

4 Diskussion

4.1 Entwicklung und Übertragbarkeit des Testprotokolls

4.1.1 Standardisierung und mögliche Alternativen

Die Durchführung von Permeations- und Penetrationsversuchen *in vitro* mittels der Franz-Diffusionszell-Technik ist weit verbreitet. Die Variationsmöglichkeiten im Versuchsdesign sind daher sehr vielfältig. Darunter zählen z. B. Unterschiede in den verwendeten Franzzellen, in der Versuchsdauer, in den Donor- und Akzeptormedien, in der Aufbereitung und Wahl der Entnahmeregion der eingesetzten Testmatrices sowie schließlich in der Analytik (Schmook, et al., 2001; Suhonen et al., 2003; van de Sandt et al., 2004). Das OECD Guidance Document 28 geht auf eine Reihe dieser Variationsmöglichkeiten ein und gibt für die Durchführung von Versuchen zur kutanen Resorption einen gewissen Rahmen vor. Dennoch wird die Beschreibung des Testverfahrens aber eher allgemein gehalten (OECD, 2003). Dies erklärt sich aus dem Erfordernis, eine verbreitete Anwendung und Akzeptanz von *in vitro*-Testungen zu gewährleisten und so Tierversuche zur kutanen Resorption möglichst zu vermeiden. Allerdings erfordern reproduzierbare Ergebnisse die Bestimmung von Einflussgrößen bzw. den Ausschluss von Fehlern. Der Einfluss der Geschwindigkeit des Rührens in der Akzeptorkammer der Franzzelle auf die Permeation zeigt (Abb. 5, S. 60), wie bereits leichte Veränderung in der Methodik die Permeation beeinflussen können. Ein hoher Grad an Standardisierung des Testprotokolls erleichtert darüber hinaus den – bislang oft nicht bzw. schwer möglichen – direkten Vergleich von Permeationsversuchen in verschiedenen Laboren. Der Ringversuch mittels einer nicht-biologischen Diffusionsbarriere und des photometrisch leicht zu quantifizierenden Farbstoffs Metylenblau unterstreicht dies und belegt zudem den hohen Grad an Standardisierung, der zwischen den Partnerlaboren bereits in der Phase des Protokolltransfers erreicht wurde (Tab. 12, S. 61). Zu diesem Ergebnis kam auch eine internationale Ringstudie, die anhand von Methylparaben nicht-barrierebedingte Einflussgrößen auf die Intra- und Interlaborvariabilität untersuchte. Die Ergebnisse offenbarten signifikante nicht-barrierebedingte Unterschiede in der Permeation von Methylparaben zwischen den beteiligten

Laboren. Die Autoren fordern daher weitere Untersuchungen zur präzisen Beschreibung der Einflussgrößen und halten eine Weiterentwicklung der *in vitro*-Methoden zur perkutanen Absorption für erforderlich (Chilcott et al., 2005). Dieser Forderung wurde hier entsprochen.

Mögliche Alternativen. Die Ergebnisse der Methoden- und Protokollentwicklung zeigen allerdings auch, dass bei einer präzisen Standardisierung des Versuchdesigns durchaus alternative Bedingungen möglich sind, was für eine breite Akzeptanz der Testmethode wichtig ist. Untersuchungen mit statischen und dynamischen Franzzellen führen zu vergleichbaren Ergebnissen (Schreiber et al., 2005), ebenso hat die analytische Auswertung mittels HPLC bzw. LSC keinen nennenswerten Einfluss auf die Permeation (Abb. 9, S. 65). Dabei muss allerdings die Menge an organischem Lösungsmittel, das durch den Zusatz von radioaktiver Stammlösung in den Donor eingebracht wird, so niedrig wie möglich und in Bezug auf das gesamte Lösungsmittel im Donor zu vernachlässigen sein. Bei den hier durchgeführten Versuchen mit Testosteron konnte im Donor ein Gehalt von 0,02 % (v/v) Toluol toleriert werden. Auch wenn auf diesen Sachverhalt bislang in Publikationen und in den OECD-Prüfrichtlinien nicht eingegangen wird, wurde für die Prävalidierungs- und Validierungsphase die Donorzusammensetzung strikt standardisiert. Bei den Substanzen, die sowohl mittels HPLC als auch alternativ mittels LSC in den Partnerlaboren quantifiziert wurden, wurde dem Donor entsprechende Mengen an Lösungsmittel zugesetzt, wenn die Analytik mittels HPLC vorgesehen war. Auf diese Weise waren identische Versuchsbedingungen gegeben und die Resultate waren unabhängig von der Wahl der Analytik.

Mögliche Alternativen im Versuchsdesign ergeben sich bei der Herstellung von Spalthaut mittels Dermatom oder Gefriermikrotom (Abb. 8, S. 64). Die Bedeutung von gleichmäßigen und reproduzierbaren Hautdicken leitet sich direkt aus dem 1. Fickschen Gesetz ab und wird von den Untersuchungen in der Methodenentwicklung bestätigt (Abb. 6, S. 61). Da gewisse Schwankungen in den Hautdicken nicht vollständig auszuschließen sind, wurde im Rahmen dieser Arbeit ein Hautdickenbereich von $1000 \pm 100 \mu\text{m}$ festgelegt und

kontrolliert. Zwar ist, wie hier gezeigt, die Gewinnung von Spalthaut mittels Gefriermikrotom möglich, doch ist die Verwendung des Dermatoms bei Permeations- und Penetrationsversuchen weitaus etablierter.

4.1.2 Donor- und Akzeptormedien

Eine besondere Herausforderung stellt die Wahl der adäquaten Akzeptor- und Donormedien dar, da diese durch den direkten Kontakt mit der Testmatrix nicht nur die Integrität und Viabilität der Haut beeinflussen, sondern auch Einfluss auf die Permeation der Substanz haben. Insbesondere für schwerlösliche Substanzen ist dabei häufig ein Kompromiss zwischen Hautverträglichkeit auf der einen und Löslichkeit der Substanz im Donor- und Akzeptormedium auf der anderen Seite erforderlich, aber oft nicht einfach zu finden. Ethanolische Lösungen können durch Herauslösen von Hautlipiden die Hornschichtbarriere schädigen. Zur Herstellung der Donoren von lipophilen Substanzen erfolgte in dieser Arbeit der Zusatz des Löslichkeitsvermittlers (Tensid) Igepal[®] CA-630 (Nonidet[®]). Zwar erwies sich eine Schaumbildung bei der Herstellung von Donor- und Akzeptorlösungen und Applikation der Donorlösung als nachteilig, doch war hingegen auch für die lipophilen Substanzen das hydrophile PBS als Standardlösungsmittel zugänglich. Auch Igepal[®] CA-630 schädigt RHE, wie eigene Untersuchungen gezeigt haben (Schreiber et al., 2005), allerdings konnte dies durch die Zugabe des Löslichkeitsvermittlers in geringst möglicher Konzentration zum Donor (2 %) und Akzeptor (0,5 % bzw. 0,2 %) der lipophilen Testsubstanzen begrenzt werden. Da ein Einfluss der Mizellbildung auf die Permeation ausgeschlossen wurde (Kaca et al., in press), steht somit der Verwendung von Igepal[®] CA-630 zur Löslichkeitsvermittlung grundsätzlich nichts entgegen.

4.1.3 Hautintegrität

Eine intakte Diffusionsbarriere während des Versuchs ist eine grundlegende Voraussetzung für aussagekräftige Ergebnisse. Daher stellt bei der Definition des Testprotokolls die Etablierung einer Methode zur Bestimmung der Hautintegrität einen wesentlichen Aspekt dar und wird vor Versuchsbeginn gefordert (OECD, 2003). Das OECD Guidance Document 28 empfiehlt die

Bestimmung mittels transepidermalen Wasserverlust (TEWL) bzw. transepidermalen elektrischen Widerstand (TEER). Alternativ kann die Permeation durch Applikation von Tritium markierten Wassers 5 h vor Versuchsbeginn herangezogen werden (OECD, 2003; COLIPA, 1995).

Im Rahmen des Projekts war die Bestimmung der Hautintegrität mittels TEWL geplant, da diese im Gegensatz zu den anderen erwähnten Methoden am wenigsten Gewebe-zerstörend ist. Sowohl der TER als auch die Bestimmung mittels Tritium markierten Wasser erfordern die Applikation von Lösungen. Insbesondere bei lipophilen Zubereitungen ist deren vollständige Entfernung nach Applikation der Testsubstanzen äußerst schwierig, und eine Beeinträchtigung der Hautintegrität durch den Integritätstest selber ist nicht auszuschließen. Die Bestimmung mittels Tritium markierten Wasser erfordert darüber hinaus die Möglichkeit des Arbeitens mit radioaktivem Material, was nicht in jedem Labor möglich ist. Auch ist bei der ausschließlichen Analytik mittels LSC eine Überschätzung an permeierter Menge durch eine Kontamination der Testmatrix mit Tritium nicht auszuschließen. Alle Methoden haben zudem den Nachteil, dass sie nur Aussagen über die Hautintegrität vor Versuchsbeginn, nicht aber während bzw. nach Versuchsende zulassen.

Da sich sowohl der TEWL (Netzlaff et al., 2006a) als auch die von der FU und LMU vorgenommenen Untersuchungen zur Histologie und Viabilität mittels MTT-Test nicht zur Erfassung von Schädigungen in der Barrierefunktion eignen (Schreiber et al., 2005), wurde auf die ursprünglich vorgesehene Bestimmung der Hautintegrität mittels TEWL-Messungen verzichtet. Diese erfolgte darauf hin visuell anhand einer Lupe und durch Prüfung der Testmatrix auf eventuell durchgetretenes Akzeptormedium auf der Haut vor Applikation der Testsubstanzen.

4.1.4 Übertragbarkeit des Protokolls

Der Nachweis, dass das entwickelte Prüfprotokoll in anderen Laboren erfolgreich angewendet werden kann, ist ein wesentlicher Schritt innerhalb eines Validierungsverfahrens. Die ersten Parallelversuche mit Koffein und Testosteron zeigten die erfolgreiche Übertragbarkeit des Protokolls. Zusätzlich diente der Protokolltransfer weiteren Protokollverfeinerungen, insbesondere in

Hinblick auf die Testung weiterer lipophiler Substanzen (standardisierte Hydratisierung der Schweinehaut im jeweiligen Akzeptormedium) und offenbarte erste Tendenzen in Hinblick auf die Barriereigenschaften der Testhäute. So waren die beiden RHE EpiDerm™ und SkinEthic® permeabler als HSE, wobei die Permeabilität von SkinEthic® am stärksten ausgeprägt war.

4.2 Prävalidierung

Die Ausweitung der Anzahl der im Protokolltransfer begonnen Parallelversuche in der Prävalidierung erlaubte präzisere Aussagen über die Streuungen der Permeationsergebnisse in und zwischen den Laboren (Intra- und Interlaborvariabilität) sowie über die Barriereigenschaften der Testhäute und führte ebenso zu abschließender Verfeinerung des Testprotokolls. Bei der Festlegung des Versuchsdesign für die Prävalidierung wurde davon ausgegangen, dass eine Erhöhung der Einzelversuche pro Charge verlässlichere Aussagen über die Streuungen pro Einzelversuch ermöglicht. Daher wurden diese auf mindestens vier Einzelversuche pro Charge festgelegt. Die Anzahl der am Parallelversuch beteiligten Labore wurde zunächst auf 2 begrenzt, da bereits eine solide Grundlage an Permeationsdaten für Koffein und Testosteron aus den vorausgegangenen Versuchen bestand. Nur bei Versuchen mit HSE wurde die Anzahl der am Parallelversuch beteiligten Labore auf drei erhöht, da HSE als „Gold-Standard“ zur Erfassung der humanen Exposition angesehen wird und die Permeationsergebnisse mit HSE höhere Streuungen vermuten ließen. Angesichts der limitierten Größe der Hautstücke wurde ein Einzelversuch mit mindestens 3 anstatt 4 Einzelversuchen pro Charge akzeptiert, um die Durchführung der Versuche nicht zu gefährden. Solche Limitierungen sind bei Versuchen mit RHE-Modellen nicht gegeben, die Zahl der Wiederholungen pro Einzelcharge kann beliebig erhöht werden. Somit bietet RHE eine hohe Flexibilität bei der Versuchsplanung.

4.2.1 Intra- und Interlaborvariabilität

Das auf Basis des OECD Guidance Document 28 (OECD, 2003) entwickelte und verfeinerte standardisierte Testprotokoll reduzierte bei Koffein (Abb. 11, S. 71) und Testosteron (Abb. 12, S. 72) gleichermaßen die Variabilität des

Permeationsverlaufs. Dies zeigte sich auch in allen Permeationsparametern, d. h. den P_{app} -Werten, permeierten Mengen und lag-Zeiten (Tab. 15, S. 73). Bei HSE und den tierischen Häuten war die Intralaborvariabilität wie erwartet am höchsten, am stärksten variierten die mit HSE ermittelten Permeationsparameter. Die geringe Variabilität der Permeationsdaten von RHE ließ eine Verringerung der Anzahl der Einzelversuche bei Versuchen mit RHEs erwarten.

Die niedrige Interlaborvariabilität (sL%) der Daten aus fünf an der Prävalidierung beteiligten Laboren zeigte die Eignung des Protokolls für die abschließende Validierung. Die Ursache des einzigen signifikanten laborabhängigen Unterschieds zwischen den Laboren, d. h. die Abweichungen der Koffein-Permeation bei dem SkinEthic[®]-Modell, konnte nicht geklärt werden. Auf Grund der geringen Interlaborvariabilität (beide Substanzen) bei den Versuchen mit HSE, sollte die Hitzeseparation keinen wesentlichen Beitrag zur gesamten Variabilität der Permeationsdaten beisteuern und die Streuung der Daten in den Versuchen mit HSE vor allem Spender-bedingt sein.

Die Permeabilität von 18 Substanzen (überwiegend Beta-Blocker) über aus Rattenkeratinozyten gezüchteter Kunsthaut und humaner Leichenepidermis zeigten Variationskoeffizienten von 6 bis 83 % bei Testung an dem Hautmodell und 27 bis 92 % bei humaner Epidermis (Suhonen et al., 2003). Allerdings wurden die Untersuchungen nur in einem einzelnen Labor vorgenommen. Bei multizentrischen (10 Labore) Untersuchungen im Rahmen des von der EU geförderten EDETOX-Projekt, das den relativ offenen Vorgaben der OECD-Prüfrichtlinie 428 folgt (van de Sandt et al., 2004) und ebenfalls die Vorhersage der kutanen Aufnahme und damit eine entsprechende Abschätzung von Gefahren für den Menschen aus *in vitro*-Untersuchungen anstrebt, sich aber weder mit Humanhautmodellen befasst noch eine formale Validierung zum Ziel hat, betrug die Interlaborvariabilität des maximalen Fluxes 50 % für Koffein und 109 % bei Testosteron zwischen den neun Laboren, die Versuche mit Humanhaut vornahmen. Dieses Ergebnis ist vermutlich auf die Unterschiede in den Hautdicken der humanen Haut, die sowohl aus kosmetischen Operationen als auch von Leichenhaut gewonnen wurde und zwischen 300 und 1800 μm

variierte, zurückzuführen. Eine weitere Variabilität ergab sich aus der Verwendung von Rattenhaut in einem Labor, was ebenfalls den Vorgaben der OECD-Prüfrichtlinien entsprach. Darüber hinaus unterschieden sich die Dimensionen der Donorkammern der Franzzellen erheblich (van de Sandt et al., 2004).

4.2.2 Barriereigenschaften der Testmatrices

Die RHE erwiesen sich, wie bereits im Protokolltransfer, für Koffein und Testosteron permeabler als humane Haut, Schweinehaut und Rindereuter. Das EpiDerm™-Modell wies unter den drei getesteten RHE die beste Barriere auf. Die P_{app} -Werte für Koffein und Testosteron überstiegen die für HSE berechneten 4fach und 7fach bei EpiDerm™, das EPIKIN®- und SkinEthic®-Modell waren insbesondere für Koffein permeabler. Dies ließ vermuten, dass hydrophile Substanzen die beiden RHE besser permeieren als lipophile. Allerdings steht der vor allem bei der Haut von Pelztieren bedeutende Shunt-Weg über Haarfollikel für die Permeation hydrophiler Substanzen über RHE nicht zur Verfügung. Suhonen et al. beobachteten anhand der 18 Testsubstanzen eine im Mittel 2-3fach höhere Permeabilität des Rattenepidermismodells im Vergleich zu humaner Epidermis, mit einer Spanne von 0,3 für hydrophile Substanzen bis 5,2 für lipophile Substanzen (Suhonen et al., 2003). Insbesondere für Testosteron stimmten die Ergebnisse mit den im Rahmen der Validierungsstudie erhobenen gut überein. So war rekonstruierte Rattenepidermis und die EpiDerm™- und EPIKIN®-Modelle ungefähr 5fach permeabler als HSE. Auch die lag-Zeiten waren bei dem Rattenepidermismodell und den 3 getesteten RHEs gleichermaßen sehr gering, in den Versuchen mit HSE hingegen lang und variabel. Letzteres wurde auch in älteren Untersuchungen beschrieben (Ramsey et al., 1994; Frantz et al., 1995). Die Permeationsuntersuchungen an den beiden tierischen Testmatrices ergaben auch für das Rindereuter eine Tendenz zur Überschätzung der Permeabilität (10,5facher P_{app} -Wert) von Koffein gegenüber humaner Epidermis. Bei Testosteron stimmte dagegen die Permeabilität von Euterhaut und humaner Epidermis überein (relativer P_{app} -Wert: 0,8). Schweinehaut war hingegen für Testosteron deutlich weniger permeabel (relativer P_{app} -Wert: 0,2),

während die Permeabilität für Koffein der von HSE entsprach (relativer P_{app} -Wert: 1,2). Eine höhere Permeabilität des Rindereuters im Vergleich zur Schweinehaut ist auch bei Untersuchungen mit Abamectin beobachtet worden (Baynes, 2004), ein Antiparasitikum, das in der Veterinärmedizin eingesetzt wird.

4.3 Validierung

Zur abschließenden Prüfung auf Verlässlichkeit, die für eine breite Akzeptanz und Anwendbarkeit der Methode essentiell ist, wurde die Anzahl beteiligter Labore nochmals erhöht, wobei auch Partner aus der toxikologischen (BASF AG) und der kosmetischen Industrie (Beiersdorf AG) gehörten. Für die Akzeptanz der Ergebnisse ist dies bedeutend, zumal BDF und BASF *in vitro*-Methoden zur perkutanen Absorption (Testung an Ratten- bzw. Schweinehaut) auf Grund regulatorischer Anforderungen bereits routinemäßig umsetzen. Daher war das Einbringen der spezifischen Expertise in das Projekt durch die Industrie von hohem Stellenwert. An den vorausgegangenen Projektschritten haben diese Firmen ebenso wie die Cognis GmbH nur beratend mitgewirkt. Die Ausweitung der Anzahl der Labore in der Validierungsphase zeigte die Praktikabilität und Anwendbarkeit des Protokolls nach der Neueinführung. Durch die erfolgreiche Übertragung der Methode unter Finite-dose-Bedingungen wurde der wesentlichen Anforderung der Toxikologie entsprochen, dass das Verfahren die Erfassung von Penetration und Permeation unter Expositionsbedingungen erlaubt.

4.3.1 Auswahl der Testsubstanzen

Bei der Ausweitung der Testsubstanzen wurde das Ziel verfolgt, das relevante Substanzspektrum (Chemikalien, Kosmetika, Arzneistoffe) möglichst repräsentativ abzudecken. Daher lag der Auswahl der Testsubstanzen ein breites physikochemisches Spektrum zu Grunde, insbesondere in Bezug auf Molekulargewicht und Lipophilie (Magnusson et al., 2004a; Magnusson et al., 2004b). Um die Zuverlässigkeit der Methode auch unter „Stress-Bedingungen“ zu zeigen, wurden Substanzen eingeschlossen, die ein problematisches Permeationsverhalten vermuten ließen (Kaca et. al., revision). Auf Grund von

Budgetkürzungen von Seiten des Projektträgers konnten allerdings nicht wie ursprünglich geplant 12, sondern nur 9 Substanzen zur Validierung herangezogen werden. Ursprünglich mit vorgesehen waren Estradiol, Salicylsäure und ein weiteres Pestizid. Auf die Salicylsäure konnte durch die Aufnahme der Flufenaminsäure in das Substanzpanel verzichtet werden, die ähnliche physikochemische Eigenschaften aufweist. Erfahrungen aus Permeationsuntersuchungen mit Flufenaminsäure konnten die US einbringen. Da Nikotin bereits im Substanzpanel vorgesehen war, wurde auf die Testung eines weiteren Pestizids/Arzneistoffs verzichtet. Für Estradiol wurde unabhängig von dem BMBF-geförderten Projekt eine kutane Metabolisierung sowie ein endogenes Vorkommen in humaner Haut beschrieben (Mahmoud et al., 2005). Daher wurde das Estradiol generell von den Untersuchungen ausgeschlossen. Der kleinere Stichprobenumfang begrenzt die Generalisierbarkeit der Resultate, daher erscheinen Nachtestungen sinnvoll.

4.3.2 Barriereigenschaften und Permeationsprofile

Testmatrices. Die Ergebnisse der Validierung bestätigen, dass die Barriere von Schweinehaut mit der menschlicher Haut gut vergleichbar ist. Somit wird auch in Zukunft der Schweinehaut für die Prüfung der perkutanen Absorption eine erhebliche Bedeutung als Testmatrix zukommen (Diembeck et al., 1999). Der Forderung des Projektträgers folgend, musste auf das Rindereuter, das bis zur Prävalidierung in die Untersuchungen eingeschlossen war, als weitere Testmatrix verzichtet werden. Da die Ergebnisse der Permeationsuntersuchungen mit dem Rindereuter, die im Rahmen des Projekts erhalten wurden, sich als vielversprechend erwiesen, wurden diese, wie auch die Testung an Rindereuter als Perfusionsmodell, außerhalb des Projekts fortgeführt (Förster et al., 1999; Kietzmann et al., 1993; Netzlaff et al., 2006b; Pittermann and Kietzmann, 2006; Pittermann et al., 1995).

Wie in den Finite-dose-Versuchen und auch in einigen zuvor durchgeführten Studien gezeigt werden konnte, sind RHE, von einzelnen Ausnahmen abgesehen, deutlich permeabler als HSE und Schweinehaut (Mahmoud et al., 2005; Suhonen et al., 2003; Wagner et al., 2002; Wagner et al., 2001). Dieser Unterschied in den Barriereigenschaften wurde bei den getesteten RHE bis

auf einzelne Ausnahmen bestätigt. So war z. B. die Permeation für Mannitol und Clotrimazol bei SkinEthic® geringer als bei HSE und Schweinehaut (Abb. 18, S. 90; Tab. 20 und 21, S. 86 ff). Die höhere Permeabilität der RHE ist möglicherweise in der Morphologie begründet. Eine Hyperproliferation und unzureichende Bildung von essentiellen Fettsäuren und hydrophilen Ceramiden (Ponec et al., 2001) sowie Unterschiede in der Ultrastruktur (Boelsma et al., 2000) im Vergleich zur humanen Haut sind beschrieben. Die Stützmembran bzw. die Trägermatrix haben hingegen keinen Einfluss auf die Barriere der RHE (Dreher et al., 2002b; Lotte et al., 2002).

Die mit RHE ermittelten Permeationsparameter offenbaren unterschiedliche Barriereigenschaften der 3 getesteten RHEs. Während das EpiDerm™-Modell die beste Barriere aufwies, zeigten im Allgemeinen die Testhäute EPISKIN® und vor allem SkinEthic® für die meisten Testsubstanzen eine deutliche höhere Permeation (Tab. 23, S. 93). Ursache könnte eine unterschiedliche Anzahl an lebenden Zellschichten sein. Das Epithel des EpiDerm™-Modells besteht aus 8 bis 12, das des SkinEthic®-Modells hingegen nur aus 5 bis 7 Zellschichten. Auch wurden Unterschiede in der Benetzungsfähigkeit der RHE beobachtet. So war die Hautoberfläche des SkinEthic®-Modells schlechter für hydrophile, das EpiDerm™-Modell schlechter für lipophile Substanzen benetzbar. Solche Effekte wurden mit dem EPISKIN®-Modell hingegen nicht beobachtet.

Testsubstanzen. Die Ergebnisse für Koffein und Testosteron aus der Prävalidierung sind im Wesentlichen in der Validierung bestätigt worden und zeigen eine gute Übereinstimmung mit den mittleren P_{app} -Werten aus Untersuchungen mit Schweinehaut von unabhängigen Arbeitsgruppen (Tang et al., 2002). Die im Vergleich zu der Prävalidierung bis zu 5fach höhere Koffein-Permeation von HSE und Schweinehaut zeigt die große Streuung bei diesen Testmatrices. Dafür ist insbesondere die hohe Streuung in einem einzelnen Labor verantwortlich (Abb. 14, S. 81). Da ein systematischer Fehler durch das standardisierte Testprotokoll und einer vorausgegangenen Schulung der experimentellen Methoden für die in der Validierung hinzugekommenen Partner ausgeschlossen werden kann, sind die Abweichungen eventuell auf die unterschiedliche Beschaffenheit der verwendeten Hautstücke in dem Labor

zurückzuführen. In jedem Fall ist bei der Testung neuer Substanzen eine Standardsubstanz ähnlicher Lipophilie/Hydrophilie, d. h. von Koffein oder Testosteron, mitzuführen, um solche Probleme rechtzeitig zu erfassen.

Entgegen der Erwartungen zeigte Benzoesäure ein inhomogenes Permeationsverhalten, dies überraschte, wurde doch radioaktiv markierte Benzoesäure vielfach für Untersuchungen der perkutanen Absorption eingesetzt (Lotte et al., 2002; Michel et al., 1995; Parry et al., 1990; Schmook et al., 2001; van de Sandt et al., 2004). Zudem lässt die einfache Struktur der Benzoesäure kaum Probleme in der Permeation erwarten. Wie bereits ausgeführt, konnten analytische Schwierigkeiten sowie ein mikrobieller Einfluss auf die extreme Datenvariabilität ausgeschlossen werden, möglicherweise liegt die Ursache in der kutanen Metabolisierung. Gestützt wird diese Vermutung von der Tatsache, dass diese Probleme bei der hier eingesetzten HPLC, nicht aber bei der Analytik mittels LSC auftraten, die nicht zwischen Prüfsubstanz und Metabolit unterscheidet. Allerdings ist eine signifikante metabolische Kapazität der humanen Haut bisher nur für eine begrenzte Anzahl an Substanzen beschrieben, wie für Glukokortikoidester (Feldmann and Maibach, 1969; Gysler et al., 1999; Gysler et al., 1997; Haberland et al., 2003; Haberland et al., 2006) und Estradiol (Mahmoud et al., 2005). Xanthine werden dagegen nur sehr wenig kutan biotransformiert (Schäfer-Korting and Schreiber, 2007; Schreiber, 2006). Die Haut von Nackt-Meerschweinchen (ex vivo) metabolisiert Benzoesäure zu Hippursäure sowie zu einem unbekanntem polaren Metaboliten (7 bis 15 % der applizierten Menge; Bronaugh et al., 1994; Macpherson et al., 1996; Nathan, et al., 1990). Auch nach systemischer Applikation zeigten sich speziesbezogene Unterschiede in der Metabolisierung der Benzoesäure. Während beim Menschen Benzoesäure hauptsächlich als Hippursäure ausgeschieden wird, bildet das Schwein wenig Hippursäure (Bridges et al., 1970). Auch Speziesunterschiede könnten daher zu den hier beobachteten Unterschieden der Permeationskurven gewonnen an Human- und Schweinehaut beitragen. Möglicherweise ist das Phänomen bei den RHE-Modellen auf Grund der kürzeren Versuchsdauer (maximal 8 h) weniger

ausgeprägt. Demnach erscheint Benzoesäure als Referenzsubstanz für Permeationsergebnisse *in vitro* ungeeignet.

Die Permeationsparameter von Nikotin ($\log D = 0,02$) und Flufenaminsäure ($\log D = 2,03$), die alle Testmatrices am besten permeierten, waren insgesamt sehr gut reproduzierbar. Insbesondere Flufenaminsäure könnte somit eine vielversprechende Alternative zur Benzoesäure als Standardsubstanz darstellen, zumal diese ebenso einfach mittels HPLC quantifizierbar ist. Allerdings unterscheidet sich der $\log D$ -Wert von Flufenaminsäure ($\log D = 2,03$) deutlich von dem der Benzoesäure ($\log D = -1,25$), so dass Flufenaminsäure nicht als Standard für hydrophile Stoffe geeignet ist. Das ausgeprägt lipophile Clotrimazol zeigte wiederum ein inhomogenes Permeationsverhalten. Zwar ist auf Grund der Lipophilie eine gute Permeation von Clotrimazol ($\log D = 5,74$) durch das Stratum corneum möglich, allerdings wird der anschließende Stofftransport durch lebende Epidermis und Korium erschwert, die beide wesentlich hydrophilere Kompartimente sind. Dies zeigt die fast nicht quantifizierbare Permeation von Clotrimazol durch Schweinespalthaut.

Ein mindestens ebenso problematisches Permeationsverhalten zeigte das ausgeprägt hydrophile Mannitol ($\log D = -4,67$). Die Permeation war sehr inhomogen, was eine P_{app} -Wert-Berechnung meist ausschloss. Die ausgeprägte Variabilität der Hautpermeation von Mannitol war aus Versuchen an den Matrices humane Haut und den RHE-Modellen EpiDerm™ und EPISKIN® bekannt (Dreher et al., 2002b) und entspricht einer schlecht reproduzierbaren Porenbildung in Phospholipidmembranen (Anezo, 2003). Das Ausbleiben der Permeation bei dem Hautmodell SkinEthic® war überraschend und bleibt letztendlich ungeklärt. Die konstante Permeation durch die Schweinehaut lässt einen Transport von Mannitol durch einen Shunt-Weg vermuten.

Wie erwartet erwies sich Ivermectin in allen Testhäuten als ein „non-permeation“-Marker, die Permeation von Digoxin (MM: 780,9 g/mol) war gering, was ebenfalls im Einklang mit bisherigen Untersuchungen steht (Bos and Meinardi, 2000). Demnach bestehen in Hinblick auf den Einfluss des Molekulargewichts auf die Permeation keine fundamentalen Unterschiede

zwischen den RHE und Human- und Schweinehaut. Damit ist ein wesentliches Qualitätskriterium der RHE erfüllt.

4.3.3 Reproduzierbarkeit in den Partnerlaboren

Die errechneten Werte zur Intra- und Interlaborvariabilität belegen, dass das standardisierte Testprotokoll in den hinzugekommenen Laboren erfolgreich etabliert werden konnte. Die Permeationsergebnisse mit RHE zeigten im Vergleich zu Human- und Schweinehaut zwar eine Tendenz zur geringeren Streuung, dies konnte allerdings statistisch nicht abgesichert werden. Somit wurde die Annahme aus der Prävalidierung, dass die Permeationsdaten mit RHE eine höhere Reproduzierbarkeit aufweisen, nicht endgültig bestätigt. Allerdings trifft dies insbesondere für die Permeationsparameter der Substanzen zu, die bei allen Testhäuten ein inhomogenes Permeationsverhalten zeigten, wie z. B. Mannitol. Ferner sind vermutlich einzelne Lieferungen an RHE von mangelhafter Qualität ursächlich gewesen, zeitweise mussten EpiDerm™-Chargen verworfen werden. Auf der Oberfläche der Häute befindliches Erhaltungsmedium wies auf eine ungenügende Integrität der Häute hin, die zum Teil auch visuell feststellbar war. Da laut Herstellerinformation intakte Chargen versendet wurden, könnten Temperaturschwankungen beim Transport der RHE ursächlich für die mangelnde Qualität gewesen sein. Beim SkinEthic®-Modell traten zeitweise Lieferengpässe auf, mangelhafte Chargen wurden nicht versendet. Positiv hervorzuheben ist die Qualität des EPISKIN®-Kit, die durch eine Verfärbung des Agarosegels bzw. des auf dem Kit angebrachten Temperaturstreifens auf einfache Weise geprüft werden kann. Ferner erfolgte nach Versand jedes EPISKIN®-Kit eine Chargenfreigabe durch den Hersteller per Fax. Um eine mögliche Verfälschung der Testergebnisse auf Grund mangelhafter Chargenqualität zu vermeiden, sind zukünftige Routinetests mit Standardsubstanzen an allen RHEs von entscheidender Bedeutung.

Fasst man alle Ergebnisse der Validierungsphase zusammen, so entspricht die Intra- und Interlaborvariabilität der aus der Prävalidierung. Unterschiede zwischen den Laboren waren auf Grund des unbalanzierten Versuchsdesigns

varianzanalytisch nicht erfassbar. Die gesamte Variabilität der Daten sollte die Situation bei Einsatz der Methode im weltweiten Umfang widerspiegeln.

4.3.4 Vergleich mit *in silico*-Daten und Prädiktionsmodell

Die Vorhersage des Permeationsverhaltens anhand von *in silico*-Verfahren ist angesichts der enormen Vielzahl an Substanzen sehr wünschenswert. Als Grundlage solcher Berechnungen dienen die physikochemischen Parameter, wie der logP (Hydrophilie/Lipophilie) und das Molekulargewicht, also Parameter, die für jede Substanz einfach zu bestimmen sind. Der durchgeführte Vergleich der experimentellen Permeationsdaten mit denen, die auf Grundlage zweier verschiedener Programme berechnet wurden, zeigte allerdings keinerlei Korrelation. Eine mögliche Erklärung ist, dass die *in silico*-Modelle auf Grundlage von Daten erstellt wurden, die aus sehr unterschiedlichen und inhomogenen Versuchsserien stammen, bei denen weder Substanzen mit hohem Molekulargewicht noch extremer Lipo-/Hydrophilie einbezogen wurden. Auch andere Versuche der Vorhersagbarkeit der Permeation von hydrophilen Substanzen oder von Stereoisomeren von NSAID-Glukosiden und Mannosiden anhand *in silico*-Modellen basierend auf dem Zwei-Parameter Fickschen-Diffusionsmodell sind gescheitert (Swart et al., 2005; Tang et al., 2002). *In silico*-Daten können experimentelle Untersuchungen bislang nicht ersetzen. Zur Verbesserung der Vorhersagbarkeit von *in vitro*- und *in silico*-Daten gleichermaßen sind standardisierte Untersuchungen an einem größeren Substanzpanel empfehlenswert.

4.4 Ausblick

Die intensive Auseinandersetzung mit den Vorgaben des OECD Guidance Document 28, das in der Toxikologie Grundlage für eine Vielzahl von regulatorischen Untersuchungen herangezogen wird und den aktuellen Stand der Wissenschaft widerspiegelt, hat die Notwendigkeit einer weiteren erheblichen Standardisierung gezeigt. Den unzureichenden Standardisierungsgrad der Vorgaben der OECD-Prüfrichtlinien bestätigt auch das EDETOX-Projekt eindrucksvoll (van de Sandt et al., 2004). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit können somit für die Durchführung und Planung

zukünftiger Permeations- und Penetrationsstudien von großem Nutzen sein. Die Testung gemäß des hier entwickelten Standardprotokolls und der zugehörigen Standardarbeitsanweisungen (SOPs) kann die Vergleichbarkeit von Ergebnissen, generiert in verschiedenen Testlabors, ermöglichen. Dafür bedarf es des Mitführens von Standardsubstanzen, für die sich vor allem Koffein und Testosteron, nicht aber Benzoesäure eignen. Die konstanten und kurzen Lagzeiten bei Permeationsversuchen mit RHE bieten Vorteile bezüglich der Flexibilität im Versuchsdesign, wie kürzere Versuchsdauern (6 bis 8 h), eine präzisere Festlegung des zeitlichen Probenzugs aus dem Akzeptormedium infolge des raschen Erreichens des linearen Bereich der Permeationskurve sowie eine mögliche geringe Anzahl notwendiger Testchargen als bei der Testung von Human- und Schweinehaut.

Wünschenswert ist ferner die Entwicklung von nicht invasiven und verlässlichen Methoden zur Integritätsmessung. Mit der Entwicklung einer standardisierten Methode zur Berechnung der P_{app} -Werte aus den Permeationsdaten konnten zudem Standards zur Datenermittlung definiert werden, die bisher nicht oder nur unzureichend betrachtet wurden. Dazu zählt gerade beim etablierten Vergleich von Permeationsdaten über den P_{app} -Wert die präzise Definition des linearen Bereichs (Niedorf et al., in press).

Trotz der geringeren Barriereigenschaften der RHE ist, wie gezeigt werden konnte, eine Korrelation der RHE EpiDerm™, SkinEthic® und EPISKIN® zu Human- und Schweinehaut gegeben. Somit erscheint es zukünftig möglich, die geringeren Barriereigenschaften über ein Prädiktionsmodell auszugleichen. Hierfür reichen die erhobenen Daten allerdings noch nicht aus. Auch bisher erarbeitete Modelle sind auf Grundlage inhomogener Datensätze wenig zuverlässig. Allerdings sind die Voraussetzungen geschaffen worden, zukünftig durch Ergänzung der Ergebnisse anhand der Testung weiterer Substanzen auf der Basis der entwickelten, standardisierten Methode, eine ausreichende Datenbasis für ein Prädiktionsmodell zu erstellen.

Wie die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit verdeutlichen, ist der Einsatz von RHE für *in vitro*-Testsverfahren prinzipiell möglich. Um die weltweite Akzeptanz des Verfahrens zu erreichen, müssen die Daten der europäischen

Validierungsbehörde ECVAM für einen peer review vorgelegt werden. Da neben den betriebsinternen Modellen mittlerweile zahlreiche RHE- und Vollhautmodelle kommerziell verfügbar geworden sind, sind auf Grundlage der Ergebnisse und der Beurteilung durch die ECVAM sogenannte „catch-up“-Studien möglich, in denen in einfacher Weise deren Eignung für Permeationsexperimente geprüft werden kann. Die Durchführung auf Basis des erstellten, standardisierten Prüfprotokolls ermöglicht dabei einen direkten Vergleich der Permeationsdaten.