

3 Ergebnisse

3.1 Methoden- und Protokollentwicklung

3.1.1 Standardisierung des Rührprozesses

Anhand einer von der TiHo definierten Methode wurde zunächst der Einfluss der Rührgeschwindigkeit auf die Permeation untersucht. Die Durchführung erfolgte, wie in 2.2.1 beschrieben, unter Infinite-dose-Bedingungen. Für den Donor diente eine 1 %ige wässrige Methylenblaulösung (1 mg/mL), Aqua dem. wurde im Akzeptormedium verwendet. Durch den Einsatz einer nicht-biologischen Dialysemembran als Barriere konnten barrierebedingte Einflussgrößen auf die Permeation ausgeschlossen werden. Untersucht wurde im Rahmen eigener Untersuchungen die Permeation von Methylenblau unter drei unterschiedlichen Rührgeschwindigkeiten, bei 400, 500 und 600 rpm. Da ferner in folgenden eigenen Versuchen der Einfluss der Membrandicke auf die Permeation gezeigt werden sollte, wurde die doppelte Membrandicke verwendet. Wie Abb. 5 zeigt, nimmt mit steigender Drehzahl die Permeation deutlich zu.

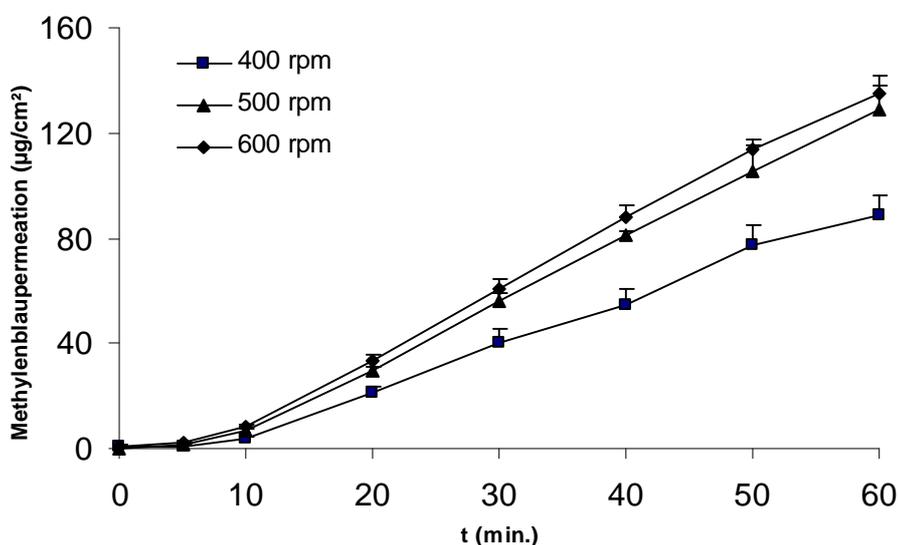


Abb. 5: Einfluss der Rührgeschwindigkeit auf die Permeation von Methylenblau aus einer 1 %igen wässrigen Lösung (1 mg/mL, Donorlösung) in Aqua dem. (Akzeptormedium) durch eine Dialysemembran (doppelte Dicke).

Ein weiteres Experiment, unter gleichen Bedingungen wie zuvor beschrieben, belegte zudem den Einfluss der Membrandicke auf die Permeation (Abb. 6). So sank bei Einspannen der doppelten Dialysemembran der P_{app} -Wert von $5,91 \times 10^{-5} \text{ cm/s}$ auf $4,12 \times 10^{-5} \text{ cm/s}$.

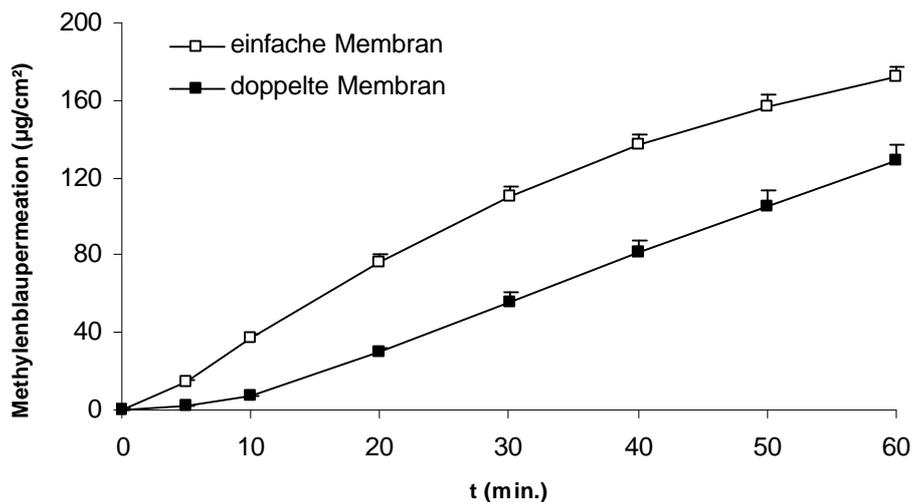


Abb. 6: Einfluss der Membrandicke der Barriere (Dialysemembran) auf die Permeation von Methyleneblau aus einer 1%igen Lösung (1 mg/mL) in Aqua dem. mit einfacher (\square) und doppelter Dialysemembran (\blacksquare). Als Akzeptormedium diente Aqua dem. Die Rührgeschwindigkeit betrug 500 rpm.

Zur Sicherstellung der hohen Standardisierung der Versuchsbedingungen und zur experimentellen Überprüfung des erreichten Standardisierungsgrads wurden dieselben Tests mit Methyleneblau von den Partnern durchgeführt. Als Rührgeschwindigkeit wurde 500 rpm festgelegt.

Wie Tab. 12 zeigt wichen die P_{app} -Werte nur sehr geringfügig voneinander ab. Ein hoher Standardisierungsgrad konnte erreicht werden.

Tab. 12: Zusammenfassung der P_{app} -Werte des Ringversuchs mit 1%iger Methyleneblaulösung (1 mg/mL); Dialysemembran: einfache Dicke; Rührgeschwindigkeit: 500 rpm; Das Ergebnis aus eigenen Untersuchungen ist im **Fettdruck** gekennzeichnet.

	US	TiHo	FU	LMU	ACB
$P_{app} (MW \pm s_{rel})$ ($\times 10^{-5} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$)	5,85 \pm 1,6 %	5,92 \pm 4,2 %	5,91 \pm 4,7 %	5,77 \pm 5,3 %	4,60 \pm 8,9 %

3.1.2 Zusammensetzung von Donor- und Akzeptormedien

Einfluss von Igepal® CA-630 auf die Permeation und Viabilität der Testhäute. Voruntersuchungen zur Löslichkeit von Testosteron von ACB hatten für die Arbeit mit wässrigen Lösungen die Notwendigkeit des Einsatzes eines Lösungsvermittlers aufgezeigt. Um den Einfluss des Löslichkeitsvermittlers Igepal® CA-630 auf die Permeation sowie auf die Viabilität der Häute zu charakterisieren, wurden Untersuchungen mit einer 0,004 %igen (40 µg/mL) Testosteron-Lösung an RHE (EpiDerm™) unter Zusatz verschiedener Konzentrationen von Igepal® CA-630 im Donor- und Akzeptormedium durchgeführt. Die Untersuchungen erfolgten in Zusammenhang von vergleichbaren Permeationsversuchen mit Koffein (Schreiber et al., 2005). Die Ergebnisse zeigten für das lipophile Testosteron eine Erhöhung der Permeation bei Zusatz von Igepal® CA-630 im Donormedium (Abb. 7).

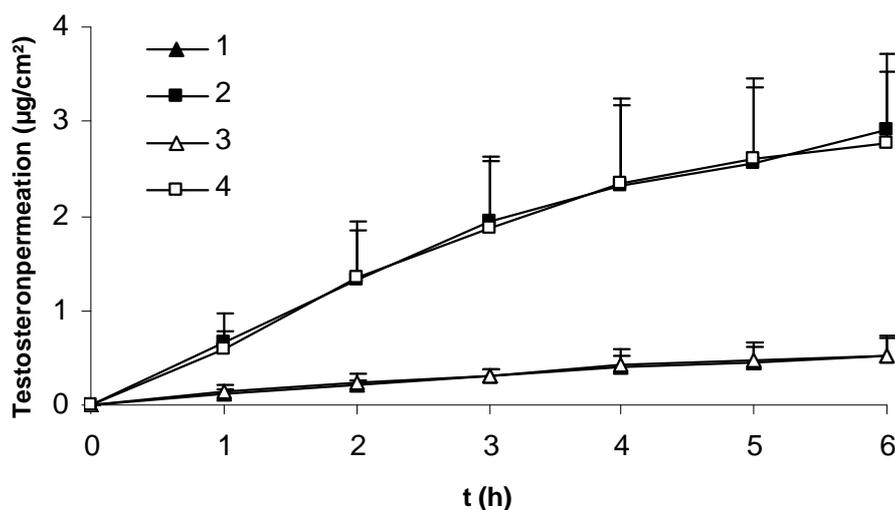


Abb. 7: Einfluss des Zusatzes von Igepal® CA-630 zum Akzeptor- bzw. Donormedium auf die Permeation von Testosteron (0,004 %ig, 40 µg/mL) durch die RHE EpiDerm™.

- 1: Donor: Miglyol® 812/EtOH 90:10 (v/v), Akzeptor: PBS
- 2: Donor: PBS + 2 % (v/v) Igepal® CA-630, Akzeptor: PBS
- 3: Donor: Miglyol® 812/EtOH 90:10 (v/v), Akzeptor: PBS + 0,5 % (v/v) Igepal® CA-630
- 4: Donor: PBS + 2 % (v/v), Akzeptor: PBS + 0,5 % (v/v) Igepal® CA-630

Dieser Effekt ist der Mizellbildung des Löslichkeitsvermittlers geschuldet. Eines Einflusses von Igepal® CA-630 auf die Barriere der Kunsthaut bedurfte es zur Erklärung nicht, zumal in den Experimenten mit dem gut löslichen und gut

permeablen Koffein keine Zunahme der Permeation auftrat (Schreiber et al., 2005). Der Zusatz von 0,5 % (v/v) Igepal[®] CA-630 im Akzeptormedium beeinflusste die Permeation von Testosteron nicht, ebenso bei Koffein (Schreiber et al., 2005).

Die im Anschluss an die Versuche durchgeführten MTT-Tests zur Prüfung der Viabilität der Häute zeigten Schädigungen der Kunsthäute, die z. T. bereits makroskopisch sichtbar waren. Der Zusatz von Igepal[®] CA-630 zum Akzeptormedium wirkte stärker toxisch als der Zusatz zum Donormedium, was durch die Schutzfunktion der Hornschichtbarriere zu erklären ist (Schreiber et al., 2005).

Die Ergebnisse rechtfertigten den weiteren Einsatz von Igepal[®] CA-630. Bei Versuchen mit Koffein wurde gänzlich auf einen Zusatz von Igepal[®] CA-630 verzichtet. Für Testosteron wurde der Zusatz von 2 % (v/v) Igepal[®] CA-630 zum Donormedium beibehalten, auf einen Zusatz zum Akzeptormedium aber verzichtet.

3.1.3 Methodenvergleich: Spalthautgewinnung

Die Spalthautgewinnung (Schweine- und Euterhaut) erfolgte im Rahmen dieser Arbeit ausschließlich mit einem Dermatome. Da von der TiHo bis zur Prävalidierung ein Gefriermikrotom zur Spalthautgewinnung verwendet wurde, erfolgten Untersuchungen zur Prüfung auf Vergleichbarkeit der Resultate. Durchgeführt wurden die Experimente an Schweinehaut desselben Tieres von insgesamt 3 Spendertieren. Die Haut wurde von der TiHo mit einem Gefriermikrotom auf die definierte Hautdicke ($1000 \pm 100 \mu\text{m}$) geschnitten und aliquotiert. Die aliquotierten Hautstücke wurden zusammen mit nativer Haut derselben Tiere auf Trockeneis an die FU versendet, mit einem Dermatome geschnitten ($1000 \pm 100 \mu\text{m}$) und im Versuch eingesetzt. Als Testlösung diente eine 0,004 %ige ($40 \mu\text{g/mL}$) Lösung von Testosteron in PBS + 2 % (v/v) Igepal[®] CA-630 (radioaktiv markiert). Als Akzeptormedium wurde PBS eingesetzt.

Die Ergebnisse zeigten eine sehr gute Übereinstimmung der Permeation von Testosteron mit beiden Methoden der Spalthautgewinnung (Abb. 8). Auch die Bestimmung der Hautdicken vor Versuchsbeginn mittels eines Mikrometers

bestätigte konstante und reproduzierbare Hautdicken im definierten Bereich von $1000 \pm 100 \mu\text{m}$.

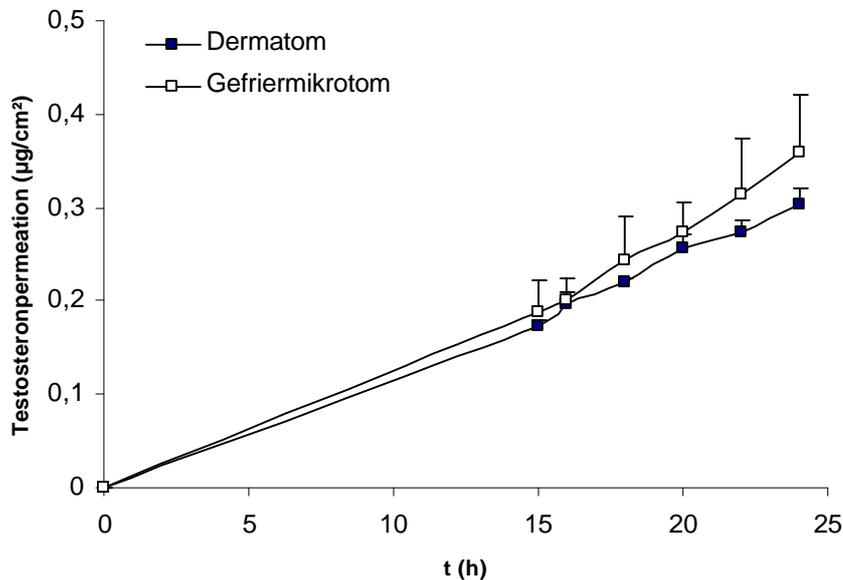


Abb. 8: Spalthautgewinnung (Schweinehaut: $1000 \pm 100 \mu\text{m}$) mittels Dermatom (■) und Gefriermikrotom (□). Getestet wurde eine 0,004 %ige Testosteron-Lösung in PBS + 2 % (v/v) Igepal[®] CA-630. Als Akzeptor diente PBS; Analytik: LSC

Beide Methoden eignen sich demnach zur Gewinnung von Spalthaut mit reproduzierbarer Hautdicke. Aus Gründen der effektiven Standardisierung und Vereinheitlichung der Methodik wurde für die Validierung auf die Spalthautgewinnung mittels Gefriermikrotom verzichtet.

3.1.4 Methodenvergleich: Testosteronanalytik

Anhand paralleler Tests von radioaktiv und nicht-radioaktiv markierten Testlösungen von 0,004 % Testosteron in PBS + 2 % (v/v) Igepal[®] CA-630 an Schweinespalthaut ($1000 \pm 100 \mu\text{m}$) desselben Spendertiers (insgesamt 3 Spendertiere) sollte geprüft werden, ob die analytische Quantifizierung von Testosteron mit HPLC und LSC zu gleichen Ergebnissen führt. Die LSC-Analytik erfolgte im Anschluss an die Versuche, für die HPLC-Analytik wurden die Proben nach dem Versuch bei -20°C eingefroren und auf Trockeneis zur ACB gesandt. Die Ergebnisse zeigen eine sehr gute Übereinstimmung der Testosteronpermeation bei beiden analytischen Methoden (Abb. 9).

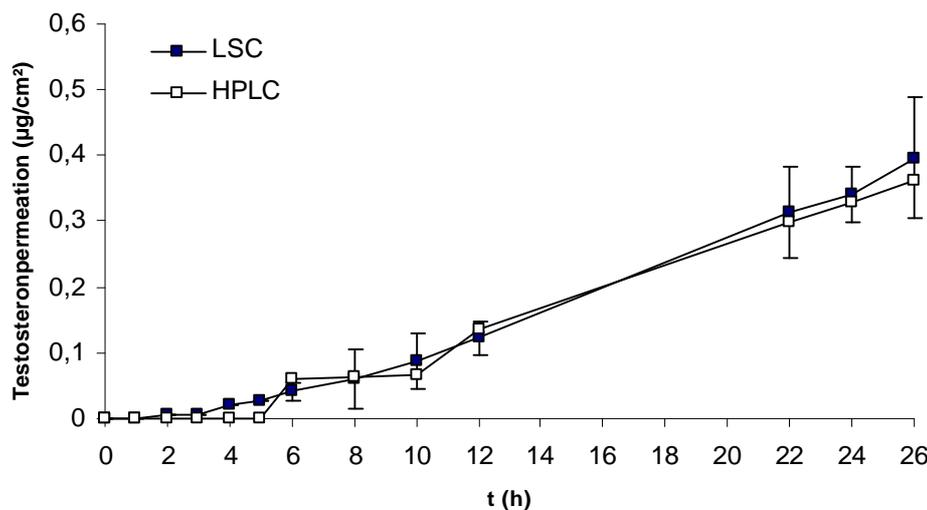


Abb. 9: Quantifizierung von Testosteron mittels LSC (■) und HPLC (□). Die HPLC-Analytik wurde von ACB vorgenommen. Getestet wurde eine radioaktiv und nicht-radioaktiv markierte 0,004 %ige Testosteronlösung in PBS + 2 % (v/v) Igepal® CA-630 an Schweinehaut von insgesamt drei Spendertieren. Als Akzeptor diente PBS.

Die Unterschiede im Permeationsverlauf bis ungefähr 10 h waren durch unterschiedliche Quantifizierungsgrenzen begründet. Somit konnte angenommen werden, dass die analytische Methode keinen relevanten Einfluss auf die Permeationsparameter von Testosteron hat. Beide analytischen Methoden wurden daher alternativ eingesetzt.

3.1.5 Ergebnisse der Partner aus der Methodenentwicklung

Im Folgenden sind die Ergebnisse der Partner im Rahmen der Methodenentwicklung kurz zusammengefasst:

- Untersuchungen an statischen und dynamischen Franz-Diffusionszellen führten zu gleichen Resultaten. Wie zu erwarten, erhöhte der Zusatz von Albumin zum Akzeptormedium die Permeation des lipophilen Testosterons (Schreiber et al., 2005).
- Kryokonservierte und frische Haut sind gleichermaßen für Permeationsuntersuchungen geeignet (Schreiber, 2006).
- Untersuchungen an porciner Rücken- und Bauchhaut zeigten, dass eine Standardisierung der Entnahmeregion von Schweinehaut erforderlich ist, da vermutlich Unterschiede in der Ausprägung des Stratum corneum vorliegen (Schreiber et al., 2005).

- Die Lipidmuster humaner Haut (Cholesterol, Cholesterolester, Fettsäuren, Triglyceride, Ceramide) wurden weder durch 24 h Inkubation mit PBS in der Franzzelle, noch durch 6 Monate Kryokonservierung (Lagerung) verändert. Damit ist eine wichtige Grundvoraussetzung, die Stabilität des humanen Hautmaterials, erfüllt (Netzlaff, 2007).
- Zum Nachweis der Integrität der Haut und Hautmodelle erwies sich der transepidermale Wasserverlust als ungeeignet (Netzlaff et al., 2006a).
- Gewebefeinstruktur (Histologie) und Viabilität (MTT-Test) korrelierten nicht und waren auch nicht prädiktiv für die Permeation von Koffein und Testosteron. Histologie und MTT-Test erfassen somit die Barrierefunktion bzw. eine Schädigung derselben nur unzureichend (Schreiber et al., 2005).

3.2 Protokolltransfer

Die Ergebnisse des Protokolltransfers, der die Übertragbarkeit und Verlässlichkeit des Protokolls unter den definierten Prüfbedingungen zeigen sollte, sind in den Tab. 13 und 14 zusammengefasst. Für die FU erfolgten im Rahmen dieser Arbeit Untersuchungen mit Testosteron. Von den Partnern wurden Untersuchungen mit Koffein und auch erste Versuche mit Benzoesäure durchgeführt, die erst in der Validierung weitergeführt wurden.

Für Testosteron wurde ein erster Parallelversuch mit ACB an derselben Spalthaut eines Spendertiers zur Prüfung der Reproduzierbarkeit der Testmethode in den beiden Labors vorgenommen. (Ein weiterer Parallelversuch wurde mit Koffein an der FU und der US durchgeführt.) Die Ergebnisse zeigten deutliche Abweichungen in der Testosteronpermeation, die nicht durch die Analytik verursacht wurden (Abb. 10). Die Ursache der Abweichungen konnte nicht abschließend geklärt werden. Das Ausmaß der Streuungen der Resultate von ACB im Vergleich zu Versuchen, die im weiteren Verlauf des Projektes mit Testosteron an Schweinehaut durchgeführt wurden, lassen allerdings darauf schließen, dass die Barriere der von ACB verwendeten Schweinehaut möglicherweise Transport-bedingt geschädigt war. Bereits ein leichtes Antauen der Haut kann zu Schädigung der Barriere führen. Der Ringversuch mit Koffein

3 Ergebnisse

ergab hingegen eine sehr gute Übereinstimmung der Permeationsverläufe (Schreiber et al., 2005). Als Ergebnis der Ringversuche wurden die Arbeitsbedingungen bei der Arbeit mit lipophilen Substanzen und tierischer Haut weiter standardisiert. So erfolgte fortan eine halbstündige Hydratisierung der Schweinehaut vor Versuchsbeginn im jeweiligen Akzeptormedium. Zusätzlich wurde der Hautdickenbereich für die Arbeit mit Schweinehaut auf $1000 \pm 100 \mu\text{m}$ verbindlich festgelegt.

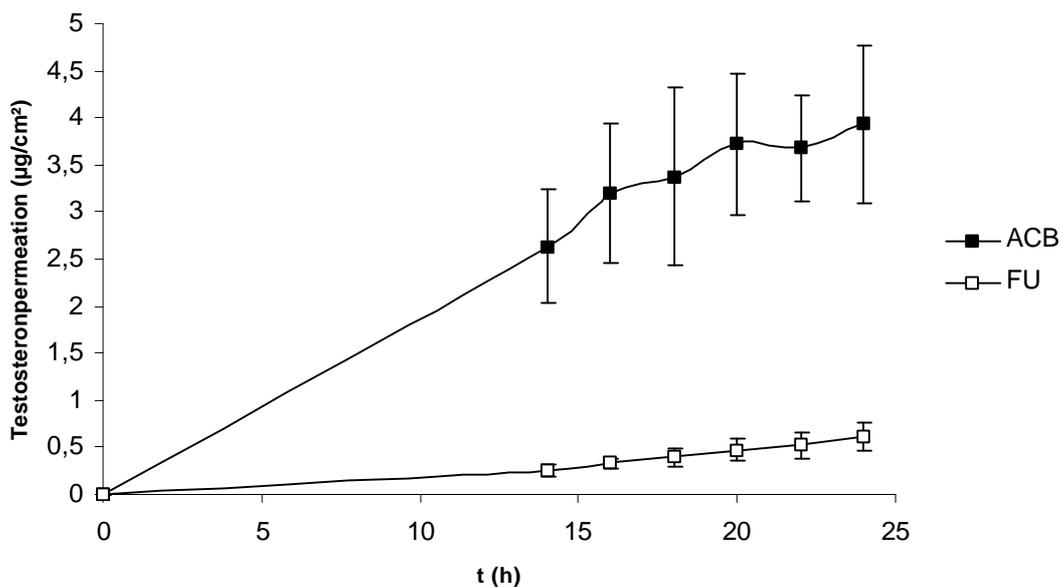


Abb. 10: Deutliche Abweichungen der Testosteronpermeation im Ringversuch FU (□) und ACB (■): Appliziert wurde eine 0,004 %ige Testosteron-Lösung in PBS + 2 % (v/v,%) Igepal® CA-630 bei Einsatz von Schweinespalthaut eines Spenertiers.

Aufbauend auf diesen Ergebnissen erfolgten ferner weitere Ringversuche zur Permeation von Testosteron (0,004 %ige Lösung in PBS + 2 % (v/v) Igepal® CA-630) und Koffein (1 %ige bzw. 0,1 %ige Lösung in PBS) an humaner und tierischer Haut, sowie an EpiDerm™ und SkinEthic®. Als Akzeptor diente PBS. Mit Ausnahme der Versuche mit SkinEthic® erfolgten die Versuche parallel in jeweils zwei Laboren an mindestens drei Häuten unterschiedlicher Spender (HSE und Schweinehaut) bzw. Chargen an RHE. Bestimmt wurden der scheinbare Permeabilitätskoeffizient P_{app} (Tab. 13) sowie die Gesamtaufnahme (Tab. 14). Auf Grund von unterschiedlichen Schwankungen der Varianz und zur besseren Charakterisierung der Permeation wurden neben dem P_{app} -Wert auch

die permeierten Mengen beurteilt. Mit Benzoesäure (0,1 %ige Lösung in PBS) wurden erste orientierende Versuche mit HSE, Schweine- und Euterhaut vorgenommen.

Tab. 13: P_{app} -Werte von Testosteron (0,004 %ig in PBS + 2 % Igepal CA-630) und Koffein (1 %ig bzw. 0,1 %ig in PBS) durch humane und tierische Haut sowie durch RHE unter den Prüfbedingungen des Protokolltransfers. Die Ergebnisse aus den eigenen Untersuchungen sind im **Fettdruck** gekennzeichnet.

Testhaut	Koffein		Testosteron	
	P_{app} [cm/s]	relativ zu HSE	P_{app} [cm/s]	relativ zu HSE
HSE	$2,1 \times 10^{-8}$ (FU) 14×10^{-8} (US) $8,05 \times 10^{-8}$ (Ø)	1	$2,6 \cdot 10^{-7}$ (FU) $2,1 \times 10^{-7}$ (US) $2,35 \times 10^{-7}$ (Ø)	1
Schweinehaut	$8,8 \times 10^{-8}$ (FU) $3,5 \times 10^{-8}$ (TiHo) $6,15 \times 10^{-8}$ (Ø)	0,76	$3,15 \cdot 10^{-7}$ (FU) $2,2 \times 10^{-7}$ (TiHo) $8,62 \times 10^{-7}$ (ACB) $4,65 \times 10^{-7}$ (Ø)	1,98
Euterhaut	31×10^{-8} (TiHo) 58×10^{-8} (ACB) $44,5 \times 10^{-8}$ (Ø)	5,5	12×10^{-7} (TiHo) $3,8 \times 10^{-7}$ (ACB) $7,9 \times 10^{-7}$ (Ø)	3,4
EpiDerm[®]	49×10^{-8} (FU) $70,2 \times 10^{-8}$ (LMU) $59,6 \times 10^{-8}$ (Ø)	7,4	$34 \cdot 10^{-7}$ (FU) 35×10^{-7} (LMU) $34,5 \times 10^{-7}$ (Ø)	14,7
SkinEthic[®]	216×10^{-8} (FU)	26,8	$59 \cdot 10^{-7}$ (FU)	25,1

Die Ergebnisse aus dem Protokolltransfer ließen erste Tendenzen für Unterschiede in der Permeation von Human- bzw. Schweinehaut und den RHE erkennen, wie eine höhere Permeabilität der RHE. Bei SkinEthic[®] war die Permeation für beide Substanzen am höchsten, für Koffein (P_{app} : 216×10^{-8} cm/s) bis zu 27fach und für Testosteron (P_{app} : 59×10^{-7} cm/s) bis zu 25fach höher als bei HSE (P_{app} : $8,05 \times 10^{-8}$ bzw. $2,35 \times 10^{-7}$ cm/s). EpiDerm[™] war für Testosteron bis zu 15fach (P_{app} : $34,5 \times 10^{-7}$ cm/s) und für Koffein 7fach (P_{app} : $59,6 \times 10^{-8}$ cm/s) permeabler als HSE (Tab. 13). Die Permeabilität von Schweinehaut im Vergleich zur HSE war dahingegen ähnlich, Euterhaut für Koffein etwa 6fach und für Testosteron etwa 3fach permeabler. Die Ergebnisse deuteten auf eine geringere Variabilität der an RHE erhobenen Permeationsparameter als an humaner Epidermis und tierischer Haut

gewonnener Resultate hin (Tab. 14).

Tab. 14: Permeation ($[\mu\text{g}/\text{cm}^2]$; $\text{MW} \pm \text{SD}$) von Koffein- (1 %ig bzw. 0,1 %ig in PBS), Testosteron- (0,004 %ig in PBS + 2 % Igepal CA-630) und Benzoesäurelösungen (0,1 %ig in PBS) nach 24 h durch humane und tierische Haut sowie nach 6 h durch RHE unter den Prüfbedingungen des Protokolltransfers. Die Ergebnisse aus den eigenen Untersuchungen sind im **Fettdruck** gekennzeichnet.

Substanz	Testhaut	Labor				
		FU	US	TiHo	ACB	LMU
Koffein	HSE	4,0 ± 2,7	33,0 ± 49,1	—	—	7,1 ± 4,7
	Schweinehaut	4,2 ± 4,5	—	5,6 ± 3,6*	—	—
	Euterhaut	—	—	61,8 ± 7,6*	40,7 ± 19,0	—
	SkinEthic ^â	37,5 ± 8,6	—	97,7 ± 30,0	—	—
	EpiDerm ^o	5,8 ± 3,2	—	—	—	4,3 ± 2,8
	EPISKIN ^â	—	50,2 ± 10,3	—	52,1 ± 11,0	—
Testosteron	HSE	0,7 ± 0,3	1,9 ± 2,2	—	—	1,4 ± 0,5
	Schweinehaut	0,2 ± 0,02	—	0,2 ± 0,1	—	—
	Euterhaut	—	—	1,7 ± 0,3	0,2 ± 0,2	—
	SkinEthic ^â	4,3 ± 0,6	—	—	—	—
	EpiDerm ^o	3,0 ± 0,0	—	—	—	2,3 ± 1,0
	EPISKIN ^â	—	1,9 ± 0,4	—	1,3 ± 0,3	—
Benzoesäure	HSE	—	10,4 ± 7,1	—	—	—
	Schweinehaut	—	—	1,1 ± 0,9	—	—
	Euterhaut	—	—	18,9 ± 3,8	7,4 ± 1,7	—

— = für den Protokolltransfer nicht vorgesehen

* 1 %ig

In den Versuchen mit Benzoesäure traten Probleme im Permeationsverlauf nach 6 h auf, verursacht durch eine rapide Abnahme an permeierter Benzoesäure im Akzeptormedium, die ein steiles Abfallen der Permeationskurve zur Folge hatte. Da zunächst eine Verschiebung des pH-

Wertes des Akzeptors (PBS, pH 7,4) als mögliche Ursache vermutet wurde, wurde bei Versuchen mit Benzoesäure zukünftig ein PBS-Puffer mit 4fach höherer Pufferkapazität als Akzeptor verwendet.

An die spezifischen Bedürfnisse der einzelnen Labors angepasste Spreadsheets (ZEBET) ermöglichten eine problemlose Dokumentation. Im Folgenden wurden die Spreadsheets für die reproduzierbare und automatisierte Auswertung der Daten weiterentwickelt, wie einer automatisierten Erstellung der P_{app} -Werte. Das Protokoll wurde erfolgreich übertragen und die Verlässlichkeit gezeigt. Basierend auf den Ergebnissen des Protokolltransfers wurden für die Phase der Prävalidierung erforderliche Verfeinerungen des Protokolls in Diskussion mit allen Projektpartnern vorgenommen (Tab. 17, s. S. 78).

3.3 Prävalidierung

In der Prävalidierung wurden die Permeationsversuche mit Koffein und Testosteron als Referenzsubstanzen niedriger und hoher Lipophilie fortgesetzt. Im Rahmen dieser Arbeit erfolgten die Untersuchungen der FU für Testosteron. Donor- und Akzeptormedien für Testosteron und Koffein blieben unverändert.

Von ACB wurden die Sättigungslöslichkeiten von Koffein und Testosteron im Akzeptormedium (PBS) bestimmt, die als Grundlage zur Beurteilung der konstanten Sink-Bedingungen während der Versuche dienen. Für Koffein war die höchste gemessene Konzentration im Akzeptormedium $10,8 \mu\text{g/mL}$, $0,04 \%$ der Sättigungslöslichkeit von Koffein in PBS (c_s : $31,08 \text{ mg/mL}$, pH 7,4) entsprechend und für Testosteron $0,6556 \mu\text{g/mL}$, $2,09 \%$ der Sättigungslöslichkeit von Testosteron in PBS (c_s : $31,31 \mu\text{g/mL}$, pH 7,4) entsprechend. Somit sind Sink-Bedingungen gewährleistet.

Abb. 11 stellt die mittlere Koffein- und Abb. 12 die mittlere Testosteronpermeation dar, die von den an der Prävalidierung beteiligten Partnerlaboren ermittelt wurden. Die Versuche wurden analog zum Protokolltransfer in zwei, für HSE in drei Laboren parallel durchgeführt.

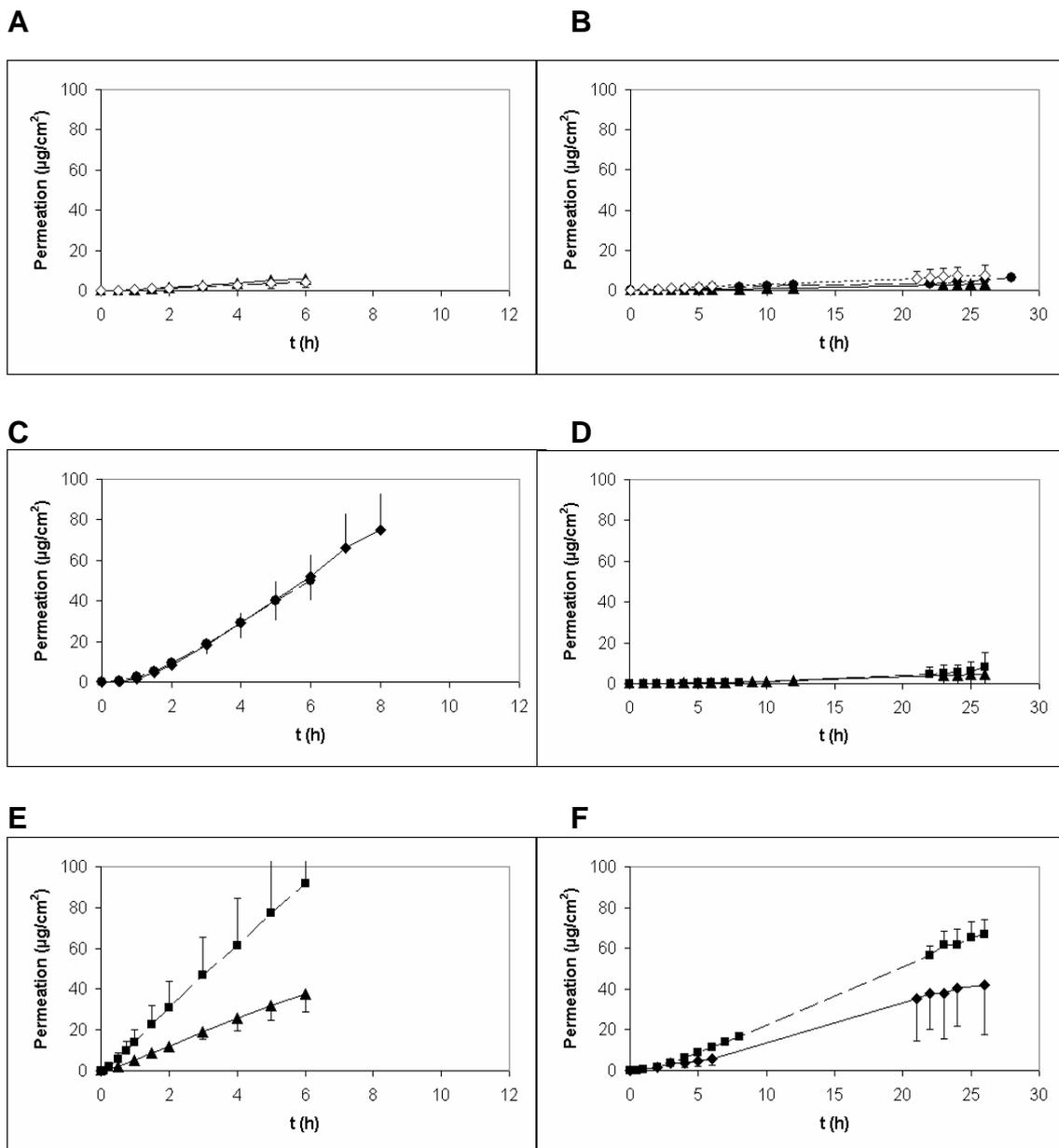


Abb. 11: Permeation von Koffein in PBS bei Applikation von 500 µL bzw. 110 µL (EPISKIN®) einer 0,1 %igen Lösung in PBS für 6 bis 8 h auf RHE (A: EpiDerm™, C: EPISKIN®, E: SkinEthic®) und für 26 bis 30 h auf HSE (B), Schweinehaut (D) und Haut des Rindereuters (F).
FU = eigene Untersuchungen
 ▲: FU; ■: TiHo; ●: US; ◇: LMU; ◆: ACB
 Jede Linie zeigt die Ergebnisse eines einzelnen Labors (MW ± SD).

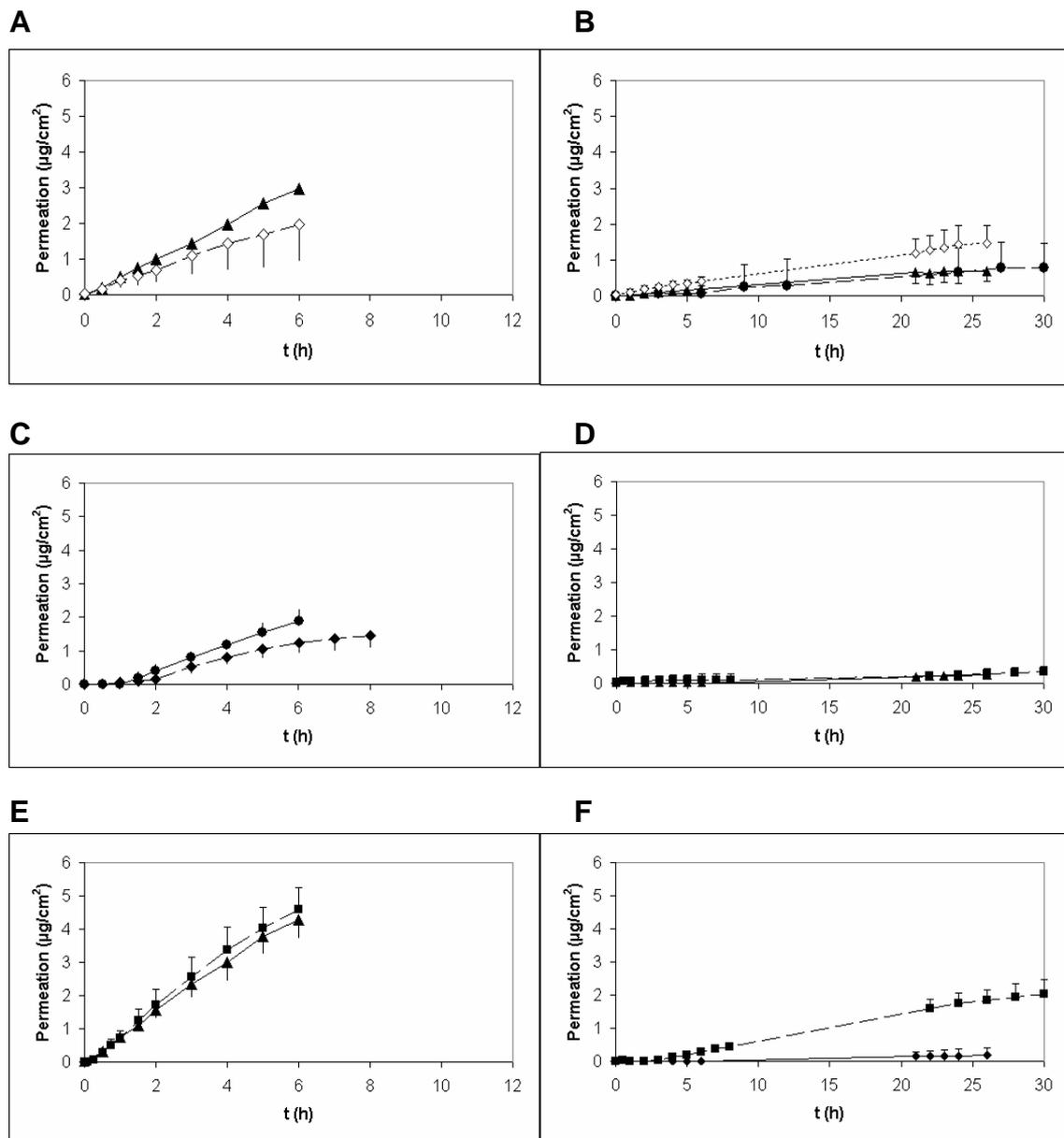


Abb. 12: Permeation von Testosteron in PBS bei Applikation von 500 µL bzw. 110 µL (EPISKIN[®]) einer 0,004 %igen Lösung in PBS (unter Zusatz von 2 % (v/v) Igepal CA-630 und 0,4 % (v/v) EtOH) für 6 bis 8 h auf (A: EpiDerm[™], C: EPISKIN[®], E: SkinEthic[®]) und 26 bis 36 h auf HSE (B), Schweinehaut (D) und Haut des Rindereuters (F). **FU** = eigene Untersuchungen
 ▲: FU; ■: TiHo; ●: US; ◇: LMU; ◆: ACB
 Jede Linie zeigt die Ergebnisse eines einzelnen Labors (MW ± SD).

Die Resultate der Permeationsparameter (P_{app} -Werte, lag-Zeit, permeierte Menge) sind in Tab. 15 zusammengefasst und in Abb. 13 grafisch dargestellt. Die Permeation nach 6 h für Koffein und Testosteron zeigen eine gute Übereinstimmung zu den ermittelten P_{app} -Werten. Sowohl für Koffein als auch für Testosteron wiesen die berechneten P_{app} -Werte bei Versuchen mit HSE die erwartete Variabilität auf. So lag der cv der P_{app} -Werte für Koffein bei 62 % und für Testosteron bei 93 %. Der cv der P_{app} -Werte war bei den Versuchen mit RHE für beide Substanzen hingegen niedriger und reichte von 20 % (Testosteron, SkinEthic[®]) bis 56 % (Koffein, EpiDerm[™]).

Tab. 15: Permeationsdaten aller Versuche in der Prävalidierung: P_{app} -Werte, lag-Zeiten und Menge an permeierter Substanz in das Akzeptormedium nach 6 h für Koffein (0,1 %ig) und Testosteron (0,004 %ig) für HSE, Schweinehaut, Haut des Rindereuters und RHE. Daten, in die eigene Untersuchungen eingeflossen sind, sind im **Fettdruck** gekennzeichnet.

MW = Mittelwert; cv = Variationskoeffizient; SD = Standardabweichung; n = Anzahl an unabhängigen Experimenten

Testhaut	Permeation 6 h ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	P_{app} ($\times 10^{-6} \text{ cm/s}$)		Lag-Zeit (h)	n
		MW \pm SD	MW \pm SD		
Koffein					
HSE	1,12 \pm 1,18	0,06 \pm 0,04	62,29	1,73 \pm 1,48	8
Schweinehaut	0,48 \pm 0,41	0,07 \pm 0,05	74,82	3,92 \pm 0,87	6
Euterhaut	8,24 \pm 3,86	0,63 \pm 0,23	37,23	1,88 \pm 0,42	7
EpiDerm [™]	4,87 \pm 2,67	0,24 \pm 0,14	55,59	0,33 \pm 0,06	5
SkinEthic [®]	73,65 \pm 36,58	3,63 \pm 1,91	52,74	0,14 \pm 0,05	6
EPISKIN [®]	51,25 \pm 9,84	2,77 \pm 0,78	24,37	1,04 \pm 0,26	7
Testosteron					
HSE	0,32 \pm 0,27	0,42 \pm 0,39	93,18	1,03 \pm 2,52	8
Schweinehaut	0,07 \pm 0,15	0,08 \pm 0,01	14,91	-0,13 \pm 11,92	4
Euterhaut	0,14 \pm 0,15	0,32 \pm 0,28	89,89	1,19 \pm 1,30	6
EpiDerm [™]	2,36 \pm 0,90	2,89 \pm 1,09	37,82	0,00 \pm 0,09	5
SkinEthic [®]	4,47 \pm 0,57	6,00 \pm 1,17	19,55	0,14 \pm 0,09	5
EPISKIN [®]	1,53 \pm 0,47	2,11 \pm 0,63	29,89	0,93 \pm 0,33	7

Signifikante laborabhängige Unterschiede zwischen den Laboren sind nur hinsichtlich der Koffein-Permeation des SkinEthic[®]-Modells aufgetreten (Abb. 13 E), alle anderen Vergleiche ergaben keinen Hinweis auf Unterschiede zwischen den Partnerlaboren.

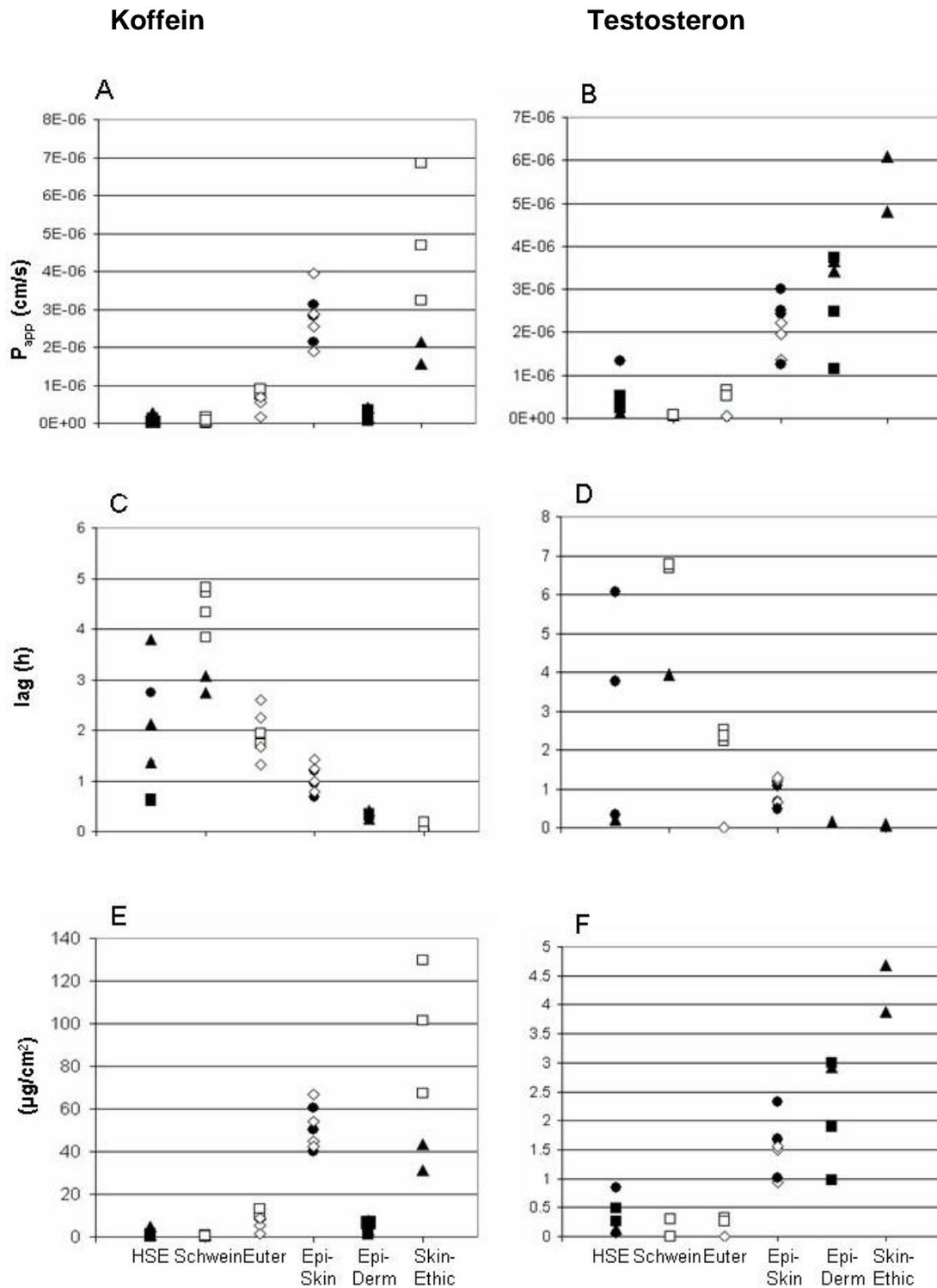


Abb. 13: Prävalidierung: Darstellung der Permeationsparameter, P_{app} -Werte, lag-Zeiten und Permeation in das Akzeptormedium PBS nach 6 h. Lösungen von Koffein 0,1 %ig (links, A; C; E) und Testosteron 0,004 %ig (rechts, B; D; F) wurden auf HSE, Schweinehaut, Haut des Rindereuters sowie auf RHE aufgetragen. **FU** = eigene Untersuchungen
 ▲: FU; ■: LMU; ●: US; ◇: ACB; □: TiHo

3.3.1 Koffein Permeation

Für Koffein erscheint das EpiDerm™-Modell weniger durchlässig (P_{app} : $0,24 \pm 0,14 \times 10^{-6}$ cm/s) als das EPISKIN®- und SkinEthic®-Modell (P_{app} : $2,77 \pm 0,78 \times 10^{-6}$ cm/s und $3,63 \pm 1,91 \times 10^{-6}$ cm/s), die vergleichbare P_{app} -Werte zeigen (Tab. 15). In der Tat zeigen die Ergebnisse der ANOVA (Tab. 16), dass sich der P_{app} -Wert von Koffein für das EpiDerm™-Modell nicht signifikant von den P_{app} -Werten für HSE (P_{app} : $0,06 \pm 0,04 \times 10^{-6}$ cm/s), Schweinehaut (P_{app} : $0,07 \pm 0,05 \times 10^{-6}$ cm/s) und Euterhaut (P_{app} : $0,63 \pm 0,23 \times 10^{-6}$ cm/s) unterscheidet. Für Koffein wurde anhand der P_{app} -Werte die Permeabilität durch die Testhäute wie folgt gereiht (ANOVA): SkinEthic®, EPISKIN® > Euterhaut, EpiDerm™, Schweinehaut und HSE. Die Reihenfolge ändert sich geringfügig – für Schweinehaut und HSE – bei Bezug auf die Permeation nach 6 h, die von 0,17 bis 26 % der applizierten Mengen an Koffein reichte. Die extremen Werte wurden dabei mit HSE und SkinEthic® erreicht.

3.3.2 Testosteron Permeation

Die biometrische Analyse der Permeation von Testosteron zeigt, dass sich die P_{app} -Werte beim EpiDerm™- und EPISKIN®-Modell statistisch nicht unterscheiden (P_{app} : $2,89 \pm 1,09 \times 10^{-6}$ cm/s und $2,11 \pm 0,63 \times 10^{-6}$ cm/s), während das SkinEthic®-Modell (P_{app} : $6,00 \pm 1,17 \times 10^{-6}$ cm/s) für Testosteron permeabler ist. Die RHEs zeigen im Vergleich zur HSE (P_{app} : $0,42 \pm 0,39 \times 10^{-6}$ cm/s), Schweinehaut (P_{app} : $0,08 \pm 0,01 \times 10^{-6}$ cm/s) und Euterhaut (P_{app} : $0,32 \pm 0,28 \times 10^{-6}$ cm/s) eine signifikant höhere Permeation, was auf eine geringere Ausprägung der Barrierefunktion bei den RHEs schließen lässt. Für Testosteron wurde anhand der P_{app} -Werte die Permeabilität durch die Testhäute wie folgt gereiht (ANOVA): SkinEthic® > EpiDerm™, EPISKIN® > HSE, Euterhaut und Schweinehaut. Die Permeation nach 6 h reichte von 0,6 % der applizierten Testosteronmenge bei Versuchen mit Schweinehaut bis zu 39,5 % bei Versuchen mit SkinEthic®. Wie auch bei Koffein sind mittels ANOVA zwischen SkinEthic® und EpiDerm™ statistisch signifikante Unterschiede feststellbar. Das Ranking der Testhäute auf Grundlage der Permeation nach 6 h ist bis auf den

zusätzlichen signifikanten Unterschied zwischen EPISKIN® und EpiDerm™ gleich (Tab. 16).

Tab. 16: Varianztafel und homogene Gruppen (nach Student-Newmann-Keuls, $\alpha < 5\%$) der Permeabilitätskoeffizienten (P_{app} in $\text{cm/s} \times 10^{-6}$)

für **a) Koffein** und **b) Testosteron**

SQ = Summe der Abweichungsquadrate

df = degrees of Freedom = Freiheitsgrade = Anzahl Werte – 1

MQ = mittlere Summe der Abweichungsquadrate = Varianz

N = Stichprobenumfang

F = F-Wert (F-Test)

a) Koffein

Quelle	SQ	df	MQ	F	Signifikanz
HAUT	62,873	5	12,575	21,388	0,0000
LABOR	5,102	4	1,276	2,170	0,0966
Fehler	17,638	30	0,588		

*) signifikant wenn Wert < 0,05

Haut	N	Untergruppe	
		1	2
Schwein	6	0,07	
HSE	9	0,22	
EpiDerm	5	0,244	
Euter	7	0,628	
EPISKIN	7		2,806
SkinEthic	6		3,628

b) Testosteron

Quelle	SQ	df	MQ	F	Signifikanz
HAUT	48,038	5	9,608	26,019	0,0000
LABOR	1,899	4	0,475	1,286	0,3146
Fehler	6,277	17	0,369		

*) signifikant wenn Wert < 0,05

Haut	N	Untergruppe		
		1	2	3
Schwein	4	0,075		
HSE	8	0,415		
Euter	3	0,568		
EPISKIN	5		2,227	
EpiDerm	5		2,892	
SkinEthic	2			5,451

3.3.3 Lag-Zeiten

Einen weiteren Unterschied in der Permeabilität zwischen RHE und HSE bzw. tierischer Haut zeigen die lag-Zeiten, die bei der RHE deutlich kürzer sind als bei humaner und tierischer Haut. Für beide Testsubstanzen waren die lag-Zeiten bei den Versuchen mit RHE sehr niedrig oder praktisch nicht feststellbar. So lag die lag-Zeit für Koffein mit EPISKIN[®] ungefähr bei 1 h, für EpiDerm[™] bei weniger als 0,5 h, und für das SkinEthic[®]-Modell war praktisch keine lag-Zeit vorhanden. Die Permeation des EPISKIN[®]-Modells ist bei beiden Testsubstanzen mit ca. 1 h am stärksten retardiert. Bei Experimenten an Hautmodellen sind somit bei den nach 90 min. gezogenen Proben keine Fehler in Folge einer nicht abgeschlossenen lag-Zeit zu erwarten.

Anders stellt sich die Situation bei HSE und tierischen Häuten dar: Die mittleren lag-Zeiten unterliegen bei beiden Substanzen für Schweinehaut und HSE ausgeprägten Schwankungen. Dadurch kam es auch zur Berechnung von nicht möglichen negativen lag-Zeiten ($- 0,13 \pm 11,92$ h) für Testosteron mit Schweinehaut. Dies erschwert die Festlegung der Zeiten der Probeziehung und erfordert eine Ausweitung der Versuchsdauer auf mindestens 24 h. Die lag-Zeiten, die bei den Versuchen an der Haut des Rindereuters auftraten, lagen in der Größenordnung zwischen denen von RHE und HSE bzw. Schweinehaut.

3.3.4 Interlaborvariabilität

Während signifikante Unterschiede zwischen den Testhäuten gemäß ANOVA festzustellen waren (Tab. 16), war die Interlaborvariabilität (sL%) zwischen den fünf Laboren niedrig. Sogar bei den Versuchen mit HSE lag der sL% der P_{app} -Werte bei 9,3% für Koffein und nahezu bei Null für Testosteron (eine präzisere Bestimmung war auf Grund von Inhomogenitäten nicht möglich).

Obgleich auf Grund dieser Resultate die Voraussetzungen für die abschließende Validierung gegeben sind, ergab die Prävalidierung weitere Möglichkeiten der Protokollverfeinerung für die Validierung, die in Tab. 17 zusammengestellt sind.

Tab. 17: Übersicht über vorgenommene Protokollverfeinerungen für die abschließende Validierung

Ausgangsmethode	Verfeinertes Protokoll für die Prävalidierung	Präzisierungen für die Validierung
Schweinehaut aus verschiedenen Körperregionen	Schweinehaut ausschließlich aus der Flankenregion	Keine Änderung
Einsatz von Schweinehaut unterschiedlicher Dicke	Definierte Dicke: $1000 \pm 100 \mu\text{m}$; Spalthautgewinnung mittels Dermatom oder Gefriermikrotom	Definierte Dicke: $1000 \pm 100 \mu\text{m}$; Spalthautgewinnung mittels Dermatom
Standard-Franzzellen von 15 mm Durchmesser (statisch und dynamisch)	Nur statisch; Tefloneinsatz zur Oberflächenreduktion bei EPISKIN [®]	Keine Änderung
Akzeptormedium (PBS \pm BSA oder Igepal [®] CA-630), Akzeptortemperatur 37,5 °C	Akzeptormedium PBS von $33,5 \pm 0,5 \text{ °C}$; Temperaturkontrolle durch Wasserbad / Inkubator	Keine Änderung
Durchmischung des Akzeptormediums mit unterschiedlichen Rührgeschwindigkeiten	Betreiben des Magnetrührers mit 500 rpm	Keine Änderung
Äquilibrieren der Haut über 30 oder 60 min.; keine Hydratisierung der Schweinehaut	30 min. Hydratisierung von Spalthaut und HSE in PBS; Äquilibrieren des Gewebes über 30 min.	Keine Änderung
Probenvolumen des Akzeptormediums: 0,4 oder 4 mL	Probenvolumen: 0,4 mL	Keine Änderung
Abdecken der Franzzelle mit unterschiedlichen Materialien	Abdecken der Franzzelle ausschließlich mit Parafilm [™]	Keine Änderung
Koffein 0,1 und 1 %ig; Testosteron 1 und 0,004 %ig	Koffein 0,1 %ig; Testosteron 0,004 %ig	Keine Änderung; zusätzlich: breiteres Substanzpanel
Applikation und Sammelperiode: 6 bis 24 h	Applikation und Sammelperiode bei RHE 6 bis 8 h, native Haut mind. bis 26 h	Hautmodelle nur bis 6 h, Häute $\geq 26 \text{ h}$
Probenzug zu geeigneten Zeiten	Probenzug zu 6 bis 8 Zeiten für mind. bis zu 6 Messwerten im linearen Kurvenbereich, obligatorisch: 0, 6, und 24 h	Keine Änderung; zusätzlich: Finite-dose-Experimente
Histologie, MTT-Test, Lactat- und LDH-Messung	Nur optional	Keine Änderung
HPLC- oder LSC-Analytik	Keine Änderung	Keine Änderung

3.4 Validierung

Wie bereits in der Prävalidierung wurden von ACB die Sättigungslöslichkeiten für jede neue Substanz im vorgesehenen Akzeptormedium bestimmt (Kaca et al., in press). Ferner wurden von der TUB die Testlösungen von Testosteron, Ivermectin und Clotrimazol, die 2 % (v/v) Igepal[®] CA-630 enthielten, auf Mizellbildung untersucht, die das Permeationsverhalten dieser Substanzen

beeinflussen könnte. Jeglicher Einfluss der Mizellbildung auf die Permeation konnte ausgeschlossen werden (Kaca et al., in press).

3.4.1 Infinite-dose-Experimente

Valide Ergebnisse der Prävalidierung aus Versuchen für Koffein und Testosteron sind in die Auswertung der Validierung eingeflossen, da diese unter identischen Bedingungen durchgeführt wurden. Alle Versuche erfolgten auf Basis der unter Punkt 2 beschriebenen Methoden, die in den endgültigen Fassungen der SOPs festgelegt wurden. Die Ergebnisse der Permeationsversuche unter Infinite-dose-Bedingungen aus den eigenen Untersuchungen und die aller Partner sind in den Tab. 20, 21 und 22 zusammengefasst. Tab. 20 stellt die Gesamtpermeation nach 6 h (A) und 24 h (B) in %, Tab. 21 die P_{app} -Werte in cm/s und Tab. 22 die lag-Zeiten in h dar.

OECD Referenzsubstanzen: Koffein, Testosteron und Benzoessäure. Tab. 19 zeigt einen Vergleich der Ergebnisse der P_{app} -Werte für Koffein und Testosteron aus der Prävalidierung (A) mit denen aus der Validierung (B). In Abb. 14 sind die Permeationsverläufe für Koffein und Testosteron aus allen Partnerlaboren grafisch dargestellt.

Im Allgemeinen stimmen die von Koffein und Testosteron ermittelten Permeationsparameter mit denen aus der Prävalidierung gut überein. Das belegt das gleiche Ranking der Permeation (P_{app} -Wert) für Testosteron und Koffein wie in der Prävalidierung. So reihte der Tamhane-Test die Permeation von Testosteron durch die Testhäute, SkinEthic[®] > EpiDerm[™], EPISKIN[®] > HSE, Schweinehaut und für Koffein, SkinEthic[®], EPISKIN[®] > EpiDerm[™], HSE und Schweinehaut (Tab. 18).

Tab. 18: Ergebnisse des von der ZEBET durchgeführten Tamhane-Tests auf Grundlage der Mittelwerte der P_{app} -Werte aller Substanzen. Buchstaben kennzeichnen homogene Untergruppen, d. h. es sind keine signifikanten Unterschiede der P_{app} -Werte vorhanden.

	Mannitol	Koffein	Nikotin	Digoxin	Benzoessäure	Testosteron	Flufenaminsäure	Clotrimazol
HSE	-	a	a	-	-	a	a	ab
Schweinehaut	b	a	a	a	a	a	a	a
EpiDerm	-	a	ab	a	ab	b	b	c
EPISKIN	b	b	b	a	a	b	b	-
SkinEthic	a	b	c	a	b	c	c	bc

3 Ergebnisse

Allerdings unterschied sich das Ausmaß der Permeation von Koffein bei HSE (P_{app} : $0,06 \pm 0,036 \times 10^{-6}$ cm/s) deutlich von dem in der Prävalidierung ermittelten Wert (P_{app} : $0,28 \pm 0,28 \times 10^{-6}$ cm/s). Auch bei Schweinehaut überstieg der P_{app} -Wert (P_{app} : $0,07 \pm 0,052 \times 10^{-6}$ cm/s) den in der Prävalidierung gemessenen Wert (P_{app} : $0,31 \pm 0,32 \times 10^{-6}$ cm/s) etwa um das 5fache. Darüber hinaus lag der cv-Wert des P_{app} -Werts von Koffein bei EpiDerm™ auffällig hoch (82,9 %).

Tab. 19: Vergleich der P_{app} -Werte aus der Prävalidierung (A) und Validierung (B) für Koffein und Testosteron. Ergebnisse aus eigenen Untersuchungen sind im **Fettdruck** gekennzeichnet.

A

P_{app} (cm/s x 10^6)		Prävalidierung					
		n	Mittelwert	SD	cv%	% s_r	% s_L
Koffein	HSE	8	0,06	0,036	62,3	61,8	9,3
	Schweinehaut	6	0,07	0,052	74,8	86,2	- ^{a)}
	EpiDerm	5	0,24	0,136	55,6	59,5	- ^{a)}
	SkinEthic	6	3,63	1,913	52,7	46,5	56,2
	EPISKIN	7	2,77	0,675	24,4	26,7	- ^{a)}
Testosteron	HSE	8	0,42	0,391	93,2	106,6	- ^{a)}
	Schweinehaut	4	0,08	0,011	14,9	17,7	- ^{a)}
	EpiDerm	5	2,89	1,094	37,8	35,5	12,2
	SkinEthic	5	6,00	1,173	19,6	20,7	- ^{a)}
	EPISKIN	7	2,11	0,630	29,9	19,0	29,3

B

P_{app} (cm/s x 10^6)		Validierung					
		n	Mittelwert	SD	cv%	% s_r	% s_L
Koffein	HSE	9	0,28	0,276	98,0	46,6	99,5
	Schweinehaut	9	0,31	0,305	98,4	61,9	88,2
	EpiDerm	8 ^{b)}	0,59	0,491	82,9	46,3	68,6
	SkinEthic	10	4,32	1,217	28,2	28,1	4,0
	EPISKIN	9	2,94	0,780	26,5	28,8	- ^{a)}
Testosteron	HSE	8^{b)}	0,50	0,467	94,0	40,4	83,4
	Schweinehaut	10	0,25	0,201	79,7	52,9	63,6
	EpiDerm	9	2,78	0,910	32,7	32,4	5,4
	SkinEthic	9	5,70	1,513	26,6	28,8	- ^{a)}
	EPISKIN	9	2,10	0,460	22,0	15,0	18,5

a) nicht berechenbar

b) Daten ausgeschlossen, auf Grund von nicht validen Experimenten

Koffein

Testosteron

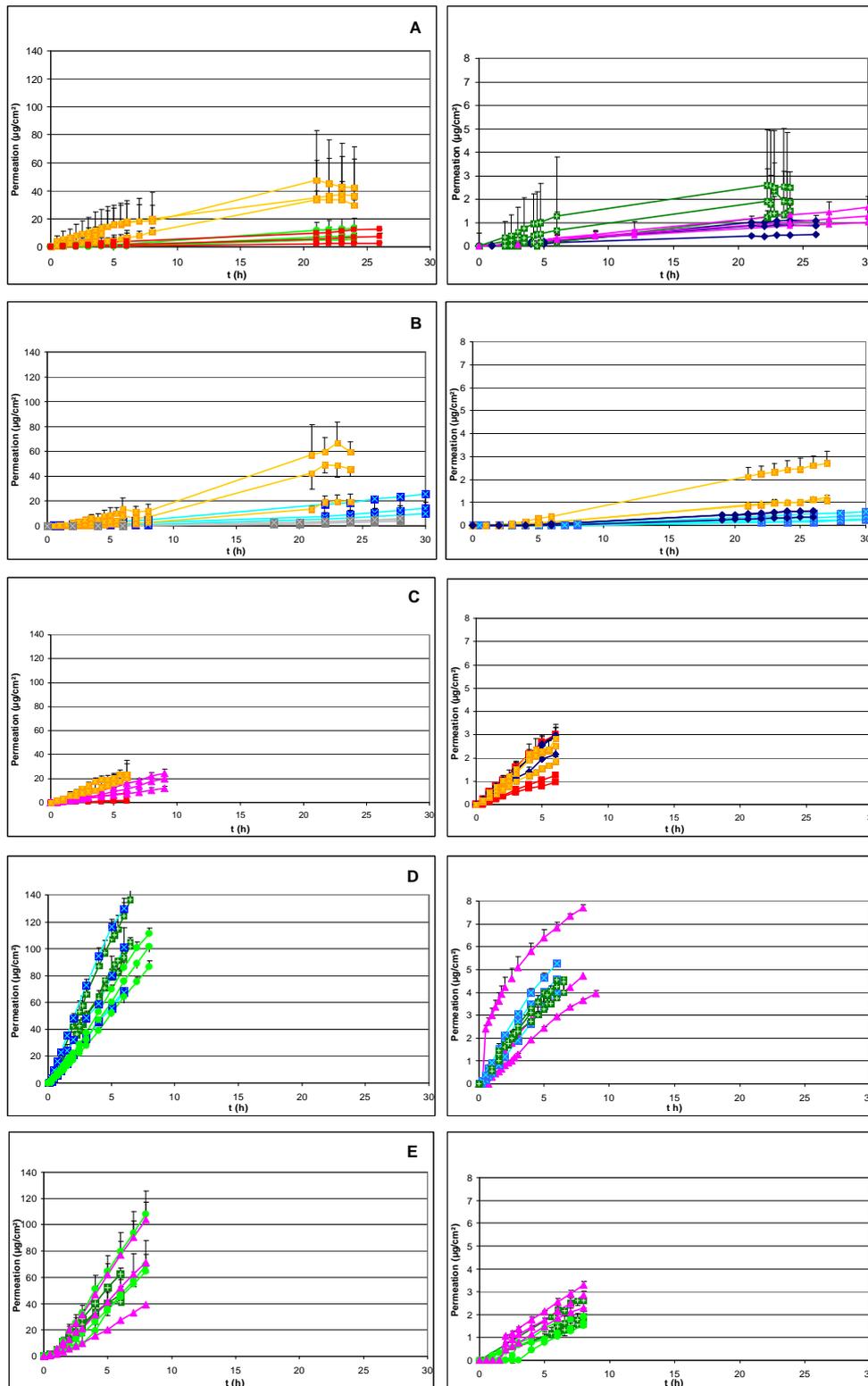


Abb. 14: Permeation von Koffein und Testosteron (Mittelwert \pm SD der Haute von individuellen Spendern und RHE von unterschiedlichen Chargen) durch HSE (A), Schweinehaut (B) und durch RHE (C: EpiDerm™; D: SkinEthic®; E: EPISKIN®). **FU** = eigene Untersuchungen

● ACB; ■ BASF; + BDF; ◆ FU; ■ IGB; ■ LMU; ⊠ TiHo; ▲ US

Auch unter dem hoch standardisierten Protokoll der Validierungsphase variierte die Permeation von Benzoesäure enorm, auffällig war eine signifikante Abnahme der Permeation einige Stunden nach Versuchsbeginn (Abb. 16). Besonders ausgeprägt war dieses Phänomen mit HSE (Abb. 15). Überraschenderweise traten diese Probleme – trotz gleicher Analytik mittels HPLC – nicht in den Versuchen mit Schweinehaut auf. Die Versuche mit Benzoesäure an HSE waren somit nicht valide auswertbar. Trotz einer sehr eingeschränkten Zahl an auswertbaren Experimenten, stellte sich das Ranking auf Grundlage des Tamhane-Tests für Benzoesäure wie folgt dar: SkinEthic[®], EpiDerm[™] > EpiDerm[™], EPISKIN[®], Schweinehaut. Es unterscheidet sich damit nicht grundlegend von dem der mit den anderen Testsubstanzen gefundenen Ranking (Tab. 18).

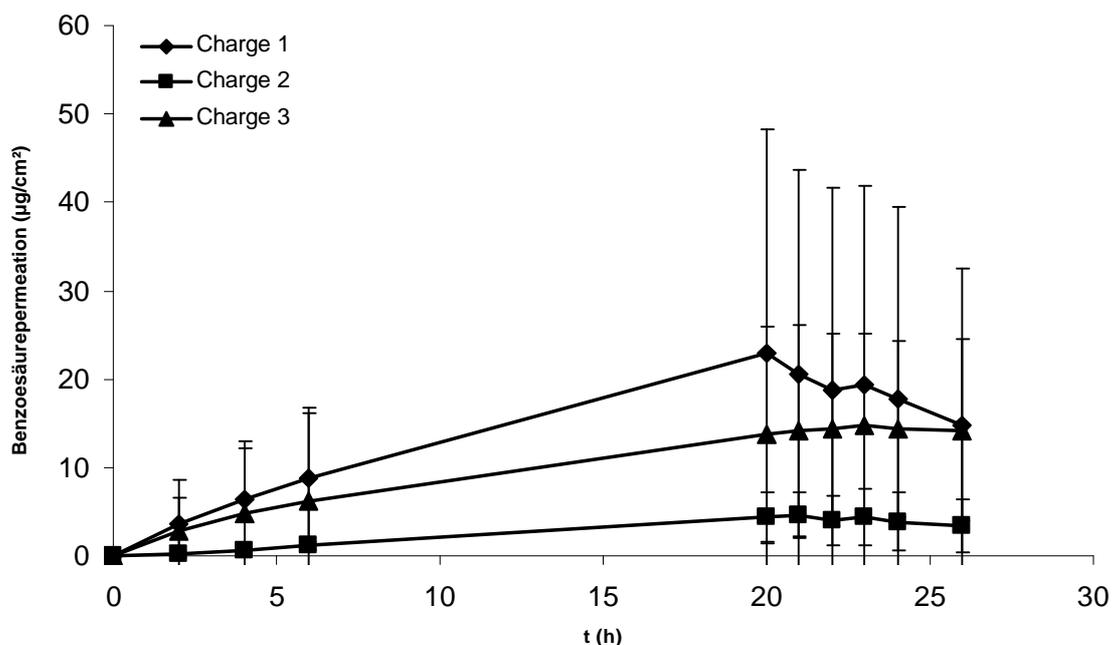


Abb. 15: Permeation von Benzoesäure (0,1 %ig in PBS) durch HSE unter den Bedingungen der Validierung an drei unterschiedlichen Chargen

Die Überprüfung der Analytik anhand von Benzoesäurestandards unter den Lagerbedingungen und -temperaturen zeigte, dass das Problem bei den Permeationsversuchen mit der Benzoesäure nicht analytisch bedingt war. Für den Abfall der Permeationskurve wurde zunächst eine mikrobielle Kontamination der Haut als mögliche Ursache diskutiert.

Benzoessäure

Digoxin

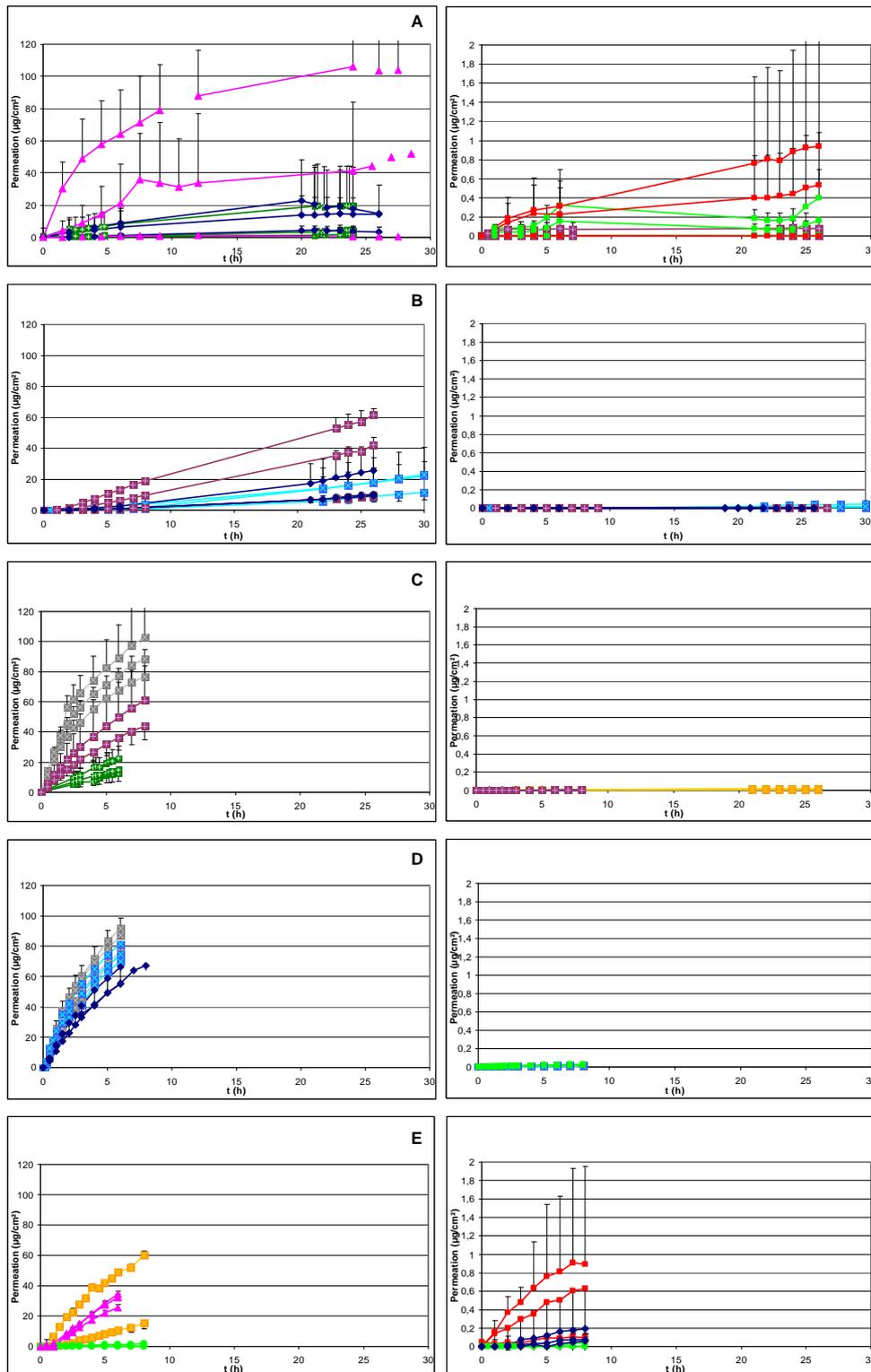


Abb. 16: Permeation von Benzoessäure und Digoxin (Mittelwert \pm SD der Häute von individuellen Spendern und RHE von unterschiedlichen Chargen) durch HSE (A), Schweinehaut (B) und durch RHE (C: EpiDerm™; D: SkinEthic®; E: EPISKIN®). FU = eigene Untersuchungen

● ACB; ■ BASF; + BDF; ◆ FU; + IGB; ■ LMU; × TiHo; ▲ US

An der US wurden daher weitere Untersuchungen mit HSE und Benzoesäure durchgeführt. Diese erfolgten unter Zusatz von unterschiedlichen Mengen an Natriumazid im Donor- und Akzeptormedium, die mikrobielle Effekte unterbinden sollten. Allerdings zeigte der Zusatz von Natriumazid zum Donor- und Akzeptormedium keinen Einfluss, so dass ein mikrobieller Einfluss als Begründung für das Permeationsverhalten der Benzoesäure ausgeschlossen wurde. Auf Grund der Probleme erscheint Benzoesäure als Referenzsubstanz für Permeationsversuche nicht geeignet.

Lipophile Testsubstanzen: Nikotin, Flufenaminsäure und Clotrimazol. Von den hier gewählten Testsubstanzen permeierte Nikotin und Flufenaminsäure bei allen Testhäuten am stärksten (Tab. 20 und 21, Abb. 17). Dies war auf Grund des Molekulargewichtes (kleiner als 700 Da) und der moderaten Lipophilie der beiden Testsubstanzen zu erwarten.

Die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse mit Flufenaminsäure war hoch. Der cv-Wert betrug 57,7 % für Schweinehaut und 56,4 % für HSE und reichte von 20,1 bis 37,7 % bei der RHE. Die Permeabilität für Flufenaminsäure durch die Testhäute folgt der Reihenfolge: SkinEthic[®] > EPISKIN[®], EpiDerm[™] > HSE, Schweinehaut. Die Reihung für Nikotin war nahezu gleich, nur dass zwischen EpiDerm[™] weder ein statistischer Unterschied zu EPISKIN[®] noch zu Schweinehaut oder HSE gezeigt werden konnte (Tab. 18, S. 79).

Das lipophilere Clotrimazol permeierte HSE und Schweinehaut in einem geringeren Umfang als Nikotin und Flufenaminsäure (Tab. 20 und 21, Abb. 18). Die mittleren P_{app} -Werte für HSE (P_{app} : $0,1 \pm 0,08 \times 10^{-6}$ cm/s) waren 10fach höher als bei Schweinehaut (P_{app} : $0,01 \pm 0,01 \times 10^{-6}$ cm/s). Insgesamt waren die Permeationsdaten, die mit HSE erhalten wurden, sehr inhomogen. Die Permeation durch EpiDerm[™] (P_{app} : $0,4 \pm 0,2 \times 10^{-6}$ cm/s) war 2fach höher als bei SkinEthic[®] (P_{app} : $0,25 \pm 0,18 \times 10^{-6}$ cm/s). Valide P_{app} -Werte für EPISKIN[®] waren nicht bestimmbar, da die Permeation nach 6 h zu gering war (0,33 %).

Nikotin

Flufenaminsäure

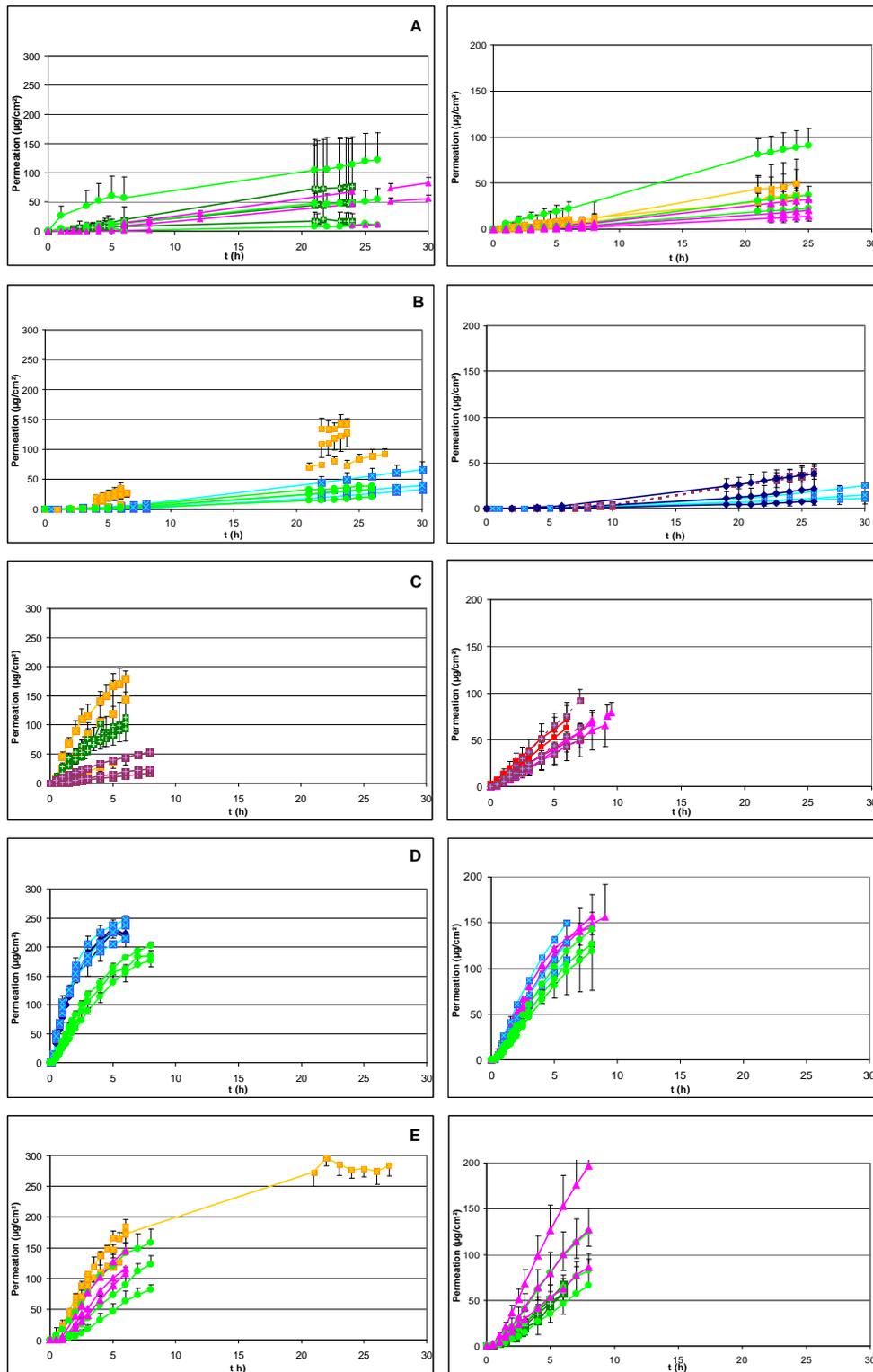


Abb. 17: Permeation von Nikotin und Flufenaminsäure (Mittelwert \pm SD der Häute von individuellen Spendern und RHE von unterschiedlichen Chargen) durch HSE (A), Schweinehaut (B) und durch RHE (C: EpiDerm™; D: SkinEthic®; E: EPISKIN®). FU = eigene Untersuchungen

● ACB; ■ BASF; + BDF; ◆ FU; + IGB; ■ LMU; ⊠ TiHo; ▲ US

3 Ergebnisse

Tab. 20: Validierung: Permeation der Testsubstanzen (%) nach 6 h (A) und 24 h (B). Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SD, der Variationskoeffizient (cv%) sowie die Intra- (%sr) und Interlaborvariabilität (%sL). Daten, in die eigene Untersuchungen eingeflossen sind, sind im **Fettdruck** gekennzeichnet.

A

Permeation nach 6 h		n	Mittelwert	SD	cv%	% sr	% sL
Mannitol	HSE	11	2,58	3,337	129,1	138,3	- ^{a)}
	Schweinehaut	9	0,61	1,451	236,8	241,9	- ^{a)}
	EpiDerm	9	0,51	1,279	252,2	249,8	39,8
	SkinEthic	10	0,02	0,037	227,5	254,9	116,8
	EPISKIN	9	3,52	2,544	72,2	66,5	32,7
Benzooesäure	HSE	0^{b)}	-	-	-	-	-
	Schweinehaut	9	1,12	1,484	132,0	115,8	73,1
	EpiDerm	8^{b)}	16,27	10,306	63,4	18,9	70,4
	SkinEthic	10	25,78	4,307	16,7	10,0	16,1
	EPISKIN	8	6,71	6,548	97,6	60,9	79,9
Koffein	HSE	9	1,96	2,476	126,3	70,4	121,1
	Schweinehaut	9	1,23	1,645	133,8	100,2	102,5
	EpiDerm	8^{b)}	3,96	2,901	73,3	29,5	69,5
	SkinEthic	10	32,01	8,179	25,6	24,6	8,4
	EPISKIN	9	18,63	5,930	31,8	36,1	- ^{a)}
Nikotin	HSE	9	5,22	5,290	101,3	107,7	- ^{a)}
	Schweinehaut	9	3,28	4,248	129,4	85,7	111,9
	EpiDerm	9	29,43	20,146	68,4	50,1	53,8
	SkinEthic	9	72,84	11,418	15,7	5,9	16,8
	EPISKIN	9	45,41	13,705	30,2	21,9	24,0
Digoxin	HSE	7^{b)}	3,15	4,574	145,3	171,2	95,7
	Schweinehaut	9	0,00	0,003	199,2	151,4	149,5
	EpiDerm	9	0,08	0,075	91,1	49,2	88,6
	SkinEthic	10	0,38	0,262	69,6	25,1	70,5
	EPISKIN	9	6,54	9,900	151,4	113,9	115,2
Flufenaminsäure	HSE	9	3,11	3,018	97,1	98,7	- ^{a)}
	Schweinehaut	9	0,46	0,405	87,2	95,3	- ^{a)}
	EpiDerm	9	25,87	5,681	22,0	22,0	- ^{a)}
	SkinEthic	9	57,26	7,703	13,5	11,0	8,9
	EPISKIN	9	36,83	15,703	42,6	38,9	20,1
Testosteron	HSE	9	3,57	3,176	88,9	79,0	47,2
	Schweinehaut	10	0,65	1,060	162,0	96,5	128,2
	EpiDerm	9	20,05	6,769	33,8	32,6	10,3
	SkinEthic	9	39,06	9,764	25,0	28,4	- ^{a)}
	EPISKIN	9	15,07	4,569	30,3	23,7	21,9
Clotrimazol	HSE	9	0,48	0,781	162,5	152,4	65,1
	Schweinehaut	9	0,00	0,007	199,3	151,6	149,5
	EpiDerm	9	2,74	1,597	58,2	56,6	15,9
	SkinEthic	9	1,29	0,952	73,8	38,1	73,0
	EPISKIN	10	0,33	0,569	171,6	184,3	- ^{a)}

a) nicht berechenbar

b) Daten ausgeschlossen, auf Grund von nicht validen Experimenten

B

Permeation nach 24 h		n	Mittelwert	SD	cv%	% sr	% sL
Mannitol	HSE	11	5,20	6,796	130,7	136,9	- ^{a)}
	Schweinehaut	9	6,06	6,272	103,4	91,8	55,1
	EpiDerm	6	2,87	5,785	201,5	195,3	64,0
	SkinEthic	7	0,16	0,317	201,2	226,9	- ^{a)}
	EPISKIN	0	-	-	-	-	-
Benzooesäure	HSE	0	-	-	-	-	-
	Schweinehaut	9	7,00	5,760	82,3	74,5	40,4
	EpiDerm	0	-	-	-	-	-
	SkinEthic	0	-	-	-	-	-
	EPISKIN	0	-	-	-	-	-
Koffein	HSE	9	6,10	5,208	85,4	29,1	92,7
	Schweinehaut	9	6,65	7,218	108,6	65,4	100,1
	EpiDerm	0	-	-	-	-	-
	SkinEthic	0	-	-	-	-	-
	EPISKIN	0	-	-	-	-	-
Nikotin	HSE	9	16,38	11,082	67,7	77,5	- ^{a)}
	Schweinehaut	9	20,86	16,411	78,7	39,1	78,8
	EpiDerm	0	-	-	-	-	-
	SkinEthic	0	-	-	-	-	-
	EPISKIN	1	97,04	-	-	-	-
Digoxin	HSE	7 ^{b)}	7,17	11,925	166,3	195,1	101,0
	Schweinehaut	9	0,19	0,338	178,0	159,7	90,6
	EpiDerm	3	0,44	0,118	26,7	26,7	-
	SkinEthic	0	-	-	-	-	-
	EPISKIN	0	-	-	-	-	-
Flufenaminsäure	HSE	9	17,31	10,523	60,8	58,9	17,4
	Schweinehaut	9	10,27	5,770	56,2	37,3	48,5
	EpiDerm	0	-	-	-	-	-
	SkinEthic	0	-	-	-	-	-
	EPISKIN	0	-	-	-	-	-
Testosteron	HSE	9	11,26	5,347	47,5	29,3	43,2
	Schweinehaut	10	6,17	5,982	96,9	61,2	78,4
	EpiDerm	0	-	-	-	-	-
	SkinEthic	0	-	-	-	-	-
	EPISKIN	0	-	-	-	-	-
Clotrimazol	HSE	9	2,29	2,727	119,1	105,8	63,1
	Schweinehaut	9	0,10	0,153	152,1	53,5	164,4
	EpiDerm	3	7,88	0,679	8,6	8,6	-
	SkinEthic	2	0,70	0,037	5,2	5,2	-
	EPISKIN	0	-	-	-	-	-

a) nicht berechenbar

b) Daten ausgeschlossen, auf Grund von nicht validen Experimenten

3 Ergebnisse

Tab. 21: P_{app} -Werte: Mittelwerte \pm SD, Variationskoeffizient (cv%) sowie Intra- (%sr) und Interlaborvariabilität (%sL). Daten, in die eigene Untersuchungen eingeflossen sind, sind im **Fettdruck** gekennzeichnet.

P_{app} (cm/s x 10 ⁶)		n	Mittelwert	SD	cv%	% sr	% sL
Mannitol	HSE	0^{b)}	-	-	-	-	-
	Schweinehaut	9	0,29	0,206	71,3	53,0	55,0
	EpiDerm	0^{b)}	-	-	-	-	-
	SkinEthic	3^{b)}	0,00	0,000	-	-	-
	EPISKIN	9	0,60	0,376	62,6	55,8	32,9
Benzoessäure	HSE	0^{b)}	-	-	-	-	-
	Schweinehaut	9	0,28	0,136	48,9	50,1	-^{a)}
	EpiDerm	8^{b)}	3,65	3,135	85,8	21,9	99,5
	SkinEthic	10	4,98	1,372	27,6	17,2	25,6
	EPISKIN	8^{b)}	1,00	0,936	93,8	52,9	82,6
Koffein	HSE	9	0,28	0,276	98,0	46,6	99,5
	Schweinehaut	9	0,31	0,305	98,4	61,9	88,2
	EpiDerm	8^{b)}	0,59	0,491	82,9	46,3	68,6
	SkinEthic	10	4,32	1,217	28,2	28,1	4,0
	EPISKIN	9	2,94	0,780	26,5	28,8	-^{a)}
Nikotin	HSE	9	0,61	0,511	84,0	94,1	-^{a)}
	Schweinehaut	9	0,80	0,526	66,1	26,9	69,7
	EpiDerm	9	4,85	3,799	78,4	62,8	54,1
	SkinEthic	8^{b)}	18,31	7,308	39,9	4,7	44,1
	EPISKIN	9	6,60	1,457	22,1	16,6	16,8
Digoxin	HSE	0^{b)}	-	-	-	-	-
	Schweinehaut	8^{b)}	0,02	0,026	166,4	65,5	133,6
	EpiDerm	9	0,01	0,009	87,6	42,5	88,5
	SkinEthic	10	0,05	0,032	68,8	26,9	68,2
	EPISKIN	7^{b)}	0,58	1,057	183,7	25,1	126,0
Flufenaminsäure	HSE	9	0,63	0,354	56,4	53,8	19,7
	Schweinehaut	9	0,57	0,314	54,7	43,8	37,7
	EpiDerm	9	3,61	0,814	22,6	23,6	-^{a)}
	SkinEthic	9	8,90	1,790	20,1	15,8	14,4
	EPISKIN	9	5,61	2,116	37,7	34,1	18,7
Testosteron	HSE	8^{b)}	0,50	0,467	94,0	40,4	83,4
	Schweinehaut	10	0,25	0,201	79,7	52,9	63,6
	EpiDerm	9	2,78	0,910	32,7	32,4	5,4
	SkinEthic	9	5,70	1,513	26,6	28,8	-^{a)}
	EPISKIN	9	2,10	0,460	22,0	15,0	18,5
Clotrimazol	HSE	8^{b)}	0,10	0,086	88,2	86,4	30,1
	Schweinehaut	9	0,01	0,008	144,0	10,7	165,8
	EpiDerm	9	0,40	0,200	49,4	47,5	15,7
	SkinEthic	9	0,25	0,182	73,2	30,4	76,9
	EPISKIN	0^{b)}	-	-	-	-	-

a) nicht berechenbar

b) Daten ausgeschlossen, auf Grund von nicht validen Experimenten

Hydrophile Testsubstanzen: Mannitol. Die Permeation von Mannitol war bei allen Testhäuten sehr inhomogen (Abb. 18). So erstreckte sich die permeierte Menge an Mannitol durch HSE nach 24 h zwischen Null und 56,4 %. Eine hohe Variabilität der Mannitolpermeation trat in jedem Labor auf, die Ergebnisse wurden nicht durch Schwankungen innerhalb eines einzelnen Labors verursacht. Der inhomogene Verlauf der Permeationskurve bei Versuchen mit EpiDerm™ und HSE schloss die Berechnung von validen P_{app} -Werten aus. Für Schweinehaut lag der P_{app} -Wert bei $0,2 \pm 0,21 \times 10^{-6}$ cm/s und war auf Grundlage des Tamhane-Tests (Tab. 18, S. 79) statistisch nicht signifikant unterschiedlich von dem P_{app} -Wert von EPISKIN® (P_{app} : $0,6 \pm 0,38 \times 10^{-6}$ cm/s). Eine Permeation von Mannitol durch SkinEthic® konnte nicht beobachtet werden, was im Gegensatz zu der generell hohen Permeabilität von SkinEthic® mit anderen Substanzen steht.

Substanzen mit Molekulargewicht > 700 Da: Ivermectin und Digoxin. In den mit Ivermectin durchgeführten Versuchen in jeweils einem Labor und an einer Testhaut wurde in allen Versuchen keine Permeation festgestellt. Damit bestätigte sich die Annahme, das Ivermectin als „no-permeation“ Marker gelten kann. Daher wurde beschlossen, auf die Wiederholung der Versuche mit der extrem aufwendigen und teuren Analytik (MS-Detektion, zentral durch ACB) in zwei anderen Laboren zu verzichten.

Bei allen Testhäuten zeigte Digoxin eine sehr niedrige oder kaum messbare Permeation. Nur in einem Labor trat wiederholt eine nennbare Permeation bei HSE und EPISKIN® bei mehreren Chargen auf. Vermutlich sind dafür technische Probleme bei der Handhabung der Testhäute ursächlich, wofür die hohe Variabilität dieser Daten (cv-Wert des P_{app} -Werts: 183,7 %, EPISKIN®) spricht. Bei den meisten Permeationsversuchen mit HSE konnte kein konstanter Anstieg der Permeation festgestellt und somit konnten auch keine validen P_{app} -Werte berechnet werden. Signifikante Abweichungen der unterschiedlichen Testhäute waren auf Grund der niedrigen Anzahl auswertbarer Versuche nicht feststellbar.

Mannitol

Clotrimazol

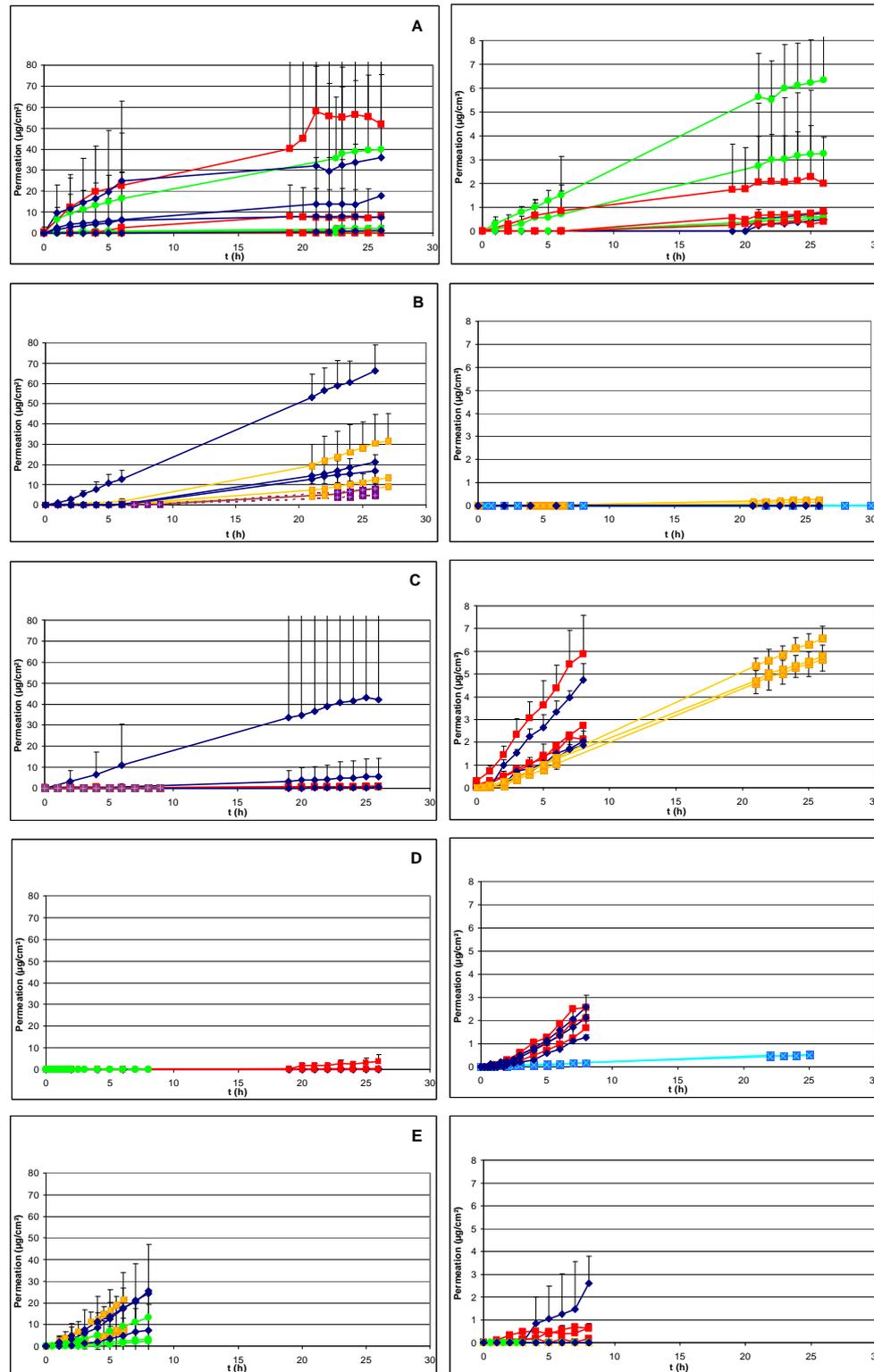


Abb. 18: Permeation von Mannitol und Clotrimazol (Mittelwert \pm SD der Häute von individuellen Spendern und RHE von unterschiedlichen Chargen) durch HSE (A), Schweinehaut (B) und durch RHE (C: EpiDerm™; D: SkinEthic®; E: EPISKIN®). FU = eigene Untersuchungen

● ACB; ■ BASF; ■ BDF; ◆ FU; + IGB; ■ LMU; × TiHo; ▲ US

Lag-Zeiten. Die Bestimmung von validen lag-Zeiten bei den Permeationsversuchen im Rahmen der Validierung war in einigen Fällen nicht möglich. Ursächlich war bei der Analytik mittels HPLC ein technischer off-set, d. h. Verschiebung der Permeationskurve parallel zur x-Achse. Hinzu kommt eine hohe Variabilität (cv%) der validen lag-Zeiten (Tab. 22). Dennoch bestätigen die Ergebnisse der Validierungsphase die Befunde aus den vorausgegangenen Untersuchungen hinsichtlich des Unterschieds in der Länge der lag-Zeiten zwischen RHE und Human- bzw. Schweinehaut. Im Allgemeinen betragen die lag-Zeiten für die RHE einige Minuten, der höchste Wert lag bei 1,42 h für Clotrimazol bei Versuchen mit SkinEthic®. Im Gegensatz dazu reichten die lag-Zeiten für Schweinehaut von 4,5 h bei Versuchen mit Nikotin bis 11,0 h bei Versuchen mit Digoxin. Zudem war die Variabilität der lag-Zeiten an Haut desselben Spendertiers sehr hoch. Mit Ausnahme von Clotrimazol (7,9 h) lagen die lag-Zeiten für HSE zwischen 0,5 und 2,6 h.

Intra- und Interlaborvariabilität. Die Variationskoeffizienten (cv%) der P_{app} -Werte sind bei Schweinehaut (48,9 bis 166,4 %) am höchsten. Bei HSE (56,4 bis 98,0 %) und den RHE, EpiDerm™ (22,6 bis 87,6 %), SkinEthic® (20,1 bis 73,2 %) und EPISKIN® (22,0 bis 93,8 %) etwas niedriger (Tab. 21). Die Unterschiede der Streuungen zwischen den Testhäuten sind allerdings statistisch nicht signifikant. Eine bessere Reproduzierbarkeit der Permeationsparameter von RHE als von Human- und Schweinehaut konnte anhand der Intralaborvariabilität somit nicht nachgewiesen und die auf Grund der Resultate der Prävalidierung erstellte Hypothese nicht bestätigt werden. Pro Testsubstanz und -haut wurden mindestens 9 Versuche pro Labor und somit insgesamt mindestens 27 unabhängige Versuche durchgeführt. Die Intralaborvariabilität sr reichte von 4,7 % (SkinEthic®, Nikotin) bis 94,1 % (HSE, Nikotin). Im Allgemeinen war der Beitrag der Intra- und Interlaborvariabilität zur Gesamtstreuung gleich groß (Tab. 21). Demnach war das Testverfahren in den beteiligten Laboren gut standardisiert.

3 Ergebnisse

Tab. 22: lag-Zeiten: Mittelwerte \pm SD, Variationskoeffizient (cv%) sowie Intra- (%sr) und Interlaborvariabilität (%sL). Daten, in die eigene Untersuchungen eingeflossen sind, sind im **Fettdruck** gekennzeichnet.

Lag-Zeit (h)		n	Mittelwert	SD	cv%	% sr	% sL
Mannitol	HSE	0 ^{b)}	-	-	-	-	-
	Schweinehaut	9	8,34	4,253	51,0	48,1	19,7
	EpiDerm	0 ^{b)}	-	-	-	-	-
	SkinEthic	0 ^{b)}	-	-	-	-	-
	EPISKIN	9	1,69	0,773	45,6	48,9	-.^{a)}
Benzooesäure	HSE	0 ^{b)}	-	-	-	-	-
	Schweinehaut	9	6,20	3,368	54,3	28,4	53,5
	EpiDerm	6 ^{b)}	0,00	0,139	5273,4	195,0	359,1
	SkinEthic	10	-0,02	0,111	513,3	517,4	-.^{a)}
	EPISKIN	6 ^{b)}	0,62	0,419	67,2	86,0	-. ^{a)}
Koffein	HSE	8 ^{b)}	1,75	1,568	89,8	69,7	80,2
	Schweinehaut	9	6,92	3,908	56,5	23,5	59,3
	EpiDerm	7 ^{b)}	0,35	0,355	100,2	55,2	83,7
	SkinEthic	10	0,17	0,201	116,2	46,7	120,8
	EPISKIN	9	0,81	0,345	42,6	34,7	28,5
Nikotin	HSE	6	1,19	1,345	113,1	83,5	98,4
	Schweinehaut	9	4,47	2,553	57,1	44,8	40,9
	EpiDerm	9	0,18	0,402	225,0	209,0	96,1
	SkinEthic	8	0,05	0,074	134,7	150,4	-.^{a)}
	EPISKIN	9	0,62	0,723	116,7	78,8	99,5
Digoxin	HSE	0 ^{b)}	-	-	-	-	-
	Schweinehaut	5 ^{b)}	11,05	5,578	50,5	53,2	-.^{a)}
	EpiDerm	4 ^{b)}	-0,11	0,585	513,8	625,8	-.^{a)}
	SkinEthic	4 ^{b)}	0,07	0,852	1188,5	457,5	259,1
	EPISKIN	0 ^{b)}	-	-	-	-	-
Flufenaminsäure	HSE	9	2,55	1,322	51,8	46,9	25,4
	Schweinehaut	9	9,93	2,770	27,9	26,9	8,6
	EpiDerm	6 ^{b)}	0,48	0,174	36,1	39,7	-. ^{a)}
	SkinEthic	9	0,27	0,124	45,6	31,4	38,2
	EPISKIN	9	0,98	0,326	33,3	30,2	16,1
Testosteron	HSE	5 ^{b)}	0,51	0,909	177,9	195,3	-.^{a)}
	Schweinehaut	10	6,66	4,338	65,2	36,1	71,2
	EpiDerm	9	0,08	0,178	223,8	237,6	-.^{a)}
	SkinEthic	8 ^{b)}	0,07	0,225	333,7	189,7	226,4
	EPISKIN	6 ^{b)}	0,52	0,724	138,2	153,8	-. ^{a)}
Clotrimazol	HSE	7 ^{b)}	7,93	4,924	62,1	46,4	44,1
	Schweinehaut	6 ^{b)}	10,24	3,155	30,8	34,0	-.^{a)}
	EpiDerm	9	0,81	0,526	65,1	50,2	48,0
	SkinEthic	9	1,42	0,701	49,3	33,8	41,4
	EPISKIN	0 ^{b)}	-	-	-	-	-

a) nicht berechenbar

b) Daten ausgeschlossen, auf Grund von nicht validen Experimenten

3 Ergebnisse

Barriereigenschaften der Testhäute. Tab. 23 stellt die Verhältnisse der P_{app} -Werte der Testhäute zu HSE bzw. Schweinehaut (Referenzmodelle) dar. Abb. 19 gibt die entsprechenden Verhältnisse in Relation zu den Molekulargewichten und der Lipophilie (LogD) wieder.

Tab. 23: Vergleich der Permeation von RHE im Vergleich zu HSE und Schweinehaut anhand der Verhältnisse der P_{app} -Werte; Faktoren = $P_{app}/P_{app}(\text{Vergleichsmodell})$; SD = Standardabweichung; cv% = Variationskoeffizient; n = Anzahl an Häuten/Chargen

Verhältnis zu:		HSE				Schweinehaut			
		n	Mittelwert	SD	cv%	n	Mittelwert	SD	cv%
HSE	Koffein	9	1,00	0,981	97,965	9	0,91	0,889	97,965
	Flufenaminsäure	9	1,00	0,564	56,412	9	1,09	0,616	56,412
	Mannitol	0	-	-	-	0	-	-	-
	Testosteron	8	1,00	0,941	94,021	8	1,97	1,852	94,021
	Benzoessäure	0	-	-	-	0	-	-	-
	Clotrimazol	8	1,00	0,882	88,210	8	17,31	15,267	88,210
	Digoxin	0	-	-	-	0	-	-	-
	Nikotin	9	1,00	0,841	84,031	9	0,76	0,642	84,031
	<i>Gesamt</i>	43	1,00	0,810	80,942	43	4,16	8,962	215,178
	Schweinehaut	Koffein	9	1,10	1,087	98,361	9	1,00	0,985
Flufenaminsäure		9	0,92	0,500	54,677	9	1,00	0,547	54,677
Mannitol		0	-	-	-	9	1,00	0,713	71,272
Testosteron		10	0,51	0,405	79,709	10	1,00	0,797	79,709
Benzoessäure		0	-	-	-	9	1,00	0,490	48,931
Clotrimazol		9	0,06	0,083	144,015	9	1,00	1,439	144,015
Digoxin		0	-	-	-	8	1,00	1,661	166,351
Nikotin		9	1,31	0,865	66,052	9	1,00	0,661	66,052
<i>Gesamt</i>		46	0,77	0,789	102,090	72	1,00	0,929	92,859
EpiDerm		Koffein	8	2,11	1,747	82,926	8	1,91	1,583
	Flufenaminsäure	9	5,76	1,299	22,556	9	6,29	1,418	22,556
	Mannitol	0	-	-	-	0	-	-	-
	Testosteron	9	5,61	1,836	32,692	9	11,05	3,613	32,692
	Benzoessäure	0	-	-	-	8	13,19	11,317	85,820
	Clotrimazol	9	4,16	2,055	49,374	9	72,05	35,576	49,374
	Digoxin	0	-	-	-	9	0,64	0,557	87,628
	Nikotin	9	7,97	6,249	78,372	9	6,09	4,773	78,372
	<i>Gesamt</i>	44	5,19	3,634	69,999	61	16,16	27,493	170,113
	SkinEthic	Koffein	10	15,38	4,330	28,156	10	13,94	3,925
Flufenaminsäure		9	14,19	2,854	20,113	9	15,50	3,118	20,113
Mannitol		0	-	-	-	3	0,00	0,000	-
Testosteron		9	11,48	3,050	26,563	9	22,60	6,004	26,563
Benzoessäure		0	-	-	-	10	17,97	4,954	27,571
Clotrimazol		9	2,55	1,866	73,184	9	44,14	32,301	73,184
Digoxin		0	-	-	-	10	2,99	2,057	68,837
Nikotin		8	30,11	12,020	39,915	8	23,00	9,181	39,915
<i>Gesamt</i>		45	14,42	10,306	71,492	68	18,72	17,126	91,473
EPISKIN		Koffein	9	10,47	2,774	26,501	9	9,49	2,515
	Flufenaminsäure	9	8,94	3,374	37,743	9	9,77	3,686	37,743
	Mannitol	0	-	-	-	9	2,08	1,302	62,625
	Testosteron	9	4,23	0,928	21,958	9	8,32	1,827	21,958
	Benzoessäure	0	-	-	-	8	3,60	3,377	93,840
	Clotrimazol	0	-	-	-	0	-	-	-
	Digoxin	0	-	-	-	7	37,11	68,182	183,727
	Nikotin	9	10,86	2,396	22,066	9	8,29	1,830	22,066
	<i>Gesamt</i>	36	8,62	3,609	41,850	60	10,50	24,103	229,504

Mit Ausnahme der lipophilen Substanzen, die HSE 2fach (Testosteron) bzw. 17fach (Clotrimazol) besser permeierten, stimmte die Permeabilität von HSE und Schweinehaut gut überein. Die Ergebnisse bestätigen, dass das

EpiDerm™-Modell die beste Barriere aufweist, die Permeabilität war im Gesamtmittel 5fach höher als bei HSE. Das SkinEthic®-Modell zeigte hingegen die höchste Permeabilität im Verhältnis zu HSE (3fach für Clotrimazol bis 30fach für Nikotin), das EPISKIN®-Modell zeigte eine mittlere Permeabilität. Die Permeabilität der Testhäute lässt sich somit im Allgemeinen wie folgt darstellen: HSE, Schweinehaut > SkinEthic® > EPISKIN® > EpiDerm™.

Trotz der hohen Variabilität der relativen P_{app} -Werte, zeigen die Streudiagramme (P_{app} -Mittelwerte aller Labore), in denen die Permeation bei allen Testhäuten verglichen wird (Abb. 20), eine eindeutige Korrelation der Resultate: r übersteigt den Wert 0,8 außer bei EPISKIN® zu HSE bzw. EpiDerm™. Dies gilt sogar, obwohl vier Substanzen mit problematischen Permeationsverhalten (hohe Hydro-/Lipophilie; Molekulargewicht >700 Da) für diese Untersuchungen eingesetzt wurden.

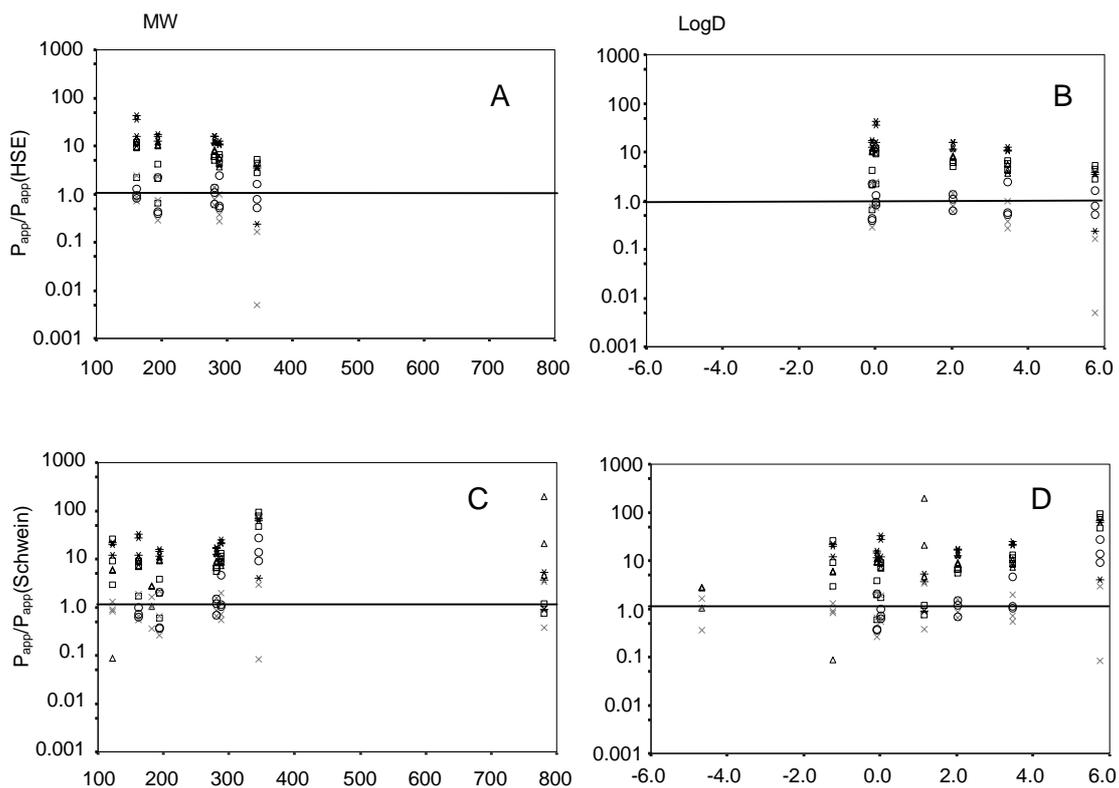


Abb 19: P_{app} -Werte der Testhäute in Relation zu den P_{app} -Werten von HSE (A, B) und von Schweinehaut (C, D); P_{app} -Wert im Mittel = 1
A, C: Einfluss des Molekulargewichts
B, D: Einfluss der Lipophilie
 Δ EPISKIN®; * SkinEthic®; \square EpiDerm™; \circ HSE; \times Schweinehaut

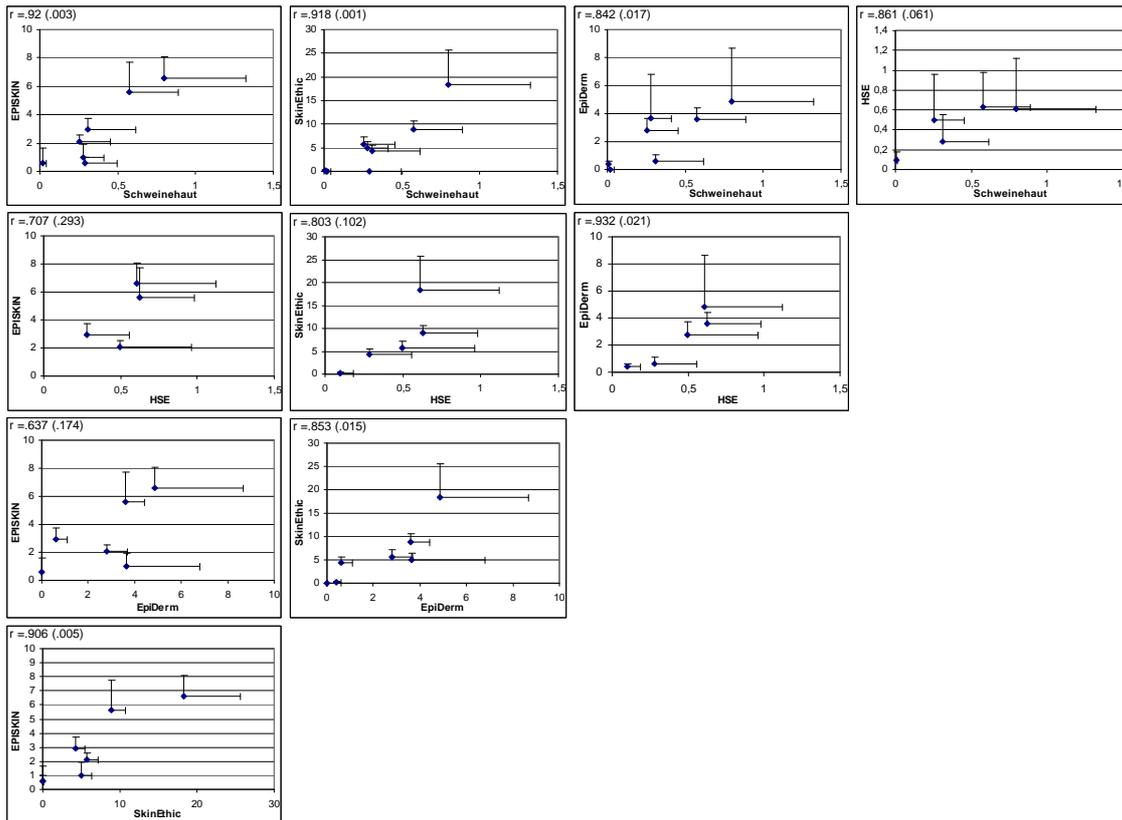


Abb. 20: Korrelationen zwischen den Testhäuten basierend auf den Verhältnissen der P_{app} -Werte (s. Tab. 23): Streudiagramm mit Fehlerbalken und zugehöriger Pearson Korrelationskoeffizient (mit Signifikanzniveau)

Permeation der Testhäute im Vergleich zu *in silico*-Daten. Von der ZEBET und der US wurden die experimentell ermittelten P_{app} -Werte der Testsubstanzen aus den Versuchen mit HSE, Schweinehaut und RHE mit theoretischen P_{app} -Werten verglichen, die auf Grundlage von Molekulargewicht und Lipophilie der Substanzen berechnet wurden (Potts and Guy, 1991; Wilschut et al., 1995). Dabei wurden zunächst die theoretischen P_{app} -Werte mit zwei verschiedenen Programmen (DERWIN- und SKINPERM-Modell) berechnet und verglichen. Die Ergebnisse der mit den beiden Modellen berechneten theoretischen (*in silico*) P_{app} -Werte stimmen gut überein ($r = 0,947$).

Wie allerdings in Abb. 21 dargestellt besteht keine Korrelation zwischen den experimentellen und den theoretischen P_{app} -Werten.

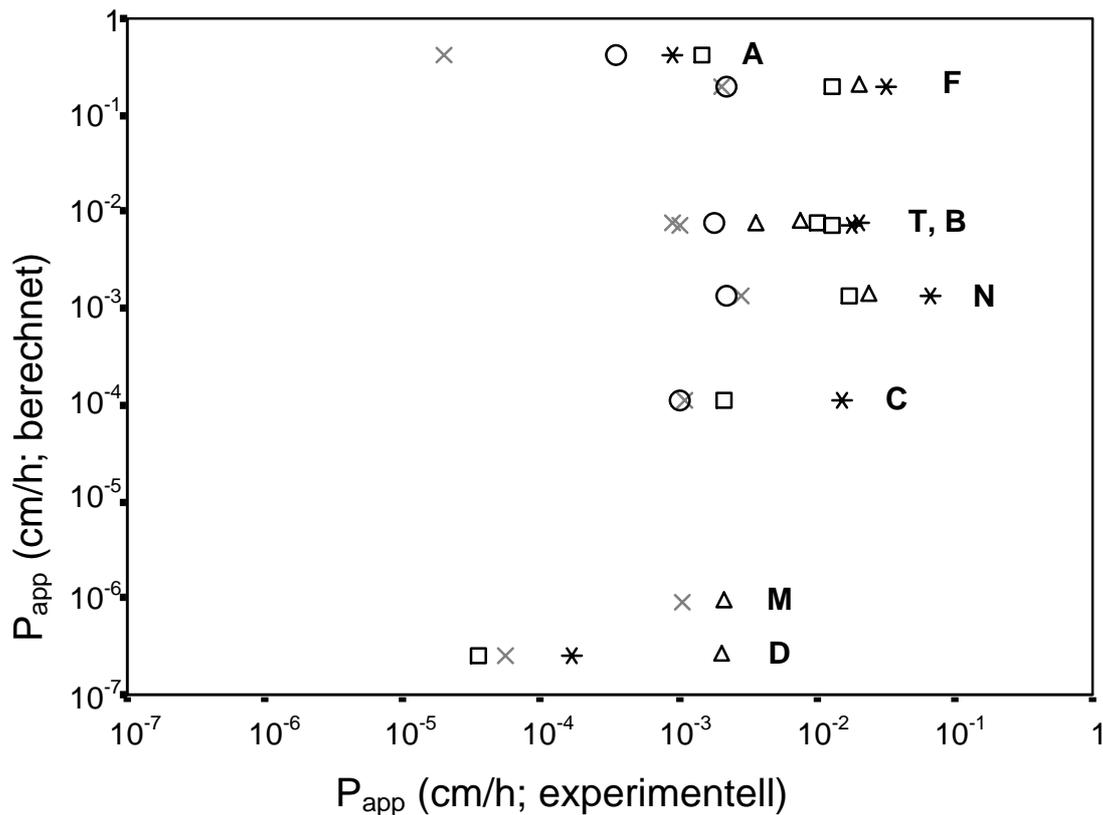


Abb. 21: P_{app} -Werte der Testsubstanzen (A = Clotrimazol; B = Benzoesäure; C = Koffein; D = Digoxin; F = Flufenaminsäure; M = Mannitol; N = Nikotin; T = Testosteron) im Verhältnis zu den theoretisch berechneten auf Grundlage des DERWIN Programms.
* SkinEthic®; Δ EPISKIN®; □ EpiDerm™; ○ HSE; × Schweinehaut

Dies gilt gleichermaßen für alle RHE, HSE und Schweinehaut. Folglich ist die Vorhersagbarkeit nicht nur für die Permeation der RHE, sondern auch für die von der OECD in der Prüfrichtlinie 428 (OECD, 2004b) akzeptierten Testhäute gering. Dazu trägt wesentlich bei, dass die physikochemischen Eigenschaften von vier der neun Substanzen (Digoxin, Ivermectin, Mannitol und Clotrimazol) außerhalb des Spektrums der Eigenschaften der für den Aufbau der Modelle dienenden Substanzen liegen (Wilschut et al., 1995), jedoch korrelieren auch nicht die errechneten P_{app} -Werte mit den experimentellen P_{app} -Werten von Testosteron, Koffein, Benzoesäure, Nikotin und Flufenaminsäure, die in das Substanzspektrum der *in silico*-Modelle passen.

3.4.2 Finite-dose-Experimente

Abb. 22 stellt die penetrierten, permeierten und auf der Haut verbliebenen Substanzmengen der Finite-dose-Experimente aller Partner für Koffein (A) und Testosteron (B) mit HSE, Schweinehaut und EpiDerm™ grafisch dar.

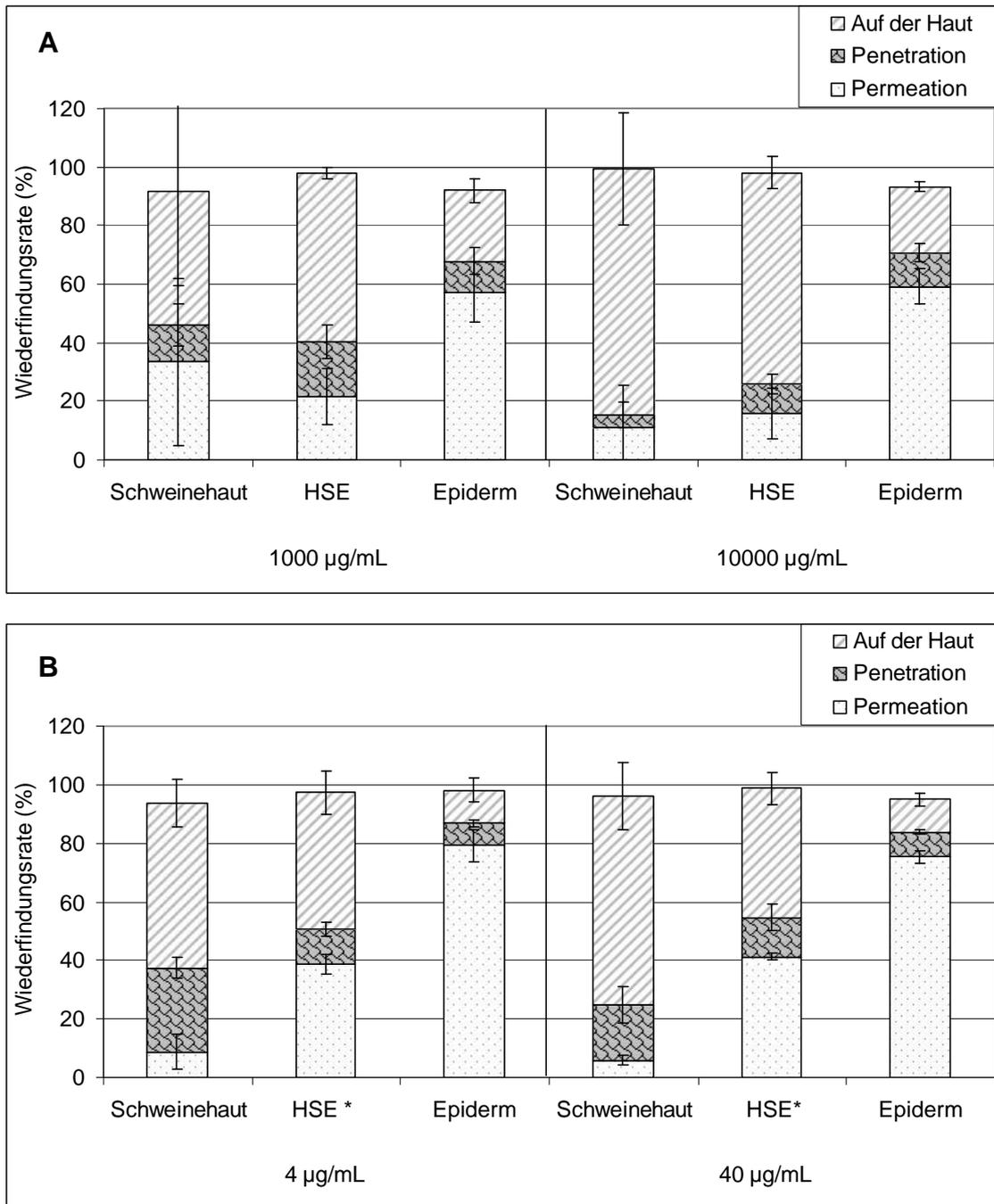


Abb. 22: Penetrierte, permeierte und im Donor verbliebene Menge. Mittelwerte (\pm SD) der Finite-dose-Versuche für (A) Koffein (1000 und 10000 µg/mL) und (B) Testosteron (4 und 40 µg/mL).

* Ergebnisse aus eigenen Untersuchungen

3 Ergebnisse

Auf Grund der reproduzierbaren Ergebnisse und der guten Barriereigenschaften wurde in der Projektbesprechung der ersten Ergebnisse der Validierungsphase das EpiDerm™-Modell als die exemplarische RHE für Finite-dose-Versuche ausgewählt. Versuche mit einer Wiederfindungsrate (Massenbilanz) von $100 \pm 15 \%$ wurden als valide eingestuft. Innerhalb von 6 h überstieg die Permeation beider Substanzen und beider geprüften Konzentrationen durch das EpiDerm™-Modell die von HSE und Schweinehaut. Auch die perkutane Absorption (Permeation + Penetration) übertraf bei Koffein (67,9 % bzw. 70,8 %; Tab. 24) und Testosteron (87,0 % bzw. 83,4 %; Tab. 25) die von HSE und Schweinehaut absorbierten Mengen.

Tab. 24: Penetrierte, permeierte und im Donor verbliebene Koffein-Menge sowie Massenbilanz. Mittelwerte (\pm SD) der Finite-dose-Experimente aller Partner.

Koffein 1 mg/mL		HSE		Schweinehaut		EpiDerm	
		Mittelwert	SD	Mittelwert	SD	Mittelwert	SD
Auf der Haut	Menge (μ g):	10,12	0,33	9,28	6,51	4,25	0,70
	Wiederfindung (%):	57,5	1,9	45,8	32,2	24,1	4,0
Penetration	Menge (μ g):	3,31	1,02	2,55	1,46	1,86	0,80
	Wiederfindung (%):	18,8	5,8	12,6	7,2	10,6	4,5
Permeation	Menge (μ g):	3,80	1,68	6,75	5,81	10,08	1,79
	Wiederfindung (%):	21,6	9,5	33,4	28,7	57,3	10,2
Gesamt	Menge (μ g):	17,23	0,89	18,58	0,39	16,19	0,63
	Wiederfindung (%):	97,9	5,1	91,8	1,9	92,0	3,6

Koffein 10 mg/mL		HSE		Schweinehaut		EpiDerm	
		Mittelwert	SD	Mittelwert	SD	Mittelwert	SD
Auf der Haut	Menge (μ g):	127,08	9,65	156,98	35,93	39,80	2,60
	Wiederfindung (%):	72,2	5,5	83,8	19,2	22,6	1,5
Penetration	Menge (μ g):	17,63	5,90	7,99	8,00	20,19	5,73
	Wiederfindung (%):	10,0	3,4	4,3	4,3	11,5	3,3
Permeation	Menge (μ g):	27,74	15,28	20,82	26,79	104,31	10,61
	Wiederfindung (%):	15,8	8,7	11,1	14,3	59,3	6,0
Gesamt	Menge (μ g):	172,44	11,13	185,78	1,74	164,30	6,90
	Wiederfindung (%):	98,0	6,3	99,2	0,9	93,4	3,9

Die permeierten Mengen (in %) für Koffein und Testosteron aus dem Finite-dose-Donor überstiegen die Permeation (in %) aus dem Infinite-dose-Donor der vorausgegangenen Versuche. Da dies grundsätzlich zutrifft, sind die permeierten Mengen (in %) nicht für einen direkten Vergleich von Finite- und Infinite-dose-Ergebnissen geeignet. Dahingegen zeigen die relativen Anteile der Permeation von Koffein und Testosteron durch die Testhäute aus den Finite-

3 Ergebnisse

dose-Versuchen eine gute Übereinstimmung mit denen unter Infinite-dose-Bedingungen. Ferner war das EpiDerm™-Modell, wie zuvor in den Infinite-dose-Versuchen gezeigt, für Testosteron permeabler als für Koffein. Koffein zeigte vergleichbare Wiederfindungsraten für HSE und Schweinehaut, auch wenn die Daten für Schweinehaut eine hohe Variabilität aufweisen. Die geringere Permeation von Testosteron durch Schweinehaut (8,8 % und 5,9 %) im Vergleich zur HSE (38,7 % bzw. 41,3 %) resultiert aus einer Substanzanreicherung in der Schweinehaut, was die bis zu 2fach höhere Penetration von Testosteron im Vergleich zur HSE (Tab. 25; Abb. 22 B) belegt.

Tab. 25: Penetrierte, permeierte und im Donor verbliebene Testosteron-Menge sowie Massenbilanz. Mittelwerte (\pm SD) der Finite-dose-Experimente aller Partner. Eigene Ergebnisse sind im **Fettdruck** gekennzeichnet.

Testosteron 4 $\mu\text{g/mL}$		HSE		Schweinehaut		EpiDerm	
		Mittelwert	SD	Mittelwert	SD	Mittelwert	SD
Auf der Haut	Menge (μg):	0,03	0,01	0,04	0,01	0,01	0,00
	Wiederfindung (%):	46,8	7,2	56,2	8,1	11,2	4,0
Penetration	Menge (μg):	0,01	0,00	0,02	0,00	0,01	0,00
	Wiederfindung (%):	11,8	2,3	28,6	3,6	7,8	1,2
Permeation	Menge (μg):	0,03	0,00	0,01	0,00	0,05	0,00
	Wiederfindung (%):	38,7	3,3	8,8	5,9	79,2	5,6
Gesamt	Menge (μg):	0,07	0,00	0,07	0,00	0,07	0,00
	Wiederfindung (%):	97,3	4,5	93,6	6,6	98,2	3,6

Testosteron 40 $\mu\text{g/mL}$		HSE		Schweinehaut		EpiDerm	
		Mittelwert	SD	Mittelwert	SD	Mittelwert	SD
Auf der Haut	Menge (μg):	0,31	0,04	0,50	0,08	0,08	0,02
	Wiederfindung (%):	44,1	5,5	71,3	11,5	11,3	2,2
Penetration	Menge (μg):	0,09	0,03	0,13	0,04	0,06	0,00
	Wiederfindung (%):	13,5	4,5	18,8	6,2	8,6	0,6
Permeation	Menge (μg):	0,29	0,01	0,04	0,01	0,51	0,01
	Wiederfindung (%):	41,3	1,1	5,9	1,9	75,3	2,2
Gesamt	Menge (μg):	0,70	0,02	0,67	0,03	0,65	0,01
	Wiederfindung (%):	98,8	2,4	96,1	4,4	95,1	0,8

Die Ergebnisse der Finite-dose-Versuche bestätigen somit die zuvor beschriebenen Barriereigenschaften der Testhäute. Zudem zeigen die beiden geprüften Konzentrationen, die sich um den Faktor 10 unterschieden, eine vergleichbare Substanzverteilung in die Kompartimente Donor, Barriere und Akzeptor. Somit sind Finite-dose-Untersuchungen mit RHE mit dem generierten Versuchsprotokoll möglich.