

## 2. Grundlagen

### 2.1. Die Wirkung von Textilien auf den Menschen

In den letzten 15 Jahren traten vermehrt Allergien und andere Hautreaktionen auf, die durch Textilien und Unterwäsche hervorgerufen wurden. Besonders mit Formaldehyd ausgerüstete Textilien stehen unter Verdacht Hautreizungen hervorzurufen. Teilweise reagierte die Textilindustrie auf diese Vorwürfe und reduzierte bzw. substituierte die verwendeten Substanzen.

Faserzusätze, die als Flammschutzmittel, Antioxidantien, optische Aufheller und UV-Adsorbentien fungieren sollen, sind oft mit Kontaktdermatitis in Verbindung gebracht worden. Aber auch Textillabel können Dermatitis auslösen. Die Ursachen für Dermatitis sind vielschichtig, die genauen Zusammenhänge müssen noch vollständig geklärt werden. [4, 5, 6, 7, 8]

Textilien können aus den unterschiedlichsten Chemiefasern und Naturfasern, wie Baumwolle oder Seide, bestehen. Weil diese Fasern oft mit menschlicher Haut in Berührung kommen, wurden sie und deren Ausrüstung verschiedenen Toxizitätstests unterzogen. Untersuchungen an Menschen zeigten z. B. bei Polyester- und Acrylfasern keine Hautirritationen. Wurden die Chemiefasern jedoch verbrannt, zeigte sich eine deutliche Toxizität der entstandenen Produkte. [9]

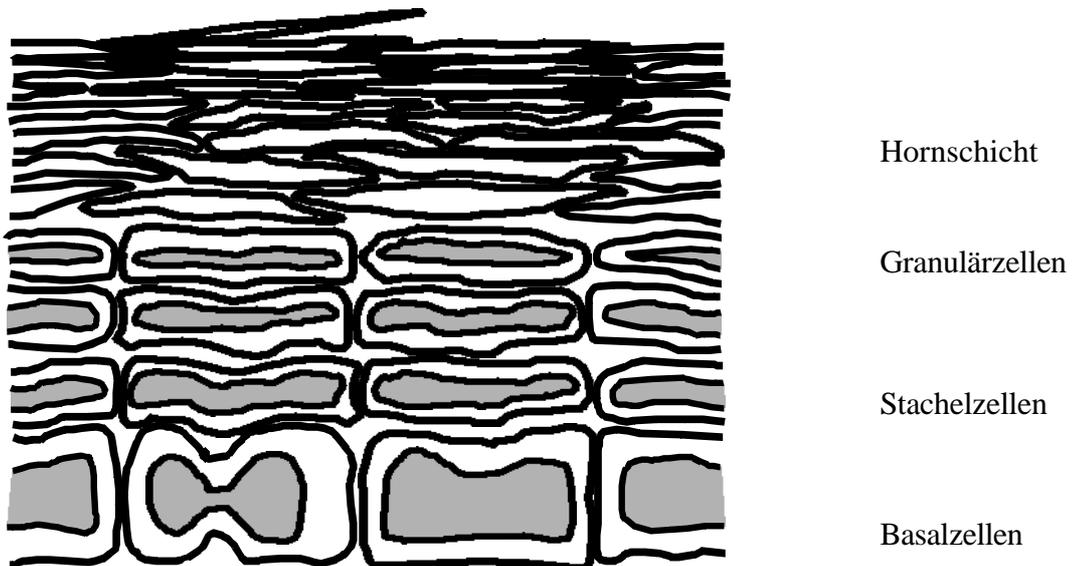
Die toxische Wirkung einer Textilprobe kann nicht immer auf eine einzelne Komponente zurückgeführt werden, vielmehr muß das Zusammenwirken sämtlicher Inhaltsstoffe untersucht werden. Die Aussagen der verschiedenen Biotests umfassen in der Regel eine Vielzahl von Komponenten gleichzeitig, sind also integrierend, dabei hoch empfindlich und zeichnen sich überdies häufig durch Schnelligkeit und Preisgünstigkeit gegenüber chemischen Bestimmungsverfahren aus. [10]

## 2.2. Der Aufbau der menschlichen Haut

Die menschliche Haut hat viele verschiedene Aufgaben für den Gesamtorganismus zu erfüllen. Dabei schützt sie nicht nur vor äußeren Einflüssen wie Temperaturänderungen, Sonnenlicht und mechanischen Beanspruchungen, sondern regelt auch den pH-Wert, die Vitamin D-Synthese, den Feuchtigkeitshaushalt und das Milieu der Mikroorganismen an der Oberfläche.

Die Epidermis ist das Gewebe, das den direkten Kontakt mit der Umwelt des Menschen hat. Sie ist die äußere Begrenzung der Haut und wirkt als erste Barriere gegen schädliche Einflüsse. Sie unterteilt sich in mehrere Schichten, in denen außer den Keratinozyten noch Melanozyten, Langerhans- und Merkelzellen vorhanden sind. Diese regeln den Informationsfluß zwischen den Zellen und sind Bestandteile des Immunsystems. Zusätzlich durchziehen Drüsen und deren Kanäle die Haut.

Abbildung 1: Aufbau der menschlichen Haut



Die innerste Schicht besteht aus Basalzellen, die auf der Basallamina haften. Die Basallamina bildet die Trennlinie zwischen Epidermis und Dermis. Die Basalzellen sind nicht differenziert, sie können sich daher unbegrenzt teilen, wobei die Tochterzelle je nach Bedarf Stammzelle bleibt oder sich differenziert. Eine Teilung der differenzierten Zelle ist dann nicht mehr möglich. Über den Basalzellen liegen mehrere

Schichten von größeren flacheren Stachelzellen. Die Basalzellschicht (stratum basale) und die Stachelzellschicht (stratum spinosum) bilden die Keimschicht (stratum germinativum). Oberhalb der Stachelzellen liegt eine Schicht von Granulärzellen, die sogenannte Körnerschicht (stratum granulosum). Darüber verschwinden nach und nach sämtliche Zellorganellen, nur noch das fibrilläre Protein Keratin ist vorhanden. Die oberste Schicht enthält sehr flache keratinisierte Hornschuppen, die Hornschicht (stratum corneum). Durch mechanische Einflüsse lösen sich die Hornschuppen von der Hautoberfläche.

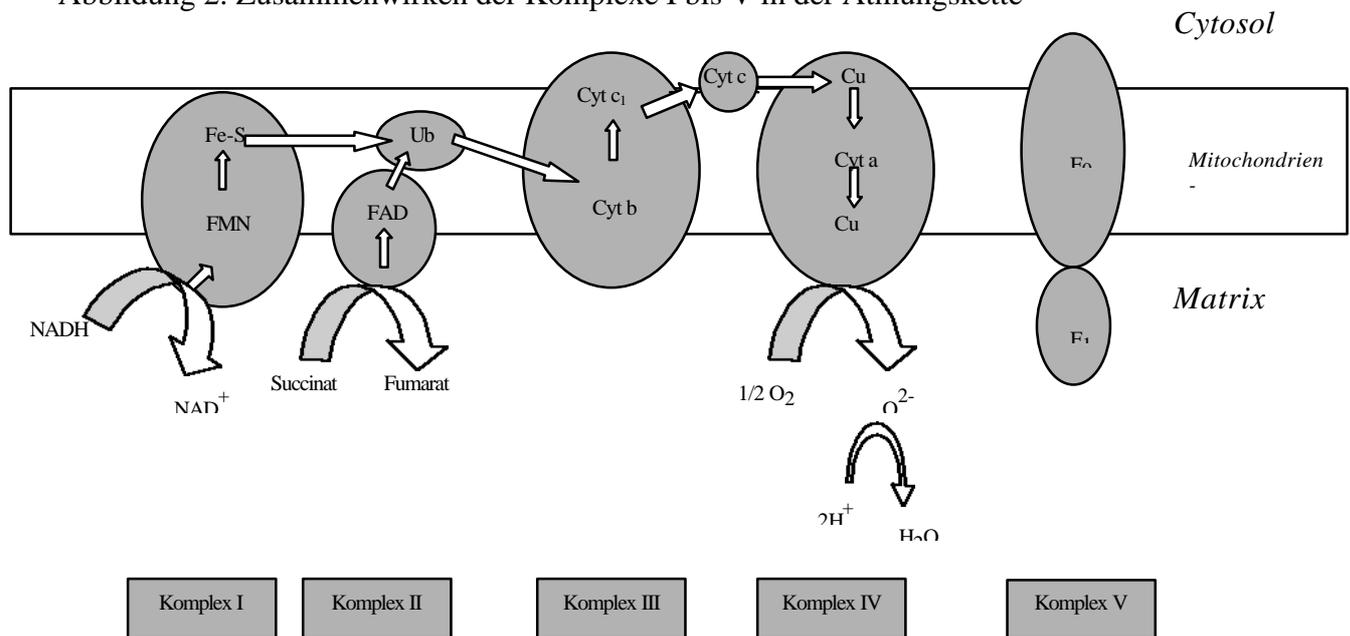
Das Wachstum einer Zelle von der Basalzelle über die Stachelzelle bis zur abgestorbenen keratinisierten Hornschuppe findet säulenartig statt. Jede dieser Säulen ist eine epidermale Proliferationseinheit. Die Höhe einer solchen Proliferationseinheit, also die Dicke der Epidermis ist je nach Körperregion unterschiedlich, ebenso die Lebensdauer einer Zelle vom Zeitpunkt der Differenzierung bis zum Ablösen an der Oberfläche. [11] Bei der Aufnahme von Substanzen zeigt die Haut durch diesen komplexen Aufbau ihre Barrierefunktion. [12]

### **2.3. Die Zellatmung**

Die Atmung der eukaryotischen Zellen findet in den Mitochondrien statt. Diese Zellorganellen besitzen zwei Membransysteme, ein äußeres und ein inneres. Die oxydative Phosphorylierung findet an der inneren Mitochondrienmembran statt. Die innere Membran ist im Gegensatz zur äußeren nicht für Ionen und die meisten kleinen Moleküle permeabel. Zwischen Matrix- und Cytosolseite der inneren Mitochondrienmembran gewährleisten Transporter den Austausch der Moleküle und Ionen.

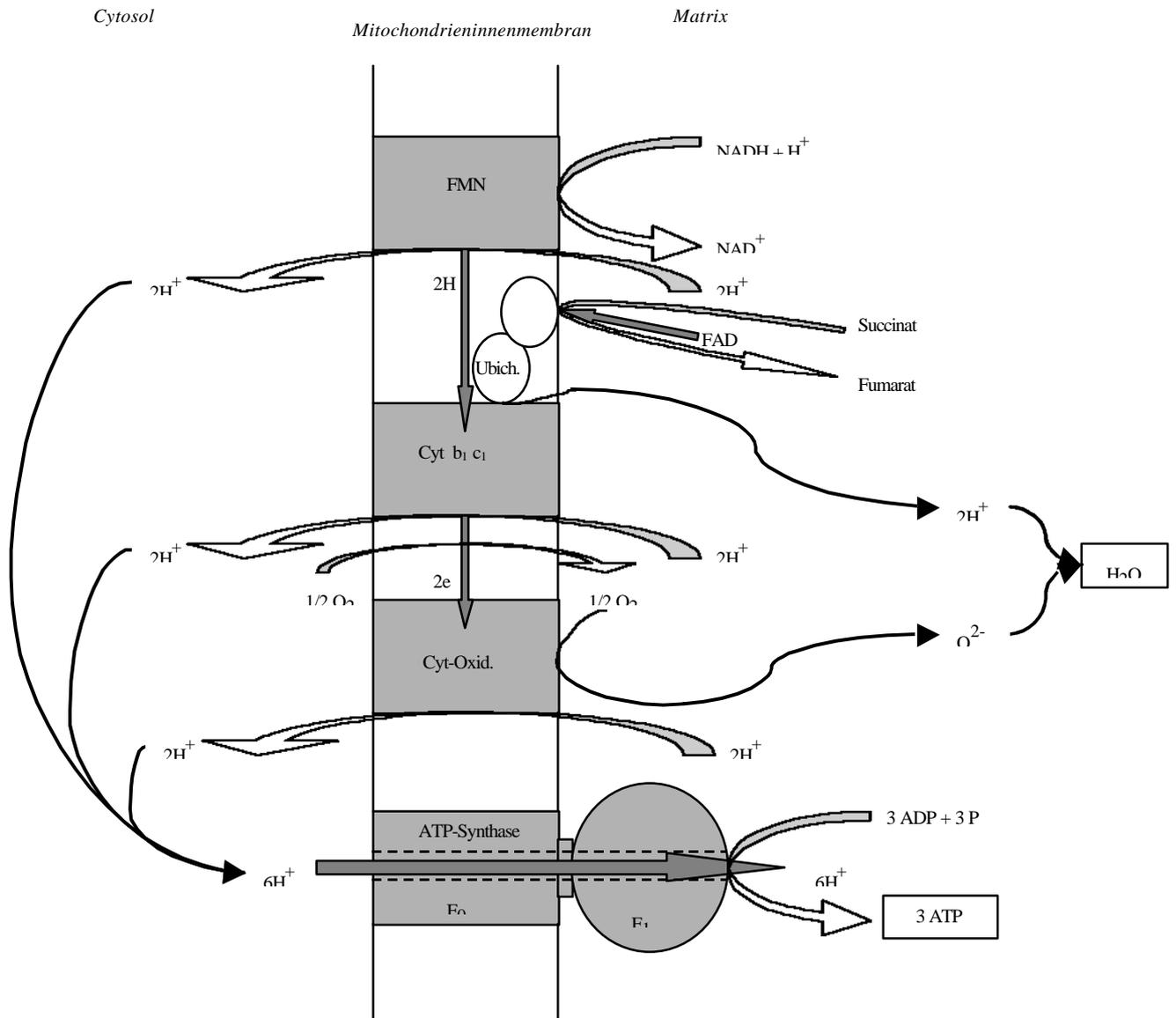
Die Atmung katalysiert stufenweise die Oxydation von substratgebundenem Wasserstoff zu Wasser, dabei wird die Energie des gebundenen Wasserstoffs enzymatisch in mehreren Teilschritten freigesetzt. Der Wasserstoff wird vorher durch Dehydrogenasen auf Substrate (NAD<sup>+</sup> und FAD) übertragen. [13]

Abbildung 2: Zusammenwirken der Komplexe I bis V in der Atmungskette



Die Teilschritte bei der Atmung lassen sich in fünf große Komplexe unterteilen. Der Elektronenfluß innerhalb dieser Komplexe bewirkt einen Protonentransport durch die Membran. Dadurch entstehen unterschiedliche Protonenkonzentrationen an Cytosol- und Matrixseite, dies führt zur Bildung eines Protonengradienten. Im Komplex I (NADH-Q-Reduktase) findet die Wasserstoffübertragung von NADH auf Ubichinon statt. Im Komplex II wird der Wasserstoff vom Succinat auf Ubichinon übertragen. Innerhalb des Komplexes III wird der Elektronentransport vom Ubichinon zum Cytochrom c katalysiert. Der Komplex IV besitzt ebenso wie die Komplexe I und III eine Protonenpumpe. Dabei wird die benötigte Energie aus dem Elektronentransport bezogen. Im Komplex V befindet sich ein Protonenkanal, der durch die Mitochondrieninnenmembran geht und für die Rückführung der Protonen notwendig ist. Für die Synthese von ATP im Komplex V sind diese Protonen eine notwendige Voraussetzung. [14]

Abbildung 3: Phosphorylierung der Atmungskette

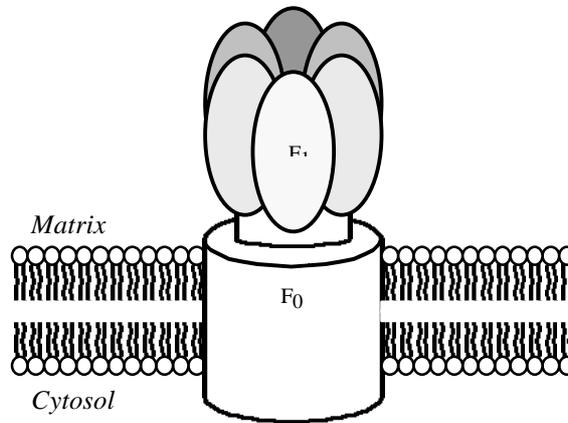


### 2.3.1. Die Wirkstoffe Oligomycin, CCCP und Antimycin A und ihr Einfluß auf die Atmung der Zellen

Sind Teilschritte oder der gesamte Ablauf der Zellatmung unterbrochen, so ist dieses lebenswichtige Verfahren der Energiegewinnung für die Einschränkung der Lebensfähigkeit der Zelle verantwortlich. Im Komplex V der Atmungskette wird ATP synthetisiert, wobei die Protonen, die durch den Protonenkanal transportiert werden,

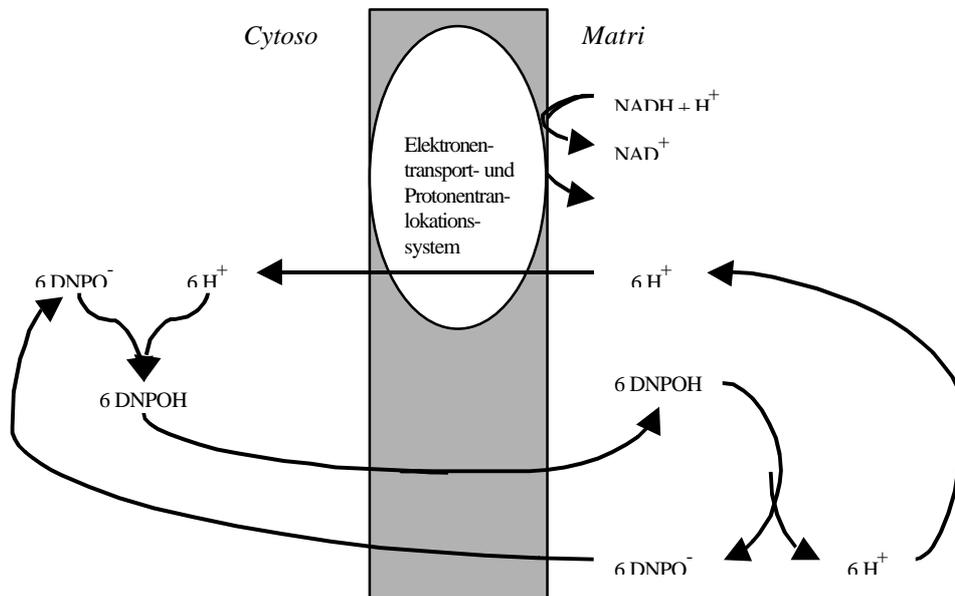
die Antriebskraft sind. Der Wirkstoff Oligomycin hemmt die ATP-Synthese nicht direkt, sondern verschließt den Protonenkanal.

Abbildung 4: Komplex V der Atmungskette mit Protonenkanal



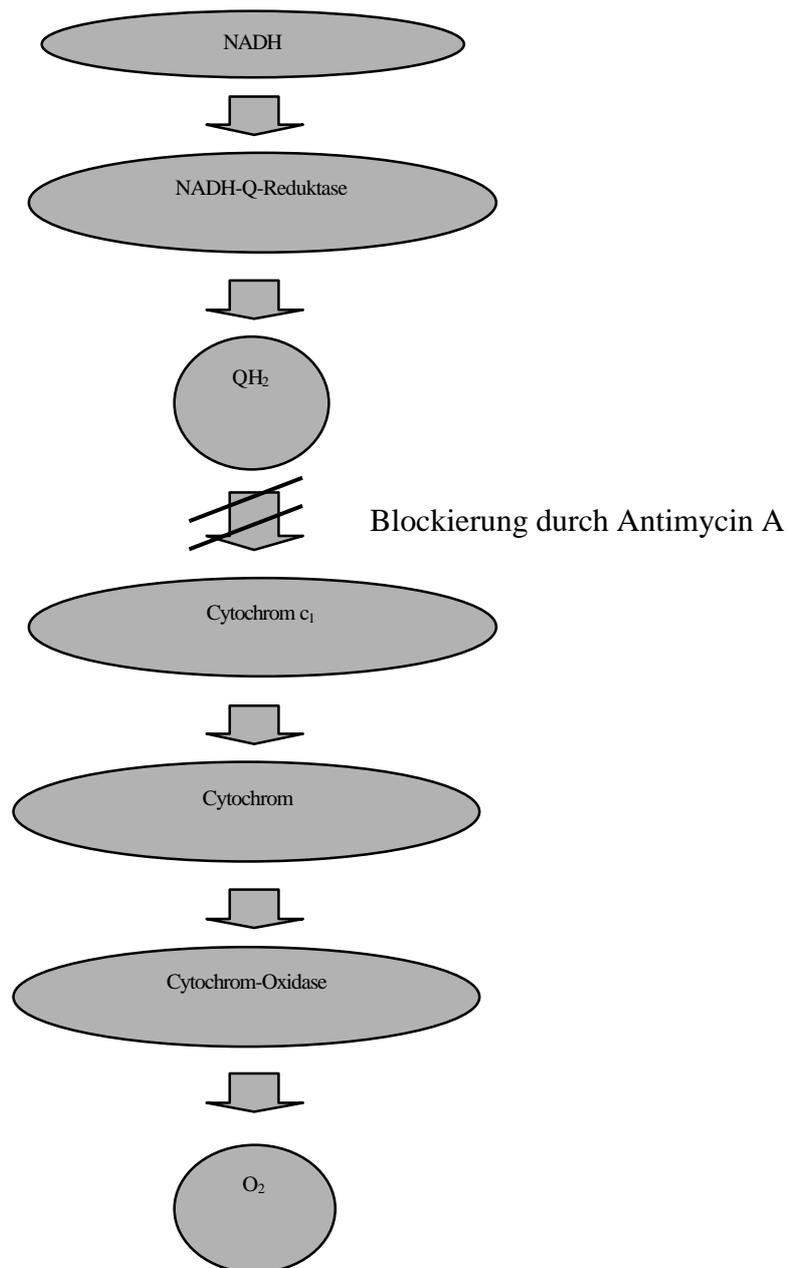
CCCP entkoppelt den Elektronentransport von der Atmungskettenphosphorylierung und bewirkt, daß die Konzentration der Protonen außerhalb und innerhalb der inneren Mitochondrienmembran gleich ist. Dadurch ist keine ATP-Synthese mehr möglich, die Energie geht vollständig in Wärme über und die Zelle atmet so lange bis alle Energie verbraucht ist und stirbt dann ab. Im Normalzustand läuft die Zellatmung nicht mit maximaler Kapazität. Die Zugabe des Entkopplers steigert den Sauerstoffverbrauch und verhindert die ATP-Synthese als geschwindigkeitsbestimmenden Schritt.

Abbildung 5: Wirkungsweise von Entkopplern am Beispiel des 2,4-Dinitrophenols



Ein weiterer spezifischer Inhibitor der Atmungskette ist das Antimycin A. Es blockiert den Komplex III, indem es den Elektronenfluß zwischen den Cytochromen  $b$  und  $c_1$  blockiert und verhindert, daß in der Cytochrom-Reduktase Protonen gepumpt werden. Bei allen Wirkstoffen sind bereits sehr geringe Konzentrationen ausreichend, um die Atmungskette an den betreffenden Stellen zu hemmen. [15]

Abbildung 6: Hemmung der Atmungskette durch Antimycin A



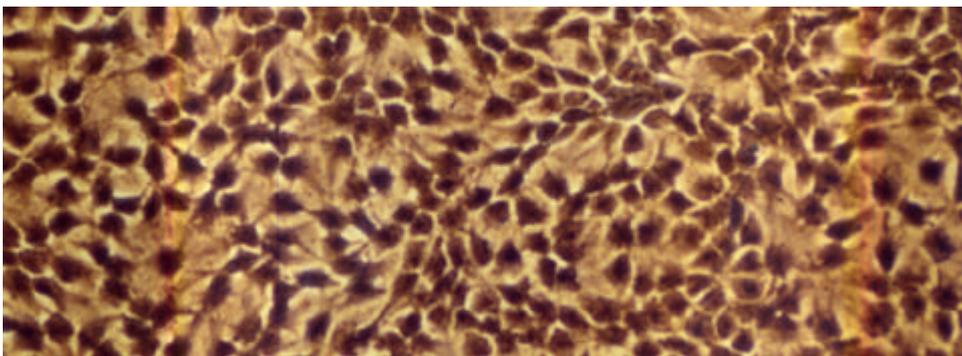
Durch Einsatz der Wirkstoffe im Keratinozytenatmungstest können nicht nur Aussagen über den gesamten Atmungsstatus getroffen werden, sondern auch die Angriffspunkte der eventuellen Hemmung auf Teilkomplexe der Atmung bestimmt werden.

#### 2.4. Die HaCaT-Keratinozyten

Es wird die Zelllinie der HaCaT-Keratinozyten für den Keratinozytenatmungstest verwendet. Die Primärkultur stammt aus Heidelberg und existiert bereits seit 1984. Bei der Isolierung der Zellen aus Hautmaterial eines erwachsenen Melanompatienten wurde mit kalziumarmen Medium bei erhöhter Inkubationstemperatur gearbeitet. Daraus resultiert der Name der Zelllinie: **H**uman **a**dult, low **C**alciumconcentration, high **T**emperature.

Die HaCaT-Keratinozyten weisen im Gegensatz zu frisch präparierten Keratinozyten nicht alle biologischen Eigenschaften auf, dafür sind die HaCaT-Zellen homogen. Außerdem ist die Reproduzierbarkeit der Zellen innerhalb der HaCaT-Zelllinie besser. Ein weiterer Vorteil liegt in den günstigen Wachstums- und Vermehrungseigenschaften. Die HaCaT-Zellen sind über viele Generationen stabil, aber nicht tumorogen und liegen epithelförmig vor. Die Zellen weisen einen abnormen Karyotyp und differente Mutationen in beiden p53-Allelen auf. Die Syntheseleistung arbeitet mit hoher Differenzierungspotenz. Bei den Keratinozyten dieser Zelllinie handelt es sich um sehr robuste und widerstandsfähige Zellen. [16, 17]

Abbildung 7: Mikroskopische Aufnahmen von HaCaT-Zellen (P24 d12)



## 2.5. Das Prinzip der Oxygrafie und die Auswertung der Daten

Der Sauerstoffgehalt wird amperometrisch mit Hilfe einer Clark-Elektrode gemessen. Der Anstieg der gemessenen Konzentrations-Zeit-Kurve entspricht dem Sauerstoffgehalt in der Lösung. Die miniaturisierte Clark-Elektrode besitzt eine dünne Polyethylenmembran, durch die der gelöste Sauerstoff schnell diffundieren kann. Veränderungen des Sauerstoffgehalts in der Meßkammer können dadurch wesentlich schneller detektiert werden. Der Sauerstoff wird an der Elektrode reduziert und die freigegebenen Elektronen werden registriert.

Abbildung 8: CLARK-Elektrode

