M. et al. (2000). Formation of 8-iso-PGF_{2α} and thromboxane A₂ by stimulation with several activators of phospholipase A₂ in the isolated human umbilical vein; *in press*

Poster

In vitro measurement of cancer tissue invasion into healthy tissue as a replacement method for animal experiments

Helmut A. Tritthart, Trevor DeVaney, Manfred Hartbauer and Helmut Ahammer
Institute of Medical Physics und Biophysics, Karl-Franzens-University A-Graz
E-mail: helmut.tritthart@kfunigraz.ac.at

Cancer is a life threatening disease, metastases can form in the body which leads to organ damage and weakening of the tissues through rapid cell division and growth. Small tumours are also capable of producing metastases.

The main aim of cancer research is the discovery of the factors involved in the development of metastases. The inhibition of the development of metastases would be a method for the successful pre-

vention of the life threatening process of metastasis formation in cancer.

Many animal experiments are used to reach the above aim. Modern methods that make use of tissue culture would be a scientifically and publicly desirable alternative to these very painful and stressful animal experiments.

Here we present an alternative method to the above experiments. Here we make use of the spheroid confrontation method

whereby continuous observation and three dimensional reconstruction of optical sections play a crucial role.

Optical sectioning of the living tissues has been made possible in that a confocal scanning microscope, fluorescent stains, and an micro-incubation chamber have been used in combination in order to enable dynamic observation of the invasive processes.

The micro incubator enables observation and optical sectioning during growth through constant temperature and gas mix.

Using new image analysis techniques it is possible to determine the stages and processes involved in the invasion process.

We hope that this new tissue culture method and analysis method will enable the replacement of painful and stressful animal experiments.

Poster

Studies on CCK-processing of primary neuronal cell cultures obtained from fertilised eggs instead of rat foetuses

Rüdiger Schade¹, Mirko Sasse¹, Peter Henklein² and Andreas Hlinak³

¹Institute of Pharmacology and Toxicology and ²Institute of Biochemistry, Medical Faculty (Charité), Humboldt-University, D-Berlin, ³State Veterinary and Food Investigation Centre, D-Frankfurt/Oder, E-mail: ruediger.schade@charite.de

Cholecystokinin (CCK) is a neuropeptide which could be demonstrated in the brain as well as in the gut of vertebrates having several biological functions. By means of antibodies (Ab) with specificity for CCK a CCK-like immunoreactivity (CCK-IR) could be shown in several rat brain areas. However, CCK-IR positive perikarya was shown in some brain regions without pretreatment with colchicin (cortex, hippocampus) in contrast to other regions (substantia nigra). This phenomenon may be explained by a region-specific or neuron-specific CCK-processing. It is assumed that CCK is synthesised in the cell body, is packed in vesicles and is transported subsequently to the terminals. During the axonal transport,

the pro-CCK becomes cleaved enzymatically to biologic active molecules (CCK-8, CCK-4). This CCK-processing results in a continuous change of the primary and secondary structure of the CCK-molecule. An anti-CCK Ab may react with a certain portion (epitop) of the CCK-molecule. It is conceivable that due to the CCK-processing this epitop disappeared during a certain period and is accessible once again in later processing-stages. We were able to confirm this assumption by means of primary neuronal cultures (PNC). We used *in vitro* cultures for this study because a cultured neurone grows in two dimensions and so can be observed as a complete structure in contrast to brain sections.

Poster

Replacement of fetal calf serum by an egg yolk factor with CCK/gastrin-like immunoreactivity in cell culture

Mirko Sasse, Thomas Lengwinat², Peter Henklein¹, Andreas Hlinak³ and Rüdiger Schade
Institute of Pharmacology and Toxicology and ¹Institute of Biochemistry, Medical Faculty (Charité), Humboldt-University, D-Berlin, ²Institute of Zoo and Wildlife Biology, D-Berlin, ³State Veterinary and Food Investigation Centre, D-Frankfurt/Oder, E-mail: ruediger.schade@charite.de

The *in vitro* culture of different cell types is an important scientific tool and becomes increasingly accepted as a real alternative to animal experiments. Foetal calve serum (FCS) is a common supplement used in many cell culture mediums and provides cells with many growth factors and cytokines necessary for a successful culture. In view of the animal protection issues surrounding the production of FCS, an alternative substance allowing the replacement or reduction of FCS is desirable.

In this paper a yolk extract (EYF-X) is described originating from chicken eggs which facilitates *in vitro* culture of a vari-

ety of cell types. When the extract was added to a culture medium used for *in vitro* fertilisation (cat) the amount of successful fertilisations was significantly increased. In a further *in vitro* model (permanent neuronal cell line N2A) the yolk extract significantly stimulated cell proliferation as well as the growth of cell processes. Surprisingly, a set of antibodies with specificity against different parts of the prepro-cholecystokinin (prepro CCK) was able to react with the extract. It could be demonstrated that the intensity of the reaction depends on the egg's age (time after the laying date). Analysis by gel chromatography recorded a main

Normally, PNC from rats were used for these studies. To obtain such cultures foetuses of pregnant rats were removed and brain areas were dissected and prepared in usual ways. A pregnant rat regularly has 10-12 foetuses. Thus, independent on the cells actually needed, 10-12 foetuses are killed. The aim of this study was to investigate whether the PNC from rats can be replaced by such cultures from fertilised eggs.

In order to obtain PNC fertilised eggs were hatched up to the 7th day. Thereafter the cells were prepared in the same way as above. According to our results the PNC obtained from fertilised eggs is a suitable alternative to PNC from rats. By using fertilised eggs it becomes possible to calculate exactly the amount of cells necessary for the actual study.

It could be demonstrated that PNC from rats could be replaced by PNC from fertilised eggs without problems concerning the scientific goal of our investigation.

Acknowledgement

This work was supported by the Bundesministerium für Bildung, Wissenschaft, Forschung und Technologie (Grant No. 0311470A).

protein fraction with an apparent molecular weight between 20 and 30 kDa. This fraction was labelled by Western-blot using an Ab with specificity against CCK-octapeptid (CCK-8). These findings suggest that the yolk factor may be a CCK/gastrin like molecule.

Since CCK/gastrin-like molecules have been detected also in spermatozoa of mammals the influence on *in vitro* fertilisation could be explained by the yolk factor replacing the endogenous CCK/gastrin-like molecule destroyed in sperm freezing. The results of this study suggest it may be possible to replace FCS by EYF-X but the application of the yolk factor to a broad spectrum of cell types remains to be investigated.

Acknowledgements

This work was supported by the Zentralstelle zur Erfassung und Bewertung von Ersatz- und Ergänzungsmethoden zum Tierversuch (ZEBET, Grant No.: 13280-150) and partly by the Bundesministerium für Bildung, Wissenschaft, Forschung und Technologie (Grant No.: 0311470A).



Poster

A New High Resolution ECG Technique for Cardiac Conduction and Refractoriness Measured With *in vitro* Perfused Mice Hearts

Andreas Lueger, Gerhard Stark, Marianne Brodmann and Helmut A. Tritthart*

Department of Internal Medicine, Inst. of Medical Physics and Biophysics, Karl-Franzens-University A-Graz, E-mail: helmut.tritthart@kfunigraz.ac.at

Increasing numbers of genetically altered mice models are being developed for a better understanding of mechanisms underlying complex cardiovascular disorders. We describe the evaluation of electrophysiologic parameters from the intact cardiac conduction and pacemaker system of isolated mice hearts perfused by the method of Langendorff. Intracardiac signals could hitherto not be measured in very small hearts, catheters and experiments with larger animals (dogs, swine) were necessary.

Methods

17 adult mice of either sex were sacrificed by dislocation of the neck. The thorax was

quickly opened, the aorta was connected to a cannula and perfused retrograde with Tyrode's solution at a constant flow rate. Two silver wire electrodes were placed on the right atrium for recording of atrial signals, two other electrodes were placed in the valve plane for ventricular and HIS-signal recording. Atrial (A-ERP), AV-nodal (AV-ERP) and ventricular effective refractory period (V-ERP) were evaluated using a standard stimulation protocol.

Results

Spontaneous sinus rate was 306 ± 42 beats/min (values are mean \pm SEM), AH, HV, QRS and QT intervals were 21.1 ± 3.3 , 6.0 ± 0.8 , 19.1 ± 3.7 and 119 ± 21 ms respec-

tively. A-ERP's evaluated under different S1-S1(60,80,100 ms) intervals were 33.0 ± 12.3 , 32.4 ± 7.3 , 30.1 ± 7.5 ms. AV-ERP's evaluated under different S1-S1(120, 140, 160 ms) intervals were 76.5 ± 11.5 , 72.6 ± 8.4 , 70.0 ± 7.4 ms. V-ERP's evaluated under different S1-S1(80, 120, 160 ms) intervals were 45.2 ± 12.8 , 42.5 ± 13.4 , 41.1 ± 12.8 ms. In contrast to the ERP's of the AV-node no clear rate adaptive phenomenon of the atrial and ventricular ERP's could be estimated.

Conclusion

The loss of the rate adaptive phenomenon of refractoriness in the mice heart may be explained by an altered composition of potassium channels compared to other (larger) species. The isolated mice heart perfused by the method of Langendorff is a reliable way for evaluation of electrophysiological parameters, also in genetically altered mice models.





- Gruber et al. (eds.), *Forschung ohne Tierversuche 2000* (40-49). Wien-New York: Springer Verlag.
- Gstraunthaler, G. and Hartung, T. (1999). Bologna Declaration toward Good Cell Culture Practice. 3rd World Congress on Alternatives and Animal Use in the Life Sciences, Bologna, Italy. *ATLA* 27, 206.
- Gstraunthaler, G., Seppi, T., and Pfaller, W. (1999). Impact of culture conditions, culture media volumes, and glucose content on metabolic properties of renal epithelial cell cultures. Are renal cells in tissue culture hypoxic? *Cell. Physiol. Biochem.* 9, 150-172.
- Hartung, T., Gstraunthaler, G. and Balls, M. (2000). Bologna Statement on Good Cell Culture Practice (GCCP). *ALTEX* 17, 38-39.
- Hay, R. J. (1988). The seed stock concept and quality control for cell lines. *Anal. Biochem.* 171, 225-237.
- Hay, R. J. (2000). Cell line authentication and the seed stock concept. In H. Schöffl, H. Spielmann, F. P. Gruber et al. (eds.), *Forschung ohne Tierversuche 2000* (275-281). Wien-New York: Springer Verlag.
- Hay, R. J., Reid, Y. A., McClintock, P. R. et al. (1996). Cell line banks and their role in cancer research. *J. Cell. Biochem. Suppl.* 24, 107-130.
- Hayflick, L., Weinberg, R. A., Sager, R. et al. (1990). In the interest of clearer communication. *In Vitro Cell. Dev. Biol.* 26, 1-6.
- Markovic, O. and Markovic, N. (1998). Cell cross-contamination in cell cultures: the silent and neglected danger. *In Vitro Cell. Dev. Biol.* 34, 1-8.
- N. N. (1988). Chancen und Risiken durch Säugerzellkulturen. *Forum Mikrobiologie* 11, 359-367.
- N. N. (1991). Gefährdungspotential durch Retroviren beim Umgang mit tierischen Zellkulturen. *BIOforum* 11, 428-436.
- Nelson-Rees, W. A., Daniels, D. W. and Flandermeyer, R. R. (1981). Cross-contamination of cells in culture. *Science* 212, 446-452.
- Schaeffer, W. I. (1984). Usage of vertebrate, invertebrate and plant cell, tissue and organ culture terminology. *In Vitro* 20, 19-24.
- Schaeffer, W. I. (1989). In the interest of clear communication. *In Vitro Cell. Dev. Biol.* 25, 389-390.
- Schaeffer, W. I. (1990). Terminology associated with cell, tissue and organ culture, molecular biology and molecular genetics. *In Vitro Cell. Dev. Biol.* 26, 97-101.
- Wiebel, F. J., Andersson, T. B., Casciano, D. A. et al. (1997). Genetically engineered cell lines: characterization and application in toxicity testing. ECVAM Workshop Report 26, *ATLA* 25, 625-639.

Korrespondenzadresse

Dr. Dr. Thomas Hartung
 Universität Konstanz
 Biochemische Pharmakologie
 Postfach M 668
 D-78457 Konstanz
 Tel. +49-7531-88 41 16
 E-mail: Thomas.Hartung@uni-konstanz.de



Poster

Biomaterials *in vitro*: Monitoring cell lines from primary cultures using Multilocus-DNA-Fingerprinting

Erwin Falkner, Wolfgang Ficke, Barbara Kapeller, Heidrun Eberl, Karin Macfelda, Udo Losert

Center for Biomedical Research, University of Vienna,
 E-mail: a8908977@unet.univie.ac.at

Cell lines originating from primary cultures are innovative tools for e.g. biocompatibility testing of biomaterials *in vitro*. In our studies we used fibroblast/endothelial cell/chondrocyte cultures of human origin and of the test animal species most common for this purpose *in vivo*. Verification of the identity of these cells is obligatory for reproducibility of the tests and valid interpretation of the results. Cultured cells have to be checked for identity, contaminations of various origins and also for genomic mutations occurring during prolonged cultivation *in*

vitro or due to exposition to biomaterials. Furthermore, the risk of genetic cross-contamination with other cells increases with the number of cell cultures passaged parallel in the same laboratory. Therefore, we generated reference fingerprints of the cultures in varying passages for comparative monitoring of cells purposed for *in vitro* tests.

Minisatellite DNA polymorphism resulting in reproducible individual DNA fingerprints is very discriminatory and can be used for cell culture monitoring. The patterns are stable over several passages,

although sudden changes did happen in some cases, i.e. loss/gain of bands or changes in band-intensity, indicating massive genomic mutations of the cultures *in vitro*. Influences of biomaterials on the prints could not be detected.

Impure genomic DNA resulting from problems during isolation due to influences of still adhering biomaterial-particles led to troublesome band-detecting with ImageMaster™ standard-software. These could be solved in most cases optimizing the scans with MS™ Corel PHOTOPAINT 7.

Several tasks can be followed at the same time: detection of contaminant cells, identification of these cells of primary culture origin used for *in vitro* testing and finally, monitoring for eventual genomic mutations due to prolonged cultivation or contact to biomaterials. Inconclusive results in just one of these aspects should lead to the disqualification of the monitored cultures from usage *in vitro*.