

3 ERGEBNISSE

3 ERGEBNISSE

3.1 Stabilität humaner Hautmodelle und primärer Keratinozyten gegenüber Medieneinflüssen

3.1.1 Einfluss von Rezeptormedien auf die Viabilität und Integrität rekonstruierter Haut

Zunächst sollte der Effekt verschiedener, häufig in perkutanen Absorptionsstudien eingesetzter Rezeptormedien auf die Viabilität und Integrität rekonstruierter Epidermis im Rahmen von Franzzelluntersuchungen bestimmt werden. Der Zusatz von bovinem Serumalbumin (BSA) in einer Konzentration von 5 % zum Rezeptormedium wird von der OECD zur Überwindung von Löslichkeitsproblemen bei Substanzen höherer Lipophilie empfohlen (OECD, 2003). Aufgrund der Hemmung des Prednicarbatmetabolismus in rekonstruierter Epidermis durch 5 % BSA im Rezeptormedium (Haberland et al., 2003), die auf eine Beeinflussung der esteratischen Enzyme der Hautzellen hindeutete und eine Beeinträchtigung der kutanen Viabilität vermuten ließ, war insbesondere der Einfluss des Albuminzusatzes von Interesse.

Viabilitätsbestimmung mittels MTT-Test. Mangelmedien wie MEME (+ Zusätze) und PBS (+ 0,1 % Glucose) reduzierten die Viabilität im Vergleich zum vom Hersteller empfohlenen Hautkulturmedium (Kontrolle) um ca. 10 % respektive 50 %. Der Zusatz von 5 % BSA resultierte in einer kleinen, aber nicht signifikanten zusätzlichen Reduktion der Viabilität im Vergleich zum korrespondierenden BSA-freien Medium (**Abb. 6**).

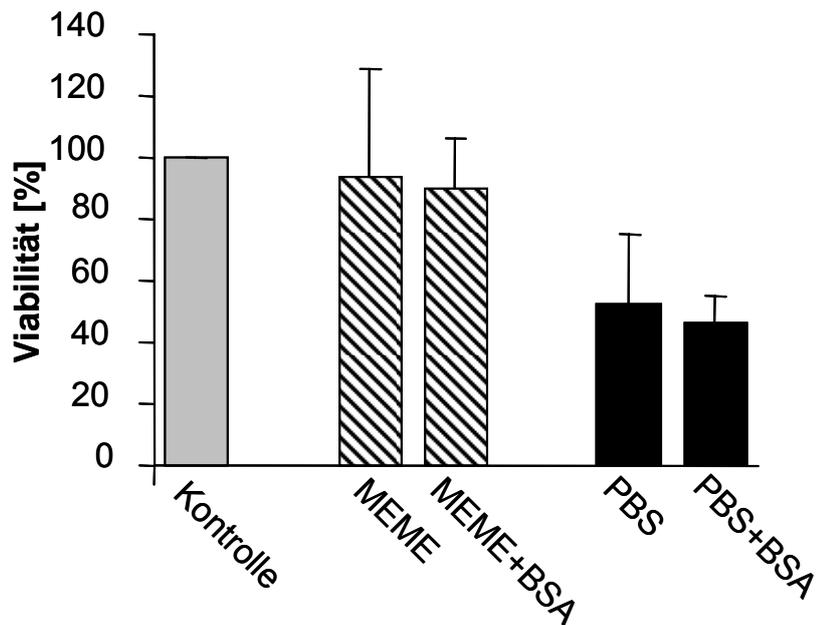


Abb. 6: Viabilität des Kunsthautmodells Skinethic® nach 6 -stündigem Franzzellversuch unter Einwirkung verschiedener Rezeptormedien. Kontrolle, vom Hersteller empfohlenes Hautkulturmedium (ErhaltungsmEDIUM); MEME und PBS, Mangelmedien. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SD von 3 bis 6 unabhängigen Versuchen.

Wiederholungen der Versuche fanden immer an den gleichen Wochentagen statt, um falsch-positive Resultate durch weitere Ausdifferenzierung der rekonstruierten Epidermis bei längerer Inkubation zu vermeiden. Alle Matrices waren somit gleichen Alters.

Viabilitätsbestimmung anhand Lactat-Messung. Die Messung der Lactatkonzentration im Rezeptormedium unter den o.g. Bedingungen des Franzzellversuches ergab sehr niedrige Messwerte, die wahrscheinlich auf die starke Verdünnung in den Rezeptormedien (Franzzellvolumen = 12 ml, dynamisches Protokoll) zurückzuführen sind. Dies schließt Aussagen zur Viabilität anhand der Lactatbestimmung aus.

LDH - Aktivität im Rezeptormedium. Die Bestimmung der LDH-Freisetzung in das Rezeptormedium (MEME mit und ohne BSA-Zusatz) als Maß für die Membranintegrität der rekonstruierten Epidermis zeigte folgende Ergebnisse: nach 6-stündigem Versuch war in BSA-freiem Medium kein Anstieg der LDH-Aktivität zu beobachten. Bei Zusatz von 5 % BSA war allerdings schon nach 30 Minuten ein Anstieg der LDH-Aktivität im Medium zu messen; diese nahm auch nach 6 h nicht

weiter zu. Dies lässt auf eine sehr schnell auftretende Membranschädigung der untersten Zellschicht durch BSA schließen (**Abb. 7**).

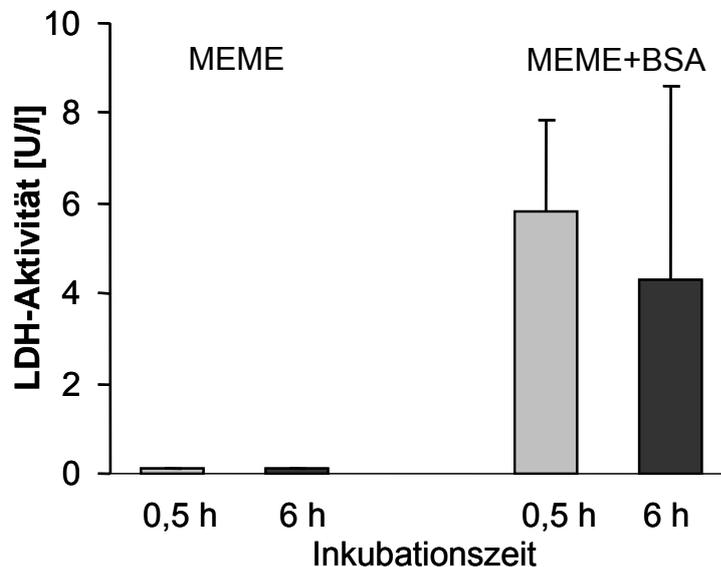


Abb. 7: LDH-Aktivität im Rezeptormedium nach 30 minütiger (graue Säulen) und nach 6-stündiger (schwarze Säulen) Exposition der Hautmodelle gegenüber verschiedenen Medien. Die Medien selbst zeigten keine detektierbare LDH-Aktivität. Die Sensitivität der Methode betrug ca. 0,1 U/l. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SD von 3 unabhängigen Versuchen.

Eine Messung der LDH-Freisetzung unter den gleichen Versuchsbedingungen wie bei der Lactat-Messung beschrieben (s.o.) ergab im Übrigen ebenfalls sehr niedrige Messwerte, so dass im hier beschriebenen Versuch kleinere Franzellen verwendet wurden (siehe auch Material und Methoden).

Histologie rekonstruierter Epidermis nach Medieneinwirkung. Auch die histologische Untersuchung der rekonstruierten Haut nach Versuchsende zeigte einen deutlichen von BSA und den Defizienzmedien induzierten Schaden auf die Membranen. Die Evaluierung unter Blindbedingungen führte zu einer Einstufung der mit PBS unterspülten Haut als mäßig geschädigt (histologischer Score 4), die mit PBS + 5 % BSA behandelte Haut wurde als schwer geschädigt (Score 2) eingestuft (siehe histologischer Score unter Material und Methoden). Die unbehandelte Kontrolle wies eine normale Morphologie (Score 8) auf (**Abb. 8**). Viabilitätsuntersuchungen mittels MTT-Test an parallel zu den histologischen Untersuchungen entnommenen Stanzbiopsien ergaben durch PBS eine Reduktion

der Viabilität auf 71 %, BSA-Zusatz schädigte die Haut zusätzlich (31 % Viabilität) im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (= 100 % Viabilität).

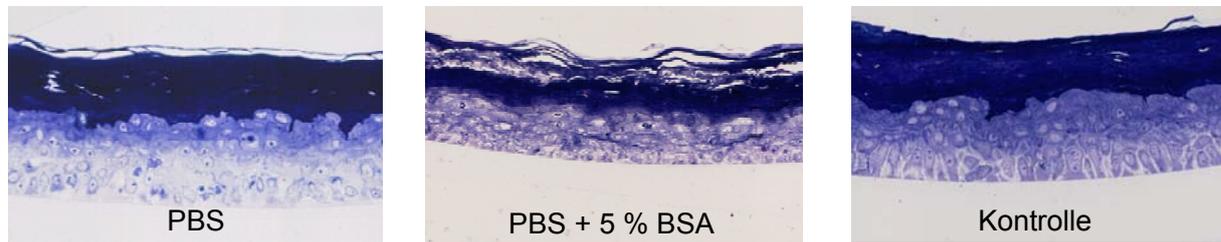


Abb. 8: Histologisches Erscheinungsbild der rekonstruierten Epidermis nach Einwirkung verschiedener Rezeptormedien. Die lichtmikroskopische Untersuchung erfolgte in 400-facher Vergrößerung.

3.1.2 Einfluss von Rezeptormedien auf die Viabilität und Proliferation primärer humaner Keratinozyten

Weitere Untersuchungen des Prednicarbatmetabolismus an primären Keratinozyten zeigten eine Reduktion der Metabolisierung zum Endprodukt Prednisolon um 37 % unter BSA-Einfluss. Der Bildung von 65 % Prednisolon ohne BSA-Zusatz stand eine Bildung von nur 28 % Prednisolon bei BSA-Zusatz gegenüber. Da dies die Beobachtungen an rekonstruierter Haut (siehe 3.1.1) bestätigte, sollte nun die an rekonstruierter Haut nachgewiesene BSA-Toxizität genauer charakterisiert werden.

Viabilitätsmessung mittels MTT-Reduktionsassay. Untersucht wurde zusätzlich der Einfluss von 10 % fetalem Kälberserum (FKS), das zur Kultivierung von Haut und auch zur Verbesserung der Viabilität der Haut besonders bei Langzeitexperimenten häufig eingesetzt wird (Kratz, 1998). FKS enthält mindestens 6 % BSA.

Defizienzmedien wie MEME und PBS reduzierten nach 6-stündiger Inkubation die Viabilität der Keratinozyten um 20 % bzw. 30 %. Der Zusatz von Serum zu den Medien führte zu keiner weiteren Viabilitätsabnahme. BSA allerdings zeigte eine signifikante Reduktion um 30 - 50 % im Vergleich zum jeweiligen BSA-freien Medium. Im Gegensatz zum Hautmodell sind bei der Monolayerkultur alle Zellen mit den suboptimalen Medien und mit BSA in Kontakt, der Einfluß auf die Viabilität zeigt sich deshalb hier sehr deutlich (**Abb. 9**).

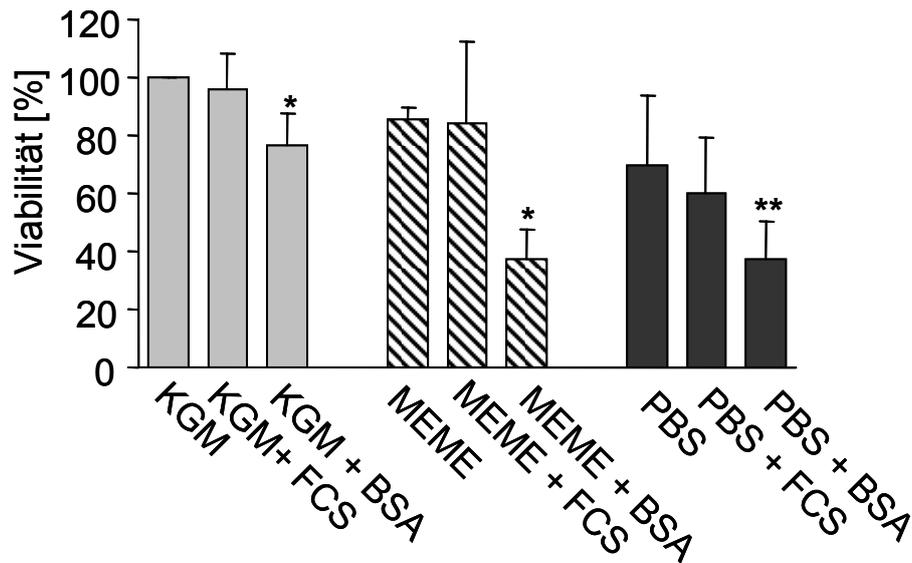


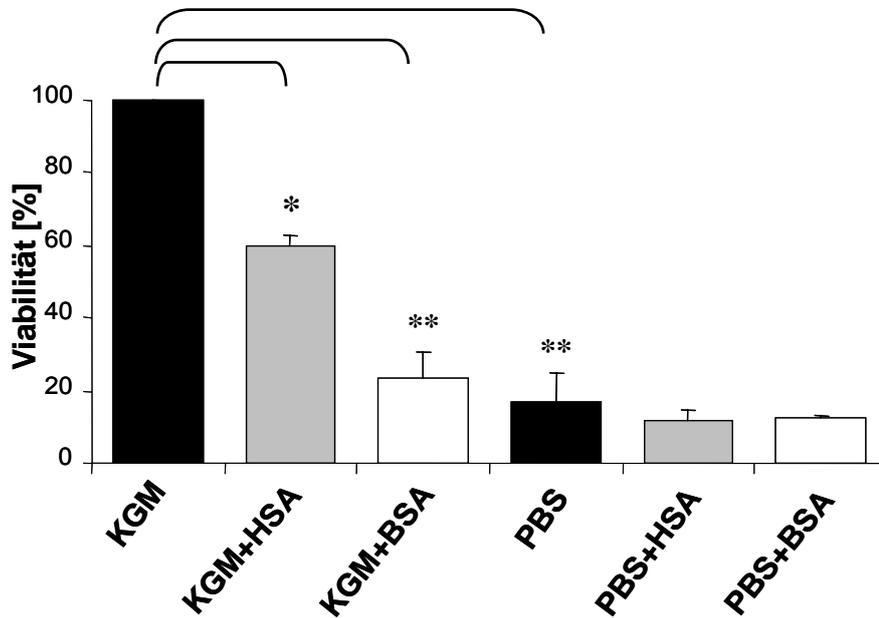
Abb. 9: Einfluss verschiedener Rezeptormedien einschließlich der Effekte von 5 % BSA und 10 % FCS auf die Viabilität primärer humaner Keratinozyten. Als Kontrolle dienten mit KGM kultivierte Zellen (Viabilität = 100 %). Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SD von $n = 3$ unabhängigen Versuchen, jeder Versuch wurde dreifach durchgeführt. *, $p \leq 0,05$; **, $p \leq 0,005$.

Einfluss von BSA auf die UV-Absorption im MTT-Test. Um auszuschließen, dass es sich bei der durch BSA verursachten deutlichen Extinktionsabnahme im MTT-Test im Vergleich zu den BSA-freien Medien um ein Artefakt durch Komplexbildung von BSA mit MTT handelt, wurden UV - Spektren einer MTT-Lösung mit und ohne den Zusatz von 5 % BSA unmittelbar nach der Herstellung sowie nochmals nach 6 h aufgenommen. Es zeigten sich keine Unterschiede in den Absorptionsintensitäten. Ein Artefakt durch Komplexierung des Farbstoffes ist damit auszuschließen.

Einfluss des Zusatzes von BSA auf die Osmolarität von Zellkulturmedien. Die Ermittlung der Osmolarität von Keratinozytenbasalmedium (KBM) mit und ohne Zusatz von 5 % BSA zeigte bei beiden Medien nahezu die gleichen Werte (KBM = 343 mosmol/l; KBM + 5 % BSA = 344 mosmol/l). Ein einfacher Osmolaritätseinfluss von BSA in dieser hohen Konzentration kann damit als Ursache der durch BSA verursachten Reduktion der Keratinozytenviabilität ausgeschlossen werden.

Einfluss von humanem Serumalbumin auf die Keratinozytenviabilität. Um speziesspezifische Effekte bei der beobachteten Toxizität von BSA auszuschließen, wurde auch der Einfluss von 5 % humanem Serumalbumin (HSA) auf die Viabilität von Keratinozyten mittels MTT-Test untersucht. Es zeigte sich eine ebenfalls signifikante Reduktion der Viabilität primärer Keratinozyten in Kultur unter HSA-

Einfluss (**Abb. 10**); man kann also zudem nicht von einem Albumin-unspezifischen Effekt ausgehen.



*Abb. 10: Einfluß von 5 % humanem im Vergleich zu 5 % bovinem Serumalbumin auf die Keratinozytenviabilität. Als Kontrolle dienten mit KGM kultivierte Zellen (Viabilität = 100 %). Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SD von $n = 2$ unabhängigen Versuchen, jeder Versuch wurde vierfach durchgeführt. *, $p \leq 0,05$; **, $p \leq 0,005$.*

Konzentrationsabhängigkeit der BSA-Toxizität auf primäre Keratinozyten. Die Inkubation der Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen von BSA in PBS (5 %; 2,5 %; 1,25 %; 0,625 %; 0,31 %; 0,156 % und 0,078 %) zeigte eine Konzentrationsabhängigkeit der durch BSA verursachten Toxizität auf primäre Keratinozyten in Kultur. Der Zusatz von 2,5 % BSA erwies sich noch als toxisch auf die Zellen (Viabilität ca. 82 %), geringere Konzentrationen waren ohne Einfluss.

Wirkung der verschiedenen Medien auf die Proliferation. Wie nach den Ergebnissen der Viabilitätsuntersuchungen zu erwarten war, reduzierten die Defizienzmedien, insbesondere der Zusatz von 5 % BSA (signifikante Proliferationshemmung bei KBM + 5 % BSA), die Proliferationsrate (**Abb. 11**). Die Hemmung des [^3H]-Thymidineinbaus war bei längerer Inkubation (belassen der Medien auf den Zellen während der 24-stündigen Inkubation mit [^3H]-Thymidin) noch deutlicher ausgeprägt (hier nicht dargestellt).

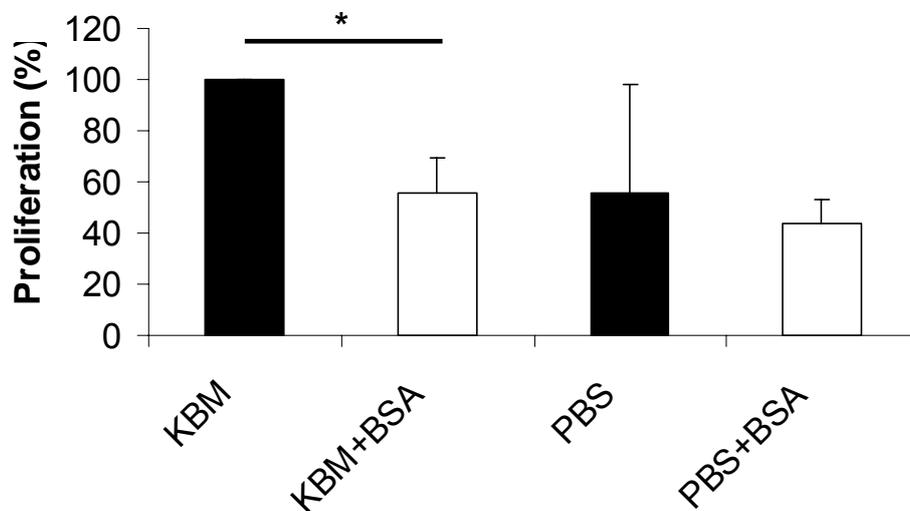


Abb. 11: Einfluss verschiedener Medien auf die Proliferation von primären Keratinozyten. Die unter Verwendung von KBM (Kontrolle) gemessene Aktivität wurde einer 100 %igen Proliferation gleichgesetzt, alle anderen Aktivitätswerte wurden dazu ins Verhältnis gesetzt. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SD von $n = 2$ unabhängigen Versuchen, jeweils durchgeführt als Doppelbestimmung. *, $p \leq 0,05$.

Lichtmikroskopische Inspektion nach Medieneinwirkung. Die lichtmikroskopischen Aufnahmen primärer Keratinozyten nach 6-stündiger Inkubation mit den Medien zeigten am Beispiel von MEME + BSA größere Abschnitte zellfreier Bereiche, d.h. die Zellen hatten sich bereits von der Kulturschale abgelöst. Nach der Inkubation mit PBS zeigten sich deutlich viele Zellen ebenfalls abgelöst von der Kulturschale im Medium schwimmend, außerdem wiesen viele Zellen an der Membranaußenseite bereits Ausstülpungen (Hinweis auf sogenanntes 'membrane blebbing') auf, diese waren gleichfalls, wenn auch in geringerem Ausmaß, bei den mit PBS und BSA-Zusatz inkubierten Zellen zu sehen (**Abb. 12**).

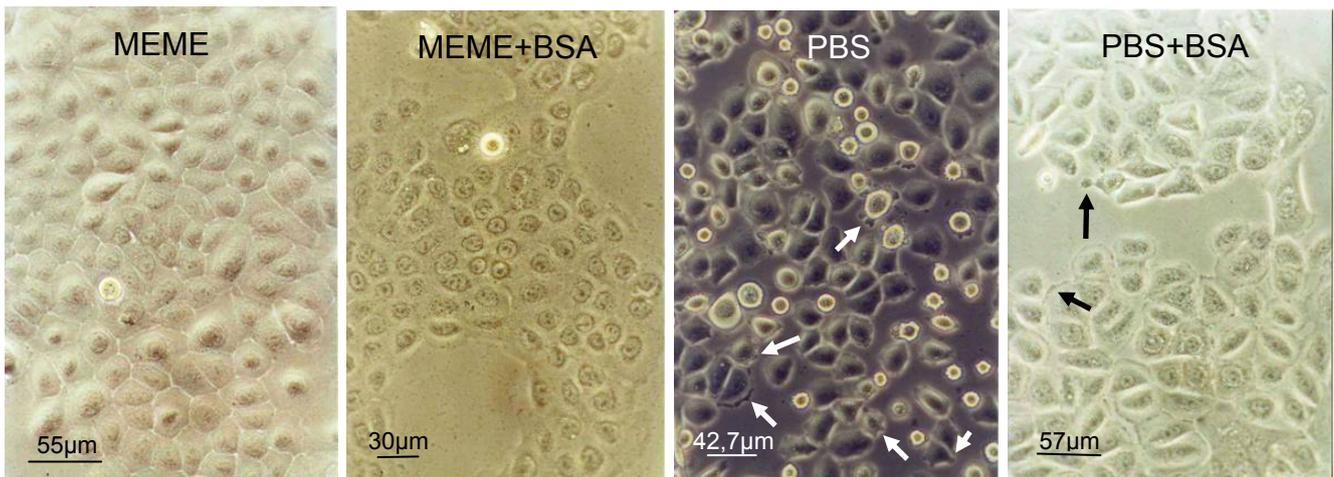
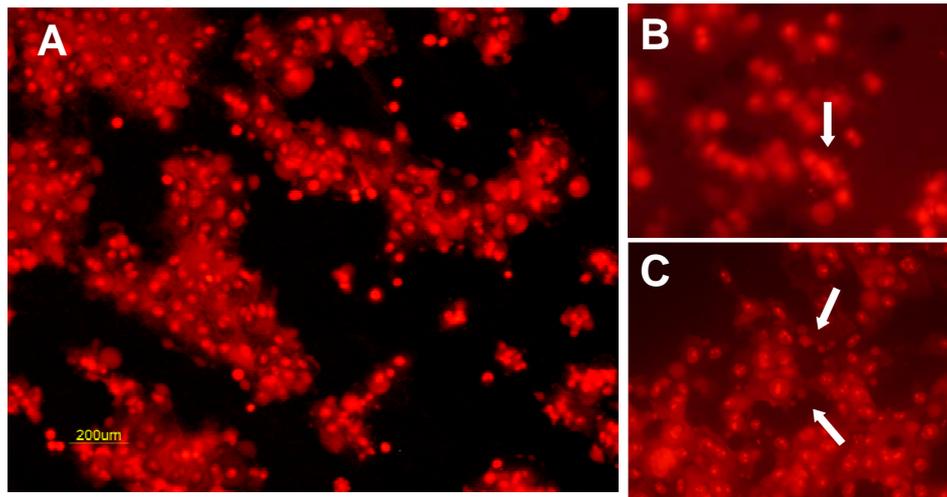


Abb. 12: Lichtmikroskopische Aufnahmen (Vergrößerung 320-fach) primärer Keratinozyten nach 6-stündiger Inkubation mit verschiedenen Medien. Die Zellen wurden bis fast zur Konfluenz kultiviert, um ähnliche Bedingungen wie im Hautmodell zu schaffen. Sogenannte 'membrane blebs' sind mit Pfeilen gekennzeichnet.

Fluoreszenzmikroskopisches Erscheinungsbild nach Medieneinwirkung und Propidiumiodidfärbung. Die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen primärer Keratinozyten nach 6-stündiger Inkubation mit verschiedenen Medien und Färbung mit Propidiumiodid (PI) bestätigen die Beobachtungen der lichtmikroskopischen Untersuchungen. Die Zellen lösten sich von der Oberfläche der Objektträger bei Einwirkung von Defizienzmedien (z.B. MEME + 5 % BSA, **Abb. 13 A**). Des Weiteren waren hier z.B. nach Inkubation mit PBS oder mit PBS + 5 % BSA (**Abb. 13 B, C**) vereinzelt Zellen zu sehen, die nun eindeutig typische Merkmale apoptotischer Prozesse, nämlich die Entstehung von Vesikeln der Plasmamembran (sogenanntes 'membrane blebbing') und die Ausbildung apoptotischer Körperchen aufwiesen. Diese enthalten nukleosomale DNA und sind deshalb nach Permeabilisierung der Zellen mit dem Interkalator PI definitiv nachzuweisen (Casciola-Rosen et al., 1994).



*Abb. 13: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen primärer Keratinozyten nach 6-stündiger Inkubation mit verschiedenen Medien, Permeabilisierung der Zellen und Propidiumiodidfärbung. Inkubation mit **A** MEME + 5 % BSA, **B** PBS, **C** PBS + 5 % BSA. Sogenannte 'membrane blebs' und apoptotische Körperchen sind mit weißen Pfeilen gekennzeichnet.*

3.1.3 Beteiligung apoptotischer Prozesse an der durch BSA vermittelten Toxizität auf primäre Keratinozyten

Da bei den licht- und fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen im Rahmen der Viabilitätsuntersuchungen mit primären Keratinozyten zumindest im Falle der Defizienzmedien morphologische Kennzeichen apoptotischer Prozesse zu sehen waren, sollte eine Beteiligung der Apoptose im Folgenden genauer untersucht werden.

Einfluss der Caspaseinhibition auf die BSA-Toxizität im MTT-Test. Aufgrund der in der Literatur beschriebenen signifikanten Reduktion der Toxizität von BSA auf Zellen des proximalen Tubulus durch Inhibierung der Initiator-Caspase 8 (Erkan et al., 2001) sollte durch Inkubation mit dem spezifischen Inhibitor Z-IETD-fmk näher untersucht werden, ob Caspase 8 auch an der BSA-Toxizität auf Keratinozyten beteiligt ist. Parallele Tests mit einem Pan-Caspase-Inhibitor (Biotin-VAD-fmk) sollten eine grundsätzliche Caspase-Beteiligung bei der Toxizität untersuchen. Weder der spezifische Caspase 8-Inhibitor noch der Pan-Caspase-Inhibitor konnten die durch BSA oder PBS verursachte Abnahme der Viabilität primärer Keratinozyten aufheben (**Abb. 14 A, B**). Demnach ist bei Keratinozyten die BSA-Toxizität unabhängig vom

Caspase 8-Signalweg sowie anderen Caspasen. Auch können einfache Protein-Verunreinigungen durch BSA wie z.B. Spuren von Zytokinen, die ihre Toxizität über den Caspase 8-vermittelten extrinsischen Rezeptor induzieren, die Abnahme von Viabilität und Proliferation der Keratinozyten nicht erklären. Des Weiteren muß auf eine substanzeigene Toxizität der Caspaseinhibitoren hingewiesen werden (**Abb. 14** C, D), die in den bei Keratinozyten für die Inhibierung der Caspasen relevanten Konzentrationen von 100 μ M (Puviani et al., 2003) auftrat. Trotz der hohen Inhibitorkonzentration konnte in der Versuchsanordnung die resultierende DMSO-Konzentration (0,5 %) unter der für Keratinozyten im MTT-Test toxischen Konzentration von > 1 % DMSO (Ergebnisse hier nicht dargestellt) gehalten werden.

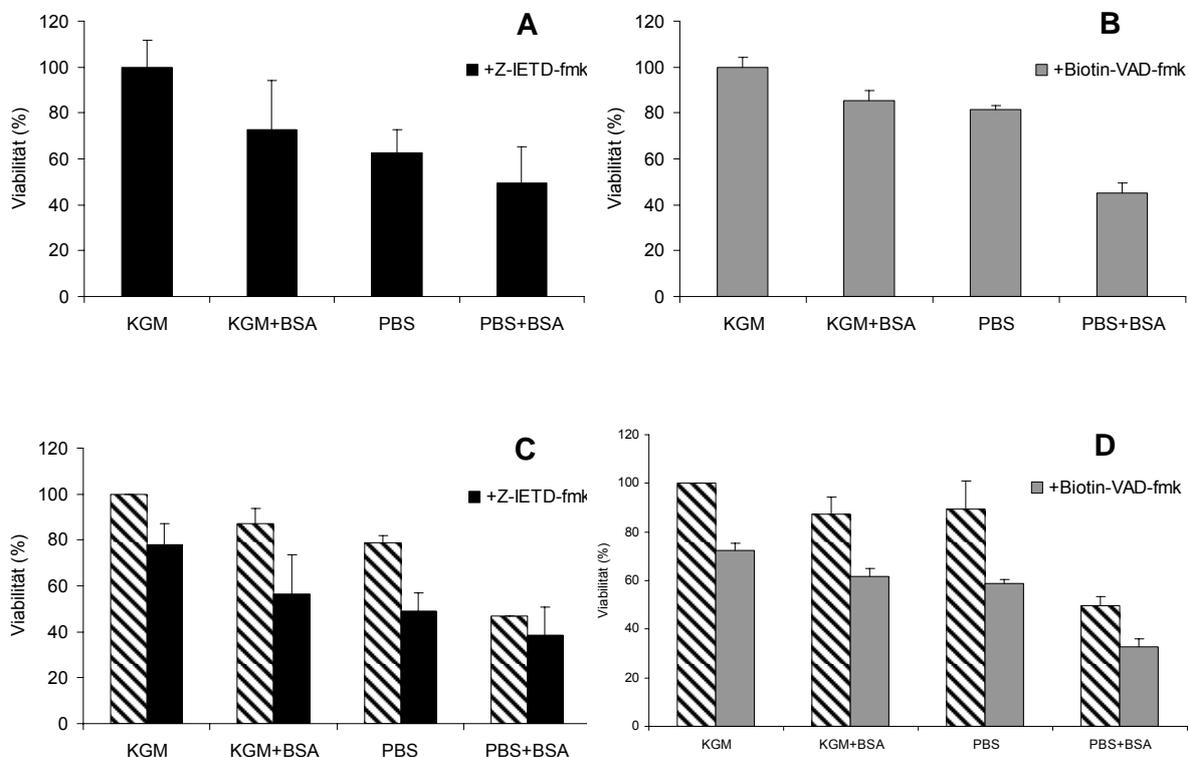


Abb. 14: Einfluss des Caspase 8-Inhibitors Z-IETD-fmk (**A, C**) und des Pan-Caspase-Inhibitors Biotin-VAD-fmk (**B, D**) auf die Zellviabilität von Keratinozyten (MTT-Test) bei Inkubation mit BSA-haltigen und BSA-freien Medien. Die gestreiften Säulen in **C** und **D** stellen die Viabilitätsdaten der entsprechenden Medien ohne den Zusatz des Caspase-Inhibitors dar; **A** und **B** sind Darstellungen allein der Medien unter Zusatz von Caspase-Inhibitoren, ins Verhältnis gesetzt zur hier als 100 % definierten Kontrolle KGM. Die bei Zusatz der Caspase-Inhibitoren entstehende DMSO-Endkonzentration in den Medien betrug 0,5 %; 0,5 % DMSO allein zeigte in den Kontrollen keine Eigentoxizität auf Keratinozyten. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SD von $n = 2$ unabhängigen Versuchen, jeweils durchgeführt als Doppelbestimmung.

Einfluss verschiedener Medien auf die Apoptose- und Nekroserate. Die Bestimmung der Fraktion nekrotischer und apoptotischer Keratinozyten nach Propidiumiodid- und Annexin V-Färbung mittels Durchflußzytometrie ergab folgendes: Der Ersatz von KGM durch Defizienzmedien wie PBS erhöhte die Zahl spät apoptotischer und nekrotischer Zellen, auch frühe Apoptose war tendenziell häufiger zu beobachten. Der Anteil apoptotischer und nekrotischer Zellen insgesamt war unter PBS-Einfluß signifikant erhöht. Überraschenderweise erhöhten BSA oder FKS den Anteil nekrotischer Zellen oder spät apoptotischer Zellen allenfalls geringfügig. Während Mangelmedien, besonders PBS, die Zahl apoptotischer Zellen erhöhten, schützte der Zusatz von FKS oder BSA zum Medium sogar tendenziell vor früh apoptotischen Prozessen (**Abb. 15**). Die Ergebnisse der Durchflußzytometrie bestätigen demnach die Untersuchungen mit den Caspase-Inhibitoren und zeigen, dass apoptotische Prozesse nicht in die BSA-Toxizität involviert sind.

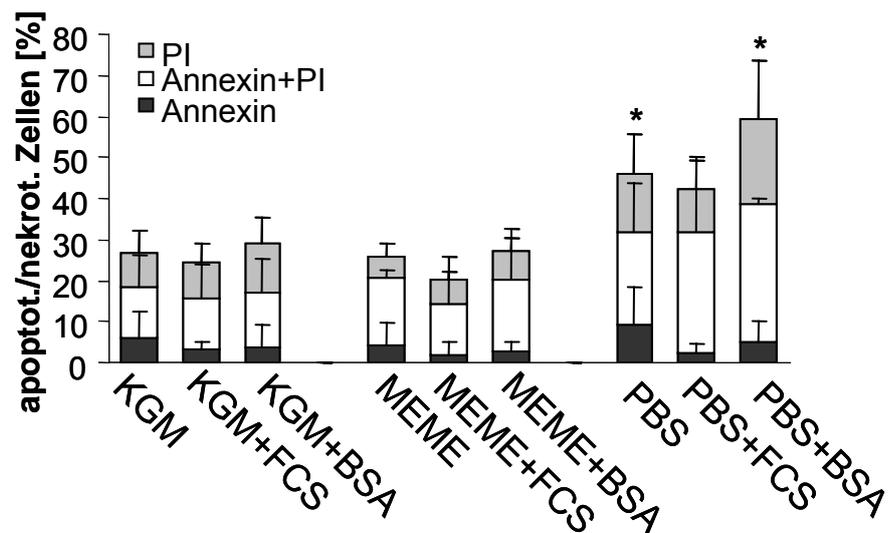


Abb. 15: Anteil früh apoptotischer (Annexin⁺ / PI⁻), spät apoptotischer (Annexin⁺ / PI⁺) und nekrotischer (Annexin⁻ / PI⁺) Keratinozyten (%) nach 5 h Inkubation mit verschiedenen Medien. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SD von $n = 3$ unabhängigen Versuchen, jeweils durchgeführt als Doppelbestimmung. *, $p \leq 0,05$.

Prüfung auf apoptotische Zellkerne, DAPI-Färbung. Die Beobachtungen bei der durchflußzytometrischen Messung wurden durch Untersuchungen der DAPI-gefärbten Zellkerne bestätigt. Während TNF- α - und Actinomycin D-Behandlung zu einem hohen prozentualen Anteil apoptotischer Zellkerne bei dermalen Fibroblasten führte (Positivkontrolle), bewirkten weder PBS noch der Zusatz von 5 % BSA zu

KGM oder PBS eine signifikante Zunahme der Apoptose von Keratinozyten (**Abb. 16**).

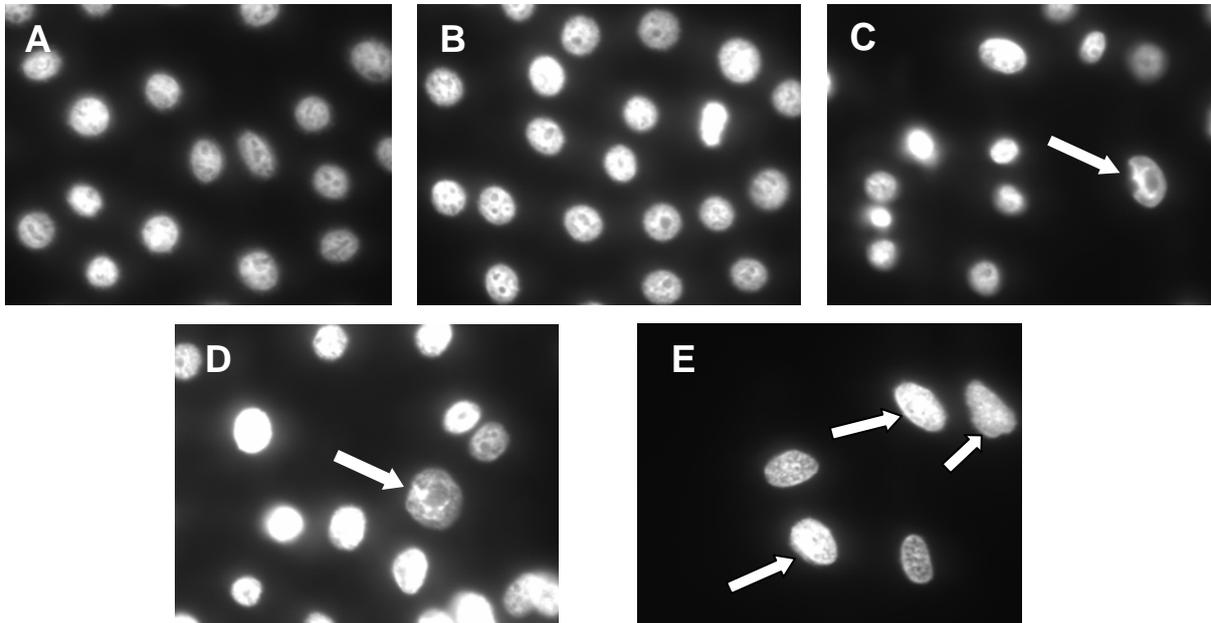


Abb. 16: Fluoreszenzmikroskopisches Erscheinungsbild der DAPI-gefärbten Zellkerne von 6 h mit unterschiedlichen Medien behandelten Keratinozyten und Fibroblasten (Positivkontrolle) in 630-facher Vergrößerung. A, unbehandelte Keratinozyten (KGM); B, mit KGM + 5 % BSA behandelte Keratinozyten; C, mit PBS behandelte Keratinozyten; D, mit PBS + 5 % BSA behandelte Keratinozyten; E, Dermale Fibroblasten, 24 h mit 20 ng/ml TNF- α und 100 ng/ml Actinomycin D behandelt, dienten als Positivkontrolle. Die Pfeile kennzeichnen Beispiele eindeutig apoptotischer Zellen. Der Versuch wurde als Doppelbestimmung durchgeführt. Eine unabhängige Wiederholung des Experiments zeigte die gleichen Ergebnisse.

Dermale Fibroblasten wurden als Positivkontrolle verwendet, da sich in Keratinozyten Apoptose mit TNF- α und Actinomycin D und den üblichen Apoptoseinduktoren nicht auslösen ließ. Dies zeigten auch Henseleit et al. in ihren Untersuchungen (Henseleit et al., 1996).

Prüfung auf DNA-Fragmentierung, DNA-Leiter. In der gelelektrophoretischen Auftrennung der aus Keratinozyten isolierten DNA konnte selbst bei Inkubation mit klassischen Apoptoseinduktoren (Positivkontrollen) keine charakteristische Leiter nachgewiesen werden. Es zeichneten sich eher schlierenartige DNA-Bahnen ab. Dieses Ergebnis deutet, auch in Ergänzung zu den Beobachtungen zur Kernfärbung mit DAPI, darauf hin, dass bei apoptotischen Keratinozyten (Positivkontrollen hier) keine klassische Fragmentierung der DNA auftritt oder diese zumindest nicht komplikationslos nachzuweisen ist.

3.1.4 Einfluss unterschiedlicher Rezeptormedien auf die Viabilität der humanen endothelähnlichen Zelllinie ECV304

Viabilitätsmessung mittels MTT-Reduktionsassay. Keratinozyten stehen physiologischerweise nicht in Kontakt mit humanem Serum. Daher war es nun von Interesse, den auf die Toxizität von 5 % Albumin gegenüber diesem Zelltyp hinweisenden Beobachtungen im MTT-Test Untersuchungen zur Viabilität mit Zellen gegenüberzustellen, die ständig Albumin in den hier eingesetzten Konzentrationen ausgesetzt sind, gegenüberzustellen. Es wurde die endothelähnliche Zelllinie ECV304 verwendet, die erstaunlicherweise allerdings wie im Falle der Keratinozyten eine signifikante Abnahme der Viabilität nach Einwirkung von 5 % BSA zeigte. Der Zusatz von 10 % FKS wirkte dagegen tendenziell protektiv auf die Zelllinie (**Abb. 17**).

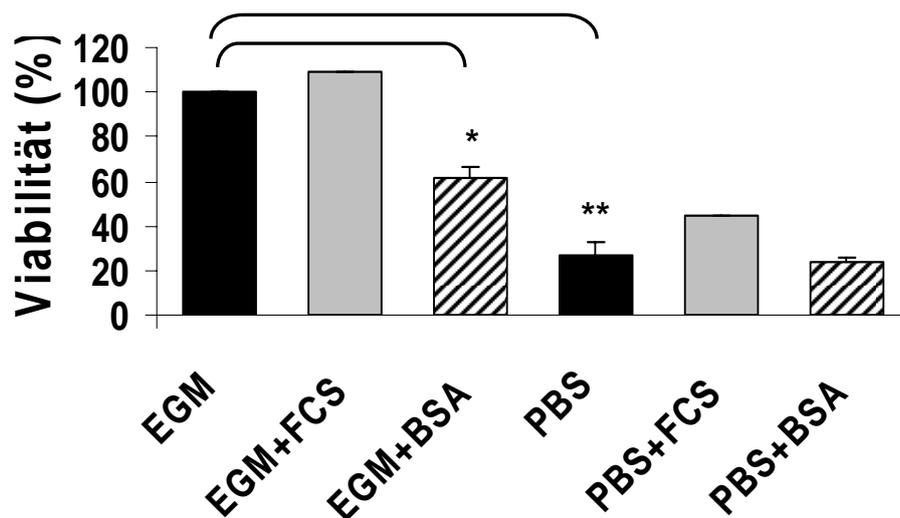


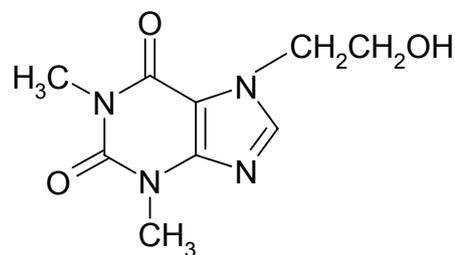
Abb. 17: Einfluss verschiedener Rezeptormedien einschließlich der Effekte von 5 % BSA und 10 % FKS auf die Viabilität der humanen endothelähnlichen Zelllinie ECV304. Als Kontrolle dienten mit EGM kultivierte Zellen (Viabilität = 100 %). Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SD von $n = 2$ unabhängigen Versuchen, jeder Versuch wurde zweifach oder dreifach durchgeführt. *, $p \leq 0,05$; **, $p \leq 0,005$.

3.2 Untersuchungen zum kutanen Metabolismus

Im zweiten Teil der Arbeit sollte die metabolische Kapazität von Hautmodellen mit jener von kutanen Monolayerkulturen anhand des Xanthins Coffein, das in weiteren Untersuchungen hinsichtlich seines Permeationsverhaltens charakterisiert werden sollte, und des Xanthins Theophyllin verglichen werden. Dazu musste zunächst eine HPLC-Analytik zur Auftrennung der Xanthine, deren Biotransformationswege sich teilweise überlagern, und deren Metaboliten etabliert werden.

3.2.1 HPLC-Analytik für Coffein und Theophyllin und deren Metabolite

Selektivität und Spezifität der Bestimmungsmethode. Zur Auftrennung und Quantifizierung von Coffein und Theophyllin, deren Metabolite 1,3-Dimethylurat (13U), 3-Methylxanthin (3X), 1-Methylurat (1U), 1-Methylxanthin (1X), 1,7-Dimethylurat (17U) und 1,7-Dimethylxanthin (17X) (siehe Material und Methoden, **Abb. 3**) sowie des internen Standards 7-(β -Hydroxyethyl)theophyllin (**Abb. 18**) wurde eine HPLC-Methode entwickelt (siehe Material und Methoden).



7-(β -Hydroxyethyl)theophyllin

Abb. 18: Interner Standard für die HPLC-Analytik.

Dabei ergaben sich folgende Retentionszeiten: 1-Methylurat, 5,27 min; 3-Methylxanthin, 6,33 min; 1-Methylxanthin, 7,93 min; 1,3-Dimethylurat, 9,87 min; 1,7-Dimethylurat, 14,42 min; 1,7-Dimethylxanthin und Theophyllin, 20,77 min; interner Standard, 27,93 min; Coffein, 44,40 min (**Abb. 19**).

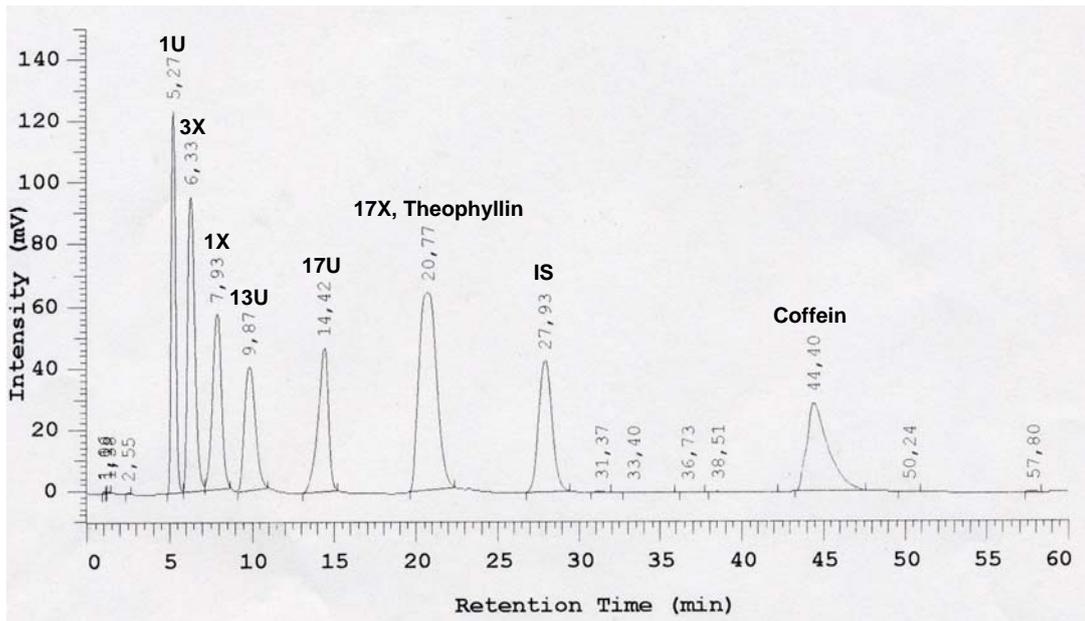


Abb. 19: Chromatogramm der Reinsubstanzen (in Fließmittel, s. 2.10), Gradientenmethode. IS, Interner Standard.

Da mit dieser Methode keine vollständige Trennung von Theophyllin und dem Metaboliten 17X erreicht werden konnte, wurde als zweite HPLC-Methode eine isokratische Eluierung der Substanzen angewendet (siehe Material und Methoden). Mit dieser konnten die beiden Substanzen eindeutig separiert werden (**Abb. 20**).

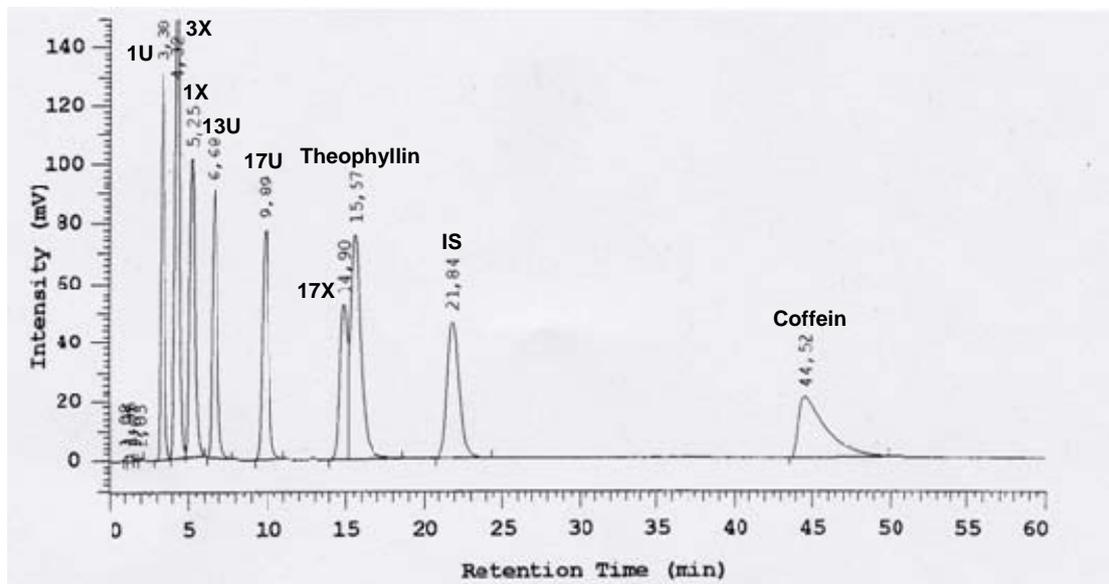


Abb. 20: Chromatogramm der Reinsubstanzen (in Fließmittel, s. 2.10), isokratische Eluierung. IS, Interner Standard.

Da sich aber im Laufe der Metabolisierungsstudien ergab, dass 17X weder in primären Zellkulturen noch im Hautmodell als Metabolit der Xanthine auftrat, erfolgte im weiteren nur die Auftrennung mit der Gradienten-HPLC-Methode.

Die Chromatogramme der Leermatrizes (Chloroform-Isopropanol-Extrakte der Zell- und Kunsthautkulturen und deren Medien) zeigten keine Signale zu den für die zu erfassenden Substanzen relevanten Retentionszeiten. Damit ist die Spezifität der Methode, also eine eindeutige Identifizierung der Substanz ohne Verfälschung durch das Probenmaterial, gewährleistet.

Nachweisgrenze (LOD). Als Nachweisgrenze (Detektionsgrenze, *limit of detection*, LOD) wird die niedrigste Konzentration eines Analyten bezeichnet, die vom Rauschen (Rauschsignal) des Instrumentes unterschieden werden kann. Das Signal-Rausch-Verhältnis sollte dabei 2:1 - 3:1 betragen. Die Nachweisgrenzen wurden für die Substanzen Coffein, Theophyllin und den internen Standard bestimmt und betragen bei allen Analyten 10^{-6} M (in Fließmittel). Beispielhaft ist hier ein Chromatogramm von Theophyllin mit der entsprechenden Konzentration dargestellt (**Abb. 21**). Die Nachweisgrenzen für die 3 Substanzen wurden in unregelmäßigen Abständen mehrfach überprüft und führten zu gleichen Ergebnissen.

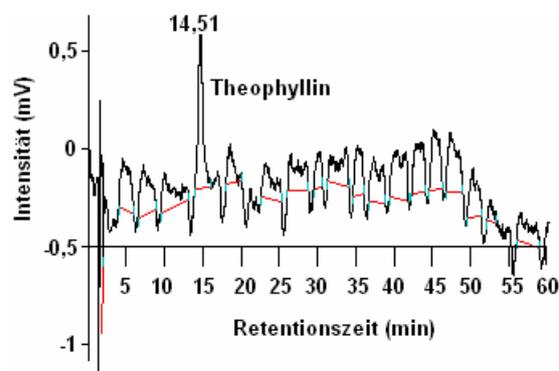


Abb. 21: Chromatogramm von Theophyllin (10^{-6} M) in Fließmittel.

Bestimmungsgrenze (LOQ). Als Bestimmungsgrenze (Quantifizierungsgrenze, *limit of quantification*, LOQ) wird die niedrigste Konzentration einer zu analysierenden Substanz mit einer maximal 20 %igen Abweichung zwischen einem mittleren Messergebnis und dem Erwartungswert (EHSLC, 2002) bezeichnet, also die niedrigste Konzentration, die noch mit der angemessenen Richtigkeit bestimmt werden kann. Zur Ermittlung wurde die Richtigkeit von jeweils 3 Proben der Substanzen Coffein, Theophyllin und dem internen Standard (IS) im unteren

Konzentrationsbereich der Kalibrierungskurven bestimmt. Daraus ergab sich für alle Analyten eine Bestimmungsgrenze von 5×10^{-6} M, wobei im Falle von Theophyllin die Richtigkeit um 2,8 % über dem geforderten Wert lag (**Tab. 5**).

Substanz	Erwartungswert [$\mu\text{g/ml}$]	MW gemessene Konz. [$\mu\text{g/ml}$]	SD gemessene Konz. [$\mu\text{g/ml}$]	Richtigkeit [%]
Coffein	0,971	1,138	0,295	117,17
Theophyllin	0,901	1,107	0,034	122,83
IS	1,121	1,293	0,015	115,29

Tab. 5: Die Bestimmungsgrenzen der Xanthine und des internen Standards (IS) betragen 5×10^{-6} M. Angegeben sind die Erwartungswerte (\equiv tatsächliche Konzentration) der Substanzen, Mittelwerte und Standardabweichungen der gemessenen Konzentrationen von $n = 3$ Bestimmungen und die Richtigkeiten. Die Bestimmung erfolgte nach EHSLC, 2002.

Linearität. Zur Bestimmung der Linearität wurden die Kalibrierungskurven der Analyten im Konzentrationsbereich von 10^{-2} - 10^{-6} M von 3 verschiedenen Einwaagen mit Hilfe der linearen Regression ausgewertet. Die Flächen der Analyten wurden gegen die zu erwartenden Konzentrationen in einem Graphen aufgetragen und zunächst visuell eine Linearität festgestellt. Die Kalibrationsgleichung wurde nach dem Prinzip der kleinsten Abweichungsquadrate aus den ermittelten Flächen relativ zu den erwarteten Konzentrationen errechnet. Die Gleichungen ($y = mx + b$) und die entsprechenden Korrelationskoeffizienten (r^2) werden neben den Graphen (**Abb. 22**) angezeigt. Das Bestimmtheitsmaß der linearen Regression sollte $>0,99$ sein (HHS, 1999).

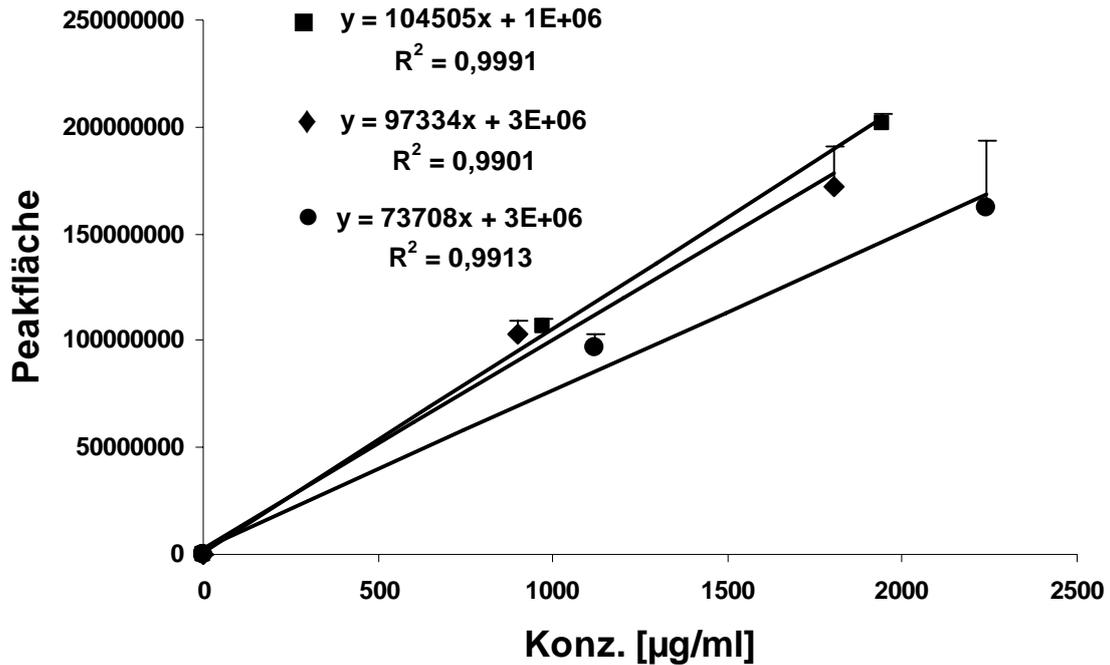


Abb. 22: Kalibrierungskurven von ■ Coffein, ◆ Theophyllin und ● dem internen Standard erstellt aus den Konzentrationen 10^{-2} M, 5×10^{-3} M, 5×10^{-6} M und 10^{-6} M von jeweils 3 verschiedenen Einwaagen; dargestellt sind die linearen Regressionen.

Das Bestimmtheitsmaß der linearen Regression erreicht in allen Kalibrierungskurven einen Wert $r^2 > 0,99$.

Richtigkeit / absolute Wiederfindung (accuracy / absolute recovery). Die Richtigkeit gibt die Übereinstimmung des Mittelwertes \bar{x} von Messergebnissen mit dem erwarteten Referenzwert μ an. Diese wird bestimmt mit Hilfe der Gleichung:

$$\text{Richtigkeit} = \frac{\bar{x} \cdot 100}{\mu} [\%].$$

Da es sich bei dem berechneten Wert auch um die in der Analyse wiedergefundene Substanzmenge in % handelt, spricht man auch von Wiederfindung.

Intra-assay (within-batch)- Bestimmung der Richtigkeit. Zur Bestimmung wurden zunächst jeweils Kalibrierkurven der einzelnen Analyten mit 4 verschiedenen Konzentrationen aus dem Meßbereich erstellt. Mit Hilfe der durch lineare Regression erhaltenen Geradengleichung wurde bei jeder Substanz anhand von ermittelten Flächen je dreier Proben der Reinsubstanzen in Fließmittel, welche die Xanthine in 3 unterschiedlichen Konzentrationen (10^{-2} M, 5×10^{-3} M und 5×10^{-6} M) enthielten, die Konzentration bestimmt und anhand des Mittelwertes die Richtigkeit ermittelt (intra-assay-Bestimmung).

Inter-assay (between-batch)- Bestimmung der Richtigkeit. Mit drei Einwaagen der Analyten wurde auch die inter-assay-Bestimmung der Richtigkeit durchgeführt.

Die Ergebnisse sind bei einer Abweichung von bis zu 15 % des gemessenen vom erwarteten Wert im Bereich der hohen und mittleren Kalibrationskonzentration und bei einer Abweichung von bis zu 20 % bei den niedrigen Konzentrationen akzeptabel (EHSLC, 2002; HHS, 1999). Über den akzeptablen Abweichungen lagen die gemessenen Werte (**Tab. 6**) bei: Coffein bei den niedrigen Konzentrationen im inter-assay-Vergleich, dem internen Standard ebenfalls bei den niedrigen Konzentrationen im inter-assay-Vergleich und Theophyllin bei den niedrigen Konzentrationen im intra- und inter-assay-Vergleich und bei den mittleren Konzentrationen im intra-assay-Vergleich.

Präzision (precision). Die Präzision ist ein Maß für den Grad der Reproduzierbarkeit der Analysenergebnisse bei wiederholter Durchführung einer analytischen Methode unter gleichen Bedingungen. Zur Beurteilung der Präzision eines Analysenverfahrens wird u.a. die relative Standardabweichung (Variationskoeffizient VK) in % bezogen auf den Mittelwert der Bestimmungen (\bar{x}) herangezogen:

$$VK = \frac{s \cdot 100}{\bar{x}} [\%]. \quad s = \text{Standardabweichung}$$

Intra-assay (within-batch)- Bestimmung der Präzision. Zur Bestimmung wurden zunächst jeweils Kalibrierkurven der einzelnen Analyten mit 4 verschiedenen Konzentrationen aus dem Meßbereich erstellt. Mit Hilfe der durch lineare Regression erhaltenen Geradengleichung wurde bei jeder Substanz anhand der Flächen je dreier Proben, die die Xanthine in 3 unterschiedlichen Konzentrationen (10^{-2} M, 5×10^{-3} M und 5×10^{-6} M) enthielten, die Konzentration bestimmt und anhand der Standardabweichung die Präzision berechnet (intra-assay-Bestimmung).

Inter-assay (between-batch)- Bestimmung der Präzision. Mit drei verschiedenen Einwaagen der Analyten wurde auch die inter-assay-Bestimmung der Präzision durchgeführt.

Relativ zum gemessenen Mittelwert dürfen die Präzisionen um nicht mehr als 15 % im Bereich der hohen und mittleren Kalibrationskonzentration und um nicht mehr als 20 % bei den niedrigen Konzentrationen abweichen (EHSLC, 2002; Lindner and Wainer, 1998). Die berechneten Werte (**Tab. 6**) lagen im Falle der niedrigen

Konzentrationen bei Coffein im intra-assay-Vergleich um ca. 6 % und beim internen Standard im inter-assay-Vergleich um ca. 3 % über den akzeptablen Abweichungen.

Coffein	tatsächliche Konz. [µg/ml]	MW gemessene Konz. [µg/ml]	SD gemessene Konz. [µg/ml]	Richtigkeit [%]	Präzision [%]
Intra-assay-Vergleich	1942	1933,7	26,16	99,57	1,35
	971	1000,12	4,87	103	0,49
	0,971	1,14	0,295	117,17	25,97
Inter-assay-Vergleich	1942	1950,94	15,478	100,46	0,79
	971	1019,48	18,57	104,99	1,82
	0,971	1,26	0,11	129,99	8,74
Theophyllin	tatsächliche Konz. [µg/ml]	MW gemessene Konz. [µg/ml]	SD gemessene Konz. [µg/ml]	Richtigkeit [%]	Präzision [%]
Intra-assay-Vergleich	1802	1738,91	64,23	96,5	3,69
	901	1004,64	8,15	111,5	0,81
	0,901	1,1	0,03	122,83	3,05
Inter-assay-Vergleich	1802	1777,94	86,6	98,66	4,87
	901	1050,52	40,8	116,6	3,88
	0,901	1,18	0,14	131,32	11,95
Interner Standard	tatsächliche Konz. [µg/ml]	MW gemessene Konz. [µg/ml]	SD gemessene Konz. [µg/ml]	Richtigkeit [%]	Präzision [%]
Intra-assay-Vergleich	2242,2	2205,2	38,58	98,35	1,75
	1121,1	1241,79	10,62	110,77	0,85
	1,1211	1,29	0,02	115,29	1,19
Inter-assay-Vergleich	2242,2	2208,49	13,2	98,5	0,6
	1121,1	1285,61	86,43	114,67	6,72
	1,1211	1,69	0,39	150,65	23,29

Tab. 6: Intra- und Inter-assay - Bestimmung von Präzision und Richtigkeit der Substanzen Coffein, Theophyllin und des internen Standards. **hervorgehoben**, Werte, die über den akzeptablen Abweichungen liegen. Dargestellt sind die Mittelwerte (MW) und Standardabweichungen (SD) der gemessenen Konzentrationen von n = 3 Bestimmungen.

Bestimmungsbereich (*range*). Der Bestimmungsbereich ist dasjenige Massen- bzw. Konzentrationsintervall, in welchem der zu bestimmende Stoff mit der angegebenen Präzision und Richtigkeit bestimmt werden kann. Dieser Bereich umfasst bei allen Analyten das Konzentrationsintervall von 10^{-2} bis 5×10^{-6} M (**Tab. 6**). Einschränkend ist auf die angegebenen Überschreitungen der akzeptablen Abweichungen von Präzision und Richtigkeit (siehe **Tab. 6**) hinzuweisen. Diese wurden als tolerabel erachtet, da mit der beschriebenen Methode orientierende Untersuchungen zum Metabolismus in humanem Hautmaterial geplant sind.

Relative Wiederfindung (*relative recovery*) der Xanthine aus biologischen Matrices. Matrixeffekte durch Absorption der Analyten am organischen Material, die zum Verlust der Analyten führen, bestimmen die relative Wiederfindung der Substanzen. Diese wurde bestimmt, indem dem entsprechenden Probenmaterial die Analyten in einer Endkonzentration von 10^{-3} M für 24 h oder 48 h zugesetzt und anschließend dem Extraktionsprozeß, wie im Material- und Methodenteil beschrieben, unterworfen wurden. Die nach der Extraktion wiedergefundene Menge des Analyten wurde mit Hilfe einer Kalibrierungsfunktion der entsprechenden Substanz zur zugesetzten Substanzmenge ins Verhältnis gesetzt und so die relative Wiederfindung in Prozent bestimmt (**Tab. 7** und **Tab. 8**). Dieses erfolgte an den Matrices Zellkulturmedien (Fibroblasten- und Keratinozytenwachstumsmedium) bzw. Hautkulturmedien (EpiDerm™- und EpiDerm™-FT-Erhaltungsmedium), Zellkulturen und Hautkulturen. Die Bestimmung der relativen Wiederfindung zeigt folgende Ergebnisse:

Wiederfindung [%]	Substanz	Inkubationszeit	Keratinocyten	Fibroblasten
Medium (allein)	IS*	24h	74,1	63,2
		48h	93,1 ± 21,7	74,2 ± 1,7
	Coffein	24h	80,9	66
		48h	93,6 ± 4,2	92,3 ± 4,7
	Theophyllin	24h	86,5	65,4
		48h	76,4 ± 10,5	75,6 ± 2,6
Zellen	IS*	24h	45,1	43,5
		48h	60,6 ± 5,4	43,8 ± 9,2
	Coffein	24h	2,3	1,8
		48h	3,3 ± 0,3	2,8 ± 0,2
	Theophyllin	24h	2,3	2,3
		48h	2,4 ± 0,5	2,1 ± 0,8
Medium	Coffein	24h	64,2	51,6
		48h	73,7 ± 7	69,8 ± 7,3
	Theophyllin	24h	47,6	32,3
		48h	43,7 ± 9,9	34,8 ± 5,9
Σ Medium+Zellen	Coffein	24h	66,5	53,4
		48h	77 ± 6,7	72,6 ± 7,4
	Theophyllin	24h	49,9	34,7
		48h	46,01 ± 10,36	36,95 ± 6,55

Tab. 7: Relative Wiederfindung der Substanzen Coffein, Theophyllin und des internen Standards (IS) aus dem Zellkulturmedium (Keratinocyten- oder Fibroblastenwachstumsmedium) allein sowie aus den Zellkulturen, dem Medium (Überstand) und der Summe der beiden. Nach Inkubation über die angegebene Zeit wurden Zellen und Medien separiert, getrennt aufgearbeitet und der HPLC zugeführt, wie unter Material und Methoden beschrieben. *, der interne Standard wurde dem Medium und den Zellen jeweils separat zugesetzt (siehe Material und Methoden) und im Anschluss seine relative Wiederfindung bestimmt.

Dargestellt sind die Werte von Einfachbestimmungen ($n = 1$) (24 h - Werte) und die Mittelwerte ± SD von $n = 3$ unabhängigen Versuchen (48 h - Werte).

Wiederfindung [%]	Substanz	ED	ED-FT
Medium (allein)	IS*	81,2 ± 4,2	85,1 ± 16,6
	Coffein	99,7 ± 3,9	94,1 ± 24
	Theophyllin	86,3 ± 13,3	112 ± 26,9
Haut	IS*	73,8 ± 26,8	94,8 ± 5,9
	Coffein	11,1 ± 1,3	13,1 ± 2,9
	Theophyllin	18,3 ± 2,4	42,7 ± 5,3
Medium	Coffein	91,6 ± 2,5	87,5 ± 0,5
	Theophyllin	74,5 ± 34,1	58,9 ± 27,6
Σ Medium+Haut	Coffein	102,7 ± 1,2	100,5 ± 3,3
	Theophyllin	92,8 ± 31,7	101,7 ± 32,8

Tab. 8: Relative Wiederfindung der Substanzen Coffein, Theophyllin und des internen Standards (IS) nach 48-stündiger Inkubation aus dem Hautkulturmedium (EpiDerm™ (ED)- oder EpiDerm™-FT (ED-FT)-ErhaltungsmEDIUM) allein sowie aus den Hautkulturen, dem Medium (Überstand) und der Summe der beiden. Nach Inkubation über die angegebene Zeit wurden Häute und Medien separiert, getrennt aufgearbeitet und der HPLC zugeführt, wie unter Material und Methoden beschrieben. *, der interne Standard wurde dem Medium und der Haut jeweils separat zugesetzt (siehe Material und Methoden) und im Anschluss seine relative Wiederfindung bestimmt.

Dargestellt sind die Mittelwerte ± SD von n = 2 unabhängigen Versuchen mit jeweils unterschiedlichen Chargen, jeder Versuch wurde einfach (EpiDerm™) oder doppelt (EpiDerm™-FT) durchgeführt.

3.2.2 Kutane Metabolisierung von Coffein und Theophyllin

Xanthinmetabolisierung an primären Keratinozyten und Fibroblasten. Die Monolayerkulturen wiesen generell eine niedrige Biotransformation auf (**Tab. 9**).

Theophyllin wurde auch nach 48 h von Keratinozyten nicht biotransformiert.

Die Metabolisierung von Coffein und Theophyllin durch dermale Fibroblasten erhöhte sich im Vergleich zu der 24-stündigen Inkubationszeit nach 48 h nur marginal.

Über den gleichen Zeitraum (24 h oder 48 h) inkubierte, mit Coffein oder Theophyllin (Endkonzentration 10^{-3} M) versetzte Zellmedien (Keratinozyten- oder Fibroblastenwachstumsmedium) zeigten nach Extraktion keine Metabolitensignale. Damit konnte eine nicht-enzymatische Zersetzung der Xanthine in den jeweiligen Medien ausgeschlossen werden.

Coffein Metaboli- sierung zu:	Inkubationszeit	Keratinocyten		Fibroblasten	
		$\times 10^{-5}$ M	%	$\times 10^{-5}$ M	%
Theophyllin	24 h	0,79	0,03	2,92	0,12
	48 h	$1,7 \pm 0,3$	$0,07 \pm 0,01$	$3,67 \pm 1,55$	$0,15 \pm 0,06$
13 U	24 h	-		3,28	0,13
	48 h			$4,35 \pm 1,34$	$0,17 \pm 0,06$
Theo- phyllin Metaboli- sierung zu:	Inkubationszeit	Keratinocyten		Fibroblasten	
		$\times 10^{-5}$ M	%	$\times 10^{-5}$ M	%
13 U	24 h	-		5,27	0,21
	48 h			$5,2 \pm 2,28$	$0,2 \pm 0,09$

Tab. 9: Metabolisierung von Coffein und Theophyllin durch primäre Keratinocyten und Fibroblasten nach 24- bzw. 48- stündiger Inkubation. 13U, 1,3-Dimethylurat. Alle Untersuchungen mit 24-stündiger Inkubationszeit wurden einfach ($n=1$ Spenderpool), mit 48-stündiger Inkubationszeit dreifach ($n=3$ Spenderpools) durchgeführt, für den letzteren Fall sind jeweils die Mittelwerte mit Standardabweichung (MW \pm SD) angegeben.

MTT-Test. Der MTT-Test zeigte keine Toxizität der für die Biotransformationsstudien eingesetzten Coffein- und Theophyllinkonzentrationen für Keratinocyten und Fibroblasten.

Xanthinmetabolisierung an den Kunsthautmodellen EpiDerm™ und EpiDerm™-FT. Von Interesse war nun, inwiefern sich die Biotransformation durch die humanen Hautmodelle von der primärer Zellkulturen unterscheiden würde. Die Metabolisierungskapazität beider Hautmodelle lag ungefähr im Bereich der Primärkulturen (**Tab. 10**).

Das Epidermismodell EpiDerm™, das auf Keratinocyten unterschiedlichen Differenzierungsgrades basiert, wies nach 48- stündiger Inkubation, wie auch schon in Keratinocytenprimärkulturen beobachtet, keine Theophyllinmetabolisierung auf.

Das Vollhautmodell EpiDerm™-FT, welches auf Keratinocyten und dermalen Fibroblasten basiert, wies ein den Fibroblastenprimärkulturen ähnliches Metabolisierungsmuster auf. Bei der Coffeinmetabolisierung war der Metabolit 1,3-Dimethylurat nur in der Haut und nicht im überstehenden Kulturmedium nachzuweisen.

Über 48 h mit Coffein oder Theophyllin (Endkonzentration 10^{-3} M) versetztes EpiDerm™- oder EpiDerm™-FT-Erhaltungsmittel zeigte nach Extraktion keine

Metabolitensignale. Damit konnte eine nicht-enzymatische Zersetzung der Xanthine in den jeweiligen Medien ausgeschlossen werden.

Coffein Metabolisierung zu:	ED		ED-FT	
	$\times 10^{-5}$ M	%	$\times 10^{-5}$ M	%
Theophyllin	1,395 \pm 0,07	0,13	5,5 \pm 3,8	0,26 \pm 0,13
13 U	-		0,91 \pm 1,1	0,04 \pm 0,05
Theophyllin Metabolisierung zu:	ED		ED-FT	
	$\times 10^{-5}$ M	%	$\times 10^{-5}$ M	%
13 U	-		1,1 \pm 0,33	0,06 \pm 0,01

Tab. 10: Metabolisierung von Coffein und Theophyllin durch das Epidermismodell EpiDerm™ (ED) und das Vollhautmodell EpiDerm™-FT (ED-FT) nach 48- stündiger Inkubation. 13U, 1,3-Dimethylurat. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SD von $n = 2$ unabhängigen Versuchen mit jeweils unterschiedlichen Chargen, jeder Versuch wurde einfach (EpiDerm™) oder doppelt (EpiDerm™-FT) durchgeführt.

In den von uns durchgeführten Biotransformationsuntersuchungen ergaben sich also hinsichtlich der metabolischen Kapazität der Hautmodelle und der primären Zellen weder qualitative noch quantitative Unterschiede. Zudem kann bei den im Folgenden durchgeführten Permeationsuntersuchungen mit Coffein ein nennenswerter Metabolismus der Substanz und damit eine Beeinflussung des Permeationsverhaltens ausgeschlossen werden.

3.3 Perkutane Absorption

Die hier dargestellten Untersuchungen zur perkutanen Absorption fanden im Rahmen einer vom BMBF geförderten 'Validierungsstudie zur Prüfung auf Hautpenetration mit Hilfe von biotechnologisch hergestellten Hautmodellen' statt. Die Ergebnisse und somit meine Beteiligung an der Studie umfassen die Phasen der Methodenentwicklung, des Protokolltransfers und der Prävalidierung des Projektes, das sich derzeit in der abschließenden Validierungsphase befindet. Parallel zu den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Permeationsuntersuchungen mit Coffein erfolgten auch solche mit der lipophilen Referenzsubstanz Testosteron, ebenfalls im Kontext des genannten Projektes (siehe Dissertation von A. Mahmoud, 2005).

3.3.1 Einflussgrößen der kutanen Permeation

Zunächst sollten gut reproduzierbare Versuchsbedingungen für perkutane Absorptionsuntersuchungen festgelegt werden. Dazu wurden Art und Ausmaß des Einflusses verschiedener Größen auf das Permeationsverhalten von Coffein (MW = 194,19; logP = -0,01) genauer charakterisiert. Diese Substanz wurde bereits intensiv in Studien zur perkutanen Absorption geprüft (Dias et al., 1999; Dreher et al., 2002a; Lotte et al., 2002; Potard et al., 1999) und wird daher als Referenzsubstanz im aktuellen OECD Guidance Document No. 28 für kutane Absorptionsstudien empfohlen (OECD, 2003).

Einfluss des Versuchsprotokolls: Vergleich unterschiedlicher Protokolle sowie Entnahmeverolumina bzw. Flussraten. Orientierende Untersuchungen an synthetischen Cellulosenitratmembranen (Porenweite 0,1 µm) zum Einfluss des statischen sowie des dynamischen Versuchsprotokolls und unterschiedlicher Entnahme- und Durchflussvolumina auf die Permeation von Coffein frei von Störfaktoren des biologischen Materials (Haut / Kunsthaut) zeigten, wie in **Abb. 23** dargestellt, eine um mehr als den Faktor 2 stärkere Permeation von Coffein beim dynamischen Versuchsprotokoll.

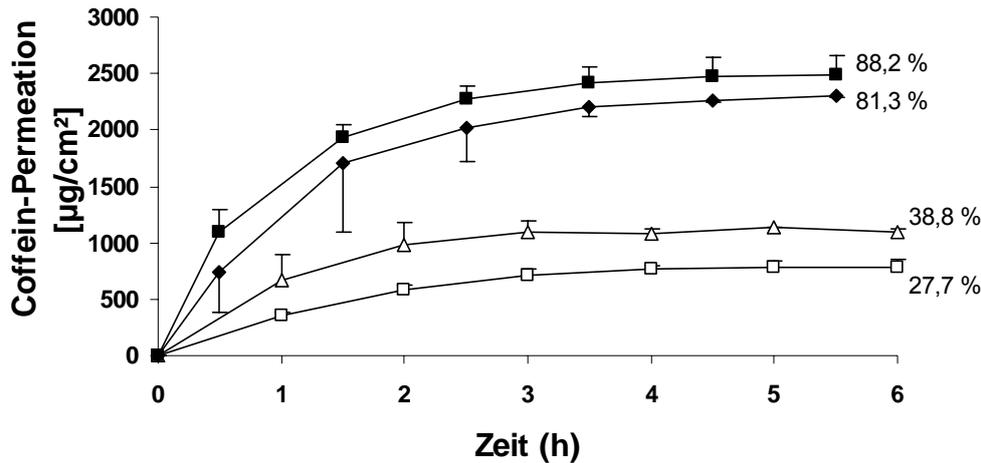


Abb. 23: Einfluss statischer und dynamischer Versuchsbedingungen sowie unterschiedlicher Entnahmeholumina bzw. Flussraten auf die Permeation von Coffein (1 %ige Lösung) über Cellulosenitratmembranen in PBS als Rezeptormedium. Offene Symbole stellen das statische Protokoll, geschlossene Symbole das dynamische dar; Quadrate bezeichnen ein Entnahmeholumen von 8 ml bzw. eine Flussrate von 8 ml/h, Rauten eine Flussrate von 4 ml/h und Dreiecke ein Entnahmeholumen von 0,4 ml. Die Zahlenwerte in der Abbildung geben den permeierten Anteil der Substanz nach 6 h in % der applizierten Menge wieder. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SD von $n = 2$ unabhängigen Versuchen, jeder Versuch wurde 3-fach durchgeführt.

Allerdings deutet bereits der Kurvenverlauf (Abflachen der Kurve nach weniger als 2 h) auf fehlende Sink-Bedingungen, bedingt durch die starke Durchlässigkeit der synthetischen Membran, hin. Nach nur 2 h permeierten beim statischen Protokoll mindestens 27 %, beim dynamischen Protokoll sogar annähernd 80 % der Substanz. Grundsätzlich sollte zu jeder Zeit eines Permeationsversuches die Konzentration der Substanz im Rezeptormedium 10 % ihrer Sättigungslöslichkeit im entsprechenden Medium nicht überschreiten, um eine Interferenz mit dem Prozeß der freien Diffusion zu minimieren, die zu einer Unterschätzung der dermalen Absorption führen könnte (SCCNFP, 2003). Diese Voraussetzung wurde nach Überprüfung allerdings erfüllt (die Sättigungslöslichkeit c_s von Coffein in PBS beträgt $210.685 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, die hier maximal permeierte Menge Coffein beträgt ungefähr $2.486 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, also ungefähr 1,2 %), auch bei allen nachfolgenden Versuchen mit biologischen Matrices waren die sink-Bedingungen garantiert. Vermutlich kommt es hier also aufgrund der hohen Permeabilität der synthetischen Membranen zu einer Verarmung der Substanz im Donormedium und dadurch zu einer geringeren Diffusion mit der Folge einer Abflachung der Permeationskurven.

Einfluss des Versuchsprotokolls: Vergleich von statischem und dynamischem Versuchsaufbau. Im nächsten Schritt erfolgten entsprechende Untersuchungen an biologischen Membranen, die der Coffein-Permeation eine höhere Barriere entgegenstellen sollten. Anders als bei den Versuchen mit den synthetischen Membranen unterschied sich die Permeation von Coffein beim statischen und dynamischen Versuchsaufbau nicht (**Abb. 24**). Die deutlich bessere Barriere des Hautmodells gewährleistete den Erhalt der sink-Bedingungen und verhinderte die Verarmung der Substanz im Donormedium.

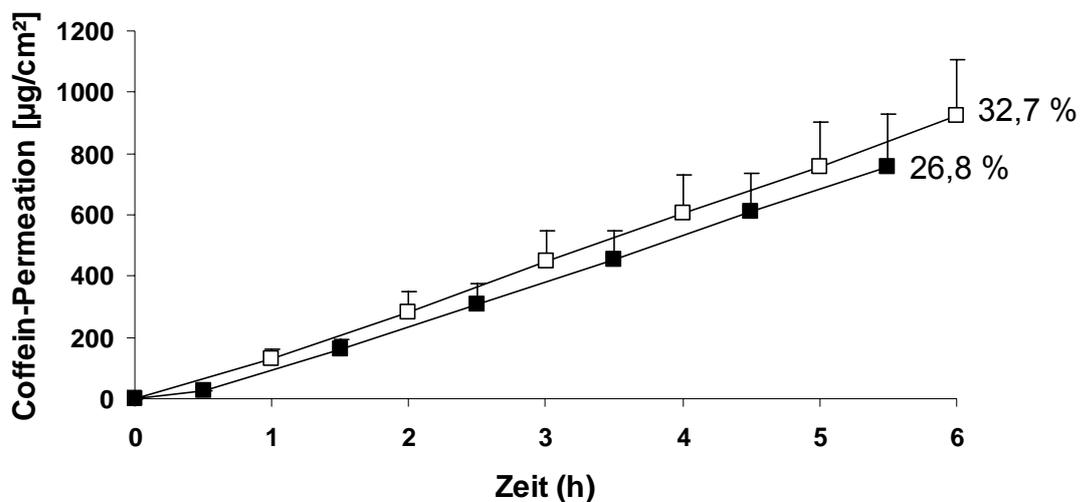


Abb. 24: Vergleich der Permeation einer 1 %igen Coffein-Lösung unter Verwendung von statischen und dynamischen Franzzellen über das Hautmodell SkinEthic® in PBS als Rezeptormedium. Offene Symbole stellen das statische Protokoll, geschlossene das dynamische dar. Die Zahlenwerte in der Abbildung geben den permeierten Anteil der Substanz nach 6 h in % der applizierten Menge wieder. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SD von $n = 3$ unabhängigen Versuchen mit 3 unterschiedlichen Chargen, jeder Versuch wurde 3-fach durchgeführt.

Aufgrund der geringfügig höheren Menge in das Rezeptormedium permeierter Substanz beim statischen Franzzelltyp und der dadurch bedingten geringeren analytischen Variabilität der Ergebnisse wurde im Folgenden ausschließlich unter statischen Bedingungen gearbeitet.

Einfluss der Rezeptormedien: Zusatz von bovinem Serumalbumin. Der Zusatz von 5 % bovinem Serumalbumin (BSA) zum Rezeptormedium wird bei der Testung lipophiler Substanzen zur Überwindung von Löslichkeitsproblemen empfohlen (OECD, 2003). Im Folgenden sollte am Beispiel der hydrophilen Testsubstanz Coffein, die benannte Löslichkeitsprobleme nicht aufweist, untersucht werden, ob und inwieweit BSA die Permeation - auch unter Berücksichtigung seines bereits

festgestellten Einflusses auf Viabilität und Integrität der humanen Hautmodelle (s. **3.1.1**) - oder auch die Analytik einer Substanz unabhängig von einer Löslichkeitsverbesserung beeinflusst.

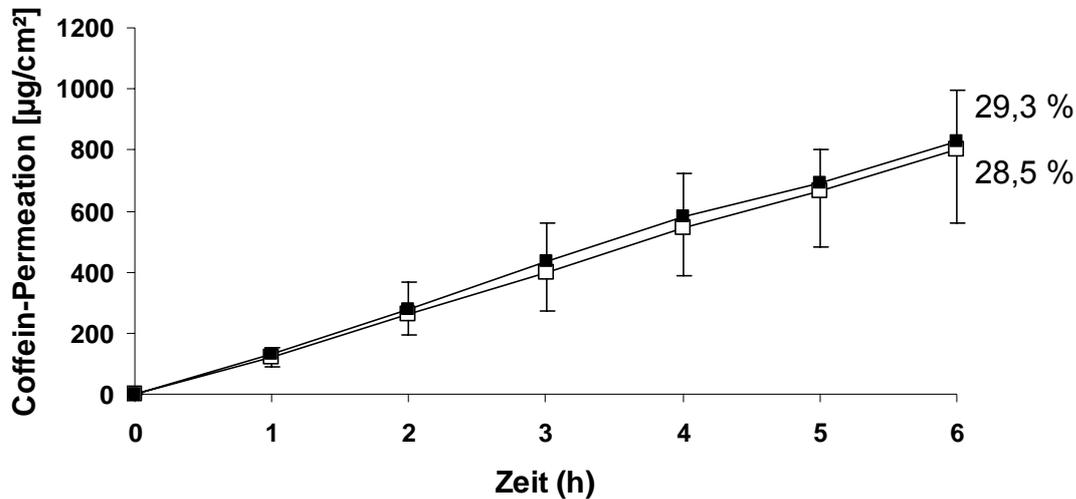


Abb. 25: Einfluss des Zusatzes von 5 % BSA zum Rezeptormedium PBS auf die Permeation einer 1 %igen Coffein-Lösung über das Hautmodell SkinEthic®. Geschlossene Symbole stellen das Rezeptormedium mit, offene Symbole ohne den Zusatz von 5 % BSA dar. Die Zahlenwerte in der Abbildung geben den permeierten Anteil der Substanz nach 6 h in % der applizierten Menge wieder. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SD von $n = 3$ unabhängigen Versuchen mit 3 unterschiedlichen Chargen, jeder Versuch wurde 3-fach durchgeführt.

Wie in **Abb. 25** zu sehen ist, beeinflusste der Zusatz von Albumin die Permeation des hydrophilen Coffein nicht; nach 6 h fanden sich ohne BSA - Zusatz 28,5 % (804,1 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) der Substanz im Rezeptormedium, mit BSA - Zusatz 29,3 % (826,6 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$).

Einfluss der Rezeptormedien: Zusatz des Lösungsvermittlers Igepal® CA-630.

Neben BSA wurde auch der nicht-ionische Lösungsvermittler Igepal® als Zusatz zum Rezeptormedium für Permeationsstudien mit lipophilen Substanzen getestet, deren Prüfung an unterschiedlichen Hautmatrices ansonsten aufgrund eingeschränkter Löslichkeit nicht möglich wäre. Der Zusatz von 0,5 % Igepal® zum Rezeptormedium resultierte bei Testung an verschiedenen Matrices allerdings in einem inkonsistenten Permeationsmuster von Coffein (hier nicht dargestellt). Des Weiteren nahm die Viabilität des Hautmodells EpiDerm™ um ungefähr 85 % ab (**Tab. 11**), wenn das Rezeptormedium 0,5 % Igepal® enthielt. Auch die Morphologie der Hautmodelle, die dem Lösungsvermittler im Rezeptormedium ausgesetzt waren, zeigten klare Anzeichen einer Schädigung (hier nicht dargestellt). Dies ist gut zu erklären durch

den engen Kontakt des Lösungsmittels zu den viablen epidermalen Zellen der 'Unterseite' der Haut. Diese Ergebnisse schlossen eine Verwendung von Igepal® als Zusatz zum Rezeptormedium aus.

Einfluss der Donormedien: Zusatz des Lösungsvermittlers Igepal® CA-630. Als nächstes wurde die Auswirkung der Zusammensetzung des Donormediums auf die Permeation untersucht. Anders als hydrophile Substanzen wie Coffein, welche in Wasser frei löslich sind und daher in isotonischen Pufferlösungen appliziert werden können, müssen hoch lipophile Substanzen häufig in nicht-physiologischen Lösungsmitteln gelöst werden, die sich auf die Integrität der Haut auswirken können. Da die Permeation von Coffein durch Zusatz des Lösungsvermittlers nicht beeinflusst werden sollte, ist dies ein adäquater Test, um den Einfluss von Igepal® auf die Integrität der Hautbarriere zu untersuchen. Auf diesem Weg können toxische Effekte und andere Interferenzen des Lösungsmittels / Lösungsvermittlers mit der Haut und den Hautmodellen erkannt werden. Die verringerte Coffein-Permeation in **Abb. 26** deutet auf eine Interferenz durch den Zusatz von 2 % Igepal® hin, allerdings fällt der Unterschied nicht signifikant aus. Gleichwohl steht die zu beobachtende Tendenz möglicherweise in Zusammenhang mit der Toxizität von Igepal® im Donormedium gegenüber rekonstruierter Epidermis, die im MTT-Test (**Tab. 11**) und in histologischen Untersuchungen (hier nicht dargestellt) beobachtet wurde.

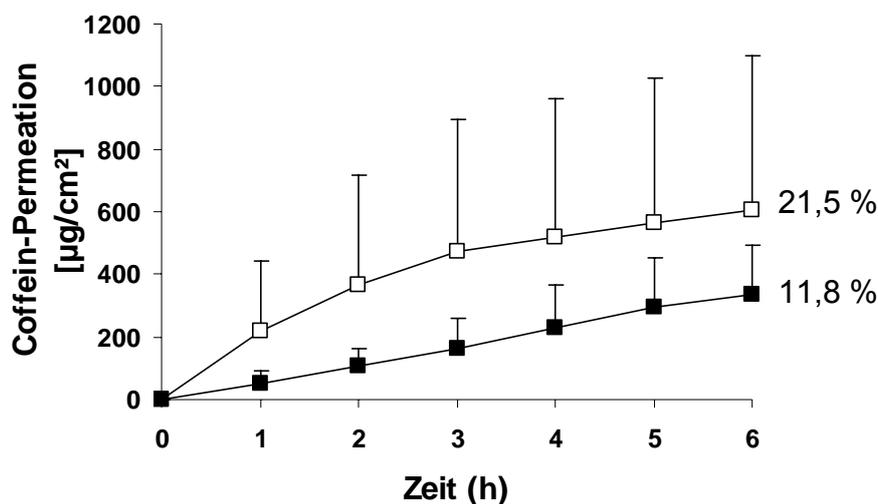


Abb. 26: Einfluss der Donorzusammensetzung auf die Permeation einer 1 %igen Coffein-Lösung ohne (offene Symbole) oder mit (geschlossene Symbole) Zusatz von 2 % Igepal® über das Hautmodell EpiDerm™ in PBS als Rezeptormedium. Die Zahlenwerte in der Abbildung geben den permeierten Anteil der Substanz nach 6 h in % der applizierten Menge wieder. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SD von $n = 3$ unabhängigen Versuchen mit 3 verschiedenen Chargen, jeder Versuch wurde 3-fach durchgeführt.

Die Schädigung der Haut erwies sich allerdings als weniger schwerwiegend als bei Zusatz von Igepal® zum Rezeptormedium oder sowohl zum Rezeptor- als auch zum Donormedium. Die Viabilität der Haut nahm um ungefähr 23 % ab, wenn sich Igepal® im Donormedium befand, verglichen zu einer Abnahme von ungefähr 85 % bei Zusatz von Igepal® zum Rezeptormedium und 95 %, wenn Igepal® beiden Medien zugesetzt wurde.

[%] Igepal® im Donormedium	0	2	0	2
[%] Igepal® im Rezeptormedium	0	0	0,5	0,5
Viabilität [%]	100 ± 0	77 ± 19,3	15 ± 13,9	5 ± 0,1

Tab. 11: Einfluss des Lösungsvermittlers Igepal® CA-630 in Rezeptor- und/oder Donormedien auf die Viabilität des Hautmodells EpiDerm™ nach 6-stündiger Exposition in der Franzzelle. Mit PBS behandelte Häute dienten als Kontrolle (= 100 % Viabilität). Dargestellt sind die Mittelwerte ± SD von n = 3 unabhängigen Versuchen mit 3 verschiedenen Chargen.

Um die Toxizität von Igepal® zu verifizieren, wurde die Viabilität des Hautmodells EpiDerm™ nach einer 24-stündigen Exposition mit verschiedenen Konzentrationen Igepal® (0,5 %, 1 %, 2 %, 4 %, 5 %, 20 %) im Donor direkt in den Hautkultureinsätzen gemessen. Bereits die niedrigste Konzentration des Lösungsvermittlers reduzierte die Viabilität des Epidermismodells auf ungefähr 13 %. Höhere Konzentrationen des Lösungsvermittlers zeigten stärkere Effekte.

Im Gegensatz zu rekonstruierter Epidermis beeinflusste der Zusatz von Igepal® zum Donormedium die Coffeinpermeation über porcine Haut nicht (**Abb. 27**).

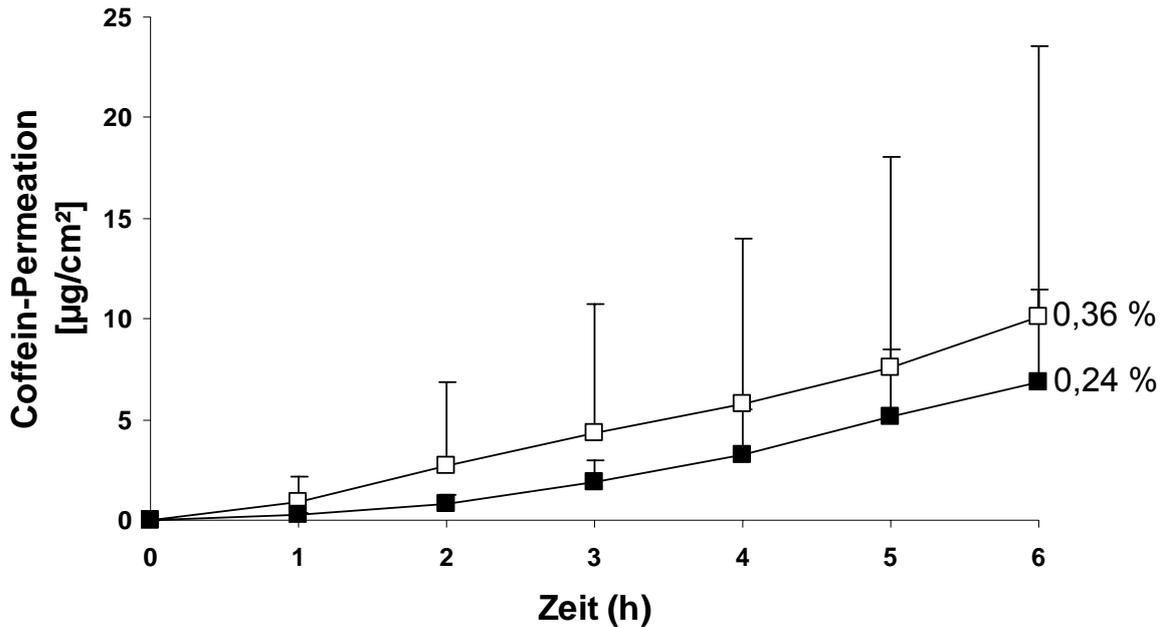


Abb. 27: Einfluss der Donorzusammensetzung auf die Permeation einer 1 %igen Coffein-Lösung ohne (offene Symbole) oder mit (geschlossene Symbole) Zusatz von 2 % Igepal[®] über porcine Haut (1000 µm Schnittdicke) in PBS als Rezeptormedium. Die Zahlenwerte in der Abbildung geben den permeierten Anteil der Substanz nach 6 h in % der applizierten Menge wieder. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SD von $n = 3$ unabhängigen Versuchen mit 3 unterschiedlichen Spendertieren, jeder Versuch wurde 2-fach durchgeführt.

In niedrigen Konzentrationen erscheint der Zusatz von Igepal[®] zum Donormedium tolerierbar und kann für die Anwendung schwerlöslicher Substanzen in Betracht gezogen werden.

Einfluss der Hautbehandlung / -präparation: Vergleich humaner hitzeseparierter Epidermis und Vollhaut. Von zusätzlichem Interesse war nun der Vergleich der Permeation über hitzeseparierte humane Epidermis und Vollhaut (1000 µm Schnittdicke), die als zusätzliche Barriere Dermis aufweist. Die Versuche wurden jeweils mit der Haut jedes Spenders parallel durchgeführt (**Abb. 28**).

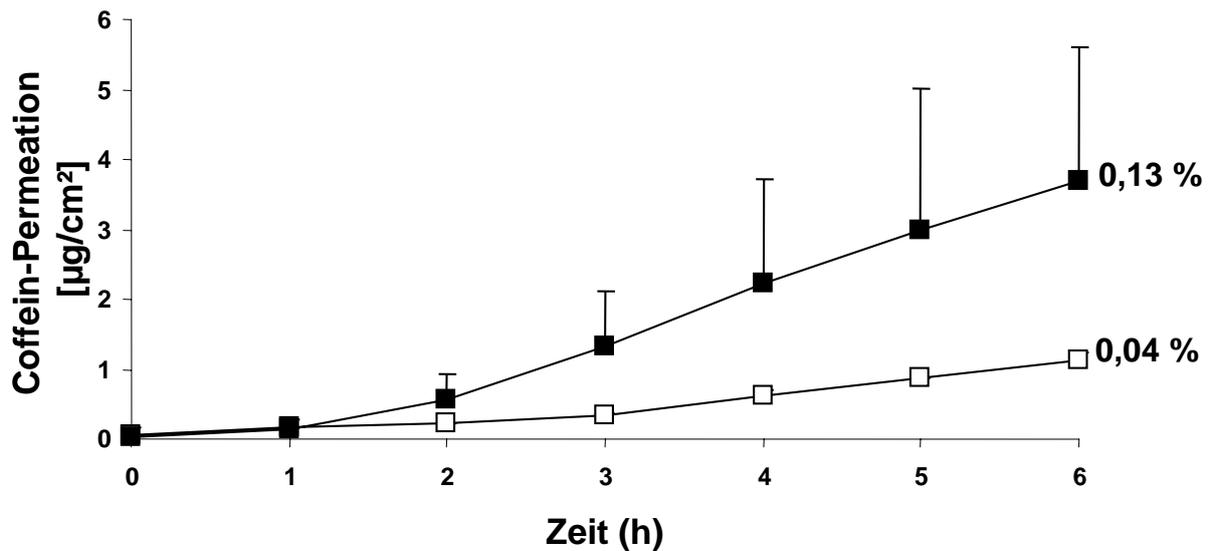


Abb. 28: Vergleich der Permeation einer 1 %igen Coffein-Lösung über unterschiedlich präparierte Humanhaut in PBS als Rezeptormedium. Offene Symbole repräsentieren hitzeseparierte Epidermis, geschlossene Symbole Vollhaut (1000 µm Schnittdicke). Die Zahlenwerte in der Abbildung geben den permeierten Anteil der Substanz nach 6 h in % der applizierten Menge wieder. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SD von $n = 2$ unabhängigen Versuchen mit 2 verschiedenen Spendern, jeder Versuch wurde 3-fach durchgeführt.

Die Coffein-Permeation zeigte sich ungefähr 3-mal effizienter über Vollhaut im Vergleich zu hitzeseparierter Epidermis. Dieser Unterschied erwies sich allerdings als nicht signifikant. Für vergleichende Versuche mit anderen Hautmatrices sollte aus Gründen der besseren Standardisierbarkeit der Präpariermethode bei der Gewinnung der Epidermis (Problematik der einheitlichen Schnittdicken bei der Verwendung von Voll- oder Spalthaut) humane hitzeseparierte Epidermis verwendet werden.

Einfluss der anatomischen Entnahmeregion bei humaner Haut. Um eine mögliche Abhängigkeit der Permeation von Coffein von der Entnahmeregion der humanen Haut zu untersuchen, erfolgte eine Zusammenstellung der Permeationskurvenverläufe von mit Coffein an humaner Vollhaut aus Brust- oder Bauchregion ermittelten Daten (**Abb. 29**). Dabei ergab sich keine Tendenz einer Abhängigkeit.

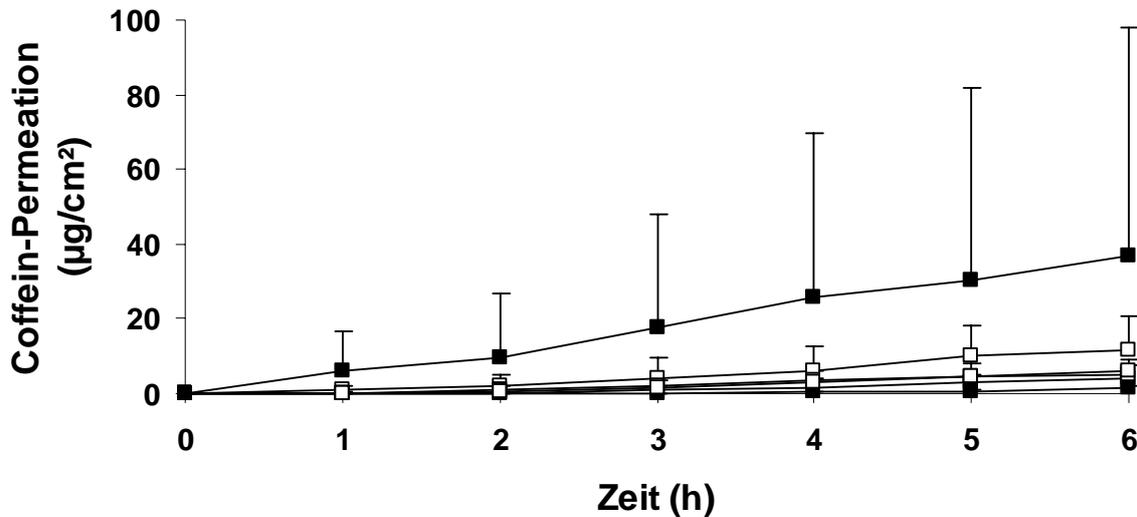


Abb. 29: Vergleich der Permeation einer 1 %igen Coffein-Lösung über humane Vollhaut (Schnittdicke 1000 µm) aus Brust- (offene Symbole) oder Bauchregion (geschlossene Symbole) in PBS als Rezeptormedium. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SD eines Versuchs von jeweils einem Spender, jeder Versuch wurde 3-fach durchgeführt. Insgesamt sind in die Darstellung die Daten von 3 verschiedenen Spendern eingegangen.

Einfluss des Zustandes der Haut: Abhängigkeit der Permeation über Humanhaut vom Alter des Spenders. Ein Vergleich der Permeationskurvenverläufe und der Permeationsparameter aller mit Coffein an humaner hitzeseparierter Epidermis (Brusthaut) generierter Daten von 6 Spendern im Alter von 38 - 62 Jahren zeigte keine Altersabhängigkeit hinsichtlich der Permeabilität (**Abb. 30**).

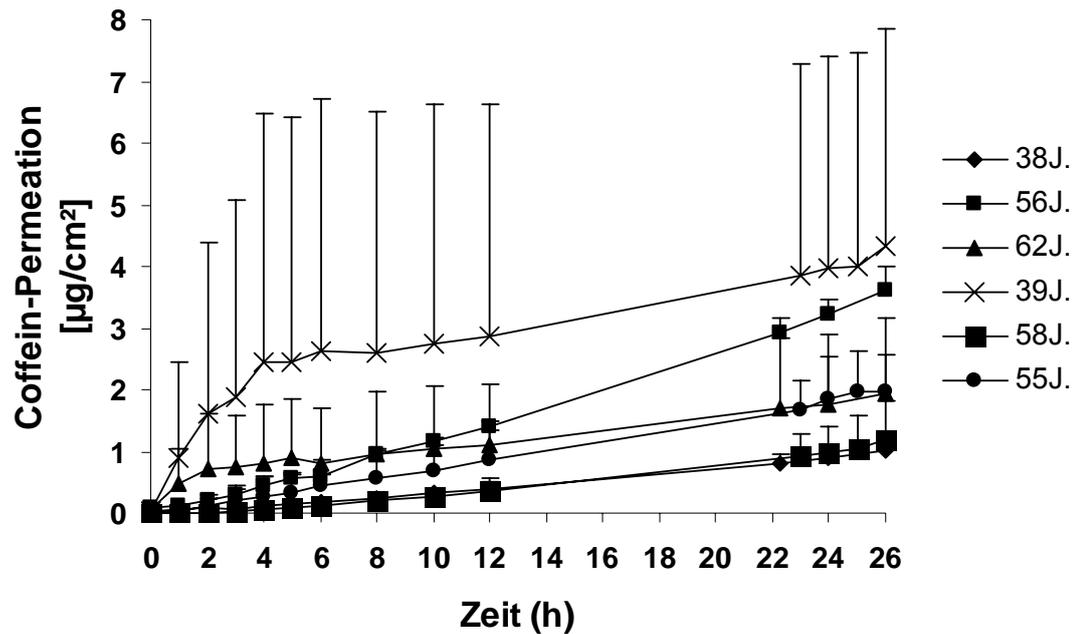


Abb. 30: Vergleich der Permeation einer 0,1 %igen Coffein-Lösung über humane hitzeseparierte Epidermis aus der Brustregion von 6 Spendern unterschiedlichen Alters in PBS als Rezeptormedium. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SD eines Versuchs von jeweils einem Spender, jeder Versuch wurde 3-fach durchgeführt.

Einfluss des Zustandes der Haut: Vergleich von frischer und kryokonservierter Haut. Während die OECD in ihrem Guidance Document 28 der Verwendung von viabler humaner Haut für Permeationstests den Vorzug gibt, wird auch die Verwendung von Haut anderer Spezies (vorzugsweise porcine Haut) und nicht-viabler Haut akzeptiert (OECD, 2003). Es sollte daher sowohl an humaner als auch an porciner Haut untersucht werden, ob frische und kryokonservierte Haut hinsichtlich ihrer Permeabilität als gleichwertig zu betrachten sind. Dazu wurden ein Teil jedes Hautstückes in frischem Zustand und ein Teil erst im Anschluß an eine Kryokonservierung bei -20°C über mindestens 24 h und maximal 6 Monate für den Permeationsversuch eingesetzt. Die Lagerdauer für die kryokonservierte Haut wurde wie o.g. festgelegt, da Untersuchungen der Universität des Saarlandes ergaben, dass die Lipidmuster humaner Haut (Cholesterol, Cholesterolester, Fettsäuren, Triglyceride, Ceramide) sich in diesem Zeitraum unter dem Einfluß der Kryokonservierung bei -20°C nicht veränderten. Es kann also von einer Stabilität bezüglich der Zusammensetzung des humanen Hautmaterials ausgegangen werden. Der Einfluss auf die Permeabilität sollte im Folgenden untersucht werden.

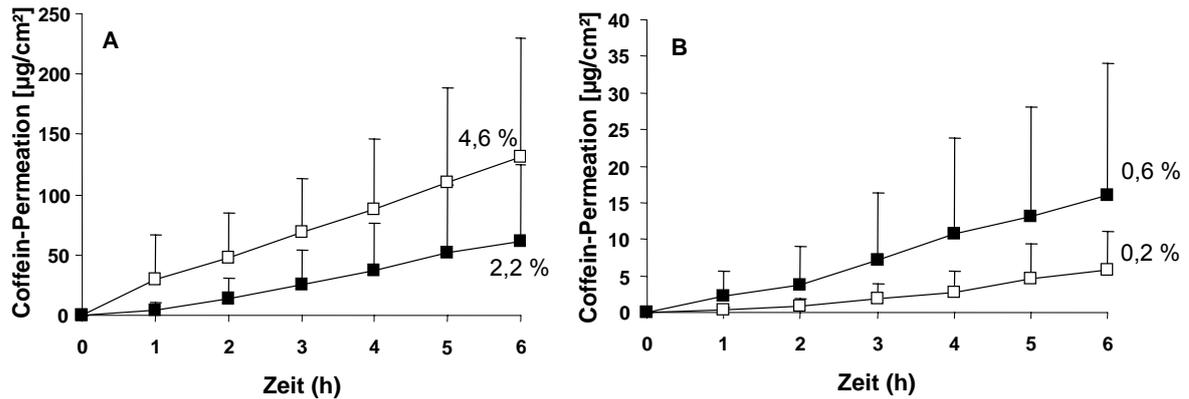


Abb. 31: Einfluss der Kryokonservierung (24 h - 6 Monate bei -20°C) tierischer und humaner Haut auf die Permeation einer 1 %igen Coffein-Lösung in PBS als Rezeptormedium. Die Permeation wurde unter Verwendung von **A** porciner Rücken- oder **B** humaner Bauch- oder Brusthaut (1000 μm Schnittdicke) in frischem (offene Symbole) oder kryokonserviertem (geschlossene Symbole) Zustand bestimmt. Die Zahlenwerte in der Abbildung geben den permeierten Anteil der Substanz nach 6 h in % der applizierten Menge wieder. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SD von $n = 3$ unabhängigen Versuchen mit 3 unterschiedlichen Spendertieren bzw. Spendern, jeder Versuch wurde 3-fach durchgeführt.

Die Kryokonservierung hatte fast keine Relevanz für den Flux von Coffein, weder bei porciner noch bei humaner Haut war ein signifikanter Unterschied hinsichtlich der Permeabilität zu beobachten (**Abb. 31**). Man kann also davon ausgehen, dass kryokonservierte Haut, die in allen folgenden Untersuchungen verwendet wurde, für Absorptionsstudien geeignet ist.

Einfluss der anatomischen Entnahmeregion: Vergleich porciner Haut aus Rücken- oder Bauchbereich. Für die weiteren Untersuchungen mit Schweinehaut sollte nun festgestellt werden, ob die Entnahmeregion der Haut Einfluss nimmt auf das Permeationsverhalten von Coffein. Dazu wurde porcine Haut aus dem Abdominalbereich (1000 μm Schnittdicke) hinsichtlich ihrer Permeabilität mit Haut aus dem Rückenbereich (1000 μm Schnittdicke) verglichen. Zu sehen ist die Tendenz zu einer besseren Überwindung von Bauchhaut als von Rückenhaut (**Abb. 32**), deren Ursache eine stärkere Ausprägung des Stratum corneum bei Rückenhaut sein könnte (**Abb. 33**), allerdings zeigten die Unterschiede in der Permeabilität keine Signifikanz. Die Entnahmeregion scheint daher bei porciner Haut von geringerer Bedeutung zu sein. Für alle folgenden Versuche wurde aufgrund der besseren Verfügbarkeit Haut aus der Rückenregion des Schweines verwendet.

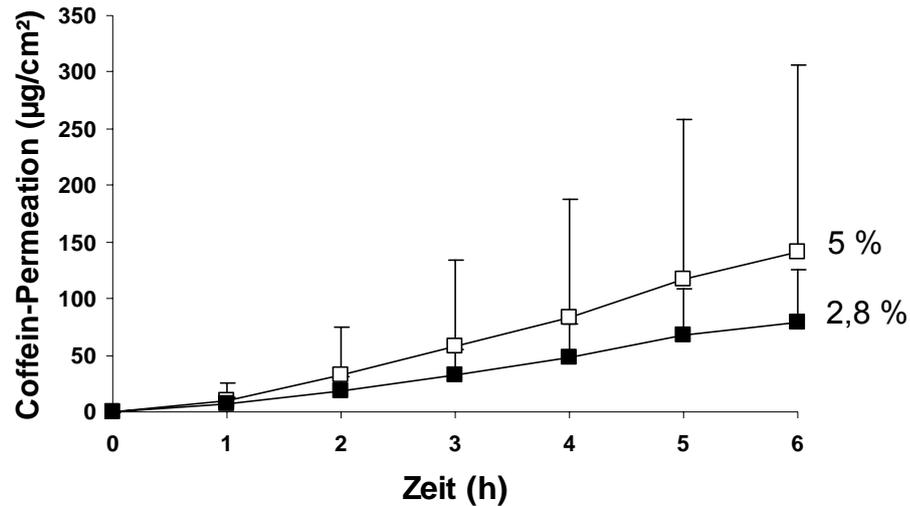


Abb. 32: Vergleich der Permeation einer 1 %igen Coffein-Lösung über porcine Haut (1000 µm Schnittdicke) unterschiedlicher anatomischer Entnahmeregionen in PBS als Rezeptormedium. Offene Symbole repräsentieren Abdominalhaut, geschlossene Symbole Rückenhaut. Die Zahlenwerte in der Abbildung geben den permeierten Anteil der Substanz nach 6 h in % der applizierten Menge wieder. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SD von $n = 3$ unabhängigen Versuchen mit 3 unterschiedlichen Spendertieren, jeder Versuch wurde 3-fach durchgeführt.

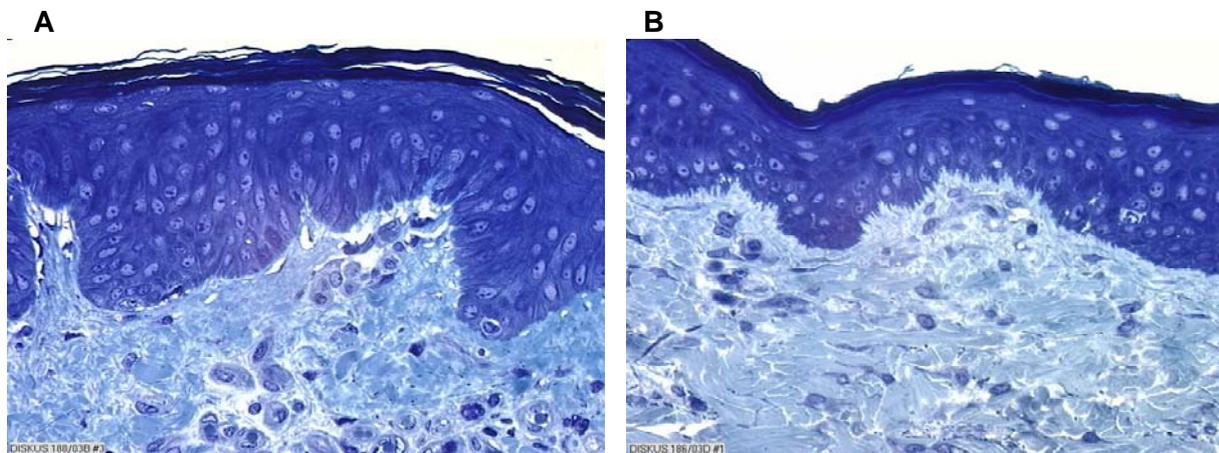


Abb. 33: Histologisches Erscheinungsbild unbehandelter porciner Vollhaut aus der **A** Abdominalregion und der **B** Rückenregion. Die lichtmikroskopische Untersuchung erfolgte in 400-facher Vergrößerung.

3.3.2 Permeabilitäten der verschiedenen Hautmatrices

Im Folgenden sollte mit längeren Versuchszeiten eine Bestimmung der 'Lag'-Zeiten, der K_p -Werte und der Menge permeierter Substanz bei Versuchsende an den

unterschiedlichen Häuten erfolgen. Die Permeationsparameter sollten eine erste Aussage zur Permeabilität inklusive Streuung der verschiedenen Matrices erlauben.

Bestimmung von Permeationsparametern. Über längere 'Lag'-Zeiten in Permeationsuntersuchungen mit humaner und porciner Haut wurde bereits berichtet (An et al., 2003; Lotte et al., 2002). Unter Berücksichtigung dieser Tatsache und um auszuschließen, dass die an humaner und porciner Haut erhobenen Messwerte in der 'Lag'-Phase lagen, wurden Experimente mit Versuchszeiten von 26 h mit allen bisher untersuchten Hautmatrices vorgenommen.

Parallel durchgeführte Untersuchungen der Lipidstruktur der humanen Haut ergaben, dass eine 24-stündige Inkubation der Haut mit PBS in der Franzzelle das epidermale Lipidmuster (Cholesterol, Cholesterolester, Fettsäuren, Triglyceride, Ceramide) nicht verändert. Dadurch ist die Stabilität der Versuchsmatrix auch über eine längere Dauer der Franzzellversuche gewährleistet. Die Lipidanalytik wurde von der Universität des Saarlandes durchgeführt.

Die erhöhte Anzahl von Meßpunkten infolge einer längeren Versuchsdauer erlaubte eine exakte Bestimmung der 'Lag'-Zeiten und Permeationsparameter (Cooper and Berner, 1985) nach Definition des linearen Teils der Permeationskurve. Aufgrund von Sättigungseffekten bei den prolongierten Versuchszeiten, vernachlässigbarer 'Lag'-Zeiten von weniger als 1 h und unter Berücksichtigung der Viabilitätsdaten wurden im Falle der Kunsthautmodelle für alle folgenden Untersuchungen kürzere Versuchszeiten (8 h) als ausreichend erachtet und anhand dieser die Permeationsparameter bestimmt (**Tab. 12**). Hitzeseparierte Epidermis zeigte ebenfalls sehr kurze 'Lag'-Zeiten bei der Coffein-Permeation. Im Gegensatz dazu wurden bei porciner Haut 'Lag'-Zeiten von bis zu 10 h beobachtet (**Tab. 12**). Dies beruht vermutlich auf veränderten experimentellen Bedingungen (verringerte Konzentration der Donorlösung und geringeres Entnahmevermögen der Rezeptorlösung) im Vergleich zum 6 h - Versuch, die dem Optimierungsprozeß der Methodenentwicklung, der eine schrittweise Änderung der Testbedingungen bedeutet, zuzuschreiben sind. Zu ergänzen bleibt allerdings, dass durch eine Erhöhung der Anzahl von Franzzellversuchen mit Schweinehaut in späteren Untersuchungen eine Verkürzung der 'Lag'-Zeiten auf im Mittel ungefähr 4 h beobachtet wurde. Versuche mit porciner Haut und hitzeseparierter humaner Epidermis sollten in allen folgenden Experimenten mit verlängerter Versuchsdauer

(24 h), mit der der Forderung von Cooper and Berner nach Mindestversuchszeiten von 6 - 10 - facher 'Lag'-Zeit zur korrekten Ermittlung des Flux-Wertes (J_{ss}) entsprochen wird, durchgeführt werden (Cooper and Berner, 1985).

Hautmatrix	Permeationsparameter			
	$K_p \times 10^{-5}$ [cm/h]	'Lag'-Zeit [h]	Permeierte Substanzmenge bei Versuchsende	
			[%]	[$\mu\text{g} / \text{cm}^2$]
hitze-separierte humane Epidermis	7,6	0	0,74 ± 0,42	2,1 ± 1,2
porcine Haut	31,7	10,7	1,77 ± 0,46	5,0 ± 1,3
EpiDerm™	176,4	0,16	4,96 ± 5,88	14 ± 16,6
SkinEthic®	777,6	0	43,9 ± 10,05	124 ± 28,4

Tab. 12: Permeationsparameter unterschiedlicher Hautmatrices ermittelt aus 8- (Kunsthautmatrices) oder 24-stündigen (humane und tierische Haut) Permeationsversuchen mit einer 0,1 %igen Coffein-Lösung (PBS) in PBS als Rezeptormedium. Dargestellt sind die Mittelwerte von $n = 3$ unabhängigen Versuchen mit 3 verschiedenen Chargen, jeder Versuch wurde doppelt durchgeführt.

Die K_p -Werte der Hautmodelle EpiDerm™ und SkinEthic® zeigten eine im Vergleich zur hitze-separierten Epidermis stark erhöhte Permeation (**Tab. 12**), es kommt bei der Durchführung der Permeationsuntersuchungen mit rekonstruierter Haut also immer zu einer Überbewertung des Permeationsverhaltens von Coffein. Dies sollte jedoch nach Untersuchung eines Substanzpanels mit Stoffen sehr unterschiedlicher physiko-chemischer Eigenschaften und Definition eines Algorithmus (= Prädiktionsmodell) korrigierbar sein.

3.3.3 Aussagekraft kutaner Viabilitäts- und Integritätstests für die perkutane Absorption

Korrelation von Viabilitäts- und Integritätsdaten. Um eine Beziehung zwischen kutaner Viabilität und Integrität herzustellen und folglich die Aussagekraft von MTT-Test und dazugehöriger histologischer Bewertung für Permeationsuntersuchungen beurteilen zu können, wurde in Form von Streudiagrammen (Scatterplots) eine

Gegenüberstellung der MTT-(Viabilitäts-)Daten und dem Score der histologischen Evaluierung der Hautmodelle EpiDerm™ und SkinEthic® vorgenommen (**Abb. 34**). Die Viabilitäts- und Integritätsuntersuchungen erfolgten im Anschluss an die Franzzellversuche als Entscheidungshilfe hinsichtlich der Auswahl der geeigneten Donor-/Rezeptormedien. Daten von 208 Einzeluntersuchungen, die an der FU Berlin und an der LMU München durchgeführt wurden, sind in die Korrelation einbezogen. In die Graphiken sind Einzeluntersuchungen mit insgesamt 30 Kombinationen von Donor- und Rezeptormedien eingegangen.

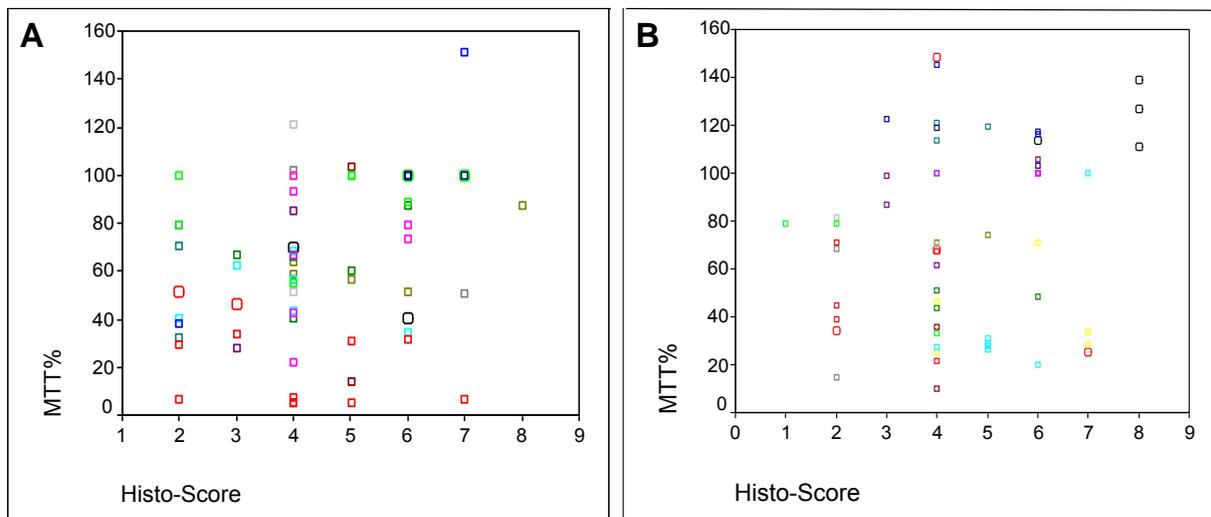


Abb. 34: Gegenüberstellung von Hautviabilität und jeweils zugehöriger histologischer Bewertung **A** des EpiDerm™ und **B** des SkinEthic®-Hautmodells mittels Streudiagramm nach Testung 30 verschiedener Donor-/Rezeptormedium-Kombinationen. Histologischer 8-Punkt-Score für den Schweregrad der Schädigung mit 8 = normal; 1 = verhornte Zellen (siehe Material und Methoden, Tab. 3).

Obgleich gelegentlich eine Tendenz zur Korrelation zwischen histologischem Score und MTT-Wert zu erkennen war, konnte diese aber statistisch nicht als Korrelation gesichert werden (E.Schmidt, ZEBET).

Korrelation von Integritäts- bzw. Viabilitätsdaten und K_p -Werten. Um schließlich den Einfluss des Zustandes der Haut hinsichtlich ihrer Integrität und Viabilität auf ihre Permeabilität näher zu charakterisieren, wurden sowohl die Scores der histologischen Bewertung als auch die MTT-Werte mit den jeweils zugehörigen K_p -Werten in einem Streudiagramm korreliert (**Abb. 35**). Der Analyse lagen Einzelwerte aus Untersuchungen (6 h-Franzzellversuche) der FU Berlin an den Kunsthautmodellen EpiDerm™ und SkinEthic® zugrunde.

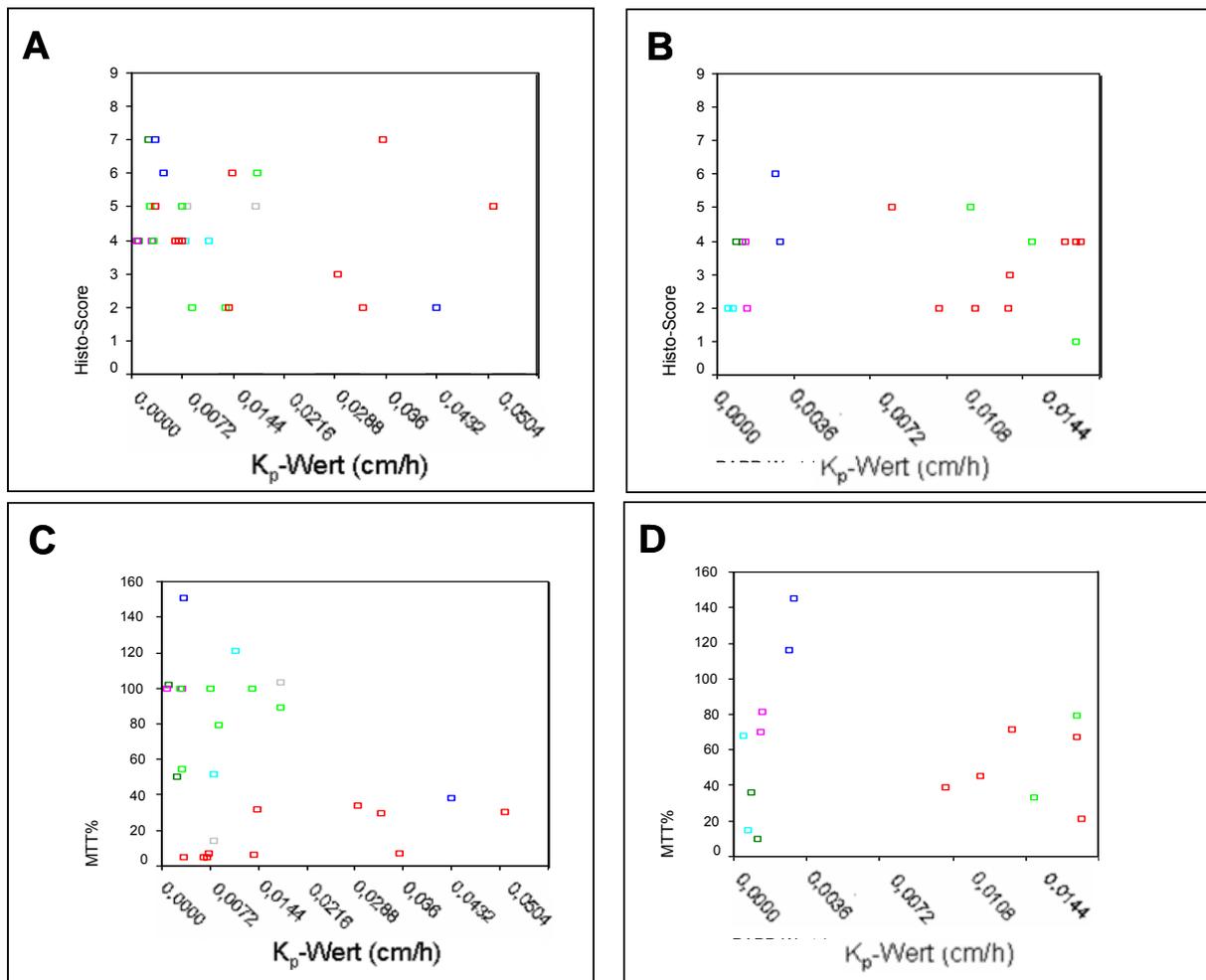


Abb. 35: Gegenüberstellung von **A**, **B** histologischer Bewertung oder **C**, **D** Hautviabilität und jeweils zugehörigem K_p -Wert **A**, **C** des EpiDerm™- und **B**, **D** des SkinEthic®- Hautmodells mittels Streudiagramm. Histologischer Score für den Schweregrad der Schädigung: 8 = normal - 1 = verhornte Zellen (siehe Material und Methoden, Tab. 3).

Es zeigte sich auch hier keine Korrelation der Viabilitätsdaten aus MTT-Test oder der Integritätsdaten aus histologischer Inspektion mit den jeweils entsprechenden K_p -Werten (E. Schmidt, ZEBET). Weder der MTT-Test noch die morphologische Untersuchung eignen sich daher als Qualitätskriterium für die Prädiktion der Permeabilität einer Haut, z.B. für die Auswahl von Donor- und Rezeptormedien für Untersuchungen der perkutanen Absorption.