

**In vitro- / ex vivo-Hautmodelle zur Erfassung
der Reaktion auf externe Reize sowie
der Wirkung einer antiinflammatorischen Behandlung**

Inauguraldissertation

zur
Erlangung der Würde eines Doktors der Philosophie

vorgelegt der
Philosophisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität Basel

von

Esther Zimmermann

aus Buochs, Nidwalden

Grenchen, 2008

Genehmigt von der Philosophisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

auf Antrag von

Prof. Dr. Georgios Imanidis (Referent)

Prof. Dr. Christian Surber (Korreferent)

PD Dr. Thomas Scholzen (externer Experte)

Basel, den 11.12.2007

Prof. Dr. Hans-Peter Hauri
Dekan

Für meine Eltern

Für Markus

DANKSAGUNG

Die vorliegende Arbeit wurde unter der Leitung von Prof. Dr. Georgios Imanidis, Institut für pharmazeutische Technologie, Universität Basel in der Firma Spirig Pharma AG in Egerkingen durchgeführt.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Georgios Imanidis für die Leitung meiner Dissertation. Danke für die ständige Diskussionsbereitschaft, die viele investierte Zeit und den Glauben daran, dass ich das Ding zu einem guten Ende bringen kann! Georg, du warst für mich eine unverzichtbare Stütze!

Herrn Prof. Dr. Christian Surber möchte ich für die spontane Zusage zum Korreferat, für das speditive Korrekturlesen und ganz speziell für die Sicherung meines Arbeitsplatzes bei der Firma Spirig bis zur Fertigstellung meiner Arbeit danken.

Herzlichen Dank an PD Dr. Thomas Scholzen, der sich mit viel Ausdauer meinem Theorieteil angenommen und abschliessend (trotzdem) eine wohlwollende Position eingenommen hat.

Bedanken möchte ich mich auch bei Herrn Dr. Markus Bättig, der sein berühmtes Adlerauge über meine Arbeit schweifen liess und mich dadurch vor Rechtschreibfehlern und anderen Peinlichkeit bewahrt hat. Danke auch für Verständnis und Unterstützung. Nur so war es möglich, mir neben der Magistralrezeptur die für die Dissertation nötige Zeit frei zu halten.

Der Geschäftsleitung der Firma Spirig Pharma AG möchte ich ganz herzlich für die Doktorandenstelle danken. Die Nutzung der modernen und bestens gewarteten Infrastruktur sowie die Gewährung der finanziellen Mittel war die Basis zur Erarbeitung meiner Dissertation.

Ein dickes Merci an das Biopharmazie-Team für die Einführung in die Welt der Biopharmazie und für die Geduld und Nachsicht mit einer Anfängerin. Insbesondere danke ich Frau Ursula Reinhart für die Erstellung der histologischen Bilder.

Dem Magrep-Team Melanie Eggenschwiler, Karin Hilfiker, Karin Aeschlimann und Pia Sikken danke ich für das viele Verständnis und für die grosse Selbstständigkeit. Nur so konnte ich mir den nötigen Freiraum schaffen.

Besten Dank auch an Herrn Benno Häfeli für die rasche und unkomplizierte Übernahme der Magrep-Pflichten.

Lieben Dank an Frau Dr. Regula Johner für die freundschaftliche und rücksichtsvolle Bürogemeinschaft. Vor allem in der Endphase war ein stiller Ort unabdingbar!

...und selbstverständlich nicht vergessen möchte ich alle Spirig-Kolleginnen und Spirig-Kollegen, ohne deren Hilfsbereitschaft und Freundlichkeit die Durchführung der Arbeit wohl kaum möglich gewesen wäre. Ein spezielles Dankeschön gebührt dabei Herrn Robert Baumgartner für den gerätetechnischen Support sowie Frau Dr. Francine Prost für die extra Bettlektüre.

Danke Markus. Deine tatkräftige Unterstützung zur HPLC-Analytik sowie der computertechnische Support, der mein Leben wesentlich vereinfacht hat, waren für mich eine wichtige Hilfe. Besonders danken möchte ich dir auch für das Korrekturlesen zu früher Morgenstunde und für die Generalprobe der Prüfung ;-)

Dein Interesse an meiner Arbeit und das Verständnis für Überstunden und sonstige Unannehmlichkeiten haben viel Wertschätzung gezeigt und mir Motivation und Energie zum Durchhalten geschenkt. In den heiklen Momenten warst du immer für mich da und hast es verstanden, mich mit kleinen Gesten wieder aufzubauen. Jetzt freue ich mich auf unsere gemeinsamen Ferien! Wollen wir die Bären mitnehmen?

ZUSAMMENFASSUNG

Hautkrankheiten sind weit verbreitet. Neben körperlichen Beschwerden wie Schmerzen und Juckreiz verursachen Dermatosen oft auch psychosoziale Probleme, wodurch die Lebensqualität der betroffenen Patienten stark beeinträchtigt wird. Zudem lassen sich viele Hautkrankheiten nach wie vor nur mit mässigem Erfolg und ausschliesslich symptomatisch behandeln. Die Erforschung der Pathophysiologie und Therapie von Dermatosen ist somit ein grosses Bedürfnis.

Ein wichtiges Hilfsmittel hierfür sind in vitro- / ex vivo-Hautmodelle. Sie ermöglichen die Bearbeitung von dermatologischen Fragestellungen unter klar definierten Bedingungen und unabhängig von Probanden. Die Durchführung von Penetrationsexperimenten mit Arzneistoffen sowie potentiell toxischen Chemikalien anhand von in vitro- / ex vivo-Hautmodellen ist heutzutage weit verbreitet. Auch für die Erfassung des irritativen und phototoxischen Effekts sowie des Allergiepentials von Substanzen und Präparaten sind sie mittlerweile etabliert. Bis anhin existieren jedoch kaum Untersuchungen, die diese beiden Anwendungen von in vitro- bzw. ex vivo-Hautmodellen parallel nutzen.

In vitro- / ex vivo-Hautmodelle bergen das Potential, neben galenischen Aspekten auch die Wirksamkeit von dermatologischen Präparaten zu erfassen. Ein entsprechend ausgearbeitetes Prüfprotokoll stellt als Screeninginstrument für die Forschung und Entwicklung von Dermatika einen grossen Gewinn dar.

Mit Blick auf dieses längerfristige Ziel wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit die Möglichkeiten und Grenzen der drei aktuell am Markt erhältlichen in vitro- bzw. ex vivo-Hautmodelle SkinEthic®, Phenion FT® und Natskin® untersucht. SkinEthic® ist ein ausschliesslich aus Keratinocyten bestehendes in vitro rekonstruiertes Epidermis-Modell. Das ebenfalls in vitro rekonstruierte Phenion® FT-Modell beinhaltet zusätzlich zur Epidermis eine Dermis (Kollagenmatrix mit Fibroblasten). Natskin® ist gebrauchsfertig präparierte ex vivo-Humanhaut.

Alle drei Hautmodelle wurden einer externen Reizung durch chemische Irritantien oder UV-Strahlung ausgesetzt. Im Anschluss daran erfolgte die Applikation von Betamethason-17-Valerat in verschiedenen Konzentrationen. Betamethason-17-Valerat ist ein stark wirksames, gut dokumentiertes und für die dermatologische Anwendung entwickeltes Glucocorticoid. Aufgrund seines antiinflammatorischen Wirkprofils wurde eine Reduktion des vorgängig induzierten Irritationszustandes im Hautmodell erwartet.

Um die Reaktion auf externe Reize und die Wirkung einer antiinflammatorischen Behandlung zu erfassen, wurden für die kutane Entzündungsreaktion relevante Zytokine (Interleukin-1 α , Interleukin-6, Tumor necrosis factor- α), Chemokine (Interleukin-8) und andere Proteine (Interleukin-1 Rezeptor Typ II, Interleukin-1 Rezeptor Antagonist, Lipocortin-1) quantifiziert. Diese Mediatoren wurden sowohl auf Proteinebene mittels enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) (Hautlysat und Sekretion) als auch auf Transkriptionsebene (mRNA) mittels real time-polymerase chain reaction (RT-PCR) analysiert. Ergänzend wurde die Hautviabilität anhand von enzymatischen und histologischen Methoden beurteilt.

Parallel zu den Auswirkungen auf die Haut wurde das Penetrations- / Permeationsverhalten von Betamethason-17-Valerat durch die drei Hautmodelle aus zwei Vehikeln (ethanolisch-wässrige Lösung und Öl-in-Wasser-Emulsion) verglichen.

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass die Hautmodelle SkinEthic®, Phenion® FT und Natskin® zur Erfassung von induzierten Irritationszuständen geeignet sind, wobei die Art und das Ausmass der Reaktion je nach Modell verschieden waren. Besonders deutlich unterschied sich das Expressionsverhalten des SkinEthic®-Modells vom Phenion® FT-Modell nach Bestrahlung im UVA / UVB-Bereich (290-400 nm, 20-250 mJ/cm²). Während die Interleukin-

1a-Sekretion im SkinEthic®-Modell unter UV-Einfluss dosisabhängig anstieg, indizierte dieser Parameter im Phenion® FT-Modell keine Reaktion. Im Phenion® FT-Modell konnte der Reizzustand besser anhand von Interleukin-8 erfasst werden. Abhängig von der UV-Dosis wurde sowohl im Hautgewebe als auch nach Sekretion eine gesteigerte Interleukin-8-Menge detektiert. Indes erwies sich Interleukin-8 im SkinEthic®-Modell nicht als zuverlässiger Indikator. Gleichzeitig zeigte sich, dass die UV-Strahlung die Viabilität der Modelle unterschiedlich beeinflusste. Dabei war die UV-induzierte Schädigung im SkinEthic®-Modell, in Form eines erhöhten Membrandefektes (LDH-Test) und einer reduzierten Anzahl an metabolisch aktiven Zellen (MTT-Test), am deutlichsten erkennbar. Im Vergleich dazu erwiesen sich das Phenion® FT- und das Natskin®-Modell als robuster. Diese unterschiedlichen Reaktionen sind wahrscheinlich auf den jeweils anders gearteten Modellaufbau zurückzuführen. Eine wichtige Rolle schienen dabei die Präsenz der Dermis und damit Effekte, welche auf der Keratinocyten-Fibroblasten-Interaktion beruhen, zu spielen.

Anhand der gesteigerten Interleukin-1a-Sekretion konnte im SkinEthic®-Modell auch der irritative Effekt von Natrium Dodecyl Sulfat (0.1 - 0.4 %) sowie von Betamethason-17-Valerat in einer topisch üblichen Dosierung (2×10^{-3} M) nachgewiesen werden. Die vorliegende Arbeit demonstriert somit zum ersten Mal die proirritative Wirkung eines Glucocorticoids im in vitro rekonstruierten Hautmodell.

Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass das Penetrations- / Permeationsverhalten von Betamethason-17-Valerat sowohl vom Hautmodell als auch vom Vehikel abhängt. Betamethason-17-Valerat permeierte durch die beiden in vitro rekonstruierten Hautmodelle SkinEthic® und Phenion® FT deutlich leichter als durch die ex vivo Natskin®-Haut. Die Untersuchungen zum Vehikeleinfluss ergaben, dass die Hautpenetration / -permeation nicht durch die total im Vehikel eingearbeitete Wirkstoffmenge, sondern durch die Konzentration in der direkt hautberührenden Phase bestimmt wurde.

Nach Irritation durch UV-Bestrahlung konnte im SkinEthic®-Modell nach Applikation von Betamethason-17-Valerat in den Dosierungen 2×10^{-5} M und 2×10^{-6} M zu Interleukin-1a eine tendenzielle Reduktion der Sekretion und der mRNA-Induktion, was auf eine antiinflammatorische Wirkung hindeutet, nachgewiesen werden. Die Modelle Phenion® FT und Natskin® zeigten hingegen keinen analogen Effekt. Dies steht in Kontrast zur eindeutig belegten Präsenz des Wirkstoffs am Wirkort sowie dazu, dass der pharmakologische Zusammenhang zwischen der UV-induzierten Hautirritation mit den ausgewählten Indikatorproteinen einerseits und dem Wirkmechanismus der Glucocorticoide andererseits in der Literatur beschrieben ist.

Keines der Modelle repräsentiert die in vivo-Situation vollständig. Für den Nachweis eines pharmakologischen Effektes ist aber vermutlich das Zusammenspiel von allen in vivo vorhandenen Komponenten erforderlich. Zudem dürfte der optimale Bereich für einen entsprechenden Nachweis eng sein. Auf der einen Seite ist die Reizdosis so festzulegen, dass der ausgelöste Effekt auf zellbiologischer Ebene maximal detektierbar ist, gleichzeitig aber keine irreversible Zellschädigung hervorgerufen wird. Auf der anderen Seite müssen Wirkstoff, Dosierung, Vehikel und Zeitpunkt der Behandlung exakt angepasst sein. Die ausgeprägte Intra- und Interbatchvariation, welche bei den Hautmodellen festgestellt wurde, erschwerte die Festlegung eines optimalen Bereichs zusätzlich.

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass die überprüften in vitro- / ex vivo-Hautmodelle prinzipiell zur Erfassung des irritativen Effektes von externen Reizen, insbesondere von UV-Strahlung geeignet sind. Die pharmakologische Ansprechbarkeit auf eine anschließende antiinflammatorische Behandlung muss jedoch Gegenstand von zukünftigen Arbeiten sein.

SUMMARY

Dermatoses are wide-spread. Beside physical discomforts like pain and itches, often psychosocial problems are caused and the quality of life of patients is strongly affected. In addition, the treatment of dermatoses is still unsatisfying in many cases, as only symptoms are considered and results are moderate. Researches in pathophysiology and therapeutics are therefore of great need.

An important tool thereby are *in vitro* / *ex vivo* skin models. They allow to carry out experiments under definite conditions and regardless of human subjects. Penetration experiments with active ingredients and potentially toxic chemicals by means of *in vitro* / *ex vivo* skin models are common nowadays. Also for measuring the irritant and phototoxic effect as well as the allergic potential of substances and preparations such models are established in the mean time. But by now, only few investigations make use of both applications in parallel.

In vitro / *ex vivo* skin models potentially allow an integrated examination, whereas not only galenical aspects but also attributes of the active substance of a pharmaceutical are considered. The elaboration of a corresponding test procedure as a screening instrument for research and development of dermatics will be of great value.

With regard to these purposes, the present study investigates the possibilities and limits of three currently available *in vitro* / *ex vivo* skin models: SkinEthic®, Phenion FT® and Natskin®. SkinEthic® and Phenion® FT are both *in vitro* reconstructed models of human skin cells. Whereas SkinEthic® is an epidermis model, consisting exclusively of keratinocytes, Phenion® FT contains epidermis and dermis (fibroblasts in collagen matrix). Natskin® is a ready to use model consisting of excised human skin.

All three models were exposed to external stimuli, namely chemical irritants or UV irradiation. Subsequently, betamethasone 17-valerate, a potent and widely documented glucocorticoid, particularly designed for dermatological administration, was applied in different dosages. Due to its anti-inflammatory efficacy, a reduction of the previously provoked skin irritation was expected.

For measuring the reaction on the external stimuli as well as the effect of the anti-inflammatory treatment, cytokines (interleukin-1a, interleukin-6, tumour necrosis factor-a), chemokins (interleukin-8), and other proteins (interleukin-1 soluble receptor type II, interleukin-1 receptor antagonist, lipocortin-1), which are involved in the cutaneous inflammatory response, were quantified. These mediators were analysed, on the one hand on protein level by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) (in homogenised tissue and secretion), and on the other hand on transcriptional level (mRNA) by real time-polymerase chain reaction (RT-PCR). Additionally, skin viability was assessed by means of different enzymatic and histological methods.

In parallel to its impact on the skin, the penetration / permeation of betamethasone 17-valerate through all three models and after administration in two vehicles (ethanol-phosphate buffer and oil-in-water emulsion) was compared.

The present study provides evidence that SkinEthic®, Phenion® FT, and Natskin® are appropriate skin models for quantifying effects in response to UV irradiation (290-400 nm, 20-250 mJ/cm²). However, the mode and extent of these effects vary from model to model. Particularly, the expression profile of the SkinEthic® model differs from that of the Phenion® FT model. While in the SkinEthic® model the interleukin-1a secretion increases depending on the applied UV dose, it is not affected in the Phenion® FT model. For the Phenion FT® model, however, interleukin-8 turned out to be a suitable indicator of irritation.

Depending on the UV dose, both in the tissue and in the culture medium an enhanced interleukin-8 concentration could be detected. Nevertheless, in the SkinEthic® model interleukin-8 was not a reliable indicator of cellular and pathophysiological processes at all. Additionally, the viability was influenced differently by UV irradiation in the three tested skin models. The SkinEthic® model proved to be most susceptible to UV induced tissue damage (plasma membrane damage [LDH-test] and number of metabolic active cells [MTT-test]). The Phenion® FT and the Natskin® model showed better robustness. Most likely, these different reactions are due to the varying composition of the particular skin models. The presence of a dermis (fibroblasts and connective tissue) and thus, effects due to the interaction of keratinocytes and fibroblasts seemed to play an important role.

Furthermore, the irritant effect of sodium dodecyl sulphate (0.1 to 0.4%) as well as of betamethasone 17-valerate in a usual dosage for topical therapy (2×10^{-3} M) could be detected by means of an increased interleukin-1a secretion in the SkinEthic® model. Hence, the present study shows for the first time the irritant effect of a glucocorticoid in an in vitro reconstructed skin model.

Moreover, it could be shown, that the penetration / permeation of betamethasone 17-valerate depended on one side on the attributes of the skin model and on the other side on the characteristics of the vehicle. Betamethasone 17-valerate permeated markedly easier through the in vitro reconstructed skin models SkinEthic® and Phenion FT® than through the ex vivo excised Natskin® model. Regarding the vehicle, penetration / permeation of betamethasone 17-valerate was not influenced by the totally incorporated quantity of the active but by its concentration in the vehicle phase directly adjacent to skin.

Reduced interleukin-1a secretion and mRNA induction were perceptible in the UV exposed SkinEthic® model after administration of betamethasone 17-valerate dosed 2×10^{-5} M and 2×10^{-6} M, which, by tendency, indicated an anti-inflammatory effect. However, the Phenion® FT and the Natskin® model showed no analogous reaction. This is in contrast to the demonstrated presence of the active substance at the target location and to the fact, that the pharmacological relation between the UV induced skin irritation and the chosen indicating proteins on the one hand and the mechanism of action of glucocorticoids on the other hand are described in the literature.

Possibly, this could be related to the incomplete composition of the skin models and therefore insufficient representation of the in vivo situation, whereas, for a pharmacological response, the cooperation of all naturally present skin components would be necessary. In addition, the optimal experimental range to prove a corresponding impact is presumably narrow. On one side, the intensity of the stimulus must be strong enough to provoke a distinct effect, but no irreversible cell damage should be caused. On the other side, active substance, dosage, vehicle, and point of treatment must be adjusted at best. In addition, the strong intra- and interbatch variation, which is characteristic for the examined skin models, rendered the definition of the optimal experimental range even more difficult.

The present study gives a proof of concept for the use of in vitro / ex vivo skin models to measure the irritant effects induced by external stimuli, particularly of UV irradiation. But the pharmacological response to a subsequent anti-inflammatory treatment may be the subject of further investigations.

INHALTSVERZEICHNIS

A	EINLEITUNG.....	1
B	ZIELSETZUNG.....	5
C	THEORETISCHER TEIL.....	7
C.1	Haut.....	7
C.1.1	Funktion und Aufbau der Haut.....	7
C.1.2	Hautmodelle.....	8
C.1.2.1	in vivo-Modelle.....	8
C.1.2.2	in vitro-Modelle.....	8
C.1.3	Entzündungsreaktionen in der Haut.....	18
C.1.3.1	Mechanismus der Hautentzündung.....	18
C.1.3.2	Ursachen von Hautentzündungen.....	23
C.1.3.3	Untersuchung der Hautentzündung anhand von in vitro-Modellen.....	27
C.1.4	Hautpenetration / Hautpermeation.....	29
C.1.4.1	Wege in und durch die Haut.....	29
C.1.4.2	Techniken zur Beeinflussung der Penetration / Permeation.....	32
C.1.4.3	Experimentelle Untersuchung der Penetration / Permeation.....	34
C.2	Dermatologische Grundlagen.....	35
C.3	Glucocorticoide.....	37
C.3.1	Anwendung und Eigenschaften.....	37
C.3.2	Struktur-Wirkungsbeziehung.....	38
C.3.3	Wirkmechanismus.....	39
C.3.3.1	Genomischer Wirkmechanismus vermittelt via zytosolische Glucocorticoid-Rezeptoren (I).....	41
C.3.3.2	Spezifisch nicht-genomischer Wirkmechanismus vermittelt via zytosolische Glucocorticoid-Rezeptoren (II).....	42
C.3.3.3	Spezifisch nicht-genomischer Wirkmechanismus vermittelt via membranständige Glucocorticoid-Rezeptoren (III).....	42
C.3.3.4	Unspezifisch nicht-genomischer Wirkmechanismen vermittelt via Interaktionen mit der Zellmembran (IV).....	43
C.3.4	Glucocorticoid-Wirkung auf die Haut anhand von in vitro-Modellen.....	43
C.3.5	Hautpenetration / Hautpermeation.....	44
C.3.6	Betamethasonvalerat.....	44
D	EXPERIMENTELLER TEIL.....	47
D.1	In vitro- / ex vivo-Hautmodelle.....	47
D.1.1	SkinEthic-Modell.....	48
D.1.2	Phenion FT-Modell.....	49
D.1.3	Natskin-Modell.....	50
D.2	Externer Reiz.....	51
D.2.1	Auslösung einer Hautentzündung durch UV-Bestrahlung (physikalischer Reiz).....	51
D.2.1.1	Leistung, Spektrum und Dosis.....	51
D.2.1.2	Ablauf und Versuchsbedingungen.....	53

D.2.2	Auslösung einer Hautentzündung durch chemische Irritantien (chemischer Reiz).....	55
D.2.2.1	Irritation durch Natrium Dodecyl Sulfat	55
D.2.2.2	Irritation durch Tributylzinn Hydrat.....	56
D.3	Antiinflammatorische Behandlung.....	57
D.3.1	Herstellung und Charakterisierung der Modellformulierungen.....	57
D.3.1.1	Wirkstoff BV-17	57
D.3.1.2	Formulierungen	58
D.3.2	Wahl der Dosierung zu BV-17 für den Vehikelvergleich.....	62
D.3.3	Applikation der Modellformulierungen.....	62
D.3.4	Inkubationszeit mit Modellformulierung.....	63
D.4	Erfassung der Hautirritation und der Wirkung der antiinflammatorischen Behandlung 64	
D.4.1	Indikatorproteine	64
D.4.1.1	ELISA	64
D.4.1.2	PCR.....	66
D.4.2	Zellviabilität	68
D.4.2.1	LDH-Test	68
D.4.2.2	MTT-Test.....	69
D.4.2.3	Histologie.....	69
D.5	Penetration / Permeation von BV-17	71
D.5.1	Quantitative Analyse von BV-17.....	71
D.5.1.1	Probenaufbereitung	71
D.5.1.2	Analysenmethode.....	73
D.6	Erarbeitetes Versuchsdesign	74
E	RESULTATE UND DISKUSSION.....	75
E.1	Erarbeitung eines Versuchsdesigns zur Erfassung der Reaktion auf externe Reize und der Wirkung von BV-17 anhand des SkinEthic-Modells.....	75
E.1.1	Charakterisierung des SkinEthic-Modells.....	75
E.1.1.1	Grundzustand des SkinEthic-Modells während der Kultivierung	75
E.1.1.2	Intra- und Interbatch-Variation im SkinEthic-Modell	81
E.1.2	Festlegung von Indikatorproteinen	83
E.1.2.1	Indikatorproteine für die Glucocorticoidwirkung ohne vorgängige Hautirritation	83
E.1.2.2	Indikatorproteine für die Glucocorticoidwirkung nach vorgängiger Hautirritation.....	87
E.1.3	Festlegung der Analysenmethode für die Indikatorproteine	94
E.1.4	Festlegung des externen Reizes	95
E.1.4.1	Hautirritation durch UV-Bestrahlung (physikalischer Reiz)	95
E.1.4.2	Hautirritation durch chemische Substanzen (chemischer Reiz).....	98
E.1.5	Festlegung der Methode zur Erfassung der Hautpenetration / -permeation von BV-17....	103
E.1.6	Festlegung der antiinflammatorischen Behandlungsmethode mit BV-17	104
E.2	Erfassung der Reaktion auf externe Reize und der Wirkung einer antiinflammatorischen Behandlung mit BV-17 anhand des erarbeiteten Versuchsdesigns in drei verschiedenen in vitro- / ex vivo-Hautmodellen.....	105
E.2.1	Reaktion auf einen externen Reiz von drei in vitro- / ex vivo-Hautmodellen	105
E.2.1.1	IL-1a-Sekretion und Menge im Gewebe	105
E.2.1.2	IL-8-Sekretion und Menge im Gewebe	109
E.2.1.3	IL-6-Sekretion und Menge im Gewebe	112
E.2.1.4	Viabilität	113

E.2.2	Wirkung einer antiinflammatorischen Behandlung mit BV-17 auf drei in vitro- / ex vivo-Hautmodelle	117
E.2.2.1	IL-1a-Sekretion und Menge im Gewebe	117
E.2.2.2	IL-8-Sekretion und Menge im Gewebe	120
E.2.2.3	IL-6-Sekretion und Menge im Gewebe	123
E.2.2.4	Viabilität	124
E.2.2.5	Penetration / Permeation von BV-17	127
F	SCHLUSSFOLGERUNG UND AUSBLICK.....	133
G	LITERATURVERZEICHNIS	137
H	ANHANG	151
H.1	Liste der verwendeten Substanzen, Materialien und Geräte	151
H.1.1	Kultivierung und Handling der in vitro- / ex vivo-Hautmodelle	151
H.1.2	Applikation externer Reiz.....	152
H.1.3	Antiinflammatorische Behandlung mit BV-17.....	152
H.1.4	Erfassung der Hautirritation und der Wirkung der antiinflammatorischen Behandlung mit BV-17.....	153
H.1.4.1	ELISA	153
H.1.4.2	PCR.....	153
H.1.4.3	LDH-Test	155
H.1.4.4	MTT-Test	155
H.1.4.5	Histologie.....	155
H.1.5	Penetration / Permeation von BV-17	156
H.1.6	Allgemeines Verbrauchsmaterial	157
H.2	Zusammensetzung Lysis-Puffer	158
H.3	Dimensionen der in vitro- / ex vivo-Hautmodelle	158
H.4	Evaluation Applikationszeitpunkt für BV-17.....	159
H.5	Reaktion auf den externen Reiz von drei in vitro- / ex vivo-Hautmodellen.....	160
H.5.1	IL-1a-Sekretion	160
H.5.2	IL-1a-Menge im Gewebe	162
H.5.3	IL-8-Sekretion.....	163
H.5.4	IL-8-Menge im Gewebe	165
H.5.5	IL-6-Sekretion.....	166
H.5.6	IL-6-Menge im Gewebe	167
H.5.7	Histologische Präparate	168
H.5.7.1	Hämalaun-Eosin-Färbung	168
H.5.7.2	CPD-Immunhistochemische Färbung.....	171
H.6	HPLC-Analytik zu BV-17.....	174
H.6.1	BV-17-Umlagerung	174
H.6.2	BV-17-Umlagerung in den Modellformulierungen	175
H.6.2.1	BV-17-Umlagerung in der Modelllösung	175
H.6.2.2	BV-17-Umlagerung in der Modellemulsion.....	176
H.6.3	BV-17-Gehaltsbestimmung in der Modellemulsion und Verteilung in den Phasen	178

VERZEICHNIS DER ABKÜRZUNGEN

AP-1	Transkriptionsfaktor activating protein-1
BV	Betamethasonvalerat
BV-17	Betamethason-17-Valerat
BV-21	Betamethason-21-Valerat
COX-2	Cyclooxygenase-2
CPD	Cyclobutanpyrimidin-Dimere
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay
GC	Glucocorticoide
GCR	Glucocorticoid-Rezeptor
HPLC	High performance liquid chromatography
I?Ba	Inhibitor kappa B alpha
IL	Interleukin
IL-1 sRI	Interleukin-1 soluble receptor type I
IL-1 sRII	Interleukin-1 soluble receptor type II
IL-1ra	Interleukin-1 receptor antagonist
LDH-Test	Lactat dehydrogenase-Test
LOD	Limit of detection
LOQ	Limit of quantification
MTT	Tetrazolium Bromid
NF-?B	Nuclear factor-kappa B
O/W-Emulsion	Öl-in-Wasser-Emulsion
PBS	Phosphate buffer saline
Phenion FT-Modell	Phenion® full thickness skin model
PLA ₂	Phospholipase A ₂
r.h.	relative humidity
ROS	Reactive oxygen species
RT-PCR	Real time-polymerase chain reaction
SDS	Sodium dodecyl sulfate
SkinEthic-Modell	SkinEthic® reconstructed human epidermis model
TBT	Tributyltin hydrate
TNF-a	Tumour necrosis factor-alpha
UV	Ultraviolett
W/O-Emulsion	Wasser-in-Öl-Emulsion

A Einleitung

Die Haut und ihre Erkrankungen stehen immer wieder im Fokus von wissenschaftlichen Fragestellungen. Zum einen sind Hautkrankheiten weit verbreitet und neben körperlichen Beschwerden wie Schmerzen und Juckreiz verursachen sie teilweise auch soziale Probleme. Die Symptome sind gut sichtbar, der Patient fühlt sich stigmatisiert, versteckt seine Haut und oft auch sich selbst. Unter Psoriasis beispielsweise, eine der häufigsten entzündlichen Erkrankungen der Haut, leiden etwa 1.5 bis 2 % aller Menschen der westlichen Industrienationen. Diese Krankheit lässt sich aber nach wie vor nur mit mässigem Erfolg und ausschliesslich symptomatisch behandeln (Lennecke 2006). Die Erforschung der Pathophysiologie und Therapie von Dermatosen ist somit ein grosses Bedürfnis. Zum anderen stellt die Haut einen wichtigen Applikationsort dar. Eine topische Behandlung, da generell für den Organismus schonender, ist einer systemischen Therapie wenn immer möglich vorzuziehen. Zudem eröffnet der transdermale Applikationsweg für diverse Wirkstoffe neue therapeutische Chancen.

Modelle sind für Forschung und Entwicklung unerlässlich. Sie bieten die Möglichkeit, unter kontrollierten Bedingungen Parameter festzulegen und so gezielt Fragestellungen zu bearbeiten. Immer wieder zum Einsatz kommen dabei Modelle zur Haut. Neben in vivo-Modellen an Mensch und Tier sowie in vitro-Untersuchungen an exzidierte Haut spielen in neuerer Zeit in vitro rekonstruierte Hautmodelle eine zunehmend wichtige Rolle (Netzlaff et al. 2005).

Die Arbeit mit in vitro rekonstruierten Hautmodellen ist verhältnismässig einfach und verspricht verbessert reproduzierbare Daten. Die Rekonstruktion basiert auf vereinzelt Zellen in Kultur, was die Verfügbarkeit gut planbar, da unabhängig von einem unmittelbaren Donor macht. Trotz aller Vorzüge muss bedacht werden, ein Modell repräsentiert nie die volle in vivo-Realität. Es vermag höchstens einen gewählten Ausschnitt zu zeigen. Die Frage nach der Übertragbarkeit von Resultaten auf die in vivo-Situation ist somit zentral und darf bei der Interpretation von Daten nicht ausser Acht gelassen werden.

Aktuell sind am Markt verschiedene gebrauchsfertige in vitro- / ex vivo-Hautmodelle erhältlich.

Bei den in vitro rekonstruierten Modellen unterscheidet man zwischen Epidermismodellen, welche ausschliesslich aus Keratinozyten bestehen und Vollhautmodellen, die zusätzlich über eine rekonstruierte Dermis aus Fibroblasten und Kollagen verfügen. In ihrer dreidimensionalen Architektur kommen die Modelle der in vivo-Haut recht nahe. Auch die Expression von wichtigen epidermalen Differenzierungsmarkern sowie die Synthese von Lipiden aus allen Hauptklassen sind nachweislich vorhanden. Trotzdem liegen gegenüber nativer Haut wesentliche Unterschiede vor. Beispielsweise konnte im SkinEthic-Modell die Expression von Keratin-6 gezeigt werden, welches in gesunder humaner Epidermis fehlt und oft mit Hyperproliferation und Wundheilung assoziiert wird. Daneben ist das Ceramid-Profil verändert sowie der relative Phospholipid-Gehalt reduziert (Ponec et al. 2002). Eine sich von nativer Haut unterscheidende Barrierefunktion liegt somit auf der Hand. Dementsprechend wird in verschiedenen Arbeiten auch eine unvollständige Ausbildung der Hautbarriere beschrieben (Ponec et al. 2001; Netzlaff et al. 2005; Schafer-Korting et al. 2006). In vitro ist also die Rekonstruktion eines recht naturgetreuen Abbildes von Epidermis und Dermis möglich. Doch die Entwicklung ist noch keineswegs abgeschlossen und die Optimierung der Hautmodelle bleibt weiterhin Gegenstand der aktuellen Forschungsarbeiten.

Im Gegensatz zu einfachen Zellkulturen bieten Hautmodelle eine Oberfläche, welche die Applikation von Substanzen oder Präparaten ähnlich zur *in vivo*-Situation erlaubt. Neben dem rein pharmakologischen Effekt kann somit auch das Penetrations- / Permeationsverhalten von Substanzen durch die Hautbarriere sowie der Vehikeleffekt von verschiedenen galenischen Formulierungen untersucht werden. Dies ist einerseits für die Entwicklung von transdermalen oder von lokal kutanen Arzneiformen und andererseits für die toxikologische Prüfung von Chemikalien interessant.

Im Zusammenhang mit der Erfassung des irritativen, toxischen oder phototoxischen Effekts sowie des Allergiepentials von Substanzen und Präparaten haben in den letzten Jahren die *in vitro* rekonstruierten Hautmodelle eine besondere Bedeutung erlangt. Es sind Bemühungen im Gang, entsprechende Tests zu validieren und als international behördlich anerkannte Prüfmethode als Alternative zum Tierversuch zu definieren (Pauwels und Rogiers 2004; Hartung 2006; Rispin und Stitzel 2006). Der Verzicht auf Tierversuche ist aus ethischer Sicht wünschenswert. Für die Prüfung von Kosmetika gar eine Notwendigkeit, da diese in den nächsten Jahren in Europa verboten werden (vgl. 7th Amendment of the European Council Directive 76/768/EEC). Diesbezüglich bereits etabliert hat sich ein behördlich anerkanntes Prüfprotokolle zur Erfassung des akuten dermalen Irritations- / Korrosionspotentials von Fertigprodukten, Rohstoffen und Chemikalien (Kandarova et al. 2006b) (vgl. auch OECD TG 431 guidelines).

Daneben bergen die *in vitro* / *ex vivo*-Hautmodelle ein grosses Potential als Screening-instrument in der Arzneimittelentwicklung, was vor allem für die Dermatologie von grossem Interesse sein dürfte. Die Hautmodelle können dabei als „Organkultur“ genutzt werden. Zum einen kann die Physiologie von gesunder respektive die Pathophysiologie von künstlich induziert erkrankter Haut studiert werden. Zum anderen sollte eine direkte Erfassung des pharmakologischen Effektes von Wirkstoffen sozusagen an Ort und Stelle möglich sein, wobei auch galenische Aspekte in die Untersuchung mit einfließen können. Besonders interessant dürfte dabei der für die Dermatologie manchmal entscheidende und demzufolge vieldiskutierte Vehikeleffekt sein. Man verspricht sich, dass geeignete Untersuchungen am Hautmodell sowohl Ergebnisse zur Eigenwirkung der einzelnen Komponenten und des Vehikels als Ganzes auf den Hautzustand liefern als auch Fragen zur vehikelbedingten Beeinflussung der kutanen Wirkstoffpermeation klären.

Ein entsprechendes Modell und Prüfprotokoll wurde bis anhin nicht etabliert, obwohl ein solches für die Forschung und Entwicklung von Dermatika, besonders auch aus industrieller Sicht, von grossem Nutzen wäre.

Der Wirkmechanismus von Glucocorticoiden ist breit erforscht, was diese Wirkstoffgruppe zur Überprüfung der pharmakologischen Ansprechbarkeit von *in vitro* / *ex vivo*-Hautmodellen gut geeignet macht. Auch die therapeutische Relevanz dieser Substanzklasse ist gegeben. Aufgrund der antiinflammatorischen Wirkkomponente ist zu erwarten, dass der Effekt der Glucocorticoide anhand einer vorgängig gezielt ausgelösten Hautentzündung am besten nachweisbar ist. Eine auf diesen Überlegungen aufbauende Modellidee ist somit interessant. Nach Induktion einer irritationsbedingten Entzündung durch einen adäquaten Reiz und der anschliessenden Behandlung mit Glucocorticoiden, eingearbeitet in verschiedene Vehikel, können die Möglichkeiten und Grenzen von *in vitro* / *ex vivo*-Hautmodellen kennen gelernt und wichtige Informationen im Hinblick auf die Entwicklung eines Screeninginstrument gewonnen werden.

Stellvertretend für die *in vitro* rekonstruierten Hautmodelle wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit das SkinEthic® Reconstructed Human Epidermis Model (Laboratoire SkinEthic, Nizza, Frankreich) sowie das Phenion® Full Thickness Skin Model (Phenion GmbH & Co. KG, Düsseldorf, Deutschland) ausgewählt. Alternativ dazu untersuchte man zusätzlich das auf *ex vivo*-Haut basierende Natskin®-Modell (Biopredict International, Rennes, Frankreich).

Die drei Modelle unterscheiden sich in ihrem Aufbau grundlegend. Während das SkinEthic-Modell eine ausschließlich aus Keratinozyten bestehende Epidermis darstellt, beinhaltet das Phenion FT-Modell zusätzlich eine rekonstruierte Dermis (Kollagenmatrix mit Fibroblasten). Auf der anderen Seite verfügt das Natskin-Modell, bestehend aus *ex vivo*-Haut, gar über alle natürlicherweise vorhandenen Zelltypen (Keratinozyten, Fibroblasten, Melanocyten, Langerhanszellen, etc). An den physiologischen Abläufen in der Haut sind die verschiedenen Zelltypen in jeweils unterschiedlichem Masse beteiligt. Beispielsweise spielt für die Auslösung von Entzündungsreaktionen das Interleukin-1a-Depot in den Keratinozyten eine wichtige Rolle (Kupper und Groves 1995). Für die Vermittlung respektive Verstärkung der nachfolgenden Entzündungssignale ist zusätzlich die Keratinozyten-Fibroblasten-Interaktion wichtig (Boxman et al. 1996). Es ist somit zu erwarten, dass die anhand der drei Modelle generierten Daten durch den Aufbau und die Komplexität des jeweiligen Hautäquivalents geprägt sind.

B Zielsetzung

Das längerfristige Ziel ist die Erarbeitung eines in vitro-Modells als Screeninginstrument für die Forschung und Entwicklung von Dermatika. Im Hinblick auf dieses Ziel befasst sich die vorliegende Arbeit mit der Untersuchung der Möglichkeiten und Grenzen von aktuell am Markt erhältlichen in vitro- / ex vivo-Hautmodellen.

Zur Durchführung von entsprechenden Experimenten wird die Substanzklasse der Glucocorticoide ausgewählt. Glucocorticoide sind therapeutisch relevant, ihr Wirkmechanismus ist gut bekannt und der Effekt vielfach belegt. Stellvertretend wird das stark wirksame, speziell für die dermatologische Anwendung entwickelte Betamethason-17-Valerat (BV-17) eingesetzt. Aufgrund der antiinflammatorischen Wirkkomponente ist zu erwarten, dass der Effekt der Glucocorticoide anhand einer vorgängig gezielt ausgelösten Hautentzündung am besten nachweisbar sein wird. Die vorliegende Arbeit befasst sich somit zum einen mit der zellbiologischen und pathophysiologischen Reaktion von in vitro- / ex vivo-Hautmodellen auf externe Reize wie UV-Strahlung und chemische Irritantien. Zum anderen wird die pharmakologische Ansprechbarkeit auf eine nachfolgende antiinflammatorische Behandlung mit BV-17 untersucht.

Die vorliegende Arbeit gliedert sich in zwei Teile.

Als Erstes gilt es, experimentelle Bedingungen zu erarbeiten und die oben genannte Zielsetzung anhand des SkinEthic-Modells umzusetzen. Insbesondere werden die folgenden Fragen bearbeitet:

- Was für ein externer Reiz eignet sich für die Untersuchungen? Auf welche Weise kann dieser im Hautmodell appliziert werden und wie soll er dosiert sein?
- Kann durch einen externen Reiz eine irritationsbedingte Hautentzündung ausgelöst werden? Zu welchem Zeitpunkt sind die Auswirkungen des Reizes am deutlichsten?
- Anhand von welchen Indikatoren, mit Hilfe welcher Analysenmethoden und in welchem Kompartiment des Hautmodells kann die Hautentzündung erfasst werden?
- Penetriert BV-17 in ausreichendem Masse in das Hautmodell? Zeigt die Wirkstoffpenetration eine Abhängigkeit vom Vehikel?
- Ist eine Wirkung der antiinflammatorische Behandlung mit BV-17 detektierbar? In welcher Form zeigt die Behandlung den deutlichsten Effekt (Dosierung, Vehikel, Applikationsmodus, Zeitpunkt)?
- Kann die Wirkung von BV-17 auch ohne vorgängige Hautirritation gezeigt werden?
- Wie verhält sich die Inter- und Intra-batchvariation im SkinEthic-Modell? Werden die generierten Daten dadurch beeinflusst?

Im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit wird die Reaktion auf externe Reize und die Ansprechbarkeit auf die antiinflammatorische Behandlung von drei unterschiedlich aufgebauten in vitro- / ex vivo-Hautmodellen verglichen. Dazu werden mehrheitlich die im ersten Teil erarbeiteten Versuchsbedingungen übernommen. Im Fokus stehen die folgenden Fragestellungen:

- Unterscheiden sich die drei in vitro- / ex vivo-Hautmodelle in ihrer Reaktion auf den Reiz und in ihrer Ansprechbarkeit auf die antiinflammatorische Behandlung? Inwiefern spielt dabei der Aufbau respektive die unterschiedliche Komplexität der Modelle eine Rolle?
- Wie verhält sich die Wirkstoffpenetration in den drei Modellen? Ist ein Einfluss des Vehikels erkennbar?
- Welches Hautmodell ist als Screeninginstrument für die Forschung und Entwicklung von Dermatika am besten geeignet?

C Theoretischer Teil

C.1 Haut

C.1.1 Funktion und Aufbau der Haut

Die Haut ist ein lebenswichtiges Organ, das die äussere Oberfläche des Organismus und damit die Schranke zwischen Umwelt und innerem Milieu bildet. In erster Linie übt die Haut eine Schutzfunktion aus. Einerseits schirmt sie den Organismus gegen mechanische, chemische und physikalische Schädigung sowie gegen das Eindringen von Mikroorganismen und deren Stoffwechselprodukte nach aussen hin ab. Andererseits wird der transepidermale Wasserverlust durch die Haut reguliert, was eine grundlegende Voraussetzung für einen intakten Wasser- und Elektrolythaushalt innerhalb des Körpers darstellt.

Neben dieser Barrierefunktion nimmt die Haut auch wichtige Aufgaben als Sinnesorgan (Druck-, Temperatur- und Schmerzrezeptoren) und als Wärmeregulator wahr.

Die Haut lässt sich anatomisch in die drei Schichten Epidermis, Dermis und Subkutis einteilen (Thews et al. 1991).

Die Epidermis (Oberhaut) ihrerseits ist ebenfalls ein mehrschichtiges System. Von innen nach aussen werden histologisch die folgenden Epidermisschichten unterschieden: Stratum basale, Stratum spinosum, Stratum granulosum und Stratum corneum. Im Stratum basale findet die Zellteilung statt, wodurch der Nachschub an Keratinozyten für die sich ständig regenerierende Epidermis gewährleistet ist. Über die Basalmembran wird der Kontakt mit der darunter liegenden Dermis hergestellt, die u.a. die Versorgung der gefässlosen Epidermis durch feine Blutgefässe sicherstellt. Über das Stratum spinosum, Stratum granulosum zum Stratum corneum findet die Ausdifferenzierung der Keratinozyten zu Korneozyten statt. Die Korneozyten sind abgeplattete, vollständig verhornte, d.h. mit Keratin angefüllte, kernlose Zellen, die an der Oberfläche ständig in Form kleiner Schüppchen abschilfern. Sie liegen im dicht gepackten Zellverband vor, wobei der interzelluläre Raum zusätzlich mit einer lipidreichen Matrix, hauptsächlich bestehend aus Ceramiden, Cholesterol und freien Fettsäuren, gefüllt ist („brick and mortar“-Modell) (Bronaugh und Maibach 1999). Die oben beschriebene Barrierefunktion wird hauptsächlich durch das Stratum corneum wahrgenommen (durchschnittliche Dicke 10 µm). Die Dicke der gesamten Epidermis variiert und beträgt je nach Intensität der mechanischen Beanspruchung der entsprechenden Körperstelle 0.05 bis 2 mm. Die Epidermis besteht zu 90 % aus Keratinozyten. Daneben sind Melanocyten, welche für die Pigmentierung der Haut verantwortlich sind, die immunkompetenten Langerhanszellen sowie die als Druckrezeptoren fungierenden Merkel-Zellen vertreten.

Die Dermis (Lederhaut, Corium) besteht aus dichtem Bindegewebe, welches der Haut einerseits Festigkeit und Belastbarkeit gegen mechanische Einwirkungen, andererseits aber auch eine gewisse Elastizität verleiht. Diese mechanischen Eigenschaften werden durch starre Collagen- und dehnbare Elastinfasern sowie durch dazwischen eingelagerte Glycosaminoglykane vermittelt. Alle drei Komponenten werden durch Fibroblasten produziert. Daneben sind in der Dermis die hauternährenden Blutgefässe, Muskel- und Nervenfasern, immunkompetente Zellen (Makrophagen, Mastzellen, Lymphozyten etc.) sowie die Hautanhangsgebilde (Talg- und Schweißsdrüsen, Haarwurzeln) lokalisiert.

Die Subkutis (Unterhaut) ist ein lockeres, lamellär aufgebautes Bindegewebe, in das mehr oder weniger reichlich Fettgewebe eingebaut ist. Das subkutane Fettgewebe dient dem Organismus vor allem als Schutz vor Kälte, Druck und Stoss und stellt ausserdem einen Energiespeicher dar.

C.1.2 Hautmodelle

Die Haut und ihre Erkrankungen stehen immer wieder im Fokus von wissenschaftlichen Fragestellungen. Zum einen ist kein anderes Organ für Untersuchungen so offensichtlich zugänglich wie die Haut. Dies weckt generell die Neugierde und den Forschergeist. Was geschieht in und auf der Haut? Wie dicht ist die Hautbarriere? Ist die Schutzwirkung gegen bestimmte toxische Substanzen gegeben? Wo liegen die Möglichkeiten und Grenzen der Haut als Applikationsweg für Arzneistoffe?

Zum anderen stellen viele Hautkrankheiten für die betroffenen Patienten ein ernsthaftes Problem und somit eine deutliche Einbusse der Lebensqualität dar. Die Erforschung der Pathophysiologie und Therapie von Dermatosen ist somit ein grosses Bedürfnis.

So wurde die Haut in den letzten rund 70 Jahren intensiv erforscht. Gleichzeitig ist eine Vielzahl von Hautmodellen entwickelt worden (Marks und Plewig 1986). Zum einen sind dies in vivo-Modelle an Mensch und Tier. Zum anderen existiert eine grosse Zahl an in vitro-Modellen der unterschiedlichsten Art.

Für Tiermodelle, gleichgültig ob in vivo oder in vitro, stellt sich immer die Frage nach der Übertragbarkeit der ermittelten Resultate auf den Menschen.

C.1.2.1 in vivo-Modelle

In vivo-Modelle bieten den Vorteil von möglichst naturidentischen Bedingungen. Nachteilig sind hingegen ethische Überlegungen, die grossen interindividuellen Schwankungen zwischen den einzelnen Prüflingen sowie der grosse Aufwand respektive auch die Schwierigkeiten hinsichtlich der Verfügbarkeit von Probanden.

Es existieren in vivo-Modelle sowohl am Menschen als auch am Tier. Bekannte Humanmodelle sind der Pyrexal Erythema Test und der Poison Ivy Test zur Prüfung des antiphlogistischen Effekts von Substanzen und Salbengrundlagen (Surber und Maibach 1992). Beispiele für Tiermodelle sind der Mouse Tail Test nach Spearman und Jarrett zur Untersuchung des atrophischen Effektes von Corticosteroiden (Spearman und Jarrett 1975) sowie das long-haired syrian hamster-Modell zur Prüfung des durch Androgene verursachten Haarwuchses (Orentreich et al. 1984) (Marks und Plewig 1986).

C.1.2.2 in vitro-Modelle

Die Entwicklung von in vitro-Modellen wurde in neuerer Zeit stark vorangetrieben.

Humane in vivo-Tests sind aus ethischer Sicht immer heikel und bieten nur wenig Spielraum. Sie sind aufwändig, langwierig und teuer.

Auch Tierversuche sind zu vermeiden respektive auf das nötige Minimum zu beschränken. Wenn immer möglich sind alternative in vitro-Methoden anzuwenden. Vgl. dazu das Konzept von Russell und Burch, das auf den drei Postulaten "Replacement, Reduction, Refinement" beruht (Russell und Burch 1959). In den nächsten Jahren werden Tierversuche zur Prüfung von Kosmetika in Europa gar ganz verboten werden (Hartke et al. 2004c). Seit 1992 besteht deshalb das Europäische Zentrum zur Validierung von Alternativmethoden (ECVAM), welches in diesem Sinne die Entwicklung und Validierung von Alternativmethoden zum Tierversuch koordiniert und um deren internationale behördliche Anerkennung bemüht ist (Pauwels und Rogiers 2004; Hartung 2006; Rispin und Stitzel 2006). Besondere Bedeutung haben in diesem Zusammenhang Modelle auf der Basis von in vitro rekonstruierter Haut erlangt (vgl. C.1.2.2.3).

Daneben liegen die Vorteile von in vitro-Modellen gegenüber den in vivo-Modellen in einer in der Regel verbesserten Reproduzierbarkeit der Resultate. Die Versuchsbedingungen sind besser standardisierbar. Je nach Design des Modells ist die Komplexität reduziert und einzelne Parameter können gezielter variiert werden.

Auch ist die Verfügbarkeit von „Probanden“ respektive von Prüfobjekten vereinfacht und entsprechende Studien müssen nicht durch eine Ethikkommission beurteilt und bewilligt werden.

Trotz allen erwähnten Pluspunkten, ein Modell repräsentiert nie die volle in vivo-Realität. Es vermag höchstens einen (bewusst) gewählten Ausschnitt zu zeigen. Die Frage nach der Übertragbarkeit von Resultaten auf die in vivo-Situation ist somit zentral und darf bei der Interpretation von Daten nie ausser Acht gelassen werden.

Die in vitro-Modelle können in drei Kategorien eingeteilt werden, wobei in allen drei Kategorien die Haut / Zellen sowohl menschlichen als auch tierischen Ursprungs sein können.

C.1.2.2.1 ex vivo Haut

Die ex vivo-Haut stammt von Schlachttieren (z.B. Schweineohren) oder fällt bei Operationen am Menschen an und darf für wissenschaftliche Zwecke eingesetzt werden (z.B. überschüssige Haut der Bauchdecke nach schönheitschirurgischen Eingriffen).

Exzidierte Haut wird hauptsächlich zur Untersuchung der Penetration / Permeation von Wirk- und Hilfsstoffen bei der Entwicklung von Arzneimitteln eingesetzt (Ayub et al. 2007). In solchen Penetrations- / Permeationsversuchen kann aber auch das Verhalten von (potentiell) toxischen Substanzen auf der Haut die zentrale Fragestellung sein (Vallet et al. 2007). Die Studien werden dabei häufig mit Hilfe des Franz Diffusion Cell Systems durchgeführt (Franz 1975; Franz 1978).

Bei Experimenten mit ex vivo-Haut kann, analog zum in vivo-Modell, einerseits die Verfügbarkeit der Hautstücke problematisch sein (beschränkte Haltbarkeit, Abhängigkeit von Lieferanten wie Spital oder Schlachthof). Andererseits ist die interindividuelle Schwankung der Resultate aus den einzelnen Hautproben meist gross und steht in Abhängigkeit vom Donor und / oder von der Entnahmestelle der Hautprobe. Dafür ist die Entnahme von exzidierte Haut mit vergleichsweise geringem Aufwand verbunden und, da sie an sich ein Abfallprodukt ist, auch recht kostengünstig.

Mit Natskin® (Biopredict International, Rennes, Frankreich) ist ein gebrauchsfertig präpariertes ex vivo-Humanhautmodell im Handel, welches im Folgenden näher charakterisiert wird.

Natskin® ex vivo Humanhaut

Natskin® (Natskin-Modell) besteht aus Epidermis und Dermis (teilweise Subkutis) und wird der weiblichen Bauchdecke entnommen. Im Nährmedium kultiviert bleibt die Natskin Humanhaut während einigen Tagen histologisch intakt und metabolisch aktiv. Ausser zur Durchführung der klassischen Penetrations- / Permeationsversuche wird das Modell auch zur Prüfung des pharmakologischen Effektes sowie zur Erkennung einer unerwünschten toxischen Nebenwirkung von Wirk- und Hilfsstoffen, welche für die dermatologische oder kosmetische Anwendung vorgesehen sind, empfohlen (Flaxman und Harper 1975; Nakamura et al. 1990).

Das Natskin-Modell ist in zwei Grössen erhältlich, wobei die durch einen Kunststoffring klar umgrenzte Applikationsfläche für Formulierungen rund 0.2 cm² respektive 0.8 cm² beträgt. Die mittlere Hautdicke liegt bei 2 mm.



Abb. C.1: Natskin-Modell, gebrauchsfertig präpariert, mit Kunststoffring zur Abgrenzung der Applikationsfläche (0.2 cm²) (Biopredict International, Rennes, Frankreich)

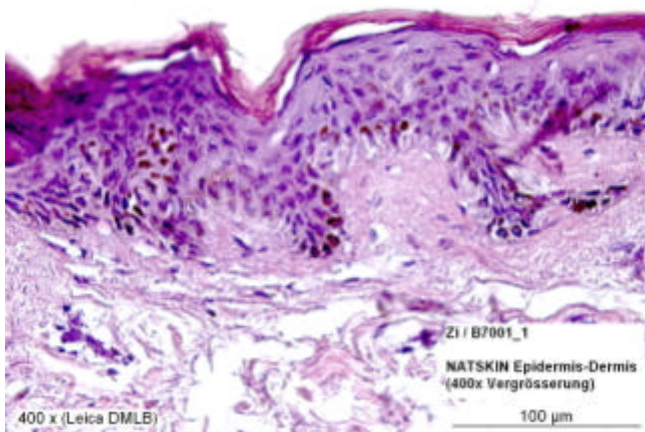


Abb. C.2: Natskin-Modell, Vergrößerung 400-fach, Hämalaun-Eosin-Färbung (Spirig Pharma AG, Egerkingen, Schweiz)

Je nach Fragestellung innerhalb eines Experiments kann die Kultivierung des Natskin-Modells in verschiedenen Nährmedien erfolgen. Üblicherweise sind dies gängige Medien aus der Zellkultur (Bsp. Defined Keratinocyte-SFM Medium, Gibco™, Invitrogen Corporation).

C.1.2.2.2 Zellkulturen

Zellkulturen zur Untersuchung von zellphysiologischen Fragestellungen und molekularbiologischen Zusammenhängen sind weit verbreitet. Die erste Zellkultur wurde schon vor über 100 Jahren erstellt (Zellkultur mit embryonalen Hühnerzellen, W. Roux, 1885). Seither sind unzählige Zelllinien zu den unterschiedlichsten Geweben sowohl menschlichen als auch tierischen Ursprungs etabliert worden. Gängige Zelllinien aus der Haut sind beispielsweise NHEK (= normal human epidermal Keratinocytes), HaCaT-Zellen (= humane, spontan immortalisierte Keratinozyten) und 3T3-Mausfibroblasten (= immortalisierte Mausfibroblasten).

Hier erwähnt seien die folgenden vier ausgewählten Beispiele für wissenschaftliche Untersuchungen zu dermatologischen Fragestellungen anhand von Zellkulturen: Einfluss von UVB-Strahlung auf die Interleukin-1-Expression in kultivierten Keratinozyten (Kondo et al. 1994), Rolle der Fibroblasten für die Regulation der Expression von verschiedenen Zytokinen (Boxman et al. 1996), Bindung von Corticosteroiden an Fibroblasten und die resultierende Wachstumshemmung (Ponec et al. 1980), zytotoxischer Effekt von Corticosteroiden auf Keratinozyten und Fibroblasten (Korting et al. 1995).

Die Resultate aus Zellkulturexperimenten sind gut reproduzierbar, da die Zellen innerhalb einer Zelllinie an sich gleich bleiben. Weitere Vorteile von der Arbeit mit Zellkulturen liegen im vergleichsweise geringen Preis und in der guten Verfügbarkeit der Zellen dank der praktisch uneingeschränkten Haltbarkeit nach Einfrieren in Flüssigstickstoff (Cryoconservation).

Die Vorgänge beim Herauslösen der Zellen aus dem Gewebe sowie anschliessend die veränderte, künstliche Umgebung beeinflussen jedoch den Zellzustand. Das Handling und die Pflege von Zellkulturen braucht viel Erfahrung und Fingerspitzengefühl. Kultivierte Zellen sind in ihrer Ausprägung und in ihrem Expressionsmuster mit den in vivo-Zellen meist nicht mehr identisch. In die Interpretation von Daten aus Zellkulturexperimenten muss dieser Aspekt unbedingt mit einfließen.

C.1.2.2.3 in vitro rekonstruierte Haut

Entstehung

In den letzten 30 Jahren ist es gelungen, einfache Keratinozyten in Kultur zur Ausbildung der dreidimensionalen Architektur von Epidermis zu stimulieren. Den Grundstein haben 1975 Rheinwald und Green gelegt, indem sie die Methodik zur Kultivierung und Expansion von Keratinozyten entwickelt haben (Rheinwald und Green 1975a; Rheinwald und Green 1975b). Für die Ausbildung der epidermalen Struktur ist eine Ausdifferenzierung der Keratinozyten bis hin zu den Korneozyten erforderlich. Ein Meilenstein in der Entwicklung war die Erkenntnis, dass diese Ausdifferenzierung durch den Kontakt der Keratinozyten mit Luft induziert wird (Prunieras et al. 1983; Asselineau et al. 1985; Rosdy und Clauss 1990). Wichtig für die Zelldifferenzierung und letztendlich Ausbildung einer möglichst der in vivo Situation entsprechenden Hautbarriere ist die Wahl der adäquaten Calcium-Konzentration (Vicanova et al. 1998). Dank der Anreicherung des Kulturmediums mit Vitamin C können die Barriereeigenschaften zusätzlich verbessert werden (Ponec et al. 1997; Pasonen-Seppänen et al. 2001).

In neuerer Zeit sind Methoden erarbeitet worden, um neben reiner Epidermis auch sog. Vollhaut, bestehend aus Epidermis und Dermis, in vitro zu rekonstruieren. Dazu werden beispielsweise Fibroblasten in eine Kollagenmatrix (Dubertret 1990; Souto et al. 2006) oder in ein dreidimensionales Nylonnetz (Contard et al. 1993) eingebettet und in einem für das Fibroblastenwachstum geeigneten Medium kultiviert. Auf der Basis dieser rekonstruierten Dermis wird in einem zweiten Schritt die Epidermis ausdifferenziert.

Anwendung

Die Liste der anhand des in vitro rekonstruierten Hautmodells durchgeführten wissenschaftlichen Arbeiten ist lang. Es wurden viele Untersuchungen zu den molekularbiologischen Abläufen und Zusammenhängen in der Haut selbst erarbeitet (Vicanova et al. 1998; Chadebecq et al. 2003; Gazel et al. 2003; Schroeder und Welss 2003; Schroeder und Welss 2004; Pigeon und Asselineau 2005; Poumay und Coquette 2007; Rezvani et al. 2007).

Im Gegensatz zu einfachen Zellkulturen bietet das in vitro rekonstruierte Hautmodelle eine Oberfläche zur Applikation von Substanzen und / oder galenischen Formulierungen ähnlich zur in vivo-Situation. Dank dieser Besonderheit eignet sich das Modell für Penetrations- / Permeationsstudien von Arzneimitteln in Abhängigkeit vom Vehikel (Zellmer et al. 1998; Gysler et al. 1999; Zghoul et al. 2001) und für Untersuchungen zum Effekt von Kosmetika (Buche et al. 1994; zur Muhlen et al. 2004). Da die Zellen metabolisch aktiv sind, liegt es auf der Hand, dass neben dem Penetrations- / Permeationsverhalten auch die Effekte auf molekularbiologischer Ebene untersucht werden wollen.

Zusätzlich hat sich in den letzten Jahren eine Reihe von Tests zur Prüfung des irritativen, toxischen und / oder phototoxischen Effekts sowie des Allergiepentials von Chemikalien und Präparaten etabliert (Bernard et al. 2000; Faller et al. 2002). Es sind Bemühungen im Gang, diese Tests zu validieren. Dabei ist das Ziel, international behördlich anerkannte Prüfmethode für Chemikalien als Alternative zum Tierversuch zu definieren (vgl. C.1.2.2). Konkret erarbeitet wurde dies bisher zur Erfassung des Irritationspotentials (Kandarova et al. 2006a) und des korrosiven Effektes von Chemikalien (Kandarova et al. 2006b) (vgl. auch OECD TG 431 guidelines).

Neben den wissenschaftlichen Aspekten war aber auch der medizinische Nutzen eine wichtige Motivation für die Entwicklung von in vitro rekonstruierter Haut. Patienten mit schweren Hautverletzungen (z.B. nach Verbrennungen) oder schlecht heilenden Wunden (z.B. bei Diabetikern) können mittlerweile erfolgreich mit entsprechenden kommerziell erhältlichen Produkten therapiert werden. Als Beispiel sei Apligraf® genannt, ein allogenes Hautsubstitut bestehend aus Dermis und Epidermis (Falanga und Sabolinski 1999).

Je nach Krankheitsbild kann eine Transplantation von autologer Haut nötig sein. Bei grossflächiger Hautverletzung kann der Patient jedoch nicht durch Entnahme entsprechender Hautareale zusätzlich geschädigt werden. Dank der in vitro-Methodik ist aber die Rekonstruktion von Epidermis aus patienteneigenen Keratinozyten möglich (Teepe et al. 1990; Dvorankova et al. 2003).

Verschiedene Modelltypen

Die Wahl von unterschiedlichen Kulturbedingungen und Trägermaterialien haben im Laufe der Entwicklung zu verschiedenen Varianten von in vitro-Hautmodellen geführt. Dabei kann auch die Art der eingesetzten Zellen unterschiedlich sein. Wie bereits erwähnt, unterscheidet man beispielsweise zwischen Epidermismodellen, welche ausschliesslich aus Keratinozyten bestehen und Vollhautmodellen, die zusätzlich über eine rekonstruierte Dermis aus Fibroblasten und Kollagen verfügen. Neuerdings werden die Modelle u.a. zusätzlich mit Melanocyten und / oder den immunkompetenten Langerhans-Zellen angereichert.

Am Markt sind verschiedene gebrauchsfertige in vitro-Modelle erhältlich.

Beispielsweise:

- SkinEthic® Reconstructed Human Epidermis Model von Laboratoire SkinEthic (neu zugehörig zu l'Oréal), Nizza, Frankreich
- Phenion® Full Thickness Skin Model von Phenion GmbH & Co. KG, Düsseldorf, Deutschland
- EpiSkin® Model von Episkin SNC (zugehörig zu l'Oréal), Chaponost, Frankreich
- EpiDerm™ Skin Model von MatTek Corporation, Ashland, Mass., USA
- Euroskin Model von Euroderm GmbH, Leipzig, Deutschland

Im Folgenden werden das SkinEthic® Reconstructed Human Epidermis Model von SkinEthic und das Phenion® Full Thickness Skin Model von Phenion näher charakterisiert.

a) SkinEthic® Reconstructed Human Epidermis Model

Das SkinEthic® reconstructed human epidermis model (SkinEthic-Modell) ist ein Epidermis-Modell, welches ausschliesslich aus humanen Keratinozyten besteht. Die Kultivierung erfolgt in speziellen Inserts mit unterschiedlich grosser Oberfläche (je nach Applikation 0.1 bis 4 cm²).



Abb. C.3: SkinEthic-Modell im Insert, Kulturtag 19, Oberfläche 0.5 cm² (Laboratoire SkinEthic, Nizza, Frankreich)

Die aus Vorhaut gewonnenen, vereinzelt, primären Keratinozyten werden auf einer inerten Polycarbonatmembran ausgesät. Die Kultur wird für einige Tage von Medium bedeckt inkubiert, um die Proliferation zu stimulieren. Anschliessend wird der Träger mit der inzwischen dünnen mehrlagigen Schicht aus Keratinozyten an die Luft-Medium-Grenze gebracht, um die epidermalen Zellen der Luft auszusetzen und dadurch ihre Differenzierung zu induzieren. Ab Kulturtag 17 (respektive ab Kulturtag 12 an der Luft-Medium-Grenze) ist das SkinEthic-Modell reif, d.h. das Modell weist die epidermistypische Schichtung auf (Stratum basale, Stratum spinosum, Stratum granulosum und Stratum corneum) und entspricht in seiner dreidimensionalen Architektur nativer Haut.

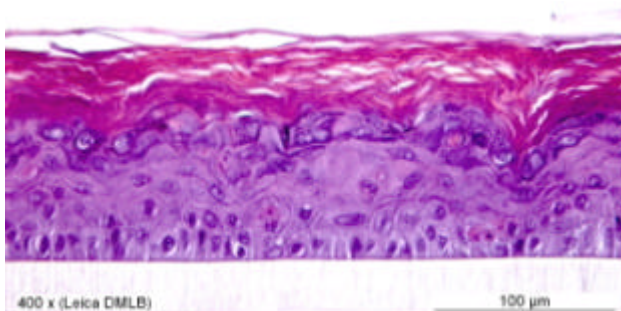


Abb. C.4: SkinEthic-Modell Kulturtag 17, Vergrösserung 400-fach, Hämalaun-Eosin-Färbung (Spirig Pharma AG, Egerkingen, Schweiz)

Mit zunehmendem Alter findet eine Verhornung statt. Im Gegensatz zur in vivo-Situation können die Korneocyten nicht abschilfern, was ca. ab Kulturtag 20 zu einer deutlichen Verdickung des Stratum corneum führt.

Weitere Details zum Vorgehen bei der Rekonstruktion von Epidermis sind vom Hersteller publiziert (Rosdy und Clauss 1990; Rosdy et al. 1993).

Der Hersteller Laboratoire SkinEthic beschreibt die Expression der für die Basalmembran wichtigen Proteine Kollagen IV, Laminin I, Laminin V, Antigen AP, Integrin α -6 und Integrin β -4 sowie der im Rahmen der Ausdifferenzierung von Keratinozyten auftretenden Proteine Filaggrin, Involucrin, Transglutaminase I, Keratin 10 und Loricrin. Die Zusammensetzung und strukturelle Anordnung der Lipide im Interzellularraum des Stratum corneum entspricht weitgehend derjenigen von nativer Haut. Neben den verschiedenen Ceramiden hat Laboratoire SkinEthic u.a. auch Cholesterol und diverse freie Fettsäuren nachgewiesen.

Verschiedene wissenschaftliche Arbeiten belegen die Eignung des SkinEthic-Modells für die in vitro-Prüfung von Substanzen hinsichtlich ihrer Fototoxizität (Bernard et al. 2000; Medina et al. 2001) und ihres Irritationspotentials (de Brugerolle de et al. 1999; Coquette et al. 2003). Der Einsatz des SkinEthic-Modells zur Ermittlung von Penetrationsdaten ist hingegen umstritten. Das SkinEthic-Modell ist gegenüber nativer Haut deutlich durchlässiger, was Schmook et al. dazu bewog, das Modell als ungeeignet zu bewerten (Schmook et al. 2001). Da das Ranking innerhalb einer Substanzgruppe mit unterschiedlicher Hydrophilie bzw. Lipophilie demjenigen von nativer Haut jedoch weitgehend entspricht, sind vergleichende Messungen trotzdem möglich. Auch zeigten die mit SkinEthic ermittelten Daten eine bessere Reproduzierbarkeit (Lotte et al. 2002).

b) Phenion® Full Thickness Skin Model

Das Phenion® full thickness skin model (Phenion FT-Modell) ist ein Vollhautmodell, welches aus Keratinozyten und Fibroblasten desselben menschlichen Donors aufgebaut ist. Zusätzlich zu Untersuchungen an der Epidermis erlaubt das Vollhautmodell Phenion FT somit Abklärungen zur dermal-epidermalen Interaktion, zum dermalen Effekt von applizierten Substanzen sowie zum Fibroblastenstoffwechsel.

Der Durchmesser eines einzelnen Modellhautstückes beträgt 1.3 cm, was einer Oberfläche von rund 1.3 cm² entspricht.

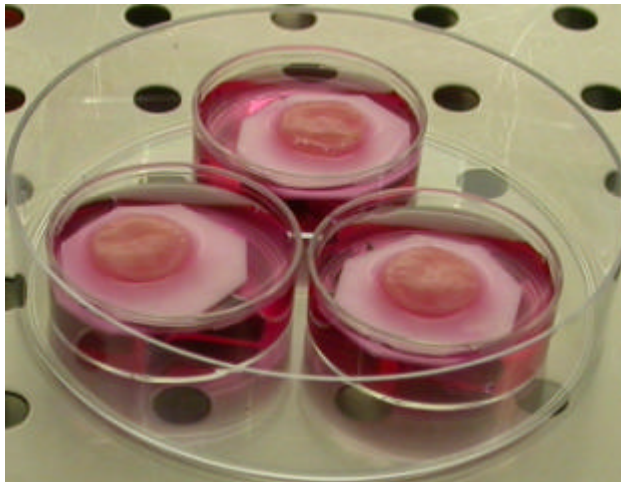


Abb. C.5: Phenion FT-Modell (Phenion GmbH & Co. KG, Düsseldorf, Deutschland)

Die Keratinozyten und Fibroblasten werden aus gesundem Vorhautgewebe gewonnen. In einem ersten Schritt werden die vereinzelt Fibroblasten in eine Kollagenmatrix eingebettet, welche die Ausbildung der dermalen Struktur unterstützt. Nach ca. 2 Wochen werden in einem zweiten Schritt auf diese rekonstruierte Dermis die Keratinozyten ausgesät. Nach einigen Tagen ist eine Ausdifferenzierung und Schichtung der Keratinozyten erkennbar.

Für eine natürliche Ausdifferenzierung ist auch im Phenion FT-Modell der Luftkontakt zum richtigen Zeitpunkt essentiell. Nach insgesamt 5-wöchiger Kultivierung, wovon die letzten 12 Tage an der Luft-Medium-Grenze, ist die Hautstruktur analog zu nativer Haut vollständig ausgebildet. Die Epidermis umfasst 8 bis 10 Zellschichten, weist die epidermistypische Schichtung auf (Stratum basale, Stratum spinosum, Stratum granulosum und Stratum corneum) und ist mit der darunter liegenden rekonstruierten Dermis fest verhaftet. Mit zunehmendem Alter findet eine Verdickung des Stratum corneum und damit eine Verhornung statt.

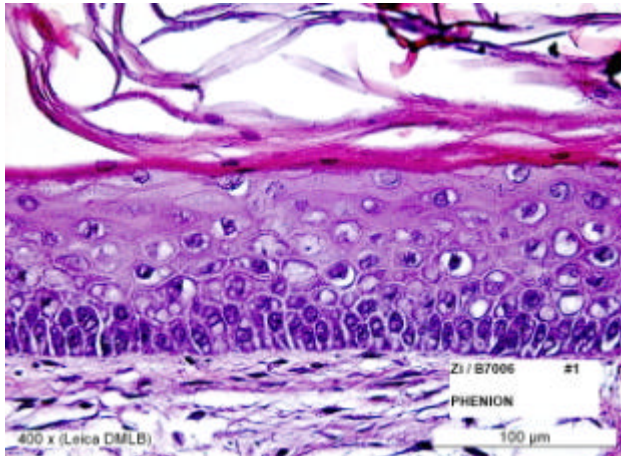


Abb. C.6: Phenion FT-Modell, Alter ca. 5 Wochen, Vergrößerung 400-fach, Hämalaun-Eosin-Färbung (Stratum corneum teilweise abgelöst) (Spirig Pharma AG, Egerkingen, Schweiz)

Weitere Details zum Vorgehen bei der Rekonstruktion des Phenion FT-Modells sind vom Hersteller publiziert (Mewes et al. 2007).

Der Hersteller Phenion beschreibt die Expression von hauttypischen Differenzierungsmarkern (u.a. Zytokeratin 10, Filaggrin, Transglutaminase und Involucrin), welche eine natürliche Ausdifferenzierung der Keratinozyten anzeigt. Der Nachweis des Proteins Ki-67 im Stratum basale lässt auf eine proliferative Tätigkeit der Zellen in diesem Bereich schließen. Im dermalen Kompartiment kann die de novo-Synthese von Elastin und Fibronectin durch die Fibroblasten gezeigt werden (Mewes et al. 2007).

Das Phenion FT-Modell ist eine Neuentwicklung (Firmengründung im Jahr 2001). Aus diesem Grund sind bis zum jetzigen Datum kaum Publikationen zu dessen Charakterisierung und Anwendung erschienen. Als Beispiel sei hier der Einsatz des Phenion FT-Modells zur Untersuchung der antiinflammatorischen Corticosteroid-Wirkung aufgeführt (Zöller et al. 2006).

Vergleich von in vitro rekonstruierten Hautmodellen mit nativer Haut

Es existieren zahlreiche Untersuchungen, welche die Charakterisierung von in vitro-Hautmodellen sowie deren Vergleich mit nativer Haut zum Gegenstand haben (Boelsma et al. 2000; Ponec et al. 2001; Ponec et al. 2002; Gazel et al. 2003; Netzlaff et al. 2005).

Die histologische Evaluierung zeigt sowohl für das SkinEthic- als auch für das Phenion FT-Modell ein vollständig stratifiziertes Epithel, welches demjenigen von nativer Haut sehr gut entspricht. Weiterhin beschreiben die Hersteller beider Modelle das Vorhandensein einer voll entwickelten Basalmembran (inkl. bedeutender Basalmembranmarker) sowie die Expression epidermaler Differenzierungsmarker (siehe oben, Charakterisierung der beiden Modelle). Die Lipide aus allen Hauptklassen (Phospholipide, Glucosylsphingolipide, Ceramide, Triglyceride, freie Fettsäuren, Cholesterol und dessen Derivate) sind nachweislich vorhanden.

Werden die Modelle im Vergleich zu nativer Haut allerdings genauer unter die Lupe genommen, sind Unterschiede erkennbar.

Aus morphologischer Sicht beispielsweise unterscheidet sich das SkinEthic-Modell von nativer Haut in der Anzahl Zellschichten respektive effektiven Dicke von einzelnen Kompartimenten innerhalb der Epidermis. Auch tritt im SkinEthic-Modell ein vergleichsweise abrupter Übergang von kubisch geformten Zellen im Stratum basale zu flachen Zellen im Stratum granulosum auf (Ponec et al. 2002).

Tab. C.1: Vergleich von morphologischen Eigenschaften des SkinEthic-Modells mit nativer Haut (Ponec et al. 2002)

	SkinEthic-Modell (Alter Kulturtag 18)	Native Humanhaut*
Anzahl Zellschichten (lebende Zellen)	5-9	7-12
Anzahl Zellschichten (Korneozyten)	14-24	15-20
Dicke der Epidermis (µm)	23-59	80-90
Dicke des Stratum corneum (µm)	15-32	10-12

*Zum Entnahmeort und zum Donor der nativen Humanhaut sind keine Angaben vorhanden.

Weiterhin werden Unterschiede in der Lokalisierung und Quantifizierung der Expression von verschiedenen Proteinen beschrieben. Dies deutet auf ein verändertes Proliferations- sowie Differentiationsverhalten der Keratinozyten in den Modellen hin. Beispielsweise konnte im SkinEthic-Modell die Expression von Keratin-6 nachgewiesen werden, welches in gesunder humaner Epidermis fehlt und oft mit Hyperproliferation und Wundheilung assoziiert wird. Auch die Präsenz von SKALP (skin derived antileukoproteinase) im SkinEthic-Modell, das vermutlich in die Regulation von entzündlichen Prozessen involviert ist und u.a. in psoriatischer, normalerweise nicht aber in intakter Haut auftritt, ist auffällig. Ein weiteres Beispiel ist die Lokalisierung von Involucrin, ein typisches Markerprotein für die Differenzierung von Keratinozyten. Physiologischerweise ist die Expression von Involucrin auf das Stratum granulosum beschränkt. Sowohl in SkinEthic- als auch im Phenion FT-Modell ist Involucrin hingegen in allen suprabasalen Schichten zu finden (Ponec et al. 2002).

Tab. C.2: Vergleich der Expression von einigen für die Differenzierung wichtigen Markerproteinen im SkinEthic-Modell mit nativer Haut (Ponec et al. 2002)

	SkinEthic-Modell (Alter: Kulturtag 18)	Native Humanhaut*
Keratin 6	Expression in allen suprabasalen Schichten	keine Expression
SKALP	Expression im Stratum spinosum und Stratum granulosum	keine Expression
Involucrin	Expression in allen suprabasalen Schichten	Expression ausschliesslich im Stratum granulosum
Transglutaminase	Expression in allen suprabasalen Schichten	Expression ausschliesslich im Stratum granulosum
SPRR2	Expression ausschliesslich im Stratum granulosum	Expression ausschliesslich im Stratum granulosum
Loricrin	Expression ausschliesslich im Stratum granulosum	Expression ausschliesslich im Stratum granulosum

*Zum Entnahmeort und zum Donor der nativen Humanhaut sind keine Angaben vorhanden.

Auch das Profil der Lipidsynthese ist in den in vitro-Modellen gegenüber nativer Haut teilweise verändert. Beispielsweise ist im SkinEthic-Modell gegenüber gesunder ex vivo-Haut der relative Phospholipid-Gehalt geringer und das Ceramid-Profil verändert (Ceramid 2 erhöht, Ceramide 6 und 7 stark reduziert, Ceramid 7 abwesend) (Ponec et al. 2002). Ausserdem fällt auch die im Vergleich zu nativer Humanhaut starke Streuung auf.

Tab. C.3: Vergleich der Lipidzusammensetzung im SkinEthic-Modell mit nativer Haut anhand von ausgesuchten Beispielen (Ponec et al. 2002)

	SkinEthic-Modell (Alter: Kulturtag 18)	Native Humanhaut*
Phospholipide	17 ± 10.6 % der totalen Lipidmenge	37 ± 4.1 % der totalen Lipidmenge
Ceramide	27 ± 12.2 % der totalen Lipidmenge Gegenüber nativer Haut verändertes Ceramid-Profil: - Ceramid 2 erhöht - Ceramide 5 und 6 reduziert - Ceramid 7 fehlt	12 ± 1.8 % der totalen Lipidmenge
Cholesterol	20 ± 9.5 % der totalen Lipidmenge	18 ± 3.2 % der totalen Lipidmenge

*Zum Entnahmeort und zum Donor der nativen Humanhaut sind keine Angaben vorhanden.

Die Lipidzusammensetzung ist u.a. wichtig für die Ausbildung und Struktur der interzellulären Matrix im Stratum corneum, was seinerseits für die Ausübung der Barrierefunktion der Epidermis entscheidend ist. Es existieren verschiedene Untersuchungen, welche für in vitro rekonstruierte Haut eine gegenüber nativer Haut reduzierte Barrierefunktion beschreiben und dafür eine unvollständige Ausbildung der Hautbarriere verantwortlich machen (Ponec et al. 2001; Netzlaff et al. 2005; Schafer-Korting et al. 2006). Dabei wäre gerade eine kompetente Hautbarriere ein wichtiges Kriterium für ein einsatzfähiges Hautmodell. Die Verbesserung der Barrierefunktion ist somit ein wichtiger Fokus bei der Weiterentwicklung und Optimierung der bereits existierenden in vitro-Hautmodelle.

Die Barriere von Vollhautmodellen wie dem Phenion FT-Modell entspricht der in vivo-Situation generell besser. Die Dermis stellt besonders für lipophile Stoffe eine effiziente Barriere dar. In vivo ist die Dermis allerdings mit Blutkapillaren durchzogen, was einen schnellen Abtransport von penetrierten Substanzen ermöglicht. Das Fehlen der Blutkapillaren in vitro führt seinerseits wieder zu einer Verfälschung von entsprechend generierten Penetrationsdaten (Netzlaff et al. 2005).

Tab. C.4: Vergleich der Barriereigenschaften des SkinEthic-Modells mit nativer Haut anhand von zwei Modellsubstanzen (Schafer-Korting et al. 2006); P_{app} = apparenter Permeabilitätskoeffizient, Lag Time = zeitliche Verzögerung bis zum Start der apparenten Permeation

	SkinEthic-Modell (Alter: Kulturtag 17)	Native Humanhaut Donor: ? zwischen 20-75-jährig Entnahmeort: Brust oder Bauch
Testosteron (lipophil)		
Permeierte Subst. Menge nach 6 h Inkubation ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	4.5 ± 0.57	0.3 ± 0.27
P_{app} (10^{-6} cm/s)	6.0 ± 1.17	0.4 ± 0.39
Lag Time (h)	0.1 ± 0.09	1.0 ± 2.52
Coffein (hydrophil)		
Permeierte Subst. Menge nach 6 h Inkubation ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	73.7 ± 36.58	1.1 ± 1.18
P_{app} (10^{-6} cm/s)	3.6 ± 1.91	0.1 ± 0.04
Lag Time (h)	0.1 ± 0.05	1.7 ± 1.48

Abschliessend kann ausgesagt werden, dass sowohl das SkinEthic- als auch das Phenion FT-Modell die Eigenschaften nativer Haut in ihren Grundzügen recht gut wiedergeben (Architektur, Stratifizierung). Doch auf zellbiologischer Ebene sind gegenüber nativer Haut deutliche Abweichungen erkennbar (Proteinexpression, Differenzierung, Lipidprofile). Unterschiede in der Barrierefunktion zum einen sowie im Verhalten gegenüber äusseren Reizen zum anderen sind somit zu erwarten.

C.1.3 Entzündungsreaktionen in der Haut

Eine Hautentzündung kann durch die verschiedensten Noxen ausgelöst werden. Als Beispiele sind hier die Reizung durch chemische Substanzen, UV-Strahlung sowie bakterielle Infektionen genannt. Art und Intensität der Noxe sowie individuelle Faktoren bestimmen die Aktivierung der verschiedenen Entzündungssysteme und damit den Charakter der ausgelösten Entzündungsreaktion. Der Entzündungsvorgang selbst ist eine Reaktion des Organismus und dient der Elimination der durch die Noxe entstandenen Gewebeschädigung und der Wiederherstellung der Homöostase.

Neben der externen Noxe kann auch eine fehlgeleitete oder überschüssige Immunreaktion (allergische Reaktion) für eine Hautentzündung verantwortlich sein.

C.1.3.1 Mechanismus der Hautentzündung

Die klassische Symptomatik der Entzündung ist generell durch die fünf Punkte „rubor, calor, tumor, dolor und functio laesa“ definiert. Zur Ausbildung des vollen Krankheitsbildes ist neben der Aktivierung von Mediatorokaskaden, was in den Keratinozyten der Epidermis selbst ablaufen kann, das Vorhandensein von auf Entzündungsreaktionen spezialisierten Zelltypen (Mastzellen, Langerhans-Zellen) sowie die Anbindung an den Blutkreislauf Voraussetzung.

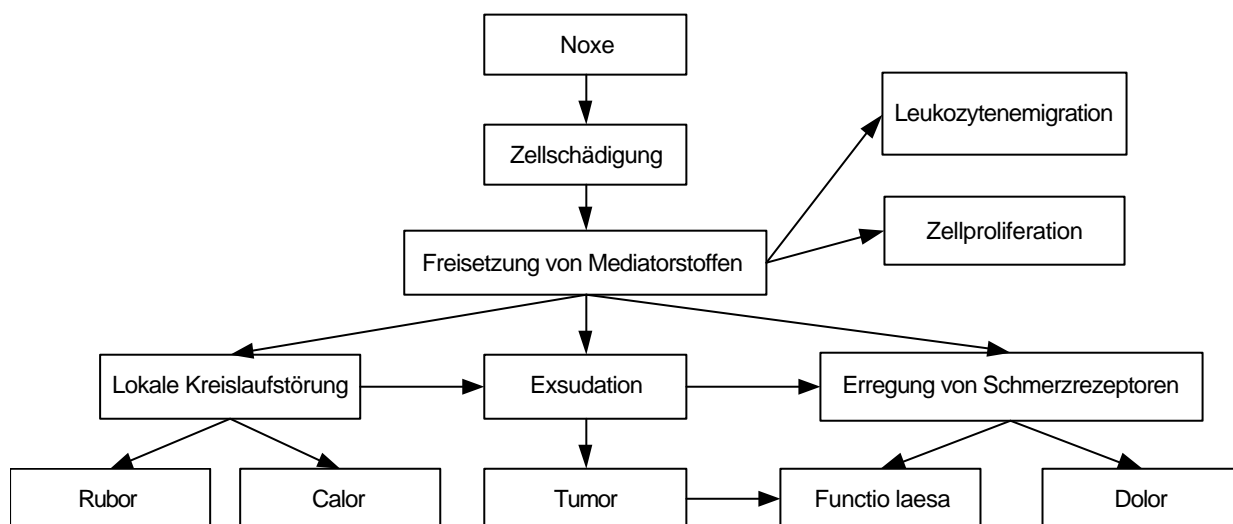


Abb. C.7: Pathogenese und Symptome der Entzündung allg. (Thews et al. 1991)

Nach erfolgter Zellschädigung durch eine Noxe wird in einem ersten Schritt die koordinierte und komplexe Freisetzung von Entzündungsmediatoren ausgelöst. Neben Wachstumsfaktoren und „klassischen“ Mediatoren wie Zytokinen, Chemokinen oder Prostaglandinen hat sich in jüngerer Zeit die Auffassung etabliert, dass auch in der Haut produzierte antimikrobielle Peptide, endokrine Hormone sowie durch sensorische Nervenzellen freigesetzte Neuropeptide massgeblich für das „fine-tuning“ der Hmöostase der Haut und die Steuerung der Entzündungsreaktion verantwortlich sind. Dieses Netzwerk aus Mediatoren verknüpft das sensorische Nervensystem und das endokrine System mit dem Immunsystem der Haut und ist essentiell für die kutane Immunantwort sowie für Wundheilungs- und Regenerationsprozesse. Alle genannten Substanzen werden entweder durch epidermale und dermale Hautzellen, sensorische Neuronen oder durch residierende respektive in die Haut einwandernde Immunzellen frei gesetzt (Peters et al. 2006). Dabei üben die Keratinocyten eine initierende, modulierende und regulierende Funktion aus (Barker et al. 1991; Steinhoff et al. 2001; Coquette et al. 2003).

Beispiele für Mediatorstoffe aus Keratinozyten sind inflammatorische Zytokine (Interleukin-1 alpha [IL-1a], Interleukin-1 beta [IL-1 β], Tumour necrosis factor-alpha [TNF-a]), chemotaktische Zytokine (Interleukin-8 [IL-8]), wachstumsfördernde Faktoren (Interleukin-6 [IL-6], Granulozyten-Makrophagen koloniestimulierender Faktor), wachstumsbeeinflussende Faktoren (TGF) sowie Zytokine, welche die humorale und die zelluläre Abwehr regulieren (Interleukin-10 [IL-10], Interleukin-12 [IL-12]) (Williams und Kupper 1996). Zur Zytokinwirkung bilden sich Regelkreise und komplexe Signalkaskaden. Durch para- und autokrine Wirkung wird infolgedessen die körpereigene Entzündungsmaschinerie mobilisiert. Eine wichtige Komponente dabei ist die Aktivierung von Immunzellen (Langerhanszellen in der Epidermis, Leukozyten aus dem Blut etc.).

Die Fibroblasten in der Dermis sind wichtig für die Verstärkung der durch die Keratinozyten ausgelöste Signalkaskade. Beispielsweise ist die in Fibroblasten synthetisierte TNF-a-Menge nach UV-Strahlung gegenüber derjenigen in Keratinozyten deutlich erhöht (de Kossodo et al. 1995). Auch IL-6 wird im Vergleich zu den Keratinozyten in Fibroblasten deutlich verstärkt exprimiert (Boxman et al. 1993).

Im Rahmen der Mediatorkaskade spielen IL-1a sowie TNF-a eine Schlüsselrolle. Nach erfolgter Zellschädigung gehören sie zu den ersten ausgeschütteten Zytokinen, wodurch ihnen eine für den Entzündungsmechanismus initiiierende Funktion zugeschrieben wird (primäre Zytokine) (Luger 1989; Kupper 1990; Corsini und Galli 1998). Im Zuge der nachfolgenden Reaktionskaskade wird die Expression von sog. Secondary Mediators induziert (IL-8, IL-6, Phospholipase A₂ [PLA₂] und viele mehr), welche ihrerseits weitere Impulse geben (Kupper 1989).

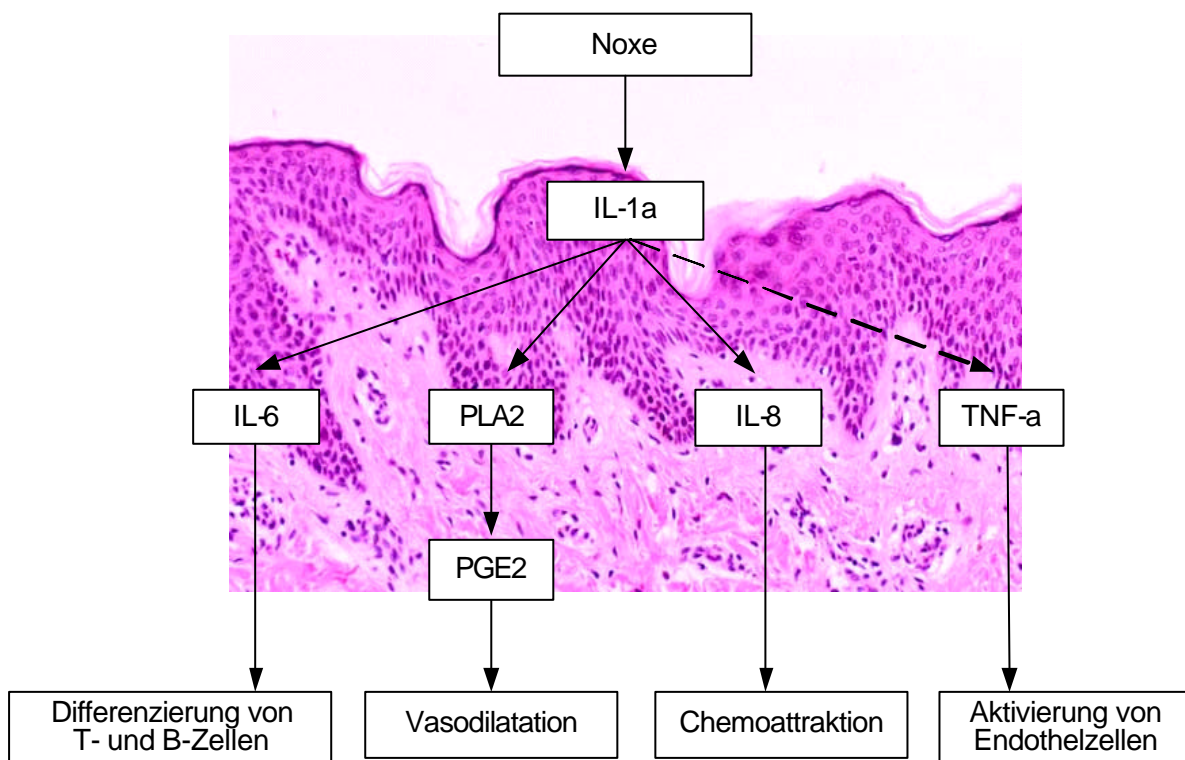


Abb.C.8: Ausschnitt aus der Entzündungskaskade in der Haut (Welss et al. 2004)

Im Folgenden wird auf die im Rahmen der vorliegenden Arbeit wichtigen Mediatorstoffe näher eingegangen.

C.1.3.1.1 Interleukin-1

Zu Interleukin-1 existieren die beiden Formen Interleukin-1a (IL-1a) und Interleukin-1 β (IL-1 β). Da in Keratinozyten das IL-1a dominiert (Williams et al. 2003), wird im Folgenden auf dieses fokussiert.

IL-1a, ein 31 kDa schweres Protein, wird physiologischerweise in Keratinozyten gebildet und ist gelöst im Zytoplasma oder membrangebunden über alle Epidermisschichten verteilt in grossen Mengen in biologisch aktiver Form gespeichert. Dieser Speicher eines primären Zytokins in den Keratinozyten an vorderster Front ermöglicht dem Organismus, nach Eintreten einer Noxe eine sofortige Abwehrreaktion auszulösen (Kupper und Groves 1995).

Obwohl IL-1a bereits in grosser Menge vorliegt, führen verschiedene Auslöser zu einer zusätzlichen de novo-Synthese. Die IL-1a-Expression wird durch den nukleären Transkriptionsfaktor Nuclear factor-kappa B (NF- κ B) vermittelt. Dieser wird einerseits durch körpereigenen Faktoren wie TNF-a (Kutsch et al. 1993), Interferon- γ , Gerinnungs- und Komplementfaktoren sowie durch Autostimulation (Dinarello 1996) aktiviert. Andererseits induzieren auch exogene Stimuli (UV-Strahlung, bakterielle Toxine, Oxidantien) die NF- κ B-Aktivität auf direktem Weg (Williams et al. 2003).

Zur Signalvermittlung bindet IL-1a an den IL-1 Rezeptor Typ I, der extrazellulär auf der Keratinozytenmembran präsentiert wird. Auf molekularer Ebene wird der IL-1a-Effekt wiederum auf dem NF- κ B-Weg (Stylianou et al. 1992) sowie auch über den Transkriptionsfaktor activating protein-1 (AP-1) (O'Neill und Greene 1998) vermittelt.

Für die Signalvermittlung muss IL-1a im Extrazellulärraum vorliegen. Da IL-1a jedoch über keine lipophile Signal-Sequenz verfügt, welche üblicherweise die Freisetzung durch intakte Zellmembranen ermöglicht, ist der genaue Freisetzungsmechanismus nach wie vor unklar und es werden verschiedene Varianten diskutiert: Oft ruft eine Noxe eine Schädigung der Zellmembran hervor (Bsp. Detergenzien). Das ungehinderte Austreten von IL-1a aus der zerstörten Zelle ist in diesem Fall der Auslöser der Entzündungsreaktion (Dinarello 1998). Es existieren aber auch Untersuchungen, wonach bereits mechanische Verformungen der Keratinozyten, möglicherweise durch einen vorübergehenden Bruch der Membran, zur IL-1a-Freisetzung führen können (Lee et al. 1997). Als weitere Möglichkeit wird der Transport von IL-1a an die Zelloberfläche nach Anlagerung von Myristyl-Gruppen gesehen. Das myristylierte IL-1a bleibt entweder mit dem Keratinozyten assoziiert und wirkt so parakrin auf direkt benachbarte Zellen (Dinarello und Wolff 1993) oder es wird enzymatisch von der Membran abgespalten und liegt extrazellulär in gelöster Form vor (Dinarello 1998). Auch die Spaltung des 31 kDa schweren IL-1a zu einer leichteren 17 kDa-Form durch die Protease Calpain soll die Freisetzung aus den Zellen ermöglichen (Williams et al. 2003). Die beiden letzteren Mechanismen entsprechen einer IL-1a-Freisetzung durch die intakte Zellmembran.

IL-1a ist ein primäres Zytokin. Das Aktionsspektrum ist demzufolge äusserst breit und kann nahezu jeden Zelltyp betreffen. Die multifunktionale Wirkung hat die Rekrutierung und Aktivierung von immunkompetenten Zellen zum Ziel (Dinarello 1998).

Innerhalb der Haut induziert IL-1a in den Keratinozyten und in den Fibroblasten die Expression von TNF-a sowie einer Reihe von sekundären Zytokinen und Chemokinen (u.a. IL-6 und IL-8). Daneben stimuliert es die Eigenproduktion (Kupper 1989) und die Synthese von für die Entzündungsreaktion wichtigen Enzymen (Cyclooxygenase-2 [COX-2], PLA₂ und inducible nitric oxide synthase [iNOS]) (Dinarello 1996). Ausserdem verstärkt IL-1a die Expression von Adhäsionsmolekülen auf dem Gefässendothel und ermöglicht so die Rekrutierung und Transmigration von Leukozyten durch die endotheliale Barriere (Kupper und Groves 1995). Systemisch induziert IL-1 unter anderem Fieber (zentralnervöses System), verstärkt die Proliferation von Thrombozyten und erhöht die Produktion von Akutphaseproteinen in der Leber (Fritsch 1998).

IL-1a ist ein sehr potentes proinflammatorisches Zytokin. Zum Schutz vor überschüssenden Entzündungsreaktionen existieren im Organismus somit zahlreiche, einander komplementierende Kontrollsysteme. Beispielsweise exprimieren unter anderem Keratinozyten den IL-1 Rezeptor Typ II (IL-1 sRII). Dieser präsentiert sich dem IL-1a an der Zelloberfläche, analog zum IL-1 Rezeptor Typ I (IL-1 sRI), doch fehlt der intrazelluläre Teil, der für die Signalvermittlung zuständig wäre. Die IL-1a-Rezeptor-Bindung bleibt somit ohne Effekt (Colotta et al. 1993; Re et al. 1996; Rauschmayr et al. 1997). Auch die Freisetzung von antiinflammatorisch wirkenden Mediatoren spielt eine wichtige Rolle. Neben Interleukin-10 und verschiedenen Neuropeptiden ist der IL-1 Rezeptor Antagonist (IL-1ra) zu erwähnen. Dieser wird durch Keratinozyten synthetisiert, ausgeschüttet und bindet mit ähnlicher Affinität an den IL-1 Rezeptor (Typ I und II) wie das IL-1a, allerdings ohne ein Signal auszulösen (Dinarello 1998). Zusätzlich findet eine Desensibilisierung von Zielzellen statt (z.B. durch Rezeptorinternalisierung) und freigesetzte Entzündungsmediatoren werden nach einer gewissen Zeit wieder aus dem Interzellularraum entfernt (z.B. Abbau durch Proteasen oder Aufnahme in Zellen durch Pinocytose und anschließende Lyse). Beispielsweise wird eine Reduktion der IL-1a-Aktivität aufgrund der Keratinozyten-Fibroblasten-Interaktion vermutet. IL-1a soll dabei rezeptorvermittelt in die Fibroblasten aufgenommen und anschließend abgebaut werden (Boxman et al. 1996).

Ein Ungleichgewicht innerhalb dieser Kontrollsysteme wird als Ursache für verschiedene entzündliche Hautkrankheiten, beispielsweise für Psoriasis, diskutiert (Groves et al. 1994).

Die Stimulierung von IL-1a-antagonisierenden Komponenten ist im therapeutischen Zusammenhang interessant. Beispielsweise soll die Expression des IL-1 sRII durch Glucocorticoide aufreguliert werden (Lukiw et al. 1999; Pousset et al. 2001).

Die IL-1a-Expression und Sekretion ist eng an die Keratinozyten geknüpft. Somit kann diese erste Stufe der Entzündungsreaktion sowohl im SkinEthic- und Phenion FT-Modell (vgl. C.1.2.2.3) als auch im Natskin-Modell (vgl. C.1.2.2.1) untersucht werden.

C.1.3.1.2 Tumour necrosis factor-a (TNF-a)

TNF-a, ein 17 kDa schweres Protein, liegt physiologischerweise gespeichert unter anderem in Mast- und Langerhanszellen vor (Gordon und Galli 1990). Durch adäquate Stimuli wird über die Aktivierung von NF- κ B auch eine de novo Synthese, beispielsweise in Keratinozyten, ausgelöst. Zum einen sind dies körpereigene Faktoren wie IL-1a (vgl. C.1.3.1.1) und Interferon- γ , zum anderen wird die TNF-a-Expression durch externe Einflüsse wie UV-Strahlung, chemische Irritantien (z.B. Tributylzinn) oder bakterielle Komponenten (z.B. Lipopolysaccharid) direkt angeregt (Kock et al. 1990). Es führt jedoch nicht jede bekanntermassen hautirritative Substanz zwangsläufig auch zu einer TNF-a-Aufregulation (Holliday et al. 1997).

TNF-a löst durch Bindung an die Rezeptoren TNF-R1 oder TNF-R2 seinerseits die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B aus (Trefzer et al. 1991). Als primäres Zytokin ist dessen Aktionsspektrum breit und ähnelt demjenigen von IL-1a (vgl. C.1.3.1.1). Durch die Kontrolle der Expression einer Vielzahl von Genen ist TNF-a wesentlich an der Organisation der Entzündungsreaktion in der Haut beteiligt. Eine entscheidende Schlüsselposition nehmen dabei die Kapillarendothelzellen der Haut ein, die nach Aktivierung durch TNF-a Adhäsionsmoleküle exprimieren und so die Extravasation von Leukozyten aus dem Blut ins Gewebe erleichtern (Groves et al. 1995). Daneben ist TNF-a nicht nur an der Entzündungsreaktion selbst, sondern auch an den nachfolgenden Reparaturmechanismen beteiligt (Banno et al. 2004).

Da Keratinozyten auf exogene Stimuli hin TNF-a de novo synthetisieren, eignet sich dieses Zytokin als Indikator zur Erfassung von Entzündungen in allen untersuchten Hautmodellen.

C.1.3.1.3 Interleukin-8 (IL-8)

IL-8 (oder CXCL8) ist ein relativ kleines Protein mit einer Masse von ca. 8 kDa. Die IL-8-Synthese erfolgt in vielen Zelltypen, darunter in Keratinozyten und in Fibroblasten. Auslöser für die IL-8-Synthese sind neben endogenen proinflammatorischen Stimuli wie IL-1a und TNF-a auch exogene Faktoren, zum Beispiel LPS (bakterielles Lipopolysaccharid), irritative Chemikalien (Coquette et al. 2003) und UV-Strahlung (Stein et al. 1997). Dabei kann die Induktion der IL-8-Expression ohne Vermittlung durch körpereigene Mediatoren erfolgen (Lin et al. 1994).

IL-8 ist ein Chemokin mit starkem chemotaktischem Effekt (Chemokin der CXC-Familie). Eine der Hauptaufgaben von IL-8 besteht in der Rekrutierung und Aktivierung von Monozyten und Neutrophilen (Barker et al. 1991). Die IL-8-Wirkung wird über CXCR1- und CXCR2-Rezeptoren vermittelt.

Boxman et al. haben gezeigt, dass die IL-8-Expression in Fibroblasten unter dem direkten Einfluss von IL-1a aus aktivierten Keratinozyten induziert wird. Dazu muss eine Mindestmenge an IL-1a vorliegen (Welss und Schröder 2003). Die in den Fibroblasten produzierte IL-8-Menge ist gegenüber derjenigen der Keratinozyten mindestens 100- bis 1000-fach erhöht. Dies lässt darauf schließen, dass die Keratinozyten-Fibroblasten-Interaktion eine wichtige Rolle in der Signalvermittlung respektive Signalverstärkung im Rahmen von inflammatorischen Reaktionen in der Haut spielt (Boxman et al. 1996).

Auch Keratinozyten sind an der IL-8-Synthese beteiligt. IL-8 sollte somit in den in vitro-Hautmodellen von SkinEthic und Phenion (vgl. C.1.2.2.3) sowie im ex vivo Hautmodell Natskin (vgl. C.1.2.2.1) in Reaktion auf eine irritative Noxe exprimiert werden. Aufgrund der viel höheren Expressionsrate in Fibroblasten werden im Phenion FT- und im Natskin-Modell entsprechend grössere IL-8-Mengen erwartet.

C.1.3.1.4 Interleukin-6 (IL-6)

IL-6, ein multifunktionales Protein mit einer Masse von 26 kDa, wurde zuerst in Fibroblasten entdeckt. Es hat sich aber gezeigt, dass IL-6 in vielen weiteren Zelltypen, unter anderem auch in Keratinozyten exprimiert wird (Sprecher und Becker 1992). Die IL-6-Expression wird durch eine Vielzahl von Faktoren auf- wie auch abreguliert. Eine Aufregulation erfolgt einerseits durch körpereigene Zytokine wie IL-1a und TNF-a und andererseits infolge exogener Stimuli wie bakterielle Endotoxine und UVB-Strahlung, wobei die Wirkung der letzteren indirekter Natur, d.h. vermittelt durch körpereigene Mediatoren sein dürfte (Wong und Clark 1988; Chung et al. 1996). Die Aufregulation wird dabei unter anderem durch den Transkriptionsfaktor NF- κ B vermittelt (Simon et al. 1994).

Das Wirkspektrum von IL-6 ist breit und zielt auf unterschiedliche Zelltypen ab. Wichtig ist u.a. der Einfluss auf die finale Differenzierung von B-Zellen zu antikörperpräsentierenden Immunzellen und die Erhöhung der Produktion von Akutphaseproteinen in der Leber (Van Snick 1990; Fritsch 1998). Daneben wird IL-6 eine stimulierende Wirkung auf die Keratinozyten-Proliferation zugeschrieben (Grossman et al. 1989).

Werden Keratinozyten und Fibroblasten gemeinsam kultiviert, steigt die IL-6-Expression unter dem direkten Einfluss des aus den Keratinozyten ausgeschütteten IL-1a sowohl in den Fibroblasten als auch in den Keratinozyten an. Dabei ist die IL-6-Synthese in Fibroblasten 100- bis 1000-fach höher als in Keratinozyten. Analog zu IL-8 (vgl. C.1.3.1.3) ist somit auch die IL-6-Synthese in den Fibroblasten wichtig für die Signalvermittlung respektive Signalverstärkung im Ablauf von Entzündungsreaktionen (Boxman et al. 1993; Boxman et al. 1996).

Obwohl IL-6 in vivo durch Keratinocyten synthetisiert wird, ist dieses Zytokin im SkinEthic-Modell nicht nachweisbar. Möglicherweise ist für eine IL-6-Expression in Keratinozyten deren Interaktion mit Fibroblasten erforderlich, was im SkinEthic-Modell jedoch fehlt (Welss et al. 2004). Das Phenion FT- und das Natskin-Modell sollten hingegen zur Erfassung von IL-6 als Entzündungsmarker geeignet sein.

C.1.3.2 Ursachen von Hautentzündungen

C.1.3.2.1 Hautentzündung durch chemische Irritantien

Diverse Chemikalien vermögen irritationsbedingte Hautentzündungen auszulösen. Das Irritationspotential der Substanzen ist dabei eng mit deren chemischer Struktur verknüpft. Es stehen besonders amphiphile Moleküle, beispielsweise Detergenzien und Emulgatoren, im Vordergrund. Innerhalb dieser chemischen Klasse ihrerseits wird eine Abhängigkeit des Irritationspotentials von der kritischen Mizellarkonzentration, der Struktur des lipophilen Alkylschwanzes und / oder der Ladung der hydrophilen Kopfgruppe diskutiert (Effendy und Maibach 1995). Daneben induzieren auch anorganische Stoffe wie Säuren, Basen und Salze irritationsbedingte Hautentzündungen.

Entsprechend den unterschiedlichen Strukturen von chemischen Irritantien werden unterschiedliche Mechanismen in der Auslösung von irritationsbedingten Hautentzündungen vermutet.

Chemikalien, insbesondere Tenside, können eine Schädigung der Barrierefunktion hervorrufen, indem sie die interzellulären Lipide des Stratum corneum herauslösen. Die Hautbarriere wird dadurch durchlässiger, was den transepidermalen Wasserfluss erhöht und weiteren potentiell schädlichen Substanzen (z.B. bakteriellen Toxinen) eine ungehinderte Penetration in tiefere Hautschichten ermöglicht.

Eine irritationsbedingte Hautentzündung kann auch durch die direkte Lyse der Zellmembran von Keratinozyten ausgelöst werden. Die lysierten Zellen setzen Zytokine frei (im Besonderen das proinflammatorische IL-1a), wodurch die Reaktionskaskade der Entzündungsreaktion in Gang gesetzt wird (vgl. C.1.3.1). Dieser Mechanismus wurde hauptsächlich anhand des anionischen Tensides Natriumlaurylsulfat (Natrium Dodecyl Sulfat, SDS) untersucht, welches in vielen Studien als Modell- respektive Referenzirritans dient (Lee und Maibach 1995; Tupker et al. 1997).

Als etwas sanfterer Mechanismus ist eine nicht destruktive Interaktion von Substanzen mit der Zellmembran denkbar. Ohne gleich zur Lyse zu führen wird dabei die Fluidität der Membran beeinflusst, was seinerseits ein rezeptorvermitteltes proinflammatorisches Signal zur Folge hat. Ein solches Verhalten wird beispielsweise einigen Fettsäuren zugeschrieben (Fulbright et al. 1997). Auch ein direktes Interagieren mit Rezeptorproteinen, meist aufgrund von nicht-spezifischer Affinität, wird vermutet (Chou et al. 2003).

Einige Irritantien sollen schliesslich die Expression von ROS (reactive oxygen species) in Keratinozyten erhöhen. ROS, namentlich Sauerstoffionen, freie Radikale und Peroxide, sind physiologischer Weise in Keratinozyten präsent. Erhöhte ROS-Konzentrationen führen jedoch zur Schädigung von Zellstrukturen sowie zu einer veränderten Genexpression. Beschrieben ist in diesem Zusammenhang die verstärkte IL-1a-Expression (Corsini et al. 1996). Als Beispiel für diesen Irritationsmechanismus kann Tributylzinn (TBT), ein industriell genutztes Biozid und bekanntes Irritans für Mensch und Tier, genannt werden (Corsini et al. 1996; Corsini et al. 1997b).

Die meisten Irritantien wirken durch eine Kombination der erwähnten Mechanismen (Welss et al. 2004).

C.1.3.2.2 Hautentzündung durch UV-Strahlung

Sonnenstrahlung und die Haut

Das Sonnenlicht setzt sich aus ultravioletter (UV) Strahlung, sichtbarem Licht und Infrarotstrahlung zusammen. Beim Eintritt in die Erdatmosphäre wird die Strahlung durch Streuung und Absorption wesentlich abgeschwächt. Insbesondere die kurzwellige und energiereiche UVC-Strahlung wird in der Stratosphäre durch molekularen Sauerstoff (O₂) abgefangen, wobei Ozon (O₃) gebildet wird.

Die nachfolgende Tabelle zeigt die durchschnittliche Zusammensetzung des auf der Erdoberfläche eintreffenden Sonnenlichts, wobei diese durch Faktoren wie Jahres- und Tageszeit, Breitengrad, Gelände (Meer, Berg) oder Luftverschmutzung wesentlich beeinflusst werden kann.

Tab. C.5: Prozentuale Zusammensetzung des auf der Erdoberfläche eintreffenden Sonnenlichts (Kindl und Raab 1998)

Bereich	Anteil (%)
UVA-Strahlung	5.6
UVB-Strahlung	0.4
Sichtbares Licht	52.0
Infrarot-Strahlung	42.0

Die Wirkung von Sonnenstrahlung auf die Haut hängt wesentlich von deren Wellenlänge, Dosis und Eindringtiefe ab. Je kürzer die Wellenlänge, desto energiereicher ist die Strahlung und desto grösser ist damit die biologische Wirksamkeit. Die Wellenlänge entscheidet auch über die Eindringtiefe in die Haut. Lange Wellen dringen stärker und tiefer in die Haut ein.

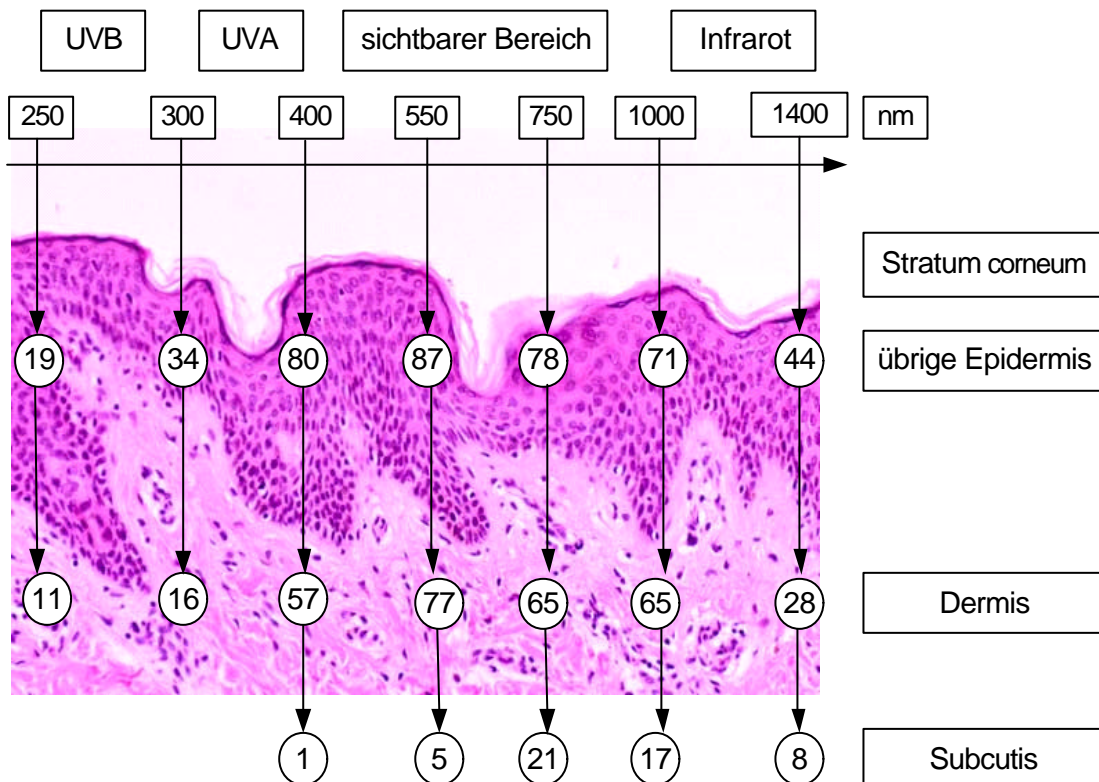


Abb. C.9: Eindringtiefe von Strahlung (UV / VIS, Infrarot) in die Haut, Angabe der Menge (%) der jeweilige Hautschicht erreichenden Photonen (Kindl und Raab 1998)

Die Graphik zeigt, dass epidermale Zellen dem gesamten UV-Spektrum ausgesetzt sind, während dermale Zellen hauptsächlich durch UVA-Strahlung erreicht werden.

UV-Strahlung und die Haut

Die Wellenlänge der UV-Strahlung erstreckt sich über einen Bereich von 10 – 400 nm. Gebräuchlich ist die folgende Einteilung: Vakuum-UV (10 – 200 nm), UVC (200 – 290 nm), UVB (290 – 320 nm), UVA II (320 – 340 nm) und UVA I (340 – 400 nm) (Kochevar und Taylor 2003).

Die folgende Tabelle gibt einen Überblick über die klinisch relevante Wirkung von UV-Strahlung auf die Haut:

Tab. C.6: Überblick zur klinisch relevanten Wirkung von UV-Strahlung auf die Haut (Stege und Mang 2006)

Bereich	Wellenlänge	Klinisch relevante Wirkung auf die Haut
UVA II UVA I	320 - 340 nm 340 - 400 nm	<ul style="list-style-type: none"> - Sofortige, aber nur kurzfristige Bräunung (direkte Pigmentierung). Bräunung via Oxidation von bereits in der Haut vorhandenem Promelanin zu Melanin. Die durch UVA-Strahlung erzeugte Bräunung bietet keinen längerfristigen UV-Schutz. - Hautalterung und Faltenbildung. Die tief in die Haut eindringende UVA-Strahlung schädigt in der Dermis die für die Festigkeit und Elastizität verantwortlichen Kollagen- und Elastinfasern. - Lichtbedingte Hautausschläge und Sonnenallergie. - Erhöhte Hautkrebsgefahr. Mutagene Wirkung aufgrund von DNA-Schädigung. - Nur geringe Erythemwirkung.
UVB	290-320 nm	<ul style="list-style-type: none"> - Langsame und anhaltende Bräunung (indirekte Pigmentierung) Bräunung via Neusynthese von Melanin in den Melanocyten. Die erhöhte Melaninmenge bewirkt einen längerfristigeren UV-Schutz. - Aufbau der Lichtschwiele (Verdickung des Stratum corneums). - Erhöhte Hautkrebsgefahr. Mutagene Wirkung aufgrund von DNA-Schädigung. - Erythemwirkung. - Bildung des antirachitischen Calciferols (Vitamin D).
UVC	200-290 nm	UVC-Strahlung wird in den obersten Luftschichten der Erdatmosphäre abgefangen und dringt nicht bis an die Haut.

Voraussetzung für eine biologische Wirkung von UV-Strahlung auf die Haut ist deren Absorption auf molekularer Ebene. Die aufgenommene Energie versetzt die Moleküle in einen angeregten, metastabilen Zustand, der durch chemische Umlagerung wieder stabilisiert werden muss. Die veränderte chemische Struktur der resultierenden Fotoprodukte hindert die betroffenen Moleküle an der Ausübung ihrer zellbiologischen Funktion. Auf diesem Weg entstehen beispielsweise strukturelle Zellschäden; vgl. Schädigung von Zellmembranen durch hochdosierte UVB-Strahlung (Kondo et al. 1994). Auch die DNA ist ein Chromophor. Nach der Absorption von UV-Strahlung steht die Ausbildung von Cyclobutanpyrimidin-Dimeren (CPD) und (6-4)-Fotoprodukten im Vordergrund (Walker et al. 2003). Die Transkription der veränderten DNA ist entsprechend gestört. Die Schädigung durch direkte Interaktion wird hauptsächlich durch UVB-Strahlung verursacht.

Nach der Aufnahme von Strahlungsenergie kann ein angeregtes Molekül auch unter der Bildung von freien Radikalen photolytisch gespalten werden. Besonders wichtig hierbei ist die Bildung von reaktiven Sauerstoffverbindungen (reactive oxygen species, ROS) (Tyrell 1996; Scharffetter-Kochanek et al. 1997). Unter ROS versteht man ein freies Radikal oder einen Stoff, der sich ähnlich einem Radikal verhält. Zu den reaktiven Sauerstoffverbindungen gehören u.a. der Singulett-Sauerstoff (1O_2), das Superoxidanion ($O_2^{\cdot-}$) sowie Wasserstoffperoxid (H_2O_2). Aufgrund ihrer hohen Reaktivität interagieren ROS relativ wahllos mit Molekülen in ihrer Umgebung. ROS oxidieren Proteine und / oder Lipide, was zu strukturellen Zellschäden führt. Sie beeinflussen auch die Genexpression. Unter anderem wird die Transkription von Tumorsuppressorgenen und Onkogenen ab- respektive aufreguliert, die das Zellwachstum, die zelluläre Alterung und die Zelltransformation in einen malignen Phänotyp steuern. Daneben spielt die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B eine bedeutende Rolle. NF- κ B kontrolliert die Expression einer Vielzahl von Genen, die in die kutane Entzündungsreaktion involviert sind (Grandjean-Laquerriere et al. 2002). Wichtig in diesem Zusammenhang ist die Steigerung der de novo-Synthese der Zytokine IL-1 α (Kupper et al. 1987; Griswold et al. 1991; Corsini et al. 1997a; Luo et al. 2004) und TNF- α (Oxholm et al. 1988; Kock et al. 1990; Pupe et al. 2003), was sich klinisch als irritationsbedingte Hautentzündung manifestieren kann (Tyrell 1996; Scharffetter-Kochanek et al. 1997). Die indirekte Schädigung über die Bildung von aggressiven photolytischen Spaltungsprodukten ist sowohl auf UVA- als auch auf UVB-Strahlung zurückzuführen.

UV-bedingte Hautschädigung ist histologisch an der Bildung von dyskeratotischen Keratinozyten mit pyknotischem Kern, so genannten Sonnenbrandzellen (Sunburn Cells), zu erkennen. Weitere Indikatoren sind der Verlust von Zell-Zellkontakten, Vakuolenbildung, geschädigte Mitochondrien und eine generelle Zellschrumpfung (Giacomoni et al. 1998).



Abb. C.10: Ausbildung von Sonnenbrandzellen und Auflockerung des Zell-Zellkontakts insbesondere im Stratum basale, Phenion® Full Thickness Skin Model nach UV-Bestrahlung (Dosis 125mJ/cm²), Vergrößerung 400-fach, Hämalaun-Eosin-Färbung (Spirig Pharma AG, Egerkingen, Schweiz)

Die Haut kann UV-bedingte Schäden bis zu einem gewissen Mass reparieren. Sie verfügt über verschiedene enzymatische Reparatursysteme sowie über antioxidative Abwehrmechanismen gegen ROS (z.B. Glutathionperoxidase). Kommt es aber zu einer Überlastung dieser Mechanismen, wird die Haut bei einmaliger Strahlenexposition akut (Erythembildung), bei wiederholter Belastung dagegen chronisch geschädigt (Bildung von Hautkrebs, Hautalterung und Faltenbildung) (Murphy 1999).

UV-Strahlung beeinflusst auch das kutane Immunsystem. Einerseits ist eine immunsuppressive Wirkung vorhanden. In diesem Zusammenhang wird unter anderem die Anzahl von Langerhanszellen in der Haut reduziert sowie deren Fähigkeit, Antigene zu präsentieren vermindert. Zusätzlich hat UV-Licht eine hemmende Wirkung auf T-Zellen. Andererseits kann das Immunsystem unter UV-Einfluss entgleisen, was in einer photoallergischen Reaktion mündet (Epstein 1997).

C.1.3.3 Untersuchung der Hautentzündung anhand von in vitro-Modellen

Viele der oben beschriebenen Erkenntnisse zur Hautentzündung sind dank Untersuchungen an in vitro-Modellen gewonnen worden. In den 80er und 90er Jahren des letzten Jahrhunderts erfolgten die Studien an Keratinozyten und / oder Fibroblasten in Zellkultur. In neuerer Zeit konnten die Experimente anhand von in vitro rekonstruierten Hautmodellen durchgeführt werden.

Mittlerweile existieren zahlreiche Arbeiten, welche den Effekt von Chemikalien auf in vitro rekonstruierte Hautmodelle zum Gegenstand haben. Vor dem ethischen Hintergrund zukünftig vollständig auf Tierversuche zu verzichten, steht dabei meist die Entwicklung und Standardisierung eines in vitro-Modells zur Erfassung, Charakterisierung und Einteilung von potentiell irritativen, korrosiven, allergisierenden oder phototoxischen Chemikalien im Zentrum (vgl. auch C.1.2.2) (Berhofer et al. 1999; Coquette et al. 2003; Tornier et al. 2005).

Die UV-Wirkung auf in vitro rekonstruierte Haut wurde bisher weniger intensiv untersucht. Beispielsweise zeigten Gelis, Girard et al. die Eignung von in vitro rekonstruierter Haut zur Überprüfung der UV-Schutzwirkung von Sunblockern (Gelis et al. 2003), Corsini, Sangha et al. demonstrierten Unterschiede in der Eindringtiefe von UVA- und UVB-Strahlung (Corsini et al. 1997a) und Zöller, Mewes et al. untersuchten den antiphlogistischen Effekt von Glucocorticoiden auf in vitro-Haut, welche vorgängig mittels UV-Strahlung irritiert worden ist (Zöller et al. 2006).

Einen Überblick über den Stand der Technik zum Einsatz von in vitro-Modellen für die Untersuchung der Hautentzündung geben Welss, Basketter et al. (Welss et al. 2004). Da Keratinozyten im Rahmen von Entzündungsprozessen eine entscheidende Rolle spielen, halten Welss, Basketter et al. den Einsatz der aktuell am Markt verfügbaren in vitro-Hautmodelle grundsätzlich für sinnvoll. Jedoch, zur Ausbildung des vollen Krankheitsbildes ist neben der Aktivierung von Mediatororkaskaden, was in den Keratinozyten der Epidermis selbst ablaufen kann, das Vorhandensein von auf Entzündungsreaktionen spezialisierten Zelltypen (Mastzellen, Langerhans-Zellen) sowie die Anbindung an den Blutkreislauf Voraussetzung. Es kann also nicht die klassische Entzündungssymptomatik diagnostiziert und analysiert werden. Die Wahl von adäquaten Prüfparametern ist somit essentiell und die gesetzten Möglichkeiten und Grenzen des jeweiligen in vitro-Hautmodells müssen bei der Interpretation der Daten berücksichtigt werden.

Vor diesem Hintergrund beschreiben Welss, Basketter et al. die folgenden Biomarker respektive Prüfungen für die Beurteilung des kutanen Entzündungszustandes als geeignet: LDH-Freisetzung (Indikator für die Plasmamembranintegrität), MTT-Umsatz (Mass für die Anzahl an metabolisch aktiven Zellen), IL-1a, IL-1ra, IL-6 (nur im Vollhautmodell), IL-8, TNF-a, IL-10, Prostaglandin E₂ (PGE₂) sowie Calcium-Ionen (Ca²⁺). Für eine zuverlässige Beurteilung eines entzündlichen Zustandes sollen immer mindestens zwei, besser mehrere Prüfparameter berücksichtigt werden.

Neben der Wahl der passenden Prüfparameter ist die Festlegung eines sinnvollen Versuchsdesigns genauso entscheidend. Der Bereich, innerhalb dem aussagekräftige Daten generierbar sind, ist oft sehr eng. Zum einen muss das Irritans, ob Chemikalie oder UV-Strahlung, für einen detektierbaren Effekt hoch genug dosiert werden, darf jedoch nicht überdosiert sein und das Hautmodell zerstören. Zum anderen muss der biologisch dynamischen Natur des Prüfsystems Rechnung getragen werden. Die richtige Wahl von Inkubationszeit und Analysenzeitpunkt sind somit grundlegend.

Die Hautmodelle selbst werden stetig verbessert, d.h. ihre Eigenschaften werden mehr und mehr der in vivo Situation nachempfunden. Dies umfasst unter anderem die Verbesserung der Barrierefunktion sowie das Einfügen von immunkompetenten Zelltypen (vgl. C.1.2.2.3). Daneben wird laufend nach noch aussagekräftigeren Prüfparametern gesucht. Eine Möglichkeit ist die Erfassung von Expressionsprofilen mittels cDNA Array Technik (Fletcher et al. 2001) oder mittels Differential Display PCR Technik (Corsini et al. 2002). Auf diesem Weg können Gene detektiert werden, deren Rolle im Rahmen der Entzündungsvorgänge bislang unbekannt war, oder es kann spezifisch zwischen den Effekten von unterschiedlichen Noxen differenziert werden.

C.1.4 Hautpenetration / Hautpermeation

C.1.4.1 Wege in und durch die Haut

Die Haut bildet eine natürliche Barriere und schützt den Körper vor externen Einflüssen (vgl. C.1.1). Etwas in oder gar durch die Haut zu befördern, ist somit physiologischerweise nicht vorgesehen.

Aus pharmazeutischer Sicht bietet die Haut und ihre Barrierefunktion eine grosse Herausforderung. Wie gut ein Wirkstoff in die Haut penetrieren soll, hängt stark vom therapeutischen Ziel ab. Steht die transdermale Applikation von systemisch wirksamen Therapeutika im Fokus, so ist eine möglichst schnelle und vollständige Hautpermeation erwünscht (z.B. Hormonsubstitution in der Menopause, Verabreichung von Nicotin bei der Raucherentwöhnung). Dasselbe gilt für die lokale Therapie von entzündlichen Schmerzzuständen des Bewegungsapparates (z.B. NSAID oder Heparin bei Sportverletzungen). Soll hingegen die Haut selbst behandelt werden, wird zwar ein Penetrieren, zur Vermeidung von potenziellen systemischen Nebenwirkungen nicht aber ein Permeieren des Wirkstoffes durch die Haut angestrebt (z.B. Glucocorticoide bei Dermatitiden unterschiedlicher Genese). Ein besonderes Beispiel hierzu ist die Applikation von Sonnenschutzpräparaten, welche zur Entfaltung ihrer Wirkung sogar vollständig auf der Hautoberfläche verbleiben sollen.

Wird ein arzneistoffhaltiges Präparat auf die Haut aufgetragen, verläuft die Penetration / Permeation in mehreren Schritten.

Als erstes wird der Wirkstoff aus der Formulierung freigesetzt, d.h. es findet eine Verteilung zwischen dem Vehikel und dem Stratum corneum statt. Diese Verteilung ist abhängig von der Konzentration an gelöstem Wirkstoff in der Formulierung sowie von der Affinität des Wirkstoffes zum Vehikel einerseits und zum Stratum corneum andererseits (Verteilungskoeffizient, $\log P$) (Sucker et al. 1991).

In einem zweiten Schritt diffundiert der Wirkstoff entlang einem Konzentrationsgefälle durch das Stratum corneum. Dieser Diffusionsprozess ist passiv, da die metabolisch inaktiven Korneozyten über keine aktiven Transportmechanismen verfügen (Sucker et al. 1991). Das Stratum corneum stellt die Hauptbarriere für die Aufnahme topisch applizierter Arzneistoffe dar. Es werden drei Penetrationswege diskutiert (Schaefer und Redelmeier 1996):

- interzellulär (durch die Lipidmatrix unter Umgehung der Korneozyten)
- transzellulär (abwechselnd durch die Korneozyten und durch die multilamellare Lipidmatrix)
- via Hautanhangsgebilde (Haarfollikel, Schweiss- und Talgdrüsen)

Welcher Weg ein jeweiliges Molekül wählt, hängt von dessen Verteilungskoeffizient ($\log P$), dessen Grösse und von einer allfälligen Ladung ab. Hydrophile Substanzen halten sich eher im wässrigen, intrazellulären Milieu auf und bevorzugen somit den transzellulären Weg. Lipophile Wirkstoffe ($\log P > 2$) bewegen sich hingegen vornehmlich innerhalb der Lipidschichten des Interzellulärraums fort. Für die meisten Substanzen spielen beide Wege eine Rolle. Verschiedene Untersuchungen belegen jedoch, dass die interzelluläre Route durch die Lipidmatrix für Arzneistoffe generell von grösserer Bedeutung ist (Potts und Francoeur 1991). So konnte beispielsweise durch optische Methoden (z.B. confocal laser scanning microscopy) das Diffusionsverhalten von verschiedenen Substanzen durch die multilamellaren Lipidstrukturen sichtbar gemacht werden (Simonetti et al. 1995).

Die meisten topisch applizierten Wirkstoffe werden bei ihrer Hautpassage zum Teil an dort lokalisierte Proteine reversibel gebunden (über Van der Waals'sche Kräfte und Wasserstoffbrücken) (Niedner und Ziegenmeyer 1992). Beispielsweise kann die Hautpermeation von Glucocorticoiden durch die Adsorption an Keratin verlangsamt sein, was unter anderem zur Bildung eines entsprechenden Wirkstoffdepots im Stratum corneum führt (Barry 1983).

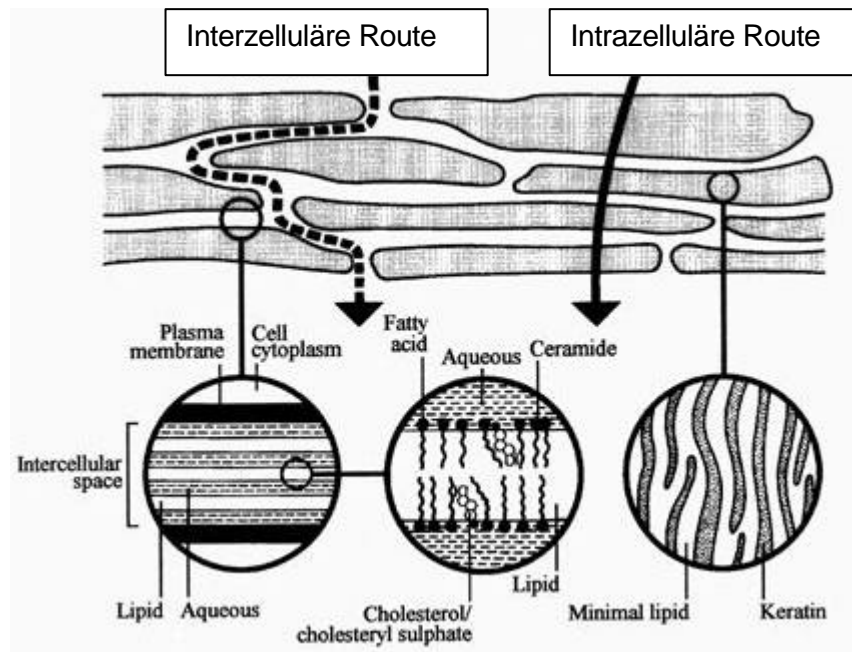


Abb. C.11: Intrazellulärer und interzellulärer Penetrationsweg durch das Stratum corneum (Schaefer und Redelmeier 1996)

Die Hautpenetration über die Hautanhangsgebilde umgeht das Stratum corneum (shunt route). Obwohl dies eine stark vereinfachte Penetration erlaubt, wird dem transfollikulären bzw. transglandulären Weg eine geringe Bedeutung bei der Hautpermeation von Arzneistoffen beigemessen. Mit rund 0.1 % nehmen die Hautanhangsgebilde nur einen kleinen Teil der gesamten Hautoberfläche ein. Für grosse polare oder ionische Moleküle, welche kaum durch das Stratum corneum selbst penetrieren, stellen die Hautanhangsgebilde dennoch den Hauptpenetrationsweg dar (Williams und Barry 1992).

Ist das Stratum corneum einmal überwunden tritt ein permeierendes Molekül in einem dritten Schritt aus dem Stratum corneum in die tieferen Schichten der Epidermis und in die Dermis über. An der Grenzfläche Stratum corneum / lebender Teil der Epidermis wechselt das Milieu von vornehmlich lipophil zu stärker hydrophil. Demzufolge sind für den Übergang der permeierenden Substanz und für die weitere Passage deren hydrophile Eigenschaften ausschlaggebend. Sind diese gering, kann sich der Wirkstoff im unteren Bereich der Hornschicht stauen und dort ein Depot ausbilden (Niedner und Ziegenmeyer 1992). Neben der passiven Diffusion kann eine Substanz in der tieferen Epidermis und in der Dermis zunehmend einem aktiven Transport unterworfen sein. Je nach Substanz ist diese auch Substrat für metabolische Prozesse (Sucker et al. 1991).

In einem vierten und letzten Schritt tritt das permeierende Molekül in die in der Dermis vorhandenen Blut- und Lymphgefäße über, worauf eine systemische Wirkstoffverteilung erfolgt. Das Molekül kann sich auch entlang dem Konzentrationsgradienten in die Subkutis ausbreiten.

Die Haut stellt somit eine äusserst komplexe Membran dar. So ist es umso erstaunlicher, dass der Substanzfluss trotzdem mit Hilfe der einfachen Diffusionsgesetze beschrieben werden kann. Im Steady State und unter Berücksichtigung von einigen Randbedingungen (infinite dose, sink condition, Diffusion ausschliesslich passiv etc.) kann das erste Fick'sche Gesetz angewendet werden:

$$J = -D \frac{dc}{dx}$$

1. Fick'sches Gesetz (Sucker et al. 1991)

J = Fluss durch die Membran (Haut)

D = Diffusionskoeffizient

$\frac{dc}{dx}$ = Konzentrationsgradient

Die Penetration / Permeation durch die Haut hängt von den folgenden Faktoren ab:

Hautzustand

Eine zentrale Rolle spielt die Integrität der Haut. Hautverletzungen jeglicher Art oder reduzierte Barriereigenschaften aufgrund eines entzündlichen Zustands oder nach Kontakt mit Lösungsmitteln erhöhen die Hautpermeabilität dramatisch. Umgekehrt kann ein hyperkeratotischer Zustand (z.B. Hautschwielen) die Penetration verringern (Sucker et al. 1991).

Neben dem Alter, dem Geschlecht oder der Rasse ist der Applikationsort ebenso wichtig. Beispielsweise ist das Hautareal hinter dem Ohr geeignet für die Applikation von transdermalen Arzneiformen, da die Haut an dieser Stelle besonders dünn ist (z.B. ehemals Scopoderm TTS® zur Therapie der Reisekrankheit). Die Fusssohle oder auch die Handinnenfläche sind aufgrund einer deutlich verdickten Hornschicht hingegen wesentlich impermeabler (Sucker et al. 1991).

Auch der Hydratationszustand der Haut ist entscheidend. Dieser hängt beispielsweise von der Hautpflege oder von der Luftfeuchtigkeit ab. Durch die Wahl des Vehikels und durch zusätzliche Applikation einer Okklusion (z.B. Pflaster) kann die Hydratation und damit in den meisten Fällen auch die Hautpermeabilität noch zusätzlich erhöht werden (Dayan 2005).

Moleküleigenschaften

Wie bereits erwähnt, ist der Verteilungskoeffizient der Substanz entscheidend. Dabei penetrieren diejenigen Moleküle, welche ein ausgeglichenes Verteilungsverhalten zeigen (Log P zwischen 1 bis 3), generell am besten (Hadgraft und Lane 2005). Aufgrund der Lipidlöslichkeit verteilen sich diese Substanzen in die Lipide des Interzellulärraums und diffundieren auf dem interzellulären Weg. Dank der Eigenschaft, sich partiell ebenso im hydrophilen Milieu zu lösen, steht den Molekülen auch der transzelluläre Weg offen.

Zur Molekülgrösse wurde die 500 Dalton-Regel aufgestellt. Diese besagt, dass für eine quantitativ relevante Hautpenetration das Molekulargewicht des Wirkstoffes maximal 500 Dalton betragen darf (Bos und Meinardi 2000).

Galenik des Vehikels und Wechselwirkungen mit dem Wirkstoff

Jedes Vehikel übt eine gewisse Eigenwirkung auf den Hautzustand aus (Vehikeleffekt). Zum einen wird dadurch die Hautpermeation / -penetration beeinflusst (vgl. Hydratation und chemische Enhancer), zum anderen wird auch eine therapeutische Wirkung erzielt (Übersicht zu den verschiedenen dermatologischen Grundlagen siehe C.2).

Zwischen dem Vehikel und dem Wirkstoff bestehen Wechselwirkungen. Diese sind entscheidend für die Wirkstofffreisetzung und somit für die Penetration / Permeation (Niedner und Ziegenmeyer 1992).

Im Vordergrund steht dabei, ob der Arzneistoff in gelöster oder in suspendierter Form vorliegt. Dies hängt davon ab, ob das Vehikel ein entsprechend geeignetes Lösungsmittel enthält und allenfalls vom gewählten pH-Wert. Nur gelöste Moleküle sind thermodynamisch aktiv. Wurde der Wirkstoff in eine Formulierung einsuspendiert, so ist dessen Korngrösse massgebend. Bei kontinuierlicher Wirkstoffabgabe aus dem Vehikel an die Haut entscheidet in diesem Fall die Korngrösse über die Auflösungsgeschwindigkeit der Partikel und somit über die „Nachlieferung“ an frei verfügbarem Wirkstoff.

Ist ein Vehikelsystem mehrphasig, so wird die Wirkstofffreisetzung einerseits durch die Verteilung des Wirkstoffs zwischen den Phasen und andererseits durch die Phasenlage innerhalb des Systems bestimmt. Es können nämlich nur diejenigen Moleküle in die Haut hinein diffundieren, welche sich in der Phase aufhalten, die im direkten Kontakt zum Stratum corneum steht. Beispielsweise wird eine ausgeprägt lipophile Substanz mit deutlicher Affinität zur Ölphase aus einer W/O-Emulsion wesentlich schneller an die Haut abgegeben als aus einer O/W-Emulsion.

Ein weiterer Faktor, der die Wirkstofffreisetzung beeinflusst, ist die Viskosität des Vehikels. In Hydrogelen beispielsweise tritt das Wasser mit dem Gerüstbildner in Wechselwirkung. Die Beweglichkeit der Wassermoleküle ist dadurch eingeschränkt und somit auch die Mobilität der darin gelösten Wirkstoffteilchen.

Ferner spielen Interaktionen zwischen dem Wirkstoff und einzelnen Komponenten innerhalb der Formulierung eine Rolle. Dermatika enthalten meist Zusatzstoffe wie Chelatbildner, Konservierungsmittel und Antioxidantien. Jeder dieser Hilfsstoffe kann die Freisetzungseigenschaften des Präparates modifizieren (Niedner und Ziegenmeyer 1992).

Dem Aspekt, dass sich das Vehikel nach Applikation sehr bald verändert, wird im Allgemeinen zuwenig Rechnung getragen. Diese Veränderung richtet sich nach der Zusammensetzung und nach den Eigenschaften des applizierten Präparates. Eher flüchtige Vehikelbestandteile verdunsten, einzelne Inhaltsstoffe dringen in die Haut ein (analog dem Wirkstoff) und /oder Hautsekrete und Komponenten aus dem Stratum corneum werden vom Vehikel aufgenommen. Die Situation innerhalb der Formulierung kann sich dadurch dramatisch ändern. Beispielsweise fällt ein ursprünglich gelöster Wirkstoff aus und /oder eine Emulsion erfährt eine Phasenumkehrung.

C.1.4.2 Techniken zur Beeinflussung der Penetration / Permeation

Für viele Anwendungen ist die Verbesserung der Penetration / Permeation erwünscht. So wurden in der Vergangenheit respektive werden auch heute noch zahlreiche Strategien mit diesem Ziel erarbeitet. Ist jedoch die Haut selbst das therapeutische Zielorgan, will man im Sinne eines Drug Targetings wohl eine Penetration erreichen, eine Permeation hingegen vermeiden (vgl. C.1.4.1). Diese Fragestellung ist bis heute weitaus seltener Gegenstand von wissenschaftlichen Untersuchungen.

Erhöhung der Hauthydratation

Die Erhöhung der Hauthydratation ist der einfachste und damit der am häufigsten gewählte Weg zur Verbesserung der Hautpermeabilität. Durch starke Hydratation wird die normalerweise kompakte Struktur des Stratum corneums aufgelockert und insbesondere hydrophilere und auch etwas grössere Moleküle dringen vereinfacht in die Haut ein. Der Wassergehalt des Stratum corneums wird entweder durch Zufuhr von aussen durch Abgabe aus dem Vehikel oder durch Reduktion des transepidermalen Wasserverlustes mit Hilfe von Okklusion erhöht (Barry 2001).

Übersättigung (Supersaturation)

In übersättigten Systemen ist die thermodynamische Aktivität eines Wirkstoffes erhöht, d.h. aufgrund eines maximalen Wirkstoffgradienten über die Membran wird der Fluss forciert (vgl. Fick'sches Gesetz). Übersättigte Systeme sind allerdings thermodynamisch instabil. Die Verhinderung der Wirkstoffausfällung stellt eine besondere galenische Herausforderung dar (Pellet et al. 2003).

Chemische Penetrationsenhancer

Es existieren verschiedene Gruppen von chemischen Penetrationsenhancern, denen unterschiedliche Wirkmechanismen zugrunde liegen.

Lösungsvermittelnde Enhancer wie Alkohole, Alkylmethylsulfoxide und Polyole erhöhen die Löslichkeit des Wirkstoffs in den Hautlipiden und beeinflussen dadurch den Verteilungskoeffizienten zu Gunsten des Stratum corneum. Zusätzlich lösen einige Verbindungen dieser Gruppe Hautlipide aus der intrazellulären Lipidmatrix heraus.

Andere Enhancer lagern sich in die Lipidstrukturen der Hornschicht ein, was die Fluidität von Membranen und Lipidstrukturen erhöht. Typische Vertreter dieser Gruppe sind die Ölsäure und das Isopropylmyristat.

Ionische Tenside, DMSO und Urea interagieren mit Keratinstrukturen in den Korneocyten. Die dicht gepackte Struktur des Stratum corneum wird aufgelockert, was vornehmlich die Diffusion auf dem transzellulären Weg erleichtert.

Chemische Penetrationsenhancer sind teilweise sehr effektiv, doch bergen die beschriebenen Interaktionen mit den Hautkomponenten auch ein beträchtliches Irritationspotential in sich (Barry 2001; Williams und Barry 2004).

Physikalische Penetrationsenhancer

Das Potential der Hauthydratation, der Supersaturation und der Anwendung von chemischen Penetrationsenhancern ist klar limitiert, sobald es um die Penetrationserhöhung für ionische Verbindungen und / oder Wirkstoffe mit grossem Molekulargewicht (z.B. Proteine) geht. In diesen Fällen können physikalische Methoden wie Iontophorese, Sonophorese, Elektroporation oder Microneedles zum Einsatz kommen (Cross und Roberts 2004).

Kolloidale Systeme

Aus galenischer Sicht besonders interessant ist die Anwendung von spezialisierten kolloidalen Systemen. Im Vordergrund stehen dabei die Mikro- und Nanoemulsion sowie die Anwendung von Liposomen und von Solid Lipid Nanoparticles (SLN).

Mikro- und Nanoemulsionen enthalten typischerweise hohe Tensidkonzentrationen. Dank der lösungsvermittelnden Wirkung der Tenside können in diese Systeme erhöhte Wirkstoffkonzentrationen eingearbeitet werden, was den Wirkstoffgradienten über die Haut und damit den Fluss erhöht (vgl. Fick'sches Gesetz). Zusätzlich wirken die Tenside als chemische Penetrationsenhancer. Wie bereits erwähnt, ist dies aber oft mit einem erhöhten Irritationspotential verbunden (Schmalfluss et al. 1997; Wu et al. 2001).

Liposomen und SLN sind als Wirkstoff-Carrier gedacht, welche nach entsprechender Markierung gar eine Akkumulierung des verpackten Wirkstoffes am Wirkort erreichen sollen (Drug Targeting). Der tatsächliche Nutzen von Liposomen und SLN steht allerdings nach wie vor zur Diskussion.

Betz, Imboden et al. konnten beispielsweise nach topischer Applikation von Liposomen eine deutliche Interaktion und Penetration der Phospholipide zeigen, bezweifeln jedoch, dass die Liposomen dabei intakt geblieben sind (Betz et al. 2001). Andererseits existiert ein Patent auf so genannte Transferosomen, die aufgrund ihrer Zusammensetzung praktisch beliebig verformbar und so über die engsten Poren ohne zu zerfallen in die Haut eindringen sollen (Cevc und Vierl 2007).

Santos Maia, Mehnert et al. applizierten kutan ein in SLN inkorporiertes Glucocorticoid und konnten dadurch eine Wirkstoffakkumulierung in der Epidermis erreichen (Santos Maia et al. 2002). Dieses epidermale Targeting ist besonders für Wirkstoffe mit potentiell systemischen Nebenwirkungen wie die Glucocorticoide äusserst interessant.

C.1.4.3 Experimentelle Untersuchung der Penetration / Permeation

Untersuchungen zum Penetrations- / Permeationsverhalten von Arzneistoffen können in vivo oder in vitro durchgeführt werden.

Eine verbreitete in vivo-Methode zur Analyse des Wirkstoffgehalts in den verschiedenen Schichten des Stratum corneum ist das Tape Stripping (Jacobi et al. 2006; Pellanda et al. 2007). Ebenfalls zur Anwendung kommt die Mikrodialyse. Dabei wird ein feiner semipermeabler Schlauch mit Pufferlösung bis in die Dermis eingeführt. Die im Puffer gefundene Wirkstoffkonzentration ist zu derjenigen im Gewebe proportional (Groth 1996).


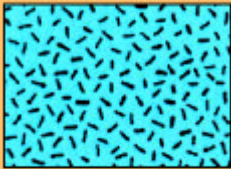
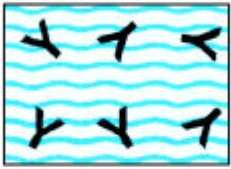
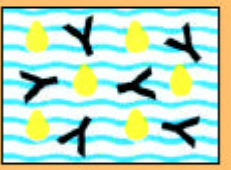
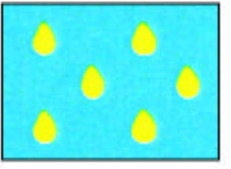
Die meisten Erkenntnisse zur Hautpenetration / -permeation wurden aus Experimenten mit ex vivo Haut (Humanhaut aus chirurgischen Eingriffen, Schweineohren) mit Hilfe der Franz Diffusions-Zelle gewonnen (Franz 1975; Franz 1978) (vgl. C.1.2.2.1). Es hat sich gezeigt, dass diese Technik auch für Untersuchungen an in vitro rekonstruierten Hautmodellen geeignet ist. Wird in vitro-Haut eingesetzt, muss allerdings die gegenüber in vivo / ex vivo Haut reduzierte Barrierefunktion berücksichtigt werden (vgl. C.1.2.2.3) (Zghoul et al. 2001; Netzlaff et al. 2005; Schafer-Korting et al. 2006).

Der Einsatz der Franz Diffusions-Zelle ist kein Muss. Penetrations- / Permeationsversuche können auch am in der Kulturschale belassenen Hautmodell durchgeführt werden. Das Nährmedium fungiert dabei als Akzeptor. Voraussetzung für ein solches Vorgehen ist jedoch, dass das Hautmodell technisch entsprechend angeordnet ist, d. h. über eine Vorrichtung verfügt, die eine definierte Applikation der Probe erlaubt sowie den Diffusionsweg durch die Haut zwingend vorgibt (z.B. Plexiglasrahmen im SkinEthic-Modell, vgl. C.1.2.2.3). Chatelain et al. haben drei Substanzen, welche in ihrem Molekulargewicht und in ihrem Verteilungskoeffizient variieren (Benzoesäure, Coffein, Testosteron) in unterschiedliche Vehikel eingearbeitet (O/W- und W/O-Emulsion, hydrophiles Gel) und deren Penetration / Permeation anhand von in vitro rekonstruierter Haut (SkinEthic Modell) untersucht. Der Versuch wurde dabei parallel einerseits mit Hilfe der Franz Diffusions-Zelle und andererseits direkt in der Kulturschale durchgeführt. Obwohl die resultierenden Daten quantitativ nicht in allen Fällen identisch waren, so führten doch beide Experimente zur gleichen Schlussfolgerung. Unabhängig von der Versuchsanordnung permeierte Benzoesäure am besten, gefolgt von Coffein und nur geringen Mengen an Testosteron. Dieses Ergebnis korrelierte übrigens auch mit den anhand von ex vivo Haut gewonnenen Daten (Daten nicht publiziert, Chatelain et al., Preclinical Research / Biopharmacy, Spirig Pharma Ltd., Switzerland, 2006).

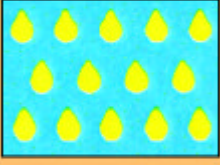
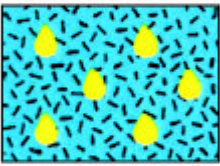
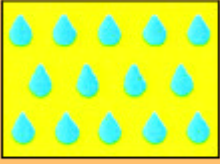
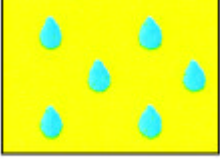
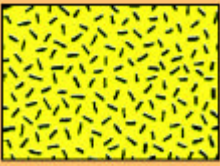

C.2 Dermatologische Grundlagen

Die folgende Übersicht zeigt die verschiedenen dermatologischen Grundlagen mit einer kurzen Beschreibung der Galenik und der entsprechenden Eigenschaften sowie mit Hinweisen zur Indikation.

Tab. C.7: Überblick über die dermatologischen Grundlagen
(mit freundlicher Genehmigung der Firma Spirig Pharma AG, Egerkingen, Schweiz)

Dermatologische Grundlagen			
Aufbau, Wirkung, Auswahl			
Die Wahl des Vehikels orientiert sich an den folgenden Kriterien:			
1. Diagnose		4. Ausdehnung der Affektion (kleinflächig-grossflächig)	
2. Akuität der Effloreszenzen (akut – subakut – chronisch)		5. Hauttyp (seborrhoischer - sebostatischer Typ)	
3. Lokalisation der Erkrankung (flache Hautpartie – Intertriginöse Stelle)		6. Kosmetische Ansprüche (Compliance)	
Galenisches System		Eigenschaften	Indikation
	Lösung (z.B. wässrig-ethanolische Lösung)	kühlend, austrocknend, nicht fettend, sekretdurchlässig	für die Behandlung behaarter Regionen, während des Tages auch der Hände
	Schüttelmixtur wässrige Lösung mit suspendiertem Feststoffanteil	kühlend, austrocknend, leicht abwaschbar	für akute nässende Läsionen im intertriginösen Bereich
	Gel wässrige bzw. wässrig-ethanolische Lösung mit Gelbildnern	kühlend, austrocknend, rasch einziehend	- stark seborrhoische Haut, z.B. bei Akne - für die perkutane Behandlung (z.B. rheumatische Erkrankungen)
	Emulgel Hydrophile O/W- Emulsion mit Gelbildnern	kühlend, kaum austrocknend, kosmetisch elegant	für die perkutane Behandlung (z.B. rheumatische Erkrankungen)
	Hydrolotio, Schaum Lipidarme O/W- Emulsion mit niedriger Konsistenz	hydrophil, nicht fettend, leicht kühlend, abwaschbar, sekretdurchlässig, kosmetisch elegant	- für akute, nässende Läsionen - für grossflächige Anwendung, auch im Haar - zur Pflege während des Tages

(Fortsetzung Tab. C.7)

Galenisches System		Eigenschaften	Indikation
	<p>Crème (Hydrocrème) O/W-Emulsion</p>	<p>hydrophil, kaum okkludierend, leicht fettend, abwaschbar, sekretdurchlässig</p>	<ul style="list-style-type: none"> - für akute, nässende Läsionen - für kleinflächige Anwendung - zur Pflege während des Tages
	<p>Crèmepaste O/W-Emulsion mit Feststoffanteil</p>	<p>hydrophil, nicht okkludierend, mit hohem Saugvermögen, austrocknend, gut haftend</p>	<ul style="list-style-type: none"> - für nässende Läsionen im intertriginösen Bereich (Windelbereich, submammär etc.)
	<p>Lipolotio Lipidreiche W/O-Emulsion mit niedriger Konsistenz</p>	<p>lipophil, okkludierend, fettend, hydratisierend, nicht abwaschbar, nur leicht glänzend</p>	<ul style="list-style-type: none"> - für grossflächige Anwendung bei trockenem Hautzustand (z.B. Neurodermitis) - zur Pflege während der Nacht
	<p>Fettcrème (Lipocrème) W/O-Emulsion</p>	<p>lipophil, okkludierend, fettend, hydratisierend, nicht abwaschbar, glänzend</p>	<ul style="list-style-type: none"> - für chronische, trockene Läsionen - zum Schutz vor hydrophilen Noxen (Berufsdermatosen) - zur Pflege während der Nacht
	<p>Fettpaste Fettsalbe mit Feststoffen</p>	<p>lipophil, okkludierend, fettend, hydratisierend, nicht abwaschbar, glänzend</p>	<ul style="list-style-type: none"> - für chronische, trockene Läsionen - zum Schutz vor hydrophilen Noxen (Berufsdermatosen)
	<p>Fettsalbe (Lipogel) Ölsalbe (Oleogel) Fettbase</p>	<p>lipophil, okkludierend, stark fettend, stark hydratisierend, nicht abwaschbar, glänzend</p>	<ul style="list-style-type: none"> - für chronische, xerotische, hyperkeratotische Läsionen - zum Kälteschutz - zur Pflege während der Nacht

C.3 Glucocorticoide

C.3.1 Anwendung und Eigenschaften

Glucocorticoide (GC) wirken therapeutisch antiinflammatorisch, immunsuppressiv und antiproliferativ. Sie finden breite Anwendung bei einer Vielzahl von Indikationen wie beispielsweise rheumatische Erkrankungen, allergische Reaktionen (anaphylaktischer Schock, allergisch bedingtes Asthma, Heuschnupfen) und im Besonderen in der Dermatologie. Zu den dermatologischen Indikationen zählen Hautentzündungen allergischen wie auch nicht allergischen Ursprungs (Neurodermitis, Ekzeme, Psoriasis, Insektenstiche, Sonnenbrand und weitere mehr). Die Applikation von GC kann dabei systemisch oder topisch erfolgen (Mutschler 1991).

Der guten Wirksamkeit der GC steht leider ein breites Nebenwirkungsspektrum gegenüber, welches sich aus dem pharmakodynamischen Wirkprofil ableitet. Hydrocortison, ein körpereigenes Hormon und erstes therapeutisch genutztes Glucocorticoid, wirkt physiologischerweise katabol (Gluconeogenese aus Proteinen, Wachstumshemmung bei Kindern, Unterdrückung der Fibroblastenbildung und Kollagensynthese), hemmt die Aktivität des Immunsystems, beeinflusst den Elektrolyt- und Wasserhaushalt (mineralocorticoide Wirkkomponente) und zeigt einen ZNS-Effekt (psychotrop sowie erhöhte Erregbarkeit des Gehirns). Klinisch manifestiert sich dies unter anderem in Form von Infektionen infolge Unterdrückung des Immunsystems, verzögerter Wundheilung, allgemein atrophischen Effekten, zentralnervösen Störungen und im so genannten „Cushing-Syndrom“ (Stammfettsucht und Vollmondgesicht). Dermatologisch stehen die Hautatrophie, die Steroidakne und die Bildung von Hautstreifen (*Striae rubrae*) im Vordergrund. Auch Kontaktallergien werden beobachtet. Die Auftretenswahrscheinlichkeit und Ausprägung der genannten Nebenwirkungen ist stark abhängig von der Dauer der Applikation, von der Dosierung, vom Applikationsweg sowie von der Art des eingesetzten Glucocorticoids (Mutschler 1991).

Bei kurzfristiger topischer Anwendung (ohne Okklusion) sind GC grundsätzlich unproblematisch (Akers 1980). Ist eine längerfristige topische oder systemische Applikation vorgesehen, können die Nebenwirkungen dank Einhaltung bestimmter Regeln deutlich minimiert werden. Für eine fachgerechte Therapie mit GC ist eine klare eindeutige Indikation, die Wahl des passenden Präparates (Wirkstärke des GCs, Vehikel, Applikationsweg) sowie eine individuelle Dosierung wichtig. Zudem werden verschiedene Therapieschemata wie die Anpassungen an den zirkadianen Rhythmus und / oder eine ausschleichende Dosierung am Therapieende empfohlen. In der Dermatologie haben sich auch die Tandemtherapie (Verum und Vehikel im 12-stündigen Wechsel) und bei chronischen Krankheitsbildern die Intervalltherapie (1 bis 5 Tage Verum, 1 bis 2 Tage Vehikel) bewährt (Gutermuth et al. 2003).

Ausserdem, für die Dermatologie ist es in neuerer Zeit gelungen, topische GC mit einer günstigen Relation zwischen erwünschter und unerwünschter Wirkung zu entwickeln. Lange Zeit sind die Verstärkung der antiinflammatorischen und der atrophischen Wirkung parallel verlaufen. Die GC der neusten Generation (4. Generation) wirken hingegen gut antiinflammatorisch und zeigen gleichzeitig einen deutlich verminderten antiproliferativen Effekt auf Keratinozyten und Fibroblasten, auch bei mehrmonatiger und kontinuierlicher Applikation.

Die Deutsche Dermatologische Gesellschaft hat eine Leitlinie mit dem Titel „Topische Dermatotherapie mit Glucocorticoiden – Therapeutischer Index (TIX)“ publiziert, worin die am häufigsten verordneten GC gemäss ihrem Wirkungs- / Nebenwirkungsverhältnis beurteilt und klassiert sind (Luger et al. 2005). Zusammengefasst resultierte die folgende Tabelle:

Tab. C.8: Einteilung der am häufigsten verordneten GC gemäss ihrem Wirkungs- / Nebenwirkungsverhältnis nach dem TIX (Werfel et al. 2006)

Kategorie	Wirkungs- / Nebenwirkungsverhältnis	GC
A	in etwa ausgeglichen, mit leichtem Vorteil für die Wirkung	Hydrocortison Triamcinolonacetonid Clobetasolpropionat Betamethasonvalerat
B	Wirkung überwiegt deutlich	Mometasonfuroat Prednicarbat Hydrocortisonbutyrat Methylprednisolonaceponat

Obwohl die GC der 4. Generation bereits deutliche Verbesserungen hinsichtlich Wirkungs- / Nebenwirkungsverhältnis gebracht haben, gehen die Forschungsarbeiten zur Optimierung weiter. Überprüft wird die Anwendung von so genannten Nitro-Steroiden (z.B. NO-Prednisolon) (Perretti et al. 2003). Auch die Entwicklung von selektiven Glucocorticoid-Rezeptor Antagonisten (SEGRAs) ist viel versprechend. SEGRAs sollen gezielt die Transrepression, nicht aber die Transaktivierung auslösen (vgl. C.3.3.1) (Stahn et al. 2007). Daneben wird die Verbesserung des Wirkungs- / Nebenwirkungsverhältnis auf dem galenischen Weg angestrebt. Eine Möglichkeit bietet dabei die Verpackung von „klassischen“ GC in Liposomen (long-circulating liposomal glucocorticoids). Das GC soll durch ein gezieltes Targeting am Ort der Entzündung akkumuliert werden (Schmidt et al. 2003). Entsprechende klinische Studien am Menschen sind allerdings noch ausstehend.

C.3.2 Struktur-Wirkungsbeziehung

GC sind Derivate des natürlichen Hydrocortisons und besitzen alle eine Sterangrundstruktur.

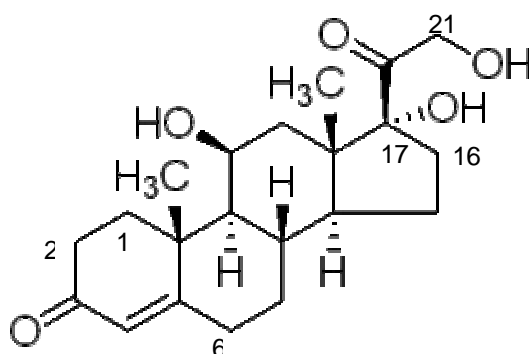


Abb. C.12: Hydrocortison

Durch differenzierte Substitutionen an den Kohlenstoffatomen 1, 2, 6, 9, 16, 17 und 21 sowie durch Änderungen im Steroidkern wurden Substanzeigenschaften moduliert. Die Einführung einer Doppelbindung zwischen C1 und C2 in einem ersten Schritt und das Anlagern von zusätzlichen Methyl- und Hydroxylgruppen bzw. von Halogenatomen an verschiedenen Stellen des Steroidgerüsts (vorwiegend an C6 und C9) in einem zweiten Schritt führt zu Derivaten mit einer bis zu 30-fach verstärkten Wirkung (GC der 1. bis 3. Generation).

Wie bereits erwähnt, sind parallel dazu auch die Nebenwirkungen verstärkt (Mutschler 1991). Die Wirkungssteigerung ist dabei auf eine erhöhte Affinität zum Glucocorticoid-Rezeptor zurückzuführen (vgl. C.3.3). Die Einführung einer Esterbindung an den Positionen C17 und / oder C21 erhöht die Lipophilie und bewirkt eine verstärkte Penetration in das Stratum corneum (vgl. C.3.5).

Die GC der 4. Generation zeigen ein verbessertes Wirkungs- / Nebenwirkungsverhältnis. Es handelt sich dabei vornehmlich um Doppelester-Verbindungen, welche entweder in den Positionen C17 und C21 oder C16 und C17 jeweils zwei Estergruppen tragen (Korting et al. 1992). Diese Veresterung verleiht den Substanzen Prodrug-Charakter. Da die Metabolisierung zur aktiven Wirkform in den Keratinozyten, jedoch kaum in den Fibroblasten stattfindet, entfaltet sich fast ausschliesslich der antiinflammatorische Effekt, welcher an die Keratinozyten gebunden ist. Der atrophische Effekt hingegen, der in der antiproliferativen Wirkung auf die Fibroblasten fusst, bleibt nahezu aus (Gysler et al. 1999). Eine schnelle Weitermetabolisierung zu unwirksamen Abbauprodukten reduziert nach erfolgter Hautpermeation auch die systemischen Nebenwirkungen (Neubert et al. 2001). Zusätzlich wird die Existenz von unterschiedlichen Glucocorticoid-Rezeptor-Subtypen in den Keratinozyten und in den Fibroblasten diskutiert, was die beiden Zelltypen unterschiedlich empfänglich für den Effekt von verschiedenen GC macht (Lange et al. 1997) (Ponec 1993).

In der Praxis werden die GC aufgrund ihrer antiinflammatorischen Wirkung in vier Stärkeklassen eingeteilt.

Tab. C.9: Auswahl topischer GC nach ihrer Wirkstärke (Neubert et al. 2001)

Klasse	Wirkstärke	Glucocorticoid	Dosierung (%)
I	schwach	Hydrocortison	0.25 - 0.5
		Hydrocortisonacetat	1.0
		Dexamethason	0.012
II	mittel	Triamcinolonacetonid	0.01 - 0.025
		Betamethasonvalerat	0.05
		Dexamethason	0.1
III	stark	Mometasonfuroat*	0.1
		Betamethasonvalerat	0.1
		Prednicarbat*	0.25
IV	sehr stark	Clobetasolpropionat	0.05
		Diflucortolonvalerat	0.3

*GC mit verbessertem Wirkungs- / Nebenwirkungsverhältnis

C.3.3 Wirkmechanismus

Auch mehr als 50 Jahre nach dem ersten klinischen Einsatz der GC ist noch nicht alles über deren Wirkmechanismen bekannt. Erst vor wenigen Jahren wurde ein Modell entwickelt, welches, ergänzend zum seit langem bekannten genomischen Effekt, drei nicht-genomische Wirkmechanismen beschreibt.

Heute geht man von den vier folgenden Wirkmechanismen aus:

- I. genomischer Wirkmechanismus vermittelt via zytosolische Glucocorticoid-Rezeptoren (klassischer Wirkmechanismus)
- II. spezifisch nicht-genomischer Wirkmechanismus vermittelt via membranständige Glucocorticoid-Rezeptoren

- III. unspezifisch nicht-genomischer Wirkmechanismen vermittelt via Interaktionen mit der Zellmembran
 - VI. spezifisch nicht-genomischer Wirkmechanismus vermittelt via zytosolische Glucocorticoid-Rezeptoren
- (Stahn et al. 2007)

Buttgereit et al. stellten 1998 eine „modulare Hypothese“ auf, wonach bei niedrigen Dosierungen zunächst ausschliesslich genomische Effekte wirksam werden ($< 10^{-12}$ mol/l). Ab Dosierungen von ca. 10^{-9} mol/l spielen zusätzlich spezifische nicht-genomische Effekte (vermittelt über membranständige Rezeptoren) eine Rolle. Bei hohen Dosierungen ($> 10^{-4}$ mol/l) kommt es nach dieser Hypothese ausserdem zu unspezifischen nicht-genomischen Wirkungen über physikochemische Effekte in Form von Interkalierung der Steroidmoleküle in der Zellmembran (Buttgereit et al. 1998).

Die folgende Graphik gibt einen Überblick über die vier genannten Wirkmechanismen:

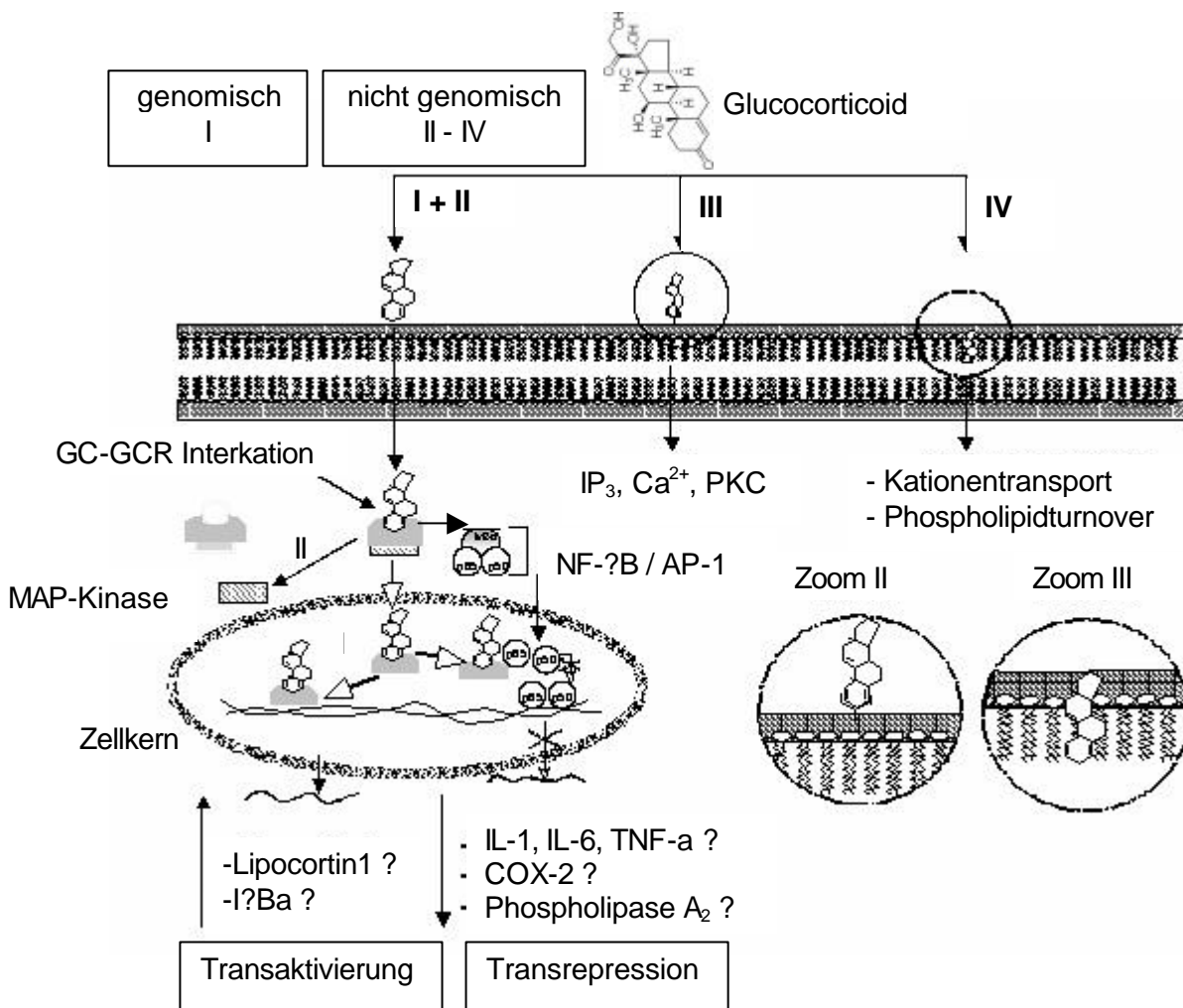


Abb. C.13: Übersicht über die vier bekannten Wirkmechanismen der Glucocorticoide (Buttgereit et al. 1998; Stahn et al. 2007)

Abkürzungen: GC = Glucocorticoid, GCR = Glucocorticoid-Rezeptor, HSP 90 = Heat-shock Protein 90; IP₃ = Inositoltrisphosphat; PKC = Proteinkinase C; NF- κ B = Nuclear factor- κ B; AP-1 = Activating protein 1, I κ Ba = Inhibitor kappa B alpha, IL = Interleukin; TNF- α = Tumour necrosis factor- α ; COX-2 = Cyclooxygenase 2

C.3.3.1 Genomischer Wirkmechanismus vermittelt via zytosolische Glucocorticoid-Rezeptoren (I)

Der genomische Wirkmechanismus wird ca. 30 min. nach GC-Applikation aktiv und zeigt sein Wirkmaximum erst 6 bis 8 h später (Reinhold und Buttgereit 2000).

Aktuell ist der genomische Wirkmechanismus am besten untersucht. Dabei diffundiert das lipophile GC durch die Zellmembran und bindet intrazellulär an den zytosolischen Glucocorticoid-Rezeptor (GCR). Der GCR wird im Organismus ubiquitär exprimiert, womit GC auf die unterschiedlichsten Zelltypen wirken können. Serres, Viac et al. haben den GCR unter anderem in Keratinozyten und in Fibroblasten lokalisiert (Serres et al. 1996). Der GCR ist ein Multiprotein-Komplex und liegt im inaktiven Stadium an Heat-shock Proteine (HSP) und an verschiedene Kinasen gebunden vor. Auf diese Weise ist die Wirkung des (GC-freien) Rezeptors auf die DNA blockiert. Bei der Bindung des GC an den Rezeptor werden die verschiedenen Proteine abgespalten und der aktivierte Rezeptor-Wirkstoffkomplex wandert in den Zellkern, wo er die Genexpression auf zwei unterschiedlichen Wegen, einem direkten und einem indirekten Weg, beeinflusst.

Die direkte Beeinflussung beruht auf der Bindung des aktivierten GCR an so genannte Glucocorticoid-responsive-elements, wodurch die Genexpression vornehmlich aktiviert wird (Transaktivierung). Beispielsweise wird die Expression der Proteine Lipocortin-1 und Inhibitor kappa B alpha (I κ B α) durch GC verstärkt. Lipocortin-1 inhibiert die Phospholipase A₂ (PLA₂) welche ihrerseits Bestandteil der Arachidonsäurekaskade ist und die Freisetzung von Phospholipiden aus der Membran zur Bildung von Entzündungsmediatoren katalysiert (Prostaglandine, Leukotriene) (De Bosscher et al. 2000). I κ B α blockiert den aktivierten NF- κ B, der für die Aufregulation einer Vielzahl von proinflammatorischen Zytokinen verantwortlich ist (Auphan et al. 1995). Neben dieser erwünschten, antiinflammatorischen Wirkkomponente ist die Transaktivierung auch verantwortlich für eine Reihe von unerwünschten Nebenwirkungen (Stahn et al. 2007).

Zusätzlich zur direkten Bindung an die DNA interagiert der aktivierte Rezeptor-Wirkstoffkomplex auch mit NF- κ B und AP-1, wodurch die Genexpression auf indirektem Weg abreguliert wird (Transrepression). Wie oben erwähnt, sind NF- κ B, aber auch AP-1, normalerweise für die Aktivierung der Expression von proinflammatorischen Genen verantwortlich. Durch die Anlagerung des aktivierten Rezeptor-Wirkstoffkomplexes werden die Faktoren jedoch blockiert und somit auch die Expression der entsprechenden proinflammatorischen Gene (Ray und Prefontaine 1994; De Bosscher et al. 2000). Beispiele für auf diesem Weg durch GC abregulierte Zytokine sind IL-1, IL-6, IL-8 und TNF- α . Die Bedeutung dieser Mediatoren für die Entzündungsreaktion in der Haut wurde bereits erläutert (C.1.3.1). Auf analoge Weise wird durch GC auch die Expression der beiden Enzyme COX-2 und PLA₂ reduziert. Beide Enzyme spielen im Rahmen der Arachidonsäurekaskade eine zentrale Rolle. Die Funktion von PLA₂ in diesem Zusammenhang wurde oben bereits erwähnt. COX-2 katalysiert die Bildung von zyklischen Endoperoxiden aus Arachidonsäure (Mutschler 1991). Auf dem indirekten Weg können GC die Transkription von Genen beeinflussen, welche über kein spezifisches Glucocorticoid-responsive-element verfügen.

Re, Muzio et al. haben nach Applikation von Dexamethason eine Aufregulation von der IL-1 sRII-Expression in PMN (polymorphkernige neutrophile Granulozyten) festgestellt (Re et al. 1994). Dieses Ergebnis konnte auch für humane Keratinozyten (Lukiw et al. 1999) sowie für murine Asterozyten (Pousset et al. 2001) bestätigt werden. Der IL-1 sRII präsentiert sich dem Zytokin IL-1a an der Zelloberfläche, doch fehlt der intrazelluläre Teil, der für die entsprechende proinflammatorische Signalvermittlung zuständig wäre (vgl. C.1.3.1.1). Die Abregulation des IL-1 sRII wird somit als weiterer Baustein im komplexen GC-Wirkmechanismus angenommen.

Ebenfalls interessant ist die Wirkung von GC auf IL-1ra, ein körpereigenes antiinflammatorisches Protein (vgl. C.1.3.1.1). Stosic-Grujicic und Lukic haben anhand von kultivierten Keratinozyten gezeigt, dass die GC-Wirkung mit dem IL-1ra im Zusammenhang steht (Stosic-Grujicic und Lukic 1992). Levine, Benfield et al. schliesslich demonstrierten die IL-1ra-Aufregulation sowohl auf mRNA als auch auf Protein-Ebene durch Dexamethason in bronchialen Epithelzellen (Levine et al. 1996). Somit ist offenbar auch die IL-1ra-Aktivierung Bestandteil des GC-Wirkmechanismus.

C.3.3.2 Spezifisch nicht-genomischer Wirkmechanismus vermittelt via zytosolische Glucocorticoid-Rezeptoren (II)

Die bereits beschriebene über die zytosolischen Glucocorticoid-Rezeptoren (GCR) vermittelte genomische Reaktion ist seit längerem bekannt. In neuerer Zeit konnte gezeigt werden, dass auch schnell eintretende GC-Effekte auf die GC-GCR-Interaktion im Zytosol zurückzuführen sind (Croxtall et al. 2000).

Treten das GC und der Multiprotein-Komplex GCR in Kontakt, werden, wie oben erwähnt, diverse Proteine abgespalten. Als Beispiel seien hier die MAP-Kinasen (mitogen-activated Protein Kinasen) erwähnt. MAP-Kinasen bilden Signalkaskaden, welche unter anderem die Freisetzung von Arachidonsäure aus der Zellmembran hemmen und somit letztendlich die Bildung von Entzündungsmediatoren im Rahmen der Arachidonsäurekaskade unterdrücken (Stahn et al. 2007).

C.3.3.3 Spezifisch nicht-genomischer Wirkmechanismus vermittelt via membranständige Glucocorticoid-Rezeptoren (III)

Die Effekte, welche über den spezifisch nicht-genomischen Wirkmechanismus ausgelöst werden, treten innerhalb von 1 bis 2 min. nach GC-Applikation ein. Eine derart schnelle Reaktion wäre für genomische Wirkmechanismen bislang nicht bekannt, womit nach alternativen Mechanismen gesucht wurde.

Für die Übermittlung der spezifisch nicht-genomischen Wirkung werden membranständige Glucocorticoid-Rezeptoren vermutet. Das Signal wird über ein Second Messenger System, in welches unter anderem Inositoltrisphosphat (IP₃), die Proteinkinase C (PKC) und Calcium (Ca²⁺) involviert sind, vermittelt. Membranständige Glucocorticoid-Rezeptoren konnten bisher auf peripheren humanen Blutzellen nachgewiesen werden (Bartholome et al. 2004; Buttgerit et al. 2004).

C.3.3.4 Unspezifisch nicht-genomischer Wirkmechanismen vermittelt via Interaktionen mit der Zellmembran (IV)

Auch der unspezifisch nicht-genomische Wirkmechanismus kommt sehr schnell nach GC-Applikation zum Tragen.

In hohen und ultra hohen Dosierungen ($> 10^{-4}$ mol/l) treten GC mit biologischen Membranen in physikochemische Wechselwirkung. Dadurch wird die Membranfluidität verringert und die Aktivität von membranassoziierten Proteinen beeinflusst. Infolgedessen wurde beispielsweise in Lymphozyten nach Applikation von hochdosiertem Methylprednisolon ein reduzierter transmembranöser Transport von Calcium- und Natrium-Ionen sowie Veränderungen in der Mitochondrienmembran festgestellt, woraus unter anderem eine Einschränkung der Zellatmung resultierte. Die auf diese Weise reduzierte Lymphocyten-Aktivität ist ein wichtiger Bestandteil der antiinflammatorischen GC-Wirkung (Buttgereit und Buttgereit 2000).

C.3.4 Glucocorticoid-Wirkung auf die Haut anhand von in vitro-Modellen

Bereits anfangs der 90er-Jahren demonstrierten Lee, Morhen et al. in kultivierten, (mittels IL-1a irritierten) Keratinozyten die Abregulation der TNF-a mRNA-Synthese nach Applikation von Hydrocortison (Lee et al. 1991).

Lange, Gysler, Kleuser et al. zeigten nach Applikation von GC in kultivierten, (mittels TNF-a) irritierten Keratinozyten eine reduzierte IL-1a- und in analog behandelten Fibroblasten eine verminderte IL-1a- sowie IL-6-Expression. Dabei konnte die Wirkstärke der beiden GC Betamethasonvalerat und Prednicarbat in Abhängigkeit vom Zelltyp unterschieden werden (Lange et al. 1997). Drei Jahre später wurden die Daten durch die gleiche Gruppe bestätigt respektive es konnten zusätzliche Aussagen zum differenzierten Wirkprofil von klassischen GC und GC der neuen Generation getroffen werden (Lange et al. 2000).

Kirnbauer, Kock et al. irritierten humane Keratinozyten mittels UV-Strahlung (UVB). Die nach UV-Bestrahlung erhöhte IL-6-Expression konnte durch die Applikation der GC Hydrocortison, Prednisolon und Dexamethason wieder abreguliert werden (IL-6 Analyse im Kulturmedium sowohl auf Protein- als auch auf mRNA-Ebene) (Kirnbauer et al. 1991).

Eine ähnliche Versuchsanordnung wurde von Stein, Bernd et al gewählt. Normale humane Keratinozyten sowie Zellen der permanenten Keratinozyten-Zelllinie (Ha-CaT) wurden ebenfalls mittels UV-Strahlung (UVA / UVB) irritiert. Nach Applikation der GC Betamethasonvalerat, Prednicarbat und Hydrocortisonbutyrat wurde im Kulturmedium von beiden Zelltypen eine reduzierte IL-8- und IL-6-Protein-Menge detektiert (Stein et al. 1997). Die Arbeit fand ihre Fortsetzung unter anderem in den Aktivitäten von Zöller, Mewes et al. Anstelle von Zellkulturen verwendete die Gruppe für ihre Untersuchungen das in vitro rekonstruierte Vollhautmodell Phenion FT (vgl. C.1.2.2). Es konnte gezeigt werden, dass die zunächst aufgrund der UVB-Bestrahlung erhöhte IL-6- und IL-8-Protein-Menge durch das GC Betamethasonvalerat wieder gesenkt worden ist (Zöller et al. 2006).

C.3.5 Hautpenetration / Hautpermeation

GC permeieren nicht besonders gut durch die Haut (Sucker et al. 1991). Sie sind in der Regel sehr lipophil und weisen auch ein relativ hohes Molekulargewicht auf (Betamethasonvalerat $M_r = 477$, Mometasonfuroat $M_r = 521$, Prednicarbat $M_r = 489$).

Die so genannte Reservoir-Bildung der GC im Stratum corneum ist seit langem bekannt (Vickers 1963; Vickers 1972; Barry 1983). Aufgrund ihrer hohen Lipophilie dringen GC, hauptsächlich auf dem interzellulären Weg, wohl in die Hornschicht ein, verteilen sich aber nur schlecht in die tieferen und hydrophileren Schichten der Epidermis (Niedner und Ziegenmeyer 1992). Daneben ist in der Literatur die Adsorption von GC an Keratin beschrieben, was jedoch eine untergeordnete Rolle zu spielen scheint (Barry 1983). Beide Effekte bewirken eine Zurückhaltung der GC im Stratum corneum. Dies führt zu einer Akkumulation und somit zur Ausbildung eines Wirkstoffdepots. Die pharmakologische vasokonstriktorische Wirkung der GC unterstützt diese Reservoir-Bildung zusätzlich. Durch die verminderte Durchblutung der Dermis wird der Abtransport der GC aus der Haut reduziert (Niedner und Ziegenmeyer 1992)

Weitere Ausführungen zu den allgemeinen Vorgängen bei der Hautpenetration / Hautpermeation sind im Kapitel C.1.4 beschrieben.

C.3.6 Betamethasonvalerat

Betamethasonvalerat (BV-17) ist das für die dermatologische Anwendung entwickelte Derivat von Betamethason. Die Veresterung am C17 mit Valeriansäure (Pentansäure) erhöht die Lipophilie und ermöglicht ein verbessertes Eindringen durch die Hornschicht in die Epidermis.

Die erste klinische Studie zur topischen Anwendung von BV-17 datiert aus dem Jahr 1964 (Mitchell et al. 1964). Seither wurde BV-17 breit eingesetzt und es existieren zahlreiche Arbeiten zu dessen Wirkungs- und Nebenwirkungsprofil, zur Anwendung bei bekannten oder spezifischen Krankheitsbildern und als Modellsubstanz, stellvertretend für Untersuchungen zu GC im Allgemeinen. Aktuell sind am Schweizer Markt die Produkte Celestoderm®-V Salbe und Celestoderm®-V Crème erhältlich (Essex Chemie AG). In beiden Präparaten ist BV-17 zu jeweils 1 mg/g (entspricht 0.1 %) dosiert. Der Hersteller empfiehlt eine Anwendung von 1-2 Mal täglich (morgens und abends eine dünne Schicht auf die erkrankte Hautstelle auftragen und leicht einmassieren). Die Behandlungsdauer richtet sich nach dem klinischen Resultat, wobei eine Therapie von länger als 4 Wochen nicht ohne erneute Patientenbeurteilung vorgenommen werden sollte. Die Präparate sind bei allergischen und ekzematösen Hautkrankheiten (Ekzeme, Kontaktdermatitis, seborrhoische Dermatitis, Neurodermitis) sowie bei akuter, nicht allergischer Dermatitis (Dermatitis exfoliativa, Psoriasis, Pruritus, Dermatitis solaris, Otitis externa) indiziert. Die Angaben zu den unerwünschten Nebenwirkungen umfassen die klassische Symptomatik (z.B. Hautatrophie, Steroidakne) (vgl. C.3.1). Bei grossflächiger und / oder okklusiver und / oder länger dauernder Applikation wird auf die Möglichkeit systemischer Nebenwirkung hingewiesen (z.B. Wachstumsverzögerung bei Kindern) (Documed 2007).

BV-17 zählt zu den „klassischen“ GC ohne verbessertes Wirkungs- / Nebenwirkungsverhältnis (vgl. C.3.1). Die Einführung der Doppelbindung zwischen C1 und C2 sowie der Fluorgruppe am C9 bewirkt eine Verstärkung der antiphlogistischen Wirksamkeit um rund das 30-fache gegenüber Hydrocortisone (Mutschler 1991) (vgl. C.3.2). Je nach Dosierung zählt BV-17 zur Stärkeklasse II (0.05 %) oder III (0.1 %) (vgl. C.3.2) (Neubert et al. 2001).

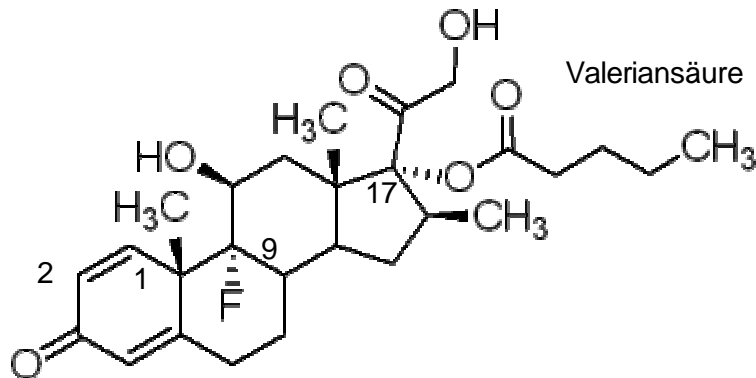


Abb. C14: BV-17

BV-17 penetriert verhältnismässig gut in die menschliche Haut (Hartke et al. 2004a). Im Penetrationsversuch wurde im Vergleich zu Betamethason in der Dermis die rund 4-fache, in der Epidermis in etwa die gleiche BV-17-Menge gefunden (humane ex vivo Vollhaut, infinite dose, aus wässriger gesättigter Lösung, sink condition, okklusiv) (Kubota und Maibach 1993) (vgl. auch C.3.5).

BV-17 ist lichtempfindlich. In der Gegenwart von Säuren oder Basen lagert die Valeriansäure leicht vom C17 an das C21 um.

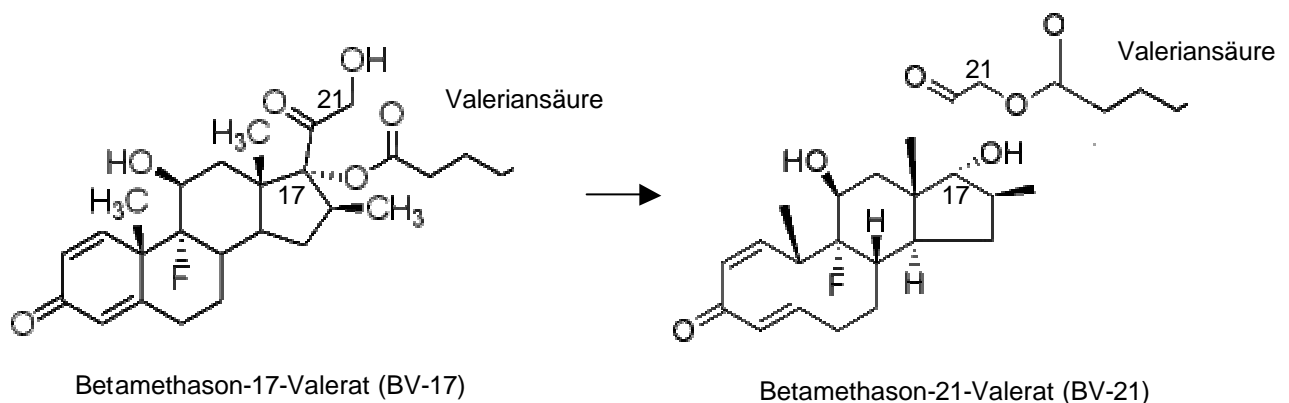


Abb. C15: Umlagerung von BV-17 zu BV-21

Diese Isomerisierung läuft im alkalischen Milieu besonders schnell ab. So wird in Salbenrezepturen bei schwach alkalischen pH-Werten innerhalb von 5 Tagen das BV-17 zu 75 % zum BV-21 umgelagert. Schwach saure pH-Werte wirken stabilisierend (pH-Optimum bei ca. 6). Die säurekatalysierte Isomerisierung nimmt erst bei wesentlich tieferen pH-Werten einen nennenswerten Umfang an. Der hydrolytische Abbau des BV-17 zum Betamethason-Alkohol spielt eine untergeordnete Rolle und ist primär basenkatalysiert (Niedner und Ziegenmeyer 1992).

Das 21-Valerat sowie auch der Betamethason-Alkohol sind beide pharmakologisch deutlich weniger aktiv als das BV-17 (Niedner und Ziegenmeyer 1992).

Die in der Haut vorhandenen Esterasen hydrolysieren das 17-Valerat kaum. Wohingegen das BV-21 praktisch vollständig zum Betamethason-Alkohol metabolisiert wird (Kubota et al. 1995).

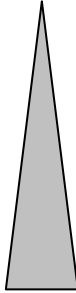
D Experimenteller Teil

Alle in der vorliegenden Arbeit eingesetzten Substanzen, Materialien und Geräte sind unter Angabe einer näheren Spezifikation und des Herstellers im Anhang H aufgelistet.

D.1 In vitro- / ex vivo-Hautmodelle

Für die Experimente der vorliegenden Arbeit wurden drei in vitro- / ex vivo-Hautmodelle ausgewählt, die sich hauptsächlich in der Art der integrierten Zellen aber auch in der Ausprägung ihrer Barrierefunktion unterscheiden (vgl. C.1.2.2).

Tab. D.1: In der vorliegenden Arbeit eingesetzte in vitro- / ex vivo-Hautmodelle

Modell	Art	Vorhandene Zelltypen	Barrierefunktion*
1 SkinEthic-Modell	in vitro rekonstruierte Epidermis	Keratinocyten	
2 Phenion FT-Modell	in vitro rekonstruierte Epidermis und Dermis (Vollhaut)	Keratinocyten, Fibroblasten	
3 Natskin-Modell	ex vivo entnommene Epidermis, Dermis (und teilweise Subkutis) (Vollhaut)	alle physiologischerweise in der Haut vorhandenen Zelltypen (Keratinocyten, Fibroblasten, Melanocyten, Langerhanszellen etc.)	

*qualitativ im Vergleich, eigene Abschätzung aufgrund des Modellaufbaus

Im Ablauf von Entzündungsreaktionen der Haut sind die verschiedenen Zelltypen auf unterschiedliche Weise beteiligt (vgl. C.1.3). Demzufolge kann die Reaktion der Hautmodelle auf externe Reize sowie auf eine nachfolgende antiinflammatorische Behandlung variieren. Auch der Einfluss der jeweiligen Barrierefunktion war von Interesse. Die Barriere bietet einerseits Schutz vor externen Reizen, bedeutet andererseits aber auch ein Hindernis für das Vordringen eines antiinflammatorisch aktiven Wirkstoffes.

Alle drei eingesetzten in vitro- / ex vivo-Hautmodelle wurden hauserntern kultiviert und konnten gebrauchsfertig bezogen werden. Die Hersteller geben präzise Vorgaben zum Umgang und zur Kultivierung ihrer in vitro-Modelle. Mit wenigen Ausnahmen wurden diese jeweils strikte befolgt. Die Ausnahmen sind im Folgenden speziell erwähnt.

Alle Handgriffe an den Hautmodellen bis zum Probenzug für die HPLC- / Protein-Analytik und für die Histologie erfolgten unter sterilen Bedingungen.

D.1.1 SkinEthic-Modell

Das SkinEthic-Modell (Laboratoire SkinEthic, Nizza, Frankreich) ist ein in vitro rekonstruiertes, ausschliesslich aus humanen Keratinozyten bestehendes Hautmodell. Als primäre Keratinozyten dienen vereinzelt Vorhautzellen.

Für die vorliegende Arbeit wurde das SkinEthic-Modell mit einer Oberfläche von 0.5 cm² gewählt. Die Haut liegt auf einer Polycarbonatmembran und ist eingebettet in ein Insert aus Plexiglas. Dadurch ist die Applikationsfläche genau umgrenzt, und ein direkter Übergang der Modellformulierung in das Medium wird vermieden.

Applikationsfläche für Formulierung

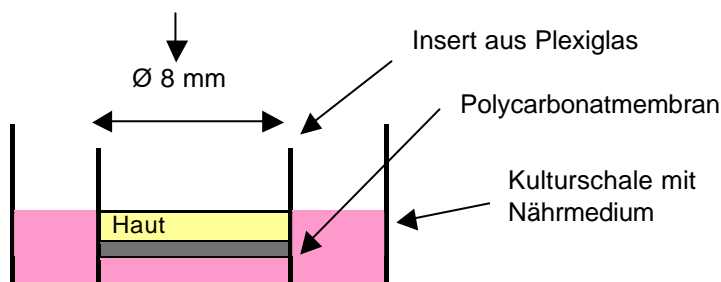


Abb. D.1: SkinEthic-Modell im Insert mit Probenapplikationsfläche (schematische Darstellung von der Seite)

Die Inserts trafen gekühlt und fixiert in geliertem Nährmedium am Kulturtag 13 (nach Start der Hautrekonstruktion) im Hause ein. Sofort nach Ankunft wurden die Hautproben in 6-Well-Plates mit je 1 ml Growth Medium (Laboratoire SkinEthic, Nizza, Frankreich) pro Insert transferiert und bis zum Kulturtag 17 im Inkubator (37°C, CO₂-Anteil 5%, Luftfeuchtigkeit 90 % r.h.) gehalten. Der Mediumwechsel erfolgte täglich (1 ml / Tag / Insert). Für das Wochenende wurden 3 ml Growth Medium appliziert.

Gemäss den Angaben des Herstellers ist im Growth Medium Hydrocortison (400 ng/ml) enthalten. Aus diesem Grund wurde am Vortag zum Experiment das Growth Medium gegen Maintenance Medium (ohne Hydrocortison) ausgetauscht, sodass die Haut während mindestens 24 h in corticosteroidfreier Umgebung vorlag. Der eigentliche Versuch startete am Kulturtag 18. Während dem Versuch selbst wurde das SkinEthic-Modell in 6-Well-Plates mit je 1 ml Maintenance Medium pro Insert im Inkubator kultiviert.

D.1.2 Phenion FT-Modell

Das Phenion FT-Modell (Phenion GmbH & Co. KG, Düsseldorf, Deutschland) ist ein Vollhautmodell, welches aus Keratinozyten und Fibroblasten desselben menschlichen Donors aufgebaut ist. Der Durchmesser eines einzelnen Modellhautstückes beträgt 1.3 cm, was einer Oberfläche von rund 1.3 cm² entspricht.

Das Phenion FT-Modell verfügt über kein Insert, welches einerseits den Applikationsbereich klar definieren und andererseits den direkten Übertritt von Modellformulierung in das Nährmedium sicher ausschliessen würde. Die Modellformulierung konnte somit nur zentral, mit deutlichem Abstand zur Randregion, appliziert werden.

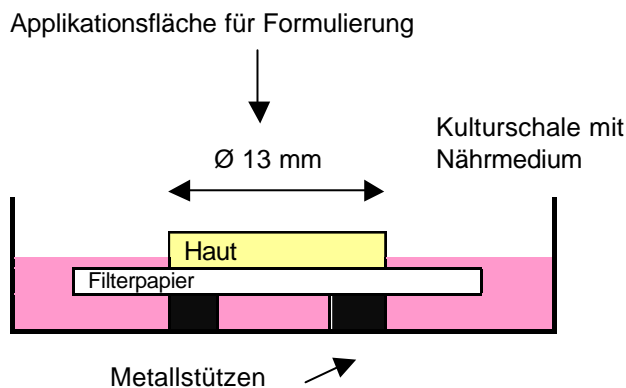


Abb. D.2: Phenion FT-Modell, platziert auf Filterpapier und Metallstützen (schematische Darstellung von der Seite)

Die Hautstücke wurden am Kulturtag 13 (nach Start der Hautrekonstruktion) gekühlt und platziert auf verfestigtem Nährmedium geliefert. Sofort nach Ankunft transferierte man die Hautstücke nach den Anweisungen des Herstellers auf ein Filterpapier. Dieses wurde in einer Petrischale (Ø 35 mm) mit Nährmedium auf spezielle Metallstützen gesetzt, wobei der Kontakt zwischen der Haut und dem Medium gewährleistet sein muss. Die Kulturschalen, das Filterpapier sowie die Metallstützen wurden von der Phenion GmbH mitgeliefert, ebenso das Nährmedium (ALI-Culture Medium, Phenion GmbH & Co. KG, Düsseldorf, Deutschland), welches gemäss Hersteller keine Glucocorticoide enthält. Die Kultivierung erfolgte im Inkubator (37°C, CO₂-Anteil 5%, Luftfeuchtigkeit 90 % r.h.). Der eigentliche Versuch wurde am Folgetag, d.h. am Kulturtag 14, gestartet.

Gegenüber den Vorgaben des Herstellers wurden zur Durchführung des Versuchs die folgenden Modifikationen vorgenommen:

- Inkubation nach Ankunft der Haut in 6 ml statt wie vorgeschrieben in 4-5 ml Nährmedium. Die Volumenerhöhung war zur Einstellung des verlangten Medium-Spiegels nötig.
- Zur Durchführung des Versuchs selbst wurde das Volumen des Nährmediums auf 2.5 ml reduziert. Anstelle der mitgelieferten Petrischalen verwendete man 12-Well-Plates. Dank dieser Volumenreduktion konnte eine zu starke Ausdünnung der Analyten (permeierender Wirkstoff, Interleukine etc.) vermieden werden.

Die Oberfläche des Phenion FT-Modells zeigte sich als sehr empfindlich. Berührungen hatten eine sichtbare Schädigung des Stratum corneums zur Folge. Das Handling der Hautstücke erforderte somit äusserste Sorgfalt.

D.1.3 Natskin-Modell

Das Natskin-Modell (Biopredict International, Rennes, Frankreich) ist ein gebrauchsfertig präpariertes ex vivo-Humanhautmodell, bestehend aus Epidermis und Dermis (teilweise Subkutis) und wird der weiblichen Bauchdecke entnommen. Im Nährmedium kultiviert bleibt die Haut während einigen Tagen histologisch intakt und metabolisch aktiv.

Für die Versuche zur Bestimmung der optimalen UV-Strahlendosis wurde das kleinere Format (innerer Durchmesser 5mm) eingesetzt. Zur Durchführung der Experimente mit Modellformulierung wählte man hingegen das grössere Format (innerer Durchmesser 10 mm). Dank der vergrösserten Applikationsfläche (0.785 cm^2) konnten bis zu $100 \mu\text{l}$ Modellformulierung aufgetragen werden, was den quantitativen Nachweis des Wirkstoffes im Permeationsversuch erleichterte.

Die Applikationsfläche ist im Natskin-Modell durch einen fest an der Haut haftenden Kunststoffring definiert. Der Kunststoffring verhindert den direkten Übergang von Komponenten aus der Modellformulierung in das Nährmedium, d.h. gibt den perkutanen Permeationsweg klar vor.

Applikationsfläche für Formulierung

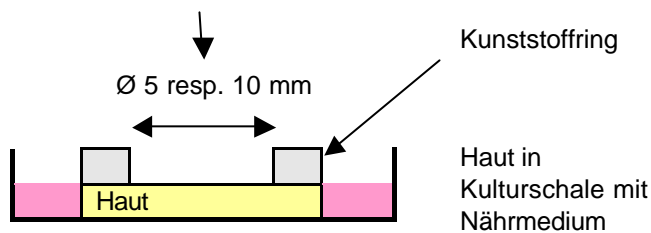


Abb. D.3: Natskin-Modell mit Kunststoffring (schematische Darstellung von der Seite)

Der Hersteller lieferte das Natskin-Modell gekühlt und fixiert in geliertem Medium. Nach Ankunft wurde die Haut vorerst im Kühlschrank (4°C) zwischengelagert und vor dem Versuchsstart am Folgetag während 30 min. im Inkubator temperiert (30°C , CO_2 -Anteil 5 %, Luftfeuchtigkeit 90 % r.h.). Zur Durchführung der Experimente wurde das Hautmodell in 6-Well-Plates in je 1.5 ml (kleineres Format) respektive 2.5 ml (grösseres Format) spezialisiertes, vom Hersteller mitgeliefertes Nährmedium (Skin Short Term Culture Medium, Biopredict International, Rennes, Frankreich) eingesetzt und im Inkubator kultiviert. Gemäss Hersteller ist das gelieferte Medium frei von Glucocorticoiden.

D.2 Externer Reiz

Verschiedene externe Reize bewirken eine irritationsbedingte Hautentzündung (vgl. C.1.3.2). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden zur Auslösung von entzündlichen Zuständen im in vitro- / ex vivo-Hautmodell einerseits physikalische (UV-Bestrahlung) und andererseits chemische Reize (irritative Substanzen) ausgewählt. In beiden Fällen sollte dabei das Hautmodell eine maximal erfassbare Entzündung (anhand von zellbiologischen Markern) bei einer gleichzeitig minimalen Beeinträchtigung der Hautviabilität erfahren. Nur bei bestmöglich erhaltener Viabilität kann ein Hautmodell auf eine antiinflammatorische Behandlung in noch messbarem Ausmass ansprechen. Die Herausforderung bestand also darin, den diesbezüglich optimalen Bereich zu finden.

Die Irritationsversuche wurden grundsätzlich im Triplikat und in Referenz zu einer Negativkontrolle durchgeführt.

D.2.1 Auslösung einer Hautentzündung durch UV-Bestrahlung (physikalischer Reiz)

Der irritative Effekt von UV-Strahlung auf Haut ist allgemein bekannt und in der Literatur umfangreich beschrieben (vgl. C.1.3.2.2). Die vorliegende Arbeit umfasst die Untersuchung des UV-Einflusses auf das SkinEthic-, das Phenion FT- und auf das Natskin-Modell. Für das im Folgenden beschriebene Vorgehen bei der UV-Bestrahlung und für die Wahl der Strahlungsdosis beachtete man weitgehend die im Haus erarbeitete Methodik (Chatelain et al., Preclinical Research / Biopharmacy, Spirig Pharma AG, Schweiz, 2006; Daten nicht publiziert).

D.2.1.1 Leistung, Spektrum und Dosis

Die Bestrahlung erfolgte am Suntest CPS+ (Atlas, Material Testing Technology BV, Deutschland). Das Suntest CPS+ enthält als Strahlungsquelle eine luftgekühlte Xenon-Bogenlampe, welche über 1.1 kW Leistung verfügt. Dank Reflexion an der parabolisch geformten Wand der geschlossenen Probenkammer ist eine gleichmässige horizontale Bestrahlung der Proben in konstantem Abstand möglich.

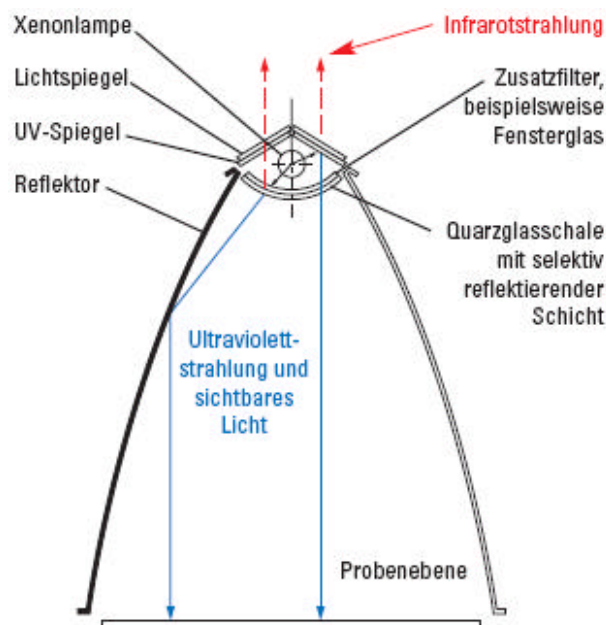


Abb. D.4: Schematische Darstellung der Anordnung im Suntest CPS+ (Atlas, Material Testing Technology BV, Deutschland)

Zur Bestrahlung wurde ein dem natürlichen Sonnenlicht möglichst ähnliches Spektrum gewählt. Dazu rüstete man die Xenon-Bogenlampe zusätzlich mit dem so genannten „solar standard-filter“ (nach COLIPA, the european cosmetic toiletry and perfumery association) aus. Daneben ist am Suntest CPS+ die globale Bestrahlungsleistung auf die Probe einstellbar (250, 550 oder 750 W/m²). Im Haus hat sich die Bestrahlung mit 750 W/m² etabliert. Dank der hohen Leistung kann für eine gleiche Dosis die Bestrahlungsdauer reduziert und dadurch das Austrocknen der Hautproben vermindert werden.

Die jährliche Kalibrierung hat für eine Strahlungsleistung von 750 W/m² und nach Applikation des „solar standard-filters“ das folgende Emissionsspektrum ergeben:

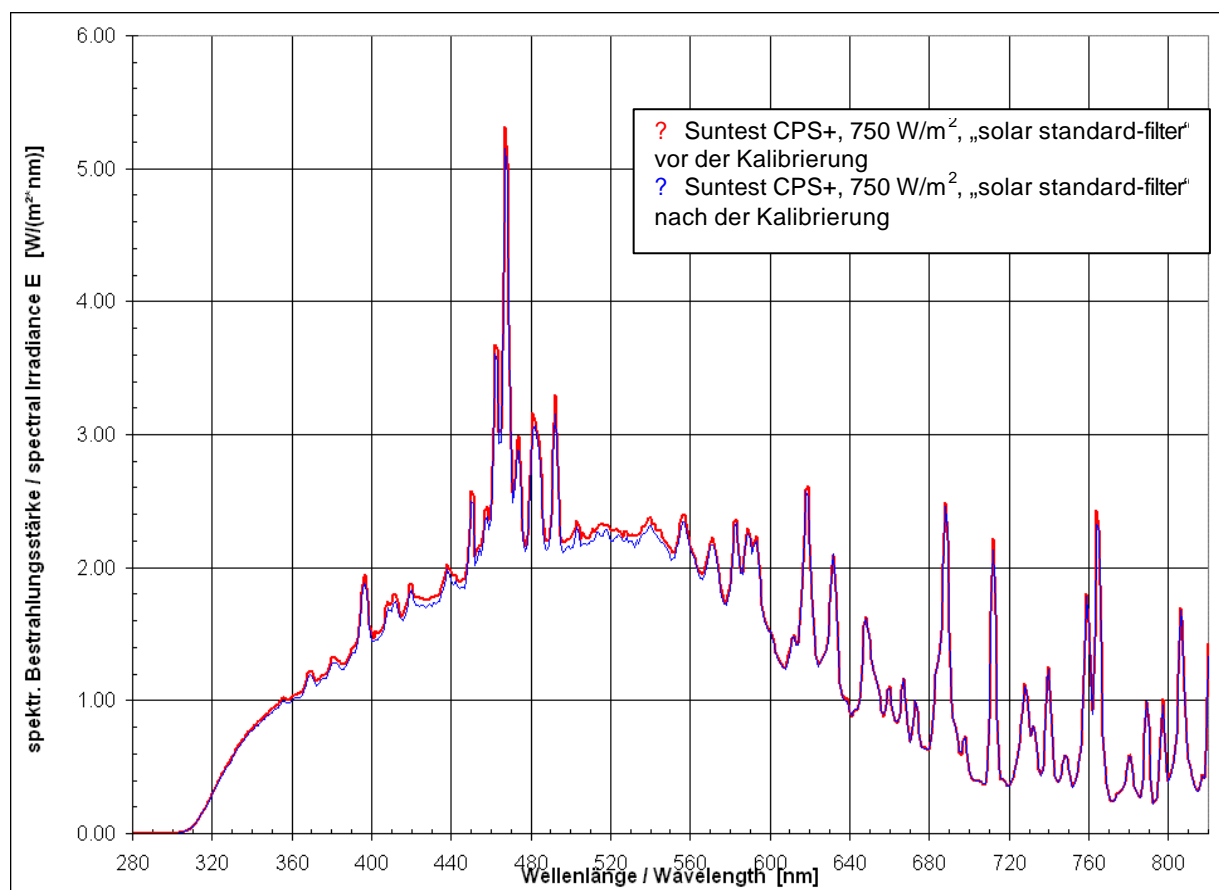


Abb. D.5: Emissionsspektrum im Suntest CPS+ bei einer Strahlungsleistung von 750 W/m² und Applikation des „solar standard-filters“ (nach COLIPA) (Opto.cal GmbH, Movelier, Schweiz)

Das Spektrum zeigt, dass die UVA-Strahlung (320-400 nm) gegenüber der UVB-Strahlung (290-320 nm) massiv dominiert. Der Hauptanteil des emittierten Lichts liegt im sichtbaren Bereich (400-760 nm). Ab rund 760 nm geht das Spektrum in den Infrarotbereich über.

Für die Wahl der an den Hautmodellen applizierten Strahlendosis wurde die Gewichtung nach McKinley und Diffey berücksichtigt. Diese beruht auf der Tatsache, dass die biologische Wirkung der Strahlung auf die Haut nicht nur von der Strahlungsstärke allein, sondern auch von der Wellenlänge abhängt. Als Parameter dient dabei die erythemale Wirkung der einzelnen Wellenlängen (CIE-action spectrum) (McKinley und Diffey 1987). Durch Integration des gewichteten Spektrums über die Wellenlänge gelangt man zur biologisch relevanten Strahlungsstärke (CIE-weighted irradiance).

Für eine globale Strahlungsleistung von 750 W/m^2 , bezogen auf den UV-Bereich nach Montage des „solar standard-filters“ und unter Berücksichtigung der Gewichtung nach McKinley und Diffey errechnen sich demnach für die einzelnen UV-Dosen die folgenden Bestrahlungszeiten:

Tab. D.2: Strahlungsstärke, UV-Dosis und die entsprechende Bestrahlungszeit am Suntest CPS+

Physikalische Strahlungsstärke (Irradiance)		Biol. relevante Strahlungsstärke (CIE-weighted irradiance) unter Berücksichtigung der Gewichtung nach McKinley und Diffey (290 - 400 nm) (W/m^2)	Biol. relevante Dosis (CIE-weighted irradiation)		Zeit für Bestrahlung (min.)
über den gesamten Wellenlängenbereich (300 – 800 nm) (W/m^2)	im UV-Bereich nach Applikation des „solar standard-filters“ (290 - 400 nm) (W/m^2)		(mJ/cm^2)	(MED*)	
750	81.2	0.401	20	0.8	8.3
			40	1.6	16.6
			60	2.4	24.9
			125	5	51.9
			250	10	103.9
			500	20	207.8

*minimale Erythemdosis

Wie bereits erwähnt, war im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht nur der Einfluss der Strahlung auf die Hautmodelle von Interesse, sondern auch die allfällige Wirkung einer anschließenden antiinflammatorischen Behandlung. Zur Ermittlung der in diesem Zusammenhang optimalen UV-Bestrahlung wurde für jedes Hautmodell eine Dosisfindung durchgeführt (vgl. E.1.4.1 und E.2).

Um für alle Hautproben eine konstant reproduzierbare UV-Dosis zu gewährleisten, wurde die Xenon-Bogenlampe bereits mind. 10 min. vor jeder Bestrahlung in Betrieb genommen.

D.2.1.2 Ablauf und Versuchsbedingungen

Ablauf

Kurz vor der UV-Bestrahlung wurden alle drei Hautmodelle in frisches Nährmedium transferiert. Die Bestrahlungsbedingungen wurden wie folgt gewählt:

SkinEthic-Modell

Um ein Austrocknen während der Bestrahlungszeit zu verhindern, wurde für das SkinEthic-Modell das Volumen des Maintenance Mediums von 1 ml auf 1.5 ml erhöht. Die Bestrahlung erfolgte in 6Well-Plates. Nach der Bestrahlung wurden die Hautproben sofort in je 1 ml frisches Maintenance Medium transferiert.

Phenion FT-Modell

Auf Empfehlung von Phenion GmbH wurde zur Bestrahlung mit UV-Licht das ALI-Culture Medium gegen Phosphat-Puffer (PBS) ohne $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ ausgetauscht. Auf diese Weise sollte die allfällige Bildung von radikalischen Abbauprodukten unter UV-Einfluss unterbunden werden.

Dazu wurde das ALI-Culture Medium aus den Kulturschalen abgesaugt und durch das gleiche Volumen PBS (6 ml) ersetzt. Das Filterpapier wurde nicht ausgetauscht. Die Bestrahlung erfolgte in den durch Phenion GmbH gelieferten Kulturschalen. Sofort nach Bestrahlung transferierte man das Hautmodell wieder in ALI-Culture Medium (2.5 ml), welches in einer 24-Well-Plate mit frischem Filterpapier vorgelegt worden war.

Natskin-Modell

Die Bestrahlung des Natskin-Modells erfolgte in 6-Well-Plates in 1.5 ml (kleineres Format) respektive 2.5 ml (grösseres Format) Skin Short Term Culture Medium. Nach der Bestrahlung wurde das Medium sofort durch frisches ersetzt.

Versuchsbedingungen

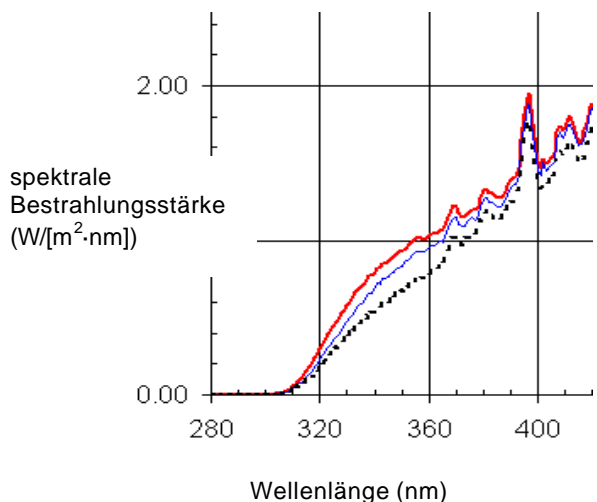
Temperatur

Messungen mittels Datalogger ergaben, dass unter Applikation einer UV-Dosis von 60 mJ/cm² (entspricht einer Bestrahlungsdauer von 25 min.) die Temperatur in der Probenkammer des Suntest CPS+ auf durchschnittlich 29°C anstieg. Diese Temperaturverhältnisse sollten für alle drei Hautmodelle unproblematisch sein (vgl. Inkubation bei 30°C respektive 37°C). Aus diesem Grund wurde auf eine zusätzliche Kühlung des Suntest CPS+ verzichtet.

Luftfeuchtigkeit und Absorption der UV-Strahlung durch den Deckel

Aus der gleichen Messung resultierte eine Reduktion der relativen Luftfeuchtigkeit in der Probenkammer auf durchschnittlich 15.7 % r.h. Um ein signifikantes Austrocknen der Hautproben zu verhindern, wurde die Bestrahlung jeweils bei geschlossener Well-Plate respektive Kulturschalendeckel durchgeführt.

Ein 6-Well-Plate-Deckel zeigt im Bereich < 300 nm eine mit abnehmender Wellenlänge steigende Absorption (Absorptionsmessung eines 6-Well-Plate-Deckels am UV/VIS-Spektrophotometer, Daten nicht aufgeführt). Auf das Emissionsspektrum im Suntest CPS+ bei einer Strahlungsleistung von 750 W/m² und nach Applikation des „solar standard-filters“ (nach COLIPA) hat der Plate-Deckel die folgende Auswirkung:



- ? Suntest CPS+, 750 W/m², „solar standard-filter“, ohne Deckel
- ? Suntest CPS+, 750 W/m², „solar standard-filter“, mit Deckel 96 Well-Plate
- ??? Suntest CPS+, 750 W/m², „solar standard-filter“, mit Deckel 6 Well-Plate

Abb. D.6: Emissionsspektrum im Suntest CPS+ bei einer Strahlungsleistung von 750 W/m² und Applikation des „solar standard-filters“ (nach COLIPA) mit und ohne Deckel (Opto.cal GmbH, Movelier, Schweiz)

Um in jedem Fall reproduzierbare Verhältnisse zu gewährleisten, wurde die Bestrahlung konsequent mit geschlossenem Plate-Deckel durchgeführt.

D.2.2 Auslösung einer Hautentzündung durch chemische Irritantien (chemischer Reiz)

Die Irritation durch chemische Substanzen wurde nur am SkinEthic-Modell durchgeführt.

D.2.2.1 Irritation durch Natrium Dodecyl Sulfat

Natrium Dodecyl Sulfat (SDS) ist ein weit verbreitetes, allgemein bekanntes chemisches Irritans, welches unter anderem oft als Positivkontrolle in der Prüfung des Irritationspotentials von Chemikalien eingesetzt wird (Lee und Maibach 1995; de Brugerolle de et al. 1999; Coquette et al. 2003; Welss et al. 2004; Tornier et al. 2005; Kandarova et al. 2006a).

Eigenschaften von SDS

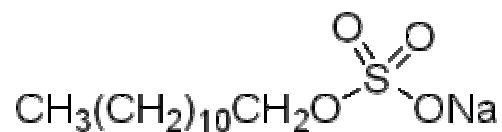
(Hartke et al. 2004b)

Synonym: Natrium Lauryl Sulfat (SLS)

Eigenschaften: SDS ist ein anionisches Tensid. Es verringert die Oberflächenspannung und emulgiert Fette. Bei längerfristiger Anwendung von Externa, die SDS enthalten, können Hautirritationen auftreten.

Löslichkeit: leicht löslich in Wasser (unter Bildung einer opaleszierenden Lösung)

Strukturformel:



Applikation von SDS

Die Applikation von SDS erfolgte topisch und über das Nährmedium. Es ist bekannt, dass SDS auf die Hautbarriere eine schädigende Wirkung zeigt (Widmer et al. 1994) (vgl. C.1.3.2.1). Da in der vorliegenden Arbeit auch die Wirkung einer an die Irritation anschließenden antiinflammatorischen Behandlung sowie die Hautpenetration des entsprechenden Wirkstoffes von Interesse war, sollte die Barrierefunktion so wenig wie möglich beeinflusst werden. Eine Möglichkeit hierzu war die Zuführung von SDS über das Nährmedium. Auf diese Weise entfiel der lokal konzentrierte Kontakt mit dem Stratum corneum bei der Applikation und somit der direkt schädigende Einfluss auf die Hautbarriere. Zur experimentellen Hautirritation sind in der Literatur SDS-Dosierungen von 0.1 bis 5% beschrieben (Boelsma et al. 1998).

a) Zugabe topisch

Für die topische Applikation wurde SDS zu 0.2 % in PBS gelöst. Die Lösung wurde direkt nach Herstellung keimfiltriert.

Vor Applikation der SDS-Lösung wurde das Hautmodell in eine 6-Well-Plate mit frischem Nährmedium transferiert (1 ml / Probe). Anschliessend tropfte man 30 µl/cm² SDS-Lösung auf die Hautoberfläche, wobei die gleichmässige Verteilung auf der Oberfläche mit Hilfe eines feinen Nylon-Netzes sichergestellt wurde. Nach einer Inkubationszeit von 2 h (im Inkubator bei 37°C, CO₂-Anteil 5 %, Luftfeuchtigkeit 90 % r.h.) wurde die SDS-Lösung vollständig abgesaugt und die Hautoberfläche dreimal mit PBS gespült. Für die weitere Inkubation transferierte man die Hautproben erneut in frisches Nährmedium (1ml / Probe).

b) Zugabe zum Nährmedium

Für die Zugabe über das Nährmedium wählte man die SDS-Dosierungen 0.1 %, 0.2 % und 0.4 %. Das SDS wurde im Maintenance Medium gelöst, welches anschliessend keimfiltriert wurde.

Das Maintenance Medium mit der entsprechenden SDS-Konzentration wurde in einer frischen 6-Well-Plate vorgelegt (1 ml / Probe) und die Hautproben eingesetzt. Nach einer Inkubationszeit von 2 h (im Inkubator bei 37°C, CO₂-Anteil 5%, Luftfeuchtigkeit 90 % r.h.) wurde das SkinEthic-Modell durch dreimaliges Schwenken in jeweils frischem PBS vollständig vom SDS-haltigen Medium befreit und zur weiteren Inkubation in neu vorgelegtes Nährmedium transferiert (1 ml / Probe).

D.2.2.2 Irritation durch Tributylzinn Hydrat

Tributylzinn Hydrat (TBT) ist ein Biozid, welches unter anderem zur Konservierung von Holzinstallationen in feuchtem Milieu eingesetzt wird. Der direkte Hautkontakt kann schwere Hautirritationen hervorrufen. Corsini et al. haben nach Applikation von TBT im Dosisbereich 67 - 536 nmol (Applikationsvolumen 10 µl) in Maushaut eine vermehrte Expression von IL-1a und TNF-a nachgewiesen (Corsini et al. 1996; Corsini et al. 1997b).

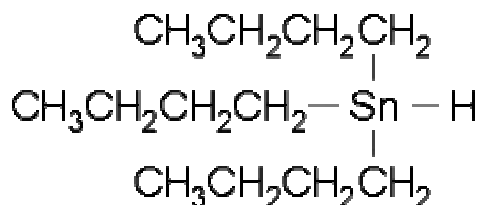
Eigenschaften von TBT

(Neumüller 1988)

Eigenschaften: TBT ist eine metallorganische Verbindung basierend auf Zinn und wirkt als Biozid.

Löslichkeit: gut löslich in den meisten organischen Lösungsmitteln
nicht löslich in Wasser

Strukturformel:



Applikation von TBT

Die Applikation von TBT erfolgte über das Nährmedium. Die Dosierung wurde in Anlehnung an die Untersuchungen von Corsini et al. gewählt, wobei die bei Corsini et al. in 10 µl Aceton applizierte TBT-Menge in 1ml Nährmedium gelöst wurde. Die entsprechenden Konzentrationen erreichte man durch Verdünnen. Das Nährmedium wurde nach Herstellung keimfiltriert.

Tab. D.3: Dosierung von TBT in Maintenance Medium zur systemischen Applikation

TBT-Konzentration (nmol)	TBT-Menge in 10 µl Aceton (Corsini et al. 1997b) (µg)	TBT-Menge in 1 ml Maintenance Medium (µg)
134	0.00046	0.00046
268	0.00092	0.00092
536	0.00184	0.00184

Der Transfer der Hautproben in die TBT-haltigen Nährmedien verlief analog zur SDS-Applikation.

D.3 Antiinflammatorische Behandlung

Die antiinflammatorische Behandlung erfolgte topisch. Dazu wurden Modellformulierungen entwickelt und auf die Oberfläche der in vitro- / ex vivo-Hautmodelle appliziert. Eine Zugabe des Wirkstoffs über das Nährmedium („systemische“ Applikation) wäre wenig sinnvoll gewesen, da im Rahmen der vorliegenden Arbeit auch der Einfluss des Vehikels auf die Penetration / Permeation des Wirkstoffes nach topischer Applikation von Interesse war. Alle Versuche liefen vehikelkontrolliert ab. Teilweise wurde auch eine gänzlich unbehandelte Probe mitgeführt. Die Behandlung erfolgte jeweils im Triplikat.

D.3.1 Herstellung und Charakterisierung der Modellformulierungen

D.3.1.1 Wirkstoff BV-17

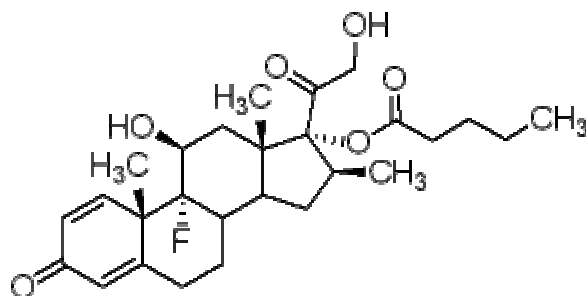
Zur antiinflammatorischen Behandlung wurden Glucocorticoide, stellvertretend das BV-17, ausgewählt. Die Wirkung der Glucocorticoide ist allgemein bekannt und in der Literatur umfangreich beschrieben (vgl. C.3.1). BV-17 im Speziellen ist für die Behandlung von Hautirritationen therapeutisch relevant, penetriert relativ gut in die Haut und zeigt eine starke Wirksamkeit (vgl. C.3.6).

Es existieren bereits Arbeiten, welche die Untersuchung des antiinflammatorischen Effektes von BV-17 oder eines analogen Glucocorticoids auf künstlich irritierte Zellen in Kultur zum Gegenstand haben (vgl. C.3.4). Entsprechende Versuche an in vitro rekonstruierter Haut wurden hingegen kaum durchgeführt.

Eigenschaften von BV-17

(Niedner und Ziegenmeyer 1992)

Strukturformel:



Molekulargewicht: 476.6

Eigenschaften: weisses bis cremeweisses, geruchs- und geschmackloses Pulver

Löslichkeit: praktisch unlöslich in Wasser
1 Teil löst sich in 12 – 16 Teilen Ethanol

UV_{max}: 239 nm

Stabilität: BV ist lichtempfindlich.

Leichte Umlagerung von 17-Monoester (BV-17) in den 21-Monoester (BV-21) besonders im alkalischen Milieu. Die Hydrolyse vom BV-17 zum Betamethason-Alkohol spielt eine untergeordnete Rolle.

So wird in Salbenrezepturen bei schwach basischen pH-Werten innerhalb von 5 Tagen das BV-17 zu 75 % abgebaut. Schwach saure pH-Werte wirken hingegen stabilisierend (pH-Optimum bei ca. 5 bis 6). Die säurekatalysierte Isomerisierung nimmt erst bei wesentlich tieferen pH-Werten einen nennenswerten Umfang an.

Dosierung BV-17

Der physiologische Konzentrationsbereich für GC liegt bei $< 10^{-7}$ M; vgl. für Cortisol gilt ein Blutspiegel von 5.5×10^{-7} M bereits als stark erhöht (Thews et al. 1991). Für die Therapie von Hautentzündungen ist die Applikation von Dermatika mit 0.05 bis 0.1 % (entspricht 10^{-3} M bis 2×10^{-3} M) BV sinnvoll (Niedner und Ziegenmeyer 1992). In den beiden aktuell am Schweizer Markt erhältlichen Produkten Celestoderm®-V Salbe und Celestoderm®-V Crème (Essex Chemie AG) ist BV zu 0.1 % dosiert. Die Untersuchungen der vorliegenden Arbeiten decken diesen gesamten Dosisbereich ab (2×10^{-7} M bis 2×10^{-2} M). Der Hauptfokus lag auf den Dosierungen 2×10^{-5} M und 2×10^{-4} M.

Aufgrund der Nachweisgrenze der HPLC-Analytik musste zur Durchführung der Penetrations- / Permeationsversuche auf die tiefsten BV-17-Dosierungen verzichtet werden. Zur Ermittlung von quantitativ zuverlässigen Resultaten an allen drei Hautmodellen war die Applikation von BV-17 in der Dosierung von mindestens 2×10^{-5} M erforderlich.

D.3.1.2 Formulierungen

Zur Applikation des Wirkstoffes BV-17 wurden die galenischen Formen Lösung und O/W-Emulsion ausgewählt (vgl. C.2). Von Interesse war dabei die unterschiedliche Freisetzung und Hautpenetration sowie die daraus erwachsenden Konsequenzen auf die Wirkstoffeffekte in der Haut.

D.3.1.2.1 Lösung

Entwicklung

Da sich BV-17 gut in Ethanol löst, wurde die Lösung in einer ersten Versuchsserie mit absolutem Ethanol hergestellt. Ethanol verfügt jedoch bekanntermassen über ein beträchtliches Hautirritationspotential und sollte nur in möglichst verdünnter Form eingesetzt werden. Andernfalls können die Resultate aufgrund eines zu ausgeprägten Vehikeffekts stark verfälscht werden. In einem Löslichkeitsversuch konnte ermittelt werden, dass aufgrund der sehr begrenzten Wasserlöslichkeit von BV-17 der Zusatz von maximal PBS möglich ist (Daten nicht gezeigt). Für die weiteren Versuche wurde somit das Lösungsmittelgemisch Ethanol 50 % - PBS 50 % (V/V) eingesetzt, in welchem BV-17 in allen applizierten Dosierungen gut löslich ist.

Neben Ethanol wurde als Lösungsmittel auch Rizinusöl überprüft. BV-17 ist darin mindestens in der Konzentration 7×10^{-3} M löslich, was für die vorliegende Anwendung ausreichend ist. BV-17 in öliger Lösung wurde allerdings nur in einem einzelnen Versuch appliziert. Darauf basierend wurde im Anschluss die O/W-Emulsion entwickelt (vgl. D.3.1.2.2).

Zusammensetzung

Tab. D.4: Zusammensetzung der Lösung

Substanz	Dosierung BV-17			
	2×10^{-7} M (= 0.0954 µg/ml)	2×10^{-6} M (= 0.954 µg/ml)	2×10^{-5} M (= 9.54 µg/ml)	2×10^{-4} M (= 95.4 µg/ml)
BV-17	0.00954 mg	0.0954 mg	0.954 mg	9.54 mg
abs. Ethanol 50 % - PBS 50 %	ad 100 ml	ad 100 ml	ad 100 ml	ad 100 ml

Herstellung

Zur Herstellung wurde eine konzentrierte Vorlösung (BV-17 10^{-2} M) in absolutem Ethanol hergestellt, welche anschliessend zu den verschiedenen Dosierungen verdünnt wurde. Dabei wählte man das Verdünnungsmedium so, dass letztendlich alle Prüflösungen auf dem Lösungsmittelgemisch Ethanol 50 % - PBS 50 % basierten. Vor Applikation wurden die Prüflösungen keimfiltriert.

Charakterisierung

Aussehen: klare, farblose Lösung
 Dichte: 0.93 g/ml
 pH-Wert: 8.0
 BV-17-Stabilität: Ein pH-Wert von 8.0 ist für die BV-17-Stabilität nicht ideal. Die in der Literatur beschriebene Umlagerung vom BV-17 zum BV-21 konnte entsprechend detektiert werden. Der hydrolytische Abbau zum Betamethason-Alkohol war hingegen quantitativ nicht relevant (Chromatogramme siehe Anhang H.6.2.1). Somit wurde die Lösung vor jeder Applikation frisch hergestellt.

D.3.1.2.2 O/W-Emulsion**Entwicklung**

An die Entwicklung der Modellemulsion wurden die folgenden Anforderungen gestellt:

- Keine stark okklusive Wirkung (O/W-Emulsion).
- BV-17 muss gelöst vorliegen.
- pH-Wert 5 - 6 (entspricht dem physiol. pH-Wert der Haut, Stabilitätsoptimum für BV-17).
- Darf keine potenziell hautreizenden Komponenten enthalten (keine Konservierungsmittel, keinen Ethanol als Lösungsmittel für BV-17, ausschliesslich milde Emulgatoren).
- Mittlere Viskosität (eine zu geringe Viskosität verunmöglicht die definierte Applikation im Phenion FT-Modell, vgl. D.1.2; eine zu hohe Viskosität erschwert die Dosierbarkeit).
- Die Modellemulsion muss nicht sterilisierbar sein. Da sie jedoch unkonserviert sein soll, muss die Herstellung vor jeder Applikation auf die Hautmodelle frisch erfolgen.
- Die BV-17-Konzentration in der äusseren (wässrigen) Phase muss derjenigen der einfachen Lösung entsprechen (vgl. Wirkstoffverteilung zwischen den Phasen).

Aufgrund dieser Vorgaben wurde eine O/W-Emulsion auf Pemulen-Basis entwickelt.

Zusammensetzung

Tab. D.5: Zusammensetzung der O/W-Emulsion

Substanz	Menge für 100 g			
	BV-17 2×10^{-5} M (= 9.54 µg/ml)	BV-17 2×10^{-4} M (= 95.4 µg/ml)	BV-17 2×10^{-3} M (= 954 µg/ml)	BV-17 2×10^{-2} M (= 9540 µg/ml)
BV-17	0.954 mg	9.54 mg	95.4 mg	954 mg
Rizinusöl	30.0 g	30.0 g	30.0 g	30.0 g
gereinigtes Wasser	70.0 g	70.0 g	70.0 g	70.0 g
Pemulen TR2	0.1 g	0.1 g	0.1 g	0.1 g
Natriumhydroxid 10 %	q.s. ad pH 5 – 6 (ca. 0.15 g)	q.s. ad pH 5 – 6 (ca. 0.15 g)	q.s. ad pH 5 – 6 (ca. 0.15 g)	q.s. ad pH 5 – 6 (ca. 0.15 g)

Rizinusöl

(Hartke et al. 2004c)

Synonym: Ricini oleum, Castor oil
 Aussehen: klare, dickflüssige, fast farblose bis schwach gelb gefärbte Flüssigkeit
 Löslichkeit: löslich in Chloroform und Ether, mischbar mit Essigsäure 98 % und Ethanol, wenig löslich in Petrolether
 Eigenschaften: Pflanzliches Öl.
 Die Fettsäurefraktion besteht zu 85 bis 90 % aus Ricinolsäure (= 12-Hydroxy-9,10-cis-octadecensäure), welche sich durch eine zusätzliche Hydroxygruppe sowie einer Doppelbindung im Alkylschwanz auszeichnet.

Dieser hohe Anteil an Ricinolsäure führt zu bemerkenswerten, von anderen pflanzlichen Ölen abweichenden Eigenschaften (hohe Viskosität und Dichte, polares Lösungsverhalten).

BV-17 ist in Rizinusöl löslich.

In der Literatur wurden keine Hinweise auf einen irritativen Effekt auf die Haut gefunden.

Pemulen TR2

(Produktebroschüre des Herstellers (Noveon 1999))

Synonym: Acrylates / C10-30 Alkyl Acrylate Crosspolymer (INCI)

Aussehen: weisses Pulver

Löslichkeit: löslich in Wasser (pH-Wert > 4)

Eigenschaften: Pemulen TR2 ist ein polymerischer Gelbildner und Öl-in-Wasser-Emulgator auf Polyacrylat-Basis. Analog zum Carbopol formt der Polyacrylat-Teil nach Einstellen des pH-Werts ein dreidimensionales Gerüst. Durch Bindung von Hydratwasser bildet sich ein Gel aus. Im Pemulen TR2 sind an das Polyacrylat-Gerüst zusätzlich Alkyl-Ketten gebunden. Diese verleihen der Struktur amphiphilen Charakter und vermögen Lipidtröpfchen zu fixieren.

In der Literatur wurden keine Hinweise auf einen irritativen Effekt auf die Haut gefunden.

Herstellung

1) Lipidphase: BV-17 wurde im Rizinusöl unter Rühren auf dem Magnetrührer bei Raumtemperatur klar gelöst.

2) Wasserphase: Pemulen TR2 wurde mittels Homogenisierstab homogen im Wasser suspendiert. Durch anschliessendes Zutropfen von Natriumhydroxid 10 % stellte man den pH-Wert ad 5 bis 6 ein. Dadurch ergab sich ein klares Gel mit mittlerer Viskosität.

3) Die Lipid- und die Wasserphase wurden mittels Ultra-Turrax homogen emulgiert.

Es erfolgte keine Endsterilisation. Da die Emulsion auch keine Konservierungsmittel enthält, wurde sie vor jeder Applikation frisch hergestellt.

Charakterisierung

Aussehen: weisse, homogene Emulsion, geringe bis mittlere Viskosität (lotionartig)

Dichte: 0.98 g/ml

pH-Wert: 5 bis 6

Phasenlage: O/W-Emulsion; Die Tröpfchengrößenverteilung ist sehr heterogen.

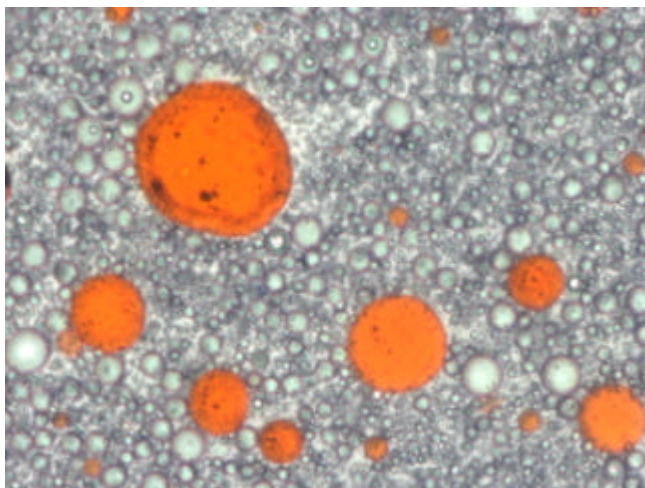
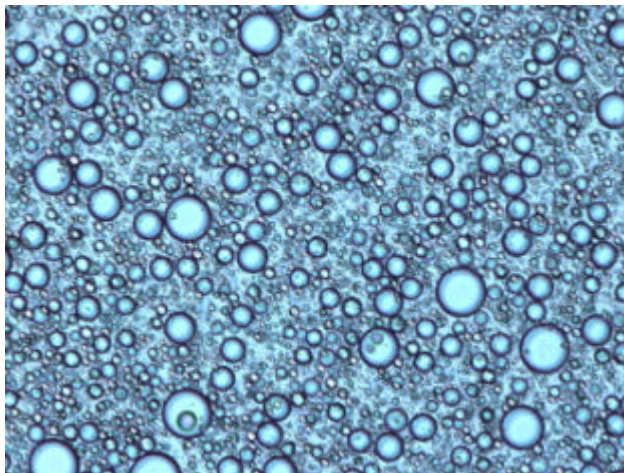


Abb. D.7: Modellemulsion (Vehikel) mit rot angefärbter innerer, lipophiler Phase (angefärbt mit Sudanrot, Vergrösserung 100-fach)

Stabilität BV-17: Obwohl der pH-Bereich mit 5 bis 6 für die BV-17-Stabilität optimal gewählt worden war, konnte die in der Literatur beschriebene Umlagerung vom BV-17 zum BV-21 detektiert werden. Der hydrolytische Abbau zum Betamethason-Alkohol war hingegen quantitativ nicht relevant (Chromatogramme siehe Anhang H.6.2.2). Die Modellemulsionen wurden somit vor jeder Applikation frisch hergestellt.

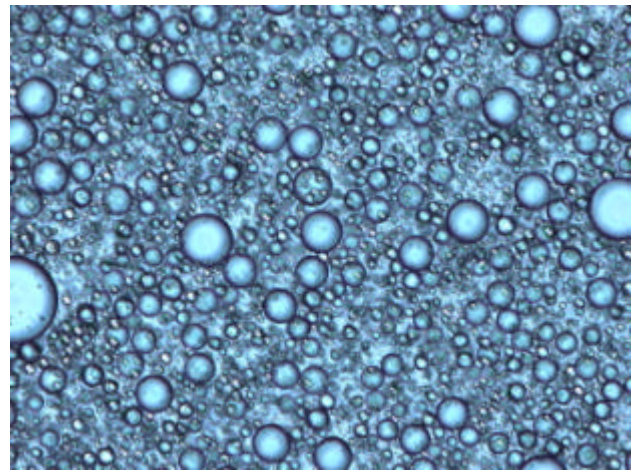
Löslichkeit BV-17: BV-17 liegt in den Dosierungen 2×10^{-5} M, 2×10^{-4} M und 2×10^{-3} M gelöst, vorwiegend in der inneren Phase vor. In der Dosierung 2×10^{-2} M ist BV-17 in der Modellemulsion nicht mehr vollständig löslich (vgl. Abb. D.8).

BV-17 2×10^{-5} M
(= 9.54 µg/ml)



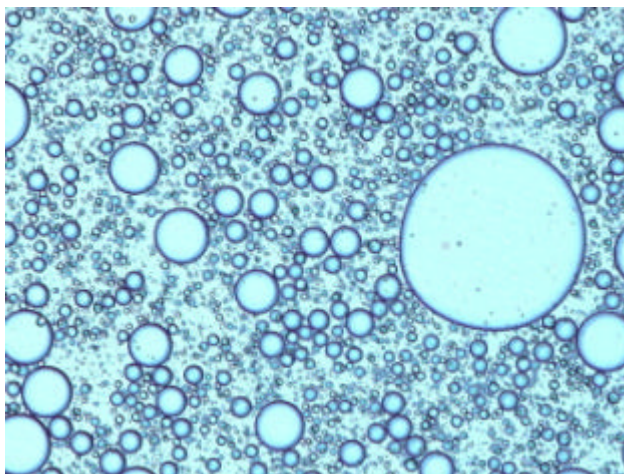
keine Kristalle, BV-17 gelöst

BV-17 2×10^{-4} M
(= 95.4 µg/ml)



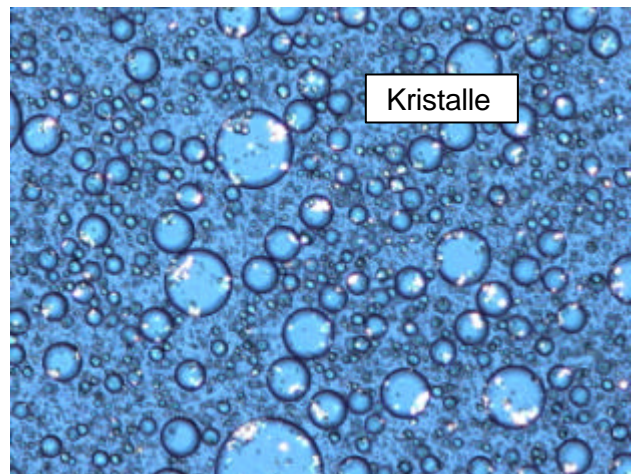
keine Kristalle, BV-17 gelöst

BV-17 2×10^{-3} M
(= 954 µg/ml)



keine Kristalle, BV-17 gelöst

BV-17 2×10^{-2} M
(= 9540 µg/ml)



Kristalle, BV-17 nur teilweise ungelöst

Abb. D.8: Modellemulsionen mit BV-17 in den verschiedenen Dosierungen (im polarisierten Licht, Vergrößerung 100-fach)

Wirkstoffverteilung zwischen den Phasen

Zur Ermittlung der Wirkstoffverteilung zwischen den Phasen brachte man die Emulsion durch Zentrifugation (30 min. bei 12500 rpm) zum Brechen. Die beiden Phasen wurde abpipettiert, in Methanol 50 % - Wasser 50 % (V/V) gelöst und in den Messbereich der HPLC-Analytik verdünnt (zur HPLC-Methode siehe D.5.1.2).

Es konnte gezeigt werden, dass BV-17 zu 99 % in der Lipid- und zu 1 % in der Wasserphase vorliegt (Daten zur Gehaltsbestimmung und Verteilung siehe Anhang H.6.3).

Tab. D.6: BV-17-Verteilung zwischen der Lipid- und der Wasserphase zu den einzelnen BV-17-Dosierungen (unter Berücksichtigung der Umlagerung von BV-17 zu BV-21)

BV-17-Dosierung	BV-17-Verteilung	
	Lipidphase (%)	Wasserphase (%)
2×10^{-5} M (= 9.54 µg/ml)	97.0	3.0
2×10^{-4} M (= 95.4 µg/ml)	99.1	0.9
2×10^{-3} M (= 954 µg/ml)	99.1	0.9
2×10^{-2} M (= 9540 µg/ml)	98.9	1.1

D.3.2 Wahl der Dosierung zu BV-17 für den Vehikelvergleich

Für einen direkten Vergleich der Emulsion mit der Lösung hinsichtlich Hautpenetration muss die BV-17-Konzentration in der mit dem Stratum corneum in unmittelbarem Kontakt stehenden Phase jeweils identisch sein. Da es sich bei der Modellemulsion um eine O/W-Emulsion handelt, ist für die Emulsion die BV-17-Konzentration in der Wasserphase relevant. Wie oben gezeigt, beträgt diese rund 1% der total eingearbeiteten Wirkstoffmenge. Unter Berücksichtigung dieser Vorgabe wurde die BV-17-Dosierung für den Vehikelvergleich wie folgt gewählt:

Tab. D.7: Wahl der BV-17-Dosierung für den Vehikelvergleich

Für die Hautpenetration relevante BV-17-Konzentration (M)	Wahl Dosierung	
	Lösung (M)	Emulsion (M)
2×10^{-5} (= 9.54 µg/ml)	2×10^{-5} (= 9.54 µg/ml)	2×10^{-3} (= 954 µg/ml)
2×10^{-4} (= 95.4 µg/ml)	2×10^{-4} (= 95.4 µg/ml)	2×10^{-2} (= 9540 µg/ml)

D.3.3 Applikation der Modellformulierungen

Die Applikation der Modellformulierung erfolgte einmalig und topisch. Wie eingangs bereits erwähnt, wäre eine Zugabe des Wirkstoffs über das Nährmedium („systemische“ Applikation) wenig sinnvoll gewesen, da im Rahmen der vorliegenden Arbeit auch der Einfluss des Vehikels auf die Penetration / Permeation des Wirkstoffes nach topsicher Applikation von Interesse war.

Die mit UV-Licht irritierten Hautproben wurden direkt nach Abschluss der Bestrahlung mit Modellformulierung versehen. Die Behandlung der auf chemischem Weg irritierten Haut startete zeitgleich mit dem Transfer in das SDS- respektive TBT-haltige Medium.

In Vorversuchen hatte man auch die Wirkung einer der Irritation vorangegangenen antiinflammatorischen Behandlung überprüft. Gegenüber der oben beschriebenen Methode konnte jedoch kein wesentlicher Unterschied festgestellt werden (Daten siehe H.4).

Vor dem Hintergrund der Penetrationsversuche wurden bei der Wahl der Applikationsmenge infinite Dose-Verhältnisse angestrebt (vgl. C.1.4.1). Aufgrund der Grösse der Applikationsfläche sowie der Gestaltung der Montage, welche sich in den drei Hautmodellen unterscheiden, musste die Applikationsmenge jeweils angepasst werden, wobei im Phenion FT- und im Natskin-Modell die grösstmögliche Formulierungsmenge aufgetragen wurden. Die Dosierung erfolgte volumetrisch (einfache Präzisionspipette für die Lösung, Präzisionspipette mit verstellbarem Ausstossdruck für die viskosere Emulsion). Die unterschiedlichen Gegebenheiten zur Probenapplikation in den drei Hautmodellen und die allenfalls damit verbundene Problematik wurden bereits beschrieben (vgl. D.1).

Tab. D.8: Applikationsvolumina für die einzelnen Hautmodelle

Hautmodell	Applikationsfläche (cm ²)	Montage	Applikationsvolumen	
			pro Hautprobe (µl/Hautprobe)	pro Oberfläche (µl/cm ²)
SkinEthic-Modell	0.5	Insert	250	500
Phenion FT-Modell	1.3	-	50	37.7
Natskin-Modell (grosstes Format)	0.8	Kunststoffring	100	127.3

Die Modellformulierung verteilte sich in allen Fällen homogen auf der Hautoberfläche. Zum einen war das Volumen gross genug, um den Applikationsbereich vollständig abzudecken, zum anderen ermöglichte die auch für die Emulsion nicht allzu hohe Viskosität ein ausgleichendes Verfliessen.

D.3.4 Inkubationszeit mit Modellformulierung

Die Inkubationszeiten mit Modellformulierung (d.h. Behandlungsdauer) wurden im Verlaufe der vorliegenden Arbeit variiert und waren abhängig vom untersuchten Parameter, von der Irritationsmethode und vom Ziel des jeweiligen Versuchs. Die Wahl stützte sich auf entsprechende Angaben in der Literatur.

Tab. D.9: Behandlungsdauer in den verschiedenen Versuchen unter Berücksichtigung des untersuchten Parameters, der Irritationsmethode und des Versuchsziels

Parameter	Irritationsmethode	Inkubationszeiten (h)	Versuchsziel
IL-1 sRII	(nicht irritiert)	6, 12, 24, 36 (ELISA) 2, 4, 6, 8 (PCR)	Evaluation zellbiologischer Marker
IL-1ra	(nicht irritiert)	5, 20 (ELISA) 2, 4, 6, 8 (PCR)	Evaluation zellbiologischer Marker
Lipocortin-1	(nicht irritiert)	2, 4, 6, 8 (PCR)	Evaluation zellbiologischer Marker
IL-8	UV-Bestrahlung	8, 20, 24, 26, 48 (ELISA) 24 (PCR)	Evaluation zellbiologischer Marker
IL-1a	UV-Bestrahlung	6, 8, 20, 24, 26, 48 (ELISA) 24 (PCR)	Evaluation zellbiologischer Marker und Irritationsmethode
	chemische Irritation	2, 6, 24 (ELISA)	
TNF-a	UV-Bestrahlung	24, 48 (ELISA)	Evaluation zellbiologischer Marker und Irritationsmethode
	chemische Irritation	2, 6, 24 (ELISA)	
LDH	UV-Bestrahlung	6, 8, 24, 48	Evaluation Irritationsmethode
	chemische Irritation	2, 6, 24	
MTT	UV-Bestrahlung	6, 8, 24, 48	Evaluation Irritationsmethode
	chemische Irritation	24, 26	
Histologie	UV-Bestrahlung	6, 8, 24, 48	Evaluation Irritationsmethode
	chemische Irritation	24	
quantitative Analyse BV-17	UV-Bestrahlung	2, 4, 6, 8, 14, 16, 18, 20, 22, 24 (HPLC)	Erfassung Permeationsprofil

D.4 Erfassung der Hautirritation und der Wirkung der antiinflammatorischen Behandlung

Die Ausprägung der Hautirritation, einerseits ausgelöst durch die Reizung und andererseits infolge der antiinflammatorischen Behandlung, wurde über die Menge von im Rahmen der Entzündungsreaktion in der Haut wichtigen Proteinen erfasst. Zusätzlich erfolgte eine Beurteilung der Zellviabilität anhand von entsprechend gängigen Methoden.

D.4.1 Indikatorproteine

Als Indikatorproteine für den Entzündungszustand in der Haut wurden IL-1a, IL-8, IL-6 und TNF-a ausgewählt. Zusätzlich wurde die Expression von Lipocortin-1, IL-1 sRII und IL-1ra untersucht, welche im Zusammenhang mit dem antiinflammatorischen Wirkmechanismus der GC stehen. Die entsprechende Relevanz all dieser Proteine ist im Kapitel C.1.3 ausgeführt.

Die Quantifizierung der Proteine erfolgte auf unterschiedlichen Expressionsstufen. Zum einen wurde mittels ELISA die zu einem bestimmten Zeitpunkt total vorhandene Proteinmenge erfasst. Zum anderen erlaubte die PCR-Analytik die Untersuchung der de novo-Synthese von mRNA zu einem Protein in Reaktion auf einen bestimmten Reiz.

Ebenfalls von Interesse war die Lokalisierung der Proteine. Die intra- oder interzellulär in der Haut verbliebenen Proteine konnten im Hautlysate quantifiziert werden. Die Erfassung der sezernierten Proteine (aufgrund von aktiver Sekretion oder von passivem Austreten nach Ruptur der Zellmembran) erfolgte aus dem Nährmedium.

D.4.1.1 ELISA

Die Proteine wurden mittels Sandwich ELISA (enzyme linked immunosorbent assay) erfasst. Die Quantifizierung erfolgte über die photometrische Messung einer enzymatisch katalysierten Farbreaktion (für IL-1a, IL-8, IL-6, IL-1ra und IL-1 sRII: Umsetzung von Tetramethylbenzidine durch die Meerrettichperoxidase; für TNF-a: Umsetzung von NADPH durch die alkalische Phosphatase, amplifiziert durch die Umsetzung von Iodonitrotetrazolium Violet durch die Diaphorase).

Je nach Versuchsdesign wurden die Proben im Duplikat oder nur einfach vermessen. Um sicherzustellen, dass die jeweils erfasste Proteinmenge aus den Hautproben stammt, wurde zu jedem Protein mindestens einmal eine Kontrollmessung im Nährmedium durchgeführt. Aufgrund des sigmoidalen Kurvenverlaufs der Eichwerte im ELISA wertete man die Messwerte mit Hilfe des „Four parameter logistic curve fit“ (4-PL) aus.

Zu allen analysierten Proteinen (IL-1a, IL-8, IL-6, TNF-a, IL-1ra und IL-1 sRII) existieren am Markt gebrauchsfertige ELISA-Kits (ELISA Quantikine® Immunoassays). Bei der Durchführung der Tests wurden die Vorschriften des Herstellers präzise und ausnahmslos befolgt.

Die Proben für den ELISA wurden folgendermassen aufbereitet:

a) Analyse sezernierte Proteine

Die Analyse der sezernierten Proteine konnte direkt aus dem Nährmedium erfolgen. Dabei war es möglich, aus der gleichen Mediumprobe jeweils mehrere Proteine zu ermitteln. In Abhängigkeit vom analysierten Protein und vom Hautmodell war teilweise eine Verdünnung der Medium-Proben (mit gereinigtem Wasser) erforderlich.

Tab. D.10: Verdünnung der Medium-Proben für den ELISA

	SkinEthic-Modell	Phenion FT-Modell	Natskin-Modell
IL-1a	unverdünnt	unverdünnt	unverdünnt
IL-8	unverdünnt	Verdünnung Faktor 8	unverdünnt
IL-6	(nicht gemessen)	Verdünnung Faktor 80	(nicht gemessen)
TNF-a	unverdünnt	(nicht gemessen)	(nicht gemessen)
IL-1ra	Verdünnung Faktor 2	(nicht gemessen)	(nicht gemessen)
IL-1 sRII	unverdünnt	(nicht gemessen)	(nicht gemessen)

Die ermittelten Proteine wurden über die zum Zeitpunkt des Probenzugs gewogene Medium-Menge hochgerechnet und als absolut vorhandene Proteinmenge pro Hautprobe (pg/Probe) ausgedrückt.

b) Analyse der intra- oder interzellulär in der Haut verbliebenen Proteine

Zur Analyse der intra- oder interzellulär in der Haut verbliebenen Proteine musste die Haut lysiert werden. Das Vorgehen zur Herstellung des Lysats richtete sich nach einer im Haus erarbeiteten Methodik (Chatelain et al., Preclinical Research / Biopharmacy, Spirig Pharma AG, Schweiz, 2006; Daten nicht publiziert).

Als erstes befreite man das Hautmodell von allfälligen Vorrichtungen und reinigte es in PBS (Entfernen von Formulierungsresten). Anschliessend gab man die Haut in ein Eppendorf-Tube, zusammen mit Lysis-Puffer (Zusammensetzung siehe Anhang H.2) und einer Edelstahlkugel und spannte dieses in eine Kugelmühle ein. Je nach Hautmodell wurde die Mahldauer unterschiedlich gewählt. Die Güte des resultierenden Lysats variierte in Abhängigkeit von der Zusammensetzung des Hautmodells, d.h. die Feinheit des Lysats war nicht in allen Fällen zufrieden stellend (siehe Tab. D.14). Eine weitere Erhöhung der Mahldauer brachte jedoch keine Verbesserung. Die Proben wurden zentrifugiert (5-10 min. bei 12500 rpm) und der Überstand direkt im ELISA eingesetzt oder, wo nötig, mit gereinigtem Wasser vorgängig verdünnt.

Tab. D.11: Verdünnung der Lysat-Proben für den ELISA

	SkinEthic-Modell	Phenion FT-Modell	Natskin-Modell
IL-1a	Verdünnung Faktor 8	Verdünnung Faktor 8	Verdünnung Faktor 8
IL-8	unverdünnt	Verdünnung Faktor 16	unverdünnt
IL-6	(nicht gemessen)	Verdünnung Faktor 160	(nicht gemessen)
TNF-a	unverdünnt	(nicht gemessen)	(nicht gemessen)
IL-1ra	Verdünnung Faktor 4	(nicht gemessen)	(nicht gemessen)
IL-1 sRII	unverdünnt	(nicht gemessen)	(nicht gemessen)

Tab. D.12: Variationen bei der Herstellung des Hautlysats aus den drei Hautmodellen

	SkinEthic-Modell	Phenion FT-Modell	Natskin-Modell
Entfernen Vorrichtung	Ausschneiden aus Plexiglasrahmen	-	Entfernen Kunststoffring
Volumen Lysis-Puffer	1 ml	1 ml	2 ml
Mahldauer bei 20 Hz	10 min.	40 min.	40 min.
Güte Lysat	fein zermahlen	zermahlen, teilweise Hautfetzchen übrig	zermahlen, auch grössere Hautfetzen übrig

Die erfasste Proteinmenge wurde pro Hautprobe (pg/Probe) oder pro Gramm Haut (pg/g) ausgedrückt.

Teilweise konnte der ELISA nicht sofort durchgeführt werden. Kurzfristig wurden sowohl die Medium- als auch die Lysat-Proben bei 4°C, für längere Perioden (> 1 Tag) bei -20°C gelagert.

D.4.1.2 PCR

Zur Quantifizierung der mRNA wurde die RT-PCR (real time-polymerase chain reaction)-Technik eingesetzt. Die RT-PCR ist eine Vervielfältigungsmethode für Nukleinsäure, die auf dem Prinzip der herkömmlichen Polymerase-Kettenreaktion (PCR) beruht und zusätzlich die Möglichkeit der Quantifizierung bietet. Die Quantifizierung wird mit Hilfe von Fluoreszenz-Messungen zeitgleich während dem Ablauf der PCR-Zyklen durchgeführt (daher Real Time), wobei die Fluoreszenz proportional zur polymerisierten DNA-Menge einer bestimmten Sequenz zunimmt.

Eine verbreitete Anwendung, so auch in der vorliegenden Arbeit, findet die TaqMan®-Methodik. Dabei ermöglicht der Einsatz der thermostabilen Taq-Polymerase die automatisierte Durchführung einer nahezu beliebigen Anzahl von Vervielfältigungszyklen (d.h. Begrenzung durch die Menge an zugesetzten Reagenzien). Zur Quantifizierung werden so genannte TaqMan®-Sonden eingesetzt. Diese lagern sich hochspezifisch an die gewünschte DNA-Sequenz an. Bei deren Vervielfältigung wird die Sonde abgespalten und entwickelt dabei ein Fluoreszenz-Signal.

Wird die Stärke des Fluoreszenz-Signals gegen die PCR-Zykluszahl aufgetragen, ergibt sich eine ansteigende Kurve mit Sättigungsverlauf. Im mittleren, linear ansteigenden Bereich wird, aufgrund von Erfahrungswerten aber auch nach Gutdünken, durch eine horizontale Linie der so genannte Threshold gesetzt. Pro Analysenprobe wird so die einem definierten Fluoreszenzsignal entsprechende Zykluszahl herausgelesen (Threshold-Cycle). Der Threshold-Cycle entspricht dem eigentlichen Messwert aus der RT-PCR-Analytik.

Die mRNA-Analyse mittels TaqMan® RT-PCR wurde nur am Hautmodell von SkinEthic durchgeführt. Dabei wurde folgendermassen vorgegangen:

a) RNA-Extraktion aus dem Hautlysat

RNA ist grundsätzlich sehr instabil. Die Hautproben mussten somit sofort nach Entnahme in ein RNA-Stabilisierungsreagenz (RNAlater® RNA Stabilisation Reagent) gegeben werden. Daneben wurde der gesamte Extraktionsprozess unter RNase-freien Bedingungen durchgeführt (doppelte Autoklavierung von sämtlichen mit der Probe in Berührung kommenden Materialien, Reinigung von Arbeitsplatz und Händen mit einem RNase-zerstörenden Detergens).

Die Extraktion selbst erfolgte mit Hilfe eines gebrauchsfertig am Markt erhältlichen Reagenzien-Kits (RNeasy® Fibrous Tissue Mini Kit in Kombination mit dem RNase-Free DNase Set). Die dazu vorgeschriebenen Arbeitsschritte wurden genauestens eingehalten. Zur Extraktion konnte das gesamte SkinEthic-Hautstück (ca. 10 mg) eingesetzt werden. Die durch das Kit maximal verarbeitbare Hautmenge von 30 mg wurde somit nicht überschritten. Zur Herstellung des Zellysats wählte man die Kugelmühle. Unter Zusatz einer Edelstahlkugel wurde die Hautprobe während total 10 min. bei 20 Hz zermahlen und homogenisiert.

Im resultierenden RNA-Extrakt erfolgte eine Bestimmung des RNA-Gehalts und der RNA-Reinheit (Daten nicht gezeigt). Dazu wurden die Proben 1:50 mit Tris HCl-Puffer (10 mM, pH 7.5) verdünnt und photometrisch vermessen. Die Wahl des Puffers als Lösungsmittel gründete in der pH-Abhängigkeit der Messwerte (Daten nicht gezeigt). Gewünscht waren dabei eine möglichst gute RNA-Ausbeute und eine hohe RNA-Reinheit. Der ermittelte RNA-Gehalt diente zur Abschätzung des optimalen Probenvolumens für die nachfolgende reverse Transkription in cDNA.

b) RNA Transkription zu cDNA (reverse Transkription)

Die reverse Transkription von RNA zu cDNA wurde mit Hilfe eines am Markt erhältlichen Reagenzien-Kits (TaqMan® Reverse Transcription Reagent) umgesetzt. Das beschriebene Vorgehen wurde dabei ohne Abweichungen befolgt.

Gemäss Hersteller ist für die effiziente Transkription von 2 µg RNA ein Reagenzienvolumen von mindestens 100 µl erforderlich (entspricht einer RNA-Konzentration von 20 µg/ml im Reaktionsgemisch). Basierend auf den Werten aus der oben beschriebenen RNA-Gehaltsbestimmung konnte somit die pro Probe erforderliche Reagenzien-Menge ermittelt werden. Für die Transkription von spezifischer mRNA empfiehlt der Hersteller den Einsatz von so genannten oligo d(T)-Primern.

Nach dem Mischen der Proben in einer speziell für PCR geeigneten 96-Well-Plate erfolgte im Thermocycler die eigentliche reverse Transkription.

Tab. D.13: Bedingungen am Thermocycler für die reverse Transkription

	Inkubation	Reverse Transkription	Inaktivierung der reversen Transkriptase
Dauer	10 min.	30 min.	5 min.
Temperatur	25°C	48°C	95°C

Nach Abschluss der Transkription wurde keine cDNA-Gehaltsbestimmung durchgeführt. Gemäss Hersteller kann von einer RNA-cDNA-Umsetzung im Verhältnis 1:1 ausgegangen werden (somit resultierende cDNA-Konzentration von 20 µg/ml).

c) PCR-Amplifikation und Detektion mittels TaqMan® RT-PCR

Die PCR-Amplifikation und Detektion erfolgte mit Hilfe des TaqMan® Universal Master Mixes und mit verschiedenen TaqMan® Gene Expression Assays, welche spezifisch auf die zwei zur quantitativen Analyse ausgewählten Proteine IL-1a und IL-8 passen.

Zur Quantifizierung wurde die comparative C_TMethod (??C_TMethod) angewandt. Dabei handelt es sich um eine „doppelt“ relative Quantifizierung, welche sich einerseits auf einen internen Standard (= Endogenous Control / House Keeping Gene) und andererseits auf einen beliebigen Kalibrator bezieht (Negativkontrolle, d.h. Hautprobe ohne Irritation und ohne antiinflammatorische Behandlung). Als interner Standard wurde β-Actin gewählt. Gemäss Literatur wird die Expression von β-Actin weder durch Entzündungsreaktionen in der Haut noch durch die Behandlung mit BV-17 beeinflusst (Takahashi und Iizuka 1991; Lukiw et al. 1999). Diese Neutralität gegenüber den jeweiligen gesetzten Versuchsbedingungen ist eine wichtige Voraussetzung für die Eignung eines internen Standards. β-Actin wurde in der gleichen Messung, nicht aber aus der gleichen Reaktionsmischung quantifiziert (singleplex). Da β-Actin als TaqMan® Endogenous Control erhältlich war, und somit innerhalb des TaqMan-Systems Kontinuität gewährt werden konnte, durfte auf die Überprüfung der PCR-Effizienz verzichtet werden. Aus der Berechnung mittels ??C_TMethod resultiert für ein spezifisches Protein (Target Gene) die relative Expressionsrate, welche sich aus dem eigenen Threshold Cycle in Relation zum Threshold Cycle des Kalibrators einerseits und des internen Standards andererseits errechnet. Die Berechnung wird durch die folgende Gleichung ausgedrückt:

$$\frac{X_{\text{test}}}{X_{\text{control}}} = 2^{\Delta\Delta C_T} = 2^{(C_{T,X} - C_{T,R})_{\text{control}} - (C_{T,X} - C_{T,R})_{\text{test}}}$$

X_{test} = Menge spez. Protein (Target Gene) relativ zum internen Standard (Endogenous Control)

X_{control} = Menge Kalibrator (Target Gene) relativ zum internen Standard (Endogenous Control)

C_{T,X} = Threshold Cycle des Target Genes

C_{T,R} = Threshold Cycle des internen Standards (Endogenous Control)

Zur Handhabung sowie zur Mischung des TaqMan® Universal Master Mixes mit dem entsprechenden TaqMan® Gene Expression Assay (Target Primer für das gewünschte Target Gene) wurden die Angaben des Herstellers genau befolgt.

Die aus der Transkription stammenden cDNA-Proben wurden mit RNase-freiem Wasser verdünnt und in einer speziell für PCR geeigneten 96-Well-Plate mit TaqMan® Universal Master Mix (inkl. Target Primer) gemischt. Die Probenvolumina wählte man dabei so, dass pro Well (= 25 µl) eine cDNA-Menge von 50 ng vorlag. Gemäss Hersteller kann der TaqMan® Gene Expression Assay in einem Reaktionsvolumen von 25 µl räumlich eine cDNA-Menge von 10 ng – 1 µg zuverlässig quantifizieren.

Für die PCR-Amplifizierung und die Detektion im Thermocycler wählte man die folgenden Bedingungen:

Tab. D.14: Bedingungen am Thermocycler für die PCR-Amplifikation und Detektion

	Polymerase Aktivierung	Denaturierung	Primerhybridisierung und Elongation
Dauer	10 min.	15 sec.	1 min.
Temperatur	95°C	95°C	60°C
Zykluszahl			45 - 50

Alle Proben wurden im Duplikat gemessen. Als Negativkontrollen wurde je ein Blank zu den drei beschriebenen Arbeitsschritten mitgeführt (Extraktion, Transkription und Amplifikation).

D.4.2 Zellviabilität

D.4.2.1 LDH-Test

Der LDH-Test gibt Auskunft über die Integrität der Plasmamembranen in einem Zellsystem. Aufgrund von defekten Membranen entlassen geschädigte Zellen unter anderem das Enzym Lactat Dehydrogenase (= LDH) in das Medium. Dieses katalysiert auf indirektem Weg die Umwandlung des gelben Tetrazolium Salzes zum roten Formazan Salz. Die resultierende Farbe wird photometrisch erfasst.

Der LDH-Test wurde mit Hilfe eines gebrauchsfertig am Markt erhältlichen Test-Kits (Cytotoxicity Detection Kit) durchgeführt. Das Vorgehen entsprach im Wesentlichen der Anleitung des Herstellers. Einige Anpassungen aufgrund von spezifischen Gegebenheiten richteten sich nach einer im Haus erarbeiteten Methodik (Chatelain et al., Preclinical Research / Biopharmacy, Spirig Pharma AG, Schweiz, 2006; Daten nicht publiziert).

Der LDH-Test wurde an einer Fraktion der Medium-Proben (vgl. ELISA) durchgeführt. Es war keine spezielle Probenaufbereitung erforderlich. Es wurden je 100 µl Medium-Probe in eine 96-Well-Plate pipettiert. Pro Probe gab man anschliessend 100 µl Reaction Mixture (hergestellt nach Vorschrift) zu und inkubierte während 30 min. (bei Raumtemperatur und unter Lichtschutz). Die Messung der gebildeten Farbe erfolgte im Duplikat und photometrisch (bei 490 nm). Zur Interpretation der Daten wurde entweder die gemessene optische Dichte innerhalb einer Probenserie verglichen oder es wurde der „relative Membrandefekt“ auf der Basis einer versuchsinternen Referenz berechnet. Als Referenz diente das Medium der unbehandelten Hautprobe.

D.4.2.2 MTT-Test

Der MTT-Test erfasst die Anzahl an metabolisch aktiven und damit an lebenden Zellen. Das gelb gefärbte Tetrazolium Bromid (MTT) dringt in die Zellen ein und wird durch die Dehydrogenase zum dunkelblauen Formazan umgesetzt. Die dunkelblaue Farbe wird photometrisch erfasst. Eine hohe optische Dichte lässt auf eine grosse Zahl an metabolisch aktiven Zellen schliessen.

Das Vorgehen richtete sich weitgehend nach dem Testprotokoll, welches im Rahmen einer multizentrisch durchgeführten Prevalidierungs-Studie zur Etablierung des SkinEthic-Modells entwickelt worden war (de Wever et al., Laboratoire SkinEthic, Final SOP for „the multi-centre pre-validation study using SkinEthic in vitro reconstituted human epidermal model to evaluate the irritation potential of topical products“, April 04, nicht publiziert).

Das dem jeweiligen Hautmodell entsprechende Nährmedium wurde mit 0.5 mg/ml MTT versetzt, keimfiltriert und in einer Well-Plate vorgelegt. Anschliessend wurde das Hautmodell in PBS gereinigt (Entfernen von Formulierungsresten), in das MTT-haltige Medium transferiert und während 6h (respektive über Nacht) inkubiert (Inkubator; 37°C, CO₂-Anteil 5 %, Luftfeuchtigkeit 90 % r.h.). Nach Inkubation erfolgte eine erneute Reinigung in PBS, allfällige Vorrichtungen am Hautmodell wurden entfernt und die Hautstücke zur Farbextraktion vollständig in Isopropanol eingetaucht. Die Farbextraktion dauerte 6 h (respektive über Nacht) (unter leichtem Schütteln, bei Raumtemperatur). Die Farbmessung erfolgte im Duplikat und photometrisch (bei 570 nm). Zur Beurteilung der Zellviabilität wurde die gemessene optische Dichte der verschiedenen Hautproben verglichen. Parallel dazu erfolgte eine Berechnung der relativen metabolischen Aktivität aufgrund einer versuchsinternen Negativkontrolle (unbehandelte Hautprobe zum jeweiligen Zeitpunkt).

Tab. D.15: Variationen bei der Durchführung des MTT-Tests mit den drei Hautmodellen

	SkinEthic-Modell	Phenion FT-Modell	Natskin-Modell (kleines Format)
Well-Plate	24-Well-Plate	12-Well-Plate	24-Well-Plate
Volumen Nährmedium mit MTT	0.5 ml	2.5 ml	0.5 ml
Entfernen Vorrichtung	Ausschneiden aus Plexiglasrahmen	-	Entfernen Kunststoffring
Volumen Isopropanol	1 ml	2 ml	1 ml

D.4.2.3 Histologie

Die Histologie ist eine wertvolle Methode zur qualitativen Beurteilung des Zustandes von Zellverbänden. Dank einer raschen und schonenden Fixierung des Gewebes kann der Ist-Zustand festgehalten respektive die postmortale Autolyse verhindert werden. Eine nachfolgende Einfärbung erlaubt die verbesserte Unterscheidung von verschiedenen Gewebestrukturen. An erster Stelle steht hierzu die Hämalaun-Eosin-Färbung als Routine- und Übersichts-färbung. In neuerer Zeit haben sich zusätzlich immunhistochemische Färbemethoden sowie die in-situ-Hybridisierung entwickelt, welche differenzierte Aussagen zu spezifischen Zellzuständen ermöglichen. Ein Beispiel für eine immunhistochemische Methode ist die Cyclobutanpyrimidin-Dimere (CPD)-Färbung. Antikörper lagern sich dabei an die CPD an, markieren diese durch eine Farbreaktion und geben so Auskunft über den Einfluss von UV-Strahlung auf ein Gewebe (vgl. C.1.3.2.2).

Zur Aufarbeitung der histologischen Proben wurde ein allgemein übliches Verfahren eingesetzt, wobei für die einzelnen Hautmodelle spezifische Anpassungen vorgenommen werden mussten. In einem ersten Schritte erfolgte eine Reinigung der Hautproben in PBS. Allfällige Formulierungsreste wurden dabei schonend entfernt, das SkinEthic-Modell aus dem Plexiglasrahmen ausgeschnitten und der Kunststoffring, wenn möglich, von der Natskin-Haut abgelöst. Anschliessend wurden die Hautproben in ein grosszügig bemessenes Volumen an Formalin eingetaucht und zur Fixierung während mindestens 24 h inkubiert (bei 4°C oder Raumtemperatur). Zur Entwässerung und Einbettung durchliefen die Hautproben verschiedene Lösungsmittel in der Abfolge Formalin 10 %, Ethanol 70 %, Ethanol 80 %, Ethanol 90 %, Ethanol 100 %, Xylol und Paraffin. Nach dem Schneiden und Aufziehen wurden die Hämalaun-Eosin- sowie die CPD-Färbung angewandt.

Die Beurteilung der histologischen Präparate erfolgte qualitativ und im Vergleich innerhalb der unterschiedlich behandelten Hautproben respektive gegenüber einer Negativkontrolle. Dabei wurden allgemeine Merkmale wie die Quellung des Stratum corneums und die Differenzierung in der Färbung von Stratum corneum und tieferen Zellschichten beurteilt. Generell deutet eine Auflockerung des Stratum corneums, eine über die gesamte Epidermis uniforme helle Hämalaun-Eosin-Färbung sowie ein Ablösen des Stratum basale vom Untergrund (je nach Hautmodell Dermis oder Polyacrylatmembran) auf einen irritierten Zustand hin. Eine Quellung der Hornschicht kann aber auch auf eine Okklusion zurückzuführen sein. Indikatoren für den Einfluss von UV-Strahlung waren eine ausgeprägte CPD-Färbung sowie die Bildung von dyskeratotischen Keratinozyten mit pyknotischem Kern (Sunburn Cells), der Verlust von Zell-Zellkontakten, die Vakuolenbildung, geschädigte Mitochondrien und eine generelle Zellschrumpfung.

D.5 Penetration / Permeation von BV-17

Voraussetzung für einen Effekt ist die Präsenz des Wirkstoffes am Wirkort. Im gleichen Mass wie die Erfassung der Wirkung der antiinflammatorischen Behandlung war somit auch die Lokalisierung des Wirkstoffes selbst im Rahmen der vorliegenden Arbeit von Interesse. Dazu wurde, parallel zu den oben beschriebenen zellbiologischen Prüfungen, die Penetration / Permeation des Wirkstoffes BV-17 aus den beiden Modellformulierungen (Lösung und O/W-Emulsion) in die drei Hautmodelle SkinEthic, Phenion FT und Natskin untersucht. Der BV-17-Gehalt wurde aus der Haut selbst (Penetration), aus dem Nährmedium (Permeation) und in den auf der Hautoberfläche verbleibenden Formulierungsresten quantifiziert. Das analysierte Probenmaterial war dabei mit demjenigen aus den zellbiologischen Prüfungen identisch, wodurch auch das Versuchsdesign (Irritationsmethode und Dosis, Modellformulierung und Wirkstoffkonzentration, Inkubationszeiten) den bereits beschriebenen Abläufen entsprach.

D.5.1 Quantitative Analyse von BV-17

BV-17 wurde mittels der HPLC-UV/VIS quantifiziert, d.h. die Proben wurden mittels HPLC (high performance liquid chromatography) aufgetrennt und die einzelnen Komponenten anschliessend im UV/VIS-Detektor erfasst.

Das Vorgehen bei der Probenaufbereitung und die Parameter für die HPLC-Analytik mussten zuerst entwickelt werden. Ausgangspunkt dazu war die für Betamethason in der europäischen Pharmakopöe monographierte Methode zur Prüfung der Reinheit (Monographie 5.0/0312) (EP-Kommission 2005). Es wurden unter anderem verschiedene Lösungsmittelgemische für die Proben sowie die Wahl der Chromatographie-Säule, das Eluenten-Gemisch, das Injektionsvolumen und die Flussrate variiert. Besondere Schwierigkeiten bot dabei die Nachweisgrenze für BV-17 und die Überlappung des Wirkstoffpeaks mit Signalen von Bestandteilen aus der Haut selbst, aus dem Nährmedium oder aus der Modellformulierung. Kritisch war auch die Stabilität des Wirkstoffs BV-17.

Als bestmögliche Methode ergab sich schlussendlich das im Folgenden beschriebene Vorgehen.

D.5.1.1 Probenaufbereitung

Bei der Probenaufbereitung wurde der Zusatz von Lösungsmitteln grundsätzlich so klein wie möglich gehalten. So konnte jeglicher Verdünnungseffekt minimiert werden. Dies war nötig, da sich die Nachweisgrenze von BV-17 im Rahmen der Methodenentwicklung als problematisch erwies. Alle zur Messung aufbereiteten Proben basierten auf dem Lösungsmittelgemisch Methanol 50 % - Wasser 50 % (V/V), was die besten Messergebnisse lieferte.

In einem Vorversuche konnte gezeigt werden, dass die Probenfiltration vor der Injektion das Analysenresultat für BV-17 nicht massgeblich beeinflusst (Daten nicht gezeigt). Somit wurden die Proben vor der Injektion generell filtriert.

Quantitative Analyse von BV-17 aus dem Nährmedium

Das Nährmedium wurde zu gleichen Teilen mit Methanol gemischt. Dabei bildete sich eine leichte Trübung. Da diese durch Zentrifugieren nicht abgetrennt werden konnte, wurden die Proben vor der Injektion filtriert. Die Medium-Proben zu allen drei Hautmodellen konnten auf identische Weise aufgearbeitet werden.

Quantitative Analyse von BV-17 aus den Hautproben

Für die BV-17-Analyse aus der SkinEthic- und aus der Phenion FT-Haut wurde das zur Proteinbestimmung hergestellte Zelllysate eingesetzt (vgl. D.4.1.1). Dem nach Zentrifugieren entnommenen Überstand setzte man zu gleichen Teilen Methanol zu und filtrierte die Probe vor der Injektion.

Aufgrund ihrer Zähigkeit konnte die Natskin-Haut in Lysis-Puffer und mit Hilfe der Kugelmühle nur unzureichend zerkleinert werden (vgl. ebenfalls D.4.1.1). Zur Quantifizierung von BV-17 wurde deshalb alternativ auf die Kaltvermahlung unter Stickstoff in organischem Lösungsmittel mittels Kugelschwingmühle ausgewichen, welche grösstenteils ein feines Hautpulver lieferte. Das Vorgehen richtete sich nach einer im Haus etablierten Methode (Chatelain et al., Preclinical Research / Biopharmacy, Spirig Pharma AG, Schweiz, 2006; Daten nicht publiziert).

Die Natskin-Haut wurde vom Kunststoffring befreit und mit PBS gereinigt (Entfernen von Formulierungsresten). Anschliessend kühlte man die Haut vor (bei -80°C), zerschnitt sie in kleine Stücke und gab diese in den Probenbecher der Kugelschwingmühle (inkl. Kugel). Die Kaltvermahlung unter Flüssigstickstoff erfolgte während 12 min. bei einer Schwingzahl von 80 Hz. Aufgrund der Grösse des zermahlenden Hautstücks waren zur Extraktion 3 ml Methanol erforderlich. Nach Ablauf von 30 min. Extraktionszeit versetzte man die Probe zusätzlich mit 3 ml Wasser und zentrifugierte (5 min. bei 12500 rpm). Der Überstand wurde filtriert und zur Analyse in das HPLC-Gerät injiziert.

Quantitative Analyse von BV-17 aus dem Kunststoffring (nur Natskin-Modell)

Der Verdacht lag nahe, dass BV-17 im Natskin-Modell nicht nur in die Haut, sondern auch in den Kunststoffring penetriert. Somit wurde das BV-17 aus dem Kunststoffring extrahiert und ebenfalls quantifiziert.

Dazu wurde der Kunststoffring nach Entfernung von der Haut mit PBS von Formulierungsresten befreit, mittels Skalpell möglichst fein zerhackt und während 30 min. in 0.7 ml Methanol extrahiert. Dem Extrakt wurde zu gleichen Teilen Wasser zugefügt, wobei eine Trübung entstand. Nach Zentrifugation (5 min. bei 12500 rpm) und Filtration erfolgte die Analyse am HPLC-Gerät.

Quantitative Analyse von BV-17 aus den Formulierungsresten auf der Hautoberfläche

Die Probenaufbereitung zu den nach Inkubation auf der Hautoberfläche verbliebenen Formulierungsresten gestaltete sich für alle drei Hautmodelle gleich. Die Formulierungsreste wurden mit in Stücke geschnittenen Watte-Pads vollständig abgewischt. Die Watte extrahierte man während 30 min. in 1 ml Methanol, fügte anschliessend 1 ml Wasser zu, zentrifugierte (5 min. bei 12500 rpm), filtrierte und injizierte die Probe zur Messung.

Die Proben zu den Formulierungsresten aus der Emulsion ergaben aufgrund der hohen BV-17-Konzentration teilweise Resultate oberhalb des Messbereich der HPLC-Analytik. Somit musste entsprechend verdünnt werden. Auch zeigten die Emulsionsproben beim Zusatz von Wasser eine starke Trübung.

Quantitative Analyse von BV-17 aus den Modellformulierungen

Die Modelllösung wurde, wo nötig, mit Methanol 50 % - Wasser 50 % (V/V) in den Eichbereich der HPLC-Methode verdünnt, filtriert und analysiert.

Aus der Modellemulsion wurde das BV-17 vorerst mittels Methanol extrahiert. Der Methanol-Extrakt wurde ebenfalls, wo nötig, mit Methanol 50 % - Wasser 50 % (V/V) in den Eichbereich der HPLC-Methode verdünnt, filtriert und analysiert.

D.5.1.2 Analysenmethode

Für die Quantifizierung von BV-17 mittels HPLC wurden die folgenden Parameter gewählt:

Säule	Reversed Phase C18, Länge 125 mm, Durchmesser 2 mm	
Vorsäule	(keine)	
Eluent	Acetonitril 44 % - Wasser 56 % (V/V)	
Detection	239 nm	
Ofen Temperatur	40°C	
Autosampler Temperatur	15°C	
Injection Volume	100 µl (Full Loop-Funktion)	
Proben	gelöst in Methanol 50 % - Wasser 50 % (V/V) Lagerung bei 4°C bis kurz vor der Analyse	
Flow Rate	0.5 ml/min.	
Run Time	Haut-Proben	60 min.
	Überstand-Proben	30 min.
	Medium-Proben	30 min.
	Modellformulierungen	30 min.
	Standardlösungen	10 min.

Der Eichbereich für BV-17 zur genannten Methode lag zwischen 0.032 und 20.0 µg/ml (in Methanol 50 % - Wasser 50 % V/V). Die entsprechende Eichgerade ermittelte man anhand einer 5-Punkte-Messung (jeweils im Duplikat). Die Analysenproben selbst wurden jeweils einfach vermessen.

Die Qualität der Analysenresultate wurde anhand von hausintern festgelegten Normen beurteilt (Abteilung für Qualitätskontrolle, Spirig Pharma AG, Schweiz), welche sich an den Vorgaben der europäischen Pharmakopöe orientieren (EP-Kommission 2005). Die wichtigsten Kenngrößen dabei waren die Gerätepräzision, die Quantifizierbarkeits- (LOQ) und Detektionsgrenze (LOD), die Peakform und Peakauflösung sowie die Wirkstoffstabilität und die Reproduzierbarkeit der Retentionszeit während der Sequenz.

Die Gerätepräzision und die Reproduzierbarkeit der Retentionszeit während der Sequenz erwiesen sich als gänzlich unproblematisch. Die BV-17-Stabilität im Verlauf von langen Sequenzen war hingegen kritisch. Kontrollmessungen zur Referenzlösung ergaben einen Verlust von bis zu 20 % (nach 36 h Lagerung bei RT). Durch die Lagerung der Proben bei 4°C bis möglichst kurz vor der Messung sowie dank der Kühlung des Autosamplers, konnte die Stabilität verbessert werden. Zusätzlich trug die Identifikation des Umlagerungsproduktes BV-21 und des durch Hydrolyse entstandenen Abbauproduktes Betamethason zum besseren Verständnis der Messresultate bei (vgl. D.3.1.1 und Chromatogramme im Anhang H.6.1). Im Rahmen der Gehaltsbestimmungen für BV-17 wurde jedoch auf die Addition der Peakflächen von BV-17 und BV-21 (respektive Betamethason) verzichtet. Die Peakform für BV-17 war grundsätzlich zufrieden stellend. Die Peakauflösung, d.h. Abtrennung von Fremdsignalen bedurfte jedoch einiger Optimierungsarbeit. Da es sich bei den Fremdpeaks meist um kleine Peaks handelte, konnte eine geringfügige Überlappung für höhere Wirkstoffkonzentrationen auch toleriert werden. Unter Standardbedingungen (BV-17 in Methanol 50 % - Wasser 50 % V/V) betrug der LOD 0.01 µg/ml und der LOQ bei 0.05 µg/ml (berechnet) respektive 0.004 µg/ml und 0.0336 µg/ml (experimentell ermittelt, Daten nicht gezeigt). Aufgrund von Fremdsignalen, die, wie erwähnt, nicht vollumfänglich abgetrennt werden konnten, lag die praxisrelevante Nachweisgrenze in den Proben zum Hautlysat, Medium und Formulierungs-extrakt allerdings höher. So konnten nach Applikation einer Modellformulierung mit der BV-17-Dosis 9.54 µg/ml ($= 2 \times 10^{-5}$ M) noch analytisch zuverlässige Penetrations- / Permeationsdaten erwartet werden. Die Ergebnisse zu den BV-17-Dosierungen = 0.954 µg/ml ($= 2 \times 10^{-6}$ M) lagen jedoch unterhalb der Nachweisgrenze.

D.6 Erarbeitetes Versuchsdesign

Wie in den Kapiteln D.1 bis D.5 beschrieben, wurden zur Erfassung der Reaktion auf externe Reize und der Wirkung einer antiinflammatorischen Behandlung auf in vitro- / ex vivo-Hautmodelle im Verlauf der vorliegenden Arbeit eine Vielzahl von Parametern variiert. Dabei hat sich das nachfolgend gezeigte Versuchsdesign herauskristallisiert, welches auf alle drei Hautmodelle angewendet werden konnte.

Tab. D.16: Für die drei Hautmodelle erarbeitetes Versuchsdesign

	SkinEthic	Phenion FT	Natskin
Design			
Anzahl Proben	im Triplikat	im Triplikat	im Duplikat
Kontrollen	1) unbestrahlt / unbehandelt 2) bestrahlt / unbehandelt 3) bestrahlt / vehikelkontrolliert	1) unbestrahlt / unbehandelt 2) bestrahlt / unbehandelt 3) bestrahlt / vehikelkontrolliert	1) unbestrahlt / unbehandelt 2) bestrahlt / unbehandelt 3) bestrahlt / vehikelkontrolliert
Versuchstage			
Ankunft im Haus	Kulturtag 13	Kulturtag 13	-
Versuchsstart	Kulturtag 18	Kulturtag 14	(Folgetag)
Externer irritativer Reiz			
Art	UV-Strahlung	UV-Strahlung	UV-Strahlung
Dosierung (mJ/cm ²)	60	100	125
antiinflammatorische Behandlung			
Wirkstoff	BV-17	BV-17	BV-17
Vehikel	Lösung, Emulsion	Lösung, Emulsion	Lösung, Emulsion
Dosierung (M)			
- Lösung	2x10 ⁻⁵ , 2x10 ⁻⁴	2x10 ⁻⁵ , 2x10 ⁻⁴	2x10 ⁻⁵ , 2x10 ⁻⁴
- Emulsion	2x10 ⁻³ , 2x10 ⁻²	2x10 ⁻³ , 2x10 ⁻²	2x10 ⁻⁵ , 2x10 ⁻⁴
Applikationsvolumen (µl/cm ²)	500	37.7	127.3
Applikationszeitpunkt	sofort nach Irritation	sofort nach Irritation	sofort nach Irritation
Inkubationszeit (h)	8, 24	8, 24	8, 24
Erfassung der Hautirritation und der Wirkung der antiinflammatorischen Behandlung			
Proteinexpression	Methode	ELISA im Medium und im Hautlysat	ELISA im Medium und im Hautlysat
	zellbiologischer Marker	IL-1a, IL-8	IL-1a, IL-8, IL-6
Zellviabilität	LDH, MTT, Histologie	LDH, MTT, Histologie	LDH, (MTT), Histologie
Penetration / Permeation			
	erfasst	erfasst	erfasst

E Resultate und Diskussion

E.1 Erarbeitung eines Versuchsdesigns zur Erfassung der Reaktion auf externe Reize und der Wirkung von BV-17 anhand des SkinEthic-Modells

E.1.1 Charakterisierung des SkinEthic-Modells

E.1.1.1 Grundzustand des SkinEthic-Modells während der Kultivierung

Das SkinEthic-Modell wurde an den Kulturtagen 13 bis 24 beobachtet und charakterisiert. Unter Kulturtag wird das Alter ab Rekonstruktionsstart des in vitro-Hautmodells verstanden. Im Fokus standen der generelle Zustand der Hautproben sowie die im Verlaufe des Alterungsprozesses auftretenden Veränderungen. Untersucht wurden einerseits die in das Nährmedium ausgeschütteten und andererseits die im Gewebe (d.h. im Zelllysat) vorhandenen IL-1a- und IL-8-Mengen (ELISA), die Integrität der Plasmamembranen (LDH-Test) sowie die Hautstruktur anhand von histologischen Präparaten. Die Kulturbedingungen waren mit denjenigen, welche zur Durchführung der Irritations- und Behandlungsversuche mit Modellformulierung gewählt worden waren, identisch (Austausch des Growth Mediums gegen das Maintenance Medium am Kulturtag 17, Mediumvolumen von 1 ml/Tag/Hautprobe, Kultivierung im Inkubator [bei 37°C, CO₂-Anteil 5 %, Luftfeuchtigkeit 90 % r.h.]; vgl. D.1.1). Praxisbedingt konnten die Daten zu den Kulturtagen 14 (nur teilweise), 16, 22 und 23 nicht erfasst werden.

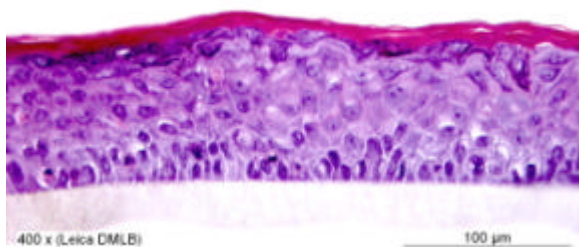
Prüfungen

a) Histologie

Die folgenden histologischen Präparate zeigen das SkinEthic-Modell an den Kulturtagen 13 bis 24. Die Beurteilung des Rosa / Violett-Farbkontrasts, des Anhaftens am Filter und der Zell-Zell-Adhäsion erfolgte visuell. Dabei indizieren ein deutlich ausgeprägter Rosa / Violett-Farbkontrast, ein festes Anhaften der Epidermis am Filter sowie eine kompakte Zell-Zell-Adhäsion eine gute Hautviabilität. Zusätzlich wurde die Dicke des Stratum corneum ausgemessen und anschliessend in % der gesamten Dicke ausgedrückt.

Kulturtag 13

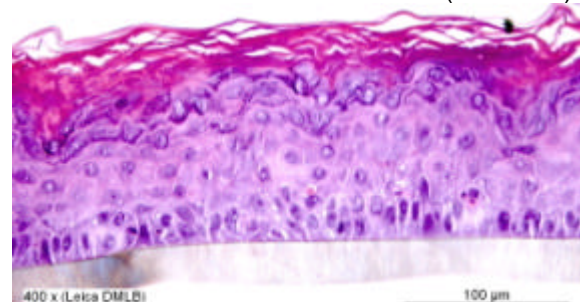
Eintreffen im Haus (fixiert in geliertem Medium)



Rosa / Violett-Farbkontrast	ausgeprägt
Anhaften am Filter	fest
Zell-Zell-Adhäsion	kompakt
relat. Dicke Stratum corneum	13 % der totalen Epidermisdicke, kompakt

Kulturtag 14

Über Nacht kultiviert in Growth Medium (1 ml/Haut)

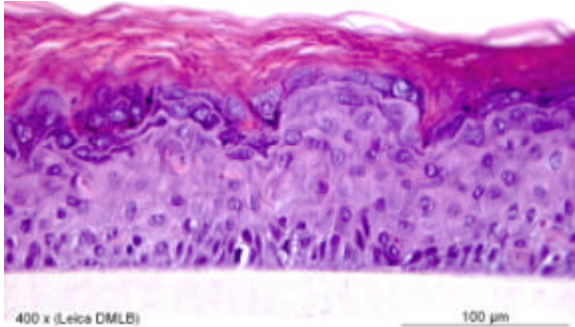


Rosa / Violett-Farbkontrast	ausgeprägt
Anhaften am Filter	fest
Zell-Zell-Adhäsion	kompakt
relat. Dicke Stratum corneum	23 % der totalen Epidermisdicke, aufgelockert

Abb. E.1: Histologische Präparate zum SkinEthic-Modell, Kulturtage 13 bis 24, Vergrößerung 400-fach, Hämalaun-Eosin-Färbung

Kulturtag 15

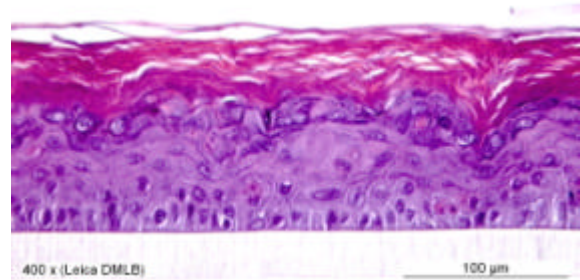
Über Nacht kultiviert in Growth Medium
(3 ml/Haut)



Rosa / Violett-Farbkontrast	ausgeprägt
Anhaften am Filter	fest
Zell-Zell-Adhäsion	kompakt
relat. Dicke Stratum corneum	33 % der totalen Epidermisdicke, aufgelockert

Kulturtag 17

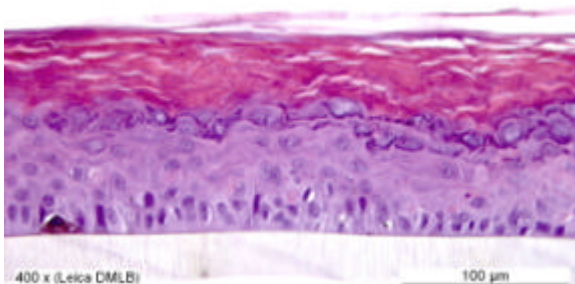
Während dem Wochenende kultiviert in Growth Medium (2 ml/Haut, ohne Wechsel)



Rosa / Violett-Farbkontrast	ausgeprägt
Anhaften am Filter	fest
Zell-Zell-Adhäsion	kompakt
relat. Dicke Stratum corneum	38 % der totalen Epidermisdicke, aufgelockert

Kulturtag 18

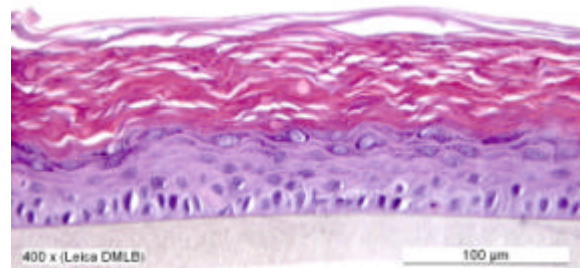
Über Nacht kultiviert in Maintenance Medium
(1 ml/Haut)



Rosa / Violett-Farbkontrast	ausgeprägt
Anhaften am Filter	fest
Zell-Zell-Adhäsion	kompakt
relat. Dicke Stratum corneum	39 % der totalen Epidermisdicke, aufgelockert

Kulturtag 19

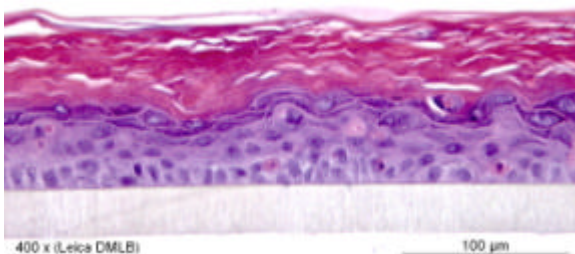
Über Nacht kultiviert in Maintenance Medium
(1 ml/Haut)



Rosa / Violett-Farbkontrast	ausgeprägt
Anhaften am Filter	fest
Zell-Zell-Adhäsion	kompakt
relat. Dicke Stratum corneum	53 % der totalen Epidermisdicke, aufgelockert

Kulturtag 20

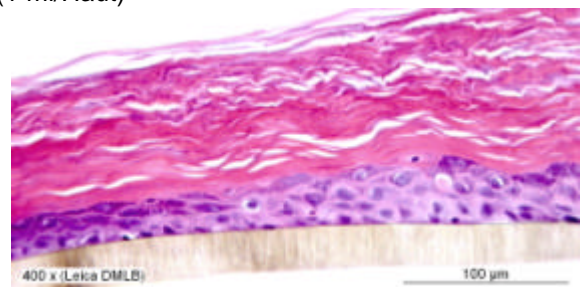
Über Nacht kultiviert in Maintenance Medium
(1 ml/Haut)



Rosa / Violett-Farbkontrast	ausgeprägt
Anhaften am Filter	fest
Zell-Zell-Adhäsion	kompakt
relat. Dicke Stratum corneum	51 % der totalen Epidermisdicke, aufgelockert

Kulturtag 21

Über Nacht kultiviert in Maintenance Medium
(1 ml/Haut)

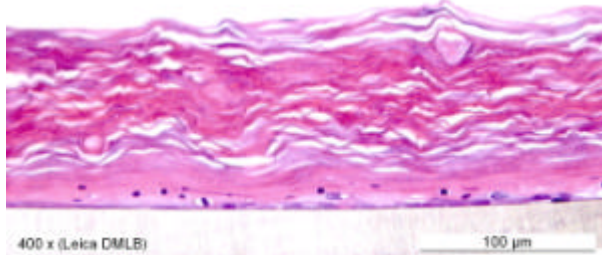


Rosa / Violett-Farbkontrast	ausgeprägt
Anhaften am Filter	fest
Zell-Zell-Adhäsion	kompakt
relat. Dicke Stratum corneum	71 % der totalen Epidermisdicke, aufgelockert

(Fortsetzung Abb. E.1)

Kulturtag 24

Während dem Wochenende kultiviert in Growth Medium (3 ml/Haut, ohne Wechsel)



Rosa / Violett-Farbkontrast	etwas reduziert
Anhaften am Filter	fest
Zell-Zell-Adhäsion	(nicht erkennbar)
relat. Dicke Stratum corneum	92 % der totalen Epidermisdicke, aufgelockert

(Fortsetzung Abb. E.1)

Bis zum Kulturtag 21 bleibt der Rosa / Violett-Farbkontrast ausgeprägt, das Anhaften der Basalschicht am Filter fest sowie die Zell-Zell-Adhäsion kompakt. Dieser Befund lässt auf ein intaktes Gewebe schließen. Das Handling und die Kulturbedingungen sind somit für das SkinEthic-Modell adäquat. Der Wechsel vom Growth auf das Maintenance Medium (am Kulturtag 17) zeigt keinen Einfluss auf die Hautviabilität.

Im Laufe der Kulturzeit verändert sich der Aufbau der Epidermis. Während die Gesamtdicke der Epidermis in etwa konstant bleibt, nimmt die Zahl der lebenden Zellschichten deutlich ab, wobei diese am Kulturtag 24 praktisch nicht mehr vorhanden sind. Parallel dazu verdickt sich das Stratum corneum kontinuierlich.

Die Reduktion der Zahl an lebenden Zellschichten ist ein Zeichen für die Alterung des Modells. Da das SkinEthic-Modell aus primären und nicht aus immortalisierten Zellen aufgebaut ist, ist dessen Lebensdauer begrenzt. Mit der Zeit erschöpft sich die Teilungsfähigkeit der Keratinozyten und im Stratum basale werden keine frischen Zellschichten nachgebildet. Die noch vorhandenen Zellen differenzieren weiter aus, um terminal in Korneozyten überzugehen. In vivo bleibt die Dicke des Stratum corneum an einer bestimmten Körperstelle und unter gleich bleibenden Bedingungen konstant. Dies ist dank einem kontinuierlichen Abschilfern der Korneozyten möglich, was im SkinEthic-Modell nicht erfolgen kann.

b) IL-1a-Menge

Die folgenden Graphiken zeigen zu den oben abgebildeten SkinEthic-Hautproben die im Gewebe vorhandene sowie die in das Nährmedium ausgeschüttete IL-1a-Menge:

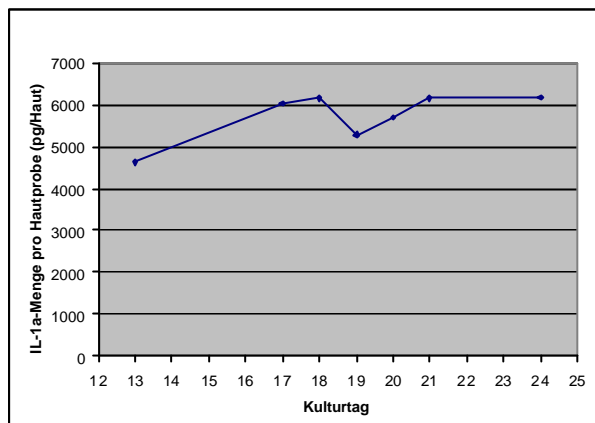


Abb. E.2: **IL-1a-Menge im Gewebe** des SkinEthic-Modells in Abhängigkeit vom Kulturtag (Mengenangabe pro Hautprobe) (n = 1)

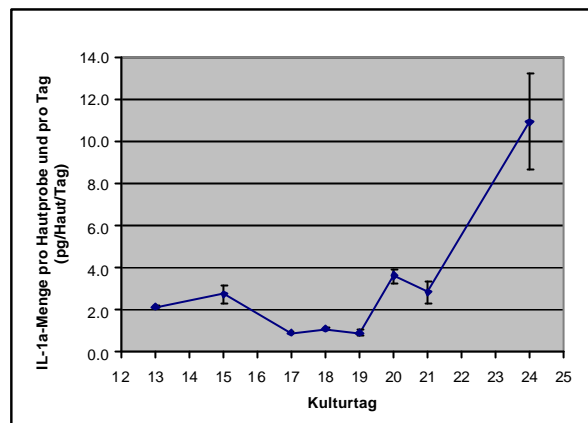


Abb. E.3: Durch das SkinEthic-Modell in das Nährmedium **ausgeschüttete IL-1a-Menge** in Abhängigkeit vom Kulturtag (Mengenangabe pro Hautprobe und pro Tag) (n = 2, Mittelwert, Angabe der Spannweite)

IL-1a ist in vivo permanent in grossen Mengen in der Epidermis gespeichert (Kupper und Groves 1995). Dies wird durch die vorliegenden Messwerte bestätigt. Im Gewebe des SkinEthic-Modells konnte an den Kulturtagen 13 bis 24 eine mehr oder weniger konstante IL-1a-Menge auf hohem Niveau ermittelt werden.

Im Vergleich dazu ist die täglich in das Nährmedium ausgeschüttete IL-1a-Menge sehr klein, wobei an den Kulturtagen 17 bis 19 ein Minimum vorliegt. Da eine erhöhte IL-1a-Sekretion irritierte Zustände und inflammatorische Prozesse indiziert (Kupper 1990), lässt die geringe Ausschüttung auf ein intaktes Gewebe schliessen. Folglich sind die gewählten Kulturbedingungen und das Handling für das SkinEthic-Modell angemessen. Der Wechsel vom Growth auf das Maintenance Medium (am Kulturtag 17) zeigt keine Auswirkungen auf die IL-1a-Sekretion. Irritative Einflüsse liegen nicht vor.

Bis zum Kulturtag 24 zeichnet sich ein Anstieg der sezernierten IL-1a-Menge ab. Dieser steht vermutlich mit der Alterung des Modells in Zusammenhang.

c) IL-8-Menge

Zu den gleichen SkinEthic-Proben wurde, analog zum IL-1a, auch die IL-8-Menge untersucht.

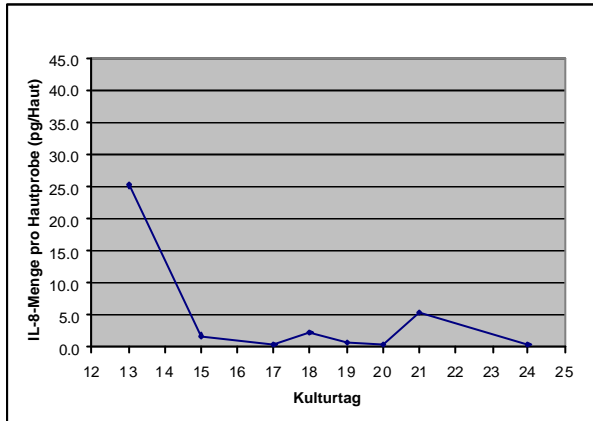


Abb. E.4: **IL-8-Menge im Gewebe** des SkinEthic-Modells in Abhängigkeit vom Kulturtag (Mengenangabe pro Hautprobe) (n = 1)

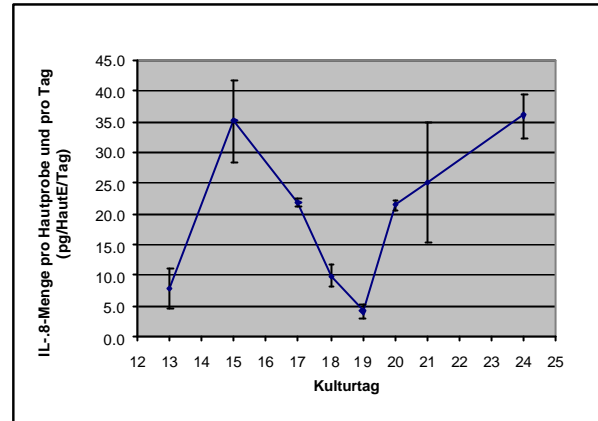


Abb. E.5: Durch das SkinEthic-Modell in das Nährmedium **ausgeschüttete IL-8-Menge** in Abhängigkeit vom Kulturtag (Mengenangabe pro Hautprobe und pro Tag) (n = 2, Mittelwert, Angabe der Spannweite)

Im Gewebe der am Kulturtag 13 im Haus eintreffenden SkinEthic-Hautprobe ist eine im Vergleich zu den folgenden Kulturtagen erhöhte IL-8-Menge vorhanden. Im Gegensatz zu IL-1a ist in der Epidermis jedoch kein permanentes IL-8-Reservoir vorhanden. Gemäss Literatur kann die IL-8-Synthese durch endogene proinflammatorische Stimuli wie IL-1a und TNF- α aber auch durch diverse exogene Faktoren ausgelöst werden (Coquette et al. 2003). Somit könnte die anfänglich erhöhte IL-8-Menge auf einen während dem Transport auftretenden Reiz zurückzuführen sein.

Anschliessend bleibt die ermittelte IL-8-Menge bis zum Ende der Beobachtungsperiode auf tiefem Niveau mehr oder weniger konstant. Dies weist auf adäquate Kulturbedingungen und ein intaktes Gewebe hin. Der Wechsel vom Growth auf das Maintenance Medium (am Kulturtag 17) beeinflusst die IL-8-Menge nicht.

Die aus dem Nährmedium ermittelten Resultate zu IL-8 zeigen zwei Tage nach Eintreffen der SkinEthic-Hautproben ein erstes Sekretionsmaximum. Vermutlich handelt es sich dabei um die am Ankunftstag erhöhte und anschliessend in das Medium entlassene IL-8-Menge. Anschliessend fällt die IL-8-Sekretion auf ein Minimum ab, um ab Kulturtag 20 wieder deutlich anzusteigen. Analog zu IL-1a könnte diese Zunahme der IL-8-Sekretion auf die Alterung des Hautmodells zurückzuführen sein.

d) Membranintegrität

Die Integrität der Plasmamembranen in den SkinEthic-Hautproben an den Kulturtagen 13 bis 24 wurde anhand des LDH-Tests überprüft und in Form der gemessenen optischen Dichte ausgedrückt.

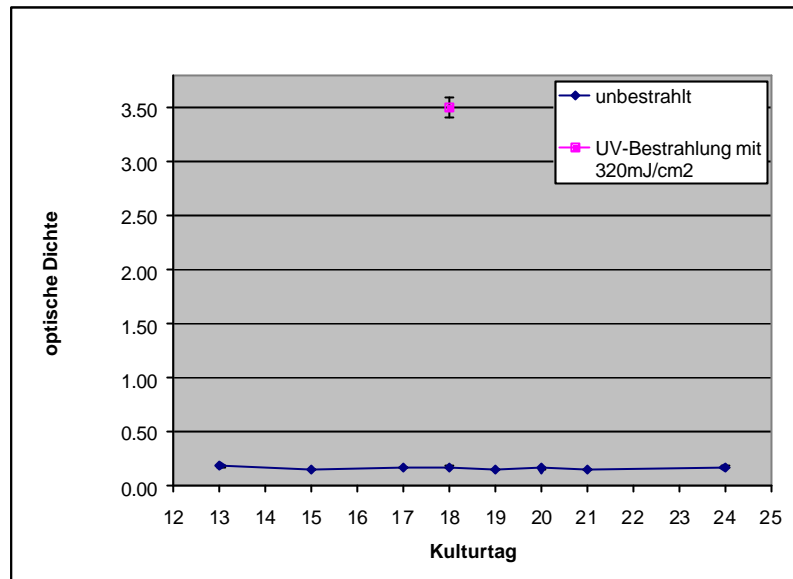


Abb. E.6: **Membranintegrität** (ausgedrückt als die gemessene optische Dichte) im SkinEthic-Modell in Abhängigkeit vom Kulturtag, unbestrahlt und bestrahlt mit einer UV-Dosis von 320 mJ/cm² (n = 3, Mittelwert, Angabe der absoluten Standardabweichung)

Im Vergleich zur optischen Dichte nach UV-Bestrahlung (Angabe eines repräsentativen Beispielwertes, UV-Dosis 320 mJ/cm², Inkubationszeit 6 h; vgl. E.1.4.1) sind die für die unbestrahlten Hautproben ermittelten Werte über die gesamte Beobachtungsperiode hinweg gering. Die Plasmamembranen der SkinEthic-Hautproben bleiben unter den gewählten Kulturbedingungen somit bis mindestens zum Kulturtag 24 intakt. Der Wechsel vom Growth auf das Maintenance Medium (am Kulturtag 17) beeinflusst die Membranintegrität nicht.

Fazit

Will man ein Hautmodell gezielt reizen und anschliessend die resultierende Hautentzündung analysieren, müssen eventuell vorhandene Faktoren, welche den Grundzustand der Haut beeinflussen, bekannt sein.

Die Ergebnisse zur IL-1a- und IL-8-Menge (im Gewebe und Sekretion), zur Membranintegrität sowie die Beobachtungen anhand von histologischen Präparaten indizieren, dass die Kulturtage 18 und 19 zur Erfassung der Reaktion auf eine bewusst ausgelöste Irritation gut geeignet sind. An diesen Tagen liegen im SkinEthic-Modell keine Anzeichen für eine Hautreizung vor. Das Handling und die Kulturbedingungen sind adäquat. Der Wechsel vom Growth auf das Maintenance Medium am Kulturtag 17 zeigt keine Auswirkungen.

Die Durchführung von entsprechenden Versuchen an den Kulturtagen kurz nach Eintreffen der Hautmodelle im Haus und gegen Ende der Beobachtungsperiode ist hingegen weniger sinnvoll. Die vorliegenden Ergebnisse weisen auf Irritationsfaktoren hin, die die eigentlichen Resultate verfälschen könnten. Zum einen ist am Ankunftstag die IL-8-Menge im Gewebe erhöht, was auf mögliche irritative Einflüsse während dem Transport hindeutet. Zum anderen steigen ab Kulturtag 20 die IL-1a- und die IL-8-Sekretion an, und ab Kulturtag 21 liegt eine Verdickung des Stratum corneum vor. Beides ist vermutlich auf die Alterung des Modells zurückzuführen.

E.1.1.2 Intra- und Interbatch-Variation im SkinEthic-Modell

Prüfungen

Im Folgenden ist die Intra- und Interbatch-Variation im SkinEthic-Modell exemplarisch anhand von ausgewählten Daten dargestellt:

a) Intra-batch-Variation

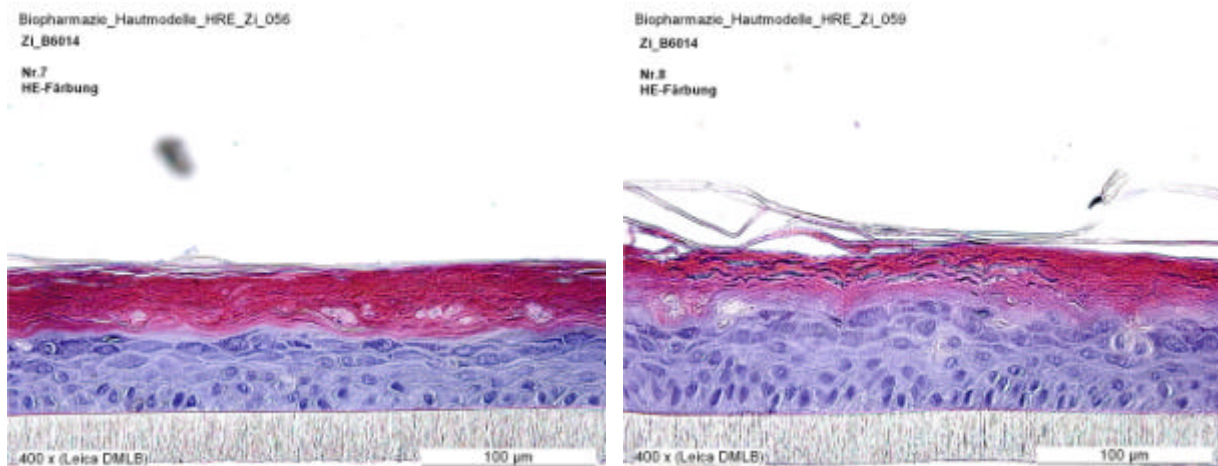


Abb. E.7: **Intra-batch-Variation** im SkinEthic-Modell, histologische Präparate zu zwei Hautproben aus dem gleichen Batch, unbestrahlt, Kulturtag 20, Vergrößerung 400-fach, Hämalaun-Eosin-Färbung

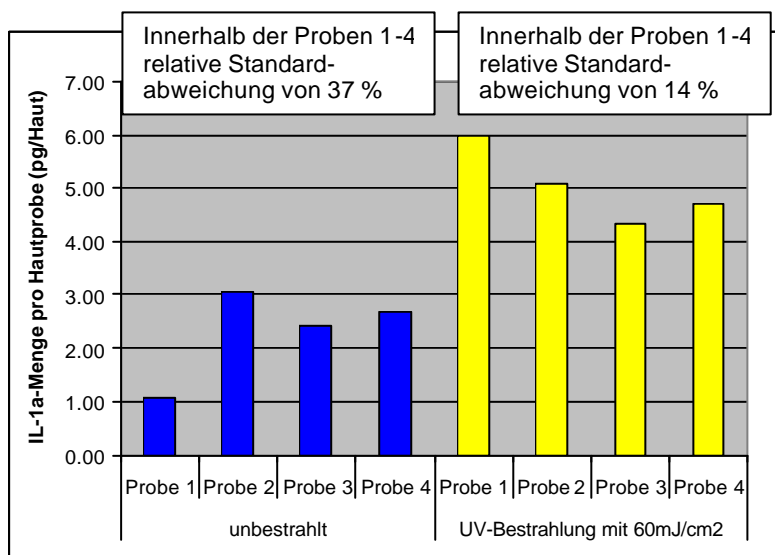


Abb. E.8: **Intra-batch-Variation** im SkinEthic-Modell, IL-1a-Menge im Nährmedium pro SkinEthic-Hautprobe (ELISA), mit respektive ohne UV-Bestrahlung, nach 24 h Inkubation (alle Hautproben aus dem gleichen Batch, Angabe der Einzelwerte aus je vier unabhängigen Hautproben)

Für die Quantifizierung von IL-1a aus dem Nährmedium zu identisch behandelten Hautproben aus einem gleichen Batch sind Standardabweichungen von durchschnittlich 30 % der Normalfall. Dabei ist die Bandbreite sehr gross und reicht von 5% bis 100%. Histologisch zeigen die Hautproben innerhalb eines Batches kaum Unterschiede.

b) Interbatch-Variation

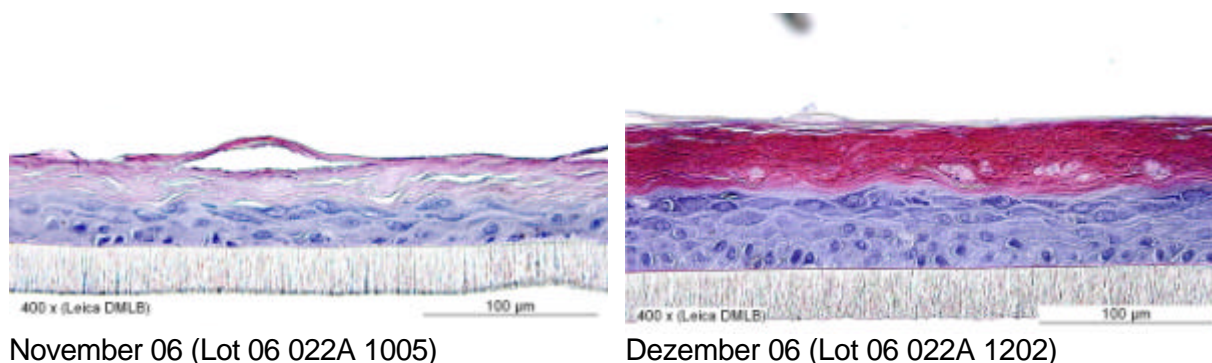


Abb. E.9: **Interbatch-Variation** im SkinEthic-Modell, histologische Präparate zu zwei unabhängigen Hautproben aus zwei unterschiedlichen Batches, unbestrahlt, Kulturtag 20, Vergrößerung 400-fach, Hämalaun-Eosin-Färbung

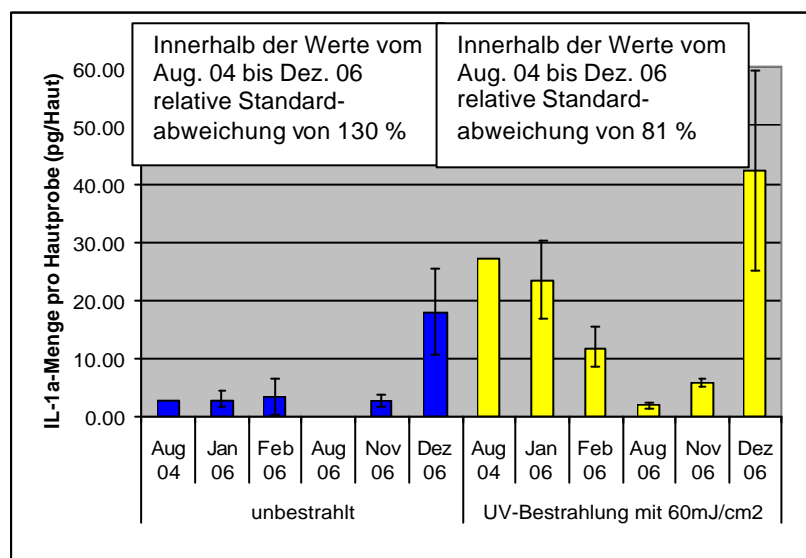


Abb. E.10: **Interbatch-Variation** im SkinEthic-Modell, IL-1a-Menge im Nährmedium pro SkinEthic-Hautprobe (ELISA), mit respektive ohne UV-Bestrahlung, nach 24 h Inkubation (Hautproben aus sechs unabhängigen Batches vom August 04 bis Dezember 06, n = 3, Mittelwert, Angabe der absoluten Standardabweichung)

Werden Daten zur IL-1a-Sekretion zu Hautproben aus verschiedenen Batches betrachtet, ist die Variation deutlich grösser als im batchinternen Vergleich. Die Interbatch-Variation ist auch histologisch erkennbar. Beispielsweise verfügen die SkinEthic-Hautproben aus Lot 06 022A 1202 (Dezember 06) über eine sichtbar grössere Zahl an lebenden Zellschichten als die Hautproben aus Lot 06 022A 1005 (November 06). Eine grössere Zellzahl vermag auch mehr IL-1a zu speichern respektive bei Bedarf auszuschütten.

Fazit

Die Arbeit mit in vitro rekonstruierten Hautmodellen verspricht, im Vergleich zu in vivo-Versuchen, eine verbesserte Reproduzierbarkeit der Resultate. Es hat sich aber gezeigt, dass grosse Intrabatch- und verstärkt noch Interbatch-Variationen die Aussagekraft des SkinEthic-Modells limitieren. Die Interpretation von Daten wird dadurch teilweise wesentlich erschwert. Will man Ergebnisse aus unterschiedlichen Batches vergleichen, ist das Mitführen von versuchsinternen Kontrollproben unerlässlich.

E.1.2 Festlegung von Indikatorproteinen

E.1.2.1 Indikatorproteine für die Glucocorticoidwirkung ohne vorgängige Hautirritation

Prüfungen

a) Überprüfung IL-1 sRII

a.1) Überprüfung IL-1 sRII-Proteinmenge (ELISA)

In den folgenden Abbildungen sind die im Gewebe und die im Nährmedium des SkinEthic-Modells gefundenen IL-1 sRII-Proteinmengen nach Applikation von BV-17 in den Dosierungen 2×10^{-5} M und 2×10^{-6} M dargestellt. Als Vehikel diente absoluter Ethanol.

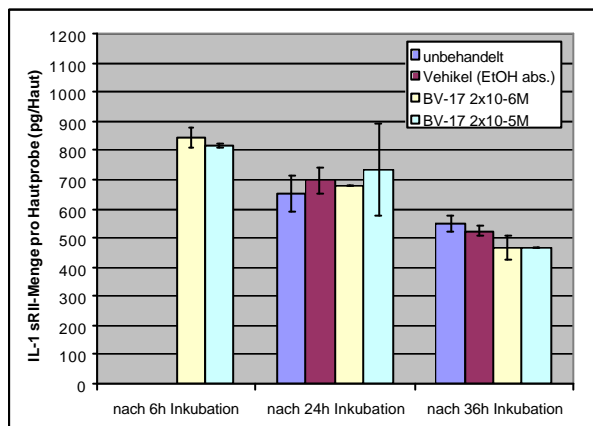


Abb. E.11: **IL-1 sRII-Proteinmenge (ELISA) im Gewebe** des SkinEthic-Modells nach Applikation von BV-17 in den Dosierungen 2×10^{-5} M und 2×10^{-6} M (Vehikel absoluter Ethanol) (n = 2, Mittelwert, Angabe der Spannweite)

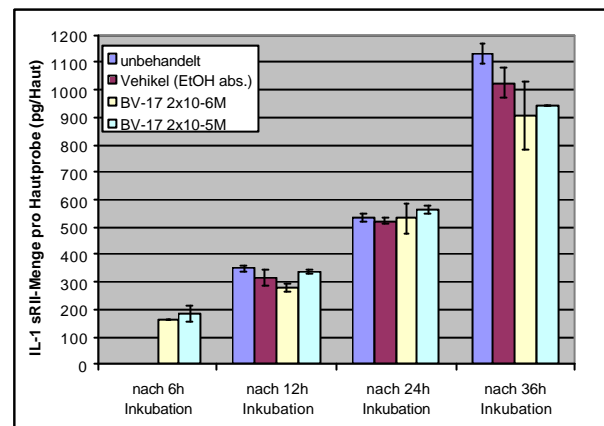


Abb. E.12: **IL-1 sRII-Proteinmenge (ELISA) im Nährmedium** des SkinEthic-Modells nach Applikation von BV-17 in den Dosierungen 2×10^{-5} M und 2×10^{-6} M (Vehikel absoluter Ethanol) (n = 2, Mittelwert, Angabe der Spannweite)

IL-1 sRII kann im SkinEthic-Modell sowohl im Gewebe als auch nach Sekretion im Nährmedium detektiert werden. Im Laufe der Zeit scheint das IL-1 sRII aus dem Gewebe in das Nährmedium überzutreten (vgl. kontinuierliche Abnahme im Gewebe bei gleichzeitiger Zunahme im Medium).

In der Literatur ist die vermehrte Expression von IL-1 sRII (Re et al. 1994; Lukiw et al. 1999; Pouset et al. 2001) nach Applikation von Glucocorticoiden beschrieben. Gemäss den vorliegenden Daten führt die Applikation von BV-17 unter den gewählten Bedingungen im SkinEthic-Modell jedoch zu keinen nachweislich erhöhten IL-1 sRII-Proteinmengen.

a.2) Überprüfung IL-1 sRII-de novo-Synthese (PCR)

Zur differenzierten Erfassung der de novo-Synthese wiederholte man den Versuch, wobei die mRNA zu IL-1 sRII mittels PCR analysiert wurde. Das Ergebnis ist in der folgenden Graphik dargestellt:

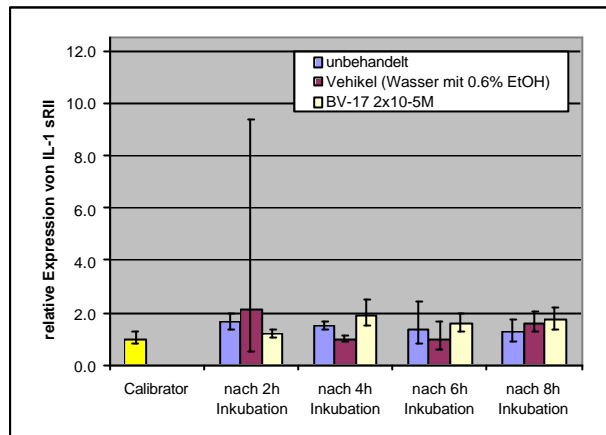


Abb. E.13: **Relative IL-1 sRII-Expression (PCR)** im SkinEthic-Modell nach Applikation von BV-17 in der Dosierung 2×10^{-5} M (Vehikel Wasser mit 0.6 % Ethanol) (Calibrator = unbehandelt, nach 0 h Inkubation) (n = 3, Mittelwert, Angabe der Spannweite)

Es ist ein Trend erkennbar, der auf eine Aufregulation der IL-1 sRII-Expression unter dem Einfluss von BV-17 hindeutet. Ab 4h Inkubation ist die IL-1 sRII-Expression im SkinEthic-Modell nach Applikation von BV-17 (2×10^{-5} M) gegenüber der vehikelkontrollierten Hautprobe tendenziell erhöht. Aufgrund der grossen Streuungen ist das Ergebnis jedoch statistisch nicht signifikant. Somit kann nach Applikation von BV-17 keine eindeutige Steigerung der de novo-Synthese von IL-1 sRII festgestellt werden.

Gegenüber der Analyse des Proteins IL-1 sRII war die Inkubationszeit zur Quantifizierung der entsprechenden mRNA verkürzt. Dieses Vorgehen basiert auf der Überlegung, dass nach erfolgter Induktion zuerst die mRNA und anschliessend nach deren Vorlage das Protein synthetisiert wird [vgl. auch das Vorgehen bei Pouset et al. (Pouset et al. 2001)].

b) Überprüfung IL-1ra

b.1) Überprüfung IL-1ra-Proteinmenge (ELISA)

Die beiden folgenden Graphiken zeigen die im Gewebe und die im Nährmedium des SkinEthic-Modells ermittelten IL-1ra-Proteinmengen nach Applikation von BV-17 in den Dosierungen 2×10^{-4} M, 2×10^{-5} M und 2×10^{-6} M. Als Vehikel diente absoluter Ethanol.

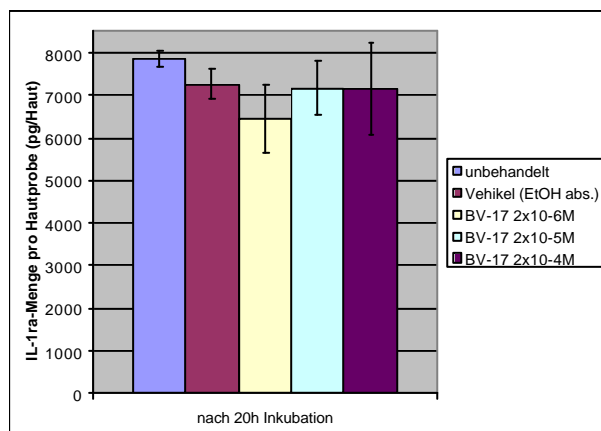


Abb. E.14: **IL-1ra-Proteinmenge (ELISA) im Gewebe** des SkinEthic-Modells nach Applikation von BV-17 in den Dosierungen 2×10^{-4} M, 2×10^{-5} M und 2×10^{-6} M (Vehikel absoluter Ethanol) (n = 2, Mittelwert, Angabe der Spannweite)

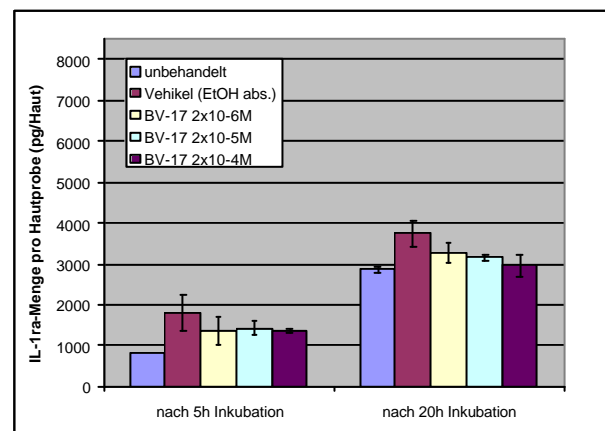


Abb. E.15: **IL-1ra-Proteinmenge (ELISA) im Nährmedium** des SkinEthic-Modells nach Applikation von BV-17 in den Dosierungen 2×10^{-4} M, 2×10^{-5} M und 2×10^{-6} M (Vehikel absoluter Ethanol) (n = 2, Mittelwert, Angabe der Spannweite)

Die Datenlage gestaltet sich ähnlich wie zu IL-1 sRII. Dabei ist die gefundene IL-1ra-Proteinmenge rund 10-mal grösser, als dies für IL-1 sRII der Fall ist. Das Protein IL-1ra kann im SkinEthic-Modell sowohl im Gewebe als auch ausgeschüttet im Nährmedium detektiert werden. Im Laufe der Inkubationszeit nimmt die im Medium gefundene IL-1ra-Menge zu. Levine et al. haben festgestellt, dass das Glucocorticoid Dexamethason eine zeit- und dosisabhängige Steigerung der IL-1 sRII-Synthese in humanen, bronchialen Epithelzellen induziert (Levine et al. 1996). Stosic-Grujicic und Lukic haben eine analoge Beobachtung zu Keratinocyten beschrieben (Stosic-Grujicic und Lukic 1992). Diese Berichte lassen sich durch die vorliegenden Resultate jedoch nicht bestätigen. BV-17 bewirkt in den Dosierungen 2×10^{-4} M, 2×10^{-5} M und 2×10^{-6} M unter den gewählten Bedingungen im SkinEthic-Modell keine Steigerung der IL-1ra-Proteinmenge.

b.2) Überprüfung IL-1ra-de novo-Synthese (PCR)

Zur differenzierten Erfassung der de novo-Synthese wurde der Versuch wiederholt und die PCR-Analytik eingesetzt. Die Daten stammen aus den gleichen Proben, aus denen bereits IL-1 sRII quantifiziert worden ist.

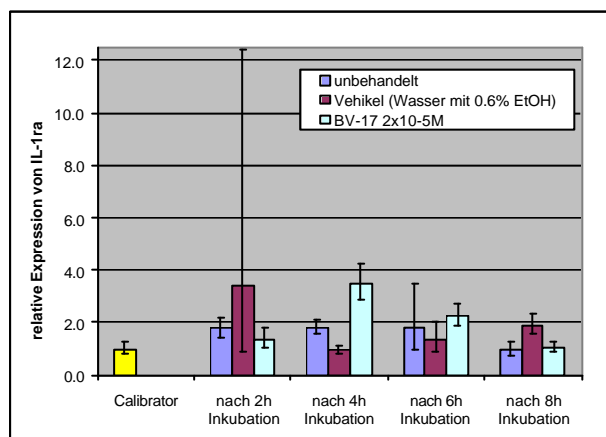


Abb. E.16: **Relative IL-1ra-Expression (PCR)** im SkinEthic-Modell nach Applikation von BV-17 in der Dosierung 2×10^{-5} M (Vehikel Wasser mit 0.6 % Ethanol) (Calibrator = unbehandelt, nach 0 h Inkubation) (n = 3, Mittelwert, Angabe der Spannweite)

Nach 4-stündiger Inkubation scheint eine signifikante durch BV-17 (in der Dosierung 2×10^{-5} M) ausgelöste Aufregulation von IL-1ra vorzuliegen. Bis 6 h respektive 8 h verschwindet dieser Effekt wieder. Die Streuung der Daten ist recht gross, wobei besonders die vehikelkontrollierte Probe nach 2-stündiger Inkubation auffällt. Der aussergewöhnlich hohe Wert stammt aus der gleichen Hautprobe, die bereits für IL-1 sRII ein entsprechendes Ergebnis geliefert hat.

Die Daten sind in sich jedoch nicht konsistent. Der nach 4 h beobachtete Effekt wird nach 2 h und 8 h nicht einmal durch einen Trend bestätigt. Der Vergleich zur Protein-Analytik ergibt keine Übereinstimmung. Nach Applikation von BV-17 kann somit keine eindeutige Steigerung der IL-1ra-de novo-Synthese nachgewiesen werden.

c) Überprüfung Lipocortin-1

Aus praktischen Gründen konnte Lipocortin-1 auf Proteinebene nicht ermittelt werden. Die folgende Graphik zeigt die Daten zur de novo-Synthese (d.h. Lipocortin-1 auf mRNA-Ebene). Es wurden die gleichen Proben, deren Resultate bereits zu IL-1 sRII und IL-1ra aufgeführt sind, analysiert.

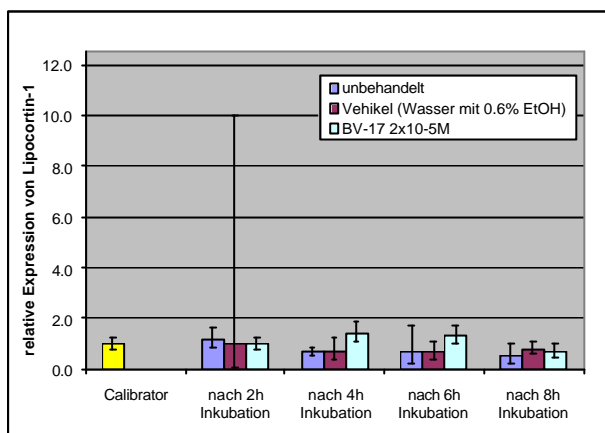


Abb. E.17: **Relative Lipocortin-1-Expression (PCR)** im SkinEthic-Modell nach Applikation von BV-17 in der Dosierung 2×10^{-5} M (Vehikel Wasser mit 0.6 % Ethanol) (Calibrator = unbehandelt, nach 0 h Inkubation) (n = 3, Mittelwert, Angabe der Spannweite)

Tendenziell kann für Lipocortin-1 eine Aufregulation nach Applikation von BV-17 (in der Dosierung 2×10^{-5} M) vermutet werden. Das Resultat ist statistisch jedoch nicht signifikant. Die Streuungen verhalten sich analog zu den für IL-1 sRII und IL-1ra ermittelten Daten.

Die Aufregulation von Lipocortin-1 spielt im Rahmen des Wirkmechanismus der Glucocorticoide eine wichtige Rolle (vgl. genomischer Wirkmechanismus C.3.3.1). Dieser Zusammenhang kann am SkinEthic-Modell unter den gewählten Versuchsbedingungen allerdings nicht aufgezeigt werden. Nach Applikation von BV-17 ist keine eindeutige Steigerung der Lipocortin-1-de novo-Synthese detektierbar.

Fazit

Die Wirkung von Glucocorticoiden lässt sich am einfachsten über ein Indikatorprotein erfassen, dessen Synthese in unmittelbarer Reaktion auf den Wirkstoff gesteigert wird. Die vorgängige Induktion einer Hautentzündung zum Nachweis des Effektes ist somit nicht nötig. Entsprechende Versuche können einfach gehalten werden. Dank einer geringen Komplexität ist die Zahl von potentiellen Einflussfaktoren und Fehlerquellen reduziert.

Aus einer Literaturrecherche hat sich ergeben, dass die Proteine IL-1 sRII, IL-1ra und Lipocortin-1 unter dem direkten Einfluss von Glucocorticoiden vermehrt exprimiert werden. Im SkinEthic-Modell konnte jedoch zu keinem der drei potentiellen Indikatorproteine eine entsprechende durch das Glucocorticoid BV-17 ausgelöste Steigerung der Synthese nachgewiesen werden. Der Dosisbereich für BV-17 sowie das Inkubationszeitintervall wurden dabei breit abgedeckt. Neben der total vorhandenen Proteinmenge überprüfte man auch gezielt die de novo-Synthese.

Die Idee einer direkten Erfassung des Glucocorticoid-Effektes ohne vorgängige Hautirritation wird somit verworfen und ein entsprechendes Vorgehen im Rahmen der vorliegenden Arbeit ausgeschlossen.

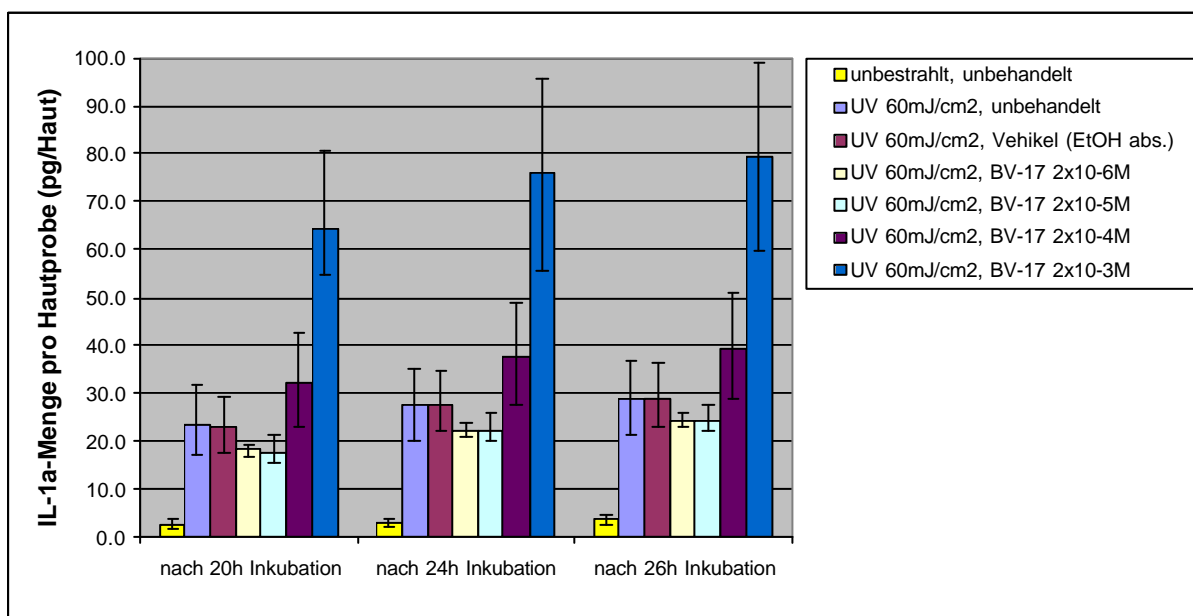
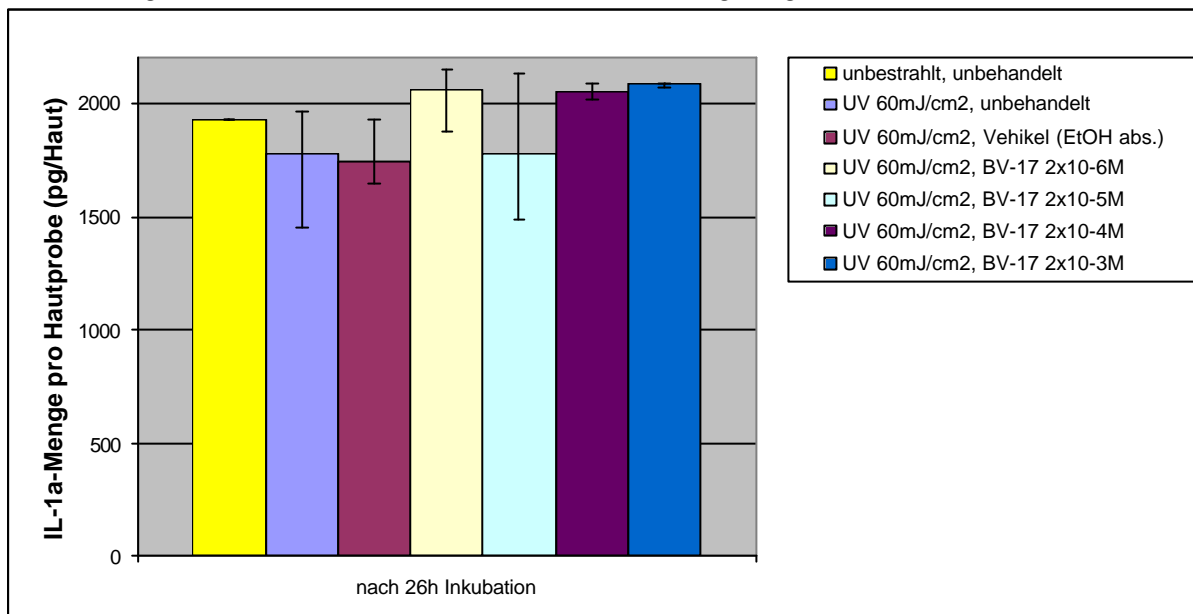
E.1.2.2 Indikatorproteine für die Glucocorticoidwirkung nach vorgängiger Hautirritation

Prüfungen

a) Überprüfung IL-1a

a.1) Überprüfung IL-1a-Proteinmenge (ELISA)

Im Folgenden ist die einerseits im Gewebe und andererseits im Nährmedium gefundene IL-1a-Proteinmenge nach Irritation mittels UV-Bestrahlung und anschliessender Applikation von BV-17 im SkinEthic-Modell dargestellt. Zur Irritation wählte man eine UV-Strahlendosis von 60 mJ/cm². BV-17 wurde in den Dosierungen 2 x 10⁻³ M, 2 x 10⁻⁴ M, 2 x 10⁻⁵ M und 2 x 10⁻⁶ M, gelöst in absolutem Ethanol, auf die Haut aufgetragen.



Im Vergleich zur im Nährmedium ermittelten Proteinmenge liegt im Gewebe des SkinEthic-Modells viel IL-1a vor. Dabei handelt es sich um das in der Literatur beschriebene permanente IL-1a-Depot in den Keratinocyten (Kupper und Groves 1995). Diese gespeicherte IL-1a-Menge wird weder durch UV-Bestrahlung (60 mJ/cm²) noch durch die Applikation von BV-17 (Dosierungen 2 x 10⁻³ M, 2 x 10⁻⁴ M, 2 x 10⁻⁵ M und 2 x 10⁻⁶ M) nachweislich beeinflusst. Die grosse Menge an vorgeformtem Protein sowie die beträchtliche Streuung können die Detektion einer möglicherweise vorhandenen, aber verhältnismässig geringen de novo-Synthese allerdings erschweren.

Die IL-1a-Sekretion in das Nährmedium wird durch die UV-Bestrahlung signifikant verstärkt (20 h p < 0.074, 24 h p < 0.063, 26 h p < 0.065; zweiseitig). Auch ein dosisabhängiger BV-17-Effekt ist ersichtlich. Während tief dosiertes BV-17 (2 x 10⁻⁵ M und 2x10⁻⁶ M) die IL-1a-Sekretion im Vergleich zur vehikelkontrollierten Hautprobe tendenziell senkt, ist nach Applikation von hoch dosiertem BV-17 (2 x 10⁻³ M) eine deutliche Steigerung der in das Nährmedium abgegebenen IL-1a-Proteinmenge zu beobachten (20 h p < 0.098, 24 h p < 0.090, 26 h p < 0.086; zweiseitig). Ein Vehikeleffekt ist nicht vorhanden. Im Laufe der Inkubationszeit nimmt die im Nährmedium gefundene IL-1a-Proteinmenge kontinuierlich leicht zu. Im Vergleich zur total im Gewebe vorhandenen IL-1a-Menge wird jedoch nur ein verhältnismässig kleiner Teil ausgeschüttet (vgl. für die unbestrahlte Probe 0.2 % nach Applikation von BV-17 2 x 10⁻³ M 3.8 %).

Inwiefern die aufgezeigte Beeinflussung der IL-1a-Sekretion auf eine Auf- respektive Abregulation der de novo-Synthese zurückzuführen ist, oder ob die Effekte vor allem in Zusammenhang mit dem Sekretionsvorgang an sich stehen, ist aufgrund der ermittelten Daten nicht ersichtlich. Zur Differenzierung von de novo synthetisiertem gegenüber im Speicher vorgebildetem IL-1a wurden die Versuche unter Anwendung der PCR-Analytik wiederholt. Die Aspekte zum Sekretionsvorgang werden zu einem späteren Zeitpunkt diskutiert (vgl. E.1.4.1).

a.2) Überprüfung IL-1a-de novo-Synthese (PCR)

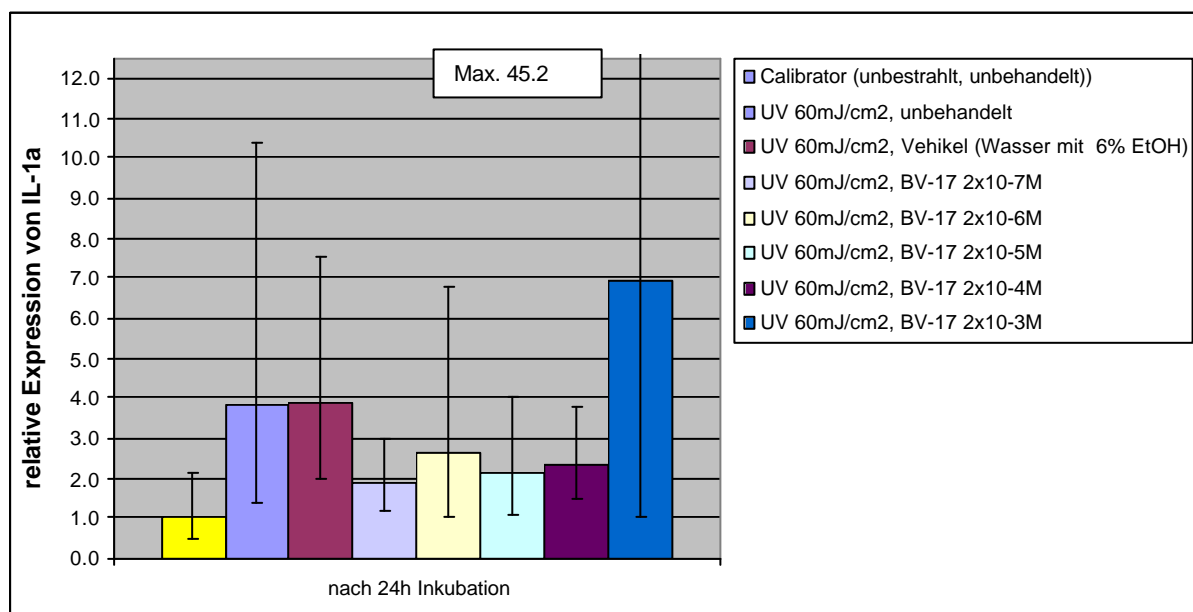


Abb. E.20: **Relative IL-1a-Expression (PCR)** im SkinEthic-Modell nach UV-Bestrahlung (60 mJ/cm²) und nach Applikation von BV-17 in den Dosierungen 2 x 10⁻³ M, 2 x 10⁻⁴ M, 2 x 10⁻⁵ M, 2 x 10⁻⁶ M und 2 x 10⁻⁷ M (Vehikel Wasser mit 6 % Ethanol V/V) (Calibrator = unbestrahlt, unbehandelt, nach 24 h Inkubation) (n = 3, Mittelwert, Angabe der Spannweite)

Die Messwerte sind mit sehr grossen Streuungen behaftet und erlauben nur die Abschätzung von Trends: Die Bestrahlung mit UV-Licht bewirkt eine Aufregulation der IL-1a-Expression. Dieser Effekt wird in der Literatur bereits mehrfach beschrieben (Kupper et al. 1987; Griswold et al. 1991; Luo et al. 2004). Ein Vehikeffekt ist nicht zu beobachten. Nach Applikation von BV-17 in den Dosierungen 2×10^{-4} M, 2×10^{-5} M, 2×10^{-6} M und 2×10^{-7} M erscheint die IL-1a-Expression gegenüber der unbehandelten sowie gegenüber der vehikelkontrollierten Probe tendenziell reduziert. Eine Dosisabhängigkeit ist dabei nicht ersichtlich. Die hohe Dosis von 2×10^{-3} M hingegen führt zu einer Steigerung der IL-1a-de novo-Synthese. BV-17 in der Dosierung 2×10^{-3} M scheint somit auf das SkinEthic-Modell einen proirritativen Effekt auszuüben. Die Applikation von 2×10^{-3} M (entspricht 0.1 %) ist für die topische Therapie von Hauterkrankungen üblich (vgl. Celestoderm®-V Crème respektive Salbe). In der Literatur ist die Auslösung von Hautirritationen als unerwünschte Nebenwirkung beschrieben (Valencia und Kerdel 2003). In der vorliegenden Arbeit wird dieser proirritative Effekt von Glucocorticoiden in therapeutischer Dosis zum ersten Mal im in vitro rekonstruierten Hautmodell gezeigt.

Das Ergebnis zur IL-1a-de novo-Synthese ist demjenigen zur Proteinanalyse aus dem Nährmedium ähnlich. Somit scheint ein Zusammenhang zwischen der de novo-Synthese und der Sekretion in das Nährmedium zu bestehen. Aus physiologischer Sicht macht dies Sinn. IL-1a ist ein primäres Zytokin, welches eine wichtige Rolle als Mediator im Ablauf von Entzündungsreaktionen spielt (vgl. C.1.3.1.1). In Reaktion auf eine Hautreizung, beispielsweise durch UV-Bestrahlung, wird es vermehrt exprimiert und muss zur Ausübung seiner Funktion als Botenstoff aus der Zelle ausgeschüttet werden.

Eine Übereinstimmung zwischen den Resultaten zur de novo-Synthese und der im Gewebe detektierten Proteinmenge liegt hingegen nicht vor. Im Vergleich zum vorgeformten und in den Keratinocyten gespeicherten IL-1a ist die de novo synthetisierte Proteinmenge offenbar so klein, dass dessen Detektion unter den vorliegenden Bedingungen nicht möglich ist.

b) Überprüfung IL-8

Die folgenden Graphiken zeigen die analog zu IL-1a ermittelten Ergebnisse zu IL-8:

b.1) Überprüfung IL-8-Proteinmenge (ELISA)

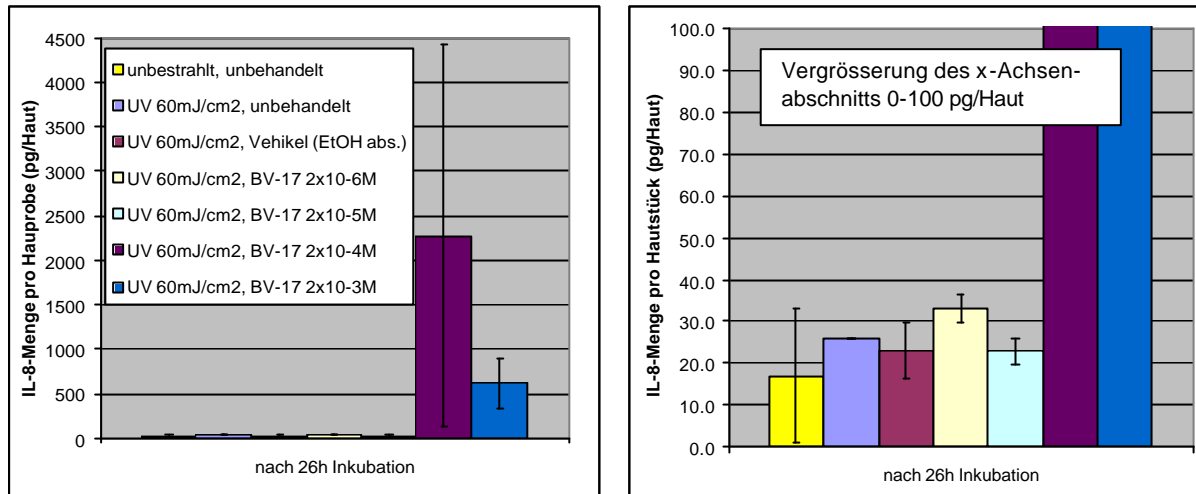


Abb. E.21: **IL-8-Proteinmenge (ELISA) im Gewebe** des SkinEthic-Modells nach UV-Bestrahlung (60 mJ/cm²) und nach Applikation von BV-17 in den Dosierungen 2 x 10⁻³ M, 2 x 10⁻⁴ M, 2 x 10⁻⁵ M und 2 x 10⁻⁶ M (Vehikel absoluter Ethanol) (n = 2, Mittelwert, Angabe der Spannweite)

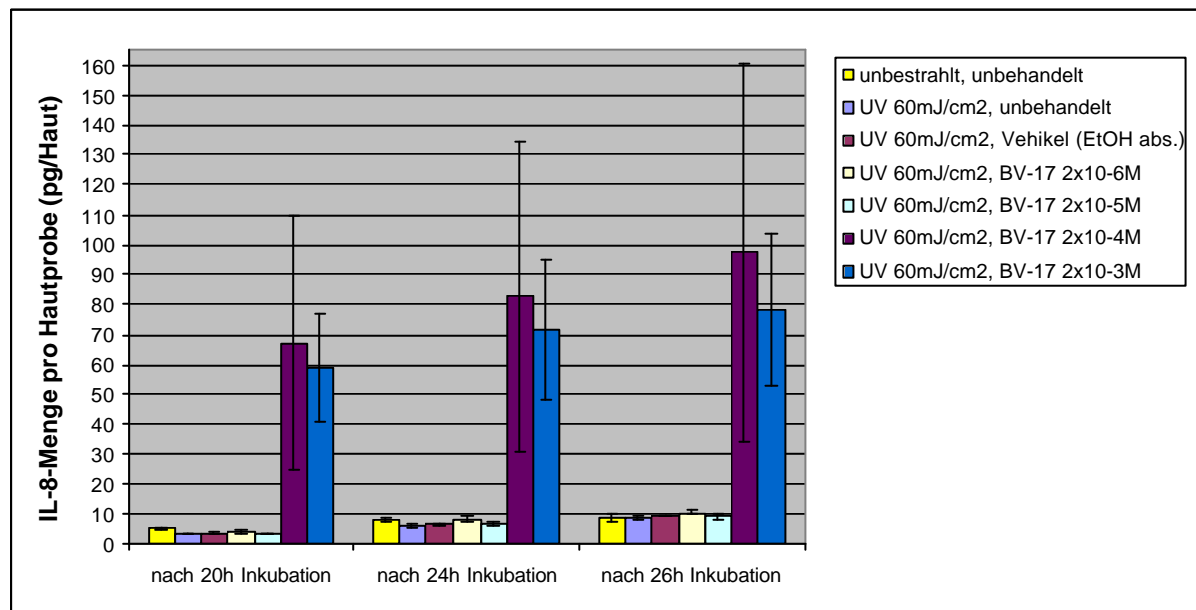


Abb. E.22: **IL-8-Proteinmenge (ELISA) im Nährmedium** des SkinEthic-Modells nach UV-Bestrahlung (60 mJ/cm²) und nach Applikation von BV-17 in den Dosierungen 2 x 10⁻³ M, 2 x 10⁻⁴ M, 2 x 10⁻⁵ M und 2 x 10⁻⁶ M (Vehikel absoluter Ethanol) (n = 2, Mittelwert, Angabe der Spannweite)

UV-Strahlung in der Dosis 60 mJ/cm² beeinflusst die IL-8-Proteinmenge im Gewebe des SkinEthic-Modells nicht. Hingegen nach Applikation von BV-17 scheint eine dosisabhängige Wirkung vorzuliegen. Dabei führt BV-17 in hohen Dosen (2 x 10⁻⁴ M und 2 x 10⁻³ M) zu einer Steigerung der IL-8-Proteinmenge. Aufgrund der grossen Streuung der Messwerte ist dieser Effekt statistisch jedoch nicht signifikant. Tiefer dosiertes BV-17 (2 x 10⁻⁶ M und 2 x 10⁻⁵ M) beeinflusst IL-8 mit Sicherheit nicht. Auch ein Vehikeleffekt liegt nicht vor. Die antiinflammatorische Wirkung von BV-17 kommt somit anhand von IL-8 nicht zum Ausdruck.

Die in das Nährmedium ausgeschüttete IL-8-Proteinmenge widerspiegelt die Situation im Gewebe. Die Hautproben mit erhöhtem IL-8-Gehalt sezernieren ca. 4 % (nach BV-17-Dosis 2×10^{-4} M) respektive 13 % (nach BV-17-Dosis 2×10^{-3} M) der total im Gewebe vorhandenen IL-8-Menge in das Medium. In den Hautproben ohne erhöhte IL-8-Werte sind es rund 40 %. Im Laufe der Inkubationszeit nimmt die im Nährmedium gefundene IL-8-Proteinmenge kontinuierlich leicht zu.

b.2) Überprüfung IL-8-de novo-Synthese (PCR)

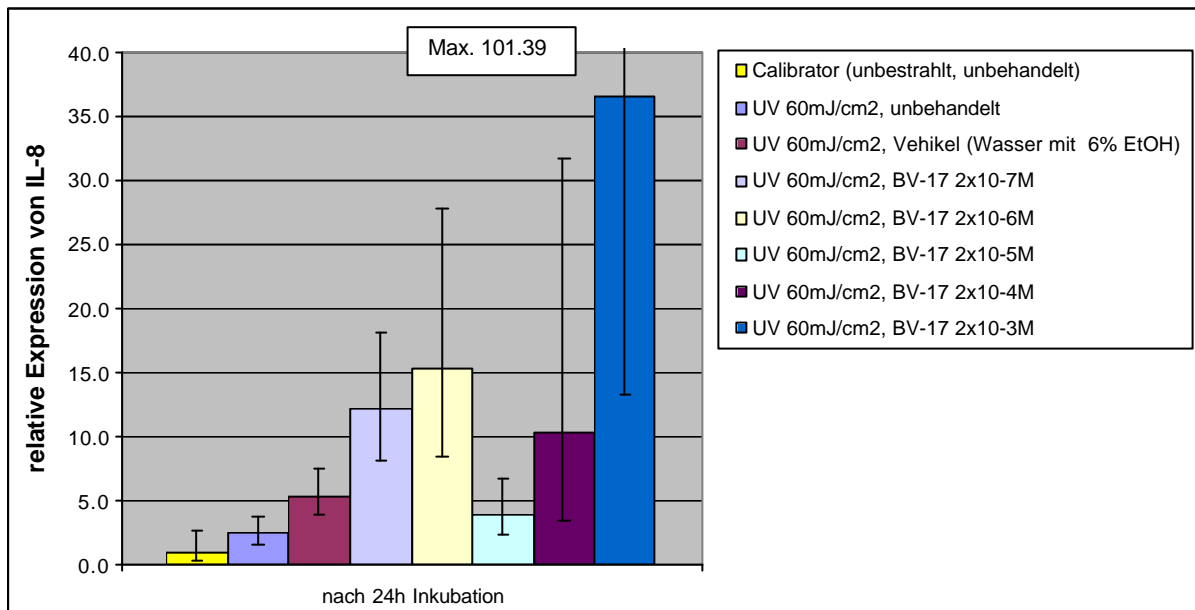


Abb. E.23: **Relative IL-8-Expression (PCR)** im SkinEthic-Modell nach UV-Bestrahlung (60 mJ/cm^2) und nach Applikation von BV-17 in den Dosierungen 2×10^{-3} M, 2×10^{-4} M, 2×10^{-5} M, 2×10^{-6} M und 2×10^{-7} M (Vehikel Wasser mit 6 % Ethanol V/V) (Calibrator = unbestrahlt, unbehandelt, nach 24 h Inkubation) (n = 3, Mittelwert, Angabe der Spannweite)

In ihren Grundzügen bestätigt die Quantifizierung von IL-8 auf mRNA-Niveau die bereits mittels ELISA gewonnene Erkenntnis:

UV-Strahlung bewirkt keine Steigerung der IL-8-de novo-Synthese. In der Literatur ist zwar die Stimulation der IL-8-Expression durch externe Reize, beispielsweise UV-Strahlung, beschrieben (Stein et al. 1997). Dies ist auf direktem oder auf indirektem Weg, vermittelt durch endogenen Mediatoren wie IL-1a, möglich (vgl. Mediator-Kaskaden im Rahmen von Entzündungsprozessen, C.1.3.1.3). Unter den vorliegenden Bedingungen am SkinEthic-Modell kann jedoch weder der direkte Einfluss von UV-Strahlung noch eine Korrelation zur entsprechenden IL-1a-Menge aufgezeigt werden.

Die Applikation von BV-17 in der Dosierung 2×10^{-3} M führt tendenziell zu einer Aufregulation der IL-8-Expression, was Ausdruck einer proirritativen Wirkung sein könnte. Dies korreliert mit den entsprechenden oben gezeigten Daten zur IL-1a-Sekretion, wonach IL-8 durch IL-1a stimuliert wird. Aufgrund der grossen Streuungen kann die statistische Signifikanz jedoch nicht gezeigt werden.

c) Überprüfung TNF-a

Die folgende Graphik zeigt die aus dem SkinEthic-Modell in das Nährmedium ausgeschüttete TNF-a-Proteinmenge nach Irritation mit UV-Licht (Dosis 60 mJ/cm²) und nach Applikation von BV-17 (Dosis 2 x 10⁻⁵ M). Als Vehikel diente Rizinusöl.

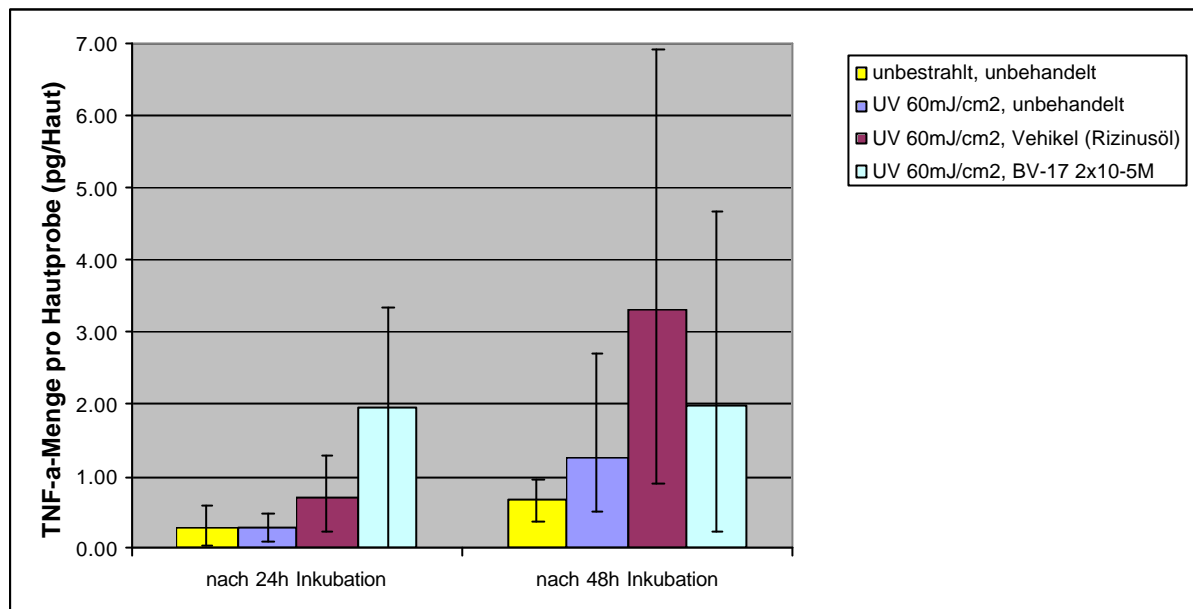


Abb. E.24: **TNF-a-Proteinmenge (ELISA) im Nährmedium** des SkinEthic-Modells nach UV-Bestrahlung (60 mJ/cm²) und nach Applikation von BV-17 in der Dosierung 2 x 10⁻⁵ M (Vehikel Rizinusöl) (n = 3, Mittelwert, Angabe der Spannweite)

Die im Nährmedium gefundenen TNF-a-Proteinmengen sind im Vergleich zu den bisher analysierten potentiellen Indikatorproteinen sehr gering. Die Analyse zum Gewebe des SkinEthic-Modells lieferte noch tiefere Werte (an respektive unterhalb der Nachweisgrenze, Daten nicht gezeigt). Obwohl ein hochsensibles ELISA-Kit eingesetzt wurde (Messbereich für TNF-a von 0.5 bis 32 pg/ml) sind die vorliegenden Daten mit sehr grossen Streuungen behaftet und es können bestenfalls Trends formuliert werden: Unter den gewählten Bedingungen zeigt die UV-Strahlung keinen Einfluss. BV-17 bewirkt möglicherweise eine Erhöhung der TNF-a-Proteinmenge. Im Laufe der Inkubationszeit nimmt die TNF-a-Proteinmenge im Nährmedium etwas zu.

In der Literatur ist die de novo-Synthese von TNF-a in Keratinocyten einerseits in Reaktion auf körpereigene Faktoren wie IL-1a und andererseits auf externe Einflüsse wie UV-Strahlung beschrieben (Kock et al. 1990). Anhand des SkinEthic-Modells kann dieser Zusammenhang jedoch nicht aufgezeigt werden.

Aufgrund der geringen Proteinmengen sowohl im Nährmedium als auch im Gewebe wurde auf die Analyse der de novo-Synthese mittels PCR-Methodik verzichtet.

d) Überprüfung IL-6

Im SkinEthic-Modell konnte nach UV-Bestrahlung mit 60 mJ/cm² und nach Applikation von BV-17 in den Dosierungen 2x 10⁻⁷ M und 2x 10⁻⁶ M (in absolutem Ethanol) mittels ELISA generell kein IL-6 nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Möglicherweise ist für eine IL-6-Expression in Keratinozyten deren Interaktion mit Fibroblasten erforderlich, was im SkinEthic-Modell jedoch fehlt (Welss et al. 2004).

Fazit

Als Reaktion auf eine Irritation werden in Keratinocyten und Fibroblasten die Entzündungsmediatoren IL-1a, IL-8, TNF-a und IL-6 vermehrt gebildet und zur Signalvermittlung an ihre Umgebung abgegeben (vgl. C.1.3). In der Literatur ist die Senkung dieser Mediatoren nach Applikation von Glucocorticoiden im Rahmen der antiinflammatorischen Wirkung mehrfach beschrieben (Kirnbauer et al. 1991; Lee et al. 1991; Lange et al. 1997; Stein et al. 1997; Lange et al. 2000; Zöller et al. 2006). Alle vier Proteine sind somit potentielle Indikatorproteine für die Wirkung von Glucocorticoiden nach vorgängiger Hautirritation.

Anhand von IL-1a lassen sich im SkinEthic-Modell statistisch signifikante Effekte zeigen. Zum einen ist nach Irritation mittels UV-Bestrahlung die IL-1a-Sekretion in das Nährmedium deutlich erhöht. Zum anderen ist nach Applikation von BV-17 eine dosisabhängige Wirkung nachweisbar. Die Dosis von 2×10^{-3} M führt dabei zu einer klaren Steigerung, die Dosierungen 2×10^{-6} M und 2×10^{-5} M bewirken hingegen tendenziell eine Reduktion der IL-1a-Sekretion. Alle genannten Effekte lassen sich durch die Analyse der IL-1a-de novo-Synthese mittels PCR-Methodik bestätigen. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wird IL-1a somit als Indikatorprotein zur Erfassung der Reaktion auf externe Reize und der Wirkung von Glucocorticoiden anhand des SkinEthic-Modells ausgewählt.

Der irritative Effekt von UV-Strahlung auf das SkinEthic-Modell wird durch IL-8 und TNF-a nicht indiziert. IL-6 kann im SkinEthic-Modell gar nicht nachgewiesen werden. Demzufolge sind weder IL-8 und TNF-a noch IL-6 als Indikatorproteine für Irritationszustände im SkinEthic-Modell geeignet. Im Zusammenhang mit dem Phenion FT- und dem Natskin-Modell werden IL-8 und IL-6 jedoch erneut analysiert und diskutiert (vgl. E.2.1.2 und E.2.1.3).

Die während der Suche nach einem geeigneten Indikatorprotein generierten Daten sind teilweise mit einer starken Streuung behaftet, was in erster Linie auf die ausgeprägten Intra- und Interbatch-Variationen im SkinEthic-Modell selbst zurückzuführen ist (vgl. E.1.1.2).

Bei der Durchführung der Versuche wurde starken Wert auf eine maximal mögliche Standardisierung der Vorgehensweise gelegt. Auch die Analytik dürfte nicht hauptverantwortlich für die grosse Streuung sein. Zumindest die ELISA-Analytik kann als unproblematisch angesehen werden. Es wurden ausnahmslos validierte, gebrauchsfertig am Markt erhältliche Kits eingesetzt, wobei man die Arbeitsanweisungen gemäss Hersteller konsequent befolgte. Die PCR-Methodik allerdings ist sehr komplex und beruht auf zahlreichen Arbeitsschritten. Vor diesem Hintergrund wären auch die besonders ausgeprägten Streuungen in den mittels PCR generierten Daten zu erklären.

Die Empfindlichkeit des SkinEthic-Modells auf externe Reize und die Wirkung von Glucocorticoiden ist stark abhängig von der Wahl des Indikatorproteins. Ausser für IL-1a konnten die in der Literatur beschriebenen Zusammenhänge nicht aufgezeigt werden. Die deutlichen Intra- und Interbatch-Variationen erschwerten die Untersuchungen zusätzlich.

E.1.3 Festlegung der Analysenmethode für die Indikatorproteine

Prüfung

Für den direkten Vergleich der beiden Methoden wurde innerhalb eines Experiments zu den gleichen Hautproben IL-1a einmal im Gewebe mittels PCR und parallel dazu ein zweites Mal nach Sekretion in das Nährmedium mittels ELISA analysiert. Abb. E.25 zeigt die entsprechenden Resultate nach Bestrahlung des SkinEthic-Modells mit verschiedenen UV-Dosen. In Abb. E.26 sind die Ergebnisse nach konstanter Bestrahlung mit 60 mJ/cm² und anschließender Applikation von BV-17 in verschiedenen Dosierungen dargestellt.

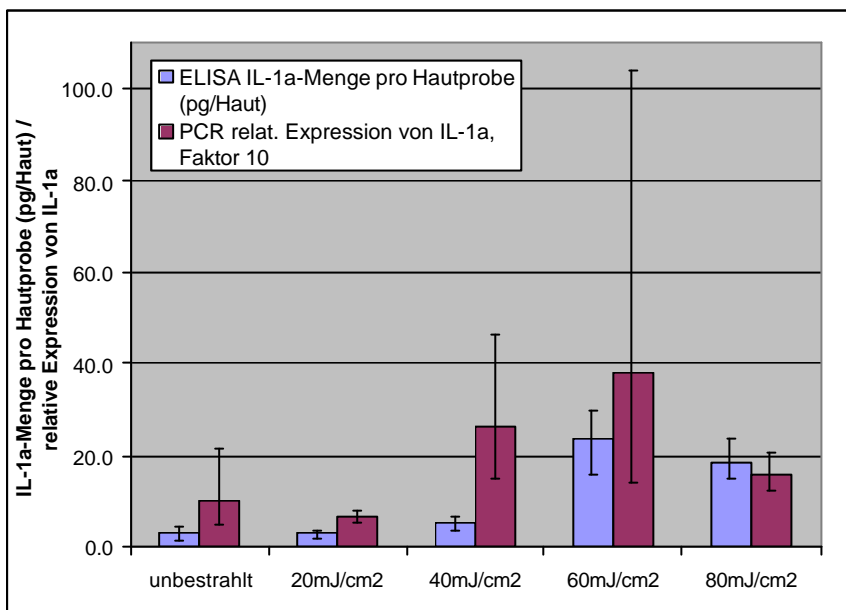


Abb. E.25: Mittels ELISA respektive PCR gewonnene Daten zu **IL-1a** im SkinEthic-Modell nach UV-Bestrahlung in den Dosierungen 20, 40, 60, 80 mJ/cm², Inkubationszeit 24 h
ELISA: IL-1a-Menge pro Hautprobe im Nährmedium (pg/Haut) (n = 3, Mittelwert, Angabe der Spannweite)
PCR: Relative Expression von IL-1a, multipliziert mit dem Faktor 10 (Calibrator = unbestrahlt, unbehandelt) (n = 3, Mittelwert, Angabe der Spannweite)

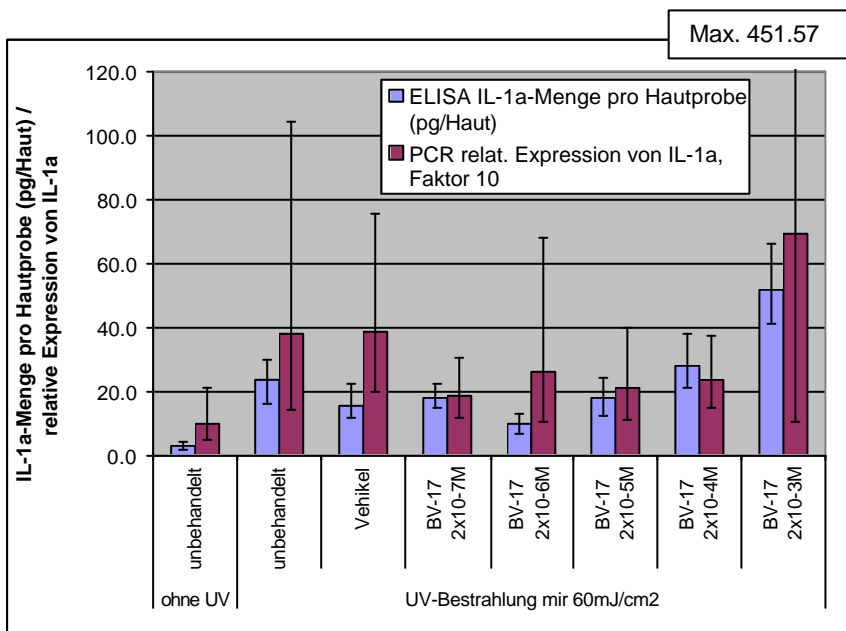


Abb. E.26: Mittels ELISA respektive PCR gewonnene Daten zu **IL-1a** im SkinEthic-Modell nach UV-Bestrahlung (60 mJ/cm²) und nach Applikation von BV-17 in den Dosierungen 2 x 10⁻³ M, 2 x 10⁻⁴ M, 2 x 10⁻⁵ M, 2 x 10⁻⁶ M, 2 x 10⁻⁷ M (Vehikel Wasser mit 6 % Ethanol V/V), Inkubationszeit 24 h
ELISA: IL-1a-Menge pro Hautprobe im Nährmedium (pg/Haut) (n = 3, Mittelwert, Angabe der Spannweite)
PCR: Relative Expression von IL-1a, multipliziert mit dem Faktor 10 (Calibrator = unbestrahlt, unbestrahlt) (n = 3, Mittelwert, Angabe der Spannweite)

Die Resultate aus den beiden Analysenmethoden führen grundsätzlich zu den gleichen Aussagen zu IL-1a. Dies gilt sowohl für die Reaktion auf die UV-Strahlung als auch für den Effekt von BV-17.

Fazit

Zur Quantifizierung der zellbiologischen Marker standen einerseits die PCR- und andererseits die ELISA-Methodik zur Auswahl. PCR bietet den Vorteil, dass die Protein-de novo-Synthese als direkte Reaktion auf einen bestimmten Reiz erfasst werden kann. Die Ausführung ist jedoch aufwändig und die zahlreichen Arbeitsschritte begünstigen die Fehlerquote. Im ELISA wird im Gewebe die gesamthaft vorhandene Proteinmenge quantifiziert, unabhängig davon, ob die Bildung auf einen bestimmten Reiz hin erfolgte ist oder ob ein Proteinspeicher vorliegt. Unter der Annahme, dass der Reiz eine Proteinsekretion verursacht, kann im Nährmedium aber auch mittels ELISA eine differenzierte Proteinanalyse durchgeführt werden. Zudem ist der Test einfach und kann mit Hilfe von validierten Kits durchgeführt werden.

Das oben dargestellte Resultat zeigt, dass sich über die in das Nährmedium ausgeschüttete Proteinmenge die Reaktion auf den externen Reiz und die Wirkung von BV-17 ebenso gut erfassen lässt wie über die de novo-Synthese. In Anbetracht dessen, dass die ELISA-Methodik Resultate mit geringerer Streuung liefert, und der Test in der Durchführung viel einfacher und schneller ist, wird für den weiteren Verlauf der vorliegenden Arbeit die ELISA-Methodik gewählt.

E.1.4 Festlegung des externen Reizes

Prüfungen

E.1.4.1 Hautirritation durch UV-Bestrahlung (physikalischer Reiz)

Die folgenden Graphiken demonstrieren die Wirkung von UV-Strahlung auf das SkinEthic-Modell anhand der IL-1a-Sekretion in das Nährmedium (ELISA), der Membranintegrität (LDH-Test) sowie der Anzahl an metabolisch aktiven Zellen (MTT-Test). Zur Bestrahlung wurden die Dosen 20 mJ/cm², 40 mJ/cm², 60 mJ/cm², 80 mJ/cm², 160 mJ/cm² und 320 mJ/cm² gewählt. Alle gezeigten Werte stammen aus den jeweils gleichen Hautproben.

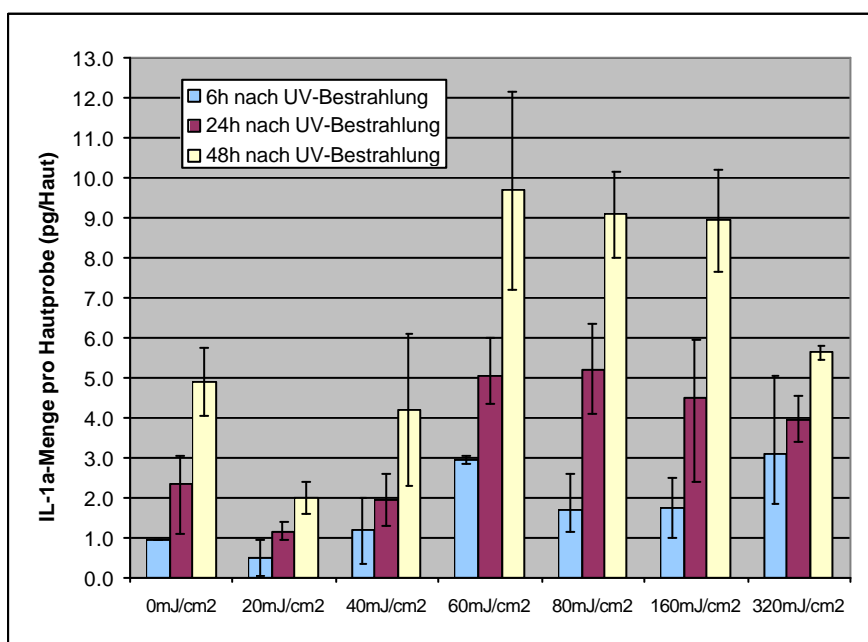


Abb. E.27: **IL-1a-Proteinmenge im Nährmedium** des SkinEthic-Modells nach **UV-Bestrahlung** in den Dosierungen 20, 40, 60, 80, 160, 320 mJ/cm² (nach 6 h n = 3, nach 24 h n = 4, nach 48 h n = 2, Mittelwert, Angabe der Spannweite)

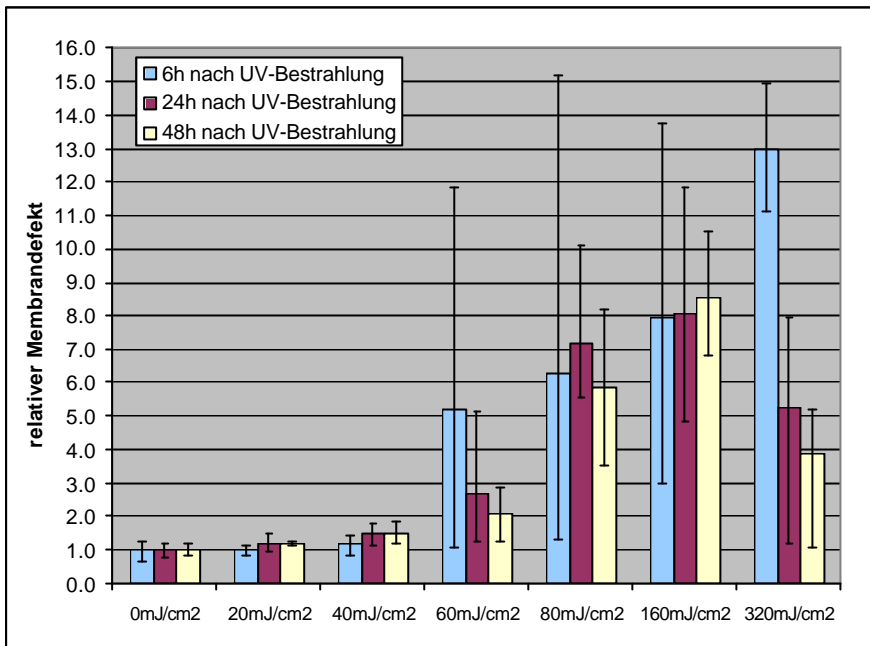


Abb. E.28: **Relativer Membrandefekt** (LDH-Test) im SkinEthic-Modell nach **UV-Bestrahlung** in den Dosierungen 20, 40, 60, 80, 160, 320 mJ/cm² (relativ zur unbestrahlten Hautprobe pro Zeitpunkt) (nach 6 h n = 6, nach 24 h n = 4, nach 48 h n = 2, Mittelwert, Angabe der Spannweite)

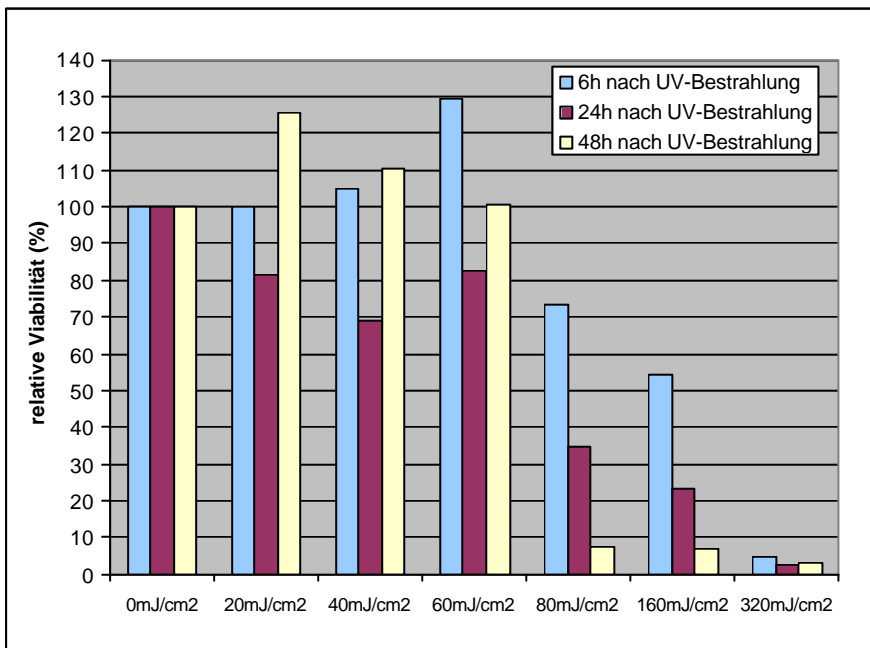


Abb. E.29: **Relative Viabilität** (Anzahl an metabolisch aktiven Zellen im MTT-Test) im SkinEthic-Modell nach **UV-Bestrahlung** in den Dosierungen 20, 40, 60, 80, 160, 320 mJ/cm² (relativ zur unbestrahlten Hautprobe pro Zeitpunkt) (n = 1)

Die UV-Strahlung bewirkt im SkinEthic-Modell eine Steigerung der IL-1a-Sekretion in das Nährmedium, eine Reduktion der Anzahl an metabolisch aktiven Zellen sowie eine Schädigung der Plasmamembran. Für alle drei Effekte ist eine Abhängigkeit von der applizierten UV-Dosis erkennbar.

Für die IL-1a-Proteinmenge im Nährmedium liegt ab einer Strahlungs-dosis von 60 mJ/cm² nach 24 h Inkubation ein signifikanter Unterschied gegenüber der unbestrahlten Hautprobe vor ($p < 0.003$; zweiseitig). Der Effekt ist bereits 6 h nach Bestrahlung zu beobachten. Aufgrund der vorliegenden Daten lässt sich allerdings die statistische Signifikanz nicht zeigen. Nach Applikation von 60 mJ/cm² befindet man sich bereits im Plateau-Bereich. Die weitere Steigerung der UV-Dosis führt zu keiner zusätzlichen Erhöhung der gefundenen IL-1a-Sekretion. Wird mit der maximal applizierten Dosis von 320 mJ/cm² bestrahlt, resultiert tendenziell sogar eine Reduktion. Es ist denkbar, dass die durch hohe UV-Dosen verursachte Gewebeschädigung so stark ausgeprägt ist, dass eine physiologische, im Verhältnis zum Reiz adäquate Reaktion nicht mehr möglich ist. Im Laufe der Inkubationszeit nimmt die IL-1a-Sekretion zu.

Die Plasmamembran wird durch die UV-Strahlung bis zur Dosis 40 mJ/cm^2 nicht wesentlich beeinflusst. Ab 60 mJ/cm^2 ist eine leichte Erhöhung des Membrandefektes relativ zur unbestrahlten Hautprobe pro Zeitpunkt erkennbar (6 h $p < 0.080$, 24 h $p < 0.144$, 48 h $p < 0.313$; zweiseitig). Erst mit weiter steigender UV-Dosis wird die Membran deutlich geschädigt (für 80 mJ/cm^2 : 6 h $p < 0.038$, 24 h $p < 0.004$, 48 h $p < 0.002$; zweiseitig) (für 160 mJ/cm^2 : 6 h $p < 0.013$, 24 h $p < 0.021$, 48 h $p < 0.028$; zweiseitig) (für 320 mJ/cm^2 : 6 h $p < 5.2 \times 10^{-14}$, 24 h $p < 0.030$, 48 h $p < 0.079$; zweiseitig). Die mit der höchsten UV-Dosis bestrahlte Hautprobe zeigt den grössten Membrandefekt und dies bereits nach 6-stündiger Inkubation.

Die relative Membranschädigung und die IL-1a-Sekretion im mittleren UV-Dosisbereich korrelieren schlecht. Nach Bestrahlung mit der Dosis von 60 mJ/cm^2 ist nämlich die IL-1a-Sekretion bereits deutlich gesteigert, während eine entsprechende Zunahme der relativen Membranschädigung erst ab 80 mJ/cm^2 vorliegt. Dies bestätigt, dass die im Nährmedium detektierte IL-1a-Menge nicht allein auf passive Diffusion durch defekte Zellmembranen zurückzuführen ist. Auch die Beobachtung, dass die ausgeschütteten IL-1a-Mengen im Verhältnis zum in den Keratinocyten vorliegenden Depot klein sind, spricht gegen eine rein passive Diffusion (Depot ca. 2000 pg/Haut , Sekretion $< 1\%$ der potentiell vorhandenen Menge; vgl. E.1.2.2). Demzufolge spielt die passive Diffusion von IL-1a durch defekte Membranen, insbesondere nach hohen UV-Dosen, eine Rolle, dürfte jedoch aufgrund der vorliegenden Daten nicht den einzigen Sekretionsweg darstellen.

Die Anzahl an metabolisch aktiven Zellen bleibt in den Hautproben bis zur Bestrahlung mit 60 mJ/cm^2 auf dem Niveau der unbehandelten Kontrolle erhalten. Ab der Anwendung einer UV-Dosis von 80 mJ/cm^2 ist eine deutliche Reduktion zu verzeichnen, nach 320 mJ/cm^2 liegt sie unter 10% . Für die intakten Hautproben spielt die verstrichene Zeit nach UV-Bestrahlung keine entscheidende Rolle. In den geschädigten Proben nimmt die Anzahl an metabolisch aktiven Zellen mit der Zeit zusätzlich ab.

Der deutliche, dosisabhängig irritative Effekt von UV-Strahlung auf das SkinEthic-Modell macht diese somit zu einem geeigneten Reiz. Die Reizdosis ist so zu wählen, dass der ausgelöste Effekt auf zellbiologischer Ebene zwar maximal detektierbar ist, gleichzeitig aber nur eine minimale irreversible Zellschädigung hervorgerufen wird. Demzufolge ist die Dosis von 60 mJ/cm^2 optimal. Auf der einen Seite vermag diese Dosis eine signifikante Steigerung der IL-1a-Sekretion auszulösen. Auf der anderen Seite wird im Vergleich zur unbestrahlten Hautprobe die Anzahl an metabolisch aktiven Zellen nicht beeinflusst und die verursachte Membranschädigung ist gering. Das histologische Präparat bestätigt diesen Befund (vgl. Abb. E.30). Zwischen der unbestrahlten und der mit 60 mJ/cm^2 bestrahlten Probe ist kein wesentlicher Unterschied erkennbar. In beiden Präparaten ist der Rosa / Violett-Farbkontrast ausgeprägt, das Anhaften der Basalschicht am Filter fest sowie die Zell-Zell-Adhäsion kompakt. Alle drei Merkmale sind typisch für intaktes Gewebe.

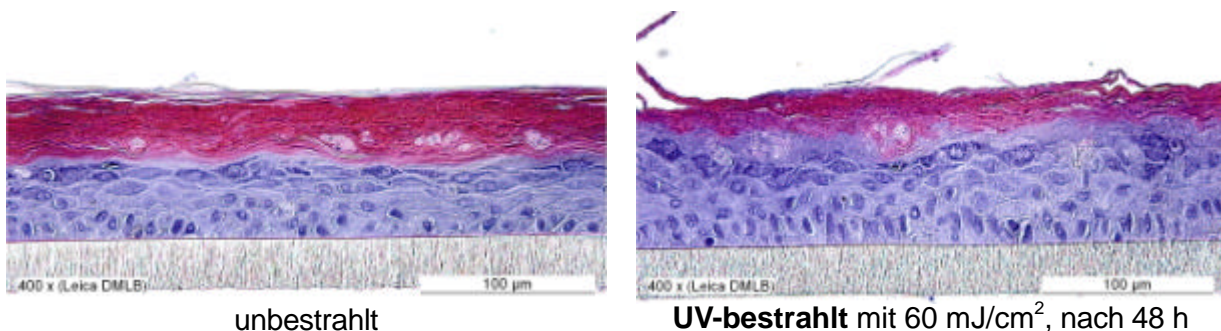
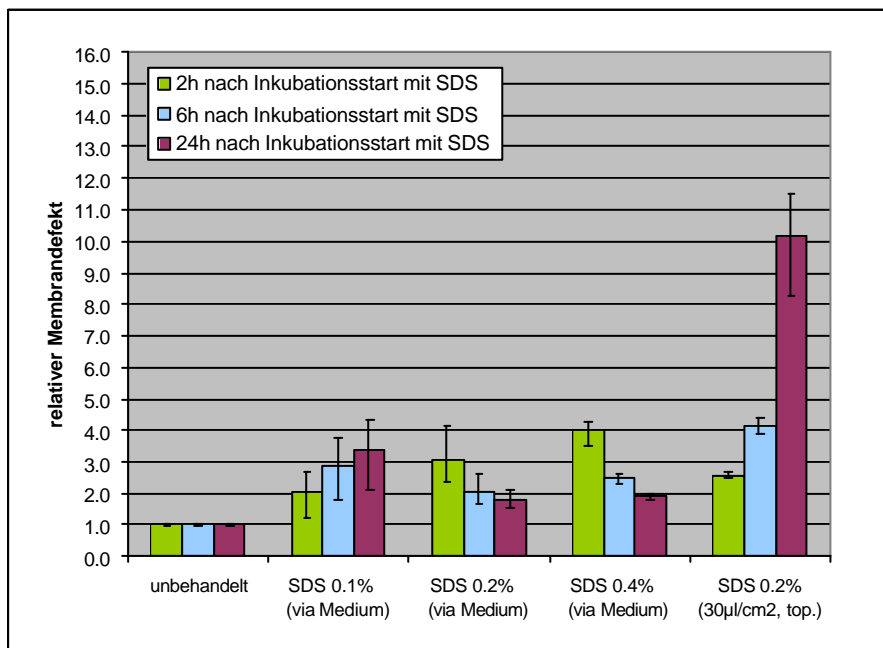
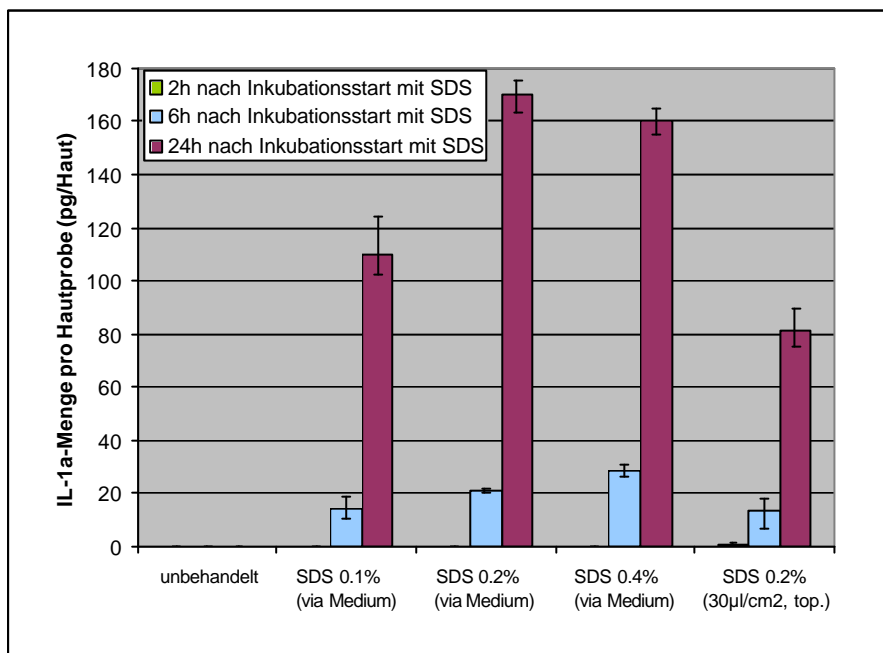


Abb. E.30: Histologische Präparate zum SkinEthic-Modell, Kulturtag 20, Vergrösserung 400-fach, Hämalaun-Eosin-Färbung

E.1.4.2 Hautirritation durch chemische Substanzen (chemischer Reiz)

a) Hautirritation mit SDS

Im Folgenden werden die Ergebnisse zur Hautirritation mit SDS im SkinEthic-Modell gezeigt. Analog zur UV-Strahlung wurden zur Beurteilung des irritativen Effektes die IL-1a-Sekretion in das Nährmedium (ELISA), die Membranintegrität (LDH-Test) sowie der Anzahl an metabolisch aktiven Zellen (MTT-Test) erfasst. SDS wurde einerseits topisch appliziert (0.2 % in PBS, 30 µl/cm²) und andererseits über das Nährmedium „systemisch“ zugeführt (0.1 %, 0.2 %, 0.4 %). Die Inkubation mit SDS erfolgte jeweils während 2 h.



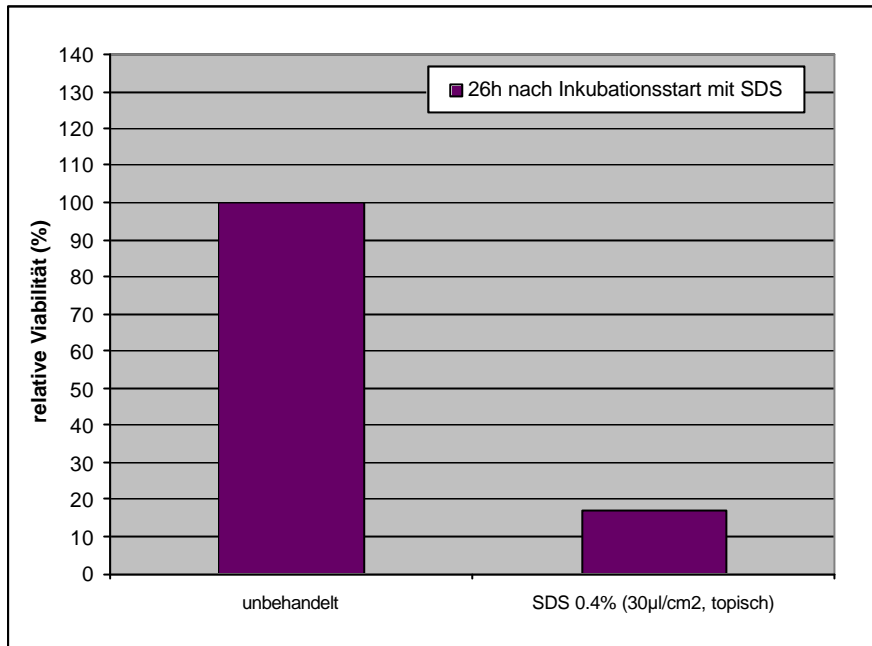


Abb. E.33: **Relative Viabilität** (Anzahl an metabolisch aktiven Zellen im MTT-Test) im SkinEthic-Modell nach topischer Zugabe von **SDS** (0.2 % in PBS, 30 µl/cm²), Inkubationszeit mit SDS 2 h (relativ zur unbestrahlten Hautprobe pro Zeitpunkt) (n = 1)

SDS zeigt auf alle drei Prüfparameter einen deutlichen Effekt. Insbesondere die IL-1a-Sekretion in das Nährmedium ist stark gesteigert. Der Sekretionsvorgang ist dabei zeitabhängig. 2h nach Inkubationsstart mit SDS liegt im Nährmedium grösstenteils noch kein detektierbares IL-1a vor. Nach 6h ist der Effekt erkennbar, nach 24 h ganz deutlich ausgeprägt. Es werden bis zu 170 pg/Haut IL-1a gefunden. Vergleicht man diese Proteinmenge mit dem nach Reizung durch UV-Strahlung ermittelten Wert, so handelt es sich um das rund 30-fache. Die Verdopplung der SDS-Konzentration von 0.1 % auf 0.2 % vermag die ausgeschüttete IL-1a-Menge um den Faktor 1.5 zu erhöhen. Die Anwendung von 0.4 % SDS bewirkt jedoch keine weitere Steigerung.

Der Applikationsmodus für SDS ist entscheidend. Wird SDS topisch zugeführt, ist nach 24-stündiger Inkubation die IL-1a-Sekretion nur knapp halb so gross, wie dies nach Applikation über das Medium („systemisch“) der gleichen Konzentration der Fall ist ($p < 0.00009$; zweiseitig). Die Hautbarriere scheint somit gegen SDS eine gewisse Schutzfunktion auszuüben. Es muss allerdings berücksichtigt werden, dass zwar für beide Applikationsmodi die Kontaktfläche zwischen SDS und Haut identisch ist, doch aufgrund von praktischen Gegebenheiten die topisch zugeführte SDS-Menge rund 60-mal kleiner gewählt werden musste (Applikationsvolumen).

SDS wirkt schädigend auf die Plasmamembran des SkinEthic-Modells (LDH-Test). Der Effekt ist nicht dosisabhängig, wird aber vom Applikationsmodus beeinflusst. Nach Zugabe über das Medium („systemisch“) steigt der relative Membrandefekt auf maximal das 4-fache gegenüber der unbehandelten Hautprobe an. Die Inkubationszeit spielt dabei keine eindeutige Rolle. Wird SDS topisch appliziert, ist der schädigende Effekt einerseits grösser und andererseits mit laufender Inkubationszeit zunehmend. Im Vergleich zu UV-Strahlung schädigt SDS in den applizierten Dosen die Plasmamembran im SkinEthic-Modell weniger ausgeprägt.

Alle Proben, welche nach SDS-Zugabe zum Medium 2h nach Inkubationsstart gezogen worden sind, zeigen im LDH-Test eine Trübung. Aufgrund des Versuchsdesigns ist in diesen Proben SDS enthalten. Diese Beobachtung deutet auf eine Interaktion zwischen SDS und dem LDH-Test hin.

Die Anzahl an metabolisch aktiven Zellen im SkinEthic-Modell sinkt 26 h nach topischer Applikation von SDS (0.4 % in PBS, 30 $\mu\text{l}/\text{cm}^2$) auf rund 17 % der unbehandelten Kontrollprobe ab (MTT-Test). Die Wirkung von SDS ist somit destruktiv.

Der histologische Vergleich der unbehandelten mit der behandelten Hautprobe (SDS 0.4 %, topisch) bestätigt den Befund aus dem MTT-Test. Die behandelte Haut weist mehrere Merkmale auf, die für Gewebeschädigung und einen inflammatorischen Zustand typisch sind: abgeschwächter Rosa/Violett-Farbkontrast, Ablösen des Gewebes vom Filtermaterial, aufgelockerte Zell-Zell-Adhäsion sowie ein gequollenes Stratum corneum.

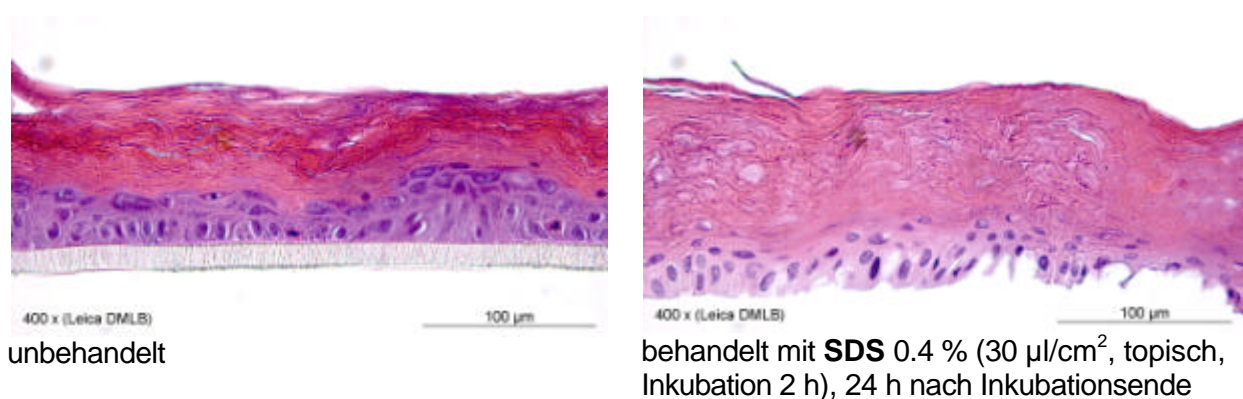


Abb. E.34: Histologische Präparate zum SkinEthic-Modell, Kulturtag 19, Vergrößerung 400-fach, Hämalaun-Eosin-Färbung

In der Literatur ist SDS als starkes chemisches Irritans beschrieben, welches aufgrund seiner tensidischen Struktur Zellmembranen direkt zu lysieren vermag. Die lysierten Zellen setzen Zytokine frei (z.B. IL-1a), wodurch die Reaktionskaskade der Entzündungsreaktion in Gang gesetzt wird (Lee und Maibach 1995; Tupker et al. 1997) (vgl. auch C.1.3.2.1). Je nach Zugabemodus können entsprechende Effekte ab einer SDS-Dosierung von 0.2 % beobachtet werden. Die oben gezeigte deutliche Wirkung von SDS auf die IL-1a-Sekretion bestätigt diese Angaben. Der MTT-Test und die Histologie indizieren gleichzeitig einen stark gewebeschädigenden Effekt. Der vor diesem Hintergrund vergleichsweise moderate relative Membrandefekt könnte ein Artefakt sein, der auf eine Interaktion zwischen SDS und LDH-Test zurückzuführen ist (siehe oben).

Die Literatur beschreibt auch die schädigende Wirkung von SDS auf die Hautbarriere (Widmer et al. 1994). Da die vorliegende Arbeit die Wirkung einer an die Reizung anschließenden antiinflammatorischen Behandlung sowie die Hautpenetration des entsprechenden Wirkstoffes mit einschließt, sollte die Barrierefunktion im irritierten Hautmodell jedoch möglichst unangetastet bleiben.

Insgesamt wirkt SDS somit recht aggressiv, wobei die Erhöhung der IL-1a-Sekretion in erster Linie auf Membranlyse zu beruhen scheint. Dies ist im Rahmen der vorliegenden Arbeit aber nicht erwünscht und SDS wird als Irritans nicht weiter eingesetzt.

b) Hautirritation mit TBT

Als zweites chemisches Irritans wurde TBT am SkinEthic-Modell überprüft. Neben der Wirkung auf die IL-1 α -Ausschüttung in das Nährmedium und der Membranintegrität (LDH-Test) erschien aufgrund von Literaturangaben im Zusammenhang mit TBT auch die Beeinflussung der TNF- α -Sekretion von Interesse (Corsini et al. 1997b). Zur Applikation wurde TBT in den Dosierungen 134 mM, 268 mM und 536 mM im Nährmedium gelöst. Die Inkubation mit TBT erfolgte jeweils während 2 h.

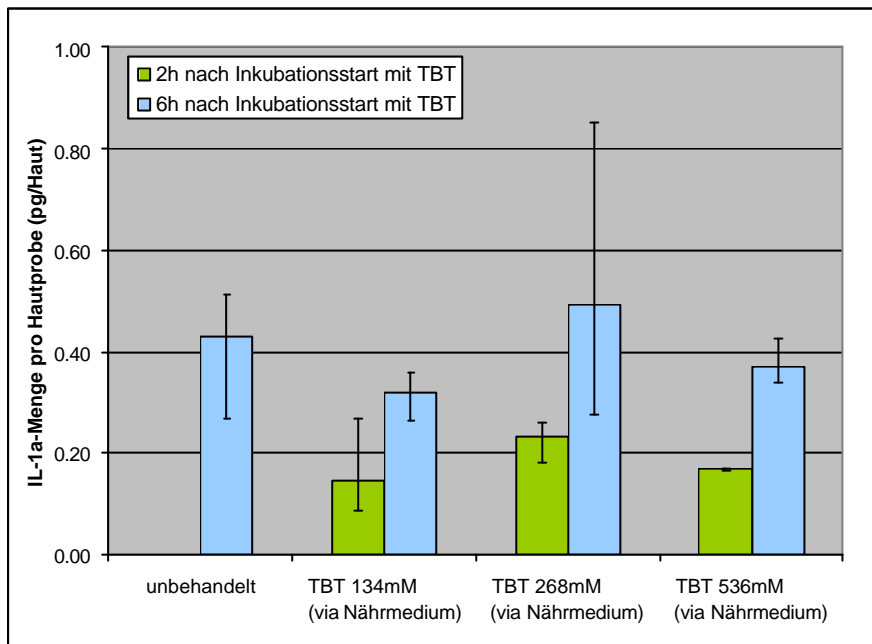


Abb. E.35: **IL-1 α -Proteinmenge** im Nährmedium des SkinEthic-Modells nach Zugabe von **TBT** zum Nährmedium (134 mM, 268 mM, 536 mM), Inkubationszeit mit TBT 2 h, (n = 3, Mittelwert, Angabe der Spannweite)

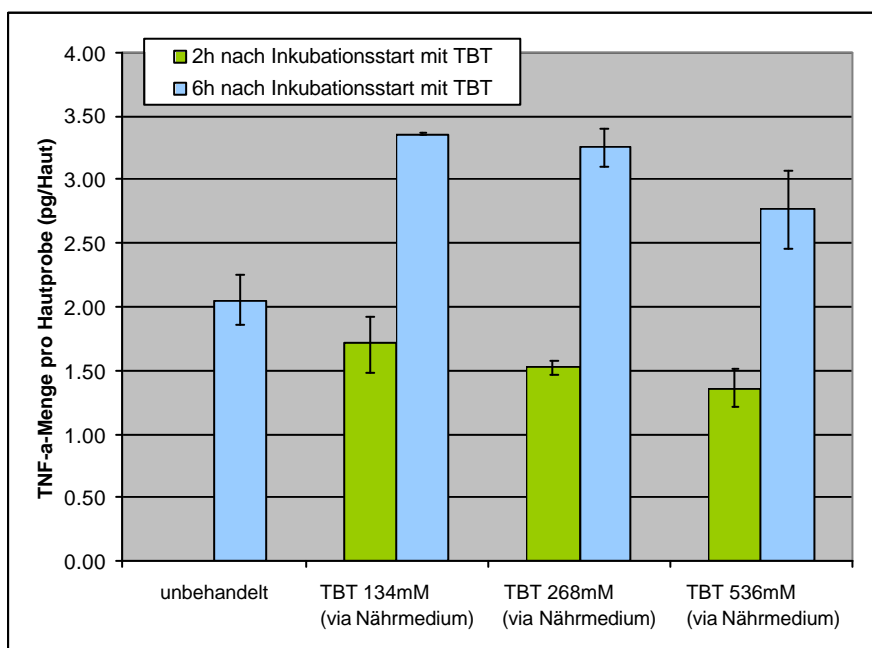


Abb. E.36: **TNF- α -Proteinmenge** im Nährmedium des SkinEthic-Modells nach Zugabe von **TBT** zum Nährmedium (134 mM, 268 mM, 536 mM), Inkubationszeit mit TBT 2 h, (nach 2 h n = 3, nach 6 h n = 2, Mittelwert, Angabe der Spannweite)

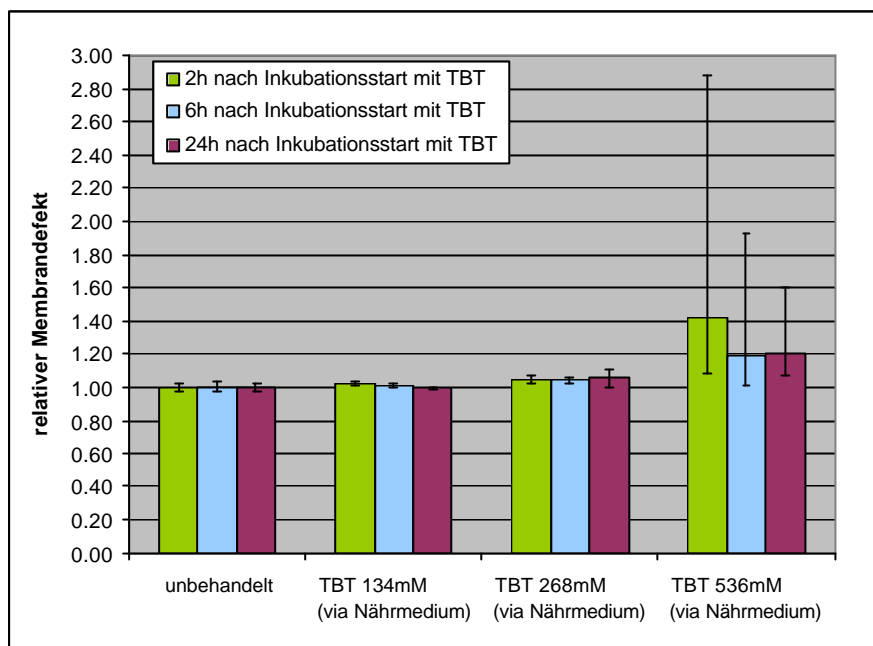


Abb. E.37: **Relativer Membrandefekt** (LDH-Test) im SkinEthic-Modell nach Zugabe von **TBT** zum Nährmedium (134 mM, 268 mM, 536 mM), Inkubationszeit mit TBT 2 h (relativ zur unbehandelten Hautprobe pro Zeitpunkt) (n = 3, Mittelwert, Angabe der Spannweite)

TBT bewirkt unter den gewählten Versuchsbedingungen keine Erhöhung der IL-1a-Sekretion. Auch die Membranintegrität wird nicht wesentlich beeinflusst. Einzig die im Nährmedium gefundene TNF-a-Proteinmenge erscheint unter TBT-Einfluss 6 h nach Inkubationsstart etwas erhöht. Die geringen TNF-a-Mengen stellen die Reproduzierbarkeit der Messresultate jedoch in Frage.

Der irritative Effekt von TBT auf das SkinEthic-Modell ist zu wenig ausgeprägt und als Irritant im Rahmen der vorliegenden Arbeit somit nicht geeignet.

Fazit

Der externe Reiz soll die infolge einer irritativen Noxe physiologischerweise ablaufenden Mediator-Kaskaden auslösen (vgl. C.1.3). Die Reizdosis ist dabei so zu wählen, dass der induzierte Effekt auf zellbiologischer Ebene zwar maximal detektierbar ist, gleichzeitig aber nur eine minimale irreversible Zellschädigung verursacht wird.

Diese Bedingungen werden am SkinEthic-Modell durch die Irritation mit UV-Strahlung am besten erfüllt. Einerseits vermag die UV-Dosis von 60 mJ/cm² eine signifikante Steigerung der IL-1a-Sekretion auszulösen, welche nicht ausschliesslich auf einen Membrandefekt zurückzuführen ist und somit einen aussagekräftigen Parameter für den Reizzustand darstellt. Andererseits wird unter den gleichen Bedingungen im Vergleich zur unbestrahlten Hautprobe die Anzahl der metabolisch aktiven Zellen nicht beeinflusst, die verursachte Membranschädigung ist gering und histologisch erscheint das Gewebe intakt. Die UV-Bestrahlung mit 60 mJ/cm² ist somit für das SkinEthic-Modell ein geeigneter externer Reiz und wird im Rahmen der vorliegenden Arbeit ausgewählt.

Die Reizung des SkinEthic-Modells mit den chemischen Irritantien SDS und TBT ergibt hingegen kein befriedigendes Resultat: Erstens, die Wirkung von SDS ist zu destruktiv. Der MTT-Test und die Histologie indizieren einen stark gewebeschädigenden Effekt. Die Erhöhung der IL-1a-Sekretion ist zwar ausgeprägt, doch vermutlich vor allem auf Membranlyse zurückzuführen. Der vergleichsweise moderate relative Membrandefekt könnte auf einen Artefakt infolge der Interaktion zwischen SDS und LDH-Test zurückzuführen sein.

Zweitens, der irritative Effekt von TBT auf das SkinEthic-Modell ist zu wenig ausgeprägt. Die chemischen Irritantien SDS und TBT sind somit für das SkinEthic-Modell keine geeigneten externen Reize und werden im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht weiter eingesetzt.

E.1.5 Festlegung der Methode zur Erfassung der Hautpenetration / -permeation von BV-17

Prüfung

Die folgende Graphik visualisiert das Penetrations- / Permeationsprofil von BV-17 durch das SkinEthic-Modell nach dessen Bestrahlung mit UV-Licht in der Dosis 60 mJ/cm^2 . Als Akzeptor diente das Nährmedium (1 ml pro Hautprobe). BV-17 wurde in der Dosierung $2 \times 10^{-5} \text{ M}$ in Ethanol 40 % - Wasser 60 % (V/V) gelöst und zu $500 \text{ } \mu\text{l/cm}^2$ auf die Haut aufgetragen, was einer total applizierten BV-17-Menge von $2.39 \text{ } \mu\text{g/Hautprobe}$ entspricht. Der Probenzug erfolgte beim Start sowie nach 2 h, 4 h, 6 h, 8 h, 14 h, 16 h, 18 h, 20 h, 22 h und 24 h Inkubation.

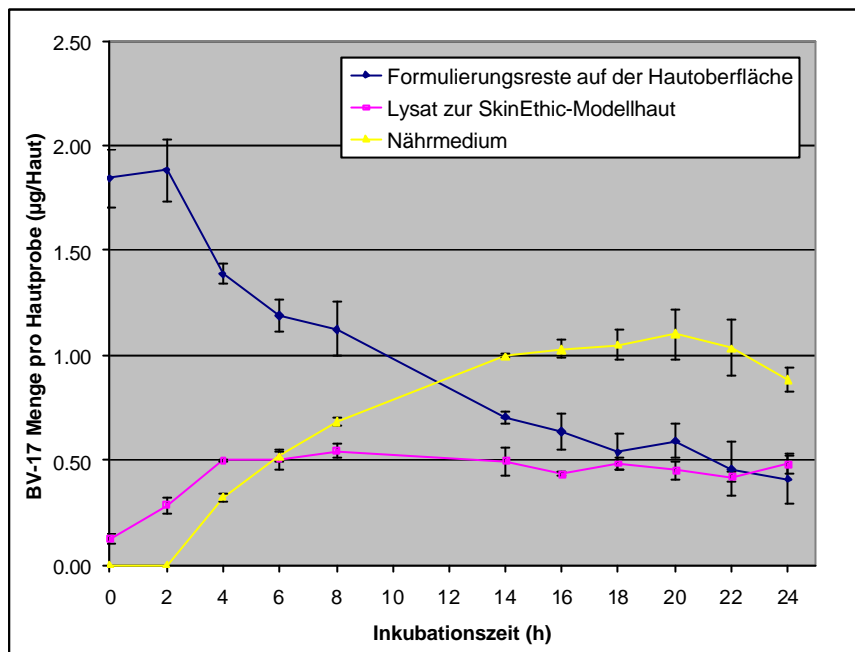


Abb. E.38: **Penetrations- / Permeationsprofil von BV-17** durch das SkinEthic-Modell nach dessen UV-Bestrahlung mit 60 mJ/cm^2 ; Akzeptor 1 ml (Nährmedium); Applikation von BV-17 zu $2 \times 10^{-5} \text{ M}$ gelöst in Ethanol 40 % - Wasser 60 % (V/V) (Applikationsvolumen $500 \text{ } \mu\text{l/cm}^2$); BV-17-Gehalt ($\mu\text{g/Hautprobe}$) im Lysat zur Modellhaut, im Nährmedium und in den auf der Hautoberfläche verbleibenden Formulieringsresten; Probenzug am Start sowie nach 2 h, 4 h, 6 h, 8 h, 14 h, 16 h, 18 h, 20 h, 22 h und 24 h Inkubation ($n = 3$, Mittelwert \pm absolute Standardabweichung)

BV-17 permeiert unter den gewählten Versuchsbedingungen sehr gut durch das SkinEthic-Modell. Nach spätestens 16 h Inkubation hat sich ein Equilibrium eingestellt, wobei rund 50 % der total applizierten Wirkstoffmenge vollständig permeiert im Nährmedium vorliegen. Der restliche Wirkstoff befindet sich zu ca. 20 % in der Haut selbst respektive verbleibt zu ca. 30 % in den Formulieringsresten auf der Hautoberfläche. Die Wiederfindung von BV-17 liegt bei rund 90 %. Ab 20 h Inkubation ist jedoch ein Rückgang der gesamthaft gefundenen Wirkstoffmenge zu verzeichnen. Dies dürfte mit der bereits beschriebenen Umlagerung von BV-17 zu BV-21 zusammenhängen (vgl. C.3.6, D.3.1.1 sowie im Anhang H.6.1). Die Reproduzierbarkeit dieser Aussagen hat sich in mehreren Versuchen bestätigt.

Fazit

Voraussetzung für einen Effekt ist die Präsenz des Wirkstoffes am Wirkort. Das Penetrations- / Permeationsprofil zeigt, dass BV-17 in quantifizierbarer Menge in das SkinEthic-Modell eindringt.

Die angewandte Methode zur Probenaufbereitung und quantitativen Analytik ist geeignet und wird für weitere Untersuchungen im Rahmen der vorliegenden Arbeit eingesetzt.

E.1.6 Festlegung der antiinflammatorischen Behandlungsmethode mit BV-17

Aufgrund der in den Kapiteln E.1.1 bis E.1.5 beschriebenen Ergebnisse wurden die Versuchsbedingungen zur Erfassung der Wirkung von Glucocorticoiden im SkinEthic-Modell wie folgt festgelegt:

Tab. E.1: Erarbeitete Versuchsbedingungen zur Erfassung der Wirkung von Glucocorticoiden im SkinEthic-Modell (inkl. Verweise auf die entsprechenden Kapitel)

Design		
Anzahl Proben	im Triplikat	
Kontrollen	1) unbestrahlt / unbehandelt 2) bestrahlt / unbehandelt 3) bestrahlt / vehikelkontrolliert	
Versuchstag		
Wechsel auf Maintenance Medium	Kulturtag 17	E.1.1.1
Versuchsstart	Kulturtag 18	
Externer Reiz		
Art	UV-Strahlung	E.1.4.1
Dosierung (mJ/cm ²)	60	
antiinflammatorische Behandlung		
Wirkstoff	BV-17	D.3.1.1, D.3.2, E.1.2.2
Dosierung (M)	Lösung: 2×10^{-5} , 2×10^{-4} Emulsion: 2×10^{-3} , 2×10^{-2}	
Vehikel	Lösung, Emulsion	D.3.1.2, H.6.2, H.6.3
Applikationsvolumen (µl/cm ²)	500	D.3.3
Applikationszeitpunkt	sofort nach Irritation	
Inkubationszeit (h)	8, 24	D.3.4, E.1.2.2, E.1.4.1, E.1.5
Erfassung der Hautirritation und der Wirkung der antiinflammatorischen Behandlung		
Proteinexpression	Methode	ELISA im Medium
	zellbiologischer Marker	IL-1a
Zellviabilität	LDH, MTT, Histologie	
Penetration / Permeation		
	wird erfasst	E.1.5

Die resultierenden Ergebnisse sind in Kapitel E.2.2 aufgeführt und werden im Vergleich zu den zwei Hautmodellen Phenion FT und Natskin diskutiert.

E.2 Erfassung der Reaktion auf externe Reize und der Wirkung einer antiinflammatorischen Behandlung mit BV-17 anhand des erarbeiteten Versuchsdesigns in drei verschiedenen in vitro- / ex vivo-Hautmodellen

E.2.1 Reaktion auf einen externen Reiz von drei in vitro- / ex vivo-Hautmodellen

Im Folgenden wird der Effekt von UV-Strahlung auf drei unterschiedlich aufgebaute in vitro- / ex vivo-Hautmodelle verglichen. Der Vergleich wird in erster Linie anhand der IL-1a-Sekretion in das Nährmedium vorgenommen. Dieser Parameter hat sich im Rahmen der Abklärungen zum SkinEthic-Modell für die Erfassung von irritativen Zuständen in der Haut als am besten geeignet erwiesen. Zusätzlich wird die Viabilität der drei Hautmodelle anhand des LDH- und MTT-Tests beurteilt, und der generelle Zustand des Gewebes wird mit Hilfe von histologischen Präparaten verglichen (Hämalaun-Eosin- und CPD-Färbung). Wo sinnvoll, sind auch die Ergebnisse zur IL-1a-Menge im Hautlysat sowie zu IL-8 und IL-6 (Sekretion und im Hautlysat) aufgeführt und diskutiert.

Es wird vermutet, dass sich das ex vivo-Hautmodell Natskin gegenüber UV-Strahlung robuster verhält, als die beiden in vitro-Modelle SkinEthic und Phenion FT. Mit dem Ziel, in allen drei Hautmodellen eine deutlich erkennbare Reaktion auf die UV-Bestrahlung auszulösen, wird somit die Dosis für das Natskin-Modell bis auf 500 mJ/cm² erhöht.

Im SkinEthic-Modell hat sich gezeigt, dass der Faktor Zeit für die Erfassung von zellbiologischen Effekten eine Rolle spielt. Aus diesem Grund werden alle Prüfungen zu mindestens zwei Zeitpunkten durchgeführt.

E.2.1.1 IL-1a-Sekretion und Menge im Gewebe

a) IL-1a-Sekretion (Nährmedium)

Die ermittelte IL-1a-Proteinmenge im Nährmedium zu den drei in vitro- / ex vivo-Hautmodellen wird in den folgenden Graphiken als relative Menge gegenüber der unbestrahlten Hautprobe (pro Zeitpunkt) dargestellt. Dies ermöglicht einen direkten Vergleich der Reaktion auf die UV-Bestrahlung (zu den absoluten Mengen siehe Anhang H.5.1).

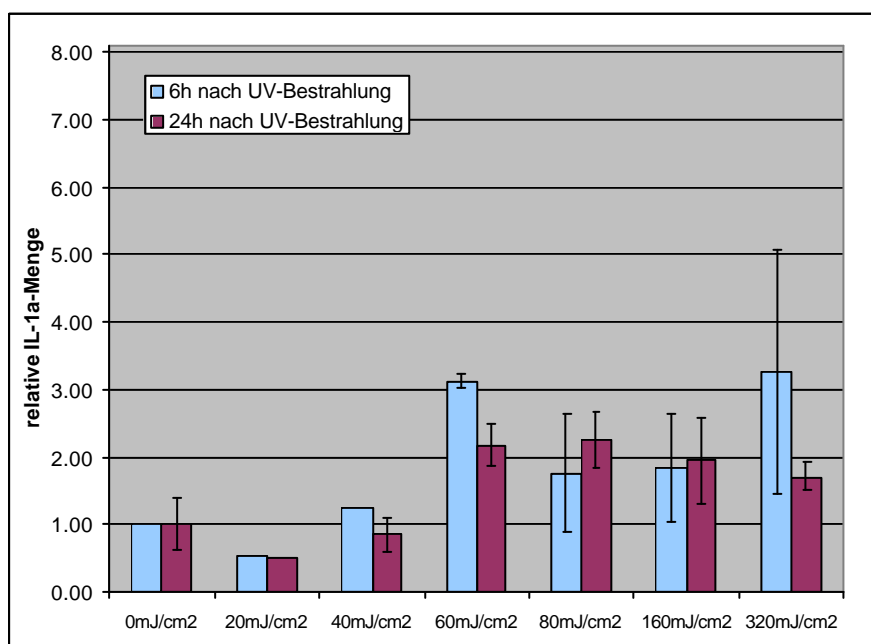


Abb. E.39: Relative IL-1a-Proteinmenge im Nährmedium des **SkinEthic-Modells** nach UV-Bestrahlung in den Dosierungen 20, 40, 60, 80, 160 und 320 mJ/cm², nach 6 h und 24 h Inkubation (relativ zur unbestrahlten Hautprobe pro Zeitpunkt) (nach 6 h n = 3, nach 24 h n = 4, Mittelwert ± absolute Standardabweichung)

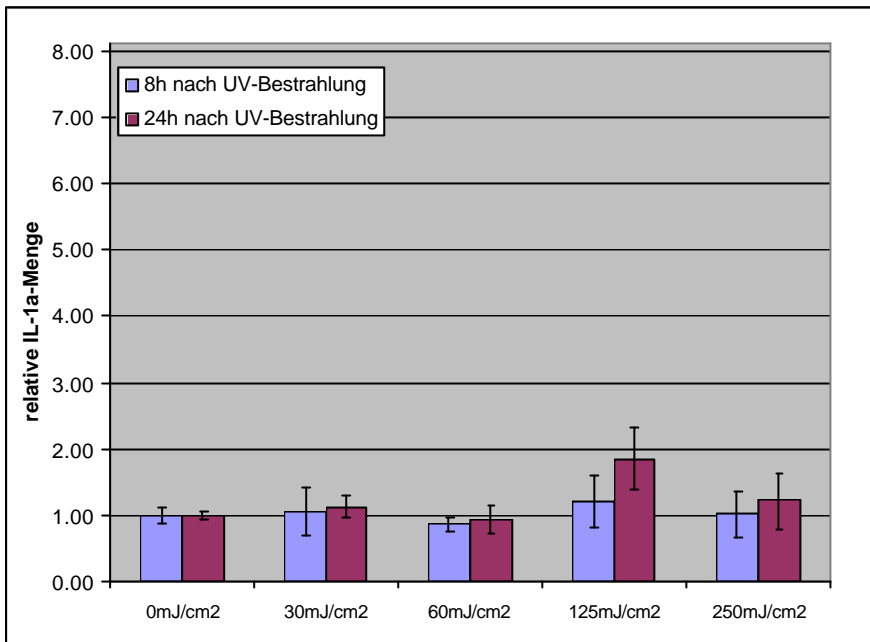


Abb. E.40: Relative IL-1a-Proteinmenge im Nährmedium des **Phenion FT-Modells** nach UV-Bestrahlung in den Dosierungen 30, 60, 125 und 250 mJ/cm², nach 8 h und 24 h Inkubation (relativ zur unbestrahlten Hautprobe pro Zeitpunkt) (n = 3, Mittelwert ± absolute Standardabweichung)

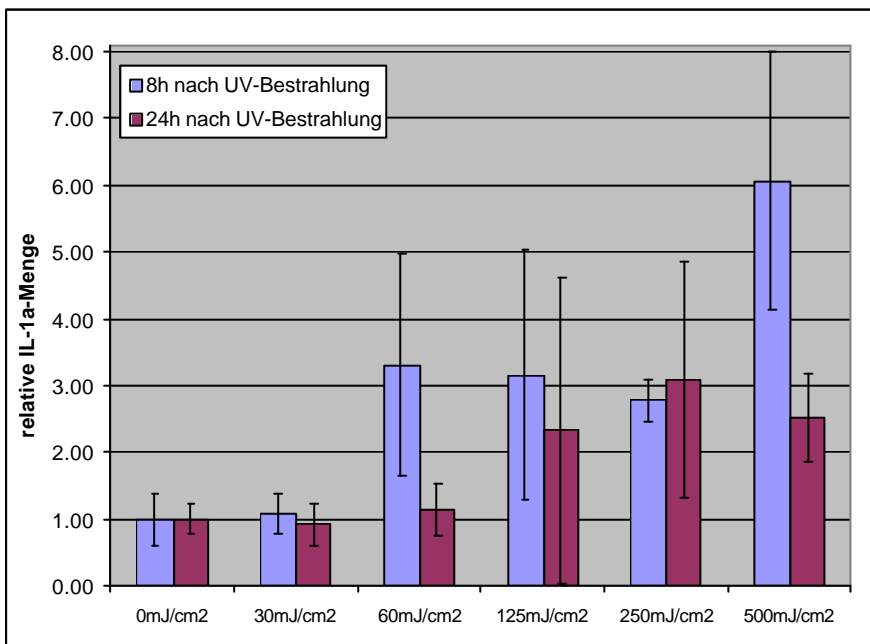


Abb. E.41: Relative IL-1a-Proteinmenge im Nährmedium des **Natskin-Modells** nach UV-Bestrahlung in den Dosierungen 30, 60, 125, 250 und 500 mJ/cm², nach 8 h und 24 h Inkubation (relativ zur unbestrahlten Hautprobe pro Zeitpunkt) (n = 3, Mittelwert ± absolute Standardabweichung)

Der Parameter IL-1a-Sekretion indiziert eine unterschiedliche Reaktion der drei Hautmodelle auf UV-Bestrahlung. Dabei variieren die Ansprechbarkeit auf die UV-Dosis, das Ausmass und die Geschwindigkeit der Reaktion sowie die absolute IL-1a-Sekretionsleistung.

Gegenüber den beiden anderen Hautmodellen zeigt das Natskin-Modell die ausgeprägteste Reaktion. Bereits 8 h nach Bestrahlung ist eine relativ zur unbestrahlten Hautprobe erhöhte IL-1a-Sekretion vorhanden. Der Effekt ist ab einer UV-Dosis von 60 mJ/cm² statistisch signifikant ($p < 0.081$; zweiseitig). Bis 24 h ist keine weitere Zunahme zu verzeichnen. Die Inkubationszeit von 8 h reicht somit zur Manifestierung der erhöhten IL-1a-Sekretion aus.

Auch das SkinEthic-Modell reagiert auf die UV-Strahlung mit einer deutlichen Steigerung der IL-1a-Sekretion (siehe auch E.1.4.1). Analog zum Natskin-Modell tritt der Effekt ab einer UV-Dosis von 60 mJ/cm² ein. 6h nach Bestrahlung ist der Effekt erkennbar, die statistische Signifikanz lässt sich aufgrund der vorliegenden Daten jedoch erst nach 24-stündiger Inkubation zeigen ($p < 0.003$; zweiseitig).

Das Phenion FT-Modell hingegen zeigt nach UV-Bestrahlung im gewählten Dosisbereich keine Zunahme der IL-1a-Sekretion. Der leicht erhöhte Wert nach Applikation von 125 mJ/cm^2 scheint eher eine Ausnahme zu sein.

Für die Auslösung der IL-1a-Sekretionsteigerung ist im SkinEthic- und im Natskin-Modell die gleiche UV-Dosis (60 mJ/cm^2) erforderlich.

Nach Applikation dieser Dosis befindet man sich bereits im Plateau-Bereich. Die weitere Steigerung der UV-Dosis führt zu keiner zusätzlichen Erhöhung, sondern tendenziell eher zu einer Reduktion der ausgeschütteten IL-1a-Menge. Für die Induktion eines statistisch signifikanten Effektes genügt somit eine moderate UV-Dosis. Es ist denkbar, dass die durch hohe UV-Dosen verursachte Gewebeschädigung so stark ausgeprägt ist, dass eine physiologische, im Verhältnis zum Reiz adäquate Reaktion nicht mehr möglich ist. IL-1a wird durch UV-Strahlung abgebaut. Die Bestrahlung einer IL-1a-Standardlösung mit 60 mJ/cm^2 reduzierte deren Gehalt um rund 25 % (Daten nicht gezeigt). Die UV-Strahlung beeinflusst somit möglicherweise die IL-1a-Menge im Gewebe. Da aber aus dem grossen Gewebespeicher nur eine vergleichsweise geringe Menge sezerniert wird, und nach Bestrahlung ein Mediumwechsel erfolgt, ist diese Beobachtung für die in das Nährmedium ausgeschüttete IL-1a-Menge nicht relevant.

Besonders deutlich unterscheiden sich die drei Hautmodelle in ihrer absoluten IL-1a-Sekretionsleistung. In Tabelle E.2 sind exemplarisch die Ergebnisse zur jeweils unbestrahlten Hautprobe gezeigt (absolute IL-1a-Mengen pro Stück Hautprobe sowie in Bezug auf deren Gewicht und Oberfläche). Die Datenlage zu den bestrahlten Proben wird dadurch gut repräsentiert.

Tab. E.2: IL-1a-Proteinmenge im Nährmedium der unbestrahlten Hautproben zu den drei in vitro- / ex vivo-Hautmodellen SkinEthic, Phenion FT und Natskin (24 h Inkubation) ($n = 3$, für SkinEthic nach 24 h $n = 4$, Mittelwert \pm absolute Standardabweichung)

	Masse Durchschnitt (g)	Oberfläche (cm^2)	IL-1a- Menge pro Stück (pg/Haut)	IL-1a- Menge pro Masse (pg/g)	IL-1a- Menge pro Oberfläche (pg/ cm^2)
SkinEthic	0.006	0.500	2.7 ± 0.32	383.4 ± 141.98	4.6 ± 1.71
Phenion FT	0.255	1.327	43.3 ± 2.84	169.8 ± 11.14	32.6 ± 2.14
Natskin (kleines Format)	0.258	0.785	9.5 ± 2.13	37.0 ± 8.27	12.1 ± 2.71

Pro Hautprobe sezerniert das SkinEthic-Modell im Vergleich zum Phenion FT-Modell wenig IL-1a. Wird jedoch die pro Gramm Hautmasse berechnete Menge betrachtet, schüttet das SkinEthic-Modell mehr als das Doppelte an IL-1a in das Nährmedium aus. Das SkinEthic-Modell besteht ausschliesslich aus Keratinocyten. Das Phenion FT-Modell verfügt zusätzlich über eine Dermis mit Fibroblasten. Das vorliegende Ergebnis zeigt somit, dass hauptsächlich die Keratinocyten für die IL-1a-Sekretion verantwortlich sind. Auch die Keratinozyten-Fibroblasten-Interaktion, welche im Phenion FT-Vollhautmodell zum Tragen kommt, könnte die IL-1a-Menge reduzieren. In der Literatur wird beschrieben, dass IL-1a rezeptorvermittelt in die Fibroblasten aufgenommen und anschliessend abgebaut werden kann (Boxman et al. 1996).

Die pro Gramm Hautmasse berechnete IL-1a-Ausschüttung aus dem Natskin-Modell ist im Vergleich zu den beiden anderen Modellen auffallend gering. Als dickstes der drei Modelle verfügt Natskin über eine ausgeprägte Dermis sowie teilweise noch über eine anhaftende Subkutis. Der Weg für IL-1a bis zum Nährmedium ist somit lang und könnte möglicherweise für die geringe detektierte IL-1a-Sekretion verantwortlich sein. Währenddessen im SkinEthic-Modell steht die Epidermis in direktem Kontakt (via Polycarbonatmembran) mit dem Nährmedium.

b) IL-1a-Menge im Gewebe

In den folgenden Graphiken ist die relative IL-1a-Proteinmenge im Gewebe des Phenion FT- und des Natskin-Modells nach UV-Bestrahlung abgebildet (zu den absoluten Mengen siehe Anhang H.5.2). Auf die Darstellung der entsprechenden Ergebnisse zum SkinEthic-Modell wird verzichtet, da bereits zu einem früheren Zeitpunkt gezeigt werden konnte, dass UV-Strahlung die IL-1a-Proteinmenge im SkinEthic-Gewebe nicht beeinflusst (vgl. E.1.2.2).

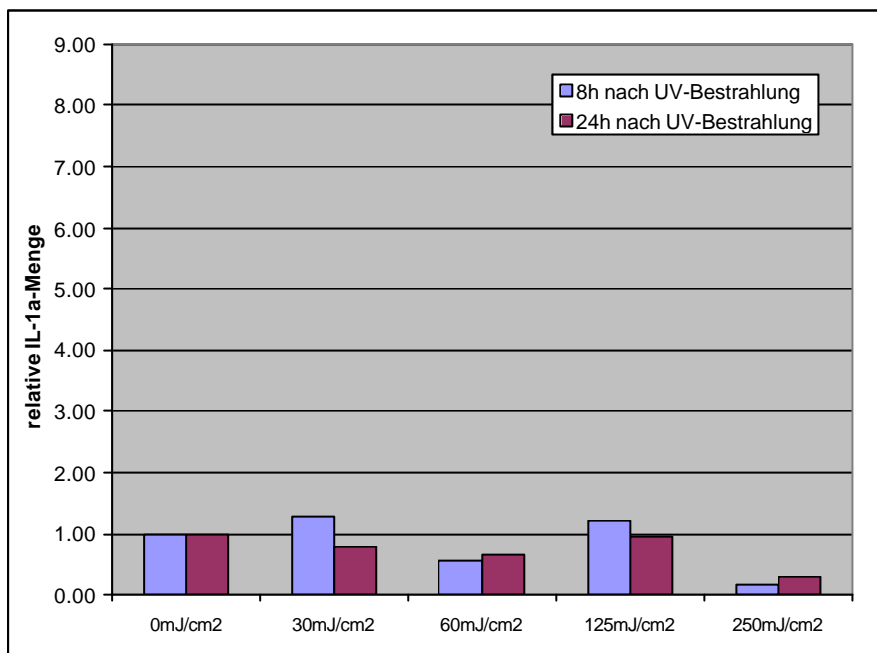


Abb. E.42: Relative IL-1a-Proteinmenge im Gewebe des **Phenion FT-Modells** nach UV-Bestrahlung in den Dosierungen 30, 60, 125 und 250 mJ/cm², nach 8 h und 24 h Inkubation (relativ zur unbestrahlten Hautprobe pro Zeitpunkt) (n = 1)

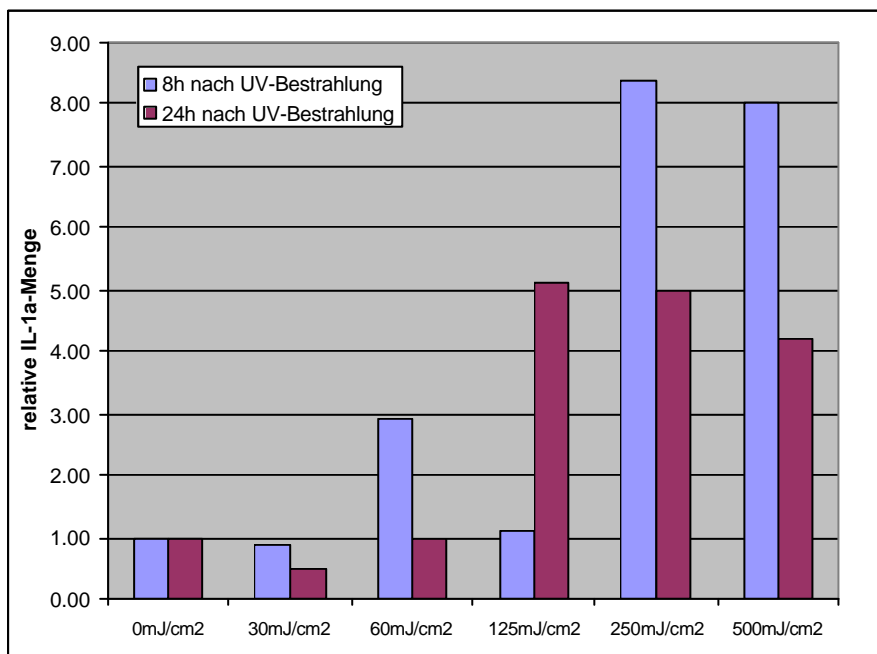


Abb. E.43: Relative IL-1a-Proteinmenge im Gewebe des **Natskin-Modells** nach UV-Bestrahlung in den Dosierungen 30, 60, 125, 250 und 500 mJ/cm², nach 8 h und 24 h Inkubation (relativ zur unbestrahlten Hautprobe pro Zeitpunkt) (n = 1)

Im Gewebe zum Phenion FT-Modell ist kein Einfluss der UV-Strahlung auf die IL-1a-Menge detektierbar. Die IL-1a-Menge im Gewebe des Natskin-Modells steigt hingegen mit zunehmender UV-Dosis an. Die zu beiden Modellen ermittelten Ergebnisse bestätigen weitgehend die bereits anhand der IL-1a-Sekretion gemachten Beobachtungen.

Tabelle E.3 zeigt für das SkinEthic-, das Phenion FT- und das Natskin-Modell die im Gewebe ermittelten absoluten IL-1a-Mengen zur jeweils unbestrahlten Hautprobe (absolute IL-1a-Mengen pro Stück Hautprobe sowie in Bezug auf deren Gewicht und Oberfläche).

Tab. E.3: Absolute IL-1a-Proteinmenge im Gewebe der unbestrahlten Hautprobe zum SkinEthic-, Phenion FT- und Natskin-Modell (24 h Inkubation) (n = 1)

	Masse Durchschnitt (g)	Oberfläche (cm ²)	IL-1a-Menge pro Stück (pg/Haut)	IL-1a-Menge pro Masse (pg/g)	IL-1a-Menge pro Oberfläche (pg/cm ²)
SkinEthic	0.006	0.500	1926.5	321077.4	3852.9
Phenion FT	0.255	1.327	1225.7	3576.6	923.7
Natskin (kleines Format)	0.258	0.785	2032.1	7888.8	2587.4

Die absolut im Gewebe vorhandene IL-a-Menge ist von Modell zu Modell verschieden. Berechnet pro Gramm Hautmasse enthält das SkinEthic-Modell gegenüber den beiden anderen Modellen deutlich am meisten IL-1a. Dieser Befund bestätigt die primäre Lokalisierung von IL-1a in den Keratinocyten.

E.2.1.2 IL-8-Sekretion und Menge im Gewebe

Die folgenden Graphiken zeigen die relative IL-8-Menge im Gewebe sowie die relative IL-8-Sekretion im Phenion FT- und im Natskin-Modell nach UV-Bestrahlung in verschiedenen Dosierungen (zu den absoluten Mengen siehe Anhang H.5.3 und H.5.4). Da sich IL-8 im Rahmen der Evaluierung der zellbiologischen Marker zur Erfassung der Reizwirkung im SkinEthic-Modell nicht als geeignet erwiesen hat, wird im Folgenden auf die Darstellung der entsprechenden Daten verzichtet (vgl. E.1.2.2).

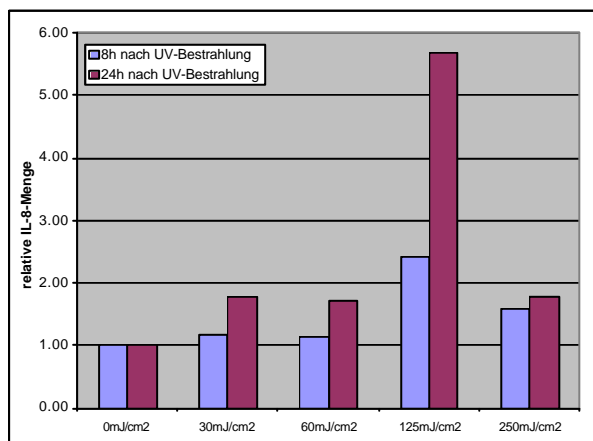


Abb. E.44: Relative IL-8-Proteinmenge im Gewebe des **Phenion FT-Modells** nach UV-Bestrahlung in den Dosierungen 30, 60, 125 und 250 mJ/cm², nach 8 h und 24 h Inkubation (relativ zur unbestrahlten Hautprobe pro Zeitpunkt) (n = 1)

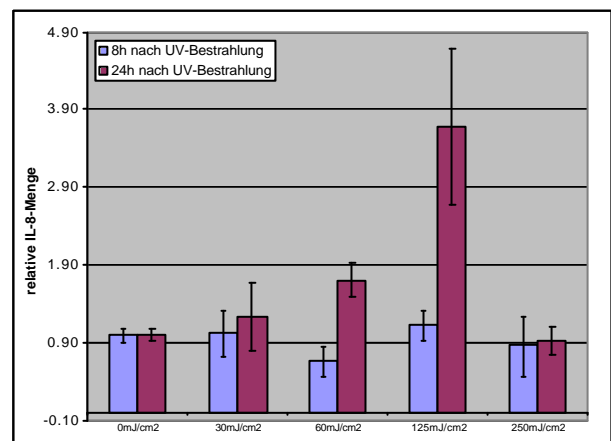


Abb. E.45: Relative IL-8-Proteinmenge im Nährmedium des **Phenion FT-Modells** nach UV-Bestrahlung in den Dosierungen 30, 60, 125 und 250 mJ/cm², nach 8 h und 24 h Inkubation (relativ zur unbestrahlten Hautprobe pro Zeitpunkt) (n = 3, Mittelwert ± absolute Standardabweichung)

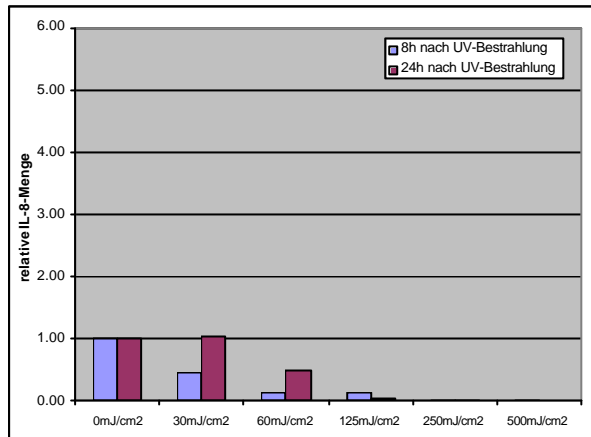


Abb. E.46: Relative IL-8-Proteinmenge im Gewebe des **Natskin-Modells** nach UV-Bestrahlung in den Dosierungen 30, 60, 125, 250 und 500 mJ/cm², nach 8 h und 24 h Inkubation (relativ zur unbestrahlten Hautprobe pro Zeitpunkt) (n = 1)

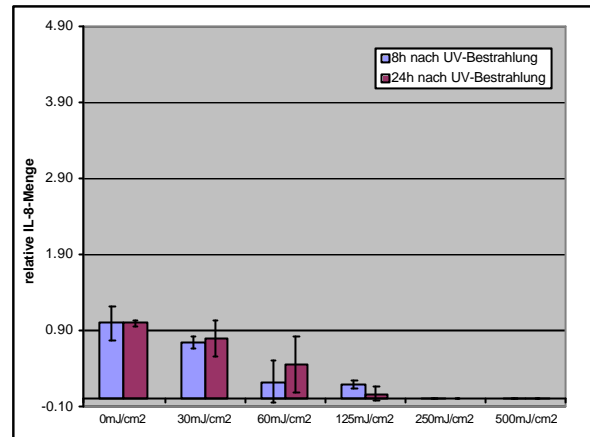


Abb. E.47: Relative IL-8-Proteinmenge im Nährmedium des **Natskin-Modells** nach UV-Bestrahlung in den Dosierungen 30, 60, 125, 250 und 500 mJ/cm², nach 8 h und 24 h Inkubation (relativ zur unbestrahlten Hautprobe pro Zeitpunkt) (n = 3, Mittelwert ± absolute Standardabweichung)

Die UV-Bestrahlung mit der Dosis 125 mJ/cm² bewirkt im Phenion FT-Modell nach 24-stündiger Inkubation eine signifikante Erhöhung der IL-8-Sekretion in das Nährmedium ($p < 0.043$; zweiseitig). Somit ist IL-8 ein geeigneter Indikator zur Erfassung der Reaktion des Phenion FT-Modells auf UV-Strahlung.

Nach Bestrahlung mit sehr hoher UV-Dosis ist die im Phenion FT-Modell ermittelte IL-8-Menge reduziert. Analog zu der bereits im Zusammenhang mit IL-1a geäußerten Vermutung kann auch für IL-8 die Ursache in der generell stark hautschädigenden Wirkung von UV-Strahlung angenommen werden. Nach Applikation von hohen UV-Dosen ist die Zellfunktion demnach so stark beeinträchtigt, dass eine physiologische Reaktion zur Erhaltung der Homöostase nicht mehr möglich ist. Zudem konnte nach Bestrahlung von IL-8-Standardlösungen mit einer mittleren UV-Dosis (60 mJ/cm²) ein IL-8-Abbau von rund 20 % nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Möglicherweise spielt diese UV-bedingte Instabilität eine Rolle.

Das Phenion FT- und das Natskin-Modell reagieren gegensätzlich auf die UV-Bestrahlung. Während das Phenion FT-Modell mit steigender UV-Dosis auch eine Erhöhung der IL-8-Menge zeigt, sinkt diese im Natskin-Modell mit zunehmender UV-Dosis kontinuierlich ab. Ausserdem, im SkinEthic-Modell war im Rahmen der Evaluierung der zellbiologischen Marker kein UV-bedingter Effekt auf die IL-8-Menge detektierbar (vgl. E.1.2.2). Das unterschiedliche Expressionsverhalten bezüglich IL-8 hängt vermutlich mit dem jeweiligen Aufbau der drei Hautmodelle zusammen.

Gemäss Boxman et al. wird IL-8 hauptsächlich in Fibroblasten synthetisiert und sezerniert, wobei die in den Fibroblasten produzierte IL-8-Menge gegenüber derjenigen in den Keratinocyten 100- bis 1000-fach erhöht ist. Die dazu erforderliche Stimulation erfolgt unter anderem durch IL-1a aus aktivierten Keratinocyten. Folglich spielt die Keratinozyten-Fibroblasten-Interaktion in der Signalvermittlung respektive Signalverstärkung im Ablauf von dermalen Entzündungsreaktionen eine wichtige Rolle (Boxman et al. 1993; Boxman et al. 1996). Vor diesem Hintergrund könnte erklärt werden, weshalb im ausschliesslich aus Keratinocyten bestehenden SkinEthic-Modell der Effekt von UV-Strahlung anhand von IL-8 nicht erfassbar war.

Die IL-8-Menge im Natskin-Modell nimmt mit steigender UV-Dosis eindeutig ab. IL-8 ist ein Chemokin mit starkem chemotaktischem Effekt, dessen Aufgabe unter anderem in der Rekrutierung und Aktivierung von Monozyten und Neutrophilen besteht und somit einen proinflammatorischen Wirkcharakter aufweist (Barker et al. 1991). Der irritative Effekt von UV-Strahlung müsste sich demnach in einer Erhöhung der IL-8-Menge äussern.

UV-Strahlung wirkt aber auch immunsuppressiv (Walker et al. 2003). Ausserdem verfügt Natskin als einziges der drei Modelle über immunkompetente Zellen. Es ist also denkbar, dass die IL-8-Reduktion mit UV-induzierten Modifikationen von kutanen Immunzellen in Zusammenhang steht.

Im Phenion FT- und im Natskin-Modell ist eine Korrelation zwischen der im Gewebe vorliegenden und der in das Nährmedium ausgeschütteten IL-8-Menge vorhanden. Dabei sezerniert das Phenion FT-Modell nach 8 h Inkubation rund 10 % und nach 24 h bis zu 60 % der im Gewebe ermittelten IL-8-Menge. Im Natskin-Modell beträgt die IL-8-Sekretion rund 5 % (8 h) respektive 8 % (24 h).

Weder im Phenion FT- noch im Natskin-Modell korreliert die gefundene IL-8-Menge mit der analog dazu ermittelten IL-1a-Sekretion (vgl. E.2.1.1). Neben endogenen proinflammatorischen Stimuli wie IL-1a und TNF- α wird die Auslösung der IL-8-Synthese in der Literatur auch exogenen Faktoren, zum Beispiel irritativen Chemikalien (Coquette et al. 2003) und UV-Strahlung (Stein et al. 1997) zugeschrieben. Dabei kann die Induktion der IL-8-Expression ohne Vermittlung durch körpereigene Mediatoren erfolgen (Lin et al. 1994). Möglicherweise ist dies auch im vorliegenden Fall zutreffend.

Die folgende Tabelle zeigt die in den unbestrahlten Hautproben zu den drei Hautmodellen absolut gefundenen IL-8-Mengen im direkten Vergleich:

Tab. E.4: Absolute IL-8-Proteinmenge im Gewebe und im Nährmedium der unbestrahlten Hautproben zum SkinEthic-, Phenion FT- und Natskin-Modell (24 h Inkubation)

		SkinEthic	Phenion FT	Natskin (kleines Format)
	Masse (\emptyset) (g)	0.006	0.255	0.258
	Oberfläche (cm ²)	0.500	1.327	0.785
Gewebe (n = 1)	Menge pro Stück (pg/Haut)	17	6518	84123
	Menge pro Masse (pg/g)	2817	19019	326563
	Menge pro Oberfläche (pg/cm ²)	34	4912	107162
Nährmedium (Phenion FT / Natskin n = 3, SkinEthic n = 2, Mittelwert, Angabe der Spannweite)	Menge pro Stück (pg/Haut)	8 (7-9)	4182 (3908-4564)	7126 (6818-7306)
	Menge pro Masse (pg/g)	1344 (1233-1455)	16400 (15326-17899)	27662 (26467-28360)
	Menge pro Oberfläche (pg/cm ²)	16 (15-17)	3151 (2945-3440)	9073 (8681-9302)

Im Vergleich zum SkinEthic-Modell zeigen besonders das Natskin- und in etwas geringerem Ausmass auch das Phenion FT-Modell im Gewebe und nach Sekretion in das Nährmedium bereits in der unbestrahlten Hautprobe sehr grosse absolute IL-8-Mengen. Die Ursache für diese erhöhten IL-8-Mengen kann im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht abgeklärt werden. Es ist jedoch nicht auszuschliessen, dass die Hautproben zu den beiden Modellen in bereits irritiertem Zustand geliefert worden sind.

E.2.1.3 IL-6-Sekretion und Menge im Gewebe

Im Folgenden sind die relative IL-6-Menge im Gewebe und die relative IL-6-Sekretion im Phenion FT-Modell nach UV-Bestrahlung in verschiedenen Dosierungen dargestellt (zu den absoluten Mengen siehe Anhang H.5.5 und H.5.6). IL-6 ist für das Phenion FT-Modell von besonderem Interesse, da für dieses Modell die UV-induzierte IL-6-Sekretionssteigerung in der Literatur beschrieben ist (Zöller et al. 2006).

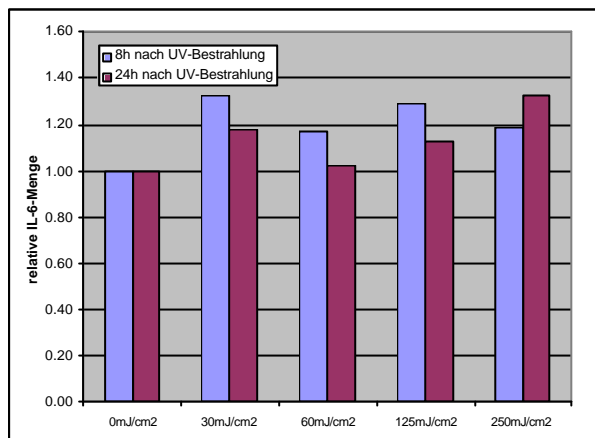


Abb. E.48: Relative IL-6-Proteinmenge im Gewebe des **Phenion FT-Modells** nach UV-Bestrahlung in den Dosierungen 30, 60, 125 und 250 mJ/cm², nach 8 h und 24 h Inkubation (relativ zur unbestrahlten Hautprobe pro Zeitpunkt) (n = 1)

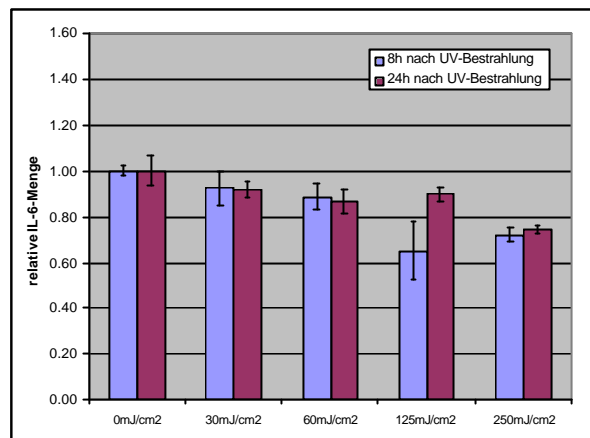


Abb. E.49: Relative IL-6-Proteinmenge im Nährmedium des **Phenion FT-Modells** nach UV-Bestrahlung in den Dosierungen 30, 60, 125 und 250 mJ/cm², nach 8 h und 24 h Inkubation (relativ zur unbestrahlten Hautprobe pro Zeitpunkt) (n = 3, Mittelwert ± absolute Standardabweichung)

Die im Gewebe detektierte IL-6-Menge korreliert nicht mit der IL-6-Sekretion. Im Gewebe des Phenion FT-Modells induziert die UV-Strahlung tendenziell eine dosisunabhängige Erhöhung der IL-6-Menge. Die IL-6-Sekretion nimmt hingegen mit steigender UV-Dosis signifikant ab (nach Bestrahlung mit 250 mJ/cm²: 8 h p < 0.001, 24 h p < 0.004; zweiseitig). Die Beobachtung von Zöller et al. kann somit unter den gewählten Versuchsbedingungen in der vorliegenden Arbeit nicht bestätigt werden.

Werden Keratinozyten und Fibroblasten gemeinsam kultiviert, was im Phenion FT-Modell der Fall ist, steigt die IL-6-Expression unter dem direkten Einfluss des aus den Keratinozyten ausgeschütteten IL-1a sowohl in den Fibroblasten als auch in den Keratinozyten an (Boxman et al. 1993; Boxman et al. 1996). Die vorliegende Arbeit zeigt jedoch keine Übereinstimmung zwischen der IL-1a-Sekretion (vgl. E.2.1.1) und der ermittelten IL-6-Menge.

Die folgende Tabelle führt die in den unbestrahlten Hautproben zum Phenion FT- und zum SkinEthic-Modell absolut gefundenen IL-6-Mengen auf:

Tab. E.5: Absolute IL-6-Proteinmenge im Gewebe und im Nährmedium der unbestrahlten Hautproben zum SkinEthic- und Phenion FT-Modell (24 h Inkubation)

		SkinEthic	Phenion FT
	Masse (ø)	0.006	0.255
	Oberfläche	0.500	1.327
Gewebe (n = 1)	Menge pro Stück	(nicht messbar)	1280
	Menge pro Masse	(nicht messbar)	3735
	Menge pro Oberfläche	(nicht messbar)	5260
Nährmedium (Phenion FT: n = 3, SkinEthic: n = 2, Mittelwert, Angabe der Spannweite)	Menge pro Stück	(nicht messbar)	2635 (2493-2836)
	Menge pro Masse	(nicht messbar)	10335 (9778-11120)
	Menge pro Oberfläche	(nicht messbar)	1986 (1879-2137)

Im SkinEthic-Modell kann generell kein IL-6 detektiert werden (vgl. auch E.1.2.2). Hingegen ist IL-6 im Phenion FT-Modell sowohl im Gewebe als auch nach Sekretion in das Nährmedium gut nachweisbar. Gemäss Boxman et al. ist die IL-6-Synthese in Fibroblasten mindestens 100- bis 1000-fach höher als in Keratinozyten (Boxman et al. 1996). Das vorliegende Ergebnis steht mit diesem Befund in Einklang.

E.2.1.4 Viabilität

Die Viabilität der drei Hautmodelle nach UV-Bestrahlung wird anhand des relativen Membrandefekts (LDH-Test) und der Anzahl an metabolisch aktiven Zellen (MTT-Test) beurteilt:

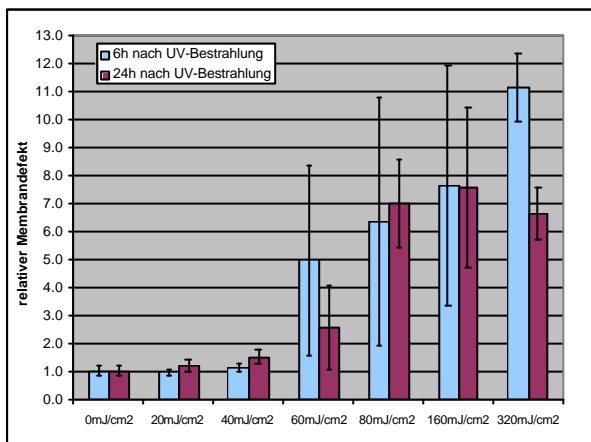


Abb. E.50: Relativer Membrandefekt (LDH-Test) im **SkinEthic-Modell** nach UV-Bestrahlung in den Dosierungen 20, 40, 60, 80, 160 und 320 mJ/cm², nach 6 h und 24 h Inkubation (relativ zur unbestrahlten Hautprobe pro Zeitpunkt) (nach 6 h n = 6, nach 24 h n = 4, Mittelwert ± absolute Standardabweichung)

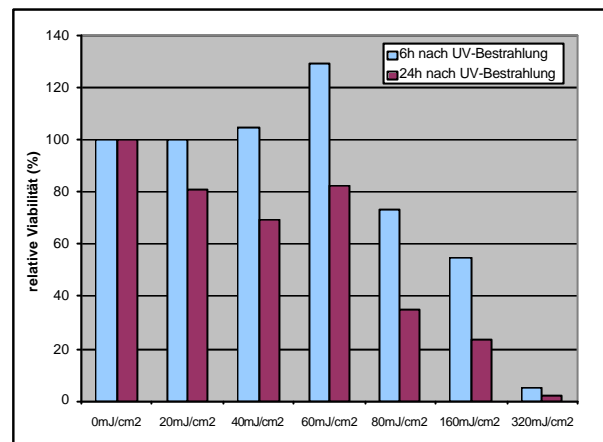


Abb. E.51: Relative Viabilität (Anzahl an metabolisch aktiven Zellen im MTT-Test) im **SkinEthic-Modell** nach UV-Bestrahlung in den Dosierungen 20, 40, 60, 80, 160 und 320 mJ/cm², nach 6 h und 24 h Inkubation (relativ zur unbestrahlten Hautprobe pro Zeitpunkt) (n = 1)

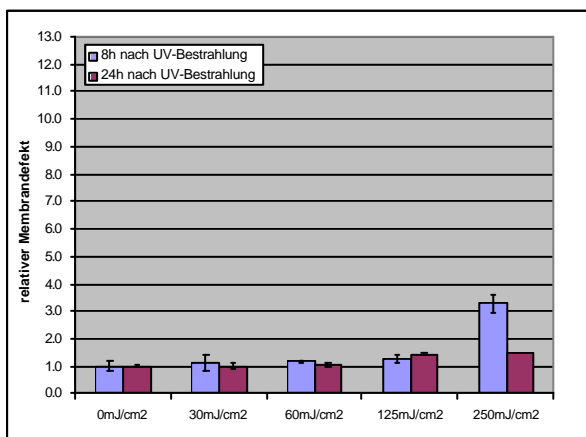


Abb. E.52: Relativer Membrandefekt (LDH-Test) im **Phenion FT-Modell** nach UV-Bestrahlung in den Dosierungen 30, 60, 125 und 250 mJ/cm², nach 8 h und 24 h Inkubation (relativ zur unbestrahlten Hautprobe pro Zeitpunkt) (n = 3, Mittelwert ± absolute Standardabweichung)

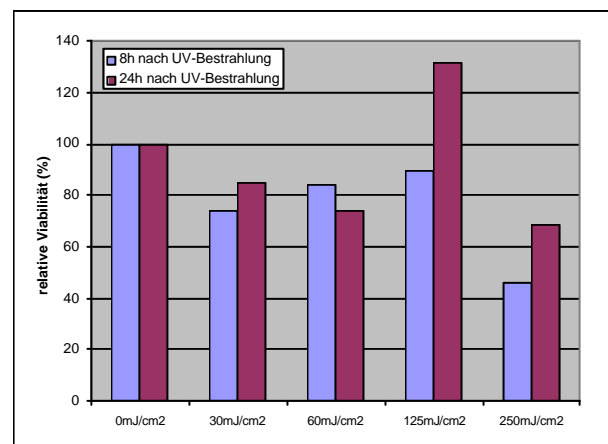


Abb. E.53: Relative Viabilität (Anzahl an metabolisch aktiven Zellen im MTT-Test) im **Phenion FT-Modell** nach UV-Bestrahlung in den Dosierungen 30, 60, 125 und 250 mJ/cm², nach 8 h und 24 h Inkubation (relativ zur unbestrahlten Hautprobe pro Zeitpunkt) (n = 1)

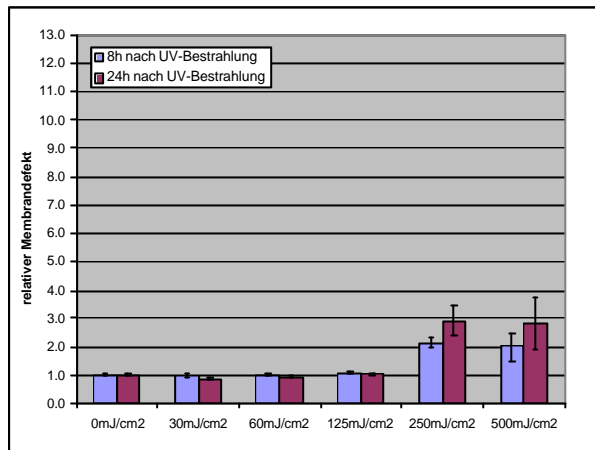


Abb. E.54: Relativer Membrandefekt (LDH-Test) im **Natskin-Modell** nach UV-Bestrahlung in den Dosierungen 30, 60, 125, 250 und 500 mJ/cm², nach 8 h und 24 h (relativ zur unbestrahlten Hautprobe pro Zeitpunkt) (n = 3, Mittelwert ± absolute Standardabweichung)

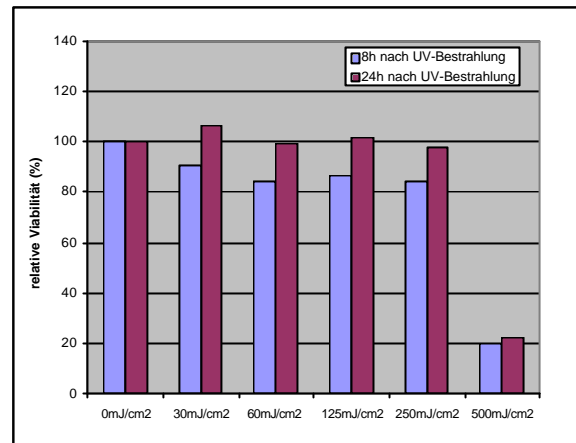


Abb. E.55: Relative Viabilität (Anzahl an metabolisch aktiven Zellen im MTT-Test) im **Natskin-Modell** nach UV-Bestrahlung in den Dosierungen 30, 60, 125, 250 und 500 mJ/cm², nach 8 h und 24 h Inkubation (relativ zur unbestrahlten Hautprobe pro Zeitpunkt) (n = 1)

Die UV-Bestrahlung reduziert die Viabilität in allen drei Hautmodellen. Dabei sind das Ausmass und die jeweils tolerierten UV-Dosen sehr unterschiedlich.

Das SkinEthic-Modell reagiert generell am empfindlichsten. Ab der Bestrahlung mit 60 mJ/cm² zeichnet sich ein relativer Membrandefekt ab, der mit weiter steigender UV-Dosis bis maximal auf das 11-fache gegenüber der unbestrahlten Probe ansteigt. Die Anzahl an metabolisch aktiven Zellen bleibt unverändert bis zur UV-Dosis von 60 mJ/cm². Ab 80 mJ/cm² nimmt diese rapide ab, um nach Applikation von 320 mJ/cm² auf ein Minimum von 5 % resp. 2 % (8 h resp. 24 h nach Bestrahlung) abzusinken (vgl. auch E.1.4.1).

An zweiter Stelle folgt das Phenion FT-Modell, welches sich gegenüber UV-Strahlung klar robuster verhält. Ein relativer Membrandefekt ist erst ab der Dosis 250 mJ/cm² deutlich und beträgt gegenüber der unbestrahlten Probe maximal das 3-fache. Nach Applikation der gleichen UV-Dosis sinkt auch die Anzahl an metabolisch aktiven Zellen ab. Das Minimum beträgt aber trotz hoher UV-Dosis noch 46 % resp. 68 % (8 h resp. 24 h nach Bestrahlung).

Am besten toleriert wird die UV-Bestrahlung vom Natskin-Modell. Im LDH-Test verhält sich die ex vivo-Haut vergleichbar zum Phenion FT-Modell. Der MTT-Test zeigt bis nach Anwendung einer UV-Dosis von 250 mJ/cm² eine unveränderte Anzahl an metabolisch aktiven Zellen. Erst die Bestrahlung mit 500 mJ/cm² bewirkt ein klares Absacken auf 20 % resp. 22 % der ursprünglichen metabolischen Aktivität (8 h resp. 24 h nach Bestrahlung).

Die unterschiedliche Empfindlichkeit der Hautmodelle auf UV-Strahlung hängt vermutlich mit dem Aufbau des jeweiligen Modells zusammen. Die Natskin-ex vivo-Haut enthält alle physiologischerweise in der Haut vertretenen Zelltypen und verfügt somit über das beste Instrumentarium zur Aufrechterhaltung der Homöostase im Gewebe. Auf der anderen Seite steht das SkinEthic-Modell, dessen Abwehrmechanismen ausschliesslich auf der Funktion der Keratinocyten basieren. Dazwischen liegt das Vollhautmodelle Phenion FT, welches im LDH- und MTT-Test eine verhältnismässig geringe Schädigung anzeigt. Die Präsenz einer Dermis scheint somit wichtig und macht ein Hautmodell gegenüber den schädigenden Einflüssen von UV-Strahlung robuster.

Zur Beurteilung der Viabilität der Hautproben nach UV-Bestrahlung wurden zusätzlich histologische Präparate hergestellt und einerseits mit der Hämalaun-Eosin- und andererseits mit der CPD-Färbung (immunhistochemische Methode) behandelt. Im Folgenden ist jeweils die unbestrahlte sowie die mit der tiefsten aufgrund des LDH- und MTT-Tests nachweislich schädigenden UV-Dosis bestrahlte Hautprobe dargestellt (histologische Präparate zu allen UV-Dosierungen siehe Anhang H.5.7):

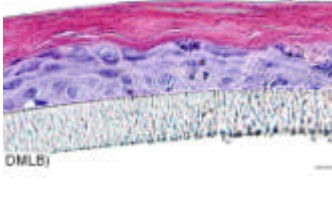
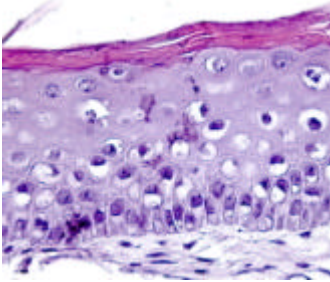
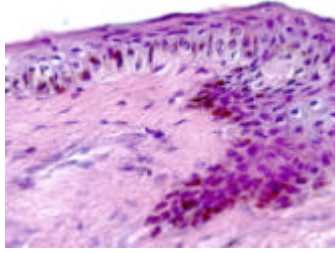
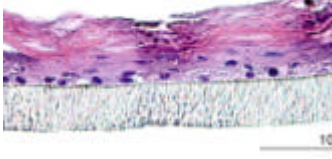
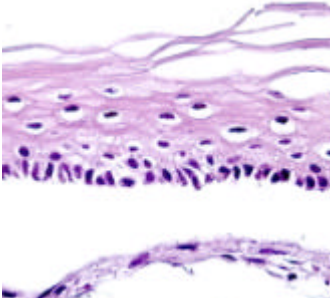
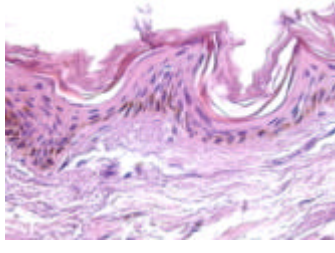
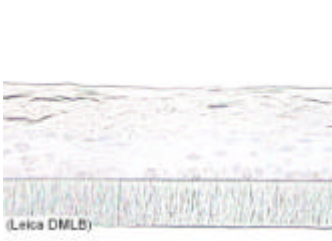
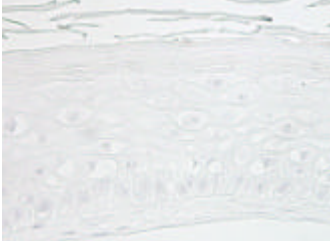
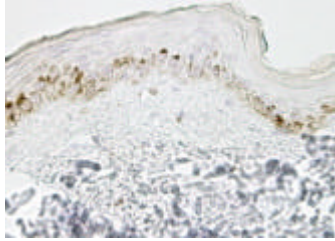
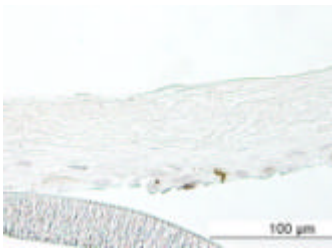
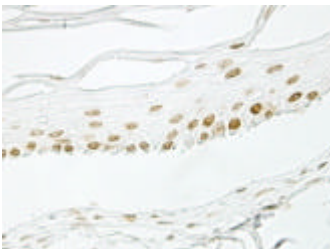
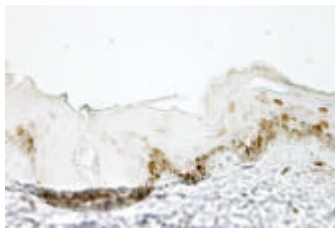
	SkinEthic	Phenion FT	Natskin
Hämalaun-Eosin			
unbestrahlt			
Farbkontrast:	ausgeprägt vorhanden	vorhanden	nicht vorhanden (beachte fehlendes Stratum corneum)
Anhaften am Untergrund:	fest	fest	fest
Zell-Zell-Adhäsion:	fest	wenig aufgelockert	wenig aufgelockert
Stratum corneum:	kompakt	kompakt	abgelöst (fehlt)
Sunburn Cells:	nicht vorhanden	vorhanden	wenig vorhanden
bestrahlt	80 mJ/cm ²	250 mJ/cm ²	500 mJ/cm ²
			
Farbkontrast:	wenig vorhanden	nicht vorhanden (beachte fehlendes Stratum corneum)	nicht vorhanden
Anhaften am Untergrund:	fest	vollständig abgelöst	teilweise abgelöst
Zell-Zell-Adhäsion:	(keine Aussage möglich)	aufgelockert	wenig aufgelockert
Stratum corneum:	gequollen	abgelöst (fehlt)	etwas gequollen
Sunburn Cells:	(keine Aussage möglich)	ausgeprägt vorhanden	wenig vorhanden
CPD			
unbestrahlt			
CPD-Färbung:	keine Färbung	keine Färbung	ausgeprägt vorhanden
bestrahlt	80 mJ/cm ²	250 mJ/cm ²	500 mJ/cm ²
			
CPD-Färbung:	wenig vorhanden	ausgeprägt vorhanden	sehr ausgeprägt vorhanden

Abb. E.56: Ausgewählte histologische Präparate zum SkinEthic, Phenion FT- und Natskin-Modell, unbestrahlt sowie nach Bestrahlung mit der tiefsten aufgrund des LDH- und MTT-Tests nachweislich schädigenden UV-Dosis (SkinEthic: 80 mJ/cm², Phenion FT: 250 mJ/cm², Natskin: 500 mJ/cm²), 24 h nach UV-Bestrahlung, Hämalaun-Eosin-Färbung und CPD-Färbung, Vergrößerung 400-fach

Der Einfluss der UV-Strahlung zeigt sich im histologischen Präparat zum Phenion FT-Modell am ausgeprägtesten. Die durch UV-Strahlung verursachten DNA-Schäden sind in den entsprechenden Zellkernen mittels CPD-Färbung deutlich braun markiert, und in den mit Hämalaun-Eosin-Färbung präparierten Proben sind die für einen Reizzustand charakteristischen Anzeichen gut erkennbar. Im Vordergrund stehen dabei die Ablösung der Epidermis von der Dermis sowie eine Auflockerung der Zell-Zell-Adhäsion. Sunburn Cells sind sowohl in der bestrahlten als auch in der unbestrahlten Hautprobe vorhanden.

Die Histologie zum SkinEthic-Modell lässt die Wirkung der UV-Strahlung weniger klar erkennen. Aufgrund der geringen Zahl an lebenden Zellschichten, besonders in der bestrahlten Hautprobe, kann zur Zell-Zell-Adhäsion und zur Ausbildung von Sunburn Cells keine Aussage gemacht werden. Aus dem gleichen Grund sind durch die CPD-Färbung nur wenige Zellkerne braun markiert. Einzig der gegenüber der unbestrahlten Hautprobe eindeutig verblasste Rosa/Violett-Farbkontrast (Hämalaun-Eosin-Färbung) nach Bestrahlung mit 80 mJ/cm^2 weist auf einen Reizzustand hin.

Die Anfertigung der histologischen Schnitte zum Natskin-Modell erwies sich als problematisch. Die resultierenden Präparate lassen kaum typische Entzündungsmerkmale erkennen. Die CPD-Färbung weist allerdings ausdrücklich auf eine DNA-Schädigung hin. Dies gilt sowohl für die bestrahlte als auch für die unbestrahlte Hautprobe. Da Natskin ein ex vivo-Hautmodell ist, kann im Rahmen der vorliegenden Arbeit die detaillierte Vorgeschichte der Haut nicht eruiert werden. Es wäre aber denkbar, dass sich der Donor bereits vor Entnahme der Hautbiopsie einer UV-Strahlung ausgesetzt hat. Eine vorgängige UV-Exposition könnte auch eine Ursache für die weiter oben festgestellte erhöhte IL-8-Menge darstellen (vgl. E.2.1.2).

E.2.2 Wirkung einer antiinflammatorischen Behandlung mit BV-17 auf drei in vitro- / ex vivo-Hautmodelle

Im Folgenden wird aufgezeigt, ob BV-17 auf das SkinEthic-, das Phenion FT- und das Natskin-Modell eine antiinflammatorische Wirkung zeigt. Hierfür werden die Hautmodelle vorgängig durch UV-Strahlung in einen Reizzustand versetzt. Die dazu erforderliche, für jedes Modell individuelle Reizdosis geht aus den Untersuchungen zur Reaktion auf UV-Strahlung hervor. Die UV-Dosis soll einen deutlichen Effekt zeigen, darf aber gleichzeitig das Hautgewebe nicht stark schädigen. Im SkinEthic-Modell sind diese Bedingungen nach Bestrahlung mit 60 mJ/cm^2 erfüllt (vgl. E.1.6). Für das Phenion FT-Modell sind 100 mJ/cm^2 und für das Natskin-Modell 125 mJ/cm^2 adäquat (vgl. E.2). BV-17 wird direkt nach Bestrahlung, eingearbeitet in zwei unterschiedliche Vehikel (ethanolisch-wässrige Lösung und O/W-Emulsion) appliziert (zur Charakterisierung der Vehikel siehe D.3.1.2). Die BV-17-Dosierung ist so gewählt, dass die Wirkstoffkonzentration in der äusseren, hautberührenden Phase für beide Vehikel gleich ist.

E.2.2.1 IL-1a-Sekretion und Menge im Gewebe

a) IL-1a-Sekretion (Nährmedium)

Die folgenden Graphiken zeigen den Effekt von BV-17 in verschiedenen Dosierungen und eingearbeitet in zwei unterschiedliche Vehikel auf das SkinEthic-, das Phenion FT- und das Natskin-Modell nach deren Irritation mit UV-Strahlung anhand der IL-1a-Sekretion in das Nährmedium:

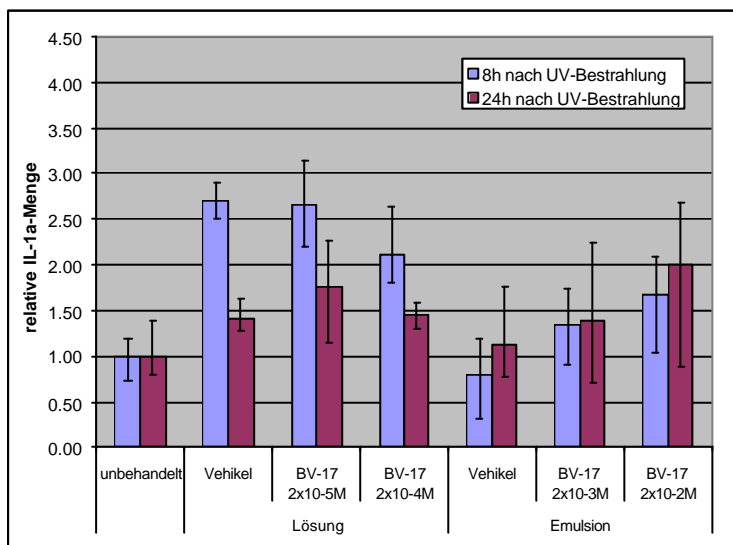


Abb. E.57: Relative IL-1a-Proteinmenge im Nährmedium des **SkinEthic-Modells** nach UV-Bestrahlung (60 mJ/cm^2) und nach Applikation von BV-17 in den Dosierungen $2 \times 10^{-4} \text{ M}$ und $2 \times 10^{-5} \text{ M}$ (Ethanol 50 % - PBS 50 % V/V) sowie $2 \times 10^{-3} \text{ M}$ und $2 \times 10^{-2} \text{ M}$ (O/W-Emulsion), nach 8 h und 24 h Inkubation (relativ zur bestrahlten, unbehandelten Hautprobe pro Zeitpunkt) (n = 3, Mittelwert, Angabe der Spannweite)

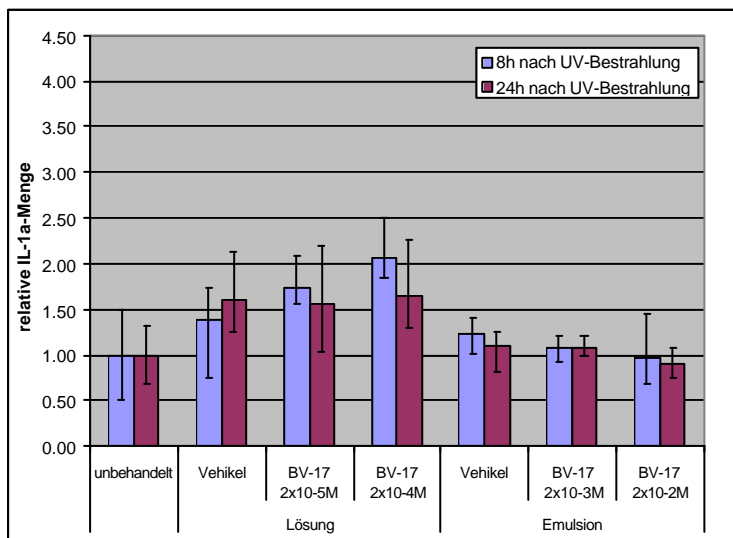


Abb. E.58: Relative IL-1a-Proteinmenge im Nährmedium des **Phenion FT-Modells** nach UV-Bestrahlung (100 mJ/cm^2) und nach Applikation von BV-17 in den Dosierungen $2 \times 10^{-4} \text{ M}$ und $2 \times 10^{-5} \text{ M}$ (Ethanol 50 % - PBS 50 % V/V) sowie $2 \times 10^{-3} \text{ M}$ und $2 \times 10^{-2} \text{ M}$ (O/W-Emulsion), nach 8 h und 24 h Inkubation (relativ zur bestrahlten, unbehandelten Hautprobe pro Zeitpunkt) (n = 3, Mittelwert, Angabe der Spannweite)

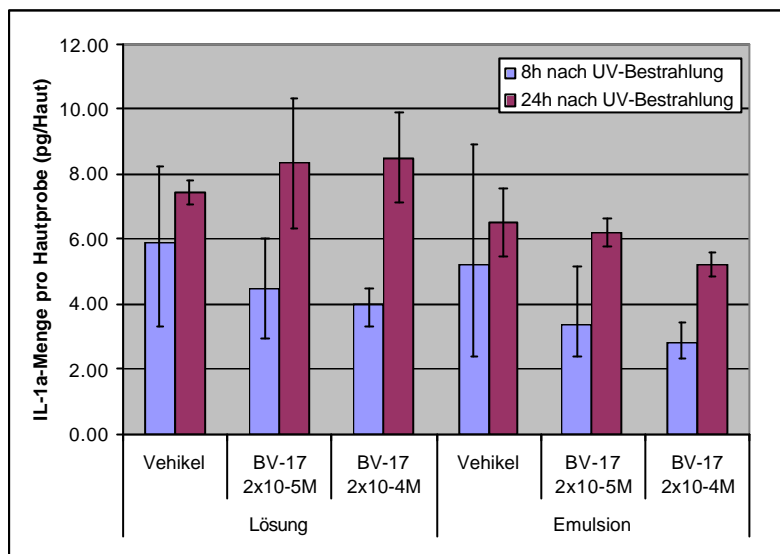


Abb. E.59: Absolute IL-1a-Proteinmenge pro Hautprobe im Nährmedium des **Natskin-Modells** (grosses Format) nach UV-Bestrahlung (125 mJ/cm²) und nach Applikation von BV-17 in den Dosierungen 2 x 10⁻⁴ M und 2 x 10⁻⁵ M (Ethanol 50 % - PBS 50 % V/V und O/W-Emulsion), nach 8 h und 24 h Inkubation (8 h n = 4, 24 h n = 2, Mittelwert, Angabe der Spannweite)

Im SkinEthic-Modell ist die IL-1a-Sekretion nach Applikation der ethanolisch-wässrigen Lösung deutlich gesteigert (8 h $p < 0.001$, 24 h $p < 0.126$; zweiseitig). Die O/W-Emulsion zeigt hingegen keinen entsprechenden Vehikeleffekt. Anhand der Interleukin-1a-Sekretion im SkinEthic-Modell kann somit zwischen einer Reizwirkung der ethanolisch-wässrigen Lösung und der guten Verträglichkeit der O/W-Emulsion differenziert werden.

Im Vergleich der drei Hautmodelle wird im Phenion FT-Modell die IL-1a-Sekretion durch die Applikation von BV-17 allgemein am schwächsten beeinflusst.

Anhand der IL-1a-Sekretion ist generell kein eindeutiger Wirkstoffeffekt von BV-17 erkennbar. Die teilweise vorhandenen Trends sind gegenläufig, das heisst, lassen sich von Modell zu Modell nicht bestätigen.

Im Rahmen der Evaluation der zellbiologischen Marker wurde im SkinEthic-Modell nach Applikation von tief dosiertem BV-17 (2 x 10⁻⁵ M und 2 x 10⁻⁶ M) eine tendenzielle Reduktion, respektive durch hoch dosiertes BV-17 (2 x 10⁻³ M) eine deutliche Steigerung der IL-1a-Sekretion festgestellt (vgl. E.1.2.2). Beides wird durch das vorliegende Resultat nicht unterstützt. Die Applikationsbedingungen für BV-17 in den genannten Versuchen waren jedoch mit denjenigen des vorliegenden Experiments nicht ganz identisch. Als Vehikel diente absoluter Ethanol. Zur Ermittlung der obigen Daten wurde BV-17 einerseits in eine ethanolisch-wässrige Lösung (Ethanol 50 % - PBS 50 % V/V) und andererseits in eine O/W-Emulsion eingearbeitet. Es konnte gezeigt werden, dass BV-17 in der O/W-Emulsion nur zu rund 1% in der äusseren Phase vorliegt (vgl. Anhang H.6.3). Zudem wird weiter unten diskutiert, dass für die Hautpenetration und somit für die Wirkung nicht die gesamthaft in der Emulsion dosierte, sondern die Wirkstoffkonzentration in der äusseren, direkt hautberührenden Phase entscheidend ist (vgl. E.2.2.5). Dies bedeutet, die wirksame BV-17-Dosierung in der oben eingesetzten O/W-Emulsion beträgt effektiv nur 2 x 10⁻⁵ M respektive 2 x 10⁻⁴ M. Beides liegt unterhalb des aufgezeigten proirritativen Dosisbereichs für BV-17 von 2 x 10⁻³ M.

Die Inkubationszeit scheint generell für die IL-1a-Sekretion keine Rolle zu spielen. Die teilweise erkennbaren Tendenzen sind modellspezifisch.

b) IL-1a-Menge im Gewebe

Die folgenden Graphiken zeigen den Effekt von BV-17 in verschiedenen Dosierungen und eingearbeitet in zwei unterschiedliche Vehikel auf das SkinEthic-, das Phenion FT- und das Natskin-Modell nach deren Irritation mit UV-Strahlung anhand der IL-1a-Menge im Gewebe:

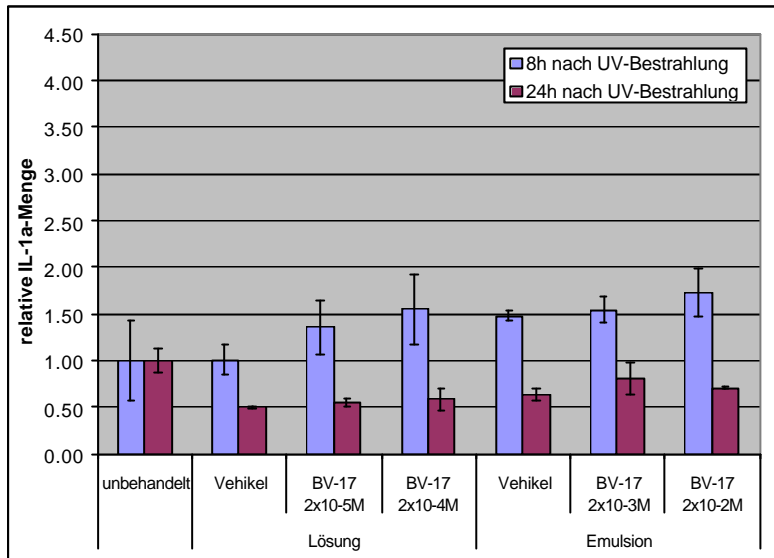


Abb. E.60: Relative IL-1a-Proteinmenge im Gewebe des **SkinEthic-Modells** nach UV-Bestrahlung (60 mJ/cm^2) und nach Applikation von BV-17 in den Dosierungen $2 \times 10^{-4} \text{ M}$ und $2 \times 10^{-5} \text{ M}$ (Ethanol 50 % - PBS 50 % V/V) sowie $2 \times 10^{-3} \text{ M}$ und $2 \times 10^{-2} \text{ M}$ (O/W-Emulsion), nach 8 h und 24 h Inkubation (relativ zur bestrahlten, unbehandelten Hautprobe pro Zeitpunkt) (n = 2, Mittelwert, Angabe der Spannweite)

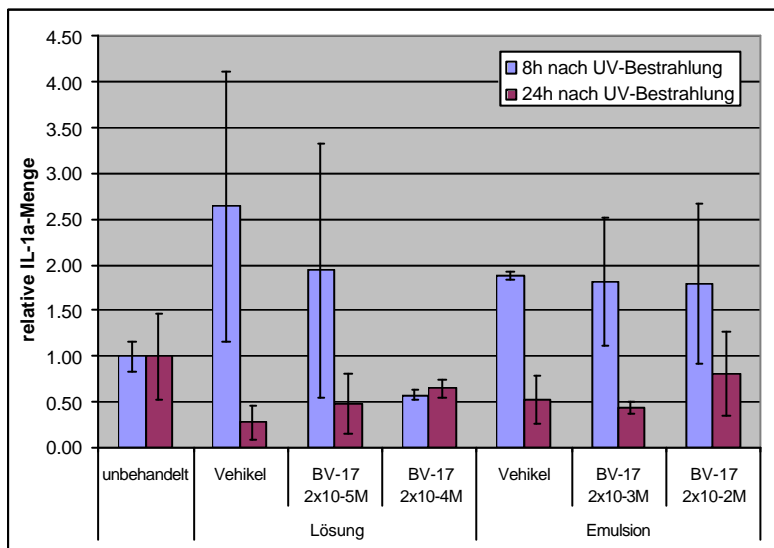


Abb. E.61: Relative IL-1a-Proteinmenge im Gewebe des **Phenion FT-Modells** nach UV-Bestrahlung (100 mJ/cm^2) und nach Applikation von BV-17 in den Dosierungen $2 \times 10^{-4} \text{ M}$ und $2 \times 10^{-5} \text{ M}$ (Ethanol 50 % - PBS 50 % V/V) sowie $2 \times 10^{-3} \text{ M}$ und $2 \times 10^{-2} \text{ M}$ (O/W-Emulsion), nach 8 h und 24 h Inkubation (relativ zur bestrahlten, unbehandelten Hautprobe pro Zeitpunkt) (n = 2, Mittelwert, Angabe der Spannweite)

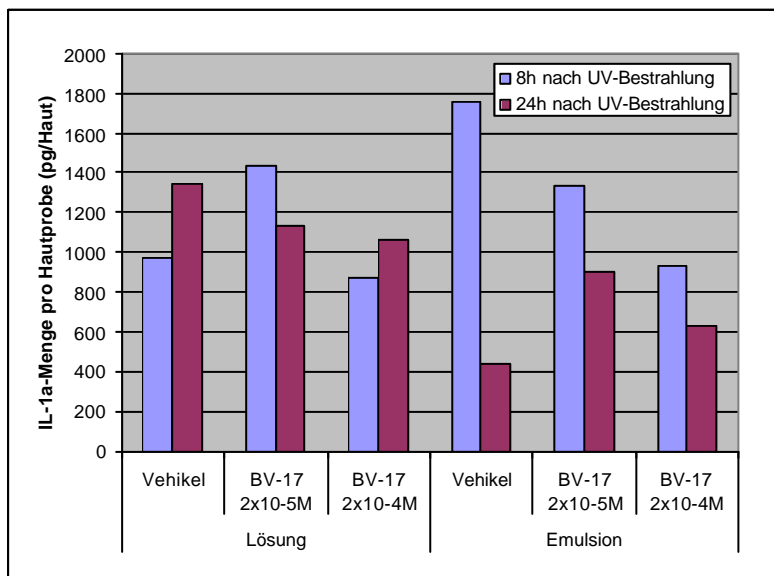


Abb. E.62: Absolute IL-1a-Proteinmenge pro Hautprobe im Gewebe des **Natskin-Modells** (grosses Format) nach UV-Bestrahlung (125 mJ/cm^2) und nach Applikation von BV-17 in den Dosierungen $2 \times 10^{-4} \text{ M}$ und $2 \times 10^{-5} \text{ M}$ (Ethanol 50 % - PBS 50 % V/V und O/W-Emulsion), nach 8 h und 24 h Inkubation (n = 1)

Das Phenion FT-Modell zeigt sowohl nach Applikation der ethanolisch-wässrige Lösung als auch der O/W-Emulsion eine erhöhte IL-1a-Menge im Gewebe. Dies deutet für beide Formulierungen auf einen proirritativen Vehikeleffekt hin.

BV-17 beeinflusst die IL-1a-Menge in keinem der überprüften Hautmodelle eindeutig. Bei der im Phenion FT-Modell nach Applikation der ethanolischen-wässrigen Lösung mit BV-17 in der Dosierung 2×10^{-4} M beobachteten Senkung der IL-1a-Menge kann es sich um einen Einzelfall handeln.

Im Vergleich der drei Hautmodelle zeigt das SkinEthic-Modell die allgemein schwächste Reaktion. Es wurde bereits früher festgestellt, dass die im SkinEthic-Modell gespeicherte IL-1a-Menge durch externe Reize nicht nachweislich beeinflusst wird (vgl. E.1.2.2). Diese Beobachtung wird durch das vorliegende Ergebnis bestätigt.

Die Ergebnisse zur IL-1a-Menge im Gewebe korrelieren generell nicht mit den zur IL-1a-Sekretion ermittelten Resultaten.

Die Differenz der IL-1a-Menge gegenüber der unbehandelten Hautprobe ist in fast allen Fällen nach 8-stündiger Inkubation grösser als nach 24 h.

E.2.2.2 IL-8-Sekretion und Menge im Gewebe

a) IL-8-Sekretion (Nährmedium)

Die folgenden Graphiken zeigen den Effekt von BV-17 in verschiedenen Dosierungen und eingearbeitet in zwei unterschiedliche Vehikel auf das SkinEthic-, das Phenion FT- und das Natskin-Modell nach deren Irritation mit UV-Strahlung anhand der IL-8-Sekretion in das Nährmedium:

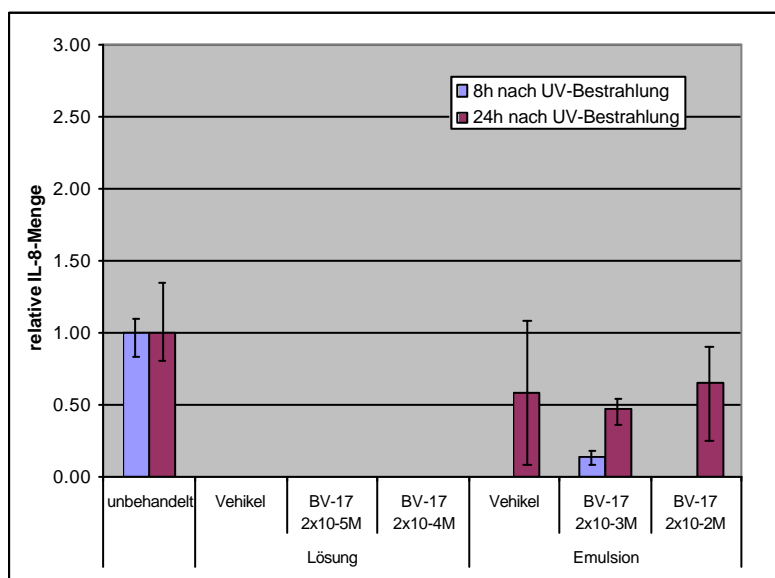


Abb. E.63: Relative IL-8-Proteinmenge im Nährmedium des **SkinEthic-Modells** nach UV-Bestrahlung (60 mJ/cm^2) und nach Applikation von BV-17 in den Dosierungen 2×10^{-4} M und 2×10^{-5} M (Ethanol 50 % - PBS 50 % V/V) sowie 2×10^{-3} M und 2×10^{-2} M (O/W-Emulsion), nach 8 h und 24 h Inkubation (relativ zur bestrahlten, unbehandelten Hautprobe pro Zeitpunkt) (n = 3, Mittelwert, Angabe der Spannweite)

Fehlende Balken = Messwerte < Nachweisgrenze

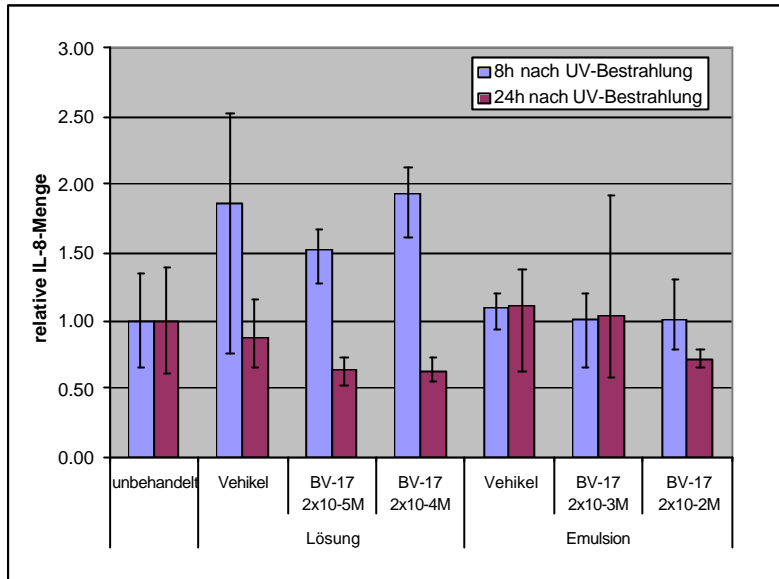


Abb. E.64: Relative IL-8-Proteinmenge im Nährmedium des **Phenion FT-Modells** nach UV-Bestrahlung (100 mJ/cm^2) und nach Applikation von BV-17 in den Dosierungen $2 \times 10^{-4} \text{ M}$ und $2 \times 10^{-5} \text{ M}$ (Ethanol 50 % - PBS 50 % V/V) sowie $2 \times 10^{-3} \text{ M}$ und $2 \times 10^{-2} \text{ M}$ (O/W-Emulsion), nach 8 h und 24 h Inkubation (relativ zur bestrahlten, unbehandelten Hautprobe pro Zeitpunkt) (n = 3, Mittelwert, Angabe der Spannweite)

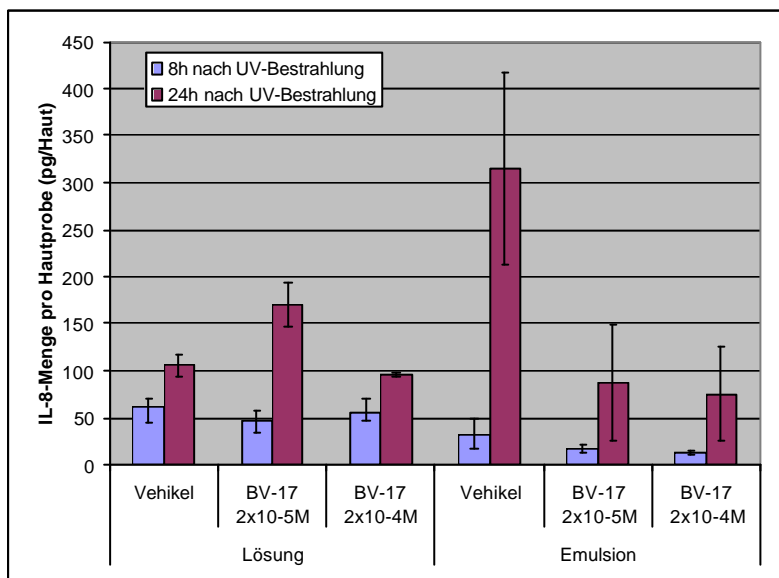


Abb. E.65: Absolute IL-8-Proteinmenge pro Hautprobe im Nährmedium des **Natskin-Modells** (grosses Format) nach UV-Bestrahlung (125 mJ/cm^2) und nach Applikation von BV-17 in den Dosierungen $2 \times 10^{-4} \text{ M}$ und $2 \times 10^{-5} \text{ M}$ (Ethanol 50 % - PBS 50 % V/V und O/W-Emulsion), nach 8 h und 24 h Inkubation (8 h n = 4, 24 h n = 2, Mittelwert, Angabe der Spannweite)

Im Phenion FT-Modell wird der bereits anhand der IL-1a-Menge im Gewebe festgestellte proirritative Vehikeleffekt der ethanolisch-wässrigen Lösung durch eine gesteigerte IL-8-Sekretion erhärtet. Die aufgrund von IL-1a ebenfalls detektierte Reizwirkung der O/W-Emulsion wird durch IL-8 allerdings nicht angezeigt.

Die IL-8-Sekretion im SkinEthic-Modell ist im Vergleich zu den beiden anderen Modellen sehr gering, respektive teilweise nicht mehr nachweisbar. Dies bestätigt, wie bereits im Rahmen der Evaluation der zellbiologischen Marker festgestellt wurde (vgl. E.1.2.2), dass IL-8 kein zuverlässiges Indikatorprotein für Effekte auf das SkinEthic-Modell darstellt. IL-8 wird hauptsächlich in Fibroblasten synthetisiert und sezerniert (Boxman et al. 1993; Boxman et al. 1996). Das Skinethic-Modell verfügt jedoch über keine Fibroblasten (vgl. auch E.2.1.2).

Analog zu den Ergebnissen zu IL-1a ist auch anhand der IL-8-Sekretion in keinem der Modelle ein eindeutiger pharmakologischer Effekt durch BV-17 erkennbar.

Im Natskin-Modell ist die IL-8-Sekretion nach 24 h deutlich grösser als nach 8 h Inkubation. Die gleiche Beobachtung für das Natskin-Modell konnte bereits zur IL-1a-Sekretion gemacht werden. Für die anderen Modelle kann keine systematische Zeitabhängigkeit festgestellt werden.

b) IL-8-Menge im Gewebe

Die folgenden Graphiken zeigen den Effekt von BV-17 in verschiedenen Dosierungen und eingearbeitet in zwei unterschiedliche Vehikel auf das SkinEthic-, das Phenion FT- und das Natskin-Modell nach deren Irritation mit UV-Strahlung anhand der IL-8-Menge im Gewebe:

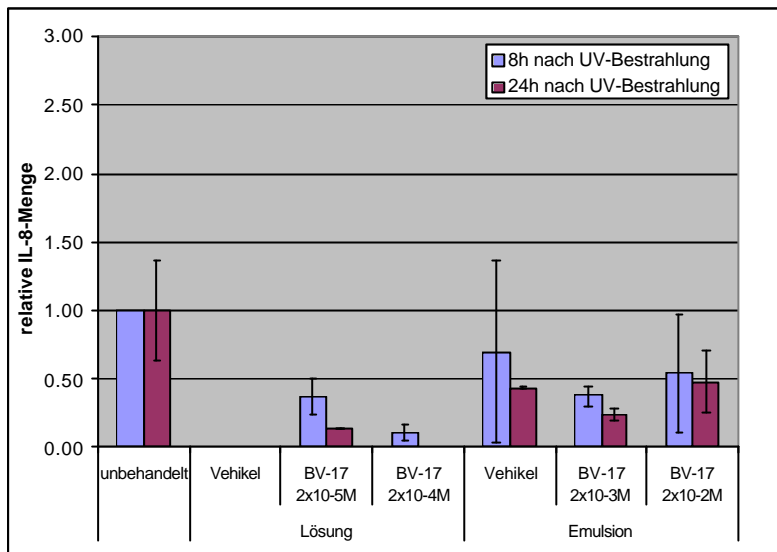


Abb. E.66: Relative IL-8-Proteinmenge im Gewebe des **SkinEthic-Modells** nach UV-Bestrahlung (60 mJ/cm²) und nach Applikation von BV-17 in den Dosierungen 2 x 10⁻⁴ M und 2 x 10⁻⁵ M (Ethanol 50 % - PBS 50 % V/V) sowie 2 x 10⁻³ M und 2 x 10⁻² M (O/W-Emulsion), nach 8 h und 24 h Inkubation (relativ zur bestrahlten, unbehandelten Hautprobe pro Zeitpunkt) (n = 2, Mittelwert, Angabe der Spannweite)

Fehlende Balken = Messwerte < Nachweisgrenze

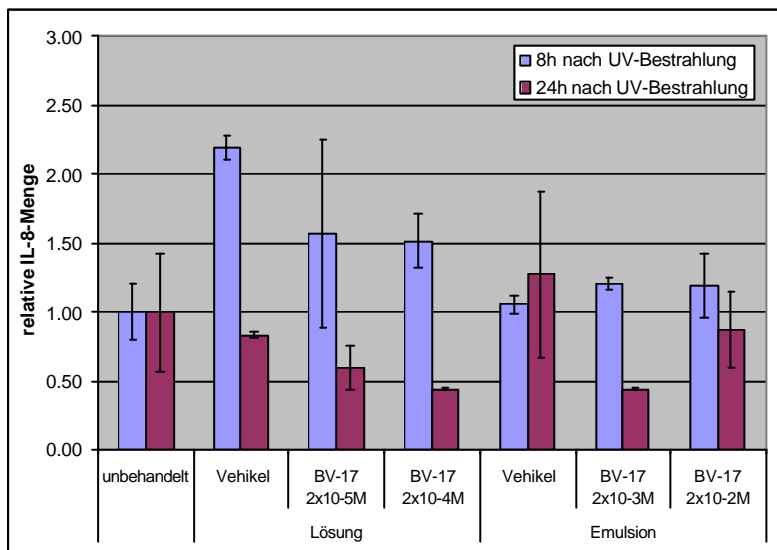


Abb. E.67: Relative IL-8-Proteinmenge im Gewebe des **Phenion FT-Modells** nach UV-Bestrahlung (100 mJ/cm²) und nach Applikation von BV-17 in den Dosierungen 2 x 10⁻⁴ M und 2 x 10⁻⁵ M (Ethanol 50 % - PBS 50 % V/V) sowie 2 x 10⁻³ M und 2 x 10⁻² M (O/W-Emulsion), nach 8 h und 24 h Inkubation (relativ zur bestrahlten, unbehandelten Hautprobe pro Zeitpunkt) (n = 2, Mittelwert, Angabe der Spannweite)

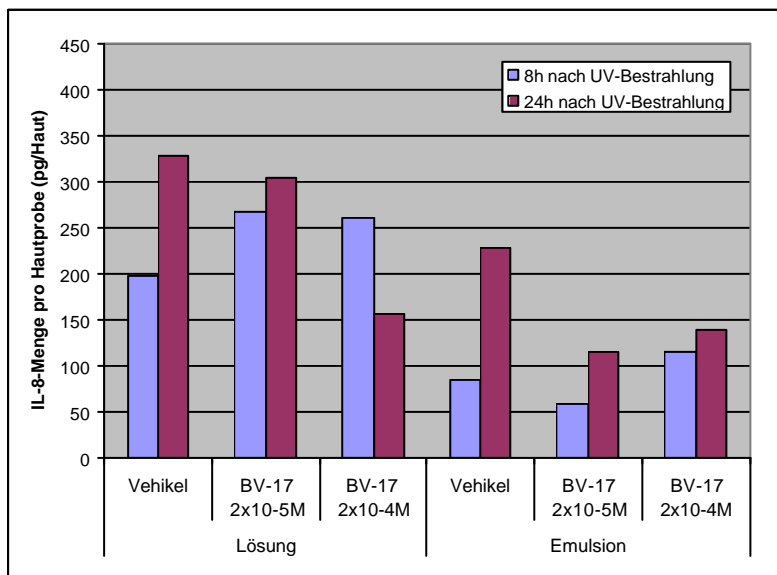


Abb. E.68: Absolute IL-8-Proteinmenge pro Hautprobe im Gewebe des **Natskin-Modells** (grosses Format) nach UV-Bestrahlung (125 mJ/cm²) und nach Applikation von BV-17 in den Dosierungen 2 x 10⁻⁴ M und 2 x 10⁻⁵ M (Ethanol 50 % - PBS 50 % V/V und O/W-Emulsion), nach 8 h und 24 h Inkubation (n = 1)

Die Ergebnisse zur IL-8-Menge im Gewebe korrelieren relativ gut mit den zur IL-8-Sekretion ermittelten Resultaten. Demzufolge decken sich die möglichen Aussagen mit dem bereits zur IL-8-Sekretion Festgestellten (siehe oben).

Einzig die im Natskin-Modell nach 24-stündiger Inkubation vermehrt detektierte IL-8-Sekretion wird durch die aus dem Gewebe analysierten IL-8-Mengen nicht bestätigt.

E.2.2.3 IL-6-Sekretion und Menge im Gewebe

Die folgenden Graphiken zeigen den Effekt von BV-17 in verschiedenen Dosierungen und eingearbeitet in zwei unterschiedliche Vehikel auf das Phenion FT-Modell nach dessen Irritation mit UV-Strahlung anhand der IL-6-Sekretion in das Nährmedium und der IL-6-Menge im Gewebe. Die Analyse von IL-6 ist für das Phenion FT-Modell von besonderem Interesse, da für dieses Modell der pharmakologische Effekt von Glucocorticoiden anhand einer Senkung der IL-6-Sekretion in der Literatur beschrieben ist (Zöller et al. 2006).

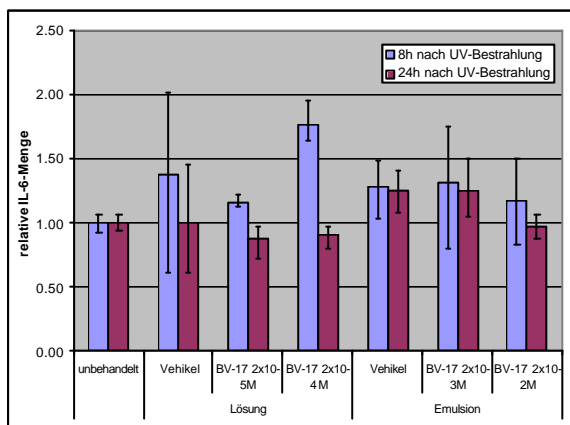


Abb. E.69: Relative IL-6-Proteinmenge im Nährmedium des **Phenion FT-Modells** nach UV-Bestrahlung (100 mJ/cm^2) und nach Applikation von BV-17 in den Dosierungen $2 \times 10^{-4} \text{ M}$ und $2 \times 10^{-5} \text{ M}$ (Ethanol 50 % - PBS 50 % V/V) sowie $2 \times 10^{-3} \text{ M}$ und $2 \times 10^{-2} \text{ M}$ (O/W-Emulsion), nach 8 h und 24 h Inkubation (relativ zur bestrahlten, unbehandelten Hautprobe pro Zeitpunkt) (n = 3, Mittelwert, Angabe der Spannweite)

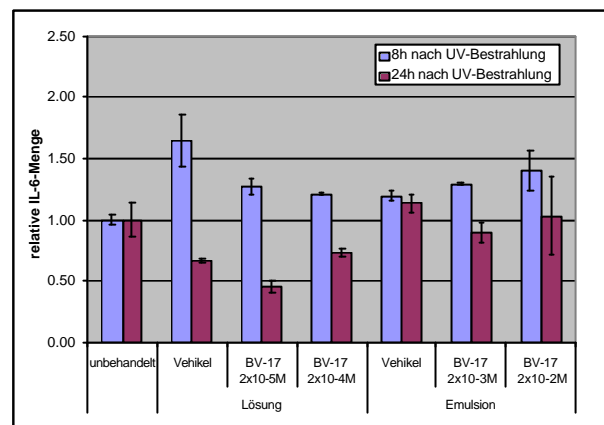


Abb. E.70: Relative IL-6-Proteinmenge im Gewebe des **Phenion FT-Modells** nach UV-Bestrahlung (100 mJ/cm^2) und nach Applikation von BV-17 in den $2 \times 10^{-4} \text{ M}$ und $2 \times 10^{-5} \text{ M}$ (Ethanol 50 % - PBS 50 % V/V) sowie $2 \times 10^{-3} \text{ M}$ und $2 \times 10^{-2} \text{ M}$ (O/W-Emulsion), nach 8 h und 24 h Inkubation (relativ zur bestrahlten, unbehandelten Hautprobe pro Zeitpunkt) (n = 2, Mittelwert, Angabe der Spannweite)

Weder die Ergebnisse zur IL-6-Sekretion noch zur IL-6-Menge im Gewebe lassen eindeutige Aussagen zu. BV-17 zeigt keine pharmakologische Wirkung, es ist kein Vehikeleffekt erkennbar, und die Inkubationszeit scheint keine Rolle zu spielen. Die Beobachtung von Zöller et al. kann somit unter den gewählten Versuchsbedingungen in der vorliegenden Arbeit nicht bestätigt werden.

Fazit

In keinem der überprüften in vitro- / ex vivo-Hautmodelle ist unter den gewählten Versuchsbedingungen nach Applikation von BV-17 eine eindeutige pharmakologische Wirkung detektierbar.

E.2.2.4 Viabilität

Zusätzlich zur Analyse der zellbiologischen Marker wurde die Viabilität der drei in vitro- / ex vivo-Hautmodelle nach deren Irritation mit UV-Strahlung sowie nachfolgender Applikation von BV-17 in verschiedenen Dosierungen und eingearbeitet in zwei unterschiedliche Vehikel beurteilt. Die folgenden Graphiken zeigen die Ergebnisse zum relativen Membrandefekt (LDH-Test) und zur Anzahl an metabolisch aktiven Zellen (MTT-Test):

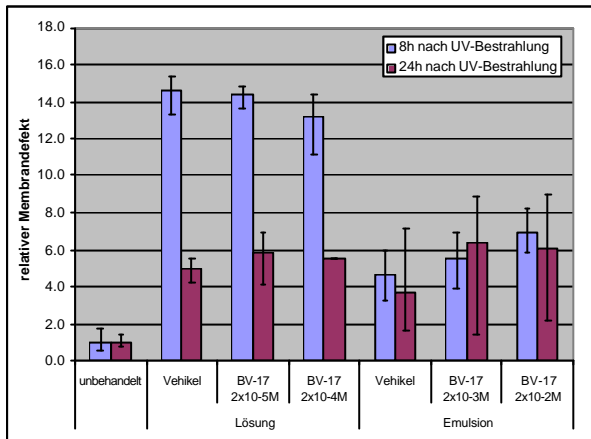


Abb. E.71: Relativer Membrandefekt (LDH-Test) im **SkinEthic-Modell** nach UV-Bestrahlung (60 mJ/cm^2) und nach Applikation von BV-17 in den Dosierungen $2 \times 10^{-4} \text{ M}$ und $2 \times 10^{-5} \text{ M}$ (Ethanol 50 % - PBS 50 % V/V) sowie $2 \times 10^{-3} \text{ M}$ und $2 \times 10^{-2} \text{ M}$ (O/W-Emulsion), nach 8 h und 24 h Inkubation (relativ zur bestrahlten, unbehandelten Hautprobe pro Zeitpunkt) (n = 3, Mittelwert, Angabe der Spannweite)

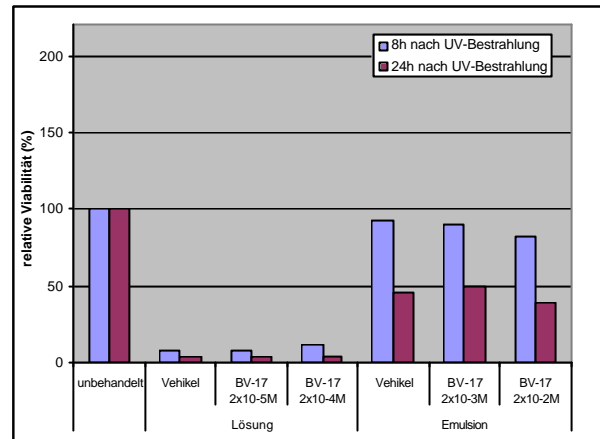


Abb. E.72: Relative Viabilität (Anzahl an metabolisch aktiven Zellen im MTT-Test) im **SkinEthic-Modell** nach UV-Bestrahlung (60 mJ/cm^2) und nach Applikation von BV-17 in den Dosierungen $2 \times 10^{-4} \text{ M}$ und $2 \times 10^{-5} \text{ M}$ (Ethanol 50 % - PBS 50 % V/V) sowie $2 \times 10^{-3} \text{ M}$ und $2 \times 10^{-2} \text{ M}$ (O/W-Emulsion), nach 8 h und 24 h Inkubation, (relativ zur bestrahlten, unbehandelten Hautprobe pro Zeitpunkt) (n = 1)

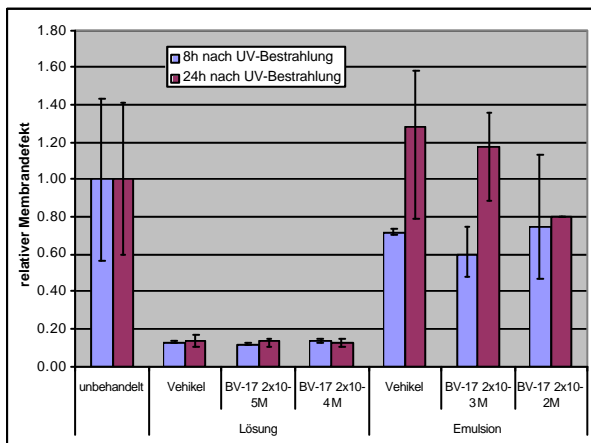


Abb. E.73: Relativer Membrandefekt (LDH-Test) im **Phenion FT-Modell** nach UV-Bestrahlung (100 mJ/cm^2) und nach Applikation von BV-17 in den Dosierungen $2 \times 10^{-4} \text{ M}$ und $2 \times 10^{-5} \text{ M}$ (Ethanol 50 % - PBS 50 % V/V) sowie $2 \times 10^{-3} \text{ M}$ und $2 \times 10^{-2} \text{ M}$ (O/W-Emulsion), nach 8 h und 24 h Inkubation (relativ zur bestrahlten, unbehandelten Hautprobe pro Zeitpunkt) (n = 3, Mittelwert, Angabe der Spannweite)

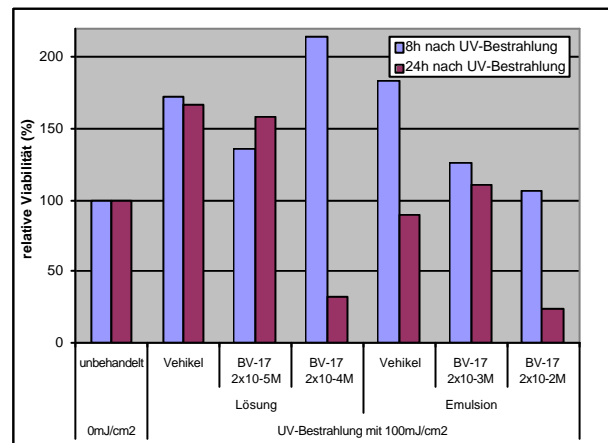


Abb. E.74: Relative Viabilität (Anzahl an metabolisch aktiven Zellen im MTT-Test) im **Phenion FT-Modell** nach UV-Bestrahlung (100 mJ/cm^2) und nach Applikation von BV-17 in den Dosierungen $2 \times 10^{-4} \text{ M}$ und $2 \times 10^{-5} \text{ M}$ (Ethanol 50 % - PBS 50 % V/V) sowie $2 \times 10^{-3} \text{ M}$ und $2 \times 10^{-2} \text{ M}$ (O/W-Emulsion), nach 8 h und 24 h Inkubation, (relativ zur unbestrahlten, unbehandelten Hautprobe pro Zeitpunkt) (n = 1)

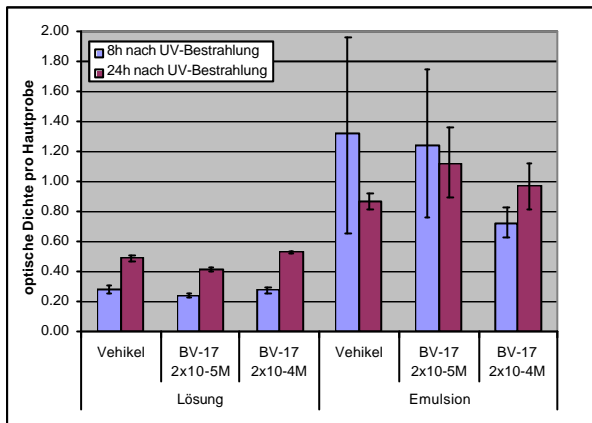


Abb. E.75: Absolute optische Dichte pro Hautprobe (LDH-Test) im **Natskin-Modell** (grosses Format) nach UV-Bestrahlung (125 mJ/cm^2) und nach Applikation von BV-17 in den Dosierungen $2 \times 10^{-4} \text{ M}$ und $2 \times 10^{-5} \text{ M}$ (Ethanol 50 % - PBS 50 % V/V und O/W-Emulsion), nach 8 h und 24 h Inkubation (8 h n = 4, 24 h n = 2, Mittelwert, Angabe der Spannweite)
Je höher die optische Dichte, desto schlechter die Membranintegrität.

Im SkinEthic-Modell ist nach Applikation der ethanolisch-wässrigen Lösung sowohl ein deutlicher relativer Membrandefekt (LDH-Test) als auch eine ausgeprägte Reduktion der Anzahl an metabolisch aktiven Zellen (MTT-Test) gegenüber der bestrahlten, aber unbehandelten Hautprobe vorhanden. Die O/W-Emulsion zeigt hingegen keinen entsprechenden Vehikeleffekt. Die ethanolisch-wässrige Lösung übt somit auf das SkinEthic-Modell eine deutliche Reizwirkung aus. Dieser Befund bestätigt die bereits anhand der IL-1a-Sekretion gemachte Feststellung (vgl. E.2.1.1).

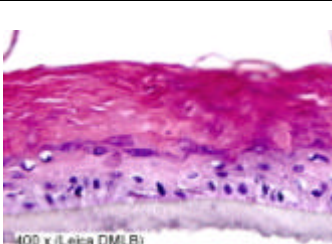
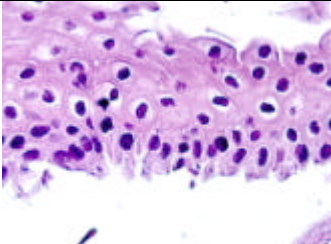




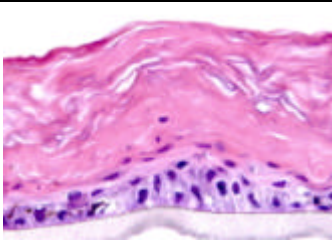
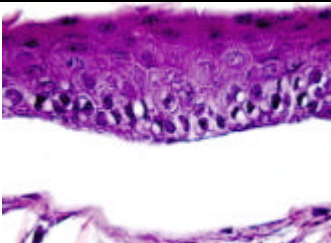
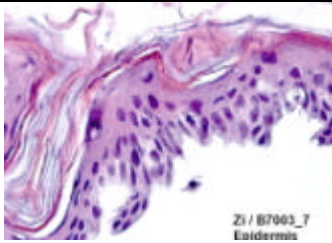
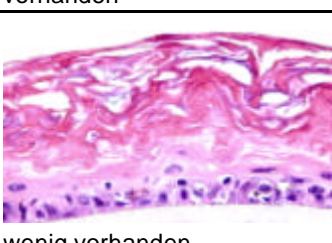


Im Phenion FT-Modell ist anhand des LDH- und des MTT-Tests weder für die ethanolisch-wässrige Lösung noch für die O/W-Emulsion ein schädigender Vehikeleffekt erkennbar. Die Viabilität des SkinEthic-Modells ist somit gegenüber der Reizwirkung des Vehikels anfälliger. Diese erhöhte Empfindlichkeit hat sich bereits in Reaktion auf die UV-Bestrahlung gezeigt (vgl. E.2.1.4). Im Gegensatz zum Phenion FT-Modell fehlt im SkinEthic-Modell die Dermis. Die Präsenz einer Dermis ist offenbar aber wichtig, da sie Hautmodelle gegenüber schädigenden Einflüssen robuster zu machen scheint.

Der Wirkstoff BV-17 beeinflusst in keinem der drei überprüften Hautmodelle die Viabilität nachweislich.

Ergänzend zum LDH- und MTT-Test wurden zu den Hautproben histologische Präparate hergestellt. Im Folgenden sind ausgewählte Bilder dargestellt:

	SkinEthic bestrahlt mit 60 mJ/cm^2	Phenion FT bestrahlt mit 100 mJ/cm^2	Natskin bestrahlt mit 125 mJ/cm^2
Hämalaun-Eosin			
unbehandelt			(nicht vorhanden)
Farbkontrast:	vorhanden	wenig vorhanden	
Anhaften am Untergrund:	fest	fest	
Zell-Zell-Adhäsion:	wenig aufgelockert	wenig aufgelockert	
Stratum corneum:	stark gequollen	kompakt	
Sunburn Cells:	vorhanden	vorhanden	

Abb. E.76: Ausgewählte histologische Präparate zum Skinethic, Phenion FT- und Natskin-Modell, nach UV-Bestrahlung und nach Applikation der ethanolisch-wässrigen Lösung (mit / ohne BV-17) und der O/W-Emulsion (mit / ohne BV-17), nach 24 h Inkubation, Hämalaun-Eosin-Färbung, Vergrößerung 400-fach

	SkinEthic bestrahlt mit 60mJ/cm ²	Phenion FT bestrahlt mit 100mJ/cm ²	Natskin bestrahlt mit 125mJ/cm ²
Hämalaun-Eosin			
Vehikel Ethanol 50 % - PBS 50 % (V/V)			
Farbkontrast:	wenig vorhanden	nicht vorhanden (beachte fehlendes Stratum corneum)	wenig vorhanden
Anhaften am Untergrund:	fest	vollständig abgelöst	vollständig abgelöst
Zell-Zell-Adhäsion:	wenig aufgelockert	stark aufgelockert	fest
Stratum corneum:	stark gequollen	abgelöst (fehlt)	gequollen
Sunburn Cells:	vorhanden	ausgeprägt vorhanden	vorhanden
BV-17 2x10 ⁻⁴ M Ethanol 50 % - PBS 50 % (V/V)			
Farbkontrast:	wenig vorhanden	nicht vorhanden (beachte fehlendes Stratum corneum)	wenig vorhanden
Anhaften am Untergrund:	fest	vollständig abgelöst	vollständig abgelöst
Zell-Zell-Adhäsion:	aufgelockert	wenig aufgelockert	fest
Stratum corneum:	stark gequollen	abgelöst (fehlt)	gequollen
Sunburn Cells:	vorhanden	ausgeprägt vorhanden	vorhanden
Vehikel O/W-Emulsion			
Farbkontrast:	wenig vorhanden	nicht vorhanden (beachte fehlendes Stratum corneum)	wenig vorhanden
Anhaften am Untergrund:	fest	vollständig abgelöst	vollständig abgelöst
Zell-Zell-Adhäsion:	aufgelockert	wenig aufgelockert	fest
Stratum corneum:	sehr stark gequollen	abgelöst (fehlt)	gequollen
Sunburn Cells:	vorhanden	ausgeprägt vorhanden	vorhanden
BV-17 2x10 ⁻⁴ M (für SkinEthic u. Phenion FT) BV-17 2x10 ⁻² M (für Natskin) O/W-Emulsion			
Farbkontrast:	wenig vorhanden	nicht vorhanden (beachte fehlendes Stratum corneum)	wenig vorhanden
Anhaften am Untergrund:	fest	vollständig abgelöst	vollständig abgelöst
Zell-Zell-Adhäsion:	aufgelockert	stark aufgelockert	fest
Stratum corneum:	sehr stark gequollen	abgelöst (fehlt)	gequollen
Sunburn Cells:	vorhanden	ausgeprägt vorhanden	vorhanden

(Fortsetzung Abb. E.76)

Es fällt der generell schlechte Zustand des SkinEthic- und auch des Phenion FT-Modells auf. Der kaum vorhandene Rosa / Violett-Farbkontrast (Hämalaun-Eosin-Färbung) im SkinEthic-Modell weist auf einen Reizzustand hin. Im Phenion FT-Modell sind vor allem die Ablösung der Epidermis von der Dermis sowie eine teilweise starke Auflockerung der Zell-Zell-Adhäsion deutliche Anzeichen für eine Irritation. Die Reizung erscheint nach Applikation der Formulierungen verstärkt. Die Art des Vehikels oder der Wirkstoff BV-17 selbst scheinen dabei aber keine wesentliche Rolle zu spielen. Daneben ist auf das generell stark gequollene Stratum corneum im SkinEthic-Modell hinzuweisen. Da die Beobachtung auch für die unbehandelte Hautprobe gilt, kann dies nicht allein durch die applizierten Formulierungen verursacht worden sein. Die Emulsion scheint allerdings die Quellung zusätzlich zu verstärken.

Die histologischen Präparate zum Natskin-Modell geben kaum Hinweise für eine Beurteilung der Viabilität. Die zu beobachtende Ablösung der Epidermis von der Dermis dürfte im Falle des Natskin-Modells primär auf ein Handling-Problem zurückzuführen sein (Ablösung beim Entfernen des Kunststoffrings).

Die aufgrund des LDH- und MTT-Test gemachten Aussagen zum Vehikeleffekt sowie zur unterschiedlichen Empfindlichkeit der Hautmodelle können in den histologischen Präparaten nicht differenziert werden.

E.2.2.5 Penetration / Permeation von BV-17

Parallel zum pharmakologischen Effekt wird das Penetrations- / Permeationsverhalten von BV-17 aus zwei unterschiedlichen Vehikeln in die drei in vitro- / ex vivo-Hautmodelle untersucht. Die überprüften Vehikel sind eine ethanolisch-wässrige Lösung (Ethanol 50 % - PBS 50 % V/V) und eine O/W-Emulsion (auf Pemulen-Basis) (zur Charakterisierung der beiden Vehikel siehe D.3.1.2). Die BV-17-Dosierung wird so gewählt, dass die Wirkstoffkonzentration in der direkt hautberührenden Phase in beiden Formulierungen identisch ist. Die folgenden Tabellen und Graphiken geben einen Überblick über die Ergebnisse. In den Tabellen sind die pro Hautprobe absolut gefundenen BV-17-Mengen zu den einzelnen Messkompartimenten aufgeführt. Die Graphiken zeigen die entsprechende Verteilung von BV-17, wobei pro Kompartiment der BV-17-Anteil relativ zur total pro Hautprobe applizierten Menge angegeben ist.

a) SkinEthic-Modell

Tab. E.6: Absolute BV-17-Mengen in den Kompartimenten zum SkinEthic-Modell nach 8h und 24 h Inkubation, Applikation einer Lösung (BV-17 2×10^{-5} M und 2×10^{-4} M) und einer O/W-Emulsion (BV-17 2×10^{-3} M und 2×10^{-2} M), Applikationsvolumen $500 \mu\text{l}/\text{cm}^2$, nach UV-Bestrahlung ($60 \text{ mJ}/\text{cm}^2$) (Medium / Überstand n = 3, Hautlysat n = 2, Mittelwert, Angabe der Spannweite)

	BV-17-Menge pro Hautprobe ($\mu\text{g}/\text{Hautprobe}$)					
	nach 8 h Inkubation			nach 24 h Inkubation		
	Mittelwert	Min.	Max.	Mittelwert	Min.	Max.
Lösung (Ethanol 50 % - PBS 50 % V/V) mit BV-17 2×10^{-5} M (entspricht total $2.385 \mu\text{g}/\text{Hautprobe}$)						
Medium	0.65	0.65	0.66	0.54	0.49	0.57
SkinEthic-Hautlysat	0.59	0.51	0.67	0.34	0.30	0.37
Überstand	0.70	0.68	0.74	0.15	0.14	0.17
Lösung (Ethanol 50 % - PBS 50 % V/V) mit BV-17 2×10^{-4} M (entspricht total $23.85 \mu\text{g}/\text{Hautprobe}$)						
Medium	6.56	6.43	6.80	4.88	3.41	5.92
SkinEthic-Hautlysat	5.89	5.15	6.63	2.75	1.96	3.54
Überstand	6.40	6.02	6.60	1.76	1.23	2.33
Emulsion (O/W-Emulsion auf Pemulen-Basis) mit BV-17 2×10^{-3} M (entspricht total $238.5 \mu\text{g}/\text{Hautprobe}$)						
Medium	0.06	0.06	0.07	0.18	0.16	0.19
SkinEthic-Hautlysat	1.06	0.92	1.20	0.71	0.55	0.86
Überstand	118.60	92.21	137.95	139.75	99.65	175.77
Emulsion (O/W-Emulsion auf Pemulen-Basis) mit BV-17 2×10^{-2} M (entspricht total $2385 \mu\text{g}/\text{Hautprobe}$)						
Medium	0.47	0.42	0.51	1.25	1.08	1.45
SkinEthic-Hautlysat	11.76	9.83	13.68	12.57	8.05	17.08
Überstand	1183.20	1072.21	1259.17	805.11	674.37	924.79

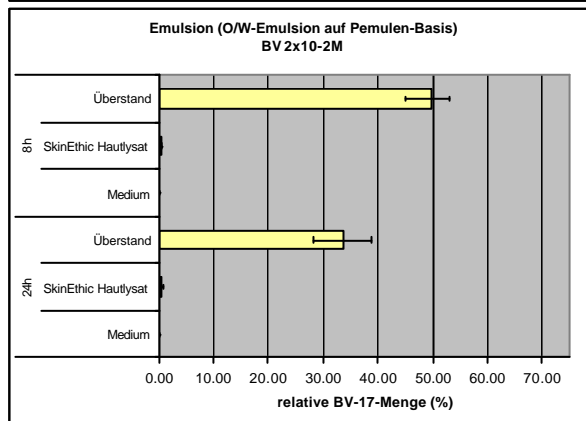
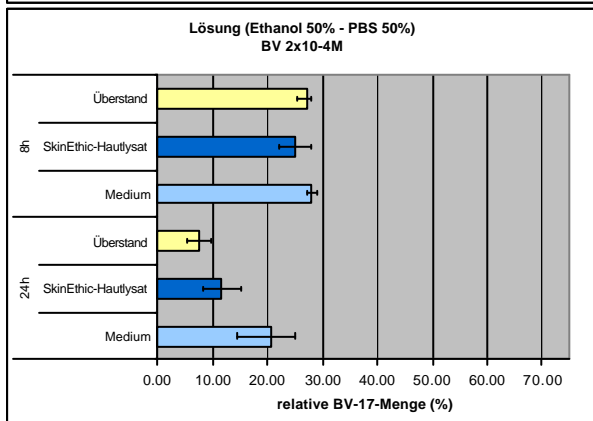
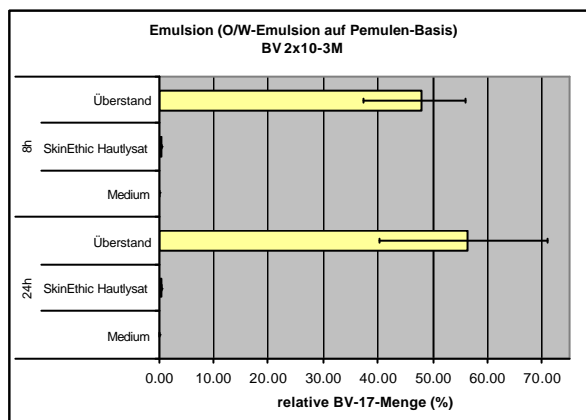
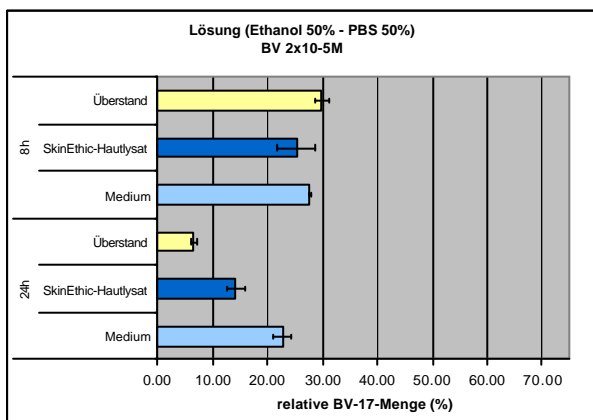


Abb. E.77: Relative Verteilung von BV-17 auf die Kompartimente im SkinEthic-Modell nach 8 h und 24 h Inkubation, Applikation einer Lösung (BV-17 2×10^{-5} M und 2×10^{-4} M), Applikationsvolumen $500 \mu\text{l}/\text{cm}^2$, nach UV-Bestrahlung ($60 \text{ mJ}/\text{cm}^2$) (relativ zur total applizierten BV-17-Menge pro Hautprobe) (Medium / Überstand n = 3, Hautlysat n = 2, Mittelwert, Angabe der Spannweite)

Abb. E.78: Relative Verteilung von BV-17 auf die Kompartimente im SkinEthic-Modell nach 8 h und 24 h Inkubation, Applikation einer O/W-Emulsion (BV-17 2×10^{-3} M und 2×10^{-2} M), Applikationsvolumen $500 \mu\text{l}/\text{cm}^2$, nach UV-Bestrahlung ($60 \text{ mJ}/\text{cm}^2$) (relativ zur total applizierten BV-17-Menge pro Hautprobe) (Medium / Überstand n = 3, Hautlysat n = 2, Mittelwert, Angabe der Spannweite)

b) Phenion FT-Modell

Tab. E.7: Absolute BV-17-Mengen in den Kompartimenten zum Phenion FT-Modell nach 8 h und 24 h Inkubation, Applikation einer Lösung (BV-17 2×10^{-5} M und 2×10^{-4} M) und einer O/W-Emulsion (BV-17 2×10^{-3} M und 2×10^{-2} M), Applikationsvolumen $37.7 \mu\text{l}/\text{cm}^2$, nach UV-Bestrahlung ($100 \text{ mJ}/\text{cm}^2$) (Medium / Überstand n = 3, Hautlysats n = 2, Mittelwert, Angabe der Spannweite)

	BV-17-Menge pro Hautprobe ($\mu\text{g}/\text{Hautprobe}$)					
	nach 8 h Inkubation			nach 24 h Inkubation		
	Mittelwert	Min.	Max.	Mittelwert	Min.	Max.
Lösung (Ethanol 50 % - PBS 50 % V/V) mit BV-17 2×10^{-5} M (entspricht total $0.477 \mu\text{g}/\text{Hautprobe}$)						
Medium	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Phenion FT-Hautlysats	0.21	0.17	0.25	0.15	0.14	0.16
Überstand	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Lösung (Ethanol 50 % - PBS 50 % V/V) mit BV-17 2×10^{-4} M (entspricht total $4.77 \mu\text{g}/\text{Hautprobe}$)						
Medium	0.12	0.06	0.22	0.18	0.08	0.31
Phenion FT-Hautlysats	1.75	0.67	2.82	0.81	0.70	0.92
Überstand	0.42	0.00	0.88	0.11	0.00	0.34
Emulsion (O/W-Emulsion auf Pemulen-Basis) mit BV-17 2×10^{-3} M (entspricht total $47.7 \mu\text{g}/\text{Hautprobe}$)						
Medium	0.00	0.00	0.00	0.02	0.00	0.03
Phenion FT-Hautlysats	0.47	0.42	0.53	0.92	0.70	1.14
Überstand	34.35	33.87	34.65	32.94	30.66	35.41
Emulsion (O/W-Emulsion auf Pemulen-Basis) mit BV-17 2×10^{-2} M (entspricht total $477 \mu\text{g}/\text{Hautprobe}$)						
Medium	0.05	0.00	0.10	0.21	0.18	0.25
Phenion FT-Hautlysats	4.25	4.25	4.26	5.42	3.11	7.73
Überstand	283.29	193.91	345.71	252.15	198.07	328.27

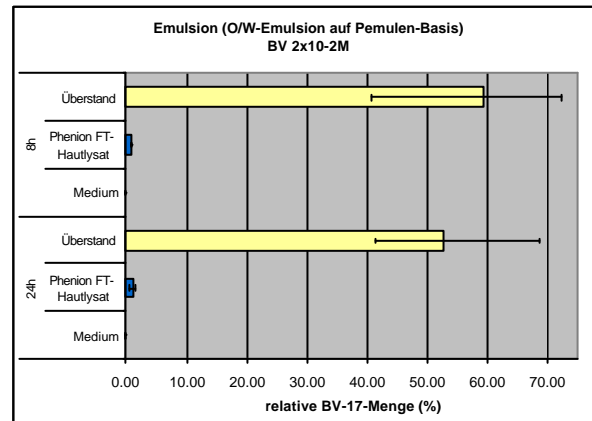
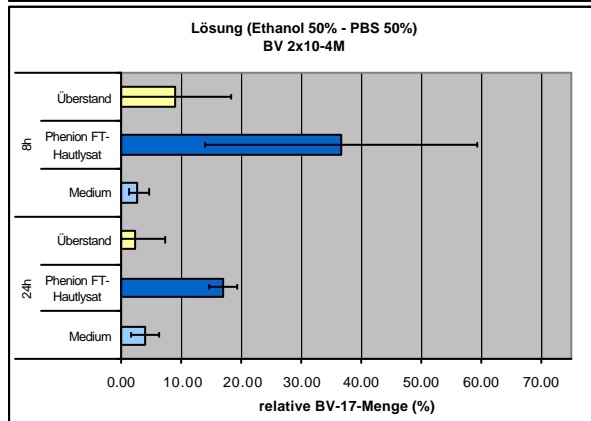
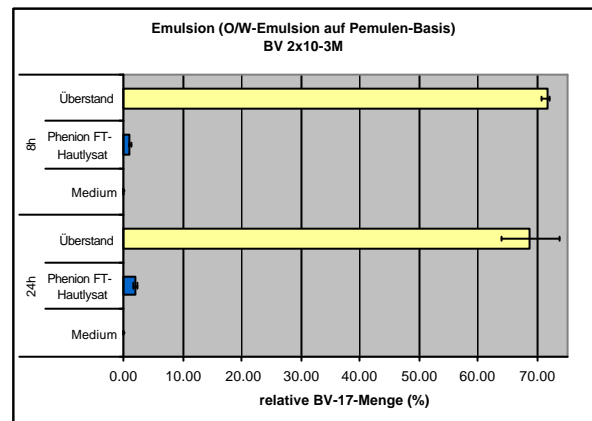
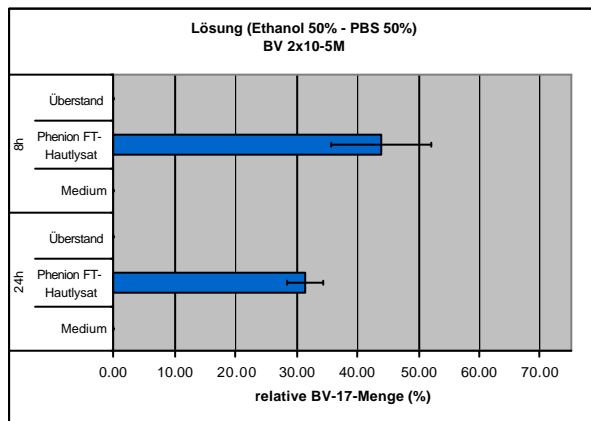


Abb. E.79: Relative Verteilung von BV-17 auf die Kompartimente im Phenion FT-Modell nach 8 h und 24 h Inkubation, Applikation einer Lösung (BV-17 2×10^{-5} M und 2×10^{-4} M), Applikationsvolumen $37.7 \mu\text{l}/\text{cm}^2$, nach UV-Bestrahlung ($100 \text{ mJ}/\text{cm}^2$) (relativ zur total applizierten BV-17-Menge pro Hautprobe) (Medium / Überstand n = 3, Hautlysats n = 2, Mittelwert, Angabe der Spannweite)

Abb. E.80: Relative Verteilung von BV-17 auf die Kompartimente im Phenion FT-Modell nach 8 h und 24 h Inkubation, Applikation einer O/W-Emulsion (BV-17 2×10^{-3} M und 2×10^{-2} M), Applikationsvolumen $37.7 \mu\text{l}/\text{cm}^2$, nach UV-Bestrahlung ($100 \text{ mJ}/\text{cm}^2$) (relativ zur total applizierten BV-17-Menge pro Hautprobe) (Medium / Überstand n = 3, Hautlysats n = 2, Mittelwert, Angabe der Spannweite)

c) Natskin-Modell

Tab. E.8: Absolute BV-17-Mengen in den Kompartimenten zum Natskin-Modell (grosses Format) nach 8 h und 24 h Inkubation, Applikation einer Lösung und einer O/W-Emulsion (BV-17 2×10^{-5} M und 2×10^{-4} M), Applikationsvolumen $127.3 \mu\text{l}/\text{cm}^2$, nach UV-Bestrahlung ($125 \text{ mJ}/\text{cm}^2$) (Medium / Überstand n = 2, Hautlysat und Kunststoffring n = 1, Mittelwert, wo möglich Angabe der Spannweite)

	BV-17-Menge pro Hautprobe ($\mu\text{g}/\text{Hautprobe}$)					
	nach 8 h Inkubation			nach 24 h Inkubation		
	Mittelwert	Min.	Max.	Mittelwert	Min.	Max.
Lösung (Ethanol 50 % - PBS 50 % V/V) mit BV-17 2×10^{-5} M (entspricht total $0.954 \mu\text{g}/\text{Hautprobe}$)						
Medium	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Natskin-Hautlysat	0.28	-	-	0.12	-	-
Überstand	0.29	0.29	0.30	0.21	0.20	0.21
Kunststoffring	0.57	-	-	0.71	-	-
Lösung (Ethanol 50 % - PBS 50 % V/V) mit BV-17 2×10^{-4} M (entspricht total $9.54 \mu\text{g}/\text{Hautprobe}$)						
Medium	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Natskin-Hautlysat	1.43	-	-	1.07	-	-
Überstand	1.66	1.50	1.82	0.89	0.72	1.06
Kunststoffring	4.64	-	-	6.76	-	-
Emulsion (O/W-Emulsion auf Pemulen-Basis) mit BV-17 2×10^{-5} M (entspricht total $0.954 \mu\text{g}/\text{Hautprobe}$)						
Medium	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Natskin-Hautlysat	0.00	-	-	0.04	-	-
Überstand	0.52	0.52	0.53	0.55	0.49	0.60
Kunststoffring	0.00	-	-	0.15	-	-
Emulsion (O/W-Emulsion auf Pemulen-Basis) mit BV-17 2×10^{-4} M (entspricht total $9.54 \mu\text{g}/\text{Hautprobe}$)						
Medium	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Natskin-Hautlysat	0.00	-	-	0.00	-	-
Überstand	4.36	4.10	4.62	4.67	4.54	4.80
Kunststoffring	0.29	-	-	0.27	-	-

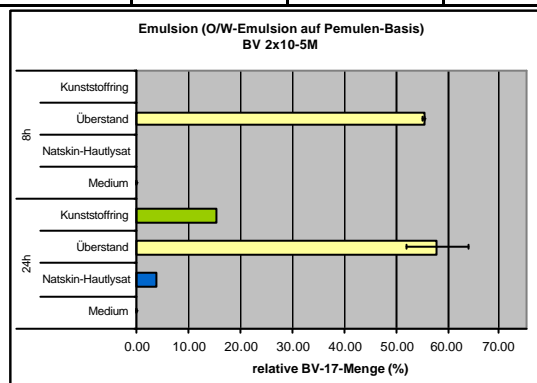
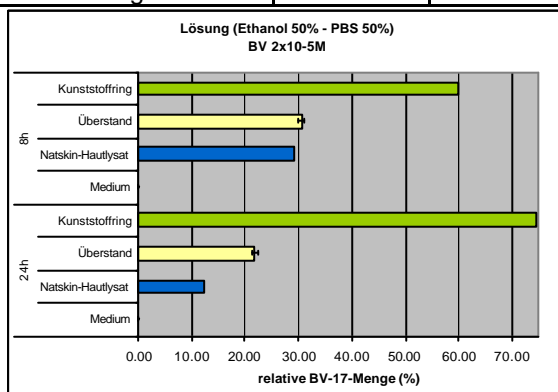


Abb. E.81: Relative Verteilung von BV-17 auf die Kompartimente im Natskin-Modell (grosses Format) nach 8 h und 24 h Inkubation, Applikation einer Lösung (BV-17 2×10^{-5} M und 2×10^{-4} M), Applikationsvolumen $127.3 \mu\text{l}/\text{cm}^2$, nach UV-Bestrahlung ($125 \text{ mJ}/\text{cm}^2$) (relativ zur total applizierten BV-17-Menge pro Hautprobe) (Medium / Überstand n = 2, Hautlysat / Kunststoffring n = 1, Mittelwert, Angabe der Spannweite)

Abb. E.82: Relative Verteilung von BV-17 auf die Kompartimente im Natskin-Modell (grosses Format) nach 8 h und 24 h Inkubation, Applikation einer O/W-Emulsion (BV-17 2×10^{-5} M und 2×10^{-4} M), Applikationsvolumen $127.3 \mu\text{l}/\text{cm}^2$, nach UV-Bestrahlung ($125 \text{ mJ}/\text{cm}^2$) (relativ zur total applizierten BV-17-Menge pro Hautprobe) (Medium / Überstand n = 2, Hautlysat / Kunststoffring n = 1, Mittelwert, Angabe der Spannweite)

Die vorliegenden Resultate zeigen die Penetration von BV-17 in das SkinEthic- und in das Phenion FT-Modell sowohl nach Applikation der Lösung als auch der O/W-Emulsion. Damit ist die Präsenz des Wirkstoffs am Wirkort belegt, was eine Grundvoraussetzung für die Ausübung eines pharmakologischen Effektes ist.

Im Natskin-Modell ist die Penetration von BV-17 nur nach Anwendung der Lösung nachweisbar. Für die Versuche an der Natskin-Haut war die BV-17-Konzentration in der O/W-Emulsion jedoch tiefer als dies für die beiden anderen Modelle der Fall war (Natskin: 2×10^{-5} M und 2×10^{-4} M, SkinEthic und Phenion FT: 2×10^{-3} M und 2×10^{-2} M). Eine möglicherweise vorhandene Penetration kann somit aufgrund der analytischen Nachweisgrenze nicht mehr detektiert werden.

Wird die Wirkstoffpermeation in die drei überprüften Hautmodelle verglichen, zeigt sich das SkinEthic-Modell für BV-17 am durchlässigsten. 24 h nach Applikation der Lösung liegt der Hauptanteil des auf die Hautoberfläche aufgetragenen Wirkstoffs im Akzeptorkompartiment (Nährmedium) vor. Auch durch das Phenion FT-Modell wird für BV-17 aus der Lösung eine Permeation detektiert, allerdings in geringerem Ausmass. Hingegen erweist sich das Natskin-Modell für BV-17 als undurchlässig. Die beiden in vitro rekonstruierten Hautmodelle SkinEthic und Phenion FT sind für BV-17 somit deutlich permeabler als das ex vivo-Hautmodell Natskin. Diese Beobachtung steht im Einklang mit entsprechenden Angaben in der Literatur. Es existieren verschiedene Untersuchungen, welche für in vitro rekonstruierte Haut eine gegenüber nativer Haut erhöhte Durchlässigkeit beschreiben und dafür die unvollständige Ausbildung der Hautbarriere verantwortlich machen (Ponec et al. 2001; Netzlauff et al. 2005; Schafer-Korting et al. 2006).

Im Phenion FT-Modell ist nach Applikation der Lösung der Hautanteil des Wirkstoffs im Hautlysat lokalisiert, was auf die Präsenz der Dermis zurückgeführt werden könnte. Eine entsprechende Anreicherung wird im Epidermis-Modell SkinEthic nicht beobachtet. Die hydrophile Dermis stellt besonders für lipophile Substanzen wie die Glucocorticoide eine effiziente Barriere dar. Die Konsequenz ist die Ausbildung eines Wirkstoffdepots im lipophileren Stratum corneum (Vickers 1963; Vickers 1972; Barry 1983) (vgl. auch C.3.5).

Der Einfluss des Vehikels auf die Verteilung von BV-17 auf die verschiedenen Kompartimente ist besonders deutlich. Während ein grosser Anteil der in die ethanolisch-wässrige Lösung eingearbeiteten BV-17-Menge in die Haut eindringt, verbleibt der Wirkstoff nach Applikation der O/W-Emulsion praktisch ausschliesslich im Vehikel. Wird allerdings nicht die relative Verteilung der gesamthaft in das Vehikel eingearbeiteten BV-17-Menge, sondern der absolut in der Haut selbst detektierte Wirkstoff betrachtet, ist der Unterschied zwischen den Vehikeln nicht mehr so ausgeprägt. Die effektiv penetrierten respektive permeierten BV-17-Mengen bewegen sich für beide Vehikel im SkinEthic- und im Phenion FT-Modell in der gleichen Grössenordnung.

Diese Beobachtungen hängen mit dem Verteilungskoeffizienten von BV-17 zusammen. Als lipophile Substanz reichert sich diese in der inneren Phase der O/W-Emulsion an. Im Rahmen der Charakterisierung der Vehikel konnte gezeigt werden, dass BV-17 in der vorliegenden Emulsion zu 99 % in der Lipid- und nur zu rund 1% in der Wasserphase vorliegt (vgl. D.3.1.2.2). Dies erklärt, warum BV-17 anteilmässig kaum aus der Emulsion freigesetzt wird. Das vorliegende Ergebnis zeigt somit, dass die effektive Hautpenetration / -permeation nicht von der gesamthaft im Vehikel dosierten, sondern von der in der direkt hautberührenden Phase vorliegenden Wirkstoffkonzentration abhängt.

Im Vergleich zur O/W-Emulsion fördert die ethanolisch-wässrige Lösung die BV-17-Permeation im SkinEthic-Modell. Parallel dazu haben die Viabilitätstests zum SkinEthic-Modell eine durch die Lösung verursachte Zellmembranschädigung (LDH-Test) sowie reduzierte Anzahl an metabolisch aktiven Zellen (MTT-Test) gezeigt (vgl. E.2.2.4). Die Erhöhung der Wirkstoffpermeabilität scheint somit mit einer allgemeinen Schädigung der Haut einher zu gehen. Verantwortlich für diesen Effekt dürfte primär der zu 50 % enthaltene Ethanol sein.

Im Phenion FT-Modell ist der permeationsfördernde Effekt der ethanolisch-wässrigen Lösung hingegen nicht erkennbar. In Übereinstimmung dazu wurde auch weder mittels LDH- noch mittels MTT-Test ein schädigender Vehikeleffekt festgestellt (vgl. E.2.2.4). Dieses Ergebnis bestätigt die erhöhte Empfindlichkeit des SkinEthic-Modells gegenüber reizenden Einflüssen.

Allgemein kann ausgesagt werden, dass in allen drei Hautmodellen und für beide Vehikel eine gute Übereinstimmung der jeweils zu den beiden BV-17-Dosierungen gefundenen Resultate vorliegt. Das beschriebene Penetrations- / Permeationsverhalten zeigt sich im überprüften Bereich somit unabhängig von der applizierten BV-17-Dosis.

Im Natskin-Modell ist zusätzlich ein Kunststoffring als Applikationshilfe integriert (vgl. D.1.3). Es hat sich gezeigt, dass sowohl nach Applikation der Lösung als auch der Emulsion BV-17 bevorzugt in diesen Kunststoffring eindringt. Die Penetration in die Haut ist demgegenüber für beide Vehikel deutlich reduziert. Die Verteilung in den Kunststoffring wird dabei durch die Lösung begünstigt. Dieser Artefakt ist für die Interpretation der Daten zum Natskin-Modell problematisch.

Der Einfluss der Inkubationszeit zeigt sich in den drei Hautmodellen etwas unterschiedlich. Während im SkinEthic-Modell die durch die Lösung begünstigte BV-17-Permeation mit der Zeit deutlich fortschreitet und nach 24 h Inkubationszeit eine klare Anreicherung im Nährmedium vorliegt, ist ein entsprechender Verlauf im Phenion FT-Modell nur ansatzweise zu beobachten. Im Natskin-Modell kumuliert der Wirkstoff mit der Zeit im Kunststoffring. Nach Applikation der Emulsion verhält sich die Situation analog.

Bei genauerer Betrachtung der Daten fällt allgemein eine mit der Zeit verringerte Wirkstoffmenge auf. Eine analoge Reduktion der detektierten BV-17-Konzentrationen wurde bereits im Rahmen der detaillierten Erfassung des BV-17-Permeationsprofils gezeigt (vgl. E.1.5). Dieser Effekt dürfte in erster Linie auf die chemische Instabilität von BV-17 zurückzuführen sein (vgl. C.3.6 und D.3.1). Die in der Literatur beschriebene Umlagerung von BV-17 zu BV-21 kann in den Chromatogrammen detektiert werden (vgl. Beispiel im Anhang H.6.1).

Alle hier gezeigten Resultate zum Penetrations- / Permeationsverhalten von BV-17 wurden an bestrahlten Hautproben ermittelt. Inwiefern dieses durch die UV-Strahlung beeinflusst wird, war nicht Gegenstand der vorliegenden Untersuchungen. Allerdings kann anhand eines am SkinEthic-Modell durchgeführten Vorversuchs eine Abschätzung vorgenommen werden. 24 h nach Bestrahlung mit einer UV-Dosis von 250 mJ/cm^2 und nach der Applikation einer ethanolisch-wässrigen Lösung (BV-17 $2 \times 10^{-6} \text{ M}$) war die BV-17-Verteilung zwischen dem Nährmedium, den Formulierungsresten auf der Oberfläche sowie der Haut selbst gegenüber der unbestrahlten Hautprobe nicht wesentlich verändert (Daten nicht gezeigt).

F Schlussfolgerung und Ausblick

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen die Möglichkeiten und Grenzen der zurzeit vorhandenen *in vitro*- / *ex vivo*-Hautmodelle bei der Erfassung der Reaktion auf externe Reize sowie der Wirkung einer antiinflammatorischen Behandlung. Untersucht wurden drei Modelle, die sich in ihrem Aufbau grundlegend unterscheiden. Zum einen waren ein *in vitro* rekonstruiertes Epidermismodell (SkinEthic) und ein Vollhautmodell (Phenion FT), zum anderen eine *ex vivo* entnommene und kultivierte Hautbiopsie (Natskin) von Interesse.

Es ist möglich, *in vitro* sowohl Dermis als auch Epidermis zu rekonstruieren, die in ihrer dreidimensionalen Struktur derjenigen von nativer Haut weitgehend entsprechen. Analog zur *in vivo* Situation sind darin die Expression von epidermalen Differenzierungsmarkern und die Präsenz von allen wichtigen Hautlipiden nachweisbar (Ponec et al. 2002).

Werden die rekonstruierten Hautmodelle externen Reizen ausgesetzt, vermögen sie darauf zu reagieren. In der vorliegenden Arbeit konnte anhand des SkinEthic-Modells gezeigt werden, dass neben Art und Dosierung des Reizes vor allem die Wahl des geeigneten Reizindikators eine entscheidende Rolle spielt. Irritationsbedingte Zustände lassen sich im SkinEthic-Modell am besten über die IL-1a-Sekretion in das Nährmedium quantifizieren. Nach Bestrahlung im UVA / UVB-Bereich (290 - 400 nm, 20 - 320 mJ/cm²) sowie nach Applikation des chemischen Irritans SDS (0.1 - 0.4 %) konnte eine dosisabhängige Steigerung der IL-1a-Sekretion detektiert werden. Die Anwendung von BV-17 in einer topisch üblichen Dosierung (2 x 10⁻³ M) induzierte einen analogen Effekt. Die vorliegende Arbeit zeigt somit zum ersten Mal den proirritativen Effekt eines Glucocorticoids im *in vitro* rekonstruierten Hautmodell. Daneben konnte anhand der IL-1a-Sekretion zwischen der Reizwirkung von zwei unterschiedlichen Vehikeln differenziert werden.

Nach UV-Bestrahlung des SkinEthic-Modells stimmt die gesteigerte IL-1a-Sekretion in das Nährmedium mit einer aufregulierten IL-1a-de novo-Synthese überein. Aus physiologischer Sicht ist dies sinnvoll. IL-1a ist ein primäres Zytokin, welches eine wichtige Rolle als Mediator im Ablauf von Entzündungsreaktionen spielt. Infolge eines Reizes muss IL-1a somit nicht nur vermehrt exprimiert, sondern zur Ausübung seiner Funktion als Botenstoff aus der Zelle auch ausgeschüttet werden. Da gezeigt werden konnte, dass die IL-1a-Sekretion und die Schädigung der Plasmamembran (LDH-Test) im mittleren UV-Dosisbereich schlecht korrelieren, wird IL-1a durch intakte Membranen ausgeschleust.

Das Phenion FT- sowie auch das Natskin-Modell reagieren teilweise anders auf die UV-Bestrahlung als das SkinEthic-Modell. Während beispielsweise die IL-1a-Sekretion im SkinEthic-Modell unter UV-Einfluss anstieg, zeigte dieser Parameter im Phenion FT-Modell keine Reaktion. Im Phenion® FT-Modell konnte der Reizzustand besser anhand von Interleukin-8 erfasst werden. Abhängig von der UV-Dosis wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit sowohl im Hautgewebe als auch nach Sekretion eine gesteigerte IL-8-Menge detektiert. Indes im SkinEthic-Modell erwies sich IL-8 nicht als zuverlässiger Indikator. Ein weiteres Beispiel für das unterschiedliche Verhalten der drei Hautmodelle gegenüber UV-Bestrahlung ist die Viabilität. Anhand des LDH- und MTT-Tests wurde im SkinEthic-Modell die ausgeprägteste UV-induzierte Schädigung nachgewiesen. Das Phenion FT- und Natskin-Modell zeigten sich diesbezüglich robuster.

Die Art und das Ausmass der Reaktion auf UV-Strahlung sind somit von Modell zu Modell verschieden und werden vom jeweiligen Modellaufbau bestimmt. Für die molekularbiologischen Abläufe sind der Typ der vertretenen Zellen sowie deren Zusammenspiel von essentieller Bedeutung. Eine wichtige Rolle scheinen dabei die Präsenz der Dermis und damit Effekte, welche auf der Keratinocyten-Fibroblasten-Interaktion beruhen, zu spielen.

Neben der Reaktion auf externe Reize lässt sich anhand von *in vitro*- / *ex vivo*-Modellen auch die Hautpenetration / -permeation von Substanzen erfassen. Es konnte gezeigt werden, dass das Penetrations- / Permeationsverhalten von BV-17 sowohl vom Hautmodell als auch vom Vehikel abhängt. BV-17 permeierte durch die beiden *in vitro* rekonstruierten Hautmodelle SkinEthic® und Phenion® FT deutlich leichter als durch die *ex vivo* Natskin®-Haut. Die Untersuchungen zum Vehikeleinfluss ergaben, dass die Hautpenetration / -permeation nicht durch die total im Vehikel eingearbeitete Wirkstoffmenge, sondern durch die Konzentration in der direkt hautberührenden Phase bestimmt wurde. Dabei spielte die Wirkstoffverteilung zwischen den Phasen des Vehikels eine zentrale Rolle.

In vitro- / *ex vivo*-Hautmodelle bieten somit viele Chancen, demgegenüber sind den Möglichkeiten aber klar Grenzen gesetzt. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte die Wirkung der antiinflammatorischen Behandlung mit BV-17 nach Irritation mit UV-Strahlung in keinem der Modelle eindeutig nachgewiesen werden. Im besten Fall war eine tendenzielle Reduktion der IL-1a-Sekretion sowie parallel dazu der mRNA-Induktion im SkinEthic-Modell nach Applikation von BV-17 in den Dosierungen 2×10^{-5} M und 2×10^{-6} M (in absolutem Ethanol) erkennbar.

Dies steht in Kontrast zur eindeutig belegten Präsenz des Wirkstoffs am Wirkort sowie dazu, dass der pharmakologische Zusammenhang zwischen der UV-induzierten Hautirritation mit den ausgewählten Indikatorproteinen einerseits und dem Wirkmechanismus der Glucocorticoide andererseits in der Literatur beschrieben ist. UV-Strahlung aktiviert den Transkriptionsfaktor NF- κ B, der die Expression von proinflammatorischen Zytokinen wie IL-1a und TNF- α induziert. Glucocorticoide üben ihre antiinflammatorische Wirkung unter anderem über die Hemmung von NF- κ B aus (Williams et al. 2003).

Keines der Modelle simuliert die *in vivo*-Situation jedoch vollständig. Das SkinEthic-Modell besteht ausschliesslich aus Keratinocyten. Das Phenion FT-Modell verfügt zwar zusätzlich über eine rekonstruierte Dermis, was Vorgänge, welche auf der Interaktion zwischen Keratinocyten und Fibroblasten beruhen, zu simulieren vermag; aber es fehlen auch hier beispielsweise immunkompetente Zellen. Das *ex vivo* Natskin-Modell letztendlich verfügt über alle Zelltypen, doch nach Entnahme wird diese Haut künstlich am Leben erhalten und es fehlt die Anbindung an den Blutkreislauf. Für den Nachweis eines pharmakologischen Effektes ist aber möglicherweise das Zusammenspiel von allen *in vivo* vorhandenen Komponenten erforderlich. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte überdies kein Zusammenhang zwischen der zunehmenden Komplexität des Modellaufbaus einerseits und einer verbesserten Ansprechbarkeit auf die pharmakologische Wirkung andererseits aufgezeigt werden.

Zudem dürfte der optimale Bereich für den Nachweis einer pharmakologischen Wirkung eng sein. Auf der einen Seite ist die Reizdosis so festzulegen, dass der ausgelöste Effekt auf zellbiologischer Ebene maximal detektierbar ist, gleichzeitig aber keine irreversible Zellschädigung hervorgerufen wird. Auf der anderen Seite müssen Wirkstoff, Dosierung, Vehikel und Zeitpunkt der Behandlung exakt angepasst sein. Die ausgeprägte Intra- und Interbatchvariation, welche bei den Hautmodellen festgestellt wurde, erschwerte die Festlegung eines optimalen Bereichs zusätzlich.

Zur Untersuchung der Fototoxizität (Liebsch et al. 1997) und des Irritationspotentials von Chemikalien (Kandarova et al. 2006a) sind *in vitro* rekonstruierten Hautmodelle etabliert. Das Prüfprotokoll zur Erfassung des akuten dermalen Irritations- / Korrosionspotentials von Fertigprodukten, Rohstoffen und Chemikalien wurde mittlerweile in Europa als behördlich anerkannte Alternative zum Tierversuch in Kraft gesetzt (Kandarova et al. 2006b) (vgl. auch OECD TG 431 guidelines).

Darüber hinaus bergen in vitro- / ex vivo-Hautmodelle das Potential, als Screeninstrument in Forschung und Entwicklung von Dermatika eingesetzt zu werden, was zusätzlich zum akademischen Interesse von grossem industriellen Nutzen ist. Die vorliegende Arbeit verdeutlicht jedoch, dass dazu die drei überprüften Hautmodelle unter den gewählten Versuchsbedingungen nicht empfindlich genug auf pharmakologische Effekte ansprechen. Dies heisst zum einen, dass eine Weiterentwicklung der Hautmodelle erforderlich ist. Zum anderen muss nach besser geeigneten Versuchsparametern gesucht werden.

G Literaturverzeichnis

- Akers, W. A. (1980). "Risks of unoccluded topical steroids in clinical trials." Arch Dermatol 116(7): 786-788.
- Asselineau, D., B. Bernhard, et al. (1985). "Epidermal morphogenesis and induction of the 67 kD keratin polypeptide by culture of human keratinocytes at the liquid-air interface." Exp Cell Res 159(2): 536-539.
- Auphan, N., J. A. DiDonato, et al. (1995). "Immunosuppression by glucocorticoids: inhibition of NF-kappa B activity through induction of I kappa B synthesis." Science 270(5234): 286-290.
- Ayub, A. C., A. D. Gomes, et al. (2007). "Topical delivery of fluconazole: in vitro skin penetration and permeation using emulsions as dosage forms." Drug Dev Ind Pharm 33(3): 273-280.
- Banno, T., A. Gazel, et al. (2004). "Effects of tumor necrosis factor-alpha (TNF alpha) in epidermal keratinocytes revealed using global transcriptional profiling." J Biol Chem 279(31): 32633-32642.
- Barker, J. N., R. S. Mitra, et al. (1991). "Keratinocytes as initiators of inflammation." Lancet 337(8735): 211-214.
- Barry, B. W. (1983). Dermatological Formulations, percutaneous absorption. New York, Basel, Marcel Dekker, Inc.
- Barry, B. W. (2001). "Novel mechanisms and devices to enable successful transdermal drug delivery." Eur J Pharm Sci 14(2): 101-114.
- Bartholome, B., C. M. Spies, et al. (2004). "Membrane glucocorticoid receptors (mGCR) are expressed in normal human peripheral blood mononuclear cells and up-regulated after in vitro stimulation and in patients with rheumatoid arthritis." Faseb J 18(1): 70-80.
- Berhofer, L. P., S. Barkovic, et al. (1999). "IL-1 alpha and IL-1ra secretion from epidermal equivalents and the prediction of the irritation potential of mild soap and surfactant-based consumer products." Toxicology in vitro(13): 231-239.
- Bernard, F. X., C. Barrault, et al. (2000). "Development of a highly sensitive in vitro phototoxicity assay using the SkinEthic reconstructed human epidermis." Cell Biol Toxicol 16(6): 391-400.
- Betz, G., R. Imboden, et al. (2001). "Interaction of liposome formulations with human skin in vitro." Int J Pharm 229(1-2): 117-129.
- Boelsma, E., S. Gibbs, et al. (2000). "Characterization and comparison of reconstructed skin models: morphological and immunohistochemical evaluation." Acta Derm Venereol 80(2): 82-88.
- Boelsma, E., S. Gibbs, et al. (1998). "Expression of skin-derived antileukoproteinase (SKALP) in reconstructed human epidermis and its value as a marker for skin irritation." Acta Derm Venereol 78(2): 107-113.

- Bos, J. D. and M. M. Meinardi (2000). "The 500 Dalton rule for the skin penetration of chemical compounds and drugs." Exp Dermatol 9(3): 165-169.
- Boxman, I., C. Lowik, et al. (1993). "Modulation of IL-6 production and IL-1 activity by keratinocyte-fibroblast interaction." J Invest Dermatol 101(3): 316-324.
- Boxman, I. L., C. Ruwhof, et al. (1996). "Role of fibroblasts in the regulation of proinflammatory interleukin IL-1, IL-6 and IL-8 levels induced by keratinocyte-derived IL-1." Arch Dermatol Res 288(7): 391-398.
- Bronaugh, R. L. and H. I. Maibach (1999). Percutaneous Absorption, Drugs-Cosmetics-Mechanisms-Methodology. New York, Basel, Marcel Dekker, Inc.
- Buche, P., L. Violin, et al. (1994). "Evaluation of the effects of cosmetic or dermo-pharmaceutical products on cutaneous energy metabolism using the Episkin model of reconstructed epidermis." Cell Biol Toxicol 10(5-6): 381-385.
- Buttgereit, F., R. H. Straub, et al. (2004). "Glucocorticoids in the treatment of rheumatic diseases: an update on the mechanisms of action." Arthritis Rheum 50(11): 3408-3417.
- Buttgereit, F., M. Wehling, et al. (1998). "A new hypothesis of modular glucocorticoid actions: steroid treatment of rheumatic diseases revisited." Arthritis Rheum 41(5): 761-767.
- Buttgereit, R. U. and F. Buttgereit (2000). "Hochdosis-Steroid-Pulstherapie, gibt es Anwendungen in der Dermatologie?" Hautarzt 51: 738-745.
- Cevc, G. and U. Vierl (2007). Aggregate with increased deformability, comprising at least three amphipats, for improved transport through semi-permeable barriers and for the non-invasive drug application in vivo, especially through the skin. E. P. Office. Germany.
- Chadebech, P., D. Goidin, et al. (2003). "Use of human reconstructed epidermis to analyze the regulation of beta-defensin hBD-1, hBD-2, and hBD-3 expression in response to LPS." Cell Biol Toxicol 19(5): 313-324.
- Chou, C. C., J. E. Riviere, et al. (2003). "The cytotoxicity of jet fuel aromatic hydrocarbons and dose-related interleukin-8 release from human epidermal keratinocytes." Arch Toxicol 77(7): 384-391.
- Chung, J. H., S. H. Youn, et al. (1996). "Ultraviolet B irradiation-enhanced interleukin (IL)-6 production and mRNA expression are mediated by IL-1 alpha in cultured human keratinocytes." J Invest Dermatol 106(4): 715-720.
- Colotta, F., F. Re, et al. (1993). "Interleukin-1 type II receptor: a decoy target for IL-1 that is regulated by IL-4." Science 261(5120): 472-475.
- Contard, P., R. L. Bartel, et al. (1993). "Culturing keratinocytes and fibroblasts in a three-dimensional mesh results in epidermal differentiation and formation of a basal lamina-anchoring zone." J Invest Dermatol 100(1): 35-39.
- Coquette, A., N. Berna, et al. (2003). "Analysis of interleukin-1alpha (IL-1alpha) and interleukin-8 (IL-8) expression and release in in vitro reconstructed human epidermis for the prediction of in vivo skin irritation and/or sensitization." Toxicol In Vitro 17(3): 311-321.
- Corsini, E., A. Bruccoleri, et al. (1996). "Endogenous interleukin-1 alpha associated with skin irritation induced by tributyltin." Toxicol Appl Pharmacol 138(2): 268-274.

- Corsini, E. and C. L. Galli (1998). "Cytokines and irritant contact dermatitis." Toxicol Lett 102-103: 277-282.
- Corsini, E., N. Sangha, et al. (1997a). "Epidermal stratification reduces the effects of UVB (but not UVA) on keratinocyte cytokine production and cytotoxicity." Photodermatol Photoimmunol Photomed 13(4): 147-152.
- Corsini, E., J. Sheasgreen, et al. (2002). "Use of differential display-polymerase chain reaction to identify genes selectively modulated by chemical allergens in reconstituted human epidermis." Toxicol In Vitro 16(4): 427-431.
- Corsini, E., A. Terzoli, et al. (1997b). "Induction of tumor necrosis factor-alpha in vivo by a skin irritant, tributyltin, through activation of transcription factors: its pharmacological modulation by anti-inflammatory drugs." J Invest Dermatol 108(6): 892-896.
- Cross, S. E. and M. S. Roberts (2004). "Physical enhancement of transdermal drug application: is delivery technology keeping up with pharmaceutical development?" Curr Drug Deliv 1(1): 81-92.
- Croxtall, J. D., Q. Choudhury, et al. (2000). "Glucocorticoids act within minutes to inhibit recruitment of signalling factors to activated EGF receptors through a receptor-dependent, transcription-independent mechanism." Br J Pharmacol 130(2): 289-298.
- Dayan, N. (2005). "Pathways for skin penetration." Cosmetics and toiletries magazine 120(6): 67-76.
- De Bosscher, K., W. Vanden Berghe, et al. (2000). "Mechanisms of anti-inflammatory action and of immunosuppression by glucocorticoids: negative interference of activated glucocorticoid receptor with transcription factors." J Neuroimmunol 109(1): 16-22.
- de Brugerolle de, F., V. Picarles, et al. (1999). "Predictivity of an in vitro model for acute and chronic skin irritation (SkinEthic) applied to the testing of topical vehicles." Cell Biol Toxicol 15(2): 121-135.
- de Kossodo, S., P. D. Cruz, Jr., et al. (1995). "Expression of the tumor necrosis factor gene by dermal fibroblasts in response to ultraviolet irradiation or lipopolysaccharide." J Invest Dermatol 104(3): 318-322.
- Dinarello, C. A. (1996). "Biologic basis for interleukin-1 in disease." Blood 87(6): 2095-2147.
- Dinarello, C. A. (1998). "Interleukin-1, interleukin-1 receptors and interleukin-1 receptor antagonist." Int Rev Immunol 16(5-6): 457-499.
- Dinarello, C. A. and S. M. Wolff (1993). "The role of interleukin-1 in disease." N Engl J Med 328(2): 106-113.
- Documed (2007). Arzneimittelkompendium der Schweiz 2007. Basel, Documed AG.
- Dubertret, L. (1990). "Reconstruction of the human skin equivalent in vitro: a new tool for skin biology." Skin Pharmacol 3(2): 144-148.
- Dvorankova, B., Z. Holikova, et al. (2003). "Reconstruction of epidermis by grafting of keratinocytes cultured on polymer support--clinical study." Int J Dermatol 42(3): 219-223.
- Effendy, I. and H. I. Maibach (1995). "Surfactants and experimental irritant contact dermatitis." Contact Dermatitis 33(4): 217-225.

- EP-Kommission (2005). Betamethason (Monographie 5.0/0312). Europäische Pharmakopöe. Stuttgart, Deutscher Apotheker Verlag. 2.
- Epstein, J. H. (1997). Biological effects of sunlight. Sunscreens, development, evaluation, and regulatory aspects. N. J. Lowe, N. A. Shaath and M. A. Pathak. New York, Basel, Hong Kong, Marcel Dekker, Inc.: 83-100.
- Falanga, V. and M. Sabolinski (1999). "A bilayered living skin construct (APLIGRAF) accelerates complete closure of hard-to-heal venous ulcers." Wound Repair Regen 7(4): 201-207.
- Faller, C., M. Bracher, et al. (2002). "Predictive ability of reconstructed human epidermis equivalents for the assessment of skin irritation of cosmetics." Toxicol In Vitro 16(5): 557-572.
- Flaxman, B. A. and R. A. Harper (1975). "Organ culture of human skin in chemically defined medium." J Invest Dermatol 64(2): 96-99.
- Fletcher, S. T., V. A. Baker, et al. (2001). "Gene expression analysis of EpiDerm following exposure to SLS using cDNA microarrays." Toxicol In Vitro 15(4-5): 393-398.
- Franz, T. J. (1975). "Percutaneous absorption on the relevance of in vitro data." J Invest Dermatol 64(3): 190-195.
- Franz, T. J. (1978). "The finite dose technique as a valid in vitro model for the study of percutaneous absorption in man." Curr Probl Dermatol 7: 58-68.
- Fritsch, P. (1998). Dermatologie und Venerologie. Berlin, Heidelberg, Springer-Verlag.
- Fulbright, R. M., D. Axelrod, et al. (1997). "Fatty acid alteration and the lateral diffusion of lipids in the plasma membrane of keratinocytes." Exp Cell Res 233(1): 128-134.
- Gazel, A., P. Ramphal, et al. (2003). "Transcriptional profiling of epidermal keratinocytes: comparison of genes expressed in skin, cultured keratinocytes, and reconstituted epidermis, using large DNA microarrays." J Invest Dermatol 121(6): 1459-1468.
- Gelis, C., S. Girard, et al. (2003). "Assessment of the skin photoprotective capacities of an organo-mineral broad-spectrum sunblock on two ex vivo skin models." Photodermatol Photoimmunol Photomed 19(5): 242-253.
- Giacomoni, P. U., J. F. Nadaud, et al. (1998). "Morphological alterations and cell blebbing in UV-irradiated human epidermis." Arch Dermatol Res 290(3): 163-166.
- Gordon, J. R. and S. J. Galli (1990). "Mast cells as a source of both preformed and immunologically inducible TNF-alpha/cachectin." Nature 346(6281): 274-276.
- Grandjean-Laquerriere, A., S. C. Gangloff, et al. (2002). "Relative contribution of NF-kappaB and AP-1 in the modulation by curcumin and pyrrolidine dithiocarbamate of the UVB-induced cytokine expression by keratinocytes." Cytokine 18(3): 168-177.
- Griswold, D. E., J. R. Connor, et al. (1991). "Activation of the IL-1 gene in UV-irradiated mouse skin: association with inflammatory sequelae and pharmacologic intervention." J Invest Dermatol 97(6): 1019-1023.
- Grossman, R. M., J. Krueger, et al. (1989). "Interleukin 6 is Expressed in High Levels in Psoriatic Skin and Stimulates Proliferation of Cultured Human Keratinocytes."

- Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 86(16): 6367-6371.
- Groth, L. (1996). "Cutaneous microdialysis. Methodology and validation." Acta Derm Venereol Suppl (Stockh) 197: 1-61.
- Groves, R. W., M. H. Allen, et al. (1995). "Tumour necrosis factor alpha is pro-inflammatory in normal human skin and modulates cutaneous adhesion molecule expression." Br J Dermatol 132(3): 345-352.
- Groves, R. W., L. Sherman, et al. (1994). "Detection of interleukin-1 receptors in human epidermis. Induction of the type II receptor after organ culture and in psoriasis." Am J Pathol 145(5): 1048-1056.
- Gutermuth, J., R. Engst, et al. (2003). "Glukokortikoide: Neubewertung eines Standards." Akt Dermatol 29: 317-326.
- Gysler, A., B. Kleuser, et al. (1999). "Skin penetration and metabolism of topical glucocorticoids in reconstructed epidermis and in excised human skin." Pharm Res 16(9): 1386-1391.
- Hadgraft, J. and M. E. Lane (2005). "Skin permeation: the years of enlightenment." Int J Pharm 305(1-2): 2-12.
- Hartke, K., H. Hartke, et al. (2004a). Betamethasonvalerat (Monographie B37). Kommentar zum europäischen Arzneibuch. W. V. mbH. Stuttgart.
- Hartke, K., H. Hartke, et al. (2004b). Natriumdodecylsulfat (Monographie N22). Kommentar zum europäischen Arzneibuch. W. V. mbH. Stuttgart.
- Hartke, K., H. Hartke, et al. (2004c). Rizinusöl, natives (Monographie R16). Kommentar zum europäischen Arzneibuch. W. V. mbH. Stuttgart.
- Hartung, T. (2006). "ECVAM's Progress in Implementing the 3Rs in Europe." Altex 23 Suppl: 21-28.
- Holliday, M. R., E. Corsini, et al. (1997). "Differential induction of cutaneous TNF-alpha and IL-6 by topically applied chemicals." Am J Contact Dermat 8(3): 158-164.
- Jacobi, U., T. Tassopoulos, et al. (2006). "Cutaneous distribution and localization of dyes affected by vehicles all with different lipophilicity." Arch Dermatol Res 297(7): 303-310.
- Kandarova, H., M. Liebsch, et al. (2006a). "Assessment of the skin irritation potential of chemicals by using the SkinEthic reconstructed human epidermal model and the common skin irritation protocol evaluated in the ECVAM skin irritation validation study." Altern Lab Anim 34(4): 393-406.
- Kandarova, H., M. Liebsch, et al. (2006b). "Assessment of the human epidermis model SkinEthic RHE for in vitro skin corrosion testing of chemicals according to new OECD TG 431." Toxicol In Vitro 20(5): 547-559.
- Kindl, G. and W. Raab (1998). Licht und Haut. Eschborn, Govi-Verlag.
- Kirnbauer, R., A. Kock, et al. (1991). "Regulation of epidermal cell interleukin-6 production by UV light and corticosteroids." J Invest Dermatol 96(4): 484-489.

- Kochevar, I. E. and C. R. Taylor (2003). Photophysics, Photochemistry, and Photobiology. Fitzpatrick's Dermatology in General Medicine. I. M. Freeberg, A. Z. Eisen, K. Wolff et al. New York, Chicago, San Francisco, McGraw - Hill, Medical Publishing Division. 1: 1267-1275.
- Kock, A., T. Schwarz, et al. (1990). "Human keratinocytes are a source for tumor necrosis factor alpha: evidence for synthesis and release upon stimulation with endotoxin or ultraviolet light." J Exp Med 172(6): 1609-1614.
- Kondo, S., D. N. Sauder, et al. (1994). "Differential modulation of interleukin-1 alpha (IL-1 alpha) and interleukin-1 beta (IL-1 beta) in human epidermal keratinocytes by UVB." Exp Dermatol 3(1): 29-39.
- Korting, H. C., E. Hulsebus, et al. (1995). "Discrimination of the toxic potential of chemically differing topical glucocorticoids using a neutral red release assay with human keratinocytes and fibroblasts." Br J Dermatol 133(1): 54-59.
- Korting, H. C., M. J. Kerscher, et al. (1992). "Topical glucocorticoids with improved benefit/risk ratio: do they exist?" J Am Acad Dermatol 27(1): 87-92.
- Kubota, K., J. Ademola, et al. (1995). "Simultaneous diffusion and metabolism of betamethasone 17-valerate in the living skin equivalent." J Pharm Sci 84(12): 1478-1481.
- Kubota, K. and H. I. Maibach (1993). "In vitro percutaneous permeation of betamethasone and betamethasone 17-valerate." J Pharm Sci 82(10): 1039-1045.
- Kupper, T. S. (1989). "Mechanisms of cutaneous inflammation. Interactions between epidermal cytokines, adhesion molecules, and leukocytes." Arch Dermatol 125(10): 1406-1412.
- Kupper, T. S. (1990). "Immune and inflammatory processes in cutaneous tissues. Mechanisms and speculations." J Clin Invest 86(6): 1783-1789.
- Kupper, T. S., A. O. Chua, et al. (1987). "Interleukin 1 gene expression in cultured human keratinocytes is augmented by ultraviolet irradiation." J Clin Invest 80(2): 430-436.
- Kupper, T. S. and R. W. Groves (1995). "The interleukin-1 axis and cutaneous inflammation." J Invest Dermatol 105(1 Suppl): 62S-66S.
- Kutsch, C. L., D. A. Norris, et al. (1993). "Tumor necrosis factor-alpha induces interleukin-1 alpha and interleukin-1 receptor antagonist production by cultured human keratinocytes." J Invest Dermatol 101(1): 79-85.
- Lange, K., A. Gysler, et al. (1997). "Prednicarbate versus conventional topical glucocorticoids: pharmacodynamic characterization in vitro." Pharm Res 14(12): 1744-1749.
- Lange, K., B. Kleuser, et al. (2000). "Cutaneous inflammation and proliferation in vitro: differential effects and mode of action of topical glucocorticoids." Skin Pharmacol Appl Skin Physiol 13(2): 93-103.
- Lee, C. H. and H. I. Maibach (1995). "The sodium lauryl sulfate model: an overview." Contact Dermatitis 33(1): 1-7.
- Lee, R. T., W. H. Briggs, et al. (1997). "Mechanical deformation promotes secretion of IL-1 alpha and IL-1 receptor antagonist." J Immunol 159(10): 5084-5088.

- Lee, S. W., V. B. Morhenn, et al. (1991). "Autocrine stimulation of interleukin-1 alpha and transforming growth factor alpha production in human keratinocytes and its antagonism by glucocorticoids." J Invest Dermatol 97(1): 106-110.
- Lennecke, K. (2006). "Psoriasis - die aktuelle Therapie." Deutsche Apotheker Zeitung 146(42): 4406-4415.
- Levine, S. J., T. Benfield, et al. (1996). "Corticosteroids induce intracellular interleukin-1 receptor antagonist type I expression by a human airway epithelial cell line." Am J Respir Cell Mol Biol 15(2): 245-251.
- Liebsch, M., C. Barrabas, et al. (1997). "[Development of a new in vitro test for dermal phototoxicity using a model of reconstituted human epidermis]." Altex 14(4): 165-174.
- Lin, G., A. E. Pearson, et al. (1994). "Regulation of interleukin-8 expression in porcine alveolar macrophages by bacterial lipopolysaccharide." J Biol Chem 269(1): 77-85.
- Lotte, C., C. Patouillet, et al. (2002). "Permeation and skin absorption: reproducibility of various industrial reconstructed human skin models." Skin Pharmacol Appl Skin Physiol 15 Suppl 1: 18-30.
- Luger, T. A. (1989). "Epidermal cytokines." Acta Derm Venereol Suppl (Stockh) 151: 61-76; discussion 106-110.
- Luger, T. A., P. Elsner, et al. (2005). "Topische Dermatotherapie mit Glukokortikoiden – Therapeutischer Index." from URL: <http://www.awmf-online.de> (02.08.2007).
- Lukiw, W. J., J. Martinez, et al. (1999). "The interleukin-1 type 2 receptor gene displays immediate early gene responsiveness in glucocorticoid-stimulated human epidermal keratinocytes." J Biol Chem 274(13): 8630-8638.
- Luo, D., M. Yaar, et al. (2004). "Solar-simulated irradiation evokes a persistent and biphasic IL-1alpha response." Exp Dermatol 13(1): 11-17.
- Marks, R. and G. Plewig (1986). Skin Models, Models to Study Function and Disease of Skin. Berlin, Heidelberg, New York, Tokyo, Springer-Verlag.
- McKinley, A. F. and B. L. Diffey (1987). "A reference action spectrum for ultraviolet induced erythema in human skin." CIE Journal 6: 17-22.
- Medina, J., C. Elsaesser, et al. (2001). "Assessment of the phototoxic potential of compounds and finished topical products using a human reconstructed epidermis." In Vitro Mol Toxicol 14(3): 157-168.
- Mewes, K. R., M. Raus, et al. (2007). "Elastin expression in a newly developed full-thickness skin equivalent." Skin Pharmacol Physiol 20(2): 85-95.
- Mitchell, D. M., S. H. Heany, et al. (1964). "Betamethasone 17-Valerate: a Clinical Trial of a New Topical Steroid." J Ir Med Assoc 55: 44-45.
- Murphy, G. M. (1999). The acute effect of ultraviolet radiation on the skin. Photodermatology. H. JLM. New York, Oxford University Press Inc.
- Mutschler, E. (1991). Arzneimittelwirkung, Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie. Stuttgart, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH.

- Nakamura, M., T. Rikimaru, et al. (1990). "Full-thickness human skin explants for testing the toxicity of topically applied chemicals." J Invest Dermatol 95(3): 325-332.
- Netzlaff, F., C. M. Lehr, et al. (2005). "The human epidermis models EpiSkin, SkinEthic and EpiDerm: an evaluation of morphology and their suitability for testing phototoxicity, irritancy, corrosivity, and substance transport." Eur J Pharm Biopharm 60(2): 167-178.
- Neubert, R. H. H., W. A. Wohlrab, et al. (2001). Dermatopharmazie, Vehikel - Wirkstoffe - Pharmakologie. Stuttgart, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH.
- Neumüller, O. A. (1988). Römpps Chemie-Lexikon. Stuttgart, Franckh'sche Verlagshandlung, W. Keller & Co. 6: 4719.
- Niedner, R. and J. Ziegenmeyer (1992). Dermatika, therapeutischer Einsatz, Pharmakologie und Pharmazie. Stuttgart, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH.
- Noveon (1999). Introducing Pemulen Polymeric Emulsifiers. Produkteprospekt. Cleveland.
- O'Neill, L. A. and C. Greene (1998). "Signal transduction pathways activated by the IL-1 receptor family: ancient signaling machinery in mammals, insects, and plants." J Leukoc Biol 63(6): 650-657.
- Orentreich, N., J. R. Matias, et al. (1984). "The local antiandrogenic effect of the intracutaneous injection of progesterone in the flank organ of sexually mature male Syrian golden hamster." Arch Dermatol Res 276(6): 401-405.
- Oxholm, A., P. Oxholm, et al. (1988). "Immunohistological detection of interleukin I-like molecules and tumour necrosis factor in human epidermis before and after UVB-irradiation in vivo." Br J Dermatol 118(3): 369-376.
- Pageon, H. and D. Asselineau (2005). "An in vitro approach to the chronological aging of skin by glycation of the collagen: the biological effect of glycation on the reconstructed skin model." Ann N Y Acad Sci 1043: 529-532.
- Pasonen-Seppänen, S., T. M. Suhonen, et al. (2001). "Vitamin C enhances differentiation of a continuous keratinocyte cell line (REK) into epidermis with normal stratum corneum ultrastructure and functional permeability barrier." Histochem Cell Biol 116(4): 287-297.
- Pauwels, M. and V. Rogiers (2004). "Safety evaluation of cosmetics in the EU. Reality and challenges for the toxicologist." Toxicol Lett 151(1): 7-17.
- Pellanda, C., C. Strub, et al. (2007). "Topical bioavailability of triamcinolone acetonide: effect of occlusion." Skin Pharmacol Physiol 20(1): 50-56.
- Pellet, M., S. L. Raghavan, et al. (2003). The Application of Supersaturated Systems to Percutaneous Drug Delivery. Transdermal Drug Delivery. R. H. Guy and J. Hadgraft. New York, Marcel Dekker: 305-326.
- Perretti, M., M. J. Paul-Clark, et al. (2003). "Generation of innovative anti-inflammatory and anti-arthritic glucocorticoid derivatives that release NO: the nitro-steroids." Dig Liver Dis 35 Suppl 2: S41-48.
- Peters, E. M., M. E. Ericson, et al. (2006). "Neuropeptide control mechanisms in cutaneous biology: physiological and clinical significance." J Invest Dermatol 126(9): 1937-1947.
- Ponec, M. (1993). "Glucocorticoid receptors." Curr Probl Dermatol 21: 20-28.

- Ponec, M., E. Boelsma, et al. (2002). "Characterization of reconstructed skin models." Skin Pharmacol Appl Skin Physiol 15 Suppl 1: 4-17.
- Ponec, M., E. R. De Kloet, et al. (1980). "Corticoids and human skin fibroblasts: intracellular specific binding in relation to growth inhibition." J Invest Dermatol 75(4): 293-296.
- Ponec, M., S. Gibbs, et al. (2001). "Barrier function in reconstructed epidermis and its resemblance to native human skin." Skin Pharmacol Appl Skin Physiol 14 Suppl 1: 63-71.
- Ponec, M., A. Weerheim, et al. (1997). "The formation of competent barrier lipids in reconstructed human epidermis requires the presence of vitamin C." J Invest Dermatol 109(3): 348-355.
- Potts, R. O. and M. L. Francoeur (1991). "The influence of stratum corneum morphology on water permeability." J Invest Dermatol 96(4): 495-499.
- Poumay, Y. and A. Coquette (2007). "Modelling the human epidermis in vitro: tools for basic and applied research." Arch Dermatol Res 298(8): 361-369.
- Pousset, F., S. Cremona, et al. (2001). "Dexamethasone up-regulates type II IL-1 receptor in mouse primary activated astrocytes." J Neurochem 76(3): 901-909.
- Prunieras, M., M. Regnier, et al. (1983). "Methods for cultivation of keratinocytes with an air-liquid interface." J Invest Dermatol 81(1 Suppl): 28s-33s.
- Pupe, A., H. Degreef, et al. (2003). "Induction of tumor necrosis factor-alpha by UVB: a role for reactive oxygen intermediates and eicosanoids." Photochem Photobiol 78(1): 68-74.
- Rauschmayr, T., R. W. Groves, et al. (1997). "Keratinocyte expression of the type 2 interleukin 1 receptor mediates local and specific inhibition of interleukin 1-mediated inflammation." Proc Natl Acad Sci U S A 94(11): 5814-5819.
- Ray, A. and K. E. Prefontaine (1994). "Physical association and functional antagonism between the p65 subunit of transcription factor NF-kappa B and the glucocorticoid receptor." Proc Natl Acad Sci U S A 91(2): 752-756.
- Re, F., M. Muzio, et al. (1994). "The type II "receptor" as a decoy target for interleukin 1 in polymorphonuclear leukocytes: characterization of induction by dexamethasone and ligand binding properties of the released decoy receptor." J Exp Med 179(2): 739-743.
- Re, F., M. Sironi, et al. (1996). "Inhibition of interleukin-1 responsiveness by type II receptor gene transfer: a surface "receptor" with anti-interleukin-1 function." J Exp Med 183(4): 1841-1850.
- Reinhold, U. and F. Buttgereit (2000). "Hochdosis-Steroid-Pulstherapie, gibt es Anwendungen in der Dermatologie?" Hautarzt 51: 738-745.
- Rezvani, H. R., M. Cario-Andre, et al. (2007). "Protection of normal human reconstructed epidermis from UV by catalase overexpression." Cancer Gene Ther 14(2): 174-186.
- Rheinwald, J. G. and H. Green (1975a). "Formation of a keratinizing epithelium in culture by a cloned cell line derived from a teratoma." Cell 6(3): 317-330.
- Rheinwald, J. G. and H. Green (1975b). "Serial cultivation of strains of human epidermal keratinocytes: the formation of keratinizing colonies from single cells." Cell 6(3): 331-343.

- Rispin, A. S. and K. Stitzel (2006). "Ensuring quality of in vitro alternative test methods." Altex 23 Suppl: 278-283.
- Rosdy, M. and L. C. Clauss (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(4): 409-414.
- Rosdy, M., A. Pisani, et al. (1993). "Production of basement membrane components by a reconstructed epidermis cultured in the absence of serum and dermal factors." Br J Dermatol 129(3): 227-234.
- Russell, W. M. S. and R. L. Burch (1959). The Principles of Humane Experimental Technique. London, Methuen.
- Santos Maia, C., W. Mehnert, et al. (2002). "Drug targeting by solid lipid nanoparticles for dermal use." J Drug Target 10(6): 489-495.
- Schaefer, H. and T. E. Redelmeier (1996). Skin Barrier, principles of percutaneous absorption. Basel, S. Karger AG.
- Schafer-Korting, M., U. Bock, et al. (2006). "Reconstructed human epidermis for skin absorption testing: results of the German prevalidation study." Altern Lab Anim 34(3): 283-294.
- Scharffetter-Kochanek, K., M. Wlaschek, et al. (1997). "UV-induced reactive oxygen species in photocarcinogenesis and photoaging." Biol Chem 378(11): 1247-1257.
- Schmalfluss, U., R. H. H. Neubert, et al. (1997). "Modification of drug penetration into human skin using microemulsions." J. Control. Release 46: 279-285.
- Schmidt, J., J. M. Metselaar, et al. (2003). "Drug targeting by long-circulating liposomal glucocorticosteroids increases therapeutic efficacy in a model of multiple sclerosis." Brain 126(Pt 8): 1895-1904.
- Schmook, F. P., J. G. Meingassner, et al. (2001). "Comparison of human skin or epidermis models with human and animal skin in in-vitro percutaneous absorption." Int J Pharm 215(1-2): 51-56.
- Schroeder, K. R. and T. Welss (2003). "Skin Irritation -Evaluation of Mechanisms: Description of an IL-1 alpha threshold." Tox Letters 14: 151.
- Schroeder, K. R. and T. Welss (2004). "Skin Irritation: Mechanistic Studies Using Reconstituted Human Epidermis."
- Serres, M., J. Viac, et al. (1996). "Glucocorticoid receptor localization in human epidermal cells." Arch Dermatol Res 288(3): 140-146.
- Simon, M. M., Y. Aragane, et al. (1994). "UVB light induces nuclear factor kappa B (NF kappa B) activity independently from chromosomal DNA damage in cell-free cytosolic extracts." J Invest Dermatol 102(4): 422-427.
- Simonetti, O., A. J. Hoogstraate, et al. (1995). "Visualization of diffusion pathways across the stratum corneum of native and in-vitro-reconstructed epidermis by confocal laser scanning microscopy." Arch Dermatol Res 287(5): 465-473.
- Souto, L. R., J. Rehder, et al. (2006). "Model for human skin reconstructed in vitro composed of associated dermis and epidermis." Sao Paulo Med J 124(2): 71-76.

- Spearman, R. I. and A. Jarrett (1975). "Bio-assay of corticosteroids for topical application." Br J Dermatol 92(5): 581-584.
- Sprecher, E. and Y. Becker (1992). "Detection of IL-1 beta, TNF-alpha, and IL-6 gene transcription by the polymerase chain reaction in keratinocytes, Langerhans cells and peritoneal exudate cells during infection with herpes simplex virus-1." Arch Virol 126(1-4): 253-269.
- Stahn, C., M. Lowenberg, et al. (2007). "Molecular mechanisms of glucocorticoid action and selective glucocorticoid receptor agonists." Mol Cell Endocrinol.
- Stege, H. and R. Mang (2006). "Lichtschutz, Grundlage der UV-Protektion." Hautarzt 57(5): 459-470.
- Stein, M., A. Bernd, et al. (1997). "Measurement of anti-inflammatory effects of glucocorticoids on human keratinocytes in vitro. Comparison of normal human keratinocytes with the keratinocyte cell line HaCaT." Arzneimittelforschung 47(11): 1266-1270.
- Steinhoff, M., T. Brzoska, et al. (2001). "Keratinocytes in epidermal immune responses." Curr Opin Allergy Clin Immunol 1(5): 469-476.
- Stosic-Grujicic, S. and M. L. Lukic (1992). "Glucocorticoid-induced keratinocyte-derived interleukin-1 receptor antagonist(s)." Immunology 75(2): 293-298.
- Stylianou, E., L. A. O'Neill, et al. (1992). "Interleukin 1 induces NF-kappa B through its type I but not its type II receptor in lymphocytes." J Biol Chem 267(22): 15836-15841.
- Sucker, H., R. Fuchs, et al. (1991). pharmazeutische Technologie. Stuttgart, Georg Thieme Verlag.
- Surber, C. and H. I. Maibach (1992). Topical Corticosteroids. Basel, Karger.
- Takahashi, H. and H. Iizuka (1991). "Regulation of beta 2-adrenergic receptors in keratinocytes: glucocorticoids increase steady-state levels of receptor mRNA in foetal rat keratinizing epidermal cells (FRSK cells)." Br J Dermatol 124(4): 341-347.
- Teepe, R. G., R. W. Kreis, et al. (1990). "The use of cultured autologous epidermis in the treatment of extensive burn wounds." J Trauma 30(3): 269-275.
- Thews, G., E. Mutschler, et al. (1991). Anatomie, Physiologie, Pathophysiologie des Menschen. Stuttgart, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH.
- Tornier, C., M. Rosdy, et al. (2005). "In vitro skin irritation testing on reconstituted human epidermis: reproducibility for 50 chemicals tested with two protocols." Toxicology In Vitro (in press).
- Trefzer, U., M. Brockhaus, et al. (1991). "55-kd tumor necrosis factor receptor is expressed by human keratinocytes and plays a pivotal role in regulation of human keratinocyte ICAM-1 expression." J Invest Dermatol 97(5): 911-916.
- Tupker, R. A., C. Willis, et al. (1997). "Guidelines on sodium lauryl sulfate (SLS) exposure tests. A report from the Standardization Group of the European Society of Contact Dermatitis." Contact Dermatitis 37(2): 53-69.
- Tyrell, R. M. (1996). "Ultraviolet radiation and free radical damage to skin." Biochem. Soc. Trans. 61: 47-53.

- Valencia, I. C. and F. A. Kerdel (2003). Topical Glucocorticoids. Fitzpatrick's Dermatology in General Medicine. I. M. Freeberg, A. Z. Eisen, K. Wolff et al. New York, Chicago, San Francisco, McGraw - Hill, Medical Publishing Division. 2: 2324-2328.
- Vallet, V., C. Cruz, et al. (2007). "In vitro percutaneous penetration of organophosphorus compounds using full-thickness and split-thickness pig and human skin." Toxicol In Vitro.
- Van Snick, J. (1990). "Interleukin-6: an overview." Annu Rev Immunol 8: 253-278.
- Vicanova, J., E. Boelsma, et al. (1998). "Normalization of epidermal calcium distribution profile in reconstructed human epidermis is related to improvement of terminal differentiation and stratum corneum barrier formation." J Invest Dermatol 111(1): 97-106.
- Vickers, C. F. (1963). "Existence of Reservoir in the Stratum Corneum. Experimental Proof." Arch Dermatol 88: 20-23.
- Vickers, C. F. (1972). "Stratum corneum reservoir for drugs." Adv Biol Skin 12: 177-189.
- Walker, S. L., J. L. M. Hawk, et al. (2003). Acute and Chronic Effects of Ultraviolet Radiation on the Skin. Fitzpatrick's Dermatology in General Medicine. I. M. Freeberg, A. Z. Eisen, K. Wolff et al. New York, Chicago, San Francisco, McGraw - Hill, Medical Publishing Division. 1: 1275-1282.
- Welss, T., D. A. Basketter, et al. (2004). "In vitro skin irritation: facts and future. State of the art review of mechanisms and models." Toxicol In Vitro 18(3): 231-243.
- Welss, T. and K. R. Schröder (2003). "Skin Irritation - Evaluation of Mechanisms: Description of IL-1alpha Threshold." Tox Letters 14: 151.
- Werfel, T., C. Claes, et al. (2006). "Therapie der Neurodermitis." Schriftenreihe Health Technology Assessment 46(1).
- Widmer, J., P. Elsner, et al. (1994). "Skin irritant reactivity following experimental cumulative irritant contact dermatitis." Contact Dermatitis 30(1): 35-39.
- Williams, A. C. and B. W. Barry (1992). "Skin absorption enhancers." Crit Rev Ther Drug Carrier Syst 9(3-4): 305-353.
- Williams, A. C. and B. W. Barry (2004). "Penetration enhancers." Adv Drug Deliv Rev 56(5): 603-618.
- Williams, I. R. and T. S. Kupper (1996). "Immunity at the surface: homeostatic mechanisms of the skin immune system." Life Sci 58(18): 1485-1507.
- Williams, I. R., B. E. Rich, et al. (2003). Cytokines. Fitzpatrick's Dermatology in General Medicine. I. M. Freeberg, A. Z. Eisen, K. Wolff et al. New York, Chicago, San Francisco, McGraw - Hill, Medical Publishing Division. 1: 285-295.
- Wong, G. G. and S. C. Clark (1988). "Multiple actions of interleukin 6 within a cytokine network." Immunol Today 9(5): 137-139.
- Wu, H., C. Ramachandran, et al. (2001). "Topical transport of hydrophilic compounds using water-in-oil nanoemulsions." Int J Pharm 220(1-2): 63-75.
- Zellmer, S., D. Reissig, et al. (1998). "Reconstructed human skin as model for liposome-skin interaction." J Control Release 55(2-3): 271-279.

- Zghoul, N., R. Fuchs, et al. (2001). "Reconstructed skin equivalents for assessing percutaneous drug absorption from pharmaceutical formulations." Altex 18(2): 103-106.
- Zöller, N., K. Mewes, et al. (2006). "The benefits of using a new full-thickness skin model to investigate anti-inflammatory activity of glucocorticoids " Cytotherapy.
- zur Muhlen, A., A. Klotz, et al. (2004). "Using skin models to assess the effects of a protection cream on skin barrier function." Skin Pharmacol Physiol 17(4): 167-175.

H Anhang

H.1 Liste der verwendeten Substanzen, Materialien und Geräte

H.1.1 Kultivierung und Handling der in vitro- / ex vivo-Hautmodelle

Tab. H.1: In vitro- / ex vivo-Hautmodelle sowie Substanzen und Materialien für die Kultivierung und das Handling

Haut/Substanz/Material	Typ/Qualität	Artikel-Nr.	Hersteller
SkinEthic-Modell			
SkinEthic® Reconstructed Human Epidermis Model	Oberfläche 0.5 cm ² Ankunft Kulturtag 13	-	Laboratoire SkinEthic, Nizza, Frankreich
Growth Medium	chemisch definiertes Medium MCDB 153 enthält: 5 µg/ml Insulin 1.5 mM CaCl ₂ Wachstumsfaktoren 25 µg/ml Gentamycin 0.4 µg/ml Hydrocortison	-	
Maintenance Medium	chemisch definiertes Medium MCDB 153 enthält: 5 µg/ml Insulin 1.5 mM CaCl ₂ 25 µg/ml Gentamycin	-	
Phenion FT-Modell			
Phenion® Full Thickness Skin Model	Oberfläche 1.3 cm ² Ankunft Kulturtag 13	-	Phenion GmbH & Co.KG, Düsseldorf, Deutschland
Air-Liquid-Interface (= ALI) Culture Medium	frei von Glucocorticoiden	-	
Petrischalen	Ø 35 mm, Ø 100 mm, steril	-	
Metalluntersätze	gewinkelt, pro Hautprobe zwei Stück, steril	-	
Filterpapier	in Stücke zugeschnitten, steril	-	
Phosphat-Puffer	D-PBS 1x ohne CaCl ₂ und MgCl ₂	14190-136	Invitrogen Corp., Paisley, UK
Natskin-Modell			
Natskin® Full Thickness Skin, ex vivo	kleines Format (innerer Durchmesser 5 mm)	NAT001	Biopredict Int., Rennes, Frankreich
Natskin® Full Thickness Skin, ex vivo	grosses Format (innerer Durchmesser 10 mm)	NAT002	
Skin Short Term Culture Medium	frei von Glucocorticoiden	MIL207	

Tab. H.2: Geräte für die Kultivierung und das Handling der In vitro- / ex vivo-Hautmodelle

Gerät	Typ	Hersteller
Laminar Flow	Aura-VE 190	Ehret, Labor- und Pharmatechnik, Emmendingen, Deutschland
Inkubator	Nuaire™ US Airflow CO ₂ Water-Jacketed Incubator Modell NU 485E	NuAire Corp., Laboratory Equipment Supply, Plymouth, MN, USA

H.1.2 Applikation externer Reiz

Tab. H.3: Substanzen und Materialien für die Applikation der externen Reize

Substanz/Material	Typ/Qualität	Artikel-Nr.	Hersteller
Sodium Dodecyl Sulfate	-	71729	Fluka Chemie, Buchs, Schweiz
Tributyltin Hydride	-	90915	Fluka Chemie, Buchs, Schweiz
Phosphat-Puffer	D-PBS 1x ohne CaCl ₂ und MgCl ₂	14190-136	Invitrogen Corp., Paisley, UK
Nährmedium (nur für SkinEthic-Modell)	Maintenance Medium (chemisch definiertes Medium MCDB 153)	-	Laboratoire SkinEthic, Nizza, Frankreich
Mesh	feines Netz aus Nylon (Maschenweite ca. 0.3 mm)	-	-

Tab. H.4: Geräte für die Applikation der externen Reize

Gerät	Typ	Hersteller
Gerät zur UV-Bestrahlung	Suntest CPS+	Atlas, Material Testing Technology BV, Deutschland

H.1.3 Antiinflammatorische Behandlung mit BV-17

Tab. H.5: Substanzen und Materialien für die antiinflammatorischen Behandlung

Substanz/Material	Typ/Qualität	Artikel-Nr.	Hersteller
BV-17	Ph.Eur., mikronisiert	104004	Dynapharm Distribution, Meyrin, Schweiz
absoluter Ethanol	HPLC-Qualität	05250602	Biosolve B.V., Valkenswaard, Holland
Phosphat-Puffer	D-PBS 1x ohne CaCl ₂ und MgCl ₂	14190-136	Invitrogen Corp., Paisley, UK
gereinigtes Wasser	Ph.Eur., Gewinnung durch Umkehrosiose	900225	Spirig Pharma AG, Egerkingen, Schweiz
Rizinusöl	Ph.Eur.	26-4620-3	Hänseler AG, Herisau, Schweiz
Sodium Hydroxide	Ph.Eur.	81976-322	Brenntag Schweizerhall AG, Basel, Schweiz
Pemulen TR 2	-	PEMTR2	Noveon Inc., Cleveland, Ohio, USA
Mesh	feines Netz aus Nylon (Maschenweite ca. 0.3 mm)	-	-

Tab. H.6: Geräte für die antiinflammatorischen Behandlung

Gerät	Typ	Hersteller
Homogenisierstab	Ultra-Turrax® T25 basic	IKA Labortechnik, Staufen, Deutschland
Messgerät für pH	Mettler-Toledo SevenMulti™	Mettler-Toledo (Schweiz) GmbH, Greifensee, Schweiz
Messgerät für Dichte	Mettler-Toledo DR40, Combined Meter	Mettler-Toledo (Schweiz) GmbH, Greifensee, Schweiz
Mikroskop	Axioskop	Carl Zeiss AG, Feldbach, Schweiz
Fotoapparat	AxioCam MRC	Carl Zeiss AG, Feldbach, Schweiz
Präzisionspipette	Gilson Repetman® 50-250 µl, mit verstellbarem Ausstossdruck für viskosere Medien	Gilson Inc., Middleton, WI, USA

H.1.4 Erfassung der Hautirritation und der Wirkung der antiinflammatorischen Behandlung mit BV-17

H.1.4.1 ELISA

Tab. H.7: Substanzen und Materialien für die Erfassung der Hautirritation und der Wirkung der antiinflammatorischen Behandlung mittels ELISA

Substanz/Material	Typ/Qualität	Artikel-Nr.	Hersteller
ELISA Kit für IL-1a	ELISA Quantikine® Immunoassay IL-1a	DLA50	R&D Systems, Minneapolis, USA
ELISA Kit für IL-8	ELISA Quantikine® Immunoassay IL-8	D8000C	R&D Systems, Minneapolis, USA
ELISA Kit für IL-6	ELISA Quantikine® Immunoassay IL-6	D6050	R&D Systems, Minneapolis, USA
ELISA Kit für TNF-a	ELISA Quantikine® Immunoassay TNF-a HS	HSTA00D	R&D Systems, Minneapolis, USA
ELISA Kit für IL-1ra	ELISA Quantikine® Immunoassay IL-1ra	DRA00	R&D Systems, Minneapolis, USA
ELISA Kit für IL-1 sRII	ELISA Quantikine® Immunoassay IL-1 sRII	DR1B00	R&D Systems, Minneapolis, USA
Phosphat-Puffer	D-PBS 1x ohne CaCl ₂ und MgCl ₂	14190-136	Invitrogen Corp., Paisley, UK
Edelstahlkugeln	Tungsten Carbide Beads, ø 3 - 5 mm	69997-69989	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland

Tab. H.8: Geräte für die Erfassung der Hautirritation und der Wirkung der antiinflammatorischen Behandlung mittels ELISA

Gerät	Typ	Hersteller
Photometer	µQuant	BioTek Instruments Inc., Winooski, Vermont, USA
Kugelmühle	MM 300	Retsch GmbH & Co. KG, Haan, Deutschland
Zentrifuge	Biofuge fresco	Heraeus (Kendro Laboratory Products AG, Zürich, Schweiz)

H.1.4.2 PCR

Tab. H.9: Substanzen und Materialien für die Erfassung der Hautirritation und der Wirkung der antiinflammatorischen Behandlung mittels PCR

Substanz/Material	Typ/Qualität	Artikel-Nr.	Hersteller
RNA-Stabilisierungsreagenz	RNAlater® RNA Stabilisation Reagent	76104	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
Kit für die RNA-Extraktion	RNeasy® Fibrous Tissue Mini Kit	74704	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
zur DNase Verdauung während der RNA-Aufreinigung	RNase-Free DNase Set	79254	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
RNase-zerstörendes Detergens	mit RNaseZap®-Spray	R-2020	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Tris(hydroxymethyl)-aminomethane	-	25,285-9	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Hydrochloric Acid 1 molar	Fixanal®	38282	Riedel-de Haën (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland)

(Fortsetzung Tab. H.9)

Substanz/Material	Typ/Qualität	Artikel-Nr.	Hersteller
absoluter Ethanol	HPLC-Qualität	05250602	Biosolve B.V., Valkenswaard, Holland
β-Mercaptoethanol	-	M-7154	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Kit für die reverse Transkription	TaqMan® Reverse Transcription Reagent	N8080234	Applied Biosystems, Warrington, UK
Kit für die cDNA- Amplifikation	TaqMan® Universal PCR Master Mix (no AmpErase® UNG)	4324018	Applied Biosystems, Warrington, UK
Spezifische Sonde zur Detektion von IL-1a	TaqMan® Gene Expression Assay für IL-1a	Hs00174092_m1	Applied Biosystems, Warrington, UK
Spezifische Sonde zur Detektion von IL-8	TaqMan® Gene Expression Assay für IL-8	Hs00174103_m1	Applied Biosystems, Warrington, UK
Spezifische Sonde zur Detektion von Lipocortin-1	TaqMan® Gene Expression Assay für Lipocortin-1 (= Annexin-1)	Hs00167549_m1	Applied Biosystems, Warrington, UK
Spezifische Sonde zur Detektion von IL-1 sRII	TaqMan® Gene Expression Assay für IL-1 sRII	Hs00174759_m1	Applied Biosystems, Warrington, UK
Spezifische Sonde zur Detektion von IL-1ra	TaqMan® Gene Expression Assay für IL-1ra	Hs00277299_m1	Applied Biosystems, Warrington, UK
Spezifische Sonde zur Detektion von β-Actin	TaqMan® Endogenous Control, für β-Actin	4310881E	Applied Biosystems, Warrington, UK
Pipettenspitzen	Biosphere® Filter Tips, 10, 100, 1000 µl, mit Filter, steril, doppelt autoklaviert	10 µl: 70.1130.210 100 µl: 70.760.212 1000 µl: 70.762.211	Eppendorf / Gilson (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland)
Eppendorf Tubes	Safe-Lock Tubes, 1.5 ml, 2 ml, doppelt autoklaviert	1.5ml: 0030 123.328 2 ml: 0030 123.344	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Edelstahlkugeln	Tungsten Carbide Beads, ø 5 mm, doppelt autoklaviert	69989	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
Einweg-Küvetten	Eppendorf UVette®	0030 106.300	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
speziell für PCR geeignete Probenplatte	96-Well Optical Reaction Plate	4306737	Applied Biosystems, Warrington, UK
Pincetten	doppelt autoklaviert	-	-
Skalpell	doppelt autoklaviert	-	-
Abdeckfolie für Arbeitsplatz	Benchkote Plus	2301 6150	Schleicher & Schuell, Dassel, Deutschland

Tab. H.10: Geräte für die Erfassung der Hautirritation und der Wirkung der antiinflammatorischen Behandlung mittels PCR

Gerät	Typ	Hersteller
Kugelmühle	MM 300	Retsch GmbH & Co. KG, Haan, Deutschland
Temperiergerät	Vortemp 56 EVC	Biolabo Scientific Instruments, Chatel-St-Denis, Schweiz
Photometer	BioPhotometer	Vaudaux-Eppendorf, Schönenbuch, Schweiz
Thermocycler	ABI Prism 7500	Applied Biosystems, Warrington, UK
Zentrifuge	Biofuge fresco	Heraeus (Kendro Laboratory Products AG, Zürich, Schweiz)

H.1.4.3 LDH-Test

Tab. H.11: Substanzen und Materialien zur Durchführung des LDH-Tests

Substanz/Material	Typ/Qualität	Artikel-Nr.	Hersteller
LDH Test-Kit	Cytotoxicity Detection Kit	1 644 793	Roche Diagnostics AG, Rotkreuz, Schweiz

Tab. H.12: Geräte zur Durchführung des LDH-Tests

Gerät	Typ	Hersteller
Photometer	µQuant	BioTek Instruments Inc., Winooski, Vermont, USA

H.1.4.4 MTT-Test

Tab. H.13: Substanzen und Materialien zur Durchführung des MTT-Tests

Substanz/Material	Typ/Qualität	Artikel-Nr.	Hersteller
Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide	-	M5655-1G	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Jeweiliges Nährmedium pro Hautmodell	Maintenance Medium (SkinEthic-Modell)	-	Laboratoire SkinEthic, Nizza, Frankreich
	ALI-Culture Medium (Phenion FT-Modell)	-	Phenion GmbH & Co.KG, Düsseldorf, Deutschland
	Skin Short Term Culture Medium (Natskin-Modell)	MIL207	Biopredict Int., Rennes, Frankreich
Phosphat-Puffer	D-PBS 1x ohne CaCl ₂ und MgCl ₂	14190-136	Invitrogen Corp., Paisley, UK
Isopropanol	Ph.Eur.	81057-550	Brenntag Schweizerhall AG, Basel, Schweiz

Tab. H.14: Geräte zur Durchführung des MTT-Tests

Gerät	Typ	Hersteller
Photometer	µQuant	BioTek Instruments Inc., Winooski, Vermont, USA
Inkubator	Nuaire™ US Airflow CO ₂ Water-Jacketed Incubator Modell NU 485E	NuAire Corp., Laboratory Equipment Supply, Plymouth, MN, USA

H.1.4.5 Histologie

Tab. H.15: Substanzen und Materialien für die Histologie

Substanz/Material	Typ/Qualität	Artikel-Nr.	Hersteller
Formalin zur Probenkonservierung	Accustain® Formalin Solution 10 %, (neutral buffered)	HT50-1-2	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Phosphat-Puffer	D-PBS 1x ohne CaCl ₂ und MgCl ₂	14190-136	Invitrogen Corp., Paisley, UK
Xylol GR	-	1.08685.2500	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Ethanol (100-90-80-70-50 %)	HPLC-Qualität (entsprechend verdünnt mit gereinigtem Wasser)	05250602	Biosolve B.V., Valkenswaard, Holland

(Fortsetzung Tab. H.15)

Substanz/Material	Typ/Qualität	Artikel-Nr.	Hersteller
gereinigtes Wasser	Ph.Eur., Gewinnung durch Umkehrosmose	900225	Spirig Pharma AG, Egerkingen, Schweiz
Einbettwachs (Paraffin)	Leica Histowax	037432123	Leica Microsystems Nussloch GmbH, Nussloch, Deutschland
Einschlussmittel für Mikroskoptechnik	Eukitt® quick-hardening mounting medium	03989	Fluka Chemie GmbH, Buchs, Schweiz
Meyers Hämalaun Lösung	-	1.09249.500	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Eosin Gelb-Lösung 0.5 %	-	1.09844.1000	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Antikörper für CPD	Pyrimidine(Thymine)-Dimer, Clone H3, monoclonal mouse	T1192	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Detektion für CPD	DakoCytamation EnVision+System-HRP-Kit	K4006	Dako Denmark A/S, Glostrup, Dänemark

Tab. H.16: Geräte für die Histologie

Gerät	Typ	Hersteller
Infiltrationsgerät	Leica TP 1020	Leica Microsystems Nussloch GmbH, Nussloch, Deutschland
Einbettstation	Leica EG 1140 H + C	
Rotations-Mikrotom	Leica RM 2135	
Wasserbad	Leica HI 1210	
Strecktisch	Leica HI 1220	
Lichtmikroskop	Leica DMLP	
Digitalkamera	Leica DC100	

H.1.5 Penetration / Permeation von BV-17

Tab. H.17: Substanzen und Materialien zur Erfassung der Penetration / Permeation des antiinflammatorischen Wirkstoffs

Substanz/Material	Typ/Qualität	Artikel-Nr.	Hersteller
Betamethason-17-Valerat	Ph.Eur., mikronisiert	104004	Dynapharm Distribution, Meyrin, Schweiz
Betamethason-21-Valerat (als Referenz)	CRS	-	Council of Europe, European Pharmacopoeia, Strasbourg, Frankreich
Betamethason (als Referenz)	USP	B-9675	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
gereinigtes Wasser	Ph.Eur., Gewinnung durch Umkehrosmose	900225	Spirig Pharma AG, Egerkingen, Schweiz
Acetonitril	HPLC-Qualität	C73C11X	Labscan Limited, Dublin, Irland
Methanol	HPLC-Qualität	C17C11X	Labscan Limited, Dublin, Irland
Flüssigstickstoff	-	-	PanGas, Dagmersellen, Schweiz
Säule	CC 125/2 Nucleosil 100-5 C18	721622.20	Macherey-Nagel AG, Oensingen, Schweiz
Vials	CleanPack 32 x 11.6 mm	551090477	Schmidlin Labor und Service AG, Neuheim, Schweiz

(Fortsetzung Tab. H.17)

Substanz/Material	Typ/Qualität	Artikel-Nr.	Hersteller
Filter	PTFE, 0.2 µm	8830-P-2(500)	Infochroma AG, Zug, Schweiz
Spritzen	Ominifix®, 5 ml	4616057V	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Watte Pads	DemakUp	-	Procter & Gamble AG, Gossau, Schweiz

Tab. H.18: Geräte zur Erfassung der Penetration / Permeation des antiinflammatorischen Wirkstoffs

Gerät	Typ	Hersteller
HPLC-Messsystem	Entgaser: SCM 1000 Pumpe: P 2000 Autosampler: AS 3000 Detector: UV 6000 LP	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Kugelschwingmühle	MM 2000 (Kühlung mit Flüssigstickstoff)	Retsch GmbH & Co. KG, Haan, Deutschland
Zentrifuge	Biofuge fresco	Heraeus (Kendro Laboratory Products AG, Zürich, Schweiz)

H.1.6 Allgemeines Verbrauchsmaterial

Tab. H.19: Allgemeines Verbrauchsmaterial

Substanz/Material	Typ/Qualität	Artikel-Nr.	Hersteller
Präzisionspipette	Gilson Pipetman® 20, 200, 1000 µl	-	Gilson Inc., Middleton, WI, USA
Pipettenspitzen	Biosphere® Filter Tips, 200, 1000 µl, mit Filter, steril	200 µl: 70.760.302 1000 µl: 70.762.211	Eppendorf / Gilson (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland)
Stabpipetten	Costar® Steripetten 5, 10, 25 ml, steril	5 ml: 4487 10 ml: 4488 25 ml: 4489	Corning Inc., NY, USA
Eppendorf Tubes	Safe-Lock Tubes, 1.5 ml, 2 ml	1.5ml: 0030 123.328 2 ml: 0030 123.344	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Kultur-Platten	Costar® Cell Culture Plate, 6-Well, 12-Well, 24-Well, 96-Well, steril	6-Well: 3506 12-Well: 3512 24Well: 3527 96-Well: 3585	Corning Inc., NY, USA
Petrischalen	Corning® Cell Culture Dish, 60 mm x 15 mm, steril	430166	Corning Inc., NY, USA
Sterilfilter	0.2 µm, steril	1210024	Orange Scientific n.v./s.a., Braine-l'Alleud, Belgien
Tubes	BlueMax™ 15 ml, steril	352097	Becton Dickinson Labware, Meylan Cedex, Frankreich
Skalpell	steril	No. 15	Feather (Socorex ISBA S.A., Ecublens-Lausanne, Schweiz)

H.2 Zusammensetzung Lysis-Puffer

Tab. H.20: Zusammensetzung Lysis-Puffer

Substanz	Artikel-Nr.	Menge für 100g	Hersteller
Grundlösung			
Tris(hydroxymethyl)-aminomethane HCl	93363	0.3152	Fluka Chemie GmbH, Buchs, Schweiz
Sodium Chloride	71378	0.8734	Fluka Chemie GmbH, Buchs, Schweiz
Edetic Acid	03609	0.0295	Fluka Chemie GmbH, Buchs, Schweiz
NP 40	74385	1.006	Fluka Chemie GmbH, Buchs, Schweiz
PMSF	78830	0.0046	Fluka Chemie GmbH, Buchs, Schweiz
gereinigtes Wasser	900225	ad 100	Spirig Pharma AG, Egerkingen, Schweiz
Gebrauchslösung			
CLAP	P-8340	0.1 ml	Sigma-Aldrich, 89552 Steinheim, Deutschland
Grundlösung	-	ad 100 ml	(siehe oben)

H.3 Dimensionen der in vitro- / ex vivo-Hautmodelle

SkinEthic-Modell

Tab. H.21: Dimensionen des SkinEthic-Modells

Messgrösse		Quelle
Durchmesser Appl.fläche (mm)	7.979	berechnet ($A = r^2 \times p$)
Oberfläche für Applikation (mm ²)	50	Angabe durch Lab. SkinEthic, Nizza, Frankreich (durch Plexiglasrahmen begrenztes Areal)
Dicke Epidermis (mm)	0.1206	Ausmessen von histologischen Schnitten (MW aus 20 Hautproben, Daten nicht gezeigt)
Dicke Membran (mm)	0.003	Angabe durch Lab. SkinEthic, Nizza, Frankreich
Volumen Epidermis (mm ³)	6.03	berechnet ($50 \text{ mm}^2 \times 0.1206 \text{ mm} = 6.03 \text{ mm}^3$)
Gewicht Epidermis (g)	0.006	(Annahme: Dichte Haut = 1)

Phenion FT-Modell

Tab. H.22: Dimensionen des Phenion FT-Modells

Messgrösse		Quelle
Durchmesser Appl.fläche (mm)	13	Angabe durch Phenion GmbH & Co. KG, Düsseldorf, Deutschland
Oberfläche für Applikation (mm ²)	132.7	berechnet ($A = r^2 \times p$)
Dicke Haut (mm)	-	-
Dicke Membran (mm)	-	-
Volumen Haut (mm ³)	-	-
Gewicht Haut (g)	0.255	gewogen (MW aus 42 Hautproben aus 2 Chargen, Daten nicht gezeigt)

Natskin-Modell

Tab. H.23: Dimensionen des Natskin-Modells

Messgrösse	Quelle	
kleines Format		
Durchmesser Appl.fläche (mm)	5	Angabe durch Biopredict Int., Rennes, Frankreich
Oberfläche für Applikation (mm ²)	19.63	berechnet ($A = r^2 \times \pi$)
Durchmesser aussen (mm)	10	Angabe durch Biopredict Int., Rennes, Frankreich
Oberfläche aussen (mm ²)	78.54	berechnet ($A = r^2 \times \pi$)
Dicke Haut (mm)	3.28	berechnet (Annahme: Dicke gleich wie grosses Format)
Dicke Membran (mm)	(keine Membran)	-
Volumen Haut (mm ³)	257.6	berechnet ($V = A \times d$)
Gewicht Haut (g)	0.2576	(Annahme: Dichte Haut = 1)
grosses Format		
Durchmesser Appl.fläche (mm)	10	Angabe durch Biopredict Int., Rennes, Frankreich
Oberfläche für Applikation (mm ²)	78.54	berechnet ($A = r^2 \times \pi$)
Durchmesser aussen (mm)	16	Angabe durch Biopredict Int., Rennes, Frankreich
Oberfläche aussen (mm ²)	201.06	berechnet ($A = r^2 \times \pi$)
Dicke Haut (mm)	3.28	berechnet (Annahme Dichte Haut = 1)
Dicke Membran (mm)	(keine Membran)	-
Volumen Haut (mm ³)	660	(Annahme: Dichte Haut = 1)
Gewicht Haut (g)	0.660	gewogen (MW aus 12 Hautproben, Daten nicht gezeigt)

H.4 Evaluation Applikationszeitpunkt für BV-17

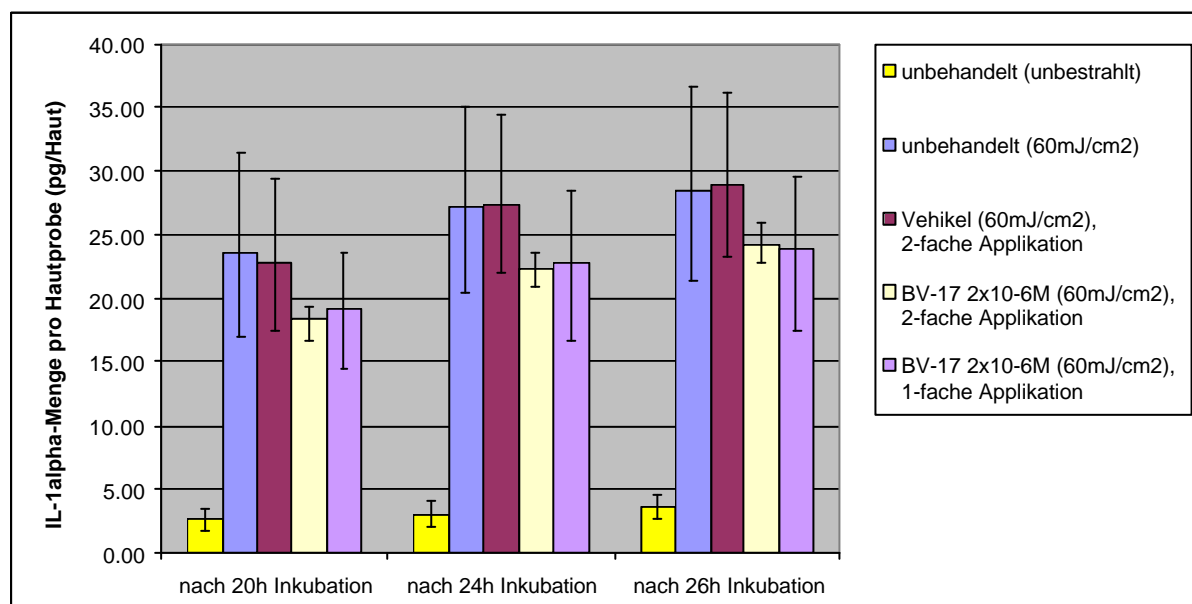


Abb. H.1: L-1a-Proteinmenge (ELISA) im Nährmedium des SkinEthic-Modells nach UV-Bestrahlung (60 J/cm²) und nach Applikation von BV-17 (2 x 10⁻⁶ M, Vehikel absoluter Ethanol), 1-fache Applikation (direkt nach UV-Bestrahlung) und 2-fache Applikation (24 h vor und direkt nach UV-Bestrahlung) (n = 2, Mittelwert, Angabe der Spannweite)

H.5 Reaktion auf den externen Reiz von drei in vitro- / ex vivo-Hautmodellen

H.5.1 IL-1a-Sekretion

Tab. H.24: Relative IL-1a-Proteinmenge im Nährmedium der in vitro-/ex vivo-Hautmodelle SkinEthic, Phenion FT und Natskin nach UV-Bestrahlung, nach 6 h resp. 8 h u. 24 h Inkubation (relativ zur unbestrahlten Hautprobe pro Zeitpunkt) (n = 3, für SkinEthic nach 24 h n = 4, Mittelwert ± absolute Standardabweichung)

UV-Dosis (mJ/cm ²)	Relative IL-1a-Menge (bezogen auf die unbestrahlte Hautprobe pro Zeitpunkt)											
	SkinEthic				Phenion FT				Natskin			
	6 h Mittelwert	abs. Stabw.	24 h Mittelwert	abs. Stabw.	8 h Mittelwert	abs. Stabw.	24 h Mittelwert	abs. Stabw.	8 h Mittelwert	abs. Stabw.	24 h Mittelwert	abs. Stabw.
0	1.00		1.00	0.370	1.00	0.126	1.00	0.066	1.00	0.388	1.00	0.224
20	0.53		0.50									
30					1.05	0.365	1.14	0.173	1.08	0.303	0.92	0.334
40	1.23		0.84	0.236								
60	3.13	0.111	2.17	0.303	0.86	0.096	0.94	0.213	3.31	1.676	1.15	0.395
80	1.75	0.873	2.25	0.404								
125					1.21	0.386	1.85	0.463	3.15	1.878	2.33	2.289
160	1.83	0.810	1.95	0.649								
250					1.03	0.352	1.22	0.419	2.78	0.322	3.09	1.786
320	3.26	1.824	1.71	0.203								
500									6.07	1.941	2.52	0.658

Tab. H.25: IL-1a-Proteinmenge pro Hautprobe im Nährmedium der in vitro-/ex vivo-Hautmodelle SkinEthic, Phenion FT und Natskin nach UV-Bestrahlung, nach 6 h resp. 8 h und 24 h Inkubation (n = 3, für SkinEthic nach 24 h n = 4, Mittelwert ± absolute Standardabweichung)

UV-Dosis (mJ/cm ²)	IL-1a-Menge pro Stück Hautprobe											
	SkinEthic				Phenion FT				Natskin			
	6 h Mittelwert (pg/Haut)	abs. Stabw.	24 h Mittelwert (pg/Haut)	abs. Stabw.	8 h Mittelwert (pg/Haut)	abs. Stabw.	24 h Mittelwert (pg/Haut)	abs. Stabw.	8 h Mittelwert (pg/Haut)	abs. Stabw.	24 h Mittelwert (pg/Haut)	abs. Stabw.
0	0.94		2.72	0.315	26.55	3.349	43.30	2.840	5.41	2.102	9.53	2.131
20	0.50		1.15									
30					27.87	9.696	49.15	7.505	5.83	1.641	8.75	3.186
40	1.16		1.95	0.545								
60	2.92	0.104	5.02	0.700	22.96	2.551	40.70	9.245	17.92	9.071	10.94	3.763
80	1.18	0.824	5.21	0.933								
125					32.09	10.252	80.14	20.070	17.06	10.166	22.15	21.809
160	1.75	0.765	4.51	1.500								
250					27.38	9.348	52.93	18.160	15.07	1.744	29.44	17.014
320	2.09	1.722	3.95	0.468								
500									32.87	10.508	23.99	6.273

Tab. H.26: IL-1a-Proteinmenge berechnet pro Masse der Hautprobe im Nährmedium der in vitro-/ex vivo-Hautmodelle SkinEthic, Phenion FT und Natskin nach UV-Bestrahlung, nach 6 h resp. 8 h und 24 h Inkubation (n = 3, für SkinEthic nach 24 h n = 4, Mittelwert ± absolute Standardabweichung)

UV-Dosis (mJ/cm ²)	IL-1a-Menge pro Masse Hautprobe											
	SkinEthic Durchschnittsmasse 0.006 g				Phenion FT Durchschnittsmasse 0.255 g				Natskin Durchschnittsmasse 0.258 g (kleines Format)			
	6 h Mittelwert (pg/g)	abs. Stabw.	24 h Mittelwert (pg/g)	abs. Stabw.	8 h Mittelwert (pg/g)	abs. Stabw.	24 h Mittelwert (pg/g)	abs. Stabw.	8 h Mittelwert (pg/g)	abs. Stabw.	24 h Mittelwert (pg/g)	abs. Stabw.
0	156.63		383.39	141.983	104.12	13.135	169.81	11.139	21.01	8.159	36.98	8.274
20	82.36		190.46									
30					109.29	38.025	192.76	29.433	22.63	6.369	33.98	12.369
40	192.97		323.32	90.438								
60	490.27	17.330	832.98	116.121	90.03	10.002	159.60	36.254	69.57	35.214	42.47	14.606
80	274.84	136.681	863.63	154.740								
125					125.83	40.202	314.27	78.705	66.23	39.464	85.99	84.664
160	286.51	126.898	747.57	248.824								
250					107.36	36.659	207.58	71.216	58.50	6.771	114.28	66.049
320	510.54	285.641	654.69	77.690								
500									127.60	40.793	93.12	24.351

Tab. H.27: IL-1a-Proteinmenge berechnet pro Oberfläche der Hautprobe im Nährmedium der in vitro-/ex vivo-Hautmodelle SkinEthic, Phenion FT und Natskin nach UV-Bestrahlung, nach 6 h resp. 8 h und 24 h Inkubation (n = 3, für SkinEthic nach 24 h n = 4, Mittelwert ± absolute Standardabweichung)

UV-Dosis (mJ/cm ²)	IL-1a-Menge pro Oberfläche Hautprobe											
	SkinEthic Oberfläche 0.500 cm ²				Phenion FT Oberfläche 1.327 cm ²				Natskin Oberfläche 0.785 cm ² (kleines Format)			
	6 h Mittelwert (pg/cm ²)	abs. Stabw.	24 h Mittelwert (pg/cm ²)	abs. Stabw.	8 h Mittelwert (pg/cm ²)	abs. Stabw.	24 h Mittelwert (pg/cm ²)	abs. Stabw.	8 h Mittelwert (pg/cm ²)	abs. Stabw.	24 h Mittelwert (pg/cm ²)	abs. Stabw.
0	1.89		4.62	1.712	20.01	2.524	32.63	2.140	6.89	2.676	12.13	2.714
20	0.99		2.30									
30					21.00	7.307	37.04	5.656	7.42	2.089	11.14	4.057
40	2.33		3.90	1.091								
60	5.91	0.209	10.05	1.400	17.30	1.922	30.67	6.967	22.82	11.550	13.93	4.791
80	3.31	1.648	10.42	1.866								
125					24.18	7.725	60.39	15.124	21.72	12.944	28.20	27.768
160	3.46	1.530	9.02	3.001								
250					20.63	7.045	39.89	13.685	19.19	2.221	37.48	21.663
320	6.16	3.445	7.90	0.937								
500									41.85	13.379	30.54	7.987

H.5.2 IL-1a-Menge im Gewebe

Tab. H.28: Relative IL-1a-Proteinmenge im Gewebe der in vitro-/ex vivo-Hautmodelle Phenion FT und Natskin nach UV-Bestrahlung, nach 8h und 24 h Inkubation (relativ zur unbestrahlten Hautprobe pro Zeitpunkt) (n = 1)

UV-Dosis (mJ/cm ²)	Relative IL-1a-Menge (bezogen auf die unbestrahlte Hautprobe pro Zeitpunkt)			
	Phenion FT		Natskin	
	8 h	24 h	8 h	24 h
0	1.00	1.00	1.00	1.00
30	1.29	0.80	0.87	0.49
60	0.58	0.66	2.91	0.97
125	1.20	0.97	1.10	5.12
250	0.18	0.30	8.37	4.97
500			8.02	4.20

Tab. H.29: IL-1a-Proteinmenge pro Hautprobe im Gewebe der in vitro-/ex vivo-Hautmodelle Phenion FT und Natskin nach UV-Bestrahlung, nach 8 h und 24 h Inkubation (n = 1)

UV-Dosis (mJ/cm ²)	IL-1a-Menge pro Stück Hautprobe			
	Phenion FT		Natskin	
	8 h (pg/Haut)	24 h (pg/Haut)	8 h (pg/Haut)	24 h (pg/Haut)
0	1027.2	1225.7	1179.4	2032.2
30	976.0	803.2	1025.7	987.1
60	484.9	793.8	3429.5	1976.8
125	936.3	1042.0	1294.9	10405.6
250	153.1	268.0	9875.5	10105.0
500			9459.3	8537.4

Tab. H.30: IL-1a-Proteinmenge berechnet pro Masse der Hautprobe im Gewebe der in vitro-/ex vivo-Hautmodelle Phenion FT und Natskin nach UV-Bestrahlung, nach 8 h und 24 h Inkubation (n = 1)

UV-Dosis (mJ/cm ²)	IL-1a-Menge pro Masse Hautprobe			
	Phenion FT Durchschnittsmasse 0.255 g		Natskin Durchschnittsmasse 0.258 g (kleines Format)	
	8 h (pg/g)	24 h (pg/g)	8 h (pg/g)	24 h (pg/g)
0	3286.0	3576.6	4578.4	7888.8
30	4241.7	2844.3	3981.8	3831.8
60	1900.8	2369.4	13313.2	7673.7
125	3945.6	3476.7	5026.7	40394.6
250	601.3	1055.8	38336.4	39227.6
500			36721.0	33142.1

Tab. H.31: IL-1a-Proteinmenge berechnet pro Oberfläche der Hautprobe im Gewebe der in vitro-/ex vivo-Hautmodelle Phenion FT und Natskin nach UV-Bestrahlung, nach 8 h und 24 h Inkubation (n = 1)

UV-Dosis (mJ/cm ²)	IL-1a-Menge pro Oberfläche Hautprobe			
	Phenion FT Oberfläche 1.327 cm ²		Natskin Oberfläche 0.785 cm ² (kleines Format)	
	8 h (pg/cm ²)	24 h (pg/cm ²)	8 h (pg/cm ²)	24 h (pg/cm ²)
0	774.1	923.7	1501.7	2587.4
30	735.5	605.3	1306.0	1256.8
60	365.4	598.2	4366.5	2516.9
125	705.6	785.2	1648.7	13248.8
250	115.4	201.9	12573.8	12866.1
500			12044.0	10870.1

H.5.3 IL-8-Sekretion

Tab. H.32: Relative IL-8-Proteinmenge im Nährmedium der in vitro-/ex vivo-Hautmodelle Phenion FT und Natskin nach UV-Bestrahlung, nach 8h und 24 h Inkubation (relativ zur unbestrahlten Hautprobe pro Zeitpunkt) (n = 3, Mittelwert ± absolute Standardabweichung)

UV-Dosis (mJ/cm ²)	Relative IL-8-Menge (bezogen auf die unbestrahlte Hautprobe pro Zeitpunkt)							
	Phenion FT				Natskin			
	8 h Mittelwert	abs. Stabw.	24 h Mittelwert	abs. Stabw.	8 h Mittelwert	abs. Stabw.	24 h Mittelwert	abs. Stabw.
0	1.00	0.089	1.00	0.082	1.00	0.223	1.00	0.038
30	1.02	0.299	1.23	0.450	0.73	0.078	0.79	0.243
60	0.66	0.189	1.70	0.217	0.22	0.280	0.46	0.370
125	1.12	0.196	3.69	1.001	0.18	0.047	0.06	0.092
250	0.86	0.386	0.92	0.180	0.00	0.001	0.00	0.000
500					0.01	0.003	0.00	0.002

Tab. H.33: IL-8-Proteinmenge pro Hautprobe im Nährmedium der in vitro-/ex vivo-Hautmodelle Phenion FT und Natskin nach UV-Bestrahlung, nach 8h und 24 h Inkubation (n = 3, Mittelwert ± absolute Standardabweichung)

UV-Dosis (mJ/cm ²)	IL-8-Menge pro Stück Hautprobe							
	Phenion FT				Natskin			
	8 h Mittelwert (pg/Haut)	abs. Stabw.	24 h Mittelwert (pg/Haut)	abs. Stabw.	8 h Mittelwert (pg/Haut)	abs. Stabw.	24 h Mittelwert (pg/Haut)	abs. Stabw.
0	2150.1	190.35	4181.9	341.25	3128.2	697.86	7125.8	267.85
30	2193.0	643.11	5150.3	1880.01	2275.7	244.51	5655.2	1733.29
60	1422.7	405.36	7112.0	907.21	694.0	874.87	3282.6	2638.67
125	2403.4	420.62	15419.4	4185.98	552.9	146.12	455.4	652.97
250	1844.0	828.87	3827.2	753.66	10.4	2.40	8.7	2.60
500					16.1	8.05	20.4	17.75

Tab. H.34: IL-8-Proteinmenge berechnet pro Masse der Hautprobe im Nährmedium der in vitro-/ex vivo-Hautmodelle Phenion FT und Natskin nach UV-Bestrahlung, nach 8 h und 24 h Inkubation (n = 3, Mittelwert ± absolute Standardabweichung)

UV-Dosis (mJ/cm ²)	IL-8-Menge pro Masse Hautprobe							
	Phenion FT Durchschnittsmasse 0.255 g				Natskin Durchschnittsmasse 0.258 g (kleines Format)			
	8 h Mittelwert (pg/g)	abs. Stabw.	24 h Mittelwert (pg/g)	abs. Stabw.	8 h Mittelwert (pg/g)	abs. Stabw.	24 h Mittelwert (pg/g)	abs. Stabw.
0	8431.7	746.46	16399.5	1338.22	12143.7	2709.10	27662.2	1039.78
30	8599.9	2522.00	20197.3	7372.57	8834.3	949.18	21953.4	6728.62
60	5579.2	1589.64	27890.2	3557.68	2693.9	3396.23	12743.2	10243.29
125	9425.1	1649.48	60468.4	16415.59	2146.2	567.25	1767.7	2534.83
250	7231.3	3250.45	15008.5	2955.52	40.4	9.31	33.7	10.09
500					62.7	31.26	79.3	68.91

Tab. H.35: IL-8-Proteinmenge berechnet pro Oberfläche der Hautprobe im Nährmedium der in vitro-/ex vivo-Hautmodelle Phenion FT und Natskin nach UV-Bestrahlung, nach 8 h und 24 h Inkubation (n = 3, Mittelwert ± absolute Standardabweichung)

UV-Dosis (mJ/cm ²)	IL-8-Menge pro Oberfläche Hautprobe							
	Phenion FT Oberfläche 1.327 cm ²				Natskin Oberfläche 0.785 cm ² (kleines Format)			
	8 h Mittelwert (pg/cm ²)	abs. Stabw.	24 h Mittelwert (pg/cm ²)	abs. Stabw.	8 h Mittelwert (pg/cm ²)	abs. Stabw.	24 h Mittelwert (pg/cm ²)	abs. Stabw.
0	1620.3	143.44	3151.4	257.16	3983.0	888.55	9072.8	341.03
30	1652.6	484.64	3881.2	1416.73	2897.5	311.32	7200.4	2206.89
60	1072.1	305.47	5359.5	683.65	883.6	1113.92	4179.6	3359.65
125	1811.2	316.97	11619.8	3154.47	703.9	186.05	579.8	831.39
250	1389.6	624.62	2884.1	567.94	13.2	3.05	11.1	3.31
500					20.6	10.25	26.0	22.60

H.5.4 IL-8-Menge im Gewebe

Tab. H.36: Relative IL-8-Proteinmenge im Gewebe der in vitro-/ex vivo-Hautmodelle Phenion FT und Natskin nach UV-Bestrahlung, nach 8 h und 24 h Inkubation (relativ zur unbestrahlten Hautprobe pro Zeitpunkt) (n = 1)

UV-Dosis (mJ/cm ²)	Relative IL-8-Menge (bezogen auf die unbestrahlte Hautprobe pro Zeitpunkt)			
	Phenion FT		Natskin	
	8 h	24 h	8 h	24 h
0	1.00	1.00	1.00	1.00
30	1.18	1.77	0.45	1.04
60	1.12	1.73	0.14	0.50
125	2.42	5.67	0.12	0.03
250	1.57	1.79	0.01	0.01
500			0.01	0.01

Tab. H.37: IL-8-Proteinmenge pro Hautprobe im Gewebe der in vitro-/ex vivo-Hautmodelle Phenion FT und Natskin nach UV-Bestrahlung, nach 8 h und 24 h Inkubation (n = 1)

UV-Dosis (mJ/cm ²)	IL-8-Menge pro Stück Hautprobe			
	Phenion FT		Natskin	
	8 h (pg/Haut)	24 h (pg/Haut)	8 h (pg/Haut)	24 h (pg/Haut)
0	16931	6518	78124	84123
30	14742	9490	35100	87213
60	15531	10991	10575	42166
125	31087	32315	9003	2685
250	21669	8646	470	668
500			644	426

Tab. H.38: IL-8-Proteinmenge berechnet pro Masse der Hautprobe im Gewebe der in vitro-/ex vivo-Hautmodelle Phenion FT und Natskin nach UV-Bestrahlung, nach 8 h und 24 h Inkubation (n = 1)

UV-Dosis (mJ/cm ²)	IL-8-Menge pro Masse Hautprobe			
	Phenion FT Durchschnittsmasse 0.255 g		Natskin Durchschnittsmasse 0.258 g (kleines Format)	
	8 h (pg/g)	24 h (pg/g)	8 h (pg/g)	24 h (pg/g)
0	54163	19019	303278	326563
30	64068	33604	136257	338560
60	60881	32808	41052	163687
125	131004	107825	34950	10424
250	85110	34068	1823	2592
500			2500	1655

Tab. H.39: IL-8-Proteinmenge berechnet pro Oberfläche der Hautprobe im Gewebe der in vitro-/ex vivo-Hautmodelle Phenion FT und Natskin nach UV-Bestrahlung, nach 8 h und 24 h Inkubation (n = 1)

UV-Dosis (mJ/cm ²)	IL-8-Menge pro Oberfläche Hautprobe			
	Phenion FT Oberfläche 1.327 cm ²		Natskin Oberfläche 0.785 cm ² (kleines Format)	
	8 h (pg/cm ²)	24 h (pg/cm ²)	8 h (pg/cm ²)	24 h (pg/cm ²)
0	12759	4912	99521	107162
30	11109	7151	44713	111099
60	11704	8282	13471	53714
125	23427	24352	11469	3421
250	16329	6516	598	851
500			820	543

H.5.5 IL-6-Sekretion

Tab. H.40: Relative IL-6-Proteinmenge im Nährmedium des Phenion FT-Modells nach UV-Bestrahlung, nach 8h und 24 h Inkubation (relativ zur unbestrahlten Hautprobe pro Zeitpunkt) (n = 3, Mittelwert ± absolute Standardabweichung)

UV-Dosis	Relative IL-6-Menge (bezogen auf die unbestrahlte Hautprobe pro Zeitpunkt)			
	Phenion FT			
	8 h		24 h	
(mJ/cm ²)	Mittelwert	abs. Stabw.	Mittelwert	abs. Stabw.
0	1.00	0.022	1.00	0.068
30	0.93	0.074	0.92	0.037
60	0.89	0.059	0.87	0.052
125	0.65	0.125	0.90	0.029
250	0.72	0.031	0.75	0.016

Tab. H.41: IL-6-Proteinmenge pro Hautprobe im Nährmedium des Phenion FT-Modells nach UV-Bestrahlung, nach 8 h und 24 h Inkubation (n = 3, Mittelwert ± absolute Standardabweichung)

UV-Dosis	IL-6-Menge pro Stück Hautprobe			
	Phenion FT			
	8 h		24 h	
(mJ/cm ²)	Mittelwert (pg/Haut)	abs. Stabw.	Mittelwert (pg/Haut)	abs. Stabw.
0	2435.8	53.12	2635.4	178.33
30	2259.8	179.14	2418.3	98.69
60	2163.8	142.87	2292.4	136.71
125	1582.1	304.48	2367.3	77.27
250	1754.3	76.23	1968.0	42.60

Tab. H.42: IL-6-Proteinmenge berechnet pro Masse der Hautprobe im Nährmedium des Phenion FT-Modells nach UV-Bestrahlung, nach 8 h und 24 h Inkubation (n = 3, Mittelwert ± absolute Standardabweichung)

UV-Dosis	IL-6-Menge pro Masse Hautprobe			
	Phenion FT Durchschnittsmasse 0.255 g			
	8 h		24 h	
(mJ/cm ²)	Mittelwert (pg/g)	abs. Stabw.	Mittelwert (pg/g)	abs. Stabw.
0	9552.0	208.30	10334.7	699.35
30	8861.9	702.52	9483.4	387.01
60	8485.6	560.29	8989.8	536.12
125	6204.3	1194.03	9283.7	303.04
250	6879.5	298.94	7717.7	167.07

Tab. H.43: IL-6-Proteinmenge berechnet pro Oberfläche der Hautprobe im Nährmedium des Phenion FT-Modells nach UV-Bestrahlung, nach 8h und 24 h Inkubation (n = 3, Mittelwert ± absolute Standardabweichung)

UV-Dosis	IL-6-Menge pro Oberfläche Hautprobe			
	Phenion FT Oberfläche 1.327 cm ²			
	8 h		24 h	
(mJ/cm ²)	Mittelwert (pg/cm ²)	abs. Stabw.	Mittelwert (pg/cm ²)	abs. Stabw.
0	1835.5	40.03	1986.0	134.39
30	1702.9	135.00	1822.4	74.37
60	1630.6	107.67	1727.5	103.02
125	1192.2	229.45	1784.0	58.23
250	1322.00	57.45	1483.1	32.11

H.5.6 IL-6-Menge im Gewebe

Tab. H.44: Relative IL-6-Proteinmenge im Gewebe des Phenion FT-Modells nach UV-Bestrahlung, nach 8 h und 24 h Inkubation (n = 1)

UV-Dosis (mJ/cm ²)	Relative IL-6-Menge (bezogen auf die unbestrahlte Hautprobe pro Zeitpunkt) Phenion FT	
	8 h	24 h
0	1.00	1.00
30	1.32	1.18
60	1.17	1.02
125	1.29	1.12
250	1.18	1.33

Tab. H.45: IL-6-Proteinmenge pro Hautprobe im Gewebe des Phenion FT-Modells nach UV-Bestrahlung, nach 8 h und 24 h Inkubation (n = 1)

UV-Dosis (mJ/cm ²)	IL-6-Menge pro Stück Hautprobe Phenion FT	
	8 h (pg/Haut)	24 h (pg/Haut)
0	1341.2	1280.0
30	1307.8	1242.4
60	1282.8	1275.8
125	1310.6	1259.1
250	1291.1	1256.4

Tab. H.46: IL-6-Proteinmenge berechnet pro Masse der Hautprobe im Gewebe des Phenion FT-Modells nach UV-Bestrahlung, nach 8 h und 24 h Inkubation (n = 1)

UV-Dosis (mJ/cm ²)	IL-6-Menge pro Masse Hautprobe Phenion FT Durchschnittsmasse 0.255 g	
	8 h (pg/g)	24 h (pg/g)
0	4290.4	3735.0
30	5683.7	4399.6
60	5028.5	3808.4
125	5522.9	4201.3
250	5071.2	4950.2

Tab. H.47: IL-6-Proteinmenge berechnet pro Oberfläche der Hautprobe im Gewebe des Phenion FT-Modells nach UV-Bestrahlung, nach 8 h und 24 h Inkubation (n = 1)

UV-Dosis (mJ/cm ²)	IL-6-Menge pro Oberfläche Hautprobe Phenion FT Oberfläche 1.327 cm ²	
	8 h (pg/cm ²)	24 h (pg/cm ²)
0	6140.5	5260.1
30	5520.0	5847.0
60	5469.7	5578.7
125	6417.1	6945.3
250	6232.7	5050.5

H.5.7 Histologische Präparate

H.5.7.1 Hämalaun-Eosin-Färbung

a) SkinEthic-Modell

UV-Dosis	6 h nach UV-Bestrahlung	24 h nach UV-Bestrahlung	48 h nach UV-Bestrahlung
0 mJ/cm ²			
20 mJ/cm ²			
40 mJ/cm ²			
60 mJ/cm ²			
80 mJ/cm ²			
160 mJ/cm ²			
320 mJ/cm ²			

Abb. H.2: Histologische Präparate zum SkinEthic-Modell nach UV-Bestrahlung, nach 6 h, 24 h und 48 h Inkubation, Vergrößerung 400-fach, Hämalaun-Eosin-Färbung

b) Phenion FT-Modell

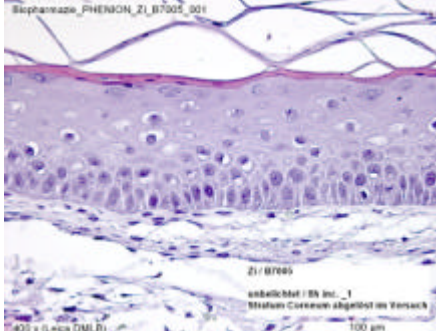
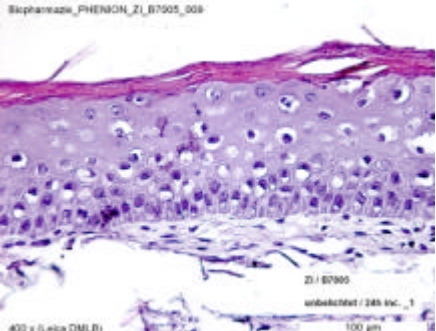
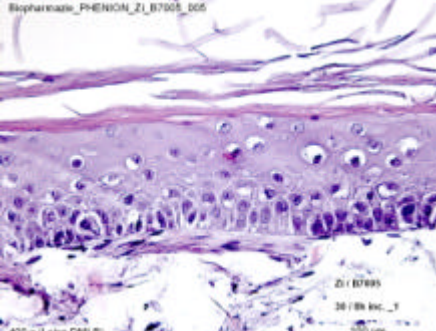
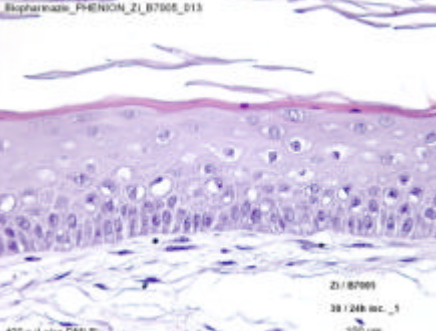
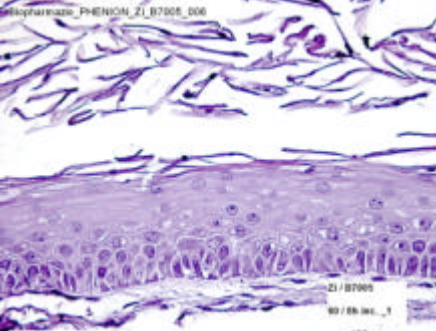
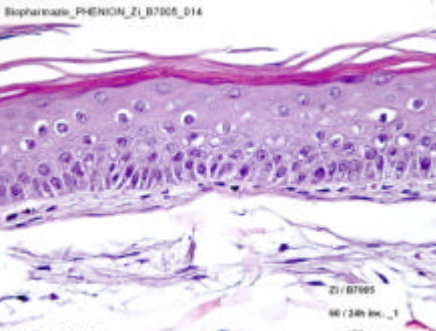

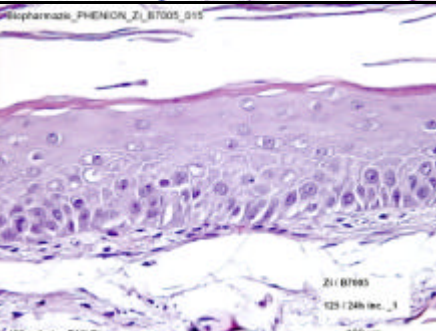
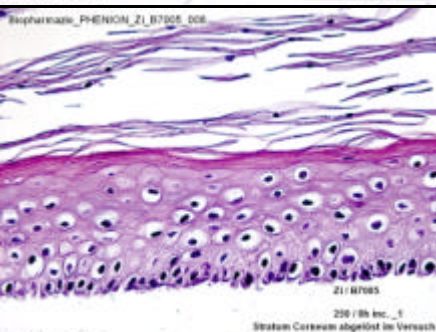
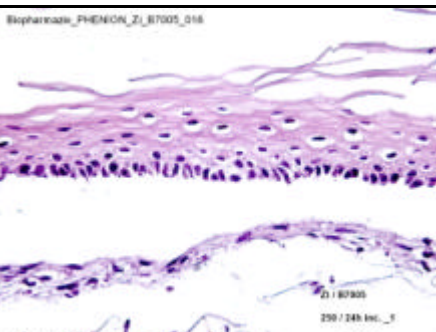
UV-Dosis	8 h nach UV-Bestrahlung	24 h nach UV-Bestrahlung
0 mJ/cm ²	 <p>Biopharmazie_PHENION_ZI_B7005_001 Zi / B7005 unbest. / 8h Inc. _1 Stratum Corneum abgelöst im Versuch 400 x (Leica DMLB) 100 µm</p>	 <p>Biopharmazie_PHENION_ZI_B7005_009 Zi / B7005 unbest. / 24h Inc. _1 400 x (Leica DMLB) 100 µm</p>
30 mJ/cm ²	 <p>Biopharmazie_PHENION_ZI_B7005_005 Zi / B7005 30 / 8h Inc. _1 400 x (Leica DMLB) 100 µm</p>	 <p>Biopharmazie_PHENION_ZI_B7005_013 Zi / B7005 30 / 24h Inc. _1 400 x (Leica DMLB) 100 µm</p>
60 mJ/cm ²	 <p>Biopharmazie_PHENION_ZI_B7005_006 Zi / B7005 60 / 8h Inc. _1 400 x (Leica DMLB) 100 µm</p>	 <p>Biopharmazie_PHENION_ZI_B7005_014 Zi / B7005 60 / 24h Inc. _1 400 x (Leica DMLB) 100 µm</p>
125 mJ/cm ²	 <p>Biopharmazie_PHENION_ZI_B7005_007 Zi / B7005 125 / 8h Inc. _1 400 x (Leica DMLB) 100 µm</p>	 <p>Biopharmazie_PHENION_ZI_B7005_015 Zi / B7005 125 / 24h Inc. _1 400 x (Leica DMLB) 100 µm</p>
250 mJ/cm ²	 <p>Biopharmazie_PHENION_ZI_B7005_008 Zi / B7005 250 / 8h Inc. _1 Stratum Corneum abgelöst im Versuch 400 x (Leica DMLB) 100 µm</p>	 <p>Biopharmazie_PHENION_ZI_B7005_016 Zi / B7005 250 / 24h Inc. _1 400 x (Leica DMLB) 100 µm</p>

Abb. H.3: Histologische Präparate zum Phenion FT-Modell nach UV-Bestrahlung, nach 8h und 24 h Inkubation, Vergrößerung 400-fach, Hämalaun-Eosin-Färbung

c) Natskin-Modell

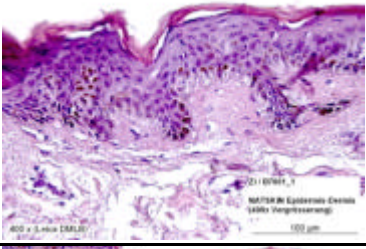
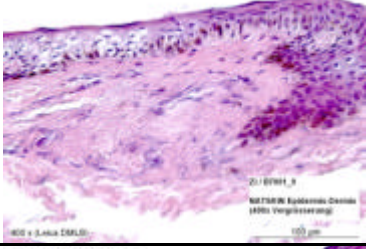
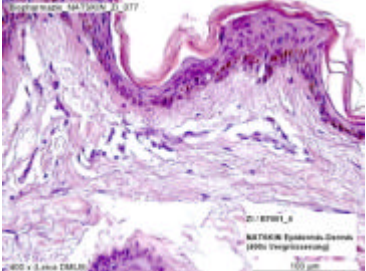
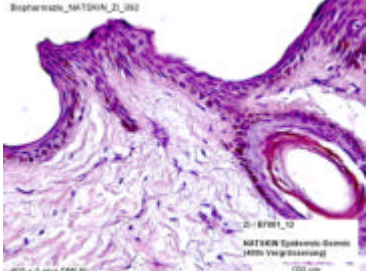
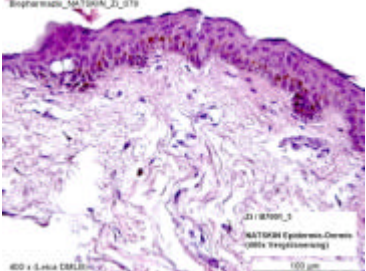
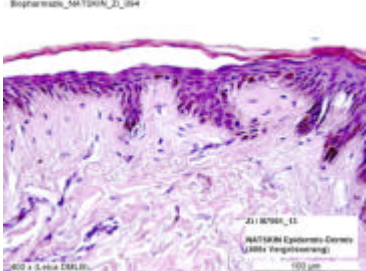
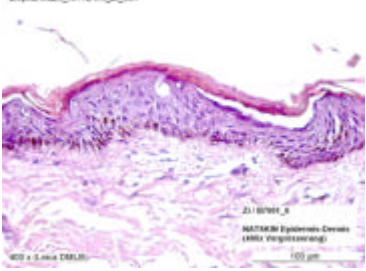
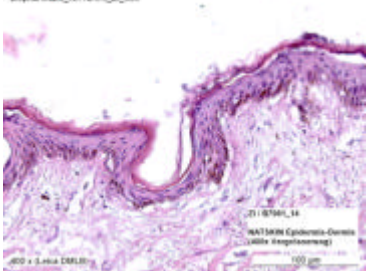
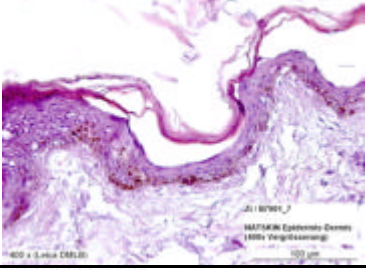
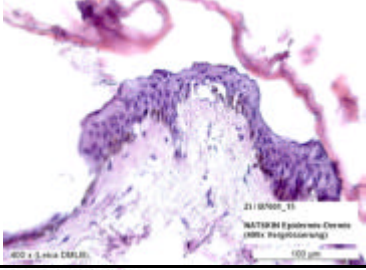
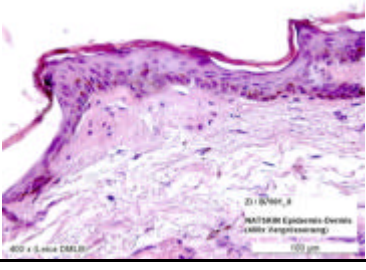
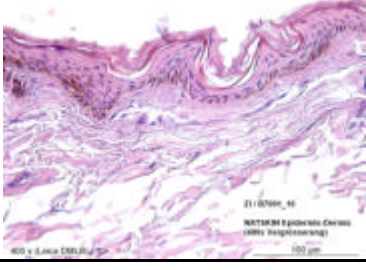
UV-Dosis	8 h nach UV-Bestrahlung	24 h nach UV-Bestrahlung
0 mJ/cm ²		
30 mJ/cm ²		
60 mJ/cm ²		
125 mJ/cm ²		
250 mJ/cm ²		
500 mJ/cm ²		

Abb. H.4: Histologische Präparate zum Natskin-Modell nach UV-Bestrahlung, nach 8 h und 24 h Inkubation, Vergrößerung 400-fach, Hämalaun-Eosin-Färbung

H.5.7.2 CPD-Immunhistochemische Färbung

a) SkinEthic-Modell

UV-Dosis	Negativkontrolle	Färbung mit Antikörper gegen CPD
0 mJ/cm ²		
20 mJ/cm ²		
40 mJ/cm ²		
60 mJ/cm ²		
80 mJ/cm ²		
160 mJ/cm ²		
320 mJ/cm ²		

Abb. H.5: Histologische Präparate zum SkinEthic-Modell nach UV-Bestrahlung, nach 24 h Inkubation, Vergrößerung 400-fach, CPD-Färbung

c) Phenion FT-Modell

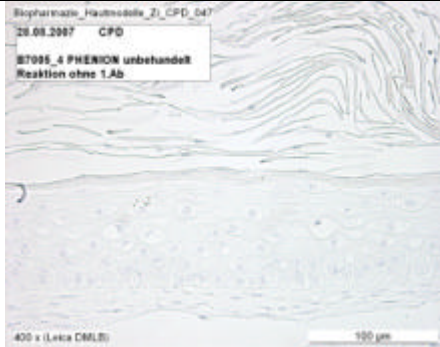
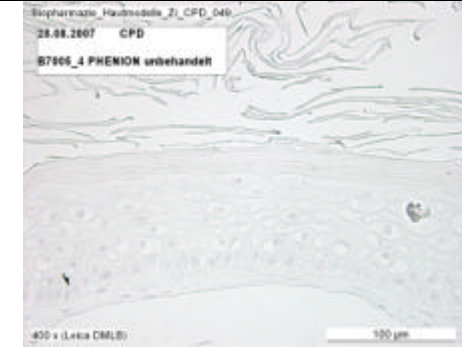
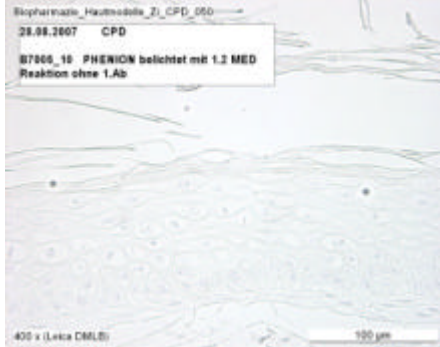
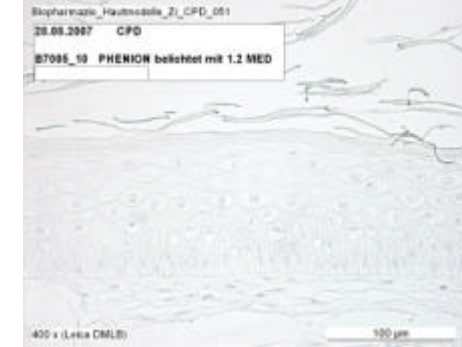
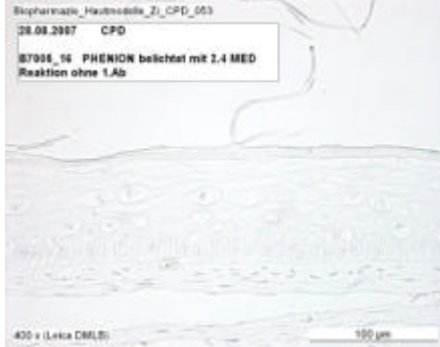
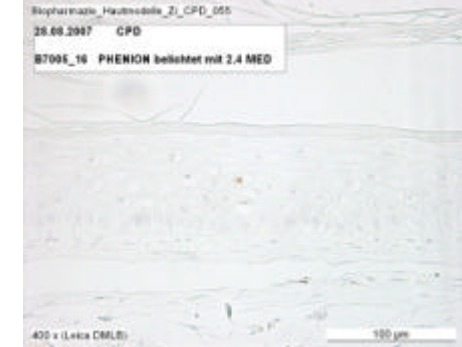
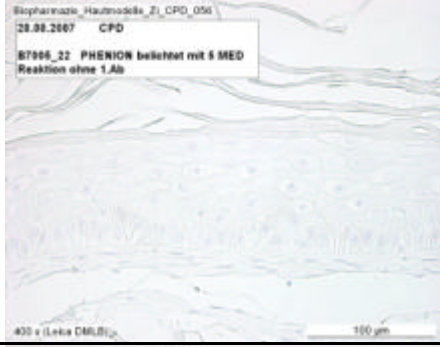
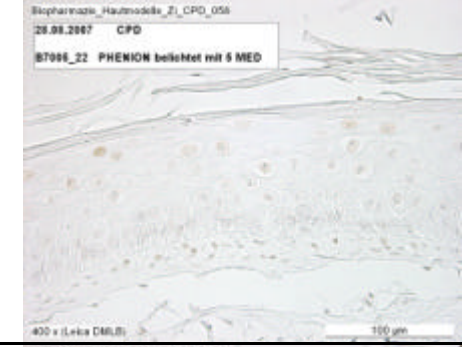
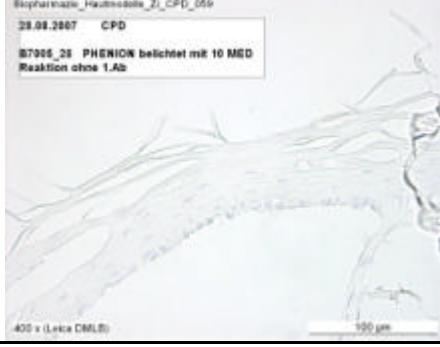
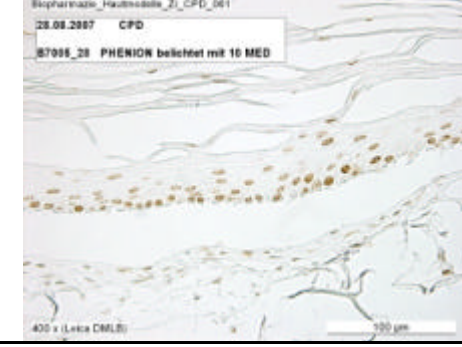
UV-Dosis	Negativkontrolle	Färbung mit Antikörper gegen CPD
0 mJ/cm ²		
30 mJ/cm ²		
60 mJ/cm ²		
125 mJ/cm ²		
250 mJ/cm ²		

Abb. H.6: Histologische Präparate zum Phenion FT-Modell nach UV-Bestrahlung, nach 24 h Inkubation, Vergrößerung 400-fach, CPD-Färbung

c) Natskin-Modell

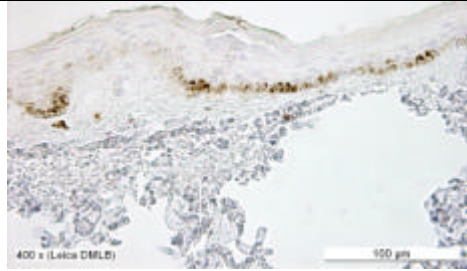
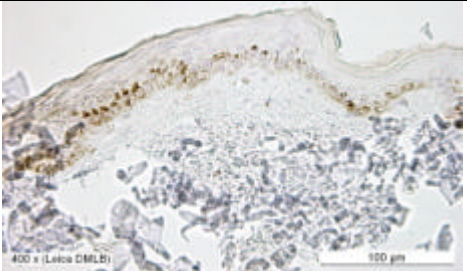
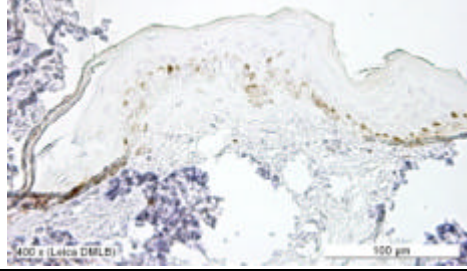
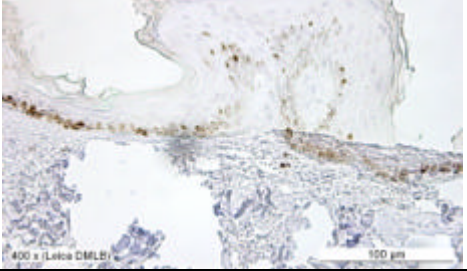
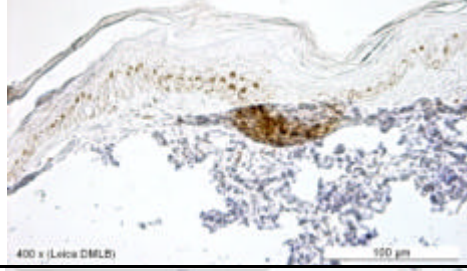
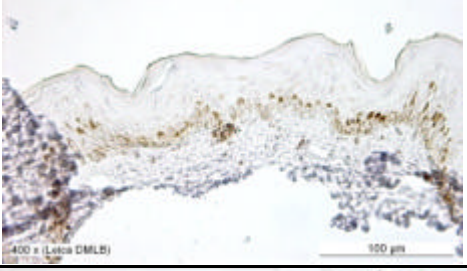
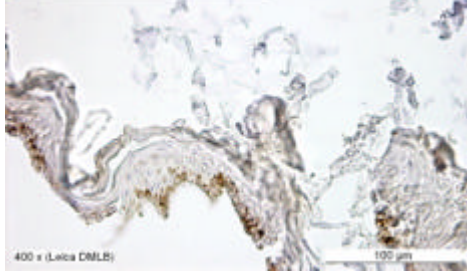
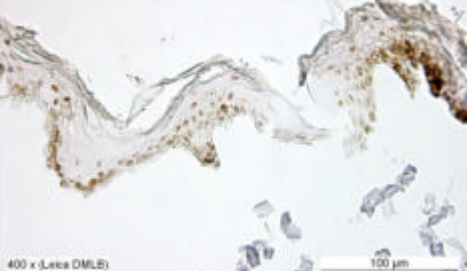
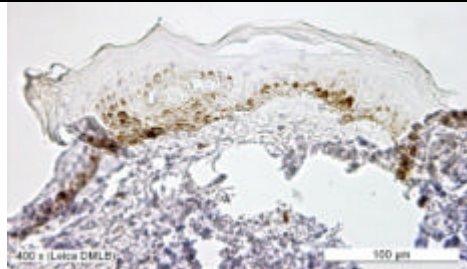
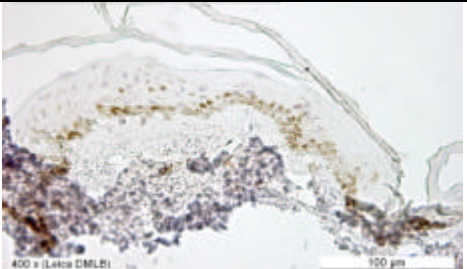
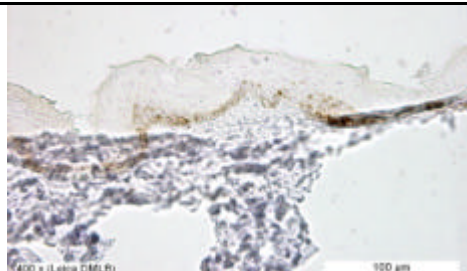

UV-Dosis	Negativkontrolle	Färbung mit Antikörper gegen CPD
0 mJ/cm ²		
30 mJ/cm ²		
60 mJ/cm ²		
125 mJ/cm ²		
250 mJ/cm ²		
500 mJ/cm ²		

Abb. H.7: Histologische Präparate zum Natskin-Modell nach UV-Bestrahlung, nach 24 h Inkubation, Vergrößerung 400-fach, CPD-Färbung

H.6 HPLC-Analytik zu BV-17

H.6.1 BV-17-Umlagerung

a) BV-17

BV-17 (Referenzsubstanz) 4.0 µg/ml in Methanol 50 % - Wasser 50 % (V/V)

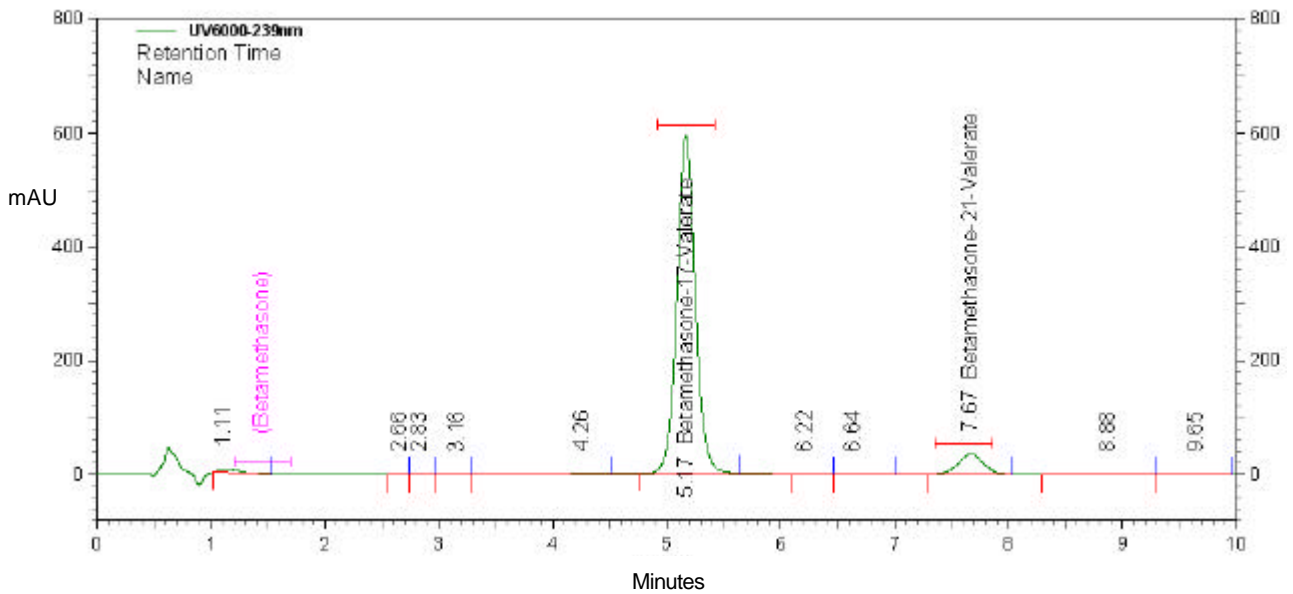


Abb. H.8: Chromatogramm zur Referenzsubstanz für BV-17

b) BV-21

BV-21 (Referenzsubstanz) 2.0 µg/ml in Methanol 50 % - Wasser 50 % (V/V)

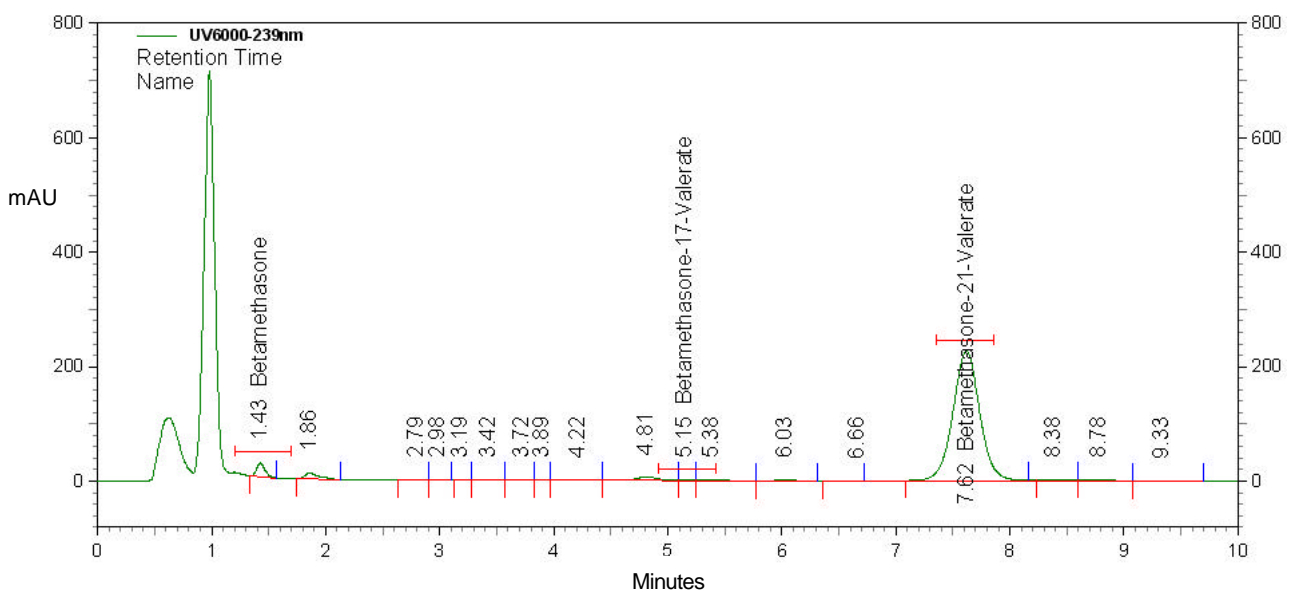


Abb. H.9: Chromatogramm zur Referenzsubstanz für BV-21

c) Betamethason

Betamethason (Referenzsubstanz) 13.0 µg/ml in Methanol 50 % - Wasser 50 % (V/V)

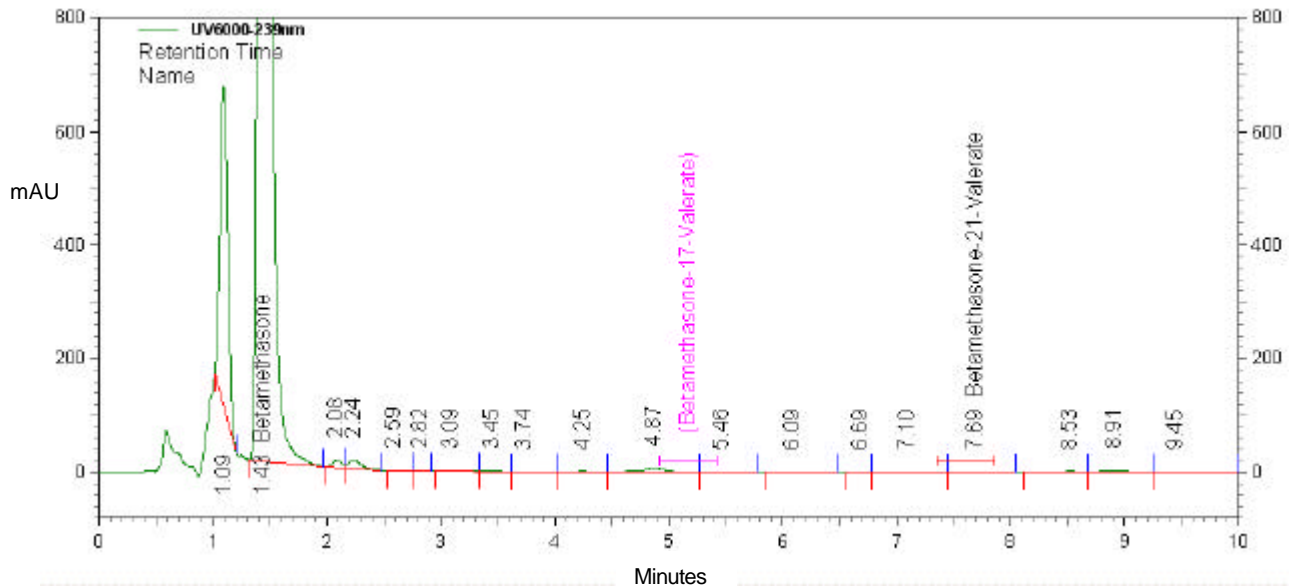


Abb. H.10: Chromatogramm zur Referenzsubstanz für Betamethason

H.6.2 BV-17-Umlagerung in den Modellformulierungen

H.6.2.1 BV-17-Umlagerung in der Modelllösung

a) Modelllösung Vehikel

Alter der Lösung 4 Tage (Lagerung bei 4-15°C und unter Lichtschutz).

Probe verdünnt (Faktor 2) in Methanol 50 % - Wasser 50 % (V/V).

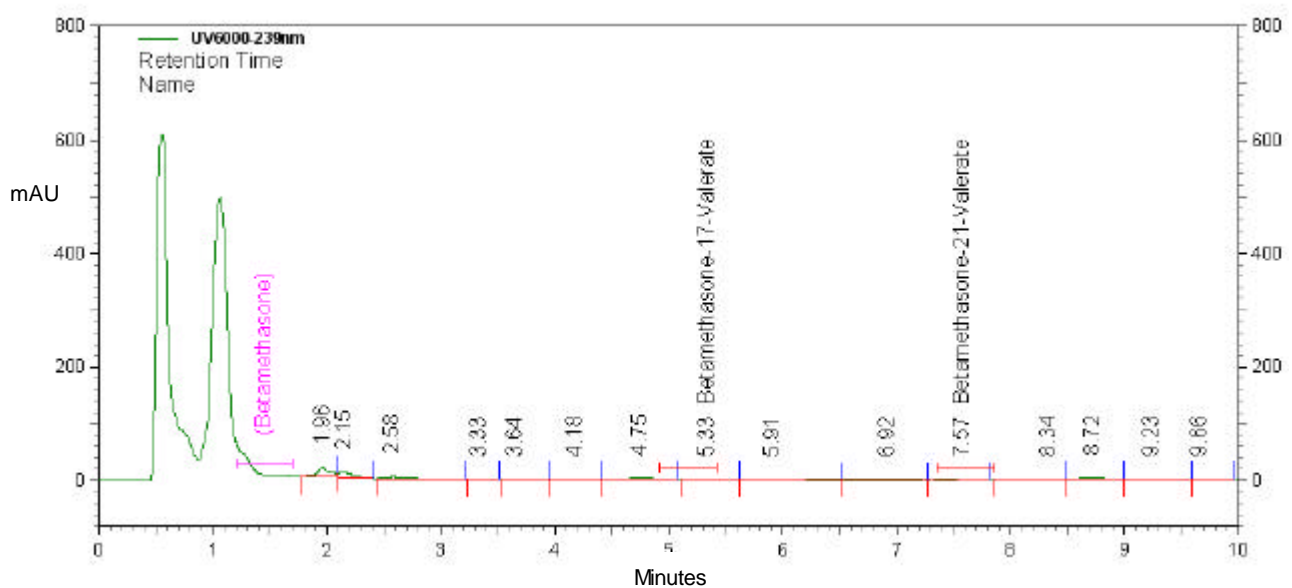


Abb. H.11: Chromatogramm zur ethanolisch-wässrigen Lösung ohne BV-17 (Vehikel)

b) Modelllösung mit BV-17 2×10^{-5} M

Alter der Lösung 4 Tage (Lagerung bei 4-15°C und unter Lichtschutz).
 Probe verdünnt (Faktor 2) in Methanol 50 % - Wasser 50 % (V/V).

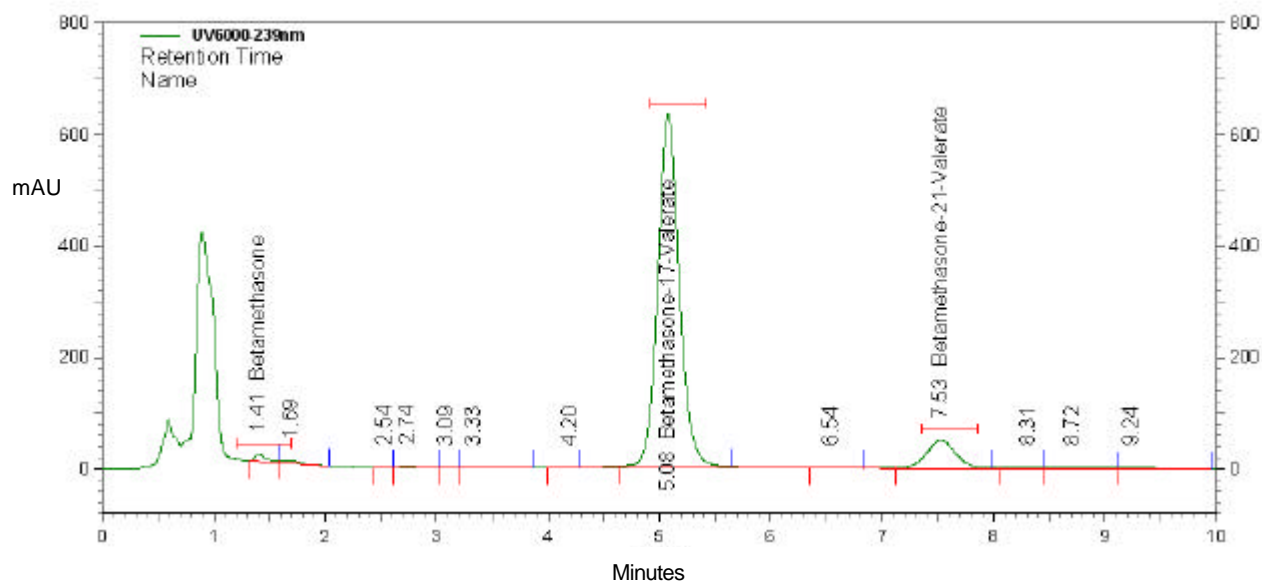


Abb. H.12: Chromatogramm zur ethanolisch-wässrigen Lösung mit BV-17 2×10^{-5} M (Verum)

H.6.2.2 BV-17-Umlagerung in der Modellemulsion

a) Modellemulsion Vehikel

Alter der Emulsion 4 Tage (Lagerung bei 4-15°C und unter Lichtschutz).
 Probe verdünnt (Faktor 200) in Methanol 50 % - Wasser 50 % (V/V).

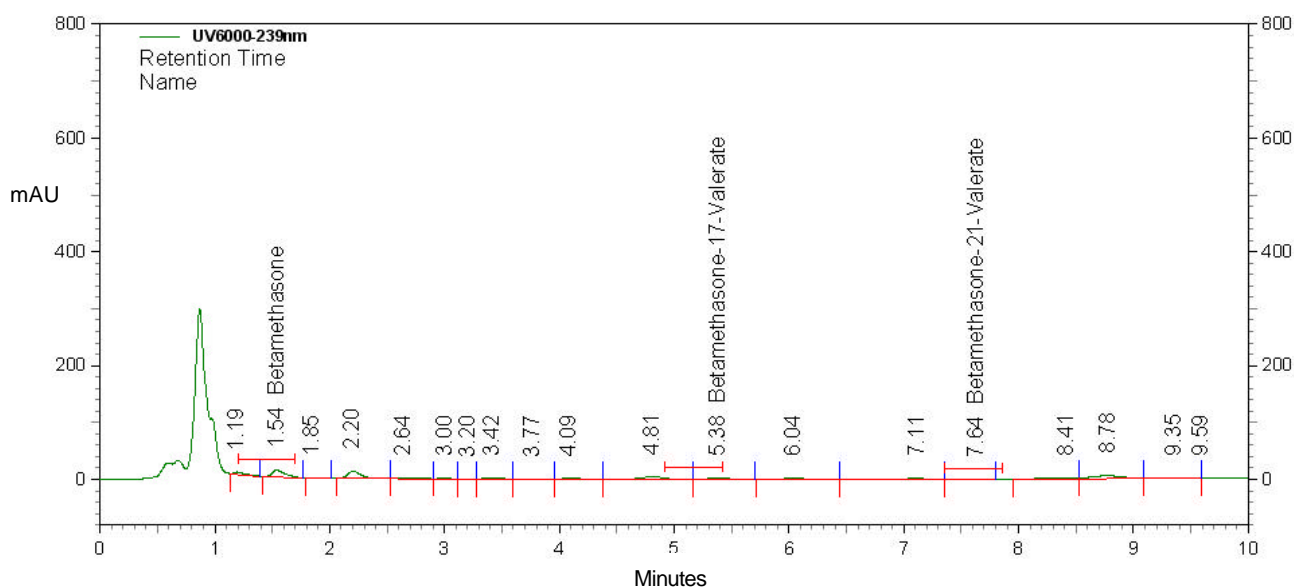
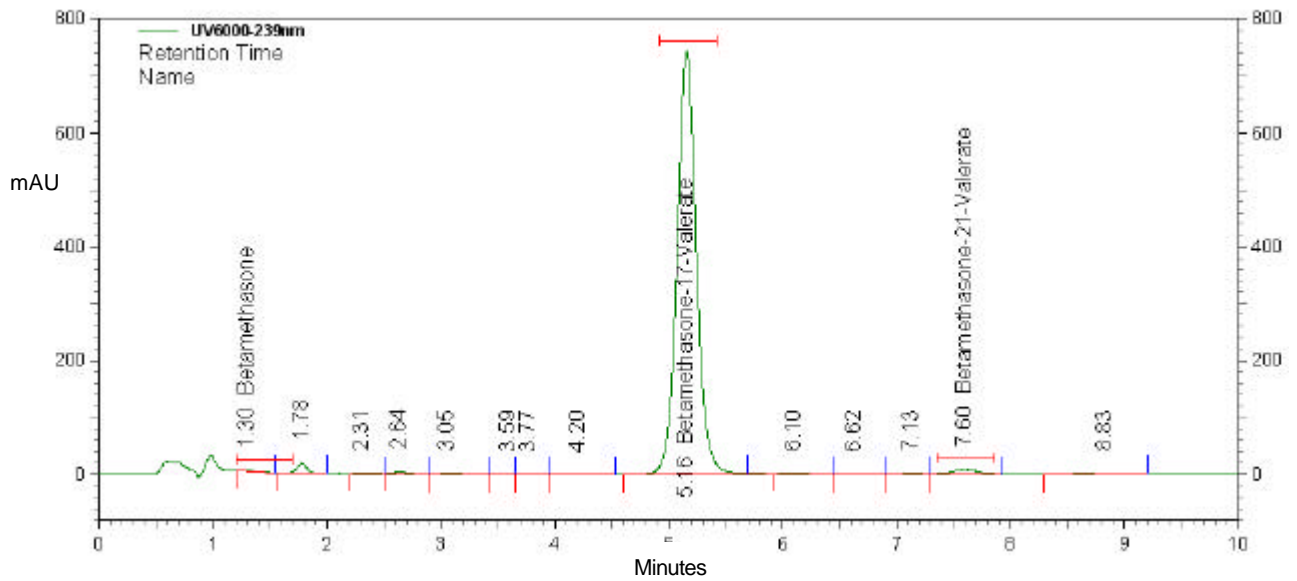


Abb. H.13: Chromatogramm zur O/W-Emulsion ohne BV-17 (Vehikel)

b) Modellemulsion BV-17 2×10^{-3} M

Alter der Emulsion 4 Tage (Lagerung bei 4-15°C und unter Lichtschutz).

Probe verdünnt (Faktor 200) in Methanol 50 % - Wasser 50 % (V/V).

Abb. H.14: Chromatogramm zur O/W-Emulsion mit BV-17 2×10^{-3} M (Verum)

H.6.3 BV-17-Gehaltsbestimmung in der Modellemulsion und Verteilung in den Phasen

a) Unter Berücksichtigung des BV-17-Peaks allein

Tab. H.48: BV-17-Gehalt (HPLC-Analytik) in der O/W-Emulsion und Verteilung in den Phasen

	IST BV-17-Konzentration Emulsion resp. Phase nach Umrechnung aus der Verdünnung und Einwaage ($\mu\text{g/g}$) resp. ($\mu\text{g/ml}$)	IST BV-17-Menge Emulsion resp. Phase unter Berücksichtigung des Phasenanteils für 100g ($\mu\text{g/g}$) resp. ($\mu\text{g/ml}$)	Verteilung Menge (%)	Wieder- findung (%)
1) BV-17 2×10^{-5} M (= 9.54 $\mu\text{g/ml}$), Einwaage 9.6 $\mu\text{g/ml}$ (ergibt in 100 g total 960 μg)				
Emulsion ganz	3.83	382.63		39.9
Lipidphase	5.01	150.16	93.0	
Wasserphase	0.16	11.36	7.0	
SUMME		161.51	100.0	
2) BV-17 2×10^{-4} M (= 95.4 $\mu\text{g/ml}$), Einwaage 99.75 $\mu\text{g/ml}$ (ergibt in 100 g total 9975 μg)				
Emulsion ganz	31.99	3199.13		32.1
Lipidphase	82.13	2463.79	97.2	
Wasserphase	1.01	70.92	2.8	
SUMME		2534.70	100.0	
3) BV-17 2×10^{-3} M (= 954 $\mu\text{g/ml}$), Einwaage 967.5 $\mu\text{g/ml}$ (ergibt in 100 g total 96750 μg)				
Emulsion ganz	388.41	38841.05		40.1
Lipidphase	578.68	17360.51	96.3	
Wasserphase	9.64	674.67	3.7	
SUMME		18035.18	100.0	
4) BV-17 2×10^{-2} M (= 9540 $\mu\text{g/ml}$), Einwaage 9533 $\mu\text{g/ml}$ (ergibt in 100 g total 953300 μg)				
Emulsion ganz	2494.07	249407.14		26.2
Lipidphase	4555.82	136674.64	98.7	
Wasserphase	25.92	1814.52	1.3	
SUMME		138489.16	100.0	

b) Unter Berücksichtigung der Umlagerung von BV-17 zu BV-21 (Addition der Peakflächen)

Tab. H.49: BV-17-Gehalt (HPLC-Analytik) in der O/W-Emulsion und Verteilung in den Phasen

	IST BV-17-Konzentration Emulsion resp. Phase nach Umrechnung aus der Verdünnung und Einwaage ($\mu\text{g/g}$) resp. ($\mu\text{g/ml}$)	IST BV-17-Menge Emulsion resp. Phase unter Berücksichtigung des Phasenanteils für 100g ($\mu\text{g/g}$) resp. ($\mu\text{g/ml}$)	Verteilung Menge (%)	Wieder- findung (%)
1) BV-17 2×10^{-5} M (= 9.54 $\mu\text{g/ml}$), Einwaage 9.6 $\mu\text{g/ml}$ (ergibt in 100 g total 960 μg)				
Emulsion ganz	6.25	624.53		65.1
Lipidphase	12.32	369.50	97.0	
Wasserphase	0.16	11.36	3.0	
SUMME		380.86	100.0	
2) BV-17 2×10^{-4} M (= 95.4 $\mu\text{g/ml}$), Einwaage 99.75 $\mu\text{g/ml}$ (ergibt in 100 g total 9975 μg)				
Emulsion ganz	84.08	8407.57		84.3
Lipidphase	267.25	8017.42	99.1	
Wasserphase	1.01	70.92	0.9	
SUMME		8088.33	100.0	
3) BV-17 2×10^{-3} M (= 954 $\mu\text{g/ml}$), Einwaage 967.5 $\mu\text{g/ml}$ (ergibt in 100 g total 96750 μg)				
Emulsion ganz	823.10	82310.34		85.1
Lipidphase	2776.69	83300.76	99.1	
Wasserphase	10.48	733.44	0.9	
SUMME		84034.20	100.0	
4) BV-17 2×10^{-2} M (= 9540 $\mu\text{g/ml}$), Einwaage 9533 $\mu\text{g/ml}$ (ergibt in 100 g total 953300 μg)				
Emulsion ganz	8036.93	803692.73		84.3
Lipidphase	16454.94	493648.14	98.9	
Wasserphase	75.93	5314.83	1.1	
SUMME		498962.97	100.0	

LEBENS LAUF

Personalien

Name: Esther Zimmermann
Zivilstand: ledig
Geburtsdatum: 22. Juni 1970
Geburtsort: Luzern

Ausbildung und berufliche Erfahrungen

Schulische Ausbildung

1977 – 1983 Primarschule Kriens
1983 – 1990 Kantonsschule Alpenquai Luzern
Matura Typus B
1990 Sprachaufenthalt in England
1990 – 1991 Pharmaziestudium an der Universität Bern
(erstes Propädeutikum)
1991 – 1992 Medizinstudium an der Universität Genf
(erstes Propädeutikum)
1992 – 1996 Pharmaziestudium an der ETH Zürich
(Abschluss als Apothekerin)

Berufliche Erfahrungen

In der Offizin

1994 – 1996 Vertretungen in diversen Apotheken
1997 Festanstellung als Apothekerin
Hochdorfer-Apotheke, Chr. Linherr, Hochdorf

In der Industrie

1997 – 2003 Laborleiterin Galenik (Entwicklung halbfeste Arzneiformen und Kosmetik)
Laborleiterin Magistralrezeptur
Spirig Pharma AG, Egerkingen
2003-2007 Dissertation zum Thema „In vitro- / ex vivo-Hautmodelle zur Erfassung der
Reaktion auf externe Reize sowie der Wirkung einer antiinflammatorischen
Behandlung“ unter der Leitung von Prof. Dr. Georgios Imanidis von der
Universität Basel
Laborleiterin Magistralrezeptur
Spirig Pharma AG, 4622 Egerkingen

Berufliche Weiterbildung

14./15.10.98	Methoden zur Entwicklung und Qualitätskontrolle von Dermatika Arbeitsgemeinschaft für pharm. Verfahrenstechnik (APV), Braunschweig
22./23.9.99	W/O-Emulsionen IFAG GmbH & Co. KG, Institut für angewandte Colloidtechnologie, Duisburg
30.9.-1.10.99	Users Meeting zum Einsatz des Turbiscan FormulAction, Toulouse
7./8.11.00	Gute Entwicklungs-Praxis Pharmaceutical Consultancy Services, Heidelberg
5./6.4.01	O/W-Emulsionen IFAG GmbH & Co. KG, Institut für angewandte Colloidtechnologie, Duisburg
28./29.6.01	Seminar für Zeit- und Energiemanagement Stiftung für Forschung und Beratung BWI ETH, Zürich
12./13.3.02	Sonnenschutz IFAG GmbH & Co. KG, Institut für angewandte Colloidtechnologie, Duisburg
Sept. 02	Pharma-Business und Pharmamarketing für Einsteiger Pharmacenter der Universitäten Basel und Zürich

Weiterbildung während der Dissertation

Juni 03 - Nov. 07	DoktorandInnenkolloquium über Wirkstofftransport durch Membranen Prof. Dr. Georgios Imanidis Pharmazeutische Technologie, Universität Basel
16.2.04	Scientific and technical writing MediWrite GmbH, Basel
15./16.3.05	Basic Real-Time PCR, Training Course Applied Biosystems, Rotkreuz
1.-10.3.06	Cell culture and in vitro models for drug absorption and delivery Saarland University, Saarbrücken
13.-15.6.06	Kommunikation für die Pharmaindustrie Pharmacenter der Universitäten Basel und Zürich
15.12.06	Herstellung in der Offizin- und Spitalapotheke Advanced Study Centre, Universität Basel