

# Presseinformation

Esslingen, 15. April 2011

## BioTeSys – 10 Jahre Analyse- und Forschungsdienstleistung für biologische Wirkungen

### Teil 3: Toxizitätsuntersuchungen 1 – Qualitätsmanagement bei toxikologischen in vitro-Untersuchungen am Beispiel NRU-Zytotoxizitätstest, bzw. Phototoxizitätstest

Die Einführung der neuen Verordnung zur Registrierung, Evaluierung und Authentifizierung von Chemikalien (REACH) im Juni 2007 stellt neue Anforderung an die Testung von Chemikalien. Seit 2010 ist BioTeSys Mitglied der In Vitro Testing Industrial Platform (IVTIP) und bietet in vitro-Testungen zu toxikologischen Untersuchungen und Evaluierungen von Chemikalien und stellt damit der chemischen Industrie im Sinne der REACH-Verordnung notwendige Daten zur Verfügung.

REACH hat das Ziel den Schutz von Mensch und Umwelt zu verbessern und verfolgt das 3R-Prinzip zur Reduzierung und Ersetzung von Tierversuchen [1].

Die Etablierung, Validierung und Neuentwicklung von alternativen in vitro-Testverfahren hat daher große Bedeutung und ermöglicht unter Berücksichtigung Zeit- und Kostenaspekten neue Ansatzpunkte zur Bearbeitung der damit verbundenen Problemstellungen.

So lässt sich die Anzahl der Tiere für den oralen systemischen Zytotoxizitätstest (in vivo) reduzieren, wenn die Anfangsdosis bekannt ist. Dazu wird für die betreffenden Substanzen mit dem Balb/c 3T3 Neutral Red Uptake (NRU) Zytotoxizitätstest in vitro der  $IC_{50}$ -Wert ermittelt, der mit zur Festsetzung der Anfangsdosis herangezogen werden

kann. Der Balb/c 3T3 NRU Test im 96-well Maßstab ist dem ICCVAM Evaluation Report Section 2 vom November 2006 angelehnt und erfüllt damit alle regulativen Vorschriften. Das Testsystem eignet sich für Toxizitätsanalysen im allgemeinen, sowie auch für Phototoxizitätsstudien, wobei nach der Supplementation mit den Testsubstanzen die Zellkulturen zusätzlich einer definierte Lichtmenge ausgesetzt werden.

Der Assay basiert auf der Aufnahme des ungeladenen membranpermeablen gelben Farbstoffes Neutralrot in die Lysosomen/Endosomen lebender Zellen. Dort wird der Farbstoff protoniert und erscheint dann rot. In dieser veränderten Form kann der Farbstoff die Zellmembran nicht mehr durchdringen. Bei geschädigten Zellen erfolgt die Aufnahme bzw. die Protonierung des Farbstoffes weniger

effizient. Im Vergleich mit unbehandelten Kulturen kann aus dem Grad der Aufnahme auf die Zellzahl und Lebensfähigkeit der behandelten Kulturen geschlossen werden. Nach einem Bereichsfindungstest, wird in mindestens zwei separaten Haupttests eine Toxizitätsprüfung nach vorangegangener 48-stündiger Supplementation mit dem Neutralrottest durchgeführt.

Nach der grafischen Darstellung der Viabilität (vgl. Abb.1), sollten die Kurvenwerten möglichst gleichmäßig den gesamten Bereich von nicht-toxisch bis 100% toxisch abdecken. Zusätzlich wird in regelmäßigen Abständen innerhalb eines Assays die Verdünnungsreihe einer Positivkontrolle mitgeführt. Nach der Berechnung des  $IC_{50}$ -Werte, müssen zunächst die Akzeptanzkriterien für die Positivkontrolle erfüllt sein. Ist dies nicht der Fall, werden die Platten und die errechneten  $IC_{50}$ -Werte der Testsubstanzen, bis zur vorhergehenden Positivkontrolle, die die Kriterien erfüllt, verworfen. Daneben müssen die Ergebnisse der einzelnen Prüfsubstanzen bestimmte Akzeptanzkriterien erfüllen.

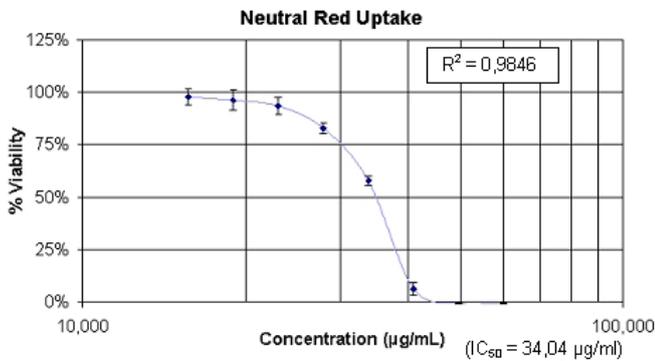


Abb. 1: Viabilität nach der Behandlung mit unterschiedlichen Konzentrationen einer Prüfsubstanz

Zur Absicherung der Qualität des Assays stellte sich BioTeSys einem Vergleich zwischen verschiedenen Laboratorien. In Abbildung 2 sind exemplarisch die  $IC_{50}$ -Werte für drei Substanzen dargestellt, die bei BioTeSys und drei Vergleichsinstituten mit Hilfe des Balb 3T3 NRU Tests ermittelt wurden.

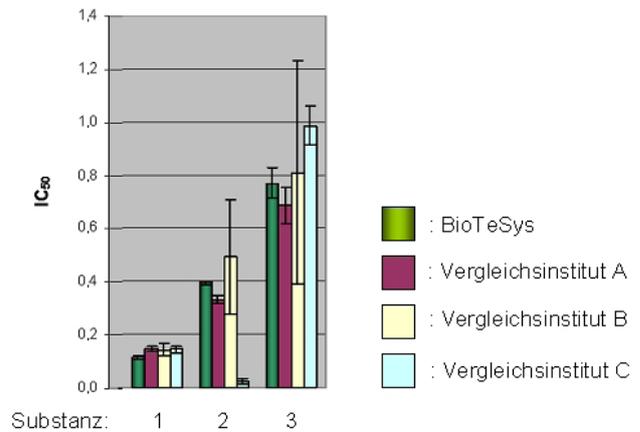


Abb. 2: Gegenüberstellung der mittleren  $IC_{50}$ -Werte für drei Prüfsubstanzen, die an 4 Instituten durchgeführt wurden

Im Rahmen der Qualitätssicherung werden nach dem Assay Guidance Manual (Eli Lilly and NIH Chemical Genome Center), regelmäßig die Einheitlichkeit der Signale über die Platte (z. B. bei Chargenwechsel), sowie die Signalvariabilität überprüft (SD, SW, Z' usw.) [2]. Um eine durchgehende Qualität zu gewährleisten, führt BioTeSys zum frühzeitigen Erkennen von Trends der Testergebnisse von Test zu Test eine Regelkarte, in der die  $IC_{50}$ -Werte der Positivkontrolle eingetragen werden (vgl. Abb. 3). So kann rechtzeitig auf Weichungen im System reagiert werden.

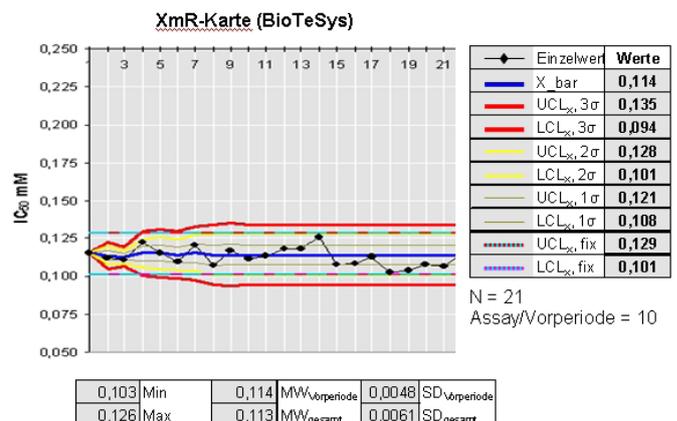


Abb. 3: XmR-Karte der Positivkontrolle

## Über BioTeSys GmbH

Die BioTeSys GmbH in Esslingen ([www.biotesys.de](http://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](mailto:info@biotesys.de)

[www.biotesys.de](http://www.biotesys.de)

## Literatur:

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

[2] Assay Guidance Manual Version 5.0, 2008, Eli Lilly and Company and NIH Chemica Genomics Center