

**Rekonstruierte humane Epidermis für die  
Bestimmung der perkutanen  
Absorption *in vitro*  
- eine Validierungsstudie -**

**DISSERTATION**

zur Erlangung des akademischen Grades  
des Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie  
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von  
**Alexander Gabriel Vuia**  
aus Giessen

August 2007

1. Gutachter:	Frau Prof. Dr. Monika Schäfer-Korting
2. Gutachter:	Herr Prof. Dr. Rupert Mutzel
Datum der Disputation:	07.12.2007

Die vorliegende Arbeit wurde auf Anregung und unter Anleitung von  
Frau Prof. Dr. Monika Schäfer-Korting  
in der Abteilung für Pharmakologie und Toxikologie  
des Instituts für Pharmazie  
der Freien Universität Berlin angefertigt.

*Für Nancy  
und Tamino Tiberiu*

## Danksagung

---

Frau Professor Dr. Monika Schäfer-Korting danke ich sehr herzlich für die Vergabe des ambitionierten Dissertationsthemas, Ihre hilfsbereite und zuverlässige Betreuung, Ihre fachliche Unterstützung und stete Motivation.

Herrn Professor Dr. Rupert Mutzel danke ich herzlich für die Erstellung des Zweitgutachtens.

Herzlich bedanken möchte ich mich bei allen Mitstreitern des BMBF-Verbundprojekts, die dieses Dissertationsvorhaben möglich gemacht haben, für die effektive Zusammenarbeit, die wissenschaftlichen Diskussionen, die herzliche Atmosphäre bei den Projekttreffen sowie für die Unterstützung der eigenen Arbeiten innerhalb des Projekts. Durch den intensiven Erfahrungsaustausch habe ich persönlich und fachlich sehr profitiert.

Mein besonderer Dank gilt Frau Elisabeth Schmidt für Ihren Einsatz bei der Erarbeitung der Grundlagen für die standardisierte Auswertung der Versuchsdaten und für Ihre Hilfsbereitschaft bei allen statistischen Fragestellungen sowie Frau Dr. Maria Rübhelke für Ihre tatkräftige Mithilfe bei der Vorbereitung von Projekttreffen und der Protokollerstellung. Herrn Professor Dr. Hans-Christian Korting und den Mitarbeitern der histologischen Arbeitsgruppe der Ludwig-Maximilians-Universität München danke ich für die zuverlässige Auswertung der histologischen Hautproben.

Herrn Dr. von Hesler und Frau Dr. Kirsch vom Emil von Behring-Krankenhaus in Berlin Zehlendorf danke ich herzlich für die Überlassung von exzidierten Brust- und Bauchhaut sowie dem gesamten chirurgischen Team für Ihre freundliche Hilfe. Ohne diese großzügige Unterstützung hätte der enorme Bedarf an Humanhaut, der im Rahmen dieser Arbeit benötigt wurde, nicht annähernd gedeckt werden können.

Ebenso gilt der ausdrückliche Dank Herrn PD Dr. Christian Große-Siestrup und seinen Mitarbeitern von der tierexperimentellen Einrichtung der Charité, Campus Virchow Klinikum, sowie Herrn Professor Dr. Manfred Kietzmann und

## **Danksagung**

---

Herrn Dr. Frank Niedorf von der Tierärztlichen Hochschule Hannover für das Überlassen von unbehandelter Schweinehaut.

Allen Mitgliedern des Arbeitskreises von Frau Professor Dr. Monika Schäfer-Korting und Herrn Professor Dr. Burkhard Kleuser danke ich für das herzliche und kollegiale Arbeitsklima, in der das Arbeiten großen Spaß gemacht hat.

Meiner Mutter danke ich dafür, dass sie mir den Weg bis zur Promotion ermöglicht hat. Mein besonderer Dank von ganzem Herzen gilt meiner Frau für Ihre unerschöpfliche Unterstützung, die mir während der gesamten Zeit stets mit Kraft und Zuversicht zur Seite stand.

**Publikationsverzeichnis**

**Originalarbeiten**

Schreiber, S., Mahmoud, A., Vuia, A., Rübhelke, M.K., Schmidt, E., Schaller, M., Kandárová, H., Haberland, A., Schäfer, U.F., Bock, U., Korting, H.C., Liebsch, M., Schäfer-Korting, M., 2005.

Reconstructed Epidermis versus Human and Animal Skin in Skin Absorption Studies.

Toxicology in Vitro 19, 813-822

Schäfer-Korting, M., Bock, U., Gamer, A., Haberland, A., Haltner-Ukomadu, E., Kaca, M., Kamp, H., Kietzmann, M., Korting, H.C., Krächter, H.U., Lehr, C.M., Liebsch, M., Mehling A., Netzlaff, F., Niedorf, F., Rübhelke, M.K., Schäfer, U.F., Schmidt, E., Schreiber, S., Schröder, K.R., Spielmann, H., Vuia, A., 2006.

Reconstructed Human Epidermis for Skin Absorption Testing: Results of the German Prevalidation Study.

Alternatives to laboratory Animals (ATLA) 34, 283-294

Schäfer-Korting, M., Bock, U., Diembeck, W., Düsing, H.J., Gamer, A., Haltner-Ukomadu, E., Hoffmann, C., Kaca, M., Kamp, H., Kersen, S., Kietzmann, M., Korting, H.C., Krächter, H.U., Lehr, C.M., Liebsch, M., Mehling, A., Müller-Goymann, C., Netzlaff, F., Niedorf, F., Rübhelke, M.K., Schäfer, U.F., Schmidt, E., Schreiber, S., Spielmann, H., Vuia, A., Weimer, M., 2007.

Reconstructed Human Epidermis for Skin Absorption Testing: Results of the Validation.

Alternatives to laboratory Animals (ATLA), in press

### Poster

Vuia, A., Bock, U., Haltner, E., Kaca, M., Kietzmann, M., Korting, H.C., Lehr, C.M., Liebsch, M., Netzlaff, F., Niedorf, F., Rübhelke, M.K., Schäfer, U.F., Schmidt, E., Schreiber, S., Schäfer-Korting, M.

Prevalidation Study on Testing Percutaneous Absorption via Reconstructed Human Epidermis.

ALTEX 22, Special Issue, 2005 (5<sup>th</sup> World Congress on Alternatives and Animal Use in the Life Sciences, 21. – 25. August 2005, Berlin)

Vuia, A., Bock, U., Diembeck, W., Düsing, H.J., Gamer, A., Haltner-Ukomadu, E., Hoffmann, C., Kaca, M., Kamp, H., Kersen, S., Kietzmann, M., Korting, H.C., Krächter, H.U., Lehr, C.M., Liebsch, M., Mehling, A., Müller-Goymann, C., Netzlaff, F., Niedorf, F., Rübhelke, M.K., Schäfer, U.F., Schmidt, E., Schreiber, S., Spielmann, H., Weimer, M. Schäfer-Korting, M.

Skin Absorption Testing via Reconstructed Human Epidermis – Results of the German Validation Study.

47. Frühjahrstagung der Deutschen Gesellschaft für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie (DGPT), 04. – 06. April 2006, Mainz

Vuia, A., Bock, U., Diembeck, W., Düsing, H.J., Gamer, A., Haltner-Ukomadu, E., Hoffmann, C., Kaca, M., Kamp, H., Kersen, S., Kietzmann, M., Korting, H.C., Krächter, H.U., Lehr, C.M., Liebsch, M., Mehling, A., Müller-Goymann, C., Netzlaff, F., Niedorf, F., Rübhelke, M.K., Schäfer, U.F., Schmidt, E., Schreiber, S., Spielmann, H., Weimer, M., Schäfer-Korting, M.

Reconstructed Human Epidermis versus Native Skin for Skin Absorption Testing – Results of the Validation Study.

33<sup>rd</sup> Annual Meeting & Exposition of the Controlled Release Society, 22. – 26. Juli 2006, Wien

### Vorträge

Vuia, A.

Skin Permeation.

INVITROTRAIN, Practical training course on alternative (non-animal) test methods, 26. – 28. September 2005, Berlin

Vuia, A., Bock, U., Diembeck, W., Düsing, H.J., Gamer, A., Haltner-Ukomadu, E., Hoffmann, C., Kaca, M., Kamp, H., Kersen, S., Kietzmann, M., Korting, H.C., Krächter, H.U., Lehr, C.M., Liebsch, M., Mehling, A., Müller-Goymann, C., Netzlaff, F., Niedorf, F., Rübhelke, M.K., Schäfer, U.F., Schmidt, E., Schreiber, S., Spielmann, H., Weimer, M., Schäfer-Korting, M.

Results of the Validation Study on Percutaneous Absorption via Reconstructed Human Epidermis.

13<sup>th</sup> Congress on Alternatives to Animal Testing and 10<sup>th</sup> Annual Meeting of MEGAT – Middle European Society for Alternative Methods to Animal Testing, 2. – 4. Juni 2006, Linz



**Inhaltsverzeichnis**

<b>1</b>	<b>Einleitung .....</b>	<b>1</b>
1.1	Grundlegende Aspekte zur perkutanen Absorption .....	2
1.1.1	Barrierefunktion der Haut.....	2
1.1.2	Transdermaler Stofftransport .....	2
1.1.3	Pharmakokinetik topisch applizierter Substanzen.....	4
1.2	Rekonstruierte humane Epidermis .....	9
1.2.1	Kultivierung und Kulturbedingungen .....	9
1.2.2	Morphologie und Immunhistochemie .....	10
1.2.3	Lipidzusammensetzung .....	11
1.3	Entwicklung von <i>in vitro</i> -Testmethoden .....	12
1.3.1	Rechtliche und politische Vorgaben.....	12
1.3.2	Verfügbarkeit von <i>in vitro</i> -Testverfahren.....	13
1.4	<i>In vitro</i> -Testverfahren zur perkutanen Absorption.....	15
1.4.1	Bestimmung der perkutanen Absorption <i>in vitro</i> .....	15
1.4.2	Testmatrices für die perkutane Absorption <i>in vitro</i> .....	20
1.5	Zielsetzung und Aufbau der Arbeit .....	24
<b>2</b>	<b>Material und Methoden.....</b>	<b>27</b>
2.1	Material.....	28
2.1.1	Geräte.....	28
2.1.2	Instrumente und Sonstiges .....	29
2.1.3	Verbrauchsmaterialien .....	29
2.1.4	Testsubstanzen, Chemikalien und Lösungen .....	30
2.1.5	Rekonstruierte humane Epidermis.....	33
2.2	Methoden.....	34
2.2.1	Durchführung und Qualitätssicherung der Versuche .....	34
2.2.2	Durchführung und Qualitätssicherung der Analytik.....	46
2.2.3	Auswertung der Versuche und Statistik .....	54
<b>3</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>59</b>
3.1	Methoden- und Protokollentwicklung.....	60
3.1.1	Standardisierung des Rührprozesses .....	60
3.1.2	Zusammensetzung von Donor- und Akzeptormedien .....	62
3.1.3	Methodenvergleich: Spalthautgewinnung .....	63
3.1.4	Methodenvergleich: Testosteronanalytik.....	64
3.1.5	Ergebnisse der Partner aus der Methodenentwicklung.....	65
3.2	Protokolltransfer .....	66
3.3	Prävalidierung.....	70
3.3.1	Koffein Permeation .....	75
3.3.2	Testosteron Permeation.....	75
3.3.3	Lag-Zeiten.....	77
3.3.4	Interlaborvariabilität.....	77
3.4	Validierung.....	78
3.4.1	Infinite-dose-Experimente .....	79
3.4.2	Finite-dose-Experimente.....	97
<b>4</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>100</b>
4.1	Entwicklung und Übertragbarkeit des Testprotokolls.....	101
4.1.1	Standardisierung und mögliche Alternativen.....	101

4.1.2	Donor- und Akzeptormedien .....	103
4.1.3	Hautintegrität .....	103
4.1.4	Übertragbarkeit des Protokolls.....	104
4.2	Prävalidierung.....	105
4.2.1	Intra- und Interlaborvariabilität .....	105
4.2.2	Barriereigenschaften der Testmatrices .....	107
4.3	Validierung.....	108
4.3.1	Auswahl der Testsubstanzen.....	108
4.3.2	Barriereigenschaften und Permeationsprofile .....	109
4.3.3	Reproduzierbarkeit in den Partnerlaboren .....	113
4.3.4	Vergleich mit <i>in silico</i> -Daten und Prädiktionsmodell .....	114
4.4	Ausblick .....	114
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung / Summary.....</b>	<b>117</b>
5.1	Zusammenfassung .....	118
5.2	Summary .....	120
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>122</b>

### Abkürzungsverzeichnis

ACB	Across Barriers GmbH
ANOVA	Analyses of Variance (Varianzanalyse)
Aqua bidest.	Aqua bidestillata
Aqua dem.	Aqua demineralisata
BASF	BASF AG
BDF	Beiersdorf AG
BMBF	Bundesministerium für Bildung und Forschung
BSA	Bovines Serumalbumin
ccpm	corrected counts per minute
cpm	counts per minute
dpm	disintegrations per minute
ECVAM	European Centre for the Validation of Alternative Methods
EtOH	Ethanol
FU	Freie Universität Berlin
Gl.	Gleichung
HPLC	High Pressure Liquid Chromatography
HQC	High Quality Control Standard
HSE	Hitzeseparierte humane Epidermis
IGB	Institut für Grenzflächen- und Bioverfahrenstechnik, Fraunhofer, Stuttgart
LMU	Ludwig-Maximilians-Universität München
LOD	Limit of Detection (Nachweisgrenze)
LOQ	Limit of Quantification (Bestimmungsgrenze)
LQC	Low Quality Control Standard
LSC	Liquid Scintillation Counting (Flüssigkeitsszintillationsmethode)
min.	Minuten
MM	Molekülmasse
MQC	Midrange Quality Control Standard
MTT	3-[4,5-Dimethylthiazol-2yl]-2,5 diphenyltetrazoliumbromid
MW	Mittelwert

## Abkürzungsverzeichnis

---

OECD	Organisation for Economic Co-operation and Development
$P_{app}$	(scheinbarer) Permeabilitätskoeffizient
PBS	Isotonischer Phosphatpuffer pH 7,4 (Phosphate Buffered Saline)
QSPR	Quantitative Structure-Properties-Relationship
REACH	Registration, Evaluation and Authorisation of Chemicals
RHE	Rekonstruierte Humane Epidermis
SCCP	Scientific Committee on Cosmetic Products and Non-Food Products intended for Consumers (vormals SCCNFP)
SD	Standard Deviation (Standardabweichung)
SKALP	Skin derived Antileukoproteinase
SOP	Standard Operating Procedure (Standardarbeitsanweisung)
TEER	Transepidermal Electrical Resistance (transepidermaler elektrischer Widerstand)
TEWL	Transepidermal Water Loss (transepidermaler Wasserverlust)
TiHo	Tierärztliche Hochschule Hannover
TUB	Technische Universität Carolo-Wilhelmina Braunschweig
US	Universität des Saarlandes, Saarbrücken
ZEBET	Zentralstelle zur Erfassung und Bewertung von Ersatz- und Ergänzungsmethoden zum Tierversuch, Berlin