

Dreidimensionale Hautmodelle zur Erfassung der perkutanen Resorption

Anja Gysler, Ute Königsmann, Monika Schäfer-Korting

Freie Universität Berlin, Institut für Pharmazie, Abteilung Pharmakologie und Toxikologie, D-Berlin

Zusammenfassung

Für die Untersuchung perkutaner Resorption bzw. Penetration von Fremdstoffen über die menschliche Haut stehen derzeit noch keine zugelassenen Alternativverfahren zu Tierversuchen zur Verfügung. Zur Abschätzung des Potentials der kommerziell verfügbaren rekonstruierten Epidermismodelle wurde ein Vergleich der Barrierefunktion der dreidimensionalen Hautäquivalente Episkin[®], EpiDerm[®] und Skinethic[®], gewonnen aus humanen Keratinozyten, mit exzidiierter Humanhaut vorgenommen. Die Methoden umfaßten die Messung des transepidermalen Wasserverlusts (TEWL) und die Penetration von Prednisolon (PD). Während Skinethic[®] und EpiDerm[®] im TEWL-Test noch nahezu identische Werte von $15 \text{ g}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$ aufwiesen, zeigte Skinethic[®] bei der PD-Penetration eine deutlich bessere Barrierefunktion. So permeierte nur die Hälfte des Wirkstoffs durch dieses Hautäquivalent, d.h. die Wirkstoff-Konzentration im Akzeptormedium betrug nur 150 gegenüber 300 ng/ml. Episkin[®] zeigte in beiden Tests die höchsten Werte ($20 \text{ g}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$ bzw. 500 ng/ml) und damit die schlechteste Barrierefunktion. Humane Haut wies TEWL-Werte von $9 \text{ g}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$ auf, die PD-Konzentration im Akzeptormedium lag stets unterhalb der Nachweisgrenze (10,1 ng/ml).

Da die Barrierefunktion somit bei Skinethic[®] am besten ausgeprägt ist, konzentrierten sich die weiteren Untersuchungen auf dieses Hautäquivalent. Seine Chargenkonformität war höher als die humaner Haut (interindividuelle Varianz von 12% bzw. über 19%). Somit besitzt dieses Hautäquivalent zwar eine insgesamt etwas schlechtere Barriereeigenschaft als die gesunde Humanhaut, ein großer Vorteil liegt aber in ihrer sehr guten Standardisierbarkeit. Daher erscheinen weiterführende Studien zur Abschätzung des Potentials humaner Hautäquivalente zur Erfassung der perkutanen Resorption äußerst vielversprechend.

Summary: Tridimensional skin models recording percutaneous absorption

Today there is a lack of generally accepted alternatives to animal experiments for the evaluation of percutaneous absorption or skin penetration. To evaluate the potential of commercially available reconstructed epidermis we compared the barrier function of the three dimensional human skin equivalents Episkin[™], EpiDerm[™], and Skinethic[™] to those of excised human skin. Moreover the batch-to-batch variation of skin equivalents was determined. Methods for evaluation included the determination of transepidermal water loss (TEWL) and of the prednisolone (PD) penetration. Whereas TEWL values of Skinethic[™] and EpiDerm[™] were very close ($15 \text{ g}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$), PD-penetration showed a clearly superior barrier function with the Skinethic[™] model. Drug penetration was only 50% of the EpiDerm[™] model and PD concentrations in the acceptor medium amounted to 150 ng/ml as compared to 300 ng/ml. The highest values were obtained with the Episkin[™] model ($20 \text{ g}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$, 500 ng/ml). Therefore this model has the poorest barrier function. The TEWL value for human skin was $9 \text{ g}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$ and PD concentrations in the acceptor medium were below the limit of detection (10.1 ng/ml).

Because of the superior barrier function of the Skinethic[™] the following evaluation was only performed using this model. Batch-to-batch variation was less than with human skin (interindividual variation of 2 h TEWL 12% and > 19%). Despite of the slightly less well-developed barrier, this skin model clearly appears superior with respect to the reproducibility of data. Therefore future investigations on the potential of human skin equivalents for the determination of percutaneous absorption appear very promising.

Keywords: reconstructed epidermis, glucocorticoids, percutaneous absorption, Franz flow through diffusion cell

1 Einleitung

Seit einigen Jahren sind menschliche Hautäquivalente reproduzierbarer Beschaffenheit kommerziell verfügbar. Sie bestehen aus humanen Keratinozyten, die an der Luft/Medium-Grenze kultiviert werden. Es entsteht ein epidermales Gewebe, das die Merkmale eines intakten *stratum corneum* und der lebenden Epi-

dermis bis hin zum *stratum basale* aufweist (Ponec, 1992; Rosdy et al., 1993). Untersuchungen zum Metabolismus der rekonstruierten Epidermis haben gezeigt, daß sowohl die Esteraseaktivität als auch die Fähigkeit, Glucose zu Lactat umzusetzen, mit der metabolischen Aktivität von exzidiierter Humanhaut und von isolierten Keratinozyten-Monolayer-Kulturen übereinstimmt (Ponec, 1992; Rosdy et al.,

1993). Allerdings war die Barrierefunktion des getesteten Hautäquivalents weniger ausgeprägt als bei normaler menschlicher Haut, was durch die nahezu zweifach höhere Permeationsrate topischer Glucocorticoide gezeigt werden konnte (Gysler et al., 1997). Trotz dieses Nachteils weist die rekonstruierte Epidermis für Penetrations- und Metabolisierungsstudien sehr günstige Eigenschaften auf, so daß

sie anderen verfügbaren Modellen, nämlich exzidierte Haut humanen oder tierischen Ursprungs, überlegen erscheint. Gegenüber der Humanhaut kommt der Verfügbarkeit hohe Bedeutung zu. Gesunde menschliche Haut fällt nur im Rahmen der plastischen Chirurgie in größerem Umfang an, wobei eine mikrobielle Kontamination mit gefährlichen Krankheitserregern (HIV, HBV) nicht von vornherein ausgeschlossen werden kann. Die Arbeit mit diesem Material erfordert zudem ein Höchstmaß an Flexibilität, da sich der Entnahmezeitpunkt ausschließlich an den Bedürfnissen von Patient und Operationsteam orientiert und daher nicht beeinflussbar ist. Zudem stellt die Freigabe des Gewebes, besonders für industrielle Nutzer, ein ethisches bzw. gesellschaftliches Problem dar. Aber auch die Barrierefunktion der menschlichen Haut variiert in ganz erheblichem Maße. So reichen die Extremwerte der Hydrocortison-Resorption von 1% (Fußsohle) bis ca. 40% (Augenlider), im mittleren Bereich liegen die Barrieren bei Unterarm und Rücken (Robertson and Maibach, 1983).

Exzidierte tierische Haut ist für Studienzwecke im Hinblick auf die oben angesprochene Problematik der Verfügbarkeit und Infektionsgefahr günstiger einzustufen. Zudem läßt sich durch standardisierte Zuchtmethoden und Tierhaltung die Variabilität der Haut verringern. Von erheblichem Nachteil ist dagegen die wesentlich stärkere Behaarung tierischer Haut, selbst wenn es sich um spezielle Zuchtformen handelt (Gruber und Spielmann, 1996). Gelangt nämlich ein Wirkstoff in nennenswertem Umfang über den transfollikulären Passageweg durch die Haut, wie es beispielsweise von diversen Steroiden und hochmolekularen Antibiotika bekannt ist, so ergeben sich daraus wesentlich höhere Penetrationsraten (Barry, 1983; Hueber et al., 1994). Weiterhin besitzt selbst Schweinehaut, die der menschlichen Haut am ehesten gleicht, einen deutlich anderen Aufbau der Lipidlamellen des *stratum corneum* und damit eine abweichende Penetration topisch applizierter Substanzen.

Da ferner in sehr naher Zukunft die Verwendung lebender Tiere für die Testung von Kosmetika nicht mehr gestattet sein wird, stellt sich die Frage nach geeigneten Alternativmethoden. Weder das perfundierte Rindereuter (Kietzmann et al.,

1993) noch das perfundierte Kaninchenohr (Behrendt and Korting, 1990) können als eine solche Alternative angesehen werden. Zwar sind Rindereuter in ausreichendem Umfang von Schlachttieren verfügbar und die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse aus Penetrationsstudien erscheint zufriedenstellend, doch sind die Größe und damit Unhandlichkeit des Objektes sowie die erheblichen Mengen an Testmaterial für die Versuche von Nachteil. Noch ungünstiger schneidet das Kaninchenohr ab, da es nicht von Schlachttieren, sondern von eigens gezüchteten Labortieren gewonnen wird. Wünschenswert ist ein stabiles dreidimensionales Hautmodell, gewonnen aus humanen Keratinozyten, mit gut reproduzierbarer Barriere für die Untersuchung der Penetration und Metabolisierung topisch applizierter Substanzen sowie zur Abschätzung des Risikos im Umgang mit Industriechemikalien.

Unter dieser Prämisse wurden die gängigen drei Epidermis-Modelle von Skinethic[®], Epiderm[®] und Episkin[®] sowie exzidierte Humanhaut bezüglich ihrer Barriereigenschaften verglichen. Die Epidermis-Modelle bestehen aus humanen Keratinozyten, die im Falle des Epiderm[®]-Produkts aus kindlicher Vorhaut und bei den beiden anderen Modellen aus adulter Haut gewonnen werden. Unter Verwendung standardisierter Nährmedien werden die Zellen auf Kunststoff-Membranen bzw. einer Kollagen-Matrix über mehrere Wochen an der Luft/Medium-Grenze kultiviert. Dieses Verfahren bewirkt eine Ausdifferenzierung der Keratinozyten zu einer mehrschichtigen Epidermis, bei der histologisch das *stratum corneum*, die lebende Epidermis und das *stratum basale* nachgewiesen werden können. Nach Herstellerangaben enthalten alle drei Modelle zumindest die Ceramide 1-6 sowie alle übrigen in humaner Haut nachweisbaren Lipide. Auch die Differenzierungsmarker Keratin und Transglutaminase sind vorhanden. Um nun Unterschiede im Barriereverhalten der Modelle nachzuweisen, wurden der transepidermale Wasserverlust und die perkutane Resorption von Prednisolon gemessen. Darüber hinaus wurde die inter- und intraindividuelle Variabilität untersucht, um ein Maß für die Standardisierbarkeit der Verfahren zu erhalten. Die Bezugsgröße in dieser Studie war das Verhalten exzidierte humaner Haut, die

zusätzlich zur intakten Epidermis ein Korium aufweist. Dieses Untergewebe mit seiner Stützfunktion fehlt den Epidermis-Modellen, daher der Einsatz der Kunststoff-Membranen bzw. der Kollagen-Matrix.

Für die Untersuchung der perkutanen Resorption sollten zunächst häufig eingesetzte Dermatika als Modellschubstanz herangezogen werden. Aufgrund ihrer anti-phlogistischen und immunsuppressiven Eigenschaften kommt unter diesen den topischen Glucocorticoiden die größte klinische Bedeutung zu. Für unsere Untersuchungen wurde Prednisolon als Testsubstanz ausgewählt, da dieses Steroid als biotransformationsstabil einzuschätzen war und zudem eine recht hohe Polarität/geringere Lipophilie aufweist. Wie klinische Studien an gesunden Probanden gezeigt haben, penetriert Prednisolon nur zu einem äußerst geringen Anteil durch die menschliche Haut (Siddiqui et al., 1989). Daher scheint dieses Glucocorticoid besonders geeignet zu sein, um ein intaktes *stratum corneum* und seine ausgeprägte Barrierefunktion darzustellen.

2 Material und Methoden

Alle verwendeten Feststoffe, der Phosphatpuffer und die Nährzusätze sowie das Filtermaterial wurden bei Sigma (Deisenhofen, D) bezogen. Die Fließmittel und Ethylacetat stammten von Merck (Darmstadt, D) und waren von höchstmöglicher Reinheit. Prednisolon-Creme (0,4%; W/O-Emulsion, Linola[®]-H-Fett N) sowie die entsprechende wirkstofffreie Zubereitung waren von Wolff (Bielefeld, D).

2.1 *In vitro* rekonstruierte Epidermis

Die Permeationsversuche wurden vergleichend an drei verschiedenen kommerziell verfügbaren humanen Hautäquivalenten durchgeführt: EPI-606[®], EpiDerm[®] Kit (Durchmesser 30 mm, MatTek[®] Corporation, Ashland, MA), rekonstruierte Epidermis (Durchmesser 23 mm, Skinethic[®], Nizza, F) und Episkin[®] (Durchmesser 12 mm, SADUC[®], Chaponost, F). Die Epidermis-Modelle wurden mit Hilfe von Skalpell oder einer Gewebe-Stanze aus ihren Transport-Gefäßen gelöst und auf Medium-getränkten Schwämmen bis zur Durchführung der Versuche bei 21°C/50-60% relativer Luftfeuchtigkeit aufbewahrt.

2.2 Exzidierte Humanhaut

Die Hautproben von Oberschenkel und Bauch stammten aus operativen Eingriffen im Rahmen der plastischen Chirurgie und wurden stets innerhalb von 4 Stunden nach der Entnahme für die Untersuchungen verwendet. Nach Entfernen des subkutanen Fettgewebes wurden Stanzbiopsien mit Durchmessern von 15 mm genommen und mit Hilfe eines Dermatoms (*Vibrating Microtome*[®], TSE Systems, Bad Homburg, D) auf eine einheitliche Dicke von 500 µm geschnitten. Das Material enthielt somit die vollständige Epidermis und Teile des Koriiums.

2.3 Transepidermaler Wasserverlust (TEWL)

Der TEWL wurde in einem Klimaschrank (KB 53[®], WTB Binder, Tuttlingen, D) bei konstanter Temperatur (21°C) und 50-60% relativer Luftfeuchte über einen Zeitraum von mindestens 2 h viertelstündlich gemessen. Den Zugriff ermöglichten kreisförmige Öffnungen in der den Klimaschrank abschließenden Glasscheibe; über die mit Gummihandschuhen versehenen Flansche konnten Manipulationen im Innenraum ohne Störung des inneren Milieus vorgenommen werden. Die Hautäquivalente wurden auf Medium-getränkten Schaumstoffpolstern gelagert und zur Equilibrierung 30 Minuten vor der ersten Messung im Klimaschrank inkubiert. Da die Meßfläche der Meßköpfe (Evaporimeter[®]/EP1, Deelux, Gödenstorf, S) kleiner als die Oberfläche der Haut bzw. rekonstruierter Epidermis ist, sind Verfälschungen durch Interferenzen aus dem umgebenden Milieu ausgeschlossen.

2.4 In vitro Permeation

Die Permeationsversuche erfolgten mit Hilfe von Durchfluß-Franzzellen (Durchmesser 9 mm, Crown Glass, Somerville, NJ). 50 mg der jeweiligen Zubereitung wurden auf die Oberseite der Haut bzw. des Hautäquivalents appliziert (sog. *infinite dose*). Als Akzeptorflüssigkeit diente isotonischer Phosphatpuffer pH 7,4 unter Zusatz von 0,1% Glucose, die Temperatur betrug konstant 37°C, die Flußrate des Puffers 6 ml/h (Peristaltische Kassettenpumpe Typ Sarah[®]; Manostat[®], New York, NY). Fraktionen wurden stündlich über einen Zeitraum von 12 Stunden gesammelt.

2.5 Prednisolon-Analytik

Unmittelbar nach den Penetrationsversuchen wurde den Proben Betamethason (2×10^{-5} M) als interner Standard zugesetzt. Die Proben wurden mit jeweils 5 ml Ethylacetat extrahiert und die organischen Phasen unter Stickstoff bei 50°C zur Trockne eingedampft. Der mit 1 ml Methanol aufgenommene und in 2-ml-Eppendorf-Gefäße überführte Rückstand wurde wiederum unter Stickstoff bei 50°C zur Trockne eingedampft und anschließend erneut mit 100 µl Methanol aufgenommen. 20 µl wurden sodann direkt in die HPLC injiziert.

Die Proben wurden mit Hilfe der Reversed Phase HPLC (LaChrome[®], Merck-Hitachi, Darmstadt, D) analysiert: Die Probenaufgabe erfolgte automatisch (Autosampler, L-7200), zur Trennung diente die Säule (LiChroCart[®]; 125 mm/4 mm ID; Füllmaterial, LiChrospher[®] RP-18/5 µm) unter Vorschaltung einer Vorsäule (LiChroCart[®]; 4 mm/4 mm). Bei der Niederdruck-Gradientenelution wechselte die mobile Phase Wasser/Acetonitril (80:20 v/v) in 25 min linear zu 100% Acetonitril. Die Flußrate betrug 1 ml/min. Nach jeder Analyse wurde 15 min mit dem Ausgangsfließmittel gespült. Die Detektion gelang mittels UV-Absorption bei 254 nm (L-7200). Die Auswertung erfolgte über die Integration der Peakflächen mit dem HPLC System Manager (HSM 32[®]).

2.6 Statistik

Konzentrationsangaben der Penetrationsstudien (n=6) sowie die Meßwerte des transepidermalen Wasserverlusts (n=3) wurden als arithmetische Mittelwerte (\bar{x}) berechnet. Als Maß für die Streuung diente die Standardabweichung (SD). Alle Meßwerte werden als Mittelwerte \pm SD angegeben. Der Variationskoeffizient wurde zur Darstellung der inter- und intraindividuellen Variabilität eingesetzt.

Zur Signifikanzprüfung kamen der Shapiro-Wilk-, F- und Student's t-Test zum Einsatz. $P < 0,05$ wurde als Hinweis auf einen Unterschied gewertet (explorative Datenanalyse).

3 Ergebnisse

3.1 Vergleich des transepidermalen Wasserverlusts exzidierte Humanhaut und rekonstruierter Epidermis

Der TEWL zeigte grundlegende Unterschiede in der Barrierefunktion der getesteten Modelle. Während die exzidierte Humanhaut nach 30 min Werte unterhalb von $9 \text{ g} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$ aufwies, besaßen alle drei Epidermis-Modelle wesentlich höhere Wasserverluste (Abb. 1). So equilibrierten die Skinethic[®]- und EpiDerm[®]-Produkte bei Werten um ca. $15 \text{ g} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$, bei dem Episkin[®]-Modell lag nach 90 min sogar ein TEWL von $20 \text{ g} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$ vor.

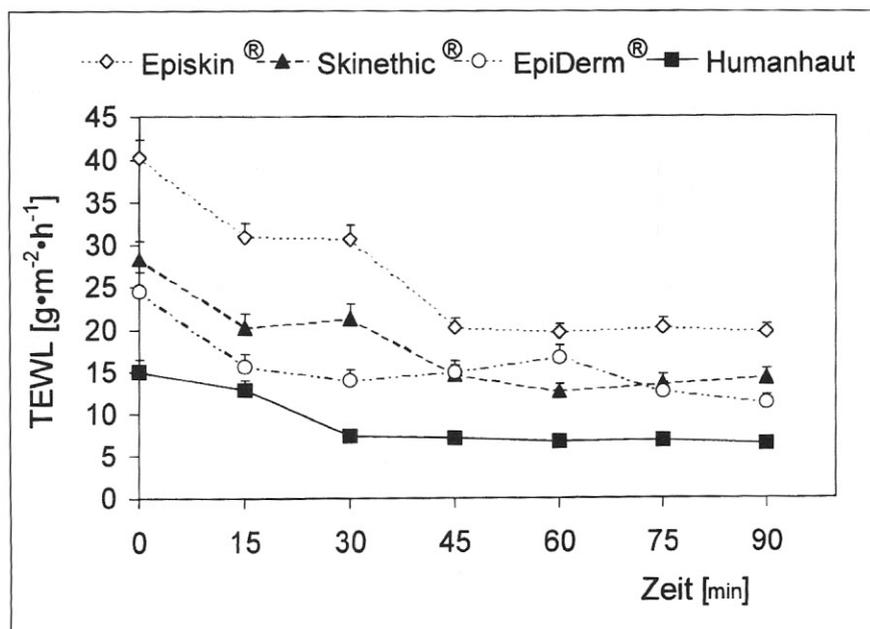


Abb. 1: Barrierefunktion humaner Hautäquivalente und exzidierte Humanhaut. Bestimmung anhand des Transepidermalen Wasserverlustes (TEWL, n = 6).

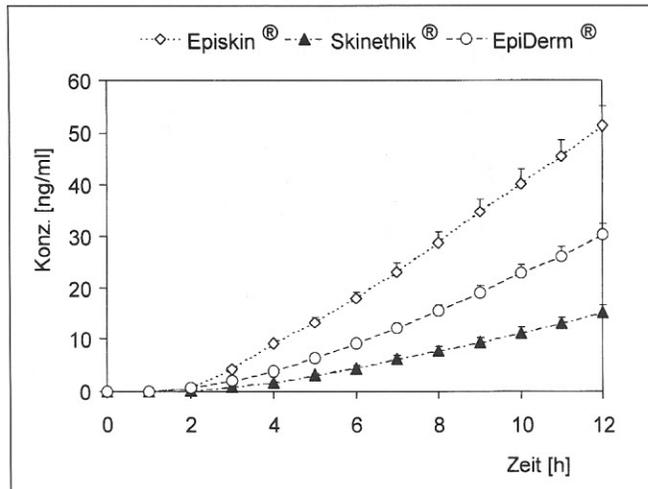


Abbildung 2: Penetration von Prednisolon durch humane Haut-äquivalente. Konzentrationen im Akzeptormedium (kumulative Darstellung, n = 6).

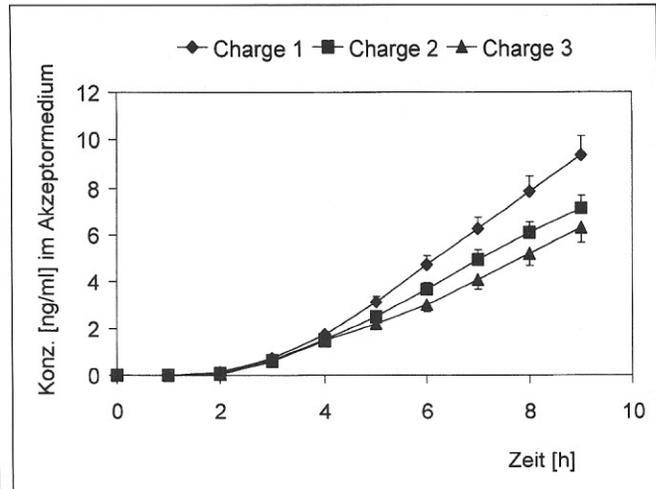


Abbildung 3: Variabilität der Barrierefunktion von Skinethik®. Vergleich der Prednisolon-Penetration (kumulative Darstellung) bei 3 unterschiedlichen Chargen (n = 6).

3.2 Prednisolon-Permeation durch exzidierte Humanhaut und rekonstruierte Epidermis

Die Bestimmung der Prednisolon-Permeation bestätigte die unterschiedliche Ausprägung der Barrierefunktion. Durch die Episkin®-Epidermis gelangten während der 12stündigen Penetrationsstudie ca. 500 ng/ml ins Akzeptormedium (Abb. 2). Die permeierte Menge lag beim EpiDerm®-Modell ca. 40% niedriger, nämlich bei 300 ng/ml, und das Skinethik®-Äquivalent zeigte sogar nur 150 ng/ml. Wie nach den TEWL-Messungen bereits zu vermuten, lag die PD-Permeation durch die exzidierte Haut am niedrigsten, sie befand sich stets unterhalb der Erfassungsgrenze.

3.3 Bestimmung der intra- und interindividuellen Variabilität

Um die Stabilität und Reproduzierbarkeit der mit den Modellen erzielten Ergebnisse zu untersuchen, wurden die Variabilitäten innerhalb einer bzw. zwischen mehreren Chargen des Skinethik®-Äquivalents und von Humanhaut wiederum mittels TEWL-Test und PD-Permeation bestimmt. Die intraindividuelle Variabilität der rekonstruierten Epidermis lag in der TEWL-Bestimmung bei 6%. Die Streuung der Resultate der PD-Permeation stand mit 7% in sehr guter Übereinstimmung mit den Ergebnissen der TEWL-Messung. Da die PD-Konzentration im Akzeptormedium bei den Experimenten an Humanhaut unterhalb der Nachweisgrenze lag (vgl. 3.2), konnte hier nur die Varianz über die TEWL-Bestimmung fest-

gestellt werden. Humane Haut zeigte ebenfalls eine Streuung von 7%, sofern Hautproben desselben Spenders eingesetzt wurden.

In der interindividuellen Variabilität unterscheiden sich das dreidimensionale Hautmodell und die exzidierte Humanhaut jedoch grundlegend. Wie Abbildung 3 zeigt, ist die Barriere der rekonstruierten Epidermis auch bei verschiedenen Chargen sehr stabil, sie weist nämlich im Permeationstest nur 14%, in der TEWL-Messung lediglich 12% Variabilität auf. Die exzidierte Humanhaut zeigt dagegen deutlich größere interindividuelle Schwankungen, der Variationskoeffizient übersteigt 19%. Verwendet man für die Studien ausschließlich abdominales Gewebe, liegt der Variationskoeffizient noch immer bei 16-17% und damit höher als bei der rekonstruierten Epidermis.

4 Diskussion

Untersuchungen zur Aufnahme von Fremdstoffen durch die Haut besitzen hohe Relevanz bei Kosmetika, bei Schadstoffen in der Umwelt und am Arbeitsplatz sowie bei Arzneimitteln. Vielfältige unerwünschte, bei Arzneistoffen auch erwünschte Effekte können mit der Resorption von der Hautoberfläche verbunden sein. Bei topischen Dermatika kommt zudem der Konzentration in der Haut hohe Bedeutung zu, stellt doch das Resorptionsorgan zugleich den Wirkort dar. Bei den Untersuchungen zur Eignung der rekonstruierten Epidermis für die Prüfung der

Penetration in bzw. der Permeation durch Humanhaut sollten daher zunächst häufig eingesetzte Dermatika als Modellsubstanzen herangezogen werden. Aufgrund ihrer antiphlogistischen und immunsuppressiven Eigenschaften kommt unter diesen den topischen Glucocorticoiden die größte klinische Bedeutung zu. Für unsere Untersuchungen wurde Prednisolon als Testsubstanz ausgewählt, da dieses Steroid — anders als die Glucocorticoidester (Gysler et al., 1997; Gysler et al., 1999) — als biotransformationsstabil einzuschätzen ist und zudem eine höhere Polarität/geringere Lipophilie und damit eine niedrigere Aufnahme über die Haut aufweist (Siddiqui et al., 1989). Untersuchungen mit dem Prednisolon-Doppelester Prednicarbat, aber auch mit dem Monoester Betamethason-valerat an einem Hautäquivalent (Skinethik™) haben bereits eine um das 1,7fach höhere Aufnahme in rekonstruierte Epidermis verglichen mit exzidierte Humanhaut gezeigt, die Metabolisierung erwies sich dagegen als sehr ähnlich (Gysler et al., 1999).

Wie der Vergleich der Hautäquivalente im TEWL- (Abb. 1) und im Penetrationstest (Abb. 2) gezeigt hat, unterscheiden sich die kommerziell verfügbaren rekonstruierten Epidermismodelle sehr stark hinsichtlich ihrer Barriereigenschaften. Das Modell des Skinethik®-Herstellers zeigt mit der niedrigsten Permeationsrate die beste Barrierefunktion. Trotzdem erreicht sie damit noch nicht die Eigenschaften menschlicher Haut, was einerseits an der reduzierten Schichtdicke des *stratum*

corneum (nur ca. 1/10 derjenigen humaner Haut), andererseits auch am fehlenden Korium liegen könnte. Die beiden anderen Modelle liegen in ihrem Resorptionsverhalten gegenüber Prednisolon ungünstiger, obwohl das Epiderm®-Modell einen sehr niedrigen transepidermalen Wasserverlust und damit eine – in diesem Testsystem – nicht erkennbar schlechtere Barrierefunktion aufwies. Um eine valide Aussage zur Einsetzbarkeit und Stabilität der Epidermisäquivalente zu machen, müssen vergleichende Untersuchungen nunmehr mit einer Vielzahl hydrophiler und lipophiler Substanzen erfolgen. Es steht jedoch bereits jetzt fest, daß Kunsthaut durchlässiger als humane Haut ist (Abb. 1 und 2). Dies konnte nicht nur in dieser Studie gezeigt werden, sondern bereits in einer früheren, bei der andere lipophilere Glucocorticoid-Topika verglichen wurden (Gysler et al., 1999). Bezieht man bei solchen Untersuchungen exzidierte Humanhaut als Referenz ein, sollte es in Zukunft möglich sein, die ermittelten Daten zuverlässig auf die humane Situation zu übertragen. Angesichts der Vielzahl von Penetrationsstudien mit Schweinehaut sollte idealerweise diese als weitere Referenz herangezogen werden.

Eine weitere in der nahen Zukunft zu lösende Aufgabe ist eine Standardisierung der angewandten Untersuchungsmethoden perkutaner Resorption. In erster Linie bezieht sich diese Forderung auf die Zusammensetzung des Akzeptormediums und – falls Durchflußzellen verwendet werden – die Durchflußrate.

Bereits mit den gegenwärtig verfügbaren Hautmodellen ist eine Aussage über die prinzipielle Aufnahme eines Fremdstoffes in den menschlichen Organismus möglich. Nicht im Akzeptormedium nachweisbare Substanzen sollten kein relevantes Gefährdungspotential für den Menschen besitzen. Erheblich schwieriger gestaltet sich die Bewertung jedoch bei penetralen Stoffen. Diese können nämlich nicht nur selbst den Menschen schädigen, vielmehr kann auch von ihren Metaboliten eine Gefahr ausgehen. Eine Biotransformation kann nicht nur – wie allgemein bekannt – in der Leber erfolgen, sondern vielmehr auch in Keratinozyten und Fibroblasten (Gysler et al., 1997; Gysler et al., 1999). Daher sollte die Weiterentwicklung künstlicher Hautäquivalente durch Zufügen eines Koriumäquivalents voran-

getrieben werden. Bislang dienen als Unterlage für die Keratinozyten diverse Filtermaterialien (Rosdy and Clauss, 1990), isoliertes humanes Korium („*deepidermised dermis*“) (Ponec, 1992) bzw. eine durch Fibroblasten besiedelte Kollagenbasis (Gysler et al., 1999). Allerdings scheint den beiden zuletzt genannten Hautäquivalenten die durch Fibroblasten – respektive freigesetzte Mediatoren – vermittelte Regulierung bzw. Stimulierung des Keratinozyten-Zellzyklus zu fehlen; insbesondere Prostaglandin E₂ ist an der Proliferation und Differenzierung der Keratinozyten beteiligt (Sato et al., 1997). Auch die Bildung bestimmter Strukturproteine der „*cornified envelopes*“ sollte sich verbessern (Robert et al., 1994). Da die Metabolisierung topisch applizierter Substanzen nur bei Vorhandensein beider Gewebe – Epidermis und Korium – korrekt wiedergegeben wird, erfolgen derzeit Versuche zur Optimierung des rekonstruierten Koriums (Dr. M. Rosdy, persönliche Kommunikation). Im Akzeptormedium nachweisbare Stoffe bei Epidermismodellen sollten daher im folgenden an einem solchen Vollhautmodell weiter untersucht werden.

Eine noch weitergehende Herausforderung, besonders zur Testung antiinflammatorisch wirkender Arzneistoffe, stellt die Realisierung eines künstlichen Entzündungsmodells dar. Denkbar erscheint eine Rekonstruktion aus isolierten Zellen von atopischer Haut oder von Psoriasis-Läsionen (Ruissen, van et al., 1996), doch ist fraglich, ob defekte Zellen in der Lage sind, ein entsprechendes Gewebe aufzubauen, bzw. ob nach Isolierung der Zellen tatsächlich eine entzündete Haut entsteht.

Einfacher realisierbar erscheint die extern induzierte Entzündung, z.B. durch Bestrahlung einer rekonstruierten Haut mit ultraviolettem Licht (Viac et al., 1997; Strickland et al., 1997) oder Stimulation mit TNF α bzw. Interleukinen (Adams and Watts, 1993; Fujisawa et al., 1997). Besonders interessant wäre in diesem Zusammenhang eine Anreicherung des Nährmediums mit Leukozyten (Springer and Anderson, 1986), deren chemotaktische Faktoren eine aufsteigende Besiedlung induzieren könnten (Wankowicz et al., 1988). Experimente zur Granulozyten-Migration durch Fibroblasten-Monolayer sind bereits erfolgreich durchgeführt worden (Gao and Issekutz, 1995; Gao and Issekutz, 1996).

Es wird interessant sein, die Entwicklung auf dem Gebiet des rekonstruierten Gewebes zu verfolgen, die Erfolge der Vergangenheit lassen weitere erhebliche Fortschritte in der nahen Zukunft erwarten.

Literatur

- Adams, J. and Watts, F. (1993). Regulation and development and differentiation by the extracellular matrix. *Development* 117, 1183-1198.
- Barry, B. W. (1983). Skin transport. In B. W. Barry (Hrsg.), *Dermatological Formulations* (95-117). New York: Marcel Dekker.
- Behrendt, H. and Korting, H. C. (1990). Experimental evidence for amide hydrolysis of indometacine in rabbit skin. *Skin Pharmacol.* 3, 41-44.
- Fujisawa, H., Wang, B., Kondo, S., Shivi, G. M. and Saunderson, D. N. (1997). Costimulation with ultraviolet B and interleukin-1 α dramatically increases tumor necrosis factor α production in human dermal fibroblasts. *J. Interferon Cytokine Res.* 17, 307-313.
- Gao, J. X. and Issekutz, A. C. (1995). Polymorphonuclear leukocyte migration through human dermal fibroblast monolayers is dependent on both β 2-integrin (CD 11/CD 18) and β 1-integrin (CD 29) mechanism. *Immunology* 85, 485-494.
- Gao, J. X. and Issekutz, A. C. (1996). Mac-1 (CD 11b/CD 18) is the predominant β 2- (CD 18) integrin mediating human neutrophil migration through synovial and dermal fibroblast barriers. *Immunology* 88, 463-470.
- Gruber, F. P. und Spielmann, H. (Hrsg.) (1996). *Alternativen zu Tierexperimenten*. Heidelberg, Berlin, Oxford: Spektrum Akademischer Verlag.
- Gysler, A., Kleuser, B., Sippl, W., Lange, K., Korting, H. C., Hölzje, H.-D. and Schäfer-Korting, M. (1999). Skin penetration and metabolism of topical glucocorticoids in reconstructed epidermis and excised human skin. *Pharm. Res.* (in press).
- Gysler, A., Lange, K., Korting, H. C. and Schäfer-Korting, M. (1997). Prednicarbate biotransformation in human foreskin keratinocytes and fibroblasts. *Pharm. Res.* 14, 793-797.
- Hueber, F., Schaefer, H. and Wepierre, J. (1994). Role of transepidermal and

- transfollicular routes in percutaneous absorption of steroids: in vitro studies on human skin. *Skin Pharmacol.* 7, 237-240.
- Kietzmann, M., Loscher, W., Arens, D., Maass, P. and Lubach, D. (1993). The isolated perfused bovine udder as an in vitro model of percutaneous drug absorption. Skin viability and percutaneous absorption of dexamthasone, benzoyl peroxide, and etofenamate. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods* 30, 75-84.
- Ponec, M. (1992). In vitro cultured skin cells as alternatives to animals for skin irritancy screening. *Int. J. Cosmet. Sci.* 14, 245-264.
- Regnier, M., Asselineau, D. and Lenoir, M. C. (1990). Human epidermis reconstructed on dermal substrates in vitro: an alternative to animals in skin pharmacology. *Skin Pharmacol.* 3, 70-85.
- Robert, M., Noël-Hudson, M.-S., Font, J., Aubery, M. and Wepierre, J. (1994). Influence of fibroblasts on epidermization by keratinocytes cultured on synthetic porous membrane (insert) at the air-liquid interface. *Cell. Biol. Toxicol.* 10, 361-365.
- Robertson, D. B. and Maibach, H. I. (1983). Topical corticosteroids. *Semin. Dermatol.* 2, 238-249.
- Rosdy, M. and Clauss, L.-C. (1990). Terminal epidermal differentiation of human keratinocytes grown in chemically defined medium on inert filter substrates at the air-liquid interface. *J. Invest. Dermatol.* 95, 409-414.
- Rosdy, M., Pisani, A. and Ortonne, J.-P. (1993). Production of basement membrane components by a reconstructed epidermis cultured in the absence of serum and dermal factors. *Br. J. Dermatol.* 129, 227-234.
- Ruissen, van, F., de Jongh, G. J., Zeeuwen, P. L., Van Erp, P. E., Madson, P. and Schalkwijk, J. (1996). Induction of normal and psoriatic phenotypes in submerged keratinocyte cultures. *J. Cell Physiol.* 168, 442-452.
- Sato, T., Kirimura, Y. and Mori, Y. (1997). The co-culture of dermal fibroblasts with human epidermal keratinocytes induces increased prostaglandin E₂ production and cyclooxygenase 2 activity in fibroblasts. *J. Invest. Dermatol.* 109, 334-339.
- Siddiqui, O., Roberts, M. S., Polack, A. E. (1989). Percutaneous absorption of steroids: relative contributions of epidermal penetration and dermal clearance. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods* 17, 405-424.
- Springer, T. A. and Anderson, D. C. (1986). The importance of the Mac-1, CFA-1 glycoprotein family in monocyte and granulocyte adherence, chemotaxis, and migration into inflammatory sites: insights from the experiments of nature. *Ciba Found. Symp.* 118, 102-126.
- Steven, A. C., Bisher, M. E., Roop, D R. and Steinert, P. M. (1990). Biosynthetic pathways of filaggrin and loridin — two major proteins expressed by terminally differentiated epidermal keratinocytes. *J. Struct. Biol.* 104, 150-162.
- Strickland, I., Rhodes, L. E., Flanagan, B. F. and Friedmann, P. S. (1997). TNF α and Il-8 are upregulated in the epidermis of normal skin after UVB exposure: correlation with neutrophil accumulation and E-selection expression. *J. Invest. Dermatol.* 108, 763-768.
- Viac, J., Goujou, C., Misery, L., Staniek, V., Faure, M., Schmitt, D. and Claudy, A. (1997). Effect of UVB 311 nm irradiation on normal human skin. *Photodermatol. Photoimmunol. Photomed.* 13, 103-108.
- Wankowicz, Z., Megyeri, P. and Issekutz, A. C. (1988). Synergy between tumor necrosis factor α and interleukin-1 in the induction of polymorphonuclear leukocyte migration during inflammation. *J. Leukoc. Biol.* 43, 349-356.

Danksagung

Die Untersuchungen wurden durch eine Sachmittelbeihilfe der ZEBET/BgVV finanziell gefördert.

Korrespondenzadresse

Prof. Dr. Monika Schäfer-Korting
Freie Universität Berlin
Institut für Pharmazie
Königin-Luise-Str. 2+4
D-14195 Berlin



Letzte Meldung:

ALTEX in ISI® Services aufgenommen

Rückwirkend zum Beginn des 15. Jahrgangs von ALTEX und vier Jahre nach dem Wechsel vom Eigenverlag zum Spektrum Akademischer Verlag in Heidelberg wird ALTEX vom *Institute for Scientific Information - ISI®* erfasst. Ab dem Heft 1/98 erfolgt die Indizierung der Inhalte in *Current Contents®/Clinical Medicine*, *ISI Alerting Services* und dem *Science Citation Index-Expanded (SciSearch®)*. ALTEX wird auch dem Literaturdienst *ISI Document Solution®* angehören. Wissenschaftler/innen können also künftig - gegen ein Entgelt - einzelne Artikel von ALTEX anfordern, wenn sie über *ISI®* auf ihn aufmerksam wurden.

Die Aufnahme in diese Literaturdienste ist zweifellos nach dem Wechsel zum Spektrum Akademischer Verlag der wichtigste Progress in der Existenz von ALTEX. Herausgeberin und Redaktion bedanken sich bei allen, die mitgeholfen haben, das Niveau der Zeitschrift über Jahre hinweg so aufzubauen, dass dieser Erfolg möglich wurde.

Gedankt sei auch den zahlreichen Gutachterinnen und Gutachtern, die für ALTEX tätig sind. Sie werden nie erwähnt, sind es aber letztlich, die für die Qualität der Artikel verantwortlich zeichnen. Immerhin wird ein Viertel der eingereichten Manuskripte abgelehnt. Bei über der Hälfte der Manuskripte müssen nach den Einwendungen der Gutachter/innen grössere inhaltliche und redaktionelle Überarbeitungen vorgenommen werden.

Dass sich ALTEX ohne Sponsoren nicht halten könnte, wird den Kennern der Branche klar sein, zu gering sind die Einnahmen durch Inserate. Deshalb muss an dieser Stelle den Organisationen, die uns das Durchhalten ermöglichen, ein besonderes Dankeschön gesagt werden. Es sind dies der Zürcher Tierschutz, der Tierschutz Bund Zürich, die Stiftung „set“ in Mainz und der Deutsche Tierschutzbund (DTB, Bonn).

fpg/hg/hsp