

# **Transdermale Hormonapplikationssysteme: Untersuchungen zu Transportmechanismus und Hautmetabolismus**

**Dissertation**

zur  
Erlangung des Doktorgrades  
der Naturwissenschaften  
(Dr. rer. nat.)

dem  
Fachbereich Pharmazie und Lebensmittelchemie  
der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

**Ralf Altenburger**

aus Monheim

**Marburg/Lahn 1998**

# Inhaltsverzeichnis

## Teil I: Transportmechanismen von Reservoirsystemen zur transdermalen Applikation von Hormonen

	Seite
1. Einleitung	1
1.1 Transdermale Applikation von Arzneistoffen	2
1.2 Penetrationsförderer	6
1.3 Aufbau Transdermaler Therapeutischer Systeme	10
1.4 Transdermale Estrogensubstitution	18
1.5 In vitro-Untersuchungen zum Transportmechanismus	21
1.6 Zielsetzungen der Untersuchungen zum Transportmechanismus von Reservoirpflastern	25
2. Pharmacokinetics of the transdermal reservoir membrane system delivering $\beta$ -estradiol: In vitro/in vivo-correlation	34
3. Rate control in transdermal $\beta$ -estradiol reservoir membrane systems: The role of membrane and adhesive layer	56
4. Transdermale Applikation von Melatonin: Ein Reservoirsystem mit zirkadianer Freisetzung des Hormons	78

## **Teil II: HaCaT: Ein Zellkulturmodell zur Untersuchung des Hautmetabolismus von Steroiden**

	Seite
5. Einleitung	111
5.1 Anatomie der Haut	112
5.2 Metabolische Reaktionen in der Haut	114
5.3 Lokalisation der Enzymsysteme	119
5.4 Untersuchungsmodelle	121
5.5 Einfluß des Metabolismus auf die transdermale Bioverfügbarkeit	129
5.6 Zielsetzungen der Untersuchungen zum Hautmetabolismus	133
6. Die HaCaT-Zelllinie: Eigenschaften und Wachstumsbedingungen	142
7. The human keratinocyte cell line HaCaT: An in vitro cell culture model for cutaneous testosterone metabolism	150
8. Biotransformation of estradiol in the human keratinocyte cell line HaCaT: Metabolism kinetics and the inhibitory effect of ethanol	176
<b>Teil III: Zusammenfassung und Ausblick</b>	<b>199</b>

# **Teil I**

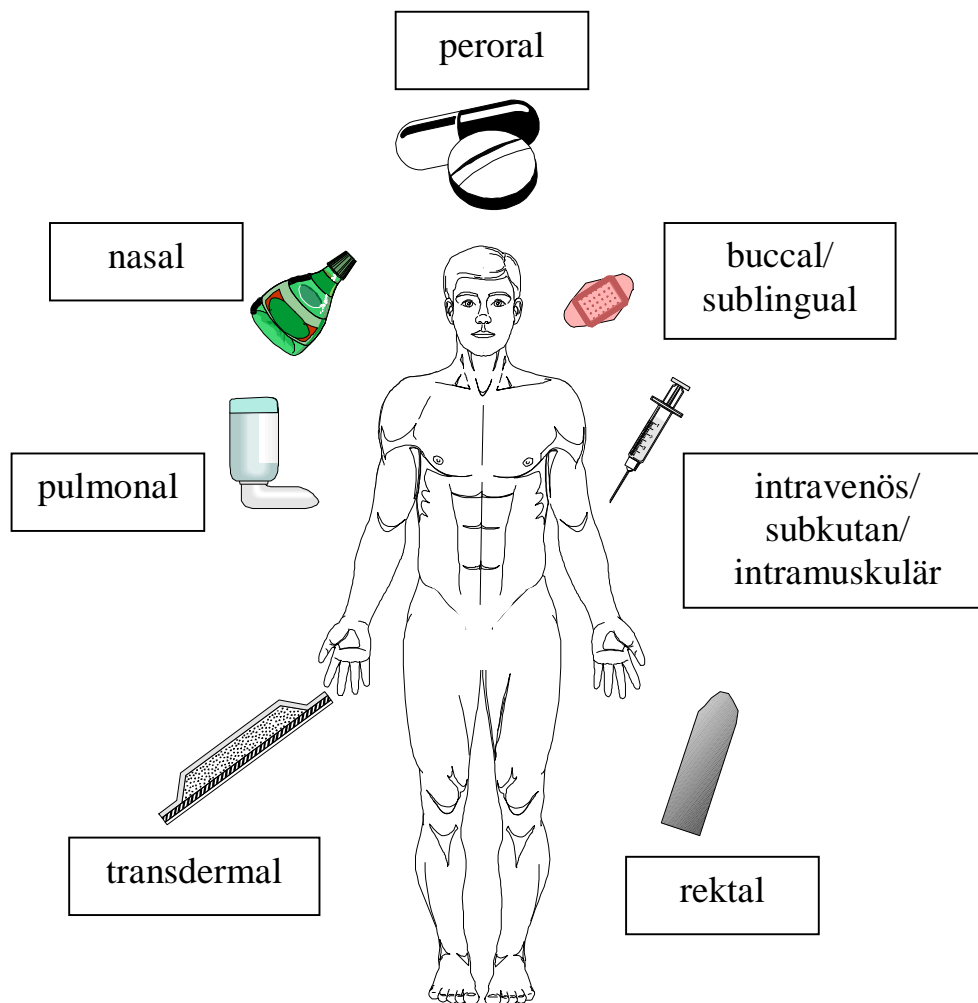
## **Transportmechanismen von Reservoirsystemen zur transdermalen Applikation von Hormonen**

### **Kapitel 1**

#### **Einleitung**

## 1.1 Transdermale Applikation von Arzneistoffen

In letzter Zeit haben alternative Applikationsrouten zur peroralen Verabreichung systemisch wirkender Arzneistoffe zunehmend an Bedeutung gewonnen. Gründe hierfür sind eine geringe perorale Bioverfügbarkeit zahlreicher Wirkstoffe, häufig bedingt durch einen hohen Leber First-pass-Effekt, eine angestrebte kontinuierliche Zufuhr des Arzneistoffes sowie eine Reduzierung des Dosierungsintervalls, um die Compliance zu fördern. Eine Übersicht der verschiedenen Applikationsarten gibt Abbildung 1.



**Abb.1:** Die verschiedenen Applikationsarten und -routen.

Die kontinuierliche intravenöse Infusion stellt in diesem Zusammenhang die ideale Applikationsform dar, weil sie unter Umgehung des First-pass-Effektes zu einem konstanten Blutspiegel des Wirkstoffes führt. Die Notwendigkeit einer stationären Behandlung durch medizinisches Personal schließt jedoch eine breitere Anwendung aus. Ausgehend von dieser idealen Route wurde nach Alternativen gesucht, welche die genannten Vorzüge bei einer vereinfachten Anwendung aufweisen. Die transdermale Applikation von Arzneistoffen, die Gegenstand der vorliegenden Arbeit ist, stellt eine solche Methode dar.

Schon in den 50er Jahren wurde versucht, Wirkstoffe über die Haut in den Organismus einzuschleusen (1). Ausgehend von diesen Pionierarbeiten konnte 1981 das erste transdermale therapeutische System (TTS) mit dem Wirkstoff Scopolamin auf dem Markt eingeführt werden (2). Bis heute sind acht verschiedene Arzneistoffe in zahlreichen Handelspräparaten mit einem Gesamtumsatz von 1,5 Mrd. US \$ kommerziell erhältlich, wodurch das große Interesse an dieser Arzneiform deutlich wird.

Gegenüber der herkömmlichen Therapie weisen die TTS eine Reihe von Vorteilen auf (1,3):

- Umgehung des hepatischen First-pass-Metabolismus
- Umgehung des GI-Traktes mit seinen Einflüssen auf den Wirkstoff
- Konstante Plasmaspiegel über einen längeren Zeitraum
- Reduktion des Dosierungsintervalles
- Unterbrechung der Therapie durch Abnahme des Systems möglich
- Einfache und schmerzlose Anwendung

Demgegenüber stehen aber auch einige Nachteile:

- Nur wenige Arzneistoffe sind geeignet, die Haut in ausreichendem Umfang zu penetrieren
- Variabilität im Transport (inter-individuell)

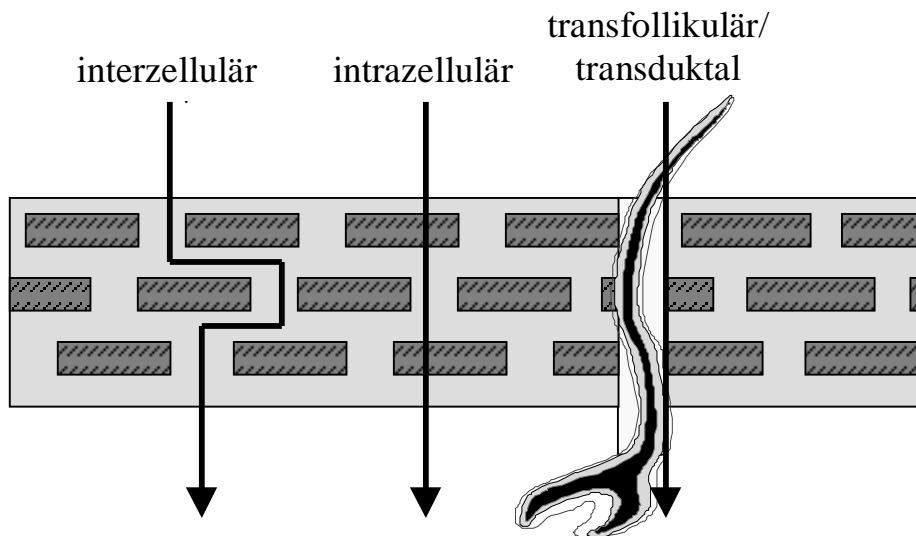
- Gefahr der Sensibilisierung
- Mögliches Auftreten von Hautirritationen
- Hohe Kosten der Arzneiform

Die menschliche Haut stellt ein mehrschichtiges Gebilde mit komplexen Funktionen (Schutz des Körpers vor äußeren Einflüssen, Regulation des Wasserhaushaltes etc.) dar. Sie gliedert sich in die drei Schichten: Epidermis, Dermis und Subcutis. (Für eine detaillierte Darstellung des Hautaufbaus siehe Kapitel 5).

Für die Barrierefunktion ist hauptsächlich die äußerste Schicht der Epidermis, das sogenannte Stratum corneum, zuständig (4). Dieses 10 bis 50  $\mu\text{m}$  dicke Gewebe ist aus verhornten Zellen von ca. 30  $\mu\text{m}$  Breite und 1  $\mu\text{m}$  Höhe aufgebaut. Diese Hornzellen sind hauptsächlich mit teilkristallinen Keratinfilamenten gefüllt. Die Zellen werden von einer amorphen Matrix umgeben, bestehend aus Lipid-Wasser-Doppelschichten und nichtfaserigen Proteinen (5). Die Lipidfraktion setzt sich aus freien Fettsäuren und Ceramiden zusammen (6, siehe auch Abbildung 3).

Man vergleicht diesen Aufbau mit dem einer Ziegelmauer, bei der die Hornzellen (Ziegel) durch die interzelluläre Masse (Mörtel) verbunden werden (7). Dieses Gefüge wird durch Haarfollikel und Ausführungsgänge von Talg- und Schweißdrüsen unterbrochen, die aber insgesamt nur einen Flächenanteil von 0,1 bis 0,5 % ausmachen.

Ausgehend von diesem Modell werden drei Wege postuliert, über die der Transport von Wirkstoffen durch das Stratum corneum erfolgen kann (Abb.2).



**Abb. 2:** Transportwege durch das Stratum corneum

Ergebnisse moderner Untersuchungsmethoden und die Aufklärung der Wirkmechanismen von Penetrationsbeschleunigern, sogenannten Enhancern, scheinen darauf hinzudeuten, daß die interzelluläre Lipidschicht eine wichtige Rolle für den Stofftransport durch das Stratum corneum spielt (7,8). Der Transport über die Hautanhangsgebilde ist von eher untergeordneter Bedeutung (9).

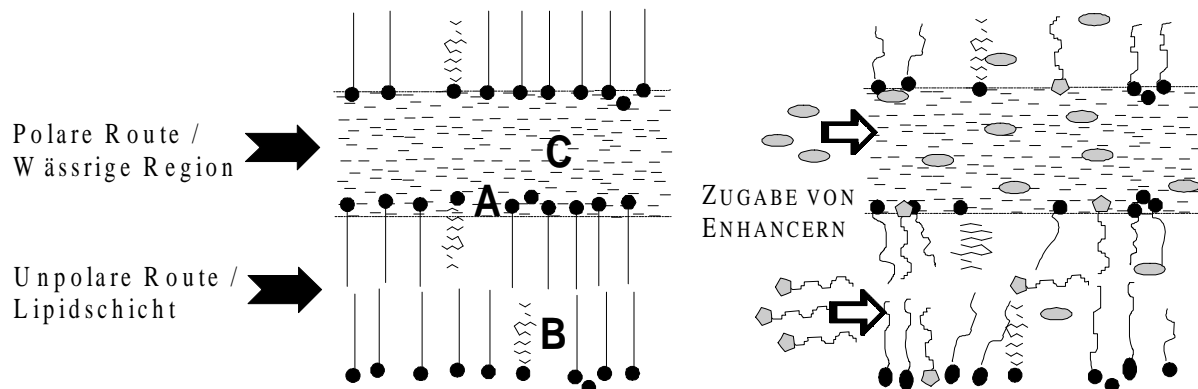
Mit wachsendem Wissen über die Funktionen der Haut hat auch das Bestreben zugenommen, den Stofftransport über diese Barriere zu optimieren. Hierbei fallen zwei Prinzipien besonders ins Gewicht. Zum einen kann die thermodynamische Aktivität der zu applizierenden Substanz durch die Auswahl des Vehikels und eine Sättigung desselben mit Wirkstoff maximiert werden (10). Zum anderen läßt sich durch geeignete Methoden der Barrierewiderstand des Stratum corneums reduzieren. Zu diesen Methoden gehören physikalische Verfahren, wie der Einsatz von Ultraschall (11) und das Anlegen eines elektrischen Feldes in der Iontophorese (12), und chemische Methoden, wie die Verwendung von Penetrationsförderern (13) und der Einsatz von lipophilen Prodrugs (14). Die Wirkung der Enhancer soll im folgenden etwas genauer charakterisiert werden.



## 1.2 Penetrationsförderer

Für alle Penetrationsförderer, auch Enhancer genannt, gilt, daß sie die Permeation durch das Stratum corneum verbessern sollen, ohne eine pharmakologische Eigenwirkung oder Toxizität im Körper auszuüben. Zusätzlich sollte die Verringerung des Transportwiderstandes vollständig reversibel sein (13).

Drei mögliche Wirkprinzipien von Enhancern sind in Abbildung 3 dargestellt.



**Abb. 3:** Angriffspunkte von Enhancern im Interzellularraum des Stratum corneums (aus 13). (Erläuterungen: siehe Text)

Enhancer können mit den hydrophilen Kopfgruppen der Phospholipid-Doppelschicht wechselwirken, was zu einer Freisetzung des chemisch gebundenen Wassers führt und eine Umordnung der Lipidketten bewirkt (A). Ein weiterer Mechanismus ist durch die Einlagerung des Enhancers zwischen die parallel angeordneten Lipidketten gekennzeichnet (B). Einige Lösungsmittel erhöhen die Löslichkeit des Arzneistoffes in der wässrigen Phase (C).

Der exakte Mechanismus für die einzelnen Verbindungen ist häufig nicht genau geklärt, so daß viele dieser Theorien nur auf Vermutungen beruhen (15).

### 1.2.1 Klassen von Enhancern

Die klassischen Gruppen von Penetrationsförderern mit ihren jeweils angenommenen Wirkweisen sind nachfolgend aufgeführt:

- Sulfoxid-Derivate: Hier werden vorrangig Dimethylsulfoxid (DMSO) und Decylmethylsulfoxid eingesetzt. DMSO verdrängt in geringeren Konzentrationen Wasser von den polaren Kopfgruppen und schafft somit hochgradig solvatisierte Kanäle zwischen den Bilayerschichten (**A**). In hohen Konzentrationen sorgt es durch eine Störung der Lipidpackung für eine erhöhte Fluidität in diesen Bereichen (**B**) (16).
- 1-Dodecylazacycloheptan-2-on (Azone<sup>®</sup>): Diese Verbindung lagert sich bedingt durch ihre Lipophilie in die semikristallinen Lipidstrukturen ein und bewirkt so eine Auflockerung dieses Bereichs, begleitet von einer Reduktion des Diffusionswiderstandes (**B**) (17). Eine Kombination mit Propylenglycol wird als notwendig angesehen, soll die Substanz ihre volle Wirksamkeit entfalten (18).
- Harnstoff: Die Wirkung des Harnstoffs beruht auf den keratinoplastischen Eigenschaften (im Intrazellularraum) sowie einer gesteigerten Wasserbindungskapazität (**C**) (19).
- Terpene und Fettsäuren: Diese lipophilen Enhancer beeinflussen die unpolare Penetrationsroute, indem sie die interzelluläre Lipidstruktur verändern (**B**) (16).
- Alkohole: Die Wirkung der mehrwertigen Alkohole als echte Enhancer ist eher umstritten. Sie scheinen durch eine Verbesserung des Vehikel/Haut-Verteilungskoeffizienten die Wirkstoffpermeation zu fördern (**C**). Ethanol, ein vielfach verwendeter Enhancer, soll etwas ausführlicher behandelt werden, da dieser Alkohol als Cosolvens und Enhancer eine große Bedeutung für die in den Kapiteln 2 bis 4 besprochenen TTS hat.

### 1.2.2 Ethanol als Enhancer

Die guten Lösungseigenschaften für verschiedene Arzneistoffe und die permeationsfördernde Wirkung des Ethanols haben diesem zu einem weit verbreiteten Einsatz in der transdermalen und topischen Applikation verholfen. Ein weiterer, bedeutender Faktor für die weite Verbreitung des Ethanols in topischen Arzneiformen und in TTS ist das geringe toxische Potential dieses Lösungsmittels (20,21). Allein drei transdermale therapeutische Systeme zur Applikation von Nitroglycerin,  $17\beta$ -Estradiol und Fentanyl enthalten diesen Alkohol (21-23).

Obwohl der Einfluß von Ethanol auf die Permeation von  $17\beta$ -Estradiol besonders intensiv untersucht wurde, ist der permeationsfördernde Mechanismus nicht vollständig geklärt. Die erzielten Ergebnisse werden z. T. recht kontrovers diskutiert:

In Nacktmäusen wird eine kontinuierliche Zunahme des Estradiolflusses (transportierte Menge pro Zeit und Fläche) durch die Haut mit steigenden Ethanolkonzentrationen bis 100% (V/V) gefunden (24). Ein ähnliches Verhalten wird auch für exzidierte Humanhaut beschrieben (25), wobei jedoch nur Ethanolkonzentrationen bis 75 % (V/V) verwendet wurden. In diesem Zusammenhang wird für Ethanol in Konzentrationen bis 50 % (V/V) eine Auflockerung der Lipidstruktur durch Interaktion mit den polaren Kopfgruppen postuliert, während höhere Konzentrationen zu einer vermehrten Porenbildung im Stratum corneum führen sollen (24,26). Andere Autoren erklären den Effekt hoher Ethanolkonzentrationen durch eine Konformationsänderung der Keratine und eine teilweise Extraktion von Lipiden (27,28).

Diese Ergebnisse stehen im Widerspruch zu einer Reihe von Untersuchungen, in denen gezeigt wird, daß sowohl die Hauttransportgeschwindigkeit von Estradiol (29,30) als auch die anderer Substanzen, wie Nitroglycerin (31), Natriumsalicylat (28), Levonorgestrel (32), hydrophiler Nukleosidanaloga (33) und Ethanol selbst (28,34) einen maximalen Wert annimmt, wenn die Ethanolkonzentration im Donor ca. 60 bis 70 % (V/V) beträgt. Wird der

Ethanolgehalt über 70 % erhöht, so nimmt der Transport all dieser Substanzen durch die Haut drastisch ab.

Die Zunahme des Flusses bei Ethanolkonzentrationen bis 50% wird durch eine erhöhte Aufnahme des Alkohols in das Stratum corneum, verbunden mit einer erhöhten Löslichkeit des Arzneistoffes in der Haut erklärt (29,30). Für eine Abnahme der Transportgeschwindigkeit bei Ethanolkonzentrationen >70 % soll eine Dehydratisierung des Stratum corneums, einhergehend mit einem erhöhten Diffusionswiderstand, verantwortlich sein (29,31,34).

Zusammenfassend läßt sich also festhalten, daß Ethanol einen stark konzentrationsabhängigen Effekt auf die Permeation vieler Arzneistoffe durch die Haut ausübt.

Inwiefern der Alkohol, eingesetzt in transdermalen Reservoirsystemen z. B. für die Applikation von Estradiol, die Eigenschaften des TTS beeinflusst, wurde bisher nicht systematisch untersucht. Zieht man jedoch in Betracht, daß die Systeme den Wirkstofftransport in die Haut kontrollieren sollen, wären gerade Untersuchungen eines möglichen Einflusses von Ethanol auf die Komponenten des Pflasters interessant.

Nur wenige Arbeiten befassen sich mit dem Effekt von Ethanol auf die Permeabilität künstlicher Membranen (29,35). Für die Praxis haben diese Studien jedoch wenig Relevanz, da die untersuchten Polymere keine Anwendung in den derzeit auf dem Markt befindlichen transdermalen Systemen finden.

Studien zu einem möglichen Einfluß auf TTS-Kleber haben bisher keinen Eingang in die Literatur gefunden.

Ausgehend von diesen Erkenntnissen wurde das membrankontrollierte Reservoirsystem zur transdermalen Applikation von 17 $\beta$ -Estradiol (Estraderm<sup>®</sup>TTS) auf einen möglichen Zusammenhang zwischen Pflasterdesign, Ethanolkonzentration im Reservoir und Pharmakokinetik des Systems untersucht (Kapitel 2 und 3).

### 1.3 Aufbau Transdermalen Therapeutischer Systeme (TTS)

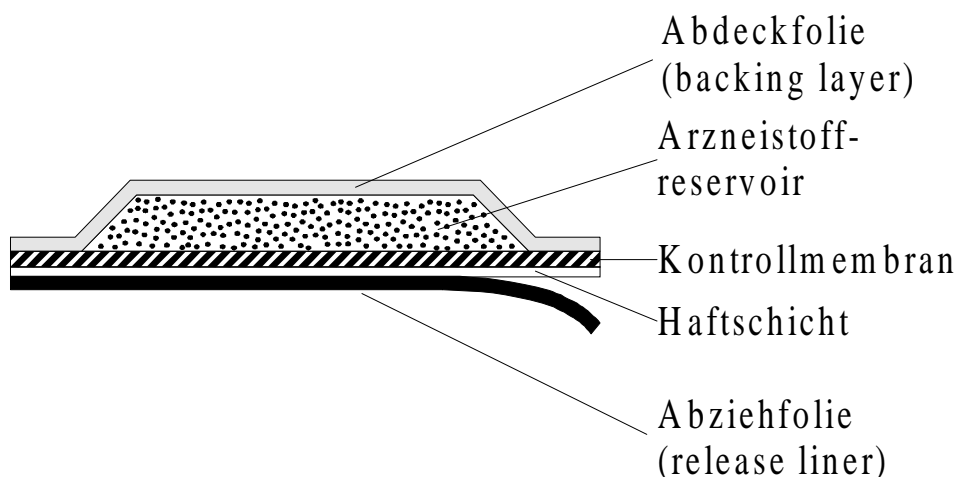
Ein TTS ist üblicherweise aus folgenden Grundbausteinen aufgebaut:

- ◆ undurchlässige Abdeckfolie (backing layer)
- ◆ Arzneistoffreservoir
- ◆ Kontrollelement, das die Arzneistoffabgabe steuert
- ◆ Adhäsiv- oder Haftschicht
- ◆ abziehbare Schutzschicht

Basierend auf dem Kontrollmechanismus der Wirkstofffreigabe lassen sich die TTS in drei Gruppen einteilen.

#### 1.3.1 Membrankontrollierte Reservoirsysteme (MCRS)

Bei diesem Typ von TTS, der schon 1971 patentiert wurde (36), befindet sich der Wirkstoff gelöst oder suspendiert in einem Reservoir zwischen backing layer und einer Polymermembran, welche die Permeation des Wirkstoffes in die Haut kontrollieren soll (Abb. 4).



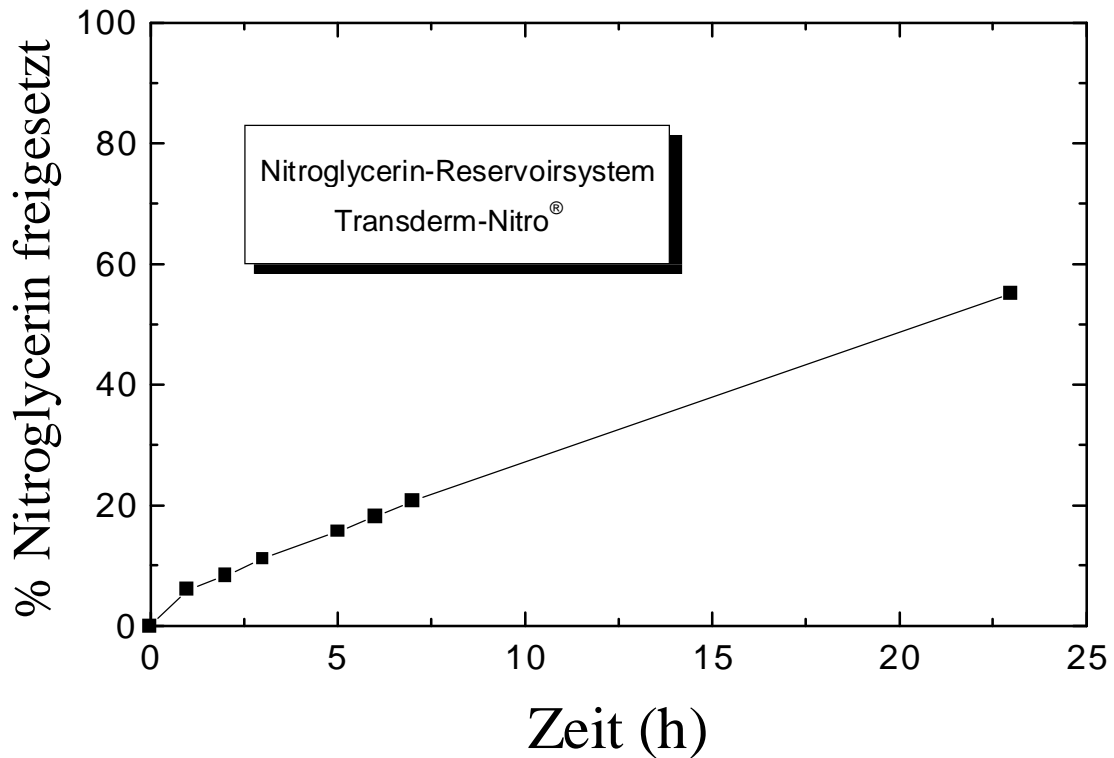
**Abb. 4:** Membrankontrolliertes Reservoirsystem (MCRS)

Man unterteilt die MCRS in Systeme mit mikroporösen und nicht-porösen Membranen. Die Herstellung der Pflaster erfolgt entweder durch das Laminieren mehrerer Schichten (Multilaminare) oder das Füllen eines gesiegelten Beutels (form-fill-seal) (siehe auch Kapitel 4).

Als wirkstoffhaltiges Vehikel zur Füllung der Systeme kommen verschiedene Substanzen in Betracht. Für die Reservoirsysteme zur Applikation von Estradiol und Fentanyl wird eine Ethanol/Wasser-Mischung eingesetzt (21,23). Hier liegt der Wirkstoff im Reservoir in gelöster Form vor. Im Falle eines MCRS zur Applikation von Nitroglycerin (Transderm-Nitro<sup>®</sup>) ist der Arzneistoff in Silikonöl suspendiert (37), während für das System zur Applikation von Clonidin Paraffinöl als Suspensionsmittel eingesetzt wird (38).

Die Kontrollmembran besteht üblicherweise aus einem Polymerfilm, basierend auf Polyolefinen, Celluloseestern, Polyamiden, Polyvinylchlorid oder deren Copolymeren (39). Ein häufig eingesetztes Material, das Ethylenvinylacetat-Copolymer (EVA), besitzt den Vorzug, daß die Permeabilität der Polymerfilme durch den Gehalt an Vinylacetat gesteuert werden kann (40). Reines HD-Polyethylen besitzt einen hohen Kristallinitätsgrad von ca. 70 %, der bei Zugabe von Vinylacetat stark abnimmt, wodurch der Transport einer lipophilen Modellsubstanz, wie Campher, stark ansteigt (41).

Das Freisetzungsverhalten der bisher beschriebenen Systeme mit einer nicht-porösen Membran kann mittels des Fick'schen-Diffusionsgesetzes beschrieben werden. Für den Fall, daß sich die Membran nicht verändert und die Konzentrationsdifferenz zwischen Reservoir und Haut relativ konstant bleibt, sollte eine Freisetzungskinetik 0. Ordnung resultieren. Somit sollte der Wirkstoff mit konstanter Geschwindigkeit aus dem TTS hinaus diffundieren. Zumindest für das erwähnte Nitroglycerin-MCRS (Transderm-Nitro<sup>®</sup>) läßt sich in vitro (Paddle-Methode der FDA) ein solches Freisetzungsprofil beobachten (Abb. 5).



**Abb. 5:** In vitro-Freisetzungsprofil von Nitroglycerin aus einem MCRS basierend auf einer Suspension des Wirkstoffes in Silikonöl (aus 42).

Mikroporöse Membranen werden häufig aus Celluloseestern oder Polyolefinen durch Phasenseparation (Celluloseester) oder durch Extrusion nahe des Schmelzpunktes (Isotaktisches Polypropylen, Celgard<sup>®</sup>, Hoechst) gewonnen. Die Filme weisen dann Porendurchmesser von 20-200 nm auf (39).

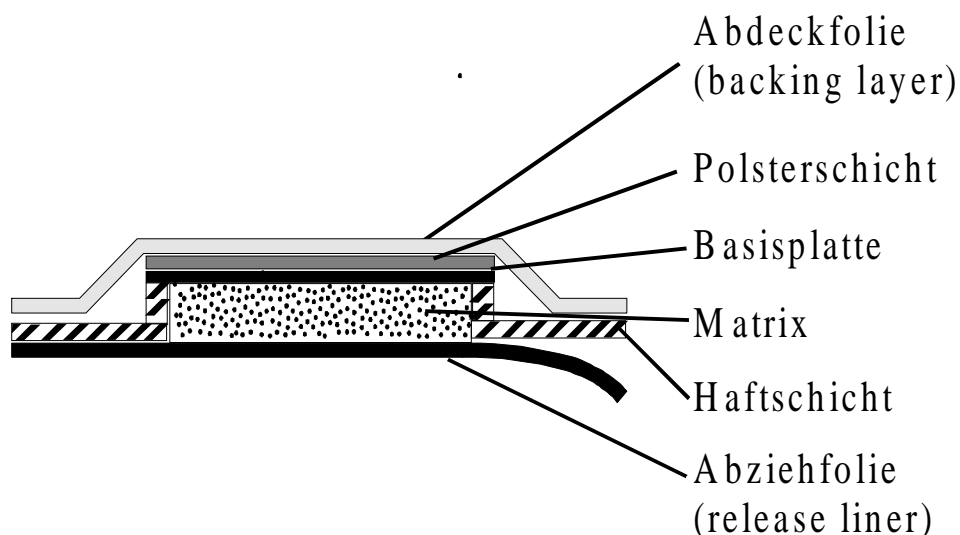
Für die Auswahl eines geeigneten Klebers spielen viele Faktoren, wie Hautverträglichkeit, Kompatibilität mit dem Wirkstoff, Haftvermögen auf der Haut, aber auch die schmerzlose Entfernbareit des TTS von derselben eine Rolle (40). Eingesetzt werden Kontaktkleber, sogenannte „pressure-sensitive adhesives“, die eine gewisse Viskoelastizität aufweisen und durch Anwendung von Druck auf der Haut heften bleiben.

Als Materialien werden vornehmlich Acrylate, Silikone und Polyisobutene verwendet. Die Acrylate besitzen eine gute Wasserdampfdurchlässigkeit und kommen ohne andere Zusatzstoffe (z. B. Weichmacher) aus, wodurch deren gute Hautverträglichkeit erklärbar ist (43). Eine noch bessere Verträglichkeit zeigen bestimmte Typen von Silikonen, während die Polyisobutene eher zu Hautirritationen führen können (40).

Ein Einfluß der Kleber auf das Freisetzungverhalten der Pflaster wurde unseres Wissens nach in der Literatur bisher nicht diskutiert. Ob diese Kleber jedoch die Kinetik eines MCRS maßgeblich beeinflussen können, wird in den Kapiteln 3 und 4 eingehender untersucht.

### 1.3.2 Matrixkontrollierte TTS

Das Arzneistoffreservoir wird durch den in einer hydrophilen oder lipophilen Matrix gelösten oder dispergierten Wirkstoff gebildet (Abb. 6).

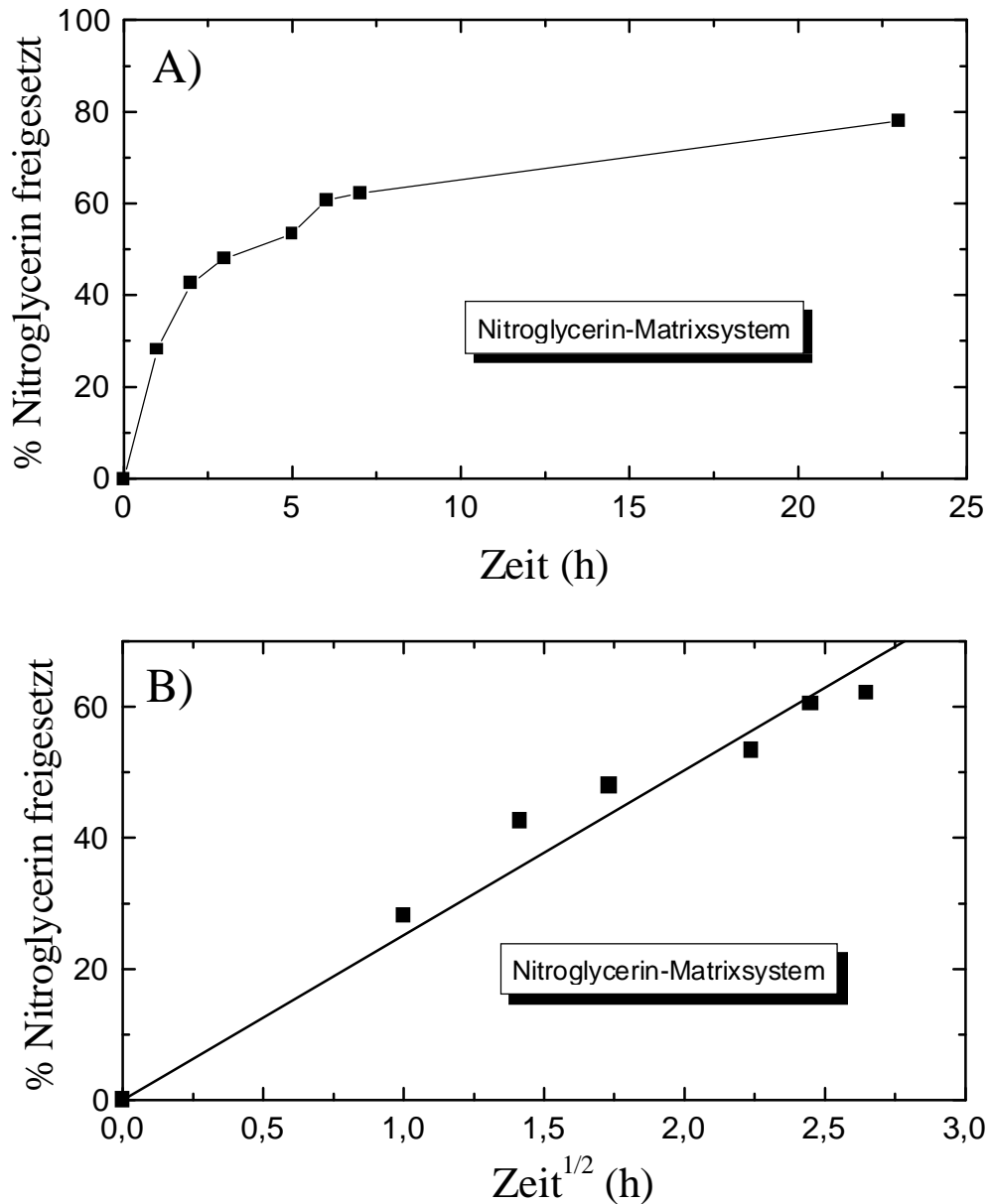


**Abb. 6:** Matrixkontrolliertes TTS (konventionelle Form, „monolithic device“)

Da die Polymermatrix die Freigabe kontrolliert, verläuft diese eher nach einer Wurzel-t-Kinetik. Ein Beispiel für ein solches Freisetzungverhalten ist in



Abbildung 7 dargestellt. Hier wurde ein Matrixsystem zur Applikation von Nitroglycerin in der Paddle-Apparatur untersucht (42).

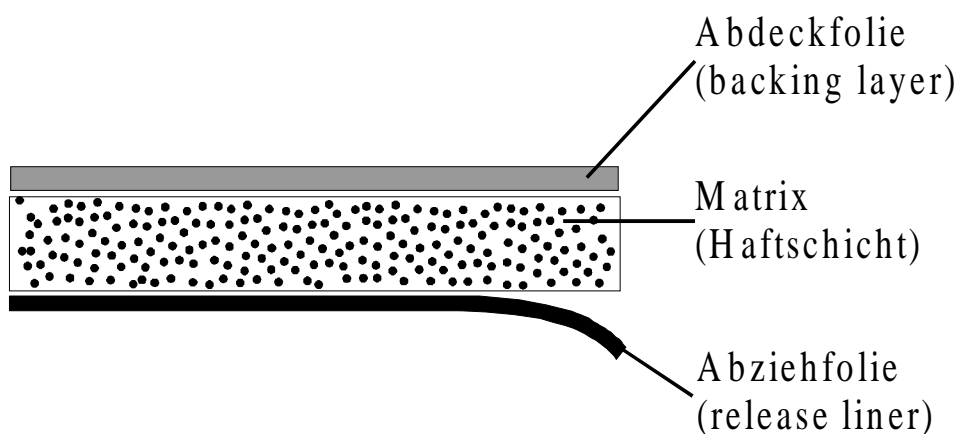


**Abb. 7:** Freisetzung von Nitroglycerin aus einem Matrixkontrollierten System als  
 A) Funktion der Zeit  
 B) Funktion der Wurzel der Zeit (aus 42).

Um der Abnahme der Freigabegeschwindigkeit als Funktion der Zeit entgegenzuwirken, kann eine quellende Matrix eingesetzt werden, bei der die Quellungsfrent mit konstanter Geschwindigkeit von der Oberfläche ins Innere einwandert (Case-II-diffusion). In diesem Fall hat die Matrix eine duale Funktion als Reservoir und Klebeschicht (Abb. 8).

Die Auswahl des geeigneten Materials für den Aufbau der Matrix orientiert sich – neben der Verträglichkeit – hauptsächlich am Lösungsvermögen und dem Diffusionswiderstand für den Arzneistoff.

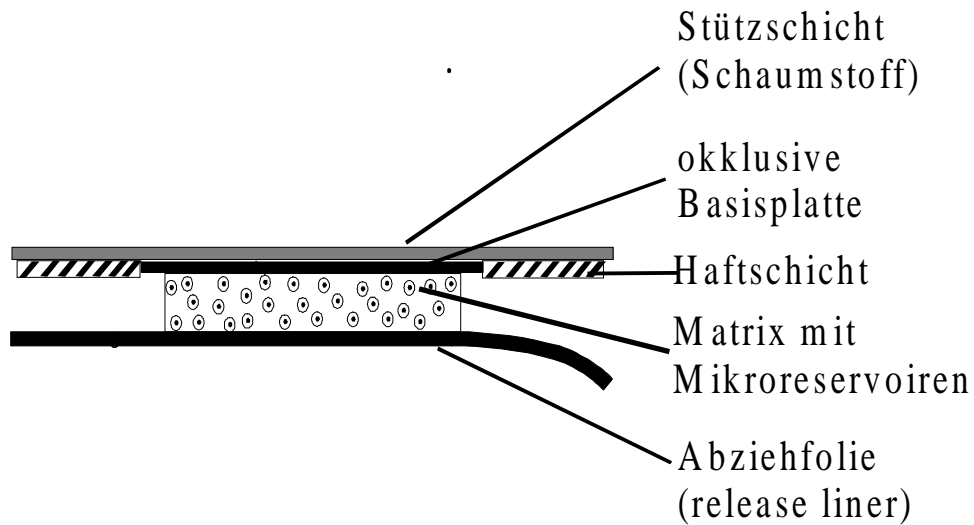
Neben den bei den Klebern genannten Acrylaten, Silikonen und Polyisobutenen kommen hydrophile Polymergele basierend auf Polyvinylpyrrolidon/ Polyvinylalkohol oder Derivaten der Acrylsäure vor (44).



**Abb.8:** Matrixkontrolliertes TTS (Dispersion des Arzneistoffes im adhäsiven Polymer, „adhesive device“)

### 1.3.3 Mikroreservoirsysteme

Das „Microsealed Drug Delivery System“ (MDD) besteht aus einer Polymermatrix, in die eine Vielzahl von flüssigen Mikroreservoirien eingelagert sind, die den Wirkstoff enthalten (Abb. 9). Diese Darreichungsform weist somit Freigabemechanismen nach dem Reservoir- und dem Matrixprinzip auf.



**Abb. 9:** Mikroservoirsystem

#### 1.3.4 Anwendungen von TTS

Eine Übersicht der bisher verwendeten Wirkstoffe in unterschiedlichen Handelspräparaten gibt Tabelle 1.

Neben den hier genannten, bereits auf dem Markt eingeführten Systemen, gibt es noch eine Reihe vielversprechender Ansätze zur Entwicklung neuer TTS. So befinden sich Systeme mit den Wirkstoffen Ketoprofen (46), Ketorolac (47), Levonorgestrel (48), 5-Fluoruracil (49) und Physostigmin (50) bereits in der klinischen Prüfung. In der Literatur finden sich zudem vielversprechende Arbeiten, in denen Systeme zur Applikation von Aspirin (51), Captopril (52), Oxymorphon (53) und Terbutalin (54,55) entwickelt und in vitro bzw. in vivo getestet wurden.

**Tab. 1:** Marktübersicht TTS sortiert nach Wirkstoffen (mod. nach 45)

Wirkstoff/Indikation	Handelsnamen	Pflastertyp
<b>Scopolamin/</b> <i>Antiemetikum</i>	Hyoscine <sup>®</sup> , Scopoderm <sup>®</sup> TTS, Transcop <sup>®</sup> , Transderm-Scop <sup>®</sup> , Transderm <sup>®</sup> V	MCRS
<b>Glyceroltrinitrat/</b> <i>Angina pectoris</i>	Nitroderm <sup>®</sup> , Transderm-Nitro <sup>®</sup> , Transiderm <sup>®</sup> -Nitro	MCRS
	MinitranS <sup>®</sup> , NitroCor <sup>®</sup> TD, Venitran T <sup>®</sup> , NTS <sup>®</sup> , Diafusor <sup>®</sup> , Nitro-Dur <sup>®</sup> , Adensitran <sup>®</sup> , Cedona <sup>®</sup> , Cordipatch <sup>®</sup> , Deponit <sup>®</sup>	Matrix
	Nitrodisc <sup>®</sup> , Nitradisc <sup>®</sup> , MDD-NG <sup>®</sup>	MDD
<b>Nicotin/ Nicotin-</b> <i>Entwöhnung</i>	Nicabate <sup>®</sup> , Nicoderm <sup>®</sup> , nicotine transdermal <sup>®</sup> , TTS-nicotine <sup>®</sup> , Nicorette <sup>®</sup> , Nicotrol <sup>®</sup>	MCRS
	Habitrol <sup>®</sup> , Nicomed <sup>®</sup> , Nicopatch <sup>®</sup> , Nicotinell <sup>®</sup> , Nicotell <sup>®</sup> , Nicotin-Pflaster-ratiopharm <sup>®</sup>	Matrix
<b>Fentanyl/</b> <i>Schmerzbehandlung</i>	Durogesic <sup>®</sup>	MCRS
<b>Clonidin/</b> <i>Blutdrucksenkung</i>	Catapres <sup>®</sup> -TTS	MCRS
	HCD-280 <sup>®</sup> , HCN-280 <sup>®</sup>	Matrix
<b>Estradiol/</b> <i>Hormonsubstitution</i>	Estraderm <sup>®</sup> TTS, TTS-estradiol <sup>®</sup>	MCRS
	Estraderm <sup>®</sup> MX, Evorel <sup>®</sup> , System <sup>®</sup> , Menorest <sup>®</sup> , Climara <sup>®</sup> , Fematrix <sup>®</sup> , Ethiderm <sup>®</sup> , Oeslim <sup>®</sup> , TS- 17 <sup>®</sup> , Vivelse <sup>®</sup> , Dermestril <sup>®</sup> , beta-Estro Patch <sup>®</sup> , Tradelia <sup>®</sup> , FemSeven <sup>®</sup> ,	Matrix
<b>Estradiol+Nor-</b> <b>ethisteronacetat/</b> <i>Hormonsubstitution</i>	Estracombi <sup>®</sup> , Estracomb <sup>®</sup> TTS	MCRS
<b>Testosteron/</b> <i>Hormonsubstitution</i>	Testoderm <sup>®</sup> , Androderm <sup>®</sup> , Andropatch <sup>®</sup>	MCRS

Aus Tabelle 1 läßt sich auch entnehmen, daß insbesondere auf dem Sektor der Hormonsubstitution eine Vielzahl von Präparaten kommerziell erhältlich ist.

Die Ansprüche der Systeme bezogen auf das zu erreichende Plasmaprofil variieren hier erheblich.

Während für Estradiol das Erreichen eines konstanten Plasmaspiegels nach der Applikation eines Pflasters über einen möglichst langen Zeitraum angestrebt wird (56), erheben die Systeme zur Applikation von Testosteron den Anspruch, die zirkadiane Rhythmik der natürlichen Hormonproduktion zu simulieren (57).

Ähnliches wurde auch für die transdermale Therapie von Schlafstörungen mittels Melatonin versucht (58,59). Bislang ist dieses Konzept aber nicht, in einer den Ansprüchen angepaßten Weise, verwirklicht worden.

Auf Grund der besonderen Bedeutung der Estrogene soll die transdermale Applikation dieser Substanzklasse im folgenden Abschnitt etwas genauer beleuchtet werden.

### **1.4 Transdermale Estrogensubstitution**

#### 1.4.1 Bedeutung der Substitution

Der Abfall des endogenen Estradiolspiegels bei Frauen in der Menopause ist von einer Reihe von Symptomen begleitet, zu denen das Auftreten von Hitze-wallungen („hot flushes“), depressiven Verstimmungen und atrophischen Veränderungen der Vaginalschleimhaut gehören (60,61). Zusätzlich steigt das Risiko kardiovaskulärer Erkrankungen (62) sowie die Neigung zur Ausbildung einer Osteoporose (63).

Die Substitution von Estrogenen hat positive Auswirkungen auf die genannten Symptome. So wird die Inzidenz von „hot flushes“ deutlich gesenkt (64). Bedingt durch eine vermehrte Produktion von TGF- $\beta$  (Transforming-Growth-Factor  $\beta$ ) in den Osteoblasten nimmt die Knochendichte zu (63). Das kardiovaskuläre Risiko wird um etwa 50 % gesenkt und das HDL-Cholesterin

erhöht sich signifikant (65). Diese Effekte lassen sich unabhängig von der Applikationsform der Hormone erzielen.

#### 1.4.2 Vorzüge der transdermalen Hormonsubstitution

Die Vorteile der transdermalen Gabe – im Vergleich zur oralen Substitution – ergeben sich aus dem Umstand, daß der Wirkstoff direkt in die systemische Zirkulation unter Umgehung des hepatischen First-pass-Effektes gelangt. Dadurch wird Estradiol ( $E_2$ ) in deutlich geringerem Umfang zu Estron ( $E_1$ ) metabolisiert, so daß ein physiologisches Verhältnis ( $E_1/ E_2$  ca. 1:1) der beiden Hormone ähnlich dem prämenopausalen Niveau resultiert (66).

Bei der oralen Gabe, meist in Form konjugierter equiner Estrogene, übersteigt der Plasmaspiegel von Estron den des Estradiols um ein Vielfaches ( $E_1/ E_2$  ca. 5:1), woraus folgt, daß hohe Dosen eingesetzt werden müssen. Diese hohen Dosen führen in der Leber zu einer vermehrten Bildung von Reninsubstraten und hormonbindenden Globulinen, welche die Thromboseneigung erhöhen (67). Die erhöhte Dosis in der oralen Therapie führt weiterhin zu einem starken Anstieg der Plasmaspiegel kurz nach der Applikation (66).

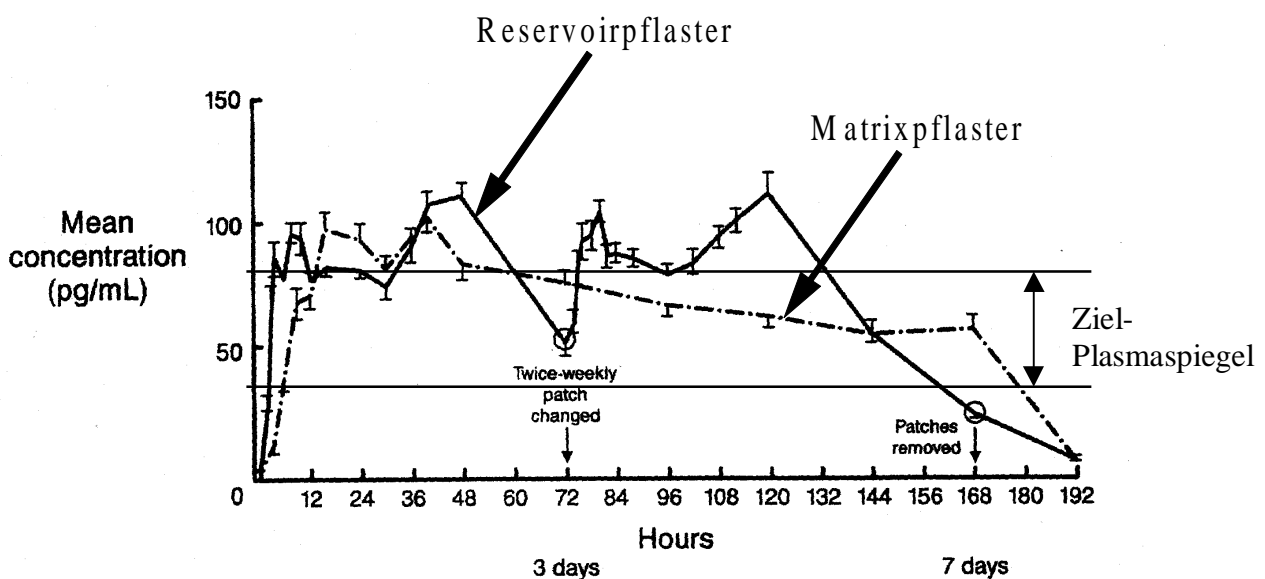
Man weiß aber, daß der Hauptgrund einer ungenügenden Compliance, das Auftreten von Brustschmerzen, mit einem erhöhten Estradiolspiegel korreliert (68). Auch die Gefahr des Auftretens von Brust- und Endometriumtumoren korreliert mit hohen Plasmaspiegeln (69).

Von daher sollte die Plasmakonzentration von Estradiol den therapeutischen Bereich nicht deutlich über- oder unterschreiten. Folglich weist die transdermale Therapie bezogen auf die therapeutische Sicherheit Vorteile auf.

#### 1.4.3 Vergleich unterschiedlicher Pflaster

In mehreren klinischen Studien wurden die neueren Matrixsysteme mit dem lange eingeführten Reservoirsystem (Estraderm<sup>®</sup>TTS) hinsichtlich ihrer Pharmakokinetik verglichen (56, 70-72).

Es zeigte sich, daß die Matrixsysteme einen konstanten Blutspiegel erzeugen, während das Reservoirsystem stärkere Schwankungen im Plasmaspiegel mit einem Peak ca. 40 Stunden nach der Applikation aufweist (Abb. 10). Daraus läßt sich ableiten, daß die Technologie des Pflasters in diesem Fall einen Einfluß auf die Resorption und somit eventuell auch auf die Wirksamkeit hat.



**Abb. 10:** Estradiol-Plasmaspiegel nach der Applikation von unterschiedlichen TTS in postmenopausalen Frauen (aus 56)

Mit Hilfe von in vivo-Studien sind mechanistische Untersuchungen nur schwer möglich. So ist die Kinetik der Wirkstoffabsorption aus in vivo-Daten nur indirekt ableitbar. Zur detaillierten Beschreibung kinetischer Konstanten eines TTS sind in vitro-Methoden wesentlich besser geeignet, die zudem eine mikroskopische Visualisierung der Transportwege mit markierten Substanzen ermöglichen. Während Freisetzungsuntersuchungen ohne die Verwendung von Haut als probates Mittel in der Qualitätskontrolle angesehen werden, gilt die

Untersuchung der in vitro-Permeation von Humanhaut als Methode der Wahl, um Aussagen über Transportmechanismen treffen zu können (73).

Unter der Verwendung von Humanhaut in einem geeigneten in vitro-Versuchsaufbau können Einblicke in den Zusammenhang zwischen Pflasteraufbau und Pharmakokinetik gewonnen werden. So kann der transdermale Fluß einer Substanz aus einem TTS und damit die Input-Rate in den Körper direkt bestimmt werden.

## **1.5 In vitro Untersuchungen zum Transportmechanismus**

Die Vorteile von in vitro-Methoden zur Bestimmung der perkutanen Absorption sind allgemein in der kostengünstigen, zeitsparenden und einfachen Ausführung unter reproduzierbaren Bedingungen zu sehen.

### **1.5.1 Auswahl der Membran**

Für eine optimale Simulation der in vivo-Situation unter in vitro-Bedingungen ist die Verwendung von Humanhaut unumgänglich (74). Dagegen wurde eine Vielzahl von Experimenten mit den Häuten unterschiedlicher Tierspezies durchgeführt (75). Letztlich muß jedoch festgestellt werden, daß die ermittelten Permeationsraten von denen der Humanhaut stark abweichen. In Einzelfällen ließen sich für bestimmte Substanzen, wie z. B. Nandrolon, übereinstimmende Ergebnisse erhalten, während im gleichen Versuchsaufbau für andere Stoffe (Allylestanol) erhebliche Unterschiede auftraten (76). Für Nicorandil, einen potenten Vasodilatator, wurden in der Haut von sechs Säugetieren ebenfalls stark differierende Transportraten gefunden (77).

Der Versuch, Humanhaut mit einem Konstrukt aus Dermis und Keratinozyten-Zellkulturen zu simulieren, scheiterte an den wesentlich höheren Permeabilitäten dieser Modelle (78).



Der Gebrauch künstlicher Membranen kann wertvolle Erkenntnisse im Hinblick auf mechanistische Aspekte der Permeabilität, wie z. B. thermodynamische Effekte in Verbindung mit der Löslichkeit des Wirkstoffes und dessen Verteilungskoeffizienten, erbringen (75). Die Eigenschaften der menschlichen Haut lassen sich so allerdings nicht simulieren (79).

Alle diese Erkenntnisse haben dazu geführt, daß auch die FDA den Gebrauch von Humanhaut vorschreibt, falls für die in vivo-Situation relevante Ergebnisse erzielt werden sollen (80).

Geht es um die Vergleichbarkeit von erhaltenen Resultaten, so muß weiterhin beachtet werden, daß die anatomische Region der Hautentnahme einen großen Einfluß auf die Permeabilität der Haut hat (81).

### 1.5.2 Präparation der Haut

In der Regel werden für Permeationsversuche nur das Stratum corneum und die Epidermis eingesetzt. Es gibt verschiedene Methoden, diese Hautschichten zu isolieren. Dazu gehören die Hitzeseparation, enzymatische Isolierungen und die mechanische Abtrennung mit Hilfe eines Dermatoms (74). Die Hitzeseparation sollte dann nicht verwendet werden, wenn neben der Penetration des Wirkstoffes auch dessen Metabolismus untersucht werden soll, da die enzymatische Aktivität der Haut hierdurch stark reduziert wird (82).

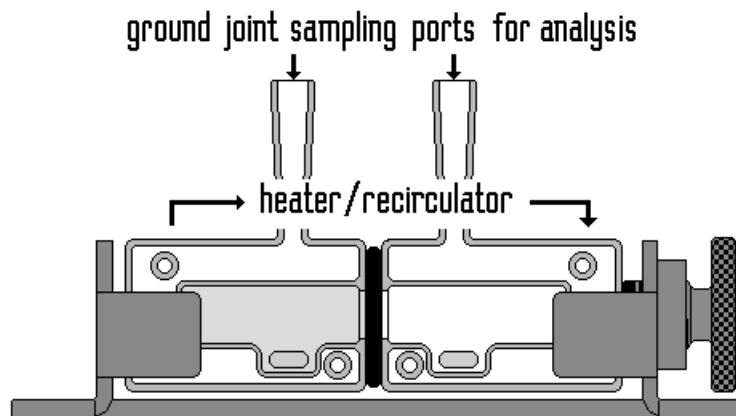
Eine Lagerung der Haut bei  $-20\text{ °C}$  für mehr als ein Jahr hat keinen Effekt auf die Barriereigenschaften (83,84).

### 1.5.3 Experimenteller Aufbau

Es lassen sich zwei Techniken mit unterschiedlichen Ansprüchen unterscheiden, nämlich die infinite dose- und die finite dose-Technik.

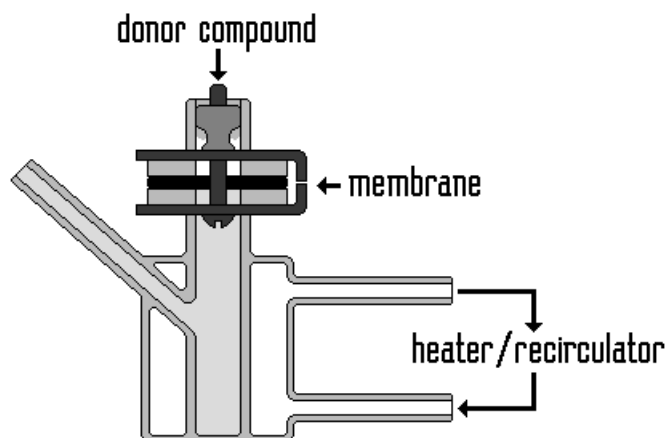
Die infinite dose-Technik bedient sich einer Zweikammerdiffusionszelle („side-by-side diffusion cell“) mit einer horizontalen Ausrichtung (Abb. 11). Die Haut befindet sich hier zwischen zwei flüssigkeitsgefüllten Kompartimenten. Dieses

Design wird insbesondere dann gewählt, wenn der Transport im Fließgleichgewicht bestimmt werden soll.



**Abb. 11:** Querschnitt einer horizontalen Diffusionszelle (side-by-side diffusion cell)

Bei der finite dose Technik kommt eine vertikale Diffusionszelle, auch Franz-Zelle genannt, zum Einsatz (85). Hier wird eine Formulierung direkt auf die Haut aufgebracht und der transportierte Wirkstoff im Akzeptormedium bestimmt (Abb. 12).



**Abb. 12:** Querschnitt einer vertikalen Diffusionszelle (Franz-Zelle)

Die Haut ist hier, ähnlich den in vivo-Bedingungen, der äußeren Umgebung ausgesetzt. Weiterhin entsprechen der Hydratisierungsgrad und der ausgebildete Temperaturgradient über die Haut eher der in vivo-Situation, als es vergleichsweise in der side-by-side-Zelle der Fall ist (86).

Mit Hilfe dieser Methode lassen sich die Eigenschaften der Formulierung auf die Permeation bestimmen. Sollen in vivo-Plasmaspiegel vorherbestimmt werden, so stellt dieses Design die Methode der Wahl dar.

Den Empfehlungen der FDA folgend, sollten die Zellen allgemein aus einem inerten Material wie Glas oder Teflon bestehen, das gut gerührte Rezeptormedium sollte, möglichst auf einem isotonischen Puffer (pH 7,4) basierend, zu allen Zeiten Sink-Bedingungen aufweisen und die Temperatur an der Hautoberfläche sollte  $32 \pm 1^\circ \text{C}$  betragen (80).

### 1.5.4 Relevanz von in vitro-Daten

Die Relevanz von in vitro-Daten für die in vivo-Situation läßt sich durch eine Fülle von Studien belegen (87).

So ergab beispielsweise ein umfangreicher Vergleich von in vitro-Daten mit der in vivo-Absorption zwölf organischer Verbindungen eine gute Übereinstimmung (85).

Bei all diesen Betrachtungen stand der Vergleich von Absorptionsraten aus einer Lösung oder Suspension eines Wirkstoffes in einem flüssigen oder halbfesten Vehikel im Vordergrund. Es stellt sich also die Frage, ob aus in vitro-Untersuchungen mit den komplexer aufgebauten TTS auch die resultierenden Plasmaspiegel bestimmt werden können.

Bei Kenntnis der totalen Plasmaclearance und der in vitro bestimmten Permeationsrate des TTS sollte sich, ähnlich einer Infusion, die Steady-state Plasmakonzentration berechnen lassen (67).

Für zwei Matrixsysteme zur transdermalen Applikation von Nitroglycerin (88) und einem zur Abgabe von  $17\beta$ -Estradiol (71) konnte eine gute

Übereinstimmung von berechneten und klinisch bestimmten Plasmaspiegeln gezeigt werden.

Die Technologie der Matrixpflaster erlaubt es, daß ein ausgestanzter Teil des TTS verwendet wird. Bei einem MCRS hingegen müßte das gesamte, intakte Pflaster in einer geeigneten Diffusionszelle untersucht werden.

Die resultierenden Anforderungen an Hautstücke und Diffusionszelle haben bislang dafür gesorgt, daß, zumindest für das relativ große MCRS zur transdermalen Applikation von Estradiol, keine solchen Untersuchungen publiziert wurden.

## **1.6 Zielsetzungen der Untersuchungen zum Transportmechanismus von Reservoirpflastern**

Aus den vorhergehenden Ausführungen wird klar, daß die transdermale Applikation für Arzneistoffe mit den geeigneten physikochemischen Eigenschaften eine attraktive Alternative zu anderen Routen darstellt.

Trotz der intensiven Forschung auf dem angesprochenen Gebiet blieben einige Mechanismen – auch im Zusammenhang mit der Pharmakokinetik der entwickelten TTS – unklar. So ist seit längerer Zeit bekannt, daß es, abhängig vom Pflastertyp, deutliche Unterschiede in den auftretenden Plasmaprofilen gibt. Insbesondere das MCRS zur transdermalen Applikation von  $17\beta$ -Estradiol erzeugt Blutspiegel, die sich in ihrem zeitlichen Verlauf deutlich von denen, die nach der Anwendung von Matrixsystemen erhalten werden, unterscheiden (56,70-72). Eine systematische Untersuchung der verantwortlichen Umstände ist bisher aber nicht erfolgt.

Gerade die genaue Kenntnis der Zusammenhänge zwischen Technologie und Pharmakokinetik der Arzneiform könnte aber dazu beitragen, das Applikationssystem zu optimieren. Durch das gezielte Design eines TTS ließe sich so ein gewünschter Plasmaspiegelverlauf einstellen. Insbesondere bei

Hormonen, die Gegenstand der vorliegenden Arbeit sind, spielt der Verlauf des Blutspiegels eine große Rolle (siehe 1.3.4 und 1.4).

Von daher soll ein geeignetes *in vitro*-Modell zur Untersuchung des transdermalen Flusses aus dem MCRS zur Applikation von Estradiol etabliert werden (Kapitel 2).

Mittels eines Vergleiches mit Daten einer klinischen Studie wird überprüft, inwieweit das *in vitro*-Modell eine Relevanz für die *in vivo*-Situation aufweist. Die permeationskontrollierenden Eigenschaften von Membran und Kleber sollen in einer systematischen Untersuchung zum Einfluß der Komponenten des Pflasters auf die transdermale Input-Rate beleuchtet werden (Kapitel 3). In diesem Zusammenhang wird in Versuchen unter Steady state-Bedingungen der Effekt der Konzentration des Enhancers Ethanol im Pflaster untersucht (Kapitel 2 und 3).

Basierend auf den Erkenntnissen aus den Kapiteln 2 und 3 soll versucht werden, ein TTS zur Applikation von Melatonin, einem Hormon der Epiphyse, zu entwickeln (Kapitel 4). Die Anwendung von Melatonin als nebenwirkungsarmes Schlafmittel ist weithin anerkannt (89,90).

Um eine ideale Wirkung des Hormons zu erzielen, müßte ein Plasmaprofil erzielt werden, das dem natürlichen, tageszeitabhängigen Blutspiegelverlauf entspricht. Bisherige Versuche, dies mittels der transdermalen Gabe zu erreichen, sind an der langen Freisetzungsphase der Systeme gescheitert (58,59). Mit Hilfe eines Reservoirsystems unter der Verwendung von Ethanol als Enhancer soll versucht werden, den zirkadianen Rhythmus der endogenen Melatoninfreisetzung nachzuvollziehen.

## **Literaturverzeichnis**

1. N. H. Parikh, A. Babar, and F. M. Plakogiannis. Transdermal therapeutic systems (Part 1). *Pharm. Acta. Helv.* 59: 290-292 (1984)
2. S. K. Chandrasekaran. Controlled release of scopolamine for prophylaxis of motion sickness. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 9: 627-646 (1983)
3. R. H. Guy, J. Hadgraft, and D. A. W. Bucks. Transdermal drug delivery and cutaneous metabolism. *Xenobiotica* 17: 325-343 (1987)
4. R. J. Scheuplein. Mechanism of percutaneous adsorption. *J. Invest. Dermatol.* 45: 334-346 (1965)
5. G. F. Flynn, E. E. Linn, T. Kurihara-Bergstrom, S. K. Govil, and S. Y. E. Hou. Parameters of skin condition and function. In: A. F. Kydonieus and B. Berner. *Transdermal delivery of drugs*. CRC Press, Boca Raton, 1987, pp. 61-69
6. P. M. Elias, J. Goerke, and D. S. Friend. Permeability barrier lipids: Composition and influence on epidermal structure. *J. Invest. Dermatol.* 69: 535-546 (1977)
7. P. M. Elias. Epidermal lipids, membranes and keratinization. *Int. J. Dermatol.* 20: 1-19 (1981)
8. J. Bouwstra, G. S. Gooris, and W. Bras. New insights in the lipid structure of the skin barrier. In: R. Gurny and A. Teubner. *Dermal and transdermal drug delivery*. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart, 1993 pp. 67-90
9. J. C. Keister and G. B. Kasting. The use of transient diffusion to investigate transport pathways through skin. *J. Control. Release* 4: 111- (1986)
10. K. B. Sloan, S. A. M. Koch, K. G. Siver, and F. P. Flowers. Use of solubility parameters of drug and vehicle to predict flux through skin. *J. Invest. Dermatol.* 87: 244-252 (1986)
11. J. Kost and R. Langer. Ultrasound-mediated transdermal drug delivery. In: V. P. Shah and H. I. Maibach (Eds.) *Topical drug bioavailability, bioequivalence, and penetration*. Plenum Press, New York, 1993, pp. 261-276
12. R. R. Burnette. Iontophoresis. In: J. Hadgraft and R. H. Guy (Eds.). *Transdermal drug delivery*. Marcel Dekker, New York, 1989, pp. 247-292
13. B. W. Barry. Vehicle effect: What is an enhancer. In: V. P. Shah and H. I. Maibach (Eds.) *Topical drug bioavailability, bioequivalence, and penetration*. Plenum Press, New York, 1993, pp. 261-276
14. D. A. W. Bucks. Skin structure and metabolism: Relevance to the design of cutaneous therapeutics. *Pharm. Res.* 1: 148-153 (1984)

15. H. E. Bodde, J. Verhoeven, and L. M. J. van Driel. Compliance of transdermal drug delivery systems. *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Systems* 6: 87-115 (1989)
16. R. Neubert, U. Schmalfuß, W. Wohlrab, and C. Huschka. Wirkstoffpenetration in die Haut und deren Modulation. *Pharmaz. Zeit. Nr. 17 141 Jahrgang*: 11-24 (1996)
17. K. A. Walters. Penetration enhancers and their use in transdermal therapeutic systems. In: J. Hadgraft and R. H. Guy (Eds.). *Transdermal drug delivery*. Marcel Dekker, New York, 1989, pp. 197-246
18. A. Hoelgaard and B. Mollgaard. Dermal drug delivery-improvement by choice of vehicle or drug derivative. *J. Control. Release* 2: 111- (1985)
19. L. Hellgren and K. Larsson. On the effect of urea on human epidermis. *Dermatologica* 149: 289-293 (1974)
20. M. Ponec, M. Haverkort, Y. L. Soei, J. Kempenaar, and H. Bodde. Use of human keratinocyte and fibroblast cultures for toxicity studies of topically applied compounds. *J. Pharm. Sci.* 79: 312-316 (1990)
21. P. S. Campbell and S. K. Chandrasekaran. US Patent 4379454
22. R. M. Gale and R. G. Berggen. US Patent 4615699 (1986)
23. R. M. Gale, E. S. Lee, L. T. Taskovich, and S. I. Yum. US Patent 4588580 (1986)
24. P. Liu, T. Kurihara-Bergstrom, and W. R. Good. Cotransport of estradiol and ethanol through human skin in vitro: Understanding the permeant/enhancer flux relationship. *Pharm. Res.* 8: 938-944 (1991)
25. A. H. Ghanem, H. Mahmoud, W. I. Higuchi, U. D. Rohr, S. Borsadia, P. Liu, J. L. Fox, and W. R. Good. The effects of ethanol on the transport of  $\beta$ -estradiol and other permeants in hairless mouse skin II: A new quantitative approach. *J. Contr. Rel.* 6: 75-83 (1987)
26. A. H. Ghanem, H. Mahmoud, W. I. Higuchi, P. Liu, and W. R. Good. The effects of ethanol on the transport of lipophilic and polar permeants across hairless mouse skin : Methods/validation of a novel approach. *Int. J. Pharm.* 78: 137-156 (1992)
27. K. Knutson, S. L. Krill, and J. Zhang. Solvent mediated alterations of the stratum corneum. *J. Control. Release* 11: 93-103 (1990)
28. T. Kurihara-Bergstrom, K. Knutson, L. J. DeNoble, and C. Y. Goates. Percutaneous absorption enhancement of an ionic molecule by ethanol-water systems in human skin. *Pharm. Res.* 7: 762-766 (1990)
29. N. A. Megrab, A. C. Williams, and B. W. Barry. Oestradiol permeation across human skin, silastic and snake skin membranes: The effects of ethanol/water co-solvent systems. *Int. J. Pharm.* 116: 101-112 (1995)

30. D. D. Kim, J. L. Kim, and Y. W. Chien. Mutual hairless rat skin permeation-enhancing effect of ethanol/water system and oleic acid. *J. Pharm. Sci.* 85: 1191-1195 (1996)
31. B. Berner, G. C. Mazzenga, J. H. Otte, R. J. Steffens, R. H. Juang and C. D. Ebert. Ethanol:water mutually enhanced transdermal therapeutic system II: Skin permeation of ethanol and nitroglycerin. *J. Pharm. Sci.* 78: 402-407 (1989)
32. G. S. Chen, D. D. Kim, and Y. W. Chien. Dual-controlled transdermal delivery of levonorgestrel and estradiol: Enhanced permeation and modulated delivery. *J. Contr. Rel.* 34: 129-143 (1994)
33. D. D. Kim and Y. W. Chien. Transdermal delivery of dideoxynucleoside-type anti-HIV drugs. 2. The effect of vehicle and enhancer on skin permeation. *J. Pharm. Sci.* 85: 214-219 (1996)
34. B. Berner, R. H. Juang, and G. C. Mazzenga. Ethanol and water sorption into stratum corneum and model systems. *J. Pharm. Sci.* 78: 472-476 (1989)
35. B. Berner, J. H. Otte, G. C. Mazzenga, R. J. Steffens, and C. D. Ebert. Ethanol:water mutually enhanced transdermal therapeutic system I: Nitroglycerin solution properties and membrane transport. *J. Pharm. Sci.* 78: 314-318 (1989)
36. A. Zaffaroni. USA, German Patent 21355339.41 (1971)
37. J. Shaw. Development of transdermal therapeutic systems. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 9: 579-603 (1983)
38. A. A. H. Lawson. Clinical and pharmacological studies with transdermal clonidine. In: L. F. Prescott and W. S. Nimmo (Eds.). *Rate control of drug therapy*. Churchill Livingstone, Edinburgh, 1985, pp. 215-223
39. R. W. Baker. *Controlled release of biologically active agents*. John Wiley, New York, 1987, pp. 161-162
40. R. W. Baker and J. Heller. Materials selections for transdermal delivery systems. In: J. Hadgraft and R. H. Guy (Eds.). *Transdermal drug delivery*. Marcel Dekker, New York, 1989, pp. 293-311
41. R. M. Gale and L. A. Spitze. Permeability of camphor in ethylene-vinyl acetate copolymers. *Proc. Int. Symp. Control. Rel. Bioactive Mater.* 8: 183-186 (1981)
42. V. P. Shah, N. W. Tymes, and J. P. Skelly. Comparative in vitro release profiles of marketed nitroglycerin patches by different dissolution methods. *J. Control. Rel.* 7: 79-86 (1988)
43. D. Satas (Ed.) *Handbook of pressure-sensitive adhesive technology*, 2<sup>nd</sup> ed., Van Nostrand Reinhold, New York, 1989



44. G. Cleary and A. Keith. Transdermal delivery of nitroglycerin from a polymeric gel system. In: A. F. Kydonieus and B. Berner. Transdermal delivery of drugs. CRC Press, Boca Raton, 1987, pp. 61-69
45. M. Dittgen. Transdermale Therapeutische Systeme (TTS). In: R. H. Müller and G. E. Hildebrand (Eds.). Pharmazeutische Technologie: Moderne Arzneiformen. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart, 1997, pp. 81-103
46. A. K. Shah, G. Wie, R. C. Lanman, V. O. Bhargava, and S. J. Weir. Percutaneous absorption of ketoprofen from different anatomical sites in man. *Pharm. Res.* 13: 168-172 (1996)
47. S. D. Roy, E. Manoukian, and D. Combs. Absorption of transdermally delivered ketorolac acid in humans. *J. Pharm. Sci.* 84: 49-52 (1995)
48. T. Y. Chien, S. J. Wu, S. J. Gong, and Y. W. Chien. Transdermal contraceptive delivery system: Preclinical development and clinical assessment. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 20: 633-664 (1994)
49. M. A. Yamane, A. C. Williams, and B. W. Barry. Effects of terpenes and oleic acid as skin penetration enhancers towards 5-fluorouracil as assessed with time; permeation, partitioning, and differential scanning calorimetry. *Int. J. Pharm.* 116: 237-251 (1995)
50. K. Walter, M. Müller, M. F. Barkworth, A. V. Niecieki, and F. Stanislaus. Pharmacokinetics of physostigmine in man following single administration of a transdermal system. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 39: 59-63 (1995)
51. H. Franke and M. Horstmann. Transdermal feasibility of aspirin containing adhesive systems: A correlation between in vitro rat skin flux and in vivo efficacy. *Proc. Int. Symp. Control. Rel. Bioactive Mater.* 22: 658-659 (1995)
52. P. C. Wu, Y. B. Huang, J. Y. Fang, and Y. H. Tsai. In vitro percutaneous absorption of captopril. *Int. J. Pharm.* 148: 41-46 (1997)
53. B. J. Aungst, J. A. Blake, N. J. Rogers, and M. A. Hussain. Transdermal Oxymorphone formulation development and methods for evaluating flux and lag times for two skin permeation-enhancing vehicles. *J. Pharm. Sci.* 79: 1072-1076 (1990)
54. S. Tenjarla, P. Puranajoti, R. Kasina, and T. Mandal. Terbutaline transdermal delivery: Preformulation studies and limitations of in-vitro predictive parameters. *J. Pharm. Pharmacol.* 48: 1138-142 (1996)
55. T. Kurihara-Bergstrom and P. Liu. US Patent 5374645
56. S. F. Gordon. Clinical experience with a seven-day estradiol transdermal system for estrogen replacement therapy. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 173: 998-1004 (1995)

57. N. A. Mazer, W. E. Heiber, J. F. Moellmer, A. W. Meikle, J. D. Stringham, S. W. Sanders, K. G. Tolman, and W. D. Odell. Enhanced transdermal delivery of testosterone: A new physiological approach for androgen replacement in hypogonadal men. *J. Contr. Rel.* 19: 347-362 (1992)
58. B. J. Lee, K. A. Parrot, J. W. Ayres, and R. L. Sack. Preliminary evaluation of transdermal delivery of melatonin in human subjects. *Res. Comm. Mol. Pathol. Pharmacol.* 85: 337-346 (1994)
59. F. E. Yates, L. T. Taskovich, S. L. Yum, and N. M. Crisologo. Controlled transdermal administration of melatonin. US Patent 5508039
60. J. A. Balfour and R. C. Heel. Transdermal estradiol: A review of its pharmacodynamic properties and therapeutic efficacy in the treatment of menopausal complaints. *Drugs* 40: 561-582 (1990)
61. K. C. Nichols, L. Schenkel, and H. Benson.  $17\beta$ -Estradiol for postmenopausal estrogen replacement therapy. *Obstet. Gynecol. Survey* 4: 230S-245S (1984)
62. M. J. Stampher and G. A. Colditz. Estrogen replacement therapy and coronary heart disease: A quantitative assessment of the epidemiologic evidence. *Prev. Med.* 20: 47-63 (1991)
63. M. J. Oursler, C. Cortese, P. Keeting, M. A. Anderson, S. K. Bonde, B. L. Riggs, and T. C. Spelsberg. Modulation of transforming growth factor- $\beta$  production in normal human osteoblast-like cells by  $\beta$ -estradiol and parathyroid hormone. *Endocrinology* 129: 3313-3320 (1991)
64. R. W. Lievertz. Pharmacology and pharmacokinetics of estrogens. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 156: 1289-1293 (1987)
65. P. L. Colvin, B. J. Auerbach, D. R. Koritnik, W. R. Hazzard, and D. Applebaum-Bowden. Differential effects of oral oestrone versus  $17\beta$ -estradiol on lipoproteins in postmenopausal women. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 70: 1568-1573 (1990)
66. R. T. Scott, B. Ross, C. Anderson, and D. F. Archer. Pharmacokinetics of percutaneous estradiol: A crossover study using a gel and a transdermal system in comparison with oral micronized estradiol. *Obstet. Gynecol.* 77: 758-764 (1991)
67. W. R. Good, M. S. Powers, P. Campbell, and L. Schenkel. A new transdermal delivery system for  $17\beta$ -Estradiol. *J. Contr. Rel.* 2: 89-94 (1985)
68. P. J. Roberts. The menopause and hormone replacement therapy: Views of women in general practice receiving hormone replacement therapy. *Br. J. Gen. Pract.* 41: 421-424 (1991)

69. P. G. Toniolo, M. Levitz, and A. Zeleniuch –Jacquotte. A prospective study of endogeneous estrogens and breast cancer in postmenopausal women. *J. Nat. Cancer Inst.* 87: 190–197 (1995)
70. Y. Le Roux, M. L. Borg, M. Sibille, J. Thebault, A. Renoux, M. J. Douin, F. Djebbar, and M. P. Dain. Bioavailability study of Menorest<sup>®</sup>, a new estrogen transdermal delivery system, compared with a transdermal reservoir system. *Clin. Drug Invest.* 10: 172-178 (1995)
71. U. D. Rohr, C. Nauert, and A. M. Ehrly. Kinetik eines neuen Pflaters zur transdermalen Applikation von 17  $\beta$ -Estradiol. *Zentralbl. Gynakol.* 117: 531-539 (1995)
72. I. Setnikar, L. C. Rovati, B. Vens-Cappell, and C. Hilgenstock. Bioavailability of estradiol from two transdermal patches. *Arzneim.-Forsch./Drug Res.* 46: 307-310 (1995)
73. V. P. Shah, L. J. Lesko, and R. L. Williams. In vitro evaluation of transdermal drug delivery. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 41: 163-167 (1995)
74. C. L. Gummer. The in vitro evaluation of transdermal delivery. In: J. Hadgraft and R. H. Guy (Eds.). *Transdermal drug delivery*. Marcel Dekker, New York, 1989, pp. 177-195
75. C. R. Behl, H. Char, S. B. Patel, D. B. Mehta, D. Piemontese, and A. W. Malick. In vivo and in vitro skin uptake and permeation studies. In: V. P. Shah and H. I. Maibach (Eds.) *Topical drug bioavailability, bioequivalence, and penetration*. Plenum Press, New York, 1993, pp. 225-259
76. M. I. Foreman, I. Clanachan, and I. P. Kelly. Diffusion barriers in skin – A new method of comparison. *Br. J. Dermatol.* 108: 549-553 (1983)
77. K. Sato, K. Sugibayashi, and Y. Morimoto. Species differences in percutaneous absorption of nicorandil. *J. Pharm. Sci.* 80: 104-107 (1989)
78. M. Regnier, D. Caron, U. Reichert, and H. Schaefer. Barrier function of human skin and human reconstructed epidermis. *J. Pharm. Sci.* 82: 404-407 (1991)
79. S. Nacht and D. Yeung. Artificial membranes and skin permeability. In: R. L. Bronaugh and H. I. (Eds.). Maibach. *Percutaneous absorption*. Marcel Dekker, New York, 1985, pp. 373-386
80. J. P. Skelly, V. P. Shah, H. I. Maibach, R. H. Guy, R. C. Wester, G. Flynn, and A. Yacobi. FDA and AAPS report of the workshop on principles and practices of in vitro percutaneous penetration studies: Relevance to bioavailability and bioequivalence. *Pharm. Res.* 4: 265-267 (1987)

81. R. L. Bronaugh, R. F. Stewart, E. R. Congdon, and A. L. Giles. Methods for in vitro percutaneous absorption studies II. Animal models. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 481: 62 (1982)
82. U. Täuber and K. L. Rost. Esterase activity of the skin including species variations. In: B. Shroot and H. Schaefer (Eds.) *Pharmacology of the skin*, Vol. 1. Karger, Basel, 1987, pp. 170-183
83. R. L. Bronaugh, R. F. Stewart, and M. Simon. Methods for in vitro percutaneous absorption studies VII. Use of excised human skin. *J. Pharm. Sci.* 75: 1094-1097 (1986)
84. S. M. Harrison, B. W. Barry, and P. H. Dugard. Effects of freezing on human skin permeability. *J. Pharm. Pharmacol.* 36: 261-262 (1983)
85. T. J. Franz. The finite dose technique as a valid in vitro model for the study of percutaneous absorption in man. *Curr. Probl. Dermatol.* 7: 56-68 (1978)
86. E. W. Smith and J. M. Haigh. In vitro systems for the assessment of drug release from topical formulations and transmembrane permeation. In: R. L. Bronaugh and H. I. (Eds.). *Maibach. Percutaneous absorption*. Marcel Dekker, New York, 1985, pp. 465-510
87. R. L. Bronaugh. Determination of percutaneous absorption by in vitro techniques. In: R. L. Bronaugh and H. I. (Eds.). *Maibach. Percutaneous absorption*. Marcel Dekker, New York, 1985, pp. 239-248
88. J. Hadgraft and M. Wolff. Physicochemical and pharmacokinetic parameters affecting percutaneous absorption. In: R. Gurny and A. Teubner. *Dermal and transdermal drug delivery*. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart, 1993 pp. 161-172
89. S. P. James, W. B. Mendelson, D. A. Sack, N. E. Rosenthal, and T. A. Wehr. The effect of melatonin on normal sleep. *Neuropsychopharmacol.* 1: 41-44 (1987)
90. D. Dawson and N. Encel. Melatonin and sleep in humans. *J. Pineal Res.* 15: 1-12 (1993)

## **Kapitel 2**

# **Pharmacokinetics of the transdermal reservoir membrane system delivering $\beta$ -estradiol: In vitro/in vivo-correlation**

Published in Pharmaceutical Research,  
Volume 15, No. 6, pp. 875-884 (1998)

## **Abstract**

**Purpose:** The aim of our study was to investigate the high fluctuations of Estradiol (E<sub>2</sub>) plasma levels transdermally delivered in postmenopausal women by a commercially available membrane controlled reservoir system (MCRS).

**Methods:** The transdermal E<sub>2</sub> flux either out of a complete MCRS or across its membrane out of defined ethanol water mixtures was determined, as well as E<sub>2</sub> plasma profiles in 6 postmenopausal women produced by a MCRS.

**Results:** The transdermal in vitro E<sub>2</sub> flux rate out of a complete MCRS, claimed to deliver 25 µg/day, increased steadily, reaching a maximum value of  $2.06 \pm 0.58$  µg/h at 30 to 40 hours and decreased to a rate of about 0.5 µg/h from 60 to 90 hours. No statistically significant differences between plasma profiles calculated from the in vitro investigation and derived from a clinical study could be identified. The E<sub>2</sub> flux in defined ethanol/water mixtures across MCRS-membrane, adhesive and skin layer increased with increasing ethanol concentrations up to a maximum of  $227 \pm 34$  ng/cm<sup>2</sup>/h at an ethanol concentration of 62.5 % (V/V) and decreased with further increase in the volume fraction of ethanol.

**Conclusion:** In vitro as well as in vivo investigations showed high fluctuation of E<sub>2</sub> plasma profiles in postmenopausal women produced by the MCRS. These fluctuations are caused by a non constant input rate of E<sub>2</sub> which may be due to changing ethanol concentrations in the reservoir of the MCRS.

## **Introduction**

Estrogen replacement therapy (ERT) is widely accepted to relieve postmenopausal symptoms such as hot flushes, atrophic vaginal changes and sleep disturbances (1,2,3). This therapy reduces the risk of cardiovascular diseases (2) as well as stroke (4).

Several routes of application as well as delivery systems for the administration of estradiol are available. The oral route is by far the most widely accepted one, whereas transdermal delivery forms have been introduced more recently (1,2). The oral application requires high doses due to the metabolism in the intestinal tract (5) and liver, which leads to an unphysiologic ratio of  $E_2$  to the metabolite estrone (1). High concentrations of estrogens in the portal circulation enhance the synthesis of hepatic proteins, resulting for example in increased plasma levels of renin substrates and several hormone binding globulins (5) thus enhancing the risk to develop thrombosis.

The transdermal application avoiding the liver first pass effect reduces the required dose and provides  $E_2$  plasma levels comparable to the mid follicular phase (2) and does not induce synthesis of unwanted hepatic proteins.

It is widely believed among researchers, that  $E_2$  plasma levels with small fluctuations should be preferred, because there is a linear relationship between  $E_2$  plasma levels and reported reduction of symptoms like hot flushes (6). Also reduced estrogen plasma levels are associated with psychological symptoms (7). On the other hand, treatment related side effects such as breast tenderness and weight gain are frequently related to higher  $E_2$  doses (8). Additionally it was also recommended to raise plasma levels at the minimum effective dose to reduce the risk of breast and endometrial cancer (9).

A balance has to be achieved between the optimal therapeutic effect and acceptable side effects. With this background in mind the pharmacokinetic profile may have important consequences in terms of efficacy, acceptability and compliance (8,10).

Currently two different types of transdermal patches for E<sub>2</sub> drug delivery are available: Patches release E<sub>2</sub> either from rather recently developed matrix type delivery system or from a so called membrane controlled reservoir system (MCRS), which is commercially available for more than ten years. In several clinical studies, where matrix patches were kinetically compared to the reservoir patches, the fluctuation in E<sub>2</sub> plasma level in postmenopausal women produced by MCRS over the whole 96 h application period is significantly higher than those seen in matrix patches (11,12,13,14). The MCRS claimed to deliver 50 µg E<sub>2</sub>/day produces E<sub>2</sub> plasma concentrations which increase to a maximum value of 80 to 100 pg/ml plasma at 30 to 40 hours post application followed by a decrease to values below 30 pg/ml at the end of the wearing period (11,13).

There have been speculations about the cause of the high fluctuation over the whole application period when MCRS patches are used.

MCRS patches consist of a reservoir which is separated from the skin by a rate controlling membrane composed of ethylene-vinyl-acetate copolymer (EVA) and a layer of adhesive. The reservoir contains a gelled solution of E<sub>2</sub> in 95 % (v/v) ethanol. The patch is attached to the skin by an adhesive consisting of a mixture of polyisobutene and light mineral oil (1,15). One possible explanation for the abrupt drop in E<sub>2</sub> delivery after 50 to 60 hours may be due to the loss of the cosolvent ethanol from the vehicle, because it is known that ethanol as well as estradiol delivered from the MCRS is absorbed by the skin (15). Taking this into account, the effect of ethanol supplementation to the patch on day three of use in postmenopausal women was investigated: A prolonged extension in E<sub>2</sub> plasma levels associated with an increase in the area under the curve by 22 percent was observed (16). However, the rise to the maximum E<sub>2</sub> plasma concentration 30 to 40 hours after the application could not be explained by these findings.

Systematic investigations relating release properties of MCRS to plasma profiles are still lacking. These investigations would help to illustrate the cause of E<sub>2</sub>



plasma level fluctuations either related to the drug delivery system or influenced by the physiology of women.

To conduct a systematic kinetic analysis under in vitro conditions using MCRS, the patch has to be attached completely onto human skin without compromising its integrity. This requires large pieces of excised human skin in the in vitro Franz cell type set up.

The aim of our investigation is therefore twofold: Firstly to determine the transdermal in vitro flux out of a MCRS across human skin, secondly, to investigate the influence of reservoir ethanol concentrations on the E<sub>2</sub> flux through the rate controlling membrane with adjacent adhesive layer and human skin.

To substantiate our in vitro investigation, an in vivo clinical study was conducted in postmenopausal women where a MCRS patch was applied for 84 hours to compare our in vitro results to in vivo findings.

## **Materials and Methods**

### **In vitro investigations**

#### **Materials**

Estradiol (Sigma Chemical Co., St. Louis, USA) and ethanol (Lenz Chemie, Westerburg, Germany) were used as received. The Estraderm<sup>®</sup>TTS 25 transdermal delivery system (Batch No. 314600) containing 2.0 mg of E<sub>2</sub> had a nominal release rate of 25 µg per day and was commercially obtained. Gradient grade acetonitrile (LiChrosolv<sup>®</sup>, Merck KGaA, Darmstadt, Germany) was used in the preparation of the HPLC mobile phase and for solid phase extraction methods. Phosphate buffered saline (PBS) pH 7.4 was prepared from distilled water. All other reagents were of analytical grade.

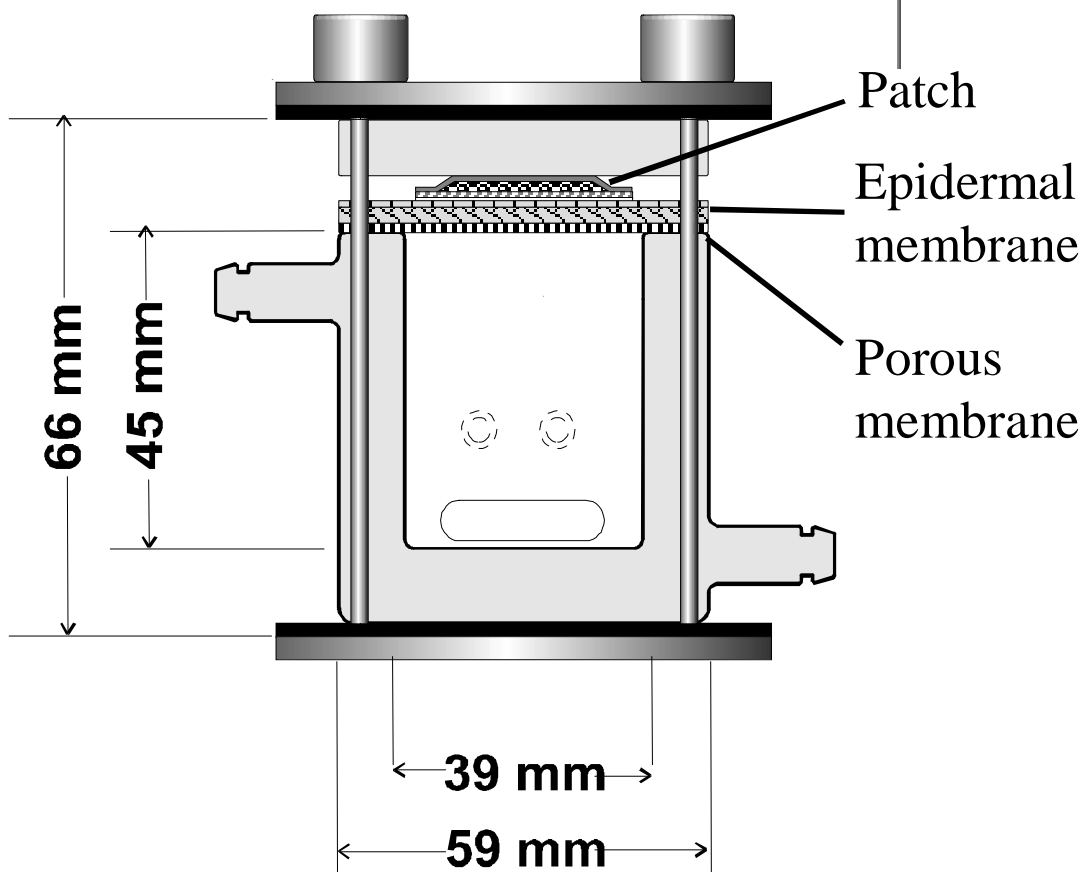
### Preparation of epidermal membranes

Human skin from breast reduction surgery was obtained from a local hospital. Skin preparation to split thickness was carried out as reported elsewhere (13). To test for skins integrity permeation experiments were conducted using E<sub>2</sub> as a marker with commercially available Franz diffusion cell type (Crown Glass Company, Inc., Somerville, N. J.).

### In vitro determination of flux rates from the patch

To investigate the transdermal E<sub>2</sub> flux out of a MCRS across excised human skin, a new diffusion cell was designed. The exact dimensions can be taken from Fig. 1. The inner glass cylinder, which served as the acceptor phase, had a diameter of 39 mm resulting in a volume of 56 ml. Sampling could be performed by two openings in the acceptor chamber (open circles, Fig. 1). During an experimental run openings were sealed by two stop-cocks. Sampling was performed by turning the complete diffusion cell, so that the openings were above the acceptor phase. A second cylinder served as a heating jacket. The experiments were performed at 37° C for 96 hr. The patch (3.8 cm in diameter) was attached to an adequate piece of human epidermis. A porous membrane (Polycarbonate, 47 mm, pore size 0.4 μm, Schleicher & Schuell, Dassel, Germany) was mounted between the skin and the diffusion cell to ensure permanent contact between skin and patch. The permeability of the membrane was estimated by a method previously described (17) and found to be in the range of  $8.5 \pm 10^{-5}$  cm/sec, which is much higher than the permeability of human skin. Furthermore it was shown that adsorption of E<sub>2</sub> by the membrane was negligible (data not shown). The receptor compartment was filled with 56 ml of PBS and stirred at a constant speed of 250 rpm. The receptor fluid was periodically changed to maintain sink conditions. Epidermal pieces were optically examined at the end of each experiment for holes or signs of degradation. At predetermined time intervals samples of 25 ml were withdrawn and replaced with the same volume of PBS.

The whole sample was extracted using solid phase extraction columns (LiChrolut<sup>®</sup> RP 18, 100 mg, Merck KGaA, Darmstadt, Germany) under vacuum. Absorbed E<sub>2</sub> was eluted by 4 ml of acetonitrile. After evaporation of the solvent the residue was dissolved in 1 ml of acetonitrile and analyzed by HPLC. The recovery for the solid phase extraction method was found to be  $92 \pm 6$  %. Amounts of E<sub>2</sub> released were calculated in each time interval after upwardly adjusting for dilution.



**Fig.1:** Schematic view of the newly developed diffusion cell.

Calculation of E<sub>2</sub> plasma profiles

To compare the results from the in vitro investigation using the whole patch delivering 25 µg/day with data from the clinical study, the determined input rates were transformed to theoretical plasma concentrations using Eq. 1 (1):

$$C_{p(ss)} = \frac{\text{Flux} (\mu\text{g} \times \text{d}^{-1} \times \text{cm}^{-2} \text{ patch}) \times \text{patch surface area} (\text{cm}^2) \times [1 - p_{21}]}{Cl_p (\text{l} \times \text{d}^{-1})} \quad (\text{Eq. 1})$$

Where  $C_{p(ss)}$  is the steady state plasma concentration,  $Cl_p$  is the total plasma clearance and  $p_{21}$  represents the ratio of the rate of conversion of E<sub>2</sub> to estrone to the input rate of E<sub>2</sub>. When steady state is attained, then  $p_{21}$  is constant and is referred to as the metabolic transfer coefficient (1). The total E<sub>2</sub> plasma clearance ranges from 615 to 790 l/d/m<sup>2</sup> (18,19), while the average body surface area of females is 1.6 m<sup>2</sup> (1). Therefore, an average plasma clearance of 1120 l/d was assumed. The metabolic transfer coefficient  $p_{21}$  has been reported to be 0.2 (20). Daily input rates for the investigated system delivering 25 µg/day were doubled to obtain the rates for a system with a nominal release rate of 50 µg/day, since it was shown that there is a linear relationship between patch surface area and obtained plasma concentrations (2). Finally the average E<sub>2</sub> baseline concentration of postmenopausal women of 10 pg/ml (2,21) was added.

Influence of ethanol on transdermal E<sub>2</sub> flux rates

MCRS membrane with adhesive layer was separated from the patch with the help of a pair of scissors. This part of the patch was attached to a piece of human skin. To investigate the E<sub>2</sub> flux through membrane, adhesive and skin layer in dependence on donor ethanol concentrations, this composite was mounted between two well stirred, 37° C water jacketed diffusion cell halves. The donor compartment, facing the membrane, consisted of 4 ml of saturated solutions of E<sub>2</sub> in defined ethanol/PBS co-solvent systems, while the receptor contained 4 ml of PBS. The receptor medium was periodically changed to maintain sink

conditions. Samples of 1 ml were withdrawn from the receiver and replaced with receptor solution. The samples were assayed for E<sub>2</sub> by HPLC. Triplicate experiments were conducted for each study.

### HPLC assay

A high performance liquid chromatographic system (Merck-Hitachi L 6200 A, Merck KGaA, Darmstadt, Germany) equipped with an F-1050 fluorescence spectrophotometer and an AS 2000 A autosampler was used in this investigation. A LiChrospher<sup>®</sup>100 RP 18 (5 µm, 250×4.6 mm i.d., Merck KGaA) was used as analytical column maintained at 30° C. The mobile phase consisted of acetonitrile/water (60:40) at a flow rate of 1.0 ml/min. The detector was set to an excitation wavelength of 225 nm with no emission filter used.

### Clinical study

#### Patients

Six healthy postmenopausal women participated in the study. Their mean age was 56 ± 5 years, with a median time since menopause of 9 ± 5 years. Postmenopausal status was confirmed in each case by a 17 β-estradiol (E<sub>2</sub>) concentration below 20 pg/ml and a FSH level higher than 40 IU/l. This investigation followed the tenets of the Declaration of Helsinki (1964) and was approved by the Ethical Committee of the University Hospital in Frankfurt. Written informed consent was obtained from all women prior to their entry into the study.

#### Study protocol

The study was performed using an open design in accordance with the Good Clinical Practice guidelines. A one week run-in period was followed by a 10.5 days treatment period and a final follow-up period of one week. During the

treatment period the transdermal system was worn for three consecutive 3.5 day-periods. A MCRS containing 4 mg E<sub>2</sub> and releasing 50 µg/day (Estraderm<sup>®</sup>TTS 50, Batch No. 108400) was used in this study.

Design, study protocol and blood sampling was conducted as was reported elsewhere (13). Blood samples were assayed for E<sub>2</sub> by a capillary gas chromatography mass spectrometry method with negative ionisation mode (GC-MS), which is described elsewhere (13). The limit of quantification was 5 pg/ml for E<sub>2</sub>.

#### Pharmacokinetic parameters

The main pharmacokinetic parameters like  $c_{\max}$  and  $t_{\max}$  were calculated according to standard methods (22). The area under the E<sub>2</sub> plasma concentration curve ( $AUC_{3\rightarrow78}$ ) was calculated using the linear trapezoidal rule for the time interval from 3 to 78 hours. The average concentration during the measurement interval,  $c_{\text{av}}$ , was calculated by dividing  $AUC_{3\rightarrow78}$  by 75 h.

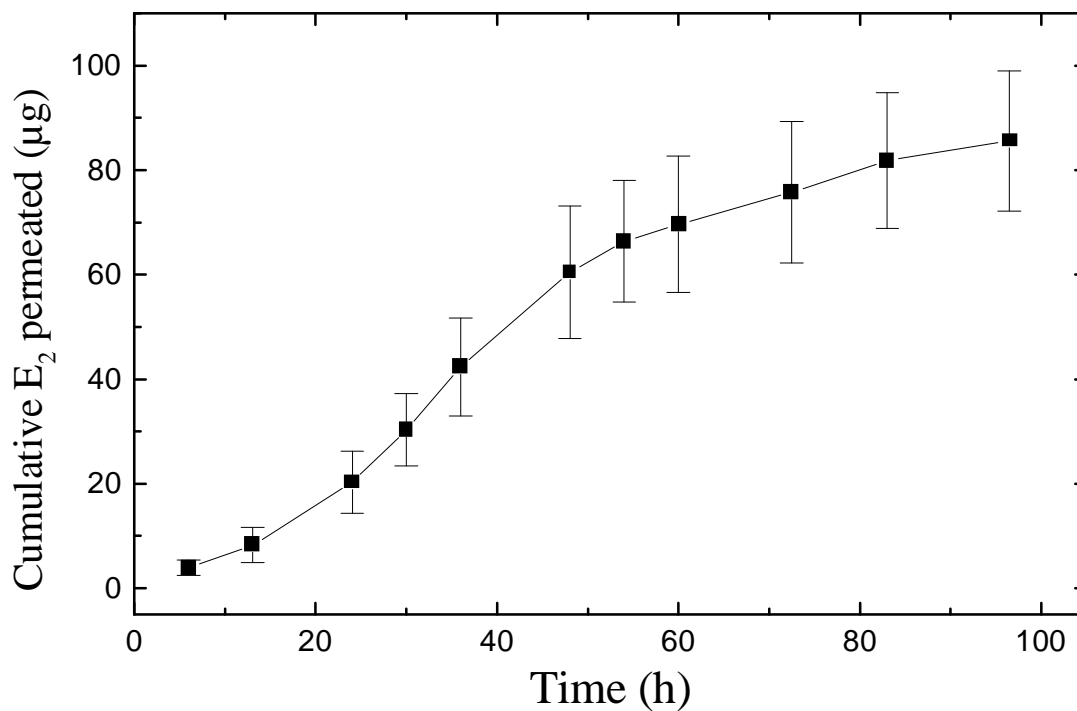
#### Statistical Comparison of E<sub>2</sub> Plasma Profiles in vivo and in vitro

$AUC_{3\rightarrow78}$ ,  $c_{\max}$ ,  $c_{\text{av}}$  and  $t_{\max}$  were compared using Students t-test at 0.05 significance level (Statgraphics Plus, Statistical Graphics Corp.). For AUC values linear regression and correlation coefficient were calculated between non-normalised parameters.

## Results

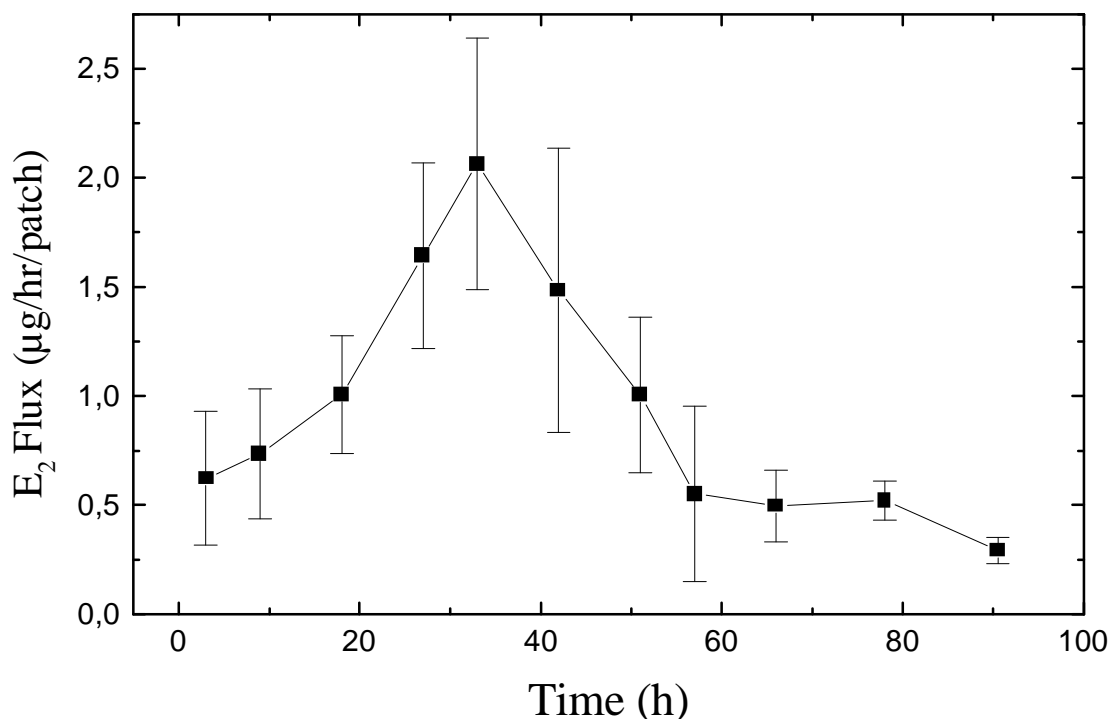
To test excised human skins integrity, flux rates from saturated solutions of  $E_2$  in water were determined. The permeability was found to be  $6.7 \times 10^{-3} \pm 3.8 \times 10^{-3}$  cm/h (n=6), which is comparable to permeabilities reported by numerous investigators (23).

The cumulative amount of  $E_2$  from a complete MCRS, claimed to deliver 25  $\mu\text{g}$   $E_2$ /day, across excised human skin in a newly designed Franz diffusion cell is depicted in Fig. 2.



**Fig.2:** Cumulative amount of  $E_2$  released from the patch (nominal release rate: 25  $\mu\text{g}/\text{day}$ ) through the skin. Each data point represents the mean and standard deviation of six determinations.

A sigmoidal curve can be identified, indicating that the release of E<sub>2</sub> into the receptor was lower at the beginning and the end of an experimental run and was largest 30 to 40 hours after the start. The receptor volume of 56 ml of the newly designed Franz diffusion cell was large enough to maintain sink conditions overcoming the problem of saturation of the acceptor phase (the solubility of E<sub>2</sub> in PBS is rather low: about 2.4 µg/ml). Transdermal E<sub>2</sub> flux rates in each respective time interval are shown in Fig. 3. These data were calculated from cumulative amounts penetrated under in vitro conditions (depicted in Fig. 2). The transdermal flux rate from the system increased steadily, reaching a maximum value of  $2.06 \pm 0.58$  µg/h at 30 to 40 hours and decreased to a rate of about 0.5 µg/h from 60 to 90 hours, indicating high fluctuation. This non constant input rate of E<sub>2</sub> from the patch across human skin is in contrast to the constant delivery rate claimed by the manufacturer.

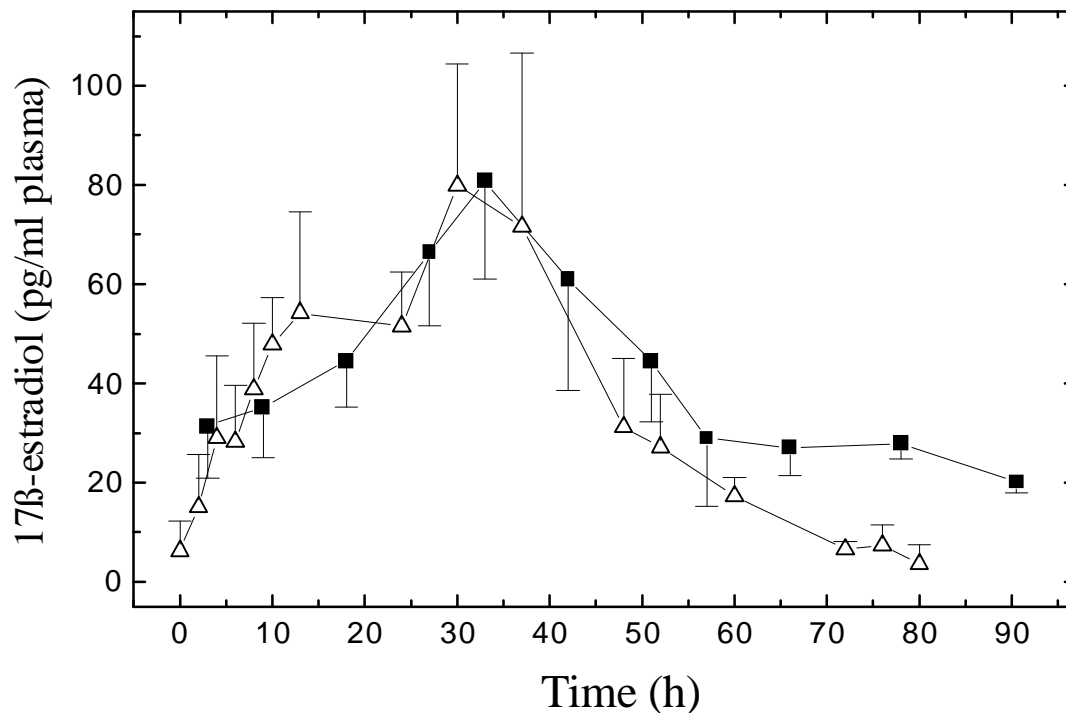


**Fig.3:** In vitro flux of E<sub>2</sub> from the MCRS across human skin. Each data point represents the mean and standard deviation of six determinations.



A clinical study was conducted with postmenopausal women receiving a MCRS with a nominal delivery rate of 50 µg/day. All patches were well tolerated and no side effects, systemically or locally, were reported.

After an increase the E<sub>2</sub> plasma profile curve reaches a relatively sharp maximum in the range of 80 pg/ml at about 30 hours post application followed by a decrease to plasma levels below 30 pg/ml after 60 hours. The E<sub>2</sub> plasma profiles experimentally obtained were compared with data from another clinical study (11). No statistically significant difference between the results of these investigations could be determined. The E<sub>2</sub> plasma profiles calculated from in vitro data (taken from Fig. 3) are depicted in Fig. 4 and are compared to the E<sub>2</sub> plasma concentration profile obtained in vivo.



**Fig.4:** Plasma E<sub>2</sub> concentrations measured before and during the third application of a MCRS in vivo (-Δ-) and calculated from in vitro determined input rates (-■-). Each data point represents the mean and standard deviation of six determinations.

Similar profiles for both curves are observed, although the decrease for the data obtained in vivo is stronger than for the calculated curve after 40 hours. This may be partially due to the quantification limit of the GC/MS method, because values below or near this limit were taken as zero. The main pharmacokinetic parameters calculated for both profiles are shown in Table 1.

**Table 1:** Pharmacokinetic parameters of plasma E<sub>2</sub> after application of a MCRS in vivo and determined for the calculated plasma profile.

Parameter	Clinical study (n=6) (mean ± Sd)	Calculated Profile (n=6) (mean ± Sd)	Statistical comparison (Student's t-test)
AUC <sub>3-78</sub> (pg/ml*h)	3033.42 ± 635.45	3411.81 ± 424.76	NS <sup>a</sup>
c <sub>max</sub> (pg/ml)	88.94 ± 27.03	88.71 ± 13.78	NS <sup>a</sup>
c <sub>av</sub> (pg/ml)	40.45 ± 8.47	45.49 ± 5.66	NS <sup>a</sup>
t <sub>max</sub> (h)	30.7 ± 9.03	32.5 ± 5.5	NS <sup>a</sup>

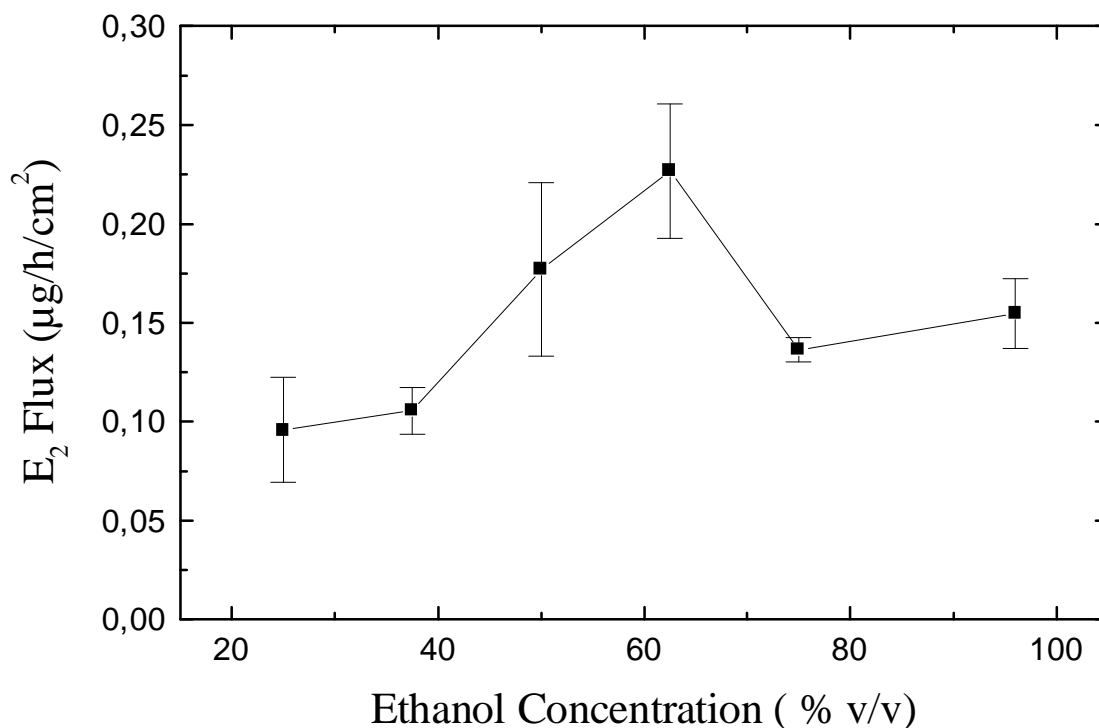
<sup>a</sup> not significant at 0.05 significance level

Abbreviations: AUC<sub>3-78</sub>: area under the plasma concentration-time curve; c<sub>max</sub>: mean maximum plasma concentration; c<sub>av</sub>: average plasma concentration from 3 to 78 hours; t<sub>max</sub>: time to c<sub>max</sub>

An in vitro/in vivo-correlation based on AUC<sub>3-t</sub> versus time comparison was conducted for the time interval from 3 to 78 hours post application. Each integral for each time interval of the calculated curve was compared to respective intervals of the in vivo curve. The comparison revealed a slope and a regression coefficient of 0.89 and 0.993, respectively, representing a good agreement between E<sub>2</sub> plasma profiles detected in vivo and predicted from in vitro data.

Since it is known that ethanol is released concomitantly with E<sub>2</sub> from the patch (15), we assumed that there should be a relationship between the ethanol concentration in the reservoir and the E<sub>2</sub> flux out of the system across human

skin. To investigate this effect, the  $E_2$  flux through a sandwich consisting of MCRS-membrane, adhesive and skin layer in dependence on ethanol concentrations in the donor was measured. The interdiffusion of ethanol and water across these barriers exists, but can be neglected at the present state of our investigations, because firstly the ethanol/PBS volume fraction in the donor phase can be judged as nearly constant within experimental time in the side-by-side in vitro diffusion cell, and secondly the diffused amount of ethanol into the acceptor phase is so low, that pure PBS solution can still be assumed.



**Fig.5:**  $E_2$  flux through membrane, adhesive and skin layer as a function of ethanol concentrations in the donor compartment. Each data point represents the mean and standard deviation of three determinations.

These permeation studies were conducted using saturated drug solutions to ensure that the permeant is at its maximum chemical potential. In the absence of any specific solvent/membrane interaction, the flux of E<sub>2</sub> from each co-solvent system ideally should be constant (24). However, the E<sub>2</sub> flux increased with increasing ethanol concentrations in the donor up to a maximum of  $0.227 \pm 0.034 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$  at an ethanol concentration of 62.5 % (v/v) (Fig. 5). The permeation then decreased with further increase in the volume fraction of ethanol in the donor solution. From these findings it can be concluded that the transdermal E<sub>2</sub> flux out of a MCRS is strictly dependent on the ethanol concentration in the donor and therefore the penetration rate of ethanol from the MCRS.

## **Discussion**

Experiments in vivo as well as in vitro were conducted to investigate the kinetic performance characteristics of a commercially available membrane controlled reservoir system (MCRS).

In vivo experiments were carried out in postmenopausal women applying a MCRS claimed to deliver 50  $\mu\text{g}$  E<sub>2</sub>/day. A maximum E<sub>2</sub> plasma concentration at about 30 to 40 h after patch application was identified, while the lower E<sub>2</sub> flux rate at the end of the wearing period leads to plasma levels below the therapeutical threshold of 30 to 40 pg/ml. This observation was confirmed by other clinical investigations in the past (11,13).

In a recently published clinical study two newly developed patches with matrix technology showed less fluctuating E<sub>2</sub> plasma profiles over the whole application period, however pronounced daily periodic changes in the E<sub>2</sub> plasma profiles (25). These daily variations could not be observed in the clinical study reported here using a MCRS.

We assumed that the fluctuations produced by the MRCS are so high, that the daily variations are difficult to detect.

Recently an in vitro/in vivo-correlation for a matrix system delivering  $E_2$  over a long period of time with a constant input rate based on experimentally determined  $E_2$  fluxes across excised human skin showed no statistical significant differences between calculated and clinically determined  $E_2$  plasma levels (13). Here, for the first time, an in vitro/in vivo-correlation for a MCRS with a non constant input rate was conducted. The transdermal in vitro flux of  $E_2$  out of a MCRS across excised human skin increased to a maximum value at about 35 hours after patch application and declined then until the end of the experiment. Calculated plasma profiles and  $E_2$  plasma concentrations obtained in vivo were compared: No statistically significant difference between the two plasma profiles could be identified, showing that there is a possibility to directly predict plasma concentrations from in vitro investigations.

The method used here reflects recommendations for in vitro skin permeation tests of dermal and transdermal drug release products of the AAPS and FDA (26,27) concerning source and preparation of skin, the cell design and the experimental conditions. Two modifications though had to be made: Firstly, the surface area had to be increased to about  $11\text{cm}^2$  and secondly a supporting membrane had to be introduced between the skin membrane and the acceptor phase. The later assured contact between skin and patch during the experimental time. This additional membrane did not add a statistically significant diffusion barrier as well no adsorption of  $E_2$  at the supporting membrane took place.

The decline in plasma levels at the end of one wearing period was interpreted by others to be due to the loss of the solvent and the enhancer ethanol from the patch (16). This does not explain, however, the increase to a maximum flux out of the system 30 to 40 hours after the application of the patch. Since both water and ethanol permeate the membrane/adhesive layer, changes must occur constantly in the alcohol to water ratio during the application of the patch.

Fig. 5 shows the effect of changing the ethanol concentration in the donor on the transdermal flux of E<sub>2</sub>: The release through membrane, adhesive and skin layer is maximum at ethanol levels of about 50 to 60 % (v/v) and is lowered if this ratio is altered in favor of water. This strongly suggests that changing ethanol concentrations in the reservoir of the patch might be responsible for the non constant transdermal E<sub>2</sub> input rate.

The release profile of a MCRS conducted at the FDA by the paddle over disc method where no skin was employed (28) produced a similar sigmoidal cumulative amount versus time profile as in the experiments summarized in Fig. 2., but differs in two important points: Firstly the total amount released per cm<sup>2</sup> was more than 2.5 times higher in dissolution tests, and secondly, the ratio between results utilizing skin membrane and no skin membrane is constant from hour 48 to 96, however, changes from hour 3 to 48. This strongly indicates that the skin not only altered the absolute amount of E<sub>2</sub> released, but also had an influence on the release kinetics.

Variability associated with the source of skin and its preparation, and its cost, preclude the use of in vitro skin penetration testing for routine quality control (29), but it can be derived that the skin is a contributing factor in regulating the release of E<sub>2</sub> out of a MCRS and cannot be ignored if in vivo events are wished to be predicted.

Therefore, the method outlined here can be seen as a tool for the prediction of influences on the pharmacokinetic profile of a MCRS resulting from variations in the technology of the patch.

In vitro and in vivo investigations suggest, that the constant delivery rate for the MCRS postulated by the manufacturer could not be confirmed.

It could thus be shown by these in vitro investigations that the MCRS produces fluctuating transdermal E<sub>2</sub> fluxes and biological factors in postmenopausal women are not responsible for this effect.

Further investigations are under way to specifically elucidate the contribution of the MCRS design to the fluctuations of E<sub>2</sub> transdermal flux rates.

## **Conclusions**

In vitro as well as in vivo investigations were conducted with a commercially available membrane controlled reservoir system (MCRS) to illustrate the high fluctuation of  $\beta$ -estradiol ( $E_2$ ) plasma profiles in postmenopausal women. The transdermal  $E_2$  flux rate out of a MCRS was investigated for the first time across excised human skin in vitro, increasing steadily, reaching a maximum value of  $2.06 \pm 0.58 \mu\text{g/h}$  at 30 to 40 hours and decreasing to a rate of about  $0.5 \mu\text{g/h}$  from 60 to 90 hours. This fluctuating profile indicates that there is a non constant input rate of  $E_2$  from the patch through the skin, which is in contrast to the constant delivery rate claimed by the manufacturer. Calculated plasma profiles from in vitro data showed a good correlation to data from a conducted clinical study, indicating that the in vitro method is suitable for the prediction of plasma levels from in vitro investigations. Changing ethanol concentrations in the reservoir have a strong influence on the flux of drug through membrane, adhesive and skin layer. This effect may be responsible for the observed unstable  $E_2$  input rates out of a MCRS.

## **References**

1. W. R. Good, M. S. Powers, P. Campbell, and L. Schenkel. A new transdermal delivery system for 17  $\beta$ -Estradiol. *J. Contr. Rel.* 2: 89-94 (1985)
2. J. A. Balfour and R. C. Heel. Transdermal estradiol: A review of its pharmacodynamic properties and therapeutic efficacy in the treatment of menopausal complaints. *Drugs* 40: 561-582 (1990)
3. L. R. Laufer, J. L. de Fazio, and J. K. L. Lu. Estrogen replacement therapy by transdermal estradiol administration. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 146: 533-539 (1983)
4. A. Paganini-Hill and R. K. Ross. Postmenopausal oestrogen treatment and stroke, a prospective study. *Br. Med. J.* 297: 519-522 (1988)
5. K. J. van Erpecum, G. P. van Berge Hengouwen, L. Verschoor, B. Stoelwinder, and F. L. H. Willekens. Different hepatobiliary effects of oral and transdermal estradiol in postmenopausal women. *Gastroenterology* 100: 482-488 (1991)
6. L. E. Nachtigall and W. H. Utian. Comparative efficacy and tolerability of transdermal Estradiol and conjugated estrogens,- a double blind multi center study. In: C. Lauritzen (ed), *Transdermal estrogen substitution*, Hans Huber, Toronto 1987, pp. 37-49
7. J. S. Frazer. New delivery systems for hormone replacement therapy. Abstract of 8<sup>th</sup> International Congress on the Menopause, Sydney, Australia (1996)
8. P. J. Roberts. The menopause and hormone replacement therapy: Views of women in general practice receiving hormone replacement therapy. *Br. J. Gen. Pract.* 41: 421-424 (1991)
9. P. G. Toniolo, M. Levitz, and A. Zeleniuch –Jacquotte. A prospective study of endogeneous estrogens and breast cancer in postmenopausal women. *J. Nat. Cancer Inst.* 87: 190–197 (1995)
10. A. Campbell and S. Crawford. Compliance of postmenopausal women under ERT. Abstract of 8<sup>th</sup> International Congress on the Menopause, Sydney, Australia (1996)
11. Y. Le Roux, M. L. Borg, M. Sibille, J. Thebault, A. Renoux, M. J. Douin, F. Djebbar, and M. P. Dain. Bioavailability study of Menorest<sup>®</sup>, a new estrogen transdermal delivery system, compared with a transdermal reservoir system. *Clin. Drug Invest.* 10: 172-178 (1995)



12. I. Setnikar, L. C. Rovati, B. Vens-Cappell, and C. Hilgenstock. Bioavailability of estradiol from two transdermal patches. *Arzneim.-Forsch./Drug Res.* 46: 307-310 (1995)
13. U. D. Rohr, C. Nauert, and A. M. Ehrly. Kinetik eines neuen Pflaters zur transdermalen Applikation von 17  $\beta$ -Estradiol. *Zentralbl. Gynakol.* 117: 531-539 (1995)
14. S. F. Gordon. Clinical experience with a seven-day estradiol transdermal system for estrogen replacement therapy. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 173: 998-1004 (1995)
15. P. S. Campbell and S. K. Chandrasekaran. US Patent 4379454
16. R. D. Smith, D. E. Robinson, B. Delignieres, B. D. Albertson, T. P. Tomai, M. J. Zinaman, and J. A. Simon. Effects of vehicle supplementation on total estradiol absorption from a transdermal estradiol delivery system. *Fertil. Steril.* 56: 1029-1033 (1991)
17. G. Schmittmann, U. D. Rohr, and T. Kissel. In vitro model for intramuscular drug bioavailability I: Can membranes mimic muscle capillary wall permeability. *Pharm. Res.* 13: 530S (1996)
18. C. Longcope, D. S. Layne, and J. F. Tait. Metabolic clearance rates and interconversions of estrone and 17 $\beta$ -estradiol in normal males and females. *J. Clin. Invest.* 47: 93-106 (1968)
19. W. C. Hembree, C. W. Bardin, and M. B. Lipsett. A study of estrogen metabolic clearance rates and transfer factors. *J. Clin. Invest.* 48: 1809-1819 (1969)
20. C. Longcope. The metabolism of estrone sulfate in normal males. *J. Clin. Endocrinol.* 34: 113-122 (1972)
21. R. T. Scott, B. Ross, C. Anderson, and D. F. Archer. Pharmacokinetics of percutaneous estradiol: A crossover study using a gel and a transdermal system in comparison with oral micronized estradiol. *Obstet. Gynecol.* 77: 758-764 (1991)
22. M. Rowland and T. N. Tozer. *Clinical pharmacokinetics-concepts and applications.* Lea and Febiger (1980)
23. M. E. Johnson, D. Blankschtein, and R. Langer. Permeation of steroids through human skin. *J. Pharm. Sci.* 84: 1144-1146 (1995)
24. T. Higuchi. Physical chemical analysis of percutaneous absorption process from creams and ointments. *J. Soc. Cosmet. Chem.* 11: 85-97 (1960)
25. U. D. Rohr, A. M. Ehrly, and H. Kuhl. Plasma profiles of transdermal 17 $\beta$ -estradiol delivered by two different matrix patches. *Arzneim.-Forsch./Drug Res.* 47: 761-767 (1997)

26. V. P. Shah, C. R. Behl, G. L. Flynn, W. I. Higuchi, and H. Schaefer. Principles and criteria in the development and optimization of topical therapeutic products. *Int. J. Pharm.* 82: 21-28 (1992)
27. J. P. Skelly, V. P. Shah, H. I. Maibach, R. H. Guy, R. C. Wester, G. Flynn, and A. Yacobi. FDA and AAPS report of the workshop on principles and practices of in vitro percutaneous penetration studies: Relevance to bioavailability and bioequivalence. *Pharm. Res.* 4: 265-267 (1987)
28. N. W. Tymes, V. P. Shah, and J. P. Skelly. In vitro release profile of estradiol transdermal therapeutic systems. *J. Pharm. Sci.* 79: 601-602 (1990)
29. V. P. Shah, L. J. Lesko, and R. L. Williams. In vitro evaluation of transdermal drug delivery. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 41: 163-167 (1995)

## **Kapitel 3**

# **Rate control in transdermal $\beta$ -estradiol reservoir membrane systems: The role of membrane and adhesive layer**

Published in Pharmaceutical Research,  
Volume 15, No. 8, pp. 1238-1243 (1998)

## **Abstract**

**Purpose:** The aim of our study was to clarify the kinetic performance of a membrane controlled reservoir system (MCRS) for  $\beta$ -estradiol ( $E_2$ ) under in vitro conditions by determination of the role of membrane and adhesive layer on  $E_2$  flux control.

**Methods:**  $E_2$  and ethanol fluxes across EVA membrane or membrane coated with adhesive from saturated solutions in defined ethanol/PBS mixtures were measured in the symmetric and asymmetric configuration. Physicochemical parameters of the EVA membrane were determined.

**Results:** The  $E_2$  flux across the 9% EVA membrane steadily increased with increasing ethanol concentrations in both configurations, due to an enhanced uptake of  $E_2$  by the polymer and an increasing membrane diffusivity. Permeation across the EVA membrane coated with adhesive layer in the symmetric and asymmetric configuration increased up to maximum values of  $0.803 \pm 0.145 \mu\text{g}\times\text{cm}^{-2}\times\text{h}^{-1}$  and  $0.366 \pm 0.024 \mu\text{g}\times\text{cm}^{-2}\times\text{h}^{-1}$ , respectively, at 62.5 % (v/v) ethanol. The fluxes then decreased with further increase in the volume fraction of ethanol due to a dramatically reduced permeability of the adhesive layer. For the asymmetric case a linear dependence of  $E_2$  on ethanol fluxes was observed.

**Conclusion:** The  $E_2$  flux from MCRS is strictly dependent on reservoir ethanol concentrations, whereas the adhesive layer represents the rate controlling barrier at high ethanol levels (>70 % v/v).

## **Introduction**

The advantage of transdermal delivery of  $\beta$ -estradiol ( $E_2$ ) over other application routes, such as the oral delivery for estrogen replacement therapy has been shown by several investigators (1,2). The transdermal application avoiding the first pass effect reduces the required dose and, therefore, provides more physiologic  $E_2$  plasma levels and does not induce side-effects such as an overproduction of unwanted hepatic proteins (3).

Currently, two different types of transdermal patches are used for estrogen replacement therapy. Firstly: Patches based on a matrix technology, where the drug is uniformly dispersed in an adhesive polymeric matrix (4,5,6). Secondly: Membrane controlled reservoir systems (MCRS), where a reservoir contains a solution of  $E_2$  and a non-porous membrane supposedly controlling the input rate of  $E_2$  (3).

Although, designed for the same therapeutic concept, both types of transdermal systems (TDS) differed significantly in their pharmacokinetic profile. In several clinical studies MCRS showed significantly higher fluctuations in  $E_2$  plasma level and a peak at 30 to 40 hours in postmenopausal women compared to matrix TDS, which yielded relative constant infusion-like profiles (6,7).

Therefore, the release kinetic of  $E_2$ -TDS needs to be clarified to relate patch design to the pharmacokinetic behavior of these systems. We have recently shown that the transdermal flux out of MCRS across excised human skin increases up to a maximum value at 30 to 40 hours followed by a decrease in flux rate (8, chapter 2). This non constant input rate of  $E_2$  from the MCRS is possibly related to the patch design.

The commercially available  $E_2$ -MCRS consists of a reservoir containing a gelled solution of  $E_2$  in 95 % (v/v) ethanol. The rate controlling membrane, composed of ethylene-vinyl-acetate copolymer (EVA) with a vinyl acetate content of 9 %, is attached to the skin by an adhesive layer based on a mixture of polyisobutene and light mineral oil (3,9). Ethylene vinyl acetate copolymer membranes have

been used in several MCRS, because it is easy to modify their permeability by adjusting the vinyl acetate content (10). The changes in permeability are related to changes in the glass transition temperature and crystallinity of EVA. The membrane used here showed a crystallinity of ca. 50 % (10).

Since ethanol is concomitantly released with  $E_2$  from the patch (11), the ethanol concentration in the reservoir steadily decreases leading to non linear release kinetics. In vitro experiments revealed that the permeation of  $E_2$  through membrane, adhesive and excised human skin as a function of donor ethanol concentration increased up to a maximum value at ethanol levels of about 50 to 60 % (v/v), indicating a strong influence of reservoir ethanol concentrations on the transdermal  $E_2$  input rate (8, chapter 2).

While there are several reports discussing the influence of ethanol on permeation of  $E_2$  (12-15) and other drug substances like Levonorgestrel (16) or salicylate ions (17) across the skin, there is only scant information available on the influence of ethanol on membranes and adhesives used in MCRS.

Systematic investigations on the effect of ethanol reservoir contents on transdermal drug flux out of MCRS are important, because ethanol is the most commonly used co-solvent in these TDS. It has a relatively good solubilization capacity and flux enhancement activity for a wide range of compounds (18) and is currently used in at least three commercially available transdermal drug delivery systems: estradiol (3), nitroglycerin (19) and fentanyl (20).

The aim of this study was to elucidate the role of the involved barriers, namely EVA membrane, adhesive layer and skin in controlling the  $E_2$  flux from a MCRS into the body, to correlate design parameters to the kinetic performance of  $E_2$ -MCRS.

## **Materials and methods**

### Materials

Estradiol (Sigma Chemical Co., St. Louis, USA) and ethanol 96 % (v/v) (Lenz Chemie, Westerburg, Germany) were used as received. The Estraderm<sup>®</sup>TTS transdermal delivery system (Batches: 312800 and 313100) contained 2.0 mg of E<sub>2</sub> and was commercially obtained. Ethylene vinyl acetate membrane 9 % (w/w) vinyl acetate (No. 9702 Cotrans<sup>®</sup>) with a thickness of 50 µm was a gift from 3 M Medica, Borken, Germany.

### Solubility of E<sub>2</sub> in ethanol/PBS mixtures

Excess amounts of E<sub>2</sub> were added to 10 ml of defined ethanol/PBS co-solvent systems from 0 to 96% (v/v) in glass vials. The suspensions were stirred using magnetic bar stirrers for 72 hours in a water bath at 37° C. The saturated solutions were then filtered through Polycarbonate membrane filters (pore size: 0.2 µm, Schleicher & Schuell, Dassel, Germany). The concentration in the filtrate was determined by HPLC after appropriate dilution with ethanol.

### E<sub>2</sub> partition coefficient into membranes

Weighed EVA membrane discs with a surface area of 3.14 cm<sup>2</sup> and a thickness of 50 µm were placed in saturated solutions of E<sub>2</sub> in defined ethanol/PBS mixtures from 0 to 96% (v/v). After 72 hours of incubation at 37° C the discs were carefully rinsed with ethanol to remove excess of drug adsorbed to the surface and blotted dry. The membranes were then quantitatively extracted for 72 hours in ethanol of 96 % (v/v) at 37° C. Extracts and donor solutions were analyzed for E<sub>2</sub> by HPLC after appropriate dilution with ethanol. Partition coefficients were calculated from the E<sub>2</sub> concentration in the membrane and the donor solution by the following equation:  $K = \frac{[\text{membrane}]}{[\text{solution}]}$ .

### Ethanol uptake into membranes

Exactly weighed discs of EVA membrane were equilibrated with 2 ml of defined ethanol/PBS mixtures from 25 to 96 % (v/v) at 37° C. After 72 h the discs were removed from the solutions and blotted dry. The membranes were then quantitatively extracted in distilled water for 72 h at 37° C. The amount of ethanol desorbed from the membrane was determined using a HPLC method described below.

### EVA membrane permeation of E<sub>2</sub> and ethanol

The E<sub>2</sub> flux through the EVA membrane in dependence on donor ethanol concentrations was studied in a two-chamber diffusion cell set up at 37° C. The membrane was mounted between the two well stirred diffusion cell halves, each having a volume of 4 ml and 0.77 cm<sup>2</sup> in effective diffusion area. Two different configurations were used: For both configurations the donor compartment consisted of a saturated solution of E<sub>2</sub> in defined ethanol/PBS co-solvent systems from 0 to 96 % (v/v).

For the symmetric case, the receptor contained a mixture of ethanol and PBS of the same composition as used in the donor. Here only the permeated amount of E<sub>2</sub> was determined.

For the asymmetric case, the receptor consisted of PBS and permeated amounts of E<sub>2</sub> and ethanol were simultaneously determined. The effect of ethanol diffusion on alcohol concentrations in both compartments can be neglected, because firstly the ethanol/PBS volume fraction in the donor phase can be judged as nearly constant within experimental time in the side-by-side in vitro diffusion cell, and secondly the diffused amount of ethanol into the acceptor phase is so low, that pure PBS solution can still be assumed.

The receptor medium was periodically changed to maintain sink conditions. Samples of 1 ml were withdrawn from the receiver compartment and replaced with fresh receptor solution. Samples were assayed for E<sub>2</sub> and ethanol by HPLC.



Steady state flux rates were determined based on linear regression analysis of total amount permeated versus time curves.

### EVA membrane and adhesive permeation

The experimental conditions used for studying the permeation kinetics of E<sub>2</sub> and ethanol across EVA membrane coated with adhesive were the same as outlined above, except that the membrane with attached adhesive layer was used in place of the EVA membrane. The membrane with adhesive was isolated from the commercially available MCRS with the help of a pair of scissors. In this investigation the donor half-cell faced the membrane while the receiver faced the adhesive layer.

### HPLC analysis

E<sub>2</sub> was assayed by a reverse phase HPLC method previously described (8). Briefly, a LiChrospher<sup>®</sup> 100 RP 18 (5 μm, 250×4.6 mm i.d., Merck KGaA) was used as analytical column maintained at 30° C. The mobile phase consisted of acetonitrile/water (60:40) at a flow rate of 1.0 ml/min. E<sub>2</sub> was detected with a fluorescence spectrophotometer set to an excitation wavelength of 225 nm with no emission filter used. The detection sensitivity was 0.1 μg/ml.

Ethanol concentrations were measured using a high performance liquid chromatographic system (Merck-Hitachi L 6200 A, Merck KGaA, Darmstadt, Germany) equipped with an AS 2000 A autosampler. A LiChrospher<sup>®</sup> 100 RP 18 (5 μm, 125×4,6 mm i.d., Merck KGaA) was used as analytical column maintained at 30° C. The mobile phase used was distilled water at a flow rate of 1.0 ml/min. Ethanol was detected with a differential refractometer (Merck RI-71), where the quantification limit was 5 μg/ml. The retention time for ethanol was 2.5 min.

### Data analysis

The permeability coefficients of E<sub>2</sub> in membrane and membrane with adjacent adhesive were calculated using Eq. 1:

$$P = \frac{J_{ss}}{C_D} \quad (\text{Eq. 1})$$

where P is the permeability coefficient, J<sub>ss</sub> is the steady state flux of E<sub>2</sub> through the barrier layer and C<sub>D</sub> is the drug concentration in the donor.

The diffusion coefficient of E<sub>2</sub> in the EVA membrane for the symmetric case was calculated using Eq. 2:

$$D = \frac{P \times h}{K} \quad (\text{Eq. 2})$$

where h is the effective thickness of the EVA membrane (50 μm, confirmed by microscopy) and K is the membrane/donor solution partition coefficient.

Permeability of the adhesive layer in the symmetric case was calculated using Eq. 3:

$$\frac{1}{P_A} = \frac{1}{P_{MA}} - \frac{1}{P_M} \quad (\text{Eq. 3})$$

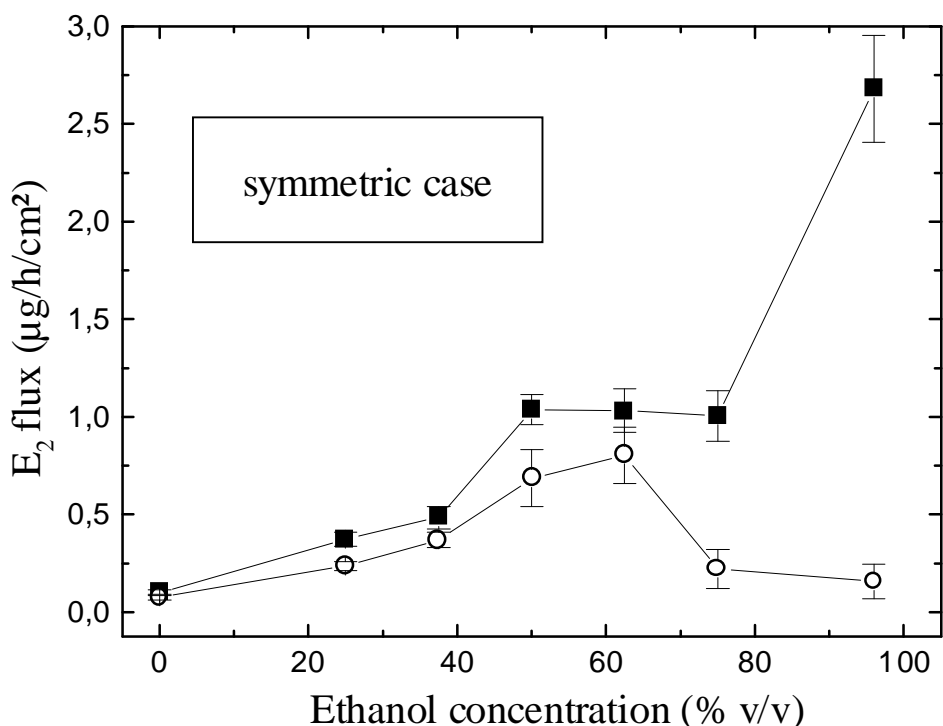
where P<sub>A</sub>, P<sub>MA</sub> and P<sub>M</sub> are the permeability coefficients of the adhesive, composite of membrane and adhesive and the single membrane, respectively.

## **Results and discussion**

### Symmetric case

The influence of the EVA membrane and the adhesive layer on E<sub>2</sub> flux from defined ethanol/PBS co-solvent systems was determined. These permeation studies were conducted using saturated solutions to ensure that the permeant is at its maximum chemical potential. To further simplify the analysis, aqueous ethanol solutions were present in the donor and the receptor compartment at equal concentrations (symmetric case) to avoid ethanol gradients across membrane and adhesive layer.

The steady state flux rates of E<sub>2</sub> across the uncoated EVA membrane are shown in Fig. 1.

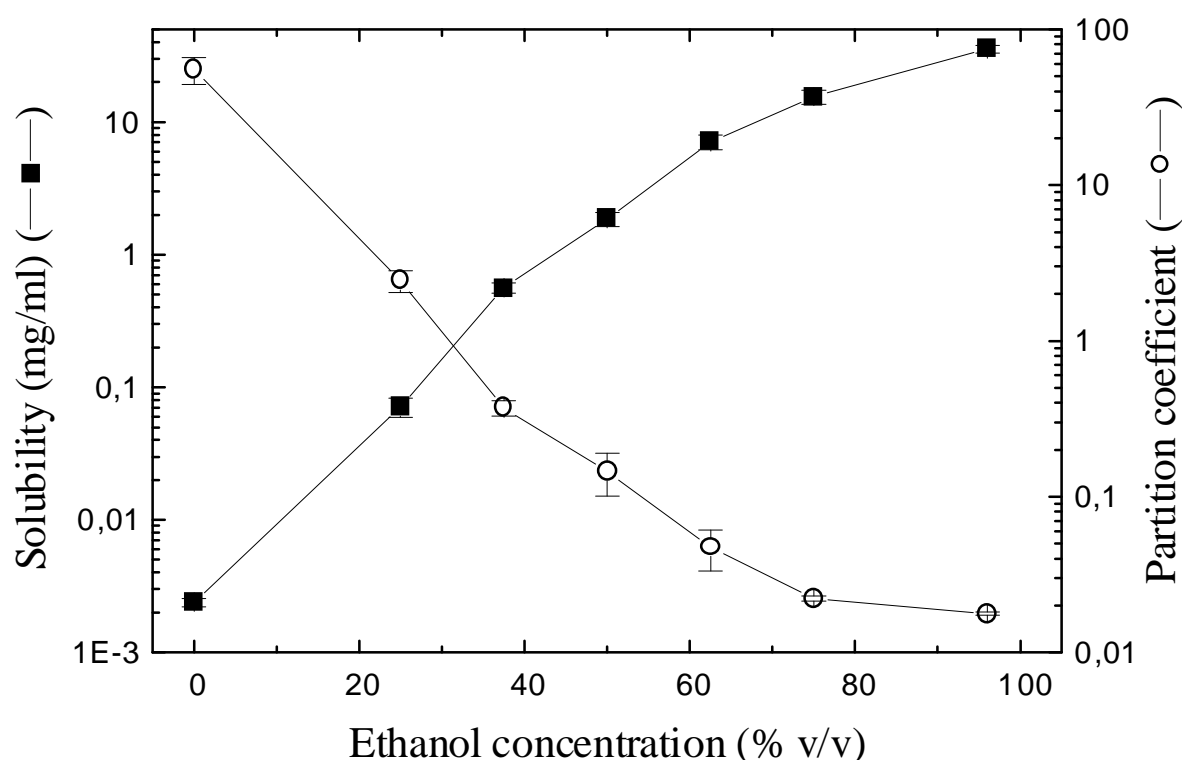


**Fig.1:** Influence of ethanol concentration on E<sub>2</sub> flux across EVA membrane (-■-) and EVA membrane coated with adhesive (-○-) in the symmetric configuration. Each data point represents the mean and standard deviation of at least three determinations.

The E<sub>2</sub> flux increased from  $0.099 \pm 0.014 \mu\text{g} \times \text{cm}^{-2} \times \text{h}^{-1}$  from PBS up to  $2.680 \pm 0.273 \mu\text{g} \times \text{cm}^{-2} \times \text{h}^{-1}$  in 96 % (v/v) ethanol. If there were no interactions between the solvent and the membrane, the flux of E<sub>2</sub> from each saturated solvent system should be constant (21).

However, a 27 fold increase in drug flux was seen, implying considerable interactions between solvent and membrane, which were characterized by the determination of physicochemical parameters relevant for E<sub>2</sub> diffusion through EVA membranes.

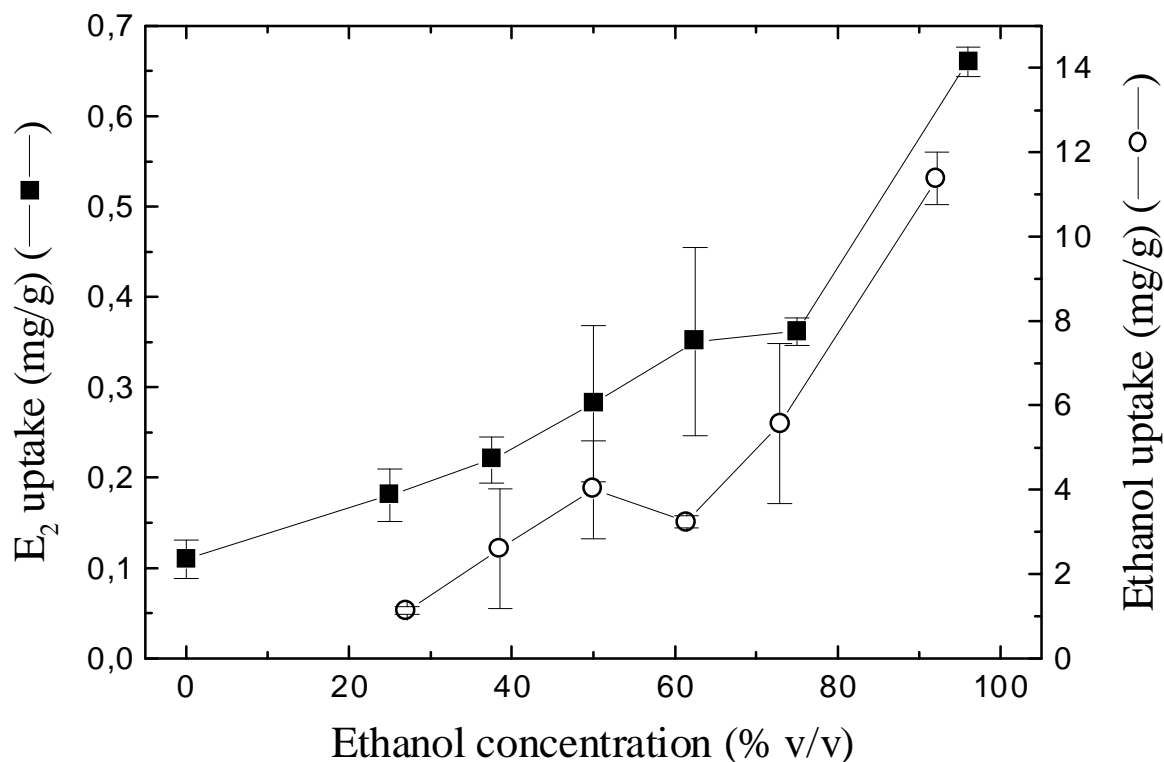
The solubility of E<sub>2</sub> in defined ethanol/PBS mixtures and the membrane/donor solution partition coefficient as a function of ethanol concentration are summarized in Fig. 2.



**Fig.2:** Influence of ethanol concentration on  $E_2$  solubility (-■- ;  $n \geq 6$ ) and the membrane/donor solution partition coefficient (-○- ;  $n \geq 3$ ).

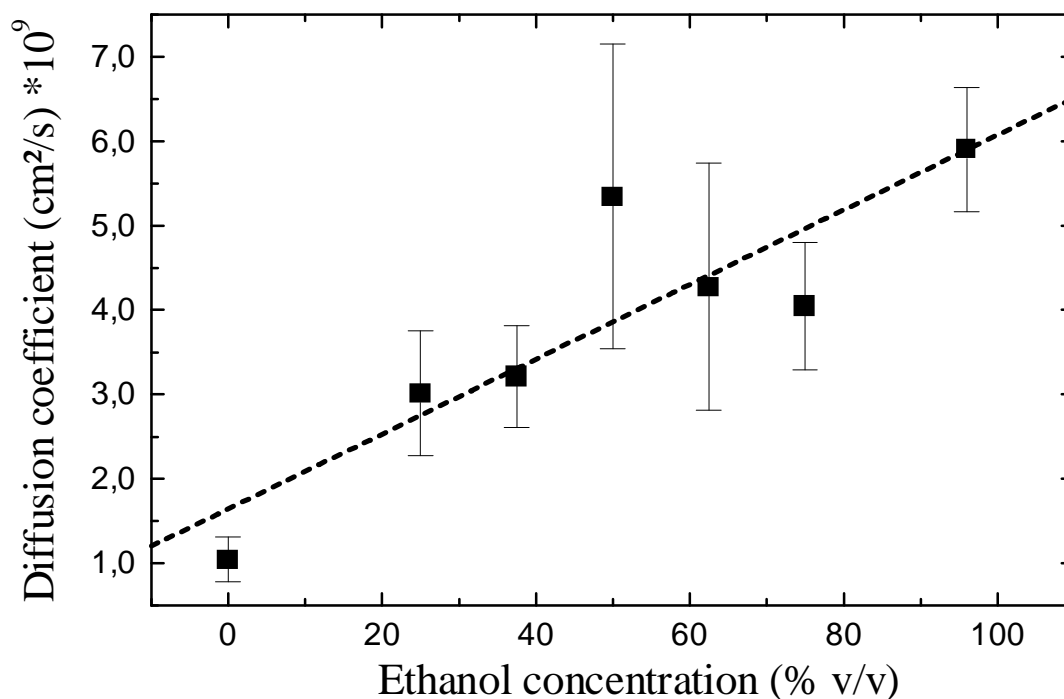
The solubility of  $E_2$ , which is in accordance with other studies (13), strongly increased with increasing ethanol concentrations. This behavior leads to a decreasing partition coefficient, which represents the proportion of  $E_2$  uptake by the membrane and solubility of drug in the donor. In contrast to the assumption of an inert membrane, the uptake of  $E_2$  by the membrane (Fig. 3) increased nearly linearly with increasing ethanol concentrations. Furthermore, from Fig. 3 it is obvious that the  $E_2$  uptake is directly proportional to the sorption of ethanol into the membrane from ethanol/PBS mixtures. Therefore, it could be concluded that increasing amounts of ethanol embedded in the membrane are responsible for an enhanced solubility of  $E_2$  in the polymer.

A markedly enhanced uptake of  $E_2$  and ethanol is observed at ethanol concentrations  $> 75\%$  (v/v), which is reflected in the non proportional rise in  $E_2$  flux across the EVA membrane at these higher ethanol concentrations.



**Fig.3:** The effect of different ethanol concentrations on the uptake of  $E_2$  from saturated ethanol/PBS co-solvent systems (-■-) and the uptake of ethanol (-○-) by the EVA membrane. Each data point represents the mean and standard deviation of at least three determinations.

Since the thickness of the membrane ( $h$ ) was not significantly altered in the presence of ethanol (data not shown), the apparent diffusion coefficients of  $E_2$  in the polymer could be calculated by Eq. 2 using the experimentally determined permeabilities and partition coefficients. From Fig. 4, where the apparent diffusion coefficients are presented as a function of ethanol concentrations, it is obvious that the diffusivity of the membrane increased with increasing ethanol concentrations.



**Fig.4:** Calculated diffusion coefficients of  $E_2$  through 9 % EVA membrane from ethanol/PBS mixtures.

An interaction between ethanol and the polymeric structure seems to be a likely explanation. To evaluate reversibility of the effect of ethanol on the polymer, discs of the membrane were preincubated with 96% (v/v) ethanol for 24 hours, washed and used for permeation studies in side-by-side diffusion cells. This

pretreatment had no influence on the experimentally determined permeabilities from defined ethanol/PBS mixtures (data not shown). Therefore, the effect of ethanol was found to be completely reversible and not due to dissolution or extraction of polymer components from the EVA membrane. These findings suggest that ethanol acts by a reversible plasticizing effect leading to reduced barrier properties of this EVA membrane.

For an EVA membrane containing 12 % vinyl acetate, an enhanced permeability for nitroglycerin and ethanol with increasing ethanol concentrations was directly attributed to such a plasticizing effect (22).

Here, in case of the 9 % EVA membrane, it was shown that the increasing  $E_2$  flux across the EVA membrane with increasing ethanol concentrations is due to a larger uptake of  $E_2$  by the membrane and the increasing diffusivity of the polymer. Both parameters are directly related to an increasing uptake of ethanol by the membrane.

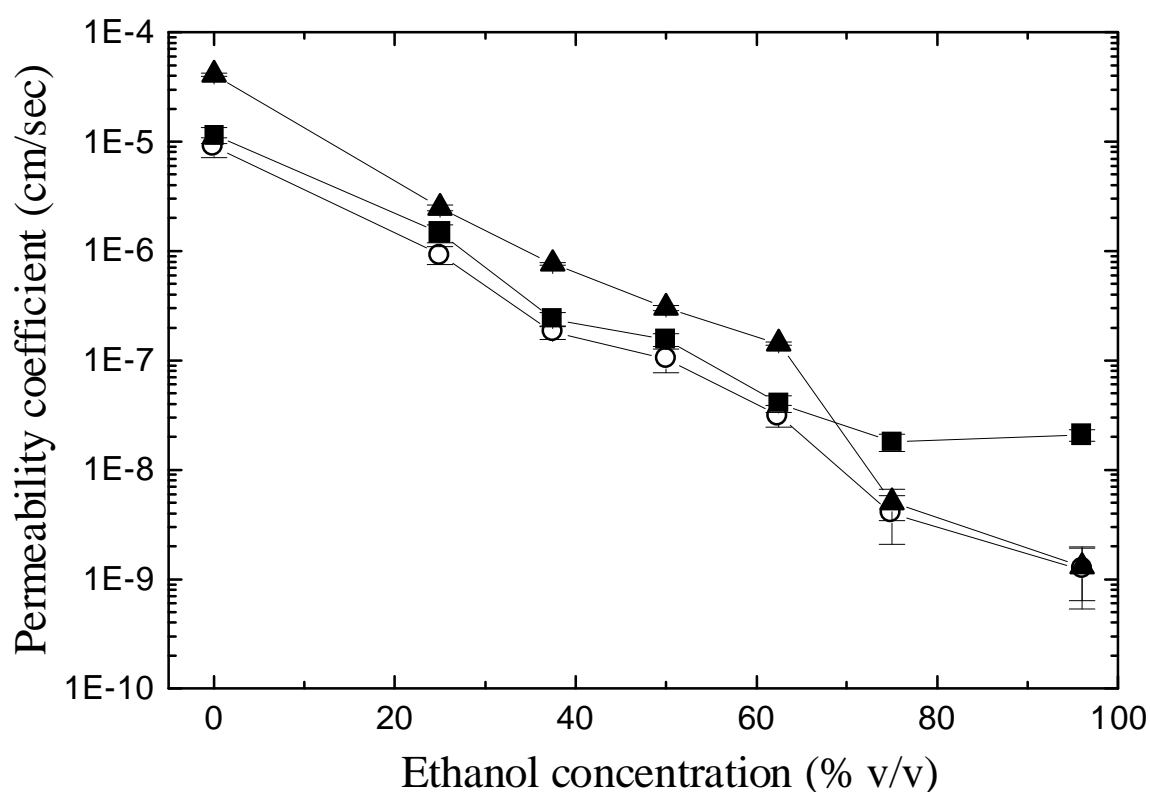
When the 9 % EVA membrane was coated with adhesive, a different profile for the  $E_2$  flux rate versus ethanol concentration curve was observed. The  $E_2$  flux across membrane and adhesive presented in Fig. 1 increased with increasing ethanol concentration up to a maximum flux ( $J_{ss}$ ) of  $0.803 \pm 0.145 \mu\text{g}\times\text{cm}^{-2}\times\text{h}^{-1}$  at 62.5 % (v/v) ethanol, decreasing then with further increase in the volume fraction of ethanol.

This suggests that the adhesive layer used for the MCRS has an important influence on the overall drug flux.

In order to clarify the extent of both barriers involved in  $E_2$  flux control, the experimentally determined permeabilities of the EVA membrane and the composite of EVA membrane and adhesive layer as well the calculated permeability for  $E_2$  of the adhesive layer (Eq. 3) were compared (Fig. 5). At lower ethanol concentrations the EVA membrane represents the rate limiting barrier. When the ethanol content exceeds 62.5 % (v/v), the permeability of the adhesive layer decreases dramatically, while the permeability of the membrane

levels off, leading to a 15 fold lower permeability of the adhesive layer compared to the membrane at 96 % (v/v) ethanol.

Therefore, the adhesive layer consisting of a mixture of polyisobutenes and light mineral oil is the rate controlling barrier for E<sub>2</sub> release from the MCRS, when the ethanol content exceeds 70 % (v/v) in the symmetric case.



**Fig.5:** The effect of different ethanol concentrations in the symmetric configuration on the experimentally determined permeability coefficients of E<sub>2</sub> across EVA membrane (■) and EVA membrane coated with adhesive (○) as well as calculated permeability of E<sub>2</sub> across the adhesive layer (▲).



The experiments discussed so far were conducted with the membrane and/or adhesive layer. The question of the rate limiting barrier in a sandwich of EVA membrane, adhesive and human skin is of practical importance. Experimental data for  $E_2$  permeabilities of human skin in dependence on ethanol concentrations in the symmetric case were taken from the literature and were compared to obtained permeabilities of the EVA membrane coated with adhesive (table 1). For ethanol concentrations from 25 to 95% (v/v) the permeability of human skin is significantly higher than the permeability of membrane and adhesive, indicating that the patch, and not the skin, limits the  $E_2$  flux in this symmetric case.

**Table 1:** Comparison of  $E_2$  permeabilities for human skin (taken from the literature) and for the EVA membrane coated with adhesive layer in the symmetric case.

Ethanol concentration (% v/v)	Human skin <sup>1</sup> $P_{HS}$ (cm × sec <sup>-1</sup> )	EVA membrane + adhesive $P_{MA}$ (cm × sec <sup>-1</sup> )
25	$1.76 \pm 0.93 \times 10^{-6*}$	$9.23 \pm 1.71 \times 10^{-7}$
50	$3.64 \pm 0.12 \times 10^{-7*}$	$1.03 \pm 0.25 \times 10^{-8}$
75	$2.78 \pm 0.56 \times 10^{-7**}$	$3.94 \pm 1.84 \times 10^{-9}$
95	$5.28 \pm 1.67 \times 10^{-7***}$	$1.23 \pm 0.69 \times 10^{-9}$

<sup>1</sup> Data were taken from the literature. All experiments were conducted in side-by-side diffusion cells in the symmetric configuration using saturated solutions of  $E_2$ .

\* Permeabilities were calculated from  $E_2$  fluxes displayed in Ref. 12 using the solubilities determined in our study.

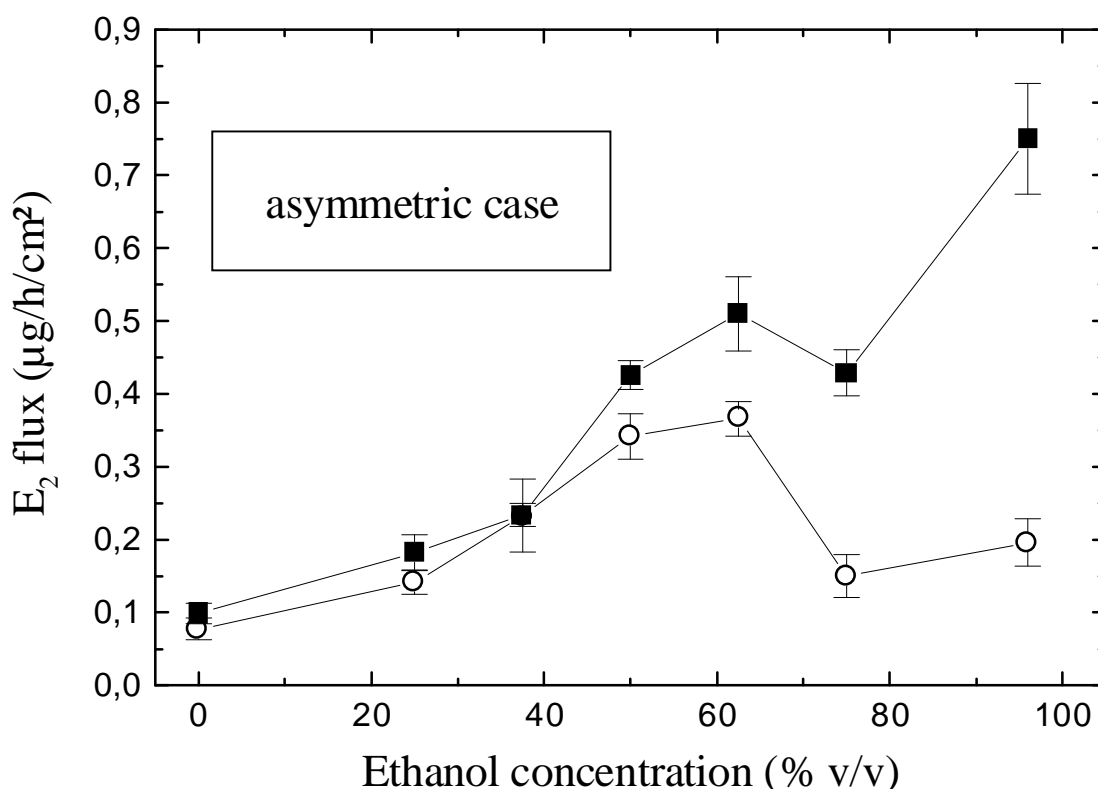
\*\* Data were taken from Ref. 23.

\*\*\* Data were taken from Ref. 24.

### Asymmetric case

The asymmetric configuration represents the practically significant situation. In this configuration the *in vivo* use of MCRS is simulated, where drug and enhancer are released from an ethanolic reservoir across the stratum corneum into an aqueous medium, the human body. However, in this case steady state ethanol gradients across the diffusion barrier may occur due to the simultaneous transport of E<sub>2</sub> and ethanol (25), leading to considerably more difficult data analysis.

In Fig. 6, E<sub>2</sub> flux rates across single EVA membrane and membrane coated with adhesive for the asymmetric case in dependence on donor ethanol concentrations are shown.



**Fig.6:** Influence of donor ethanol concentration on E<sub>2</sub> flux across EVA membrane (-■-) and EVA membrane coated with adhesive (-○-) in the asymmetric configuration. Each data point represents the mean and standard deviation of at least three determinations.

For both curves a profile comparable to the symmetric case could be observed, although the absolute flux rates are somewhat lower in this case.

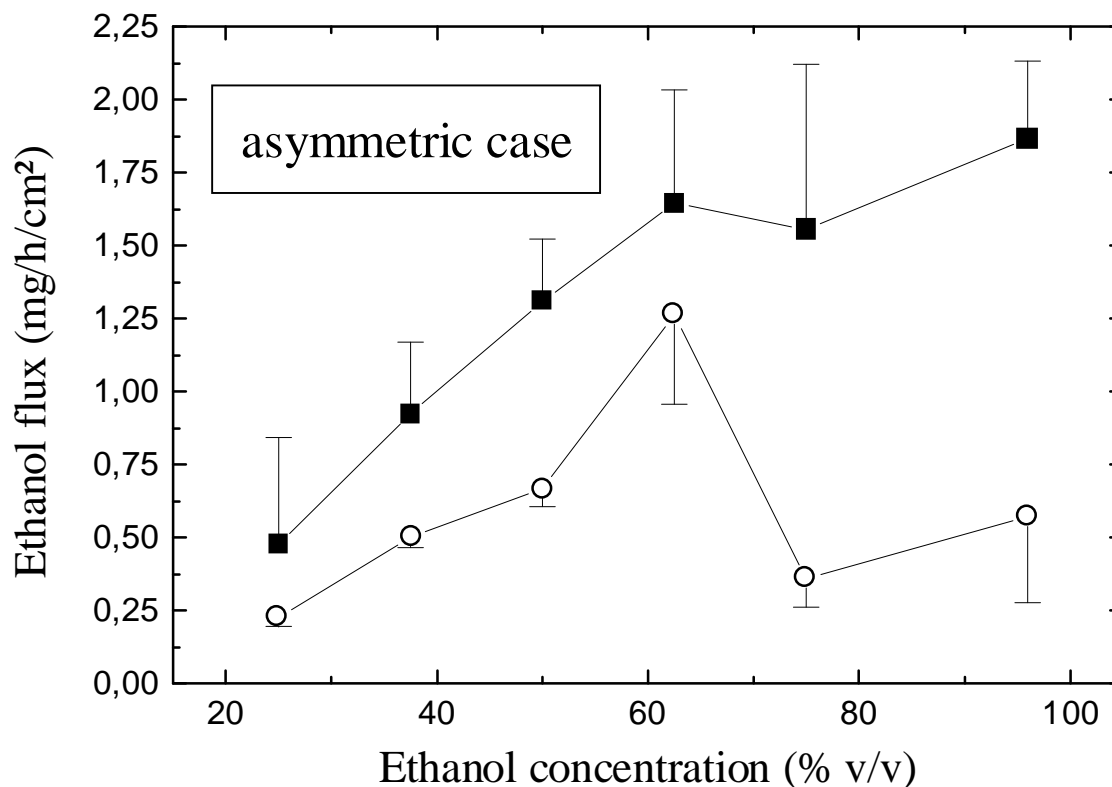
As already shown in the symmetric case, both curves yield a similar pattern up to 62.5 % (v/v) ethanol, but differed significantly at higher alcohol concentrations.

The permeation across the EVA membrane steadily rose with increasing ethanol concentrations in the donor. Here a 7.5 fold increase could be observed when the  $E_2$  flux rates from pure PBS and from ethanol of 96 % (v/v) were compared.

The  $E_2$  flux across EVA membrane coated with adhesive increased up to a maximum value of  $0.366 \pm 0.024 \mu\text{g}\times\text{cm}^{-2}\times\text{h}^{-1}$  at 62.5 % ethanol followed by a decrease with increasing ethanol content in the donor solution, indicating that the adhesive layer again represents the rate controlling barrier at donor ethanol concentrations  $\geq 70$  % (v/v).

The ethanol fluxes determined simultaneously are presented as a function of donor ethanol content in Fig. 7. As seen for  $E_2$  fluxes, the permeation of ethanol across the membrane exhibited a nearly linear dependence on donor ethanol concentrations from  $0.477 \pm 0.356 \text{mg}\times\text{cm}^{-2}\times\text{h}^{-1}$  at 25 % ethanol up to  $1.866 \pm 0.267 \text{mg}\times\text{cm}^{-2}\times\text{h}^{-1}$  at 96 % ethanol.

When membrane and adhesive layer were employed a maximum ethanol flux of  $1.263 \pm 0.308 \text{mg}\times\text{cm}^{-2}\times\text{h}^{-1}$  at 62.5 % (v/v) ethanol followed by a decrease at higher donor ethanol contents could be observed.



**Fig.7:** Influence of donor ethanol concentration on ethanol flux across EVA membrane (-■-) and EVA membrane coated with adhesive (-○-) in the asymmetric configuration. Each data point represents the mean and standard deviation of three determinations.

Since similar flux rate versus donor ethanol concentration curve profiles for E<sub>2</sub> and ethanol could be observed, a nearly linear relationship between E<sub>2</sub> and ethanol fluxes could be assumed. A similar linear dependence was previously shown for permeation of E<sub>2</sub> (12,15) as well as permeation of nitroglycerin (18) across human skin, when the drug was dissolved in ethanol/water mixtures. It was argued that the drug should be co-transported with the solvent ethanol (15,18). From our investigations, it seems that this linear relationship between drug and ethanol fluxes is also valid for artificial polymeric diffusion barriers as the 9 % EVA membrane as well as an adhesive consisting of polyisobutenes.

The experiments conducted here can be used to interpret *in vitro* experiments, where the transdermal  $E_2$  flux rate across a sandwich of MCRS membrane, adhesive and excised human skin was determined in the asymmetric configuration (8, chapter 2). In this study an  $E_2$  flux rate maximizing at 62.5% (v/v) ethanol and then decreasing at higher donor ethanol contents was observed. This profile indicates, that the transdermal  $E_2$  flux is strictly dependent on ethanol concentrations in the reservoir of the patch. At ethanol contents  $\geq 70\%$  (v/v) the adhesive layer of the MCRS controls the release of  $E_2$  from the patch into the body, and not the EVA membrane, as claimed by the manufacturer. If the ethanol content in the reservoir changes, which may occur due to the release of ethanol during the application (11), a non constant transdermal flux rate results. Such a fluctuating input rate was recently observed *in vitro* and *in vivo* for the investigated MCRS delivering  $E_2$  (8, chapter 2).

Investigations presented here, where the release kinetic of the MCRS was directly related to the composition of the patch may be helpful for designing improved transdermal reservoir systems. It should be possible to optimize MCRS by adjusting the ethanol content in the reservoir as well as by the selection of materials to get sufficiently high and stable transdermal input rates.

## Conclusions

*In vitro* investigations in the kinetics of a commercially available membrane controlled reservoir system (MCRS) delivering  $\beta$ -estradiol ( $E_2$ ) were conducted to elucidate mechanisms responsible for drug flux control.

A comparison of our data to investigations conducted with human skin revealed that the MCRS design controls the transdermal  $E_2$  input rate.

Furthermore, it was shown that the release of  $E_2$  from the TDS is strictly dependent on the ethanol content in the reservoir of the patch: When a MCRS is

applied to the skin in vivo, the adhesive layer consisting of a mixture of polyisobutenes and light mineral oil represents the rate controlling barrier, and not the EVA membrane, as claimed by the manufacturer. Since ethanol is released from the patch during the application, the reservoir ethanol concentration steadily decreases leading to changes in E<sub>2</sub> flux control. At ethanol contents below ca. 70 % (v/v) the E<sub>2</sub> flux is mainly controlled by the EVA membrane. With further decrease in the ethanol content the E<sub>2</sub> flux decreases due to a decreasing uptake of E<sub>2</sub> by the EVA membrane as well as a decreasing diffusivity of the polymer, both parameters directly correlated to the ethanol uptake by the membrane.

## **References**

1. J. A. Balfour and R. C. Heel. Transdermal estradiol: A review of its pharmacodynamic properties and therapeutic efficacy in the treatment of menopausal complaints. *Drugs* 40: 561-582 (1990)
2. L. R. Laufer, J. L. de Fazio, and J. K. L. Lu. Estrogen replacement therapy by transdermal estradiol administration. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 146: 533-539 (1983)
3. W. R. Good, M. S. Powers, P. Campbell, and L. Schenkel. A new transdermal delivery system for 17  $\beta$ -Estradiol. *J. Contr. Rel.* 2: 89-94 (1985)
4. I. Setnikar, L. C. Rovati, B. Vens-Cappell, and C. Hilgenstock. Bioavailability of estradiol from two transdermal patches. *Arzneim.-Forsch./Drug Res.* 46: 307-310 (1995)
5. S. F. Gordon. Clinical experience with a seven-day estradiol transdermal system for estrogen replacement therapy. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 173: 998-1004 (1995)
6. U. D. Rohr, C. Nauert, and A. M. Ehrly. Kinetik eines neuen Pflaters zur transdermalen Applikation von 17  $\beta$ -Estradiol. *Zentralbl. Gynakol.* 117: 531-539 (1995)
7. Y. Le Roux, M. L. Borg, M. Sibille, J. Thebault, A. Renoux, M. J. Douin, F. Djebbar, and M. P. Dain. Bioavailability study of Menorest<sup>®</sup> a new estrogen

- transdermal delivery system, compared with a transdermal reservoir system. *Clin. Drug Invest.* 10: 172-178 (1995)
8. U. D. Rohr, R. Altenburger, and T. Kissel. Kinetics of the transdermal reservoir membrane system delivering  $\beta$ -estradiol: In vitro/in vivo correlation. *Pharm. Res.* 15: 875-884 (1998)
  9. P. S. Campbell and S. K. Chandrasekaran. US Patent 4379454
  10. R. W. Baker and J. Heller. Materials selections for transdermal delivery systems. In: J. Hadgraft and R. H. Guy (Eds.). *Transdermal drug delivery*. Marcel Dekker, New York, 1989, pp. 293-311
  11. R. D. Smith, D. E. Robinson, B. Delignieres, B. D. Albertson, T. P. Tomai, M. J. Zinaman, and J. A. Simon. Effects of vehicle supplementation on total estradiol absorption from a transdermal estradiol delivery system. *Fertil. Steril.* 56: 1029-1033 (1991)
  12. P. Liu, T. Kurihara-Bergstrom, and W. R. Good. Cotransport of estradiol and ethanol through human skin in vitro: Understanding the permeant/enhancer flux relationship. *Pharm. Res.* 8: 938-944 (1991)
  13. A. H. Ghanem, H. Mahmoud, W. I. Higuchi, U. D. Rohr, S. Borsadia, P. Liu, J. L. Fox, and W. R. Good. The effects of ethanol on the transport of  $\beta$ -estradiol and other permeants in hairless mouse skin II: A new quantitative approach. *J. Contr. Rel.* 6: 75-83 (1987)
  14. N. A. Megrab, A. C. Williams, and B. W. Barry. Oestradiol permeation across human skin, silastic and snake skin membranes: The effects of ethanol/water co-solvent systems. *Int. J. Pharm.* 116: 101-112 (1995)
  15. D. D. Kim, J. L. Kim, and Y. W. Chien. Mutual hairless rat skin permeation-enhancing effect of ethanol/water system and oleic acid. *J. Pharm. Sci.* 85: 1191-1195 (1996)
  16. G. S. Chen, D. D. Kim, and Y. W. Chien. Dual-controlled transdermal delivery of levonorgestrel and estradiol: Enhanced permeation and modulated delivery. *J. Contr. Rel.* 34: 129-143 (1994)
  17. T. Kurihara-Bergstrom, K. Knutson, L. J. DeNoble, and C. Y. Goates. Percutaneous absorption enhancement of an ionic molecule by ethanol-water systems in human skin. *Pharm. Res.* 7: 762-766 (1990)
  18. S. I. Yum, E. S. Lee, L. Taskovich, and F. Theeuwes. Mechanism of action of ethanol as flux enhancer for drug permeation through human skin. *Proc. Int. Symp. Control. Rel. Bioactive Mater.* 14: 103-104 (1987)
  19. R. M. Gale and R. G. Berggen. US Patent 4615699 (1986)
  20. R. M. Gale, E. S. Lee, L. T. Taskovich, and S. I. Yum. US Patent 4588580 (1986)

21. T. Higuchi. Physical chemical analysis of percutaneous absorption process from creams and ointments. *J. Soc. Cosmet. Chem.* 11: 85-97 (1960)
22. B. Berner, J. H. Otte, G. C. Mazzenga, R. J. Steffens, and C. D. Ebert. Ethanol:water mutually enhanced transdermal therapeutic system I: Nitroglycerin solution properties and membrane transport. *J. Pharm. Sci.* 78: 314-318 (1989)
23. L. K. Pershing, G. E. Parry, and L. D. Lambert. Disparity of in vitro and in vivo oleic acid-enhanced  $\beta$ -estradiol percutaneous absorption across human skin. *Pharm. Res.* 10: 1745-1750 (1993)
24. L. K. Pershing, L. D. Lambert, and K. Knutson. Mechanism of ethanol-enhanced permeation across human skin in vivo. *Pharm. Res.* 7: 170-175 (1990)
25. P. Liu, WQ. I. Higuchi, A. H. Ghanem, J. L. Fox, T. Kurihara-Bergstrom, and W. R. Good. Influence of ethanol on diffusion/metabolism of  $\beta$ -estradiol in hairless mouse skin for the "asymmetric" situation. *Proc. Int. Symp. Control. Rel. Bioactive Mater.* 16: 35-36 (1989)



## **Kapitel 4**

# **Transdermale Applikation von Melatonin: Ein Reservoirsystem mit zirkadianer Freisetzung des Hormons**

## **Zusammenfassung**

Ziel dieser Studie war es zu untersuchen, ob ein Transdermales Therapeutisches System (TTS) für Melatonin machbar ist. Um eine ideale Wirkung des Hormons zu erzielen, sollte die zirkadiane Rhythmik der endogenen Melatoninfreisetzung mit Hilfe dieses TTS nachvollzogen werden.

Zu diesem Zweck wurden Reservoirsysteme unter Verwendung verschiedener Kontaktkleber mit einem ethanolhaltigen Vehikel hergestellt und der transdermale Fluß des Wirkstoffes aus diesen TTS unter in vitro-Bedingungen bestimmt.

Es zeigte sich eine starke Abhängigkeit der Wirkstofffreigabe vom verwendeten Kleber. Während ein Polyisobutylkleber sowohl für Ethanol als auch für Melatonin nur eine geringe Permeabilität aufwies, zeigte ein Silikonkleber zumindest für den Alkohol eine hohe Durchlässigkeit. Im Gegensatz dazu konnte unter der Verwendung eines Acrylatklebers ein Melatonin-TTS entwickelt werden, bei dem eine hohe Ethanolfreigaberate für eine zeitliche Änderung der Ethanolkonzentration im Reservoir sorgte, welche dann das gewünschte, glockenförmige Flußprofil für Melatonin bedingte.

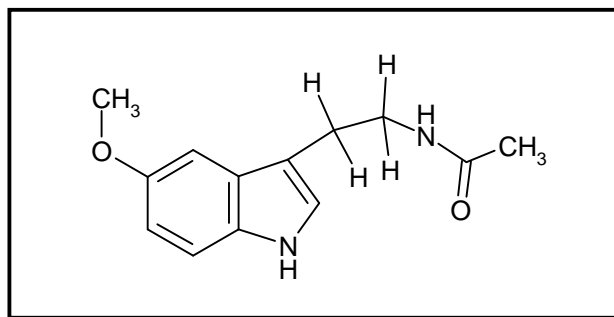
Eine Berechnung der theoretischen Melatonin-Plasmakonzentrationen unter in vivo-Bedingungen aus den ermittelten transdermalen Input-Raten des TTS ergab eine gute Annäherung an die physiologischen Blutspiegel des Hormons.

Das errechnete Plasmaprofil zeigte bezüglich der maximalen Wirkstoffkonzentration ( $c_{\max}$ ) und der AUC eine starke Abhängigkeit von der Ethanolmenge im Reservoir.

Daraus ergibt sich die Möglichkeit, auf einfache Weise eine pulsformige Melatonin-Freisetzung, die der physiologischen Situation nahe kommt, zu realisieren.

## Einleitung

In der Epiphyse (Zirbeldrüse) wird das Hormon Melatonin (N-acetyl-5-methoxytryptamin, Abb. 1) synthetisiert. Die Bildung und Freisetzung der Substanz wird durch Lichtinformationen der Netzhaut gesteuert. Das sekretierte Melatonin wirkt auf den Nucleus Suprachiasmaticus (NS) im Gehirn, welcher als biologische Uhr des Körpers angesehen wird. (1).

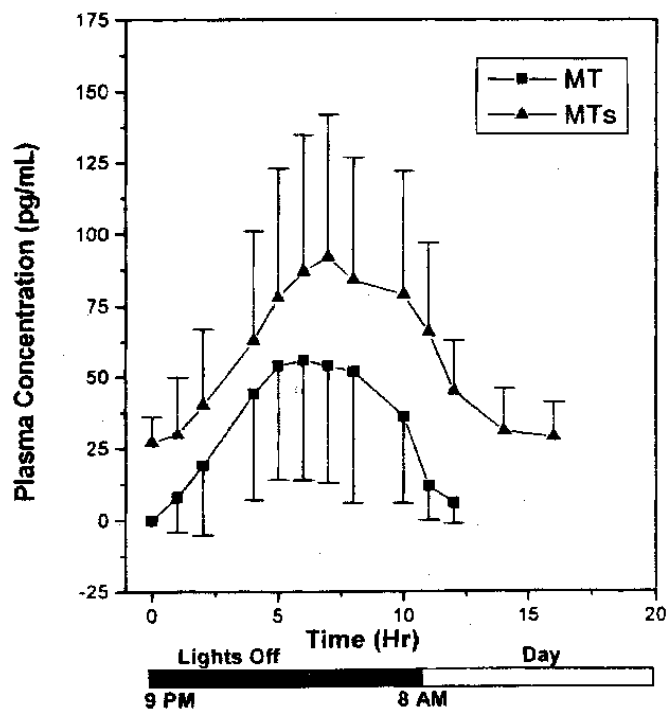


**Abb. 1:** Struktur von Melatonin, N-[2-(5-Methoxy-1H-indol-3yl)ethyl]acetamide

Angeregt wird dieser Mechanismus durch Dunkelheit, während Tageslicht die Melatoninfreisetzung hemmt. Daraus resultiert ein glockenförmiger, tageszeitabhängiger Plasmaspiegel, der in der Regel ab 21 Uhr ansteigt. Zwischen zwei und vier Uhr morgens wird ein Maximum von ca. 50 bis 100 pg/ml erreicht, gefolgt von einem Abfall auf das Basisniveau (ca. 10 pg/ml) gegen sieben bis neun Uhr (2). Die Höhe des Maximums unterliegt zum Teil starken interindividuellen Schwankungen. Abbildung 2 zeigt die endogenen Plasmakonzentrationen von Melatonin und dem Hauptmetaboliten 6-Sulfatoxymelatonin (6-MT) in 20 gesunden Probanden (2). Bei älteren Menschen verläuft die Plasmakurve flacher, da die Melatoninproduktion im Alter nachläßt (3).

Verschiedene Studien deuten auf einen immunstimulierenden Effekt (4,5) sowie eine hemmende Wirkung auf das Wachstum von Tumoren (6,7) hin. Das antioxidative Potential des Melatonins soll das von Vitamin E noch übertreffen (8).

Gegenüber diesen neueren, teils widersprüchlichen Befunden ist die Wirkung auf den Schlaf-Wach-Rhythmus eindeutig belegt. So ist bekannt, daß bei Personen mit Schlafstörungen die Melatoninplasmaspiegel signifikant niedriger sind als bei Menschen mit normalem Schlafverhalten (9).



**Abb. 2:** Endogene Plasmakonzentrationen von Melatonin (MT, -■-) und 6-MT (MTs, -▲-) in 20 gesunden, männlichen Probanden (nach 2)

Eine Vielzahl von Studien belegt, daß die exogene Zufuhr von Melatonin zu einer Reduktion der Schlafstörungen führen kann. Bei Patienten, die unter chronischer Schlaflosigkeit leiden, läßt sich die Schlafdauer signifikant verbessern (10-12).

Insbesondere ältere Menschen sind von Schlafstörungen häufiger betroffen. Das zeigt sich darin, daß ca. 40 % aller Verschreibungen von Hypnotika auf Personen über 65 Jahren entfallen (13). Besonders diese Patientenpopulation würde von der Einnahme von Melatonin profitieren (13,14).

Benzodiazepine und Beta-Blocker verändern beispielsweise die endogene Melatoninproduktion und lösen so häufig Schlafstörungen aus. Eine Therapie mit peroral zugeführtem Melatonin kann hier Abhilfe schaffen (15,16).

Die Zufuhr von Melatonin synchronisiert den Schlaf-Wach-Rhythmus. Bei Schichtarbeitern kann so das Einschlafen gefördert werden, verbunden mit einem gesteigerten Wohlbefinden am Folgetag (17).

Ein Einsatz des Hormons zur Unterdrückung der Symptome des „jet-lags“, welcher nach Interkontinentalflügen auftreten kann, hat sich in klinischen Studien ebenfalls bewährt (18) und gilt hier als die einzig wirkungsvolle Therapie (19).

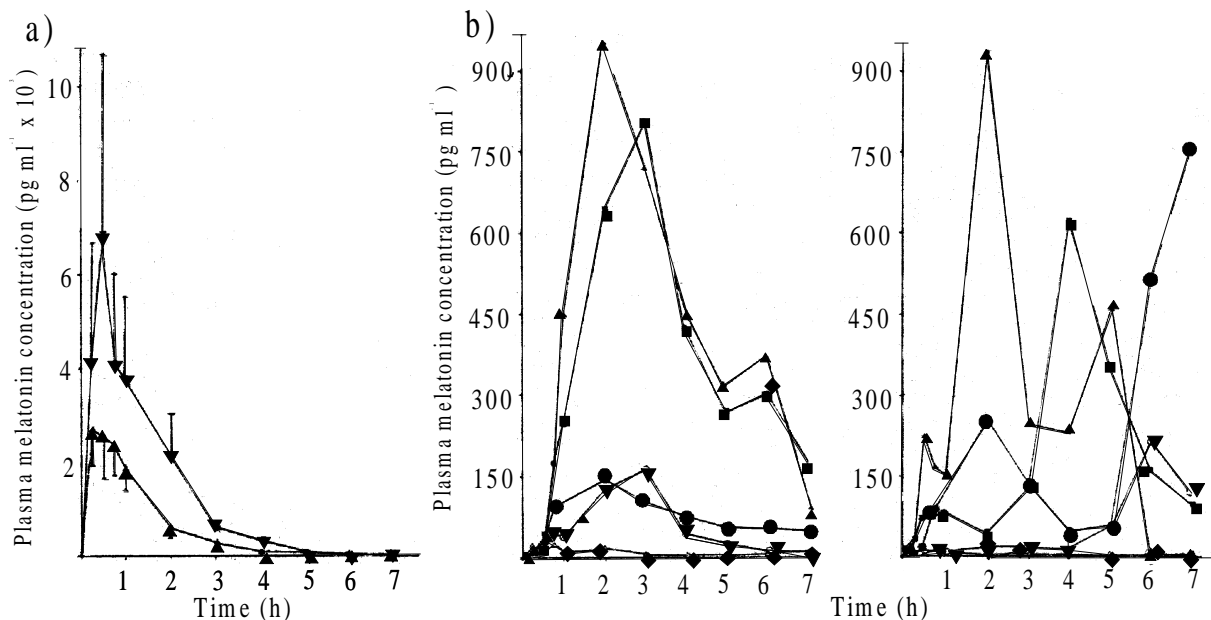
Den deutlichsten Beleg für die Wirkung von Melatonin auf die Synchronisation des Schlaf/Wach-Zyklus erhielt man aus Studien mit blinden Probanden. Bei dieser Personengruppe fehlt auf Grund ausbleibender Lichtreize häufig der endogene Rhythmus der Melatoninfreisetzung, was zum Auftreten von Schlafstörungen führt. Auch hier läßt sich durch Supplementierung des Hormons eine Verbesserung erzielen (20).

Der genaue Mechanismus der schlaffördernden Wirkung ist noch nicht geklärt. Vielfach wird ein thermoregulatorischer Effekt diskutiert. Durch das Absenken der Körpertemperatur soll der Schlaf angeregt werden (21).

Die Effektivität der Therapie scheint aber stark in Abhängigkeit von der verwendeten Arzneiform zu stehen. Während die oben genannten Effekte vorrangig mit hohen Dosen (80-1000 mg) oder retardierten oralen Formen erzielt wurden, zeigte sich in einer Studie mit 5 mg Melatonin in einer schnell freisetzenden Tablette keine signifikante Verbesserung des Schlafverhaltens im Elektroenzephalogramm (22). Ein Grund hierfür könnte sein, daß die Plasmahalbwertszeit von Melatonin nach oraler Applikation nur 30 – 40 Minuten beträgt, u. a. bedingt durch einen ausgeprägten First-pass-Effekt (23). Der Spitzenblutspiegel wird schon nach sehr kurzer Zeit (ca. 30-60 min) erreicht (24). Die Plasmakonzentration fällt nachfolgend sehr schnell auf das Basisniveau ab.

Ausgehend von diesen Erfahrungen, ist eine möglichst weitgehende Übereinstimmung der Melatoninfreisetzung mit den physiologischen Melatonin-Spiegeln wünschenswert. Während der 6 bis 8 Stunden in der Nacht sollen Spiegel von 50-100 pg/ml aufrecht erhalten werden, die als notwendiges Kriterium für eine Wirkung angesehen werden (16,19). Andererseits sollte das zugeführte Melatonin zu Tagesbeginn weitgehend eliminiert sein (16).

In Abbildung 3 sind die Melatonin-Plasmaprofile nach der Einnahme einer schnell freisetzenden Formulierung (3a) und einer peroralen Retardarzneiformen (3b) dargestellt.



**Abb. 3:** Melatonin Plasmakonzentrationen nach der Applikation von 2 mg Melatonin. a) Gabe einer schnell freisetzenden Gelatine kapsel zum Zeitpunkt  $t=0$  an 5 Probanden.  $\blacktriangle$ : auf nüchternem Magen;  $\blacktriangledown$ : nach einem Standardfrühstück b) Gabe einer Retardarzneiform zum Zeitpunkt  $t=0$  an 5 Probanden. links: auf nüchternem Magen; rechts: nach einem Standardfrühstück (aus 24)

Hohe orale Dosen führen zu stark überhöhten Plasmaspiegeln (10.000 fach im Vergleich zum normalen Bereich) und einem unphysiologischen Verhältnis von Muttersubstanz und dem Metaboliten 6-MT (2,25). Obwohl für 6-MT keine physiologische Bedeutung oder toxische Wirkung bekannt ist, könnten andere entstehende Metaboliten Nebenwirkungen hervorrufen (2).

Orale Retardarzneiformen bringen zwar per se Vorteile in Bezug auf die Form des Plasmaprofils mit sich, zeigen aber eine starke Abhängigkeit von der Nahrungsaufnahme (24). Hierdurch wird eine gesteuerte zirkadiane Freisetzung des Melatonins erschwert.

Auf der Suche nach alternativen Applikationsformen wurden buccale und insbesondere transdermale Systeme zur Melatoninabgabe entwickelt (2,26-28). Für alle TTS konnte gezeigt werden, daß der Wirkstofffluß durch die Haut hinreichend groß ist, um einen effektiven Blutspiegel zu erzielen. Allen Systemen ist als Nachteil jedoch gemein, daß sie nach einer gewissen lag-Phase den Wirkstoff über einen sehr langen Zeitraum freisetzen und somit nicht den angestrebten glockenförmigen Plasmaspiegelverlauf erzeugen. In klinischen Studien umging man diesen Nachteil, indem die Pflaster nach 4, 6 oder 10 Stunden entfernt wurden. In der Praxis kann dieses Verfahren jedoch nicht angewendet werden, da der Patient das Pflaster dann mitten in der Nacht abnehmen müßte.

Unser Ziel war es also, ein TTS zu entwickeln, das auf Grund seiner Technologie den Wirkstoff über einen begrenzten Zeitraum von etwa 12 Stunden freisetzt und somit den zirkadianen Rhythmus der endogenen Melatoninfreisetzung nachvollzieht.

Basierend auf den Erkenntnissen der Kapitel 2 und 3 wurde versucht, ein Reservoirsystem mit gesteuertem Pulsverhalten zu konzipieren. Hierzu sollte die, von der Ethanolkonzentration abhängige, Transporteigenschaft von MCRS ausgenutzt werden. Voraussetzung für diesen Ansatz sind ein idealer Ausgangsgehalt an Ethanol und die Auswahl geeigneter Pflasterkomponenten (Membran und Kleber).

## **Material und Methoden**

### Materialien

Melatonin, Acetonitril zur Chromatographie und Methanol wurden von Merck (Darmstadt) bezogen. Ethanol (96 % v/v) wurde von Lenz Chemie (Westerburg) erworben. Hydroxypropylcellulose (Klucel<sup>®</sup> Typ H, MG 1.000.000) war eine Gabe der Firma Hercules (Düsseldorf). Humanhaut von Brustreduktionen konnte von einer lokalen Klinik bezogen werden. Die verwendeten Membranen mit Adhäsienschicht, release liner und die als backing layer verwendete Polyesterfolie hatte die Firma Lohmann Therapie Systeme (Andernach) zur Verfügung gestellt. Alle anderen Chemikalien wurden in analytischer Reinheit von Merck (Darmstadt) bezogen.

### Präparation der Haut

Die Haut wurde innerhalb von 6 Stunden nach der operativen Entnahme einer gängigen Methode folgend verarbeitet (29). Nachdem die Haut mit Hilfe eines Skalpells weitgehend von Fett befreit war, konnte die Epidermis mit anheftendem Stratum corneum mittels der Hitze-Separationsmethode (2 min, 60° C) isoliert werden. Die präparierte Epidermis wurde bis zum Gebrauch bei -70° C gelagert.

### Löslichkeit von Melatonin in Ethanol/Wasser-Mischungen

Ein Überschuß von Melatonin wurde in 1,5 ml Polypropylen-Reaktionsgefäßen mit 200 µl eines Ethanol/Wasser-Gemisches mit einem Volumenanteil von 0 bis 96 % Ethanol versetzt und bei 32° C im Trockenschrank über 72 Stunden geschüttelt. Anschließend wurden die Gefäße 5 Minuten bei 14000 rpm zentrifugiert und 100 µl des Überstands abgenommen. Die Bestimmung der Melatoninkonzentration erfolgte nach einer geeigneten Verdünnung durch Methanol mittels HPLC.



### Hauttransport von Melatonin und Ethanol

Der Fluß von Melatonin und Ethanol durch Humanhaut in Abhängigkeit der Ethanolkonzentration im Donator wurde in side-by-side-Diffusionszellen untersucht, von denen jede Halbzelle ein Volumen von 4 ml und eine Diffusionsfläche von 0,77 cm<sup>2</sup> aufwies. Die Haut wurde zwischen den beiden gerührten, auf 32° C temperierten Halbzellen eingespannt.

Die Donator-Halbzelle enthielt eine Lösung von 5 mg/ml Melatonin in dem jeweiligen Ethanol/Wasser-Gemisch, während das Akzeptormedium auf einem Phosphatpuffer (PBS; pH 7,4; Ionenstärke: 0,165) basierte. Im Falle der Verwendung von reinem PBS als Donatormedium betrug die Melatoninkonzentration 1 mg/ml.

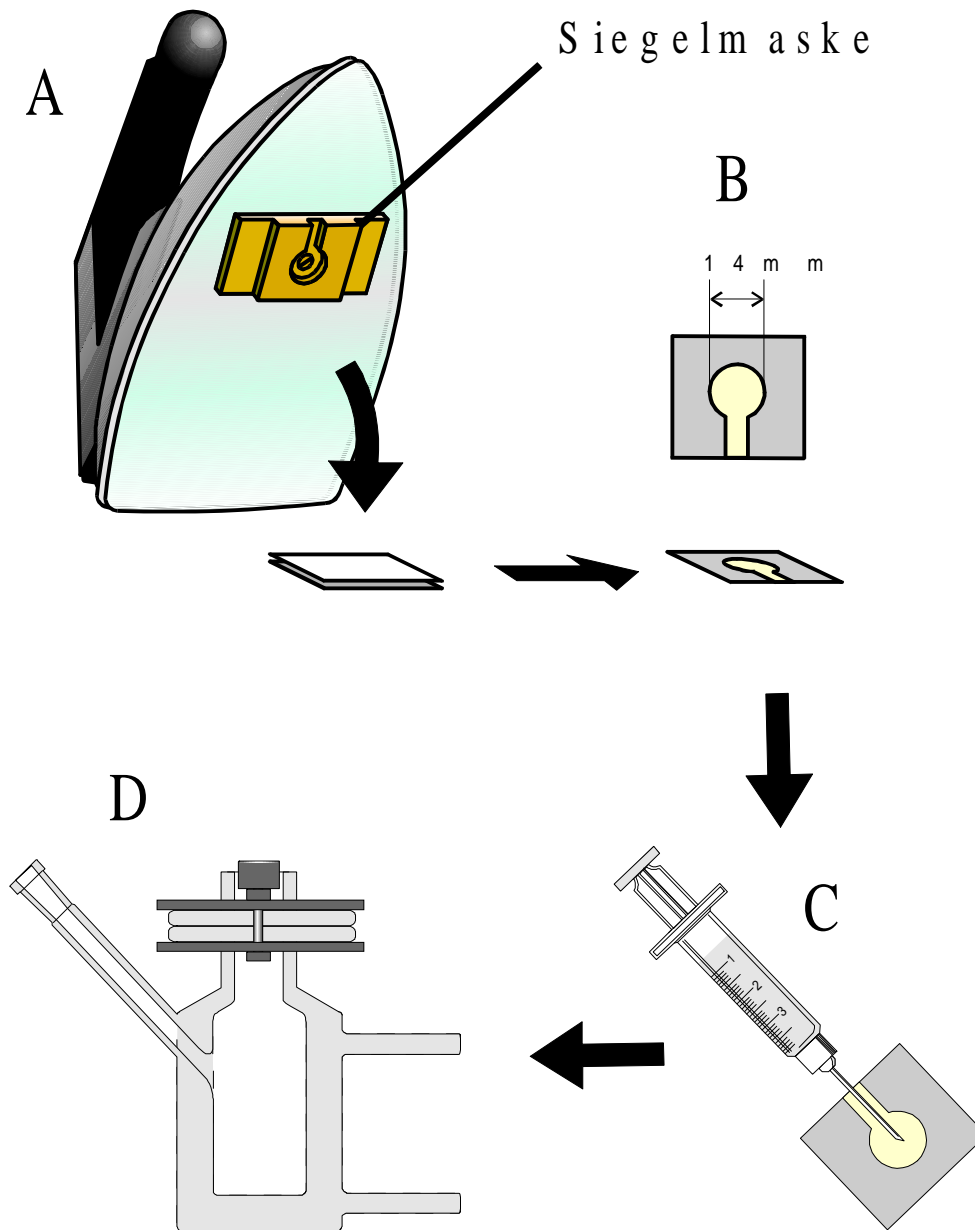
Zu vorgegebenen Zeiten wurden zwei Proben à 1 ml aus dem Akzeptor entnommen und durch PBS ersetzt. Eine Probe wurde mit 0,2 ml Methanol versetzt und für die Bestimmung des Melatoningehaltes mittels HPLC verwendet. Die andere Probe diente der hochdruckflüssigkeitschromatographischen Bestimmung des Ethanolgehaltes.

In der Akzeptor-Halbzelle herrschten nachweislich zu allen Zeiten Sink-Bedingungen. Die Zunahme der Ethanolkonzentration im Akzeptormedium sowie die Abnahme des Ethanolgehaltes in der Donator-Halbzelle ist auf Grund der geringen diffundierten Mengen zu vernachlässigen.

Die Transportgeschwindigkeit im Fließgleichgewicht wurde durch lineare Regression der kumulativ transportierten Menge, aufgetragen gegen die Zeit, ermittelt. Die Steigung der Regressionsgeraden entsprach hier dem Substanzfluß.

### Herstellung von Reservoirpflastern

Eine schematische Übersicht zur Herstellung der Membranpflaster gibt Abbildung 4.



**Abb. 4:** Herstellung, Füllung und Verwendung der Reservoirpflaster

Auf die mikroporöse Membran (Celgard<sup>®</sup>2500, Porengröße 0,04  $\mu\text{m}$ , Celanese Separation Products, Charlotte, USA), die durch den jeweiligen Kleber (siehe Tabelle 1) auf einem release liner (siehe Tabelle 1) fixiert war, wurde eine Polyesterfolie (No. 1220 Scotchpak<sup>®</sup>Film, 3M, Borken) aufgelegt. Mittels einer speziellen Siegelmaske, die über ein handelsübliches Bügeleisen aufgeheizt

wurde, konnten Beutel gefertigt werden (A), die ein rundes Reservoir mit einem Durchmesser von 14 mm aufwiesen (B). Über eine vorhandene Öffnung zum Reservoir wurde die jeweilige Mischung mittels einer Spritze in das Reservoir eingefüllt (C). Nach dem Füllen konnte die Öffnung mit Hilfe des Bügeleisens verschweißt werden, so daß ein komplett abgeschlossenes Reservoir entstand. In Tabelle 1 sind die verschiedenen Pflastertypen aufgeführt.

Typ	Verwendete Kleber	Verwendete release liner
I	Isobutylkleber, Oppanol B100/B10 (50/50), 50 g/m <sup>2</sup>	100 mm dicke PET-Folie (Hostaphan RN 110, Hoechst AG)
II	Silikonkleber, PSA Q7-4302, 50 g/m <sup>2</sup>	Scotchpak <sup>®</sup> 1022 (3M, Borken)
III	Acrylatkleber, Durotak 2287, 20 g/m <sup>2</sup>	100 mm dicke PET-Folie (Hostaphan RN 110, Hoechst AG)

Die Füllung der Pflaster setzte sich aus einer Lösung von 210 mg/ml Melatonin in 75% igen (V/V) Ethanol mit einem Zusatz von 2% Hydroxypropylcellulose (Gelbildner) zusammen.

#### Bestimmung der Transportgeschwindigkeit verschiedener Pflaster

Der transdermale Fluß wurde in Franz-Diffusionszellen mit Volumina zwischen 11,5 und 14 ml und einer Diffusionsfläche von 1,77 cm<sup>2</sup> bestimmt (Abb. 3D). Nachdem das jeweilige Pflaster mit einer Diffusionsfläche von 1,54 cm<sup>2</sup> auf ein Stück Epidermis geklebt worden war, konnte dieses Gefüge in der Franz-Zelle fixiert werden. Das Akzeptormedium, bestehend aus PBS (pH-Wert: 7,4), wurde mittels eines Rührfisches bei einer Umdrehungszahl von 600 rpm gemischt. Ein äußerer Temperiermantel wurde mit Hilfe eines Umwälzwasserbades auf 37° C aufgeheizt. Man geht davon aus, daß die Temperatur an der Oberfläche der Haut dann etwa 32° C beträgt. Dies entspricht in etwa der Hauttemperatur in vivo (30). Zu gegebenen Zeiten wurden zwei Proben à 1 ml aus dem

Akzeptormedium entnommen und durch PBS ersetzt. Eine Probe wurde mit 0,2 ml Methanol versetzt und für die Bestimmung des Melatoningehaltes mittels HPLC verwendet. Die andere Probe diente der hochdruckflüssigkeitschromatographischen Bestimmung des Ethanolgehaltes. Am Ende jedes Versuches erfolgte eine optische Untersuchung der verwendeten Haut auf Löcher oder Risse.

### HPLC-Analytik

Melatonin: Die HPLC-Anlage bestand aus einer Gradientenpumpe (L 6200 A), einem Autosampler (AS-2000 A), einem Säulenthermostaten (T-6300), einem UV-Detektor (L-4000) und einem Fluoreszenz-Detektor (F-1050) von Merck-Hitachi, Merck KGaA (Darmstadt). Die Trennsäule (LiChrospher® 100 RP 18, 5 µm, 250×4.6 mm i.d., Merck KGaA) wurde auf 30° C temperiert. Das Fließmittel aus Acetonitril/Wasser (65:35) wurde mit einer Flußrate von 1 ml/min gepumpt. Die Detektionswellenlänge am UV-Detektor betrug 222 nm, während am Fluoreszenz-Detektor eine Exzitationswellenlänge von 278 und eine Emissionswellenlänge von 345 nm eingestellt waren.

Die Retentionszeit für Melatonin betrug 4,5 min, bei einem Detektionslimit von 0,2 µg/ml für die UV-Bestimmung und einem Limit von 10 ng/ml für die Fluoreszenzdetektion. Beide Detektionsmethoden führten zu übereinstimmenden Ergebnissen und wurden je nach vorliegender Melatoninkonzentration eingesetzt.

Ethanol: Die Ethanolkonzentration in den Proben wurde nach der in Kapitel 3 beschriebenen Methode bestimmt.

### Berechnung theoretischer Plasmaspiegel

Um überprüfen zu können, ob das Pflaster den zirkadianen Rhythmus der Melatoninfreisetzung simuliert, wurden aus den experimentell bestimmten transdermalen Input-Raten theoretische Plasmaspiegelverläufe berechnet. Die verwendete Methode hatte ihre Eignung schon bei der in vitro/in vivo-

Korrelation für das Estradiol-Reservoirpflaster bewiesen (31, Kapitel 2). Die Steady state-Plasmakonzentration zu einer bestimmten Zeit berechnete sich nach Gleichung 1:

$$C_{p(ss)} = \frac{\text{Fluß}(\mu\text{g} \times \text{h}^{-1} \times \text{cm}^{-2}) \times \text{Pflasterfläche}(\text{cm}^2)}{Cl_p(1 \times \text{h}^{-1})} \quad (\text{Gleichung 1})$$

$C_{p(ss)}$  ist die Steady-state Plasmakonzentration und  $Cl_p$  steht für die totale Plasmaclearance. Für die Clearance wurde in einer Studie zur intravenösen Injektion und Infusion ein Wert von  $966 \text{ ml} \times \text{min}^{-1}$  gefunden (32). Da der Blutspiegel einer transdermal applizierten Substanz direkt mit der Pflasterfläche korreliert (33), konnte von den experimentell bestimmten Transportgeschwindigkeiten der Pflaster (Fläche  $1,54 \text{ cm}^2$ ) auf die theoretische Input-Rate eines Systems beliebiger Größe extrapoliert werden.

Für die theoretischen Plasmaspiegel wurden teilweise die pharmakokinetischen Parameter  $t_{\max}$  und  $c_{\max}$  basierend auf Standardverfahren berechnet (34). Die Fläche unter der Melatonin-Plasmakonzentrationskurve (AUC) wurde mit Hilfe der Trapezregel ermittelt.

## **Ergebnisse und Diskussion**

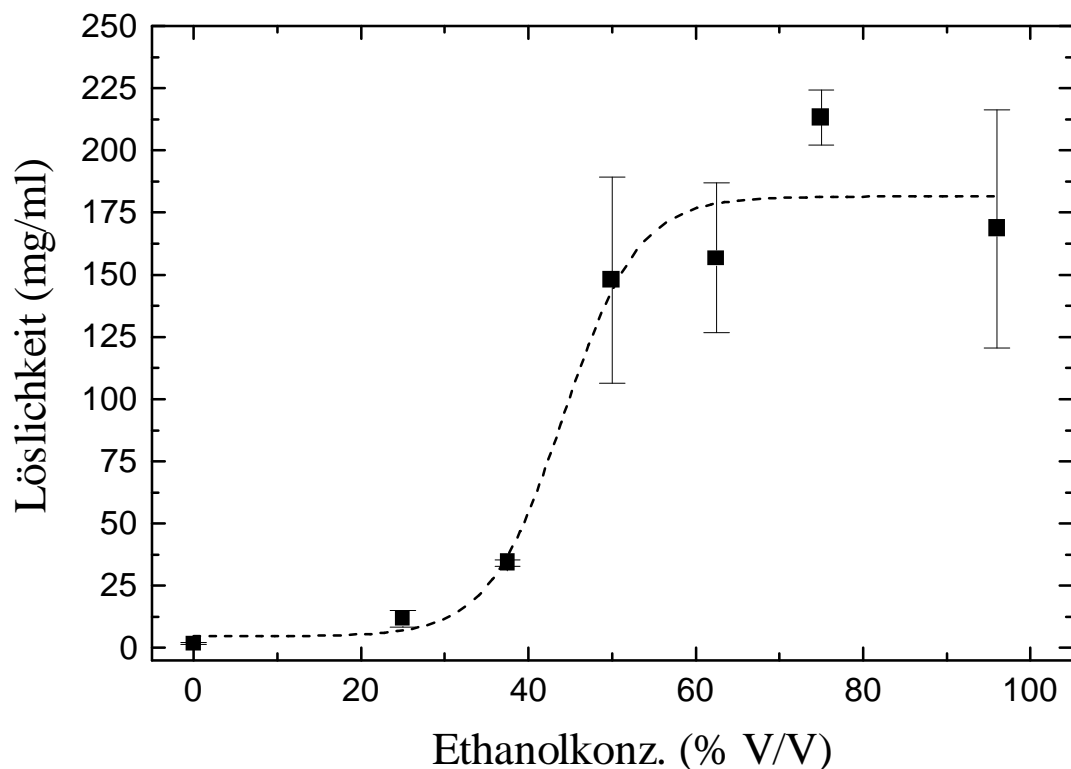
### **Löslichkeit und Hauttransport von Melatonin**

Im Falle der transdermalen Melatoninzufuhr ist ein System anzustreben, welches zu Beginn des Applikationsintervalles einen sehr hohen Substanzfluß erlaubt, der sich dann aber recht schnell reduziert, so daß die Input-Rate nach zehn bis zwölf Stunden gegen Null strebt.

Um einen möglichst hohen Anfangsfluß zu erzielen, wurde ein TTS mit einer mikroporösen Membran entwickelt, die in der Regel eine untergeordnete Rolle

für die Geschwindigkeitskontrolle der transdermalen Wirkstoffaufnahme spielt. Daraus ergibt sich, daß der Barrierefunktion der Haut eine größere Bedeutung zukommen sollte.

Aus den Ausführungen in den Kapiteln 1 bis 3 wird deutlich, daß Ethanol die Kinetik der transdermalen Wirkstoffaufnahme stark beeinflussen kann. Folglich sollte in Vorversuchen abgeklärt werden, inwiefern Löslichkeit und Hautpermeabilität des Melatonins vom Ethanolgehalt eines möglichen Reservoirs abhängen.

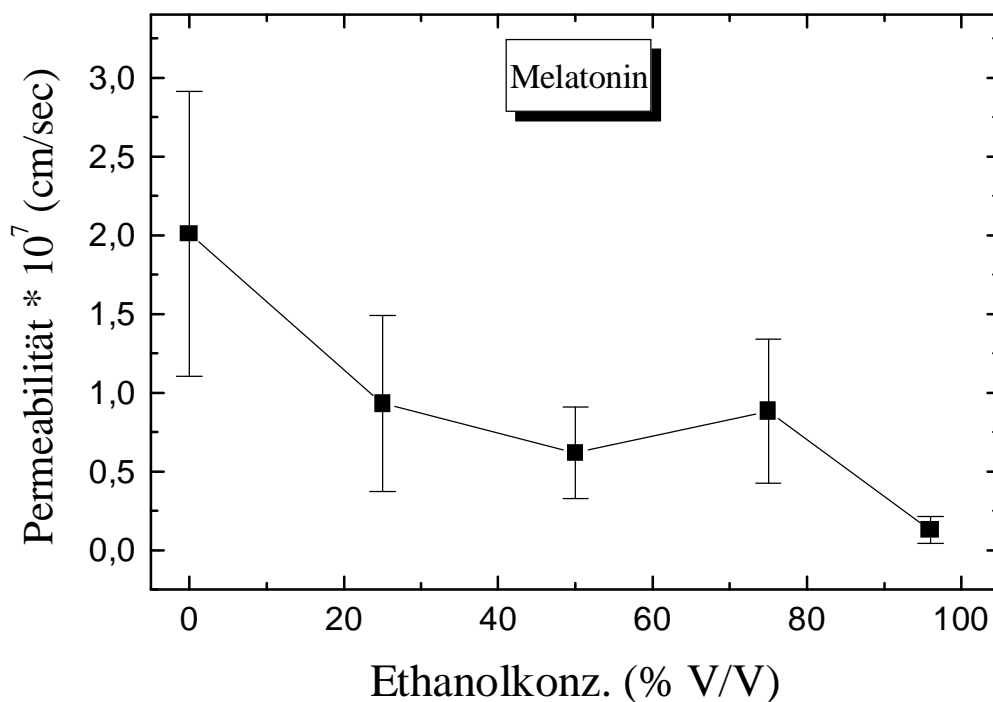


**Abb. 5:** Löslichkeit von Melatonin in verschiedenen Ethanol/Wasser-Mischungen. Aufgetragen sind die Mittelwerte aus sechs Bestimmungen  $\pm$  Standardabweichung.

In Abbildung 5 ist die Sättigungslöslichkeit in Ethanol/Wasser-Mischungen als Funktion des Ethanolgehaltes dargestellt. Die Kurve weist einen nahezu sigmoiden Verlauf mit einem steilen Anstieg der Löslichkeit im Bereich von 40

bis 50 % (V/V) Ethanol auf. Die Löslichkeit von Melatonin in reinem PBS ( $1,77 \pm 0,47 \mu\text{g/ml}$ ) unterscheidet sich nur unwesentlich von Literaturwerten (35). Die maximale Löslichkeit wurde in 75 %igen Ethanol zu  $213,2 \pm 10,9 \text{ mg/ml}$  bestimmt.

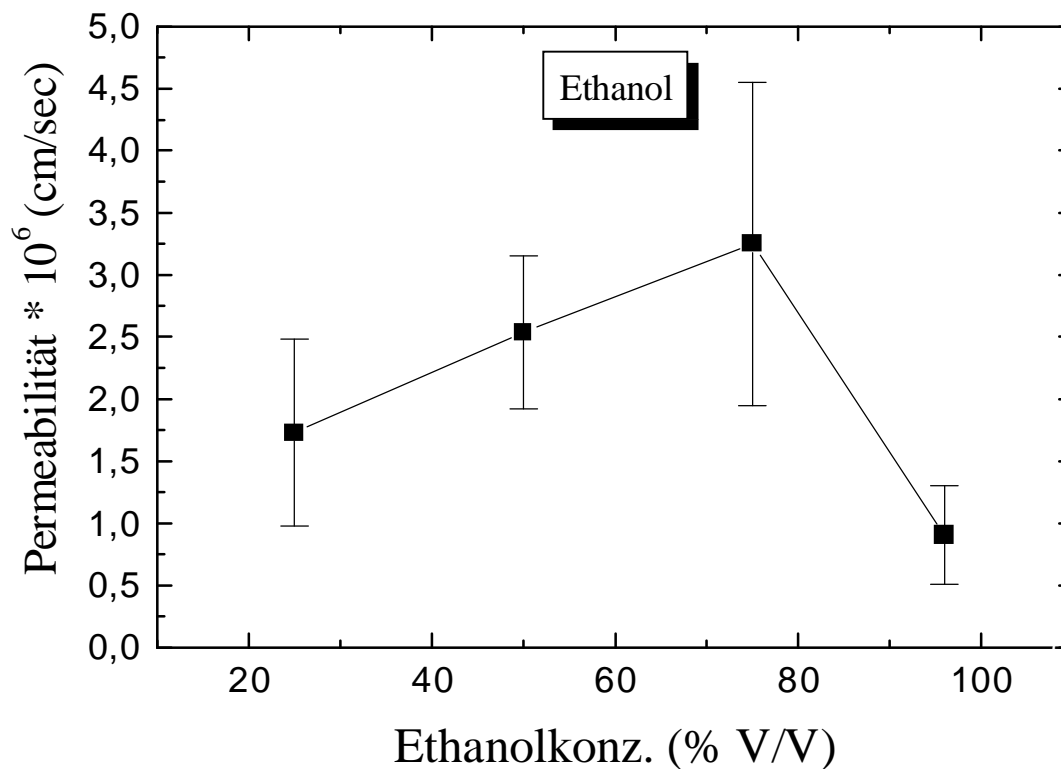
In side-by-side-Diffusionszellen wurden der Melatonin- und der Ethanolfluß durch Humanhaut in Abhängigkeit der Ethanolkonzentration in der Donator-Halbzelle bestimmt. Aus den ermittelten Transportgeschwindigkeiten im Fließgleichgewicht konnte die Permeabilität der Haut für beide Substanzen berechnet werden.



**Abb. 6:** Permeabilität von Humanhaut für Melatonin in Abhängigkeit der Ethanolkonzentration in der Donator-Halbzelle. Aufgetragen sind die Mittelwerte aus sechs Bestimmungen  $\pm$  Standardabweichung.

Abbildung 6 zeigt die Permeabilität für Melatonin als Funktion des Ethanolgehaltes im Donator-Kompartiment. Es läßt sich eine Abnahme der

Permeabilität bei steigenden Ethanolkonzentrationen feststellen, wobei dieser Trend durch eine leichte Steigung bei 75 % (V/V) Ethanol unterbrochen wird. Ein Maximum in diesem Bereich läßt sich für die Permeabilität der Haut für Ethanol erkennen (Abbildung 7). Auf dieses Maximum folgt eine starke Reduktion der Permeabilität bei hohen Ethanolkonzentrationen (96 % V/V). Der Grund hierfür könnte in einer Dehydratisierung des Stratum corneums verbunden mit einer Erhöhung des Diffusionswiderstandes gesehen werden (36, siehe auch Kapitel 1).

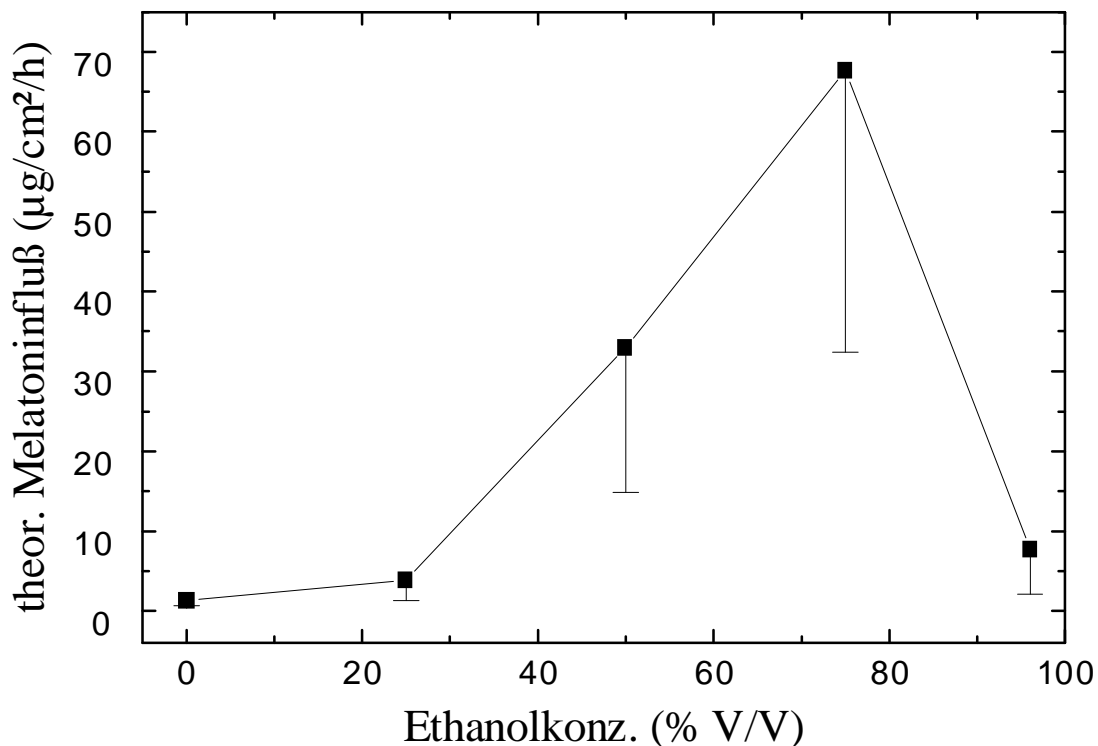


**Abb. 7:** Permeabilität von Humanhaut für Ethanol in Abhängigkeit der Ethanolkonzentration in der Donator-Halbzelle. Aufgetragen sind die Mittelwerte aus sechs Bestimmungen  $\pm$  Standardabweichung.

Die in Abbildung 7 präsentierten Daten zeigen eine sehr gute Übereinstimmung mit Literaturwerten (37), wodurch belegt wird, daß unter den gewählten Versuchsbedingungen reproduzierbare Resultate erzielt werden können.



Um die Abhängigkeit des transdermalen Melatoninflusses von der Ethanolkonzentration im Donator eindrucksvoll darzustellen, wurden theoretische Transportgeschwindigkeiten aus einer gesättigten Lösung von Melatonin im jeweiligen Lösungsmittelgemisch berechnet (Abbildung 8). Diese wurden dem Produkt aus Permeabilität und Sättigungslöslichkeit gleichgesetzt. Die Berechnung der Standardabweichungen erfolgte nach dem Verfahren von Fenner (38). Die erhaltenen Ergebnisse könnten auf Grund einer fehlenden Berücksichtigung thermodynamischer Effekte, welche abhängig vom Sättigungsgrad einer Lösung sind, von den wahren Werten abweichen. Die gewählte Art der Darstellung gewährleistet jedoch einen klaren Überblick über die Größenordnung des Melatoninflusses durch Humanhaut.



**Abb. 8:** Theoretischer Melatoninfluß durch Humanhaut berechnet für eine gesättigte Lösung des Hormons in verschiedenen Ethanol/Wasser-Mischungen.

Es zeigte sich, daß der transdermale Melatoninfluß bei einem Ethanolgehalt von 75 Volumenprozent einen maximalen Wert annimmt. Bei abnehmenden Ethanolkonzentrationen reduziert sich die theoretische Transportgeschwindigkeit um ein Vielfaches.

Ausgehend von diesen Betrachtungen wurden die angefertigten Reservoirpflaster mit einer nahezu gesättigten Lösung von Melatonin in einem Ethanol/Wasser-Gemisch mit einem Ethanolgehalt von 75 % (V/V) gefüllt. Die Dosierung der Füllung erfolgte über die Masse und betrug für die nachfolgend beschriebenen Systeme (Diffusionsfläche: 1,54 cm<sup>2</sup>)  $42,4 \pm 4,5$  mg des unter Material und Methoden beschriebenen Vehikels.

### Transportgeschwindigkeit unterschiedlicher Reservoirsysteme

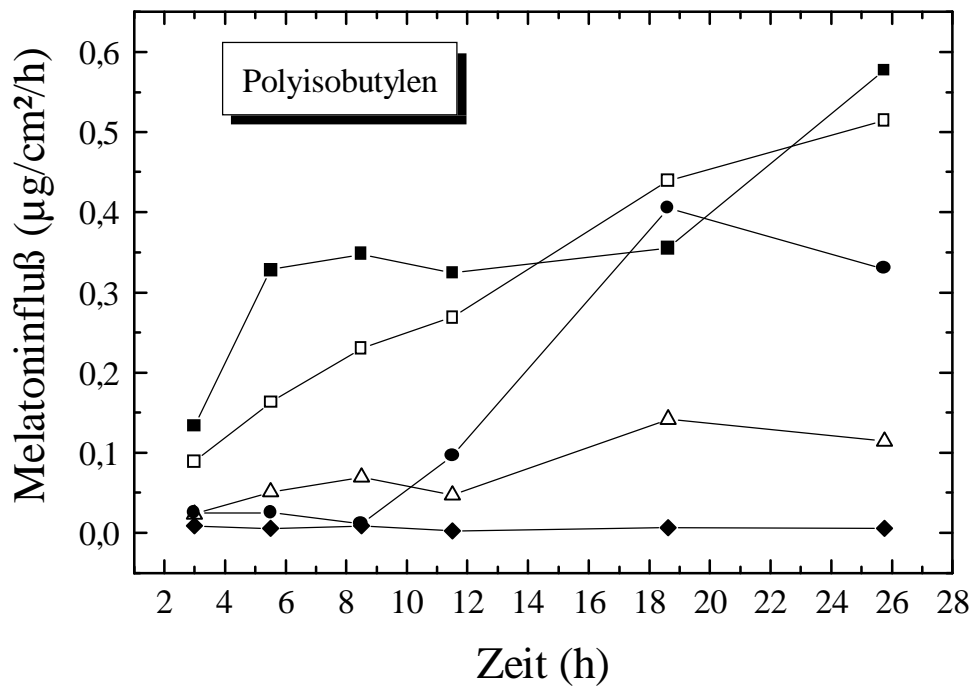
Die Erkenntnisse aus Kapitel 3 haben verdeutlicht, welchen Einfluß der verwendete Kleber auf die Wirkstofffreisetzung aus einem Reservoirsystem haben kann. Daher wurden in dieser Untersuchung drei unterschiedliche Kleber verwendet. Diese basierten auf unterschiedlichen Polymeren: Polyisobutylen (**I**), Silikon (**II**) und Polyacrylat (**III**).

Es sollte nun untersucht werden, ob die Systeme mit verschiedenen Klebern unterschiedliche Eigenschaften aufweisen und welches Design am ehesten geeignet ist, die besonderen Anforderungen an ein TTS zur transdermalen Applikation von Melatonin zu erfüllen.

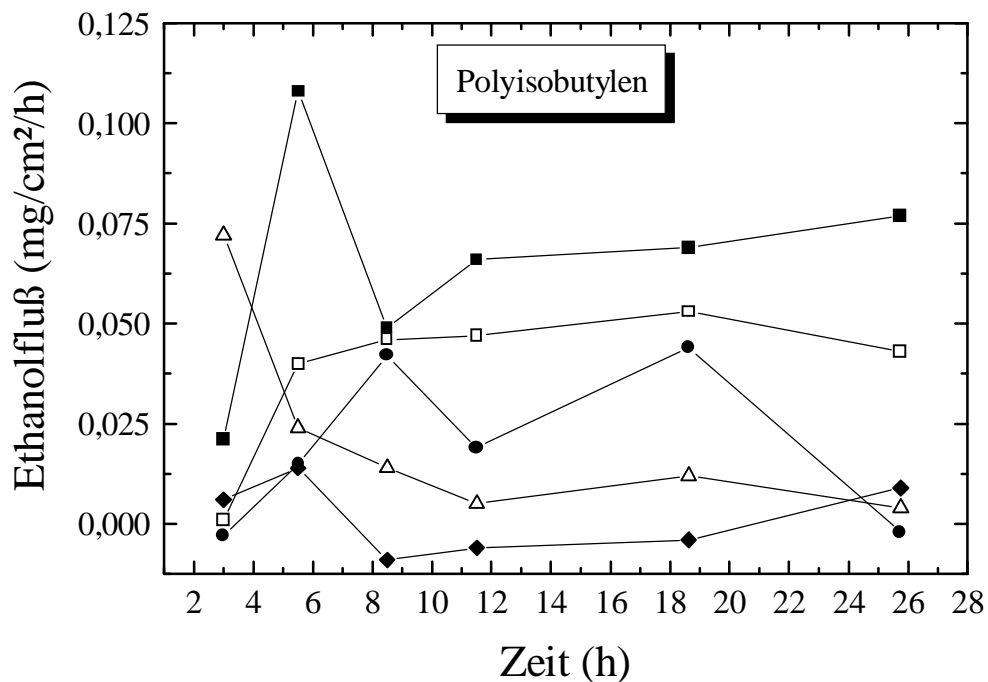
Um einen möglichst repräsentativen Überblick zu bekommen, wurden die Permeationsversuche mit Häuten unterschiedlicher Spender durchgeführt. Durch die simultane Messung von Melatonin- und Ethanoltransport konnte direkt bestimmt werden, ob eine Änderung der Ethanolkonzentration im Reservoir den Melatoninfluß beeinflusst.

Aus den kumulativ permeierten Mengen wurden die Transportgeschwindigkeiten für die entsprechenden Zeitintervalle berechnet.

In den Abbildungen 9 und 10 sind die transdermalen Flüsse für das System mit dem Polyisobutylenkleber (**I**) dargestellt.



**Abb. 9:** Transdermaler Melatoninfluß aus dem System I (Polyisobutylenkleber) in Abhängigkeit der Zeit an fünf verschiedenen Häuten bestimmt.



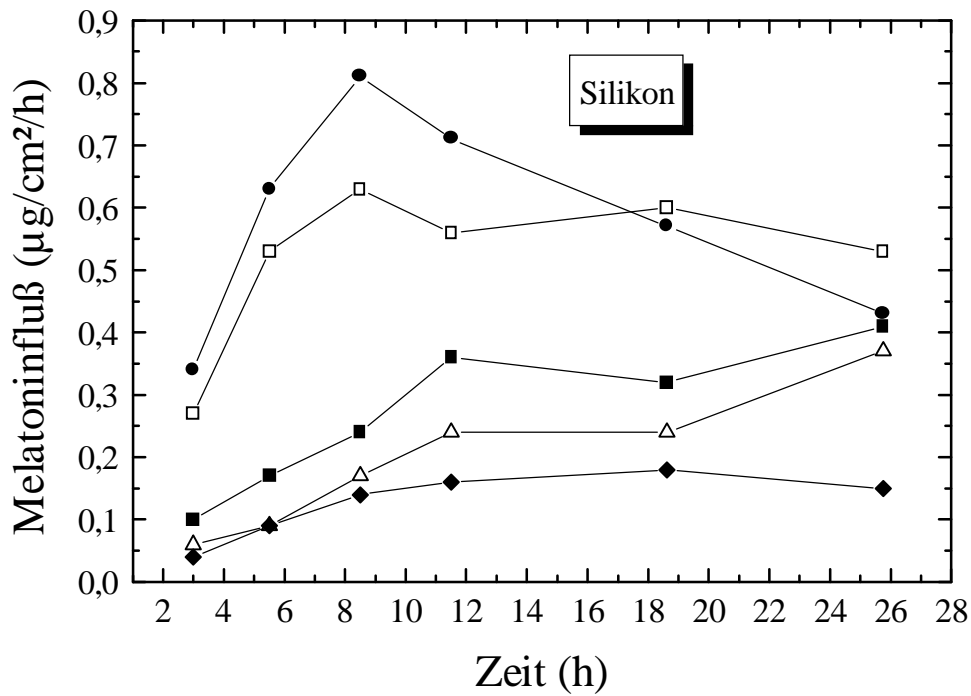
**Abb. 10:** Transdermaler Ethanolfluß aus dem System I (Polyisobutylenkleber) in Abhängigkeit der Zeit an fünf verschiedenen Häuten bestimmt.

Der Melatoninfluß durch die Haut nimmt im beobachteten Zeitraum in drei Versuchen zu, während er in zwei weiteren Versuchen relativ konstant bleibt (Abb. 9). Eine Reduktion der Transportgeschwindigkeit ist in keinem Fall zu erkennen. Dies läßt sich über den Ethanolfluß erklären (Abb. 10). Dieser ist äußerst gering und verändert sich über den gesamten Zeitraum nicht wesentlich, wodurch belegt wird, daß gegen Ende des Versuches nahezu die gesamte Menge an Ethanol im Reservoir verblieben ist. Daraus läßt sich ableiten, daß der verwendete Kleber nur eine sehr geringe Durchlässigkeit für Ethanol aufweist und somit für das Vorhaben, ein TTS zu entwickeln, welches das Lösungsmittel relativ schnell freisetzt, ungeeignet erscheint.

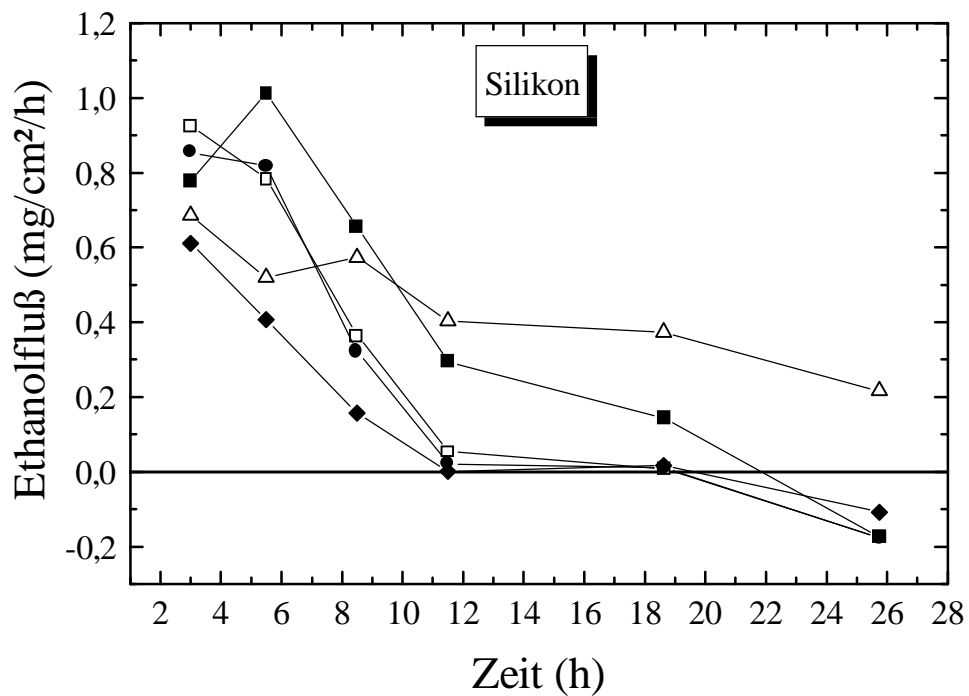
Für das System mit dem Silikonkleber (**II**) ergibt sich ein anderes Bild. Der Melatoninfluß ist vom Betrag her dem des Systems **I** vergleichbar und zeigt ebenfalls keine deutliche Abnahme über den Beobachtungszeitraum (Abb. 11). Der Ethanolfluß hingegen ist am Anfang wesentlich höher und reduziert sich mit fortlaufender Versuchsdauer drastisch (Abb. 12). Bei einigen Versuchen kommt der Ethanolfluß nach ca. 12 Stunden völlig zum Erliegen, was bedeutet, daß der gesamte Alkohol des Reservoirs über die Haut transportiert wurde.

Demnach sollte man eigentlich erwarten können, daß der Melatoninfluß sich ebenfalls stärker reduziert. Eine mögliche Erklärung für das Ausbleiben dieses Effektes ist, daß der Silikonkleber nur eine sehr geringe Permeabilität für Melatonin aufweist, die durch den Alkohol nicht deutlich verändert wird. Unter der Annahme einer idealen Membran könnte für gesättigte Lösungen, unabhängig von der absoluten Konzentration, ein gleichbleibender Massenfluß resultieren (39).

Zusammenfassend läßt sich auch für Typ **II** feststellen, daß dieses System unter den vorgegebenen Bedingungen nicht in der Lage ist, das natürliche Melatonin-Plasmaprofil zu erzeugen.



**Abb. 11:** Transdermaler Melatoninfluß aus dem System II (Silikonkleber) in Abhängigkeit der Zeit an fünf verschiedenen Häuten bestimmt.

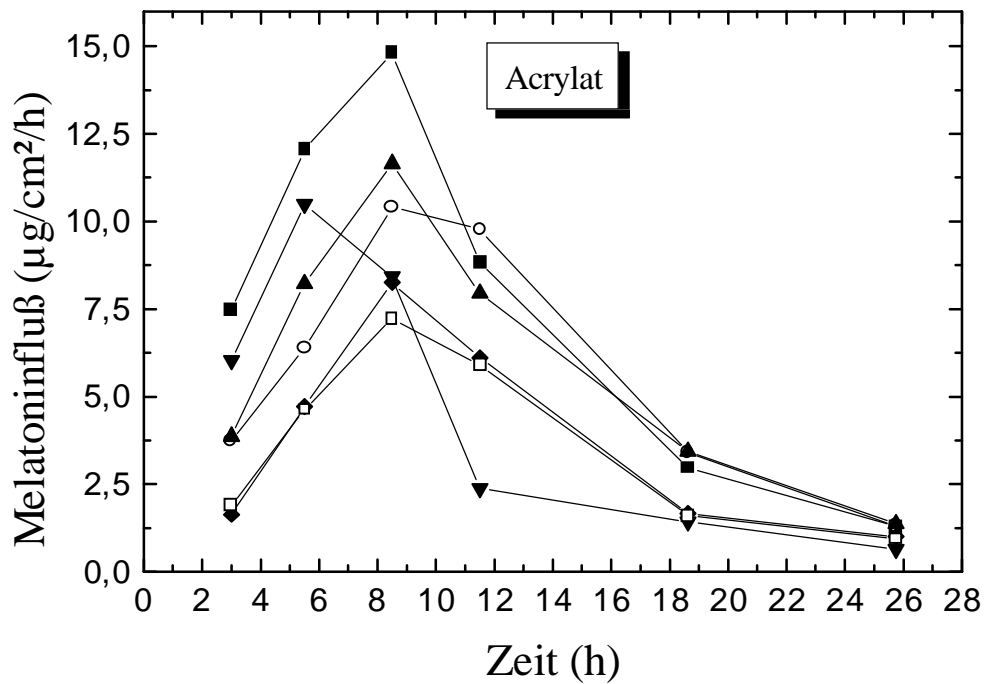


**Abb. 12:** Transdermaler Ethanolfluß aus dem System II (Silikonkleber) in Abhängigkeit der Zeit an fünf verschiedenen Häuten bestimmt.

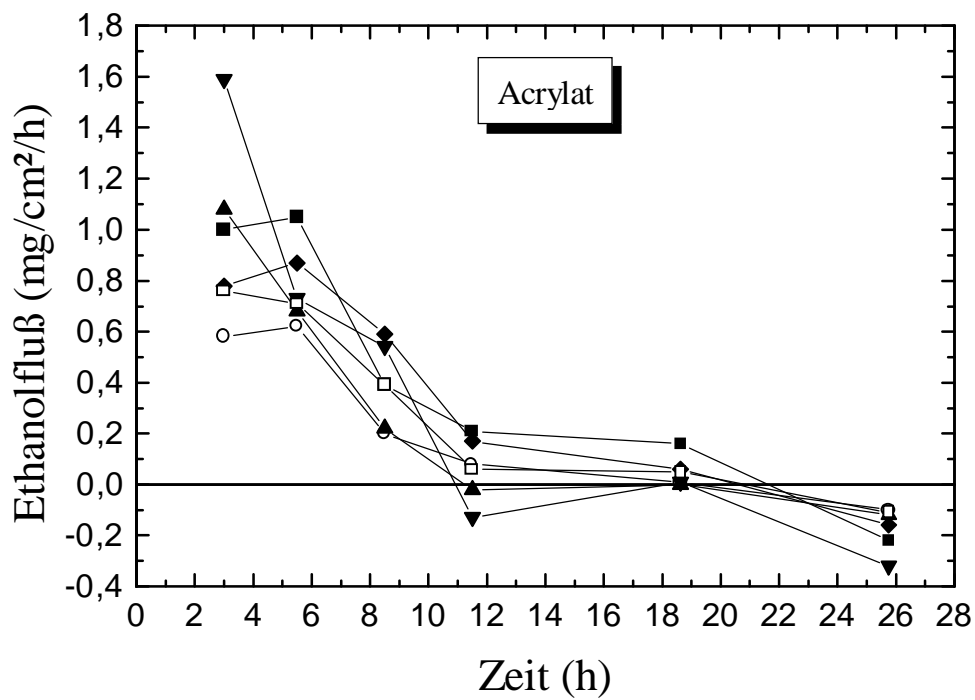
Demgegenüber zeigten die Pflaster mit dem Acrylatkleber (**III**) wesentlich günstigere Eigenschaften in Bezug auf eine praktische Anwendung. Der Melatoninfluß durch die Haut steigt nach der Applikation an und erreicht nach ca. acht Stunden bei fast allen Versuchen ein Maximum (Abb. 13). Die absoluten Werte liegen um ein Vielfaches über denen der Systeme **I** und **II**. Nach Erreichen des Maximums fallen die Transportgeschwindigkeiten deutlich ab. Unterschiede in Höhe und Steilheit des Flußprofils entstehen durch die Verwendung der Haut verschiedener Spender.

Betrachtet man den zeitlichen Verlauf des Ethanolflusses für dieses System in Abbildung 14, so läßt sich feststellen, daß die Transportgeschwindigkeit im beobachteten Zeitraum stetig abnimmt und nach 12 bis 18 Stunden zum Erliegen kommt. Folglich ist zu diesem Zeitpunkt die gesamte Menge an Ethanol in den Akzeptor diffundiert. Das Auftreten negativer Werte ist durch Messungenauigkeiten bedingt oder könnte über den Verlust von Ethanol durch Evaporation erklärt werden.

Das beobachtete Flußprofil für Typ **III** scheint am ehesten den Ansprüchen an ein System zur transdermalen Applikation von Melatonin zu genügen. Von daher wurde es für weitergehende Betrachtungen ausgewählt.



**Abb. 13:** Transdermaler Melatoninfluß aus dem System **III** (Acrylatkleber) in Abhängigkeit der Zeit an sechs verschiedenen Häuten bestimmt.



**Abb. 14:** Transdermaler Ethanolfluß aus dem System **III** (Acrylatkleber) in Abhängigkeit der Zeit an sechs verschiedenen Häuten bestimmt.

Aus den bisherigen Ergebnissen läßt sich schlußfolgern, daß für ein ethanolhaltiges Reservoirsystem mit einer mikroporösen Membran die Auswahl des Kontaktklebers ein große Rolle in bezug auf die Eigenschaften des Pflasters spielt.

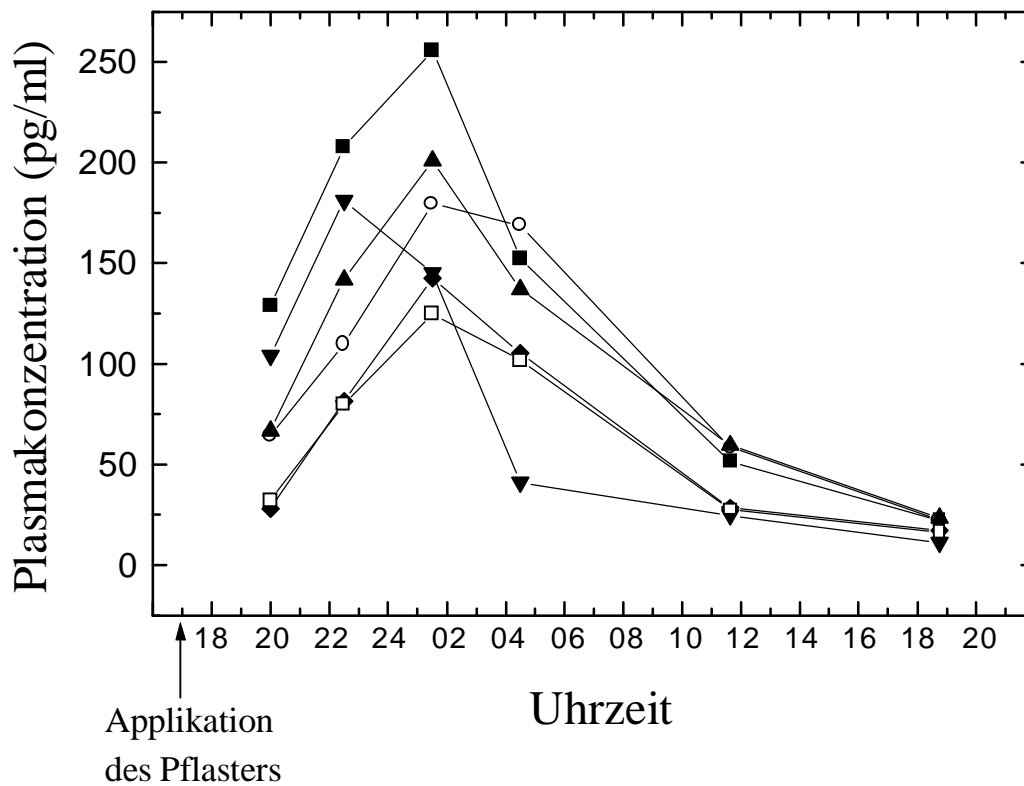
Während die verwendeten Silikon- und Acrylatkleber eine hohe Permeabilität für Ethanol aufweisen, erlaubt nur der Acrylatkleber einen ausreichend großen Melatoninfluß durch die Haut. Eine andere Studie wies für die in vitro-Freisetzung von Ketorolac aus verschiedenen TTS ebenfalls eine höhere Durchlässigkeit eines Acrylatklebers im Vergleich zu einem Silikonkleber auf (40).

Der Polyisobutylkleber zeigte hingegen für beide Substanzen nur eine geringe Durchlässigkeit und stellt, ähnlich dem Reservoirsystem zur Applikation von Estradiol, die permeationskontrollierende Barriere dar.

### Theoretische Melatonin-Plasmaspiegel

Nach dem bewährten Verfahren zur Berechnung von Blutspiegeln aus transdermalen Transportraten von TTS wurden aus den, in Abbildung 13 dargestellten, Kurven theoretische Plasmakonzentrationen berechnet. In Abbildung 15 sind die Verläufe dieser Plasmaspiegel dargestellt. Auf der x-Achse wurde die Tageszeit aufgetragen, wobei die Applikation eines Pflasters mit einer Diffusionsfläche von  $1 \text{ cm}^2$  für 17 Uhr angenommen wurde.





**Abb. 15:** Theoretische Melatonin-Plasmaspiegel mit Hilfe von Gleichung 1 aus den transdermalen Flüssen des Systems **III** berechnet.

Demnach würde die Plasmakonzentration gegen 20 Uhr ansteigen und gegen ca. zwei Uhr ein Maximum erreichen. Anschließend würden die Blutspiegel abfallen, um am Vormittag wieder das Niveau von 20 Uhr zu erreichen. Die absolute Höhe der Spiegel läßt sich über die Pflasterfläche variieren.

Dieses Profil kommt dem der natürlichen Melatoninproduktion schon sehr nahe. Lediglich ein leichter Überhang in den Morgenstunden ist bei den künstlich erzeugten Spiegeln zu erwarten.

Insgesamt betrachtet weist das entwickelte TTS aber deutliche Vorteile zu allen anderen, bisher in der Literatur beschriebenen Systemen auf. Weder mit einem anderen Reservoirsystem (26) noch mit einem matrixkontrollierten TTS (2) ließ sich ein ähnliches, glockenförmiges Plasmaprofil erzeugen. Die Pflaster mußten in beiden Fällen von der Haut entfernt werden, um ein Absinken der Plasma-

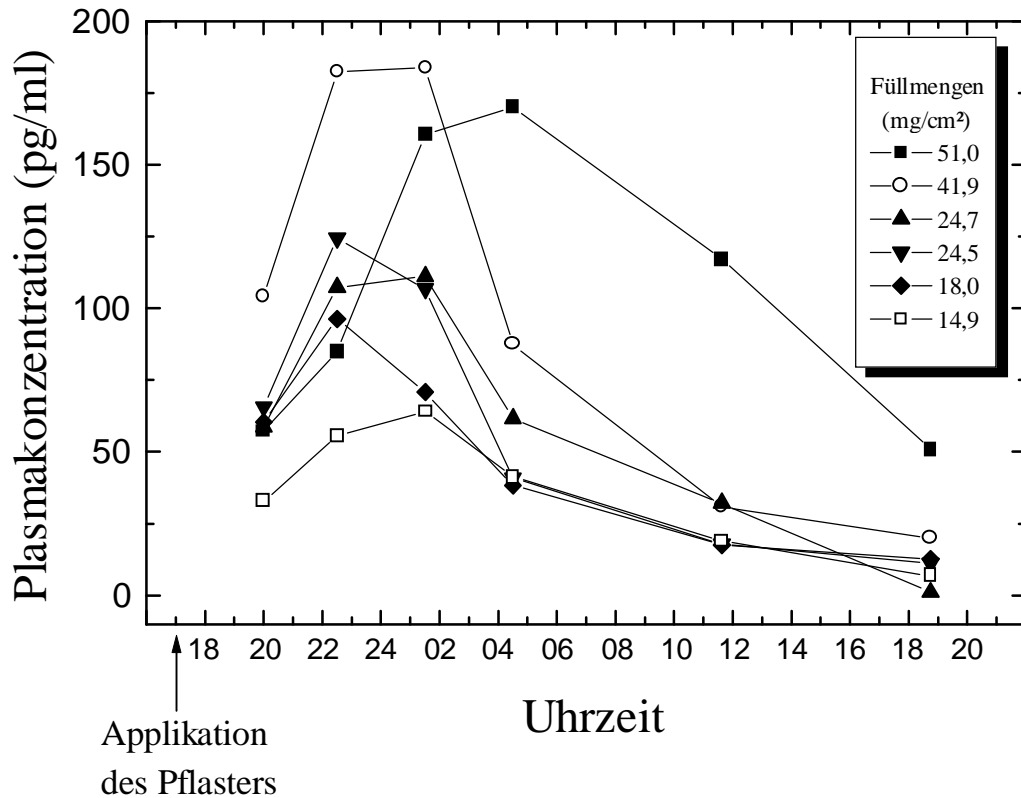
konzentrationen zu erreichen. Für das Matrixsystem war selbst 14 Stunden nach Entfernung des TTS noch ein stark erhöhter Melatoninspiegel zu verzeichnen. Ähnliches gilt für ein buccales Applikationssystem, welches als günstigste Form propagiert wird (2). Auch hier war eine Abnahme des Systems notwendig, welche um sechs Uhr morgens erfolgte, woraufhin der Plasmaspiegel erst gegen 14 Uhr das vorabendliche Niveau erreichte.

### Einfluß der Füllmenge auf die AUC

Bei den bisherigen Versuchen war die Füllmenge im Reservoir und damit der absolute Ethanol- und Melatoningehalt für alle Systeme in etwa vergleichbar. In einem weiteren Versuch sollte der Einfluß der Reservoirfüllung für Typ **III** auf die theoretische AUC untersucht werden. Hierzu wurde für alle Versuche die Haut eines Spenders verwendet, um inter-individuelle Unterschiede in bezug auf die Permeabilität auszuschließen.

In Abbildung 16 sind die theoretischen Plasmaspiegel in Abhängigkeit der Tageszeit dargestellt.

Es lassen sich deutliche Unterschiede im Hinblick auf das Plasmaprofil erkennen. So fallen die Plasmaspiegel bei den Pflastern mit einem hohen absoluten Ethanolgehalt weniger steil ab. Auch das Maximum wird etwas später erreicht.



**Abb. 16:** Einfluß des absoluten Ethanolgehaltes auf das theoretische Melatonin-Plasmaprofil. Die Füllung setzte sich aus einer Lösung von 210 mg Melatonin pro ml Ethanol 75 % (V/V) mit einem 2 %igen Zusatz an Hydroxypropylcellulose zusammen.

Um den beobachteten Effekt genauer zu charakterisieren, wurden die pharmakokinetischen Parameter  $t_{\max}$ ,  $c_{\max}$  und AUC für den dargestellten Bereich berechnet.

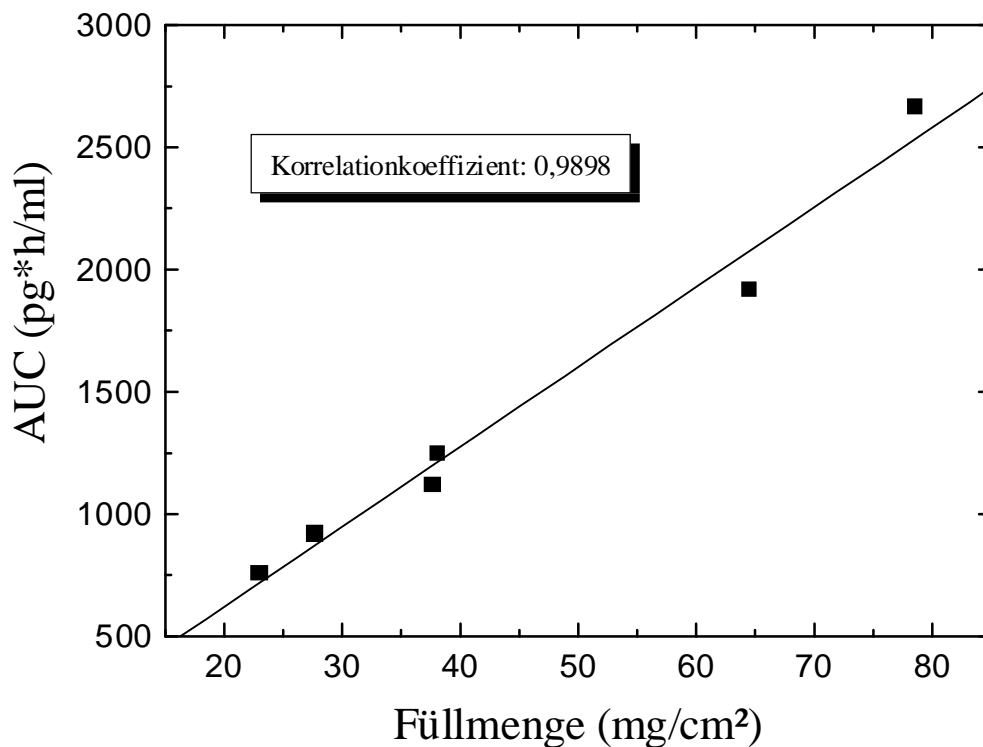
Eine Übersicht gibt Tabelle 2.

**Tab. 2:** Pharmakokinetische Parameter

Versuch	Füllmenge (mg/cm <sup>2</sup> )	t <sub>max</sub> (h)	c <sub>max</sub> (pg/ml)	AUC (pg*h/ml)
1	51,0	11,5	170,1	2663
2	41,9	8,5	183,9	1915
3	24,7	8,5	111,1	1246
4	24,5	5,5	124,2	1118
5	18,0	5,5	96,3	917
6	14,9	8,5	64,1	755

Es läßt sich ablesen, daß sowohl die maximale Höhe des Plasmaspiegels (c<sub>max</sub>) als auch die AUC klar von der Füllmenge des Reservoirs abhängen. Auch t<sub>max</sub> wird durch diesen Faktor in einem gewissen Maße beeinflusst.

Eine Auftragung der ermittelten AUC gegen die Füllmenge sollte den Zusammenhang genauer belegen (Abb. 17).



**Abb. 17:** Zusammenhang zwischen der Füllmenge im Reservoir und der ermittelten Fläche unter der Plasmakonzentrationskurve.

Es resultierte eine lineare Korrelation mit einem Koeffizienten von 0,99. Dies belegt eindeutig die Abhängigkeit des zu erwartenden Plasmaprofiles von der Ethanolmenge im Reservoir.

Für die Praxis würde dies bedeuten, daß ein Pflaster mit einer Füllmenge von über 40 mg/cm<sup>2</sup> weniger geeignet erscheint, da es den Wirkstoff über einen zu langen Zeitraum freisetzt. Demnach wären die Plasmaspiegel am Folgetag noch zu hoch. Füllmengen unter 20 mg/cm<sup>2</sup> reichen eventuell nicht aus, um einen ausreichend hohen Plasmapeak zu erzeugen. Ideal erscheint nach den vorliegenden Daten eine Füllung des Reservoir mit 20 bis 30 mg/cm<sup>2</sup> des gewählten Vehikels.

Es sollte jedoch auch bedacht werden, daß die verwendete Haut einen Einfluß auf den Ethanolfluß und somit auf das zu erwartende Melatonin-Plasmaprofil haben kann.

Letztendlich haben die vorliegenden Untersuchungen aber gezeigt, daß es möglich ist, ein TTS zu entwickeln, das Melatonin einer zirkadianen Rhythmik folgend freisetzt.

Ein ähnlicher Versuch wurde für die transdermale Applikation von Testosteron unternommen (41,42). Auch hier konnte eine weitgehend Simulation des natürlichen Testosteron-Plasmaspiegels erreicht werden, wobei dieser jedoch einer Glockenkurve über einem 24stündigen Intervall gleicht. Folglich war in diesem Fall eine länger andauernde Freisetzung des Wirkstoffes erwünscht.

### **Schlußfolgerungen**

Die diskutierten Untersuchungen belegen, daß es möglich ist, den zirkadianen Rhythmus der Melatoninsekretion im menschlichen Körper mit Hilfe eines Transdermalen Therapeutischen Systems (TTS) weitgehend nachzuvollziehen. Damit eröffnet sich die Chance, einen nachweislich nebenwirkungsarmen

Arzneistoff in der Therapie von Schlafstörungen und Phasenverschiebungen, welche z. B. beim sogenannten „jet-lag“ auftreten, einzusetzen.

Die Invasionskinetik des TTS, welche entscheidend für dessen Vorteile gegenüber anderen Applikationsformen in dieser Therapierichtung ist, hängt maßgeblich von der Auswahl der Pflasterkomponenten und der Zusammensetzung des Reservoirs ab. Mit Hilfe von Ethanol, einem weit verbreiteten und gut verträglichen Enhancer (43,44), läßt sich ein TTS konstruieren, bei dem der Melatoninfluß auf Grund der zeitlichen Änderung der Ethanolkonzentration im Reservoir ein glockenförmiges Profil aufweist.

Über die Pflasterfläche und die Menge an Ethanol im Reservoir lassen sich die Plasmaprofile in bezug auf die absolute Konzentration und den zeitlichen Verlauf variieren.

Während die Reservoirsysteme im Hinblick auf das Erreichen konstanter Plasmaspiegel, wie es bei der Estrogensubstitution gewünscht ist, eher Nachteile gegenüber den Matrixsystemen aufweisen (siehe Kapitel 2 und 3), belegt die vorliegende Arbeit die Vorteile solcher Systeme in bezug auf pulsformige Freisetzungen.

### **Literaturverzeichnis**

1. A. Brzezinski. Melatonin in humans. *N. Engl. J. Med.* 336: 186-195 (1997)
2. L. Benes, B. Claustrat, F. Horriere, M. Geoffriau, J. Konsil, K. A. Parrot, G. DeGrande, R. L. McQuinn, and J. W. Ayres. Transmucosal, oral controlled-release, and transdermal drug administration in human subjects: A crossover study with melatonin. *J. Pharm. Sci.* 86: 1115-1119 (1997)
3. H. Iguchi, K. Kato, and H. Ibayashi. Age-dependent reduction in serum melatonin concentration in healthy human subjects. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 55: 27-29 (1982)
4. G. J. Maestroni. The immunoneuroendocrine role of melatonin. *J. Pineal Res.* 14: 1-10 (1993)

5. M. W. Wichmann, R. Zellweger, A. Ayala, and I. H. Chaudry. Melatonin administration attenuates depressed immune functions trauma-hemorrhage. *J. Surg. Res.* 63: 256-262 (1996)
6. P. Lissoni, S. Barni, S. Meregalli, V. Fossati, M. Cazzaniga, D. Eposti, and G. Tancini. Modulation of cancer endocrine therapy by melatonin: A phase II study of tamoxifen plus melatonin in metastatic breast cancer patients progressing under tamoxifen alone. *Br. J. Cancer* 71: 854-856 (1995)
7. S. M. Hill, L. L. Spriggs, M. A. Simon, H. Muraoka, and D. E. Blask. The growth inhibitory action of melatonin on human breast cancer cells is linked to the estrogen response system. *Cancer Lett.* 10: 249-256 (1992)
8. R. J. Reiter, D. Melchiorri, E. Sewerynek, B. Poeggeler, L. Barlow-Walden, J. Chuang, G. G. Ortiz, and D. Acuna-Castroviejo. A review of the evidence supporting melatonin's role as an antioxidant. *J. Pineal Res.* 18: 1-11 (1995)
9. K. Lushington, L. Lack, and D. Dawson. Melatonin production in good and poor elderly sleepers. *Sleep Res.* 24A: 168 (1995)
10. J. G. McFarlane, J. M. Cleghorn, G. M. Brown, and D. L. Streiner. The effects of exogenous melatonin on the total sleep time and daytime alertness of chronic insomniacs: A preliminary study. *Biol. Psychiatry* 30: 371-376 (1991)
11. F. Waldhauser, B. Saletu, and I. Trinchard-Lugan. Sleep laboratory investigations on hypnotic properties of melatonin. *Psychopharmacol.* 100: 222-226 (1990)
12. I. Haimov, P. Lavie, M. Laudon, P. Herer, C. Vigder, and N. Zisapel. Melatonin replacement therapy of elderly insomniacs. *Sleep* 18: 598-603 (1995)
13. I. Haimov and P. Lavie. Potential of melatonin replacement therapy in older patients with sleep disorders. *Drugs & Aging* 7: 75-78 (1995)
14. D. Garfinkel, M. Laudon, D. Nof, and N. Zisapel. Improvement of sleep quality in elderly people by controlled-release melatonin. *Lancet* 346: 541-544 (1995)
15. D. Garfinkel, M. Laudon, and N. Zisapel. Improvement of sleep quality by controlled-release melatonin in benzodiazepin-treated elderly insomniacs. *Arch. Gerontol. Geriatr.* 24: 223-231 (1997)
16. D. Dawson and N. Encel. Melatonin and sleep in humans. *J. Pineal Res.* 15: 1-12 (1993)
17. S. Folkard, J. Arendt, and M. Clark. Can melatonin improve shift workers' tolerance of the night shift? Some preliminary findings. *Chronobiol. Int.* 10: 315-320 (1993)

18. J. M. Arendt, M. Aldhous, J. English, and V. Marks. The effect of jet-lag and their alleviation by melatonin. *Ergonomics* 30: 1379-1393 (1987)
19. D. Dawson and S. M. Armstrong. Chronobiotics-drugs that shift rhythms. *Pharmacol. Ther.* 69: 15-36 (1996)
20. R. L. Sack, A. J. Lewy, M. L. Blood, J. Stevenson, and L. D. Keith. Melatonin administration to blind people: Phase advances and entrainment. *J. Biol. Rhythms* 6: 249-261 (1991)
21. A. Cagnacci, J. A. Elliott, and S. S. C. Yen. Melatonin. A major regulator of the circadian rhythm of core body temperature in humans. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 75: 447-452 (1992)
22. S. P. James, W. B. Mendelson, D. A. Sack, N. E. Rosenthal, and T. A. Wehr. The effect of melatonin on normal sleep. *Neuropsychopharmacol.* 1: 41-44 (1987)
23. E. A. Lane and H. B. Moss. Pharmacokinetics of melatonin in man: First pass hepatic metabolism. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 61: 1214-1216 (1985)
24. M. Aldhous, C. Franey, J. Wright, and J. Arendt. Plasma concentrations of melatonin in man following oral absorption of different preparations. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 19: 517-521 (1985)
25. F. Waldhauser, M. Waldhauser, H. R. Liebermann, M. H. Deng, H. J. Lynch, and R. J. Wurtman. Bioavailability of oral melatonin in humans. *Neuroendocrinol.* 39: 307-313 (1984)
26. B. J. Lee, K. A. Parrot, J. W. Ayres, and R. L. Sack. Preliminary evaluation of transdermal delivery of melatonin in human subjects. *Res. Comm. Mol. Pathol. Pharmacol.* 85: 337-346 (1994)
27. F. E. Yates, L. T. Taskovich, S. L. Yum, and N. M. Crisologo. Controlled transdermal administration of melatonin. US Patent 5508039
28. J. Konsil, K. A. Parrot, and J. W. Ayres. Development of a transdermal delivery device for melatonin: In vitro study. *Drug Develop. Ind. Pharm.* 21: 1377-1387 (1995)
29. R. L. Bronaugh, R. F. Stewart, and M. Simon. Methods for in vitro percutaneous absorption studies VII. Use of excised human skin. *J. Pharm. Sci.* 75: 1094-1097 (1986)
30. E. W. Smith and J. M. Haigh. In vitro systems for the assessment of drug release from topical formulations and transmembrane permeation. In: R. L. Bronaugh and H. I. (Eds.). *Maibach. Percutaneous absorption.* Marcel Dekker, New York, 1985, pp. 465-510
31. U. D. Rohr, R. Altenburger, and T. Kissel. Kinetics of the transdermal reservoir membrane system delivering  $\beta$ -estradiol: In vitro/in vivo correlation. *Pharm. Res.* 15: 875-884 (1998)



- 
32. C. Mallo, R. Zaidan, G. Galy, E. Vermeulen, J. Brun, G. Chazot, and B. Claustrat. Pharmacokinetics of melatonin in man after intravenous infusion and bolus injection. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 38: 297-301 (1990)
  33. W. R. Good, M. S. Powers, P. Campbell, and L. Schenkel. A new transdermal delivery system for 17  $\beta$ -Estradiol. *J. Contr. Rel.* 2: 89-94 (1985)
  34. M. Rowland and T. N. Tozer. *Clinical pharmacokinetics-concepts and applications.* Lea and Febiger (1980)
  35. C. S. Shida, A. M. Castrucci, and M. T. Lamy-Freund. High melatonin solubility in aqueous medium. *J. Pineal Res.* 16: 198-201 (1994)
  36. B. Berner, R. H. Juang, and G. C. Mazzenga. Ethanol and water sorption into stratum corneum and model systems. *J. Pharm. Sci.* 78: 472-476 (1989)
  37. T. Kurihara-Bergstrom, K. Knutson, L. J. DeNoble, and C. Y. Goates. Percutaneous absorption enhancement of an ionic molecule by ethanol-water systems in human skin. *Pharm. Res.* 7: 762-766 (1990)
  38. L. Sachs. *Statistische Auswertungsmethoden.* 3. Aufl., Springer Verlag Berlin, Heidelberg, New York, 1972, pp. 76-78
  39. T. Higuchi. Physical chemical analysis of percutaneous absorption process from creams and ointments. *J. Soc. Cosmet. Chem.* 11: 85-97 (1960)
  40. S. R. Roy and E. Manoukian. Transdermal delivery of ketorolac tromethamine: Permeation enhancement, device design, and pharmacokinetics in healthy humans. *J. Pharm. Sci.* 84: 1190-1196 (1995)
  41. N. A. Mazer, W. E. Heiber, J. F. Moellmer, A. W. Meikle, J. D. Stringham, S. W. Sanders, K. G. Tolman, and W. D. Odell. Enhanced transdermal delivery of testosterone: A new physiological approach for androgen replacement in hypogonadal men. *J. Contr. Rel.* 19: 347-362 (1992)
  42. A. Misra, R. Pal, S. S. Majumdar, G. P. Talwar, and O. Singh. Biphasic testosterone delivery profile with two different transdermal formulations. *Pharm. Res.* 14: 1264-1268 (1997)
  43. M. Ponec, M. Haverkort, Y. L. Soei, J. Kempenaar, and H. Bodde. Use of human keratinocyte and fibroblast cultures for toxicity studies of topically applied compounds. *J. Pharm. Sci.* 79: 312-316 (1990)
  44. H. E. Bodde, J. Verhoeven, and L. M. J. van Driel. Compliance of transdermal drug delivery systems. *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Systems* 6: 87-115 (1989)

## **Teil II**

# **HaCaT: Ein Zellkulturmodell zur Untersuchung des Hautmetabolismus von Steroiden**

## **Kapitel 5**

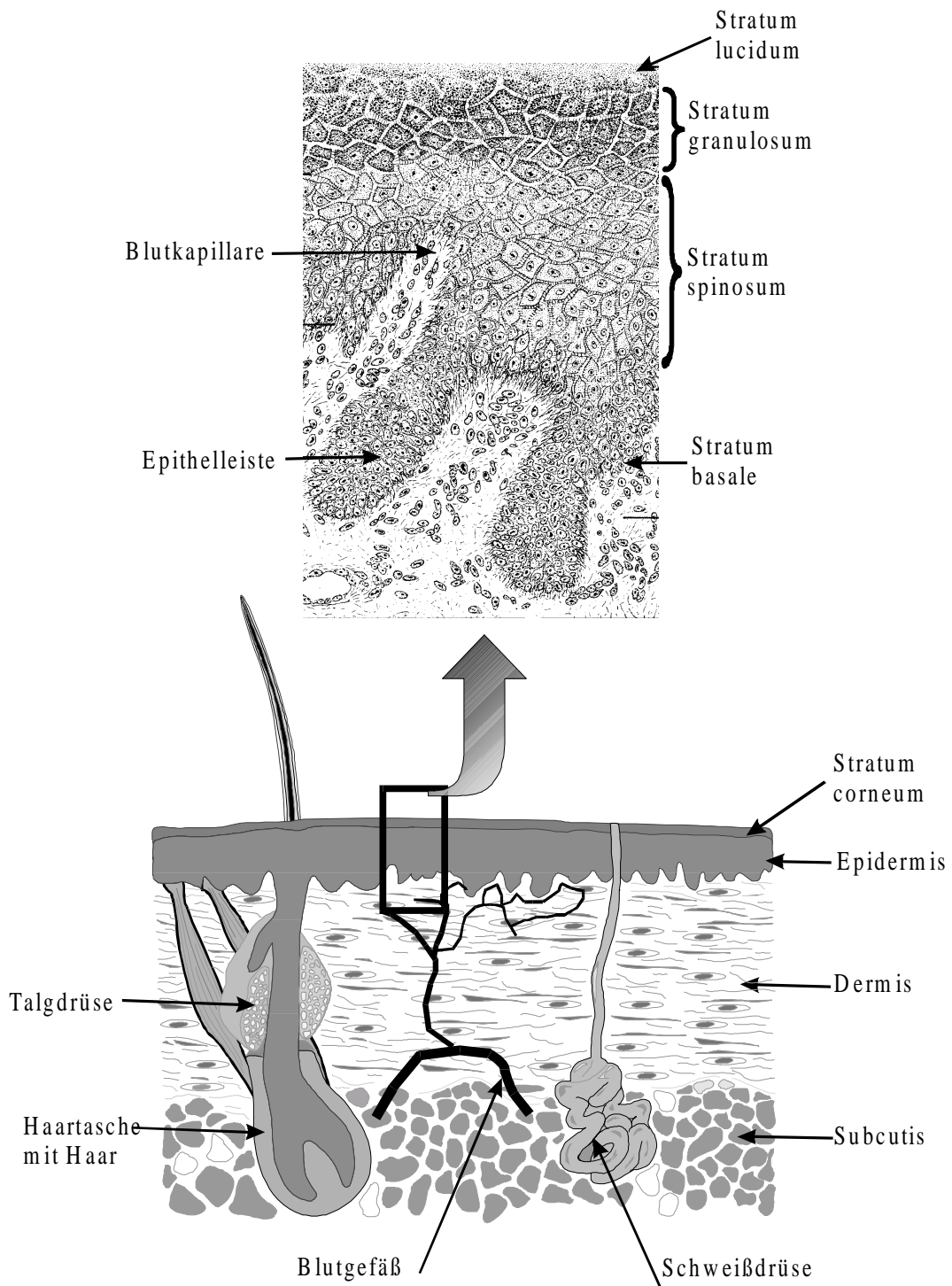
### **Einleitung**

## **5.1 Anatomie der Haut**

Die Haut stellt mit einer Oberfläche von ca. 2 m<sup>2</sup> und einem Anteil von 10% des Körpergewichtes eines der größten Organe des menschlichen Körpers dar (1). Lange Zeit hat man dieses Gewebe als eine Art lebende Schutzhülle für den Körper angesehen, die das Eindringen von Fremdstoffen ebenso wie den Verlust körpereigener Substrate (Wasser und Nährstoffe) verhindert (2). Der Umstand, daß diese Hülle eine gewisse Permeabilität aufweist, wurde erst zu Beginn dieses Jahrhunderts realisiert und nachfolgend in einer Reihe systematischer Untersuchungen belegt (3).

Das Augenmerk war im folgenden Zeitraum aus medizinischer oder pharmazeutischer Sicht einzig auf die Überwindung dieser Barriere gelegt, um Arzneistoffe einer lokalen oder systemischen Wirkung nach topischer Applikation zugänglich zu machen. Seit ca. 20 Jahren hat sich jedoch herauskristallisiert, daß es auch eine metabolische Aktivität in der Haut gibt (4). Um diese Funktion genauer charakterisieren zu können, ist es notwendig, die Anatomie der Haut zu betrachten.

In Abbildung 1 ist der Aufbau der Haut schematisch dargestellt. Die äußerste Schicht, die Epidermis, weist eine Dicke von 40 µm (Augenlid) bis 1,6 mm (Fußsohle) auf. Sie gliedert sich in fünf Schichten, von denen vier aus vitalen Zellen bestehen. Der in der lebenden Epidermis vorrangig auftretende Zelltyp wird durch die Keratinozyten repräsentiert. Diese entstehen aus den Basalzellen, die sich in Stammzellen und Keratinozyten teilen. Die Keratinozyten wandern dann während eines ca. 30-tägigen Differenzierungsprozesses nach außen, wobei sie die Synthese von Keratinen, Involucrin und  $\gamma$ -Transglutaminase aufnehmen, alles Faktoren, welche für die Verhornung der Zellen in den äußeren Schichten der Epidermis verantwortlich sind. Daneben treten melaninproduzierende Melanozyten, verantwortlich für die Pigmentierung der Haut, immunkompetente Langerhanszellen und Merkelzellen auf, die vermutlich als eine Art Tastrezeptoren fungieren.



**Abb. 1:** Anatomie der Haut mit Ausschnittsvergrößerung der Epidermis

Das **Stratum corneum**, die äußerste Hautschicht, bestehend aus vollständig verhornten, kernlosen Zellen, den Korneozyten, stellt die hauptsächliche Diffusionsbarriere für topisch applizierte Stoffe dar (5).

Das **Stratum lucidum** besteht aus stark lichtbrechenden Zellen, die ölähnliches Elaidin enthalten. Im sich anschließenden **Stratum granulosum** lagern die Zellen Ceramide in Keratinosomen ein, welche eine wichtige Rolle für die Barrierefunktion des Stratum corneums spielen. Das **Stratum spinosum** ist aus polygonalen Zellen aufgebaut, die über Plasmabrücken, sogenannte Desmosomen, verbundenen sind. Die innerste Schicht, das **Stratum basale**, bestehend aus zylindrischen Zellen mit ovoiden Kernen, ist vorrangig für die Regeneration der Epidermis verantwortlich.

An die Epidermis schließt sich die **Dermis**, auch Korium genannt, an. Diese ist aus sich kreuzenden, verflochtenen Kollagenfasern aufgebaut. Eingebunden in dieses kollagene Bindegewebe finden sich verschiedene Zellarten, von denen die Fibroblasten den größten Anteil ausmachen. Die Anhangsorgane Haarfollikel und Talgdrüsen bilden weitere Bestandteile dieses Gewebes. Hier treten auch Blutkapillaren auf, von denen ein transdermal applizierter Stoff aufgenommen werden kann und somit systemisch verfügbar wird. Die Dermis geht in die **Subcutis** über, welche ein lockeres Bindegewebe darstellt, in das zahlreiche Fettzellen integriert sind.

## 5.2 Metabolische Reaktionen in der Haut

Wie eingangs erwähnt, weiß man heute, daß es in der Haut eine metabolische Aktivität gibt, die für die Biotransformation einer Vielzahl von Stoffen verantwortlich ist. Eine Zusammenstellung nachgewiesener Enzymsysteme sowie deren Substrate gibt Tabelle 1.

**Tabelle 1:** Biotransformationen in der Haut (aus 6)

Reaktionstyp	Katalysierendes Enzym	Biotransformation
<b>Phase I-Reaktionen</b>		
Oxidationen	CP-450 abh. Mono-oxygenasen	Benzo[a]pyren → Phenole, Quinone, Dihydrole 7,12-Dimethylbenz[a]anthracen → 7-Hydroxy-12-methylbenz[a]anthracen Dehydroepiandrosteron → 7α/7β-OH-DHEA
	17β-Hydroxysteroid-dehydrogenase	Testosteron → Androsten-3,17-dion Hydrocortison → Cortison 17β-Estradiol → Estron
	Monoaminoxidase	Noradrenalin → Dehydroxymandelsäure
	Dopa-Decarboxylase	DOPA → Dopamin
	Anilin-Hydroxylase	Anilin → p-Aminophenol
	Adenosin-Desaminase	Vidarabin → β-D-Arabinofuranosyl Hypoxanthin
Reduktionen	Ketoreduktasen	Progesteron → Pregnandiol Phorbolmyristataacetat → Phorbololmyristataacetat Estron → 17β-Estradiol
	5α-Reduktase	Testosteron → 5α-Dihydrotestosteron Progesteron → 5α-Dihydroprogesteron
Hydrolysen	Epoxidhydratase	Styrenoxid → Styrenglycol
	Esterasen	Hydrocortison-17-ester → Hydrocortison Hydrocortison-21-ester → Hydrocortison Betamethason-17-valerat → Betamethason Difluorcortolonvalerat → Difluorcortolon Acetylsalicylsäure → Salicylsäure Benzoylperoxid → Benzoesäure p-Nitrobenzoesäureester → p-Nitrobenzoesäure Cromoglicinsäureester → Cromoglicinsäure Ester des Theophyllins → Theophyllin Ester des Metronidazols → Metronidazol
	Arylester-O-dealkylase	p-Nitroanison → p-Nitrophenol p-Nitrophenetol → p-Nitrophenol
<b>Phase II-Reaktionen</b>		
Methylierung	COMT	Noradrenalin → Normetanephrin
Glucuronidierung	Glucuronyltransferase	p-Aminophenol → p-Aminophenolglucuronid p-Nitrophenol → p-Nitrophenolglucuronid
Sulfatierung	Sulfotransferase	Dehydroepiandrosteron → DHEA-sulfat Δ5-Androsten-3β,17β-diol → Δ5-Androsten-3β,17β-diolsulfat

Sowohl Phase I-Reaktionen (Oxidationen, Reduktionen und Hydrolysen) als auch Phase II-Reaktionen, sogenannte Konjugationen, können in der Haut beobachtet werden.

Die frühen Studien des Hautmetabolismus waren hauptsächlich auf zwei Stoffgruppen fokussiert: Polycyclische aromatische Kohlenwasserstoffe (PAH), die wegen des bekannten kanzerogenen Potentials genauer untersucht wurden (7), und Steroidhormone, die ihre Wirkung zum Teil in der Haut entfalten (8-10).

### 5.2.1 Hautmetabolismus von Polycyclischen aromatischen Kohlenwasserstoffen

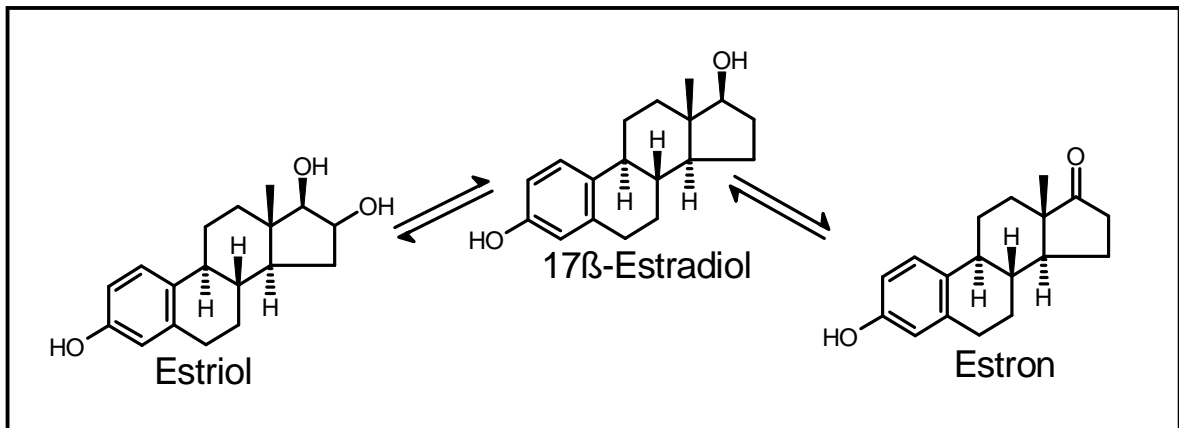
Im Zusammenhang mit dem Hautmetabolismus der PAH's ist bekannt, daß Benzo[a]pyren, ein Bestandteil des Steinkohlenteers, durch CP-450-abhängige Monooxygenasen, die Aryl-Kohlenwasserstoff-Hydroxylase (AHH) und die Epoxid-Hydrolase, in ein Di-epoxid überführt wird, das als alkylierend wirkendes ultimates Kanzerogen gilt (11). Dieser Reaktionsablauf wird für das gehäufte Auftreten von Hautkarzinomen in der Teerfarbenindustrie verantwortlich gemacht (12) und könnte in der dermatologischen Anwendung von Teershampoos sowie Teerverbänden eine Rolle spielen (13).

Von daher stellen diese Kohlenwasserstoffe die am besten beschriebene Substanzklasse in Bezug auf den Hautmetabolismus dar. Die Untersuchungen erfolgten in zahlreichen Modellen, wie Primärkulturen menschlicher (14,15) und tierischer (15,16) Keratinozyten, exzidiierter Humanhaut (17) sowie im lebenden Tier (18,19).

### 5.2.2. Hautmetabolismus von Steroidhormonen

Zahlreiche Studien belegen die umfangreichen Biotransformationsvorgänge von Steroiden in der menschlichen Haut (20) (siehe auch Tab. 1). Testosteron wird zu einer Vielzahl von aktiven und inaktiven Verbindungen metabolisiert (9,21,22) (Kapitel 7), während Estradiol zu den weniger aktiven Substanzen

Estron und Estriol verstoffwechselt wird (23) (Abb. 2). Dehydroepiandrosteron, ein Precursor der erstgenannten Hormone, erfährt ebenfalls eine Reihe unterschiedlicher Transformationen (20).



**Abb.2:** Biotransformation von Estradiol in der Haut (nach 23)

Der Hautmetabolismus von Steroiden spielt in zweierlei Hinsicht eine große Rolle:

Zum einen hat die transdermale Applikation von Steroiden im Rahmen der Hormonersatztherapie in den letzten Jahren stark an Bedeutung gewonnen. Neben den in Kapiteln 1 bis 3 genauer beschriebenen Systemen zur Behandlung postmenopausaler Symptome gewinnt auch die Substitution von Testosteron zunehmend an Bedeutung (24). Weiterhin gibt es Überlegungen, das Hormon Dehydroepiandrosteron auf dem transdermalen Wege zu substituieren, da dessen Blutspiegel mit zunehmenden Alter abnehmen. Das Hormon übt aber anscheinend positive Effekte in Bezug auf das Immunsystem (25) und die psychische Verfassung (26) aus.

Daraus ergibt sich die Notwendigkeit, die Biotransformation dieser Hormone in der Haut genauer zu untersuchen, um im Hinblick auf eine transdermale Anwendung abschätzen zu können, ob eventuell entstehende Metabolite Nebenwirkungen in der Haut hervorrufen könnten. Für das Erreichen



therapeutischer Blutspiegel ist es außerdem wichtig, in welchem Umfang die Steroide zu unwirksamen Metaboliten transformiert werden.

Der zweite Grund für die Bedeutung des Steroidmetabolismus in der Haut ist, daß diese Androgenrezeptoren aufweist und somit ein Zielorgan für die Hormone darstellt (27). So werden verschiedene pathologische Vorgänge, wie das Auftreten von Akne, idiopathischem Hirsutismus und androgenabhängiger Alopezie, der Wirkung von Androgenen zugeschrieben (27). Dabei spielt ein Metabolit des Testosterons, das Dihydrotestosteron (DHT), eine bedeutende Rolle als wirksames Agens. DHT besitzt eine wesentlich höhere Affinität zum Rezeptor als Testosteron selbst (28). Verantwortlich für diese Aktivierung ist die  $5\alpha$ -Reduktase, ein gewebsabhängig in zwei Isoenzymen auftretendes Hormon, das in der Haut vorrangig als Typ 1 Isoform exprimiert wird (27). Die erhöhte lokale Bildung von DHT begünstigt die o. g. Erkrankungen. Dies führt zu dem therapeutischen Konzept, die Aktivität der  $5\alpha$ -Reduktase in der Haut zu reduzieren.

Ausgehend von dieser Theorie ist eine Vielzahl von Substanzen synthetisiert worden, von denen die selektiven Inhibitoren des Isoenzym 1, also des kutanen Typs, MK 386 (29) und LY 191704 (30) am ehesten das Potential für eine therapeutische Anwendung aufweisen. Auch bestimmte Kationen, in erster Linie Zink und Kupfer, inhibieren dieses Isoenzym (31,32). Die Suche nach geeigneten Therapeutika ist aber noch lange nicht abgeschlossen, woraus folgt, daß neben der Synthese neuer Verbindungen die Charakterisierung des Enzyms und seiner Eigenschaften erforderlich ist. Dies unterstreicht die Bedeutung geeigneter Modelle zur Untersuchung des Hautmetabolismus.

### **5.3 Lokalisation der Enzymsysteme**

Zahlreiche Studien beschäftigen sich mit der genauen Verteilung der enzymatischen Aktivität, wobei entweder zwischen den Hautschichten Epidermis und Dermis unterschieden wird, oder isolierte Zellfraktionen auf ihre metabolische Kapazität hin untersucht werden.

In den ersten Arbeiten zu diesem Thema wurde mit Hilfe histologischer Techniken eine Enzymtätigkeit in der Epidermis und den Hautanhangsorganen Haarfollikel, Talg- und Schweißdrüsen festgestellt (33).

Aus einer Vielzahl nachfolgender Arbeiten läßt sich ableiten, daß die metabolische Kapazität der Epidermis die der Dermis übersteigt. So ist die AHH-Aktivität in der Epidermis von Ratten und Mäusen bis zu fünf mal größer (18,34,35). Ähnliches gilt für das Auftreten von unspezifischen Esterasen (36,37), die Oxidation von  $\beta$ -Estradiol zu Estron, vermittelt durch die 17- $\beta$ -Hydroxysteroiddehydrogenase (38) sowie für die Catechol-O-Methyltransferase (COMT), welche Adrenalin und Noradrenalin inaktiviert (39).

In den Anhangsorganen der Haut, wie Haarfollikeln und Talgdrüsen, läßt sich ebenfalls ein verstärktes Auftreten bestimmter Enzyme nachweisen. So ist hier die Aktivität steroidmetabolisierender Enzyme (40-42) und CP-450 abhängiger Monooxygenasen (43) stark ausgeprägt.

Nur wenige Autoren berichten von einer höheren metabolischen Kapazität der Dermis. Eine Arbeitsgruppe hat starke Aktivitäten von CP-450 in dieser Schicht aufgezeigt, wobei jedoch anzumerken ist, daß die Dermis in diesem Falle Talgdrüsen enthielt, die mit Sicherheit zum erhöhten Umsatz beitragen (44).

Andere Autoren argumentieren, daß das metabolische Potential der Dermis dasjenige der Epidermis übersteigt, wenn man die Aktivität, statt auf die Masse oder den Proteingehalt, direkt auf die Fläche der Haut bezieht (45). Hier kommt zum tragen, daß die Dermis wesentlich dicker ist und somit eine größere absolute Masse aufweist.

Für die praktische Anwendung dürfte dies aber ohne Belang sein, da transdermal applizierte Substanzen nur einen geringen Teil der Dermis permeieren, bevor sie von den hier auftretenden Kapillaren aufgenommen werden.

Neben der Unterscheidung von Hautschichten ist auch die Aktivität in verschiedenen Zellarten eines Gewebes von Interesse. Hierbei spielt sowohl der Zelltyp selbst als auch der Differenzierungsgrad der Zelle eine Rolle.

Die Zellen werden nach enzymatischer Separation mit Trypsin oder Pronase mittels einer Zentrifugation im Dichtegradienten aufgetrennt (46,47). Sowohl für die Oxidation, katalysiert durch AHH, als auch für die Konjugation mit Glucuronsäure mittels UDP-Glucuronyltransferase konnte gezeigt werden, daß die Zellen der Talgdrüsen die größte Aktivität aufweisen, gefolgt von differenzierten Keratinozyten und Basalzellen (46,47). Am Beispiel des Propranolols zeigt sich, daß die Keratinozyten – im Vergleich zu Fibroblasten oder Melanozyten – eine wesentlich höhere metabolische Aktivität aufweisen (48).

Ein weiterer Hinweis auf den Einfluß des Differenzierungsgrades von Zellen ergibt sich aus einer Untersuchung der  $5\alpha$ -Reduktase-Aktivität in Primärkulturen von Keratinozyten (49). Der metabolische Umsatz erhöhte sich bei längerer Kultivierungsdauer und somit steigendem Differenzierungsgrad über einen Zeitraum von drei Wochen permanent.

Zusammenfassend läßt sich ableiten, daß die lebende Epidermis, im Hinblick auf eine mögliche Biotransformation transdermal applizierter Stoffe, den größten Einfluß ausüben dürfte. Hierbei kommt den stärker differenzierten Keratinozyten gegenüber anderen Zellen eine größere Bedeutung zu. Diesem Umstand ist bei der Auswahl eines geeigneten Untersuchungsmodells für eine gezielte Untersuchung von Biotransformationen Rechnung zu tragen.

Neben den bisher beschriebenen histologischen Unterschieden hängt die metabolische Kapazität der Haut sehr stark vom betrachteten Körpereareal ab. So ist z. B. bekannt, daß die Aktivität der  $5\alpha$ -Reduktase in der Haut des Genitaltraktes besonders stark ausgeprägt ist (37).

## **5.4 Untersuchungsmodelle**

Eine Vielzahl unterschiedlicher Modelle, welche je nach Fragestellung mehr oder minder geeignet sind, steht zur Untersuchung des Hautmetabolismus zur Verfügung.

Im folgenden werden diese in in vivo- und in vitro-Methoden unterschieden, wobei die individuellen Vor- und Nachteile der einzelnen Modelle im Vordergrund stehen sollen.

### **5.4.1 In vivo-Methoden**

#### **Humanversuche**

Humanversuche weisen mit Sicherheit die höchste Relevanz auf, sind aber in der Regel schwer durchführbar, da neben den hohen Kosten die Akzeptanz solcher Untersuchungen nicht gegeben ist. Einige Studien zum Metabolismus von Steroiden wurden durchgeführt, indem simultan  $^{14}\text{C}$ -markiertes  $17\beta$ -Estradiol intravenös und  $^3\text{H}$ -markiertes Estrogen topisch appliziert wurden (50). Aus dem Verhältnis der Isotopen im Urin konnte der Anteil der Haut am Gesamtumfang des Metabolismus kalkuliert werden. Neben Estradiol wurde auch der Hautmetabolismus von Testosteron auf diese Weise quantifiziert.

#### **Tierversuche**

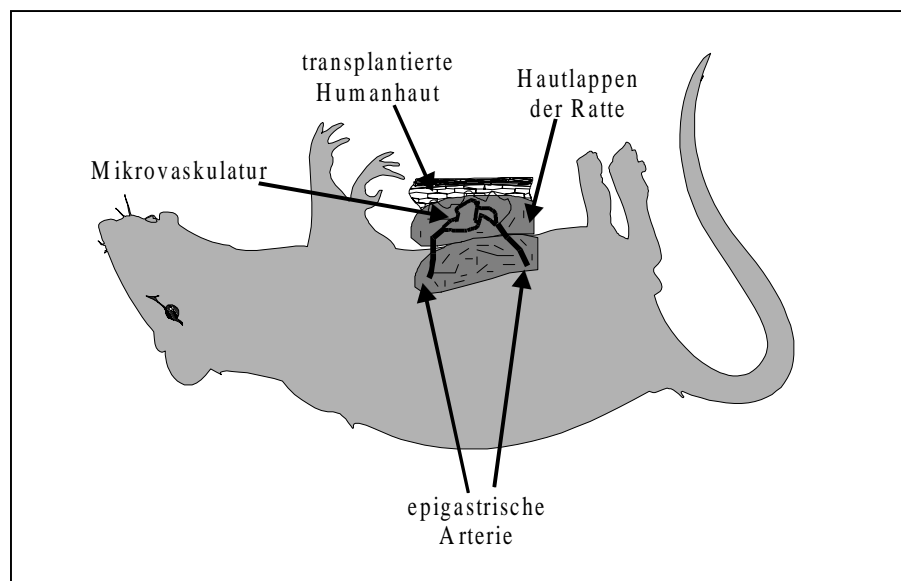
Eine ähnliche Vorgehensweise wurde bei der Untersuchung der Biotransformation von Nitroglycerin an Rhesusaffen gewählt (51). Im Tierversuch besteht zudem die Möglichkeit, nach dem Töten des Tieres, die Verteilung eventueller Metabolite in der Haut zu untersuchen.

Grundsätzlich ist es in Bezug auf den Metabolismus jedoch fraglich, ob tierische Haut in qualitativer sowie in quantitativer Hinsicht der menschlichen Haut vergleichbar ist. Allein die Dicke der Epidermis differiert erheblich, vergleicht man z. B. die Haut von Mäusen mit Humanhaut (52). Zusätzlich ist die Dichte an Hautanhangsorganen unterschiedlich.

Ein Vergleich der Biotransformation von Benz[a]pyren und Testosteron in sechs verschiedenen Spezies einschließlich Humanhaut ergab deutliche Unterschiede im Metabolitenprofil (53). Die Esteraseaktivität und die Bildung von Konjugaten in humaner und tierischer Haut weist ebenfalls große Differenzen auf (36,54).

### Rat-human skin flap-Systeme

Ein Stück frisch exzidiertes Humanhaut wird auf einen teilweise gelösten Hautlappen einer Ratte transplantiert, dessen Blutversorgung durch die epigastrische Arterie gesichert ist (Abb. 3). Es bildet sich dann ein Kapillargeflecht zwischen tierischer und menschlicher Haut, so daß eine Versorgung mit Nährstoffen sowie ein Abtransport von Substanzen aus dem Transplantat gewährleistet ist (55).



**Abb. 3:** Skin Flap-Modell an einer Ratte

Insbesondere die transdermale Applikation von  $17\beta$ -Estradiol sowie der Einfluß des Enhancers Ethanol auf den Transport wurde in diesem Modell untersucht

(56,57). Es stellt aber auch eine gute Methode dar, den Effekt des Blutflusses auf metabolische Vorgänge abzuschätzen.

Neben den Vorteilen sei jedoch erwähnt, daß diese sehr aufwendige und teure Methode von der technischen Durchführung her sehr anspruchsvoll ist.

#### 5.4.2 In vitro-Methoden

Allen in vitro-Modellen ist gemein, daß sie in der Regel einfacher zu handhaben sind und schneller zu Ergebnissen führen, als die entsprechenden in vivo-Untersuchungen. Bei diesen in vivo-Verfahren kommt es darauf an, zu zeigen, daß die enzymatische Aktivität im jeweiligen Modell der des lebenden Organismus entspricht.

#### Exzidierte Haut

Der Einsatz von Hautstücken, welche im Falle von Humanhaut meist von chirurgischen Eingriffen herkommen, stellt die am häufigsten benutzte Methode dar. Die Haut wird entweder in Diffusionszellen (58), als sogenannte Organkultur (53), oder zerkleinert in Reaktionsgefäßen („skin slices, minced skin“, 9) verwendet. Der Gebrauch von Diffusionszellen erlaubt die gleichzeitige Bestimmung der Wirkstoffabsorption und liefert somit Daten zum Verhältnis von Transport und Biotransformation (59). Entscheidend für diese Methoden ist, daß die enzymatische Kapazität der Haut – oft über die Vitalität charakterisiert – für die jeweilige Versuchsdauer erhalten bleibt.

Zahlreiche Autoren haben sich mit diesem Problem auseinandergesetzt und z. T. recht unterschiedliche Ergebnisse gefunden.

Die Lagerung frisch exzidierte Haut bei Temperaturen von  $-20^{\circ}\text{C}$  über mehrere Wochen hatte keinen nennenswerten Einfluß auf die Aktivität von Esterasen und CP-450 abhängigen Monooxygenasen (36,60). Ähnlich behandelte Haut zeigte jedoch in histologischen Untersuchungen und bei der Bestimmung des Glucose-Umsatzes keine Anzeichen von Vitalität (61).

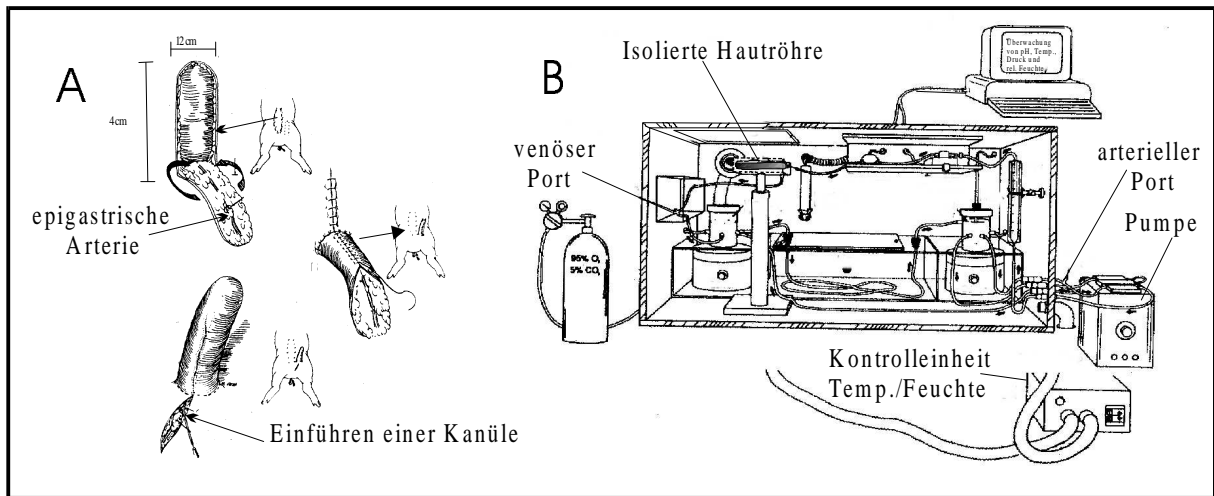
Die Art der Separation von Epidermis und Dermis übt ebenfalls einen gewissen Einfluß aus. So ist die Esteraseaktivität in enzymatisch isolierter Epidermis signifikant höher als in Epidermis, die mittels der Hitze-Separationsmethode gewonnen wird (36).

Die Vitalität der Haut während des Versuches hängt auch von der Art des verwendeten Inkubationsmediums ab. Mit handelsüblichen Wachstumsmedien, wie Eagle's minimal essential medium (MEM) oder mit glucosehaltigen Puffern, ließ sich in Durchflußzellen die Vitalität der Haut für 24 Stunden aufrechterhalten. Zur Überprüfung des Zustandes der Haut kann der Umsatz  $^{14}\text{C}$ -markierter Glucose zu  $\text{CO}_2$  (61) oder die Freisetzung der Laktatdehydrogenase (LDH), eines zytosolischen Enzyms, das bei Membranschädigung vermehrt im Medium gefunden wird (62), gemessen werden.

Beim Vergleich von Ergebnissen, die unter der Verwendung verschiedener Hautstücke erzielt wurden, ist immer zu berücksichtigen, daß die metabolische Kapazität durch Faktoren wie Rasse, Alter und Geschlecht des Spenders (63), aber auch durch den anatomischen Ort der Hautentnahme (4,38) beeinflusst wird.

### Isolierte perfundierte Schweinehaut (IPPSF)

Dieses Modell stellt eine Besonderheit unter den Systemen dar, die exzidierte Tierhaut verwenden. Am lebenden Schwein wird aus einem teilweise abgelösten Hautlappen eine Röhre geformt, die durch eine epigastrische Arterie versorgt wird. Nachdem diese "Hautröhre" vaskularisiert ist, wird sie vom Tier abgetrennt und in einer Perfusionkammer unter definierten Bedingungen über die epigastrische Arterie perfundiert. Nachfolgend kann der Einfluß des simulierten Blutflusses auf den Metabolismus untersucht werden (Abb. 4) (64). Der Aufwand für diese Methode ist ähnlich dem, der für die Operation des Rat-human skin flap-Modells notwendig ist.



**Abb. 4:** Isolated perfused porcine skin flap (IPPSF).  
 A: Operation des Hautlappens; B: Perfusionskammer mit Hautröhre

### Haarfollikel

Es ist bekannt, daß Androgene einen erheblichen Einfluß auf das Haarwachstum ausüben (27). Daher wird der Metabolismus dieser Steroide teilweise in isolierten Haarfollikeln untersucht, welche nach der Entnahme über einige Stunden ihre Vitalität behalten (65).

Werden diese Haarfollikel unter bestimmten Bedingungen in Kulturmedien gegeben, so bilden sich fibroblastenfreie Kolonien von Keratinozyten, die zu dichten Zellverbänden auswachsen (14). So erhaltene Kulturen werden ebenfalls eingesetzt.

### Isolierte Zellen

Mittels einer Inkubation von Hautstücken in Trypsin-Lösung bei geringen Temperaturen lassen sich sowohl die einzelnen Hautschichten als auch die interzellularen Verbindungen trennen. Die resultierende Zellsuspension wird durch Zentrifugation im Dichtegradienten aufgetrennt. Die isolierte,



resuspendierte Fraktion der Keratinozyten weist Enzymaktivitäten auf, die der in vivo-Situation entsprechen, da die Zellen ihren Differenzierungsgrad während der Aufarbeitung nicht verlieren (46,47). Nachteilig ist jedoch, daß diese Zellen unter diesen Bedingungen nur eine kurze Lebensdauer aufweisen.

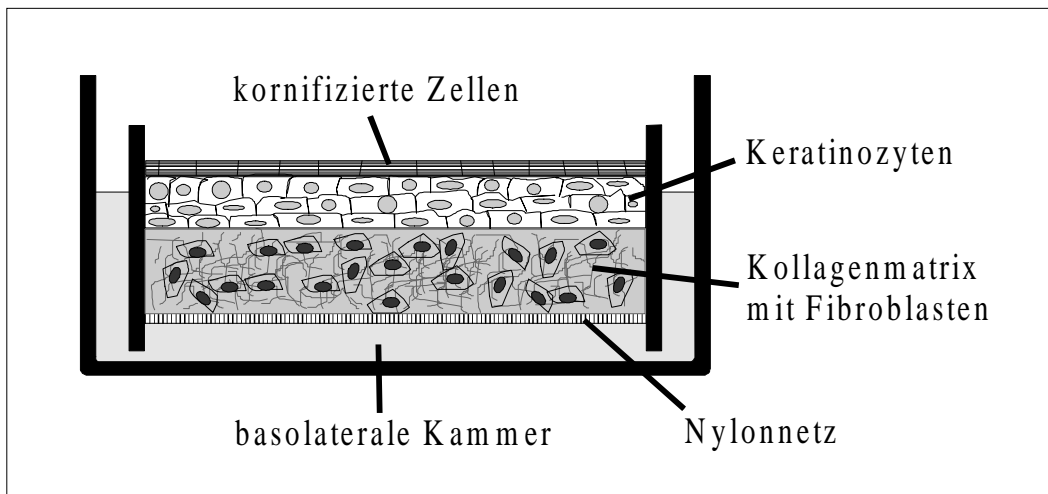
### Primärkulturen von Keratinozyten

Durch Trypsinisierung erhaltene Zellen werden auf einem sogenannten „feeder layer“, einer Zellschicht teilungsunfähiger Fibroblasten, in serumhaltigen Kulturmedien ausgesät. Unter diesen Bedingungen vermehren sich nur die Keratinozyten, während die dermalen Fibroblasten absterben (66). Diese ursprüngliche Methode hat mittlerweile viele Variationen dahingehend erfahren, daß der Fibroblasten-feeder layer durch Kollagene und Fibronectin als Substrate ersetzt wurde (67,68). Der Metabolismus so unterschiedlicher Substanzen, wie z. B. Estradiol (69), Leukotrien B4 (70), Dopamin (71) und Calcipotriol (72), läßt sich mit dem so variierten Modell untersuchen.

Ein Problem im Hinblick auf die Relevanz erhaltener Ergebnisse für die in vivo-Situation ist jedoch, daß in der Kultur eine Dedifferenzierung auftreten kann, welche sich im Verlust von Enzymaktivitäten niederschlagen könnte.

### Dreidimensionale Kulturen

Bei diesen neueren Modellen wird mittels verschiedener Zellen und Substrate eine Art „synthetische Haut“ erzeugt. Zur Herstellung des kommerziell erhältlichen „Living Skin Equivalent“ (LSE) werden Fibroblasten über vier Wochen auf einem Nylonnetz kultiviert, bis sie eine dermisähnliche Matrix aus Kollagenen, Fibronectin und Glycosaminglycanen bilden. Auf diese werden Keratinozyten ausgesät, die dann an der Grenzfläche zwischen Medium und Luft in Kultur gehalten werden (73). Eine schematische Darstellung des Modells gibt Abbildung 5.



**Abb. 5:** Living Skin Equivalent (LSE)

Die Zellen formen unter diesen Bedingungen eine differenzierte Epidermis inklusive Stratum corneum. Obwohl die Permeabilitäten in diesem Modell deutlich über denen exzidiertter Haut liegen, wurde ein der Humanhaut sehr ähnliches Metabolitenprofil für Testosteron gefunden (74). Weiterhin weist das Modell eine ausgeprägte Esteraseaktivität auf (75,76).

Nachteilig an dieser Methode sind die, durch die aufwendige Herstellung bedingten, hohen Kosten.

### Zelllinien

Im Gegensatz zu den Primärkulturen, die ihre Teilungsfähigkeit nur über eine begrenzte Zahl von Passagen behalten, sind transformierte Zelllinien theoretisch unbegrenzt zu passagieren. Daraus ergibt sich, daß hier ein Modell zur Verfügung steht, welches lebende Zellen in großem Umfang bereitstellt.

Da es sich um Zellen eines Spenders handelt, ist zusätzlich ein hohes Maß an Reproduzierbarkeit gegeben. Die Zellen stammen häufig von Tumoren ab, wodurch sich ihre Immortalität begründet, oder werden durch die Behandlung mit Viren transformiert (77).

Grundsätzlich besteht bei diesen Modellen die Gefahr, daß wichtige Zellfunktionen durch die Transformation verlorengehen. Von daher ist es notwendig, die Linie auf die verschiedenen Zellfunktionen, in unserem Falle auf die metabolische Kapazität, hin zu charakterisieren.

Derzeit werden mehrere epitheliale Zelllinien genutzt. Die sogenannte NTCC 2544-Linie bildet wenig differenzierte Monolayer und wurde insbesondere zur Bestimmung des Metabolismus von Nitroglycerin herangezogen (78). Eine durch Infektion mit Viren erzeugte Linie, SVK 14, weist ebenfalls ein verringertes Differenzierungspotential auf (77).

Die nicht-tumorgene, spontan transformierte Keratinozyten-Zelllinie HaCaT (**H**uman **a**dult keratinocytes, low **C**alcium condition, elevated **T**emperature) weist eine Differenzierungskapazität auf, die den Keratinozyten der lebenden Haut vergleichbar ist (79). Die weiteren Eigenschaften der Zelllinie werden später noch genauer behandelt (Kapitel 6). Dieses Modell wurde für alle in den Kapiteln 7 und 8 beschriebenen Versuchen gewählt.

### Homogenate

Dieses weit verbreitete Modell schließt die Verwendung ganzer Haut sowie bestimmter Teile der Haut als Ausgangsmaterial ein. Durch das Poolen von Homogenaten verschiedener Spender läßt sich die Reproduzierbarkeit der Methode steigern. Obwohl die unterschiedlichsten Stoffklassen in Homogenaten auf ihren Metabolismus hin untersucht wurden, gibt es nur wenige Informationen zur Vergleichbarkeit mit anderen Modellen. So wurde für den Peptidmetabolismus in Homogenaten eine den kultivierten Zellen vergleichbare Aktivität gefunden (80).

Durch Zentrifugation läßt sich das Homogenat weiter in Mikrosomenfraktionen und cytosolische Fraktion auftrennen, wobei gerade die Mikrosomen hohe Aktivitäten membrangebundener Enzyme aufweisen (35,81).

Die recht belastenden Bedingungen der Homogenisation können jedoch zu einer Verminderung der Enzymaktivität führen (18). Weiterhin wird auch der Verlust

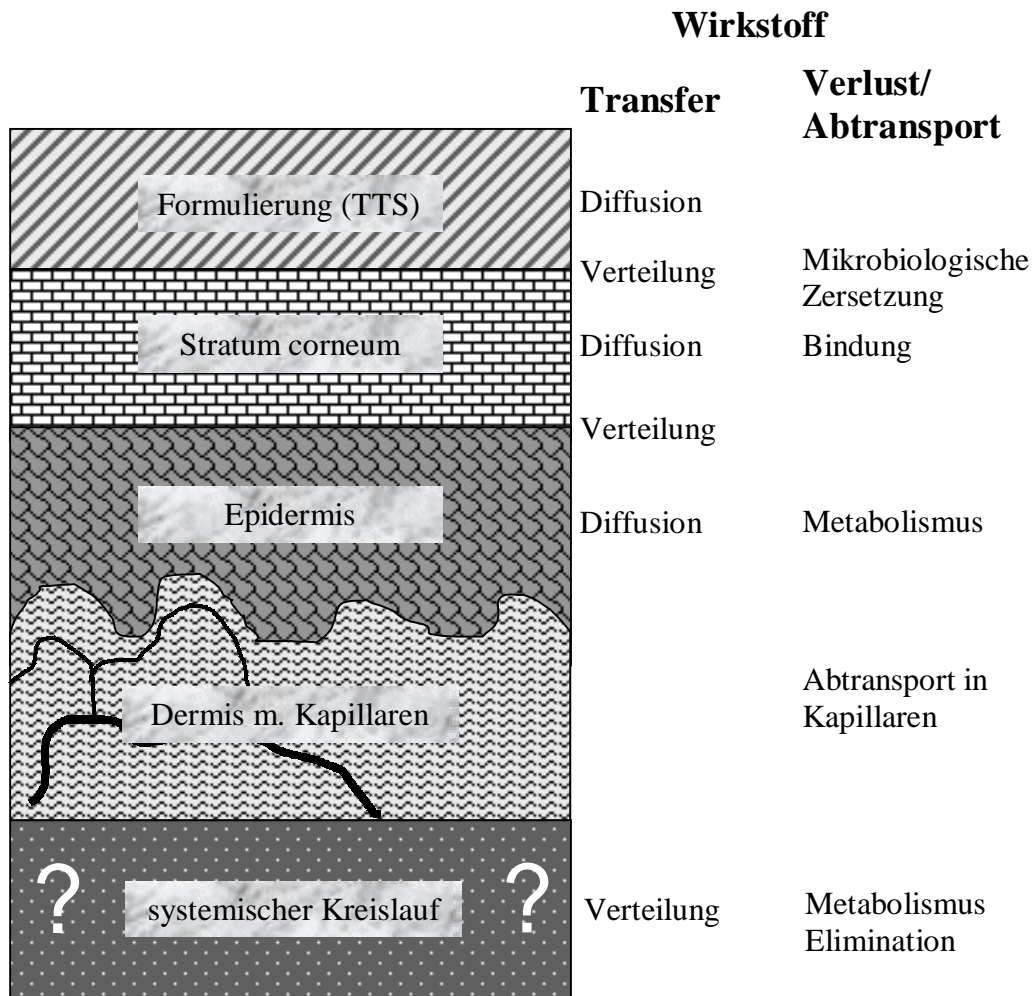
der zellulären Struktur und somit die freie Zugänglichkeit der Enzyme für Substrate einen Vergleich mit der in vivo-Situation erschweren (82).

### Isolierte Enzyme

Die recht aufwendige Isolierung und Reinigung der Enzyme macht dann Sinn, wenn enzyspezifische Parameter, wie Substratspezifität u. ä., untersucht werden sollen. Hier ist es, ähnlich den Homogenaten, auf jeden Fall nötig, Co-Faktoren zu supplementieren.

## **5.5 Einfluß des Metabolismus auf die transdermale Bioverfügbarkeit**

Lange wurde ignoriert, daß die metabolische Kapazität der Haut einen Einfluß auf die perkutane Absorption eines Stoffes haben könnte (83). Recht eindrucksvoll wurde dieser Umstand jedoch am Beispiel von Nitroglycerin demonstriert. Nach topischer Verabreichung wurden 16-20 % des Wirkstoffes in der Haut von Rhesusaffen metabolisiert (51). Es läßt sich folglich ableiten, daß die Bioverfügbarkeit eines transdermal applizierten Stoffes durch die Enzymaktivität der Haut reduziert werden kann. Das Ausmaß dieses sogenannten kutanen "First-pass-Effektes" ist schwierig zu bestimmen (83). Der Grund hierfür liegt in der Komplexität der Vorgänge im Zusammenhang mit der transdermalen Applikation, die in Abbildung 6 veranschaulicht sind.



**Abb. 6:** Vorgänge bei der transdermalen Wirkstoffapplikation

### 5.5.1 In vivo-Untersuchungen

Das Problem von in vivo-Methoden ist es, den kutanen First-pass-Effekt von der systemischen Biotransformation zu differenzieren.

Man versucht diese Schwierigkeit durch die Methode der simultanen ipsilateralen und contralateralen Blutentnahme zu umgehen (84). So wurde mittels dieses Versuchsdesigns festgestellt, daß ca. 65-70 % der absorbierten Menge an Visoprostol während des Transportes durch die Haut metabolisiert werden (2).

### 5.5.2 In-vitro-Untersuchungen

Bei der Verwendung von in vitro-Methoden stellt sich grundsätzlich die Frage nach der Relevanz für die in vivo-Situation.

Ein Vergleich von Resultaten, erzielt mit Salicylatestern an exzidierte Humanhaut und einem Transplantat dieser Haut auf Mäusen, hat signifikante Unterschiede in bezug auf Ausmaß und Verteilung der metabolischen Kapazität gezeigt (85).

In vitro konnten nach der perkutanen Applikation von Estern der Acetylsalicylsäure lediglich Salicylsäure oder Salicylatester gefunden werden, während man im Tierversuch auch größere Mengen an Aspirin nachgewiesen hatte (86).

Trotz dieser Defizite lassen sich viele Zusammenhänge aus in vitro-Untersuchungen ableiten.

So besteht scheinbar eine Korrelation zwischen dem Ausmaß des Metabolismus in Leber und Haut (58). Ausgehend von verschiedenen Formulierungen des Nitroglycerin wurde gezeigt, daß das relative Ausmaß des Metabolismus steigt, wenn der Fluß durch die Haut gering ist (87).

Eine schnelle Absorption kann andererseits eine Sättigung der enzymalen Systeme bewirken (88).

### 5.5.3 Prodrugprinzip

Der Umstand, daß die Haut eine metabolische Kapazität aufweist, kann aber auch dazu genutzt werden, Substanzen mit eher schlechten Transporteigenschaften der transdermalen Therapie zugänglich zu machen. Dies geschieht durch die Herstellung von Prodrugs, die auf Grund einer erhöhten Lipophilie das Stratum corneum besser penetrieren können. In der lebenden Epidermis wird dann die eigentliche Wirksubstanz freigesetzt und systemisch verfügbar (89).

#### 5.5.4 Induktion / Inhibition des Metabolismus

Anhand zahlreicher Untersuchungen zur Biotransformation von PAHs konnte gezeigt werden, daß sich der Metabolismus durch die Applikation bestimmter Substanzen induzieren läßt (4). So verzehnfacht sich die AHH-Aktivität durch topische Applikation von Aroclor 1254, eines polychloriertes Biphenyls (19).

Auf der anderen Seite gibt es aber auch Substanzen, wie z. B. Clotrimazol, die als Inhibitoren agieren (16).

Die Wirkung von Inhibitoren in der Behandlung androgenabhängiger Hauterkrankungen wurde bereits unter 5.2.1 angesprochen.

Auch für die transdermale Applikation könnte die Wirkung eines Inhibitors interessant sein, bedenkt man, daß sich die Bioverfügbarkeit eines Wirkstoffes erhöht, wenn sich das Ausmaß des Metabolismus in der Haut reduziert.

Insbesondere die als Lösungsvermittler oder Enhancer benutzten organischen Lösungsmittel, wie z. B. Polyethylenglycol, Propylenglycol und DMSO, zeigen eine Inhibition CP-450-abhängiger Enzyme in Lebermikrosomen (90). Der in transdermalen Systemen häufig eingesetzte Alkohol Ethanol inhibiert in der Haut sowohl die Aktivität von Esterasen (91) als auch die Umsetzung von Estradiol zu Estron (59,92). Dies gewinnt an Bedeutung, berücksichtigt man den Einsatz von Ethanol in dem für die transdermale Applikation von Estradiol verwendeten Reservoirsystem (siehe Kapitel 1-3).

Die inhibitorische Wirkung des Ethanols in Bezug auf den Estradiol-Metabolismus in der HaCaT-Zelllinie wird in Kapitel 8 genauer charakterisiert.

## **5.6 Zielsetzungen der Untersuchungen zum Hautmetabolismus**

Aus den Ausführungen unter 5.5 läßt sich ableiten, daß die metabolische Kapazität der Haut einen Einfluß auf die transdermale Applikation von Wirkstoffen hat. Daraus ergibt sich die Notwendigkeit, geeignete Modelle zur Untersuchung der kutanen Biotransformation zu etablieren, um die Konsequenzen dieses Phänomens für die Therapie abschätzen zu können.

Die bisher entwickelten, unter 5.4 beschriebenen, Methoden weisen bestimmte Vorzüge wie auch Nachteile in Bezug auf Anwendbarkeit und Aussagekraft auf. Insbesondere unter den in vitro-Methoden gibt es vielversprechende Ansätze, die zwar Defizite bei der Quantifizierung eines kutanen First-pass-Effektes aufweisen, jedoch qualitative Aussagen und die Untersuchung mechanistischer Prinzipien zulassen.

Zellkulturmodelle stellen in diesem Zusammenhang kostengünstige und gleichzeitig potente Modelle dar, die es erlauben unter definierten Bedingungen Studien durchzuführen.

Ein solches in vitro-Modell, die Keratinozyten-Zelllinie HaCaT, soll im folgenden Teil der Arbeit im Hinblick auf ihre Eignung zur Untersuchung des Hautmetabolismus genauer untersucht werden.

Die Relevanz der Zellart ergibt sich aus den Ausführungen unter 5.3, die belegen, daß die lebende Epidermis, hauptsächlich bestehend aus Keratinozyten, die metabolische Barriere für die transdermale Applikation darstellt.

Voraussetzung für die Eignung der Zelllinie sind ein reproduzierbares Zellwachstum und eine Expression der Enzymsysteme, die mit der in vivo-Situation vergleichbar ist. Da eine möglichst weitgehende Differenzierung von Keratinozyten als notwendiges Kriterium für ein Auftreten der Enzyme angesehen wird (49,69), wurde versucht, aus Literaturangaben und morphologischen Beobachtungen die Kulturbedingungen für eine metabolische Studie zu optimieren.



Nach einer allgemeinen Beschreibung der Zelllinie sowie deren Eigenschaften und Kulturbedingungen (Kapitel 6) wird die Biotransformation der Steroide Testosteron (Kapitel 7) und Estradiol (Kapitel 8) in diesem Modell beschrieben. Diese Steroidhormone wurden als Modellsubstanzen ausgewählt, da sowohl ihre wichtige Rolle in der transdermalen Therapie (Kapitel 1) als auch ihre physiologische Bedeutung (5.2.1) die Tragweite des Metabolismus dieser Substanzen in der Haut verdeutlichen.

Im Hinblick auf die transdermale Applikation von Estradiol wurde der Effekt des Enhancers Ethanol charakterisiert (Kapitel 8), während die Inhibition der Biotransformation von Testosteron zu Dihydrotestosteron in HaCaT eine Eignung dieses Modells für das Screening geeigneter Inhibitoren aufzeigen sollte (Kapitel 7).

### **Literaturverzeichnis**

1. E. L. Rongone. Skin structure, function, and biochemistry. In: F. N. Marzulli and H. I. Maibach (Eds.). *Dermatotoxicology*. Hemisphere Publishing Corp., Washington, 1987, pp. 1-70
2. G. Nicolau and A. Yacobi. Skin metabolism. Cutaneous first-pass effect of a transdermally absorbed prostaglandin. In: V. P. Shah and H. I. Maibach (Eds.) *Topical drug bioavailability, bioequivalence, and penetration*. Plenum Press, New York, 1993, pp. 291-308
3. R. J. Scheuplein. Percutaneous absorption: Theoretical aspects. In: P. Mauvais-Jarvis, C. F. H. Vickers, and J. Wepierre (Eds.) *Percutaneous absorption of steroids*. Academic Press, London, 1980, pp. 1-18
4. A. Pannatier, P. Jenner, B. Testa, and J. C. Etter. The skin as a drug-metabolizing organ. *Drug Metab. Rev.* 8: 319-343 (1978)
5. R. J. Scheuplein and I. H. Blank. Permeability of the skin. *Physiol. Rev.* 51: 702-747 (1971)
6. R. J. Martin, S. P. Denyer, and J. Hadgraft. Skin metabolism of topically applied compounds. *Int. J. Pharm.* 39: 23-32 (1987)
7. H. Mukhtar and W. A. Khan. Cutaneous cytochrome P-450. *Drug Metab. Rev.* 20: 657-673 (1989)

8. H. H. Wotiz, H. Mescon, H. Doppel, and H. M. Lemon. The in vitro metabolism of testosterone by human skin. *J. Invest. Dermatol.* 26: 113-119 (1956)
9. J. D. Wilson and J. D. Walker. The conversion of testosterone to 5 $\alpha$ -androstan-17 $\beta$ -ol-3-one (dihydrotestosterone) by skin slices of man. *J. Invest. Dermatol.* 48: 371-379 (1969)
10. F. Kutenn, I. Mowszowicz, and P. Mauvais-Jarvis. Androgen metabolism in human skin. In: P. Mauvais-Jarvis, C. F. H. Vickers, and J. Wepierre (Eds.) *Percutaneous absorption of steroids*. Academic Press, London, 1980, pp. 99-122
11. U. Stephan, P. Elstner, and R. K. Müller. *Toxikologie*. VEB Bibliographisches Institut, Leipzig, 1987
12. H. Beyer and W. Walter. *Lehrbuch der Organischen Chemie*. 21. Aufl. Hirzel Verlag, Stuttgart, 1988.
13. W. A. Khan, S. S. Park, H. V. Gelboin, D. R. Bickers, and H. Mukhtar. Monoclonal antibodies directed characterization of epidermal and hepatic cytochrome P-450 isozymes induced by skin application of therapeutic crude coal tar. *J. Invest. Dermatol.* 93: 40-45 (1989)
14. F. N. A. M. van Pelt, Y. J. M. Olde-Meierink, B. J. Blaauboer, and P. J. J. M. Weterings. Immunohistochemical detection of cytochrome P450 isoenzymes in cultured human epidermal cells. *J. Histochem. Cytochem.* 38: 1847-1851 (1990)
15. R. Heimann and R. H. Rice. Polycyclic aromatic hydrocarbon toxicity and induction of metabolism in cultivated esophageal and epidermal keratinocytes. *Cancer Res.* 43: 4856-4862 (1983)
16. M. Das, H. Mukhtar, B. J. DelTito, C. L. Marcelo, and D. R. Bickers. Clotrimazole, an inhibitor of benzo[a]pyrene metabolism and its subsequent glucuronidation, sulfation, and macromolecular binding in BALB/c mouse cultured keratinocytes. *J. Invest. Dermatol.* 87: 4-10 (1986)
17. D. R. Bickers, H. Mukhtar, T. Dutta-Choudhury, C. L. Marcelo, and J. J. Voorhees. Aryl hydrocarbon hydroxylase, epoxide hydrolase, and benzo[a]pyrene metabolism in human epidermis: Comparative studies in normal subjects and patients with psoriasis. *J. Invest. Dermatol.* 83: 51-56 (1984)
18. F. J. Akin and W. P. Norred. Factors affecting measurement of aryl hydrocarbon hydroxylase activity in mouse skin. *J. Invest. Dermatol.* 67: 709-712 (1976)
19. D. R. Bickers, T. Dutta-Choudhury, and H. Mukhtar. Epidermis: A site of drug metabolism in neonatal rat skin. *Mol. Pharmacol.* 21: 239-247 (1981)

20. S. L. Hsia. Metabolism of steroids in human skin. In: P. Mauvais-Jarvis, C. F. H. Vickers, and J. Wepierre (Eds.) Percutaneous absorption of steroids. Academic Press, London, 1980, pp. 81-88
21. E. C. Gomez and S. L. Hsia. In vitro metabolism of testosterone-4-<sup>14</sup>C and  $\Delta^4$ -androstene-3,17-dione-4-<sup>14</sup>C in human skin. *Biochemistry* 7: 24-31 (1968)
22. V. H. Price. Testosterone metabolism in the skin. *Arch. Dermatol.* 111: 1496-1502 (1975)
23. J. Kao and J. Hall. Skin absorption and cutaneous first pass metabolism of steroids: In vitro studies with mouse skin in organ culture. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 241: 482-487 (1987)
24. N. A. Mazer, W. E. Heiber, J. F. Moellmer, A. W. Meikle, J. D. Stringham, S. W. Sanders, K. G. Tolman, and W. D. Odell. Enhanced transdermal delivery of testosterone: A new physiological approach for androgen replacement in hypogonadal men. *J. Contr. Rel.* 19: 347-362 (1992)
25. P. R. Casson, R. N. Andersen, H. G. Herrod, F. B. Stentz, A. B. Straughn, G. E. Abraham, and J. E. Buster. Oral dehydroepiandrosterone in physiologic doses modulates immune function in postmenopausal women. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 169: 1536-1539 (1993)
26. A. J. Morales, J. J. Nolan, J. C. Nelson, and S. S. C. Yen. Effects of replacement dose of dehydroepiandrosterone in men and women of advancing age. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 78: 1360-1367 (1994)
27. W. Chen, C. C. Zouboulis, and C. E. Orfanos. The 5 $\alpha$ -reductase system and its inhibitors. *Dermatology* 193: 177-184 (1996)
28. X. Li, C. Chen, S. M. Sng, and F. Labire. The enzyme and inhibitors of 4-ene-3-oxosteroid 5oxidoreductase. *Steroids* 60: 430-441 (1995)
29. K. Ellsworth, B. Azzolina, W. Baginsky, H. Bull, B. Chang, G. Cimis, S. Mitra, J. Torney, R. K. Bakshi, G. R. Rasmusson, R. L. Tolman, and G. S. Harris. MK386: A potent, selective inhibitor of the human type 1 5 $\alpha$ -reductase. *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.* 58: 377-384 (1996)
30. K. S. Hirsch, C. D. Jones, J. E. Audia, S. Andersson, L. McQuaid, N. B. Stamm, B. L. Neubauer, P. Pennington, R. E. Toomey, and D. W. Russell. LY191704: A selective, nonsteroidal inhibitor of human steroid 5 $\alpha$ -reductase type 1. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 90: 5277-5281 (1993)
31. D. Stamatidis, M. C. Bulteau-Portois, and I. Mowosowicz. Inhibition of 5 $\alpha$ -reductase activity in human skin by zinc and azelaic acid. *Br. J. Dermatol.* 119: 627-632 (1988)

32. Y. Sugimoto, I. Lopez-Solache, F. Labrie, and V. Luu-The. Cations inhibit specifically type I 5 $\alpha$ -reductase found in human skin. *J. Invest. Dermatol.* 104: 775-778 (1995)
33. W. Montagna. Histology and cytochemistry of human skin IX. The distribution of non-specific esterases. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 1: 13-16 (1955)
34. S. Thompson and T. J. Slaga. Mouse epidermal aryl hydrocarbon hydroxylase. *J. Invest. Dermatol.* 66: 108-111 (1976)
35. M. Das, D. R. Bickers, and H. Mukhtar. Epidermis: The major site of cutaneous benzo[a]pyrene and benzo[a]pyrene-7,8-diol metabolism in neonatal BALB/c mice. *Drug Metab. Dispos.* 14: 637-642 (1986)
36. U. Täuber and K. L. Rost. Esterase activity of the skin including species variations. In: B. Shroot and H. Schaefer (Eds.) *Pharmacology of the skin*, Vol. 1. Karger, Basel, 1987, pp. 170-183
37. U. K. Jain, V. Srinivasan, and C. D. Ebert. Evidence for esterase activity in the human cadaver skin. *Proceed. Intern. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater.* 22: 702-703 (1995)
38. G. D. Weinstein, P. Frost, and S. L. Hsia. In vitro interconversion of estrone and 17 $\beta$ -estradiol in human skin and vaginal mucosa. *J. Invest. Dermatol.* 51: 4-10 (1968)
39. J. Bamshad. Catechol-O-methyl transferase in epidermis, dermis and whole skin. *J. Invest. Dermatol.* 52: 351-352 (1969)
40. A. H. Baillie, K. C. Calman, and J. A. Milne. Histochemical distribution of hydroxysteroid dehydrogenases in human skin. *Br. J. Dermatol.* 77: 610-616 (1965)
41. J. B. Hay and M. B. Hodgins. Metabolism of androgens by human skin in acne. *Br. J. Dermatol.* 91: 123-133 (1974)
42. S. Takayasu and K. Adachi. The conversion of testosterone to 17 $\beta$ -hydroxy-5 $\alpha$ -androstan-3-one (dihydrotestosterone) by human hair follicles. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 34: 1098-1101 (1972)
43. J. Baron, T. Kawabata, J. A. Redick, S. A. Knapp, D. G. Wick, R. B. Wallace, W. B. Jakoby, and F. P. Guengerich. Localization of carcinogen-metabolizing enzymes in human and animal tissues. In: I. Ryström, J. Montelius, and M. Bengtsson (Eds.) *Extrahepatic drug metabolism and chemical carcinogenesis*, Elsevier, Amsterdam, 1983, pp. 73-89
44. F. J. Wiebel, J. C. Leutz, and H. V. Gelboin. Aryl hydrocarbon (benzo[a]pyrene) hydroxylase: A mixed-function oxygenase in mouse skin. *J. Invest. Dermatol.* 64: 184-189 (1975)

- 
45. M. J. Finnen. Skin metabolism by oxidation and conjugation. In: B. Shroet and H. Schaefer (Eds.) *Pharmacology of the skin*, Vol. 1. Karger, Basel, 1987, pp. 163-169
  46. M. W. Coomes, A. H. Norling, R. J. Pohl, D. Muller, and J. R. Fouts. Foreign compound metabolism by isolated skin cells from the hairless mouse. *J. Pharm. Exp. Ther.* 225: 770-777 (1983)
  47. R. J. Pohl, M. W. Coomes, R. W. Sparks, and J. R. Fouts. 7-Ethoxycoumarin-O-deethylation activity in viable basal and differentiated keratinocytes isolated from the skin of the hairless mouse. *Drug Metab. Dispos.* 12: 25-34 (1984)
  48. M. Cormier, P. W. Ledger, J. P. Marty, and A. Amkraut. In vitro cutaneous biotransformation of Propranolol. *J. Invest. Dermatol.* 97: 447-453 (1991)
  49. L. Milewich, V. Kaimal, C. B. Shaw, and R. D. Sontheimer. Epidermal keratinocytes: A source of 5 $\alpha$ -dihydrotestosterone production in human skin. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 62: 739-746 (1986)
  50. C. Longcope. The metabolism of oestrogens by human skin. In: P. Mauvais-Jarvis, C. F. H. Vickers, and J. Wepierre (Eds.) *Percutaneous absorption of steroids*. Academic Press, London, 1980, pp. 1-18
  51. R. C. Wester, P. K. Noonan, S. Smeach, and L. Kosobud. Estimate of nitroglycerin percutaneous first-pass metabolism. *Pharmacologist* 23: 203 (1981)
  52. R. C. Wester and H. I. Maibach. Animal models for transdermal delivery. In: A. F. Kydonieus and B. Berner. *Transdermal delivery of drugs*. CRC Press, Boca Raton, 1987, pp. 61-69
  53. J. Kao, F. K. Patterson, and J. Hall. Skin penetration and metabolism of topically applied chemicals in six mammalian species, including man: An in vitro study with benzo[a]pyrene and testosterone. *J. Toxicol. Appl. Pharmacol.* 81: 503-516 (1985)
  54. J. J. M. van de Sandt, A. A. J. J. L. Rutten, and B. van Ommen. Species specific cutaneous biotransformation of the pesticide propoxur during percutaneous absorption in vitro. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 123: 144-150 (1993)
  55. G. G. Krueger, Z. J. Wojchichowski, S. A. Burton, A. Gilhar, S. E. Huether, L. G. Leonard, U. D. Rohr, T. J. Petelenz, W. I. Higuchi, and L. K. Pershing. The development of of a rat/human skin flaped served by a defined vasculature on a congenitally athymic (nude) rat. *Fundam. Appl. Toxicol.* 5: S112-S121 (1985)

56. L. K. Pershing, G. E. Parry, and L. D. Lambert. Disparity of in vitro and in vivo oleic acid-enhanced  $\beta$ -estradiol percutaneous absorption across human skin. *Pharm. Res.* 10: 1745-1750 (1993)
57. L. K. Pershing, L. D. Lambert, and K. Knutson. Mechanism of ethanol-enhanced permeation across human skin in vivo. *Pharm. Res.* 7: 170-175 (1990)
58. R. L. Bronaugh, R. F. Stewart, and J. E. Storm. Extent of cutaneous metabolism during percutaneous absorption of xenobiotics. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 99: 534-543 (1989)
59. P. Liu, W. I. Higuchi, W. Song, T. Kurihara-Bergstrom, and W. R. Good. Quantitative evaluation of ethanol effects on diffusion and metabolism of  $\beta$ -estradiol in hairless mouse skin. *Pharm. Res.* 8: 865-872 (1991)
60. J. M. Damen and P. D. Mier. Cytochrome P-450-dependent O-dealkylase activity in mammalian skin. *Br. J. Pharmacol.* 75: 123-127 (1982)
61. S. W. Collier, N. M. Sheikh, A. Sakr, J. L. Lichtin, R. F. Stewart, and R. L. Bronaugh. Maintenance of skin viability during in vitro percutaneous absorption/metabolism studies. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 99: 522-533 (1989)
62. J. Kao, J. Hall, and M. Holland. Quantitation of cutaneous toxicity: An in vitro approach using skin organ culture. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 68: 206-217 (1983)
63. P. H. Chapman, M. D. Rawlins, and S. Shuster. The activity of aryl hydrocarbon hydroxylase in adult human skin. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 7: 499-503 (1970)
64. J. E. Riviere. Grafted skin and skin flaps. In: V. P. Shah and H. I. Maibach (Eds.) *Topical drug bioavailability, bioequivalence, and penetration.* Plenum Press, New York, 1993, pp. 209-221
65. M. J. Finnen and S. Shuster. Phase 1 and Phase 2 drug metabolism in isolated epidermal cells from adult hairless mice and in whole human hair follicles. *Biochem. Pharmacol.* 34: 3571-3575 (1985)
66. J. G. Rheinwald and H. Green. Serial cultivation of strains of human epidermal keratinocytes: The formation of keratinizing colonies from single cells. *Cell* 6: 331-344 (1975)
67. M. A. Karasek. Culture of human keratinocytes in liquid medium. *J. Invest. Dermatol.* 81: 24s-28s (1983)
68. M. Prunieras, M. Regnier, and D. Woodley. Methods for cultivation of keratinocytes with an air-liquid interface. *J. Invest. Dermatol.* 81: 28s-33s (1983)

69. L. Milewich, C. B. Shaw, and R. D. Sontheimer. Steroid metabolism by epidermal keratinocytes. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 548: 66-89 (1988)
70. P. Wheelan, J. A. Zirrolli, J. G. Morelli, and R. C. Murphy. Metabolism of Leukotriene B<sub>4</sub> by cultured human keratinocytes. *J. Biol. Chem.* 268: 25439-25448 (1993)
71. C. N. Ramchand, A. E. Clark, R. Ramchand, and G. P. Hemmings. Cultured human keratinocytes as a model for studying the dopamine metabolism in schizophrenia. *Med. Hypoth.* 44: 53-57 (1995)
72. S. Masuda, S. Strugnell, M. J. Calverley, H. L. J. Makin, R. Krmer, and G. Jones. In vitro metabolism of the anti-psoriatic vitamin D analog calcipotriol, in two cultured human keratinocyte models. *J. Biol. Chem.* 269: 4794-4803 (1994)
73. S. R. Slivka, L. K. Landeen, F. Zeigler, M. P. Zimmer, and R. L. Bartel. Characterization, barrier function, and drug metabolism of an in vitro skin model. *J. Invest. Dermatol.* 100: 40-46 (1993)
74. A. M. Ernesti, M. Swiderek, and R. Gay. Absorption and metabolism of topically applied testosterone in an organotypic skin culture. *Skin Pharmacol.* 5: 146-153 (1992)
75. M. Tamura, T. Sueishi, K. Sugibayashi, Y. Morimoto, K. Juni, T. Hasegawa, and T. Kawaguchi. Metabolism of testosterone and its ester derivatives in organotypic coculture of human dermal fibroblasts with differentiated epidermis. *Int. J. Pharm.* 131: 263-271 (1996)
76. K. Kubota, J. Ademola, and H. I. Maibach. Metabolism and degradation of betamethasone 17-valerate in homogenized living skin equivalent. *Dermatology* 188: 13-17 (1994)
77. J. Taylor-Papadimitriou, P. Purkis, E. B. Lane, I. A. McKay, and S. E. Chang. Effects of SV 40 transformation on the cytoskeleton and behavioural properties of human keratinocytes. *Cell Diff.* 11: 169-180 (1982)
78. K. A. Lamb, S. P. Denyer, and F. D. Anderson. The evaluation of a commercially available skin epithelial cell line for metabolic studies of transdermal drugs or prodrugs. *Proceed. Intern. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater.* 17: 399-340 (1990)
79. P. Boukamp, R. T. Petrussevska, D. Breitkreuz, J. Hornung, A. Markham, and N. E. Fusenig. Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line. *J. Cell Biol.* 106: 761-771 (1982)
80. P. K. Shah and R. T. Borchardt. A comparison of peptidase activities and peptide metabolism in cultured mouse keratinocytes and neonatal mouse epidermis. *Pharm. Res.* 8: 70-75 (1991)

81. B. P. Davis, E. Rampini, and S. L. Hsia.  $17\beta$ -Hydroxysteroid dehydrogenase of rat skin. *J. Biol. Chem.* 247: 1407-1413 (1972)
82. I. Steinstrasser, K. Koopmann, and H. P. Merkle. Epidermal aminopeptidase activity and metabolism as observed in an organized HaCaT cell sheet model. *J. Pharm. Sci.* 86: 378-383 (1997)
83. J. Kao and M. P. Carver. Cutaneous metabolism of xenobiotics. *Drug Met. Rev.* 22: 363-410 (1990)
84. R. C. Wester, P. K. Noonan, S. Smeach, and L. Kosobud. Pharmacokinetics and bioavailability of intravenous and topical nitroglycerin in the Rhesus monkey, estimate of percutaneous first-pass metabolism. *J. Pharm. Sci.* 72: 745-748 (1983)
85. D. B. Guzek, A. H. Kennedy, S. C. McNeill, E. Wakshull, and R. O. Potts. Transdermal drug transport and metabolism. I. Comparison of in vitro and in vivo results. *Pharm. Res.* 6: 33-39 (1989)
86. T. Loftsson and N. Bodor. Improved delivery through biological membranes X: Percutaneous absorption and metabolism of methylsulfinylmethyl-2-acetoxybenzoate and related aspirin prodrugs. *J. Pharm. Sci.* 70: 756-758 (1981)
87. N. Higo, R. S. Hinz, D. T. W. Lau, L. Z. Benet, and R. H. Guy. Cutaneous metabolism of nitroglycerin in vitro. I. Homogenized versus intact skin. *Pharm. Res.* 9: 187-190 (1992)
88. P. K. Noonan and R. C. Wester. Cutaneous Biotransformations and some pharmacological and toxicological implications. In: F. N. Marzulli and H. I. Maibach (Eds.). *Dermatotoxicology*. Hemisphere Publishing Corp., Washington, 1987, pp. 71-94
89. D. A. W. Bucks. Skin structure and metabolism: Relevance to the design of cutaneous therapeutics. *Pharm. Res.* 1: 148-153 (1984)
90. M. M. Cotreau-Bibbo, L. L. von Moltke, and D. J. Greenblatt. Influence of polyethylene glycol and acetone on the in vitro biotransformation of tamoxifen and alprazolam by human liver microsomes. *J. Pharm. Sci.* 85: 1180-1185 (1996)
91. T. Hayashi, Y. Iida, T. Hatanaka, T. Kawaguchi, K. Sugibayashi, and Y. Morimoto. The effects of several penetration-enhancers on the simultaneous transport and metabolism of ethyl nicotinate in hairless rat skin. *Int. J. Pharm.* 154: 141-148 (1997)
92. W. I. Higuchi, P. Liu, A. H. Ghanem, and W. Song. Mechanism of ethanol effects on the simultaneous transport and metabolism of  $\beta$ -estradiol in hairless mouse skin. *Proceed. Intern. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater.* 14: 101-102 (1987)



## **Kapitel 6**

# **Die HaCaT-Zelllinie: Eigenschaften und Wachstumsbedingungen**

### **Eigenschaften der Zelllinie**

Die in Kapitel 5 bereits angesprochene Zelllinie HaCaT wurde als potentielles Untersuchungsmodell ausgewählt, da sie von den bekannten epidermalen Zelllinien den höchsten Differenzierungsgrad aufweist. Dieser wird als Indikator für eine Ausbildung biotransformierender Enzyme angesehen (vgl. Kapitel 5).

Die Zellen entstammen ursprünglich einer histologisch normalen Gewebeprobe eines Melanompatienten. Die heute verwendete Zelllinie verdankt ihre Etablierung u. a. dem Einsatz eines Nährmediums mit geringem Calciumgehalt und einer leicht erhöhten Inkubationstemperatur (38,5°C: fördert chromosomalen Austausch). Hierbei wird eine spontane Transformation der primären Stammzellen diskutiert (1).

Das ausgeprägte Differenzierungspotential der Zelllinie zeigt sich u. a. darin, daß die Zellen in einer in vivo-Umgebung (Transplantat auf Nacktmäusen) eine vollständig strukturierte Epidermis ausbilden (2).

HaCaT-Zellen exprimieren die Keratine 1 und 10, die charakteristisch für Zellen des Stratum granulosum und Stratum spinosum sind, also Marker, welche die Einleitung der terminalen Differenzierung anzeigen (3). Auch das Auftreten von Desmosomen in den Kulturen spricht für ein ausgeprägtes Differenzierungspotential.

Entscheidend für die Ausbildung der o. g. Differenzierungsmarker ist die Zelldichte in der Kultur. Bei geringer Zelldichte werden bevorzugt – für Basalzellen charakteristische – Keratine gebildet (K7, K8, K18 und K19), während nach Erreichen der Konfluenz deren Konzentration zu Gunsten der suprabasalen Keratine (K1, K10/11) abnimmt (4,5). Mit Hilfe von Immunfluoreszenzmessungen konnte gezeigt werden, daß die Bildung der Zytokeratine K1 und K 10/11 ab dem zwölften Tag nach Aussaat der Zellen stark ansteigt. Dieser Anstieg setzt sich bis zum 22sten Tag fort (6).

Folglich ist die Kultivierungsdauer der Zellen für einen hohen Differenzierungsgrad maßgebend. Diesem Umstand wurde bei den weiteren Untersuchungen

dahingehend Rechnung getragen, daß alle Versuche zum Metabolismus in HaCaT-Zellen mit drei Wochen alten Kulturen durchgeführt wurden (Kapitel 7 und 8).

Eine weitergehende Differenzierung läßt sich durch das Einwirken äußerer Faktoren erzielen. Durch die Anwendung von mechanischem Druck auf die Zellen läßt sich die Synthese des Zytokeratins 9 induzieren, welches für eine Schwielenbildung *in vivo* charakteristisch ist (7), während die Zugabe von Nicotin zum Kulturmedium die Kornifizierung der Zellen fördert (8). Auch ein stark erhöhter Calciumgehalt im Medium (8 mM) scheint eine weitergehende Differenzierung auszulösen, da unter diesen Bedingungen größere Konzentrationen an Differenzierungsmarkern nachgewiesen werden können (9). Auf Grund der guten Übereinstimmung der Zellmerkmale mit denen natürlicher Keratinozyten wurde dieses Modell für Toxizitätsstudien (10,11) und zur Charakterisierung der Wirkung antiproliferativer Substanzen eingesetzt, die in der Psoriasis- und Alopezietherapie eine Anwendung finden (12-14).

Gezielte Studien zum Metabolismus von Xenobiotika in HaCaT-Zellen beschränkten sich bislang auf die Co-Faktoren-unabhängige Hydrolyse von Peptiden in der intakten Zelle wie auch in Homogenaten (15,16).

Die herausgestellte Bedeutung des Metabolismus von Steroiden in der Haut (siehe 5.2.2) hat uns dazu veranlaßt, mögliche Biotransformationen dieser Substanzklasse im HaCaT-Modell zu untersuchen.

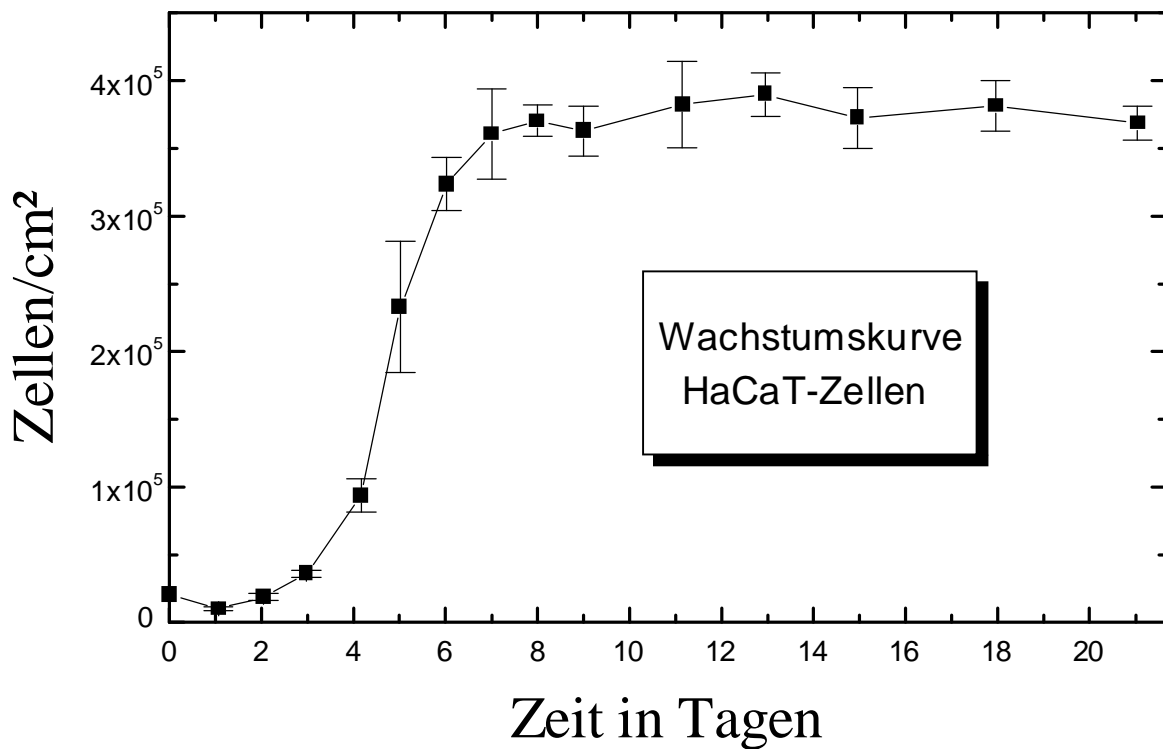
### **Kultivierungsbedingungen und Wachstumscharakteristika**

HaCaT-Zellen können ohne die Verwendung von dermalen Substraten in Kulturgefäßen aus Polystyrol gezüchtet werden. In unserem Falle wurden die Zellen in einer Dichte von  $2 \times 10^4$  Zellen/cm<sup>2</sup> ausgesät und in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) mit einem Zusatz von 10 % fötalem Kälberserum, 2mM Glutamin und 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin bei 37° C in einer Atmosphäre von 5 % CO<sub>2</sub> und 95 % relativer Feuchte kultiviert. Mediumwechsel erfolgte zweimal pro Woche.

Konfluente Zellen konnten vereinzelt werden, indem sie mit Phosphatpuffer ohne Calcium und Magnesium (PBS) gewaschen wurden, mit einer 0,05 %igen EDTA-Lösung 15 min vorinkubiert und anschließend mit einer 0,05 %igen Trypsinlösung, die 0,025 % EDTA enthielt, versetzt wurden. Nach einer Suspension der Zellen in Kulturmedium wurde die Zellzahl mit einer Neubauer-Zählkammer bestimmt und die Zellen in der o. a. Dichte in Kulturschalen neu ausgesät.

In regelmäßigen Abständen wurden die Zellen auf eine Kontamination mit Mykoplasmen untersucht. Hierzu wurden Deckgläschenkulturen angelegt. Nach Erreichen einer ca. 50 %igen Konfluenz wurden die Zellen mit DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindol-dihydrochlorid, Boehringer Mannheim, Deutschland), einem Fluoreszenzfarbstoff, der an die DNA im Kern der Zellen bindet, umgesetzt (17). Fluoreszenzmikroskopisch konnte so nachgewiesen werden, daß zu keinem Zeitpunkt unserer Untersuchungen eine Kontamination der Zellen mit Mykoplasmen vorlag.

Um das Proliferationsverhalten der HaCaT-Zellen zu charakterisieren, wurde eine Wachstumskurve aufgenommen. Die Zellen wurden unter den o. a. Bedingungen in 24-well Kulturschalen kultiviert, zum gegebenen Zeitpunkt trypsinisiert und mittels einer Neubauer-Zählkammer quantitativ erfaßt. Das Ergebnis ist in Abbildung 1 dargestellt.

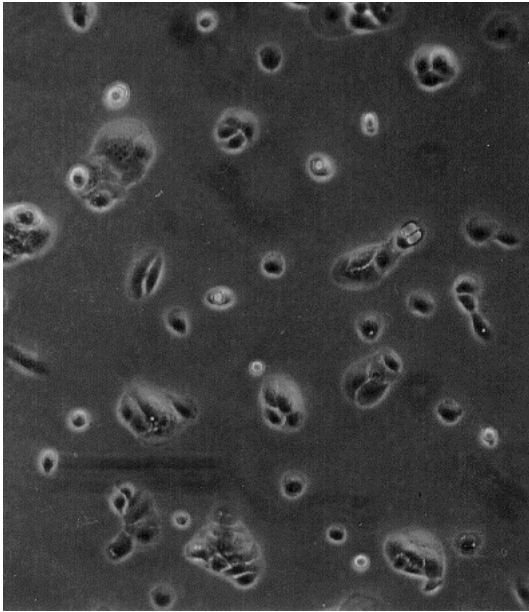


**Abb. 1:** Proliferation von HaCaT Zellen. (Neubauer-Zählkammer, n=3)

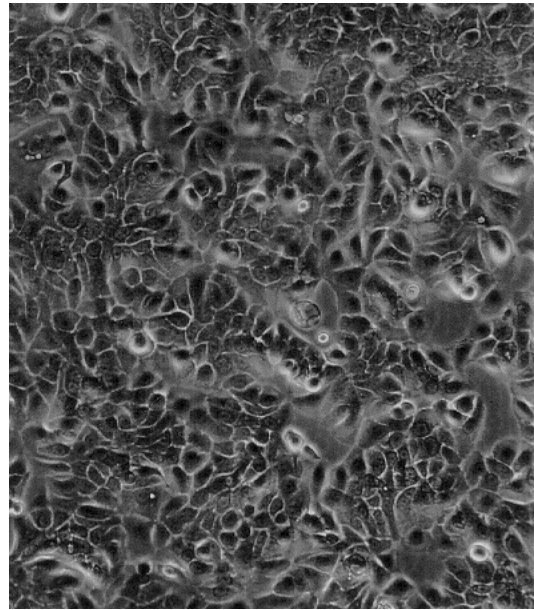
Die Zellzahl sinkt nach der Aussaat etwas ab, da sich nicht alle Zellen angeheftet haben bzw. Teile der Population abgestorben sind. Nach einer gewissen lag-Phase, einer Art Anpassungs- und Orientierungsphase, folgt die logarithmische Wachstumsphase, in der sich die Zellzahl in 24 Stunden etwa verdoppelt. Nach ca. 7 Tagen bildet sich eine Plateauphase (= stationäre Phase) aus, in der sich die Zellzahl in den folgenden zwei Wochen nicht mehr signifikant verändert. Die mittlere Zelldichte beträgt hier  $3,9 \times 10^5$  Zellen/cm<sup>2</sup>.

Das Wachstumsverhalten und die Morphologie der Zellen wurden weiterhin lichtmikroskopisch charakterisiert. Dazu wurden die Kulturen unter einem inversen Phasenkontrastmikroskop der Firma Nikon beobachtet. In Abbildung 2 ist die Morphologie der Zellen in Abhängigkeit der Kultivierungsdauer fotografisch dargestellt.

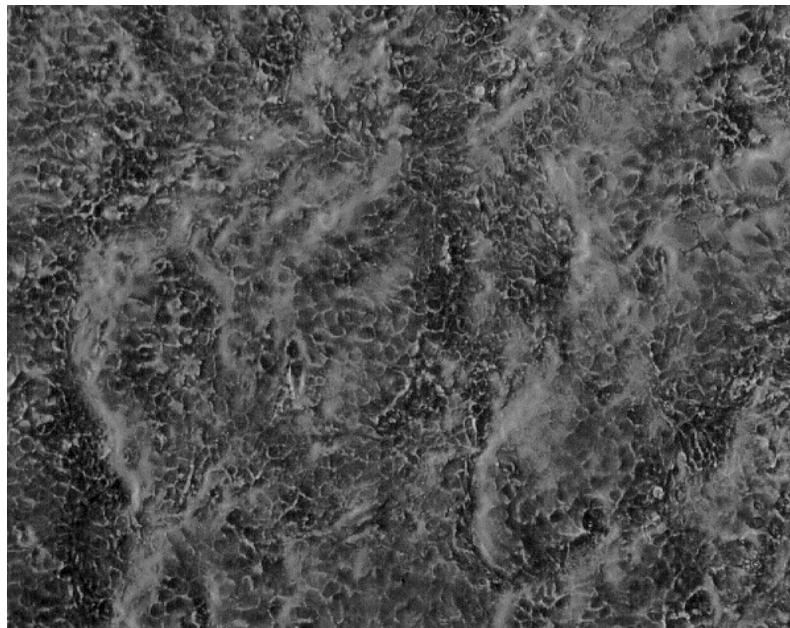
A)



B)



C)



**Abb. 2:** Phasenkontrastaufnahmen von HaCaT-Zellen im inversen Mikroskop (100 $\times$ ). A) 24 Stunden, B) 4 Tage und C) 3 Wochen nach Aussaat in Petrischalen.

Nach der Aussaat heften sich die Zellen auf dem Boden der Kulturgefäße an. Innerhalb von 24 Stunden beginnen die Zellen mit der Proliferation, was sich in der Ausbildung kleiner Kolonien bemerkbar macht (Abb. 2A). Diese Kolonien dehnen sich aus, bis eine Konfluenz erreicht ist. Die Zellen weisen dann das typisch kopfsteinpflasterartige Aussehen auf (Abb. 2B). Abbildung 2C zeigt eine Kultur drei Wochen nach der Aussaat. Die Zellen wachsen in mehreren Schichten übereinander, im Foto daran zu erkennen, daß Teile der Kultur unscharf abgebildet sind, da sie außerhalb des Fokus liegen.

### **Literaturverzeichnis**

1. D. Breitkreuz, P. Boukamp, A. Hülsen, C. Ryle, H. J. Stark, H. Smola, G. Thiekötter, and N. E. Fusenig. Human keratinocyte cell lines. In: G. Wilson. *Pharmaceutical applications of cell and tissue culture to drug transport*. Plenum Press, New York, 1991, pp. 283-296
2. P. Boukamp, R. T. Petrussevska, D. Breitkreuz, J. Hornung, A. Markham, and N. E. Fusenig. Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line. *J. Cell Biol.* 106: 761-771 (1982)
3. H. Holzmann, S. Kippenberger, A. Ramirez-Bosca, J. Bereiter-Hahn, and A. Bernd. Zell- und Gewebekulturmodelle in der Dermatologie. *Hautarzt* 45: 304-312 (1994)
4. C. Ryle, D. Breitkreuz, H. J. Stark, I. Leigh, P. Steinert, D. Roop, and N. E. Fusenig. Density-dependent modulation of synthesis of keratins 1 and 10 in the human keratinocyte line HaCaT and in ras-transfected tumorigenic clones. *Differentiation* 40: 42-54 (1989)
5. D. Breitkreuz, P. Boukamp, H. J. Stark, C. Ryle, and N. E. Fusenig. Response of established keratinocyte lines to modulators of epidermal differentiation. In: U. Reichert and B. Shroot (Eds.). *Pharmacology of the skin*, Vol. 3. Karger, Basel, 1989, pp. 8-14
6. F. E. Görmar, C. Theilig, K. Dold, A. Bernd, and H. Holzmann. Fluorometric measurement of suprabasal cytokeratins and DNA of human keratinocytes cultivated in microtiter plates. In: A. Bernd (Ed.). *Cell and tissue culture models in dermatological research*. Springer, Berlin Heidelberg New York, 1993, pp. 126-131

7. F. E. Görmar, A. Bernd, J. Bereiter-Hahn, and H. Holzmann. A new model of epidermal differentiation: Induction by mechanical stimulation. *Arch. Dermatol. Res.* 282: 22-32 (1990)
8. C. Theilig, A. Bernd, A. Ramirez-Bosca, F. E. Görmar, J. Bereiter-Hahn, B. Keller-Satnislowski, A. C. Sewell, N. Rietbrock, and H. Holzmann. Reactions of human keratinocytes in vitro after application of nicotine. *Skin Pharmacol.* 7: 307-315 (1994)
9. S. Y. Kim, H. K. Hwang, K. Yoneda, L. N. Marekov, P. M. Steinert, and S. I. Chung. HacaT cells: A new model to study calcium-induced terminal differentiation. *J. Invest. Dermatol.* 102: 594 (1994)
10. A. Bernd and H. Holzmann. Zellkulturen von Keratinozyten und Fibroblasten zur Prüfung der Toxizität und des Metabolismus von Arzneistoffen. In: N. Rietbrock (Ed.). *Die Haut als Transportorgan für Arzneistoffe*. Steinkopff Verlag, Darmstadt, 1990, pp. 37-46
11. B. Bonnekoh, B. Farkas, J. Geisel, and G. Mahrle. Lactate dehydrogenase release as an indicator of dithranol-induced membrane injury in cultured human keratinocytes. *Arch. Dermatol. Res.* 282: 325-329 (1990)
12. B. Bonnekoh, A. Wevers, J. Geisel, H. Rasokat, and G. Mahrle. Antiproliferative potential of zidovudine in human keratinocyte cultures. *J. Am. Acad. Dermatol.* 25: 483-490 (1991)
13. B. Bonnekoh, H. Tanzer, M. Seidel, J. Geisel, H. F. Merk, G. Mahrle, and W. Wiegrebe. Structure-function relationship of new Anthralin derivatives assayed for growth inhibition and cytotoxicity in human keratinocyte cultures. *Arch. Pharm.* 324: 899-906 (1991)
14. A. Bernd, M. Breuer, K. Dold, and H. Holzmann. Uptake kinetics and the effect of minoxidil on human keratinocyte cultures. *Arzneim. Forsch./Drug. Res.* 40: 413-416 (1990)
15. I. Steinstrasser, K. Koopmann, and H. P. Merkle. Epidermal aminopeptidase activity and metabolism as observed in an organized HaCaT cell sheet model. *J. Pharm. Sci.* 86: 378-383 (1997)
16. P. K. Shah and R. T. Borchardt. Liquid chromatographic analysis of leucine-enkephalin and its metabolites in homogenates of cultured human keratinocytes. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 8: 457-461 (1990)
17. D. D. Uphoff, S. M. Gignac, and H. G. Drexler. Mycoplasma contamination in human leukemia cell lines I: Comparison of various detection methods. *J. Immunol. Methods* 149: 43-53 (1992)



## **Kapitel 7**

# **The human keratinocyte cell line HaCaT: An in vitro cell culture model for cutaneous testosterone metabolism**

Submitted to Pharmaceutical Research

## **Abstract**

**Purpose:** An in vitro cell culture model based on the human keratinocyte cell line HaCaT was characterized with respect to testosterone (T) metabolism.

**Methods:** Properties relevant for the reproducibility of experiments, such as cell density and viability in different culture media were determined using established methods. The metabolism of T in HaCaT cells was studied by different analytical methods either using tritium labeled T or unlabeled T in combination with an liquid chromatography/mass spectrometry (LC/MS) assay. To further characterize the enzyme 5 $\alpha$ -reductase (5 $\alpha$ -R) with respect to the expression of subtypes, the effects of pH and specific inhibitors on the activity of this enzyme were determined.

**Results:** HaCaT cells showed reproducible cell growth. Both analytical methods revealed similar formation rates of metabolites, whereas the LC/MS allowed comfortable identification of metabolites by their corresponding mass spectra. The metabolic profile obtained for T metabolism in HaCaT was similar to those in other in vitro models, such as excised human skin or primary cell cultures, indicating that the steroid metabolizing enzymes previously found in human skin are also expressed in the HaCaT cell line. A broad optimum of 5 $\alpha$ -R activity at neutral pH and a strong inhibitory effect of MK 386, a selective 5 $\alpha$ -R1 inhibitor, with an IC<sub>50</sub> of about 25 nM accounts for the predominant expression of the subtype I of 5 $\alpha$ -R in HaCaT cells.

**Conclusion:** The HaCaT cell line seems to be a suitable model for studying testosterone metabolism equivalent to the human skin.

## **Introduction**

In recent years the skin has been shown to contain a broad spectrum of enzymes capable of metabolizing a wide range of topically applied drugs and endogenous substrates (1,2). A major part of this metabolic activity is located within the epidermis (3). All types of biotransformation reactions known from liver metabolism, such as phase I-reactions and conjugation were found for numerous drug substances (4). The skin is now recognized as an important site for the extrahepatic metabolism of xenobiotics (2).

The metabolic capacity of the skin may have consequences for the topical as well as the transdermal delivery of drugs. If the extent of biotransformation for a transdermally delivered substance is large enough, the bioavailability of transdermal delivery systems may be reduced significantly (5). For example 16-21% of transdermally applied glyceryl trinitrate was reported to be metabolized in the skin (6). Cutaneous metabolism may also lead to reactive metabolites, having the potential for contact sensitization, an important problem in transdermal delivery (7).

For these reasons, there is a growing interest in methods for studying human skin metabolism.

Since it is difficult to differentiate skin from systemic metabolism under in vivo conditions (5), there is need for suitable in vitro models. These in vitro methods include the use of freshly excised human skin, primary cultures and reconstructed human skin (3). The main drawback of all these methods is the need for freshly excised human skin and the known inter-individual variability between samples from different donors.

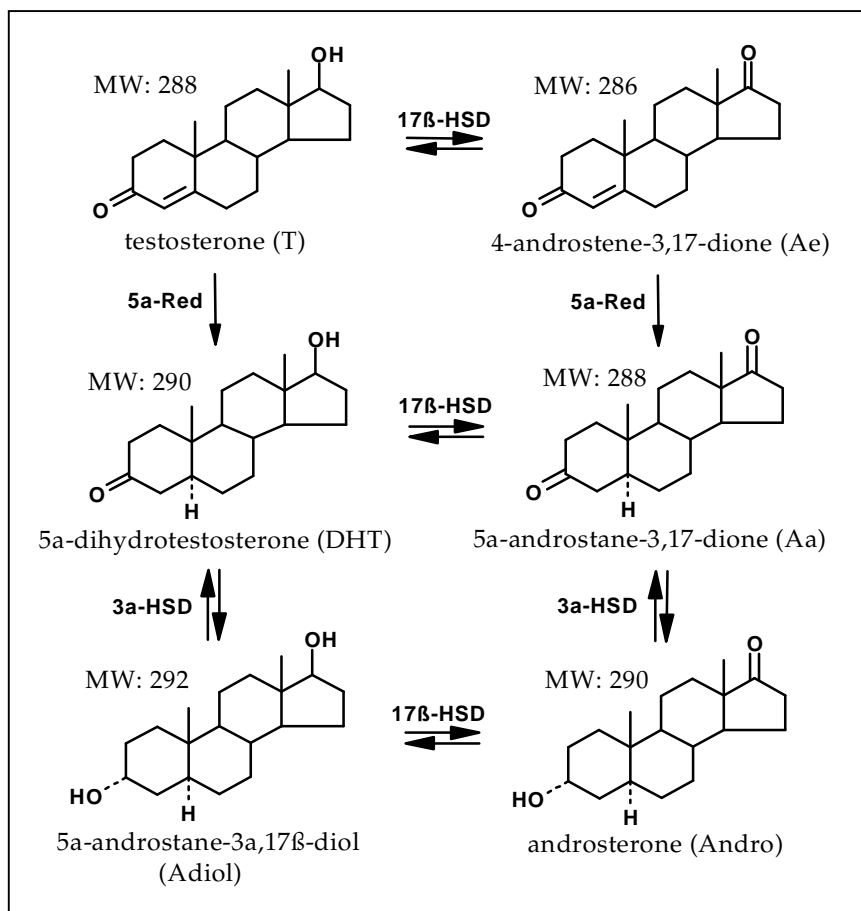
In contrast, epidermal cell lines are readily available, can be grown under reproducible conditions and should therefore be more suitable for metabolism experiments.

The spontaneously transformed human keratinocyte cell line HaCaT is an example for an in vitro model and has been used as a model for skin toxicity studies (8).

Some authors observed that cell differentiation is a necessary condition for the expression of enzyme systems in human keratinocytes (9,10). The marked differentiation of HaCaT cells at confluency is indicated by the expression of a number of terminal differentiation markers, such as keratins 1 and 10, profillagrin, and loricrin (11). Furthermore, the full epidermal differentiation capacity of HaCaT cells was demonstrated by transplantation onto nude mouse skin (12). The HaCaT cell line, forming sheets of several cell layers in submerge culture, was recently shown to metabolize amino acid amides and a model peptide (Leu-enkephalin) by epidermal aminopeptidases (13).

The aim of our study was to investigate the metabolism of the androgen testosterone (T) in HaCaT cells. The major difference to the hydrolysis and enzymatic degradation of peptides is that the biotransformation of steroids is cofactor-dependent and, therefore, the intact cell is needed for metabolism studies. The androgen T was chosen as a model steroid, because the metabolic pathways in human skin are well known (Fig.1) (14). The transdermal application of T in the treatment of male hypogonadism has yielded several commercially available transdermal systems (15,16). Although it is known that T is extensively metabolized in human skin (17), there is only scant information available on the effect of metabolism on the pharmacokinetics of transdermal delivery systems.

Furthermore, cutaneous metabolism of T is of general interest, because the skin has been recognized as a major site for endogenous androgen metabolism as well as a target organ for these steroids. Androgens are important regulators of human hair growth (14) and are generally considered responsible for the stimulation of the sebaceous glands (18).



**Fig. 1:** Biotransformation pathways of testosterone in human skin. (5 $\alpha$ -Red, 5 $\alpha$ -reductase; 17 $\beta$ -HSD, 17 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase; 3 $\alpha$ -HSD, 3 $\alpha$ -hydroxysteroid dehydrogenase; MW, molecular weight of steroid)

T is reduced to 5 $\alpha$ -dihydrotestosterone (DHT) by two distinct isoforms of the membrane bound steroid 5 $\alpha$ -reductase (5 $\alpha$ -R) (EC 1.3.1.22) at the target cell site. DHT represents the most potent androgen and is thought to be involved in acne and other androgen-related disorders, such as male pattern baldness and hirsutism (19). The reduction of local DHT concentrations by inhibition of 5 $\alpha$ -R might provide a useful approach for reversing these conditions (20). We investigated the metabolism of T in HaCaT cells under different cell culture conditions as well as in the presence of enzyme inhibitors to determine the suitability of this in vitro model for steroid metabolism in human skin.

## **Materials and methods**

### Materials

Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) with and without HEPES, fetal calf serum (FCS), 0.05% trypsin/0.025% ethylenediamine tetra-acetic acid (EDTA) solution and penicillin 10000 U/ml, streptomycin 10000 µg/ml solution were obtained from Gibco BRL-Life Technologies, Paisley, UK. PBS with and without Ca<sup>2+</sup> and Mg<sup>2+</sup> and EBSS were prepared from double distilled water. Cell culture dishes and six-well multidishes (35 mm) were purchased from Nunc, Roskilde, Denmark. Twelve-well multidishes (22.5 mm) were obtained from Costar, Cambridge, USA.

Testosterone (T), dihydrotestosterone (DHT), androstenedione (Ae), androstanedione (Aa), androsterone (Andro) and epiandrosterone were a gift of Schering AG, Berlin, Germany. Androstan-3 $\alpha$ ,17 $\beta$ -diol (Adiol), Finasteride and MTT were obtained from Sigma Chemical Co., St. Louis, USA. MK 386 was donated by Merck Sharp&Dohme GmbH, Haar, Germany. [1,2,6,7-<sup>3</sup>H] testosterone (spec. activity 98.0 Ci/mmol, radiochemical purity: 97.8%) was purchased from Amersham Life Science, Braunschweig, Germany. TLC silica gel plates (Polygram SIL G) were obtained from Machery-Nagel, Dueren, Germany. Dichloromethane, diethylether, dimethyl sulfoxide (DMSO), ethanol and methanol were purchased from Merck KGaA, Darmstadt, Germany.

### Cell culture

HaCaT cells seeded at a density of  $2 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup> were maintained in DMEM containing 10% FCS, 2mM glutamine and antibiotic additives (100 U/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin) at 37° C in an atmosphere of 5% CO<sub>2</sub> and 95% relative humidity. The medium was changed twice a week. The cells were used between the 35<sup>th</sup> and 43<sup>th</sup> passage.

For passaging, cells were washed with PBS without Ca<sup>2+</sup> and Mg<sup>2+</sup>, preincubated with 0.05% EDTA solution and then harvested with a 0.05%

trypsin/0.025% EDTA solution at 37° C. After counting the cells in the resulting cell suspension, a defined number of keratinocytes was plated in culture dishes. The cell line was periodically assayed for mycoplasma infection using DAPI staining (4',6-diamidino-2-phenylindole, Boehringer, Mannheim, Germany) (21). No such infections were observed.

Light microscopic examinations were performed to study growth and morphology of the cells, using an inverted phase contrast Nikon microscope.

#### Determination of protein contents

The protein contents of different passages grown on various culture dishes were determined by the method of Lowry (22). Cells were washed and lysed with 0.5 N NaOH. After appropriate dilution with water the protein content was determined spectrophotometrically (UV-160, Shimadzu, Kyoto, Japan) at wavelength of 740 nm using bovine serum albumin as a standard (n=3).

#### Cell viability using different media

For the different incubation conditions it was necessary to use other media than DMEM, because this medium interfered with specific assays. In case of incubations with radiolabeled compounds, CO<sub>2</sub> independent buffer systems were needed. The effects of DMSO, HEPES, PBS supplemented with glucose and EBSS on the mitochondrial activity were determined using a colorimetric assay (MTT) based on the cleavage of a yellow tetrazolium salt to purple formazan crystals by mitochondrial enzymes of viable cells. HaCaT cells were seeded at a density of  $2 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup> into 96-well multidishes and cultivated under normal conditions. After 3 weeks the cells were incubated for up to 24 h with HEPES buffered DMEM, PBS, EBSS or EBSS supplemented with DMSO at 37° C in an atmosphere of 5% CO<sub>2</sub> and 95% relative humidity. Afterwards the cells were washed and incubated with 200 µl medium containing 0.5 mg/ml MTT for 4 hours. The MTT solution was removed, developed formazan crystals were dissolved in 200 µl DMSO and quantitated spectrophotometrically using an

ELISA reader (Titertek Plus MS 212, ICN, Eschwege, Germany) at wavelength of 570 nm and 690 nm. The MTT transformation of cells in complete DMEM was set as 100 % viability.

#### Incubation with $^3\text{H}$ -testosterone

HaCaT cells were seeded into 12-well plates at a density of  $2 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup>. After 3 weeks medium was removed, the cells were washed and 0.5 ml of a solution of [1,2,6,7- $^3\text{H}$ ]-T ( $^3\text{H}$ -T) together with unlabeled substrate in DMEM with HEPES (pH 7.4) was added. If necessary, DMSO was used as solvent for T, where the final DMSO concentration did not exceed 1% (v/v). The pH of the incubation medium (pH 7.4) was constant during the reaction time. The incubation temperature was 37° C in a humidified atmosphere. At the end of each incubation period, the medium was removed and the cells were washed with 0.5 ml PBS. Combined media and wash were extracted twice with 1ml of diethylether. The solvent was evaporated to dryness and the residue was redissolved in 100  $\mu\text{l}$  ether. The yield of radioactivity in the organic phase was measured by scintillation counting of control incubations (TRI-CARB 2100 TR liquid scintillation analyzer, Canberra-Packard GmbH, Dreieich, Germany) and was found to be  $93 \pm 4\%$  (n=3).

#### Separation of tritium labeled metabolites

The whole etheric solution was applied to  $20 \times 20$  cm silica-TLC plates, which were then developed in dichloromethane-diethylether (4+1). Plates were scanned for radioactivity using an automatic linear  $\beta$ -scanner (Berthold, Wildbad, Germany) and the Chroma software (Berthold). The radioactive metabolites were identified by comparison with  $^3\text{H}$ -steroid standards run in parallel. Steroids were quantified as a percentage of total radioactivity by integration of the peaks. The sensitivity was 50 dpm per 10 min for tritium at a resolution of 1.0 mm. The analyzer automatically subtracted the background count rate. Additionally, identity of the metabolites was verified using unlabeled



steroids added on TLC-plates. After developing of the plates, steroids were visualized by spraying with 10% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> in ethanol followed by heating.

#### Incubations with unlabeled testosterone

HaCaT cells were seeded into 6-well plates at a density of  $2 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup>. After 3 weeks medium was removed, the cells were washed and 1 ml of a solution of T in DMSO and EBSS (pH 7.4) was added. The final DMSO concentration did not exceed 1% (v/v). PBS was chosen as incubation medium, because DMEM interfered with the liquid chromatographic/mass spectrometry (LC/MS) assay. The cells were incubated for varying periods at 37° C in 5% CO<sub>2</sub> and 95% relative humidity. At the end of each incubation period, the medium was removed and the cells were washed with 1 ml of water. Combined media and wash solutions were lyophilized and the residue was redissolved in 4ml diethylether. After centrifugation 3 ml of the solution were taken to dryness, redissolved in 1 ml of methanol and analyzed by a LC/MS method. The recovery for this method was found to be  $98 \pm 3\%$ .

#### LC/MS assay

Unlabeled T and metabolites were assayed by liquid chromatography/mass spectrometry (LC/MS) using a Waters™ LC Module I plus liquid chromatograph equipped with a Fisons™ MD 800 mass detector. A LiChrospher®100 RP 18 (5 µm, 250×4.6 mm i.d., Merck KGaA) was used as analytical column maintained at 30° C. The mobile phase consisted of methanol/water (65:35) at a flow rate of 1.0 ml/min. The identification of the steroids was based on comparison with authentic standards and on individual mass spectra. Quantification of T and metabolites was performed from peak areas at individual ion mass in comparison to authentic standards by the MassLab software (Fisons). The limit of detection for T was 100 ng/ml.

### Effect of pH on 5 $\alpha$ -R activity

The experimental conditions used for studying the effect of pH on 5 $\alpha$ -R activity were the same as outlined above for incubations with labeled testosterone, except that the cells were incubated in PBS adjusted to pH values from 5 to 8.5 containing 0.1  $\mu$ M T. The pH of the incubation medium was constant during the reaction time. In a time course experiment, the conversion to 5 $\alpha$ -reduced metabolites linearly increased up to 2 hours. Therefore, an incubation time of 1 hour was chosen. The activity of 5 $\alpha$ -R was expressed by the sum of DHT, Adiol, Andro and Aa.

### Inhibition studies

The experimental conditions used for studying the effect of two inhibitors, Finasteride and MK 386, on 5 $\alpha$ -R activity were the same as outlined above for incubations with labeled testosterone, except that the cells were incubated for one hour with 0.1  $\mu$ M T and the specific inhibitor. Finasteride, a high affinity inhibitor of 5 $\alpha$ -R subtype II (5 $\alpha$ -R2), and MK 386, a selective inhibitor of 5 $\alpha$ -R subtype I (5 $\alpha$ -R1), were dissolved in ethanol and used in final concentrations of 0-500 nM. The volume of ethanol added to the incubation medium (0.5% v/v) did not affect enzyme activity. Inhibitory activities were expressed as percentage of the sum of 5 $\alpha$ -reduced products formed in the absence of inhibitor. The 50% inhibitory concentration (IC<sub>50</sub> value) represents the concentration of inhibitor required to decrease enzyme activity to 50% of the control.

## **Results and discussion**

### Properties of HaCaT cells

In order to study cutaneous metabolism in a cell culture model, some preliminary investigations in the growth characteristics of the cells and the experimental setup were necessary.

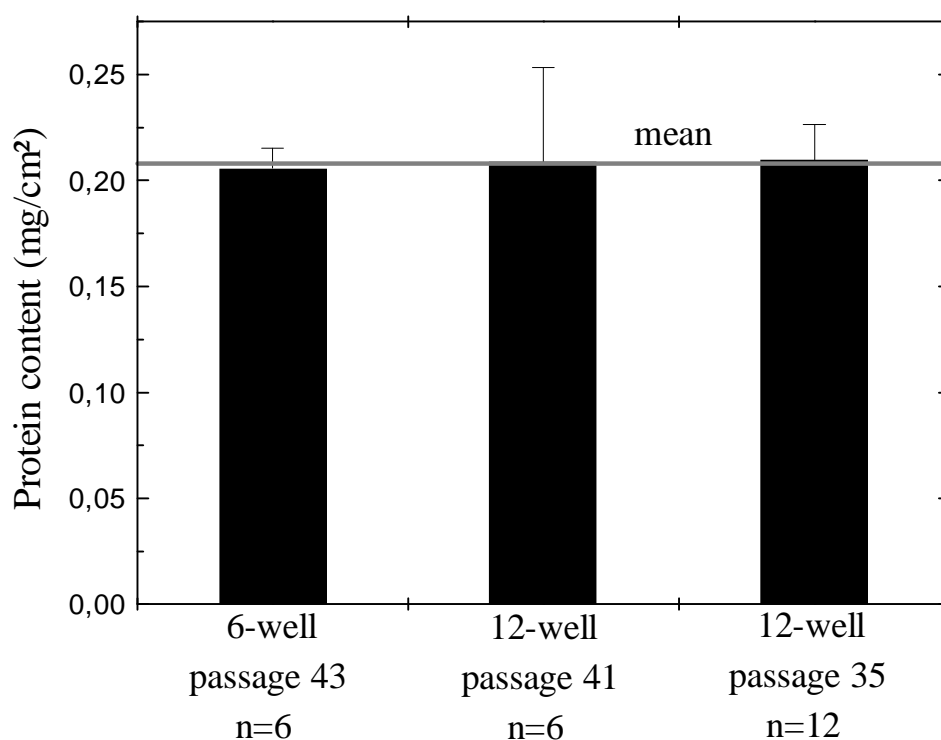
The morphology of HaCaT cells of different passages was examined by light microscopy, showing the typical “cobble-stone-pattern” as well as formation of multilayers, which is in accordance to observations by others (23).

Previously, it was shown that the specific activity of  $5\alpha$ -R and other steroid metabolizing enzymes in keratinocytes increased with cell time in culture (10), indicating that specific enzyme activity is directly related to terminal differentiation in these cells.

For HaCaT cells it was demonstrated that the expression of terminal differentiation markers, such as cytokeratins K1 and K10, significantly increased with time in culture up to 3 weeks (24). From growth curves (chapter 6) it is known that the number of cells increases up to 7 days after seeding the cells at a density of  $2 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup> remaining constant up to 21 days.

Taking this into account all investigations were performed with HaCaT cells grown for 3 weeks.

The protein contents of HaCaT cells of different passages grown in multiwell-dishes for 21 days are illustrated in Fig. 1. The average protein content was  $0.21 \pm 0.025$  mg  $\times$  cm<sup>-2</sup>. There were no statistically significant differences, neither between different passages of cells, nor between the cell culture dishes used, indicating constant cell density, a necessary condition for the reproducibility of results obtained from different experiments.

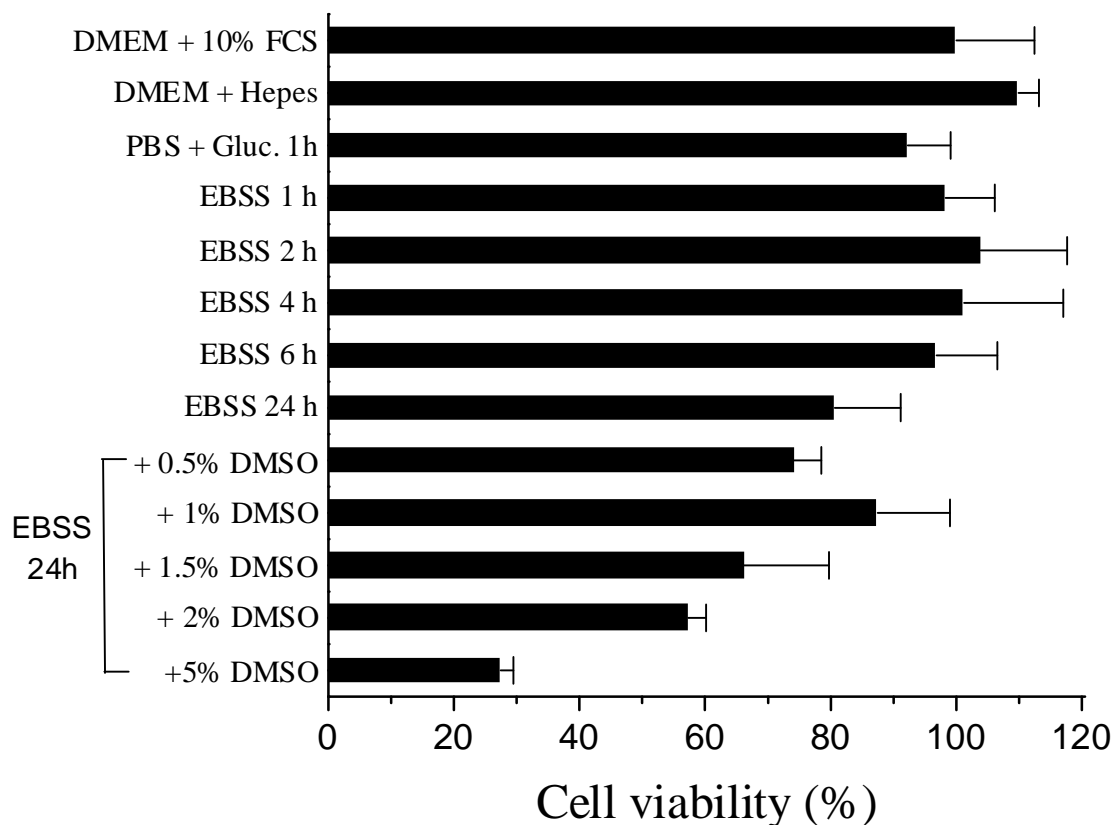


**Fig. 2:** Protein content of HaCaT cells of various passages grown in different cell culture mutidishes determined by the method of Lowry (23). Error bars indicate the standard deviation for each column.

### Cytotoxicity studies

To demonstrate cell viability under different cell culture conditions used for metabolism studies, the MTT cytotoxicity assay was conducted for cells maintained in different media, partially supplemented with DMSO (Fig. 2). The MTT assay is based on the activity of mitochondrial enzymes and is frequently used for the assessment of cytotoxicity. Supplementation of HEPES, which was used in incubations with radiolabeled compounds, did not lead to any toxic effect on the cells. The viability of HaCaT maintained in EBSS, the medium used for incubations with unlabeled T, decreased with time, but did not fall below 80% in 24 hours. The presence of the cosolvent DMSO up to 1.5% (v/v) did not lead to a further reduction of cell viability. Therefore, a maximum concentration of 1% DMSO was used for solubilizing of the substrate T in the

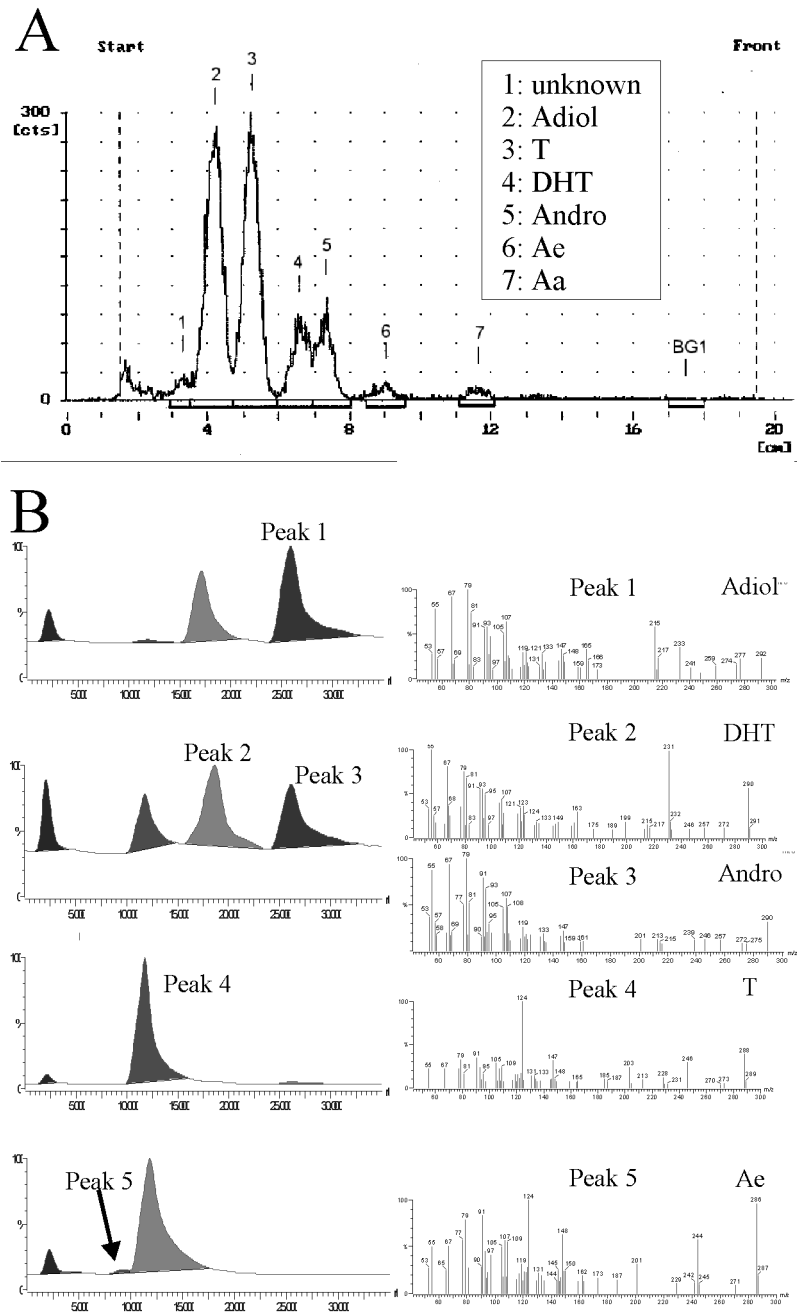
incubations. This supplement also had no influence on the formation of metabolites (data not shown).



**Fig. 3:** Viability of HaCaT cells after incubation with different media and buffers for various incubation periods as well as toxicity of DMSO in buffer systems as observed in the MTT cytotoxicity test. Viability in DMEM + 10% FCS was set as 100%. Values are mean and SD ( $n \geq 6$ ).

### Metabolism of T in HaCaT

When HaCaT cells were incubated with  $^3\text{H-T}$ ,  $93 \pm 4\%$  of the radioactivity added was found in the culture medium plus wash. Therefore, the amount of metabolites formed was measured only in these combined solutions. The results of chromatographic identification and quantification of T metabolites are shown in Figures 4A and 4B.

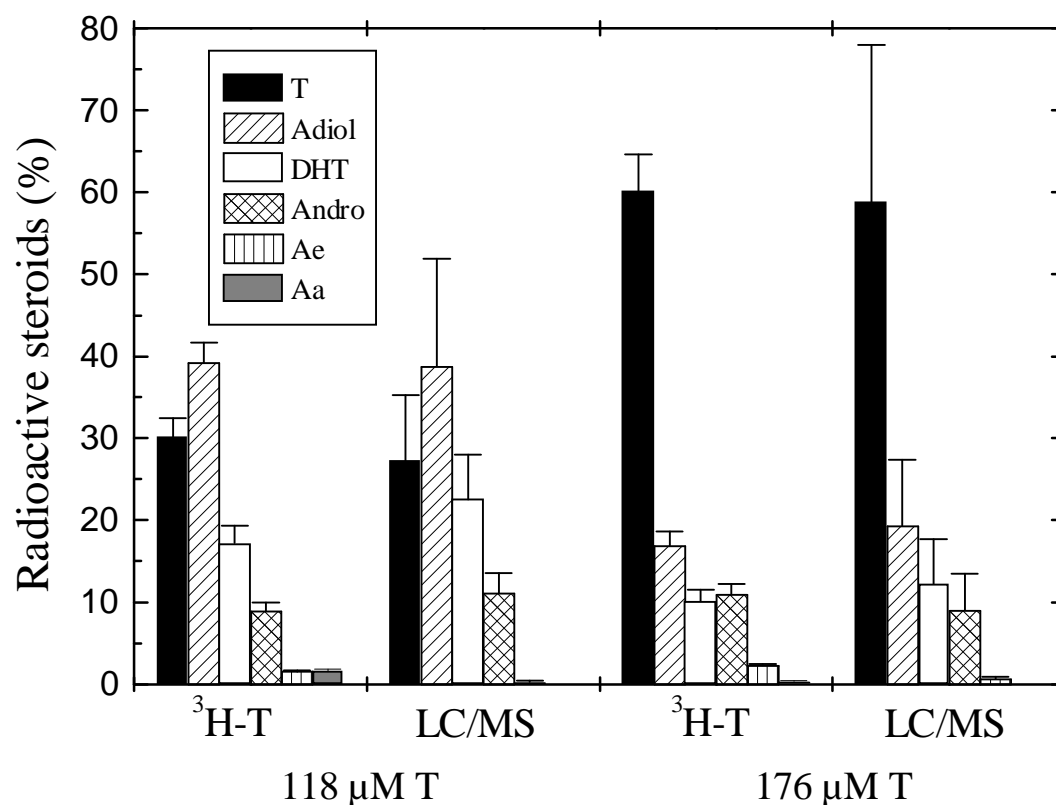


**Fig. 4:** **A:** Representative TLC chromatogram of extracts from the incubation of HaCaT cells with  $^3\text{H}$ -testosterone.  
**B:** Representative HPLC chromatogram of extracts from the incubation of HaCaT cells with unlabeled testosterone including mass spectra of the isolated peaks. The area of the peaks was determined at the channel corresponding to the specific ion mass.

After the incubation with  $^3\text{H-T}$  five metabolites were separated by TLC and identified against authentic standards:  $5\alpha$ -androstane- $3\alpha,17\beta$ -diol (Adiol),  $5\alpha$ -dihydrotestosterone (DHT), androsterone (Andro), androst-4-ene- $3,17$ -dione (Ae) and  $5\alpha$ -androstane- $3,17$ -dione (Aa) (Fig. 4A). Another peak was found with a greater polarity than Adiol (Rf: 0.1), which did not correspond with any of the available standards. Since the authentic standard of epiandrosterone, another possible metabolite of T was not separated from Andro by this TLC method, additional plates were developed in an alternative solvent system consisting of dichloromethane-diethylether (1:1). Using this method, no epiandrosterone was detectable. However, a similar pattern of metabolites was observed for human skin and cultured epidermis (25).

A close agreement to the above reported results was found with the incubation of unlabeled T, where Adiol, DHT, Andro and Ae were found by the LC/MS assay. No other peaks could be detected by this method. The identity of the metabolites was confirmed by comparing mass spectra of metabolites (Fig. 4B) to those of authentic standards. Although Adiol and Andro had similar retention times, it was possible to separately quantitate both metabolites at the specific channel corresponding to the individual ion mass. In contrast to incubations with  $^3\text{H-T}$ , no Aa was detected, which may be due to the higher detection limit.

A comparison of results from incubations with two different concentrations of T showed similar formation rates of metabolites detected by both methods (Fig. 5).

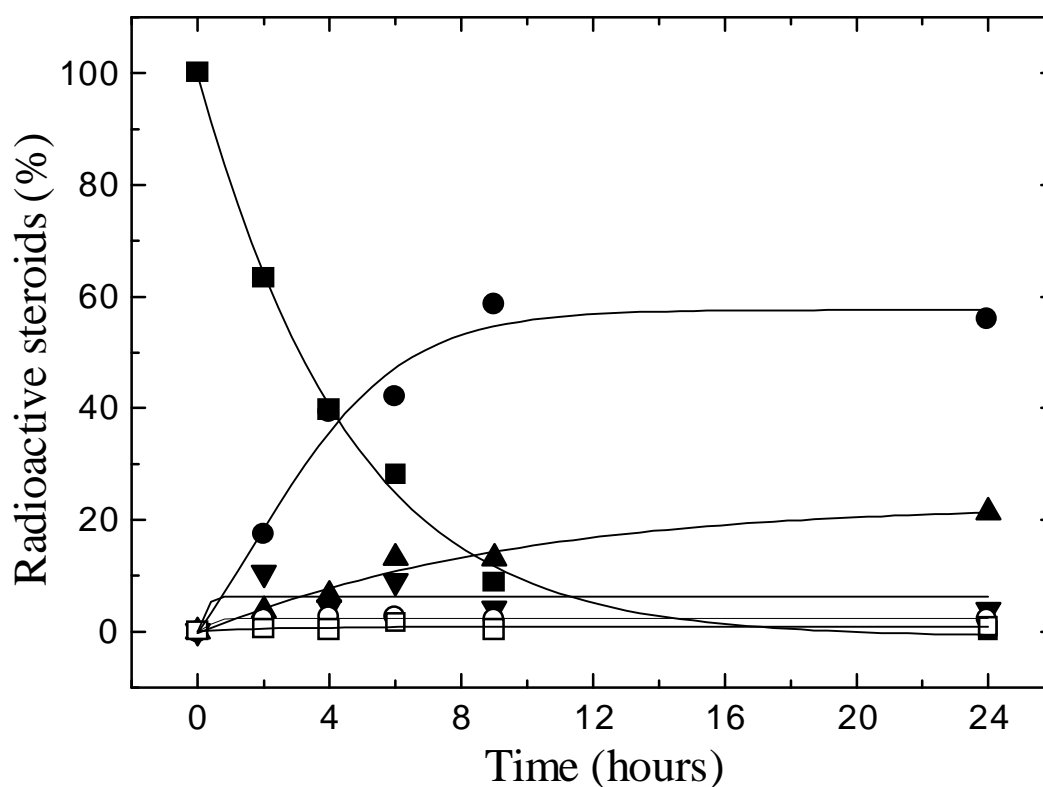


**Fig. 5:** Comparison of the relative amounts of metabolites detected by the different methods. HaCaT cells were incubated with 118  $\mu\text{M}$  and 176  $\mu\text{M}$  T, respectively. In case of studies with  $^3\text{H}$ -testosterone, metabolites were separated by TLC and quantitated by scanning of plates for radioactivity ( $^3\text{H-T}$ ). When unlabeled testosterone was used, metabolites were assayed by a LC/MS method (LC/MS). Values are mean and SD (n=3).

An advantage of using the LC/MS assay is that identification of metabolites is not only based on the determination of retention times, but also on comparison of the individual mass spectra. However, when small, physiologic-like, concentrations of T should be investigated in the cell culture model, the use of radiolabeled substrate is indispensable, due to the lower detection limit of this method.



Therefore, all subsequent investigations were performed with tritium labeled T. A time course of the appearance of the various metabolites during the incubation of HaCaT cells with 0.4  $\mu\text{M}$  tritium labeled T for 2 up to 24 hours is illustrated in Fig. 6.



**Fig. 6:** Time course of the formation of various metabolites of testosterone in HaCaT cells. Incubation with 0.4  $\mu\text{M}$  of  $^3\text{H}$ -testosterone under standard conditions. Each point represents the mean of two determinations. (-■-, testosterone; -●-, androstane-3 $\alpha$ ,17 $\beta$ -diol; -▲-, dihydrotestosterone; -▼-, androsterone; -○-, androstene-3,17-dione; -□-, androstane-3,17-dione)

The amounts of metabolites recovered are expressed as percentage of the radioactivity extracted from medium and wash. The concentration of T fell progressively with time so that after 24 h nearly all T was transformed to the corresponding metabolites. The amount of the main metabolites Adiol and DHT increased linearly up to 4 hours. The observed time course was strictly dependent on the substrate concentration, while there were no significant differences for cells of different passages detectable (data not shown).

From the metabolic pattern observed in these experiments it can be concluded, that the same enzymes, that were previously found in human skin (14,25), are also expressed in the HaCaT cell line. These enzymes are:  $5\alpha$ -reductase ( $5\alpha$ -R),  $17\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase ( $17\beta$ -HSD) and  $3\alpha$ -hydroxysteroid dehydrogenase ( $3\alpha$ -HSD).

#### Comparison with other in vitro models

To determine whether the profile of metabolites derived from the HaCaT cells is similar to those obtained with other in vitro methods, we compared our data to studies performed with excised human skin (17,26), the so called Living Skin Equivalent (LSE™) (26) and human fibroblasts in culture (27). Therefore, results of an incubation were chosen, which yielded a relative amount of T unchanged comparable to the examined studies (Table 1). Metabolites found in HaCaT and fibroblasts were divided into groups to compare with results of the other studies, conducted with solvent systems incapable to separate all biotransformation products.

**Table 1:** Comparison of the metabolic profile of testosterone in different in vitro models.

Metabolites	Human leg skin <sup>1</sup>	Human abdominal skin <sup>2</sup>	LSE <sup>3</sup>	Cultured skin fibroblasts <sup>4</sup>	HaCaT <sup>5</sup>
polar metabolites	23±1 <sup>6</sup>	12±1	13±5	-	7±1
testosterone	45±2	64±6	54±11	44±26	45±1
5 $\alpha$ -androstane-3 $\alpha$ ,17 $\beta$ -diol	-	13±3	6±2	23±21	31±2
androstenedione, epi-androsterone, 5 $\alpha$ -DHT	15±1	4±1	5±1	22±10	9±1
5 $\alpha$ -DHT, androsterone	15±1	4±1	14±2	21±7	13±1
androstanedione	2±0	1±0	1±0	1±1	1±0

Results are expressed as the mean percentage of radioactivity found  $\pm$  SD.

<sup>1</sup> Data taken from Ref. 16, Application of 5 $\mu$ g/cm<sup>2</sup> T for 24 h (n=4).

<sup>2</sup> Data taken from Ref. 24, Application of 5 $\mu$ g/cm<sup>2</sup> T for 24 h (n=3).

<sup>3</sup> Data taken from Ref. 24, Application of 5 $\mu$ g/cm<sup>2</sup> T for 24 h (n=3).

<sup>4</sup> Data taken from Ref. 25, Incubation of cells in 60 mm petri dish with 0.05  $\mu$ Ci/2ml for 48 h (n=10).

<sup>5</sup> Incubation of HaCaT cells (passage 42) with 0.8  $\mu$ M T for 4 h (n=6).

<sup>6</sup> This fraction possibly contains Adiol, because all peaks with Rf values smaller than T were counted here.

It is obvious that the metabolic profile in HaCaT cells is similar to those obtained in human skin, LSE and skin fibroblasts. The major difference for the HaCaT cells is an increased amount of Adiol formed, indicating high activities of 3 $\alpha$ -HSD besides marked activities of 5 $\alpha$ -R, which is known to be predominant in human skin (28). The lower standard deviations for the HaCaT cells demonstrate higher reproducibility, while in human skin and primary cultures other variables, such as differences in anatomical site and inter-individual variability may contribute to differences in the metabolic pattern (28).

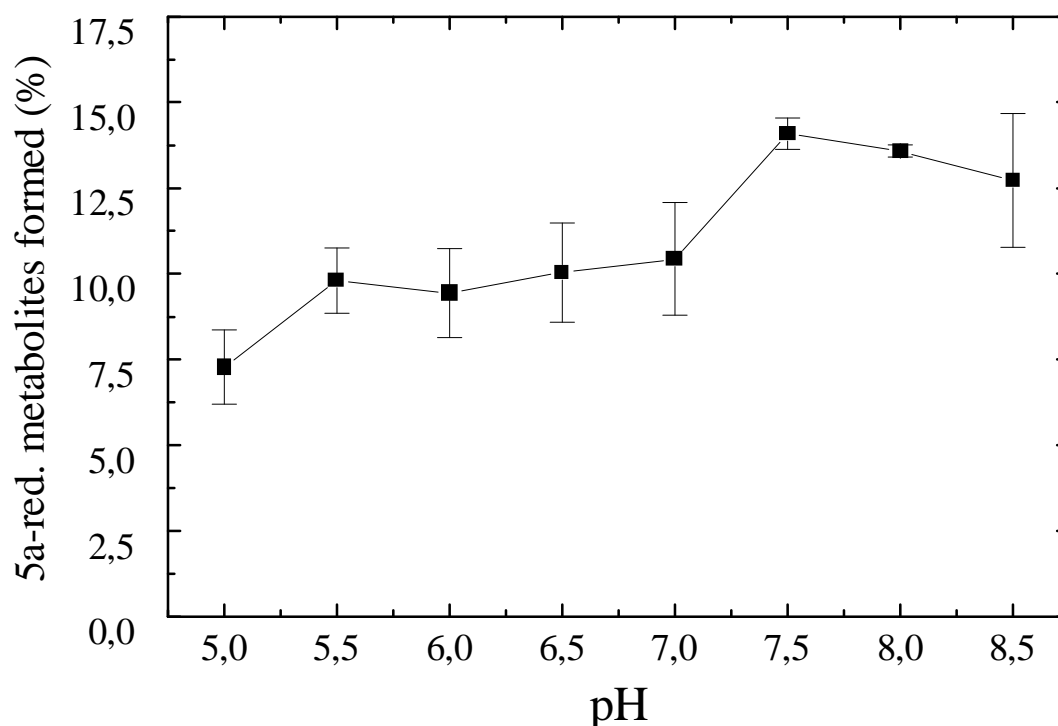
### 5 $\alpha$ -reductase activity

To further characterize the enzymatic activity in the HaCaT cell line, we investigated which of the two distinct isozymes of 5 $\alpha$ -R is expressed in these cells. From these investigations it should be possible to estimate the ability of this model to serve as an in vitro method for inhibition studies of the 5 $\alpha$ -R.

It is well known that there are two isoforms of 5 $\alpha$ -R selectively transforming 4-ene-3-oxosteroids (e.g. T) irreversibly to the corresponding 5 $\alpha$ -3-oxosteroids

(e.g. DHT) (17). Both subtypes of  $5\alpha$ -R differ in their tissue distribution and biochemical properties. The type I isozyme ( $5\alpha$ -R1) has a broad optimal pH of 6-9 and represents the cutaneous type, because it is mainly located in the sebaceous glands and in epidermal and follicular keratinocytes (18). This isozyme is inhibited by MK 386 (7- $\beta$ -methyl-4-aza-cholestan-3-one), a new selective  $5\alpha$ -R1 inhibitor (29).

The type 2 isozyme has a sharp pH optimum of about 5.5 and is located predominantly in the prostate and in genital skin, while there are only low levels in non-genital skin (18). Finasteride, the first compound currently approved for treatment of benign prostatic hyperplasia, represents a high affinity inhibitor of  $5\alpha$ -R2 and a slow binding, low affinity inhibitor of  $5\alpha$ -R1 (30).



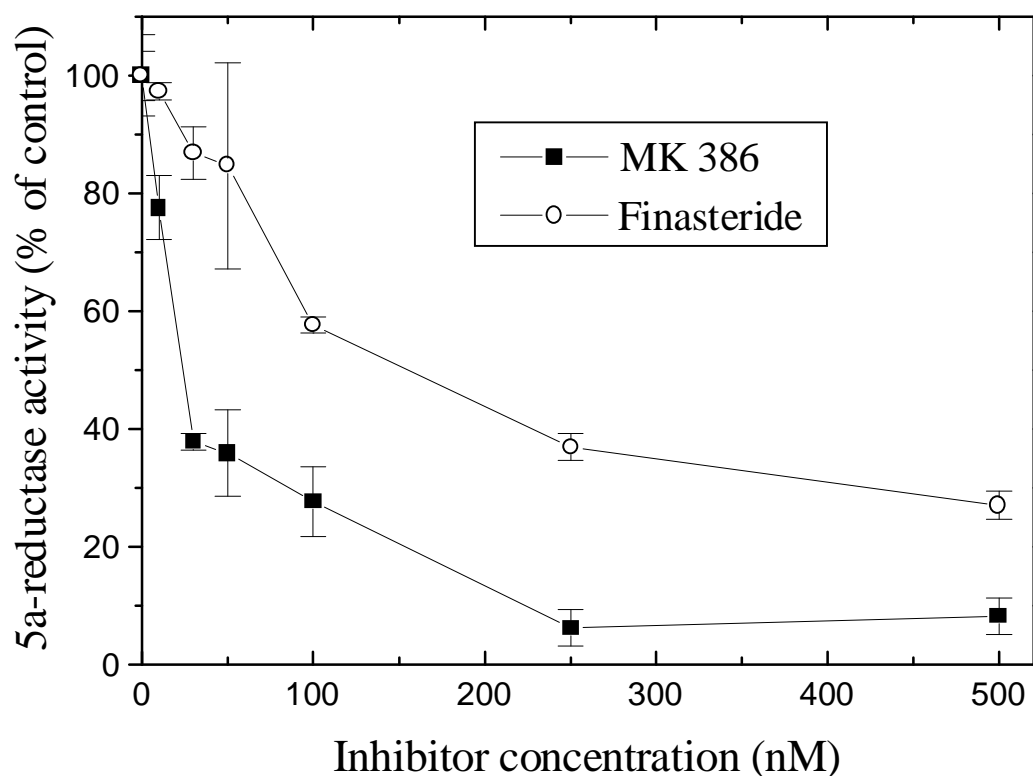
**Fig. 7:** The effect of pH on the  $5\alpha$ -reductase activity in HaCaT cells. PBS buffer adjusted to the defined pH values from 5 to 8.5 was used as incubation medium. The concentration of testosterone was 0.1  $\mu$ M. Each data point represents the mean and standard deviation of three determinations.

### pH optimum

To determine the pH optimum for 5 $\alpha$ -R in HaCaT cells, enzyme activity was measured over the pH range 5-8.5 using a substrate concentration of 0.1  $\mu$ M, which approximated the plasma level of T in adult male. From Fig. 7 it can be seen that the amount of 5 $\alpha$ -reduced metabolites increased from pH 5 to 8. Optimal activity was observed at pH 7.5-8, while there was minor transformation at pH 5. From this pH profile it was assumed that the activity of isozyme type 1 is markedly higher in HaCaT cells than the activity of 5 $\alpha$ -R2. The presence of low activities of 5 $\alpha$ -R2 can not be ruled out from this investigation, because there is also some transformation at lower pH values. At higher pH, increased activity of 17 $\beta$ -HSD was observed, which is in accordance to investigations performed by others (19).

### Inhibition studies

To substantiate the results from the pH-dependent incubations, we investigated the effect of selective inhibitors on the 5 $\alpha$ -R activity in the HaCaT cell line. As shown in Fig. 8, MK 386 exhibited a strong dose-dependent inhibition of 5 $\alpha$ -R activity in HaCaT cells. The concentration of MK 386 required to inhibit 5 $\alpha$ -R by 50% ( $IC_{50}$ ) was estimated to be about 25 nM. This is in close agreement with the  $IC_{50}$  of 20 nM found for 5 $\alpha$ -R1 expressed in human scalp skin (29). Finasteride showed markedly less inhibitory activity on 5 $\alpha$ -R in HaCaT cells with an  $IC_{50}$  of about 150 nM, which is similar to the value of 200 nM found for hair follicles expressing 5 $\alpha$ -R1, and much higher than the typical  $IC_{50}$  of 5nM in genital skin (20). 17- $\beta$ -HSD activity was not decreased by any of the inhibitors used, which is in accordance to results reported by others (20). From these findings, it was assumed that the subtype I of 5 $\alpha$ -R is predominantly expressed in HaCaT cells, while there is little or no activity of 5 $\alpha$ -R2.



**Fig. 8:** Inhibition of 5 $\alpha$ -reductase activity in HaCaT cells by MK 386 (-■-) and Finasteride (-O-): Cells were incubated with 0.1  $\mu$ M testosterone. Each data point represents the mean and standard deviation of three determinations.

The high levels of type 1 5 $\alpha$ -R expressed in human skin and scalp are thought to be important in controlling the function of sebaceous glands and regulating hair growth. Therefore, the development of new compounds that specifically and effectively inhibit the type 1 isozyme of 5 $\alpha$ -R may be of importance for dermatological purposes in the near future (18). Since the HaCaT cell line mainly expresses this 5 $\alpha$ -R subtype, our model may be useful in the process of screening for potential inhibitors for the treatment of androgen-dependent skin disorders, such as alopecia or acne. For this purpose the main advantages of the cell line are the ability to work in intact cells, which is believed to be a more physiological model (30), besides the possibility to simultaneously study the

effect of the potential inhibitors on other steroid metabolizing enzymes. The high reproducibility found for HaCaT cells allows the comparison of results from different experiments conducted with different passages of cells.

### **Conclusions**

From investigations using unlabeled testosterone (T) combined with a LC/MS assay and from incubations with tritium labeled substrate it was shown that the HaCaT cell line expresses the enzyme systems for the biotransformation of T in the same manner as was previously observed for human skin. While the LC/MS assay allows clear identification of the metabolites by their mass spectra, the use of tritium labeled T is preferable when small concentrations of metabolites should be quantitated.

The metabolite profile for T in HaCaT cells was similar to that seen in excised human skin and other in vitro models, indicating that metabolic pathways are comparable. However, from the low standard deviations it was seen that the HaCaT cell line exhibits a higher degree of reproducibility compared to other methods.

Therefore, we suggest that the HaCaT cell line represents a suitable model for studying skin testosterone metabolism under controlled conditions.

Furthermore, the model is useful for the estimation of effects of xenobiotics on the endogenous steroid metabolism, as shown by 5 $\alpha$ -R inhibition studies. This offers the possibility to use the HaCaT cell line as readily available tool for screening potential inhibitors useful in the treatment of androgen related skin disorders.

## **References**

1. J. Kao and M. P. Carver. Cutaneous metabolism of xenobiotics. *Drug Met. Rev.* 22: 363-410 (1990)
2. R. J. Martin, S. P. Denyer, and J. Hadgraft. Skin metabolism of topically applied compounds. *Int. J. Pharm.* 39: 23-32 (1987)
3. S. A. M. Hotchkiss. Skin as a xenobiotic metabolizing organ. In: G. G. Gibson (Ed.). *Progress in drug metabolism*. Taylor and Francis Ltd., London, 1992, pp. 217-262
4. U. Tauber. Drug metabolism in the skin. In: J. Hadgraft and R. H. Guy (Eds.). *Transdermal drug delivery*. Marcel Dekker, New York, 1989, pp. 99-112
5. S. W. Collier and R. L. Bronaugh. Cutaneous metabolism during percutaneous absorption. In: H. Mukhtar (Ed). *Pharmacology of the skin*. CRC Press, Boca Raton, 1992, pp. 111-130
6. R. C. Wester, P. K. Noonan, S. Smeach, and L. Kosobud. Estimate of nitroglycerin percutaneous first-pass metabolism. *Pharmacologist* 23: 203 (1981)
7. M. Cormier, P. W. Ledger, J. P. Marty, and A. Amkraut. In vitro cutaneous biotransformation of Propranolol. *J. Invest. Dermatol.* 97: 447-453 (1991)
8. B. Bonnekoh, B. Farkas, J. Geisel, G. Mahrle. Lactate dehydrogenase release as an indicator of dithranol-induced membrane injury in cultured human keratinocytes. *Arch. Dermatol. Res.* 282: 325-329 (1990)
9. J. F. Guo, R. Brown, C. E. Rothwell, and I. A. Bernstein. Levels of cytochrome P-450-mediated aryl hydrocarbon hydroxylase (AHH) are higher in differentiated than in germinative cutaneous keratinocytes. *J. Invest. Dermatol.* 94: 86-93 (1990)
10. L. Milewich, V. Kaimal, C. B. Shaw, and R. D. Sontheimer. Epidermal keratinocytes: A source of 5 $\alpha$ -dihydrotestosterone production in human skin. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 62: 739-746 (1986)
11. S. Y. Kim, H. K. Hwang, K. Yoneda, L. N. Marekov, P. M. Steinert, and S. I. Chung. HacaT cells: a new model to study calcium-induced terminal differentiation. *J. Invest. Dermatol.* 102: 594 (1994)
12. P. Boukamp, R. T. Petrussevska, D. Breitkreuz, J. Hornung, A. Markham, and N. E. Fusenig. Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line. *J. Cell Biol.* 106: 761-771 (1982)
13. I. Steinstrasser, K. Koopmann, and H. P. Merkle. Epidermal aminopeptidase activity and metabolism as observed in an organized HaCaT cell sheet model. *J. Pharm. Sci.* 86: 378-383 (1997)



14. A. J. M. Vermorcken, C. M. A. A. Goos, and H. M. J. Roelofs. A method for the evaluation of the local antiandrogenic action of 5 $\alpha$ -reductase inhibitors on human skin. *Br. J. Dermatol.* 102: 695-701 (1980)
15. N. A. Mazer, W. E. Heiber, J. F. Moellmer, A. W. Meikle, J. D. Stringham, S. W. Sanders, K. G. Tolman, and W. D. Odell. Enhanced transdermal delivery of testosterone: A new physiological approach for androgen replacement in hypogonadal men. *J. Contr. Rel.* 19: 347-362 (1992)
16. R. D. McClure, R. Oses, and M. L. Ernest. Hypogonadal impotence treated by transdermal testosterone. *Urology* 37: 224-228 (1991)
17. J. Kao, F. K. Patterson, and J. Hall. Skin penetration and metabolism of topically applied chemicals in six mammalian species, including man: An in vitro study with benzo[a]pyrene and testosterone. *J. Toxicol. Appl. Pharmacol.* 81: 503-516 (1985)
18. W. Chen, C. C. Zouboulis, and C. E. Orfanos. The 5 $\alpha$ -reductase system and its inhibitors. *Dermatology* 193: 177-184 (1996)
19. D. Thiboutot, G. Harris, V. Iles, G. Cimisi, K. Gilliland, and S. Hagari. Activity of the type 1 5 $\alpha$ -reductase exhibits regional differences in isolated sebaceous glands and whole skin. *J. Invest. Dermatol.* 105: 209-214 (1995)
20. T. N. Mellin, R. D. Busch, and G. H. Rasmusson. Azasteroids as inhibitors of testosterone 5 $\alpha$ -reductase in mammalian skin. *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.* 44: 121-131 (1993)
21. D. D. Uphoff, S. M. Gignac, and H. G. Drexler. Mycoplasma contamination in human leukemia cell lines I: Comparison of various detection methods. *J. Immunol. Methods* 149: 43-53 (1992)
22. O. H. Lowry, N. J. Rosenbrough, A. L. Farr, and R. J. Randall. Protein measurement with the folin red. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275 (1951)
23. D. Breitkreuz, P. Boukamp, A. Hulsen, C. Ryle, H. J. Stark, H. Smola, G. Thiekotter, and N. E. Fusenig. Human keratinocyte cell lines. In: G. Wilson. *Pharmaceutical applications of cell and tissue culture to drug transport.* Plenum Press, New York, 1991, pp. 283-296
24. F. E. Gormar, C. Theilig, K. Dold, A. Bernd, and H. Holzmann. Fluorometric measurement of suprabasal cytokeratins and DANN of human keratinocytes cultivated in microtiter plates. In: A. Bernd (Ed.). *Cell and tissue culture models in dermatological research.* Springer, Berlin Heidelberg New York, 1993, pp. 126-131
25. S. R. Slivka, L. K. Landeen, F. Zeigler, M. P. Zimmer, and R. L. Bartel. Characterization, barrier function, and drug metabolism of an in vitro skin model. *J. Invest. Dermatol.* 100: 40-46 (1993)

26. A. M. Ernesti, M. Swiderek, and R. Gay. Absorption and metabolism of topically applied testosterone in an organotypic skin culture. *Skin Pharmacol.* 5: 146-153 (1992)
27. L. Pinsky, M. Kaufman, C. Straisfeld, and B. Shanfield. Lack of difference in testosterone metabolism between cultured skin fibroblasts of human adult males and females. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 39: 395-398 (1974)
28. J. B. Hay and M. B. Hodgins. Metabolism of androgens by human skin in acne. *Br. J. Dermatol.* 91: 123-133 (1974)
29. K. Ellsworth, B. Azzolina, W. Baginsky, H. Bull, B. Chang, G. Cimis, S. Mitra, J. Torney, R. K. Bakshi, G. R. Rasmusson, R. L. Tolman, and G. S. Harris. MK386: A potent, selective inhibitor of the human type 1 5 $\alpha$ -reductase. *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.* 58: 377-384 (1996)
30. C. Mestayer, I. Berthaut, M. C. Portois, F. Wright, F. Kuttann, I. Mowszowicz, and P. Mauvais-Jarvis. Predominant expression of 5 $\alpha$ -reductase type 1 in pubic skin from normal subjects and hirsute patients *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 81: 1989-1993 (1996)

## **Kapitel 8**

# **Biotransformation of estradiol in the human keratinocyte cell line HaCaT: Metabolism kinetics and the inhibitory effect of ethanol**

Submitted to Pharmaceutical Research

## **Abstract**

**Purpose:** The aim of our study was to investigate the kinetics of  $\beta$ -estradiol ( $E_2$ ) metabolism in the human keratinocyte cell line HaCaT and to estimate the effect of the potential inhibitor ethanol on the biotransformation reaction.

**Methods:** The formation rates of estrone ( $E_1$ ) in dependence on substrate concentrations were determined in HaCaT cells using tritium labelled  $E_2$ . Experiments were conducted with and without addition of dehydroepiandrosterone (DHEA) and ethanol. Possible toxic effects on the cells due to ethanol were investigated by cytotoxicity tests.

**Results:** The metabolism of  $E_2$  in HaCaT cells exhibited Michaelis-Menten kinetics with  $K_m$  and  $V_{max}$  values of  $3.5 \mu\text{M}$  and  $216 \text{ pmol} \times \text{mg}^{-1} \text{ protein} \times \text{h}^{-1}$ , respectively. The reaction was inhibited by DHEA and ethanol. The alcohol showed a reversible competitive inhibition mechanism for concentrations of 4 to 8% (v/v). Lower ethanol concentrations had no effect, whereas levels  $\geq 10\%$  decreased cell viability significantly leading to a different inhibition mechanism.

**Conclusion:** The HaCaT cell line seems to be a suitable model for studying enzyme kinetics equivalent to the human skin. The concentration dependent inhibitory effect of ethanol observed in this cell line may be relevant for the transdermal  $E_2$  application in patients.

## **Introduction**

Transdermal application of drugs for systemic therapy was shown to have several advantages over the oral application route, such as the avoidance of liver first pass metabolism and the formation of more constant blood levels (1). The main barrier for transdermally delivered drugs is the stratum corneum, the outermost layer of human skin, consisting of dead cornified cells (1). Therefore, various approaches were studied to increase the permeability of substances across this layer, including the use of enhancers and prodrugs (2).

In recent years, however, it has been recognized that the metabolic activity of the skin needs to be taken into account in transdermal therapy (3). Although the metabolic activities in the skin are substantially lower than in the liver (4), the systemic bioavailability of some extensively metabolized drugs may be affected following transdermal application.

Remarkably high cutaneous biotransformation rates were reported for glyceryl trinitrate (5) and the steroid hormones estradiol ( $E_2$ ) and testosterone (6).

The ability of skin to metabolize topically administered xenobiotics was demonstrated to be inducible. On the other hand, inhibition of skin enzyme activity was reported as a consequence of simultaneous coapplication of drugs (7) or organic solvents (8). For several enhancers, inhibitory effects on drug metabolism were reported (8), which may alter the proportion of systemically available drug and metabolite(s).

In the case of  $E_2$ , it was reported that ethanol acts as an inhibitor of the conversion of  $E_2$  to the less active metabolite estrone ( $E_1$ ) (9), catalyzed by the enzyme 17 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase (17 $\beta$ -HSD) subtype II. These findings may have practical relevance, because ethanol is used as solvent and enhancer in the commercially available membrane controlled reservoir system (MCRS) for the transdermal application of  $E_2$ .

We have recently reported that the transdermal input rate of  $E_2$  from this patch is strictly dependent on the ethanol content in the reservoir (10, chapter 2) and that

ethanol modulates the barrier properties of the dense membrane and the adhesive layer used in this MCRS (11, chapter 3).

The objective of our present investigation was to estimate the influence of the enhancer ethanol on the biotransformation of  $E_2$  in the skin.

Therefore, the spontaneously transformed human keratinocyte cell line HaCaT, which exhibits a similar differentiation behavior as normal human keratinocytes (12), was chosen as an *in vitro* cell culture model. Cell lines represent a reproducible source of viable cells in a controlled environment. Therefore, factors as variability of skin source with regard to different donors or anatomical body sites, which were both shown to have a strong influence on  $E_2$  metabolism (13), can be ruled out.

We have recently shown that HaCaT cells expressed the steroid metabolizing enzymes responsible for skin biotransformation of testosterone (14, chapter 7). The metabolic pattern was comparable to that from excised human skin and other *in vitro* models, indicating that the HaCaT cell line may be suitable as a model for studying cutaneous steroid metabolism. In the case of testosterone, it was not possible to calculate kinetic parameters for the enzymes, due to the complex metabolic pathway. In contrast, the only metabolite formed after topical  $E_2$  application was reported to be  $E_1$ , while little, if any, estriol was formed in the skin (13,15,16).

Therefore, the aim of our study was twofold: Firstly, we investigated whether it is possible to study enzyme kinetics in intact HaCaT cells. In addition, the effect of a well known inhibitor of the type II  $17\beta$ -HSD, dehydroepiandrosterone (DHEA) (17), on  $E_2$  metabolism was determined. Secondly, we tried to elucidate the inhibitory effect of ethanol on the biotransformation of  $E_2$ .

## **Materials and methods**

### Materials

Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, 1.8 mM Ca<sup>2+</sup>) with and without HEPES, fetal calf serum (FCS), 0.05% trypsin/0.025%, ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA) solution and penicillin 10000 U/ml/streptomycin 10000 µg/ml solution were obtained from Gibco BRL-Life Technologies, Paisley, U.K. PBS with and without Ca<sup>2+</sup> and Mg<sup>2+</sup> was prepared from double distilled water. Cell culture dishes of 10 cm diameter and 96-well multidishes were purchased from Nunc, Roskilde, Denmark. Twelve-well multidishes (area: 4 cm<sup>2</sup>/well) were obtained from Costar, Cambridge, USA.

Estradiol (E<sub>2</sub>), estrone (E<sub>1</sub>), estriol (E<sub>3</sub>) and dehydroepiandrosterone (DHEA) were obtained from Sigma Chemical Co., St. Louis, USA. [2,4,6,7-<sup>3</sup>H]estradiol (spec. activity 75.0 Ci/mmol, radiochemical purity: 98.4%) was purchased from Amersham Life Science, Braunschweig, Germany. TLC silica gel plates (Kieselgel 60 F<sub>254</sub>), acetone, chloroform, diethylether, dimethyl sulfoxide (DMSO) and ethanol were obtained from Merck KGaA, Darmstadt, Germany.

### Cell culture

The spontaneously transformed human keratinocyte cell line HaCaT was provided by N. Fusenig, German Cancer Research Institute, Heidelberg, Germany.

HaCaT cells at passages between 36 and 42 seeded at a density of  $2 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup> were maintained in DMEM supplemented with 10% FCS, 2mM glutamine and antibiotic additives (100 U/ml penicillin/100 µg/ml streptomycin) at 37° C in an atmosphere of 5% CO<sub>2</sub> and 95% relative humidity. The culture medium was replaced twice a week.

For passaging, cells were washed with PBS without Ca<sup>2+</sup> and Mg<sup>2+</sup>, preincubated with 0.05% EDTA solution and then disintegrated with a 0.05%

trypsin/0.025% EDTA solution at 37° C. After counting the cells in the resulting suspension, a defined amount of keratinocytes was plated in culture dishes.

### Metabolism studies with <sup>3</sup>H-estradiol in HaCaT

HaCaT cells were seeded into 12-well plates at a density of  $2 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup>. After 3 weeks medium was removed, the cells were washed and 0.5 ml of a solution of [2,4,6,7-<sup>3</sup>H]-E<sub>2</sub> (<sup>3</sup>H-E<sub>2</sub>) together with unlabelled substrate in DMEM with HEPES (pH 7.4) was added. The concentration of E<sub>2</sub> in the medium ranged from 0.1 to 10 µM. If necessary, DMSO was used as solvent for E<sub>2</sub>. The final DMSO concentration did not exceed 1% (v/v). This concentration of DMSO was shown to be non-toxic for HaCaT cells (14) and had no influence on E<sub>2</sub> metabolism. The incubation temperature was 37° C in a humidified atmosphere. Control incubations were conducted under the same conditions in the absence of cells. The pH of the medium was constant during the experiments. At the end of each incubation period, the medium was removed and the cells were washed with 0.5 ml PBS. Cell protein was determined by the method of Lowry (18), using bovine serum albumin as the standard. Combined media and washes were extracted twice with 1ml of diethylether. The solvent was evaporated to dryness and the residue was redissolved in 100 µl ether. The recovery of radioactivity in the organic phase was measured by scintillation counting of control incubations (TRI-CARB 2100 TR liquid scintillation analyzer, Canberra-Packard GmbH, Dreieich, Germany) and was found to be  $92 \pm 4\%$  (n=3).

The etheric solutions were applied to Silica-TLC plates, which were then developed in chloroforme-acetone (70:30). Plates were scanned for radioactivity using a linear β-scanner and the Chroma software (Berthold, Wildbad, Germany). To identify the steroids, unlabelled E<sub>2</sub>, E<sub>1</sub> and E<sub>3</sub> were added on TLC-plates. After developing of the plates, steroids were visualized by spraying with 10% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> in ethanol followed by heating. The identity of the metabolite was verified using an alternative solvent system consisting of chloroforme-ethyl



acetate (80:20). Steroids were quantified as a percentage of total radioactivity by integration of the peaks.

#### Inhibition studies using DHEA

The experimental conditions used for studying the effect of DHEA on E<sub>2</sub> metabolism were the same as outlined above, except that 5 or 10 μM of DHEA were added to the incubation medium.

#### Inhibition studies using ethanol

The experimental conditions used for studying the effect of ethanol on E<sub>2</sub> metabolism were the same as outlined above, except that the incubation medium contained 1, 2, 4, 6, 8 or 10% (v/v) of ethanol. To avoid evaporation of the alcohol, the plates were sealed with adhesive tape for multiwell plates (Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim, Germany).

To investigate whether the effect of ethanol is reversible, HaCaT cells were preincubated with DMEM with HEPES containing 6 or 8% (v/v) ethanol. After 1.5 h the cells were washed and incubated for another 1.5 h with <sup>3</sup>H- E<sub>2</sub> as described above.

#### Data analysis

For the determination of apparent K<sub>m</sub> and V<sub>max</sub> values, data were analyzed with the Microcal™ Origin 4.1 program (Microcal Software Inc., Northampton, USA). This program fits data to the Michaelis-Menten equation using nonlinear regression analysis.

#### Effect of ethanol on MTT formation in HaCaT cells

The effect of ethanol on the mitochondrial activity was determined using a colorimetric assay (MTT) based on the reduction of a yellow tetrazolium salt to a purple formazan precipitate by mitochondrial enzymes of viable cells. HaCaT

cells were seeded at a density of  $2 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup> into 96-well mutidishes and cultivated under normal conditions. After 3 weeks the cells were incubated for 1.5 h in DMEM with Hepes containing ethanol from 0 to 15% (v/v) at 37° C. The cells were kept under occlusion by means of an adhesive tape to avoid evaporation of the alcohol. Afterwards the cells were washed and incubated with 200 µl medium containing 0.5 mg/ml MTT for 4 hours. The MTT solution was removed, developed formazan crystals were dissolved with 200 µl DMSO and quantitated spectrophotometrically using an ELISA reader (Titertek Plus MS 212, ICN, Eschwege, Germany) at wavelength of 570 nm and 690 nm. The MTT transformation in cells maintained in DMEM without ethanol was set as 100 %.

#### Effect of ethanol on lactate dehydrogenase (LDH) release from HaCaT cells

LDH is a cytosolic enzyme and its presence in the incubation medium is generally regarded as evidence for cell membrane damage.

HaCaT cells were seeded at a density of  $2 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup> into 12-well mutidishes and cultivated under normal conditions. After 3 weeks the cells were washed and incubated for 1.5 h in PBS supplemented with glucose containing ethanol from 0 to 12% (v/v) at 37° C. PBS was chosen, because DMEM interfered with the photometric assay. Recently, it was shown that the viability of HaCaT cells maintained in PBS for 1.5 h exceeds 90% (14, chapter 7). The plates were sealed with adhesive tape in order to prevent evaporation of the alcohol. After 1.5 h the LDH content in the samples was assayed using a test kit (DG 1340-K, Sigma, Deisenhofen, Germany), which allows the photometric determination (UV-160, Shimadzu, Kyoto, Japan) of the reduction of NAD in the presence of lactate and LDH. In preliminary experiments it was verified that concentrations up to 12% ethanol did not interfere with the test. Control experiments were performed with 0.1% Triton X-100 (ICN, Eschwege, Germany), which is known to completely lyse cell membranes.

## **Results and discussion**

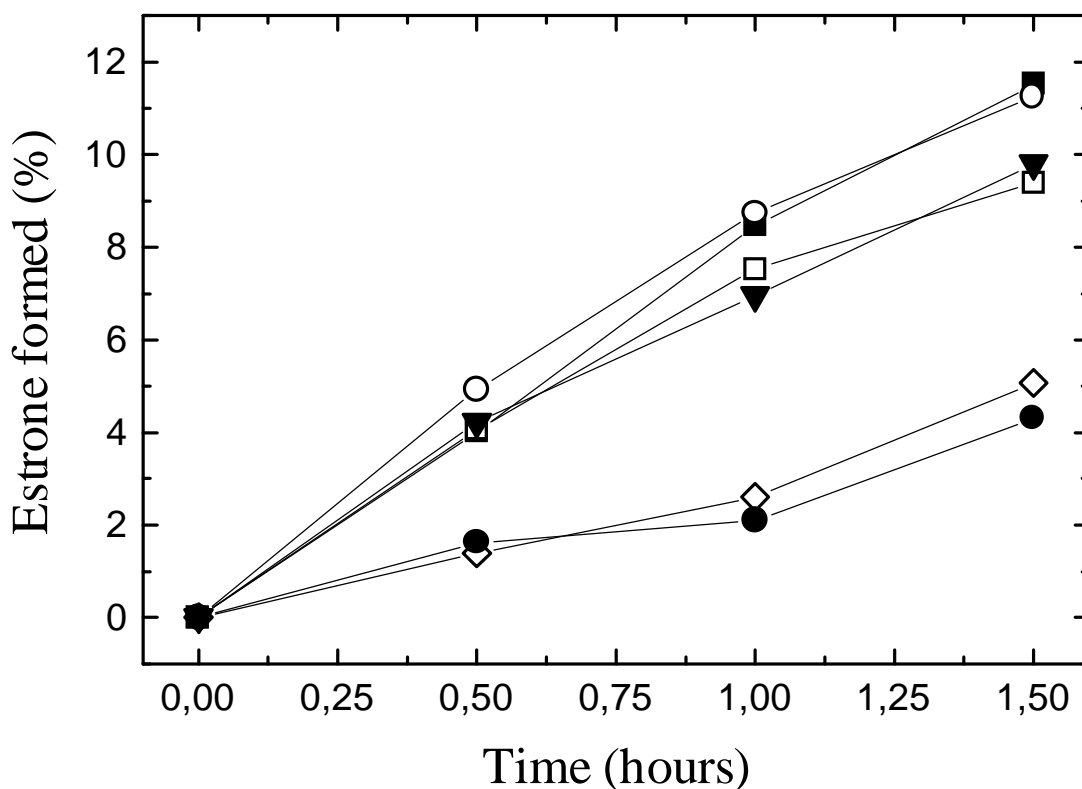
### Metabolism of E<sub>2</sub> in HaCaT cells

In this study we investigated the kinetics of E<sub>2</sub> metabolism in the spontaneously transformed human keratinocyte cell line HaCaT and estimated the effect of enzymatic inhibitors on the formation of E<sub>1</sub>.

We have recently shown that HaCaT cells exhibited constant cell growth, when maintained in culture for 3 weeks (14, chapter 7). This reproducible cell density is seen as a necessary condition for metabolism studies, where results from experiments conducted with cells of different passages are compared.

After incubation of HaCaT cells with <sup>3</sup>H-E<sub>2</sub> the only metabolite detected was E<sub>1</sub>. There was no evidence for the formation of estriol, which is in accordance to studies using human skin (13). From control incubations in the absence of keratinocytes, no E<sub>1</sub> was found, indicating that there was no spontaneous (non-biological) oxidation of E<sub>2</sub>. Overall recovery of radioactivity was satisfactory, typically being about 92% in culture medium and wash.

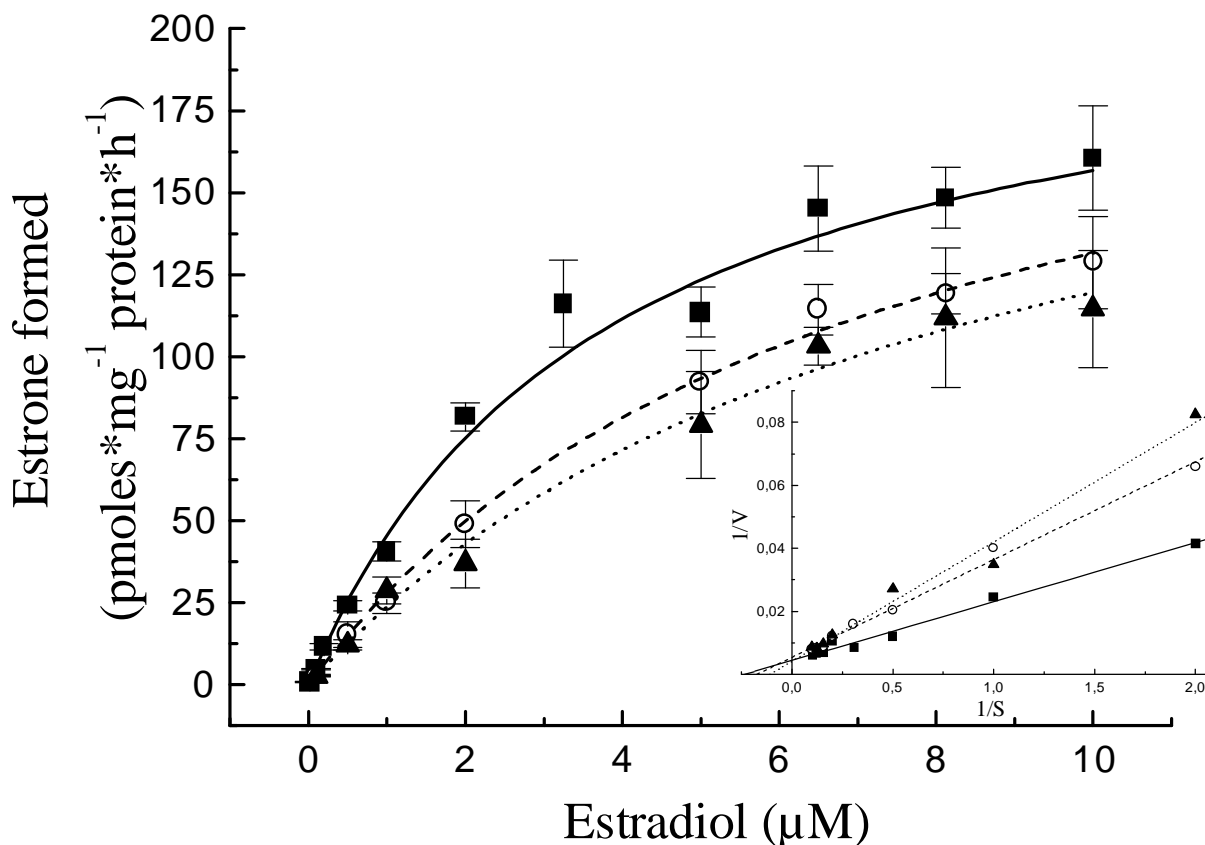
To investigate the influence of incubation time and substrate concentration, HaCaT cells were incubated with amounts of 0.1-10 μM for up to 1.5 hours. These supraphysiological substrate concentrations were chosen, because the local E<sub>2</sub> concentration in the skin after transdermal application should exceed the average plasma concentration in women. Higher substrate concentrations than 10 μM were not investigated, due to the low solubility of E<sub>2</sub> in the aqueous medium. From Fig. 1 it is obvious, that formation of E<sub>1</sub> was linear with incubation time up to 1.5 hours for all concentrations tested. Furthermore, E<sub>2</sub> degradation did not exceed 12% under these conditions, indicating that substrate concentrations can be judged as constant in this case. Therefore, all subsequent investigations were performed for 1.5 hours under the conditions described above.



**Fig.1:** Time course of the formation of estrone by HaCaT cells. Incubation with different concentrations of  $^3\text{H}$ -estradiol for up to 1.5 hours. (-■-, 0.1  $\mu\text{M}$ ; -○-, 0.5  $\mu\text{M}$ ; -□-, 1  $\mu\text{M}$ ; -▼-, 2  $\mu\text{M}$ ; -◇-, 5  $\mu\text{M}$ ; -●-, 10  $\mu\text{M}$ )

For the metabolism of hydrophilic peptides in HaCaT cell sheets, it was reported that the diffusion of the substrate into the cells strongly affected the metabolism kinetics, resulting in enzyme kinetics, which could not be described by the Michaelis-Menten equation (19). In contrast, for lipophilic steroids including  $\text{E}_2$  it was demonstrated that the diffusion across the membrane of animal cells does not limit interaction between steroids and cellular components. This was explained by the large permeability coefficient of  $\text{E}_2$  of  $4 \times 10^{-4} \text{ cm} \times \text{sec}^{-1}$  found for different cell lines (20).

In Fig. 2 velocities of  $E_1$  formation estimated over the concentration range of 0.1-10  $\mu\text{M}$   $E_2$  are shown. Additional curves demonstrate the effect of 5 and 10  $\mu\text{M}$  DHEA, an inhibitor of  $17\beta\text{-HSD}$ , on the formation rate of  $E_1$ .



**Fig.2:** Formation of estrone as a function of substrate concentration. HaCaT cells were incubated with  $^3\text{H}$ -estradiol for 1.5 hours. Incubations with estradiol only (■, solid line) and with 5  $\mu\text{M}$  DHEA (○, dashed line) or 10  $\mu\text{M}$  DHEA (▲, dotted line) are presented. The curves were fitted with the Michaelis-Menten equation. The inset graph represents a Lineweaver-Burk plot. Each data point represents the mean and standard deviation of three determinations.

It is obvious, that the metabolic rate versus substrate concentration plot exhibits Michaelis-Menten kinetics for the observed concentration interval. Therefore, we assumed that it depends on the polarity of the substrate, whether the metabolism kinetics are partially controlled by the transport of substances into the cells or solely by the enzyme characteristics. Our findings were confirmed by others, where the metabolism of steroid hormones, such as androstenedione and progesterone in human keratinocytes clearly exhibited Michaelis-Menten kinetics (21).

The apparent  $K_m$  value in our experiment was found to be 3.51  $\mu\text{M}$ , which is in the range of values found for  $17\beta\text{-HSD}$  in other human tissues (1.6-11  $\mu\text{M}$ ) (17,22).

Other studies, where the metabolism of  $E_2$  was investigated in primary keratinocytes after incubation with 1  $\mu\text{M}$   $E_2$  revealed a rate of  $E_1$  formation of about 23  $\text{pmol} \times 10^{-6} \text{ cells} \times \text{h}^{-1}$  (23). With a typical cell number of  $3.9 \times 10^5$  per  $\text{cm}^2$  determined from growth curves of HaCaT cells at confluency (chapter 6) and an average protein content of 0.21  $\text{mg} \times \text{cm}^{-2}$  previously estimated (14, chapter 7), a velocity of  $E_1$  formation of 21.9  $\text{pmol} \times 10^{-6} \text{ cells} \times \text{h}^{-1}$  results for the HaCaT cell line at this  $E_2$  concentration. Since both rates are very similar, it can be assumed that the HaCaT cells exhibit similar properties compared to normal keratinocytes with respect to their enzymatic pattern.

From the above findings, it seems that the HaCaT cell line represents a model suitable for studying kinetics of steroid metabolizing enzymes. This model system has some advantages in comparison to other in vitro methods. In contrast to excised skin, the cell line is readily available and expresses a higher reproducibility, due to the lack of inter-individual variations. In comparison to homogenates, which are frequently used for estimating enzyme kinetics, intact HaCaT cell layers exhibit the compartmentation of enzyme systems as occurring in vivo. In homogenates, enzymes are separated from their physiological environment, which may alter their characteristics (19). Furthermore, the harsh homogenization methods used may result in the destruction of enzyme activity.

### Inhibition by DHEA

From Fig. 2, it can be also seen that the metabolism of E<sub>2</sub> was inhibited in a concentration dependent manner by DHEA. From the Lineweaver-Burk plot in Fig. 2 and the calculated K<sub>m</sub> and V<sub>max</sub> values shown in table 1, it was derived that DHEA acted by a competitive inhibition mechanism.

**Table 1:** Kinetic parameters for the oxidation of E<sub>2</sub> in HaCaT cells in the presence of DHEA.

	K <sub>m</sub> <sup>1</sup> (μM)	V <sub>max</sub> <sup>1</sup> (pmol×h <sup>-1</sup> ×mg <sup>-1</sup> protein)
Control	3.51	215,7
5 μM DHEA	6.97	223,3
10 μM DHEA	8.10	216,4

<sup>1</sup>Data were calculated from Michaelis-Menten fit.

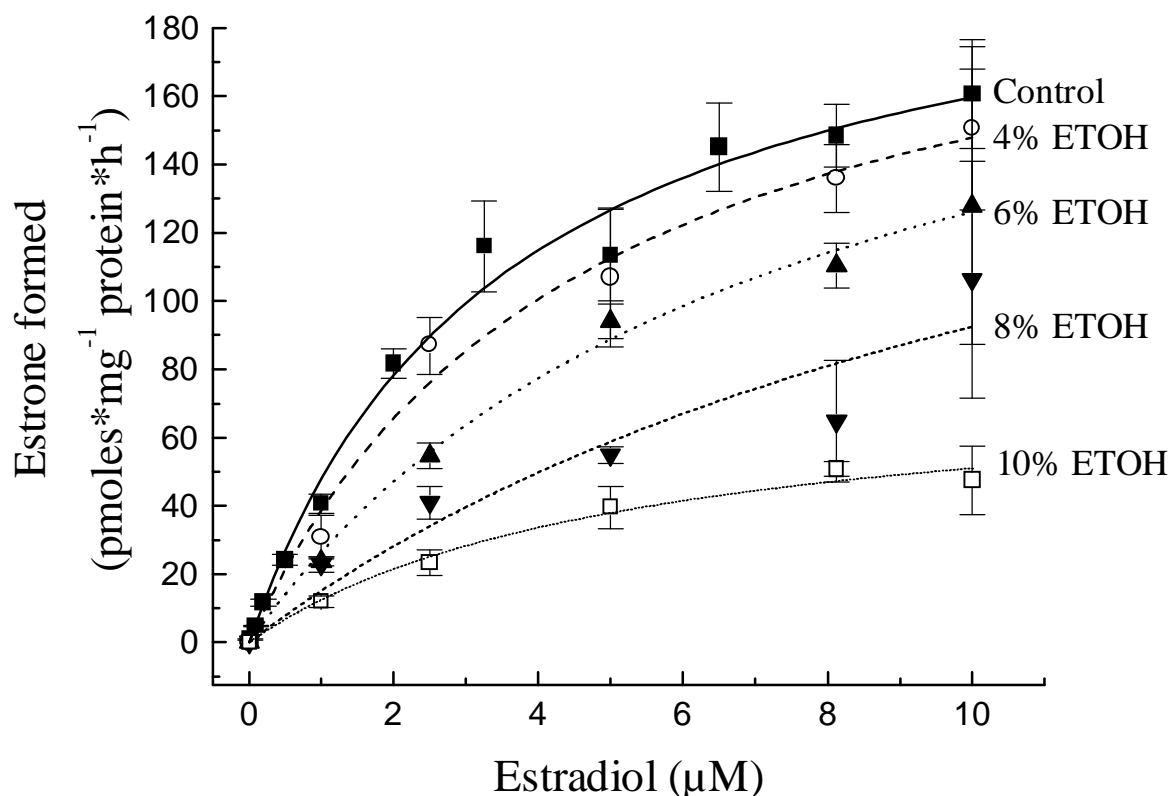
The observed inhibition characteristics may also have practical consequences, because there is growing interest in the transdermal delivery of DHEA (24). The simultaneous application of E<sub>2</sub> and DHEA for the therapy of postmenopausal symptoms as a parenteral depot system is well established (25). Therefore, there may be a rationale for the development of transdermal systems for the combined application of both steroids, with the advantage of a reduced cutaneous first pass metabolism of E<sub>2</sub>.

### Inhibitory effect of ethanol

Previously, several studies have established the inhibitory action of ethanol on the biotransformation of  $E_2$  (9) and other drug substances or endogenous substrates (26). While the ethanol concentration after alcohol ingestion rarely exceeds 0.4% (v/v) (27), there may be elevated local concentrations after topical application of ethanol. This fact was previously realized and investigated in hairless mouse skin for  $E_2$  (9). In this study, the interpretation of results was complicated, because two effects, the diffusion and metabolism of  $E_2$  were simultaneously investigated. It is well known, that ethanol strongly enhances the transport of  $E_2$  across the skin. For testosterone it was reported that the relative extent of cutaneous first pass metabolism was decreased, when the amount of permeating substrate was increased, due to the potential saturation of the cutaneous drug metabolism enzymes (16). Therefore, an overestimation of the inhibitory effect of ethanol may result, if the enhanced transport rates of substrate and metabolite are assayed.

To determine the effect of ethanol on metabolism kinetics of  $E_2$  in the metabolic active skin cells, the keratinocytes, HaCaT cells were incubated with different amounts of ethanol from 1 to 10% (v/v). The addition of 1 or 2 % (v/v) ethanol had no significant effect on  $E_2$  metabolism compared to control incubations. The in vitro rates of  $E_1$  formation in relation to the substrate concentration in the presence of ethanol are shown in Fig. 3.





**Fig.3:** Influence of ethanol on formation rates of estrone as a function of substrate concentration. HaCaT cells were incubated with <sup>3</sup>H-estradiol (0.1-10 µM) for 1.5 hours. The curves were fitted with the Michaelis-Menten equation. Each data point represents the mean and standard deviation of three determinations. (■—, 0; ○- -, 4; ▲···, 6; ▼---, 8; □····, 10 % (v/v) ethanol)

With 4 up to 10 % (v/v) alcohol a significant reduction of E<sub>1</sub> formation was detected. The apparent K<sub>m</sub> and V<sub>max</sub> values calculated from the Michaelis-Menten fit are presented in table 2. The V<sub>max</sub> values for control incubations and the reaction in presence of 4 to 8 % (v/v) ethanol are similar, while the K<sub>m</sub> values differed significantly, suggesting that ethanol acted by a competitive inhibition mechanism in HaCaT cells. This kind of mechanism was also determined for the inhibitory effect of ethanol on the metabolism of other drug

substances (26). For the addition of 10 % (v/v) ethanol the apparent  $V_{\max}$  value was significantly lower than seen in control incubations, suggesting an altered inhibition mechanism existing for this higher alcohol concentration.

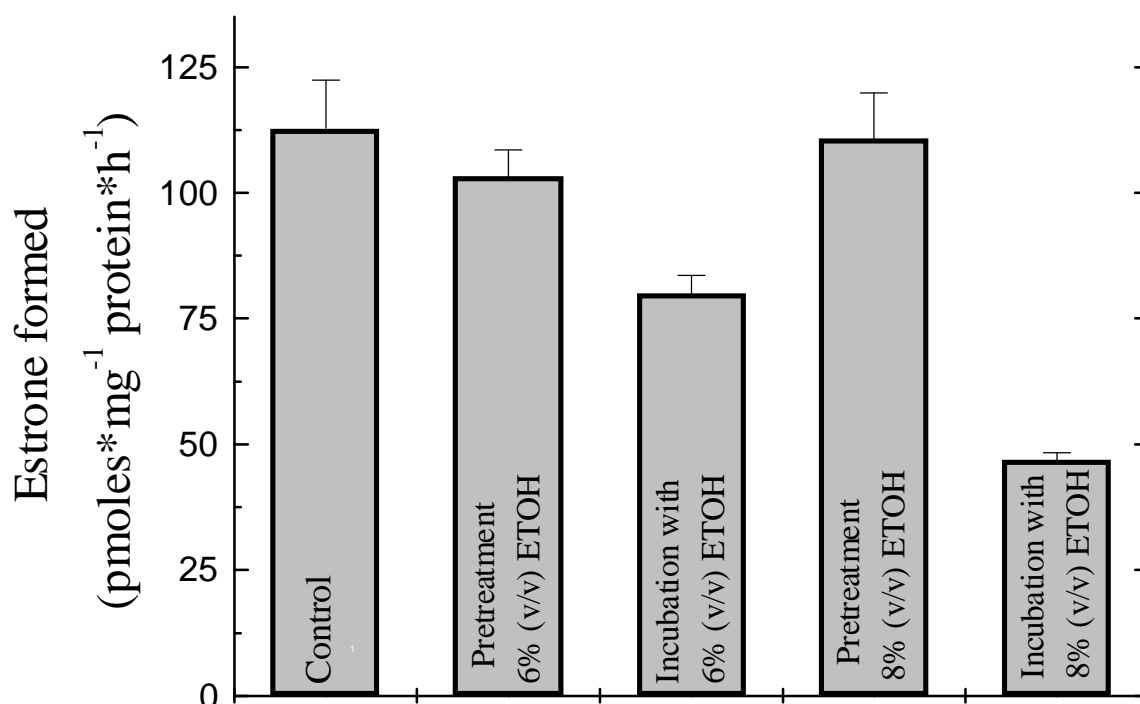
**Table 2:** Kinetic parameters for the oxidation of E<sub>2</sub> in HaCaT cells in the presence of ethanol.

Ethanol concentration	$K_m$ <sup>1</sup> (μM)	$V_{\max}$ <sup>1</sup> (pmol×h <sup>-1</sup> ×mg <sup>-1</sup> protein)
Control	3.51	215,7
4% (v/v)	4.57	215,6
6% (v/v)	7.25	217,6
8% (v/v)	13.37	216,2
10% (v/v)	5.25	77,8

<sup>1</sup>Data were calculated from Michaelis-Menten fit.

To evaluate reversibility of the observed effect, HaCaT cells were preincubated with 6 and 8 % (v/v) ethanol, washed and afterwards incubated with 5 μM E<sub>2</sub>. In Fig. 4 the formation rates of control incubations, experiments after ethanol pretreatment and incubations with simultaneous application of ethanol and E<sub>2</sub> are presented.

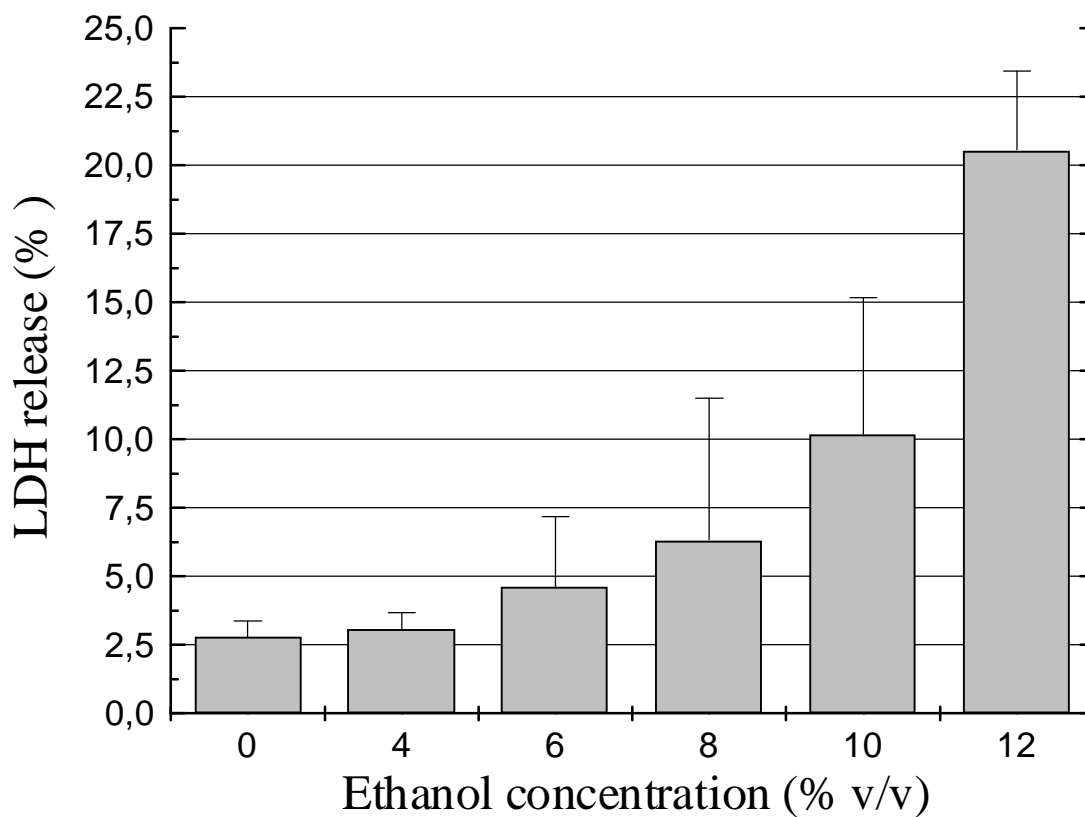
It can be derived, that pretreatment with ethanol had no effect on the 17β-HSD activity in HaCaT cells, although simultaneous treatment significantly suppressed the reaction. Therefore, it can be concluded, that the effect of ethanol application for 1.5 hours up to 8% (v/v) is completely reversible.



**Fig.4:** Effect of ethanol pretreatment on the metabolism of E<sub>2</sub>. HaCaT cells were incubated with 5 μM E<sub>2</sub> for 1.5 hours after pretreatment with 6 and 8 % (v/v). Control incubations were performed in the absence of alcohol or by simultaneous incubation with 5μM E<sub>2</sub> and 6 or 8% (v/v) ethanol. Each data point represents the mean and standard deviation of three determinations.

### Toxicity of ethanol

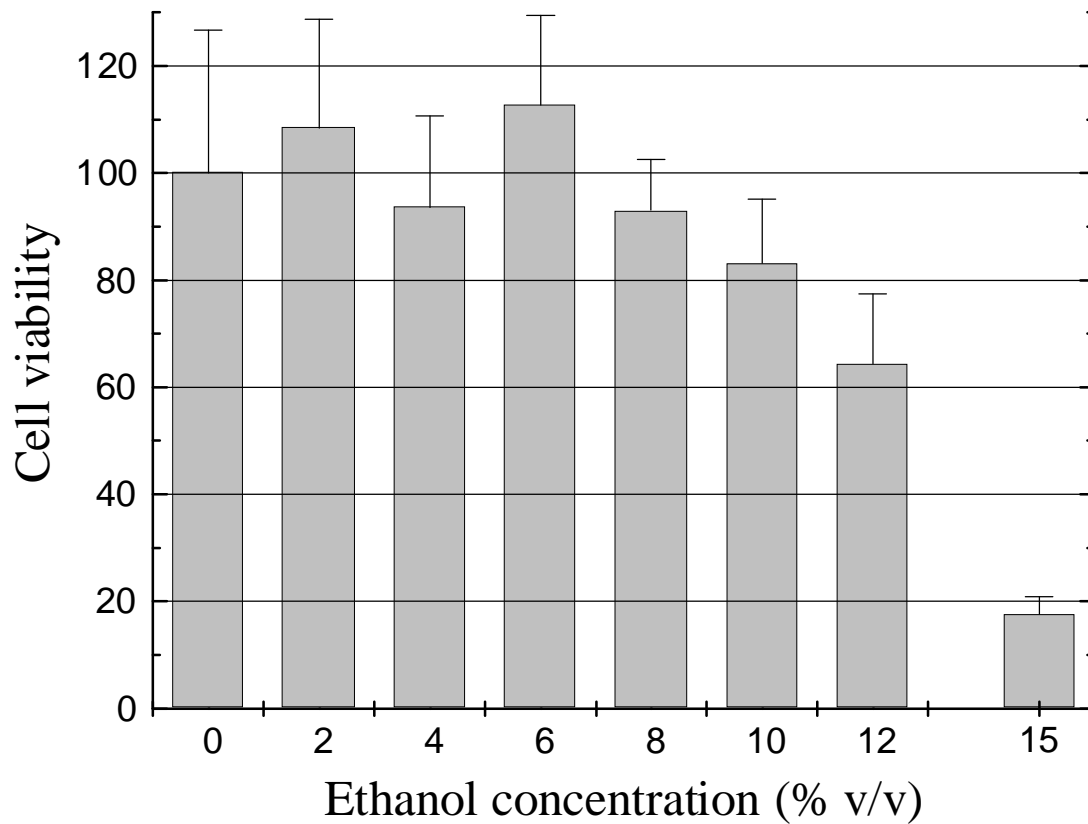
To further characterize the observed effect of ethanol on E<sub>2</sub> metabolism, the toxicity of the solvent was determined in HaCaT cells. Two different tests were performed to estimate the effect on different cell structures. In Fig. 5 the LDH release from HaCaT cells in dependence on ethanol contents in the incubation medium is presented. This test reflects cell membrane damages caused by foreign substances. Values are expressed as percent of total LDH content of cells.



**Fig.5:** LDH release from HaCaT cells after incubation with different amounts of ethanol in PBS supplemented with glucose for 1.5 hours. Values are expressed as percentage of total LDH release after incubation with 0.1% Triton. Values are mean and standard deviation of three determinations.

It can be seen, that the LDH release slightly increased from 4 to 8 % (v/v), while at 10% and more impressively at 12% (v/v) ethanol concentration the release distinctly increased.

The effect of ethanol on the mitochondrial dehydrogenases, estimated by the MTT test, is shown in Fig. 6. Again, addition of up to 8% (v/v) ethanol to the incubation medium for 1.5 hours had no significant effect on the dehydrogenase activity. Higher alcohol concentrations ( $\geq 10\%$  v/v) decreased MTT formation to values below 20% of control experiments.



**Fig.6:** MTT formation in HaCaT cells after incubation with different amounts of ethanol in DMEM + HEPES. Viability in medium without ethanol was set as 100%. Values are mean and standard deviation of eight determinations.

In summary, it was shown that HaCaT cells are relatively resistant to environmental ethanol. This is in accordance to another study, where the toxic effects of several enhancers on keratinocytes and fibroblasts were investigated (28).

For our incubation conditions, an elevated toxicity at ethanol concentrations  $\geq 10\%$  (v/v) with regard to membrane damage and mitochondrial activity was detectable. This may explain the deviation from the competitive inhibition mechanism, when 10% (v/v) ethanol was present during the incubation. In this

case, a reduced cell viability and/or partially destruction of enzyme systems may result, decreasing the maximum metabolism rate ( $V_{\max}$ ).

However, the reduction in  $E_1$  formation caused by ethanol contents from 4 to 8% (v/v) was due to a reversible inhibition of  $17\beta$ -HSD activity and was not influenced by toxic effects of the enhancer on the cells.

## **Conclusions**

The human keratinocyte cell line HaCaT was found to be suitable for studying the metabolism kinetics of estradiol ( $E_2$ ), as well as the inhibitory effects of DHEA and ethanol on this metabolic reaction. Regarding the advantages of this readily available model system, such as a high degree of reproducibility for steroid metabolism in a controlled environment (14, chapter 7) and a compartmentation of enzyme systems comparable to living skin (19), the HaCaT model represents a readily available and useful tool in the investigation of enzyme kinetics.

For the enhancer ethanol, it was observed that 4 to 8% (v/v) inhibited  $17\beta$ -HSD activity in a concentration dependent manner, while higher ethanol levels ( $\geq 10\%$  v/v) irreversibly damaged the keratinocytes. However, skin cells were shown to be rather resistant to ethanol treatment, supporting the thesis that ethanol represents a relatively safe enhancer (28).

The inhibitory effect may have consequences for the use of the MCRS delivering  $E_2$ , because both substances, ethanol and  $E_2$ , are released from the patch and permeate the skin. Since it is difficult to determine the absolute alcohol concentration in the skin during the application of the patch, we are not able to clearly evaluate the influence of the solvent on  $17\beta$ -HSD activity in living skin. However, from another study, where two transdermal systems for the delivery of nitroglycerin were compared, a smaller extent of metabolism was observed in an

ethanol-based system compared to an ethanol-free system (29). This indicates, that the design and the composition of transdermal systems may influence the cutaneous first pass metabolism of the delivered drug.

### **References**

1. R. O. Potts, D. B. Bommaman, and R. H. Guy. Percutaneous absorption. In: H. Mukhtar (Ed). Pharmacology of the skin. CRC Press, Boca Raton, 1992, pp. 13-28
2. D. A. W. Bucks. Skin structure and metabolism: Relevance to the design of cutaneous therapeutics. *Pharm. Res.* 1: 148-153 (1984)
3. S. W. Collier and R. L. Bronaugh. Cutaneous metabolism during percutaneous absorption. In: H. Mukhtar (Ed). Pharmacology of the skin. CRC Press, Boca Raton, 1992, pp. 111-130
4. U. Tauber. Drug metabolism in the skin. In: J. Hadgraft and R. H. Guy (Eds.). Transdermal drug delivery. Marcel Dekker, New York, 1989, pp. 99-112
5. R. C. Wester, P. K. Noonan, S. Smeach, and L. Kosobud. Estimate of nitroglycerin percutaneous first-pass metabolism. *Pharmacologist* 23: 203 (1981)
6. S. W. Collier, N. M. Sheikh, A. Sakr, J. L. Lichtin, R. F. Stewart, and R. L. Bronaugh. Maintenance of skin viability during in vitro percutaneous absorption/metabolism studies. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 99: 522-533 (1989)
7. J. Kao and M. P. Carver. Cutaneous metabolism of xenobiotics. *Drug Met. Rev.* 22: 363-410 (1990)
8. T. Hayashi, Y. Iida, T. Hatanaka, T. Kawaguchi, K. Sugibayashi, and Y. Morimoto. The effects of several penetration-enhancers on the simultaneous transport and metabolism of ethyl nicotinate in hairless rat skin. *Int. J. Pharm.* 154: 141-148 (1997)
9. P. Liu, W. I. Higuchi, W. Song, T. Kurihara-Bergstrom, and W. R. Good. Quantitative evaluation of ethanol effects on diffusion and metabolism of  $\beta$ -estradiol in hairless mouse skin. *Pharm. Res.* 8: 865-872 (1991)

10. U. D. Rohr, R. Altenburger, and T. Kissel. Kinetics of the transdermal reservoir membrane system delivering  $\beta$ -estradiol: In vitro/in vivo correlation. *Pharm. Res.* 15: 875-884 (1998)
11. R. Altenburger, U. D. Rohr, and T. Kissel. Rate control in transdermal  $\beta$ -estradiol reservoir membrane systems: The role of membrane and adhesive layer. *Pharm. Res.* 15: 1238-1243 (1998)
12. P. Boukamp, R. T. Petrussevska, D. Breitkreuz, J. Hornung, A. Markham, and N. E. Fusenig. Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line. *J. Cell Biol.* 106: 761-771 (1982)
13. G. D. Weinstein, P. Frost, and S. L. Hsia. In vitro interconversion of estrone and  $17\beta$ -estradiol in human skin and vaginal mucosa. *J. Invest. Derm.* 51: 4-10 (1968)
14. R. Altenburger and T. Kissel. The human keratinocyte cell line HaCaT: An in vitro cell culture model for cutaneous testosterone metabolism. Submitted for publication
15. C. Longcope. The metabolism of oestrogens by human skin. In: P. Mauvais-Jarvis, C. F. H. Vickers, and J. Wepierre (Eds.) *Percutaneous absorption of steroids*. Academic Press, London, 1980, pp. 89-98
16. J. Kao and J. Hall. Skin absorption and cutaneous first pass metabolism of topical steroids: In vitro studies with mouse skin in organ culture. *J. Pharm. Exp. Ther.* 241: 482-487 (1987)
17. R. C. Bonney, M. J. Reed, and V. H. James. Inhibition of  $17\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase activity in human endometrium by adrenal androgens. *J. Steroid Biochem.* 18: 59-64 (1983)
18. O. H. Lowry, N. J. Rosenbrough, A. L. Farr, and R. J. Randall. Protein measurement with the folin red. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275 (1951)
19. I. Steinstrasser, K. Koopmann, and H. P. Merkle. Epidermal aminopeptidase activity and metabolism as observed in an organized HaCaT cell sheet model. *J. Pharm. Sci.* 86: 378-383 (1997)
20. E. P. Giorgi and W. D. Stein. The transport of steroids into animal cells in culture. *Endocrinology* 108: 688-697 (1981)
21. L. Milewich, V. Kaimal, C. B. Shaw, and R. D. Sontheimer. Epidermal keratinocytes: A source of  $5\alpha$ -dihydrotestosterone production in human skin. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 62: 739-746 (1986)
22. L. Milewich, P. C. MacDonald, and B. R. Carr. Activity of  $17\beta$ -hydroxysteroid oxidoreductase in tissues of the human fetus. *J. Endocrinol.* 123: 509-518 (1989)
23. L. Milewich, C. B. Shaw, and R. D. Sontheimer. Steroid metabolism by epidermal keratinocytes. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 548: 66-89 (1988)



24. P. Diamond, L. Cusan, J. L. Gomez, A. Belanger, and F. Labrie. Metabolic effects of 12-month percutaneous dehydroepiandrosterone replacement therapy in postmenopausal women. *J. Endocrinol.* 150: S43-50 (1996)
25. B. Dusterberg and H. Wendt. Plasma levels of dehydroepiandrosterone and 17 $\beta$ -estradiol after intramuscular administration of Gynodian-Depot<sup>®</sup> in 3 women. *Hormone Res.* 17: 84-89 (1983)
26. R. C. Pirola. *Drug Metabolism and alcohol.* ADIS Press, Sydney, University Park Press, Baltimore, 1977
27. J. Cabezas-Herrera, F. J. Campoy, and C. J. Vidal. Differential effects of ethanol on membrane-bound and soluble acetylcholinesterase from sarcoplasmic reticulum membranes. *Neurochem. Res.* 17: 717-722 (1992)
28. M. Ponc, M. Haverkort, Y. L. Soei, J. Kempenaar, and H. Bodde. Use of human keratinocyte and fibroblast cultures for toxicity studies of topically applied compounds. *J. Pharm. Sci.* 79: 312-316 (1990)
29. R. J. Steffens, M. J. Hayes, M. Powell, B. Berner, J. Morgan, J. C. Joshi, K. Guernsey, and W. R. Good. The cutaneous metabolism of nitroglycerin. *Proc. Int. Symp. Control. Rel. Bioactive Mater.* 19: 236-237 (1992)

## **Teil III**

### **Zusammenfassung und Ausblick**

Die transdermale Applikation von Arzneistoffen gewinnt zunehmend an Bedeutung, da wirkstoffbezogene Faktoren, wie eine mangelnde orale Bioverfügbarkeit oder sehr kurze Plasmahalbwertszeiten, die klassische orale Applikation erschweren. Ein Vorteil der Transdermalen Therapeutischen Systeme ist weiterhin darin zu sehen, daß konstante Plasmaspiegel erzielt werden können.

Gerade im Bereich der Hormonsubstitution spielt diese Applikationsform eine große Rolle (1). Viele Steroidhormone können die Haut in so großem Umfang permeieren, daß therapeutisch relevante Plasmaspiegel resultieren. Damit ist eine wesentliche Voraussetzung für die transdermale Wirkstoffapplikation gegeben. Hinzu kommt, daß der ausgeprägte hepatische First-pass-Effekt dieser Substanzen die Applikation hoher Dosen auf dem oralen Wege bedingt, die zu einer Reihe von Nebenwirkungen führen können. Im Falle des Estradiols wäre hier das Auftreten von Brustschmerzen sowie ein erhöhtes Risiko zur Ausbildung von Brust- und Endometriumtumoren zu nennen (2,3).

Auf Grund der ausgewiesenen Vorteile der transdermalen Applikation – nicht nur im Bereich der Hormonsubstitution – wurden in der Vergangenheit zahlreiche Methoden entwickelt, die Barrierefunktion der Haut zu reduzieren, bzw. die Applikationsform im Hinblick auf den transdermalen Wirkstofffluß zu optimieren. Diese Bestrebungen führten zu der Anwendung einer Vielzahl von Enhancern und einer Reihe verschiedener TTS-Typen.

Trotz des großen Interesses, verbunden mit einem hohem Forschungsaufwand, blieben bedeutende Faktoren im Hinblick auf die transdermale Applikation von Wirkstoffen ungeklärt.

Zu diesen gehören zum einen der Zusammenhang zwischen dem Design und der Pharmakokinetik eines TTS. So konnte in der Vergangenheit zwar gezeigt werden, daß verschiedene Pflastertypen für die Applikation von  $17\beta$ -Estradiol signifikant unterschiedliche Blutspiegel produzierten, jedoch gab es keine plausible Erklärung für diesen Effekt (4,5).

Ein weiterer, wenig beachteter Faktor ist die metabolische Kapazität der Haut. Obwohl zahlreiche Studien die Vielfalt von Biotransformationsreaktionen in der Haut belegen (6), gibt es nur wenige Untersuchungen zum Einfluß dieses metabolischen Potentials auf die transdermale Bioverfügbarkeit eines Arzneistoffes. In diesem Zusammenhang besteht ein Bedarf an Modellen, die geeignet sind, grundlegende Prinzipien des Hautmetabolismus zu untersuchen. Hier kommen auf Grund der einfacheren Handhabung vorrangig in vitro-Methoden in Betracht. Zellkulturmodelle stellen in diesem Rahmen kostengünstige und gleichzeitig potente Modelle dar, die es erlauben unter kontrollierten Bedingungen einzelne Komponenten eines Mechanismus – abseits von der Komplexität eines lebenden Organismus – zu untersuchen (7). Hier haben Zelllinien, wegen der einfachen Verfügbarkeit bei gleichzeitig hoher Reproduzierbarkeit, Vorteile.

Aus den angeführten Betrachtungen ergaben sich für die vorliegende Arbeit somit zwei Zielsetzungen. In Teil I sollte das Design des sogenannten Membrankontrollierten Reservoirsystems (MCRS) zur transdermalen Applikation von  $17\beta$ -Estradiol mit dem erzeugten Plasmaprofil in Zusammenhang gebracht werden. Hierbei stand eine Bewertung der Pflasterkomponenten und des verwendeten Enhancers (Ethanol) im Vordergrund. Auf der Basis der gewonnenen Erkenntnisse sollte ein Reservoirsystem für die transdermale Applikation von Melatonin, einem Hormon der Epiphyse, entwickelt werden.

Ziel in Teil II war es, die humane Keratinozyten-Zelllinie HaCaT im Hinblick auf ihre Eignung zur Untersuchung des Hautmetabolismus von Steroiden zu charakterisieren. Hierzu wurde sowohl die Bildung der Metabolite von Estradiol und Testosteron untersucht als auch die Einflußnahme auf die Reaktionsabläufe betrachtet.

**I:** Eine durchgeführte klinische Studie für das MCRS zur transdermalen Applikation von  $17\beta$ -Estradiol an sechs postmenopausalen Frauen ergab – im Gegensatz zur Produktbeschreibung des Herstellers – einen nicht konstanten Estradiol-Blutspiegel. Die Plasmakonzentration stieg nach der Applikation des Pflasters an, erreichte ein Maximum nach 30 bis 40 Stunden und fiel anschließend nach ca. 60 Stunden unter den therapeutischen Bereich ab. Ein ähnliches Verhalten hatten bereits andere Arbeitsgruppen gefunden (4,5). Mit Hilfe einer neu entwickelten Diffusionszelle wurde der transdermale Fluß aus dem Pflaster bestimmt. Dieser kommt bei einem TTS der Input-Rate in den Körper gleich. Hier ergab sich eine nicht-konstante Transportgeschwindigkeit mit einem Maximum nach 30 bis 40 Stunden. Nach einer Berechnung theoretischer Plasmakonzentrationen aus der Input-Rate zeigte ein Vergleich dieser Werte, mit denen der klinischen Studie, eine sehr gute Übereinstimmung in bezug auf das Plasmaprofil und die pharmakokinetischen Parameter  $c_{\max}$ ,  $t_{\max}$  und AUC. Daraus läßt sich schlußfolgern, daß die verwendete Methode geeignet ist, von in vitro-Untersuchungen auf das in vivo-Verhalten der Pflaster zu schließen. Die fluktuierende Input-Rate ist der Grund für die beobachteten Plasmaspiegelschwankungen.

In vitro zeigte der transdermale Fluß eine starke Abhängigkeit vom Ethanolgehalt im Reservoir mit einem Maximum bei einer Ethanolkonzentration von 62,5 % (V/V).

Daraus ließ sich schließen, daß der Verlust an Ethanol, den in diesem System eingesetzten Enhancer und Lösungsmittel, verantwortlich für die zeitliche Veränderung des transdermalen Flusses ist.

Die sich ergebende Frage nach der permeationskontrollierenden Diffusionsbarriere – Membran, Kleber oder Haut – konnte in weiteren Versuchen beantwortet werden. So zeigte es sich, daß der Einfluß der Haut, ähnlich der allgemeinen Lehrmeinung, für dieses System eine eher untergeordnete Rolle spielt. Entgegen der Annahme, daß die sogenannte EVA-Kontrollmembran die Transportgeschwindigkeit reguliert, wurde nachgewiesen,

daß der verwendete Isobutylkleber in diesem Zusammenhang eine wichtige Rolle spielt. Abhängig ist dieser Umstand wiederum von der Ethanolkonzentration im Reservoir des TTS. So repräsentiert der Kleber bei hohen Ethanolgehalten auf Grund einer stark reduzierten Permeabilität die eigentliche Diffusionsbarriere. Die Membran lagert hier größere Mengen des Alkohols ein. Dieser setzt dann den Diffusionswiderstand herab und bedingt eine erhöhte Löslichkeit von Estradiol im Polymer, wodurch sich die höhere Permeabilität der Membran in konzentrierten ethanolischen Lösungen erklärt.

Sinkt der Ethanolgehalt im Reservoir durch eine Freisetzung des Alkohols während der Applikation unter 70 % (V/V), so übernimmt die EVA-Membran die Kontrolle der Diffusionsgeschwindigkeit. Dies gilt für die Transportraten von Ethanol und Estradiol gleichermaßen, da der Estradiolfluß mit dem Ethanolfluß korreliert.

Die erlangten Erkenntnisse könnten in der Zukunft genutzt werden, das untersuchte TTS durch eine geeignete Modifikation der Reservoirzusammensetzung im Hinblick auf eine konstantere Input-Rate zu verbessern. Das Wissen um die Zusammenhänge zwischen Vehikeleinfluß (Ethanol) bzw. Pflaster-Design und der transdermalen Input-Rate kann aber auch dazu benutzt werden, TTS mit speziellen Funktionen zu entwickeln. Ein solcher Versuch wurde in den Untersuchungen zu Kapitel 4 unternommen.

Hier sollte ein TTS zur Applikation von Melatonin entwickelt werden. Dieses, von der Epiphyse gebildete Hormon, hat sich in der Therapie von Schlafstörungen und des sogenannten „jet-lags“ bewährt (8,9).

Als Voraussetzung für eine ideale Wirkung exogen zugeführten Melatonins wird eine Simulation der körpereigenen Sekretion des Hormons, mit einem glockenförmigen Plasmapeak in den Nachtstunden angesehen (10).

Nach unserer Vorstellung sollte ein ethanolhaltiges TTS, bei dem sich eine hohe Transportgeschwindigkeit für Melatonin zu Beginn der Applikation durch den Verlust von Ethanol schnell reduziert, ein solches Plasmaprofil erzeugen können.

Zu diesem Zwecke gefertigte Reservoirsysteme mit einer mikroporösen Membran zeigten eine starke Abhängigkeit der Systemeigenschaften vom verwendeten Kleber. Während ein Polyisobutylenkleber sowohl für Ethanol als auch für Melatonin nur eine geringe Permeabilität aufwies, zeigte ein Silikonkleber zumindest für den Alkohol eine hohe Durchlässigkeit. Im Gegensatz dazu konnte unter der Verwendung eines Acrylatklebers ein TTS entwickelt werden, bei dem eine schnelle Ethanolfreisetzung für eine zeitliche Änderung der Ethanolkonzentration im Reservoir sorgte.

Die, aus den ermittelten transdermalen Flüssen des letztgenannten Systems berechneten, theoretischen Melatonin-Plasmakonzentrationen zeigten eine gute Annäherung an den natürlichen Blutspiegel des Hormons.

Das Plasmaprofil hängt von der Ethanolmenge im Reservoir ab, wodurch sich die Möglichkeit ergibt, das System den Bedürfnissen entsprechend anzupassen.

Während die Reservoirsysteme im Hinblick auf das Erreichen konstanter Plasmaspiegel, wie es bei der Estrogensubstitution gewünscht ist, eher Nachteile gegenüber den Matrixsystemen aufweisen (siehe Kapitel 2 und 3), belegt Kapitel 4 die Vorzüge solcher TTS in bezug auf die Simulation tageszeitabhängiger Plasmaprofile.

Letztlich müßten in vivo-Studien angeschlossen werden, um die in vitro erhaltenen Ergebnisse zu verifizieren. Dennoch haben wir eine Methode aufzeigen können, die eine neue Richtung im Hinblick auf die Entwicklung von TTS darstellen könnte.

**II:** Die im zweiten Teil der Arbeit verwendete humane Keratinozyten-Zelllinie HaCaT hat sich in der Vergangenheit als ein Modell für Toxizitätsstudien bewährt (11). Die Zellen zeigen ein ausgeprägtes Differenzierungspotential, welches sich in der Synthese diverser Differenzierungsmarker offenbart (12).

Es sollte in der vorliegenden Arbeit überprüft werden, ob diese Keratinozyten-Zelllinie das metabolische Potential der Haut repräsentiert. Steroidhormone

dienten in diesem Fall, wegen ihrer besonderen Bedeutung in der transdermalen Therapie, als Substrate.

Für die Zellen konnte ein reproduzierbares Wachstumsverhalten mit einer konstanten Zelldichte zum Zeitpunkt der Versuche, unabhängig von der verwendeten Passage, gefunden werden. Damit war die Voraussetzung für eine Vergleichbarkeit von Ergebnissen unterschiedlicher Versuche gegeben.

Für Testosteron konnte ein umfangreicher Metabolismus in HaCaT-Zellen nachgewiesen werden. Die üblicherweise in Humanhaut gebildeten Metabolite wurden auch in der Zellkultur gefunden, wodurch belegt ist, daß HaCaT-Zellen ein Enzymmuster in bezug auf den Testosteron-Metabolismus exprimieren, welches der lebenden Haut vergleichbar ist.

Zum Nachweis von gebildeten Metaboliten wurden zwei unterschiedliche Methoden herangezogen.

Eine Auftrennung der Biotransformationsprodukte mittels HPLC gekoppelt mit einem Massendetektor hatte eindeutige Vorteile im Hinblick auf eine Identifikation der Metabolite. Neben der Retentionszeit als Indiz lassen die erhaltenen Massenspektren eine eindeutige Aussage in bezug auf die Identität der gefundenen Produkte zu.

Die Verwendung von Tritium-markiertem Testosteron in Verbindung mit einer automatisierten Erfassung der Radioaktivität einzelner Metabolite weist ein wesentlich geringeres Detektionslimit auf und eignet sich so auch für Untersuchungen mit physiologischen Substratkonzentrationen.

Ein Vergleich der gefundenen Zusammensetzung des Metabolitenspektrums mit dem anderer in vitro-Modelle, wie z. B. exzidiierter Haut, ergab eine gute Übereinstimmung der Resultate. Die geringeren Standardabweichungen für das HaCaT-Modell bescheinigten diesem jedoch eine höhere Reproduzierbarkeit.

Das Enzym  $5\alpha$ -Reduktase, welches von großer Bedeutung für das Auftreten verschiedener lokaler Erkrankungen wie Akne und androgenbedingtem Haarausfall ist, konnte in den HaCaT-Zellen im Hinblick auf eine Ausbildung von Subtypen genauer charakterisiert werden. Aus der pH-Abhängigkeit der  $5\alpha$ -



Reduktase-Aktivität und dem Einfluß spezifischer Inhibitoren konnte geschlossen werden, daß der Subtyp I des Enzyms, der sogenannte kutane Typ, vorrangig exprimiert wird. Dieses Isoenzym tritt – mit Ausnahme des Genitaltraktes – auch in der lebenden Haut verstärkt auf und bietet einen möglichen Ansatzpunkt in der Therapie der genannten Erkrankungen. Damit ergibt sich die Möglichkeit, die HaCaT-Zelllinie als ein kostengünstiges, jederzeit verfügbares Modell zum Screening therapeutisch anwendbarer Inhibitoren zu nutzen.

Während die Bestimmung kinetischer Parameter für den Metabolismus von Testosteron auf Grund der komplexen Reaktionswege nicht ohne weiteres möglich war, konnten diese Betrachtungen für die Biotransformation von Estradiol in HaCaT-Zellen angestellt werden. Die Kinetik der Bildung von Estron konnte mit Hilfe der Michaelis-Menten-Theorie beschrieben werden. Dies steht im Widerspruch zu einer Untersuchung zum Metabolismus von Peptiden in HaCaT-Zellen, wo auf Grund eines langsamen Transportes der Substanzen in die Zelle keine solche Kinetik gefunden wurde (13). Der Unterschied ist unserer Meinung nach in der höheren Lipophilie der Steroide, verbunden mit einer schnellen Aufnahme in die Zelle, zu sehen.

Mit Bezug auf die Verwendung von Ethanol im MCRS zur transdermalen Applikation von Estradiol wurde der Einfluß des Alkohols auf die Biotransformation von Estradiol in HaCaT-Zellen untersucht. Für Konzentrationen von vier bis acht Prozent (V/V) im Kulturmedium wurde eine Inhibition des Metabolismus nach einem kompetitiven Mechanismus aufgezeigt. Der Effekt war nach Austausch der Inkubationslösung voll reversibel. Höhere Ethanolgehalte im Medium (10%) zeigten einen veränderten Mechanismus. Mit Hilfe mehrerer Toxizitätstests konnte gezeigt werden, daß in diesem Konzentrationsbereich eine Zellschädigung stattfand. Diese wird für die Abweichung vom kompetitiven Inhibitionsmechanismus verantwortlich gemacht. Das Ergebnis zeigt aber auch, daß Ethanol erst in relativ hohen

Konzentrationen zytotoxisch wirkt. Diese Erkenntnis unterstreicht die Annahme, daß es sich hier um einen relativ gut verträglichen Enhancer handelt (14).

Letztlich kann festgehalten werden, daß Ethanol den Metabolismus von Estradiol inhibiert. Dieses Phänomen könnte Konsequenzen für das zuvor beschriebene MCRS haben. Inwiefern sich die Bioverfügbarkeit von Estradiol durch einen parallelen Ethanoltransport in der Haut verändert, kann nur in einer *in vivo*-Studie geklärt werden. Zellkulturmodelle, wie das beschriebene HaCaT-Modell, können aber, wie hier demonstriert wurde, wichtige Informationen über die beteiligten Mechanismen liefern.

Zusammenfassend läßt sich ableiten, daß die HaCaT-Zelllinie ein Modell darstellt, in welchem der Metabolismus von Steroiden in Anlehnung an die menschliche Haut untersucht werden kann.

In zukünftigen Untersuchungen könnte geklärt werden, inwiefern das Modell eine Relevanz für den Hautmetabolismus anderer Substanzklassen hat. Hier sollten in erster Linie Substanzen betrachtet werden, die in der transdermalen Anwendung eine Rolle spielen.

Weiterhin wäre es interessant genauer zu untersuchen, welchen Einfluß der Differenzierungsgrad auf den Metabolismus in Keratinozyten hat. Mit Hilfe der Induktion einer weitergehenden Differenzierung der Zellen über eine Veränderung der Kulturbedingungen ließe sich das Modell gezielt verändern. Als Induktoren kämen die in Kapitel 6 benannten Faktoren, wie Calciumgehalt im Medium u. ä., aber auch eine Kultivierung der Zellen an der Grenzfläche zwischen Medium und Luft in Frage. Diese Art der Kultivierung soll eine weitergehende Differenzierung der Zellen bewirken (15). Letztlich könnte dann die Biotransformation der Steroide in veränderten Kulturen bestimmt und mit den hier gezeigten Ergebnissen verglichen werden.

Die Bandbreite der Stoffe, welche sich auf Grund ihrer physikalisch-chemischen Eigenschaften für eine transdermale Anwendung eignen, ist nicht sehr groß. Folglich gibt es Überlegungen, Arzneistoffe chemisch zu verändern, um

Prodrugs zu schaffen, die bessere Transporteigenschaften aufweisen. Ein notwendiges Kriterium für die Wirkung solcher Prodrugs ist die rasche Umsetzung zur eigentlichen Wirksubstanz in der Haut. Ein mögliches Einsatzgebiet der HaCaT-Zelllinie könnte sich somit im Bereich des Screenings möglicher Prodrugs im Hinblick auf deren Wirkstofffreisetzung in der Haut ergeben. Die in der Zellkultur erhaltenen Ergebnisse sollten aber mit in vivo-Daten verglichen werden, um die Aussagekraft des Modells zu überprüfen.

### **Literaturverzeichnis**

1. J. A. Balfour and R. C. Heel. Transdermal estradiol: A review of its pharmacodynamic properties and therapeutic efficacy in the treatment of menopausal complaints. *Drugs* 40: 561-582 (1990)
2. P. J. Roberts. The menopause and hormone replacement therapy: Views of women in general practice receiving hormone replacement therapy. *Br. J. Gen. Pract.* 41: 421-424 (1991)
3. P. G. Toniolo, M. Levitz, and A. Zeleniuch –Jacquotte. A prospective study of endogenous estrogens and breast cancer in postmenopausal women. *J. Nat. Cancer Inst.* 87: 190–197 (1995)
4. Y. Le Roux, M. L. Borg, M. Sibille, J. Thebault, A. Renoux, M. J. Douin, F. Djebbar, and M. P. Dain. Bioavailability study of Menorest<sup>®</sup>, a new estrogen transdermal delivery system, compared with a transdermal reservoir system. *Clin. Drug Invest.* 10: 172-178 (1995)
5. S. F. Gordon. Clinical experience with a seven-day estradiol transdermal system for estrogen replacement therapy. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 173: 998-1004 (1995)
6. J. Kao and M. P. Carver. Cutaneous metabolism of xenobiotics. *Drug Met. Rev.* 22: 363-410 (1990)
7. K. L. Audus, R. L. Bartel, I. J. Hidalgo, and R. T. Borchardt. The use of epithelial and endothelial cells for drug transport and metabolism. *Pharm. Res.* 7: 435-451 (1990)
8. I. Haimov and P. Lavie. Potential of melatonin replacement therapy in older patients with sleep disorders. *Drugs & Aging* 7: 75-78 (1995)
9. J. M. Arendt, M. Aldhous, J. English, and V. Marks. The effect of jet-lag and their alleviation by melatonin. *Ergonomics* 30: 1379-1393 (1987)

10. L. Benes, B. Claustrat, F. Horriere, M. Geoffriau, J. Konsil, K. A. Parrot, G. DeGrande, R. L. McQuinn, and J. W. Ayres. Transmucosal, oral controlled-release, and transdermal drug administration in human subjects: A crossover study with melatonin. *J. Pharm. Sci.* 86: 1115-1119 (1997)
11. B. Bonnekoh, B. Farkas, J. Geisel, and G. Mahrle. Lactate dehydrogenase release as an indicator of dithranol-induced membrane injury in cultured human keratinocytes. *Arch. Dermatol. Res.* 282: 325-329 (1990)
12. D. Breitkreuz, P. Boukamp, A. Hülsen, C. Ryle, H. J. Stark, H. Smola, G. Thiekötter, and N. E. Fusenig. Human keratinocyte cell lines. In: G. Wilson. *Pharmaceutical applications of cell and tissue culture to drug transport*. Plenum Press, New York, 1991, pp. 283-296
13. I. Steinstrasser, K. Koopmann, and H. P. Merkle. Epidermal aminopeptidase activity and metabolism as observed in an organized HaCaT cell sheet model. *J. Pharm. Sci.* 86: 378-383 (1997)
14. M. Ponec, M. Haverkort, Y. L. Soei, J. Kempenaar, and H. Bodde. Use of human keratinocyte and fibroblast cultures for toxicity studies of topically applied compounds. *J. Pharm. Sci.* 79: 312-316 (1990)
15. M. Prunieras, M. Regnier, and D. Woodley. Methods for cultivation of keratinocytes with an air-liquid interface. *J. Invest. Dermatol.* 81: 28S-33S (1983)