

### 5. Diskussion

Tenside sind Substanzen mit grenzflächenaktiven Eigenschaften, die in großem Umfang als Hilfsstoffe in der Pharmazie eingesetzt werden. Sie müssen neben den gewünschten pharmazeutisch-technologischen Eigenschaften vor allem eine gute physiologische Verträglichkeit aufweisen. Mit Hilfe mehrerer In-vitro-Testsysteme und an zwei Zellkulturen wurden wichtige Vitalitätsmerkmale der Zelle, wie die Integrität der Zellmembran, die Stoffwechselaktivität sowie morphologische Zellveränderungen und der Mechanismus des Zellsterbens untersucht. Die ermittelten Konzentrations-Wirkungs-Beziehungen und die errechneten Kenngrößen sollen dazu dienen, das Irritationspotenzial von 12 offizinellen Tensiden, die eine große Rolle in unserem täglichen Leben und in der pharmazeutischen Praxis spielen, und die die wichtigsten Gruppen der Tenside vertreten, zu beurteilen.

#### ***Methoden zur Bestimmung des Irritationspotenzials***

Zur Bestimmung des Irritationspotenzials von Tensiden sind verschiedene Testansätze möglich. Grundsätzlich muss zwischen In-vivo- und In-vitro-Methoden unterschieden werden. In der Tabelle 49 sind einige In-vivo-Methoden zur Ermittlung lokaler Irritationen aufgeführt. Bei den angegebenen Literaturstellen wurden die Methoden vor allem zur Untersuchung von Tensiden verwendet.

Das Irritationspotenzial an der Haut kann in vivo an freiwilligen Probanden oder Patienten bestimmt werden. Es gibt daneben auch Methoden zur Bestimmung von Hautirritationen am Tier, die jedoch sehr schlecht reproduzierbar und invasiv sind [81]. Auch steht der Aufwand derartiger Tierversuche nicht im Verhältnis zu deren Nutzen. So wurde z.B. Nacktmäusen menschliche Haut auf den Rücken transplantiert, um Untersuchungen an der menschlichen Haut durchzuführen [227].

Die Ergebnisse von Tierversuchen zur Bestimmung einer Hautirritation variieren sehr stark, da die Unterschiede zwischen den Spezies wie z.B. Mensch, Meerschweinchen und Kaninchen sehr groß sind [97]. Das Kaninchen reagiert wesentlich empfindlicher als der Mensch [97]. Da die Tiere rasiert werden müssen, reagiert die Haut deutlich stärker [81, 97, 105]. Reproduzierbarkeit, Zulänglichkeit und Voraussagemöglichkeit des Patchtests am rasierten Kaninchen und anderen Tieren werden immer mehr in Frage gestellt [97].

Auf solche Tierversuche kann durchaus verzichtet werden, zumal die gewonnenen Aussagen höchstens denen eines Screening entsprechen [170]. Wegen des hohen Versuchsaufwandes, der starken Belastung des Versuchstieres und der erwähnten Unzuverlässigkeit sollten derartige Versuche der Vergangenheit angehören. Wesentlich besser geeignete Screening-Methoden zur Abschätzung des Hautirritationspotenzials sind Zytotoxizitätsuntersuchungen, wie sie auch in der vorliegenden Arbeit durchgeführt wurden.

Tabelle 49: Einige gebräuchliche Methoden zur Ermittlung lokaler Irritationen in vivo

Haut		Auge		Weitere Methoden	
<b><i>T i e r v e r s u c h e</i></b>					
Tiere	Nachweis- methoden	Tiere	Nachweis- methoden	Tiere	Nachweis- methoden
<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Ratte [81, 176, 185]</li> <li>➤ Kaninchen [67, 81, 105, 170]</li> <li>➤ Meerschweinchen [81, 170, 185]</li> <li>➤ Maus [140]</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Morphologie von Gewebeschnitten evtl. nach Trypanblaufärbung [81, 140]</li> <li>➤ Visueller Score [67, 105, 170, 185]</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Kaninchen [124, 129]</li> <li>➤ Ratte [157]</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Vermessung der Hornhautdicke [124, 129]</li> <li>➤ Untersuchung morphologischer Hornhautveränderungen [124, 157]</li> <li>➤ Visueller Score [67, 129]</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Maus [41]</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Atemfrequenz als Maß für Irritationen im oberen Respirationstrakt [41]</li> </ul>
<b><i>T e s t s   a n   P r o b a n d e n   u n d   P a t i e n t e n</i></b>					
<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Patch-Test mit und ohne Okklusion [6, 7, 24, 74, 81, 145, 146, 185, 236]</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Visueller Score [6, 7, 81, 185]</li> <li>➤ TEWL [6, 7, 74, 145]</li> <li>➤ Vermessung v. Erythemen, Desquamation, Hydratation [6, 7, 24, 74, 236]</li> </ul>			<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Untersuchungen an der Mundschleimhaut [112, 113]</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Visueller Score [112]</li> </ul>

Hautirritationen sind vor allem mit Entzündungsreaktionen wie Rötung, Ödemen und Schmerz sowie mit mehr oder weniger starker Zytotoxizität verbunden. Dabei ist es durchaus von Interesse, ob der Zelltod nekrotischer oder apoptotischer Art ist. Denn nekrotische Zellveränderungen führen in der Regel auch zur Beeinträchtigung des umgebenden Gewebes [97, 171], was bei der Apoptose nicht der Fall ist [69, 70].

Nach umfassenden Zytotoxizitätsuntersuchungen sind die erwähnten In-vivo-Tests an Freiwilligen am besten zur Bestimmung von Irritationen an der Haut geeignet. Bei solchen Tests sind auch gute Korrelationen von subjektivem Score und objektiven Parametern, wie z.B. dem transepidermalen Wasserverlust (TEWL), gefunden worden [6, 7, 72]. Objektive Daten sind jedoch in jedem Fall zuverlässiger [72, 145].

Irritationen am Auge können aus ethischen Gründen in vivo nur am Tier untersucht werden. Als Standardtest galt hier lange Zeit der Draize-Test am Kaninchen-Auge. Dieser Test ist

jedoch sehr invasiv und oft nicht reproduzierbar [67, 129, 211]. Bei Untersuchungen am Auge sind signifikante Interspeziesvariationen zwischen Hund, Schwein und Kaninchen gefunden worden [97]. Auch gilt zu bedenken, dass sich das menschliche Auge vor allem durch die Hornhautdicke, die fehlende Nickhaut, die Pufferkapazität der Tränenflüssigkeit sowie dem Blinzelreflex vom Kaninchenauge unterscheidet [114, 211].

Der Draize-Test gerät wegen ethischer Aspekte und der mangelhaften Aussagekraft und Reproduzierbarkeit immer mehr in die Kritik [114, 211]. In Ringversuchen wurden Substanzen von den einzelnen Labors teilweise sehr unterschiedlich bewertet. Ein und dieselbe Substanz wurde von verschiedenen Arbeitsgruppen als nicht bzw. stark irritierend eingestuft [114]. Ursache hierfür ist die subjektive Einschätzung beim Ablesen der Reaktionen und beim Ablesen der Bewertungsskala [129, 211]. Alternativ werden objektive Parameter wie Hornhautdicke und -veränderung gemessen [124, 129].

Da bei Augenirritationen der Zelltod eine Schlüsselrolle spielt und derzeit keine zuverlässige In-vivo-Methode zur Verfügung steht, kommt hier den spezifischen Untersuchungen an Zellen große Bedeutung zu [124, 157].

In der vorliegenden Arbeit wurden mehrere Methoden verwendet, mit denen spezifische Funktionen der Zelle und Zellstrukturen analysiert wurden, um so eine Toxizität an der Zelle nachzuweisen.

Eine Zytotoxizität kann durch verschiedene Mechanismen ausgelöst werden. Wichtige Angriffspunkte für toxische Substanzen sind dabei die Störung der Membranfunktion, der Redoxhomöostase, der ATP- und Makromolekülsynthese sowie eine Schädigung des Erbguts [198]. Toxische Zellveränderungen können dabei reversibel sein, wie z.B. eine Bindung an Rezeptoren, die Komplexbildung mit Enzymen oder Permeabilitätsveränderungen von Membranen. Einige Zellveränderungen sind jedoch irreversibel, z.B. Reaktionen wie Oxidation, Hydrolyse oder Bildung kovalenter Bindungen sowie eine massive Störung der Membranfunktion [198]. Dabei gilt immer, dass Wirkungen, die über einen physiologischen Schwankungsbereich hinausgehen, zum Tod der Zelle führen. Dieser kann nekrotisch oder apoptotisch sein [198].

Es gibt sehr viele unterschiedliche Methoden um den Zelltod zu bestimmen. Bei den meisten Methoden wird zu einem festgelegten Zeitpunkt (Endpunkt) ein spezieller Parameter ermittelt, der eine typische Funktion der Zelle kennzeichnet, die bestimmend für deren Vitalität ist. In der Tabelle 50 sind einige gebräuchliche Methoden zur Ermittlung der Zytotoxizität aufgelistet. Bei den angegebenen Literaturstellen wurden die Tests vor allem zur Untersuchung von Tensiden oder als Ersatzmethode zur Bestimmung lokaler Irritationen verwendet.

Tabelle 50: Einige gebräuchliche Methoden zur Ermittlung der Zytotoxizität

Prinzip		Methode		Literatur
Bestimmung physiologischer Leistungen	Aktive Aufnahme von Stoffen durch die Zelle als Maß für ihre Vitalität	Neutralrot-Aufnahme-Test	nach Aufnahme des Farbstoffes bzw. des Nukleosides photometrische bzw. radiographische Messung	[17, 22, 47, 62, 87, 90, 101, 126, 139, 141, 142, 143, 146, 154, 162, 174, 188, 194, 207, 237, 244]
		[ <sup>3</sup> H]Uridin-Aufnahme-Test		[139]
	Reduktionsvermögen lebender Zellen	XTT-Test MTT-Test	nach Reduktion der Tetrazoliumsalze zu farbigen Formazanen bzw. der BG-Leukobase zu grünem Farbstoff photometrische Messung	[36, 188] [12, 22, 26, 47, 52, 56, 60, 76, 90, 92, 93, 94, 101, 126, 137, 154, 161, 164, 174, 177, 180, 224, 234, 245]
		Bindschedler's Grün-Leukobase-Test (BG)		[244]
	DNA- o. Proteingehalt als Maß für die Zellzahl	[ <sup>3</sup> H]Thymidin-Test	fluorimetrische bzw. autoradiographische Bestimmung der DNA-Menge	[22, 102]
		Färbung mit Hoechst 33258		[26]
		Kenacidblau-Färbung	photometrische bzw. radiographische Bestimmung	[42, 87, 154, 182, 197]
		[ <sup>3</sup> H]Prolin-Test	des Gesamtproteingehaltes der Zelle	[19]
		Bio-Rad-Färbung		[136, 154, 188, 194]
	Enzyme u. Substrate als Maß für den Stoffwechsel lebender Zellen	Intrazelluläres ATP	luminometrische Best.	[37]
		Lactatproduktion	photometrische Best.	[182]
		Glukoseverbrauch	Best. im Autoanalyser	[174]
Bestimmung der Membranintegrität	Freisetzung v. intrazellulären Stoffen, Farbstoffen bzw. Membranbestandteilen	LDH-Freisetzung	Best. im Autoanalyser	[12, 76, 90, 101, 126, 154, 160, 174, 194, 219]
		β-NAG-Freisetzung	Best. im Autoanalyser	[160, 174]
		Hämolyse	photometrische Messung	[25, 156, 169, 187, 175]
		Neutralrot-Freisetzung	photometrische Messung	[136, 137, 154]
		[ <sup>3</sup> H]Arachidonsäure	radiographische Messung	[39, 133, 134, 164, 222]
	Aufnahme des Farbstoffes durch tote Zellen	Trypanblaufärbung	Auszählung der Zellen	[56, 179, 188]
		Janus-Grünfärbung	photometrische Bestimmung	[180]
Beobachtungen	Kenntlichmachen morphologischer Zellveränderungen	Agar-Overlay-Test	Sichtbarmachen der Zelllyse (Lysehöfe)	[154, 194]
		Licht- u. Elektronen-Mikroskop		[17, 27, 94, 104, 153, 177, 178, 237, 190, 200, 218, 224]
	Färbemethoden	Durchflusszytometrie, Mikroskop	[126, 153, 186, 229]	
	Zellzahl	Kristallviolett-Färbung, Durchflusszytometrie, Zählkammer, Counter	[98, 104]	
	Zelladhäsion		[102, 154]	
	Zellvolumen		[98, 238]	

Es werden bei den aufgeführten Methoden entweder spezielle physiologische Leistungen, die nur von der lebenden Zelle erbracht werden können, untersucht oder es wird mit unterschiedlichen Methoden die Membranintegrität bestimmt. Doch auch morphologische Veränderungen an der Zelle spielen eine große Rolle bei zytotoxikologischen Untersuchungen. In der vorliegenden Arbeit wurden mehrere Methoden verwendet, bei denen alle drei Nachweis-Prinzipien zur Bestimmung der Toxizität an der Zelle genutzt wurden.

Das Vitalitätsmerkmal Reduktionsvermögen wurde mit einem XTT-Test bestimmt. Bei diesem Test wird wie beim MTT-Test das Reduktionsvermögen mitochondrialer Dehydrogenasen lebender Zellen bestimmt.

Eine gute Übereinstimmung des MTT-Tests mit In-vivo-Studien wurde für Tenside in zahlreichen Arbeiten nachgewiesen. Gut korrelierten die Ergebnisse des MTT-Tests mit dem Augenirritationstest am Kaninchen nach Draize [101, 177]. Die In-vitro-Versuche wurden an Cornea-Zellen vom Kaninchen [101] oder rekonstruiertem Cornea-Epithel vom Rind [177] durchgeführt. Bei den Versuchen an den Kaninchen-Cornea-Zellen wurde das gleiche Ranking wie in der vorliegenden Arbeit (Benzalkoniumchlorid > Natriumdodecylsulfat > Triton® X-100) ermittelt [101].

Gut korrelierten Ergebnisse des MTT-Tests an primären und permanenten Keratinozyten mit der in vivo bestimmten Hautirritation am rasierten Kaninchen. In dieser Studie wurde ebenfalls das gleiche Ranking wie in der vorliegenden Arbeit (Benzalkoniumchlorid > Natriumdodecylsulfat = Cocamidopropylbetain) gefunden [234].

Auch Tests am Menschen, wie der Patch-Test an der Haut, zeigten eine gute Übereinstimmung mit dem MTT-Test [60, 137, 174]. Die Untersuchungen wurden an primären Keratinozyten [137, 174] oder am humanen Hautmodell [60, 174] durchgeführt. Auch bei einer solchen Studie wurde das gleiche Ranking wie in der vorliegenden Arbeit (Benzalkoniumchlorid > Natriumdodecylsulfat > Polysorbat 80) festgestellt [174].

In einer weiteren Studie wurde wie in der vorliegenden Arbeit der XTT-Test an HaCaT-Zellen durchgeführt. Beim Vergleich der Ergebnisse des XTT-Tests mit den Ergebnissen eines Patch-Tests wurde eine sehr gute Übereinstimmung gefunden. Die Ergebnisse des XTT-Tests entsprachen denen der vorliegenden Arbeit (Benzalkoniumchlorid > Natriumdodecylsulfat > Polysorbat 80) [36].

Der häufig verwendete MTT-Test hat den Nachteil der Wasserunlöslichkeit des gebildeten Formazans [199]. Die Vorteile des XTT-Tests gegenüber dem MTT-Test bestehen vor allem in der einfacheren Handhabung sowie im Wegfall der Verwendung toxischer Lösungsmittel [36, 135]. Außerdem sind nach Durchführung des MTT-Tests die Zellen durch die Kristalle des wasserunlöslichen Formazans zerstört [121].

Zu bedenken ist jedoch, dass auch das Substrat XTT gewisse toxische Eigenschaften hat. Wie in der vorliegende Arbeit nachgewiesen werden konnte, beträgt die Zytotoxizität von XTT 84%. XTT verursachte deutliche morphologische Veränderungen an den HaCaT-Zellen. Des Weiteren wurde durch das Substrat die Zytotoxizität von Cremophor® EL verstärkt. Wird der Test wie beschrieben durchgeführt, ist nicht auszuschließen, dass bei der 2-stündigen Inkubation mit dem Substrat weitere Schäden an den Zellen auftreten, vor allem dann, wenn Stoffe untersucht werden, deren Zytotoxizität mit der Zeit stark zu nimmt.

Um Störungen der Membranintegrität der Zelle zu untersuchen, wurde der AART verwendet, da bei diesem Test nicht die Freisetzung eines intrazellulären Stoffes, sondern die Herauslösung eines Bestandteils der Zellmembran bestimmt wird.

Auch die Freisetzung der Arachidonsäure aus der Zellmembran wurde in einigen Arbeiten mit unterschiedlichen Tests untersucht. Dabei wurde für Tenside eine gute Übereinstimmung mit In-vivo-Tests nachgewiesen [39, 56, 164]. In einer der Studien wurden mehrere Tenside, die auch in der vorliegenden Arbeit untersucht wurden, getestet. Ein gleiches Ranking (Benzalkoniumchlorid > Natriumdodecylsulfat > Polysorbat 80) wurde festgestellt [164].

Die Arachidonsäure kann dabei wie im AART als [<sup>3</sup>H]Arachidonsäure radiographisch oder mit HPLC direkt bestimmt werden. Die Vorteile der Bestimmung der [<sup>3</sup>H]Arachidonsäure sind zum einen eine wesentlich einfachere Handhabung zum anderen die Erfassung aller Arachidonsäurederivate, wie Metabolite der Arachidonsäure und in Phosphoglyceride eingebaute Arachidonsäure.

Auch mit der Trypanblaufärbung kann eine gestörte Membranintegrität der Zelle nachgewiesen werden. Nachteile der Trypanblaufärbung sind die Toxizität des Farbstoffs sowie die Tatsache, dass die Zellen ausgezählt werden müssen und nicht photometrisch vermessen werden können. Außerdem können lysierte Zellen nicht erfasst werden. Zudem ist die Methode relativ aufwendig. Es muss wegen der Toxizität des Trypanblaus sehr zügig gearbeitet werden. Wegen dieser Nachteile wurde die Trypanblaufärbung nur bei zwei Tensiden durchgeführt.

Als drittes Nachweis-Prinzip zur Bestimmung der Zytotoxizität wurden in der vorliegenden Arbeit morphologische Veränderungen an den Zellen beobachtet. Auch morphologische Zellveränderungen korrelierten in mehreren Studien gut mit In-vivo-Daten [27, 101, 104, 167, 237].

Bei der Verwendung verschiedener Methoden spielen jedoch auch die Versuchsbedingungen eine Rolle. Wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden konnte, wurden zumindest nach 24-stündiger Exposition unter AART-Bedingungen die Zellen etwas weniger geschädigt

als bei der Zytotoxizitätsbestimmung. Ursache hierfür ist wahrscheinlich, dass für eine Suspensionszellkultur die Inkubation in Röhren günstiger ist als auf der Mikrotiterplatte. Außerdem verringert die Verwendung von FCS die Zytotoxizität, wie in einer Studie festgestellt wurde [47]. Die Reihenfolge der Toxizität der untersuchten Substanzen wurde in dieser Studie jedoch nicht beeinflusst [47].

Unabhängig von diesen auf die Versuchsbedingungen zurückzuführenden Unterschieden in der Toxizität, waren in der vorliegenden Arbeit die Mitochondrien nach kürzerer Exposition und bei geringeren Tensid-Konzentrationen bereits beeinträchtigt. Die Membran wurde erst nach längerer Exposition und bei höheren Konzentrationen so geschädigt, dass Arachidonsäure freigesetzt wurde. Ähnliche Ergebnisse bei Tensiden sind auch von einer anderen Arbeitsgruppe gefunden worden, die MTT-Test und LDH-Freisetzung als Methoden nutzte. Auch hier fand die LDH-Freisetzung im Vergleich zum MTT-Test später und bei höheren Konzentrationen statt [76].

Bei allen Methoden zur Bestimmung der Zytotoxizität werden einzelne Vitalitätsmerkmale der Zelle untersucht. Es ist möglich, dass die Ergebnisse verschiedener Methoden voneinander abweichen [154, 188]. Deshalb ist es wichtig, mehrere unterschiedliche Methoden zur Ermittlung der Zytotoxizität zu verwenden. Um zuverlässige Vorhersagen zum Irritationspotenzial einer Substanz zu treffen, sind unbedingt mehrere Endpunkte zu verschiedenen Zeitpunkten nötig. Auch andere Autoren fordern Endpunkte, die durch unterschiedliche Methoden bestimmt werden [101, 188, 194, 224]. Durch die Ergebnisse der verschiedenen Methoden sind auch Rückschlüsse auf den toxischen Mechanismus einer Substanz möglich [188].

In der vorliegenden Arbeit wurden deshalb drei unterschiedliche Methoden zur Zytotoxizitätsbestimmung sowie zwei Zelltypen verwendet. Auf die Verwendung von primären Zellkulturen wurde verzichtet, da die Übereinstimmung der Zytotoxizitätsergebnisse bei primären und permanenten Kulturen sehr gut bewertet wurde [104].

Bei den Untersuchungen zur Art des Zelltodes wurden in dieser Arbeit ebenfalls verschiedene Methoden verwendet. Zwei typische Merkmale der Apoptose, Histon-assoziierte DNA-Fragmente in den Zellen und die Aufhebung des Phosphatidylserin-Gradienten an der Zellmembran, wurden dabei untersucht [70, 226].

Zur Bestimmung der Art des Zelltodes waren die Beobachtungen der morphologischen Zellveränderungen ebenfalls sehr hilfreich. Bei der Bewertung der mikroskopischen Bilder der U937-Zellen konnte auf andere Studien zurückgegriffen werden [59, 96, 125, 128, 195, 196, 223, 239]. Die Abbildungen der apoptotischen U937-Zellen der aufgeführten Studien

glichen denen in der vorliegenden Arbeit. Auch für apoptotische HaCaT-Zellen standen in der Literatur Abbildungen zum Vergleich zur Verfügung [11, 111].

Zur Ermittlung von unbekanntem lokalen Irritationen sind im Vorfeld durchgeführte Untersuchungen zur Zytotoxizität mit verschiedenen Endpunkten unerlässlich. Es können neben einer Voreinstufung zur Gefährlichkeit der Substanzen auch wichtige Informationen zum Mechanismus der Toxizität der Substanzen gewonnen werden [90, 139].

Diesen zytotoxikologischen Untersuchungen sollten ganz spezifische In-vitro-Tests folgen, die den spezifischen Mechanismus der Testsubstanzen und die entsprechenden Eigenschaften des betroffenen Organs berücksichtigen [141].

Es wird kritisiert, dass für Haut- und Augenirritationen das gleiche Modell verwendet wird. Bei zytotoxikologischen Untersuchungen, die immer nur Voruntersuchungen darstellen, bei denen wichtige Informationen zu einem komplexen Mechanismus an der Zelle gewonnen werden, kann dies noch toleriert werden. Gänzlich abzulehnen sind Untersuchungen für die Abschätzung von Augenirritationen an Hautmodellen bzw. Untersuchungen für die Abschätzung von Hautirritationen an Augenmodellen. Oft werden bei einer nachgewiesenen Oculotoxizität auch entsprechende Interaktionen mit der Haut angenommen und umgekehrt. Diese hypothetische Korrelation wurde inzwischen widerlegt [114].

Für spezifischere Untersuchungen lokaler Irritationen sind Methoden notwendig, bei denen nicht allein die Zytotoxizität untersucht wird, sondern spezielle Parameter zur Charakterisierung von Toxizitätsmechanismen der Testsubstanzen unter Berücksichtigung der betroffenen Organe bestimmt werden können. In Tabelle 51 sind einige solcher spezifischen Methoden aufgeführt. Die genannten Methoden finden insbesondere bei der Untersuchung von Tensiden Verwendung.

Erst nach zytotoxikologischen und spezifischen In-vitro-Tests sollten In-vivo-Untersuchungen durchgeführt werden, die so auf einen sehr geringen Umfang begrenzt bleiben können. Auch Erfahrungswerte aus der Praxis spielen eine Rolle. Nach ihrer Freigabe sollten Substanzen weiterkontrolliert und eventuell auftretende toxische Wirkungen erfasst werden [97].

Zur Beurteilung des Irritationspotenzials einer bestimmten Stoffgruppe sollten möglichst viele Vertreter dieser Stoffgruppe mit unterschiedlichen Eigenschaften untersucht werden. Zu allen in der vorliegenden Arbeit untersuchten Tensiden gibt es Literaturangaben zu deren Toxizität. Jedoch ist die Zahl der untersuchten Tenside in den einzelnen Studien in der Regel auf ein bis drei Vertreter begrenzt. In der vorliegenden Arbeit sind alle offizinellen, das heißt alle wichtigen Tenside aus der pharmazeutischen Praxis, an den gleichen Modellen untersucht worden.



Tabelle 51: Weitere In-vitro-Methoden zur Bestimmung lokaler Irritationen

Haut		Auge		Gefäße
Model	Bestimmung von:	Model	Bestimmung von:	
<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ dreidimensionale Hautepithelzellkulturen, Hautmodelle [37, 84, 92, 183, 193, 224, 245]</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Zytotoxizität [92, 193, 224, 245]</li> <li>➤ Penetration [37, 193]</li> <li>➤ genetischen Markern [233]</li> <li>➤ Entzündungsmediatoren [92, 183, 224]</li> <li>➤ morphologischen Veränderungen [183]</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ isolierte Hornhäute [100, 119]</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Hornhauttrübung [119]</li> <li>➤ Hornhautpassage [119]</li> <li>➤ Hornhautdicke [100, 129]</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Hyperämie, Haemorrhagie, Koagulation an d. Chorionallantoismembran des bebrüteten Hühnerreis (HET-CAM-Test) [139, 156, 194]</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Keratinozytenkulturen [141, 143]</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Entzündungsmediatoren [141, 143]</li> <li>➤ genetischen Markern [104, 228]</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ isoliertes Rinderauge [194]</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Hornhauttrübung und Hornhautpassage [194]</li> </ul>	
<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ humane Echthaut [200]</li> <li>➤ Tierhautexplantate [139]</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ morphologischen Veränderungen [200]</li> <li>➤ Entzündungsmediatoren [166]</li> </ul>			
<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Saugbläschenflüssigkeit der Haut [176]</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Entzündungsmediatoren [176]</li> </ul>			

### ***Benzalkoniumchlorid***

Aus der Gruppe der kationischen Tenside wurde das Benzalkoniumchlorid untersucht. Kationische Tenside führen im Gegensatz zu anderen Tensiden gelegentlich zu oralen Vergiftungen [99], die unter Umständen auch tödlich enden können [217]. Intravasal verabreicht verursachen kationische Tenside curareartige Wirkungen [217].

Im Vergleich zu den anderen untersuchten Tensiden weist Benzalkoniumchlorid die höchste Zytotoxizität auf. Es ist auch, zumindest nach 24-stündiger Exposition, das am stärksten membrantoxische Tensid.

Benzalkoniumchlorid ist das einzige untersuchte Tensid, das im AART ein Maximum aufweist. Es wäre falsch daraus zu schließen, dass es bei höheren Konzentrationen zu einer Verringerung der Membrantoxizität von Benzalkoniumchlorid kommt. Obwohl die Zellen bei höheren Konzentrationen, z.B. bei 32 µg/ml, weniger oder keine Arachidonsäure mehr freisetzen, ist die Membran permeabel für Trypanblau, also keineswegs intakt. Auch im XTT-Test sind bei diesen Konzentrationen 100% Zytotoxizität bestimmt worden.

Da die Arachidonsäure-Freisetzung auch in Kälte, also nicht enzymatisch, erfolgt, kann man die verringerten Werte freigesetzter Arachidonsäure bei höheren Konzentrationen nicht auf eine Enzymhemmung zurückführen.

Aus den mikroskopischen Beobachtungen der Zellen nach Exposition mit zytotoxischen Konzentrationen geht hervor, dass bei höheren Konzentrationen im Gegensatz zur Exposition mit geringeren Konzentrationen keine Lyse der Zellen erfolgt. Die Zellen erscheinen lediglich verkleinert und behalten eine glatte Oberfläche. Die toten Zellen werden in ihrer Form fixiert. Möglicherweise verursachen höhere Konzentrationen von Benzalkoniumchlorid eine so starke Denaturierung der Membran-Proteine, dass eine kompakte Struktur der ursprünglichen Membran erhalten bleibt.

Bei der MTK sind bereits deutliche Zytotoxizitätswerte im XTT-Test bestimmt worden. Jedoch wurden mit der Trypanblaufärbung nach 1-stündiger Exposition wesentlich höhere Werte für die Zytotoxizität ermittelt, als im XTT-Test. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Membran vor der Schädigung der Mitochondrien bereits durchlässiger ist. Sie ist jedoch nicht so massiv geschädigt, dass Arachidonsäure freigesetzt wird.

Von anderen Arbeitsgruppen wurden zahlreiche Zytotoxizitätsuntersuchungen mit Benzalkoniumchlorid durchgeführt. So z.B. an primären Hornhautepithelzellen, die über 24 Stunden mit Phasenkontrastmikroskopie beobachtet wurden. Morphologische Veränderungen wie Einstellung der normalen Zytokinese, der Zellbewegung, der mitotischen Aktivität, sowie Zelldegeneration und Zellschrumpfung wurden beobachtet. Benzalkoniumchlorid wurde dabei nur in der Konzentration von 0,01% untersucht [218]. Des Weiteren wurden Mausfibroblasten mittels Fluoreszenzmikroskopie und Lebend-Tot-Färbung mit Acridinorange und Propidiumiodid untersucht. Die 0,01%ige Lösung führte nach 25 Minuten zu 90% und nach 40 Minuten zu 100% Zytotoxizität [229]. Ein Vorteil dieser Methoden gegenüber den Methoden, die in dieser Arbeit verwendet wurden, ist die Erfassung zeitlicher Abläufe im zytotoxischen Geschehen ohne einen fixen Endpunkt, der willkürlich festgelegt wird. Nachteilig ist, dass keine Konzentrations-Wirkungs-Kurven erstellt werden können.

Benzalkoniumchlorid bewirkt in geringen Konzentrationen zunächst Apoptose, bei höheren Konzentrationen jedoch vor allem Nekrose. Dies wurde im Zusammenhang mit den Zytotoxizitätstests durch Bestimmung Histon-assoziiierter DNA-Fragmente, Annexin-V-Färbung und morphologische Beobachtungen ermittelt.

Apoptose-induzierende Eigenschaften konnten für Benzalkoniumchlorid auch an einer konjunktivalen humanen Zelllinie nachgewiesen werden [57, 58]. Die Zellen wurden hier mit 0,1 bis 0,0001% Benzalkoniumchlorid 10 Minuten lang inkubiert und nach Reexposition von 3, 24, 48 und 72 Stunden wurde die Zellzahl, die Zytotoxizität mit Kristallviolett, die Expression von Apo 2.7, p53, Fas und Fas-Ligand sowie der DNA-Gehalt und die DNA-Fragmentierung bestimmt. Morphologische Aspekte wurden mit Kernfärbung analysiert.

Benzalkoniumchlorid-Konzentrationen von 0,1 und 0,05% führten unmittelbar zur Zelllyse. Bei 0,01% Benzalkoniumchlorid starben die Zellen nach 24 Stunden hauptsächlich apoptotisch. Geringe Konzentrationen (0,005 bis 0,0001%) führten dosisabhängig nach 24 bis 72 Stunden zu Wachstumshemmung und Apoptose. Fas und p53 wurden durch Benzalkoniumchlorid nicht beeinflusst. Der Fas-Ligand war immer negativ. Wie bei den hier vorliegenden Ergebnissen führten hohe Konzentrationen von Benzalkoniumchlorid zu Nekrose, während Apoptose bei niedrigen Konzentrationen beobachtet wurde [57, 58].

Nach den vorliegenden Ergebnissen ist folgender Ablauf bei den Zellveränderungen durch Benzalkoniumchlorid wahrscheinlich: konzentrationsabhängig findet an den Zellen zunächst eine Permeabilitätserhöhung der Zellmembran, anschließend eine Reduktion der mitochondrialen Aktivität und dann eine apoptotische Veränderung statt. Bei höheren Konzentrationen kommt es zur nachhaltigen Schädigung der Zellmembran und zur Nekrose, schließlich zur Zelllyse, während sehr hohe Konzentrationen zu einer Zellmembranfixierung ohne Lyse der Zelle führen. Dieser Mechanismus ist typisch für Benzalkoniumchlorid. Er wurde bei keinem anderen Tensid beobachtet.

Benzalkoniumchlorid wurde hinlänglich auf seine Zytotoxizität untersucht. In der Tabelle 52 sind die halbmaximalen Zytotoxizitätswerte von Benzalkoniumchlorid aus der Literatur zusammengefasst und den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit gegenübergestellt.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit stimmen bei Benzalkoniumchlorid mit denen aus der Literatur gut überein. Abgesehen von den Ergebnissen des Neutralrot-Freisetzungstests, bei dem eine sehr kurzzeitige Exposition (1min) erfolgte, und den Ergebnissen der Totalproteingehaltsbestimmung, einer Methode, die generell sehr großen Schwankungen in den Ergebnissen unterliegt, befinden sich die halbmaximalen Zytotoxizitätswerte von Benzalkoniumchlorid in einem Konzentrationsbereich von 0,5 bis 20 µg/ml.

In einer vergleichenden Studie zur Zytotoxizität von Antiseptika und Antibiotika wurde festgestellt, dass viele Antiseptika, darunter auch Benzalkoniumchlorid, in klinisch verwendeten Konzentrationen bereits zytotoxisch waren. Die Untersuchungen wurden an primären Fibroblasten und Keratinozyten mit dem MTT-Test durchgeführt. Die Autoren kamen zu dem Schluss, dass Antibiotika besser zur lokalen Behandlung und Prophylaxe von Infektionen geeignet wären als Antiseptika [52]. Mit Benzalkoniumchlorid wurden auch spezifische Untersuchungen an isolierten Hornhäuten durchgeführt. Dabei wurden Hornhauttrübungen und ein Eindringen von Benzalkoniumchlorid in tiefere Schichten festgestellt. Außerdem wurde die Passage von Pilocarpin durch die Hornhaut erhöht [119].

Die in der vorliegenden Arbeit und in vielen anderen Untersuchungen ermittelten Zytotoxizitätswerte von Benzalkoniumchlorid liegen fast immer in einem Konzentrationsbereich, in dem es therapeutisch oder als Hilfsstoff eingesetzt wird. Benzalkoniumchlorid ist in Deutschland das am häufigsten verwendete Konservierungsmittel in Augen- und Nasentropfen. Bei

der bekannten Problematik der Schleimhautschädigung durch längere Anwendung solcher Arzneiformen sind alternative Konservierungsmittel oder konservierungsmittelfreie Systeme dringend notwendig, um Benzalkoniumchlorid zu ersetzen. Eine so breite und unkritische Anwendung, wie sie derzeit mit Benzalkoniumchlorid erfolgt, ist nach diesen und anderen Ergebnissen zytotoxischer Untersuchungen nicht mehr zu befürworten.

Tabelle 52: Halbmaximale zytotoxische Konzentrationen (CC<sub>50</sub>) von Benzalkoniumchlorid

CC <sub>50</sub> [µg/ml]	Endpunkt (Methode)	Exposition [h]	Zellen	Lit.
9,2	MTT	15 min	primäre humane Keratinozyten	[52]
6,68	MTT	15 min	primäre humane Vorhaut-Fibroblasten	[52]
5,1	MTT	1	prim. Kaninchen-Hornhaut-Epithelzellen	[101]
8,3	Neutralrotaufnahme	1	prim. Kaninchen-Hornhaut-Epithelzellen	[101]
22,9	MTT	24	primäre Hornhautzellen vom Rind	[177]
11,0	MTT	24	primäre Epithelzellen vom Rinderauge	[177]
12,4	MTT	24	rekonstruierte Hornhaut	[177]
32	Phosphataseaktivität	3	primäre humane Keratinozyten	[62/143]
3,3	Neutralrotaufnahme	3	primäre humane Keratinozyten	[62/143]
5,1	MTT	24	rekonstruierte humane Epidermis	[178]
1,4	Hemmung Ca <sup>2+</sup> -ATPase	-	Erythrozytenmembranen	[120]
5,8-15	Neutralrotaufnahme	24	verschiedene Biosysteme	[154]
4,7	MTT	12	HDF-Biosystem	[154]
1,1-94	Totalproteingehalt	24	verschiedene Biosysteme	[154]
440-1700	Neutralrotfreisetzung	1min	verschiedene Biosysteme	[154]
6,05	XTT	1	promonozytäre Zelllinie U937	d.A. <sup>1)</sup>
0,6	XTT	24	promonozytäre Zelllinie U937	d.A. <sup>1)</sup>
2,73	Trypanblaufärbung	1	promonozytäre Zelllinie U937	d.A. <sup>1)</sup>
0,8	Trypanblaufärbung	24	promonozytäre Zelllinie U937	d.A. <sup>1)</sup>
15,2	XTT	1	Keratinozytenzelllinie HaCaT	d.A. <sup>1)</sup>
2,46	XTT	24	Keratinozytenzelllinie HaCaT	d.A. <sup>1)</sup>

<sup>1)</sup> diese Arbeit

### **Anionische Tenside**

Aus der Gruppe der anionischen Tenside wurden drei Verbindungen untersucht, zwei Alkylsulfate, das Natriumdodecylsulfat und das Natriumcetylstearylsulfat, sowie ein ethoxyliertes Alkylsulfat, das Natriumdodecylethersulfat. Natriumdodecylsulfat wurde sehr häufig und an unterschiedlichen Modellen sowohl in vivo als auch in vitro auf seine lokalirritierenden Eigen-

schaften hin untersucht. Es wird seit längerem als Standardirritans verwendet [27, 73, 236]. Die starken Wechselwirkungen, die Natriumdodecylsulfat mit der Haut zeigt, und die Tatsache, dass die von Natriumdodecylsulfat ausgelösten toxischen Wirkungen schnell, gleichmäßig und vor allem nicht allergisch verursacht sind, stellen Gründe für diese Verwendung dar [73].

Viele Aspekte der Wirkung von Natriumdodecylsulfat auf die Haut sind wegen der Verwendung als Standardirritans bereits untersucht worden. Natriumdodecylsulfat bewirkt starke Barriereveränderungen, es führt zur Schwellung und Zerstörung des Stratum corneum. Dabei tritt es sowohl mit Lipid- als auch mit Proteinstrukturen in Wechselwirkung [73]. Schon seit langem ist bekannt, dass Alkylsulfate stark an dermales Keratin binden [99]. Verschiedene genetische Marker, die bei entzündlichen Dermatosen überexprimiert werden, wie Integrine und ICAM-1, werden durch Natriumdodecylsulfat vermehrt produziert, wie in vivo nachgewiesen werden konnte [233].

Am haarlosen Rattenmodell wurde die Penetration von Natriumdodecylsulfat in die Haut und in darunterliegende Gewebe sowie die dadurch verursachte systemische Exposition untersucht. Natriumdodecylsulfat dringt relativ tief in die Haut ein, auch unter der Haut liegende Schichten werden gut erreicht. Bei kumulativer Behandlung ist eine deutliche Erhöhung der Natriumdodecylsulfat-Konzentrationen in den unteren Schichten bestimmt worden. Die im Blut zu findende Konzentration ist jedoch nicht in der Lage, systemische Effekte zu verursachen [176].

Die Veränderungen in der Haut, die durch Natriumdodecylsulfat verursacht werden, finden vor allem in den tieferen Teilen des Stratum corneum statt. Höhere Schichten des Stratum corneum zeigen intakte Lipidschichten, während Teile der Epidermis, die aus kernhaltigen, also lebenden Zellen bestehen, deutliche morphologische Veränderungen aufweisen [78]. Zytotoxikologische Untersuchungen von Natriumdodecylsulfat haben demnach auch für die Einschätzung des Irritationspotenzials an der Haut eine große Relevanz.

Natriumdodecylsulfat wurde in mehreren Studien auf seine Zytotoxizität hin untersucht. Die Ergebnisse aus der Literatur sind in Tabelle 53 den Ergebnissen dieser Arbeit gegenübergestellt. Bei Betrachtung der verschiedenen halbmaximalen Zytotoxizitätswerte von Natriumdodecylsulfat sind erhebliche Unterschiede in den Ergebnissen der einzelnen Arbeitsgruppen festzustellen. Der Konzentrationbereich, in dem die  $CC_{50}$ -Werte von Natriumdodecylsulfat liegen können, ist aufgrund dessen sehr groß. Bei 24-stündiger Exposition reicht er nach diesen Literaturangaben von 5 µg/ml bis 2,2 mg/ml. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit stimmen mit einzelnen Daten aus der Literatur sehr gut überein [47, 101, 207, 237]. Diese Zytotoxizitätswerte wurden an primären und permanenten Zellen, die von Haut bzw. Auge abstammten, ermittelt. Der Endpunkt der Zytotoxizität wurde dabei mit Neutralrot-Aufnahme, MTT-Test bzw. LDH-Freisetzung bestimmt.

## 5. Diskussion

Tabelle 53: Halbmaximale zytotoxische Konzentrationen (CC<sub>50</sub>) von Natriumdodecylsulfat

CC <sub>50</sub> [µg/ml]	Endpunkt (Methode)	Exposition [h]	Zellen	Lit.
35,6	Neutralrotaufnahme	24	Fibroblastenzelllinie (3T3)	[207]
8,2	Neutralrotaufnahme	2	primäre humane Hautfibroblasten	[47]
10,6	Neutralrotaufnahme	2	primäre humane Keratinozyten	[47]
13,4	MTT	2	primäre humane Hautfibroblasten	[47]
16,7	MTT	2	primäre humane Keratinozyten	[47]
57	LDH-Freisetzung	1	primäre Kaninichenorneazellen	[101]
50	MTT	1	primäre Kaninichenorneazellen	[101]
15	Neutralrotaufnahme	1	primäre Kaninichenorneazellen	[101]
790	Stoffwechselrate	400sec	Mausfibroblastenzelllinie	[194]
83	Neutralrotaufnahme	24	Kaninichenorneazelllinie	[194]
87	Proteingehalt	24	Lungenfibroblastenlinie v. chin. Hamster	[194]
145	MTT	24	rekonstruierte Hornhaut	[177]
77,8	Zellvolumenänderung	14	humane H7-B-Lymphozytenlinie	[238]
160	Phosphataseaktivität	3	primäre humane Keratinozyten	[62/143]
80	Neutralrotaufnahme	3	primäre humane Keratinozyten	[62/143]
500	Phosphataseaktivität	4	Keratinozytenzelllinie (Ratte, sublingual)	[87]
73	Neutralrotaufnahme	3d	Keratinozytenzelllinie (Ratte, sublingual)	[87]
88	Proteingehalt	3d	Keratinozytenzelllinie (Ratte, sublingual)	[87]
61	Neutralrotaufnahme	3d	Fibroblastenzelllinie (3T3)	[88]
65	Proteingehalt	3d	Fibroblastenzelllinie (3T3)	[88]
10,6	Neutralrotaufnahme	3d	primäre humane Keratinozyten (SVK14)	[104]
4090	Neutralrotfreisetzung	1min	primäre humane Keratinozyten	[136]
7260	Neutralrotfreisetzung	1min	Keratinozytenzelllinie HaCaT	[136]
1890	Neutralrotfreisetzung	1min	permanente Mausfibroblasten	[136]
131	MTT	24	rekonstruierte humane Epidermis	[178]
43,3	Neutralrotaufnahme	24	Keratinozytenzelllinie HaCaT	[237]
2198-39	Neutralrotaufnahme	24	verschiedene Biosysteme	[154]
76,2	MTT	12	HDF-Biosystem	[154]
90-5,2	Totalproteingehalt	24	verschiedene Biosysteme	[154]
1600-1000	Neutralrotfreisetzung	1min	verschiedene Biosysteme	[154]
17,0	LDH-Freisetzung	2	HDF-Biosystem	[154]
447	Proteingehalt	4	Lungenfibroblastenlinie chin. Hamster V79	[89]
2,3	Hemmung Ca <sup>2+</sup> -ATPase	-	Erythrozytenmembranen	[120]
31,9	XTT	1	promonozytäre Zelllinie U937	d.A. <sup>1)</sup>
5,67	XTT	24	promonozytäre Zelllinie U937	d.A. <sup>1)</sup>
56,4	XTT	1	Keratinozytenzelllinie HaCaT	d.A. <sup>1)</sup>
17,9	XTT	24	Keratinozytenzelllinie HaCaT	d.A. <sup>1)</sup>

<sup>1)</sup> diese Arbeit

Zu den anderen beiden anionischen Tensiden, Natriumcetylstearylsulfat und Natriumdodecylethersulfat, die in der vorliegenden Arbeit untersucht wurden, sind nicht annähernd so viele Daten in der Literatur zu finden wie zu Natriumdodecylsulfat.

Natriumdodecylsulfat wird im allgemeinen stärker irritierend eingeschätzt als andere anionische Tenside. So sollen z.B. anionische Tenside mit der Kettenlänge C12 mehr Unverträglichkeiten verursachen als die entsprechenden Tenside mit kürzerer oder längerer Kohlenstoffkette [99]. An Kaninchenhaut wurde der Einfluss der Kettenlänge von Alkylethersulfaten auf das Ausmaß der Hautirritationen untersucht. Hier sind keine signifikanten Unterschiede zwischen Tensiden unterschiedlicher Kettenlänge festgestellt worden. Alle untersuchten Tenside verursachten konzentrationsabhängig eine in Ausmaß und Form ähnliche Hautirritation [181].

Obwohl Natriumcetylstearylsulfat als verträglicher gilt [99, 151], ist es nach den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit deutlich zytotoxischer und membrantoxischer als Natriumdodecylsulfat. Danach ist Natriumdodecylsulfat besser verträglich als Natriumcetylstearylsulfat.

Natriumdodecylethersulfat weist an beiden Zelllinien in etwa die gleiche Zytotoxizität wie Natriumdodecylsulfat auf. Es ist außerdem etwas stärker membrantoxisch als das Standardirritans. Dabei gilt auch dieses Tensid als besser verträglich im Vergleich zu Natriumdodecylsulfat. So ist z.B. die LD<sub>50</sub> des ethoxylierten Derivates von Natriumdodecylsulfat geringer [99]. Bei Tierversuchen am oberen Respirationstrakt der Maus und im Krümmungstest war Natriumdodecylethersulfat weniger toxisch als Natriumdodecylsulfat [41]. An der Haut verursacht Natriumdodecylsulfat im Vergleich zu Natriumdodecylethersulfat einen höheren transepidermalen Wasserverlust und mehr Erytheme [137]. An primären Keratinozyten weist Natriumdodecylethersulfat im MTT-Test die gleiche und im Neutralrot-Freisetzungstest eine geringere Zytotoxizität als Natriumdodecylsulfat auf [137].

In der Tabelle 54 sind halbmaximale Zytotoxizitätswerte von Natriumdodecylethersulfat aus der Literatur den Ergebnissen dieser Arbeit gegenübergestellt.

Die in der Literatur gefundenen halbmaximalen zytotoxischen Konzentrationen sind bei Natriumdodecylethersulfat teils größer (Kurzzeitexposition: Neutralrot-Freisetzung, Stoffwechselrate), teils geringer (nach 24h: Neutralrot-Aufnahme, Proteingehalt) als die entsprechenden Werte von Natriumdodecylsulfat. Die CC<sub>50</sub>-Werte der vorliegenden Arbeit sind deutlich geringer als die in der Literatur gefundenen. In Bezug auf die Zytotoxizität und die Membrantoxizität ist Natriumdodecylethersulfat nicht verträglicher einzuschätzen als Natriumdodecylsulfat.

Tabelle 54: Halbmaximale zytotoxische Konzentrationen (CC<sub>50</sub>) von Natriumdodecylethersulfat

CC <sub>50</sub> [µg/ml]	Endpunkt (Methode)	Exposition [h]	Zellen	Lit.
6060	Neutralrotfreisetzung	1min	primäre humane Keratinozyten	[136]
9560	Neutralrotfreisetzung	1min	Keratinozytenzelllinie HaCaT	[136]
4770	Neutralrotfreisetzung	1min	permanente Mausfibroblasten	[136]
1260	Stoffwechselrate	400sec	Mausfibroblastenzelllinie	[194]
73	Neutralrotaufnahme	24	Kaninchencorneazelllinie	[194]
62	Proteingehalt	24	Lungenfibroblastenlinie v. chin. Hamster	[194]
28,1	XTT	1	promonozytäre Zelllinie U937	d.A. <sup>1)</sup>
7,81	XTT	24	promonozytäre Zelllinie U937	d.A. <sup>1)</sup>
47,5	XTT	1	Keratinozytenzelllinie HaCaT	d.A. <sup>1)</sup>
14,0	XTT	24	Keratinozytenzelllinie HaCaT	d.A. <sup>1)</sup>

<sup>1)</sup> diese Arbeit

Alle drei untersuchten anionischen Tenside führen zu gleichen morphologischen Veränderungen sowohl an den U937- als auch an den HaCaT-Zellen. Dazu gehören vor allem Schrumpfung und Lyse der Zelle.

Schon bei frühen Untersuchungen (1967) an Ciliatenzellen wurden nach Exposition mit Natriumdodecylsulfat Veränderungen wie Aufblähung und Abrundung der Zelle, Vergrößerung des Zellkerns sowie Schwellung der Mitochondrien festgestellt [190]. Dass anionische Tenside zur Zelllyse führen, ist auch seit längerem bekannt [99]. Hämoglobinfreie "ghosts"-Zellen zeigen nach Exposition mit Natriumdodecylsulfat ähnliche morphologische Veränderungen wie die U937-Zellen [99]. An primären humanen Keratinozyten wurden nach Exposition mit Natriumdodecylsulfat Abrundung, Schrumpfung und Lyse der Zellen, also die gleichen morphologischen Veränderungen wie an den HaCaT-Zellen, festgestellt [27].

Zum Mechanismus, den Natriumdodecylsulfat in Gang setzt, der letztendlich zum Zelltod führt, wurden verschiedene Untersuchungen durchgeführt. Natriumdodecylsulfat greift direkt an der Membran an und hat eine hohe Sensitivität für lysosomale Membranen [160]. Es führt zur Erhöhung des mitochondrialen Membranpotenzials und zur Abnahme des ATP/ADP-Verhältnisses durch Wechselwirkung mit der Mitochondrienmembran [246].

Bei anionischen Tensiden kommt es wahrscheinlich primär zu einem Membranschaden, sowohl an der Zellmembran als auch an lysosomalen Membranen. Dass bei Natriumdodecylsulfat und Natriumdodecylethersulfat die MTK keine nachweisbare Zytotoxizität verursacht, spricht auch für diesen Ablauf. Zunächst kommt es konzentrations- und



zeitabhängig zur Membranschädigung und dadurch zur Arachidonsäure-Freisetzung, bei höheren Konzentrationen und nach längerer Exposition werden die Mitochondrien in ihrer Funktion beeinträchtigt, was im XTT-Test nachgewiesen wurde.

Sowohl Natriumdodecylsulfat als auch Natriumdodecylethersulfat besitzen Apoptose-induzierende Eigenschaften. Histon-assoziierte DNA-Fragmente und apoptotische Zellen konnten bereits vor der Beeinträchtigung der Mitochondrienfunktion nachgewiesen werden. Apoptose-Induktion durch Natriumdodecylsulfat konnte auch an primären Keratinozyten, nicht jedoch an Langerhanszellen, nachgewiesen werden [86]. In höheren Konzentrationen führen anionische Tenside überwiegend zu nekrotischen Zellveränderungen, wie durch die zytometrischen und morphologischen Untersuchungen in dieser Arbeit gezeigt werden konnten.

Natriumdodecylsulfat beeinflusst auch die Proliferation verschiedener Zelltypen. So wird durch subletale Dosen von Natriumdodecylsulfat die Proliferation von primären Keratinozyten und Fibroblasten erhöht [28, 96]. Typische Marker für die hyperproliferative Epidermis werden durch Natriumdodecylsulfat vermehrt exprimiert [228].

Obwohl es geringe quantitative Unterschiede bei der Toxizität der drei untersuchten anionischen Tenside gibt, scheinen grundsätzlich bei allen drei Tensiden die gleichen Mechanismen abzulaufen, die zum Zelltod führen.

Die untersuchten anionischen Tenside führen nach den vorliegenden Ergebnissen wahrscheinlich zu folgenden Zellveränderungen: konzentrations- und zeitabhängig werden primär Lysosomen- und Zellmembran in ihrer Struktur und Funktion beeinträchtigt. Bei einem Teil der Zellen wird Apoptose induziert. Später findet an den Zellen eine Reduktion der mitochondrialen Aktivität statt. Diese Funktionsbeeinträchtigung der Mitochondrien wird wahrscheinlich auch primär durch die Interaktionen mit der Mitochondrienmembran verursacht. Bei höheren Konzentrationen kommt es bei den Zellen zur Nekrose und schließlich zur kompletten Lyse der Zelle.

### ***Amphotere Tenside***

Es wurden zwei amphotere Tenside, die sich jedoch sehr in ihren Eigenschaften unterscheiden, untersucht. Während Sojalecithin ein Naturprodukt und komplexes Gemisch von verschiedenen Phospholipiden darstellt, ist Cocamidopropylbetain ein einzelnes aktives Tensid in wässriger Lösung.

Da Sojalecithin im allgemeinen als nicht toxisch eingeschätzt wird, und sogar in parenteralen Arzneiformen Verwendung findet, ist es nicht erstaunlich, dass bei ihm eine relativ geringe Zytotoxizität und Membrantoxizität ermittelt wurde. An den U937-Zellen, die ursprünglich aus dem Blut stammen, ist Sojalecithin nur in sehr hohen Konzentrationen überhaupt toxisch. Jedoch ist die Zytotoxizität an den HaCaT-Zellen aus der Haut deutlich größer. Nach 24-stündiger Exposition sind die Zytotoxizitätswerte an HaCaT-Zellen ca. 100mal höher als an

U937-Zellen. Bezüglich dieser deutlich erhöhten Empfindlichkeit der HaCaT-Zellen gegenüber U937-Zellen bildet Sojalecithin eine Ausnahme. Die anderen untersuchten Tenside waren für U937-Zellen toxischer als für HaCaT-Zellen.

Im Konzentrationsbereich von ca. 0,2 bis 10 mg/ml, in dem nach 24 Stunden eine Freisetzung von Arachidonsäure durch Sojalecithin induziert wurde, war die im XTT-Test ermittelte Zytotoxizität nur gering. Auch bei der MTK sind keine oder nur sehr geringe Zytotoxizitätswerte bestimmt worden. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Veränderungen der Membran bereits vor der Beeinträchtigung der Mitochondrienfunktion erfolgt.

Da die Arachidonsäure-Freisetzung bei 4°C sehr gering, und die MTK bei 4°C wesentlich größer war als bei 37°C, sind enzymatische Prozesse, die die Arachidonsäure-Freisetzung mitbedingen, im Konzentrationsbereich zwischen den MTK-Werten bei 4 und 37°C anzunehmen. Zu bedenken wäre, dass die Phospholipide des Sojalecithins denen der Membranen sehr ähnlich sind, und mit diesen in Wechselwirkung treten könnten, sodass eine Verfälschung des Ergebnisses der Membrantoxizität nicht auszuschließen ist. Mit einer solchen Wechselwirkung könnte man auch die verringerte Arachidonsäure-Freisetzung nach 24 Stunden im Vergleich zur 1-stündigen Exposition mit 64 mg/ml erklären. Des Weiteren könnte ein geringer Gehalt an hämolytisch wirkendem Lysolecithin für eine membrantoxische Wirkung mitverantwortlich sein.

Sojalecithin erhöht deutlich die Histon-assoziierten DNA-Fragmente in den U937-Zellen. Zytometrische Untersuchungen konnten zwar nicht durchgeführt werden, jedoch ist die Apoptose als typische Art des Zelltodes durch Sojalecithin anzunehmen. Eine DNA-Fragmentierung durch Sojalecithin selbst, ohne aktive Beteiligung des Zellstoffwechsels ist sehr unwahrscheinlich, da Phospholipide ubiquitär in der Zelle vorkommen. Außerdem konnten Histon-assoziierte DNA-Fragmente nahezu für jede der zytotoxischen Konzentrationen nachgewiesen werden. Sojalecithin führt vermutlich überwiegend zu einem apoptotischen Zelltod infolge einer Membranveränderung, die teilweise enzymatisch verursacht ist. Die Mitochondrien werden wahrscheinlich sekundär geschädigt.

Außer Sojalecithin wurde Cocamidopropylbetain als ein weiteres amphoterer Tensid untersucht. Obwohl Cocamidopropylbetain stark augenreizend ist, gilt es als nicht irritierend an der Haut [215]. Des Weiteren soll ein Cocoamidopropylbetainzusatz die Hautverträglichkeit von anionischen Tensiden verbessern [64, 65]. Dennoch waren die Zyto- und Membrantoxizitäten des Cocamidopropylbetains mit denen des Natriumdodecylsulfates vergleichbar.

Die Ergebnisse von In-vivo-Untersuchungen weisen Cocamidopropylbetain als weniger irritierend als Natriumdodecylsulfat aus. In einer Studie wurde ein geringerer transepidermaler Wasserverlust und weniger klinische Hautirritationen im Vergleich zu Natriumdodecylsulfat ermittelt [136]. In einem In-vivo-Plastikkklusionsstresstest (POST)

verursachte Natriumdodecylsulfat einen stärkeren Oberflächenwasserverlust als Cocamidopropylbetain [23]. Zahnpasten mit Natriumdodecylsulfat führen zu signifikant stärkeren Mundschleimhautdesquamationen als Cocamidopropylbetainhaltige Zahnpasten [112].

In Untersuchungen zur Zytotoxizität war Cocamidopropylbetain hingegen vergleichsweise stark zytotoxisch [73, 136]. An primären Keratinozyten im MTT-Test und im Neutralrot-Freisetzungstest war Cocamidopropylbetain ebenso zytotoxisch wie Natriumdodecylsulfat [137]. An primären humanen Keratinozyten, einer humanen Keratinozytenlinie und an einer Nierenepithelzelllinie vom Kaninchen wurde im MTT-Test ebenfalls eine mit Natriumdodecylsulfat vergleichbare Zytotoxizität von Cocamidopropylbetain festgestellt [234]. Cocamidopropylbetain ist sogar stärker hämolytisch als Natriumdodecylsulfat [175]. In der Tabelle 55 sind einige Ergebnisse von Cocamidopropylbetain aus der Literatur den  $CC_{50}$ -Werten dieser Arbeit gegenübergestellt.

Tabelle 55: Halbmaximale zytotoxische Konzentrationen ( $CC_{50}$ ) von Cocamidopropylbetain

$CC_{50}$ [ $\mu\text{g/ml}$ ]	Endpunkt (Methode)	Exposition [h]	Zellen	Lit.
4380	Neutralrotfreisetzung	1 min	primäre humane Keratinozyten	[136]
5140	Neutralrotfreisetzung	1 min	Keratinozytenzelllinie HaCaT	[136]
1600	Neutralrotfreisetzung	1 min	permanente Mausfibroblasten	[136]
2630	Stoffwechselrate	400sec	Mausfibroblastenzelllinie	[194]
77	Neutralrotaufnahme	24	Kaninchencorneazelllinie	[194]
62	Proteingehalt	24	Lungenfibroblastenlinie v. chin. Hamster	[194]
13,4	XTT	1	promonozytäre Zelllinie U937	d.A. <sup>1)</sup>
7,47	XTT	24	promonozytäre Zelllinie U937	d.A. <sup>1)</sup>
44,1	XTT	1	Keratinozytenzelllinie HaCaT	d.A. <sup>1)</sup>
10,9	XTT	24	Keratinozytenzelllinie HaCaT	d.A. <sup>1)</sup>

<sup>1)</sup> diese Arbeit

Auch bei den in den Tabellen 53 und 55 gelisteten Werten zeigt Cocamidopropylbetain eine mit Natriumdodecylsulfat vergleichbare Zytotoxizität. Im Neutralrot-Freisetzungstest war Cocamidopropylbetain im Vergleich zu Natriumdodecylsulfat toxischer. Die  $CC_{50}$ -Werte der vorliegenden Arbeit sind im Vergleich zu den gefundenen Literaturdaten deutlich geringer, entsprechen dabei jedoch denen des Natriumdodecylsulfats.

Auch der Mechanismus der toxischen Zellveränderungen ähnelt dem der anionischen Tenside. Bei Cocamidopropylbetain ist bei der MTK keine oder eine nur geringe Zytotoxizität nachzuweisen. Auch Cocamidopropylbetain induziert Apoptose. Wie bei den anionischen

Tensiden findet konzentrations- und zeitabhängig primär eine Membranveränderung statt, dem folgt eine Reduktion der mitochondrialen Aktivität. Die durchflusszytometrischen Untersuchungen zeigen, dass geringe Konzentrationen Apoptose induzieren, während bei höheren Konzentrationen Nekrose stattfindet. Auch Cocamidopropylbetain führt schließlich zur Lyse der Zelle. Jedoch verursachen anionische Tenside sowohl an HaCaT- als auch an U937-Zellen andere sichtbare morphologische Veränderungen als Cocamidopropylbetain.

Da keine signifikanten Unterschiede in der Toxizität der verschiedenen kommerziellen Produkte von Cocamidopropylbetain festzustellen waren, können Einflüsse von eventuellen Zusätzen (Konservierungsmittel, Stabilisatoren, unterschiedlicher Salzgehalt) wahrscheinlich vernachlässigt werden.

### ***Macrogolcetylstearylether***

Bei den nichtionischen Tensiden handelt es sich um eine sehr heterogene Gruppe. Auch die untersuchten Stoffe dieser Gruppe unterscheiden sich sehr in ihren Eigenschaften und differieren stark in ihrer Toxizität. Alle untersuchten nichtionischen Tenside leiten sich jedoch vom Macrogol ab und haben demzufolge die gleichen hydrophilen Gruppen. Die verschiedenen lipophilen Gruppen hingegen bestimmen die Heterogenität der nichtionischen Tenside.

Die Macrogolcetylstearylether Brij<sup>®</sup>78 und Cremophor<sup>®</sup> A25 waren deutlich stärker zytotoxisch als Natriumdodecylsulfat. Sie waren zusammen mit Benzalkoniumchlorid am stärksten membrantoxisch.

Auch in anderen Studien sind Macrogolfettalkoholether vom Typ des Brij<sup>®</sup> als stark zytotoxisch und stark hämolytisch eingeschätzt worden [44, 47]. Macrogolfettalkoholether wurden am Rattenauge getestet und als moderat irritierend eingestuft [157]. Laut Draize-Test sind sie nicht augenirritierend [157]. Bei In-vivo-In-vitro-Vergleichstudien mit prinzipiell guter Korrelation von In-vivo- und In-vitro-Daten konnte Brij<sup>®</sup> meist nicht in die Analyse mit einbezogen werden [47, 157].

Brij<sup>®</sup>78 wurde im MTT-Test und im Neutralrot-Aufnahmetest untersucht. Bei 2-stündiger Exposition wies es eine halbmaximale zytotoxische Konzentration von 4,6 bzw. 4,2 µg/ml an Hautfibroblasten und von 8,6 bzw. 6,2 µg/ml an Keratinozyten auf [47]. Diese Werte stimmen ausgezeichnet mit den in dieser Arbeit ermittelten Werten von Brij<sup>®</sup>78 und Cremophor<sup>®</sup> A25 überein. Da Brij<sup>®</sup>78 und Cremophor<sup>®</sup> A25 sich chemisch sehr ähnlich sind und auch in ihren Eigenschaften weitestgehend übereinstimmen, ist es nicht erstaunlich, dass sie sich in ihrer Toxizität nicht unterscheiden.

Die In-vivo-Daten zur Verträglichkeit von Macrogolcetylstearylethern variieren von nicht bis moderat irritierend. Obwohl sie immer besser verträglich als Natriumdodecylsulfat eingeschätzt wurden, sollten diese Substanzen nicht unkritisch eingesetzt werden. Denn sie sind

zum einen sehr deutlich zytotoxisch und zum anderen auch sehr gute Enhancer. Brij<sup>®</sup>78 war im Gegensatz zu Natriumdodecylsulfat in der Lage die nasale Absorption von einem Wachstumsfaktor deutlich zu verbessern [155]. Es ist nicht auszuschließen, dass Macrogolfettalkoholether erst in tieferen Haut- bzw. Schleimhautschichten Schäden anrichten, die in einem visuellem Score nicht erfasst werden können.

Bei den Macrogolfettalkoholethern laufen zunächst ähnliche toxische Veränderungen ab wie bei Cocamidopropylbetain und den anionischen Tensiden.

Bei der MTK war keine oder nur geringe Zytotoxizität nachzuweisen. Wie bei den anionischen Tensiden und Cocamidopropylbetain findet bei Macrogolfettalkoholethern konzentrations- und zeitabhängig primär eine Membranveränderung statt. Dies zeigt auch der Vergleich der Trypanblaufärbung mit dem XTT-Test. Zunächst sind die Zellen mit Trypanblau anfärbbar, erst danach folgt eine Reduktion der mitochondrialen Aktivität.

Die durchgeführten Untersuchungen zeigen, dass bei den Macrogolfettalkoholethern Apoptose und Nekrose nebeneinander ablaufen. Hohe Konzentrationen verursachen vor allem Nekrose. Allerdings führen Macrogolfettalkoholether nicht unmittelbar zur Lyse der Zelle. Des Weiteren bewirken Macrogolfettalkoholether im Vergleich zu anionischen Tensiden und Cocamidopropylbetain teilweise andere sichtbare morphologische Veränderungen sowohl an HaCaT- als auch an U937-Zellen.

Zusätzlich zu Brij<sup>®</sup>78 und Cremophor<sup>®</sup> A25 wurde auch der Komplexemulgator Romulgin<sup>®</sup> N untersucht. Er enthält etwa 32% Alkylpolyglykolether, die denen des Brij<sup>®</sup>78 und Cremophor<sup>®</sup> A25 ähneln. Die bestimmte und auf den Aktivgehalt berechnete halbmaximale zytotoxische Konzentration des Romulgin<sup>®</sup> N war wesentlich höher als die von Brij<sup>®</sup>78 und Cremophor<sup>®</sup> A25. Nach 1-stündiger Exposition waren sie über 100mal zytotoxischer, nach 24 Stunden immerhin noch 10fach so toxisch wie die Alkylpolyglykolether in Romulgin<sup>®</sup> N. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Zusätze in Komplexemulgatoren wie höhermolekulare Fettalkohole und hochmolekulare Fettsäuren die Zytotoxizität der Tenside verringern.

Die anderen untersuchten nichtionischen Tenside waren alle geringer zytotoxisch und membrantoxisch als Natriumdodecylsulfat.

### ***Triton<sup>®</sup> X-100***

Triton<sup>®</sup> X-100 weist 60% relative Zytotoxizität und 10% relative Membrantoxizität im Vergleich zu Natriumdodecylsulfat auf. Triton<sup>®</sup> X-100 gilt als gut hautverträglich und wurde am Rattenauge untersucht und als mild irritierend eingestuft [79, 157]. Jedoch ist Triton<sup>®</sup> X-100 wie Natriumdodecylsulfat stark hämolytisch [187]. Triton<sup>®</sup> X-100 wurde in mehreren Studien auf seine Zytotoxizität hin untersucht. Die Ergebnisse sind in Tabelle 56 den Ergebnissen dieser Arbeit gegenübergestellt.

## 5. Diskussion

Nach den verschiedenen Untersuchungen ist Triton® X-100 in einem Konzentrationsbereich von 10 bis 100 µg/ml zytotoxisch. Die ermittelten CC<sub>50</sub>-Werte der vorliegenden Arbeit liegen in diesem Bereich. Die halbmaximale zytotoxische Konzentration an U937-Zellen nach 24-stündiger Exposition stellt jedoch den geringsten Wert dar.

Tabelle 56: Halbmaximale zytotoxische Konzentrationen (CC<sub>50</sub>) von Triton® X-100

CC <sub>50</sub> [µg/ml]	Endpunkt (Methode)	Exposition [h]	Zellen	Lit.
85	MTT	1	primäre Kaninchen-Hornhaut-Epithelzellen	[101]
66	Neutralrotaufnahme	1	primäre Kaninchen-Hornhaut-Epithelzellen	[101]
91	LDH-Freisetzung	1	primäre Kaninchen-Hornhaut-Epithelzellen	[101]
111	MTT	24	primäre Hornhautzellen vom Rind	[177]
76,3	MTT	24	primäre Epithelzellen vom Rinderauge	[177]
82,7	MTT	24	rekonstruierte Hornhaut	[177]
82,5	MTT	24	rekonstruierte humane Epidermis	[178]
38,2	Neutralrotaufnahme	2	primäre humane Hautfibroblasten	[47]
71,9	Neutralrotaufnahme	2	primäre humane Keratinozyten	[47]
39,9	MTT	2	primäre humane Hautfibroblasten	[47]
69,2	MTT	2	primäre humane Keratinozyten	[47]
54	Neutralrotaufnahme	24	Kaninchencorneazelllinie	[194]
24	Proteingehalt	24	Lungenfibroblastenlinie v. chin. Hamster	[194]
36,2	XTT	24	Lungenfibroblastenlinie chin. Hamster V79	[188]
49,8	Neutralrotaufnahme	24	Lungenfibroblastenlinie chin. Hamster V79	[188]
38,8	Proteingehalt	24	Lungenfibroblastenlinie chin. Hamster V79	[188]
15,5	Trypanblaufärbung	24	Lungenfibroblastenlinie chin. Hamster V79	[188]
48,4	XTT	1	promonozytäre Zelllinie U937	d.A. <sup>1)</sup>
8,98	XTT	24	promonozytäre Zelllinie U937	d.A. <sup>1)</sup>
84,9	XTT	1	Keratinozytenzelllinie HaCaT	d.A. <sup>1)</sup>
26,0	XTT	24	Keratinozytenzelllinie HaCaT	d.A. <sup>1)</sup>

<sup>1)</sup> diese Arbeit

Die morphologischen Veränderungen an den Zellen, die Triton® X-100 verursacht, waren von den durch Natriumdodecylsulfat ausgelösten verschieden. Das trifft sowohl für HaCaT- als auch für U937-Zellen zu. In einer anderen Studie wurden diesbezüglich auch Unterschiede zwischen Triton® X-100 und Natriumdodecylsulfat festgestellt. Die morphologischen Veränderungen an primären Keratinozyten wie Abrundung, Schrumpfung und Lyse durch Triton® X-100 und Natriumdodecylsulfat waren ähnlich jedoch nicht identisch [27]. Triton® X-100

bewirkte in dieser Untersuchung Veränderungen in der Morphologie der primären Keratinozyten, die denen an HaCaT-Zellen entsprachen [27].

Bei Triton<sup>®</sup> X-100 war bei der MTK sowohl nach 1 Stunde als auch nach 24 Stunden eine deutliche Zytotoxizität festzustellen. Das deutet darauf hin, dass Triton<sup>®</sup> X-100 zunächst die Mitochondrien beeinträchtigt und erst dann die Membran nachhaltig schädigt. Dieser Ablauf weicht also auch von dem des Natriumdodecylsulfats ab.

Die durch Triton<sup>®</sup> X-100 induzierte Apoptose konnte durchflusszytometrisch und durch Bestimmung vermehrt gebildeter Histon-assoziiierter DNA-Fragmente nachgewiesen werden. Sowohl an U937-Zellen als auch an HaCaT-Zellen waren die typischen morphologischen Veränderungen der Apoptose zu beobachten.

Zu Triton<sup>®</sup> X-100 sind mehrere Untersuchungen angestellt worden, in denen die Apoptose-induzierenden Eigenschaften analysiert wurden. Zur Etablierung eines Nekrosemodells in Prostata- und Kolonkrebszelllinien wurde Triton<sup>®</sup> X-100 verwendet. Es wurde jedoch festgestellt, dass es neben Nekrose auch Apoptose induziert. Typische morphologische Merkmale und eine internukleosomale DNA-Fragmentierung (DNA-Leiter bei Gelelektrophorese) wurden nachgewiesen. Ein rapider Ausbruch der Apoptose erfolgte innerhalb von 60 Minuten. Die Apoptose war nicht abhängig von Genexpression und Proteinsynthese. Sie konnte nicht mit Cycloheximid gehemmt werden. Als Mechanismus wurde eine Erhöhung der Membranpermeabilität mit der Folge, dass toxische Metaboliten aus dem Zellkulturmedium in die Zelle eindringen und Apoptose induzieren, diskutiert, weil Apoptose auch durch suboptimale Kulturbedingungen ausgelöst wurde. Eventuell soll eine Denaturierung eines zell-eigenen Apoptosehemmers ursächlich sein [31].

Auch in einer humanen Leberkrebszelllinie induzierte Triton<sup>®</sup> X-100 Apoptose. Eine 0,01%ige Lösung erzeugte innerhalb weniger als 60 Minuten Apoptose. Nachgewiesen wurde die DNA-Leiter mit Gelelektrophorese. Außerdem erfolgte eine TUNEL-Färbung. In mehr als 90% der Zellen war nach 150 Minuten Apoptose zu beobachten. Auch deutliche morphologische Veränderungen an den Zellen traten neben der für die Apoptose typischen internukleosomalen DNA-Fragmentierung auf [5].

Es gibt Hinweise darauf, dass Triton<sup>®</sup> X-100 Konformationsveränderungen der DNA induziert. In höheren Konzentrationen (50 bis 90%) kommt es zum Kollaps der DNA [158]. Eine weitere Ursache für die Induktion der Apoptose könnte auch sein, dass durch Triton<sup>®</sup> X-100 das Bax-Molekül aus der Bcl-Familie hetero- und homodimerisiert wird. Dadurch werden bestimmte Regionen dieser membrangebundenen Bcl-Moleküle freigelegt. Bcl-Moleküle spielen eine wichtige Rolle bei der Apoptose [116].

In Konzentrationen, die unterhalb der kritischen Mizellbildungskonzentration und unterhalb der Lysekonzentration liegen, führte Triton<sup>®</sup> X-100 zur Aktivierung von Caspasen und typischen apoptotischen Veränderungen an mehreren Zelllinien [209].

In einer Studie wurde diskutiert, dass Triton® X-100 keine Apoptose, sondern nur DNA-Doppelstrangbrüche auslöst. Es konnten hier an der humanen Lungenepithelzelllinie im Mikroskop keine apoptotischen Körperchen nachgewiesen werden, obwohl die DNA die typische Fragmentierung der Apoptose aufwies [231, 232]. In der vorliegenden Arbeit waren im Gegensatz dazu deutliche apoptotische Merkmale an HaCaT- und an U937-Zellen zu beobachten, die durch Triton® X-100 induziert wurden.

Höhere Konzentrationen von Triton® X-100 führen zur Nekrose und schließlich zur Lyse der Zellen.

Nach den vorliegenden Ergebnissen ist folgender Ablauf bei den Zellveränderungen durch Triton® X-100 wahrscheinlich: konzentrations- und zeitabhängig findet an den Zellen zunächst eine Reduktion der mitochondrialen Aktivität und dann apoptotische Veränderungen statt. Bei höheren Konzentrationen kommt es zur Zerstörung der Membran, zur Nekrose und schließlich zur kompletten Lyse der Zellen. Wahrscheinlich ist die Membran zunächst nur permeabel für Triton® X-100, aber Arachidonsäure wird nicht freigesetzt. Dafür spricht auch, dass schon bei einer Konzentration von 0,1 µg/ml nach 1 Stunde 100% der Zellen einer Prostata- und einer Kolonkrebszelllinie mit Trypanblau anfärbbar waren [31].

Des Weiteren wird Triton® X-100 bereits unterhalb der kritischen Mizellbildungskonzentration in Phospholipidbilayer aufgenommen [51], kann also in die Zelle eindringen. Die komplette Auflösung des Bilayers erfolgt jedoch erst oberhalb der kritischen Mizellbildungskonzentration [51]. Die Zellyse, die bei höheren Triton® X-100-Konzentrationen erfolgt, beruht wahrscheinlich vor allem auf Hydrolyse von Proteinen und Phospholipiden [219].

### ***Polysorbat 80***

Polysorbat 80 wird als gut verträglich für Haut und Auge eingeschätzt [1, 79, 109]. Es ist nicht hämolytisch und reagiert nicht mit Keratin [99]. Polysorbat 80 weist 20% relative Zytotoxizität und 5% relative Membrantoxizität im Vergleich zu Natriumdodecylsulfat auf, was diese allgemeine Einschätzung unterstützt.

Die Zytotoxizität von Polysorbat 80 wurde an verschiedenen Modellen untersucht. In einer Untersuchung an HaCaT-Zellen mit dem XTT-Test war Polysorbat 80 wie in der vorliegenden Arbeit wesentlich weniger toxisch als Natriumdodecylsulfat und Benzalkoniumchlorid [36]. Die Ergebnisse aus den Literaturquellen sind in Tabelle 57 den Ergebnissen dieser Arbeit gegenübergestellt.

Die in dieser Arbeit ermittelten Werte sind deutlich geringer als die der Literatur. Trotzdem ist Polysorbat 80 insgesamt als gering toxisch einzuschätzen, vor allem bei lokaler Applikation.

Polysorbat 80 führt wie andere Tenside konzentrations- und zeitabhängig zunächst zur Apoptose, dann zur Nekrose und schließlich zur Lyse der Zellen. Wie bei Triton® X-100 ist auch bei Polysorbat 80 eine deutliche Zytotoxizität bei der MTK nachgewiesen worden. Der



Mechanismus der Toxizität entspricht allem Anschein nach dem des Triton® X-100. Auch die morphologischen Veränderungen an beiden Zellarten sind bei Triton® X-100 und Polysorbat 80 gleich.

Tabelle 57: Halbmaximale zytotoxische Konzentrationen (CC<sub>50</sub>) von Polysorbat 80

CC <sub>50</sub> [µg/ml]	Endpunkt (Methode)	Exposition [h]	Zellen	Lit.
2270	Neutralrotaufnahme	2	primäre humane Hautfibroblasten	[47]
880	Neutralrotaufnahme	2	primäre humane Keratinozyten	[47]
2600	MTT	2	primäre humane Hautfibroblasten	[47]
750	MTT	2	primäre humane Keratinozyten	[47]
2700000	Stoffwechselrate	400 sec	Mausfibroblastenzelllinie	[194]
1909	Neutralrotaufnahme	24	Kaninchencorneazelllinie	[194]
590	Proteingehalt	24	Lungenfibroblastenlinie v. chin. Hamster	[194]
1000	Neutralrotaufnahme	3d	Keratinozytenzelllinie (Ratte, sublingual)	[87]
890	Proteingehalt	3d	Keratinozytenzelllinie (Ratte, sublingual)	[87]
619	Proteingehalt	3d	Fibroblastenzelllinie (3T3)	[88]
279	XTT	1	promonozytäre Zelllinie U937	d.A. <sup>1)</sup>
48,1	XTT	24	promonozytäre Zelllinie U937	d.A. <sup>1)</sup>
302	XTT	1	Keratinozytenzelllinie HaCaT	d.A. <sup>1)</sup>
87,2	XTT	24	Keratinozytenzelllinie HaCaT	d.A. <sup>1)</sup>

<sup>1)</sup> diese Arbeit

### **Cremophor® EL**

Die Verträglichkeit von Cremophor® EL an der Haut und am Auge gilt als gut [79]. Da Cremophor® EL keine Hämolyse verursacht, wird es auch für parenterale Arzneiformen verwendet [172, 187]. Nach 1-stündiger Exposition ist die Membrantoxizität und die Zytotoxizität bei beiden Zellarten noch sehr gering. Bei U937-Zellen beträgt die relative Zytotoxizität 0,02%, bei HaCaT-Zellen liegt sie bei 0,8%, die relative Membrantoxizität beträgt 0,03%. Dies würde eine gute Verträglichkeit begründen und könnte eine Rechtfertigung für die parenterale Anwendung sein.

Die Zunahme der Zytotoxizität mit der Expositionszeit ist jedoch bei keiner der getesteten Substanzen so ausgeprägt wie bei Cremophor® EL. Nach 24 Stunden ist Cremophor® EL für U937-Zellen 1000mal toxischer als nach 1 Stunde. Es wäre also zu überprüfen, ob durch Cremophor® EL nicht nach länger dauernder oder wiederholter Applikation eine Hämolyse eintreten kann bzw. Schäden an anderen Zellen entstehen könnten.

Obwohl Cremophor<sup>®</sup> EL sogar antihämolytische Eigenschaften haben soll [99], ist es in mehreren Studien als zytotoxisch eingeschätzt worden. Es könnte neurotoxisch sein, da es die Funktionstüchtigkeit von differenzierten Neuroblastom-Zellen beeinträchtigt. Bei Langzeitanwendung kann eine Nervenschädigung nicht ausgeschlossen werden [35].

Des Weiteren verursacht es direkte Zellschäden an Rattennierenzellen, was mit mehreren Testsystemen (LDH-Freisetzung, MTT-Test, Neutralrot-Aufnahme, Propidiumiodid-Färbung) und morphologischen Untersuchungen nachgewiesen wurde. Auch hier war eine lange Expositionszeit nötig um die Veränderungen zu bewirken [126]. Weiterhin hemmt Cremophor<sup>®</sup> EL die Proteinkinaseaktivität und das Wachstum von humanen myeloblastischen Leukämiezellen [40]. Auch die Lebensfähigkeit von murinen Leukämiezellen wird verringert [130].

Eine Erklärungsmöglichkeit für die gefundene verzögerte Toxizität bei fehlenden hämolytischen Eigenschaften könnte die Tatsache sein, dass bei Cremophor<sup>®</sup> EL der Hauptmechanismus des Zellsterbens die Apoptose ist. Die kernlosen Erythrozyten gehen in der Regel nicht apoptotisch zu Grunde.

Die parenterale Anwendung von Cremophor<sup>®</sup> EL ist abgesehen von der eventuellen Zytotoxizität mit weiteren Risiken behaftet. Bei dieser Applikationsform kann als Nebenwirkung von Cremophor<sup>®</sup> EL eine Hyperlipidämie auftreten [66, 77, 106]. Bei Beageln führte dies zu Fettablagerungen in Milz, Lymphknoten, Leber und Niere. Es kann zu Blutbildveränderungen wie Verringerung der Plättchenzahl und Neutropenie kommen [66, 106, 159]. Cremophor<sup>®</sup> EL verursacht besonders heftige anaphylaktische Reaktionen. Sie sind z.B. bei 1-5% der Kinder aufgetreten, die wegen eines Neuroblastoms oder lymphoidem Krebs mit Taxol<sup>®</sup> behandelt wurden [66]. Hierbei können Vasodilatation, Dyspnoe, Flush, Brustschmerzen, Pruritus, Urticaria, Kopfschmerz und Hypotension auftreten [66, 159]. Auch an Beageln konnten Flush, Hautveränderungen und Kopfschütteln nachgewiesen werden [106].

Des Weiteren verursacht Cremophor<sup>®</sup> EL eine Nephrotoxizität [33, 103, 205]. Als Ursachen für diese werden vor allem eine Minderdurchblutung des Nierengewebes, [3, 206] aber auch eine Zytotoxizität [126] diskutiert. Weiterhin wird durch Cremophor<sup>®</sup> EL die Durchblutung der Leber verringert [33]. Eine Neurotoxizität wird diskutiert [35].

Die erwähnten Nebenwirkungen durch den Hilfsstoff Cremophor<sup>®</sup> EL sind bei verschiedenen parenteralen Arzneimitteln beobachtet worden. Zu diesen gehören Cremophor<sup>®</sup> EL-Kombinationen mit Zink(II)-octapentyl-phthalocyanin, Doxorubicin, Teniposid, Paclitaxel, Cyclosporin, Diazepam, Athesin und Propanidid [66, 71, 77, 103, 106, 115, 118, 159, 205, 216].

Den unerwünschten Wirkungen des Cremophor<sup>®</sup> EL stehen jedoch auch Vorteile solcher Cremophor<sup>®</sup> EL-Kombinationen gegenüber. Bei Zytostatika wie Paclitaxel und Doxorubicin verhindert Cremophor<sup>®</sup> EL die Multidrug Resistance [66, 159, 240]. Als Ursache für die Verringerung der Multidrug Resistance werden eine pharmakokinetische Wechselwirkung mit

Erhöhung der Bioverfügbarkeit des Zytostatikums, Enhancer-Effekte bei den Arzneimittel-sensitiven Tumoren sowie die Verstärkung der Zytotoxizität des Zytostatikums diskutiert [126, 159, 204].

Eine Verstärkung der Zytotoxizität von Paclitaxel durch Cremophor<sup>®</sup> EL wurde in mehreren Studien an verschiedenen Krebszelllinien und Tumorproben nachgewiesen [39, 45, 46, 50, 82, 83]. Taxol<sup>®</sup>, eine Kombination von Paclitaxel mit Cremophor<sup>®</sup> EL, war in jedem Fall mehr aktiv als Paclitaxel allein. Cremophor<sup>®</sup> EL selbst wird in diesen Studien als sehr gering zytotoxisch eingeschätzt. Der additive Effekt von Paclitaxel und Cremophor<sup>®</sup> EL wird durch die Überwindung der P-glykoprotein vermittelten und tubulin-assoziierten Drug Resistance erklärt [45, 50, 173]. Auch bei Cyclosporin verstärkt Cremophor<sup>®</sup> EL die Zytotoxizität [126]. Ebenso wurde eine Wirkungsverstärkung des Zytostatikums Cisplatin durch Cremophor<sup>®</sup> EL in einer Studie nachgewiesen, in der Cremophor<sup>®</sup> EL deshalb als Hilfsstoff für Cisplatin vorgeschlagen wurde [18].

Es gibt jedoch auch In-vitro-Studien, in denen kein Effekt zur Wirkungsverstärkung durch Cremophor<sup>®</sup> EL nachgewiesen werden konnte [75, 93, 214]. In einer Untersuchung wurde sogar ein antagonisierender Effekt des Cremophor<sup>®</sup> EL auf die Wirkung des Paclitaxel festgestellt [150].

Durch die Erkenntnis, dass Cremophor<sup>®</sup> EL selbst einen Zelltod durch Apoptose bewirkt, eröffnet sich eine neue Erklärungsmöglichkeit für die Verhinderung der Multidrug Resistance bzw. für die Wirkungsverstärkung durch das Vehikel. Durch die Apoptoseinduktion des Cremophor<sup>®</sup> EL werden zusätzlich Tumorzellen beseitigt.

Trotz der Vorteile zur Wirkungsverbesserung bzw. Wirkungsverstärkung durch Cremophor<sup>®</sup> EL sollte eine sorgsame Nutzen-Risiko-Abwägung bei Verwendung dieses Vehikels für Parenteralia erfolgen. Eine topische Anwendung ist sicher in jedem Fall vertretbar, da die relative Toxizität gegenüber Natriumdodecylsulfat nach 24 Stunden nur bei maximal 12% liegt.

Als Ersatz für Cremophor<sup>®</sup> EL als Vehikel zur parenteralen Applikation werden vor allem Liposomen empfohlen [49, 103, 149, 201, 205]. Auch eine polymere Poly(DL-Lactid)-block-methoxy-polyethylenglykol-Mizelle, die den Mizellen aus Poloxamer<sup>®</sup> 188 ähnelt, wurde für tauglich und günstiger als Cremophor<sup>®</sup> EL befunden [250]. Nach den Untersuchungen der vorliegenden Arbeit, kann ein Austausch von Cremophor<sup>®</sup> EL gegen Poloxamer<sup>®</sup> 188 befürwortet und empfohlen werden. Auch Emulsionen mit Polysorbat 80 werden als Ersatz für Cremophor<sup>®</sup> EL in Parenteralia empfohlen [127]. Polysorbat 80 kann ebenso wie Cremophor<sup>®</sup> EL die zytotoxischen Effekte von Zytostatika verstärken [220]. Jedoch ist Polysorbat 80 nach 24 Stunden an U937-Zellen 4mal so toxisch wie Cremophor<sup>®</sup> EL und deshalb als Hilfsstoff für Parenteralia ungeeignet.

Bei den U937-Zellen ist die Hauptursache des Zellsterbens durch Cremophor<sup>®</sup> EL die Apoptose. Sie wird erst nach längerer Exposition, nach 20 Stunden induziert. Diese Ergebnisse stimmen mit denen des Zytotoxizitätstest mit EZ4U überein. Der Verlust der mitochondrialen Reduktaseaktivität stellt ein wichtiges Merkmal der frühen Apoptose dar. Diese Dysregulation der Mitochondrienfunktion geht der Zellschrumpfung und der Kernfragmentierung und schließlich der Lyse der Zelle voraus [248]. Die Ergebnisse bei Cremophor<sup>®</sup> EL entsprechen einem solchen Ablauf.

Auch die morphologischen Beobachtungen an U937-Zellen bestätigen, dass überwiegend Apoptose durch Cremophor<sup>®</sup> EL induziert wird. Die Zellveränderungen nach 1-stündiger Exposition mit sehr hohen Cremophor<sup>®</sup> EL-Konzentrationen sind dabei völlig verschieden von denen, die nach längerer Expositionszeit mit geringeren Konzentrationen beobachtet wurden. Während nach 24-stündiger Exposition die Zellen apoptotisch und lysiert sind, erscheinen die Zellen nach 1 Stunde im Durchmesser kleiner aber rund. Bei diesen extrem hohen Konzentrationen könnte das Zellsterben allein durch die hohe Osmolarität verursacht, also nekrotisch, sein.

Ganz anders waren die morphologischen Veränderungen an den HaCaT-Zellen. Es konnten weder Hinweise auf eine Apoptose, noch eine Zelllyse beobachtet werden. Nach einer Stunde ist Cremophor<sup>®</sup> EL toxischer für HaCaT-Zellen als für U937-Zellen. In einem größeren Konzentrationsbereich (0,5-100 mg/ml) liegt bei HaCaT-Zellen die Zytotoxizität bei 30-70%. Es scheint in diesem Konzentrationsbereich nur ein Teil der HaCaT-Zellen geschädigt zu werden. Wie gezeigt werden konnte, können sich die HaCaT-Zellen in diesem Konzentrationsbereich nach Entfernung des Cremophor<sup>®</sup> EL wieder etwas regenerieren. Eine anhaltende zytotoxische Wirkung des Cremophor<sup>®</sup> EL nach seiner Entfernung ist an HaCaT-Zellen ausgeschlossen.

Die Membrantoxizität des Cremophor<sup>®</sup> EL ist wie die Zytotoxizität gering, nimmt jedoch ebenfalls mit der Expositionszeit stark zu. Da die Arachidonsäure-Freisetzung bei 4°C sehr niedrig ist, und die MTK bei 4°C wesentlich größer ist als die bei 37°C, sind enzymatische Prozesse, die die Arachidonsäure-Freisetzung mitbedingen, im Konzentrationsbereich zwischen den MTK-Werten anzunehmen.

Die beiden untersuchten Fraktionen des Cremophor<sup>®</sup> EL weisen Unterschiede in ihrer Toxizität auf. Dabei ist die Aqua-Fraktion, die vor allem hydrophobere Bestandteile enthält, in jedem Fall weniger toxisch als Cremophor<sup>®</sup> EL selbst. An den HaCaT-Zellen ist nur ein additiver Effekt der beiden Cremophor<sup>®</sup> EL-Fraktionen nachgewiesen worden. Der Effekt an den U937-Zellen ist jedoch überadditiv.

Auch die Effekte der beiden Fraktionen auf die Zellmembran waren überadditiv. Die Methanol-Fraktion bewirkt in etwa die gleiche Arachidonsäure-Freisetzung wie unfraktioniertes Cremophor<sup>®</sup> EL. Die Aqua-Fraktion hingegen ist weniger membrantoxisch.

Beide Fraktionen des Cremophor® EL verursachen Apoptose. Der Anteil der Aqua-Fraktion am Gesamtgemisch verursacht jedoch weniger Zellveränderungen.

Beide Fraktionen bewirken an den U937-Zellen die gleichen morphologischen Veränderungen wie das Gesamtgemisch. Auch an HaCaT-Zellen führte zumindest die Methanol-Fraktion zu den gleichen Veränderungen an den Zellen. Die Aqua-Fraktion verursachte bei den HaCaT-Zellen andere sichtbare Zellveränderungen als die Methanol-Fraktion und das Gesamtgemisch. Cremophor® EL könnte durch Entfernung der hydrophilen Komponenten hinsichtlich seiner Zytotoxizität verbessert werden.

Bei Untersuchungen von Cremophor® EL-Fraktionen durch eine andere Arbeitsgruppe wurde festgestellt, dass vor allem Komponenten mittlerer Hydrophobie die Lipoproteinverschiebung und die Aminosäure-Transport-Hemmung vermitteln sowie die Lebensfähigkeit von murinen Leukämiezellen verringern. Die Multidrug Resistance wird im Gegensatz dazu durch die hydrophoberen Komponenten verhindert. So wird von den Autoren vorgeschlagen, durch Entfernung der Komponenten, die das Lipoproteinmuster verschieben, Cremophor® EL zu verbessern. Die allergischen Nebenwirkungen und die Zytotoxizitäts-vermittelnden Komponenten sind jedoch dann immer noch enthalten [130].

Der Vorschlag Cremophor® EL zu fragmentieren und so das Wirkungs-Nebenwirkungs-Profil zu verbessern scheint jedoch sehr sinnvoll, wie auch die vorliegende Arbeit bestätigt. Es müsste allerdings auch gewährleistet sein, dass die gewünschten Hilfsstoffeigenschaften und die wirkungsverstärkenden Qualitäten bei Entfernung der unerwünschten Komponenten erhalten bleiben.

### **Poloxamer® 188**

Poloxamer® 188 wird am Auge sehr gut toleriert. Fünf Tage nach einer Applikation von 1 und 2%iger Lösung waren weder toxische noch entzündliche Reaktionen festzustellen. Auch an der Cornea gab es keine Veränderungen. Poloxamer® 188 ist weder hepato- noch nephrotoxisch und wirkt nicht hämolytisch. Aufgrund dieser geringen Toxizität wird Poloxamer® 188 für die Anwendung am Auge und die parenterale Applikation empfohlen [131].

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit bestätigen diese geringen toxischen Eigenschaften. Poloxamer® 188 ist die am wenigsten toxische Substanz, bezogen sowohl auf die Zytotoxizität als auch auf die Membrantoxizität. Es weist 0,03% relative Zytotoxizität und 0,01% relative Membrantoxizität im Vergleich zu Natriumdodecylsulfat auf. Wie bei Cremophor® EL nach 1-stündiger Exposition entstehen Zellen, die im Durchmesser kleiner aber rund sind. Bei den extrem hohen Konzentrationen, in denen Poloxamer® 188 toxisch ist, könnte das Zellsterben allein durch die hohe Osmolarität verursacht sein. Auch für Poloxamer® 188 sind enzymatische Effekte, die zu Membranschäden führen, anzunehmen. Die MTK bei 4°C ist deutlich größer als die bei 37°C.

Da sich alle nichtionischen Tenside vom Macrogol ableiten, wurde auch Macrogol 6000 an U937-Zellen auf Zytotoxizität untersucht. Es ist jedoch noch geringer zytotoxisch als Poloxamer<sup>®</sup> 188. Die  $CC_{50}$  nach 24 Stunden war 3mal so groß. Auch hier wurde das Zellsterben wahrscheinlich durch die hohe Osmolarität verursacht.

### ***Gegenüberstellung der untersuchten Tenside***

Die untersuchten offizinellen Tenside weisen deutliche Unterschiede in ihrer In-vitro-Toxizität auf. Während einige schon in Konzentrationen von wenigen  $\mu\text{g/ml}$  zytotoxisch und membran-toxisch sind, gibt es Tenside die erst im Milligrammbereich überhaupt toxische Erscheinungen an den Zellen verursachen. Die relative Toxizität im Vergleich zu Natriumdodecylsulfat reicht aufgrund dessen von 900 bis 0,01%.

Die Rangfolge in der Toxizität bei den verwendeten Methoden war für die untersuchten Tenside weitestgehend übereinstimmend. In zahlreichen Studien wurde das gleiche Ranking in der Toxizität der Tenside ermittelt. Eine stärkere Zytotoxizität von Benzalkoniumchlorid im Vergleich zu Natriumdodecylsulfat wurde an verschiedenen Testsystemen zur Zytotoxizität, wie Neutralrotaufnahme, MTT-Test, Totalproteingehalt, Neutralrot-Freisetzung, LDH-Freisetzung an primären und permanenten Zellkulturen unter anderem von Haut und Mundschleimhaut sowie an Hautorgankulturen festgestellt [62, 76, 120, 143, 154, 224].

An einer Zelllinie von Rattensublingualzellen sowie an einer Fibroblastenzelllinie wurde mit Neutralrot-Aufnahme, Proteingehalt-Messung sowie Aktivitätsbestimmung der sauren Phosphatase eine stärkere Toxizität von Natriumdodecylsulfat im Vergleich zu Polysorbat 80 bestimmt [87, 88].

Die Toxizitätsrangfolge Benzalkoniumchlorid > Natriumdodecylsulfat > Polysorbat 80 wurde an HaCaT-Zellen mit XTT-Test sowie an primären humanen Keratinozyten und zwei teilweise bzw. ganz verhornten Keratinozyten-Hautfibroblasten-Cokulturen mit Neutralrot-Aufnahme, MTT-Test, LDH-Freisetzung,  $\beta$ -N-Acetyl-Glucosamidase-Freisetzung, Glucoseverbrauch und Prostaglandinfreisetzung ermittelt [36, 174]. Sie stimmt auch mit In-vivo-Daten von Patchtests überein [36, 174].

Eine stärkere Toxizität von Benzalkoniumchlorid gegenüber Natriumdodecylsulfat und Cocamidopropylbetain wurde an primären humanen Keratinozyten, einer humanen Keratinozytenlinie, an einer Kaninchennierenepithelzelllinie im MTT-Test sowie in vivo an rasierter Kaninchenhaut festgestellt. Die Toxizität des Natriumdodecylsulfats entsprach dabei der des Cocamidopropylbetains [234].

An primären Keratinozyten, HaCaT-Zellen und einer permanenten Mausfibroblastenlinie hatten Natriumdodecylsulfat, Natriumdodecylethersulfat und Cocamidopropylbetain bei der Neutralrot-Freisetzung, in Proliferationsuntersuchungen, im MTT-Test und bei der Proteingehaltsbestimmung wie in der vorliegende Arbeit eine gleiche Toxizität [136, 137]. Diese

Übereinstimmung in der Toxizität wurde auch bei einem okklusiven Patchtest mittels Seifenkammer in vivo bestimmt [136, 137].

Die in der vorliegenden Arbeit ermittelte Rangfolge Benzalkoniumchlorid > Natriumdodecylsulfat > Triton<sup>®</sup> X-100 wurde mit LDH-Freisetzung, MTT-Test, Neutralrot-Aufnahme an primären Kaninchencorneazellen und in vivo im Draize-Test bestätigt [101].

In einer Studie wurde die gleiche Rangfolge in der Toxizität von vier der getesteten Tensiden (Brij<sup>®</sup>78 > Natriumdodecylsulfat > Triton<sup>®</sup> X-100 > Polysorbat 80) gefunden. Die Untersuchungen wurden an humanen Haut-Fibroblasten und Keratinozyten mit MTT-Test und Neutralrot-Aufnahme durchgeführt [47].

Ähnliche Ergebnisse wie in der vorliegenden Arbeit wurden bei zwei weiteren Studien ermittelt. Natriumdodecylsulfat und Triton<sup>®</sup> X-100 waren stark hämolytisch, während Cremophor<sup>®</sup> EL nicht hämolytisch war [187]. Bei einer In-vivo-Studie am Rattenauge war Triton<sup>®</sup> X-100 weniger reizend als Brij<sup>®</sup>78 [157].

Auch in anderen In-vitro-Tests, die die Freisetzung von Arachidonsäure bestimmen, wurden Tenside untersucht. Dabei wurde das gleiche Ranking der Membrantoxizität (Benzalkoniumchlorid > Natriumdodecylsulfat > Polysorbat 80) wie bei der vorliegenden Arbeit bestimmt [164, 165].

Es wurde jedoch auch in mehreren Untersuchungen ein von den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit abweichendes Ranking gefunden. So wurde am humanen Hautmodell Skin2 mit MTT-Test und vergleichenden In-vivo-Tests an der humanen Haut folgende Reihenfolge festgestellt: Benzalkoniumchlorid > Natriumdodecylsulfat = Triton<sup>®</sup> X-100 > Natriumdodecylethersulfat = Cocamidopropylbetain [60]. An normalen humanen Fibroblasten wurde im Neutralrottest, LDH-Freisetzungstest und MTT-Test folgendes Ranking gefunden: Triton<sup>®</sup> X-100 > Natriumdodecylsulfat > Natriumdodecylethersulfat > Polysorbat 80 [12].

Ein völlig anderes Ranking als in der vorliegenden Arbeit wurde bei einem Hämolysetest ermittelt: Cocamidopropylbetain = Benzalkoniumchlorid > Natriumdodecylsulfat = Natriumdodecylethersulfat [175]. Auch hier wurde eine gute Korrelation mit In-vivo-Daten aus dem Draize-Test errechnet [175].

Bei einem Plastik-Okklusions-Stress-Test wurde auch eine von der in der vorliegenden Arbeit abweichende Reihenfolge der Toxizität festgestellt. Der gemessene Oberflächenwasserverlust war bei Natriumdodecylsulfat am stärksten, das Ranking war wie folgt: Natriumdodecylsulfat > Gemisch aus amphoteren und nichionischen Tensiden > Coamidopropylbetain > Benzalkoniumchlorid > Sorbitanalkylether [23].

In anderen Untersuchungen war nur jeweils ein Tensid abweichend vom Ranking der vorliegenden Arbeit.

Cocamidopropylbetain, dass in der vorliegenden Arbeit die gleiche Toxizität wie Natriumdodecylsulfat aufweist, zeigte sich in einer Untersuchung an normalen humanen

Keratinocyten im MTT- und im Neutralrot-Aufnahmetest zytotoxischer als Natriumdodecylsulfat [22]. Bei parallel durchgeführten In-vivo-Studien war jedoch Natriumdodecylsulfat stärker irritierend als Cocamidopropylbetain [22]. Polysorbat 80 war in dieser Studie entsprechend den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit weniger toxisch als Cocamidopropylbetain und Natriumdodecylsulfat [22].

In einer anderen Studie war Triton<sup>®</sup> X-100 zytotoxischer als Natriumdodecylsulfat, Natriumdodecylethersulfat und Coamidopropylbetain, die wie in der vorliegenden Arbeit die gleiche Toxizität aufwiesen. Polysorbat 80 war entsprechend weniger toxisch als die anderen Tenside. Die Untersuchungen umfassten die Ermittlung der Stoffwechselrate einer Mausfibroblastenzelllinie, den Neutralrot-Aufnahmetest an einer Kaninchencorneazelllinie sowie die Proteingehaltsbestimmung an einer Lungenfibroblastenlinie von chinesischen Hamstern [194].

Eine mit Natriumdodecylsulfat vergleichbare Zytotoxizität von Triton<sup>®</sup> X-100 wurde an primären Hornhautzellen im MTT-Test ermittelt. Übereinstimmend war Benzalkoniumchlorid am meisten und Polysorbat 20 am wenigsten toxisch [177].

An rekonstruierter Haut war die Zytotoxizität von Triton<sup>®</sup> X-100 größer als die des Natriumdodecylsulfats, während Benzalkoniumchlorid und Polysorbat 80 wie in der vorher erwähnten Studie dem Ranking der vorliegenden Arbeit entsprachen [178]. Eine gute Korrelation mit den augenreizenden Eigenschaften der Tenside wurde überdies für dieses Ranking festgestellt [178].

Cocamidopropylbetain, Natriumdodecylethersulfat und Natriumdodecylsulfat besitzen nach der vorliegenden Arbeit die gleiche Toxizität. Cocamidopropylbetain wurde auf Grund von Untersuchungen mit MTT-Test und Proteingehaltsbestimmung an einer Fibroblastenlinie sowie durch In-vivo-Untersuchungen, bei denen die Desquamation der Mundschleimhaut bestimmt wurde, als signifikant besser verträglich als Natriumdodecylsulfat eingestuft [94]. Auch der Einfluss von Natriumdodecylsulfat auf wiederkehrende Aphthengeschwüre war signifikant größer als der von Cocamidopropylbetain [113]. Bei Tierversuchen an der Maus war Natriumdodecylethersulfat im Krümmungstest besser verträglich und im oberen Respirationstrakt weniger irritierend als Natriumdodecylsulfat [41].

Abweichungen vom Ranking der vorliegenden Arbeit sind vor allem bei In-vivo-Daten aufgetreten, jedoch gibt es auch gute Übereinstimmungen mit In-vivo-Untersuchungen. Es gilt zu bedenken, dass In-vivo-Daten an sich schon stark variieren. Besonders der Widerspruch zwischen der starken Zytotoxizität von Brij<sup>®</sup>s und ihren scheinbar geringen irritierenden Eigenschaften wurde mehrmals diskutiert [47, 157]. Eine gute Korrelation von Zytotoxizitätswerten und Draize-Test konnte so z.B. nur ohne Einbeziehung des Brij<sup>®</sup> ermittelt werden [47]. Auch beim Vergleich von Hämolyse, Draize-Test und Zytotoxizität an der Kaninchen-



cornea konnte Brij® nicht in die Korrelationsrechnung einbezogen werden. Es ist stark zytotoxisch, verursacht jedoch keine Augenreizung im Draize-Test [44].

### ***Toxische Mechanismen der Tenside***

Alle getesteten Tenside zeigen eine deutliche Zunahme ihrer In-vitro-Toxizität mit der Expositionszeit. Dies ist nicht für jede Substanzgruppe gesetzmäßig, bei Heparinoiden ist z.B. bei ähnlichen Versuchen mit dem XTT-Test keine Änderung der  $CC_{50}$ -Werte nach 24 Stunden im Vergleich zur 1-stündigen Expositionszeit festgestellt worden [132].

Diese zeitabhängige Zunahme der Toxizität ist bei Tensiden vor allem dann von Bedeutung, wenn es sich um wiederholte Applikationen oder eine Daueranwendung von Tensiden handelt. Eine Zunahme der In-vivo-Toxizität mit der Zeit wurde mit Tandemmodellen an der humanen Haut mehrfach untersucht und bestätigt [6, 74, 145, 235].

Bei wiederholter Applikation und nach längerer Exposition mit geringen Tensidkonzentrationen wurden auch völlig andere Veränderungen an den Epidermiszellen nachgewiesen. Es kam zu einer Verdickung des Stratum spinosum, zu Hyperkeratose und Zellkerntümmer wurden gebildet. Bei kurzzeitiger Exposition mit höheren Dosen waren solche Veränderungen nicht zu beobachten [140]. In einer Übersichtsarbeit wurde geschlossen, dass die Einwirkdauer der Tenside auch das Ranking ihrer Toxizität entscheidend mitbestimmt [185].

Tenside sind seit längerer Zeit bekannt dafür, dass sie Membranschäden verursachen [190]. Bereits 1967 wurde diese Eigenschaft des Natriumdodecylsulfats an Zilienzellen untersucht [190].

Im Testsystem der vorliegenden Arbeit war für alle getesteten Tenside eine Membranschädigung nachzuweisen. Alle Substanzen, die untersucht wurden, erhöhten die Arachidonsäure-Freisetzung zeit- und konzentrationsabhängig. Das Ausmaß der Membrantoxizität der untersuchten Tenside war jedoch sehr unterschiedlich.

Die Temperatur hatte bei den meisten Tensiden keinen Einfluss auf die Desintegration der Membran, sodass für diese Tenside ein enzymatischer Mechanismus ausgeschlossen werden konnte. Wahrscheinlich wird die Arachidonsäure bzw. die Phosphoglyceride durch die oberflächenaktiven Eigenschaften der Testsubstanzen aus der Membran herausgelöst. Es handelt sich also um eine unspezifische Membranschädigung ohne Phospholipase A2-Aktivierung. Lediglich bei den gering toxischen Tensiden, Cremophor® EL, Poloxamer® 188 und Sojalecithin, sind enzymatische Prozesse an der Membranschädigung mitbeteiligt.

An Keratinozyten der Sublingualschleimhaut wurde festgestellt, dass eine Prostaglandin E2-Freisetzung durch Natriumdodecylsulfat nur in zytotoxischen Konzentrationen erfolgt. Andere untersuchte Substanzen waren in der Lage Prostaglandin E2 auch in Abwesenheit von Zytotoxizität freizusetzen. Die Autoren schlussfolgerten daraus einen nicht enzymatischen

Mechanismus für Natriumdodecylsulfat [142]. Was mit den Untersuchungen der vorliegenden Arbeit übereinstimmen würde.

Beim Vergleich der Ergebnisse der Trypanblaufärbung mit den Ergebnissen des AART ist festzustellen, dass bei der MTK bereits 10-30% (Brij<sup>®</sup>78) bzw. 30-50% (Benzalkoniumchlorid) der Zellen mit Trypanblau anfärbbar waren. Das spricht für eine Permeabilitätserhöhung der Membran vor der Zerstörung der Membran. Diese Permeabilitätserhöhung erfolgt auch vor der Beeinträchtigung der Mitochondrien. Ein solcher Mechanismus tritt jedoch nicht immer auf. Er scheint vielmehr typisch zu sein für stark zytotoxische Tenside. Bei ähnlichen Untersuchungen an Heparinoiden, die nur sehr gering toxisch waren, wurden Mitochondrien in ihrer Funktion gestört, ohne dass sich die Zellen mit Trypanblau anfärben ließen [132].

Außer bei Benzalkoniumchlorid und Cremophor<sup>®</sup> EL konnte durch alle Tenside eine der Positivkontrolle entsprechende maximale Arachidonsäure-Menge freigesetzt werden. Das Erreichen der maximalen Arachidonsäure-Freisetzung, aber auch die morphologischen Untersuchungen sprechen für eine Lyse der Zellen durch hohe Tensidkonzentrationen bzw. nach längerer Expositionszeit. Auch dieser Umstand scheint für Tenside typisch zu sein. Benzalkoniumchlorid führt zwar ebenfalls zur Lyse der Zellen, höhere Konzentrationen fixieren jedoch die Zellen und die Membran bleibt in ihrer Form erhalten. Cremophor<sup>®</sup> EL scheint bezüglich des Mechanismus der Membrantoxizität von den anderen Tensiden abzuweichen, das Zellsterben ist hier vor allem apoptotisch verursacht. Eine Lyse der Zellen erfolgt nicht primär durch Desintegration der Membran, sondern nur im Anschluss an die Apoptose.

Die durchgeführten Untersuchungen legen folgenden Ablauf der Membrantoxizität nahe: konzentrations- und zeitabhängig erfolgt primär eine Erhöhung der Membranpermeabilität, dann eine Desintegration der Membran und schließlich die völlige Auflösung der Membran. Dieser beschriebene Mechanismus wurde von mehreren Autoren vertreten.

Natriumdodecylsulfat und Triton<sup>®</sup> X-100 bewirkten unterhalb der kritischen Mizellbildungskonzentration (cmc) eine Zytotoxizität bei B16-Melanomzellen, die mit Trypanblaufärbung nachgewiesen wurde. In der Nähe der cmc kam es zur Zelllyse, die als Zellverflüssigung photometrisch ermittelt wurde. In dieser Arbeit wurde die Membranschädigung als primäre Schlüsselstelle der Zytotoxizität bezeichnet [179].

An C3H-Zellen (embryonale Mausfibroblasten), normalen humanen Epidermiskeratinocyten und am Hautmodell wurden bei geringen Tensidkonzentrationen zunächst Effekte wie eine Bindung an die Membran und feine Änderungen in der Membranpermeabilität festgestellt. Untersucht wurden bei dieser Studie ebenfalls Natriumdodecylsulfat und Triton<sup>®</sup> X-100. In höheren Konzentrationen führten diese dann zur Membranlyse und Membranfusion. Schließlich kam es zur Zerstörung der Membran. Es bildeten sich gemischte Mizellen, Proteine und Lipoproteinkomplexe [39].

Der gleiche Ablauf der Membrantoxizität, dass Tenside an dermales Keratin binden und die Löslichkeit für Proteine erhöhen, Cholesterol, Phospholipide und Proteine aus der Membran herausgelöst werden und schließlich Zytolyse folgt, wurde schon 1974 diskutiert [99].

In einer weiteren Studie konnte gezeigt werden, dass Triton<sup>®</sup> X-100 unterhalb der cmc in Phospholipid Bilayer aufgenommen wird. In höheren Konzentrationen kam es zur teilweisen Auflösung des Bilayers, oberhalb der cmc erfolgte dann die komplette Auflösung des Bilayers [51].

In einer Übersichtsarbeit werden die Zusammenhänge der Wechselwirkung von Tensiden mit Zellmembranen genauer analysiert. Unterhalb der cmc haben Tenside eine hohe Bindungsaffinität zu den Membranproteinen. Diese werden durch Tenside verändert. Die Membranfläche wird vergrößert, sodass es zunächst zur Stabilisierung der Membran gegen osmotische Einflüsse kommt. In diesen Konzentrationen schützen Natriumdodecylsulfat und Triton<sup>®</sup> X-100 Erythrozyten gegen osmotischen Schock. In höheren Konzentrationen erfolgt die Lyse<sup>1</sup> der Zellen. Sie beginnt, wenn Proteine und Makromoleküle durch die Membran gelangen. Die Lyse der Membran steht mit einer massiven Erhöhung der Bindung der Tenside an die Membran in Zusammenhang. Eine Hämolyse bedeutet aber nicht die komplette Zerstörung der lamellaren Membran. Die Tensid-Monomere werden bei der Hämolyse adsorbiert, penetrieren durch die Membran, induzieren Änderungen in der molekularen Organisation und Permeabilität der Membran. So verschiebt sich das osmotische Gleichgewicht, es kommt zur Hämoglobin-Freisetzung. Der Prozess des völligen Zusammenbruchs der lamellaren Struktur der Membran wird in dieser Arbeit als Solubilisation der Membran bezeichnet. Es entstehen Lipoproteine, Proteine und gemischte Mizellen. Bei maximaler [<sup>3</sup>H]Arachidonsäure-Freisetzung müsste eine derartige Solubilisation der Zellmembran eingetreten sein. Zudem verändern Tenside membrangebundene Enzymaktivitäten. Sie können dabei Enzyme aktivieren, hemmen oder modifizieren [110].

Da alle untersuchten Tenside eine Arachidonsäure-Freisetzung bewirken, ist bei Tensiden auch mit verstärkter Bildung von Entzündungsmediatoren zu rechnen.

So konnten für Natriumdodecylsulfat und Benzalkoniumchlorid auch eine Prostaglandin E<sub>2</sub>-Freisetzung sowohl in vivo an Ratten als auch an humanen Keratinozyten festgestellt werden. Diese stand dabei wie die Arachidonsäure-Freisetzung in enger Beziehung zur Zytotoxizität [141]. Auch an primären Keratinozyten von der Sublingualschleimhaut verursachte Natriumdodecylsulfat eine Prostaglandin E<sub>2</sub>-Freisetzung [142].

An humaner Haut wurden aus der Flüssigkeit von Saugbläschen nach Exposition mit Tensiden Entzündungsmediatoren wie Arachidonsäure, Eicosanoide, Interleukin-1 alpha gaschromatografisch und mit ELISA bestimmt. Benzalkoniumchlorid, Natriumdodecylsulfat

---

<sup>1</sup> mit Lyse ist in diesem Zusammenhang nicht die komplette Auflösung der Zelle gemeint

und Polysorbat 80 führten zur signifikanten Erhöhungen dieser Entzündungsmediatoren [166]. An Mastzellen konnte des Weiteren durch Tenside Histamin freigesetzt werden. Natriumdodecylsulfat und Natriumdodecylethersulfat führten zur Lyse der Mastzellen [185].

Die Schädigung der Mitochondrien scheint auch im Zusammenhang mit der Membrantoxizität der Tenside zu stehen. Durch die Tenside werden die Mitochondrien in ihrer Funktion nachhaltig beeinträchtigt. In der vorliegenden Arbeit war der XTT-Test bei allen Tensiden sehr empfindlich. Durch Tenside verursachte Schwellungen der Mitochondrien wurden bereits 1967 an Ziliatenzellen festgestellt [190].

Eine Veränderung membrangebundener Enzymaktivitäten findet auch an der Mitochondrienmembran statt. Eine Erhöhung der Phosphorylierungsrate in den Mitochondrien wurde nachgewiesen [110]. Außerdem werden Protein-Protein-Wechselwirkungen im Mitochondrium durch Tenside gestört [110].

An einer Primärkultur von Kaninchenorneaepithelzellen wurde der Einfluss von Natriumdodecylsulfat auf die Mitochondrien untersucht. Natriumdodecylsulfat schädigte diese nachhaltig. Es kam zur Erhöhung des mitochondrialen Membranpotenzials und zur Abnahme des ATP/ADP-Verhältnisses in den Mitochondrien. Eine Wechselwirkung des Tensides mit der Mitochondrienmembran wurde geschlussfolgert [246].

Alle untersuchten Tenside führen in geringen Konzentrationen zu apoptotischen Veränderungen an den Zellen. Jedoch ist in höheren Konzentrationen die Nekrose dominierend. Lediglich Cremophor<sup>®</sup> EL und wahrscheinlich auch Sojalecithin führen überwiegend zu Apoptose.

Bei Triton<sup>®</sup> X-100 und Benzalkoniumchlorid ist Apoptose auch von anderen Arbeitsgruppen nachgewiesen worden. Auch hier war in geringen Konzentrationen Apoptose und in höheren Nekrose festgestellt worden [31, 57]. Die Ursachen für die Apoptoseinduktion stehen nach den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit wahrscheinlich auch im Zusammenhang mit den membrantoxischen Eigenschaften der Tenside. Die Theorie, dass eine Erhöhung der Membranpermeabilität mit der Folge, dass toxische Metaboliten aus dem Zellkulturmedium in die Zelle eindringen und Apoptose induzieren, könnte zwar eine Rolle spielen, die Übereinstimmung der Konzentrations-Wirkungs-Kurven von AART und XTT-Test mit dem Vorkommen von Histon-assoziierten DNA-Fragmenten deutet jedoch auf eine direkte Apoptose-Induktion durch die Tenside hin [31].

Einen Zusammenhang von Membrantoxizität und Apoptose machen folgende Befunde aus der Literatur wahrscheinlich.

Der Tumornekrosefaktor induziert sowohl Apoptose als auch eine Arachidonsäure-Freisetzung [241].

Eine Fas-vermittelte Apoptose wird von einer Erhöhung der Arachidonsäure-Freisetzung aus der Membran von U937-Zellen begleitet. Die Spaltung der zytosolischen Phospholipase A2 korreliert dabei mit der Erhöhung der Caspase-3-artigen Proteaseaktivität in apoptotischen Zellen. Die durch die  $\text{Ca}^{2+}$ -unabhängige Phospholipase A2 vermittelte Fettsäure-Freisetzung ist in den FAS-stimulierten Zellen erleichtert. Die freigesetzte Arachidonsäure scheint eine modifizierende, nicht aber essentielle Rolle im apoptotischen Prozess des Zelltodes zu spielen [15].

Eine Phospholipaseaktivierung löste in Mauslymphomzellen Apoptose aus, während die Hemmung der Phospholipase A2 die DNA-Fragmentierung blockierte [4].

Die Membran von apoptotischen Zellen ist hochempfindlich für Phospholipase A2 Typ II. In U937-Zellen war die Arachidonsäure-Freisetzung signifikant beschleunigt in Verbindung mit dem Fortschreiten der Apoptose. Die apoptotische Zellmembran stellt einen potenziellen Angriffspunkt für extrazelluläre Typ-II-Phospholipase A2 dar. Die Arachidonsäure-Freisetzung war durch eine bevorzugte Hydrolyse von Phosphatidylserin, dem Phospholipid, das eine Schlüsselrolle bei der Apoptose spielt, begleitet [16].

Eine Phospholipase-A2-Aktivierung ist jedoch für die Apoptose nicht erforderlich, wie an einer Rinderaortenendothelzelllinie festgestellt wurde. An diesen Zellen modifiziert die Menge freigesetzter Arachidonsäure die TNF-induzierte DNA-Fragmentierung nicht [189].

Auch die Beeinträchtigung der Mitochondrien, die bei einigen der untersuchten Tenside aus der Membranschädigung resultiert, könnte in Beziehung zur Apoptose stehen.

So spielt der mitochondriale Membranpermeabilitätsübergang (MPT) eine zentrale Rolle bei der Modulation der apoptotischen Schwelle. Durch Hemmung des MPT kann Apoptose verhindert werden [191].

Die Veränderungen der Mitochondrienfunktion, genauer der Verlust der mitochondrialen Reduktaseaktivität, wie er mittels XTT-Test bestimmt wurde, stellt ein wichtiges Merkmal bei der frühen Apoptose dar. Die Dysregulation der Mitochondrienfunktion geht der Zellschrumpfung und der Kernfragmentierung voraus. Derartige Veränderungen werden auch für die zytoplasmatische Apoptosekontrolle in kernlosen Zellen, die apoptotisch sterben, verantwortlich gemacht [248].

Die Aufrechterhaltung des mitochondrialen Membranpotenzials geht möglicherweise parallel mit einer Erhöhung der Membranstabilität und dem Mechanismus der Apoptoseinduktion [48].

Die untersuchten Tenside scheinen durch vergleichbare Mechanismen die Membran und das Mitochondrium zu schädigen. Auch bei Induktion des programmierten Zelltodes scheinen sie ähnliche Mechanismen in Gang zu setzen. Dennoch weisen sie deutliche Unterschiede im

Mechanismus ihrer Toxizität auf, besonders die beobachteten morphologischen Zellveränderungen durch die einzelnen Tenside weichen sehr voneinander ab. Auch andere Arbeitsgruppen konnten diesbezüglich Unterschiede zwischen den Tensiden erkennen. An primären humanen Keratinozyten konnte bei Natriumdodecylsulfat im Gegensatz zu Triton® X-100 eine langsame Progression der morphologischen Änderungen an den Zellen beobachtet werden. Diese Progression der Zellveränderungen war bei Triton® X-100 etwas stärker als bei Natriumdodecylsulfat. Für die beiden Tenside wurden ähnliche, aber nicht identische morphologische Zellveränderungen festgestellt [27].

Auch bei Polysorbat 20 wurden an primären Kaninchenhornhautzellen andere morphologische Veränderungen als bei Tensiden wie Triton® X-100, Benzalkoniumchlorid und Natriumdodecylsulfat beobachtet [101].

Bei grenzflächenaktiven Substanzen stellt sich die Frage nach dem Zusammenhang zwischen ihrer Membrantoxizität und ihren physiko-chemischen Eigenschaften.

Über einen Zusammenhang zwischen Membranveränderungen, den Wechselwirkungen von Tensiden mit Phospholipiden und ihrem HLB-Wert bzw. ihrer kritischen Mizellbildungskonzentration wurde mehrfach berichtet [51, 55, 99, 110, 179]. Allerdings wurden bei diesen Arbeiten immer nur einige wenige Tenside untersucht.

Tabelle 58: HLB-Werte von Tensiden im Vergleich mit MTK-Werten

<b>Substanzen</b>	<b>MTK [<math>\mu\text{g/ml}</math>]; 1h Exposition</b>	<b>HLB-Wert</b>	<b>[Literatur]</b>
<b>Benzalkoniumchlorid</b>	<b>2,93</b>	<b>34,6</b>	[249]
<b>Natriumcetylstearylsulfat</b>	<b>1,87</b>	<b>37</b>	[20]
<b>Natriumdodecylsulfat</b>	<b>6,76</b>	<b>40</b>	[251]
<b>Cremophor® A25</b>	<b>1,64</b>	<b>16</b>	[79]
<b>Brij®78</b>	<b>1,66</b>	<b>15,3</b>	[79]
<b>Triton® X-100</b>	<b>41,1</b>	<b>13,4</b>	[249]
<b>Polysorbat 80</b>	<b>80,0</b>	<b>15</b>	[79]
<b>Cremophor® EL</b>	<b>20300</b>	<b>13</b>	[79]
<b>Poloxamer® 188</b>	<b>59600</b>	<b>29</b>	[20]

In der vorliegenden Arbeit war kein Zusammenhang zwischen HLB-Wert und Membrantoxizität zu erkennen. In der Tabelle 58 sind die HLB-Werte einiger untersuchter Tenside den MTK-Werten gegenübergestellt.

Es besteht ebenso kein Zusammenhang zwischen kritischer Mizellbildungskonzentration und den hämolytischen Eigenschaften von Tensiden [187]. Des Weiteren scheint auch der HLB-Wert nicht bestimmend für das Ausmaß lokaler Irritationen sein. Vielmehr ist die Bindungsfähigkeit der Tenside an Proteine ein entscheidender Faktor für das Auftreten lokaler Irritationen, wie bei In-vivo-Versuchen an der Haut der Maus gezeigt werden konnte [140].

In einigen Arbeiten wurde eine pauschale Einstufung der Toxizitätsrangfolge nach der hydrophilen Gruppe der Tenside unternommen. Es wurden z.B. folgende Rankings angegeben: kationische > anionische = amphotere > nicht ionische Tenside [101]; kationische > anionische > nicht ionische Tenside [73]. Da jedoch immer nur eine kleine Auswahl von Tensiden untersucht wurde, ist eine solche Verallgemeinerung abzulehnen. Sie wird auch durch die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit widerlegt. Es besteht kein Zusammenhang zwischen der Ladung der hydrophilen Gruppe der Tenside und ihrer Zyto- bzw. Membrantoxizität.

Die in der Literatur teilweise postulierte Annahme, dass anionische Tenside generell toxischer sind als nichtionische, konnte auch nicht bestätigt werden, da die nichtionischen Polyethylenglycolfettalkoholether deutlich toxischer waren als das anionische Natriumdodecylsulfat [73, 144, 185].

Jedes einzelne Tensid scheint sehr spezifische und komplizierte Abläufe in Zellen und Geweben auszulösen. Die Toxizität der Tenside wird nicht allein durch die simple Auflösung der Zellmembran in Folge der grenzflächenaktiven Eigenschaften verursacht. Viele unterschiedliche Faktoren tragen zu ihrer Wirkung bei. Die grenzflächenaktive Eigenschaft von Tensiden ist nur eine von vielen Ursachen, die die Art und das Ausmaß ihrer Toxizität bestimmen. Aus diesem Grund ist es immer problematisch, von der Toxizität einzelner Tenside auf andere zu schließen.

Auch bei In-vivo-Versuchen wurde festgestellt, dass es keinen einheitlichen Mechanismus der Toxizität von Tensiden gibt. Die einzelnen Tenside lösen durch unterschiedliche Mechanismen lokale Irritationen aus [6, 74].

Die durch Tenside verursachte Zytotoxizität, unabhängig davon welcher Mechanismus sie verursacht hat, ist von großer Bedeutung bei der Entstehung lokaler Irritationen. Am Kanichenaugen wurden Natriumdodecylsulfat und Brij<sup>®</sup> untersucht. Hier waren neben Fläche und Tiefe der Verletzung spezifisch der Umfang des Zelltodes ein wichtiger und prinzipieller Faktor für das Auftreten von Augenirritationen [124].

An der Haut der Maus kam es durch Tenside zur Zelldegeneration, zu fokalen Nekrosen mit entzündlicher Zellinfiltration und bei wiederholter Applikation zu Akanthose und Hyperkera-

tose. Dabei waren Zellkerntrümmer zu beobachten, die von apoptotischen Zellen stammen könnten [140]. In vivo bestimmte lokale Irritationen korrelierten mit der Zytotoxizität der Tenside [185].

In der Haut provozieren Tenside vor allem Schäden in den kernhaltigen, also lebenden, Teilen der Epidermis und bewirken Veränderungen in tieferen Teilen des Stratum corneum. Höhere Schichten des Stratum corneum zeigen dagegen intakte Lipidschichten. Dies widerspricht der alten These: Tenside schädigen allein durch Entfettung der Haut [78]. Auch die Barrierezerstörung durch Tenside an der Haut erfolgt überwiegend durch Zytotoxizität [228].

Außer der Zytotoxizität spielen bei lokalen Irritationen durch Tenside vor allem die Penetration der Tenside in Haut und Schleimhaut, die Bindung der Tenside an Proteine, insbesondere an Keratin und an der Haut auch die Lipidentfernung eine Rolle [140, 185].

Es ist bekannt, dass durch die Kombination unterschiedlicher Tenside die Toxizität der einzelnen Komponenten der Tensidmischung herabgesetzt wird. Üblich ist es deshalb Co-Tenside zu verwenden. Cocamidopropylbetain ist ein bekanntes Co-Tensid zur Verbesserung der Hautverträglichkeit [64, 65]. Es wird häufig zusammen mit Natriumdodecylsulfat und Natriumdodecylethersulfat eingesetzt. Die Zytotoxizität des Gemisches von Cocamidopropylbetain ist nach 24-stündiger Exposition signifikant weniger toxisch als Natriumdodecylsulfat allein.

Auch Kombinationen von nichtionischen Tensiden mit anionischen Tensiden und Kombinationen von verschiedenen anionischen Tensiden verursachen weniger Irritationen als die einzelnen Tenside. So wurden verschiedene Kombinationen von Tensiden z.B. Natriumdodecylsulfat mit Cocamidopropylbetain und Natriumdodecylsulfat mit Natriumdodecylethersulfat in vivo im Patchtest getestet. Die Gemische verursachten immer eine deutlich geringere Irritation als die Tensidkomponenten allein [63].

Als Ursachen für die verringerte Toxizität werden unter andern eine Verringerung der Monomer-Konzentration durch Bildung gemischter Mizellen diskutiert. Das Monomer wird hier für die irritierenden Wirkungen verantwortlich gemacht [152]. Gegen diese These sprechen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit, bei der eine Verringerung der Toxizität bereits in sehr geringen Konzentrationen deutlich unterhalb der kritischen Mizellbildungskonzentration erreicht wurde. Andere Autoren sind ebenfalls der Meinung, dass die Reduktion der kritischen Mizellbildungskonzentration als Erklärung nicht genügt. Hier wird auch die Fähigkeit zur Proteinbindung, die in den Kombinationen geringer ist, als wichtiger Faktor für die Toxizitätsverringering bezeichnet [107]. Gegen die Hypothese, dass Wechselwirkungen zwischen anionischen und kationischen Gruppen zur Toxizitätsverringering



beitragen, spricht, dass auch nichtionische Tenside in Kombination die Toxizität herabsetzen [63].

### ***Beurteilung der Toxizität der Tenside und der verwendeten Methoden***

In der vorliegenden Arbeit wurden 12 Tenside, die im Europäischen Arzneibuch, im Deutschen Arzneibuch oder im Deutschen Arzneimittelcodex offizinell sind, auf ihre In-vitro-Toxizität untersucht. Dabei wurden für alle Tenside die gleichen Testsysteme verwendet. Zwischen den In-vitro-Toxizitäten der einzelnen Vertreter der untersuchten Tenside bestehen deutliche Unterschiede. Da Natriumdodecylsulfat, Benzalkoniumchlorid, Polysorbat 80 und Triton<sup>®</sup> X-100 schon hinlänglich untersucht wurden, sind Vergleiche der Tenside untereinander gut möglich.

Nach den aus Konzentrations-Wirkungs-Kurven ermittelten Parametern MTK und  $CC_{50}$  wurden die Tenside in stark reizende, schwach reizende und nicht reizende Tenside eingeteilt [122]. Stark reizende Tenside sind dabei mit relativen Toxizitätswerten von 75 bis 900: Benzalkoniumchlorid, Cremophor<sup>®</sup> A25, Brij<sup>®</sup>78, Natriumcetylstearylsulfat, Natriumdodecylsulfat, Natriumdodecylethersulfat und Cocamidopropylbetain. Ein schwach reizendes Tensid war mit relativen Toxizitätswerten von 65 bis 10 Triton<sup>®</sup> X-100. Polysorbat 80, Sojalecithin, Poloxamer<sup>®</sup> 188 und Cremophor<sup>®</sup> EL wurden mit relativen Toxizitätswerten von 30 bis 0,003 als nicht reizend eingeschätzt.

Da mit den in der vorliegenden Arbeit verwendeten Methoden wichtige Vitalitätsmerkmale der Zelle bestimmt werden, die essentiell für das Entstehen lokaler Irritationen sind, und die verwendeten Methoden in vielen Studien mit In-vivo-Daten korrelieren, sind sie zur Beurteilung des Irritationspotenzials von Tensiden geeignet. Die Ergebnisse der verschiedenen in der vorliegenden Arbeit verwendeten Methoden stimmten sehr gut überein. Aus ihnen kann sowohl auf das Irritationspotenzial der Tenside als auch auf deren toxische Mechanismen geschlossen werden. Auf der Basis der gefundenen Ergebnisse können weitere spezifische In-vitro-Versuche bzw. In-vivo-Studien durchgeführt werden.