

4 DISKUSSION

4 DISKUSSION

Im Rahmen der Charakterisierung humaner Hautmodelle hinsichtlich ihrer Qualifizierung als Testmatrix für die Bestimmung der perkutanen Absorption wurde zunächst die Eignung von verschiedenen üblichen Rezeptormedien (OECD, 2003) überprüft und damit die Stabilität der Hautmodelle unter den Bedingungen der Permeationsexperimente untersucht. Aufgrund von Hinweisen auf eine Hemmung der Metabolisierung von Prednicarbat in rekonstruierter Epidermis durch den Zusatz von 5 % bovinem Serumalbumin (BSA) zum Medium (Haberland et al., 2003), welches die OECD als Rezeptormedienzusatz bei der Untersuchung lipophiler Substanzen empfiehlt (OECD, 2003), galt es, insbesondere den Einfluss des Albumins auf rekonstruierte Epidermis und primäre Keratinozyten genauer zu prüfen. Ferner sollte die bislang an Humanhaut noch nicht untersuchte Metabolisierung der OECD-Referenzsubstanz Coffein an humanen kutanen Monolayerkulturen und Humanhautmodellen betrachtet werden. Eine nennenswerte Biotransformation konnte ausgeschlossen werden und zudem - durch Paralleltests mit einem weiteren Xanthin (Theophyllin) - ein Vergleich der metabolischen Kapazität von Monolayerkulturen mit jener der Hautmodelle erfolgen.

Schließlich erfolgten unter Berücksichtigung dieser Resultate Untersuchungen zur perkutanen Absorption mit verschiedenen Hautmatrices, die zur Entwicklung einer besser standardisierten Testmethode führten und unter den einheitlichen Testbedingungen erste vergleichende Aussagen zur Permeabilität exzidierter tierischer und humaner Häute sowie der Hautmodelle erlaubten.

4.1 Stabilität humaner Hautmodelle und primärer Keratinozyten gegenüber Medieneinflüssen

Einem geeigneten Rezeptormedium kommt eine hohe Bedeutung in perkutanen Absorptionsstudien zu, wenn bei diesen der kutane Metabolismus der entsprechenden Substanz in Betracht gezogen werden muss. Beispielsweise beobachteten analog zu unseren Ergebnissen mit Prednicarbat Collier et al. eine verminderte Metabolisierung von Testosteron und Estradiol durch Rattenhaut bei

Verwendung eines Defizienzmediums als Rezeptor (Collier et al., 1989). Sie halten zudem den Zusatz von bovinem Serum als verzichtbar für den Erhalt der Viabilität der Haut. Es schien sogar die Extraktion des Metaboliten Estron aus den Rezeptormediumfraktionen in Estradiolabsorptions- / Metabolisierungsexperimenten zu inhibieren. Auch Bronaugh et al. weisen auf die Bedeutung der Erfassung von Metaboliten bei der Bestimmung der perkutanen Absorption und somit des Erhalts der Viabilität der Haut hin (Bronaugh et al., 1989). Unter Berücksichtigung dieser Beobachtungen und aufgrund der in dieser Arbeit beschriebenen Hemmung der Metabolisierung von Prednicarbat durch 5 % BSA, die durch eine Beeinträchtigung der Viabilität der rekonstruierten Epidermis und der primären Keratinozyten durch das Albumin verursacht wurde, sollte seine Verwendung als Zusatz zum Rezeptormedium in Frage gestellt werden. Konsequenterweise müsste die Empfehlung der OECD (OECD, 2003), 5 % BSA als Zusatz zum Rezeptormedium bei der Untersuchung lipophiler Substanzen in perkutanen Absorptionsstudien zu verwenden, wenn die Viabilität der Matrix von Bedeutung ist, aus dem Guidance Document gestrichen werden.

Einfluss verschiedener Rezeptormedien auf die Viabilität und Integrität rekonstruierter Haut. Der MTT-Reduktionstest am Hautmodell zeigte eine deutliche, aber nicht signifikante Abnahme der Viabilität unter Einfluss der Defizienzmedien, die sich in Anwesenheit von BSA nochmals leicht verstärkte (**Abb. 6**). Da in die Auswertung des MTT-Tests die Viabilität aller Zellschichten eingeht, im Franzzellversuch aber nur die untersten Zellschichten des Hautmodells in direktem Kontakt mit den Medien sind und damit eine Schädigung erfahren können, sollten Untersuchungen mit Primärkulturen eindeutiger Aussagen erlauben (s. unten). Durch erhöhte LDH-Werte bereits nach kurzer Äquillibrierzeit der Hautmodelle mit BSA-haltigem Medium wurde ein Verlust der Membranintegrität zumindest der unteren Zellschichten festgestellt (**Abb. 7**). Des Weiteren wurden in histologischen Untersuchungen schwere morphologische Schädigungen des Hautmodells durch BSA gesehen (**Abb. 8**).

Einfluss von Rezeptormedien auf die Viabilität und Proliferation primärer humaner Keratinozyten. Versuche mit Primärkulturen sollten nun die Hintergründe der Medien- und insbesondere der BSA-bedingten Toxizität genauer aufzeigen, die bei den Hautmodellen beobachtet wurde. Viabilitätsuntersuchungen an primären

Keratinocyten und an rekonstruierter Haut zeigten eine deutlich stärker ausgeprägte Toxizität von BSA bei der Monolayerkultur, was durch einen direkten Kontakt aller Zellen mit den Medien zu erklären ist. Die Toxizität ist nicht einer höheren Osmolarität bedingt durch die relativ hohe Konzentration von BSA geschuldet, und ihr liegt auch kein Assay-bedingtes Artefakt durch Adsorption oder Komplexierung von BSA durch den MTT-Farbstoff zugrunde. Der Verdacht, dass die beobachtete Toxizität von BSA gegenüber humanen Keratinocyten darin begründet liegt, dass es sich um ein tierisches Albumin handelt, widerlegten signifikante Effekte von humanem Serumalbumin in der gleichen Konzentration (**Abb. 10**). Untersuchungen zur Proliferationshemmung von Keratinocyten durch Defizienzmedien und 5 % BSA (**Abb. 11**) bestätigten die Resultate der Viabilitätsversuche. Im Gegensatz dazu stehen allerdings Resultate von Kitano et al.: Verschiedene Fraktionen von bovinem Serum wurden hinsichtlich ihrer wachstumsinhibierenden und -stimulierenden Eigenschaften bei der Kultivierung von Keratinocyten getestet, die am besten wachstumsfördernde Serumfraktion enthielt BSA und die β -Globulinfraktion. Auch kommerziell erhältliches BSA allein förderte das Wachstum der Zellen. Überraschenderweise proliferierten die Zellen im Gegensatz zu unseren Ergebnissen unter beiden Bedingungen, allerdings weniger, wenn dem Medium nur BSA zugesetzt wurde (Kitano et al., 1990).

Unter dem Einfluss von Defizienzmedien und besonders unter Zusatz von BSA lösten sich die Zellen vermehrt von den Kulturschalen ab (**Abb. 12**). Kennzeichen apoptotischer Vorgänge wie 'membrane blebbing' und Ausbildung apoptotischer Körperchen traten insbesondere bei Inkubation mit PBS auf (**Abb. 13**).

Eine Konzentrationsabhängigkeit der BSA-bedingten Reduktion der Viabilität beobachteten auch Erkan et al. bei der Apoptoseinduktion durch BSA an LLC-PK(1)-Zellen (Erkan et al., 2001).

Beteiligung apoptotischer Prozesse an der durch BSA vermittelten Toxizität auf primäre Keratinocyten. Der toxische Einfluss von BSA auf porcine Zellen des proximalen Tubulus (LLC-PK(1)-Zellen), der dosis- und zeitabhängig war (Erkan et al., 2001), wurde über den Fas-FADD-Signalweg vermittelt, während der TNF-1 Signalweg ausgeschlossen werden konnte. Der Fas-FADD-Signalweg kann durch Inhibierung der Caspase 8 unterbrochen werden (siehe **1.9**), was in diesen Experimenten zu einer signifikanten Reduktion der Todesrate der Zellen führte. Bekannt ist, dass der gleiche Signalweg auch an der Apoptoseinduktion bei

Keratinozyten beteiligt ist (Puviani et al., 2003). In den hier beschriebenen Experimenten, bei denen der Zusatz von 5 % BSA zum Medium eine deutliche Abnahme der Keratinozytenviabilität zeigte, hoben allerdings 100 μM des Caspase 8 - Inhibitors Z-IETD-fmk die Toxizität nicht auf (siehe **Abb. 14**). Im Gegensatz zu den Herstellerempfehlungen, für 1×10^6 Jurkat-Zellen eine Konzentration von 1 μl einer 1 mM -Lösung des Inhibitors für eine komplette Inhibierung der Caspase 8 zu verwenden, wurde der Hemmstoff in sehr hohen Konzentrationen von 100 μM eingesetzt, da bei Keratinozyten eine effektive Caspase 8 - Inhibierung nur bei derart hohen Konzentrationen erreichbar ist (Puviani et al., 2003). Der extrinsische, Caspase 8 - vermittelte Apoptosesignalweg kann demzufolge bei der beobachteten BSA-Toxizität ausgeschlossen werden. Auch eine parallel dazu getestete generelle Caspase-Beteiligung an der BSA-Toxizität war auszuschließen, da auch 100 μM des Pan-Caspase-Inhibitors Biotin-VAD-fmk die im MTT-Test beobachtete Viabilitätsreduktion nicht aufheben konnten (siehe **Abb. 14**). Generell eignet sich der MTT-Test zur Bestimmung der Caspase-Beteiligung bei Zelltoxizitätsuntersuchungen (Zhang et al., 2004). Die Tatsache, dass die BSA-verursachte Toxizität im MTT-Test nicht von einer Zunahme apoptotischer Prozesse begleitet wurde (Fehlen von Annexin V - positiven Zellen (**Abb. 15**), Abwesenheit von DAPI - positiven Zellen (**Abb. 16**)), bestätigte die Vermutung, dass die typische Zytokin-vermittelte Apoptose (vermittelt über Caspase 8), die beispielsweise durch einfache Proteinverunreinigungen von BSA verursacht sein könnte, nicht involviert ist.

Generell zeigen Keratinozyten ein ambivalentes und von verschiedenen Faktoren beeinflussbares Verhalten beim Ablauf apoptotischer Vorgänge, beim Phänotyp der Apoptose, d.h. es besteht eine Variabilität bei den typischen Kennzeichen der Apoptose, und bei der Induktion derselben. So beobachteten Jansen et al. bei der Ermittlung der apoptotischen Wirkungen von TRAIL (tumor necrosis factor related apoptosis inducing ligand) einen starken Einfluss der Zellkulturbedingungen auf die Apoptose bei Keratinozyten (Jansen et al., 2003). Undifferenzierte Keratinozyten waren deutlich sensitiver gegenüber der TRAIL-induzierten Apoptose als differenzierte. Die über TRAIL vermittelte Apoptose zeigte keine typische internukleosomale DNA-Fragmentierung (Jansen et al., 2003), was vergleichbar ist mit unseren Beobachtungen - der Nachweis einer typischen DNA-Leiter im Agarosegel war selbst bei den Positivkontrollen nicht möglich (siehe **3.1.3**). Ähnliche Beobachtungen beschrieben auch bereits andere Autoren (Gandarillas et al., 1999;

Lockshin and Zakeri, 2004). Anstelle klarer Fragmente abgebauter genomischer DNA können oft nur Schlieren, verursacht durch das Vorkommen von Keratin, detektiert werden (Jansen et al., 2003). Häufig wurde auch Apoptose mit DNA-Leiternegativen und TUNEL-positiven Ereignissen beschrieben und diskutiert (Gniadecki et al., 1998). Allerdings ist auch das TUNEL-Assay im Falle der Keratinozyten nicht immer ein spezifischer Test für Apoptose und unterliegt oft hohem Hintergrundrauschen (Gandarillas et al., 1999). Daher sind bei Keratinozyten apoptotische Vorgänge schwierig nachzuweisen. Zudem ist die Auslösung der Apoptose bei Keratinozyten nicht mit den klassischen Induktoren wie TNF- α möglich (Bowen et al., 2003; Henseleit et al., 1996). Dies bestätigen auch die eigenen Beobachtungen beim DAPI-Assay (**Abb. 16**), bei dem Fibroblasten als Positivkontrolle dienen mussten. Es gibt mittlerweile zahlreiche Hinweise darauf, dass in Keratinozyten apoptotische Vorgänge und deren morphologisches Erscheinungsbild stark vom Stimulus abhängig sind, der die Apoptose induziert (Gniadecki et al., 1998). Auch müssen die epidermale Differenzierung, die ebenfalls unter Beteiligung von Caspasen abläuft, und die experimentell provozierte Apoptose unterschieden werden (Lippens et al., 2000; Lockshin and Zakeri, 2004). Zusätzlich wurde auch eine Vielzahl Caspase-unabhängiger Zelltodmechanismen u.a. bei Keratinozyten beschrieben (Lockshin and Zakeri, 2004).

Die Diskrepanz zwischen dem BSA-vermittelten Zelltod bei Keratinozyten und LLC-PK(1)-Zellen liegt möglicherweise in ihrer unterschiedlichen physiologischen Funktion und Morphologie begründet. Zellen des proximalen Tubulus kommen physiologischerweise mit Albumin aus dem glomerulären Filtrat (Konzentration von Albumin darin ca. 0,001 % - 0,0135 %) in Kontakt, und es kommt zur Rezeptorvermittelten Endozytose über Cubilin- und Megalinrezeptoren, die im proximalen Tubulus ko-exprimiert werden (Christensen and Birn, 2001). Diese Albumin-Reabsorption verhindert den Verlust großer Mengen des wichtigen Plasmaproteins über den Urin (Brunskill, 1998). Liegt Albumin allerdings im proximalen Tubulus in pathologisch erhöhten Konzentrationen vor, beispielsweise bei glomerulären Erkrankungen, soll Albumin als Signalmolekül die Expression zahlreicher proinflammatorischer Gene induzieren (Brunskill, 1998). So wird auch diskutiert, dass hohe Albuminkonzentrationen im Tubulus zur Entwicklung tubulärer und interstitieller Entzündung und Fibrose führen (Christensen and Birn, 2001). Erkan et al.

beobachteten demgemäß apoptotische Vorgänge an LLC-PK(1)-Zellen erst bei pathologisch hohen Albuminkonzentrationen (0,5 %, 1 % und 2 %).

Keratinocyten hingegen sind physiologischerweise generell nicht in Kontakt mit Serum, sondern nur im Falle eines Verletzungsprozesses der Haut (Henry et al., 2003). Möglicherweise liegt die Ausnahmestellung der Keratinocyten bei apoptotischen Vorgängen im Vergleich zu anderen Zellen darin begründet, dass sie als äußerste Barriere des Körpers, die durch zahlreiche endogene und exogene Faktoren beeinflusst werden, verschiedene protektive Mechanismen besitzen, Apoptose zu verhindern und die strukturelle Integrität der Haut zu bewahren (Henseleit et al., 1996).

Interessant war nun, das Verhalten von Zellen, die physiologischerweise mit hohen Albuminkonzentrationen in Kontakt kommen, gegenüber BSA im MTT-Test zu untersuchen.

Einfluss unterschiedlicher Rezeptormedien auf die Viabilität der humanen endothelähnlichen Zelllinie ECV304. Im Gegensatz zu Beobachtungen in der Literatur, die protektive Effekte von Albumin in physiologischen Plasmakonzentrationen von ca. 3,24 % - 5,17 % gegenüber Endothelzellen beschreiben (Brunskill, 1998; Märkl, 1979), erwiesen sich 5 % BSA gegenüber der hier getesteten endothelähnlichen Zelllinie ECV304 als toxisch (**Abb. 17**). Zoellner et al. zeigten bei Endothelzelllinien und primären Endothelzellen eine Inhibierung der Apoptose durch verschiedene Albumine, z.B. durch BSA in den auch hier verwendeten Konzentrationen (Zoellner et al., 1996). Möglicherweise liegt das differente Verhalten darin begründet, dass ECV304 keine reine Endothelzelllinie ist. Kürzlich wurden Merkmale einer humanen Blasenkarzinomzelllinie auf ihr gefunden, weswegen sie nicht als Modellsystem für Endothelzellen gesehen werden kann (Drexler et al., 2002) und daher eventuell auch konträr auf den Zusatz von 5 % Albumin reagiert.

4.2 Untersuchungen zum kutanen Metabolismus

Mittels Untersuchungen zum kutanen Metabolismus der Xanthine Coffein und Theophyllin konnte die metabolische Kapazität zweier Hautmodelle und Monolayerkulturen sowohl qualitativ als auch quantitativ anhand einer in diesem

Rahmen entwickelten HPLC-Methode zur Auftrennung beider Substanzen und deren Metaboliten miteinander verglichen werden.

HPLC-analytische Auftrennung der Xanthine Coffein und Theophyllin sowie deren Metabolite. Da die Biotransformation der Xanthine Coffein und Theophyllin eng miteinander verknüpft ist und sich zum Teil überlagert (**Abb. 3**), wurde eine HPLC-Methode zur Auftrennung dieser Substanzen, ihrer Metaboliten und des internen Standards 7-(β -Hydroxyethyl)theophyllin, basierend auf einer Methode von Kizu et al. (Kizu et al., 1999b), etabliert. Mit der verwendeten Gradientenmethode war allerdings keine Trennung der strukturell sehr ähnlichen Substanzen Theophyllin (13X) und Paraxanthin (17X) möglich, die sich nur durch die Position einer Methylgruppe unterscheiden (Position 3 bzw. 7) (s. **Abb. 19**). Diese Problematik, nämlich die Interferenz von Coffein-Metaboliten, insbesondere Paraxanthin, mit der Detektion von Theophyllin und seinen Metaboliten, beobachteten bereits mehrere Autoren (Kizu et al., 1999b; Naline et al., 1987; Sarkar et al., 1992) bei der Entwicklung von HPLC-Methoden zur Analytik von Theophyllin und seinen Metaboliten bei Patienten, die Coffein-haltige Nahrungsmittel und Getränke konsumieren. Mit Hilfe einer isokratischen Eluierung gelang schließlich die Separierung von 17X und Theophyllin (s. **Abb. 20**). Die im Anschluß durchgeführten Metabolisierungsuntersuchungen ergaben jedoch, dass 17X weder in Primärkulturen noch in den untersuchten Hautmodellen als Metabolit auftrat (siehe unten). Daher wurde im Folgenden nur die Gradientenmethode angewendet, da mit Hilfe dieser Methode Coffein, das eine relativ hohe Retentionszeit aufwies, präziser eluiert werden konnte (siehe **Abb. 19** und **Abb. 20**).

Kutane Metabolisierung der Xanthine Coffein und Theophyllin. Coffein, das über den gleichen Enzymweg (CYP-Isoform CYP2E1) in der Leber zum Hauptmetaboliten 17X (80 %), zu 12 % zu Theobromin und nur zu 7 % zu Theophyllin metabolisiert wird, wurde in primären Keratinozyten nur zu Theophyllin abgebaut, das in primären Fibroblasten weiter (ebenfalls über CYP2E1) zu 13U verstoffwechselt wurde (s. **Tab. 9**). Die Metabolisierung in den Hautmodellen, die bisher wie auch jene an Humanhaut noch nicht untersucht wurde, zeigte ähnliche Metabolitenmuster wie die entsprechenden primären Hautzellen: Das ausschließlich aus Keratinozyten bestehende Epidermismodell metabolisierte Coffein zu Theophyllin, das zusätzlich aus Fibroblasten aufgebaute Vollhautmodell zeigte eine weitere Verstoffwechslung

zu 13U (s. **Tab. 10**). Auch quantitativ war die Metabolisierung in Primärkulturen und den Hautmodellen ähnlich und lag generell unter 1 %. Im Gegensatz dazu konnte von anderen Forschungsgruppen keine Coffein-Metabolisierung an Fibroblastenkulturen menschlichen Ursprungs nach 24-stündiger Inkubation mit dem Xanthin festgestellt werden (Tu et al., 1982). Allerdings lag bei diesen Versuchen Coffein in Konzentrationen von 5×10^{-6} M - 5×10^{-3} M vor. Bei den hier durchgeführten Untersuchungen wurden die Inhalte mehrerer Zellkulturflaschen nach der Inkubationszeit vereinigt, extrahiert und anschließend eingeeengt, um beim Nachweis der Metaboliten sicher über der Bestimmungsgrenze von 5×10^{-6} M zu liegen. Möglicherweise wurde diese Bedingung von Tu et al. nicht erfüllt. Die enzymatische Ausstattung von Fibroblasten (CYP2E1; siehe **Tab. 2**) ist nämlich in Übereinstimmung mit der von uns beobachteten Metabolisierung. Bronaugh et al. fanden nach topischer Applikation von Coffein auf exzidierte Rattenhaut keinen Coffeinabbau (Bronaugh et al., 1989). Dieses zu unseren Untersuchungen widersprüchliche Ergebnis könnte in einer anderen Enzymausstattung bei dieser Spezies begründet sein (siehe Unterschiede beim humanen und tierischen kutanen Metabolismus unter **1.11**) oder Folge der generell in Haut im Vergleich zu Primärkulturen oder Hautmodellen geringeren Biotransformationsrate (weitere Ausführungen dazu siehe unten) sein - neben einem möglichen Unterschied in der Sensitivität der HPLC-Methode (s. die generell sehr niedrigen Metabolitenmengen (**Tab. 9** und **Tab. 10**)).

Eine Theophyllinmetabolisierung zu 13U konnte nur in primären Fibroblasten oder im Vollhautmodell EpiDerm™-FT nachgewiesen werden (s. **Tab. 9** und **Tab. 10**). Die Metabolitenmuster der 2D-Kulturen entsprachen also wiederum jenen der 3D-Modelle. Keratinozyten scheinen demnach, obwohl sie CYP2E1 bilden, nicht in der Lage zu sein, Theophyllin zu hydroxylieren. Dies ist in Übereinstimmung mit unseren Beobachtungen bei der Biotransformation von Coffein, auch dort fand eine Verstoffwechslung des 1. Metaboliten Theophyllin nur in Fibroblasten und dem Vollhautmodell statt. Weitere enzymatische Abbauege von Theophyllin wie in der Leber (siehe **Abb. 3**) wurden aufgrund der enzymatischen Ausstattung kutaner Zellen (siehe **Tab. 2**) nicht erwartet und sind in unseren Versuchen auch nicht aufgetreten.

Entsprechende Untersuchungen an kutanen Primärkulturen oder an Hautmodellen finden sich bisher nicht in der Literatur. Lediglich der Theophyllinmetabolismus an

humaner Spalthaut wurde untersucht (Ademola et al., 1992) und zeigte neben 13U überraschenderweise auch eine Biotransformierung zu 3X und 1U, obwohl die entsprechenden Enzyme (CYP1A2), die zumindest für die Bildung von 3X erforderlich sind, in kutanen Zellen nicht nachgewiesen werden konnten. Erst kürzlich wurde ein Hinweis veröffentlicht, dass CYP1A2 möglicherweise doch in differenzierenden Keratinozyten und in humaner Epidermis exprimiert wird (Du et al., abstract online verfügbar), was die Beobachtungen von Ademola et al. erklären würde.

Theophyllin zeigte in unseren Untersuchungen sowohl in Primärkulturen (dermale Fibroblasten) als auch im Vollhautmodell eine im Vergleich zur Humanhaut (Ademola et al., 1992) unerwartet niedrige Biotransformationsrate (ca. 0,2 % respektive ca. 0,06 %). Die Gesamtmetabolisierungsrate in der Matrix Humanhaut lag bei 0,2 - 4,6 % (Ademola et al., 1992). Grundsätzlich zeigt Humanhaut nämlich eine im Vergleich zu primären Keratinozyten in Kultur und Humanhautmodellen geringere metabolische Kapazität, da die Haut wesentlich weniger mitochondriale Proteine exprimiert (Gazel et al., 2003).

Generell ist der Metabolismus einer Substanz in der Haut geringer als in der Leber, da für eine Reihe von Verbindungen die Hepatozyten wesentlich stärker als Hautzellen die Enzyme des Fremdstoffwechsels exprimieren (Ademola et al., 1992; Bronaugh et al., 1989). Daher richteten viele Autoren ihre Erwartungshaltung bei der Untersuchung des kutanen Metabolismus entsprechend des Lebermetabolismus der Substanz aus. So gehen Bronaugh et al. beispielsweise davon aus, dass eine niedrige Stoffwechselrate in der Leber wie im Falle von Coffein sehr oft prädiktiv für die Abwesenheit einer messbaren Metabolisierung im Rahmen der kutanen Permeation sein kann (Bronaugh et al., 1989). Aus diesen Gründen erschienen nach Betrachtung der geringen Metabolisierung sowohl von Coffein als auch von Theophyllin in den metabolisch verhältnismäßig aktiveren Matrices (die Biotransformationsrate lag bei beiden Xanthinen sowohl in Primärkulturen als auch bei den Hautmodellen immer unter 1 %) weitere Untersuchungen an exzidiierter Humanhaut verzichtbar.

Folglich ist bei der Untersuchung der perkutanen Absorption mit der OECD-Referenzsubstanz Coffein nicht mit Verfälschungen der Permeationsraten durch Biotransformation der Muttersubstanz zu rechnen.

Durch Untersuchung von Substanzen, die Substrate anderer in der Haut exprimierter CYP-Systeme sind, sollte geprüft werden, ob generell der oxidative Metabolismus dort sich auf wenige % der Dosis beschränkt. In diesem Fall erscheint eine noch stärkere Nutzung dieses Applikationsweges für Pharmaka mit ausgeprägtem First-pass-Effekt infolge starker Metabolisierung in Darm und Leber bedenkenswert.

4.3 Perkutane Absorption

4.3.1 Einflussgrößen der kutanen Permeation

In diesem Teil der Arbeit wurden die Versuchsbedingungen für Permeationsuntersuchungen durch Analyse verschiedener Einflussgrößen einheitlich festgelegt und optimiert.

Versuchsprotokoll. Der Vergleich des statischen und dynamischen Versuchsaufbaus zeigte keinen Unterschied zwischen den beiden Franzzelltypen (**Abb. 24**). Fast identische Kurvenverläufe, unabhängig vom Franzzelltyp, wurden auch von Bosman et al. und Van de Sandt et al. beobachtet (Bosman et al., 1998; van de Sandt et al., 2004). Die systematische Variation der Versuchsbedingungen zeigt deutlich das bereits von Bosman et al. angesprochene Risiko, bei Versuchen mit hydrophilen Substanzen wie Coffein, die keine Löslichkeitseinschränkungen zeigen, die sink-Bedingungen zu verletzen, wenn der Flux hoch ist. Abnehmende Permeation mit fortschreitender Inkubationszeit ist ein Zeichen für fehlende sink-Bedingungen, eine sehr sorgfältige Kontrolle der Ergebnisse ist dringend angezeigt. Bei den Untersuchungen mit synthetischen Membranen ist die Abflachung der Permeationskurve mit ihrer hohen Durchlässigkeit und vermutlich einer dadurch bedingten Verarmung der Substanz im Donormedium zu erklären. Anders als biologische Matrices wie Hautmodelle, die eine deutlich bessere Barriere aufweisen, sind synthetische ungeeignet für Permeationsuntersuchungen zur Charakterisierung der substanzeigenen Permeation (Takahashi et al., 2002).

Rezeptormedien. Die Auswahl eines geeigneten Rezeptormediums für Permeationsuntersuchungen ist bei schwerlöslichen, lipophilen Substanzen kritisch, da diese ohne Zusatz eines Lösungsvermittlers früh an die Grenzen ihrer

Sättigungslöslichkeit stoßen. Die OECD macht ihre Empfehlungen für Rezeptormedien abhängig von dem Ziel der perkutanen Absorptionsuntersuchung: soll die metabolische Aktivität der Haut erhalten bleiben, ist also die Viabilität von Bedeutung, sollen bei lipophilen Substanzen Zusätze wie 5 % bovines Serumalbumin (BSA) oder 6 % Polyethylenglycol (PEG) verwendet werden. Ist nur Penetration oder Permeation von Interesse, können organische Lösungsmittel wie Ethanol oder ebenfalls 6 % PEG unter Gewährleistung des Erhalts der Integrität der Haut dem Medium zugesetzt werden (OECD, 2003).

Da im Falle des hydrophilen Coffein keine Verbesserung der Löslichkeit im Rezeptormedium durch BSA-Zusatz zu erwarten ist, konnte mit dieser Substanz überprüft werden, ob sich Albumin auf die Permeabilität des Hautmodells auswirkt. Dies war nicht der Fall (**Abb. 25**); der schädigende Effekt von BSA auf rekonstruierte Haut (siehe Abschnitt **3.1.1** und **4.1**: Reduktion der Viabilität im MTT-Test, Anstieg der LDH-Aktivität im Medium und histologische Befunde) scheint sich also nicht auf deren Permeabilität auszuwirken. Dies lässt sich mit der vernachlässigbar geringen Metabolisierung von Coffein in Kunsthaut erklären (siehe **3.2.2**). Im Gegensatz dazu unterliegt der lipophile Diester Prednicarbat einer ausgeprägten kutanen Metabolisierung. Daher hemmt BSA durch Beeinflussung der Viabilität der Haut die Metabolisierung von Prednicarbat und damit indirekt auch die Permeation der Substanz (siehe **4.1**).

Die Verwendung von 0,5 % des Lösungsvermittlers Igepal[®] CA-630 im Rezeptormedium, die ebenfalls deutlich die Viabilität der Haut reduzierte, beeinflusste dagegen auch die Coffeinpermeation - dies zeigte sich in einem inkonsistenten Permeationsmuster. Da der Lösungsvermittler nicht zu einer konstanten Erhöhung der Permeabilität der Haut für Coffein führte, schädigte Igepal[®] die Integrität der Haut nicht gleichermaßen wie ihre Viabilität. Die Ergebnisse schlossen den Zusatz von Igepal[®] zum Rezeptormedium für weitere Versuche aus und weisen darauf hin, dass die Integrität der Haut großen Einfluss auf deren Permeationsverhalten hat. Damit kommt der von der OECD (OECD, 2003) geforderten Erfassung der Integrität der Hautmatrices größte Bedeutung zu.

Einfluss der Donormedien auf die Permeation und Viabilität / Integrität der Haut. Eine heikle Frage ist die Auswahl eines Donormediums insbesondere bei der Testung lipophiler Substanzen. Um eine Lösung lipophiler Substanzen in wasserbasierten Lösungsmitteln zu ermöglichen, müssen Lösungsvermittler

eingeführt werden. Mit steigenden Konzentrationen kommt es allerdings zu einer Interferenz mit der hochgeordneten interzellulären Lipidstruktur des Stratum corneum (Krishnaiah et al., 2002) und folglich zu einer Schädigung der Barriere (Goto et al., 1993; Levang et al., 1999). Dies muß beim Vergleich verschiedener Hautmatrices hinsichtlich ihrer Eignung für Permeationsversuche sorgfältig beobachtet werden; eventuell müssen Kompromisse zwischen ausreichender Löslichkeit der Substanz und gleichzeitig noch genügender Viabilität der Haut geschlossen werden. Die Untersuchung des hydrophilen Coffein, dessen Permeation nur durch eine Schädigung der Integrität der Testmatrix durch den Lösungsvermittler beeinflusst werden kann, eignet sich, um die Wirkung von Igepal® auf die Hautbarriere zu untersuchen. Die Permeation von Coffein veränderte sich unter dem Einfluss von 2 % Igepal® im Donormedium nicht signifikant (**Abb. 26** und **Abb. 27**) und die Schädigung der Haut war weniger schwerwiegend als bei Zusatz des Lösungsvermittlers zum Rezeptormedium (**Tab. 11**). Auch unter Berücksichtigung der 24 h-Viabilitätsdaten bei optimalen Inkubationsbedingungen (Exposition der Hautmodelle mit Kulturmedium im Hautkultureinsatz), erscheint der Zusatz von 2 % Igepal zum Donormedium zum Erreichen adäquater Löslichkeit bei Verwendung lipophiler Substanzen möglich. Ob angesichts der im Folgenden begrenzten Versuchsdauer bei Permeationsversuchen an Hautmodellen (siehe **3.3.2**) auf 8 h Igepal® in höherer Konzentration einsetzbar ist, bleibt weiteren Prüfungen vorbehalten. In jedem Fall kann davon ausgegangen werden, dass 2 % Igepal® im Donormedium bei dem hier untersuchten Hautmodell EpiDerm™ nicht zu einer derart starken Reduktion der Integrität und Viabilität führen wird. Für Hautmodelle anderer Art muß die Igepal®-Resistenz erneut getestet werden.

Einfluss der Behandlung sowie der Entnahmeregion humaner Haut auf ihre Permeabilität. Vergleichende Permeationsuntersuchungen von Coffein über humane hitzeseparierte Epidermis und Vollhaut, ermittelt jeweils an der Haut desselben Spenders, ergaben keine signifikanten Unterschiede in den Permeationskurvenverläufen (**Abb. 28**). Die Ergebnisse stimmen mit den Beobachtungen von Cross et al. überein, die zeigten, dass Substanzen mit niedrigem logP-Wert, zu denen auch die hier untersuchte Substanz Coffein gehört, einen hohen Flux in der Dermis aufweisen (Cross et al., 2003). Auch in ihren Untersuchungen war die Permeabilität von hitzeseparierter humaner Epidermis ähnlich mit der von

Vollhaut. Als wesentliche Barriere für hydrophile Stoffe ist demnach das Stratum corneum zu betrachten.

Ein Vergleich der Permeationskurven von Coffein ermittelt an humaner Vollhaut aus Brust- oder Bauchregion zeigte keine Abhängigkeit der Permeabilität von der anatomischen Entnahmeregion (**Abb. 29**). Körperregionabhängige Unterschiede in den Permeationsraten wurden hingegen in *in vivo* Untersuchungen mit Hydrocortison (Feldmann and Maibach, 1969), 4-Cyanophenol und Cimetidin (Tsai et al., 2003), Benzoessäure und deren Natriumsalz, Acetylsalicylsäure sowie Coffein (Rougier et al., 1987) festgestellt. Allerdings korrelierte weder die Anzahl der Zellschichten noch die Dicke des Stratum corneum mit den beobachteten Permeabilitätsunterschieden (Tsai et al., 2003). Möglicherweise führen Unterschiede in der Haarfollikelgröße und -verteilung in verschiedenen Körperregionen zu abweichenden Absorptionsraten (Otberg et al., 2004). Dies könnte auch der Grund für die in unseren Untersuchungen mit Haut aus Regionen mit vergleichbarer Haarfollikeldichte festgestellten vergleichbaren Permeationsraten sein. Ähnliche Permeationskoeffizienten an humaner Leichenhaut selbst aus morphologisch so unterschiedlichen Regionen wie Fußsohle, Brust, Oberschenkel oder Abdomen ergaben Untersuchungen von Roy et al., die diese Auswirkung mit den lipophilen Substanzen Fentanyl ($\log P = 4,144$) und Sufentanil ($\log P = 3,382$) prüften (Roy and Flynn, 1990). Unter Berücksichtigung der Follikelverteilung würde dies den Einsatz humaner Haut verschiedener anatomischer Herkunft erlauben, was sich aufgrund der ohnehin schlechten Verfügbarkeit dieser Matrix als vorteilhaft für Permeationsuntersuchungen erweist.

Einfluss des Zustandes der Haut. Die Permeation von Coffein über humane hitzeseparierte Epidermis erwies sich zudem als altersunabhängig (**Abb. 30**). Ebenfalls keine Korrelation der K_p -Werte mit dem Alter des Spenders beobachteten auch Bronaugh et al. und Roy et al. (Bronaugh et al., 1986; Roy and Flynn, 1990). Hingegen zeigten Salicylate eine erhöhte Permeation über die Haut älterer Menschen (Merk, 1989), die von Roskos et al. festgestellte verminderte Permeation von Coffein (generell von hydrophilen Substanzen) über gealterte Haut im Gegensatz zur unveränderten Permeation lipophiler Stoffe wurde mit einem abnehmenden Gehalt der Oberflächenlipide bei älterer Haut begründet, der die Permeation hydrophiler Stoffe reduzieren sollte. Die reduzierte Hydratation des Stratum corneum sollte diesen Effekt für hydrophile Substanzen verstärken (Roskos et al., 1989). Da die in unseren Versuchen verwendete hitzeseparierte Epidermis vor Versuchsbeginn

im Rezeptormedium (PBS-Puffer) hydratisiert wurde, und auch während des Versuchs eine ständige artifizielle Befeuchtung die reduzierte Hydratation des Stratum corneum aufheben sollte, entfallen bei unseren Untersuchungen möglicherweise die Voraussetzungen für eine unterschiedliche Permeation. Des Weiteren sollte noch erwähnt werden, dass sowohl die Beobachtungen von Merk et al. als auch die von Roskos et al. aus *in vivo* Studien stammen.

Weder im Falle von humaner noch von porciner Haut beeinflusste die Kryokonservierung bei -20°C über mindestens 24 h und maximal 6 Monate die Permeabilität der Matrix signifikant (**Abb. 31**). Zu diesem Ergebnis kamen auch Bronaugh et al., die die K_p -Werte von tritiiertem Wasser an kryokonservierter und nicht-gefrorener Humanhaut bestimmten. Eine Lagerung der Haut bei -20°C für bis zu 1 Jahr führte zu keiner Veränderung der Wasserpermeabilität im Vergleich zu frischer Haut (Bronaugh et al., 1986). Ebenfalls keinen signifikanten Permeabilitätsunterschied für tritiiertes Wasser zeigte für bis zu 466 Tage bei -20°C gelagerte Haut und frische Haut (Harrison et al., 1984). Ein Grund für unsere Ergebnisse ist sicherlich die vernachlässigbar geringe Metabolisierung der hier untersuchten Testsubstanz Coffein (s. **3.2.2**). Kryokonservierte Haut, die sich als praktikabler für Absorptionsstudien erweist, konnte daher für alle weiteren Untersuchungen verwendet werden.

Einfluss der anatomischen Entnahmeregion porciner Haut. Der Vergleich der Permeation von Coffein über porcine Rücken- mit der über Bauchhaut zeigte eine tendenziell, allerdings nicht signifikant höhere Permeabilität der Bauchhaut (**Abb. 32**), die auf die stärkere Ausprägung des Stratum corneum der Rücken- im Vergleich zur Bauchhaut zurückzuführen sein könnte (**Abb. 33**). Über die regionale Variation der perkutanen Absorption beim Schwein ist bisher wenig bekannt (Simon and Maibach, 2000). Die meisten Studien zur perkutanen Permeation an porciner Haut wurden jeweils mit Haut nur einer Region durchgeführt, jedoch ohne Erklärung, warum diese Region gewählt wurde (Simon and Maibach, 2000). Eine vergleichende Studie an Haut aus der Rücken-, Schulter- und Gesäßregion des Schweines ist auf die kutane Enzymverteilung beschränkt (Meyer and Neurand, 1976). Der in dieser Arbeit durchgeführte Vergleich zeigt zwar im Falle von Bauch- oder Rücken- Haut keinen experimentell bedeutsamen Unterschied, deutet allerdings darauf hin, dass porcine Haut einer bestimmten Entnahmeregion für Permeationsstudien eingesetzt werden sollte, um die Reproduzierbarkeit der Daten durch Reduktion der

biologischen Variabilität zu erhöhen. So wurde in unserem Fall in allen weiteren Versuchen mit Schweinehaut Haut aus der Rückenregion verwendet.

4.3.2 Vergleich der Permeabilität unterschiedlicher Hautmatrices anhand ihrer Permeationsparameter

Beim ersten Vergleich der Permeabilitäten der untersuchten Hautmatrices konnte nach der Bestimmung der 'Lag'-Zeiten die jeweils erforderliche Versuchsdauer festgelegt werden. Kurze und konstante 'Lag'-Zeiten und dadurch mögliche kurze Versuchszeiten bei den Hautmodellen erweisen sich als vorteilhaft für die Routinetestung der perkutanen Absorption. Die bei den Hautmodellen beobachtete höhere Permeation (**Tab. 12**) und die daraus folgende Überschätzung der perkutanen Absorption bei Verwendung rekonstruierter Epidermismodelle steht in guter Übereinstimmung mit der unvollständigen Barrierefunktion, die bei den Hautmodellen festgestellt wurde. Diese ist durch niedrigere Konzentrationen freier Fettsäuren und hydrophiler Ceramidfraktionen und durch die Expression von Zytokinen und Wachstumsfaktoren verursacht, die zu einer Hyperproliferation der epidermalen Zellen führen ((Ponec et al., 2002); siehe auch **1.2**). Eine Vielzahl von Studien, die die Permeation über humane Voll- oder Spalthaut (Dreher et al., 2002a; Santos Maia et al., 2002; Wagner et al., 2003), humane hitzeseparierte Epidermis (Marjukka Suhonen et al., 2003; Wagner et al., 2003) oder porcine Haut (Mahmoud et al., 2005) mit jener über rekonstruierte Haut verglichen, zeigte eine höhere Permeabilität der organotypischen Modelle. Der von uns sowohl bei einer lipophilen (Paralleltests mit Testosteron) als auch bei einer hydrophilen Substanz (Coffein) beobachtete Permeabilitätsunterschied zwischen den beiden Epidermismodellen EpiDerm™ und SkinEthic® liegt möglicherweise in der unterschiedlichen Morphologie der Häute begründet. So fanden Boelsma et al. (Boelsma et al., 2000) Unterschiede in der Anzahl der lebenden Zellschichten. EpiDerm™ zeigt ein Epithel, das aus ca. 8-12 Zellschichten besteht, das SkinEthic®-Modell hat dagegen eine niedrigere Zahl von nur 5-7 lebenden Zellschichten. Möglicherweise ist dies wiederum durch eine unterschiedliche Inkubationszeit der Hautkulturen beim Herstellungsprozess bedingt. Die beobachteten Unterschiede können nicht durch die bei den Hautmodellen verwendeten Stützmembranen bedingt sein, beide Kunsthauthersteller verwenden Polycarbonatmembranen (Netzlaff et al., 2005b), die zudem im Gegensatz zu den

Kollagenmembranen beim Hautmodell EPISKIN[®] fast keinen Einfluss auf die Permeabilität der Häute haben (Dreher et al., 2002b; Lotte et al., 2002).

Bei den Experimenten im Rahmen dieser Arbeit war das unterschiedliche Verhalten der beiden Hautmodelle gegenüber wässrigen Donormedien makroskopisch auffällig: Im Gegensatz zum EpiDerm[™]-Modell ließ sich das SkinEthic[®]-Modell nur schwierig benetzen, es besitzt offenbar eine lipophilere Oberflächenstruktur. Trotzdem zeigten unsere weiteren Untersuchungen (Prävalidierungsphase mit erhöhten Versuchszahlen) bei beiden Hautmodellen ein gleiches Ranking für die in ihren physikochemischen Eigenschaften unterschiedlichen Substanzen Coffein und Testosteron (siehe auch Beobachtungen von (Lotte et al., 2002)). Eine ANOVA-Analyse der K_p -Werte (E. Schmidt, ZEBET) ergab dabei im Falle von Coffein folgende Rangfolge der Hautpermeabilitäten:

SkinEthic[®] > EpiDerm[™], porcine Haut, hitzeseparierte humane Epidermis mit einem signifikanten Unterschied nur zwischen dem Hautmodell SkinEthic[®] und den anderen Hautmatrices ($p \leq 0,05$). Testosteron zeigte folgende Reihenfolge:

SkinEthic[®] > EpiDerm[™] > hitzeseparierte humane Epidermis, porcine Haut. Hier erwies sich im Vergleich zu humaner Epidermis und porciner Haut die Barrierefunktion beider rekonstruierten Häute klar als weniger ausgebildet, die K_p -Werte beider Kunsthautmodelle zeigten auch untereinander signifikante Unterschiede ($p \leq 0,05$).

Die Hautmodelle verhalten sich also, wie ebenfalls bereits Lotte et al. beschrieben (Lotte et al., 2002), in Anbetracht der applizierten Substanz allerdings nicht einheitlich hinsichtlich ihrer relativen Effizienz der Barrierefunktion (Zuordnung der beiden Hautmodelle zu unterschiedlichen ANOVA-Gruppen: im Falle von Coffein zeigte EpiDerm[™] im Gegensatz zu SkinEthic[®] eine vergleichbare Permeabilität wie die porcine und humane Haut, bei Testosteron bildeten die beiden Kunsthäute jeweils 2 separate Gruppen). Daher erscheint es unverzichtbar, noch weitere Hautmodelle, vor allem aber weitere Testsubstanzen hinsichtlich ihres Permeationsverhaltens zu testen, um unsere Beobachtungen zu ergänzen und aufgrund einer größeren Datenbasis ein Prädiktionsmodell entwickeln zu können.

4.3.3 Viabilitäts- und Integritätsparameter der Haut

Weder der MTT-Reduktionstest noch die histologische Inspektion erwiesen sich angesichts fehlender Korrelation der Viabilitätsdaten oder der Integritätsdaten untereinander und mit dem jeweils entsprechenden Permeationsparameter K_p als geeignete Tests für die Überwachung der Eignung von Häuten für die Bestimmung der kutanen Absorption (**Abb. 34** und **Abb. 35**). Zwar sind MTT-Test und die histologische Untersuchung nicht generell ungeeignet als Tests zur Bestimmung der Viabilität bzw. Integrität von Hautmodellen, doch scheint kein Zusammenhang mit ihrem Permeationsverhalten zu bestehen, es ist also keine Voraussage für die Permeabilität der Haut anhand dieser Tests möglich. Da bei den in dieser Arbeit vorgestellten Permeationsuntersuchungen der Metabolisierung von Substanzen in der Haut keine Bedeutung zukommt (vernachlässigbar geringe Metabolisierung der Testsubstanz Coffein, siehe **3.2.2**), konnte hier problemlos auf die genannten Tests verzichtet werden. Größte Bedeutung für die Permeation besitzt das Stratum corneum (siehe auch: Einfluss der Behandlung sowie der Entnahmeregion humaner Haut auf ihre Permeabilität und Einfluss des Zustandes der Haut unter **4.3.1**).

Generell sind verlässliche Integritätstests zur Bestimmung der Eignung einer Haut vor Durchführung einer Permeations- / Penetrationsuntersuchung unverzichtbar (Fasano et al., 2002). Die OECD und auch die COLIPA schlagen neben der visuellen Untersuchung der Haut die Bestimmung des elektrischen Widerstandes, des transepidermalen Wasserverlustes (TEWL) oder der Permeation von tritiiertem Wasser vor (COLIPA, 1995; OECD, 2003). Die Eignung dieser Tests wurde allerdings bereits wiederholt in Frage gestellt: So stellte sich in Untersuchungen von Lotte et al. heraus, dass weder TEWL noch die Leitfähigkeitsmessung eine Aussage über die Integrität einer Haut treffen können (Lotte et al., 2002). Im Falle des TEWL zeigten dies auch Untersuchungen an humaner hitzeseparierter Epidermis (Netzlaff et al., 2005a): TEWL-Messungen können zwar schwerwiegende Schädigungen des Stratum corneum erfassen, nicht jedoch kleine Veränderungen, die allerdings bereits das Permeationsverhalten von Substanzen beeinflussen können, und sind daher als Barriere-Integritätstest für humane Epidermis ungeeignet. Bei den hier durchgeführten Permeationsuntersuchungen limitierte die Applikation von Lösungen die Anwendung der Leitfähigkeitsmessung, da eine vollständige Entfernung der Lösung nicht sichergestellt werden kann. Einzig die Bestimmung der Permeation von

tritiertem Wasser vor Versuchsbeginn scheint ein angemessener Test zu sein (Bronaugh et al., 1986), allerdings handelt es sich um eine sehr invasive Methode - durch die Applikation von tritiertem Wasser für 5 h auf die Haut (COLIPA, 1995) kommt es bereits vor Versuchsbeginn zu einer starken Hydratation der Haut, wodurch die Qualität der Matrix beeinträchtigt wird. Des Weiteren lässt sich das markierte Wasser nie vollständig von den Häuten entfernen, was zu einer Überschätzung der permeierten Menge einer entsprechend markierten Testsubstanz durch die radioaktive Kontamination führen kann. Die visuelle Überprüfung jeder Haut vor Versuchsbeginn, die auch in der hier vorgestellten Arbeit durchgeführt wurde, scheint der zurzeit einzige geeignete Integritätstest für Studien zur Untersuchung der perkutanen Absorption zu sein.

Ist der Metabolismus einer Substanz ausgeprägt und dementsprechend auch für ihre Permeation von Bedeutung, sollte allerdings über eine unabhängige Bestimmung von Viabilität / Integrität mittels MTT-Test / histologischer Untersuchung, vor allem aber über die Entwicklung besserer, alternativer Integritätstests nachgedacht werden.

4.4 Ausblick

Mittlerweile wurden zahlreiche weitere Humanhautmodelle, wie die Vollhautmodelle AST-2000, SkinEthic®-RFT und Phenion FT oder das Epidermismodell EST-1000, auf den Markt gebracht. Außerdem gibt es einige betriebsinterne Modelle wie z.B. ein Hautmodell der Firma Henkel und eine Rattenkerationzytenzelllinie, die ebenfalls für Absorptionsstudien geeignet sein könnten. Auch diese sollten demnächst genauer charakterisiert und schließlich sorgfältig hinsichtlich ihres Permeationsverhaltens vergleichend zu den hier geprüften und nun der Validierung unterzogenen Häuten / Testmethoden getestet werden. Erst dann ist eine Aussage für eine generelle Eignung von Kunsthaut oder speziellen Kunsthäuten alternativ zu Humanhaut und tierischen Häuten in perkutanen Absorptionsstudien möglich.

Unbestritten ist die bei Hautmodellen im Vergleich zu exzidiertem Hautmaterial schlechter ausgeprägte Barrierefunktion. Dies lässt sich allerdings, so ist zu hoffen, über ein Prädiktionsmodell ausgleichen. Interessant bleibt zudem die Variabilität der

Ergebnisse von Permeations- und Penetrationsuntersuchungen bei den verschiedenen Matrices - bekanntermaßen ist diese bei der exzidierten Humanhaut sehr hoch. Sollten die Hautmodelle in der sich derzeit in der Schlussphase befindenden 'Validierungsstudie zur Prüfung auf Hautpenetration mit Hilfe von biotechnologisch hergestellten Hautmodellen' eine geringere Variabilität der Permeations- und Penetrationsdaten im Vergleich zu anderen Häuten aufweisen, erscheint bei ihrer Verwendung eine Reduktion der erforderlichen Zahl der individuellen Experimente möglich. Konstante und kurze 'Lag'-Zeiten, die eine kürzere Versuchsdauer (8 h) und weniger häufige Probenentnahmen als bei humaner oder tierischer Haut erlauben, sollten den Routineeinsatz dieses Testsystems fördern. Dann könnte die bereits in dem OECD Guidance Document No. 28 vorgesehene alternative Testmethode weltweit eingesetzt werden.

Die in unseren Untersuchungen beobachtete Toxizität von 5 % BSA auf primäre Keratinozyten und rekonstruierte Epidermis schränkt den Einsatz des Albumins als Rezeptormedienzusatz stark ein und steht der Empfehlung des OECD Guidance Documents No. 28 entgegen.

Bei Anerkennung der Hautmodelle zur Bestimmung der perkutanen Absorption könnten Permeation und Penetration am identischen Testsystem wie der bereits durch die OECD anerkannte Test auf Hautkorrosion oder der sich in der Validierungsphase befindende Test auf Hautirritation bestimmt werden.

Dann sollten allerdings auch geeignete Integritätstests für perkutane Absorptionsstudien entwickelt werden, da sich bisher einzig die visuelle Integritätsprüfung der Häute vor Versuchsbeginn als geeignet erwies - allerdings auch nur zum Ausschluss von Häuten mit deutlichen Schäden.

Hautmodelle ermöglichen als viable Matrix zudem die gleichzeitige Bestimmung des kutanen Metabolismus und dessen Einfluss auf die perkutane Absorption der untersuchten Substanzen in einfacher Weise. Dies könnte von größtem Belang für die derzeit in Entwicklung befindlichen Tests zur Erfassung der Sensibilisierung sein, wirken bei kleinen Molekülen vor allem die Metaboliten allergisierend.

Ergänzend zu den in dieser Arbeit durchgeführten Metabolisierungsuntersuchungen mit Coffein und Theophyllin könnte die Expression der beteiligten CYP-450-Isoenzyme in den hier verwendeten Hautmodellen EpiDerm™ und EpiDerm™-FT auf mRNA-Ebene mittels real-time RT-PCR untersucht werden.