

1 Einleitung

1.1 Grundlegende Aspekte zur perkutanen Absorption

1.1.1 Barrierefunktion der Haut

Das intakte Stratum corneum (Hornschicht) bedingt im Wesentlichen die Barrierefunktion der Haut (Scheuplein and Blank, 1971; Wertz and Downing, 1989). Es besteht aus vollständig verhornten, abgeplatteten und kernlosen Zellen, den Korneozyten. Diese sind ziegelsteinähnlich in 10 bis 15 Schichten angeordnet und erneuern sich durch apoptotische Prozesse der inneren und durch oberflächliches Abschilfern der äußeren Keratinozyten im Zeitraum von 1 bis 2 Wochen. Eingebettet sind die überwiegend aus Keratinfilamenten aufgebauten Zellen in eine dicht vernetzte und stabile Matrix aus Lipiden und Proteinen („cornified envelope“), die im Stratum granulosum induziert wird. Daher wird die Struktur des Stratum corneum als „Ziegelstein-Mörtel-Modell“ („brick and mortar-model“) bezeichnet (Elias, 1983). Der Wasseranteil ist mit ca. 5 bis 10 % sehr niedrig. Die Anzahl der Schichten und somit die Dicke des Stratum corneum ist von der Körperregion abhängig und kann zwischen 10 und 80 µm schwanken. Die interzelluläre Lipidmatrix besteht aus Ceramiden (40 %), Cholesterol (27 %), Cholesterylestern (10 %) und freien Fettsäuren (9 %) (Hadgraft, 2005; Wertz and Downing, 1989), umgibt in mehreren Lagen die Keratinozyten und ist von wesentlicher Bedeutung für die Aufrechterhaltung der Barriere der Haut nach außen sowie für den Schutz des Organismus vor Dehydratation (Grubauer et al., 1989; Potts and Francoeur, 1991).

1.1.2 Transdermaler Stofftransport

Nach topischer Applikation einer Substanz bzw. Formulierung auf die Haut ist die perkutane Absorption definiert als die insgesamt aufgenommene (absorbierte) Menge (OECD, 2003; OECD, 2004a; OECD, 2004b). Bei der perkutanen Absorption wird zwischen den Begriffen Penetration, Permeation und Resorption unterschieden. Unter Penetration versteht man das Eindringen in die Hautschichten. Wie tief eine Substanz die Haut penetriert und gegebenenfalls in dieser akkumuliert, ist sehr unterschiedlich und u. a. abhängig von den physikochemischen Eigenschaften der aufgetragenen

Substanz. Durchwandert der applizierte Stoff schließlich die Hautschichten und gelangt in die kutanen Blut- bzw. Lymphgefäße, so wird von Permeation gesprochen. Die Substanz ist systemisch verfügbar. Da bei topisch applizierten Substanzen das Stratum corneum auch als Reservoir dienen kann, ist die systemische Aufnahme von penetrierter Substanz durch verzögerte Permeation ebenso möglich. Aus Sicherheitsaspekten ist die Resorption daher definiert als die Summe aus Penetration und Permeation. Abb. 1 stellt die Substanzaufnahme in und durch die Haut schematisch dar. Im *in vitro*-Modell der Franz-Diffusionszelle entspricht die Permeation der Menge, die durch die Testmatrix in das Akzeptormedium übergegangen ist.

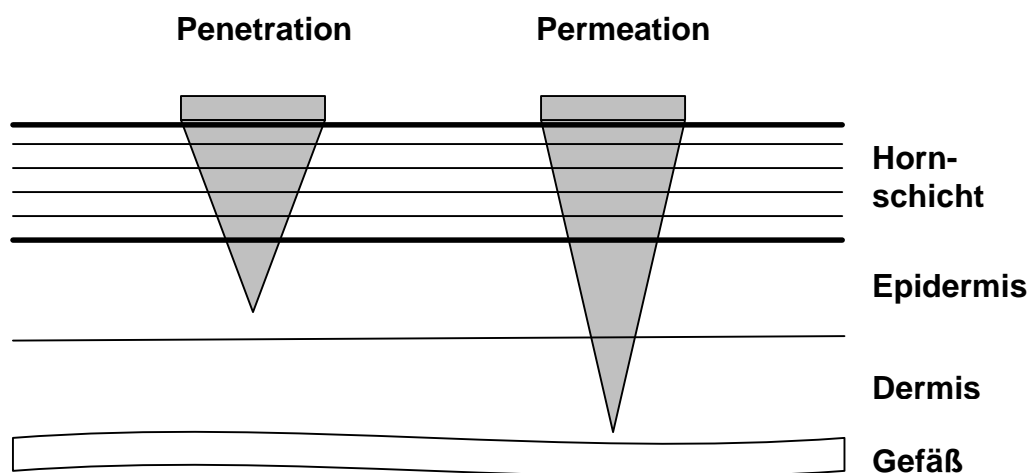


Abb. 1: Substanzaufnahme in und durch die Haut

In Abhängigkeit von den physikochemischen Eigenschaften einer Substanz kann entsprechend dem Zwei-Kompartiment-Modell das Stratum corneum durch transzellulären (Transport durch die Korneozyten) vorwiegend aber durch interzelluläre Passage (Transport über die im Interzellularraum vorhandene Lipidmatrix) durchdrungen werden (Potts and Guy, 1992). Die Bedeutung des als „Shunt-Weg“ bezeichnete Resorption einer Substanz durch Passage von Haarfollikeln, Talgdrüsen und/oder ekkrine Schweißdrüsen (Lademann et al., 2001; Schaefer and Lademann, 2001) kann im Einzelfall, insbesondere bei

stark behaarter tierischer Haut, von Bedeutung sein (Barry, 2002; Hadgraft, 2001b). Die Penetration in bzw. Permeation von gesunder humaner Haut ist für die überwiegende Mehrzahl der Stoffe meist sehr gering, wofür der Lipidanteil des Stratum corneum wesentlich verantwortlich ist (Benfeldt, 1999; Hadgraft et al., 1992; Hirvonen et al., 1991; Kitagawa and Li, 1999; Yagi et al., 1998).

Die Einflussgrößen auf die perkutane Absorption sind vielfältig und komplex. Neben den physikochemischen Eigenschaften der applizierten Substanz wie Löslichkeit, Polarität und Molekulargröße, hat insbesondere auch der Vehikel, in dem die Substanz aufgebracht wird, einen erheblichen Einfluss auf das Ausmaß und Geschwindigkeit der perkutanen Absorption (Yagi et al., 1998). Durch die Modifikation des Vehikels, Zusatz von penetrationsfördernden Substanzen sowie durch Einsatz übersättigter Lösungen kann die Permeation erhöht werden (Hadgraft, 2001a; Moser et al., 2001). Penetrationsfördernde Substanzen fördern entweder die Diffusion in die Haut oder erhöhen die Löslichkeit der Substanz in der Haut. Darüber hinaus deuten Untersuchungen auf diskrete Poren in den Lipidlamellen hin, die sich unter dem Einfluss von Penetrationsverstärkern weiten können (Menon and Elias, 1997).

1.1.3 Pharmakokinetik topisch applizierter Substanzen

Der Transport topisch applizierter Substanzen durch die Haut erfolgt vorwiegend durch passive Diffusion (Potts et al., 1992), aktive Transportvorgänge haben allenfalls eine untergeordnete Bedeutung. Zur mathematischen Beschreibung und Quantifizierung der perkutanen Absorption wird daher näherungsweise von der Gültigkeit des 1. Fickschen Gesetzes ausgegangen (Scheuplein, 1976):

$$J = \frac{\Delta m}{\Delta t \cdot A} = \frac{D \cdot K \cdot \Delta c}{dx}$$

Gl. 1

J : Flux = transportierte Stoffmenge pro Zeiteinheit und Fläche
[mol*s⁻¹*cm⁻²]

Δm : permeierte Menge [mol]

Δt : Zeitintervall [s]

- A : Fläche [cm^2]
 D : Diffusionskoeffizient [$\text{cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$]
 K : Verteilungskoeffizient
 Δc : Konzentrationsdifferenz [$\text{mol} \cdot \text{cm}^{-3}$]
 dx : Membrandicke [cm]

Nach dem 1. Fickschen Gesetz ist somit die Abnahme einer auf die Haut applizierten Substanz pro Zeiteinheit direkt proportional zum Diffusions- und Verteilungskoeffizienten sowie umgekehrt proportional zur Dicke der Membran. Der Flux (J) ist dabei definiert als die transportierte Stoffmenge pro Zeiteinheit und Fläche. Zur Vereinfachung wird dabei von einer homogenen Hautbarriere ausgegangen.

Infinite-dose-Bedingungen. Die Penetration einer applizierten Substanz mit anschließender Anreicherung in der Haut ist der erste Schritt für eine lineare Permeation und Voraussetzung eines Transportgleichgewichts, d. h. Steady-State-Bedingungen. Diese müssen bei Versuchen unter so genannten Infinite-dose-Bedingungen gewährleistet sein. Gemäß dem 1. Fickschen Gesetz gilt dabei, dass die transportierte Stoffmenge pro Zeiteinheit über eine Membran (nach Einstellung eines Transportgleichgewichts) konstant ist, solange sich die Substanzkonzentrationen in Donor und Akzeptor nur unwesentlich ändern. („Sink-Bedingungen“). Beim Versuch unter Infinite-dose-Bedingungen muss während der gesamten Versuchsdauer die Konzentration im Donormedium (c_D) die im Akzeptor (c_A) um ein Vielfaches übersteigen ($c_D \gg c_A$). Somit bleibt die Donorkonzentration unbegrenzt, d. h. „infinite“. In der Gleichung 1 kann folglich die Konzentrationsdifferenz zwischen Donor und Akzeptor (Δc) durch die Donorkonzentration (c_D) ersetzt werden:

$$J = \frac{\Delta m}{\Delta t \cdot A} = \frac{D \cdot K \cdot c_D}{dx}$$

Gl. 2

Der Flux zeigt sich unter konstanten Steady-State-Bedingungen (J_{ss}) grafisch in Form eines linearen Kurvenabschnitts (Cooper and Berner, 1985).

Scheinbarer Permeabilitätskoeffizient (P_{app}). Bei der Konzentrationsabnahme im Vehikel bzw. bei der Stoffdiffusion durch das Stratum corneum handelt es sich um eine Kinetik 1. Ordnung. Gemäß dem 1. Fickschen Diffusionsgesetz kann bei Permeationsversuchen unter Infinite-dose-Bedingungen der scheinbare Permeabilitätskoeffizient berechnet werden, der ein Maß für die Geschwindigkeit ist, mit der eine Substanz unter Steady-State-Bedingungen permeiert (Nokhodchi et al., 2003; OECD, 2003). Die Berechnung lässt sich direkt aus Gl. 2 ableiten:

$$P_{app} = -\frac{D \cdot K}{dx} = \frac{J}{c_D}$$

Gl. 3

Durch Division des Fluxes durch die Ausgangskonzentration einer Substanz lässt sich somit der P_{app} -Wert berechnen, welcher sowohl die Permeabilität einer Membran als auch die Permeationseigenschaften einer Substanz charakterisiert. Ein niedriger P_{app} -Wert bedeutet einen hohen Membranwiderstand, d. h. eine geringe Permeabilität der Substanz und umgekehrt. Ein Vergleich von Ergebnissen verschiedener Permeationsuntersuchungen wird damit möglich. In den P_{app} -Wert gehen die nicht ohne weiteres zugänglichen Parameter, wie der Diffusions- und Verteilungskoeffizient sowie die Membrandicke als Konstanten ein. Synonym für den P_{app} -Wert wird in der Literatur auch der Begriff „ k_p -Wert“ verwendet.

Die Berechnung des P_{app} -Werts gemäß Gl. 3 kann dabei an Bedingungen, wie sie bei Permeationsuntersuchungen mit der Franz-Diffusionszelle gelten, angepasst werden (Jäckle et al., 2003; Moss and Cronin, 2002):

$$P_{app}(k_p) = \frac{V}{A \cdot c_i} \cdot \frac{dc_A}{dt}$$

Gl. 4

V : Akzeptorvolumen der Franzzelle [cm^3]

A : Fläche der Membran in Kontakt mit dem Akzeptormedium [cm^2]

c_i : Ausgangskonzentration der Substanz im Donormedium [$\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$]

$\frac{dc_A}{dt}$: zunehmende Konzentration der Substanz im Akzeptormedium über die
Zeit [$\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}\cdot\text{s}^{-1}$]

P_{app} : scheinbarer Permeabilitätskoeffizient [$\text{cm}\cdot\text{s}^{-1}$]

Finite-dose-Bedingungen. Bei Versuchen unter Finite-dose-Bedingungen sind nicht über den gesamten Versuchsverlauf Sink-Bedingungen gegeben. Die applizierte Menge an Substanz im Donor ist „finite“, d. h. begrenzt, und nimmt mit der Zeit deutlich ab. Ein Transportgleichgewicht ist nur zu Beginn des Versuchs nach Äquilibration der Barriere mit der Testsubstanz vorhanden. Die fehlenden Sink-Bedingungen zeigen sich grafisch in dem Abflachen der Permeationskurve zu Versuchsende (Abb. 2 B). Theoretisch kann zwar ein P_{app} -Wert aus dem linearen Teil der Kurve berechnet werden, in der Praxis schließt dies allerdings die zeitlich überlagerte Substanzverteilung in der Membran aus. Abb. 2 zeigt schematisch typische Permeationsverläufe unter Infinite- (A) und Finite-dose-Bedingungen (B).

Die wiedergefundene Menge an applizierter Substanz (Massenbilanz) setzt sich zusammen aus der Summe von penetrierter, permeierter und in der Donorlösung (auf der Haut) verbliebener Menge (OECD, 2003). Die Massenbilanz dient der Qualitätskontrolle der berechneten Daten (s. 1.4.1, S. 16)

Lag-Zeit. Die Zeit, die infolge einer Aufsättigung der Barriere vergeht, bis eine Substanz linear aus der Haut permeiert, ist die lag-Zeit. Bei der grafischen Darstellung der Permeation ergibt sich die lag-Zeit als Schnittpunkt der durch den linearen Teil der Kurve verlaufenden Geraden mit der x-Achse (Abb. 2 A). Daher ist die Bestimmung von Flux und lag-Zeit direkt miteinander verbunden, d. h. die lag-Zeit ist eine abhängige Größe. Zu kürzeren lag-Zeiten kann es durch Einbeziehung von Messpunkten aus dem Sättigungsbereich der Permeationskurve kommen. In einigen Fällen kann infolge von Streuungen der lineare Teil der Permeationskurve so verschoben sein, dass rechnerisch negative lag-Zeiten ermittelt werden, die physikalisch unmöglich sind.

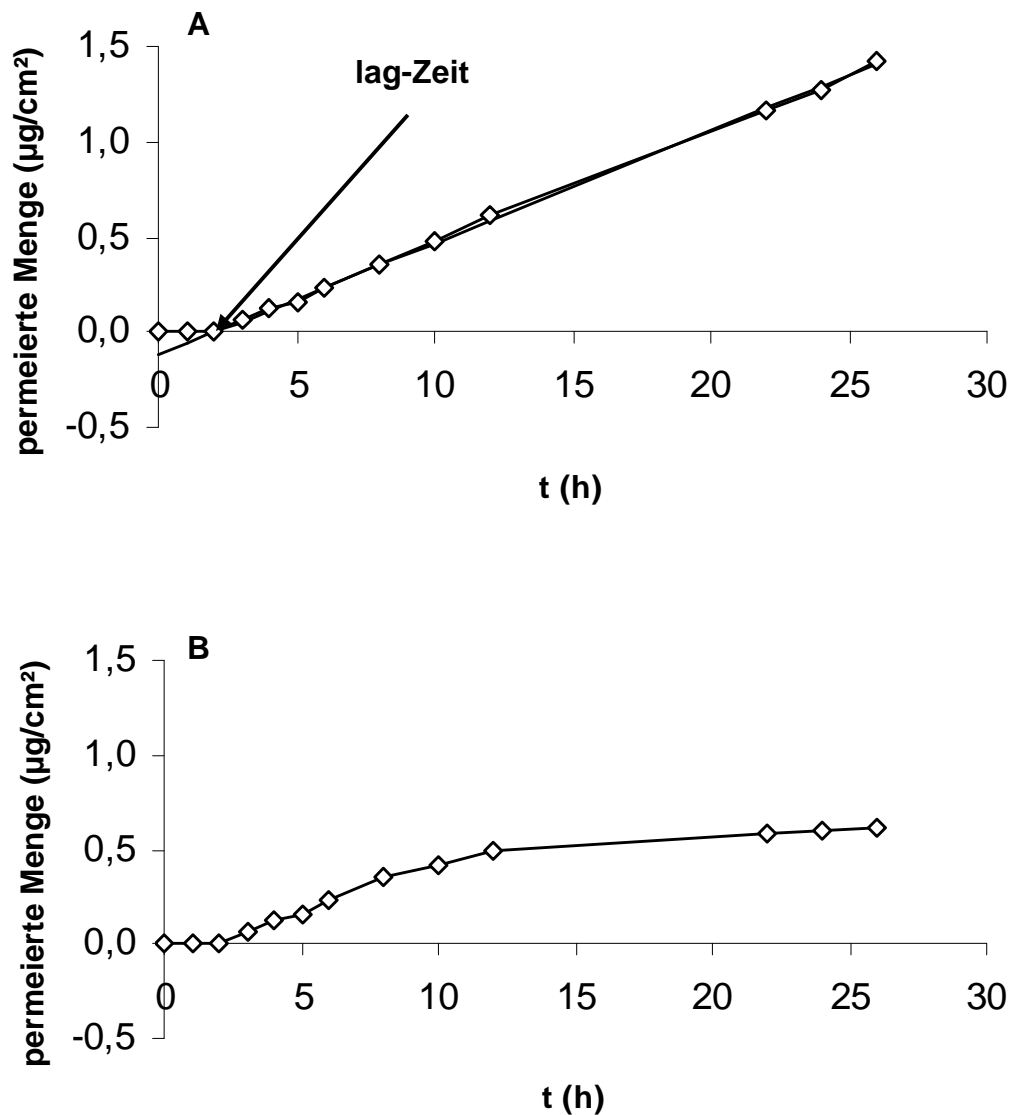


Abb. 2: Typischer Verlauf (schematisch) der Permeationskurve bei Versuchen unter Infinite- (A) und Finite-dose-Bedingungen (B).

Für eine möglichst präzise Berechnung der lag-Zeiten sind Messpunkte aus Permeationsversuchen, die unterhalb der doppelten lag-Zeit liegen, von der Auswertung auszuschließen. Ebenso wird eine Dauer des Permeationsversuchs von mindestens 6 bis 10fachen der lag-Zeit empfohlen (Cooper and Berner, 1985). Damit soll sichergestellt werden, dass alle Werte, die in die Auswertung einfließen, im linearen Verlauf der Permeationskurve liegen. Dieses Vorgehen ist allerdings in der Praxis, insbesondere bei

exzidierten Häuten auf Grund extrem langer lag-Zeiten häufig nicht praktikabel, so dass Abweichungen, wie die Verwendung eines geringeren Sicherheitsfaktors, nicht zu vermeiden sind.

1.2 Rekonstruierte humane Epidermis

Die limitierte Verfügbarkeit von humaner Haut für *in vitro*-Testverfahren hat die Entwicklung von rekonstruierter humaner Epidermis (RHE) und von rekonstruierter Vollhaut, die auch als Kunsthäute oder Hautmodelle bezeichnet werden, in den letzten Jahren gefördert. Neben hausinternen Modellen sind mittlerweile rekonstruierte Epidermis und Vollhaut unterschiedlichen Differenzierungsgrads und in verschiedenen Größen (z. B. 6- oder 12-Well-Platten) von verschiedenen Anbietern kommerziell verfügbar, in Zukunft werden voraussichtlich weitere folgen.

Neben der rekonstruierten Epidermis bzw. Haut sind weitere rekonstruierte Gewebe, wie humane Kornea, Mundschleimhaut, Gingiva und rekonstruiertes humanes Ösophagusepithel entwickelt worden. Im Folgenden wird auf die drei in dieser Arbeit getesteten RHE-Modelle, SkinEthic[®] Skin Model (SkinEthic laboratories, Nizza, Frankreich), EpiDerm[™] 606-X (MatTek Corporation, Ashland, MA, USA) und EPISKIN[®] Reconstructed Human Epidermis Kit (EPISKIN, SNC, Lyon, Frankreich), eingegangen.

1.2.1 Kultivierung und Kulturbedingungen

Bei der Kultivierung der rekonstruierten Haut wird von primären Keratinozyten ausgegangen. Nach Aussaat auf ein geeignetes Trägermaterial (SkinEthic[®]- und EpiDerm[™]-Modell: Polycarbonatmembran; EPISKIN[®]-Modell: Kollagen Typ I/III-Struktur beschichtet mit Kollagen Typ IV) und Proliferation zu einem mehrschichtigen Gewebe wird die Differenzierung der Zellschichten durch den Kontakt mit der Luft-Medium-Grenze induziert. Die Luft-Exposition ist Voraussetzung für die Ausbildung der hauttypischen Schichten und eines kohärenten Stratum corneum (Asselineau et al., 1985; Bodde et al., 1990; Ponc et al., 1988; Regnier et al., 1986). Bei Vollhautmodellen, wie dem EpiDermFT[™] Model, werden mit Fibroblasten besiedelte Kollagengele oder dermale Fibroblastenkulturen in die Hautmodelle integriert.

Die Dauer der Exposition ist für die Ausdifferenzierung der Zellschichten ausschlaggebend. SkinEthic[®] laboratories liefert Hautmodelle nach 10, 12 und 17 Tagen Kultivierungsdauer in unterschiedlichen Größen (0,11 cm²; 0,33 cm²; 0,50 cm²; 4,0 cm²). EPISKIN[®]-Modelle sind mit einer Kultivierungsdauer über 13 und 20 Tagen erhältlich. Ersteres wird für Irritationstests verwendet, letzteres ist insbesondere für die Bestimmung der Permeation *in vitro* entwickelt worden (Ponec et al., 2002; Roguet et al., 1993). Die maximale Größe der EPISKIN[®]-Modelle beträgt 1,07 cm². Auch das EpiDerm[™]-Modell für die Bestimmung der perkutanen Absorption wird in verschiedenen Dimensionen und Ausprägungen angeboten, darunter u. a. auch hydrocortisonfrei kultivierte Modelle.

Die Kulturbedingungen (Umgebungstemperatur und Atmosphäre, Art und Zusammensetzung des Wachstumsmediums, Wahl des Trägermaterials) haben erheblichen Einfluss auf die Histologie und den Lipidgehalt. Für eine gleichbleibende Qualität der rekonstruierten Modelle ist eine hohe Standardisierung der Kulturbedingungen zwingend erforderlich. Daher wird auf den Zusatz von Serum, das in seiner Zusammensetzung sehr variabel ist, mittlerweile verzichtet und an dieser Stelle Hormone, Wachstumsfaktoren und Vitamine supplementiert. Insbesondere Vitamin C ist für die Ausbildung einer stabilen Hautbarriere von Bedeutung (Ponec et al., 1997).

1.2.2 Morphologie und Immunhistochemie

Die RHE-Modelle zeigen morphologisch eine gute Übereinstimmung mit humaner Epidermis. Histologische Untersuchungen zeigten eine vollständig ausgebildete Epidermis mit Stratum basale, spinosum, granulosum und corneum sowie Basalmembran (Boelsma et al., 2000). Ebenso konnten charakteristische epidermale Ultrastrukturen nachgewiesen werden (Gibbs et al., 1997; Ponec et al., 1997; Rosdy and Clauss, 1990). Unterschiede zur humanen Haut, wie Abweichungen in der Anzahl an Zellschichten, in Zellstrukturen und Zellorganisation sowie das Vorhandensein von Lipidtropfen, sind allerdings beschrieben worden (Netzloff et al., 2005; Ponec et al., 2002; Ponec et al., 2000).

Die Expression epidermaler Differenzierungsmarker ist Voraussetzung für die Differenzierung der Epidermis und somit für die Ausbildung einer kompetenten

Barriere (Lee et al., 1999; Netzlaff et al., 2005). Untersuchungen zur Immunhistochemie der RHE zeigten bei allen Hautmodellen die Expression von Keratin 1 und 10, SPRR (small proline rich-protein), SPRR3, Loricrin, Involucrin und Transglutaminase (Boelsma et al, 2000; Gibbs et al., 1998; Ponec, 1991; Ponec et al., 2002; Tinois et al., 1991). Die Untersuchungen offenbarten allerdings auch Unterschiede in der Expression und Lokalisation von differenzierungsspezifischen Proteinmarkern, die auf ein Ungleichgewicht von Proliferation und Differenzierung hindeuten. So exprimieren die RHE-Modelle Keratin 6 und SKALP (skin derived antileukoprotease), die in gesunder humaner Epidermis nicht exprimiert werden. Der Serin-Protease-Inhibitor SKALP kommt in psoriatischer Epidermis vor und ist neben der Beteiligung an der Regulierung kutaner inflammatorischer Prozesse mit Hyperproliferation assoziiert (Yoshida et al., 2002). Darüber hinaus zeigten sich Unterschiede in der Expression von kleineren prolinreichen Proteinen und Involucrin sowie die vorzeitige Expression von Transglutaminase (Boelsma et al., 2000).

1.2.3 Lipidzusammensetzung

Untersuchungen zur Lipidzusammensetzung der RHE-Modelle zeigten das Vorkommen aller epidermalen Lipidklassen (Ponec et al., 2000). Dennoch gibt es Unterschiede zur humanen Epidermis im Lipidprofil (Ponec et al., 2000) und in der lamellaren Struktur der Lipide in den keratinisierten Zellschichten (Doucet et al., 1997; Robert et al., 1997). Der Gehalt der polaren Ceramide 5 und 6 ist niedriger, der von Ceramid 2 wesentlich höher als in humaner Epidermis. Ceramid 7 konnte nicht nachgewiesen werden (Ponec et al., 2000). Für das EPISKIN[®]-Modell wurden große Schwankungen in der Lipidzusammensetzung zwischen verschiedenen Chargen festgestellt, ein Hinweis auf zu dieser Zeit noch ungenügende Standardisierung (Ponec et al., 2000). Bei allen untersuchten rekonstruierten Häuten war der Gehalt an freien Fettsäuren und Cholesterolestern niedriger als in humaner Haut. Lanosterol, das in humaner Haut nicht vorkommt, konnte in allen Modellen in signifikanten Mengen nachgewiesen werden, Di- und Triglyceride kommen im Stratum corneum vermehrt vor (Wertz et al., 1985), der Glycosphingolipidgehalt war hingegen erniedrigt (Boyce et al., 1990; Lenoir and Bernard, 1990; Ponec,

1991). Allerdings könnte das Vorkommen von Di- und Triglyceriden bei humaner Haut auf eine Kontamination mit subkutanem Fettgewebe zurückzuführen sein (Netzlaff et al., 2005).

1.3 Entwicklung von *in vitro*-Testmethoden

Zum Schutz der Gesundheit und der Umwelt erfolgen zur Beurteilung des Gefährdungspotentials und der Risikobewertung für eine Vielzahl von Stoffen und Produkten umfangreiche toxikologische Untersuchungen. Im Sinne des Verbraucher- und Arbeitsschutzes ist dabei der Nachweis der Unbedenklichkeit von zentraler Bedeutung. Gesetzliche Regelungen gelten für das In-Verkehr-Bringen neuer Pflanzenschutzmittel, Industriechemikalien, Kosmetika und Arzneimittel.

1.3.1 Rechtliche und politische Vorgaben

Bei der toxikologischen Prüfung werden nach wie vor in erheblichem Umfang Tierversuche vorgenommen. Die Weiter- und Neuentwicklung alternativer *in vitro*-Testverfahren wurde allerdings mit der Aufnahme der Staatszielbestimmung „Tierschutz“ in den Artikel 20a des Grundgesetzes im Juni 2002 durch den deutschen Gesetzgeber und durch zunehmende gesellschaftliche Bedeutung wesentlich gefördert. Die 7. Novellierung der Kosmetikverordnung der EU (76/768/EWG) von 2003 sieht ein vollständiges europaweites Verbot von Tierversuchen zur Prüfung von kosmetischen Produkten (EC, 2003a) vor. Bei der Erstellung toxikologischer Substanzprofile für Bestandteile und Bestandteilkombinationen kosmetischer Mittel dürfen ab dem Jahr 2009 ausschließlich alternative Testverfahren eingesetzt werden, ab 2013 gilt dies auch für Versuche zur Toxizität nach wiederholter Verabreichung, Reproduktionstoxizität und Toxikokinetik. Die 1998 verabschiedete EU-Biozidrichtlinie fordert ebenso eine Beschränkung von Tierversuchen auf ein Minimum (EC, 1998). Für Arzneimittel gilt das Verbot für alle Untersuchungen, für die bereits eine *in vitro*-Alternativmethode verfügbar ist (EC, 2003b).

Der Forderung nach Einsparung von Tierversuchen stehen wiederum verstärkte Bestrebungen zur Erhöhung der Sicherheit gegenüber. Das von der EU-Kommission im Jahr 2001 vorgelegte Weißbuch zur Chemikalienpolitik fasst die

Grundlagen für eine Reform zusammen. Die konkrete Umsetzung der Neuregulierung des EU-Chemikalienrechts wurde mit der Vorlage eines Gesetzentwurfs durch die EU-Kommission Ende Oktober 2003 begonnen. Kernstück ist ein umfassendes System zur Registrierung, Bewertung und Zulassung von Chemikalien für rund 30.000 Stoffe, die daher als REACH-Initiative (Registration, Evaluation and Authorisation of Chemicals) bezeichnet wurde. Diese bezweckt sowohl die Sicherstellung eines hohen Schutzniveaus für die menschliche Gesundheit und für die Umwelt als auch die Gewährleistung des freien Verkehrs von Stoffen, Zubereitungen und Erzeugnissen in der EU. Somit sollen gleichzeitig Wettbewerbsfähigkeit und Innovation verbessert, aber auch Entwicklung alternativer Beurteilungsmethoden für die von Stoffen ausgehenden Gefahren gefördert werden. Die Umsetzung und Ausgestaltung der Ziele von REACH führten erwartungsgemäß zu einem langwierigen und kontrovers geführten Gesetzgebungsverfahren. Dieses wurde mit dem Beschluss der europäischen Chemikalienverordnung durch die EU-Umweltminister Ende Dezember 2006 abgeschlossen und die REACH-Verordnung, die 40 bisherige Rechtstexte zum Chemikalienrecht zusammenfasst, ist am 1. Juli 2007 in Kraft getreten. Künftig werden damit ca. 30.000 bislang nicht erfasste Chemikalien („Altstoffe“) in einer zentralen Datenbank bei der neu gegründeten Agentur für chemische Stoffe mit Sitz in Helsinki registriert. Diese neu erfassten Chemikalien wurden bereits vor 1981 auf den Markt gebracht, und es werden jährlich mehr als 1 t produziert oder importiert. Die aus der REACH-Verordnung resultierenden erhöhten Sicherheitsanforderungen werden zwangsläufig eine erhöhte Anzahl an toxikologischen Untersuchungen nach sich ziehen (Höfer et al., 2004).

1.3.2 Verfügbarkeit von *in vitro*-Testverfahren

Eine Zunahme an toxikologischen Untersuchungen bedeutet, dass ausreichend zuverlässige, d. h. validierte Verfahren zur Verfügung stehen müssen, vor dem Hintergrund des Tierschutzes vorzugsweise *in vitro*. Das steht im Einklang mit der 2002 erhobenen Forderung des Scientific Committee on Cosmetic Products and Non-Food Products intended for Consumers (SCCP), vormals SCCNFP, den Zeitpunkt der Marktsperre für am Tier getestete Kosmetika oder

Inhaltsstoffe bis zu dem Zeitpunkt zu verschieben, an dem aussagekräftige, validierte Alternativverfahren existieren, die den vollen Schutz des Konsumenten garantieren (SCCP/0599/02, 2002). In einem weiteren Memorandum hat das SCCP auf den bisher unzulänglichen Entwicklungsstand auf dem Gebiet der Tiersersatzmethoden bereits hingewiesen und unterstreicht, dass bei einer Vielzahl in der wissenschaftlichen Literatur beschriebenen Ersatzverfahren eine formale Validierung fehlt. Den Sicherheitsanforderungen für den Verbraucher wird somit nicht genügt, insbesondere auf der Grundlage der von der OECD geforderten Kriterien (SCCP/0546/02, 2002).

Die Entwicklung, vor allem aber die Validierung neuer *in vitro*- und *in silico*-Tests als Tiersersatzmethoden, förderte bzw. fördert die Europäische Union in ihrem 5. (1998-2002) und 6. Rahmenprogramm (2002-2006). Ziel ist die internationale Anerkennung, die eine weltweite Anwendung der Methode ermöglicht. In den letzten Jahren konnte ein erheblicher Fortschritt bei dem Ersatz von Tierversuchen durch *in vitro*-Verfahren erzielt werden. Experimentelle Verfahren zur Testung von Korrosivität (Fentem, 1999; Kandárová et al., 2006b; Liebsch et al., 2000; Zuang et al., 2005), Embryotoxizität (Liebsch and Spielmann, 2002; Spielmann, 2003) und Phototoxizität (Liebsch et al., 2005; Spielmann et al., 1994; Spielmann et al., 2000) wurden entwickelt und validiert. Zudem haben die OECD sowie die Europäische Union Richtlinien niedergelegt, in denen die Prinzipien für auf RHE basierende Versuche bezüglich Hautkorrosion (OECD, 2004c) und Phototoxizität (OECD, 2004d) festgehalten sind. Die Entwicklung von tierversuchsfreien Methoden zur Prüfung auf Hautirritation (Cotovio et al., 2005; Fentem and Botham, 2002; Kandárová et al., 2004; Kandárová et al., 2005; Welss et al., 2004; Zuang et al., 2005) führte mittlerweile zur erfolgreichen Validierung einer *in vitro*-Methode mittels der RHE-Modelle EpiDerm™ und EPISKIN®, die Übertragbarkeit des Protokolls für das SkinEthic®-Modell im Rahmen einer „catch-up“-Validierungsstudie erscheint möglich (Kandárová et al., 2006a). Möglicherweise können zukünftig alternative Verfahren - als Erweiterung der OECD-Prüfrichtlinie 406 (OECD, 1992) - auch Tierversuche zur

Hautsensibilisierung ersetzen (Aeby et al., 2004; Basketter et al., 2007; Jowsey et al., 2006).

1.4 *In vitro*-Testverfahren zur perkutanen Absorption

Für die Beurteilung der von einer Substanz ausgehenden Gefahren ist die Kenntnis über das Ausmaß der in den Kreislauf gelangten Menge an aktiver Substanz erforderlich. Diese ist wesentlich von dem Applikationsweg bzw. der Exposition abhängig. Die Aufnahme von Stoffen erfolgt meist oral, ferner inhalativ oder perkutan. Vor allem bei der Exposition von Pflanzenschutzmitteln erfolgt die Aufnahme primär über die Haut, wobei ein Anteil der Haut an der Gesamtexposition von 90 % angenommen wird (Lundehn, 1992; van Ravenzwaay and Leibold, 2004). Verschiedene Berufsgruppen sind einer verstärkten Exposition von gefährlichen Substanzen ausgesetzt, die dermal absorbiert werden können. Dies ist z. B. bei der Vergiftung von Tabakbauern auf Grund der perkutanen Aufnahme von Nikotin bei der Arbeit mit nassen Tabakblättern beschrieben worden (Onuki et al., 2003). Auch eine kutane Sensibilisierung setzt eine Aufnahme in bzw. einen Durchtritt durch die Haut voraus.

Sind keine Daten über die kutane Aufnahme verfügbar, wird in der Regel im Sinne eines „worst-case“-Szenarios von einer 100%igen Aufnahme ausgegangen. Das in der REACH-Verordnung vorgesehene „tailor-made testing programm“, das ein auf die jeweilige Substanz abgestimmtes Testprozedere vorsieht (Höfer et al., 2004), berücksichtigt dabei auch die topische Applikation. Der Entwicklung von *in vitro*-Testverfahren für die perkutane Absorption kommt somit sowohl bei der Testung von Pestiziden (Navidi and Bunge, 2002) und Umweltschadstoffen (Pont et al., 2004; Riviere et al., 2003; Qiao and Riviere, 2002) als auch von Kosmetika, wie die SCCP Notes für Guidance verdeutlicht, ein hoher Stellenwert zu (SCCP, 2003; SCCP, 2006). Das gilt ferner für die Bestimmung der kutanen Penetration und Permeation von Dermatika.

1.4.1 Bestimmung der perkutanen Absorption *in vitro*

Die Bestimmung der perkutanen Absorption *in vitro* erfolgt derzeit gemäß der 2004 verabschiedeten OECD-Prüfrichtlinie 428 (OECD, 2004b), begleitet von

dem OECD Guidance Document 28 (OECD, 2003) und der 1995 verabschiedeten COLIPA-Guideline (COLIPA, 1995). Diese basieren auf der Verwendung von Human-, Schweine- und Rattenhaut. Für die Bestimmung der perkutanen Absorption *in vivo* wurde 2004 die OECD-Prüfrichtlinie 427 verabschiedet (OECD, 2004a). Die Verabschiedung dieser Richtlinien erfolgte allerdings nicht anhand formaler Validierungsstudien, sondern auf Basis einer retrospektiven Validierung von zuvor generierten Datensätzen gemäß der ECVAM-Kriterien zur Feststellung der Validität von *in vitro*-Tests (Hartung et al., 2004).

Franz-Diffusionszellen-Methode. Eine etablierte und vielseitig eingesetzte Methode zur Bestimmung der perkutanen Absorption *in vitro* ist die Bestimmung mittels der Franz-Diffusionszelle (Franz, 1975; Wagner et al., 2000) und davon abgeleitete Modifikationen. Die in der OECD-Prüfrichtlinie 428 beschriebene Methode gilt als Standardmethode (OECD, 2003).

Zwischen einer Donor- und Akzeptorkammer wird die Testmatrix fixiert (Abb. 3), der feste und dichte Verschluss kann gegebenenfalls mit einem Dichtungsring unterstützt werden. Die Oberseite der Testmatrix, also das Stratum corneum, hat Kontakt zur Luft, die dermale Seite der Haut bzw. die Stützmembran bei den Hautmodellen mit dem Akzeptormedium in der Akzeptorkammer. Als Akzeptormedium dient z. B. isotonischer Phosphatpuffer pH 7,4 (PBS). Das OECD Guidance Document 28 empfiehlt bei Testung von lipophilen Substanzen zur Löslichkeitserhöhung den Zusatz von BSA in 5 %iger Konzentration zum Akzeptormedium (OECD, 2003). In verschiedenen Untersuchungen führte allerdings dieser BSA-Zusatz zu morphologischen Schädigungen und Hemmung der Metabolisierung von Prednicarbat (Haberland et al., 2003; Haberland et al., 2006; Schreiber et al., 2005), die Notwendigkeit der Verwendung sollte daher im Einzelfall geprüft werden.

Mit Hilfe eines Wasserbads (oder alternativ eines Inkubators) kann das Akzeptormedium so temperiert werden, dass die Hautoberfläche die physiologische Temperatur von 32 ± 1 °C erreicht (OECD, 2003). Die gleichmäßige Durchmischung des Akzeptormediums wird durch einen Rührkern gewährleistet.

Um die *in vivo*-Situation so nah wie möglich abzubilden, sind konstante Sink-Bedingungen während des gesamten Versuchs erforderlich. Das Akzeptormedium muss daher für die Testsubstanz ausreichende Löslichkeit bieten. Ansonsten kann es zu Sättigungsphänomenen und signifikanter Rückdiffusion in die Haut kommen. Darüber hinaus sollte das Akzeptormedium weder auf die Barriere der Testmatrix noch auf die Analytik Einfluss haben (Howes et al., 1996).



Abb. 3: Foto einer statischen Franz-Diffusionszelle: 1 = Donordeckel (Donorkammer); 2 = Probeentnahmerohr; 3 = Klammer; 4 = Fläche zum Aufbringen der Testmatrix; 5 = Akzeptorkammer; 6 = Zufuhrrohr für den Wassermantel (Temperierung der Akzeptorkammer)

Wird das Akzeptormedium während des Permeationsversuchs nicht kontinuierlich erneuert, spricht man vom statischen Versuchsdesign. Bei dynamischen Franz-Diffusionszellen, sogenannten Durchflusszellen („flow-through“-Diffusionszellen) wird über ein Pumpsystem während des Permeationsversuchs kontinuierlich frisches Akzeptormedium zu- und „verbrauchtes“ Akzeptormedium abgeführt. Die dynamischen Franz-Diffusionszellen entsprechen der Mikrozirkulation der Haut. Sie simulieren den physiologischen Blutfluß *in vivo* (Wagner et al., 2000) und gewährleisten

konstante Sink-Bedingungen während des Versuchs. Für spezielle Fragestellungen, insbesondere bei Bestimmung der Resorption, können Durchflusszellen besser geeignet sein als statische Franz-Diffusionszellen (Wester and Maibach, 1985), meist sind aber statische und dynamische Diffusionszellen für Permeationsversuche *in vitro* gleichermaßen geeignet (OECD, 2003; Schreiber et al., 2005). Beim statischen Versuchsdesign ist allerdings eine sorgfältige Kontrolle der Gültigkeit der Sink-Bedingungen während des Versuchs (Bestimmung der Sättigungslöslichkeit der Testsubstanz im Akzeptormedium) notwendig.

Auf die Testmatrices können sowohl halbfeste als auch flüssige Zubereitungen der Testsubstanzen aufgebracht werden. In der OECD-Prüfrichtlinie 428 sind Koffein, Benzoessäure und Testosteron als Referenzsubstanzen anerkannt, da für diese bereits umfangreiche Erfahrungen in Permeationsversuchen vorliegen (OECD, 2003). Der Verschluss der Donorkammer ist variabel und kann mit einer elastischen Kunststoffolie (z. B. Parafilm™) erfolgen. Aus der Akzeptorkammer können über ein Entnahmerohr, das mit der Akzeptorkammer verbunden ist (Abb. 3), während des Versuchs Proben, z. B. mittels einer Einmalspritze, entnommen werden. Die Festlegung der Zeitpunkte für die Probenentnahmen richtet sich nach der jeweiligen getesteten Substanzformulierung bzw. Testmatrix.

Je nach Fragestellung werden Permeations- und Penetrationsversuche sowohl unter Infinite- als auch Finite-dose-Bedingungen durchgeführt. Zur Charakterisierung der Membranen unter variablen Bedingungen und/oder von verschiedenen Prüfsubstanzen eignen sich insbesondere Versuche unter Infinite-dose-Bedingungen. Die berechneten Permeationsparameter (P_{app} -Werte, lag-Zeiten, permeierte Menge in %) erlauben einen schnellen und einfachen Vergleich der Membraneigenschaften bzw. der kutanen Resorbierbarkeit einer Substanz. Gemäß der Vorgaben der OECD-Prüfrichtlinien wird für Versuche unter Infinite-dose-Bedingungen eine Substanzapplikation von $>100 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ bzw. $1 \mu\text{Ci}/\text{cm}^2$ empfohlen (COLIPA, 1995; OECD, 2003). Zur Abschätzung des von einer Substanz ausgehenden Risikos sind allerdings Finite-dose-Versuche erforderlich, die OECD-

Prüfrichtlinien empfehlen bei flüssigen Zubereitungen eine Substanzapplikation von $5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, für halb feste Zubereitungen $2 \text{mg}/\text{cm}^2$ (COLIPA, 1995; OECD, 2003). Die für die Risikoabschätzung benötigten detaillierten Informationen über die Verteilung der wiedergefundenen Substanzmenge liefert die Summe von penetrierter, permeierter und in der Donorlösung verbliebener Substanz. Die OECD-Prüfrichtlinien zur perkutanen Absorption *in vitro* fordern als Qualitätskriterium eine Wiederfindungsrate (recovery oder Massenbilanz) im Bereich von $100 \pm 10 \%$ (OECD, 2003; OECD, 2004b), doch kann auch eine Wiederfindungsrate von $100 \pm 20 \%$ akzeptabel sein, z. B. wenn auf Grund der Analytik mit höheren Substanzverlusten gerechnet werden muss.

Toxikologisch werden auch die eigentlichen Endprodukte unter Berücksichtigung der Dauer der Exposition getestet. Bleibt die Substanz *in vivo* nur eine bestimmte Zeit mit der Haut in Berührung, kann während des Versuchs das Abwaschen der Substanz von der Applikationsfläche nach einer definierten Zeit erfolgen. In einem solchen Fall wird vom „Rinse-off-mode“ gesprochen. Dieses Verfahren findet u. a. Anwendung bei der Testung von Haarfarbstoffen (Steiling et al., 2001). Bleibt die Substanz bei der üblichen Anwendung dauerhaft in Kontakt mit der Haut, wird dies auch im toxikologischen Experiment nachgestellt („leave-on-mode“).

Weitere Methoden. Neben der Methode der Franz-Diffusionszelle werden seltener auch andere Methoden zur perkutanen Absorption angewendet. Dazu gehören verschiedene Perfusionsmodelle, wie der isolierte perfundierte porcine Hautlappen (Qiao and Riviere, 2002; Riviere et al., 2003), der perfundierte Schweinevorderlauf (Mahmoud et al., 2005; Wagner et al., 2003) und das perfundierte Rindereuter (Förster et al., 1999; Kietzmann et al., 1993; Pittermann et al., 1995). Prinzipiell können Perfusionsmodelle der *in vivo*-Situation näher kommen, doch limitieren die begrenzte Lebensfähigkeit der perfundierten Organe und der höhere technische Aufwand den Einsatz insbesondere als Routinemethode (Howes et al., 1996).

Für die Beschreibung der Substanzverteilung in der Haut (Penetration) eignet sich insbesondere die „Tape-Stripping“-Methode (Weigmann et al., 2001), die auch im Saarbrücker Penetrationsmodell verwendet wird (Wagner et al., 2000).

Dabei wird nach Auftragen der Testsubstanz und anschließender Inkubation über unterschiedlich lange Zeit das Stratum corneum mittels Tesa Film[®]-Streifen Schicht für Schicht abgetragen. Die Epidermis wird darauf mit einem Gefriermikrotom parallel zur Hautoberfläche in definierte Schichten geschnitten. Nach Extraktion der zu untersuchenden Substanz aus den Tesa[®]-Strips und den Hautschnitten erfolgt die Bestimmung der Verteilung der Testsubstanz, z. B. durch HPLC (Wagner et al., 2000). Die Tape-Stripping-Methode kann auch *in vivo* angewendet werden. Für Flufenaminsäure konnte eine gute *in vitro/in vivo*-Korrelation für die Resultate, die sowohl mit der Franz-Diffusionszelle, als auch mit dem Saarbrücker Penetrationsmodell erhalten wurden, gezeigt werden (Wagner et al., 2000).

1.4.2 Testmatrices für die perkutane Absorption *in vitro*

Humane Haut. Für eine Risikoabschätzung von Substanzen bei dermalen Absorption beim Menschen müssen *in vitro*-Methoden die Penetration bzw. Permeation in und durch die menschliche Haut möglichst präzise widerspiegeln. Daher empfehlen die von der OECD verabschiedeten Prüfrichtlinien (neben tierischen Häuten) primär die Verwendung von Humanhaut (OECD, 2003; OECD, 2004b). Für die Messung der perkutanen Absorption ist vitale Haut nicht erforderlich, da die Penetration einen passiven Diffusionsprozeß darstellt (Potts et al., 1992) und das für die Barriereigenschaften entscheidende Stratum corneum eine nicht vitale Matrix ist. Die Möglichkeit der Kryokonservierung, d. h. Lagerung der Haut bei –20 °C erlaubt die wiederholte Testung an derselben Charge. Untersuchungen zur Integrität der Barriereigenschaften unter den Bedingungen der Kryokonservierung belegen eine Stabilität der Lipidzusammensetzung der Haut bei Lagerung über einen Zeitraum von bis zu 6 Monaten (Schäfer and Loth, 1996; Theobald, 1998) bzw. bis zu einem Jahr (Bronaugh et al., 1986; Harrison et al., 1984). Auf Grund möglicher irreversibler Schädigung der Barriere der Haut muss bei der Kryokonservierung unbedingt ein Auftauen und erneutes Gefrieren der Haut vermieden werden. Soll die kutane Metabolisierung untersucht werden, ist vitale Haut erforderlich.

Bei Permeations- und Penetrationsuntersuchungen *in vitro* wird sehr häufig humane Epidermis verwendet, die unter Erwärmen im Wasserbad auf 60 °C

von der Dermis getrennt wurde (Kligmann and Christophers, 1963). Daher wird diese auch als hitzeseparierte humane Epidermis (HSE) bezeichnet.

Neben der HSE werden auch Spalthaut und Vollhaut in unterschiedlichen Dicken verwendet, wobei das Schneiden in reproduzierbaren Hautdicken nicht einfach ist und sich HSE leichter handhaben lässt. Bei der Gewinnung von humaner als auch tierischer Haut ist eine oberflächliche Kontamination mit subkutanen Lipiden, die z. B. durch den Transport oder direkt beim chirurgischen Eingriff bzw. bei der Hautpräparation erfolgen kann, problematisch. Eine Lipidkontamination der Hautoberfläche kann die Barriere der Haut verändern, lässt sich aber in der Praxis nicht gänzlich vermeiden. Daher muss bei der Arbeit mit nativen Häuten darauf geachtet werden, die Kontamination der Hautoberfläche so gering wie möglich zu halten.

Die Verfügbarkeit von Humanhaut, z. B. aus chirurgischen Eingriffen, ist allerdings sehr begrenzt und kann den Bedarf, wie er im Rahmen aktueller und zukünftiger Routinetestungen (REACH) in der Toxikologie benötigt wird, bei weitem nicht decken. Dies gilt ebenso für den aktuellen Bedarf in der Forschung. Jedes Primärgewebe stellt darüber hinaus eine potentielle Infektionsquelle dar, ist doch oft der Gesundheitszustand des Spenders nicht genau bekannt. Die damit verbundenen Fragen des Arbeitsschutzes, wie auch die immer wieder gestellte Frage nach der ethischen Rechtfertigung solcher Versuche erschweren Untersuchungen an Humanhaut, besonders in der Industrie.

Tierische Häute. Tierische Häute sind im Gegensatz zur Humanhaut für Permeationsversuche hinreichend verfügbar und dienen daher häufig als Ersatz für die humane Haut. Das gilt insbesondere für die Rattenhaut, die sowohl für die Bestimmung der perkutanen Absorption *in vitro*, wie für die Abschätzung der Toxizität nach Einfach- und Mehrfachapplikation von Testsubstanzen, als auch für die Testung der perkutanen Absorption von Chemikalien und verschiedenen Testformulierungen *in vivo* verwendet wird (OECD, 2004a). Zahlreiche Untersuchungen zeigen für tierische Häute – mit Ausnahme der Schweinehaut – eine höhere Permeabilität als Humanhaut (Bartek et al., 1972; Frantz et al., 1995; Hewitt et al., 2000; Pont et al., 2004; Ramsey et al., 1994; Wester and

Maibach, 1976). Ein *in vitro/in vivo*-Vergleich von Permeationsuntersuchungen mit 8 Pflanzenschutzmitteln an Rattenhaut im Vergleich zu humaner Haut zeigte *in vitro* eine 2-3fach höhere Permeabilität als *in vivo* (Scott et al., 1992). Mögliche Ursache dafür ist ein Transport durch die Haut über einen Shunt-Weg, was eine Abnahme der Penetration von Estradiol durch follikelreiche Haut nackter Ratten nach Zerstörung der Follikel unterstreicht (Hueber et al., 1994). Somit wird deutlich, dass vergleichende Prüfungen, deren konkrete Gestaltung in einer 1999 veröffentlichten Leitlinie beschrieben wurde (de Heer et al., 1999), von Ratten- und Humanhaut notwendig sind, um verlässliche Aussagen im Bezug auf die Permeabilität treffen zu können.

Ein wesentlicher Unterschied zwischen tierischer und humaner Haut liegt insbesondere in der Dichte und Anzahl an Haarfollikeln. Da dies bei Schweinehaut geringer ausgeprägt ist, ist vor allem in der kosmetischen Industrie die Testung mit Schweinehaut etabliert (Diembeck et al., 1999; Reifenrath et al., 1989). Für Permeationsuntersuchungen wird dabei neben der Haut aus dem Flankenbereich auch die Haut des Schweineohrs eingesetzt (Chambin et al., 1993; Hoeck et al., 1994). Die Permeabilität von Schweinehaut ist geringer als bei anderen tierischen Häuten (Baynes et al., 1997; Kellner et al., 1986). Substanzanreicherungen in den Haarfollikeln und in den Furchen von Schweinehaut sind beschrieben (Kellner et al., 1986).

Rekonstruierte humane Epidermis. Die Verwendung von RHE als Testmatrix für die perkutane Absorption *in vitro* hat in den letzten Jahren stark zugenommen. Eine regulatorische Akzeptanz ist bisher nicht erfolgt, allerdings trägt die OECD der zunehmenden Bedeutung und Verwendung der RHE zur Bestimmung der perkutanen Absorption Rechnung. So wird im OECD Guidance Document 28 darauf verwiesen, dass zur Bestimmung der perkutanen Absorption prinzipiell rekonstruierte Haut verwendet werden kann, sofern die Daten aus Versuchen mit Referenzchemikalien, wie beispielsweise Testosteron oder Koffein, vergleichbare Resultate mit publizierten Daten ergeben (OECD, 2003). Vor dem Hintergrund des 5. Rahmenprogramms der Europäischen Union zur Förderung der Entwicklung von *in vitro*-Tierersatzmethoden erfolgten erste Untersuchungen zur Charakterisierung der perkutanen Absorption der

RHE im Vergleich zur humanen Haut anhand verschiedener Referenzsubstanzen (Dreher et al., 2002a; Dreher et al., 2002b; Lotte et al., 2002). Mit dem SkinEthic[®]-, EpiDerm[™]- und EPISKIN[®]-Modell wurden Permeations- und Penetrationsuntersuchungen mit Laurylsäure, Koffein und Mannitol im Vergleich zur humanen Haut vorgenommen. Alle Testsubstanzen wiesen dabei sowohl für die RHE als auch für Humanhaut in Bezug auf die Permeabilität die gleiche Rangfolge auf, am besten permeierte Laurylsäure. Die Permeationsdaten, die mit der RHE erhalten wurden, zeigten eine niedrigere Variabilität als die mit Humanhaut erhobenen Daten. In Abhängigkeit von der Lipophilie und den physikochemischen Eigenschaften der Substanzen war bei den getesteten Epidermismodellen die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse innerhalb einer Charge größer als zwischen verschiedenen Chargen (Lotte et al., 2002). Die Ergebnisse von Lotte et al. werden durch weitere Untersuchungen für das EPISKIN[®]- und EpiDerm[™]-Modell mit Koffein und alpha-Tocopherol bestätigt. Wieder erwiesen sich die RHE-Modelle permeabler als exzidierte humane Haut. Mit Ausnahme der Alkohol enthaltenden Vehikel konnte bezüglich der Permeabilität die gleiche Rangordnung bei den untersuchten Formulierungen gezeigt werden (Dreher et al., 2002a). Zusätzlich wurden für beide Modelle die höhere Permeation von Mannitol durch humane Haut bestätigt (Dreher et al., 2002b). Auch Permeationsuntersuchungen von Terbinafin, Clotrimazol, Hydrocortison und Salicylsäure durch das SkinEthic[®]-Modell sowie dem Graftskin[™] LSE-Modell bestätigten mit Ausnahme der Salicylsäure, die vergleichbare Permeationsdaten lieferte, die höhere Permeabilität der RHE im Vergleich zur humanen Haut (Schmook et al., 2001). Erste Untersuchungen mit insgesamt 7 beteiligten Laboren gemäß der in den OECD-Prüfrichtlinien vorgeschlagenen Referenzsubstanzen Benzoesäure, Koffein und Testosteron mit dem SkinEthic[®]-Modell zeigten eine geringe Interlaborvariabilität und hohe Reproduzierbarkeit der Permeationsdaten (Heylings et al., 1998). Dagegen war die in einem internationalen Ringversuch in 10 unabhängigen Labors mit den gleichen Substanzen an Human- und Rattenhaut bestimmte Intra- und Interlaborvariabilität hoch (van de Sandt et al., 2004).

Außer zur Charakterisierung der Barriere bzw. Permeabilität diente das SkinEthic[®]-Modell zur Untersuchung der Permeation (z. B. von Estradiol) im Vergleich mit dem perfundierten Schweinevorderlauf (Mahmoud et al., 2005). Ferner wurden an diesem Hautmodell der Einfluss von Albumin auf die Permeation sowie der Metabolismus von Glukokortikoiden untersucht (Gysler et al., 1997; Haberland et al., 2003), aber auch Arzneistoffträgersysteme verglichen (Doucet et al., 1998; Münster et al., 2005; Santos Maia et al., 2002; Sivaramakrishnan et al., 2004). Ähnliche Versuche erfolgten am EpiDerm[™]-Modell mit Flufenaminsäure (Zghoul et al., 2001) und Prednicarbat (Lombardi Borgia et al., 2008).

1.5 Zielsetzung und Aufbau der Arbeit

Ziel dieser Arbeit ist die Charakterisierung und Qualifizierung der drei RHE-Modelle EpiDerm[™], SkinEthic[®] und EPISKIN[®] für die perkutane Absorption *in vitro*. Kommerziell verfügbare RHE-Modelle sind eine vielversprechende Alternative zu Human- und Schweinehaut, sind diese doch für die Prüfung auf Korrosion und Irritation sowie als vergleichende Untersuchung auf Phototoxizität etabliert. Daher bietet eine Etablierung der RHE für Permeationsversuche die Möglichkeit, unterschiedliche Fragestellungen an derselben Testmatrix zu prüfen. Die Arbeit erfolgte im Rahmen eines vom Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) geförderten Verbundprojekts unter der Projektleitung der FU in enger Zusammenarbeit mit Partnern aus Universitäten/Instituten (LMU, US, TiHo, TUB, IGB) Industrie (BASF, BDF, ACB) und der ZEBET (unabhängige statistische Datenauswertung und -zusammen mit der Cognis GmbH - Projektberatung). Um eine Akzeptanz durch die OECD zu erreichen, sollte mittels einer standardisierten und validierten *in vitro*-Testmethode zur perkutanen Absorption unter Verwendung von RHE der im OECD Guidance Document 28 geforderte Nachweis der Vergleichbarkeit der Aufnahme bei der Testung an Hautmodellen und bei Humanhaut oder tierischen Häuten sowie die Konsistenz mit publizierten Daten erbracht werden.

Der Aufbau dieser Arbeit bzw. des Verbundprojekts folgte den Empfehlungen der ECVAM (Hartung et al., 2004) und der OECD (OECD, 2007; OECD, 2005) zur formalen Validierung einer Testmethode.

Methoden- und Protokollentwicklung. Basierend auf den Vorgaben des OECD Guidance Document 28 galt es zu Beginn des Projekts die erforderlichen Qualitätskriterien für ein standardisiertes Protokoll zu definieren, d. h. methodisch bedingte Einflussgrößen auf die Permeation zu erfassen. Eigene Untersuchungen erfolgten zum Einfluss unterschiedlicher Rührgeschwindigkeiten des Akzeptormediums auf die Permeation. Da PBS als Donor- und Akzeptormedium auch für lipophile Testsubstanzen eingesetzt werden sollte, bildeten die Untersuchung des Einflusses des Lösungsvermittlers Igepal[®] CA-630 auf die Permeation sowie auf die Viabilität der Testhäute (RHE sowie Human- und Schweinehaut) einen weiteren Schwerpunkt in der ersten Phase der Arbeit. Um Alternativen in der Hautvorbereitung und Analytik zulassen zu können, wurden ferner zwei Methoden zur Spalthautgewinnung sowie der Analytik von Testosteron mittels LSC und HPLC verglichen. Der erreichte Grad an Standardisierung der Permeationsmethode wurde anhand eines Ringversuchs an einer nicht-biologischen standardisierten Membran geprüft.

Protokolltransfer. Die erfolgreiche Übertragbarkeit des Protokolls auf alle beteiligten Labore erfolgte mit Parallelversuchen (eigene Untersuchungen mit Testosteron) an HSE, Schweinespalthaut sowie den RHE-Modellen EpiDerm[™] und SkinEthic[®]. Abweichungen in den Permeationsergebnissen mit Testosteron an Schweinehaut zeigten die notwendigen Verfeinerungen des Protokolls.

Prävalidierung. Die Erhöhung der Anzahl der an den Parallelversuchen beteiligten Labore in der Phase der Prävalidierung („protocol performance“) diente einer ersten Analyse der Permeabilität der RHE sowie einer ersten Abschätzung der Intra- und Interlaborvariabilität. Auf dieser Basis wurde die abschließende Verfeinerung des Protokolls für die Validierung vorgenommen.

Validierung. Zur präzisen Bestimmung der Permeabilität von RHE, Human- und Schweinehaut, und um gleichzeitig eine breite Anwendbarkeit der Methode zu belegen, wurden zur Validierung insgesamt neun Substanzen

unterschiedlicher Lipo- und Hydrophilie und Molekulargewicht eingesetzt sowie weitere Labore beteiligt. Der Datenanalyse dienten die von der TiHo in Zusammenarbeit mit der ZEBET entwickelten standardisierten Auswertalgorithmen. Eigene Ergebnisse wurden zusammen mit den Ergebnissen der Partner gemeinsam bewertet.

Um den Anforderungen der Toxikologie zu genügen, galt es schließlich, die Einsatzmöglichkeit der Methode und der RHE unter Finite-dose-Bedingungen zu belegen. Dies erfolgte für Koffein und Testosteron (je 2 Konzentrationen) mit HSE und Schweinehaut sowie exemplarisch an einer RHE (EpiDerm™).