



PRÜFUNG AUF LOKALE VERTRÄGLICHKEIT MITTELS EINER HUMANEN ZELLKULTURHAUT

Zweite Generation einer Ersatzmethode zum Draize-Test

Ralf Michael Dreher

Abteilung für Molekulare und Zelluläre Biologie
BATTELLE-EUROPA, Frankfurt
Am Römerhof 35, 6000 Frankfurt/Main

ZUSAMMENFASSUNG

Es wurde eine Methode entwickelt, die zur Abschätzung der Reizwirkung von Chemikalien dient, und die als eine Art "zweite Generation von Ersatzmethoden" zum Draize Test angesehen werden kann.

Aus menschlicher Haut gewonnene Keratinozyten werden in 24-well-Platten bis zur Konfluenz gezüchtet. Nach zwei weiteren Tagen werden die Zellkulturhautstückchen ($1 - 2 \text{ cm}^2$) enzymatisch als zusammenhängender Zellverband abgelöst und eingefroren.

Der Test erfolgt durch eine 24-stündige Inkubation der aufgetauten Zellkulturhaut mit der zu untersuchenden Substanz in einer Verdünnungsreihe. Durch eine 3-stündige Inkubation mit einer 0,4% Neutralrot-Lösung und einen Waschvorgang wird der von den lebenden Zellen aufgenommene Farbstoff extrahiert und photometrisch bestimmt.

Erste Erfahrungen wurden mit dem Tensid Natriumdodecylsulfat gemacht.



EINLEITUNG

Kenntnisse über die lokale Verträglichkeit, d.h. die Haut- und Schleimhautverträglichkeit, gehören zu den Basisdaten im Rahmen der toxikologischen Charakterisierung und Bewertung chemischer Stoffe. Insbesondere bei Artikeln des täglichen Bedarfs wie Haushalts- und Reinigungsmitteln oder Körperpflegeprodukten ist es unverzichtbar, das Risiko von Haut- oder Augenschädigung beim Umgang mit diesen Erzeugnissen auszuschließen.

Untersuchungen zur lokalen Verträglichkeit sind deshalb unverzichtbarer Bestandteil verschiedener Prüfprogramme, wie sie z.B. das Chemikaliengesetz (BGBI. I Nr. 58 S. 1718 vom 16. September 1980) vorschreibt.

Die Prüfung der haut- und augenreizenden Eigenschaften von Chemikalien erfolgt nach dem gegenwärtigen Stand der Technik an Versuchstieren mit Hilfe des Draize-Tests (1). Da diese Prüfung mit zum Teil erheblichen Belastungen für die Tiere verbunden ist, wurde frühzeitig versucht, Ersatzmethoden, die ohne bzw. mit geringeren Tierzahlen oder Belastungen auskommen, zu etablieren. Diese Versuche sind zum Teil recht erfolgreich bearbeitet worden, teilweise befinden sie sich in der Phase der Validierung.

Folgende Ansätze erscheinen dabei erfolgversprechend:

1. Chorionallantoismembran (CAM) an befruchteten und bebrüteten Hühnereiern (2, 3)
2. Isolierte Organkulturen wie Hautpräparate von Nacktmäusen (4) oder Augenexplantate aus Schlachthofmaterial (5).
3. Zell- und Gewebekulturen mit verschiedenen permanenten Zelllinien und primären Zellen; speziell der Neutralrot-Test (6).

Diese Ersatzmethoden für den Draize-Test entsprechen weitgehend, aber nicht völlig, den Forderungen an eine ideale Alternativmethode wie:

- Völliger Ersatz von Tierversuchen
- Die richtige Targetzelle (humane Keratinozyten)
- Dreidimensionaler Zellverband
- Praktische Durchführbarkeit
- Geringe Kosten
- Übertragbarkeit der Resultate auf in vivo Versuche.

Gerade die Forderung des dreidimensionalen Zellverbands bei toxikologischen Zellkulturtests ist für die Übertragbarkeit von in vitro- auf in vivo Versuche sehr wichtig, was auch von der Arbeitsgruppe von Prof. Hülser bei der Erforschung von Multizell-Sphäroiden gezeigt wurde (7), da bei dreidimensional wachsenden Zellaggregaten im Gegensatz zu zweidimensional wachsenden Zellkulturen Regulationsleistungen und Organisationsmerkmale nachzuweisen sind, wie man sie von intakten Organismen her kennt.

HUMANE ZELLKULTURHAUT

Den Anforderungen an eine ideale Ersatzmethode würde man mit einer dreidimensionalen Zellkulturhaut, gewonnen und gebildet aus primären humanen Keratinozyten, sehr nahe kommen. Beim Battelle Institut Frankfurt läuft seit ca 1 Jahr ein in Deutschland einmaliges Projekt, bei dem aus 1 - 2 cm² großen Spalt- oder Vollhautproben von Brandverletzten die Hautzellen (Keratinozyten) gewonnen werden, innerhalb von 3 - 4 Wochen bis zu 1 m² Fläche in vitro expandiert und, nach enzymatischer Ablösung aus den Kulturschalen, den Brandverletzten wieder transplantiert werden (Abb. 1 und 2).

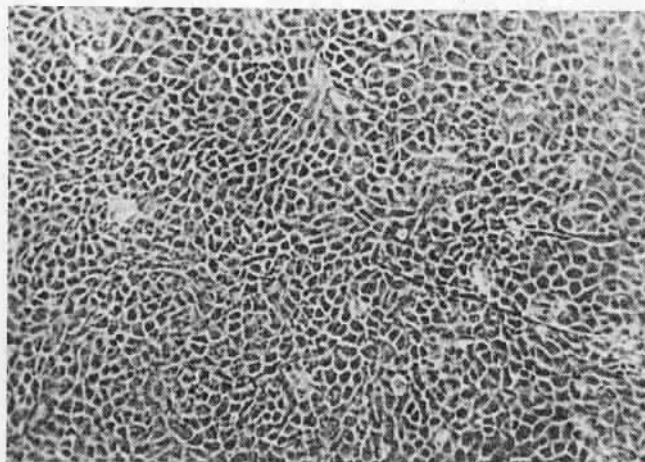


Abb. 1: Mikroskopische Aufnahme einer konfluenten Keratinozytenkultur, Vergrößerung 128fach

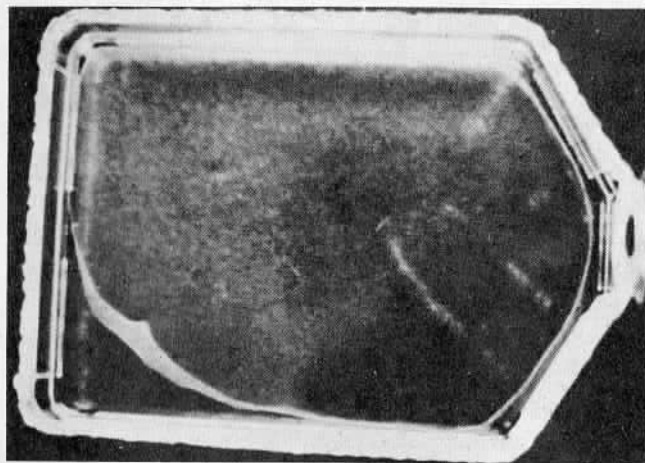


Abb. 2: Ablösen einer in vitro gezüchteten humanen Zellkulturhaut aus der Zellkulturflasche

Es handelt sich hierbei um autologe Haut, d.h. es gibt keinerlei immunologische Abstoßung. Diese transplantierte Haut wächst innerhalb wenige Tage an und differenziert sich völlig aus (8).

Mikroskopische Aufnahmen der frisch abgelösten Haut zeigen, daß sie aus ca 3 - 6 Schichten Keratinozyten besteht.

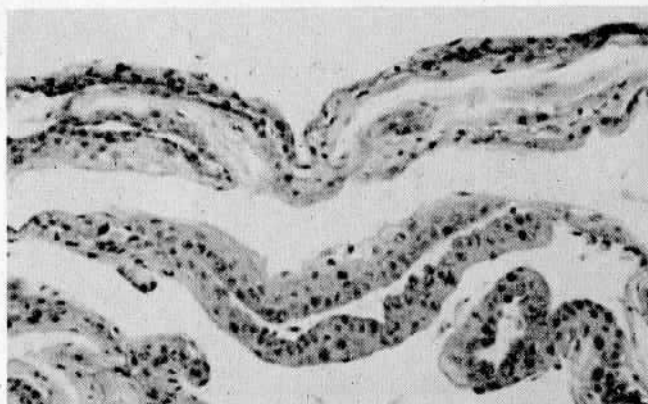


Abb. 3: Schnitt einer frisch abgelösten Zellkulturhaut:
Hämatoxylin-Eosin-Färbung, Vergrößerung 128fach

Erste Voruntersuchungen zeigten, daß diese "Haut" ein ideales Untersuchungsobjekt für toxikologische in vitro Untersuchungen bei Prüfungen auf lokale Verträglichkeit darstellt.

METHODE

Aus humaner Haut werden die Keratinozyten gewonnen und in 24 well-Platten angezüchtet. Nach Erreichen der Konfluenz werden die Zellen noch zwei Tage weitergezüchtet; mit Hilfe von Trypsin werden die 2 cm² großen Zellkulturhautstückchen abgelöst und mit üblichen Methoden eingefroren. Nach dem Auftauen und Waschen wird das Zellkulturhautstückchen 24 h mit der zu prüfenden Substanz bzw. einer Verdünnung kultiviert, 3 h mit einer 0,4% Neutralrot-Lösung behandelt, gewaschen und mit 0,2 ml essigsäurem Alkohol der von den vitalen Zellen aufgenommene Farbstoff aus den Zellen heraus gelöst. Die Auswertung erfolgt photometrisch bei 540 nm (6).

ERGEBNISSE

Wie oben erwähnt, wurden bisher erst wenige Experimente mit dieser Methode durchgeführt. Als Modells substanz diente dabei das anionische Tensid Natriumdodecylsulfat, das in verschiedenen Konzentrationen (20 $\mu\text{g/ml}$ - 360 $\mu\text{g/ml}$) mit den Hautstückchen inkubiert wurde. Neben dem NR 90 - Wert, (Reduktion der Vitalität der Zellen um 10% auf 90%), der 31 $\mu\text{g/ml}$ betrug, wurde auch der NR-50 Wert ermittelt, nämlich 56 $\mu\text{g/ml}$. Der gleiche Versuch wurde auch statt mit abgelösten Zellkulturhautstückchen mit einem konfluenten Zellrasen aus humanen Keratinozyten in 24 well-Platten durchgeführt. Der Vergleich der beiden Versuche, der in Abbildung 4 dargestellt ist, zeigt, daß die beiden Systeme ähnlich reagieren, wobei die Zellkulturhaut doppelt empfindlich reagiert. Der NR 90 Wert betrug 50 $\mu\text{g/ml}$ und der NR 50 -Wert 89 $\mu\text{g/ml}$.

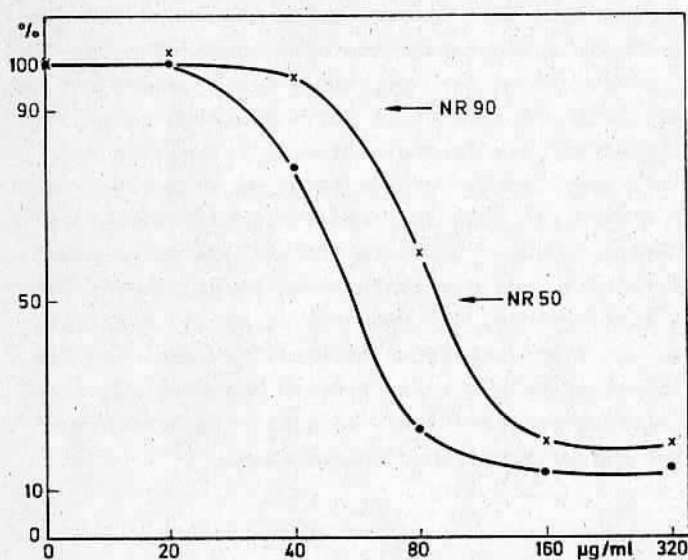


Abb.4: Bestimmung des NR 90-Wertes bzw. NR 50-Wertes für Natriumdodecylsulfat mittels Zellkulturhautstückchen (•) bzw. konfluenten Keratinozytenkulturen (x).

Weitere Versuche zeigten zudem, daß die abgelöste Zellkulturhaut ohne Probleme durch Einfrieren bei -70°C kryokonserviert und je nach Bedarf aufgetaut und für Tests benutzt werden können. Diese Tatsache ist für einen breiten Einsatz der gezüchteten Haut für toxikologische bzw. pharmakologische Fragestellungen von entscheidender Bedeutung.

AUSSICHTEN

Diese ersten Versuche zeigen, daß in dieser humanen Zellkulturhaut ein großes Potential für toxikologische in vitro Untersuchungen liegt. Welcher Parameter letztendlich als Endpunkt des Systems herangezogen wird, muß in weiteren Studien geklärt werden, wobei die Neutralrotmethode sich durch ihre Einfachheit auszeichnet.

Bis endgültige Aussagen über dieses System gemacht werden können, müssen noch viele Substanzen aus verschiedensten Substanzklassen untersucht werden, und diese Daten sowohl mit in vivo-Daten, als auch mit anderen in vitro Systemen verglichen werden. Ermutigend ist die Tatsache, daß in Frankreich von Wissenschaftlern des "Centre-International de Recherches Dermatologiques" (CIRD) ein sehr ähnlicher Forschungsansatz gewählt wurde. Diese Forscher benützen für ihre Versuche künstliche Hautäquivalente, auf die menschliche Keratinozyten ausgesät werden, eine Methode, die von Bell et al (9) ebenfalls zur Behandlung von Brandverletzten entwickelt wurde, und die sie als physiologisches Modell zur Prüfung von Substanzen auf hautreizende Wirkung benutzen (10). Detaillierte Ergebnisse stehen auch bei dieser Arbeitsgruppe noch aus.

LITERATUR

- (1) DRAIZE, J.H., WOODWARD, G., CALVERY, H.O. (1944): Methods for the study of irritation and toxicity of substances applied to the skin and mucous membrane J. Pharmacol. Exp. Therap. 82, 377 - 389
- (2) LEIGHTON, J., NAUSSAUER, J., TCHAO, R., (1985): The chick embryo in toxicology: an alternative to the rabbit eye, Fd. Chem. Toxic. 23, 293 - 298
- (3) LÜPKE, N.P., KEMPER, F.H. (1986): The HET-CAM test: A alternative to the Draize eye test, Fd. Chem. Toxic. 24, 495 - 496
- (4) KAO, J., HALL, J., HOLLAND, M. (1983): Quantification of cutaneous toxicity: An in vitro approach using skin organ culture, Toxicol. Appl. Pharmacol. 68, 206 - 217
- (5) PRICE, J.B., ANDREWS, I.J., (1985): The in vitro assessment of eye irritancy using isolated eyes, Fd. Chem. Toxic. 23, 313 - 315
- (6) BORENFREUND, E., PUERNER, J.A., (1985): Toxicity determined in vitro by morphological alterations and neutral red absorption, Toxicol. Lett., 24, 119 - 124
- (7) HÜLSER, D.F., BRÄUNER, T., BRÜMMER, F. (1986): Interzelluläre Kommunikation in dreidimensional wachsenden Multizell-Sphäroiden, BMFT, Biotechnologie, 103 - 124
- (8) GREEN, H. KEHINDE, O., THOMAS, J. (1979): Growth of cultured human epidermal cells into multiple epithelia suitable for grafting, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76, 5665 - 5669
- (9) BELL, E., IVARSSON, B. MERRILL, C. (1979): Production of a tissue-like structure by concentration of collagen lattices by human fibroblasts of different proliferative potential in vitro, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76, 1274 - 1278
- (10) ASSELINEAU, D., BERNARD, B., BAILLY, C., (1986): Three-dimensional culture of human keratinocytes of a dermal equivalent as a model system to study environmental modulation of epidermal physiology in vitro: effect of air exposure, Brit. J. Dermatol. 115, Suppl. 31, 126 - 127