

1 EINLEITUNG

1 EINLEITUNG

1.1 Aufbau der humanen Haut

Die wichtigste Aufgabe der Haut - als eines der größten Körperorgane - besteht in ihrer Barriere gegenüber der Umwelt. Das innere Gleichgewicht wird aufrechterhalten, indem übermäßiger Flüssigkeitsverlust verhindert wird, ein Schutz vor UV-Strahlung gewährleistet wird sowie eine Beteiligung der Haut an der Regulation der Körpertemperatur und der Immunabwehr besteht (Gawkrodger, 1995). Makroskopisch lassen sich bei der Haut die Epidermis (Oberhaut), die zusammen mit der Dermis (Lederhaut, Korium) die Kutis bildet, und die Subkutis (Unterhaut, Hypodermis) unterscheiden.

Epidermis. Die Epidermis, deren Dicke ungefähr 0,1 mm (abhängig von der Körperregion von 0,05 mm bis zu 1,4 mm) beträgt, besteht aus 4 Schichten: dem Stratum corneum (SC, Hornschicht), Stratum granulosum (Körnerzellschicht), Stratum spinosum (Stachelzellschicht) und dem Stratum basale (Basalzellschicht) (Gawkrodger, 1995). Hauptzellpopulation in der Epidermis sind die Keratinozyten. Ausgehend vom proliferativ aktiven Stratum basale durchläuft der Keratinozyt im Zuge der Differenzierung die einzelnen Schichten der Epidermis, bis er schließlich als kernloser und keratinreicher Korneozyt in der äußersten Schicht, dem Stratum corneum, endet. Neben Keratinozyten sind pigmentproduzierende Melanozyten, immunologisch aktive Langerhanszellen sowie Merkel-Zellen, die eine Bedeutung für die Sinneswahrnehmung besitzen, als bedeutende epidermale Zellpopulationen zu nennen.

Das Stratum corneum besteht aus ungefähr 10 - 15 Schichten Korneozyten, die nur einen geringen Wasseranteil (ca. 5-10 %) und als Hauptbestandteile eine Lipidmatrix und Keratin (50 % der Trockenmasse) enthalten, interzellulären Lipiden sowie wasserbindenden „moisturizing factors“. Die Dicke der Hornschicht beträgt abhängig von der Körperregion 10-80 µm, verhindert die übermäßige Wasserverdunstung und erschwert das Eindringen von Fremdstoffen. Diese Barrierefunktion wird der Lipidmatrix, die aus Ceramiden (40 %), Cholesterol (27 %), Cholesterylestern (10 %)

und Fettsäuren (9 %) zusammengesetzt ist, zugeschrieben (Wertz and Downing, 1989).

Im darunterliegenden Stratum granulosum vollzieht sich die Keratinisierung, bei der sich unter anderem eine sehr rigide Hülle um die Keratinmatrix bildet (cornified envelope) (Eckert et al., 1993; Schaefer and Redelmeier, 1996). Keratinosomen (odland bodies), die aus dem Golgiapparat hervorgehen, fusionieren mit der Zellmembran und geben ihre hochlipophilen Bestandteile frei, die zur Hornschichtbarriere beitragen (Fartasch et al., 1993; Plewig et al., 1997).

Das Stratum spinosum, in dem die Keratinisierung bereits vorbereitet wird, enthält polygonale, leicht abgeflachte Zellen, die miteinander durch Desmosomen verbunden sind (Cozzani et al., 2000). Keratin-Tonofibrillen formieren ein zytoplasmatisches Stützskelett.

Die Basalzellschicht setzt sich aus proliferierenden und ruhenden Zellen zusammen und ermöglicht die Regeneration der Epidermis. Den Abschluss der Epidermis bildet die Basalmembran, die aus der Basallamina und darunterliegenden Kollagenfibrillen besteht.

Dermis. Die Dermis schließt sich mit einer Dicke von ca. 0,6 - 3 mm als stützendes Bindegewebe an die Epidermis an. Kollagenfasern, die etwa 70 % der Dermis ausmachen und für Straffheit und Halt sorgen, liegen neben Elastinfasern, die für die Elastizität zuständig sind, vor (Gawkrodger, 1995). Der häufigste Zelltyp in der Dermis ist der Fibroblast, der Kollagen, Elastin und andere Bindegewebsbestandteile bildet.

Subkutis. Die Subkutis besteht aus unterschiedlich großen, von Bindegewebssepten umgebenen Fettläppchen, in denen größere Blutgefäße, Lymphgefäße und Nerven verlaufen sowie apokrine bzw. ekkrine Schweißdrüsen und die größeren Haarfollikel-Bulbi liegen. Die Subkutis dient als Wärmeisolator, Fettdepot und mechanisches Polster (Hornstein and Nürnberg, 1985).

1.2 Rekonstruierte Epidermis- und Vollhautmodelle

In den letzten Jahren kam es zur Entwicklung zahlreicher *in vitro* Epidermis- und Vollhautmodelle, die insbesondere die Untersuchung der perkutanen Absorption, der Toxizität bei Hautkontakt und des kutanen Metabolismus erlauben sollen.

Kultivierung der Hautmodelle. Die Kultivierung der Epidermismodelle erfolgt durch Aussaat der vereinzelt primären Keratinozyten auf ein geeignetes Trägermaterial (z.B. Polycarbonatmembran im Falle des EpiDerm™- und des SkinEthic®-Hautmodells oder Strukturen aus Kollagen Typ I und III beschichtet mit Kollagen Typ IV beim EPISKIN®-Modell). Die Kultur wird für einige Tage von Medium bedeckt inkubiert, um die Proliferation zu stimulieren. Nachfolgend wird der Träger mit der inzwischen dünnen mehrlagigen Schicht von Keratinozyten an die Luft-Medium-Grenze verbracht, um die epidermalen Zellen der Luft auszusetzen und nun ihre Differenzierung zu induzieren. Unter diesen angenähert physiologischen Konditionen werden die Zellen durch Diffusion von Nährstoffen durch das darunterliegende Substrat versorgt. Luft-Exposition der epidermalen Zellen ist ausschlaggebend für das Auftreten eines vielschichtigen Gewebes mit einem kohärenten Stratum corneum (Asselineau et al., 1985; Bodde et al., 1990; Ponec et al., 1988; Regnier et al., 1986). Bei den Vollhautmodellen können Fibroblasten-besiedelte Kollagengele, aber auch dermale Fibroblasten in die Hautmodelle inkorporiert werden. Letzteres erfolgt z.B. durch Aussaat auf den Boden der Kulturplatte, durch Züchtung auf der basolateralen Seite von de-epidermalisierter Dermis mit erhaltenen Basalmembran-Komponenten (Freeman et al., 1976; Ponec et al., 1988; Regnier et al., 1990), oder durch Kultivierung auf Inertfiltern, bevor die Keratinozyten eingesät werden. Dieses Modell erlaubt es, die dermal-epidermale Interaktionen, den Fibroblastenstoffwechsel und dermale Matrixeffekte von topisch applizierten Arzneistoffen zu untersuchen. Die Fibroblasten synthetisieren Kollagenfibrillen und lagern diese im dermalen Kompartiment ein (Bell et al., 1979; Naughton et al., 1989). Die Funktion von Fibroblasten im dermalen Kompartiment wird jedoch hauptsächlich ihrer Regulation der Keratinozytenproliferation zugeschrieben. Da der direkte Kontakt zwischen Keratinozyten und Fibroblasten nicht von vitaler Bedeutung zu sein scheint, wurden diffusionsfähige dermale Produkte wie Wachstumsfaktoren und / oder Zytokine als wichtige Signale der interzellulären Kommunikation angesehen (Coulomb et al., 1989; Mackenzie and Fusenig, 1983).

Neben epithelial-mesenchymalen Ko-kulturen können auch Keratinozyten und Melanozyten (Bertaux et al., 1988; Nakazawa et al., 1995; Todd et al., 1993) im epidermalen Kompartiment gemeinsam kultiviert werden. Dies ermöglicht beispielsweise die Untersuchung der kontrollierten UV-induzierten Melanogenese

oder die Testung von z.B. bleichenden Substanzen und deren Effekt auf die Melaninproduktion.

Hoeller et al. entwickelten ein Hautmodell auf der Basis autologer Keratinozyten, Fibroblasten und mit Serum des entsprechenden Spenders angereichertem Medium (Hoeller et al., 2001). Histologische und Immunfluoreszenzuntersuchungen deuteten darauf hin, dass diese Hautäquivalente der *in vivo* Situation in humaner Haut am nächsten kommen. Das vollständig differenzierte Hautäquivalent erlaubt z.B. die Untersuchung metabolischer Prozesse in der Haut wie den „Cross-Talk“ zwischen dermalen Fibroblasten und epidermalen Keratinozyten, ein Beispiel dafür ist der Retinoidmetabolismus. Die Verwendung ausschließlich autologen Materials ermöglicht zudem die Nutzung dieser Hautmodelle für die autologe Transplantation und damit die Reduktion des Risikos der Transplantatabstoßung.

Kulturbedingungen. Das extrazelluläre Milieu, bestehend aus Umgebungstemperatur und Atmosphäre, Wachstumsmedium, Matrix und Trägermaterial erweist sich als äußerst kritisch bei der Kultivierung von Hautmodellen. Auf den Zusatz von Serum, das bisher aufgrund seiner wachstumsfördernden Wirkung als essentiell galt, wird wegen seiner biologischen Variabilität und schlechter Standardisierbarkeit mittlerweile verzichtet. Um das Fehlen von Serum zu kompensieren, müssen u.a. Hormone, Wachstumsfaktoren, Vitamine, Transport- und lipidbindende Proteine, Spurenelemente, Antioxidantien, stabilisierende Faktoren und andere niedermolekulare Nährstoffe substituiert werden. Eine graduelle Modifikation der Inkubationsbedingungen für die Kultivierung von Hautmodellen führte dazu, dass Hautäquivalente mit großer Ähnlichkeit zu nativer Epidermis erhalten werden können (Gibbs et al., 1997; Ponec et al., 1997). Die wichtigsten Änderungen waren der Wegfall von Serum, die Reduktion von Wachstumsfaktorkonzentrationen und die Vitaminsupplementierung, wobei insbesondere Vitamin C für die Bildung einer kompetenten Hautbarriere essentiell ist (Ponec et al., 1997).

Morphologie und Immunohistochemie. Die histologische Evaluierung der kommerziell erhältlichen Hautmodelle EPISKIN[®], EpiDerm[™] und SkinEthic[®] zeigte bei allen Epidermismodellen ein vollständig stratifiziertes Epithel, bestehend aus einem organisierten Stratum basale, Stratum spinosum, Stratum granulosum und Stratum corneum (Boelsma et al., 2000). Die Hersteller der Epidermis- und Vollhautmodelle beschreiben weiterhin das Vorhandensein einer voll entwickelten

Basalmembran und die Expression bedeutender Basalmembranmarker wie Kollagen IV und VII, Laminin I und V, Integrin $\alpha 6$ und $\beta 4$ sowie von Antigen BP. Weiterhin wiesen sie charakteristische epidermale Ultrastrukturen nach (Gibbs et al., 1997; Ponec et al., 1997; Rosdy and Clauss, 1990) und die Expression epidermaler Differenzierungsmarker (Gibbs et al., 1998; Ponec, 1991; Tinois et al., 1991). Die genauere Untersuchung der Expression und Lokalisierung einer Vielzahl von differenzierungsspezifischen Proteinmarkern ließ jedoch bei allen Hautmodellen einige Eigenschaften anormaler Differenzierung erkennen. Beispielsweise zeigte sich eine abweichende Expression von Keratin-6, welches in gesunder humaner Epidermis fehlt und oft mit Hyperproliferation und Wundheilung assoziiert ist, sowie von SKALP (skin derived antileukoproteinase), das ebenfalls physiologisch nicht in humaner Haut auftritt. Anomalien zeigten sich auch bei der Expression von kleinen prolinreichen Proteinen und Involucrin sowie in Form der frühzeitigen Expression von Transglutaminase (Boelsma et al., 2000). Daraus ergibt sich ein Ungleichgewicht von Proliferation und Differenzierung, das zu der unzureichenden Barrierefunktion der Hautmodelle beiträgt.

Lipidzusammensetzung. Die Lipidanalytik zeigte das Vorkommen aller bedeutenden epidermalen Lipidklassen, allerdings war das Ceramidprofil der untersuchten Hautmodelle (EPISKIN[®], EpiDerm[™] und SkinEthic[®]) unvollständig: Der Gehalt der polaren Ceramide 5 und 6 war niedriger als bei Humanhaut, Ceramid 7 fehlte vollständig, und der Gehalt an freien Fettsäuren erwies sich ebenfalls als sehr niedrig (Ponec et al., 2000). Es gibt allerdings Hinweise, dass der Zusatz z.B. von Ascorbinsäure die Synthese der Ceramide 6 und 7 fördert (Ponec et al., 1997). Im Stratum corneum sind Cholesterol, Ceramide und freie Fettsäuren in annähernd äquimolarem Verhältnis (Man et al., 1993) vorhanden. Die Lipidzusammensetzung des Stratum corneum von rekonstruierter Epidermis unterscheidet sich insofern von der des „normalen“ Stratum corneum, dass Triglyceride vermehrt vorkommen, während der Glycosphingolipidgehalt und insbesondere der Gehalt an Linolensäure erniedrigt sind (Boyce et al., 1990; Lenoir and Bernard, 1990; Ponec, 1991). Abweichungen zeigen sich auch bei den lamellaren Strukturen der 'cornified layers' mit Auswirkungen auf die Permeabilität der Hautmodelle (Doucet et al., 1997; Robert et al., 1997). Da die Zusammensetzung und Organisation der epidermalen Lipide als substantiell für die Permeabilitätsbarriere des Stratum corneum erachtet wird, dürften

auch diese Abweichungen zu der schlechteren Barrierefunktion der Hautmodelle beitragen (Ponec and Weerheim, 1990; Slivka et al., 1993).

1.3 Perkutane Absorption

Der perkutanen Absorption von Stoffen kommt unter anderem bei der Risikobewertung von Chemikalien erhebliche Bedeutung zu. Für die Anwendung von Pestiziden wird geschätzt, dass ungefähr 90 % der Gesamtexposition die Haut betrifft (Lundehn, 1992; van Ravenzwaay and Leibold, 2004). Die 1998 verabschiedete EC-Biozidrichtlinie sieht allerdings bei der Testung von Bioziden eine Beschränkung von Tierversuchen auf ein Minimum vor (EC, 1998). Angesichts der Reduktion von Tierversuchen bei der Testung von Arzneimitteln auf die Fälle, für die keine Alternativmethode zur Verfügung steht (EC, 2003b), und im Hinblick auf das Verbot von Tierversuchen zur Prüfung von kosmetischen Produkten und ihren Inhaltsstoffen in der 7. Ergänzung der Kosmetikarichtlinie der Europäischen Kommission (EC, 2003a) wurde es nötig, Methoden zu entwickeln, um die kutane Penetration / Permeation solcher Stoffe *in vitro* erfassen zu können. Die Bestimmung der perkutanen Absorption mittels exzidierter Human- oder tierischer Haut (Hadgraft, 2001; Simon and Maibach, 2000) ist mittlerweile für die toxikologische Risikobewertung (Mattie et al., 1994; Poet and McDougal, 2002) akzeptiert. Testungen am lebenden Tier erfolgen nunmehr bei speziellen Fragestellungen. Die *in vitro* Bestimmung ist ebenfalls relevant für die Entwicklung von Arzneistoffen (Bauerova et al., 2001; Moser et al., 2001) und die Prüfung der Unbedenklichkeit von Kosmetika (Diembeck et al., 1999; Indans, 2002).

Im Jahr 2001 wurde das sogenannte Weißbuch der EU-Kommission, das eine Strategie für eine zukünftige Chemikalienpolitik in der Europäischen Union darstellt, verabschiedet. Es beinhaltet u.a. die Verlagerung der Verantwortung für die Prüfungen und die Risikobewertung von Chemikalien von den Behörden auf die Industrie. Das neue System zur Beurteilung von chemischen Altstoffen und neuen Stoffen wird als REACH (Registration, Evaluation and Authorisation of Chemicals)-System bezeichnet und umfasst die 3 Elemente der Registrierung, Prüfung und Zulassung von Chemikalien, deren Einordnung in Gefahrenklassen u.a. von der Produktionsmenge und der Gefährdung, die von diesen Stoffen ausgeht, abhängig ist. Die REACH-Initiative wurde 2003 von der Europäischen Kommission

verabschiedet und sieht vor, dass in naher Zukunft alle Chemikalien, die in Mengen ab 1 t jährlich produziert oder importiert werden, und für die bisher toxikologische Profile noch nicht dokumentiert sind, beurteilt werden müssen. Dies bedeutet eine Bewertung von ca. 30.000 Chemikalien innerhalb eines Zeitraumes von 15 Jahren (Hofer et al., 2004). REACH fordert ein auf die jeweilige Substanz zugeschnittenes Testprogramm (sogenanntes „tailor-made testing program“), welches die spezielle Exposition des Menschen berücksichtigt. Daher wird die Absorption über die Haut große Bedeutung haben. Weiterhin kommt der kutanen Absorption bei Kosmetika, d.h. in den SCCNFP's (Scientific Committee on Cosmetic Products and Non-Food Products intended for Consumers) Notes of Guidance, hohe Relevanz zu (SCCNFP, 2003).

Validierung von *in vitro* Methoden zur perkutanen Absorption. Angesichts der Entwicklung in der Chemikalienpolitik und der EU-Harmonisierung der Arzneimittelpolitik wird die Notwendigkeit der Validierung alternativer Testmethoden im Allgemeinen deutlich (Huggins, 2003), um sie als adäquaten Ersatz für Tierversuche anzuerkennen. Im Jahr 2004 hat die OECD die Testrichtlinie 428 (OECD, 2004b) und das korrespondierende Guidance Document 28 (OECD, 2003) für die *in vitro* Testung perkutaner Absorption, die auf der Verwendung viabler Humanhaut, Rattenhaut und Schweinehaut basieren, verabschiedet. Zudem wurde gleichzeitig eine weitere Testrichtlinie 427 für die *in vivo* Testung verabschiedet (OECD, 2004a). Gemäß den ECVAM (European Centre for the Validation of Alternative Methods)-Kriterien zur Feststellung der Validität von *in vitro* Tests basieren diese Richtlinien auf einer retrospektiven Validierung von Datensätzen, die zuvor generiert worden sind (Hartung et al., 2004). Anfang der Neunziger Jahre wurden rekonstruierte Hautmodelle kommerziell verfügbar, diese sind bereits von der OECD zur Prüfung auf Korrosivität anerkannt (OECD, 2004c). Möglicherweise kann rekonstruierte Haut auch für die Bestimmung der Aufnahme über die Haut verwendet werden. Dies erfordert allerdings eine Etablierung und gründliche Validierung der Testmethode, die bereits finanziert durch das 5. EU-Rahmenprogramm der Europäischen Kommission ihren Anfang fand (Dreher et al., 2002a; Lotte et al., 2002).

Testmethode zur kutanen Permeation / Penetration. Die Franzdiffusionszelle ist ein etabliertes *in vitro* Modell für Studien zur perkutanen Absorption (Franz, 1975;

Wagner et al., 2000). Die Diffusionszelle besteht aus einer Donor- und Rezeptorkammer, zwischen denen die Hautmatrix eingebracht wird. Das Stratum corneum ist dabei in Kontakt mit der Luft, die Hautunterseite wird mit einem gleichmäßig temperierten Rezeptormedium umspült, so dass die Temperatur der Hautoberfläche wie im physiologischen Zustand $32 \pm 1^\circ\text{C}$ beträgt (OECD, 2003). Als Testsubstanzen im Donorkompartiment dienen sehr häufig die Substanzen Coffein, Benzoessäure und Testosteron, die als OECD-Referenzsubstanzen für die Testung der perkutanen Absorption anerkannt sind (OECD, 2003). Das Rezeptormedium simuliert durch Aufrechterhaltung der Sink-Bedingungen in der Haut während der gesamten Versuchsdauer den Blutfluß (Wagner et al., 2000). Es werden gleichermaßen statische oder Durchflusszellen verwendet (OECD, 2003).

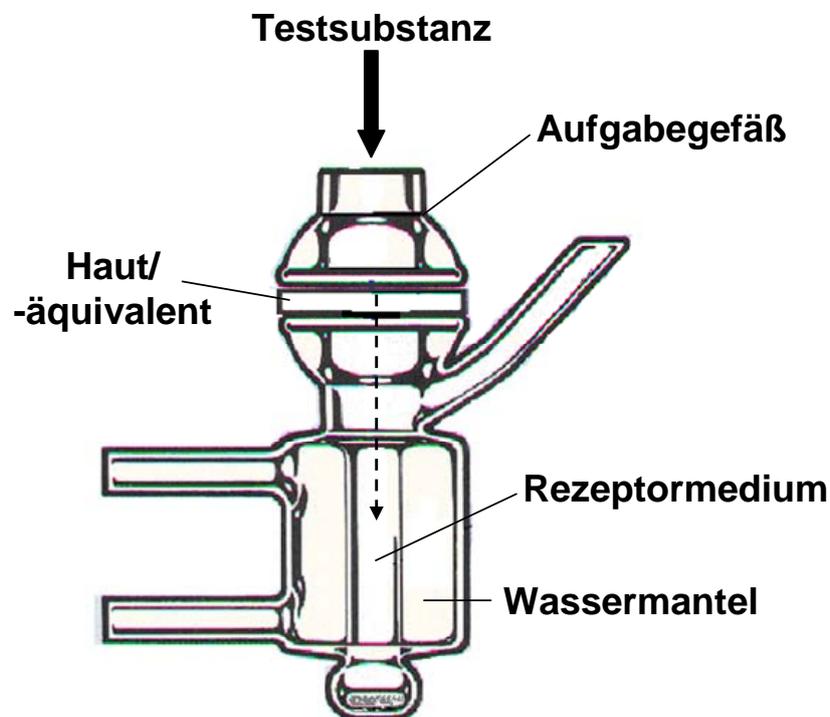


Abb. 1: Schematische Darstellung der statischen Franzdiffusionszelle.

1.4 Matrices für perkutane Absorptionsstudien *in vitro*

Während die Testrichtlinie 428 die Verbreitung der Franzdiffusionszell-Technik (siehe **Abb. 1**) für Penetrations- und Permeationsstudien beschleunigen wird, finden auch andere *in vitro* Methoden wie der isolierte perfundierte porcine Hautlappen (Qiao and Riviere, 2002; Riviere et al., 2003), der perfundierte Schweinevorderlauf (Mahmoud

et al., 2005; Wagner et al., 2003) und das perfundierte Euter (Kietzmann et al., 1993; Pittermann et al., 1995) bei speziellen Problemen Verwendung.

1.5 *In vitro* und *ex vivo* Hautmodelle

Exzidierte Humanhaut. Die OECD favorisiert angesichts der Risikoabschätzung für den Menschen Untersuchungen an Humanhaut (OECD, 2004b). *In vivo* und *in vitro* gleichermaßen übersteigt zudem die Permeation über tierische Haut die Aufnahme über die humane oft erheblich (Bartek et al., 1972; Frantz et al., 1995; Hewitt et al., 2000; Pont et al., 2004; Ramsey et al., 1994; Wester and Maibach, 1976). Zu der geringen Penetration / Permeation in / durch gesunde Humanhaut tragen, wie bereits erwähnt, die epidermalen Lipide der Hornschicht wesentlich bei (Benfeldt, 1999; Hadgraft et al., 1992; Hirvonen et al., 1991; Kitagawa and Li, 1999; Yagi et al., 1998). Neuere Untersuchungen deuten auf die Ausbildung diskreter Poren in den Lipidlamellen hin, die sich unter dem Einfluss von Penetrationsverstärkern weiten können (Menon and Elias, 1997). Daher kann auch das Vehikel die Aufnahme wesentlich beeinflussen (Yagi et al., 1998). In Studien zur perkutanen Absorption werden sehr häufig humane hitzeseparierte Epidermis, allerdings auch Spalthaut in unterschiedlichen Stärken sowie Vollhaut eingesetzt. Da die derzeitige Verfügbarkeit exzidiertes humaner Haut aus der plastischen Chirurgie schon heute den Bedarf nicht deckt (und REACH einen erheblichen Anstieg bedingen wird), werden stattdessen häufig tierische Häute, hauptsächlich von Ratte und Schwein, verwendet.

Tierische Häute. Versuche an Schweinehaut gelten heute als etabliert und erfolgen in Europa in großem Umfang (Diembeck et al., 1999; Reifenrath et al., 1989). Schweinehaut stimmt in ihrer Morphologie besser mit der menschlichen Haut überein als Haut von Pelztieren (Vorhandensein zahlreicher Haarfollikel), und Fremdstoffe penetrieren in / durch Schweinehaut in den meisten Fällen schlechter als durch Haut von Pelztieren (Baynes et al., 1997; Kellner et al., 1986). Aber auch in den Haarfollikeln und den Furchen der Schweinehaut reichert sich der Wirkstoff an (Kellner et al., 1986), und die in die Tiefe der Haut reichenden Follikel stellen einen Shuntweg der Resorption dar. So liegt z.B. die Penetration von Estradiol in die follikelreiche Haut nackter Ratten bei 13,0 %, nach Zerstören der Follikel jedoch nur bei 5,7 %; die Unterschiede bei der Permeation sind mit 10,8 % und 1,5 % noch größer (Hueber et al., 1994).

International werden für die Bestimmung der dermalen Penetration / Permeation von Pflanzenschutzmitteln neben Tierversuchen an der Ratte *in vitro* Prüfungen an Ratten- und Humanhaut empfohlen. Die vergleichende Prüfung an Ratten- und Humanhaut ist notwendig, da Humanhaut meist weniger permeabel ist als Rattenhaut, das Ausmaß der Unterschiede jedoch von Substanzeigenschaften bestimmt wird. 1999 wurde eine Leitlinie zur Gestaltung solcher Studien veröffentlicht (de Heer et al., 1999). Generell wird Rattenhaut oft für Untersuchungen zur perkutanen Absorption verwendet, da diese Spezies auch für die Abschätzung der Toxizität nach Einfach- und wiederholter Verabreichung sowie in *in vivo* Absorptionsstudien von Chemikalien oder Formulierungen eingesetzt wird (OECD, 2004a). Allerdings muss berücksichtigt werden, dass die *in vitro* - Absorption von 8 Pestiziden durch Rattenhaut eine im Vergleich zu humaner Haut ungefähr 2-3 fach höhere *in vivo* - Aufnahme zeigte (Scott et al., 1992). Generelle Aussagen sind nicht möglich, da systematische Untersuchungen an einem ausreichend großen und strukturell unterschiedlichen Substanzpanel fehlen.

Rekonstruierte Hautmodelle. Das OECD Guidance Document No. 28 (OECD, 2003) besagt, dass rekonstruierte Humanhautmodelle ebenfalls zur Bestimmung der perkutanen Absorption verwendet werden können, sofern Äquivalenz belegt ist, d.h. wenn die Daten von Referenzchemikalien konsistent sind mit bereits publizierten Werten. Daher gibt es in letzter Zeit große Bemühungen, Hautmodelle für Absorptionsstudien zu evaluieren. Wie unter **1.2** beschrieben, wurden die Hautmodelle zudem hinsichtlich ihrer morphologischen Charakteristika und epidermaler Lipidzusammensetzung bereits eingehend charakterisiert und mit Humanhaut *ex vivo* verglichen. Eine formale Validierung fehlt jedoch bisher.

Dreher et al. verglichen die Bioverfügbarkeit von Coffein und α -Tocopherol aus verschiedenen Vehikeln an den Hautmodellen EpiDerm™ und EPISKIN® mit der an exzidierten humaner Haut. Mit Ausnahme der Alkohol-enthaltenden Vehikel war die Rangordnung der Permeabilitäten der Substanzlösungen ähnlich (Dreher et al., 2002a). Die Aufnahme von Estradiol über das Hautmodell SkinEthic® wurde weiterhin verglichen mit der Aufnahme über porcine Haut und den perfundierten Schweinevorderlauf (Mahmoud et al., 2005), während Crème- und ein lipidbasiertes Arzneistoffträgersystem bezüglich der Glucocorticoid- und Antiandrogenabsorption und des Arzneistofftargeting verglichen wurden (Munster et al., 2005; Santos Maia et al., 2002; Sivaramakrishnan et al., 2004). Bezüglich der perkutanen Permeation und

Penetration zeigten die Epidermismodelle EpiDerm™, EPISKIN® und SkinEthic® größere Reproduzierbarkeit innerhalb einer Charge als zwischen verschiedenen Chargen. Die Reproduzierbarkeit war außerdem abhängig von der Lipophilie (logP) und anderen physikochemischen Parametern der untersuchten Substanzen (Lotte et al., 2002). Ferner wurde die Intra-Labor-Streuung der Aufnahme der OECD-Referenzsubstanzen Benzoesäure, Coffein und Testosteron über das SkinEthic® - Hautmodell durch 7 unabhängige Labors bestimmt (Heylings et al., 1998). Van de Sandt et al. führten einen internationalen Ringversuch in 10 unabhängigen Labors mit den gleichen Substanzen an Human- und Rattenhaut durch und bestimmten die Inter- und Intralaborvariabilität. Sie kamen zu dem Schluß, dass die *in vitro* Methode zur Untersuchung der perkutanen Absorption relativ robust und daher unabhängig von den experimentellen Bedingungen ist. Sie fokussierten ihre Studie allerdings auf humane Haut und ließen die rekonstruierte Epidermis außer Acht (van de Sandt et al., 2004). Suhonen et al. berichten über eine gute Korrelation der Permeabilitätscharakteristika eines organotypischen Epidermismodells, das aus einer epidermalen Rattenkeratinozytenzelllinie entwickelt und kultiviert wurde, mit denen isolierter humaner Leichenepidermis, ermittelt an 18 verschiedenen Substanzen, die ein großes Spektrum physikochemischer Eigenschaften umfassten (Marjukka Suhonen et al., 2003).

Basierend auf rekonstruierten Hautmodellen als Testmatrix hat die OECD bereits eine Testrichtlinie zur Testung der *in vitro* Hautkorrosion verabschiedet (Liebsch, 2000; OECD, 2004c; Spielmann et al., 2000). Rekonstruierte Hautmodelle werden bei der Hauttoxizitätstestung aufgrund der großen Ähnlichkeit zu Humanhaut bevorzugt (Welss et al., 2004). Eine weitere OECD-Testrichtlinie zur Testung der Phototoxizität wird mit einer Mausfibroblastenzelllinie (3T3) durchgeführt (OECD, 2004d). Eine erneute Testung an rekonstruierter Epidermis ist erforderlich, wenn der Verdacht eines falsch-positiven Ergebnisses infolge einer übermäßigen Exposition infolge fehlender Barriere besteht. Darüber hinaus werden derzeit *in vitro* Tests zur Bestimmung der Hautirritation (Fentem and Botham, 2002; Kandarova et al., 2004; Welss et al., 2004) validiert und der Hautsensibilisierung (Aeby et al., 2004) entwickelt, allerdings wurde bisher noch keine regulatorische Akzeptanz erreicht.

1.6 Viabilität von Hautmodellen und Keratinozyten unter Einfluss von bovinem Serumalbumin (BSA)

Die OECD empfiehlt bei Untersuchungen zur *in vitro* perkutanen Absorption den Zusatz von 5 % bovinem Serumalbumin (BSA) zum Rezeptormedium, wenn die Viabilität der entsprechenden Haut (z.B. bei gleichzeitiger Untersuchung der kutanen Metabolisierung von Substanzen) erhalten bleiben soll (OECD, 2003). BSA in einer Konzentration von 5 %, die der Konzentration von Albumin im Plasma entspricht (ca. 470 µM - 750 µM \equiv 3,24 % - 5,17 %), soll die Löslichkeit von Substanzen höherer Lipophilie im Rezeptormedium verbessern (Howes et al., 1996). Allerdings wird ein toxischer Einfluss von BSA kontrovers diskutiert. So gilt der Zusatz von fetalem Kälberserum (FKS, Anteil von BSA darin ca. 6 %) zur Kultivierung von Haut und Hautmodellen zum Teil noch als unverzichtbar. Auch wird der Einsatz bei Langzeitversuchen empfohlen, um die Viabilität der Haut oder Hautmodelle zu verbessern (Kratz, 1998). Primäre Keratinozyten werden mit (Gilchrest et al., 1980; Isseroff et al., 1985; Pisansarakit et al., 1990) oder ohne (Castro-Munozledo et al., 1997; Maciag et al., 1981; Prenosil and Kino-oka, 1999) FKS kultiviert. Die letztere Möglichkeit wurde entwickelt, um hormonelle Effekte auf das Zellwachstum ohne Interferenzen durch nicht-standardisierte Sera zu untersuchen (Maciag et al., 1981). Allerdings wurde auch bereits über toxische Effekte von FKS auf Keratinozyten in Kultur berichtet (Wille et al., 1984); wachstumsinhibierende und wachstumsstimulierende Fraktionen von FKS wurden beschrieben (Kitano et al., 1990). Haberland et al. (Haberland et al., 2003) zeigten an Humanhautmodellen eine unvollständige Metabolisierung von Prednicarbat unter BSA-Einfluss im Rezeptormedium, die durch eine BSA-bedingte Schädigung der viablen Zellschichten der rekonstruierten Epidermis bedingt sein könnte. Wenn BSA das Metabolisierungsmuster beeinflusst, sollte sein Einsatz als Rezeptormedium in Frage gestellt werden, da dies zusätzlich Einfluss auf das Penetrations- / Permeationsverhalten von Substanzen haben kann (siehe **1.11**).

Der Einfluss von BSA auf verschiedene andere Zelltypen in Kultur wurde bereits untersucht, und eine vermehrte Apoptose bei porcinen Epithelzellen des proximalen Tubulus (LLC-PK(1)-Zellen) festgestellt (Erkan et al., 2001). Dieser Effekt ist über den Fas-FADD-Signalweg vermittelt, der durch Inhibierung der Caspase-8

unterbrochen werden kann. Dieser Signalweg ist auch an der Apoptoseinduktion bei Keratinozyten beteiligt (Puviani et al., 2003).

1.7 Apoptose und Nekrose

Grundsätzlich unterscheidet man 2 Formen des Zelltodes bei eukaryotischen Zellen: Apoptose oder Nekrose. Apoptose wurde zuerst von Kerr et al. (Kerr et al., 1972) als stark regulierter Mechanismus mit dem Synonym des „programmierten Zelltodes“ (PCD) beschrieben. Apoptose, die häufig auf eine einzelne Zelle oder Zellgruppen begrenzt ist, ist durch folgende Merkmale charakterisiert: Chromatinkondensation, internukleosomalen DNA-Abbau (Fragmentierung der DNA in Bruchstücke von annähernd 200 bp), Reduktion der Kerngröße und Zellschrumpfung, die durch umfangreiche Blasenbildung der Plasmamembran (sog. 'membrane blebbing') begleitet wird und in der Trennung der Zelle in etliche membrangebundene Vesikel (sog. 'apoptotic bodies') resultiert. Strukturelle Veränderungen auf der Zelloberfläche (z.B. die Translokierung von Phosphatidylserin zur Außenseite der Zellmembran (siehe auch **2.9**)) stellen sicher, dass die apoptotischen Zellen durch Makrophagen oder benachbarte Epithelzellen erkannt und phagozytiert werden können (Duvall et al., 1985). *In vitro* schwellen die 'apoptotic bodies' sowie die übrig bleibenden Zellfragmente an und lysieren am Ende. Diese terminale Phase des *in vitro* Zelltodes wird 'secondary necrosis' genannt. Apoptose tritt überwiegend unter physiologischen Bedingungen auf. Im Gegensatz dazu ist Nekrose eine Art von Zelltod, der als Folge einer Reihe schädlicher Bedingungen und toxischer Substanzen, wie Hyperthermie, Hypoxie, Ischämie und metabolische Toxine, direktem zellulären Trauma etc. auftritt und typischerweise Gruppen benachbarter Zellen betrifft. Der nekrotische Prozess ist durch Anschwellen des Zytoplasmas und der Zellorganellen, besonders der Mitochondrien, aufgrund des Einstromes von Wasser und extrazellulären Ionen charakterisiert. Letztendlich zerreißt die Plasmamembran und zytoplasmatische Inhalte wie lysosomale Enzyme werden in den extrazellulären Raum freigesetzt. Daher ist Nekrose oft mit extensiver Zerstörung der umgebenden Zellen und einer intensiven entzündlichen Antwort des betreffenden Gewebes assoziiert (**Abb. 2**).

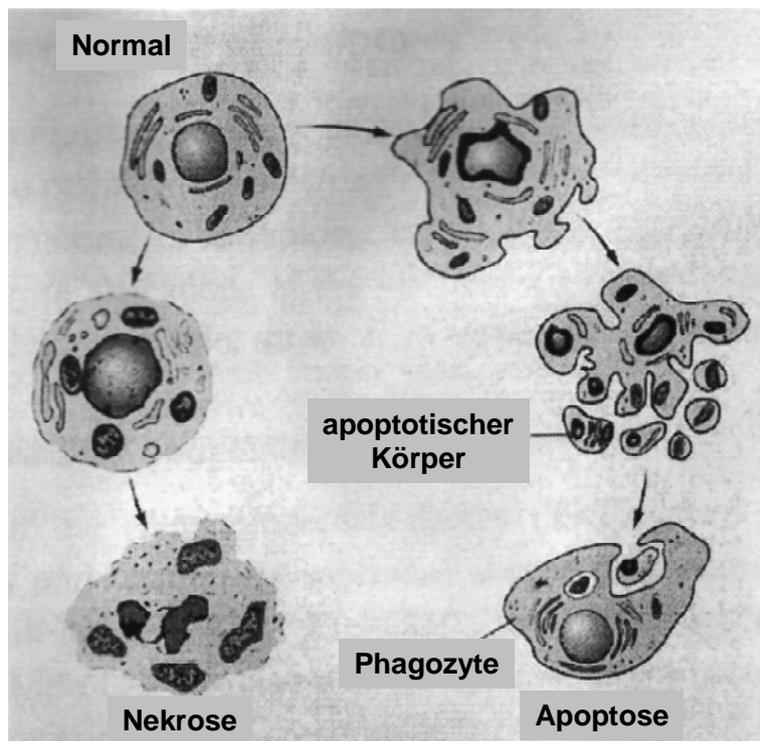


Abb. 2: Schematische Darstellung von apoptotischem und nekrotischem Zelltod (nach (Walker et al., 1988)).

1.8 Caspasen

Bei apoptotischen Vorgängen spielen Caspasen (Cysteinyl-Aspartat-spezifische Proteinasen) eine zentrale Rolle. Caspasen, die als Zymogene synthetisiert werden und aus einer Prodomäne sowie einer großen (p20) und einer kleinen (p10) Untereinheit bestehen, werden durch proteolytische Spaltung aktiviert (Lippens et al., 2000). Phyllogenetisch lassen sich die bei Säugern mittlerweile identifizierten 14 Caspasen in 3 Subfamilien einteilen; entsprechend ihrer Funktion werden sie in 3 Gruppen, nämlich die an der Zytokin-Bildung beteiligten inflammatorischen Caspasen, die Initiator-Caspasen, die durch Autoproteolyse selbstaktiviert werden, sowie die Effektor-Caspasen, die durch Initiator-Caspasen aktiviert werden, unterteilt (**Tab. 1**).

Caspase	Funktion	Subfamilie
Caspase 1	Zytokin-Bildung	Caspase-1-Subfamilie
Caspase 2	Initiator	Caspase-2-Subfamilie
Caspase 3	Effektor	Caspase-3-Subfamilie
Caspase 4	Zytokin-Bildung	Caspase-1-Subfamilie
Caspase 5	Zytokin-Bildung	Caspase-1-Subfamilie
Caspase 6	Effektor	Caspase-3-Subfamilie
Caspase 7	Effektor	Caspase-3-Subfamilie
Caspase 8	Initiator	Caspase-3-Subfamilie
<i>Caspase 9</i>	Initiator	Caspase-3-Subfamilie
Caspase 10	Initiator	Caspase-3-Subfamilie
Caspase 11	Zytokin-Bildung	Caspase-1-Subfamilie
Caspase 12	Zytokin-Bildung	Caspase-1-Subfamilie
Caspase 13	Zytokin-Bildung	-
Caspase 14	Zytokin-Bildung, Keratinocytdifferenzierung	Caspase-1-Subfamilie

Tab. 1: Funktion, phylogenetische Zugehörigkeit sowie kutane Verteilung der 14 bisher bei Säugern nachgewiesenen Caspasen. **hervorgehoben**, in Keratinozyten nachgewiesen; *kursiv hervorgehoben*, in differenzierenden Hautzellen nachgewiesen; nach (Allombert-Blaise et al., 2003; Lippens et al., 2000; Puviani et al., 2003; Takahashi et al., 1998).

1.9 Signaltransduktion bei apoptotischen Vorgängen

Es gibt 2 Hauptaktivierungswege für Pro-Caspasen während der Apoptose: den extrinsischen und intrinsischen Weg. Beide Wege laufen bei der proteolytischen Aktivierung der Effektor-Caspasen 3, 6 und 7 zusammen.

Der extrinsische Weg wird an der Zelloberfläche durch ligandabhängiges Triggern von Rezeptoren initiiert. Dabei wird die Initiator-Procaspase 8 z.B. durch die Bindung des Adapterproteins FADD (Fas-associated death domain) an Rezeptoren der TNF-Rezeptorsuperfamilie wie TNF-R1 (Tumor-Nekrosis-Faktor-Rezeptor 1) und Fas aktiviert (Schulze-Osthoff et al., 1998; Wallach et al., 1997).

Der intrinsische Weg geht von Veränderungen auf der Stufe der Mitochondrien aus und wird beispielsweise durch zytotoxische Arzneistoffe oder DNA-Schäden

ausgelöst und durch die mitochondriale Freisetzung von Cytochrom C kontrolliert. Cytochrom C bindet zusammen mit dATP den Adapter Apaf-1 (Apoptosis-activating-factor-1), der zur Rekrutierung und Aktivierung der Initiator-Procaspase 9 führt (Li et al., 1997; Pan et al., 1998).

Seit einiger Zeit gibt es Hinweise darauf, dass der sogenannte „programmierte Zelltod“, der oft gleichgesetzt wurde mit dem Begriff Apoptose (s.o.), in völliger Abwesenheit von Caspasen stattfinden kann. Dieser sogenannte „Caspase-unabhängige programmierte Zelltod“ ist u.a. durch eine in ihrem Erscheinungsbild von der Apoptose abweichende Chromatinkondensation gekennzeichnet (Jaattela and Tschopp, 2003).

1.10 Apoptotische Vorgänge in der Haut

In der Haut sind die basalen Zellen zur Proliferation befähigt, suprabasale Keratinozyten proliferieren dagegen nicht und durchlaufen den „programmierten Zelltod“ in der finalen Stufe der Differenzierung, also bei der Bildung der Hornschicht. Der molekulare Mechanismus dieses Prozesses ist noch nicht geklärt, allerdings gibt es einige Hinweise auf eine Beziehung zwischen Caspasen und terminaler Keratinozytendifferenzierung (Lippens et al., 2000). Kürzlich wurde die Expression von Caspase 1, 2, 3, 4 und 7 in Keratinozyten nachgewiesen (s. **Tab. 1**; (Takahashi et al., 1998)). Allombert-Blaise et al. (Allombert-Blaise et al., 2003) detektierten aktivierte Caspase 3, 8 und 9 in differenzierenden Hautzellen (**Tab. 1**). Puviani et al. wiesen eine Aktivierung der Initiator-Caspase 8 in Keratinozyten bei Patienten mit Pemphigus vulgaris nach, einer Autoimmunerkrankung, gekennzeichnet durch Akantholyse der Epidermis (intraepidermale Spaltbildung) (Puviani et al., 2003). Die kürzlich identifizierte Caspase 14 weist im Gegensatz zu allen bisher gefundenen Caspasen ein eingeschränktes Expressionsmuster auf (Van de Craen et al., 1998), sie konnte beispielsweise weder in Herz, Lunge, Muskel, Niere, Thymus, Milz, Gehirn oder Testis nachgewiesen werden, aber in Embryonalgewebe und der Haut. Ihre Expression in der Epidermis ist auf differenzierte Keratinozyten beschränkt, also auf das Stratum granulosum. Die pro-apoptotischen Caspasen 3 und 7 waren hingegen in der Haut nur als Vorläuferformen vorhanden, sind also, wie auch die Caspase 6, während der epidermalen Differenzierung nicht aktiviert (Lippens et al., 2000). Caspase 14 ist nicht an apoptotischen Signalwegen beteiligt, im Gegensatz zu

anderen Caspasen ist sie während der durch UV-Bestrahlung oder zytotoxische Substanzen ausgelösten Apoptose nicht aktiviert. Ihre Ausprägung ist mit der epidermalen Differenzierung assoziiert, da Caspase 14 unter den Bedingungen der terminalen Keratinozytendifferenzierung gespalten wird (Rendl et al., 2002). Dies zeigt sich auch darin, dass nicht-verhornende orale Keratinozytenepithelien keine Caspase 14 exprimieren (Lippens et al., 2000). Caspase 14 ist also wesentlich an der Ausbildung der Humanhautbarriere beteiligt (Eckhart et al., 2000; Pistritto et al., 2002).

Experimentell provozierte Apoptose, an der die Caspasen 3, 6 und 7 beteiligt sind, gelingt bei Keratinozyten beispielsweise durch niedrige Dosen UVB-Strahlung (5-20 mJ/cm²) (Lockshin and Zakeri, 2004), induziert durch DNA-Schädigung (Pfundt et al., 2001), durch Aktivierung des Tumorsuppressors p53 (Liu et al., 1996) oder durch direktes Triggern von Todesrezeptoren (Sheikh et al., 1998). Bei der o.g. UVB-Dosis ist auch eine Differenzierung zu reifen Keratinozyten möglich. Bei Dosen über 20 mJ/cm² sind sowohl Differenzierung als auch Apoptose inhibiert und die Zellen unterliegen der Nekrose (Gandarillas et al., 1999). Zudem sind zahlreiche Hauterkrankungen wie beispielsweise die toxisch epidermale Nekrolyse mit apoptotischen Vorgängen in der Epidermis assoziiert (Viard et al., 1998).

Typische Apoptoseinduktoren bei anderen Zelltypen wie Dexamethason, TNF- α , TGF- β , TPA, Retinoinsäure, Etoposid, das Thromboxan A₂-Analoge U 46619, Cycloheximid, Nitroprussid-Natrium und S-Nitroso-Glutathion lösten in der humanen immortalisierten Keratinozytenzelllinie HaCaT keine Apoptose aus (Henseleit et al., 1996). Ebenso wenig wirkte Cisplatin in Konzentrationen von 10-90 μ M apoptotisch (Bowen et al., 2003). Grundsätzlich ist der Apoptosenachweis bei Keratinozyten schwierig; z.B. ist das TUNEL-Assay nicht immer ein spezifischer Marker für Apoptose in Keratinozyten (Gandarillas et al., 1999). Das Assay unterliegt oft hohem Hintergrundrauschen, und der Nachweis typischer DNA-Leitern im Agarosegel ist durch das Vorhandensein von Keratin oft nicht möglich (Gandarillas et al., 1999).

1.11 Kutaner Metabolismus

Über die metabolische Kapazität der Haut ist wesentlich weniger bekannt als über den Ablauf der kutanen Apoptose oder über die Resorptionsvorgänge. Neben der Rolle des Stratum corneum als entscheidende Struktur für die epidermale Barrierefunktion gibt es zunehmend Hinweise darauf, dass Xenobiotika-metabolisierende Enzyme und Transportproteine als eine zweite, biochemische Barriere der Haut dienen (Jugert et al., 1994; Keeney et al., 1998; Merk, 1998). Nach der Penetration werden Xenobiotika zunächst durch Phase-I-Reaktionen, die im wesentlichen Oxidations-, Reduktions- und Hydrolysevorgänge umfassen, und Phase-II-Reaktionen (Glucuronidierung, Sulfatierung, Methylierung und Glutathionkonjugation) chemisch aktiviert oder inaktiviert (Kao and Carver, 1991).

Phase-I-Reaktionen. Die bedeutendste Enzymfamilie, die an Phase-I-Reaktionen beteiligt ist, sind die Cytochrom P450 (CYP)-abhängigen Monooxygenasen, deren Existenz in der Haut bei Untersuchungen von Enzyminduktoren vom Phenobarbital- und Methylcholanthren-Typ festgestellt wurde (Vecchini et al., 1995). CYP-Enzyme und Transport-assoziierte Proteine spielen komplementäre Rollen in der Arzneistoffdisposition durch Aufnahme (Phase 0), Biotransformation (Phase I und II) und Antitransport (Phase III) (Baron et al., 2001a). Baron et al. (Baron et al., 2001b) analysierten die Expressionsmuster sowohl von polyspezifischen Membrantransportern wie den MRP (multidrug - resistance - associated proteins) als auch von CYP450-Isoenzymen in humanen Keratinozyten unter konstitutiven Bedingungen und nach Induktion mit verschiedenen Induktoren und Zytokinen. RT-PCR-Analyse und Immunoblotting zeigten die konstitutive Expression fast aller MRPs sowie der CYP-Subtypen 1A1, 1B1, 2B6, 2E1 und 3A5. CYP3A4 wurde dagegen nur nach Induktion mit Dexamethason exprimiert.

Das CYP-Isoenzym 1A1 aktiviert Prokarzinogene z.B. in der Haut; Faktoren, die die CYP1A1-Expression in der Haut kontrollieren, sind allerdings unbekannt. Induzierbar ist die Expression dieses Enzyms in der Haut von Ratten durch β -Naphthoflavon (Raza and Mukhtar, 1993) sowie in der Rattenepidermis und kultivierten humanen Keratinozyten durch Benz-(a)-anthracen und β -Naphthoflavon (Khan et al., 1992).

Ein weiterer CYP450-Subtyp, CYP26A1, konnte in humaner Epidermis und in primären Keratinozyten nachgewiesen werden, allerdings nur in sehr niedrigen Konzentrationen (Popa et al., 1999).

Zusätzlich zu ihrer Entgiftungsfunktion gibt es Hinweise auf die Beteiligung der CYP-Enzyme an Allergien gegen Substanzen mit kleinem Molekulargewicht: so zeigten Basketter et al. (Basketter et al., 1996), dass die Metaboliten des kutanen Sensibilisators Eugenol, die über das CYP-Isoenzym 1A1 gebildet werden, vermutlich die Hauptantigene sind. Al Masaoudi et al. (Al Masaoudi et al., 2001) beobachteten einen starken Anstieg der CYP1A1 mRNA-Menge in humanen Keratinozyten innerhalb von 10 h nach der Stimulation mit Eugenol. Zusammengefaßt deuten die Ergebnisse darauf hin, dass Eugenol seine immunogenen Effekte nach Metabolisierung über CYP1A1 ausübt.

In primären humanen Keratinozyten wurden ferner das Phase-I-Enzym NADPH-Reduktase (Smith, 1994) nachgewiesen.

An der Haut von Nacktmäusen wurde - neben einer stereospezifischen transdermalen Resorption - eine kutane Hydrolyse von R/S-Propranolol-Esterprodrugs beobachtet (Ahmed et al., 1996). Ex vivo - Versuche mit Parabenen an Rattenhaut sowie Modellrechnungen ergaben, dass eine verstärkte Esterhydrolyse in der lebenden Epidermis die Resorption fördert, wobei zwar die Konzentration der Ausgangssubstanz sinkt, die des Metaboliten jedoch erheblich steigt (Bando et al., 1997; Seko et al., 1999). Zu diesem Ergebnis führten auch Untersuchungen zur Aufnahme von L-Ala-4-methoxy-2-naphthylamid über gestrippte Humanhaut und HaCaT-Zellen (Boderke et al., 2000).

Phase-II-Reaktionen. Bei Untersuchungen an primären Keratinozyten in Kultur konnten Aktivitäten von dem Phase-I-Enzym Phenacetin-Deethylase und den Phase-II-Enzymen Procainamid-N-Acetyltransferase und Paracetamol-Sulfotransferase nachgewiesen werden. Post-konfluente Keratinozyten zeigten niedrigere Aktivitäten und andere Enzymmuster als prä-konfluente Zellen. Kryokonservierung reduzierte die Aktivitäten der Xenobiotika-metabolisierenden Enzyme allenfalls geringfügig (Hirel et al., 1995). Die Phase-II-Enzyme Phenol-UGT und Glutathion-S-Transferase wurden ebenfalls in primären humanen Keratinozyten (Vecchini et al., 1995) nachgewiesen.

Unterschiede beim humanen und tierischen kutanen Metabolismus. Untersuchungen zur Biotransformation von Epoxidharzen erbrachten den Nachweis der Epoxidhydrolase und - in geringem Umfang - der Glutathion-S-Transferase in der Haut von Mensch, Maus und Ratte; dabei überstieg die

Metabolisierungsgeschwindigkeit der tierischen Haut die der humanen nahezu 10 fach (Boogaard et al., 1999).

Eingehende Untersuchungen zur kutanen Resorption und zur Biotransformation von Prednicarbat, einem topischen Glucocorticoid, ergaben erhebliche Unterschiede im Metabolisierungsmuster bei Mensch und verschiedenen Säugerspezies. Beispielsweise konnten bei der Ratte nach topischer Applikation von Prednicarbat ungefähr 20 verschiedene Metaboliten im Blut identifiziert werden (Kellner et al., 1986). Obwohl es sich hier zu einem wesentlichen Teil um hepatische Abbauprodukte handelt, wird der Unterschied zum humanen Metabolismus deutlich, da beim Menschen der hydrolytische Abbau zu Prednisolon-17-ethylcarbonat und Prednisolon in Leber und Haut klar dominiert (Barth et al., 1993; Gysler et al., 1999; Gysler et al., 1997; Kellner et al., 1986).

Die resorptive Toxizität eines kutan applizierten Wirkstoffs ist demnach unvollständig vorhersagbar, wenn man allein die Ergebnisse von Penetrations- / Permeationsstudien am Tier in Beziehung zu den Ergebnissen der toxikologischen Prüfung setzt. Die von der OECD empfohlenen Untersuchungen zur Penetration und Permeation an (frischer) Humanhaut (OECD, 2004b) erscheinen daher sinnvoll.

Bedeutung des kutanen Metabolismus für die perkutane Absorption. Die Bedeutung des Hautmetabolismus für die Bestimmung der perkutanen Absorption ist offensichtlich, wenn eine Substanz während ihrer Passage durch das Stratum corneum zu Substanzen metabolisiert wird, die die Haut unabhängig von der Ausgangssubstanz penetrieren. Tritt die kutane Metabolisierung erst nach der geschwindigkeitsbestimmenden Passage des Stratum corneum auf, ist zwar die Metabolisierung kein die Absorption beeinflussender Faktor (Howes et al., 1996), doch können die Metaboliten die Risiken bestimmen. Über die Bedeutung des Erhalts des metabolischen Potentials der Haut für ihr Permeationsverhalten gibt es unterschiedliche Ansichten: Boehnlein et al. zeigten (Boehnlein et al., 1994), dass die perkutane Absorption von Methylsalicylat (gemessen als Salicylat in der Rezeptorlösung) über viable Haut des unbehaarten Meerschweinchens der über nicht-viable Haut sehr ähnlich war. Interessanterweise wies demnach die nicht-viable Haut noch eine deutliche esteratische Aktivität auf. Im Gegensatz dazu ergaben Untersuchungen mit Phenylazophenol, dass die Penetrationsbarriere der Epidermis durch ihre Viabilität beeinflusst wird (Collier et al., 1993). Im Falle von hochlipophilen Substanzen beeinflusst die kutane Metabolisierung direkt die Gesamtmenge

penetrierter / permeierter Substanz: je höher die Rate der Biotransformation zu hydrophilen Stoffen war, desto größer war die Gesamtpenetration der Substanz (Muttersubstanz und Metaboliten) (Bando et al., 1997; Seko et al., 1999). Sinnvoll sind also die Untersuchung des kutanen Metabolismus parallel zur Bestimmung der Hautabsorption sowie die Erfassung der Metabolisierungsprodukte und Berücksichtigung dieser bei der Risikobewertung einer Substanz (Howes et al., 1996).

Kutane Verteilung und subzelluläre Lokalisierung von Enzymen des Fremdstoffmetabolismus. Das Vorkommen verschiedener Cytochrom P450 Isoenzyme in Zellkulturen dermaler Fibroblasten, Langerhanszellen, Melanozyten und Keratinozyten auf mRNA-Ebene untersuchten Saeki et al. mittels RT-PCR (Saeki et al., 2002), die Cytochromverteilung in muriner Haut (Induktion der Subtypen 1A1, 2B1, 2E1 und 3A durch topische Applikation von Dexamethason) auf mRNA-, Protein- und funktioneller Ebene Jugert et al. (Jugert et al., 1994). Cytochrom P450 abhängige Monooxygenasen finden sich in der Haut von Nacktmäusen vorzugsweise in der Dermis und subzellulär in der mikrosomalen Fraktion, also dem glatten endoplasmatischen Retikulum (Finnen et al., 1985). Allerdings gibt es auch Anzeichen für das Vorkommen Cytochrom P450- und Phase-II-metabolisierender Enzyme in der Epidermis und den Hautanhangsgebilden (Pendlington et al., 1994). Das Stratum corneum ist zur Esterhydrolyse befähigt; dort sind Lipase-, Protease-, Phosphatase-, Sulfatase- und Glycosidase-Aktivitäten identifiziert worden, die z.B. mit den Desquamationsprozessen der Haut in Verbindung gebracht werden (Elias and Menon, 1991; Forestier, 1992; Suzuki et al., 1993).

Xanthinoxidaseaktivität wurde in muriner Haut (Sultana and Saleem, 2004), in humanen Fibroblasten (Han et al., 2004) und in Rattenhaut, dort im Cytosol (Ueda et al., 2003), gefunden.

Neben den Epidermisschichten sind auch die Dermis und die Hautanhangsgebilde an der Metabolisierung beteiligt. Obwohl die Dermis fünfmal größer als die Epidermis ist, ist letztere meist Hauptort des kutanen Metabolismus. Verantwortlich dafür ist die kurze Verweildauer der Mehrheit der Substanzen in der Dermis durch den raschen Abtransport über die Blutgefäße. Talgdrüsen zeigen hohe 5 α -Reduktase-Aktivität und sind wesentlich an der Steroidmetabolisierung beteiligt. Beispielsweise tragen Sebozyten zur Aktivierung von Testosteron zu 5 α -Dihydrotestosteron bei. Zellen der dermalen Papille metabolisieren Testosteron durch 5 α -Reduktion und 17 β -

Hydroxysteroid-Dehydrogenisation, Schweißdrüsen enthalten Esterasen (Cozzani et al., 2000).

1.12 Hepatischer und kutaner Xanthinmetabolismus

Coffein. Die hepatische Metabolisierung von Coffein (1,3,7-Trimethylxanthin) nach oraler Aufnahme ist bereits im Detail bekannt (Caubet et al., 2002; Georgia et al., 2001; Krul and Hageman, 1998). Hintergrund für diese genaue Untersuchung des Coffein-Stoffwechsels ist die Bestimmung des Phänotyps verschiedener hepatischer Biotransformationsenzyme, z.B. der CYP1A2-Enzymaktivität anhand des Paraxanthin / Coffein-Verhältnisses im Urin (Caubet et al., 2002). Im Urin nachweisbare Hauptmetabolite des Xanthins und die beteiligten Isoenzyme der Cytochrom-P450-Monooxygenasen sind in **Abb. 3** dargestellt. Weniger als 2 % der Muttersubstanz werden unverändert mit dem Urin ausgeschieden, und zu ungefähr 7 % trägt Theophyllin (1,3-Dimethylxanthin), zu 12 % Theobromin (3,7-Dimethylxanthin) und zu 80 % Paraxanthin (1,7-Dimethylxanthin) (Georgia et al., 2001), welches im Anschluß zu 10 % zu 1-Methylxanthin und zu 90 % zu 1,7-Dimethylurat weiter abgebaut wird (Krul and Hageman, 1998), zum Metabolitenspektrum bei. Diese Metaboliten können chromatographisch aufgetrennt und quantifiziert werden (Arnaud, 1985; Caubet et al., 2002; Georgia et al., 2001; Gorodischer et al., 1986; Krul and Hageman, 1998).

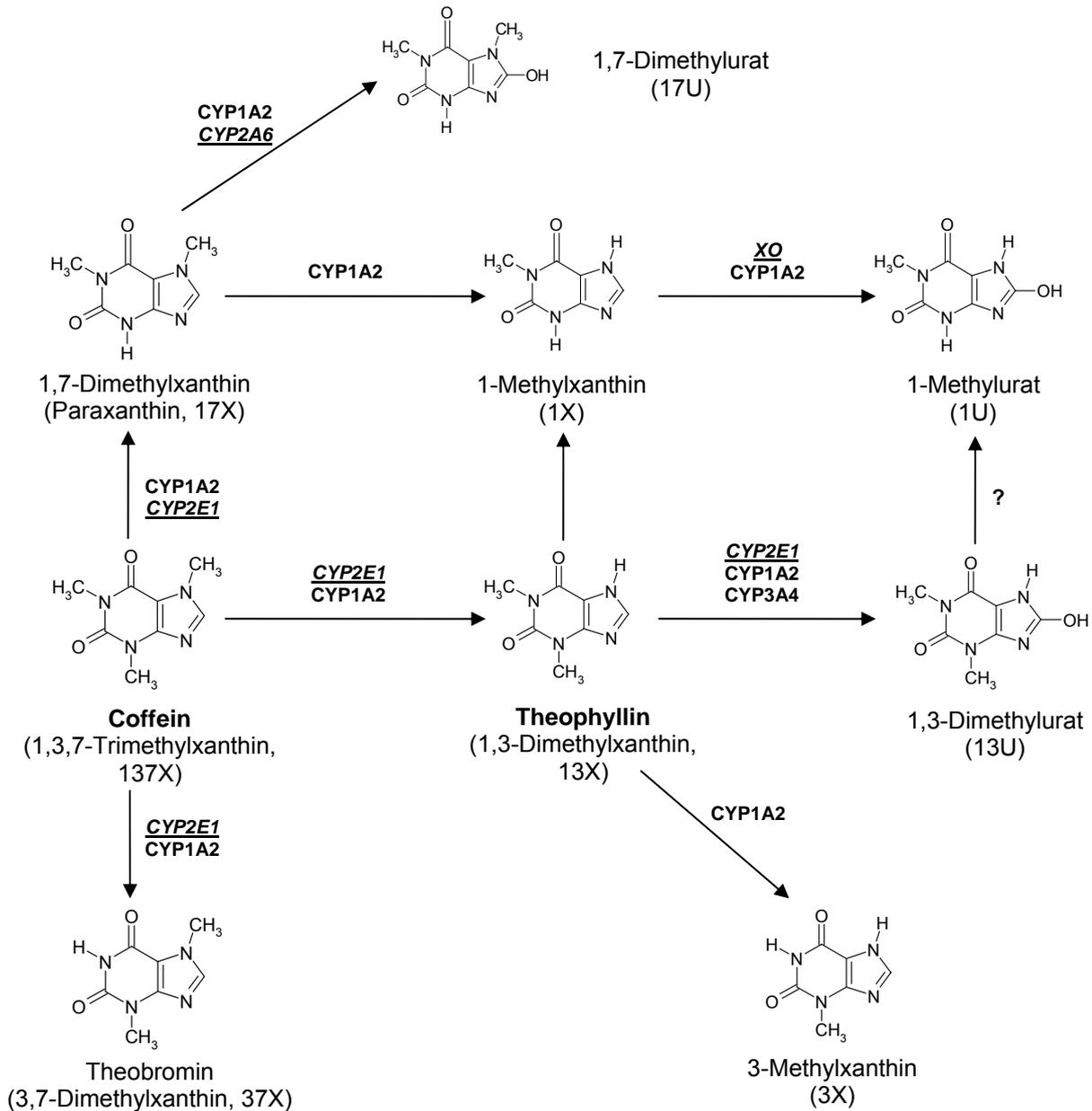


Abb. 3: Hauptmetabolisierungswege der Xanthine Coffein und Theophyllin in der Leber und beteiligte CYP 450-Isoenzyme. XO, Xanthinoxidase; kursiv und unterstrichen, in der Haut bzw. in kutanen Zellen vorkommende Subtypen der CYP 450-Monooxygenasen; nach (Ademola et al., 1992; Caubet et al., 2002; Georgia et al., 2001; Kizu et al., 1999b; Krul and Hageman, 1998).

Untersuchungen zur kutanen Coffein-Metabolisierung erfolgten bisher nur an Fibroblastenkulturen menschlichen Ursprungs, die keine detektierbare Biotransformation zeigten (Tu et al., 1982) sowie an exzidiert Rattenhaut nach topischer Applikation von Coffein (Bronaugh et al., 1989). Auch hier war kein Coffeinabbau nachweisbar. Allerdings ist eine Reihe der für den kutanen

Stoffwechsel von Coffein verantwortlichen CYP 450 - Isoenzyme in kutanen Zellen und Geweben nachgewiesen (**Tab. 2**).

Angaben zur Metabolisierung in humaner Haut oder Hautmodellen bei topischer Applikation von Coffein finden sich nicht, obgleich Coffein aufgrund seiner langjährigen Verwendung als Testsubstanz in *in vitro* Studien zur perkutanen Absorption - häufig unter Verwendung humaner Haut als Testmatrix - als Referenzsubstanz durch die OECD anerkannt ist (OECD, 2003).

Enzyme des Xanthinstoffwechsels	Vorkommen in der Haut
XO	murine Haut humane Fb Rattenhaut
CYP1A1 (für Xanthinmetabolismus nur nach Induktion von Bedeutung)	LC, KC, Fb, MC
CYP1A2	-
CYP2E1	KC, MC, LC, Fb, murine Haut
CYP2A6	Fb, MC
CYP3A4	KC (nach Induktion)
CYP2D6 *	Fb

Tab. 2: Gewebe- und zelluläre Verteilung von am kutanen Coffein- und Theophyllinmetabolismus beteiligten Isoenzymen. Fb, dermale Fibroblasten; LC, Langerhanszellen; KC, Keratinozyten; MC, Melanozyten; *, untergeordnete Bedeutung; **hervorgehoben**, nur für Coffeinstoffwechsel von Bedeutung; nach (Baron et al., 2001b; Han et al., 2004; Jugert et al., 1994; Saeki et al., 2002; Sultana and Saleem, 2004; Ueda et al., 2003).

Zudem wird Coffein seit einigen Jahren als Wirkstoff von Kosmetika genutzt, u.a. zur Behandlung der Cellulite. Die Wirkung soll auf einer Stimulation des Fettmetabolismus beruhen (Nicoli et al., 2005). Klinische Studien mit unterschiedlichen Produkten (Bertin et al., 2001; Sainio et al., 2000), zeigten einen Rückgang der Cellulite sowie in den meisten Fällen eine Produktsicherheit, bei ¼ der Produkte trat jedoch eine Allergisierung auf. Allerdings bleibt anzumerken, dass die Wirksamkeitsnachweise in der klinischen Studie hauptsächlich auf makroskopischen, subjektiven Methoden beruhten.

Als eine weitere Indikation für die Applikation von Coffein auf die Haut wird die neonatale Apnoe in Betracht gezogen (Nicoli et al., 2005). Frühgeborene Säuglinge erhalten Coffein üblicherweise durch intravenöse Infusion, da die Plasmaspiegelspitzen toxische Manifestationen wie Hypertonie, Tachykardie, Herzversagen etc. hervorrufen können (Anderson et al., 1999). Die transdermale

Administration von Coffein wurde aufgrund der bei Frühgeborenen anatomisch und funktionell noch unreifen Ausprägung der epidermalen Barriere sowie der schmerzfreien nicht-invasiven Therapiemöglichkeit als Alternative betrachtet und daher in verschiedenen Darreichungsformen bei Frühgeborenen untersucht. Mit einem Gel ließen sich Serumspiegel im therapeutischen Bereich erzielen (Amato et al., 1991; Barrett and Rutter, 1994). Die Anwendung von Coffein inkorporiert in einen bioadhäsiven Film zeigte zwar anhaltend konstante Plasma-Spiegel, allerdings auch eine schnelle Permeation zu Beginn der Therapie gefolgt von einer verzögerten, nicht-linearen Freisetzung, was auf eine schwierige Steuerbarkeit der Therapie hindeutet. Derzeit sind keine topischen Präparate für diese Indikation im Handel.

Theophyllin. Theophyllin wird bereits mit langjähriger Erfahrung als Bronchodilatator bei der Behandlung von akutem und chronischem Asthma angewendet. Die enge therapeutische Breite des Arzneistoffes und die interindividuell beträchtlich variable hepatische Metabolisierung machen ein therapeutisches 'drug monitoring' erforderlich, weshalb die hepatische Biotransformation von Theophyllin gut untersucht ist (Ha et al., 1995; Kizu et al., 1999b) (**Abb. 3**). Weniger als 10 % Theophyllin werden unverändert mit dem Urin ausgeschieden (Georgia et al., 2001). Wie im Falle von Coffein erfolgt der Hauptteil der Metabolisierung über das mikrosomale Cytochrom P450-System. Der bedeutendste Schritt im Stoffwechselweg ist die 8-Hydroxylierung, die zur Bildung von 1,3-Dimethylurat führt und ca. 45-55 % der Gesamttheophyllinclearance ausmacht. Ungefähr 20-25 % trägt die Bildung von 1-Methylxanthin und 13-16 % die Bildung von 3-Methylxanthin zum Metabolismus bei. 1-Methylxanthin wird über die Xanthinoxidase sehr schnell zu 1-Methylurat oxidiert und ist daher normalerweise nicht detektierbar (Kizu et al., 1999b). Die für die Biotransformation in der Leber verantwortlichen CYP450-Isoenzyme (CYP1A2, CYP1A1, CYP2E1, CYP2D6, Xanthinoxidase) sind bekannt, wobei der Subtyp CYP1A1 nur nach Induktion eine Rolle spielen dürfte, CYP3A4 *in vitro* nicht aktiv ist, und CYP2D6 nur eine untergeordnete Bedeutung hat (Ha et al., 1995; Kizu et al., 1999a; Kizu et al., 1999b).

Im Gegensatz zu Coffein wurde die Metabolisierung von Theophyllin in der Haut eingehend untersucht, Theophyllin und seine Metaboliten sind über chromatographische Verfahren quantifizierbar (Ademola et al., 1992; Kizu et al., 1999b). Hintergrund für diese Untersuchungen war die potentielle Entwicklung eines transdermalen Applikationssystems als Alternative zur oralen Retardform von

Theophyllin unter Umgehung der schwankenden hepatischen Metabolisierung und pharmakokinetischer Interaktionen mit der Nahrung. Micali et al. beschreiben ausreichend hohe Plasmaspiegel bei der Anwendung einer transdermalen Arzneiform von Theophyllin zur Behandlung der Apnoe bei Neugeborenen (Barrett and Rutter, 1994; Micali et al., 1993). Derzeit sind allerdings keine topischen Arzneiformen mit dem Wirkstoff Theophyllin im Handel. *In vitro* Untersuchungen mit einer transdermalen Arzneiform von Theophyllin an exzidierte Humanhaut zeigten ein schnelles Anfluten des Arzneistoffs direkt nach der Applikation (Ademola et al., 1992). Teile des Arzneistoffs verblieben noch nach Tagen als Reservoir in der Haut und diffundierten in den folgenden Tagen graduell ins lebende Gewebe und wurden dort metabolisiert. Dies zeigt auch hier wie bereits im Falle von Coffein die schlechte Steuerbarkeit der transdermalen Therapie. Des Weiteren kam es durch Retention der Metaboliten zu Hautirritationen. Die Hauptmetaboliten in Humanhaut sind 1,3-Dimethylurat, 3-Methylxanthin und 1-Methylurat. 3-Methylxanthin erwies sich als ebenso potent wie Theophyllin, 1,3-Dimethylurat war ebenfalls wirksam und für die Nebenwirkungen verantwortlich (Ademola et al., 1992).

1.13 Metabolische Kapazität von Hautmodellen

Die metabolische Kapazität von Hautmodellen wurde bisher nur in geringem Umfang untersucht, zum Metabolismus der Xanthine Coffein und Theophyllin ist nichts bekannt. Harris et al. verglichen die drei Modelle EPISKIN[®], EpiDerm[™] und Skinethic[®] mit Monolayerkulturen und exzidierte humaner Epidermis hinsichtlich der Phase-I- (CYP1A1) und Phase II- (Glutathion S-Transferase) Aktivität und zeigten eine hohe Variabilität der Enzymaktivitäten in Abhängigkeit von Donor / Charge und vom Hautmodell (Harris et al., 2002a). In einer weiteren Arbeit bestimmten sie die NADP(H):Chinonreduktase - Aktivität in primären Keratinozytenkulturen, humaner Epidermis und den drei Hautmodellen und fanden eine ähnliche Aktivität in rekonstruierter Epidermis und humaner Epidermis, die bei beiden Matrices allerdings niedriger war als in den Monolayerkulturen (Harris et al., 2002b).

Untersuchungen zur Metabolisierung von Betamethason-17-valerat an einem artifiziellen Hautäquivalent zeigten eine höhere esteratische Aktivität des Modells im Vergleich zum Kontrollkulturmedium sowie eine beschleunigte Metabolisierung zu Betamethason (Kubota et al., 1994). Ein institutseigenes Vollhautmodell einer

Arbeitsgruppe wies ein Metabolitenprofil von Testosteron auf, das dem neonataler Vorhaut sehr ähnlich war (Slivka et al., 1993). Ein ebenfalls internes Epidermismodell hatte aktive membrangebundene mischfunktionelle Oxidasen, NADPH-Cytochrom C-(P450)-Reduktasen, Testosteron-5 α -Reduktase, UDP-Glucuronosyltransferase, Glutathion-S-transferase, Steroid- und Arylsulfatasen und Epoxidhydrolasen (Pham et al., 1990).

Generell zeigen primäre Keratinozyten in Kultur, Humanhaut und rekonstruierte Epidermis Unterschiede in der Genexpression. Große Ähnlichkeiten bestehen bei Humanhaut und rekonstruierter Epidermis, doch exprimiert die Haut viel weniger mitochondriale Proteine als Monolayerkulturen und Hautmodelle. Im Verhältnis zu den beiden anderen Matrices ist der Zellstoffwechsel bei der Haut daher geringer (Gazel et al., 2003). Hinsichtlich einer Diskriminierung der metabolischen Aktivität der Primärkulturen von jener der Hautmodelle gibt es allerdings bisher keine eindeutigen Aussagen.

1.14 Fragestellung und Zielsetzung

In vitro Testmethoden zur Bestimmung der perkutanen Absorption gewinnen in der Toxikologie aufgrund der politischen Vorgaben in den letzten Jahren - wie dem Verbot von Tierversuchen bei der Sicherheitstestung von Kosmetika und der geforderten 'Nach'-Testung von ca. 30.000 Altstoffen durch die chemische Industrie in naher Zukunft - immer mehr an Bedeutung. Die Verwendung humanen Hautmaterials zu diesem Zweck ist bereits etabliert, allerdings ist seine Verfügbarkeit, beispielsweise aus chirurgischen Eingriffen, limitiert. Die OECD hat 2004 ihre Bereitschaft zur Akzeptanz der kommerziell erhältlichen rekonstruierten Haut als Testmodell erklärt, sofern die Testmethode erfolgreich standardisiert und validiert ist.

Ziele dieser Arbeit sind eine umfassende Charakterisierung der Hautmodelle hinsichtlich ihrer bislang nicht definierten Stabilität / Resistenz gegenüber verschiedenen Medien und ihrer metabolischen Kapazität, ferner die Entwicklung einer besser standardisierten Testmethode zur Bestimmung der perkutanen Absorption, d.h. letztendlich eine Anerkennung als *in vitro* Testsystem.

Zunächst galt es die Stabilität der Hautmodelle unter den Bedingungen der Permeationsexperimente zu untersuchen. Vorangegangene Untersuchungen zeigten, dass durch den Zusatz von 5 % bovinem Serumalbumin (BSA) zum Rezeptormedium die Metabolisierung von Prednicarbat in rekonstruierter Epidermis (Haberland et al., 2003) gehemmt wurde. Dies deutet auf eine Beeinflussung der esteratischen Enzyme hin und könnte durch eine BSA-bedingte Schädigung der Zellen verursacht sein. Daher sollte zunächst der Einfluss des Albumins sowie einiger häufig in perkutanen Absorptionsstudien eingesetzter Mangelmedien auf die Viabilität und Integrität der rekonstruierten Epidermismodelle untersucht werden. Zur näheren Charakterisierung der bei Epithelzellen des proximalen Tubulus (LLC-PK(1)-Zellen) (Erkan et al., 2001) beobachteten BSA-bedingten Toxizität wurden auch primäre Keratinozytenkulturen untersucht. Da bei LLC-PK(1)-Zellen dieser Effekt über den Fas-FADD-Signalweg vermittelt ist, sollte eine Beteiligung apoptotischer Prozesse nach BSA-Einwirkung auf primäre Keratinozyten mittels spezifischer Inhibition der Caspase-8, unspezifischer Inhibition aller bedeutenden Caspasen, durchflusszytometrischer Bestimmung apoptotischer und nekrotischer Zellfraktionen sowie mittels fluoreszenzmikroskopischer Detektion apoptotischer Zellkerne untersucht werden.

Im zweiten Teil der Arbeit sollte die metabolische Aktivität eines Epidermis- und eines Vollhautmodells im Vergleich zu jener von kutanen Primärkulturen untersucht werden. Der Einfluss des kutanen Metabolismus auf das Permeationsverhalten einer Substanz wurde mehrfach nachgewiesen (Bando et al., 1997; Howes et al., 1996; Seko et al., 1999). Ebenso zeigten sich erhebliche Unterschiede im Metabolisierungsmuster bei Mensch und Tier - daher ist es bedeutsam, die Biotransformation von kutan applizierten Substanzen an humanem Hautmaterial zu untersuchen. Aus diesem Grund erschien es hier sinnvoll, den kutanen Metabolismus des Xanthins Coffein, das als OECD-Referenzsubstanz in den nachfolgenden Untersuchungen zur perkutanen Absorption hinsichtlich seines Permeationsverhaltens charakterisiert werden sollte, zu bestimmen. Hinweise in der Literatur, die eine kutane Biotransformation von Coffein ausschließen, wurden bislang ausschließlich an Fibroblasten (Tu et al., 1982) oder exzidiierter Rattenhaut (Bronaugh et al., 1989) durchgeführt. Der kutane Coffein-Stoffwechsel wurde bisher noch nicht an humanem Hautmaterial untersucht. Daher sollte seine Biotransformation zunächst an kutanen Primärzellen und schließlich an

Hautmodellen - einem Epidermis- und einem Vollhautmodell - untersucht werden. Eine deutliche Metabolisierung der Referenzsubstanz hätte einen Einfluss auf das Ausmaß der Penetration / Permeation, auf die Anforderungen an die Analytik, an den Zustand der Haut für die Permeationsuntersuchungen - es dürfte in diesem Fall nur noch frisch exzidierte Haut verwendet werden - und an die verwendeten Rezeptormedien. Parallel dazu wurden die o.g. Untersuchungen auch am Xanthin Theophyllin durchgeführt. Für Theophyllin wurde eine kutane Metabolisierung an Humanhaut bereits nachgewiesen (Ademola et al., 1992), so dass in jedem Fall anhand dieser Substanz die metabolischen Kapazitäten beider Testsysteme, des 2D- und 3D-Modells, verglichen werden können. Zu diesem Zweck wurde eine HPLC-Analytik für eine Auftrennung beider Xanthine, da deren Stoffwechselwege sich zum Teil überschneiden, und deren Metaboliten etabliert.

Schließlich sollten unter Berücksichtigung der Ergebnisse der vorangegangenen Untersuchungen unter Verwendung der OECD-Referenzsubstanz Coffein und der Franzzelltechnik die Versuchsbedingungen perkutaner Absorptionsuntersuchungen anhand verschiedener Hautmatrices einschließlich rekonstruierter Epidermismodelle definiert werden. Dazu wurden verschiedene Einflussgrößen auf die Permeation untersucht. Im Anschluss sollten unter diesen einheitlichen Versuchsbedingungen erste vergleichende Permeationsuntersuchungen an den unterschiedlichen Matrices erfolgen und die relevanten Permeationsparameter (Lag-Zeiten, K_p -Werte, Menge permeierter Substanz nach Versuchsende) berechnet werden. Auf dieser Grundlage sollte über die Eignung der Hautmodelle als Testmatrix für Studien zur perkutanen Absorption entschieden werden. Durch eine Gegenüberstellung von im Rahmen der Permeationsuntersuchungen gewonnenen Viabilitäts- und Integritätsdaten der Hautmatrices und den hier ermittelten K_p -Werten aus den Permeationstests sollte ferner die Eignung von MTT-Reduktionsassay und histologischer Untersuchung der exponierten Häute als Qualitätskriterien für deren Barriere bestimmt werden.