



Universitätsklinikum Jena Postfach 07740 Jena

Thüringisches Institut für Textil- und Kunststoff-

Forschung e. V.

Breitscheidstraße 97

07407 Rudolstadt

Klinik für Dermatologie und dermatologische Allergologie

Qualitäts-zertifiziert nach DIN EN ISO 9001:2000



Laborleiter
Dr.U.-Ch. Hipler

Erfurter Strasse 35
D-07743 Jena

Telefon: 0 36 41 · 937355
Telefax: 0 36 41 · 937437

E-Mail:
chipr@derma.uni-jena.de

Jena, den 1. September 2008

In-vitro-Toxizität von Micromodal Lyocell + Zinkoxid 10105

Zusammenfassung

In der vorliegenden Studie wurde die Wirkung von Micromodal Lyocell+Zinkoxid 10105 auf HaCaT-Keratinocyten anhand von Cytotoxizitätsuntersuchungen verfolgt. Dazu wurden der ATP-Biolumineszenzassay und der BCA-Proteinassay eingesetzt. Es zeigte sich bei den Untersuchungen, dass Micromodal Lyocell+ZnO 10105 in Abhängigkeit von der Konzentration und der Inkubationszeit eine geringe cytotoxische Wirkung bei HaCaT-Keratinocyten aufweist. Als toxische Positivkontrolle wurde Triton X100 verwendet, welches zu HaCaT-Keratinocyten zugegeben wurde (Endkonzentration 2%). Als Kontrolle diente das Zellkulturmedium (DMEM + FKS).

1. Material und Methoden

1.1 Testmaterial

Die Extrakte von Micromodal Lyocell mit Zinkoxid 10105 wurden nach der DIN Norm ISO 10993-11; (1995) hergestellt. Nach Einwaage von 1 g Stoff wurde dieser zerkleinert und autoklaviert. Zu den sterilen Proben wurden 50 mL DMEM (ohne FCS) zugegeben. Es wurden zwei verschiedene Extraktionsbedingungen durchgeführt:

24 h bei 37°C im Schüttelwasserbad und

72 h bei 37°C im Schüttelwasserbad.

Beide Proben wurden dann über Gaze bei 1000 Upm zentrifugiert, steril filtriert und mit FKS supplementiert.

1.2 Anzucht der HaCaT-Keratinocyten

Humane HaCaT -Keratinocyten wurden in Dulbecco's modifiziertem Eagle's medium (DMEM, Promocell, Germany) kultiviert, welches mit einer 1%igen antibiotisch-antimykotischen Lösung (Promocell, Germany) und 10%igem fötalem Kälberserum (Promocell, Germany) supplementiert wurde. Die Kultivierung wurde über 7 Tage in einer 75 cm² Zellkulturflasche (Greiner, Germany) bei 37°C und einer 5%igen CO₂-Atmosphäre durchgeführt.

Die Zellen wurden dann mit Trypsin-EDTA (Invitrogen, Germany) abgelöst, in eine 96-Well- Mikrotiterplatten (Greiner) (30000 Zellen/cm²) ausgesät und 48 h kultiviert.

Die HaCaT-Keratinocyten wurden mit den folgenden Verdünnungen des Micromodal-Extraktes Lyocell+Zinkoxid 1h, 24 h und 48 h inkubiert:

0,1 % (dies entspricht 0,02 mg/ml)

1 % (0,2 mg/ml)

10 % (2 mg/ml)

25 % (5 mg/ml)

50 % (10 mg/ml)

75 % (15 mg/ml)

100 % (20 mg/ml)

1.3 ATP-Biolumineszenz-Messungen

Die Bestimmung der Zytotoxizität erfolgte auf der Basis der luminometrischen ATP-Messung mit Hilfe des ATPLite™-M (Packard Bioscience B.V., Niederlande). Der Assay basiert auf der Produktion von Licht, das bei der Reaktion von ATP mit Luciferase und D-Luciferin entsteht. Das emittierte Licht ist zur ATP-Konzentration direkt proportional.

50 µL der Zelllysatlösung wurden jeweils zu 100 µL der Zellsuspension pro Well der Mikrotiterplatte gegeben. Danach schüttelt man 5 min bei 700 rpm im Orbitalshaker. Nach Addition von jeweils 50 µL Substratlösung (Luciferin /Luciferase) zu jeden Well schüttelt man erneut für 5 min. Danach belässt man die Mikrotiterplatte 10 min im Dunklen und misst anschließend die Lumineszenz im Mikroplattenluminometer LUMIstar Galaxy (BMG LabTechnologies GmbH, Offenburg, Deutschland). Die ATP-Konzentrationen werden auf der Basis einer ATP-Standardkurve ermittelt.

1.4 Proteinbestimmung mittels BC Assay Protein Quantitation Kit

Der Assay beruht auf folgendem Prinzip: Protein bildet mit Cu^{2+} -Ionen in alkalischer Lösung einen Komplex (Biuret- Reaktion). Die Cu^{2+} - Ionen des Komplexes werden zu Cu^{+} - Ionen reduziert, die mit Bicinchonininsäure (BCA) einen violetten Farbkomplex bilden.

Dazu werden die HaCaT-Zellen nach entsprechender Inkubationszeit 2x mit PBS gewaschen und dann 10 min mit einer Proteinlyselösung (PBS + 0,1% Triton X) bei 90°C lysiert. Im Anschluss werden die Proteinlysate bei -20°C eingefroren. Die Quantifizierung des Gesamtproteingehaltes erfolgt mittels einer BSA-Standardkurve, indem zu 25 µL Lysat 200 µl BCA-Reaganz gegeben werden. Die Bildung des violetten Farbkomplexes erfolgt bei einer 30-minütigen Inkubation bei 60°C. Die Messung der optischen Dichte wird bei 580 nm im Mikrotiterplattenreader FLUOstar Galaxy (BMG LabTechnologies GmbH, Offenburg, Deutschland) durchgeführt.

1.5 Statistik

Die statistische Auswertung der Messwerte erfolgte auf der Basis von MS Excel und den Student-Test.

2. Ergebnisse

Wir führten die Untersuchungen mit dem 24h und 72h Extrakt des Micromodalgewebes Lyocell + Zinkoxid 10105 in den Konzentrationen: 0,1 %, 1 %, 10 %, 25 %, 50 %, 75 % und 100 % durch; die Inkubationszeit betrug 1, 24 und 48 h.

Dabei wurde bei hohen Extraktkonzentrationen (75 und 100%) ein leichter toxischer Einfluss nach 24h Inkubation auf das Wachstum von HaCaT-Keratinocyten nachgewiesen. Jedoch ist diese minimale Toxizität nach 48h nicht mehr messbar, da sich die Zellen regenerieren. Dieser Effekt ist nur beim ATP-Assay festgestellt wurden.

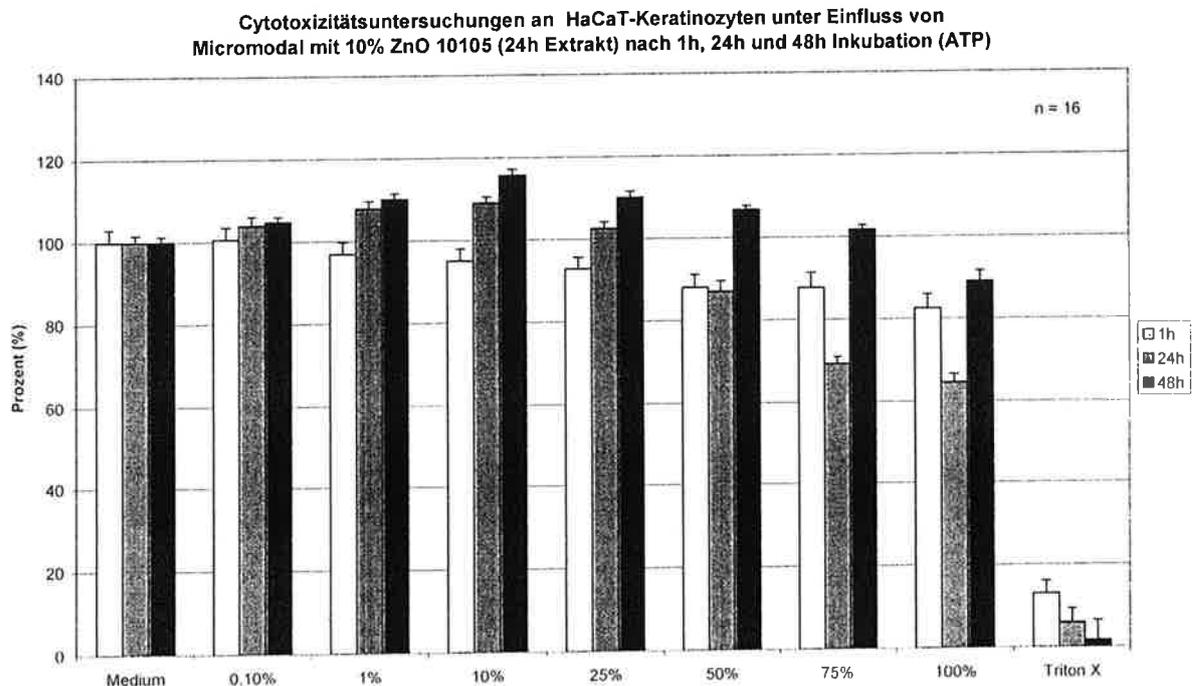


Abbildung 1: HaCaT-Keratinocyten unter dem Einfluss von Gewebe Lyocell+ZnO 10105 **24h Extrakt** – In-Vitro-Toxizität nach 1h, 24h und 48h Inkubation – ATP-Assay

Cytotoxizitätsuntersuchungen an HaCaT-Keratinocyten unter Einfluss von Micromodal mit 10% ZnO 10105 (72h Extrakt) nach 1h, 24h und 48h Inkubation (ATP)

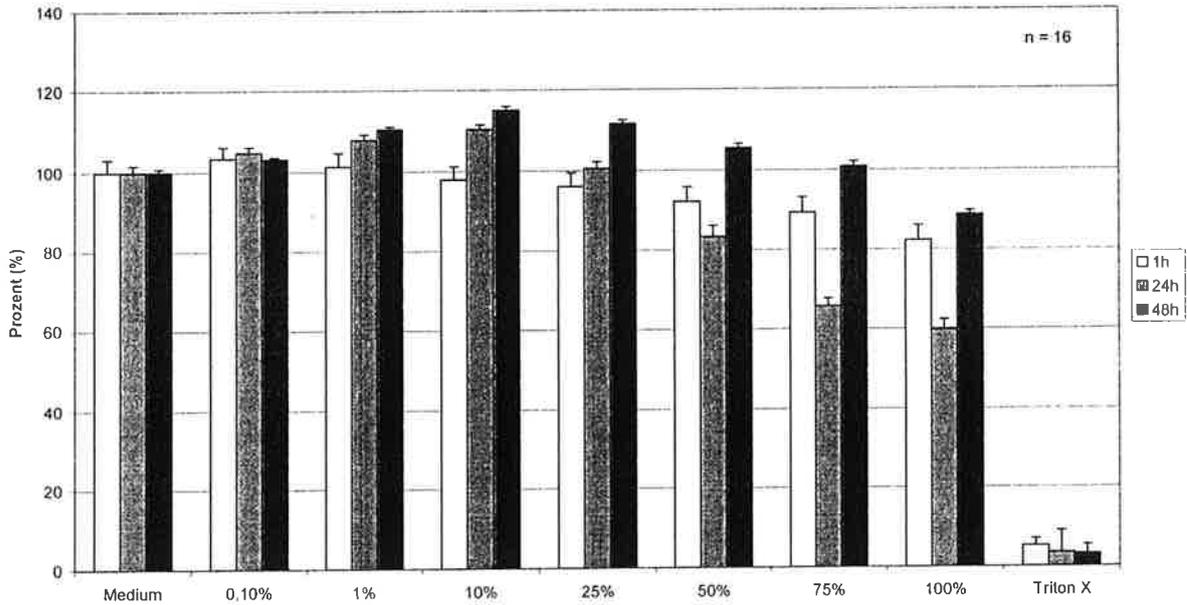


Abbildung 2: HaCaT-Keratinocyten unter dem Einfluss von Gewebe Lyocell+ZnO 10105 **72h Extrakt** - In-Vitro-Toxizität nach 1h, 24h und 48h Inkubation – ATP-Assay

Cytotoxizitätsuntersuchungen an HaCaT-Keratinocyten unter Einfluss von Micromodal mit 10% ZnO 10105 (24h Extrakt) nach 1h, 24h und 48h Inkubation (Protein)

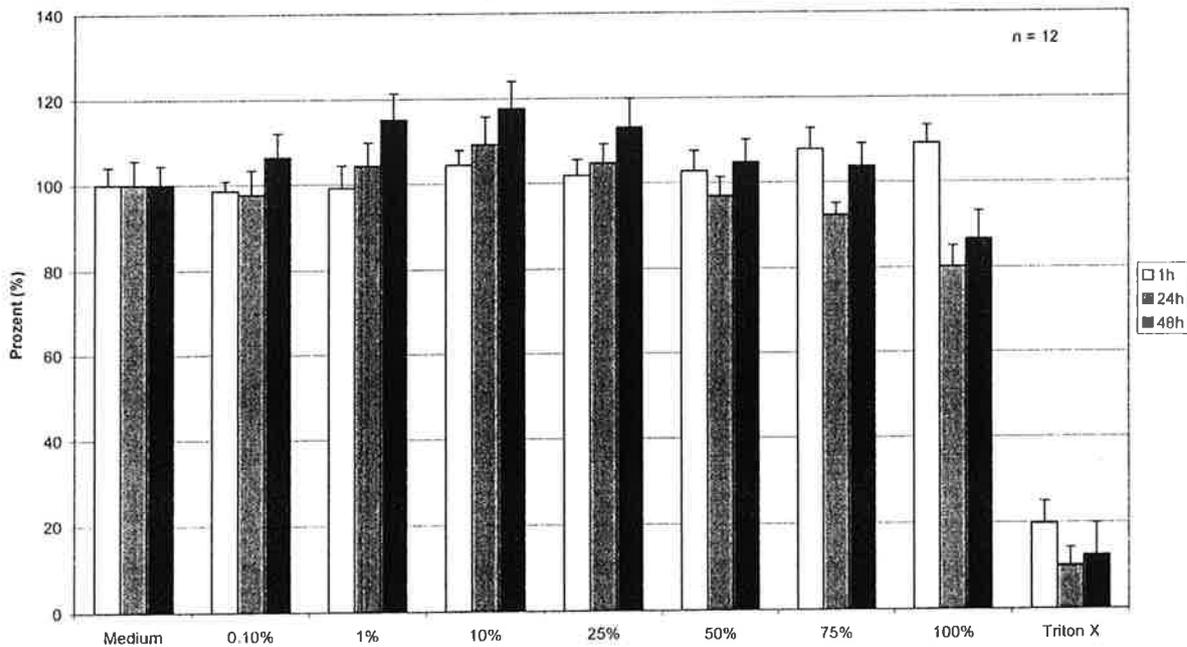


Abbildung 3: HaCaT-Keratinocyten unter dem Einfluss von Gewebe Lyocell+ZnO 10105 **24h Extrakt** - In-Vitro-Toxizität nach 1h, 24h und 48h Inkubation – Protein-Assay

Cytotoxizitätsuntersuchungen an HaCaT-Keratinocyten unter Einfluss von Micromodal mit 10% ZnO 10105 (72h Extrakt) nach 1h, 24h und 48h Inkubation (Protein)

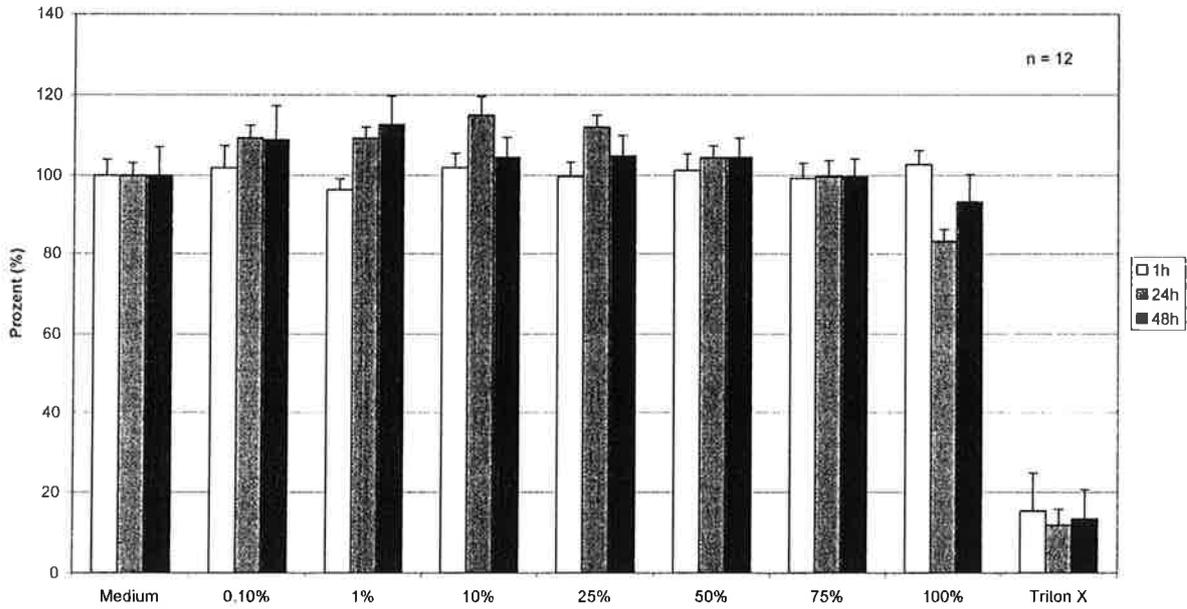


Abbildung 4: HaCaT-Keratinocyten unter dem Einfluss von Gewebe Lyocell+ZnO 10105 **72hExtrakt**– In-Vitro-Toxizität nach 1h, 24h und 48h Inkubation – Protein-Assay

3. **Literatur**

1. Stadler R, Detmar M, Stephanek K, Bangemann C, Orfanos CE. A rapid fluorometric assay for the determination of keratinocyte proliferation. In vitro. J Invest Dermatol 1989; 532-534
2. Hipler U-Ch, Knöll B, Wollina U. The use of an ATP Bioluminescence assay to quantify HaCaT cell cytotoxicity. In: Roda A, Pazzagli M, Kricka LJ, Stanley PE. Bioluminescence and Chemiluminescence. Wiley 1999, 169-172.
3. Hipler UC, Fischer TW, Elsner P. HaCaT cell proliferation influence by melatonin. Skin Pharmacol Appl skin Physiol 2003, 16: 379-85
4. Crouch SPM, Kozlowski R, Slater KJ, Fletcher J. The use of ATP bioluminescence as a measure of cell proliferation and cytotoxicity. J Immunolog Methods 1993; 160: 81-88
5. Lundin A, Hasenson M, Persson J, Pousette A. Estimation of biomass in growing cell lines by ATP assay. Methods Enzymol 1986; 133: 27-42

Jena, 27.08.08

Dipl.-Chem. Dr. Christina Hipler
Laborleiterin
Klinik für Hautkrankheiten
D-07740 Jena/Tel.: 03641/9-37355
Besuchsadresse: Erfurter Straße 35
Dr. rer. nat. U.-Ch. Hipler
Laborleiter