

Rekonstruierte humane Epidermis für die In-vitro-Bestimmung der perkutanen Absorption

Alexander Vuia, Tierärztliche Hochschule Hannover

1. Einführung und Hintergründe

Rekonstruierte humane Epidermis (RHE), auch als „Kunsthäute“ oder „Hautmodelle“ bezeichnet, wird in vitro aus humanen Keratinozyten gewonnen. Zur Ausbildung eines mehrschichtigen Gewebes, bestehend aus den charakteristischen Epidermisschichten (Stratum basale, spinosum, granulosum und corneum sowie Basalmembran), ist bei der Kultivierung der Zellen im Medium (aufgebracht auf einer Stützmembran) der Kontakt mit der Luft (sog. Luft-Medium-Grenze) erforderlich. Die Dauer der Exposition beeinflusst dabei den Differenzierungsgrad der Zellschichten.

Die nach der Kultivierung gewonnene rekonstruierte humane Epidermis ist vollständig ausgebildet und zeigt morphologisch eine gute Übereinstimmung mit humaner Epidermis (Abb. 1). Dies gilt ebenso für die Expression wichtiger epidermaler Differenzierungsmarker (z. B. Keratin 1 und 10) als auch für das Vorhandensein hauttypischer Lipidklassen, beides essentiell für die Ausbildung einer kompetenten Barriere (1). Allerdings sind auch Unterschiede zur humanen Epidermis in der Feinstruktur (Anzahl der Zellschichten, -struktur und -organisation), der Lipidzusammensetzung sowie im Ausmaß der immunhistologischen Expression beschrieben (2, 3).

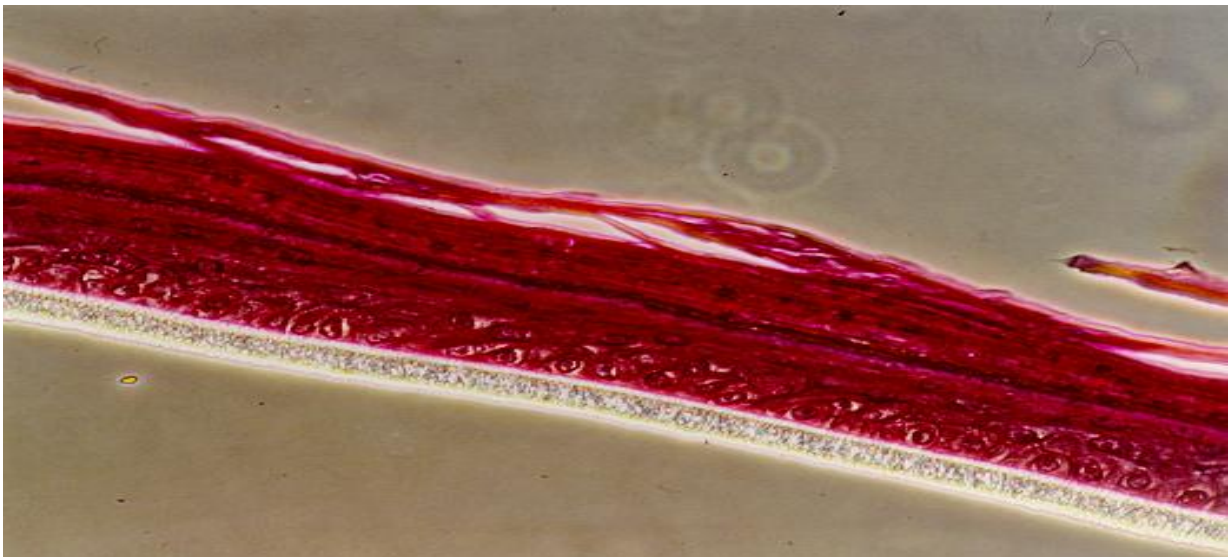


Abb. 1: Histologischer Schnitt von rekonstruierter humaner Epidermis (SkinEthic®-Modell). Die vollständig ausgebildeten epidermalen Zellschichten, kultiviert auf einer Polycarbonat-Stützmembran (ohne Färbung), sind rot angefärbt.

2. Rekonstruierte humane Epidermis als Testhaut

Humane Haut gilt bei der Bestimmung der perkutanen Absorption in vitro als „Gold-Standard“, allerdings ist die Verfügbarkeit sehr begrenzt und deckt weder den Bedarf der Routinetestung in

der Toxikologie noch in der Forschung. Tierische Häute, wie Ratten- und vor allem Schweinehaut werden daher häufig gemäß den aktuell geltenden europäischen Richtlinien für die Bestimmung der perkutanen Absorption in vitro alternativ als Testhäute eingesetzt (4, 5).

Mit rekonstruierter humaner Epidermis, die von verschiedenen Anbietern kommerziell verfügbar ist und bereits für In-vitro-Untersuchungen (z. B. Bestimmung der Phototoxizität) eingesetzt wird, ist für die In-vitro-Bestimmung der perkutanen Absorption eine weitere zusätzliche Alternative verfügbar. Das zeigen die Ergebnisse einer Validierungsstudie, durchgeführt im Rahmen eines Verbundprojektes mit Partnern aus Industrie und Universitäten, in der die perkutane Absorption anhand einer Substanzauswahl mit breitem physikochemischen Spektrum (Stoffe mit hoher Lipo- und Hydrophilie und hohem Molekulargewicht) an drei RHE-Modellen (EpiDerm™, SkinEthic® und EPIKIN®) in Vergleich zu Human- und Schweinehaut (Referenzhäute) verglichen wurde. Zwar ist die perkutane Absorption bei den RHE-Modelle in der Regel höher als bei Human- und Schweinehaut (Abb. 2), doch konnte, auf Grundlage der abschließenden statistischen Auswertung, zwischen allen Testhäuten eine Korrelation gezeigt werden, die die Eignung von RHE als Testhaut belegt (6).

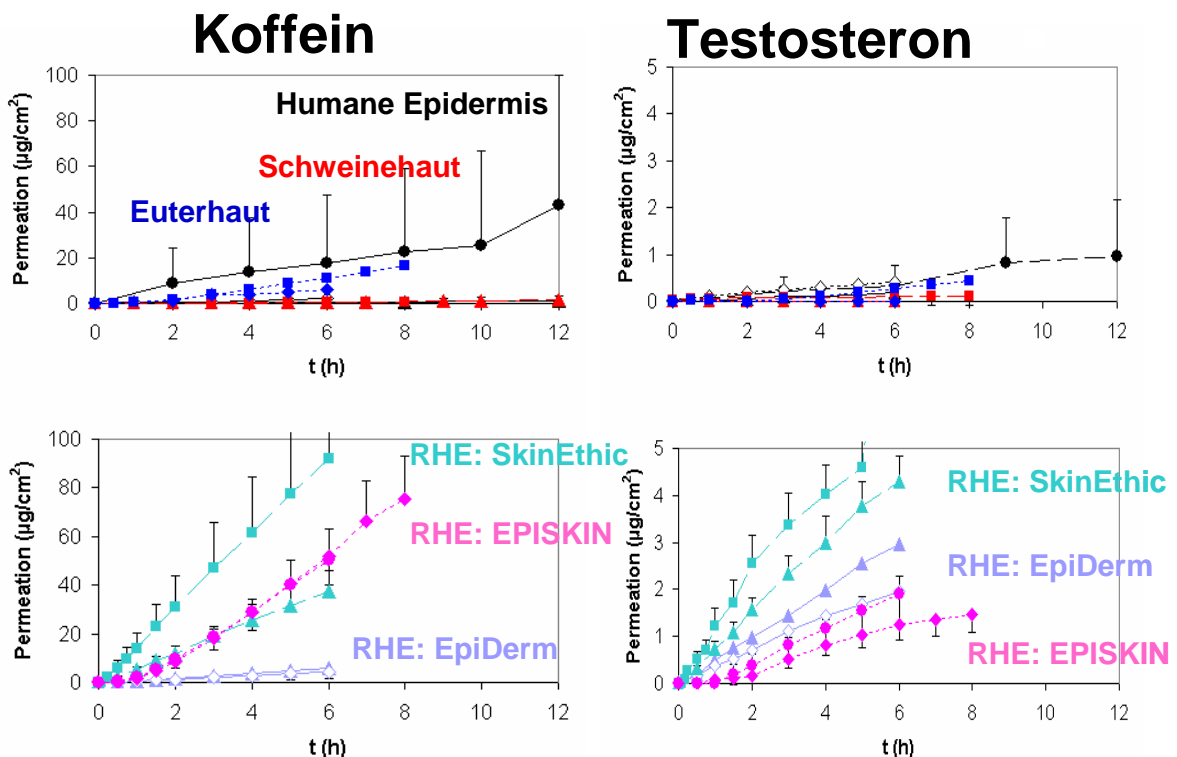


Abb. 2: Ergebnisse aus einer Validierungsstudie mit RHE (7): Permeation von Koffein (0,1 %ige Lösung in PBS) und Testosteron (0,004%ige Lösung in PBS + 2 % Igepal® CA 630), getestet mit der Franz-Diffusionszelle an humaner Epidermis, Schweine- und Euterhaut sowie an drei RHE-Modellen (SkinEthic®, EpiDerm™ und EPIKIN®). Als Akzeptormedium diente PBS.

Die hohen biologischen Streuungen bei humanen und tierischen Häuten erschweren die Gewinnung reproduzierbarer Daten. Daher empfiehlt sich beim Testen neuer Substanzen das Mitführen einer Referenzsubstanz, wodurch zusätzlich systematische Fehler bei der Versuchsdurchführung ausgeschlossen werden können. Hierfür eignen sich insbesondere Koffein und/oder Testosteron (4, 5, 6).

3. Experimentelle Durchführung

Die RHE-Modelle werden von den Herstellern zusammen mit Erhaltungsmedium (je nach Größe in 6- bzw. 12-Well-Platten) steril verpackt und gekühlt versendet (Abb. 3). Je nach experimenteller Fragestellung kann RHE mit unterschiedlichen Differenzierungsgrad der Epidermis bezogen werden. Die einzelnen rekonstruierten Häute befinden sich innerhalb eines Kunststoffrings (Insert) in den einzelnen Wells der Platten und sind mit der Hautunterseite (Stützmembran) im direkten Kontakt mit einem Agarose-Gel.

Vor Versuchsbeginn muss die RHE über mindestens 1 h bei 37 °C und 5 % CO₂ im Brutschrank inkubiert werden. Dazu werden die RHE-Inserts unter sterilen Bedingungen (z. B. an einer Sterilarbeitsbank) in das mitgelieferte Erhaltungsmedium überführt, das zuvor auf Raumtemperatur temperiert wurde. Nach erfolgter Inkubation muss die RHE sofort für den Versuch eingesetzt werden.



Abb. 3: In den einzelnen Wells der 6-Well-Platte befindet sich die RHE (EpiDerm™) innerhalb eines Kunststoffrings. Die Unterseite der RHE-Inserts (Stützmembran) ist im Kontakt zu einem rötlich gefärbten Agarose-Gel (Well links unten, ohne RHE-Insert), das der Erhaltung der Häute für die Dauer des Transports dient.

Die perkutane Absorption in vitro mittels RHE ist z. B. mit der Franz-Diffusionszellen-Methode bestimmbar. Aber auch eine Durchführung des Versuchs direkt in den Inserts ist theoretisch möglich. Für den Versuch in der Franzzelle wird die RHE vorsichtig an den Seitenrändern der Inserts mit Hilfe eines Skalpells herausgeschnitten und anschließend so mit einer Pinzette auf die Franzzelle zentriert, dass die Stratum-corneum-Seite nach oben zeigt (Abb. 4). Dabei ist darauf zu achten, dass sich die RHE nicht von der Stützmembran löst oder sich nach Aufbringen der RHE auf die Franzzelle im Kontakt mit dem Akzeptormedium Luftblasen unterhalb der Haut befinden.



Abb. 4: Die RHE (EpiDerm™) wurde aus dem Insert herausgeschnitten und auf die Oberseite der Franzzelle mit Hilfe einer Pinzette zentriert. Die Stratum-corneum-Seite hat Kontakt zur Luft (Donorseite), die Hautunterseite mit dem Akzeptormedium (rötlich gefärbt).

Das Akzeptormedium der Franzzelle sowie das Trägermedium für die Testsubstanzen sollten so gewählt sein, dass die RHE dadurch nicht geschädigt wird. Isotonischer Phosphatpuffer (PBS, pH 7,4) dient daher häufig als Standardmedium, bei lipophilen Substanzen kann unter Berücksichtigung der Hautverträglichkeit ein Lösungsvermittler (z. B. Igepal® CA 630) verwendet werden.

Auf Grund der in der Regel höheren Permeabilität, sind Versuche mit RHE (Dauer bis zu 10 h) im Allgemeinen schneller durchführbar als mit Human- und Schweinehaut (Dauer bis zu 26 h). Darüber hinaus bietet RHE den Vorteil, dass die Wiederholbarkeit der Versuche an verschiedenen (oder gleichen) Chargen nicht limitiert ist.

4. Auswertung

Zur Auswertung von Permeationsuntersuchungen können verschiedene Endpunkte herangezogen werden, die einen Vergleich mit anderen Permeationsergebnissen ermöglichen:

Scheinbarer Permeabilitätskoeffizient (P_{app} -Wert): Da der Transport topisch applizierter Substanzen durch die Haut vorwiegend durch passive Diffusion erfolgt, kann von der Gültigkeit des 1. Fickschen Gesetzes ausgegangen werden. Nach dem 1. Fickschen Gesetz ist die Abnahme einer auf die Haut applizierten Substanz pro Zeiteinheit direkt proportional zum Diffusions- und Verteilungskoeffizienten sowie umgekehrt proportional zur Dicke der Membran. Der Flux (J) ist definiert als die transportierte Stoffmenge pro Zeiteinheit und Fläche. Zur Vereinfachung wird dabei von einer homogenen Hautbarriere ausgegangen.

Der scheinbare Permeabilitätskoeffizient (P_{app} - oder k_p -Wert) leitet sich direkt aus dem 1. Fickschen Gesetz ab und ist ein Maß für die Geschwindigkeit, mit der eine Substanz unter Steady-State-Bedingungen permeiert. Der P_{app} -Wert charakterisiert sowohl die Permeabilität einer Membran als auch die Permeationseigenschaften einer Substanz. Bei den Bedingungen, wie sie bei Permeationsuntersuchungen mit der Franz-Diffusionszelle gelten, kann dieser wie folgt berechnet werden:

$$P_{app}(k_p) = \frac{V}{A \cdot c_i} \cdot \frac{dc_A}{dt}$$

V : Akzeptorvolumen der Franzzelle [cm^3]

A : Fläche der Membran in Kontakt mit dem Akzeptormedium [cm^2]

c_i : Ausgangskonzentration der Substanz im Donormedium [$\mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}$]

$\frac{dc_A}{dt}$: zunehmende Konzentration der Substanz im Akzeptormedium über die Zeit [$\mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-3} \cdot \text{s}^{-1}$]

P_{app} : scheinbarer Permeabilitätskoeffizient [$\text{cm} \cdot \text{s}^{-1}$]

Um die Gültigkeit des 1. Fickschen Gesetzes sicherzustellen, dürfen für die Berechnung des P_{app} -Werts nur Messpunkte aus dem linearen Teil der Permeationskurve herangezogen werden (Abb. 5). Die Entnahmezeiten der einzelnen Messproben aus der Akzeptorkammer der Franzzelle sollten daher so gewählt werden, dass mindestens 6 Messwerte innerhalb des linearen Teils der Permeation vorliegen. Nur so ist eine valide Berechnung des P_{app} -Werts möglich. Um den linearen Bereich korrekt erfassen zu können, müssen Messwerte aus dem Bereich der lag-Zeit (s. u.) oder einer eventuell eingetretenen Sättigung des Akzeptormedium mit Testsubstanz (Abflachen der Permeationskurve) aus der Berechnung des P_{app} -Werts ausgeschlossen werden.

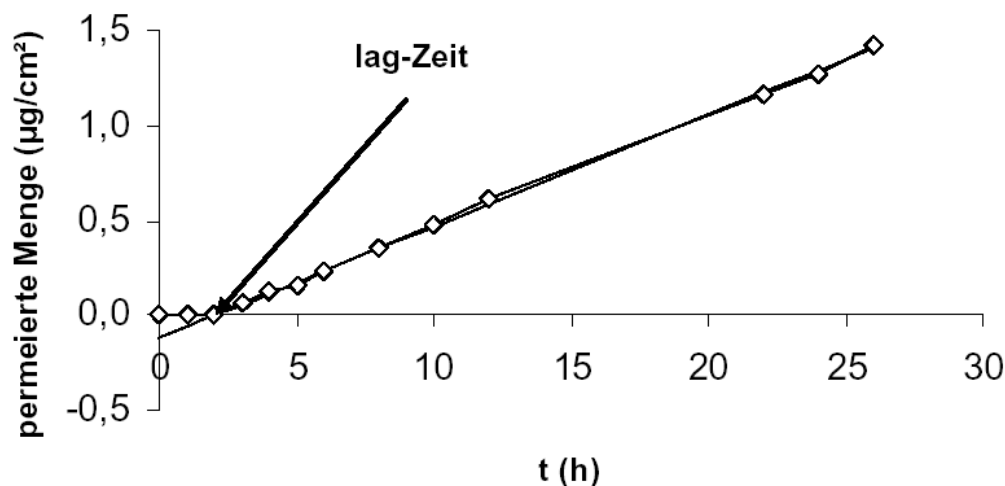


Abb. 5: Grafische Auswertung eines Permeationsversuchs (Permeationskurve mit insgesamt 13 Messwerten). Dargestellt ist die permeierte Menge gegen die Zeit. Der lineare Bereich der Permeation (Steady-State) ist gekennzeichnet durch die schwarze Linie und bestimmt die Berechnung des P_{app} -Werts. Die lag-Zeit lässt sich grafisch aus dem Schnittpunkt mit der x-Achse ermitteln (ca. 2 h).

Lag-Zeit: Die Zeit die vergeht, bis eine lineare Permeation (d. h. Steady-State-Bedingungen) beginnt, wird als lag-Zeit bezeichnet. Sie wird bestimmt von dem Ausmaß und der Zeit der Aufsättigung der Haut mit der applizierten Substanz und kann je nach Hauttyp sehr schwanken. Bei RHE ist die lag-Zeit in der Regel sehr gering, bzw. nicht vorhanden. Bei der grafischen

Darstellung der Permeation ergibt sich die lag-Zeit als Schnittpunkt der durch den linearen Teil der Kurve verlaufenden Geraden mit der x-Achse (Abb. 5).

5. Literatur

1. Boelsma, E., et al., *Characterization and comparison of reconstructed skin models: morphological and immunohistochemical evaluation*. Acta Derm Venereol, 2000. 80: p. 82-88.
2. Ponec, M., et al., *Characterization of reconstructed skin models*. Skin Pharmacol Appl Skin Physiol, 2002. 15 Suppl 1: p. 4-17.
3. Ponec, M., et al., *Lipid and ultrastructural characterization of reconstructed skin models*. Int J Pharm, 2000. 203: p. 211-225.
4. OECD, *Test Guideline 428: Skin absorption: in vitro Method*. 2004. Adopted on 13th April 2004.
5. OECD, *Guidance Document No 28 for the conduct of skin absorption studies*. 2003. Adopted at 35th Joint Meeting August 2003.
6. Schäfer-Korting, M., et al., *Reconstructed Human Epidermis for Skin Absorption Testing: Results of the Validation*. Altern Lab Anim, in revision.
7. Schäfer-Korting, M., et al., *Reconstructed Human Epidermis for Skin Absorption Testing: Results of the German Prevalidation Study*. Altern Lab Anim, 2006. 34: p. 283-294.