

Problematik der Biokompatibilitätstestung von Wundverbänden in vitro

U. Wollina

Klinik für Hautkrankheiten, Klinikum der Friedrich-Schiller-Universität Jena

Die Anpassung der ISO-Standards für die Testung von Materialien, welche an oder im Menschen zur Anwendung kommen, an Arzneimittelprüfrichtlinien ist in Vorbereitung. Für die Prüfung der biologischen Verträglichkeit oder Biokompatibilität sind in vitro-Verfahren im Zulassungsrecht anerkannt. Sie dienen in erster Linie der Erfassung des zellschädigenden (zytotoxischen) Potentials und damit der Anwendersicherheit.

Unbefriedigend ist jedoch ihr Aussagewert bezüglich der Erfassung bestimmter nicht-zytotoxischer Wirkungen, welche u. U. für das Verständnis biologischer Wirkungen in vivo ausschlaggebend sind. Hierzu sind sowohl von den Forschungslabors der Firmen als auch von unabhängiger Seite bestimmte in vitro-Modelle entwickelt worden, bei denen zumeist Zellkulturen mesenchymaler oder epithelialer Zellen eingesetzt werden. Hautäquivalenzmodelle, die aus einer epidermisbedeckten Dermis bestehen und in vitro für einige Zeit vitale gehalten wer-

den können, stellen eine neue Generation komplizierterer Mehrkomponenten-Modelle dar, die wegen ihres bisher beschränkten Einsatzes zur Testung von Wundverbänden im folgenden nicht berücksichtigt werden.

Im wesentlichen lassen sich Testmethoden mit direktem Material-Zell-Kontakt (Direktverfahren), indirektem Material-Zell-Kontakt mit dünner Agar-Trennschicht und Extraktions- oder Elutionsverfahren unterscheiden.

BIOKOMPATIBILITÄT UND ZYTOTOXIZITÄT

Die lethale Schädigung lebender Zellen ist Ausdruck der Zytotoxizität von Wundverbänden. Die Zytotoxizität wird auf unterschiedliche Weise erfaßt. Üblich ist die direkte Messung der Proliferationshemmung über Zellzahlen (Tab. 1) oder $[^3\text{H}]$ Thymidin-Einbau. Zunehmend finden jedoch auch nicht-radioaktive Verfahren mit Farb- oder Fluoreszenzfarbstoffen Anwendung. Nachteilig ist für alle verwendeten Verfahren, daß *nicht* zwischen zytotoxischen (le-

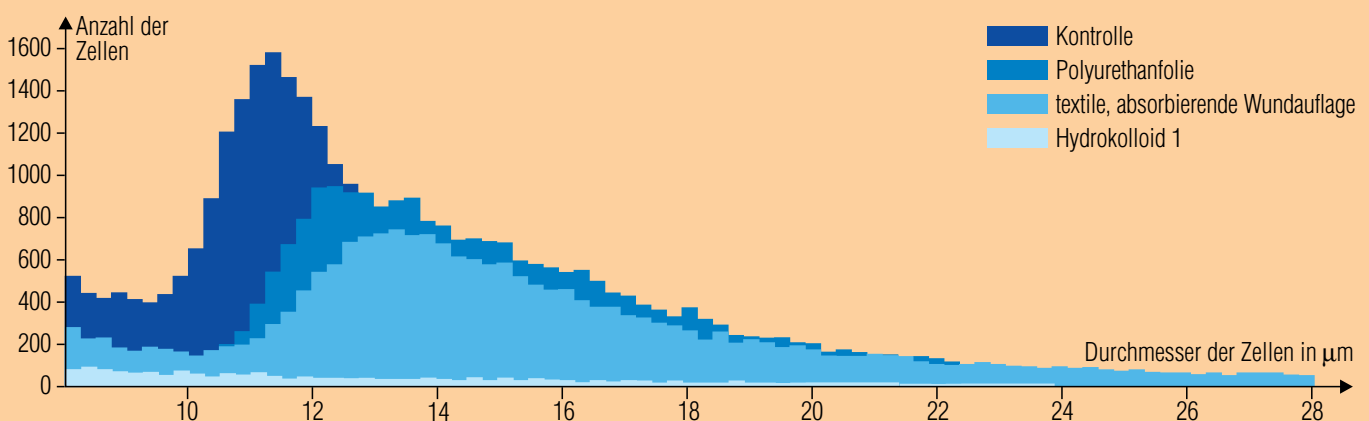
thalen) und zytopathischen (sublethalen) Wirkungen differenziert wird. Letztere können einen Arrest im Zellzyklus bewirken oder letztendlich in einer adaptiven Reaktion münden, die einen Wiedereintritt in die Proliferation erlaubt.

Hier bieten die Bestimmungen intrazellulärer Enzyme im Kulturüberstand eine sinnvolle Ergänzung. Am gebräuchlichsten ist der Lactat-Dehydrogenase-Assay. Lactat-Dehydrogenase ist ein zytosolisches Enzym, welches L-Lactat unter Bildung von NADH in Pyruvat umwandelt. Bei Zellschädigungen kann das Enzym freigesetzt werden. Die Messung erfolgt über eine photometrische Bestimmung des produzierten NADH.

Zellschädigungen können jedoch auch zu einer Abnahme des zellulären Volumens / Durchmessers führen. Solche „Schrumpfungen“ lassen sich mit Partikelzählgeräten (teil-)automatisiert erfassen (Tab. 2). Schließlich liefert auch der durch Fluoreszenzassays gemessene Wert lebender Zellen im Vergleich zur Gesamtzahl lebender plus abgestorbener Zellen einen detaillierten Aufschluß.

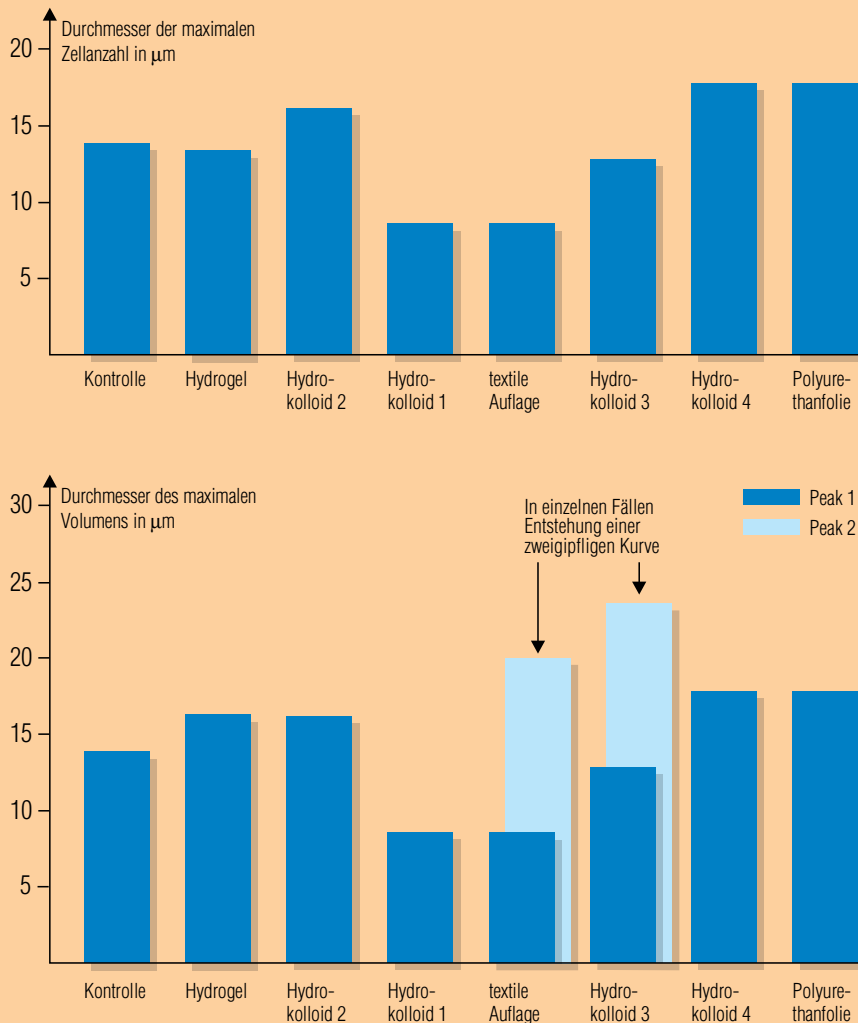
Die Ursachen der zytotoxischen Effekte von Wundverbänden können sowohl in der Liberation partikulären (z. B. Fasern oder Gelpartikel) als auch löslichen (z. B. Acrylate u. a.) Materials liegen (Abb. 1a/b). Für die Erfassung beider Komponenten ist die Kombination direkter und indirekter Testverfahren erforderlich. Die Zytotoxizität kommerzieller Wundverbände ist abhängig

VERMINDERUNG DER ZELLZAHLEN UND VERSCHIEBUNG DER DURCHMESSERPEAKS (TAB. 1)



Beim Direktkontakttest von Wundverbänden mit humanen HaCaT-Keratinocyten kann eine Durchmesserzunahme durch eine Änderung osmotischer Verhältnisse wie durch Pinozytose und Phagozytose von Degradationsprodukten von Wundverbänden zustande kommen.

MORPHOLOGISCHE EFFEKTE AUF KERATINOZYTEN DURCH WUNDVERBÄNDE (TAB. 2)



vom eingesetzten Zelltyp und den Kulturbedingungen. Sie ist also nicht absolut. Sie bleibt sowohl limitiert als auch selektiv.

Zytotoxische Wirkungen können sowohl von den traditionellen Wundverbänden wie textilen Materialien und beschichteten Gazen als auch von den neuen synthetischen Produkten ausgehen. Letztere gewinnen durch ihre heilungsstimulierenden oder -optimierenden Effekte an praktischer Bedeutung, weshalb zur Gewährleistung einer hohen Produktsicherheit ihr mögliches zytotoxisches Potential auszuloten ist. Entsprechend den häufiger eingesetzten synthetischen Wundverbänden wurden in dieser Biokompatibilitätstestung verschiedene Arten von Hydrokolloiden, Hydrogelen, Polyurethanfolien und textilen, absorbierenden Wundauflagen untersucht.

NICHT-ZYTOTOXISCHE WACHSTUMSEFFEKTE

Wundverbände können das Zellwachstum in vitro ohne eine signifikante Freisetzung intrazellulärer Enzyme hemmen (vgl. Tab. 3). In diesen Fällen sprechen wir von zytopathischen Wirkungen oder nicht-zytotoxischer Wachstumshemmung. Verlängerungen der Zellzykluszeit, Arretierungen in bestimmten Zyklusphasen (wie bei Mitosehemmern), die Induktion des sog. programmierten individuellen Zelltodes (Apoptose) oder der Differenzierung sind dabei zu berücksichtigen.

Es ist bisher kaum systematisch untersucht, welche Komponenten der Wundverbände für die nicht-zytotoxische Wachstumshemmung verantwortlich zeichnen. Nicht unwesentlich sind bei direktem Material-Zell-Kontakt die Oberflächenladung, der Polymerisie-

rungsgrad, die sterischen Verhältnisse ladungstragender Seitengruppen etc. Über solche Materialeigenschaften kann zum Beispiel die Anheftung lebender Zellen vermittelt werden. Adhäsion und Proliferation werden durchaus unterschiedlich moduliert.

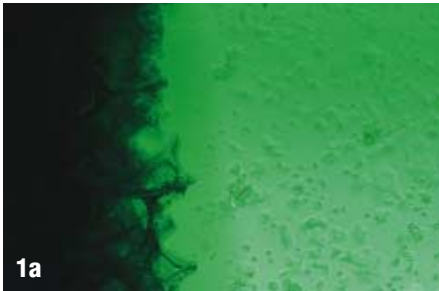
Eine wundverbandbedingte Minderung der Zelladhäsivität resultiert im Flottieren von Zellen im Überstand und kann somit zu einer Überschätzung der Zytotoxizität bei Zellzahl-Messungen führen (vgl. Tab. 3).

Die Degradation der Verbandmaterialien sowie die pH-Effekte (insbesondere Azidität) sollen ebenfalls zur Proliferationshemmung führen. Eine Phagozytose von liberiertem Material aus Hydrokolloid-Verbänden ist bei experimentellen Untersuchungen in vivo bestätigt worden und kann u. U. zur Fremdkörperreaktion führen (Abb. 1c). Abbauprodukte sollten deshalb komplett biologisch abbaubar sein. Einige Produktentwicklungen zielen auf eine höhere Stabilität der Wundverbände in vivo ab. Ob sich damit auch eine Stimulation der Wundheilung erreichen läßt, bleibt abzuwarten.

ZYTOTOXIZITÄT UND OPTIMIERTE WUNDHEILUNG – EIN PARADOXON?

Das zytotoxische Potential synthetischer Materialien, aus denen moderne Wundverbände bestehen, ist grundsätzlich begrenzt. Hersteller bemühen sich um bioverträgliche und wirksame Produkte. Dennoch ist bei allen Wundverbänden eine – je nach Testmodell – mehr oder minder große Zytotoxizität nachweisbar. Diese Feststellung mag den Unerfahrenen auf diesem Gebiet abschrecken, synthetische Wundverbände einzusetzen. Sie führt aber auch zu Fragen nach der klinischen Relevanz bestimmter in vitro durchgeführter Biokompatibilitätstests.

Ganz sicher ist, daß kein einziger der heute publizierten Tests in der Lage wäre, die Wechselwirkungen der Wundverbände mit lebenden Zellen in allen Facetten darzustellen. Wir haben davon auszugehen, daß Monokultur-Systeme nur sehr vereinfachte Annäherungen an die Situation einer Wunde in vivo erlauben. Ihr großer Vorteil liegt jedoch in der reproduzierbaren Untersuchung bestimmter Zusammenhänge von Materialqualität und durch die Versuchsbedingungen definierter Biokompatibilität. Sie stellen somit ein wichti-



Zytotoxische Effekte im direkten Material-Zell-Kontakt, morphologisches Monitoring.

Abb. 1a
Hemmfhof bei einem Hydrogel.



Abb. 1b
Induktion flottierender Zellen durch Adhäsionshemmung bei einem Hydrokolloid.

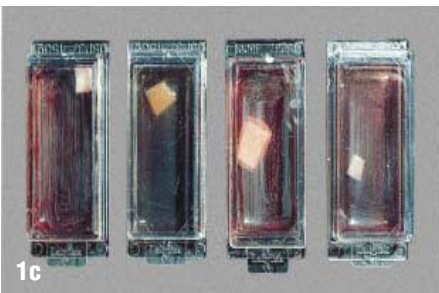


Abb. 1c
Degradation von Wundverbänden in vitro. Es wurden Material-Proben differenter Hydrokolloide in gleicher Größe für 4 Tage humanen Keratinozyten in subkonfluenten Kulturen exponiert. Zu beachten ist der unterschiedliche Abbaugrad und die unterschiedliche Quellung der Materialien.

ges Werkzeug für den technischen Fortschritt auf dem Gebiet der Wundverbände dar und erlauben zugleich auch die Erkennung und Kalkulation von Risiken und Vorzügen bestimmter Materialkombinationen.

Derzeitige Entwicklungen zur Verfeinerung der Monokultur-Systeme verknüpfen mehrere Parameter der biologischen Wirkungen von Wundverbänden auf lebende Zellen. Auf diese Weise wird der bisher weithin übliche Reduktionismus im Hinblick auf die Zytotoxizität von synthetischen Wundverbänden vermieden.

Es liegen Untersuchungsergebnisse vor, die für eine Förderung bestimmter Funktionen von Zellen in der Wunde sprechen. So sind blutstillende Wirkungen für Alginat, fibrinolytische und kollagenbildende für Hydrokolloide und migrationsfördernde für Kollagenschwämme beschrieben worden. Unser Labor konnte die Zytokininduktion in Keratinozyten durch bestimmte Hydrokolloide und Hydrogele nachweisen.

Damit klärt sich das scheinbare Paradoxon auf: Wundverbände können die Wundheilung in vivo optimieren, weil sie fördernde biologische Eigen-

schaften besitzen, ihre Zytotoxizität in vitro limitiert und selektiv ist. Einige Autoren sind darüber hinaus der Ansicht, daß ein geringes zytotoxisches Potential der Wundverbände bei *chronischen* Wunden sogar von Vorteil sein könnte, da diese Wunden sowohl im Wundbett als auch am Wundrand epidermal Zeichen einer Hyperaktivität aufweisen (z. B. vermehrte Freisetzung von Proteasen und Zytokinen im Wundbett, epidermale Hyperplasie im kallösen Wundrand). Möglicherweise ist eine gewisse Reduktion der Keimflora zu erwarten.

ZUSAMMENFASSUNG

In vitro-Methoden haben einen festen Platz in der Beurteilung der Produktsicherheit und -charakterisierung von Wundverbänden erlangt. Sie tragen auch zur sinnvollen Reduzierung von Tierversuchen in der Medizin bei. Ihre Interpretation setzt jedoch Detailkenntnisse sowohl zum Produkt als auch zum Testverfahren voraus. Auf unterschiedliche Testverfahren, ihre Vorzüge und Limitierungen wird Bezug genommen. Die vorliegende Darstellung sollte das Interesse an dieser Form klinisch-orientierter Forschung wecken und den Zusammenhang zur klinischen Anwendung illustrieren.

SUMMARY

Biocompatibility tests of wound dressings in vitro

Biocompatibility tests of wound dressings are gaining increasing interest as a standardization of test procedures for dressings according to pharmacological guidelines is expected. In vitro models commonly used for analyses are monocultures of mesenchymal or epithelial cells. These systems can easily be standardised but yield only limited results: eg they allow no differentiation between cytotoxic or cytopathic effects. The cytotoxic potential of wound dressings tested so far was only modest and may enhance the healing process in chronic wounds.

*Prof. Dr. med. habil. Uwe Wollina
Komm. Direktor der Klinik für
Hautkrankheiten
Klinikum der Friedrich-Schiller-
Universität Jena
07740 Jena*

Literatur bei der Redaktion

WACHSTUMSHEMMUNG UND ZELLZAHLREDUKTION (TAB. 3)

Wundverband	Zellproliferations-Inhibitionsindex		Zellzahl	
	Keratinozyten	Fibroblasten	Keratinozyten	Fibroblasten
Hydrokolloid 3	21	17	42	78
Hydrogel	24	-23	32	47
Hydrokolloid 4	15	5	34	32

Extraktionsverfahren (24h Exposition); Zellproliferations-Inhibitionsindex (CPII) nach Rosdy and Clauss (1990).