

6 Zusammenfassung

Die wissenschaftliche und ethische Problematik, die mit dem Draize-Test am Kaninchen verbunden ist, hat zur intensiven Suche nach Ersatz- und Ergänzungsmethoden für dieses Verfahren zur Prüfung der Hautverträglichkeit geführt. Bisher ist kein Test bekannt, der für alle Substanzen und alle Expositionssituationen eine sichere Aussage bezüglich der Gefährdung des Menschen zuläßt. Das Ziel dieser Arbeit war es, zu untersuchen, ob das isoliert perfundierte Rindereuter ein geeignetes Modell zur Prüfung der Hautverträglichkeit darstellt. Anhand der im Perfusat gemessenen LDH-Aktivität, des Glukoseverbrauchs und der Laktatproduktion, sowie der Messung der Hauttemperatur sollte zunächst die Lebensfähigkeit des Gewebes nachgewiesen werden. Zur Beurteilung der Ödembildung wurde vor und während der Perfusion die Hautfaltendicke bestimmt. Zusätzlich wurden histologische Proben zur Einschätzung der Lebensfähigkeit und der Ödembildung untersucht. Die Versuchsergebnisse zeigen, daß das Gewebe des perfundierten Euters lebensfähig ist und es während einer 6-stündigen Perfusion zu keiner nennenswerten Ödembildung kommt.

Um das Modell für weitergehende Experimente zu standardisieren, wurden nach Abschluß der Versuche folgende Kriterien aufgestellt, die ein isoliert perfundiertes Rindereuter erfüllen sollte, bevor eine Auswertung der mit diesem Euter erhaltenen Ergebnisse ohne Bedenken erfolgen kann:

- (1) Das Gewicht der Euter sollte zwischen 10 und 15 kg betragen.
- (2) Die Hautfaltendicke vor der Perfusion sollte 4 mm nicht überschreiten und während der Perfusion um nicht mehr als 25% zunehmen.
- (3) Die LDH-Aktivität sollte während der gesamten Versuchsdauer unter 100 U/h liegen.
- (4) Die Hauttemperatur sollte ab der 60. Minute über 31⁰C liegen.
- (5) Der Glukoseverbrauch sollte durchschnittlich mindestens 0,6 g/h betragen.

Die Versuche zur Hautverträglichkeitsuntersuchung umfaßten die Bestimmung des Prostaglandin E₂- und D₂-Gehaltes, sowie des Leukotrien B₄ und C₄-Gehaltes, einen modifizierten Methylnitrazolium-Test (MTT-Test) und histologische Untersuchungen nach zweistündiger Applikation verschiedener Testsubstanzen. Die Applikation von A23187 (Calcimycin), Lotagen^R, 1N und 0,1 N Natronlauge, 5N Salzsäure, n-Hexadecan, Formalin und 12-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetat riefen einen signifikanten Anstieg des Prostaglandin E₂-Gehaltes der Haut hervor. Eine signifikante Abnahme der umgesetzten Farbstoffmenge im MTT-Test wurde nach der Applikation von 25%iger Ameisensäure festgestellt. Histologische Veränderungen konnten nach der Applikation von 1N Natronlauge, 5N Salzsäure und 25%iger Ameisensäure nachgewiesen werden. Die Versuchsergebnisse zeigen, daß Effekte stark reizender Substanzen, wie Ameisensäure, Natronlauge und Salzsäure am Modell des isoliert perfundierten Rindereuters erkennbar sind. Schwach reizende Substanzen können nicht identifiziert werden. Das Euter erscheint aufgrund der mangelnden Empfindlichkeit gegenüber schwach reizenden Substanzen und der relativ großen Streuung der Ergebnisse nicht geeignet für die routinemäßige Untersuchung der Hautverträglichkeit.

Durch die Versuche zur Vitalität und Ödembildung wurde aber die Eignung des isoliert perfundierten Rindereuters für Resorptionsstudien untermauert. Im Rahmen solcher Resorptionsstudien können mit der beschriebenen Methodik toxikologische Zusatzinformationen über die untersuchten Substanzen erhoben werden.

Petra Maaß

The isolated perfused bovine udder - An in vitro model for studying primary irritancy ?

7 Summary

Due to the problems involved in the Draize rabbit skin test, intensive research has been done on alternative methods to this test. Currently, there is no single test predicting the hazard to man for all substances in all exposure situations. The aim of the present study was to investigate whether the isolated perfused bovine udder is a useful tool in predicting primary irritancy of test substances. First, the viability of the perfused udder was assessed by measuring LDH leakage, glucose consumption and lactate production in the perfusate as well as skin temperature. For evaluating edema formation, skin fold thickness was determined throughout perfusion. Histological samples were taken in order to assess viability as well as edema formation. Test results indicate tissue viability and lack of edema formation for a 6-h perfusion period. In order to standardize the model for further use, criteria for assessing viability and edema formation are postulated, that have to be met before results obtained with a given preparation can be considered acceptable. These criteria are:

- (1) The udder's weight should range within 10 and 15 kg before perfusion.
- (2) Skin fold thickness should not exceed 4 mm before perfusion and should not increase more than 25% during perfusion.
- (3) LDH leakage should remain under 100 U/h.
- (4) After one hour of perfusion skin temperature should reach at least 31° C.
- (5) Glucose consumption should be at least 0,6 g/h on average.

In the experiments investigating primary irritancy the MTT tetrazolium salt colorimetric assay was adopted for use in the isolated perfused udder, prostaglandin D₂ and E₂ concentrations, as well as leukotriene B₄

and C₄ concentrations, in skin samples were measured and histological samples were taken after application of various test substances. Application of A23187 (Calcimycin), 1N and 0,1 N sodium hydroxide, 5N hydrochloric acid, n-hexadecane, Lotagen^R, formalin and 12-o-Tetradecanoylphorbol-13-acetate resulted in a significant increase in prostaglandin E₂ concentrations. Only formic acid (25%) caused a significant reduction in MTT tetrazolium dye conversion. Histological changes were observed after treatment with formic acid (25%), 1N and 0,1N sodium hydroxide and 5N hydrochloric acid. The results indicate that effects of strong primary irritants are noticeable in the isolated perfused udder. Due to the lack of identifying slight and mild irritants and the variability of test results the isolated perfused bovine udder does not seem to be a useful tool in predicting primary irritancy as a matter of routine. Nevertheless, the experiments concerning tissue viability and edema formation underline the usefulness of this model for percutaneous absorption studies. In such absorption studies the methods described in this paper may be helpful in getting additional information on cutaneous toxicity or primary irritancy of the substances investigated.