

HET-CAM Test

Jana Pardeike & Rainer Müller, Freie Universität Berlin

1. Grundlegendes

Die Abkürzung HET-CAM steht für hens egg test-chorio-allantoic membrane. 1985 wurde dieser Test von Lüpke als Alternative zum Irritationstest am Kaninchenaugew entwickelt [1]. Neue dermal zu applizierende Arzneizubereitungen, kosmetische Produkte und Chemikalien können mit Hilfe des HET-CAM Tests auf ihr Potential, Reizungen am Auge hervorzurufen, untersucht werden. Hierzu wird die zu testende Formulierung/Substanz direkt mit der Chorion-Allantois-Membran (CAM) eines befruchteten und neun Tage bebrüteten Hühnereis in Berührung gebracht und das zeitabhängige Auftreten von Hämorrhagie, Gefäßlysis und Koagulation (Gerinnung des Blutes) erfasst, wobei das zeitliche Auftreten der Reaktion mit der Stärke des Reizpotentials korreliert [2-5].

2. Durchführung

Für den HET-CAM Test werden befruchtete Eier der Hühnerrasse White Leghorn verwendet. Die Eier werden neun Tage bei $37\pm 0,5^{\circ}\text{C}$ und einer relativen Luftfeuchtigkeit von $62,5\pm 7,5\%$ unter regelmäßigem Drehen bebrütet. Am neunten Tag werden die Eier mit einer Lampe durchleuchtet und die Luftblase markiert. Nicht befruchtete Eier werden verworfen. Entlang der Markierung werden die Eier geöffnet und die Eimembran mit physiologischer Kochsalzlösung befeuchtet. Die Eimembran wird abgezogen, das Ei unter ein Binokular gestellt und so ausgerichtet, dass die CAM und die Blutgefäße gut zu sehen sind (Abb.1).

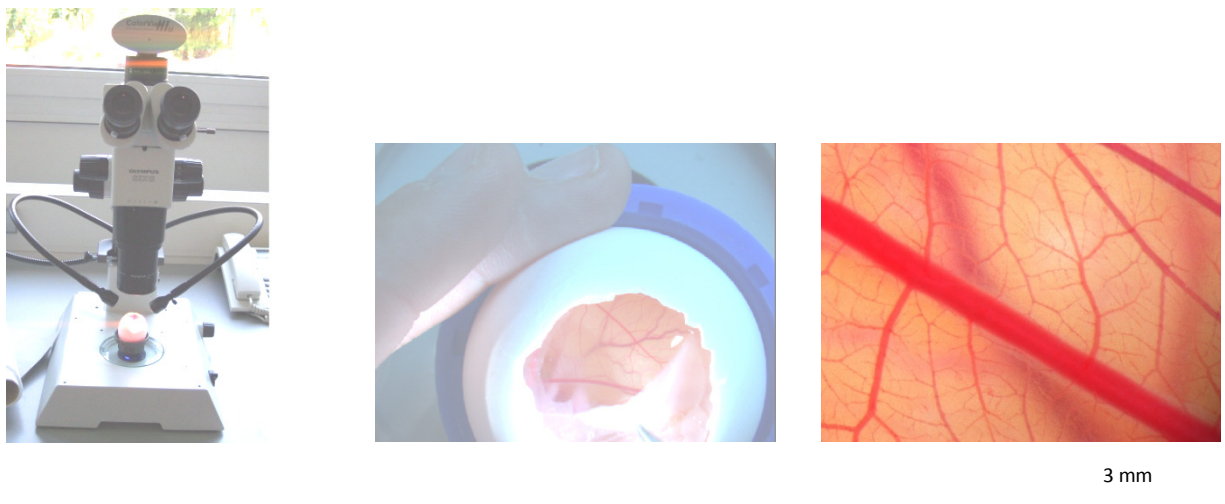


Abb. 1: Binokular zur Durchführung des HET-CAM Tests (links), geöffnetes Ei bei dem die Eimembran abgezogen wird (Mitte) und Bild einer unbehandelten CAM in 63-facher Vergrößerung (rechts).

Zu testende Formulierungen/Substanzen werden auf die CAM aufgetragen und das Auftreten von Hämorrhagie, Gefäßlysis und Koagulation (Abb. 2) im Vergleich zu Standards nach einem Punktesystem bewertet. Zur Bestimmung des Irritationspotentials stehen die drei nachfolgenden Methoden zur Verfügung:

1. Reaktions-Zeit-Methode: Die CAM wird über 5 min nach Applikation der Testsubstanz beobachtet und der Zeitpunkt des Auftretens von Hämorrhagie, Gefäßlysis und Koagulation bestimmt. Diese Methode ist nur für transparente Materialien geeignet.

2. Irritations-Grenzwert: Die höchste Konzentration der Testsubstanz, bei der Hämorrhagie, Gefäßlysis oder Koagulation erst nach einer fünfminütigen Kontaktzeit auftritt, wird bestimmt. Diese Methode eignet sich nur für transparente Materialien.

3. Endpunktbestimmung: Die CAM wird für eine bestimmte Zeit z.B. 30 s oder 5 min mit der Testsubstanz in Berührung gebracht und nach vorsichtigem Entfernen der Testsubstanz beurteilt. Diese Methode eignet sich auch für undurchsichtige Proben und Feststoffe.

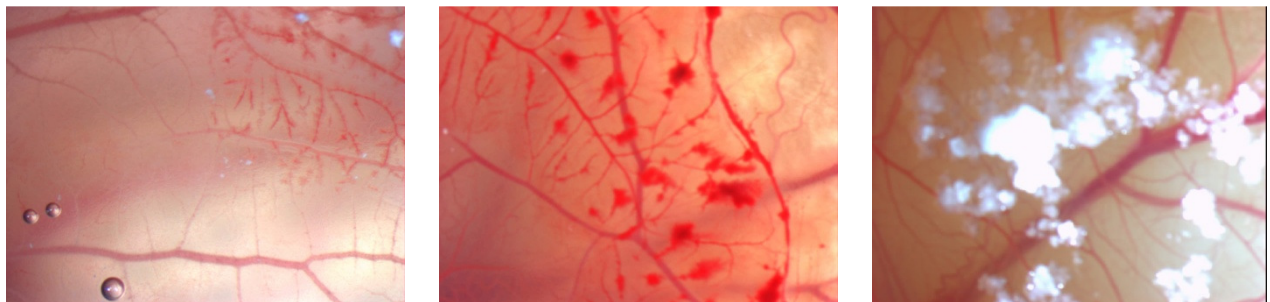


Abb. 2: Gefäßlysis und Hämorrhagie 5 min nach Applikation von 1% des Tensids Natriumlaurylsulfat (links), Koagulation 5 min nach Applikation von 0,3% NaOH (Mitte) und Bild der CAM nach Applikation der pulverförmigen Substanz PX-18 (rechts) in 63-facher Vergrößerung [6].

3. Vor- und Nachteile

Vorteile des HET-CAM Tests bei der Ermittlung des Augenirritationspotentials sind eine einfache und schnelle Durchführbarkeit, die hohe Empfindlichkeit des Tests sowie ein relativ geringer Kostenaufwand für die Durchführung.

Einer der Hauptnachteile des Tests ist die subjektive Ermittlung des Testergebnisses. Dieser Nachteil kann z.T. durch den Einsatz von positiven Standards und einem anhand der Standards entwickelten Bewertungsschemas vermindert werden. Der HET-CAM Test kann nicht eingesetzt werden zum Testen von Substanzen mit einem pharmakologischen Effekt auf Blutgefäße, färbenden Substanzen, die die CAM irreversibel verfärben und adhäsive, undurchsichtige Substanzen, die sich nicht von der CAM entfernen lassen.

Des Weiteren stellt sich die Frage, ob der HET-CAM Test zu den Tierversuchen zählt. Für den HET-CAM Test werden befruchtete Hühnereier am Tag neun der Embryogenese verwendet. Zu diesem Zeitpunkt sind das Nervengewebe und das Schmerzempfinden noch nicht entwickelt. Zurzeit wird der HET-CAM Test als grenzwertig betrachtet. Er wird eingesetzt, um die Anzahl der an Säugetieren durchgeführten Versuche und die damit verbundenen Qualen zu reduzieren [7].

4. Literatur

1. N. P. Lüpke, Hen's egg chorioallantoic membrane test for irritation potential, *Food Chem Toxicol* 1985, 23(2): p. 287–291
2. HET-CAM Test INVITTOX n° 47, ECVAM DB-ALM., 1992, p. 1-8
3. HET-CAM Test – Test protocol used in Phase II of the German Validation Study for Replacement of the Draize Eye Test. BGA-ZEBET, 1991, p.1-8
4. The hen's egg-chorioallantoic membrane test (HET-CAM test) for the assessment of the eye irritation potential of chemical substances, ZEBET, 2001: p. 1-7
5. The Hen's Egg Test on the Chorioallantoic Membrane (HET-CAM) INCITTOX n°96. ECVAM DB-ALM, 1994: p. 1-18.
6. J. Pardeike; Nanosuspensions and nanostructured lipid carriers for dermal application, PhD-Thesis, Free University Berlin, 2008
7. M. Liebsch, H. Spielmann, Currently available in vitro methods used in the regulatory toxicology, *Toxicology Letters*, 2002, 127: p. 127-134