

Optimierung der topischen Therapie: Einsatz von *In-vitro*-Modellen

H. P. PODHAISKY, CH. HUSCHKA und W. WOHLRAB

1. Einleitung
2. Faktoren, die die dermale Verfügbarkeit limitieren
 - 2.1. Hautzustand
 - 2.2. Vehikel- und Arzneistoffeigenschaften
 - 2.2.1. Liberation
 - 2.2.2. Penetration
3. Dermale Verträglichkeit
 - 3.1. Evaluierung der Hautverträglichkeit durch Tierversuche
 - 3.2. In vitro-Systeme zur Bestimmung der Hautverträglichkeit
 - 3.3. Zellkulturmodelle
 - 3.4. Dreidimensionale Hautäquivalentmodelle

1. Einleitung

Ziel der Anwendung topischer Formulierungen ist in der Regel eine lokale Wirkung. Diese Wirkung kann sowohl durch den Arzneistoff als auch durch Vehikelbestandteile erzielt werden. Die Effektivität einer dermalen Therapie hängt von vier wesentlichen Faktoren ab: vom Hautzustand, von den Arzneistoffeigenschaften, der Zusammensetzung des Vehikels und von der dermalen Verträglichkeit. Diese Komplexe sind nicht isoliert zu betrachten, sie sind vielfältigen Wechselwirkungen unterworfen und können sich gegenseitig auf sehr unterschiedliche Weise beeinflussen. Betrachtet man dabei den eingesetzten Wirkstoff, so hängt die therapeutische Effektivität in erster Linie davon ab, inwieweit es gelingt, in der entsprechend erkrankten Hautschicht eine ausreichende Wirkstoffkonzentration über längere Zeit zu erreichen, also vom Konzentrations-Zeit-Profil des Wirkstoffes. Anliegen der vorliegenden Übersicht ist die Diskussion der einzelnen Einflußfaktoren und das Aufzeigen von Modellen zu ihrer Evaluation.

2. Faktoren, die die dermale Verfügbarkeit limitieren

2.1. Hautzustand

Der allgemeine Aufbau der menschlichen Haut variiert intra- und interindividuell, wobei dem strukturellen Aufbau der Hornschicht, d. h. ihrer Barriere- und Reservoirfunktion, die größte Bedeutung zukommt [1]. Der Hydrationsstatus der Hornschicht beeinflusst den Transport der Wirkstoffe fundamental. Besteht das therapeutische Ziel in einem systemischen Effekt, stellt die Hautdurchblutung einen entscheidenden Faktor dar. Im Laufe des Lebens unterliegt die Haut verschiedensten externen Einflüssen, die ihre Permeabilität verändern. Obwohl Reifgeborene über eine effektive Barriere verfügen, kommt es bei ihnen aufgrund ihrer im Verhältnis zur Körpermasse großen Körperoberfläche zu einer verstärkten systemischen Resorption und damit zu einem erhöhten Nebenwirkungsrisiko [2, 3]. Im Zuge des physiologischen Alterungsprozesses kommt es zu atrophischen, trockenen, faltigen Hautzuständen, die mit einem Elastizitätsverlust einhergehen. Es wird vermutet, daß die Abnahme der Elastizität und Festigkeit der Haut im Alter auf einer Verminderung

des Anteils der Kollagenfasern und deren zunehmender Quervernetzung und Bündelung beruht. Dieser Effekt ist auf die Abnahme der Fibroblastenzahl bzw. deren Aktivitätsverminderung zurückzuführen. Im weiteren wird eine Abnahme des Anteils der wasserlöslichen Aminosäuren beobachtet, die auf eine verminderte Profilaggrinsynthese zurückgeführt wird. Dadurch kommt es zu einer Verminderung der natürlichen Feuchthaltefaktoren (NMF) [4].

Eine exakte Evaluierung des Hautzustandes ist Voraussetzung für eine optimale Therapie der geschädigten Haut. Der Hauttyp, das Stadium der Dermatose sowie die Morphologie der Hautkrankheit sollten bei der Wahl des Vehikels berücksichtigt werden [5] (Abb. 1, 2).

2.2. Vehikel- und Arzneistoffeigenschaften

Neben dem jeweiligen Hautzustand limitieren die Substanz- sowie Vehikeleigenschaften die Effektivität der topischen Therapie. Diese Faktoren sind nicht isoliert zu be-

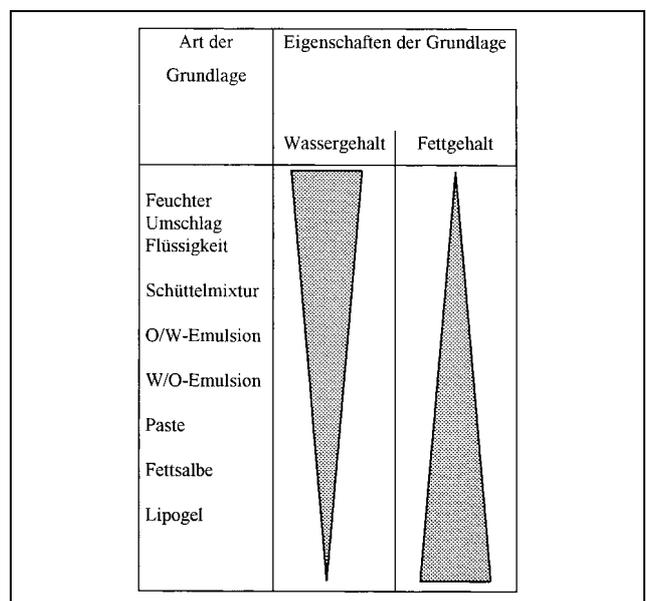


Abb. 1: Eigenschaften verschiedener Grundlagen zur topischen Therapie (mod. nach Niedner)

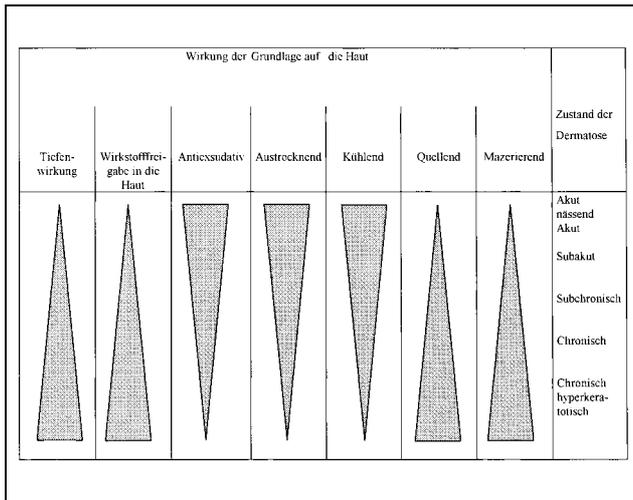


Abb. 2: Wirkung verschiedener Vehikel auf die Haut (mod. nach Niedner)

trachten. Sie beeinflussen sich gegenseitig, und erst das Zusammenspiel aller Faktoren ermöglicht eine therapeutische Wirkung. Bei der Beurteilung des Vehikeffektes müssen sein Einfluß auf die Hydratation der Hornschicht, die Modulation der Barrierefunktion/Penetration, die Stabilität der Gesamtformulierung sowie die Freisetzung des Arzneistoffes aus dem Vehikel berücksichtigt werden.

Die perkutane Absorption topisch applizierter Substanzen hängt von der Körperregion, dem Gehalt und der Zusammensetzung der Stratum-corneum-Lipide, dem Hydratationsstatus bzw. dem Anteil an natürlichen Feuchthaltefaktoren wie Harnstoff oder Aminosäuren ab [6–8]. Im Falle eines okklusiv wirkenden Vehikels, wie z. B. bei Lipidgrundlagen oder W/O-Emulsionen, ist eine verstärkte Hydratation und damit eine erhöhte Hautpermeabilität zu erwarten. Vehikelbestandteile wie Isopropylmyrisat, mittelkettige Triglyceride oder 2-Octyldodecanol beeinflussen den Ordnungszustand der interzellulären Stratum-corneum-Bilayer und können daher als Penetrationenhancer wirken. Im Falle der Beeinträchtigung der epidermalen Barrierefunktion (z. B. Dermatosen, Verletzungen, Lipidextraktion oder Hydratation) oder einer extrem langsamen Penetration des Wirkstoffes durch das Vehikel wird seine Freisetzung aus der Grundlage zur limitierenden Größe seiner Verfügbarkeit am Wirkort. Liegt der Wirkstoff in der Zubereitung gelöst vor, kann durch eine Erhöhung der Initialkonzentration z. B. durch Salz-, Ester-, Komplexbildner oder Lösungsvermittler eine verbesserte Liberation erreicht werden. Die größte thermodynamische Aktivität wird dabei mit Annäherung an die Sättigungskonzentration erzielt. Im Falle von Suspensionssystemen kann das Nachlösen des Wirkstoffes bei Unterschreiten der Sättigungskonzentration zum geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Liberation und damit zur Voraussetzung der Penetration werden. Die Auswahl eines Vehikels stellt damit einen Kompromiß dar zwischen den physikochemischen Erfordernissen (Löslichkeit – thermodynamische Aktivität des Arzneistoffes in der Grundlage) sowie dem Verteilungskoeffizient Vehikel/Stratum corneum.

2.2.1. Liberation

Die bekannten Modelle zur Bestimmung der Arzneistoffliberation bestehen aus einem Donorkompartiment, in (oder auf) welches die Formulierung aufgebracht werden kann und einem Akzeptorkompartiment, welches ein geeignetes Medium zur Aufnahme des liberierten Arzneistoffes ent-

hält. Mit dem Mehrschichtmembranmodell nach Fürst und Neubert (MSMM) steht ein System zur Verfügung, das sich durch eine gewisse Variabilität und Kombinierbarkeit der Akzeptorkompartimente und durch eine gut an topische *In-vivo*-Bedingungen angepaßte, einfache Handhabbarkeit auszeichnet (Abb. 3) [9, 10]. Eine der wesentlichen Adaptionen an topische Applikationsbedingungen ist mit dem Einsatz nichtwässriger Akzeptoren gegeben. Sie simulieren die relevanten Eigenschaften der Haut besser als wässrige Kompartimente. Die Nutzung mehrerer lipophiler Membranen ermöglicht dabei im Gegensatz zu flüssigen Akzeptormedien die zeitliche Erfassung des Diffusionsprozesses durch schichtweise analytische Bestimmung nach Versuchsende und die Erstellung von Konzentrationsprofilen. Das ist grundsätzlich für Wirkstoffe und Vehikelkomponenten parallel realisierbar. Da der Substanztransfer in einen artifiziellen Membranakzeptor ausschließlich in Abhängigkeit physikochemischer Parameter erfolgt, kann der Einfluß penetrationsmodulierender Additiva auf diese Größen und die Auswirkungen auf das Ausmaß und Geschwindigkeit der Liberation charakterisiert werden. Bei der Nutzung des beschriebenen Modells ist als vorteilhaft zu bewerten, daß die Applikation der Formulierung in klinisch relevanten Dosen (2–5 mg/cm²) und in Analogie zu *In-vivo*-Verhältnissen direkt auf den Akzeptor erfolgt.

2.2.2. Penetration

Penetrationsstudien an Humanhaut unter *Ex-vivo*-Bedingungen sind aus Verfügbarkeitsgründen in ihrem Ausmaß limitiert und zudem durch eine gewisse intra- und interindividuelle Variabilität geprägt. Daher und durch die Komplexität weiterer Einflußfaktoren auf den Penetrationsprozeß bedarf es umfassend standardisierter Versuchsbedingungen für reproduzierbare und aussagekräftige Ergebnisse.

Das gebräuchlichste *In-vitro*-Modell zum Studium des dermalen Wirkstofftransportes ist die Diffusionszelle nach Franz. Seine Anwendung begründet sich in der hohen Korrelation der Barriereigenschaften exzidiierter Haut mit *In-vivo*-Verhältnissen. So stellte Franz (1975) für 12 verschiedene organische Substanzen eine ausgezeichnete Übereinstimmung mit *In-vivo*-Befunden von Feldmann und Maibach (1970) fest [11, 12].

Die Diffusionszelle nach Franz besteht aus einer doppelwandigen, temperierbaren Glaskammer zur Aufnahme der gerührten Akzeptorflüssigkeit. Auf dieses Gerät wird mit Hilfe einer Gaze das präparierte Hautstück gelegt und durch einen Glasring und eine Metallklammer so fixiert, daß es mit der dermalen Seite in Kontakt zum Akzeptormedium gelangt. Eine Glasbedeckung dient der Vermeidung von evaporativem Wasserverlust und ermöglicht konstante Hydratationsbedingungen (Abb. 4).

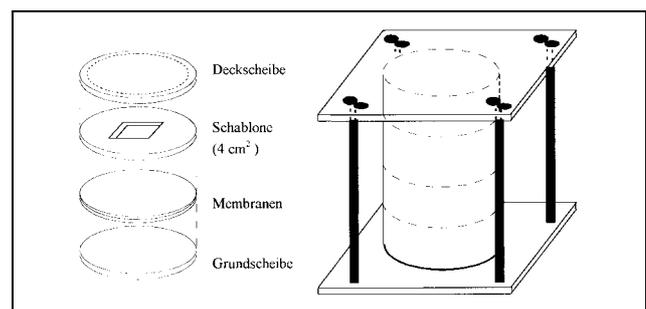


Abb. 3: Mehrschichtmembran-Modellsystem nach Fürst und Neubert [9, 10]

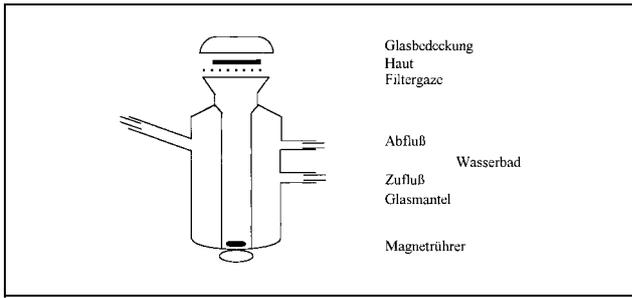


Abb. 4: Diffusionszelle nach Franz

Die Diffusionszelle gehört zu den Einkammersystemen. Diese zeichnen sich durch eine horizontale Anordnung von ungerührtem Donator, Haut als Diffusionsbarriere und gerührtem Akzeptor aus. Diese Anordnung ermöglicht, im Gegensatz zu den Zweikammermodellen, bei denen die Membran zwischen den flüssigkeitsgefüllten Kompartimenten vertikal eingespannt ist, *in-vivo*-ähnliche Arbeitsbedingungen. Das äußert sich darin, daß die Haut nicht im voll hydratisierten Zustand und mit drastisch funktionsgestörter Hornschicht vorliegt, sondern mit der epidermalen Seite in trockene bzw. kontrolliert hydratisierte Umgebung gerichtet, eingesetzt wird. Des weiteren kann die Applikation des Wirkstoffes in klinischen Konzentrationen (finite-dose-Technik) und dermatologisch gebräuchlichen Zubereitungen erfolgen [13]. Sie ist nicht an die Verwendung „unendlich“ großer Substanzmengen in unangemessenen Volumina meist wässriger Lösungen (infinite-dose-Technik) gebunden.

Zur Applikation werden allgemein Dosierungen von 2 bis 5 mg/cm² für halb feste bzw. 6–7 ml/cm² für flüssige Zubereitungen empfohlen [14, 15]. Als Applikationszeiten werden in Anlehnung an die in der Dermatopharmazie verbreitete logarithmische Zeiteinteilung entweder 30, 100, 300 und 1000 min oder nur 30 und 300 min ausgewählt, um Konzentrationsprofile für mindestens eine Kurz- und eine prolongierte Anwendung zu erhalten.

3. Dermale Verträglichkeit

Bei den unerwünschten kutanen Arzneimittelwirkungen sind pharmakologische Nebenwirkungen, phototoxische und photoallergische Reaktionen, Sensibilisierungen sowie irritative Reaktionen zu unterscheiden. Von den pharmakologischen Nebenwirkungen sind die atrophischen Effekte der Glukokortikoide am bekanntesten. Erwähnt sei auch das verstärkte Auftreten von Basaliomen oder Plattenepithelkarzinomen nach PUVA-Therapie mit 8-Methoxy-psoralen. Phototoxische Reaktionen werden durch die UV-abhängige Aktivierung sogenannter Photosensibilisatoren ausgelöst. Sie werden sowohl nach systemischer Applikation (z. B. Phenothiazine, Sulfonylharnstoffe, Tetrazykline und Thiazide) als auch nach topischer Behandlung (Furocumarine) beobachtet. Photoallergische Reaktionen, die immunologisch vermittelt werden, sind z. B. für Sonnenschutzmittel (Benzophenone, p-Aminobenzoesäure, Digalloyltriolate) beschrieben. Klinischer Ausdruck einer Sensibilisierung im Sinne einer Typ-IV-Reaktion ist das allergische Kontaktekzem. Hautirritationen sind im Gegensatz zu Allergien nicht immunologisch bedingt, sondern können bereits nach Erstkontakt infolge direkter Wechselwirkungen mit den Zellen der lebenden Epidermis und Dermis auftreten. Bei irritativen Reaktionen der Haut muß zwischen akuten Unverträglichkeiten und chronisch-kumulativen Irritationen unterschieden werden. Klinischer Aus-

druck dafür ist das akute toxische Kontaktekzem und das chronisch-toxisch-degenerative Ekzem. Während akute Reaktionen schnell auftreten, ist bei chronisch-kumulativen Reaktionen eine langsame Schädigung der Barrierefunktion der Hornschicht Voraussetzung für die Unverträglichkeitsreaktionen.

3.1. Evaluierung der Hautverträglichkeit durch Tierversuche

Für das Studium von Hautirritationen und die Erstellung von Rangordnungen in der Verträglichkeit bedient man sich verschiedener Tests an Tierspecies (z. B. Kaninchen, Meerschweinchen, Ratte). Als eine Standardmethode kann der sogenannte Draize-Test gelten [16, 17]. Die Durchführung erfolgt an dorsaler Haut von Kaninchen. Die zu testenden Substanzen werden auf zwei Hautareale aufgetragen, von denen bei einem die Hornschicht durch Abrasion entfernt wurde. Die aufgetragenen Proben werden durch Mull abgedeckt und mit Hilfe eines Klebebandes arretiert. Anschließend wird der komplette Rumpf des Tieres mit einem dehnbaren Schlauch umhüllt, um eine Feuchtigkeitsabgabe der Probe bzw. eine Beschädigung durch das Tier zu vermeiden. Nach 24stündiger Einwirkzeit werden die Proben entfernt und die Erythem- sowie Ödembildung visuell beurteilt. Dabei wendet man einen subjektiven Test-Score an, mit dem sowohl das abrasiv vorbehandelte als auch das unvorbehandelte Hautareal bewertet wird. Das Ergebnis des Draize-Testes wird gewöhnlich in Form einer Tabelle dargestellt, in der die Erythem- und Ödemreaktion jedes Tieres aufgezeigt wird. Aufgrund der Werte des Testscores wird der Irritationsindex berechnet, der eine Einordnung der Substanz als mild, mittelmäßig oder stark irritierend ermöglicht (Tabelle).

Der beschriebene Versuchsablauf besitzt erfahrungsgemäß verschiedene Mängel. Zum einen ist die Zuordnung der beobachteten Läsionen in den Test-Score schwer objektivierbar. Darüber hinaus ist die Übertragung der gewonnenen Ergebnisse auf humane Haut nur begrenzt möglich. Unterschiede im Aufbau der tierischen Haut bedingen Abweichungen der Penetrationsverhältnisse sowie der Reaktionsmuster [18]. Die geschilderten Unzulänglichkeiten und nicht zuletzt die geforderte Einschränkung von Tierversuchen verlangen die Entwicklung von objektiven, standardi-

Tabelle: Bestimmung des Irritationsindex mit Hilfe des Draize-Testes [17]

Beschreibung der Läsion	zugewiesene Punkte
Erythem- und Ätزشorfbildung	
kein Erythem	0
sehr leichtes Erythem (gerade wahrnehmbar)	1
gut definierbares Erythem	2
mittelmäßiges bis schweres Erythem	3
schweres Erythem (tief Rot) bis leichte Ätزشorfbildung (Tiefenschädigung)	4
Ödembildung	
kein Ödem	0
sehr leichtes Ödem (gerade wahrnehmbar)	1
leichtes Ödem (die Grenzen der Fläche sind durch Erhebung gut definierbar)	2
mittelmäßiges Ödem (Erhebung um ungefähr 1 mm)	3
schweres Erythem (Erhebung >1 mm und um Expositionsfläche ausgedehnt)	4

Der Irritationsindex wird aus den Mittelwerten der Erythem- und Ödemwerte berechnet (Maximum 8). Dabei gelten Substanzen mit einem Wert <2 als mild irritierend, von 2–5 als mittelmäßig irritierend und von >5 als schwer irritierend.

sierten und reproduzierbaren Screeningmethoden, die die systematische Untersuchung der Hautverträglichkeit erlauben, ohne auf Tiertests angewiesen zu sein.

3.2. *In-vitro*-Systeme zur Bestimmung der Hautverträglichkeit

Zur *In-vitro*-Überprüfung der Hautverträglichkeit sind verschiedene Ansätze verfolgt worden: exzidierte tierische und humane Haut, bebrütete Hühnereier, sensible Mikroorganismen, Zellkulturen als Monolayer und dreidimensionale Hautäquivalente. Naheliegender erscheint die Überlegung, Tierversuche durch explantierte Haut zu ersetzen. Die Haut kann dabei sowohl humanen Ursprungs sein [19] als auch von verschiedenen Tierspecies wie Schwein, Maus, Kaninchen, oder Meerschweinchen stammen [20–22]. Üblicherweise wird die exzidierte Haut in gleich große Stücke zerteilt und dann so kultiviert, daß die Unterseite durch Nährmedium versorgt wird und die epidermale Seite der umgebenden Atmosphäre zugewandt ist. Allerdings limitieren die begrenzte Kultivierungszeit (48 h) der Explantate sowie die unzureichende Verfügbarkeit humaner Haut die Anwendung solcher *Ex-vivo*-Modelle. Das Hühnereimodell nutzt die gut vaskularisierte Chorio-Allantois-Membran (CAM) eines befruchteten Hühnereis [23, 24]. Die Eischale wird über dem unteren Eiende teilweise geöffnet, die innere Eimembran entfernt, und die Testsubstanzen werden direkt auf die CAM aufgetragen. Nach 30minütiger Inkubation wird die Hämorrhagie der Blutgefäße beurteilt. Das Modell, das bisher vor allem zur Untersuchung von Augenirritationen herangezogen wurde, ist prinzipiell auch auf die Haut übertragbar. Modelle mit Mikroorganismen untersuchen z. B. die Lumineszenz als ein Maß der Vitalität von Bakterien (*Photobacterium phosphoricum*) [25] oder aber auch die Motilität von Protozoen (*Tetrahymena thermophila*) [26] unter Einfluß von chemischen Noxen und vergleichen diese mit unbehandelten Organismen.

3.3. Zellkulturmodelle

Am weitesten verbreitet und mit Sicherheit am bedeutendsten für die *In-vitro*-Prüfung der Hautverträglichkeit sind Zellkulturmodelle (Abb. 5).

Die Anwendung von isolierten Hautzellen, vor allem von Keratinozyten, Melanozyten und Endothelzellen, ermöglicht das Arbeiten mit großen Zellzahlen, die ein breit angelegtes Verträglichkeitsscreening mit vielen Testsubstanzen unterstützen.

Die Haut besitzt entsprechend ihren Aufgaben einen komplexen Aufbau und eine Vielzahl von Zelltypen. Bei der Testung von Substanzen zur Aufklärung der Genese toxischer Effekte auf molekularer Ebene sind daher Modelle von Vorteil, die sich durch Einfachheit und Überschaubarkeit auszeichnen. Deshalb sind Einzellsysteme verbreitet, die mit Standardgewebekulturtechniken erhalten werden. Vor allem die Verwendung von Keratinozyten- und Fibroblastenkulturen ist weit verbreitet [27]. Aufgrund der Bedeutung dieser Zelltypen können mit solchen Modellen wertvolle Informationen über die Biochemie und Physiologie der Dermis/Epidermis gewonnen werden [28]. In Abhängigkeit vom Ursprung des biologischen Materials und von den Kulturbedingungen sind Keratinozytenrein- und -mischkulturen etabliert. Weit verbreitet sind Mediumkulturen. Während native Zellen wegen ihrer besseren Vergleichbarkeit mit *In-vivo*-Verhältnissen genutzt werden, ist die Anwendung transformierter Zellen – vor allem HaCaT-Keratinozyten [29] – auf die über eine Vielzahl von Passagen stabile Replikationsrate zurückzuführen. Zur Beurteilung des irritativen Potentials einer Substanz werden Parameter wie Zellmorphologie, Zellproliferation, Zelldifferenzierung und Zellvitalität/Membranintegrität herangezogen. Für die *In-vivo*-Wirkung einer Substanz können solche Modelle allerdings nur von orientierender Bedeutung sein, da den komplexen physiologischen Verhältnissen nicht ausreichend Rechnung getragen wird. In erster Linie mangelt es diesen Systemen an charakteristi-

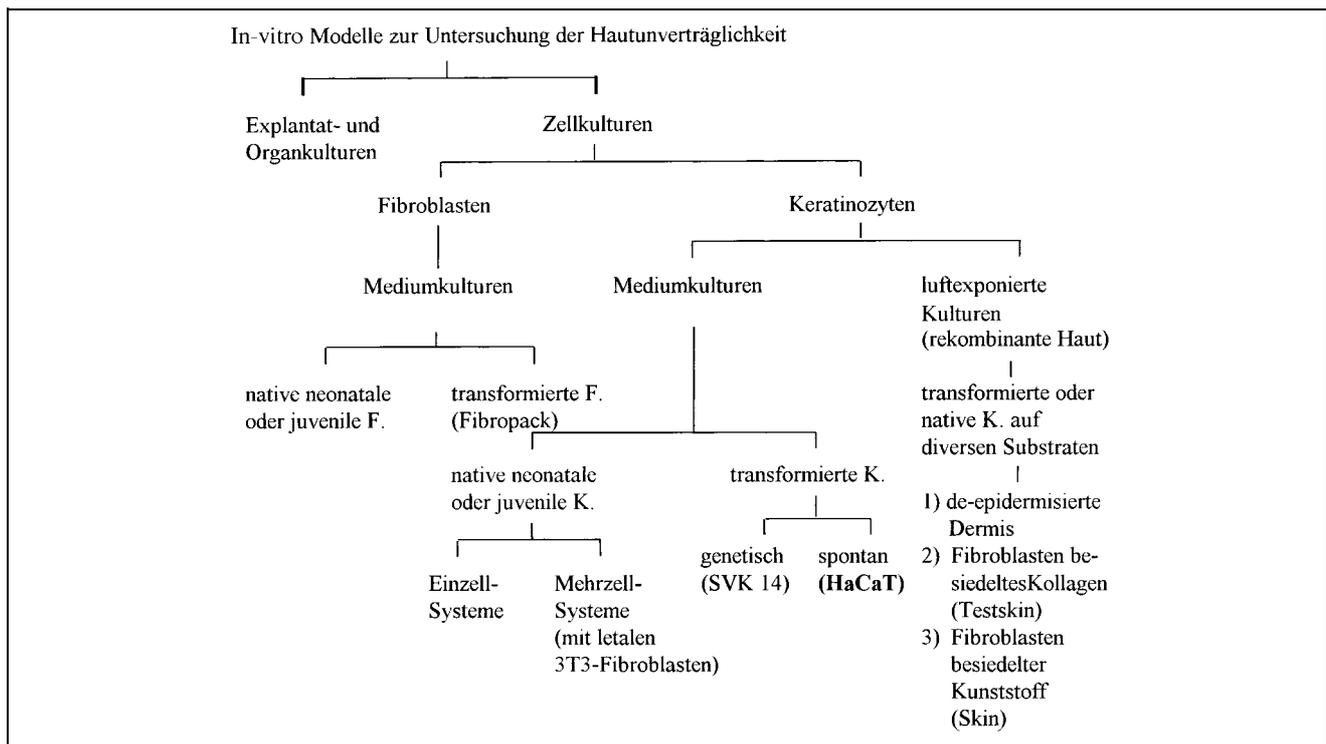


Abb. 5: Ausgewählte *In-vitro*-Modelle zur Untersuchung der Hautverträglichkeit

schen Eigenschaften intakter Haut, z. B. an der Hornschicht-Barriere und an Interaktionen unterschiedlicher Zellen.

3.4. Dreidimensionale Hautäquivalentmodelle

Eine Annäherung an physiologische Verhältnisse versucht man durch die Verwendung dreidimensionaler Hautäquivalente zu erreichen. Dabei werden Keratinozyten auf Dermis- [30], Kollagen- [31] oder Kunststoffsubstraten [32] luftexponiert kultiviert (Abb. 6). Vorteile dieser Modelle sind die Ausbildung einer Hornschichtbarriere und die Möglichkeit, die Interaktionen verschiedener epidermaler Zellentypen zu erfassen. Ponc und Kempenaar untersuchten mit Hilfe von Hautäquivalentmodellen den irritativen Einfluß von Natriumlaurylsulfat. Zur Beurteilung der Wirkung der Modellsubstanz bestimmten sie morphologische Veränderungen, die Expression verschiedener Differenzierungsmarker (Involucrin, Keratin 1, 10, 16 und Transglutaminase), die Freisetzung von proinflammatorischen Botenstoffen wie Cytokinen (Il-1, Il-6, Il-8) und PGE₂ sowie die Integrität der Zellmembranen. Die Autoren stellten eine hohe Korrelation zwischen der Sensibilität der verwendeten Modelle und *In-vivo*-Verhältnissen fest [33]. Mittlerweile ist es gelungen, die Hautäquivalentmodelle weiter an physiologische Verhältnisse anzunähern. So beschrieben Bessou et al. [34] die Integration von Melanozyten in die künstliche Epidermis. Die Inkorporation von Langerhanszellen ist eine weitere wichtige Zielstellung, da dieser Zelltyp *in vitro* bisher nicht subkultivierbar ist. In einer kürzlich publizierten Arbeit von Fransson et al. [35] wird ein vielversprechender Ansatz beschrieben: In eine Kollagenmatrix mit Fibroblasten wird eine Hautbiopsie implantiert, von der aus Keratinozyten und Langerhanszellen in die Matrix einwandern. Da Langerhanszellen als antigenpräsentierende Zellen eine zentrale Rolle in der Pathophysiologie des allergischen Kontaktekzemes spielen, könnte das Modell für das Studium der initialen Phase dieser Dermatose von Interesse sein. Nachteil der bisher beschriebenen Hautäquivalentmodelle ist ein Ungleichgewicht zwischen Proliferation und Differenzierung. Die Reifung der Keratinozyten ist beschleunigt, Differenzierungsmarker (Involucrin, Transglutaminase und Filag-

grin) werden verfrüht exprimiert und Proteine, die in gesunder Haut nicht vorliegen (Keratin 6, Keratin 16 und SKALP), sind nachweisbar. Der Zustand ist den bei hyperproliferativer Dermatosen beobachteten Anomalien ähnlich [36].

Literatur

- 1 Norlen, L.; Nicander, I.; Lundh Rozell, B.; Ollmar, S.; Forslind, B.: *J. Invest. Dermatol.* **112**(1), 72 (1998)
- 2 Zesch, A.: *Pharm. Ind.* **50**, 746 (1988)
- 3 Rutter, N.: *Clin. Perinatol.* **14**, 911 (1987)
- 4 Gilchrist, B. A.: *Br. J. Dermatol.* **135**, 867 (1996)
- 5 Niedner, R.; in: Niedner, R., Ziegenmeyer, J. (eds.): *Dermatika Therapeutischer Einsatz, Pharmakologie und Pharmazie*. p. 41, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart 1992
- 6 Grubauer, G.; Feingold, K. R.; Harris, R. M.; Elias, P. M.: *J. Lipid Res.* **30**, 89 (1989)
- 7 Schneider, I. M.; Wohlrab, W.; Neubert, R.: *Hautarzt* **48**, 303 (1997)
- 8 Held, E.; Sveinsdottir, A.; Agner, T.: *Acta Derm. Venereol.* **79**, 49 (1999)
- 9 Neubert, R.; Bendas, C.; Gienau, B.; Wohlrab, W.; Fürst, W.: *Int. J. Pharm.* **75**, 89 (1991)
- 10 Neubert, R.; Wohlrab, W.; Bendas, C.: *Skin. Pharmacol.* **8**, 119 (1995)
- 11 Feldmann, R. J.; Maibach, H. J.: *J. Invest. Dermatol.* **54**, 399 (1970)
- 12 Franz, T. J.: *J. Invest. Dermatol.* **64**, 190 (1975)
- 13 Franz, T. J.: *Curr. Probl. Dermatol.* **7**, 58 (1978)
- 14 Schäfer, H.; Redelmeier, T. E. (Eds.): *Skin barrier. Principles of percutaneous absorption*. Karger, Basel 1996
- 15 Walker, M.; Chambers, L. A.; Hollingsbee, D. A.; Hadgraft, J.: *Int. J. Pharm.* **70**, 167 (1991)
- 16 Draize, H. J.; Woodard, G.; Calvery, H. O.: *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **82**, 377 (1944)
- 17 Patil, S. M.; Patrick, E.; Maibach, H. I. in: Marzulli, F. N. and Maibach, H. I. (Eds.): *Dermatotoxicology methods: the laboratory worker's vade mecum* p. 89, Taylor & Francis Washington, DC 1998
- 18 Priborsky, J.; Muhlbachova, E.: *J. Pharm. Pharmacol.* **42**, 468 (1990)
- 19 Nakamura, M.; Rikimaru, T.; Yano, T.; Moore, K. G.; Pula, P. J.; Schofield, B. H.; Danneberg, A. M.: *J. Invest. Dermatol.* **95**, 325 (1990)
- 20 Chapman, S. J.; Walsh, A.; Beckett, E.; Vickers, C. F. H.: *J. Invest. Dermatol.* **93**, 762 (1989)
- 21 Dannenberg, A. M.; Pula, P. J.; Liu, L. H.; Harada, S.; Tanaka, F.; Vogt, R. F.; Kajiki, A.; Higuchi, K.: *Am. J. Pathol.* **121**, 15 (1985)
- 22 Kao, J.; Hall, J.; Holland, J. M.: *Toxic Appl. Pharmacol.* **68**, 206 (1983)
- 23 Lawrence, R. S.; Groom, M. H.; Ackrody, D. M.; Parish, W. E.: *Food Chem. Toxicol.* **24**, 497 (1986)
- 24 Pape, W. J.; Hoppe, U.: *Skin Pharmacol.* **4**, 205 (1991)
- 25 Decker, D.; Harper, R.; Rehfeldt, T.: *In Vitro Toxicol.* **7**, 83 (1994)
- 26 Silverman, J.; Pennist, S.: *J. Toxicol. Cutan Ocular Toxicol.* **6**, 33 (1987)
- 27 Korting, H. C.; Hülsebus, E.; Kerscher, M.; Greber, R.; Schäfer Korting, M.: *Br. J. Dermatol.* **133**, 54 (1995)
- 28 Roguet, R.; Schaefer, H.: *Toxicology in vitro* **11**, 591 (1997)
- 29 Boukamp, P.; Petrussevska, R. T.; Breitkreutz, D.; Hornung, J.; Markham, A.; Fusenig, N. E.: *J. Cell Biol.* **106**, 761 (1988)
- 30 Regnier, M.; Asselineau, D.; Lenoir, M. C.: *Skin Pharmacol.* **3**, 70 (1990)
- 31 Bell, E.; Parenteau, N.; Gay, R.; Nolte, C.; Kemp, P.; Ekstein, B.; Johnson, E.: *Toxicol. in vitro* **5**, 591 (1991)
- 32 Naughton, G. K.; Jacob, L.; Naughton, B. A.; in: *Alternative Methods in Toxicology*, Vol. 7, p. 183, Mary Ann Liebert New York 1989
- 33 Ponc, M.; Kempenaar, J.: *Skin Pharmacol.* **8**, 49 (1995)
- 34 Bessou, S.; Sulebe-Bazeille, J. E.; Sorbier, E.; Taieb, A.: *Pigment Cell Res.* **8**, 241 (1995)
- 35 Fransson, J.; Heffler, L. C.; Tengvall Linder, M.; Scheynius, A.: *Br. J. Dermatol.* **139**, 598 (1998)
- 36 Gibbs, S.; Vicanova, J.; Bouwstra, J.; Valstar, D.; Kempenaar, J.; Ponc, M.: *Arch. Dermatol. Res.* **289**, 585 (1997)

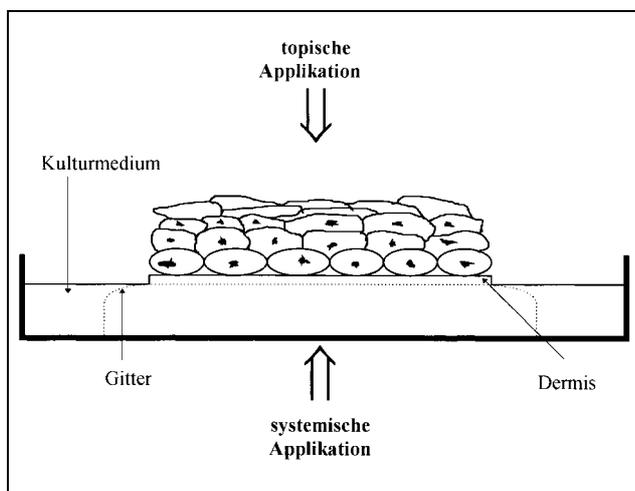


Abb. 6: Dreidimensionales Hautäquivalentmodell [30]

Eingegangen am 9. Juni 1999 Prof. Dr. W. Wohlrab
 Angenommen am 15. August 1999 Klinik und Poliklinik für Hautkrankheiten der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Ernst-Kronmayer-Straße 5-8 D-06097 Halle wolfgang.wohlab@medizin.uni-halle.de