

Presseinformation

Esslingen, 15. April 2011

BioTeSys – 10 Jahre Analyse- und Forschungsdienstleistung für biologische Wirkungen

Teil 4: Toxizitätsuntersuchungen 2 – Haut-Korrosions- und Haut-Irritationstest

Die neue Verordnung zur Registrierung, Evaluierung und Authentizierung von Chemikalien (REACH) hat sich 2007 zum besseren Schutz von Mensch und Umwelt die Reduktion und den Ersatz von Tierversuchen zum Ziel gesetzt. Dabei wird das 3R-Prinzip (Refinement, Reduction, Replacement) von Russel und Burch verfolgt [1]. Im Kosmetikbereich soll ein generelles Verbot von Tierversuchen bereits bis 2013 umgesetzt werden.

Die Haut als größtes Organ des Menschen hat unter anderem die Aufgabe den Körper vor Umweltgefahren, wie toxischen oder ätzenden Stoffen, zu schützen. Andererseits ist die Haut ein aktives Organ, das aktiv an Respirationsprozessen beteiligt ist. Nach der Exposition beispielsweise mit chemischen Stoffen reagiert die Haut mit spezifischen immunologischen Reaktionen, die dann auch histologisch nachweisbar sind [2]. Es ist klar, dass die Haut für kosmetische Fragen ein wesentliches Zielorgan ist.

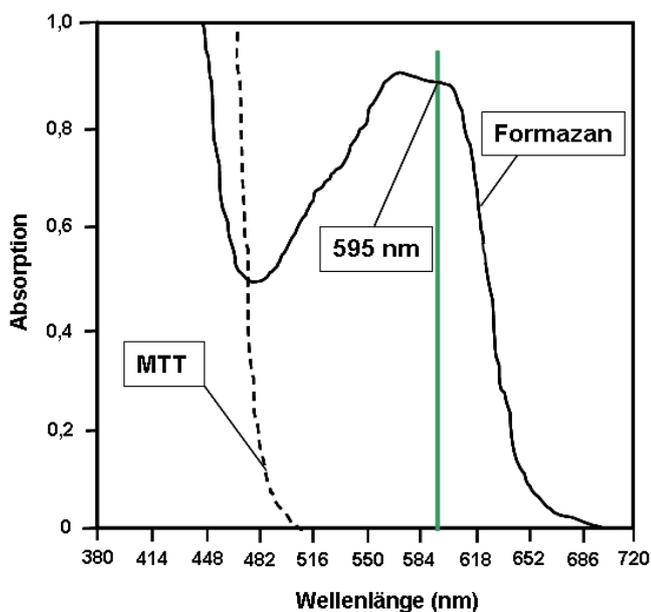
Haut-Korrosionstest

Bis vor kurzem wurden korrosive bzw. ätzende Substanzen, die im Verdacht stehen die Haut zu schädigen, noch routinemäßig in vivo im Tiermodell getestet. Bei der Bewertung der Wirkung derartiger Substanzen und zur weitergehenden Standardisierung der eingesetzten Testverfahren, können heute in vitro Tests eingesetzt werden,

die auf Humanzellen basieren. Die BioTeSys hat im Rahmen des Haut-Korrosionstestverfahrens nach OECD-Leitfaden 341 erfolgreich an der ECVAM Validierung des Hautmodell EST-1000 der Firma CellSystems® teilgenommen.

Der Assay eignet sich für die Analyse der korrosiven Effekte von flüssigen und viskosen Substanzen, aber auch von Feststoffen. Zur Untersuchung werden die zu testenden Substanzen, Mischungen oder Formulierungen auf ein dreidimensionales Hautmodell aufgebracht. Das Prinzip der Assays basiert auf der Annahme, dass ätzende Stoffe die äußerste Schicht der Epidermis (Oberhaut oder das Stratum corneum) durch Diffusion oder Erosion durchdringen und sich zytotoxisch auf die darunter liegende Zellschicht auswirken. Der negative Einfluss auf die Lebensfähigkeit der Zellen wird mit Hilfe eines Farbstoffes im so genannten MTT-Assays gemessen. Nur die Zellen

mit einem intakten Metabolismus und respiratorischer Aktivität können das MTT (Diphenyltetrazoliumbromid) zum Formazan reduzieren, welches dann photometrisch quantifiziert werden kann.



Um standardisierte Ergebnisse zu erhalten und die Voraussetzungen der funktionellen und generellen Einsetzbarkeit der Hautmodelle zu gewährleisten, kommen nur kommerzielle und für diesen Assay validierte Hautmodelle zum Einsatz. Die Testsubstanzen werden dabei für genau 3 min und für 1 h mit den Hautmodellen in Kontakt gebracht, bevor sie wieder abgewaschen werden. Danach schließt sich oben erwähnter MTT-Zytotoxizitätstest an. Jede Probe, einschließlich der Positiv- und Negativkontrolle sowie jeder Zeitwert wird dreifach bestimmt.

Die Testsubstanzen gelten als korrosiv, wenn nach einer Exposition von 3 Minuten die Vitalität der Zellen $< 50\%$ ist. Korrosiv bezeichnet man sie auch, wenn zwar nach 3 min Exposition die Vitalität $\geq 50\%$ ist, aber nach 1 h Exposition $< 15\%$. Liegt die Vitalität jedoch nach 1 h Exposition noch $> 15\%$, dann erachtet man die Testsubstanz als nicht korrosiv auf der Haut.

Zur Qualitätssicherung wird in regelmäßigen Abständen die Funktionalität der Hautmodelle anhand des korrosiven Potentials von Referenzsubstanzen überprüft.

Haut-Irritationstest

Eine Hautirritation stellt eine reversible Schädigung der Haut dar, die bei einer Applikation der Testsubstanz von bis zu 4 h (Definition durch die United Nations (UN) Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS) [3]) auftritt und kaskadenhaft abläuft. Nachdem die chemische Substanz das Stratum corneum durchdrungen hat, werden die darunter liegenden Keratinozyten geschädigt. Die absterbenden Keratinozyten entlassen Mediatoren, die eine Entzündungskaskade starten, die sich in einer Hautrötung und Ausbildung eines Ödems niederschlagen. Wie beim Haut-Korrosionstest wird die Zellviabilität mittels eines MTT-Zytotoxizitätstest charakterisiert.

Für dieses Testsystem sind strengere Qualitätssicherungsmaßnahmen erforderlich, als für den Haut-Korrosionstest. BioTeSys hat das Testsystem mit den im OECD-Leitfaden (OECD-Guideline 439) angegebenen Prüfsubstanzen und dem EpiSkin™ (SM) validiert. Vor dem Einsatz des Hautmodells werden die Hautmodelle sofort nach der Ankunft nach Angaben des Herstellers auf ihre Barriereigenschaften hin untersucht. Histologisch muss die epidermisartige Struktur nachgewiesen werden (vielschichtiges Stratum corneum). Zusätzlich sollte eine Negativkontrolle während der Expositionszeit stabil sein und unter den Haut-Irritationstestbedingungen die optische Dichte (OD) in einem akzeptablen Bereich liegen: LAL (lower acceptance limit) $\geq 0,6$ und UAP (upper acceptance limit) $\leq 1,5$. Der akzeptable Bereich für den IC_{50} - oder ET_{50} -Wert der Positivkontrolle wird vom Hersteller bereitgestellt.

Jede Testsubstanz, Negativ- und Positivkontrolle wird in drei Ansätzen untersucht. Die Expositionszeiten, -temperaturen und Nachinkubationszeiten richten sich nach den Angaben der Hersteller der validierten Test-Modelle (EpiSkin™ (SM), EpiDerm™ (EPI-200) oder SkinEthic™ (RHE)). Die Testsubstanzen gelten als hautirritierend, wenn die Vitalität der Zellen im Vergleich zur Negativkontrolle $\leq 50\%$ ist. Liegt der Vitalitätswert über 50% , gelten die Substanzen als nicht hautirritierend.

Zur Qualitätssicherung und zum frühzeitigen Erkennen von Trends werden bei der BioTeSys Regelkarten geführt, in der die OD-Werte für die immer gleich bleibende Positivkontrolle bzw. Negativkontrolle aufgeführt werden (die Standardabweichungen der Triplikate sollte im einseitigen 95%-Intervall liegen).

Über BioTeSys GmbH

Die BioTeSys GmbH in Esslingen (www.biotesys.de) wurde 1999 gegründet als Spin-Off des Instituts für Biologische Chemie und Ernährungswissenschaften der Universität Hohenheim. Heute versteht sich BioTeSys als Partner bei der Entwicklung und Umsetzung neuer Konzepte auf den Gebieten Kosmetik, Nahrungsmittel, und Consumer Health Care/OTC. Das Angebot umfasst Screening-Verfahren zur Erfassung des bioaktiven Potentials von Substanzen oder Substanzgemischen, in vitro-Testverfahren unter Verwendung von Einzelzellkulturen, Co-Kulturen und verschiedenen Organmodellen sowie klinische Studien für den Lebensmittelbereich. BioTeSys ist gemäß ISO 9001:2008 zertifiziert; die Abteilung Analytik mit den Schwerpunkten HPLC und Photometrie ist zusätzlich nach DIN EN ISO/IEC 17025:2005 akkreditiert. Alle verwendeten Messverfahren und Versuchsparameter sind auf physiologische Vorgaben hin entwickelt und optimiert. Die Ergebnisse und erho-benen Wirkkonzentrationen haben dadurch unmittelbare Aussagekraft für die Einschätzung biologischer Wirkungen. Als kompletter Dienstleister auf dem Gebiet der biologischen und chemischen Analyse bietet das Unternehmen ein sehr weitreichendes Service-Angebot einschließlich der Entwicklung neuer Verfahren und Produkte im Kundenauftrag.

Ihr Ansprechpartner:

Dr. Karin Engelhart
Telefon 07 11 / 31 05 71 44
E-Mail info@biotesys.de
www.biotesys.de

Literatur:

- [1] Russel, William M.S./Burch, Rex L. (1959): The Principles of Humane Experimental Technique. London: Methuen.

- [2] Williams, A.C. (2003). Structure and function of human skin. In: Transdermal and Topical Drug Delivery – From theory to clinical practice. Pharmaceutical Press. Chicago.

- [3] EC-ECVAM (2009), Statement on the “Performance under UN GHS of three in vitro assays for skin irritation testing and the adaptation of the Reference Chemicals and Defined Accuracy Values of the ECVAM skin irritation Performance Standards”, issued by the ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC30), 9 April 2009.