

**Charakterisierung humaner Hautmodelle -
Stabilität und metabolische Kapazität
sowie vergleichende Untersuchungen zur
perkutanen Absorption**

DISSERTATION

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

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

vorgelegt von
Sylvia Schreiber
aus Datteln

Berlin 05/2006

1. Gutachter: Frau Prof. Dr. Monika Schäfer-Korting

2. Gutachter: Herr Prof. Dr. Ralf Stahlmann

Datum der Disputation: 26.07.2006

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

Meinen Eltern
und Angela

DANKSAGUNG

Frau Professor Dr. Monika Schäfer-Korting danke ich sehr herzlich für die Vergabe des interessanten Dissertationsthemas, die wissenschaftlichen Anregungen sowie die stete Gesprächsbereitschaft und ihre Motivationsfähigkeit.

Herrn Professor Dr. Ralf Stahlmann danke ich herzlich für die Erstellung des Zweitgutachtens.

Mein besonderer Dank gilt allen BMBF-Projektpartnern für die Diskussionsbereitschaft und den steten Austausch neuer Erkenntnisse bezüglich der Permeationsuntersuchungen. Insbesondere möchte ich mich hier bei Frau E. Schmidt, ZEBET (BfR), für die Durchführung der ANOVA-Analysen der K_p -Werte, die statistische Auswertung der Streudiagramme und die wertvolle gemeinsame Erarbeitung der Datenanalytik bedanken. Auch Frau Helena Kandarova (ZEBET, BfR) möchte ich für ihre Gesprächsbereitschaft und die Durchführung der Toxizitätstests danken. Herrn Professor Dr. Hans Christian Korting, PD Dr. Martin Schaller und den Mitarbeitern des Elektronenmikroskopischen Labors der Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie des Klinikums der Ludwig-Maximilians-Universität München danke ich für die histologische Inspektion der Haut.

Des Weiteren danke ich Professor Dr. Ingolf Schimke, Medizinische Klinik der Humboldt-Universität zu Berlin, für die Durchführung der Osmolaritäts- sowie LDH- und Lactatmessungen.

Frau PD Dr. Kerstin Danker, Institut für Biochemie und Molekularbiologie, Charité-Universitätsmedizin Berlin, Campus Benjamin Franklin, möchte ich für das zur Verfügung Stellen des Fluoreszenzmikroskops herzlich danken.

Ich danke Herrn Dr. Eule, Herrn Dr. Jung, Herrn Dr. Knoblauch, Herrn Dr. Schildknecht sowie dem Ärzteteam des St. Josphskrankenhauses für das Gewebematerial zur Zellgewinnung. Frau Dr. Kirsch, Herrn Dr. Hesler und Team des Emil von Behring-Krankenhauses Berlin Zehlendorf danke ich für die Überlassung von exzidierte humaner Brust- und Bauchhaut.

Den Mitarbeitern der Lehr- und Versuchsanstalt für Tierzucht und Tierhaltung Ruhlsdorf / Groß Kreutz e.V. sowie der Tierärztlichen Hochschule Hannover danke ich für die bereitwillige Überlassung nicht gebrühter Schweinehaut.

Allen Mitgliedern der Arbeitskreise von Frau Prof. Dr. Monika Schäfer-Korting und Herrn PD Dr. Burkhard Kleuser danke ich für das freundschaftliche Arbeitsklima und die vielen gemeinsamen Unternehmungen. Für mich persönlich sehr wertvolle Freundschaften sind in dieser Zeit entstanden.

Besonders möchte ich hier Frau Dr. Annekathrin Haberland und Herrn Dr. Simone Lombardi Borgia für ihre wissenschaftliche Zusammenarbeit und ständige Gesprächs- und Diskussionsbereitschaft danken. Frau Hannelore Gonska gilt mein Dank für die Hilfe bei der Isolierung und Kultivierung der Zellen.

Originalarbeiten

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

Reconstructed Epidermis versus Human and Animal Skin in Skin Absorption Studies.
Toxicology in Vitro 19, 813-822

Haberland, A., Schreiber, S., Santos Maia, C., Rübhelke, M.K., Schaller, M., Korting, H.C., Kleuser, B., Schimke, I., Schäfer-Korting, M., 2006.

The impact of skin viability on drug metabolism and permeation - BSA toxicity on primary keratinocytes.

Toxicology in Vitro 20, 347 - 354

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

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

Alternatives to laboratory animals: ATLA (im Druck)

Übersichtsarbeiten

Schreiber, S.

Einsparung von Tierversuchen mit Humanhautmodellen

DermoTopics, Ausgabe 2, 2004

Schreiber, S., Kresken, J., Kresken, J.

Nutzen und Risiken von injizierbaren Füllmaterialien zur Hautaugmentation

DermoTopics, Ausgabe 1, 2006

Poster

Schreiber, S., Mahmoud, A., Santos Maia, C., Rübhelke, M.K., Schaller, M., Korting, H.C., Schäfer-Korting, M.

Validation study on percutaneous absorption via human skin models: first results.

DPhG-Jahrestagung, 8. - 11. Oktober 2003, Würzburg

Schreiber, S., Mahmoud, A., Rübhelke, M.K., Schaller, M., Korting, H.C., Schmidt, E., Liebsch, M., Schäfer-Korting, M.

Validation study on percutaneous absorption via human skin models.

Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology 369 (Suppl. 1), 29, 2004

Schreiber, S., Mahmoud, A., Rübhelke, M.K., Schaller, M., Korting, H.C., Schmidt, E., Liebsch, M., Schäfer-Korting, M.

Validation study on percutaneous absorption via human skin models: protocol transfer.

Symposium der DFG-Forschergruppe 463: Targets, Drugs and Carriers. Novel Therapeutic Approaches, 2004, Berlin

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

Prevalidation Study on Testing Percutaneous Absorption via Reconstructed Human Epidermis.

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

Vorträge

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

Validation study on percutaneous absorption via human skin models

ALTEX 21, 3rd issue 2004 (12. Kongress über Alternativen zu Tierversuchen, MEGAT-Jahrestagung, 15. - 17. Oktober 2004, Linz)

Schreiber, S., Haberland, A., Santos Maia, C., Schaller, M., Korting, H.C., Schimke, I., Liebsch, M., Schäfer-Korting, M.

The impact of skin viability on drug metabolism and permeation - Bovine serum albumin toxicity on keratinocytes.

Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology 371 (Suppl. 1), 388, 2005 (46. Frühjahrstagung der Deutschen Gesellschaft für experimentelle und klinische Pharmakologie und Toxikologie (DGPT), 15. - 17. März 2005, Mainz)

Stipendium

Promotionsabschlussstipendium durch das Berliner Programm zur Förderung der Chancengleichheit für Frauen in Forschung und Lehre (Januar - August 2005)

1	EINLEITUNG	1
1.1	Aufbau der humanen Haut	1
1.2	Rekonstruierte Epidermis- und Vollhautmodelle.....	2
1.3	Perkutane Absorption	6
1.4	Matrices für perkutane Absorptionsstudien <i>in vitro</i>	8
1.5	<i>In vitro</i> und <i>ex vivo</i> Hautmodelle.....	9
1.6	Viabilität von Hautmodellen und Keratinozyten unter Einfluss von bovinem Serumalbumin (BSA)....	12
1.7	Apoptose und Nekrose	13
1.8	Caspasen	14
1.9	Signaltransduktion bei apoptotischen Vorgängen	15
1.10	Apoptotische Vorgänge in der Haut.....	16
1.11	Kutaner Metabolismus	17
1.12	Hepatischer und kutaner Xanthinmetabolismus	22
1.13	Metabolische Kapazität von Hautmodellen.....	26
1.14	Fragestellung und Zielsetzung	27
2	MATERIAL UND METHODEN.....	31
2.1	Material.....	31
2.1.1	Geräte.....	31
2.1.2	Reagenzien und Verbrauchsmaterialien.....	32
2.1.3	Nährmedien und Lösungen	37
2.1.4	Lösungen für die Keratinozyten- und Fibroblastenisolierung und deren Behandlung.....	38
2.1.5	Lösungen für die Apoptosebestimmungen	39
2.1.6	Lösungen der Testsubstanzen.....	40
2.1.7	Pufferlösung für die HPLC-Analytik	40
2.1.8	Fixationsmedium nach Karnovsky (pH 7,5)	40
2.2	Gewinnung und Kultivierung primärer kutaner Zellen.....	40
2.3	Kultivierung von Zelllinien.....	42
2.4	Vorbehandlung und Inkubation der Humanhautmodelle.....	42
2.5	Hautgewinnung.....	43
2.6	Untersuchungen zur Viabilität und Integrität rekonstruierter Haut	44
2.7	Viabilitätsuntersuchungen an primären Keratinozyten.....	46
2.8	Untersuchungen zur Zellproliferation.....	48
2.9	Untersuchungen zur Apoptose und Nekrose an primären Keratinozyten	48
2.10	Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC)	51
2.11	Untersuchung des kutanen Xanthinstoffwechsels an primären Keratinozyten und Fibroblasten.....	52
2.12	Untersuchung des kutanen Xanthinstoffwechsels an Humanhautmodellen	54
2.13	Franzzelluntersuchungen	55
2.14	Statistik	58
3	ERGEBNISSE.....	60
3.1	Stabilität humaner Hautmodelle und primärer Keratinozyten gegenüber Medieneinflüssen.....	60
3.1.1	Einfluss von Rezeptormedien auf die Viabilität und Integrität rekonstruierter Haut.....	60
3.1.2	Einfluss von Rezeptormedien auf die Viabilität und Proliferation primärer humaner Keratinozyten.....	63
3.1.3	Beteiligung apoptotischer Prozesse an der durch BSA vermittelten Toxizität auf primäre Keratinozyten	68

3.1.4	Einfluss unterschiedlicher Rezeptormedien auf die Viabilität der humanen endothelähnlichen Zelllinie ECV304	72
3.2	Untersuchungen zum kutanen Metabolismus	73
3.2.1	HPLC-Analytik für Coffein und Theophyllin und deren Metabolite	73
3.2.2	Kutane Metabolisierung von Coffein und Theophyllin	82
3.3	Perkutane Absorption	85
3.3.1	Einflussgrößen der kutanen Permeation	85
3.3.2	Permeabilitäten der verschiedenen Hautmatrices	96
3.3.3	Aussagekraft kutaner Viabilitäts- und Integritätstests für die perkutane Absorption	98
4	DISKUSSION	102
4.1	Stabilität humaner Hautmodelle und primärer Keratinozyten gegenüber Medieneinflüssen	102
4.2	Untersuchungen zum kutanen Metabolismus	107
4.3	Perkutane Absorption	111
4.3.1	Einflussgrößen der kutanen Permeation	111
4.3.2	Vergleich der Permeabilität unterschiedlicher Hautmatrices anhand ihrer Permeationsparameter 116	
4.3.3	Viabilitäts- und Integritätsparameter der Haut	118
4.4	Ausblick	119
5	ZUSAMMENFASSUNG	122
6	LITERATURVERZEICHNIS	130

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ANOVA	analyses of variance
Apaf	Apoptosis-activating-factor
BMBF	Bundesministerium für Bildung und Forschung
BPE	Bovine Pituitary Extract (Rinderhypophysenextrakt)
BSA	Bovines Serumalbumin
Caspase	Cysteiny-Aspartat-spezifische Proteinase
CYP	Cytochrom P
DAPI	4', 6-Diamidino-2-Phenylindol
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
EC	European Commission (Europäische Kommission)
ECVAM	European Centre for the Validation of Alternative Methods
EDTA	Ethylendiamin-N, N, N', N' -tetraessigsäure
EGM	Endothelial cell growth medium (Endothelzellwachstumsmedium)
ELISA	enzyme linked immunosorbent assay
FACS	fluorescence activated cell sorting
FADD	Fas-associated death domain
Fb	Fibroblasten
FBM	Fibroblastenbasalmedium
FGM	Fibroblast Groth Medium (Fibroblastenwachstumsmedium)
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FKS	Fetales Kälberserum
FSC	Forwardscatter (Vorwärtsstreulicht)
FT	full thickness
g	relative Zentrifugalbeschleunigung
hEGF	human epidermal growth factor (humaner epidermaler Wachstumsfaktor)
HEPES	Hydroxyethylpiperazin-N-ethansulfonsäure
HPLC	High Pressure Liquid Chromatography
HSA	Humanes Serumalbumin
IS	Interner Standard

KBM	Keratinocytenbasalmedium
Kc	Keratinocyten
KGM	Keratinocyte Growth Medium (Keratinocytenwachstumsmedium)
K _p	Permeabilitätskonstante
LC	Langerhans-Zellen
LDH	Lactatdehydrogenase
LOD	Limit of detection (Nachweisgrenze)
LOQ	Limit of quantification (Bestimmungsgrenze)
MC	Melanozyten
MEME	Minimum Essential Medium Eagle
MRP	multidrug-resistance-associated proteins
MTT	3-(4, 5-Dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazoliumbromid
MW	Mittelwert; molecular weight (Molekulargewicht)
OECD	Organisation for Economic Co-operation and Development
PBS	Phosphate buffered saline (phosphatgepufferte Kochsalzlösung)
PCD	Programmed cell death
PEG	Polyethylenglykol
PI	Propidiumiodid
REACH	Registration, Evaluation and Authorisation of Chemicals
RT-PCR	Reverse-Transkriptase Polymerase-Kettenreaktion
SC	Stratum corneum
SCCNFP	Scientific Committee on Cosmetic Products and Non-Food Products intended for Consumers
SD	Standard deviation (Standardabweichung)
SSC	Sidewardscatter (Seitwärtsstreulicht)
TEWL	transepidermal water loss (transepidermaler Wasserverlust)
TGF	transforming growth factor
TNF	Tumor necrosis factor
TPA	tissue plasminogen activator
TRAIL	Tumor necrosis factor related apoptosis inducing ligand
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
TUNEL	terminal dUTP-nick-end labelling
1X	1-Methylxanthin
3X	3-Methylxanthin

13X	1,3-Dimethylxanthin (Theophyllin)
137X	1,3,7-Trimethylxanthin (Coffein)
17X	1,7-Dimethylxanthin (Paraxanthin)
37X	3,7-Dimethylxanthin
1U	1-Methylurat
13U	1,3-Dimethylurat
17U	1,7-Dimethylurat
UGT	UDP-Glucuronosyltransferase
VK	Variationskoeffizient
XO	Xanthinoxidase