



universität
wien

MASTERARBEIT / MASTER'S THESIS

Titel der Masterarbeit / Title of the Master's Thesis

Phototoxizität von oral und dermal verwendeten Wirkstoffen: Untersuchungsmethoden, Status quo und Perspektiven für einheitliche Studienprotokolle

verfasst von / submitted by

Antonia Reith, BSc

angestrebter akademischer Grad / in partial fulfilment of the requirements for the
degree of

Magistra pharmaciae (Mag.pharm.)

Wien, 2022

Studienkennzahl lt. Studienblatt /
degree programme code as it appears on
the student record sheet:

UA 066 605

Studienrichtung lt. Studienblatt /
degree programme as it appears on
the student record sheet:

Masterstudium Pharmazie

Betreut von / Supervisor:

ao. Univ.-Prof. Mag. Dr. Michael Wirth

Mitbetreut von / Co-Supervisor:

Mag. Dr. Victoria Klang

Für meinen Großvater

Danksagung

In erster Linie möchte ich den Personen danken, die mich in der Durchführung dieser literarischen Arbeit unterstützt haben. Ich bedanke mich sehr herzlich bei Dr. Victoria Klang, die mir stets hilfsbereit zur Seite gestanden ist und bei Fragen durch ihre Erfahrung neue Blickwinkel geöffnet hat. Ich bedanke mich weiter bei Professor Dr. Michael Wirth für die Übernahme der Betreuung meiner Diplomarbeit.

Auch gebührt mein Dank meinen Eltern, die mir mein Studium erst ermöglicht haben und mir währenddessen immer mit Rat und Tat zur Seite gestanden sind.

Zudem gilt mein besonderer Dank Alexander, der mich bei den technischen Herausforderungen sowie dem Korrekturlesen meiner Diplomarbeit mit großer Geduld unterstützt hat.

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|--------------------|--|
| +UV | In Anwesenheit von ultravioletter Strahlung |
| 3Rs | Refinement, Reduction, Replacement |
| 3T3 NRU PT | 3T3 Neutral Red Uptake Phototoxicity test |
| ADME-Tox-Parameter | Absorptions-, Verteilungs-, Metabolismus-, Exkretions- und Toxikologie-Parameter |
| AMG | Arzneimittelgesetz |
| AP-Zelle | Antigen-präsentierende Zelle |
| CD4+T-Zelle | Cluster of Differentiation 4 Thymus-Zelle |
| COLIPA | The European Cosmetic Toiletry and Perfumery Association |
| DAPT | Deutschsprachige Arbeitsgemeinschaft Photopatchtest |
| DI | Differenzierungsindex |
| EC | European Commission, Europäische Kommission |
| ECVAM | European Center for the Validation of Alternative methods |
| EMA | European Medicines Agency |
| FDA | Food and Drug Administration |
| H3D-Skin Model | Humanes dreidimensionales Hautmodell |
| HaCaT | Humane Keratinozytenzelllinie |
| HaCaT-NRU PT | Humane Keratinozytenzelllinie-Neutral Red Uptake Phototoxicity Test |
| HET | Hühnereitest |
| HOMO | Highest occupied molecular orbital |
| HR | Hämorrhagie |
| IC50 | Half maximum inhibitory concentration |
| ICH-Guidelines | International Council for Harmonisation of the Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use-Guidelines |
| IMDS | Integrated Model For The Differentiation Of Chemicals-Induced Allergic And Irritant Skin Reactions |
| LLNA | Local Lymph Node Assay |

| | |
|-------------------|---|
| LOAEL | Lowest observed adverse effect |
| LSF | Lichtschutzfaktor |
| LUMO | Lowest unoccupied molecular orbital |
| MD | Membrane Dicoloration |
| MED | Minimale Erythemdosis |
| MEDUVA | UVA-Strahlung, die die minimale Erythemdosis auslöst |
| MPE | Mean photo effect |
| MTD | Maximal tolerated dose |
| MTT-Test | 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid); Testung der Reduktion der Zellviabilität |
| NODCAR | Standard Guidelines of the National Organization for Drug Control & Research |
| OD | Optische Dichte |
| OD _{max} | Maximale Optische Dichte |
| OECD | Organisation for Economic Cooperation and Development |
| OSIRIS | Optimized strategies for risk assessment of industrial chemicals through integration of non-test and test information |
| PAHs | Polycyclic aromatic hydrocarbons; polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe |
| PDT | Photodynamische Therapie |
| PHET | Photo Hen`s Egg Test |
| PHF | Photohämolysfaktor |
| PIF | Photoirritationsfaktor |
| PIH | klinische Photosensitivierungsmodelle |
| PIV | Phototoxizität- <i>in vitro</i> -Modelle |
| PPT | Photopatchtest |
| PUVA-Therapie | Psoralen und UVA-Strahlungstherapie |
| QSAR | Quantitative structure activity relationships |
| RBC | Red Blood Cell |
| RBC PT | Red Blood Cell Phototoxicity Test |

| | |
|--------------|--|
| REACH | Registration, evaluation, authorisation and restriction of chemicals |
| SAR | Structure Activity Relationships |
| SED | Standard-Erythemdosis |
| TG | Testguideline |
| -UV | In Abwesenheit von ultravioletter Strahlung |
| UV/VIS-Licht | Ultraviolettes/sichtbares Licht |
| UV-Licht | Ultraviolettes Licht |
| ZEBET | Zentralstelle zur Erfassung und Bewertung von Ersatz- und Ergänzungsmethoden zum Tierversuch |

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|--------|--|----|
| 1. | Kurzbeschreibung / Abstract | 11 |
| 2. | Einleitung und Zielsetzung | 13 |
| 3. | Die Haut | 14 |
| 3.1. | Funktion und Aufbau der Haut | 14 |
| 3.2. | Anatomie und Funktion der einzelnen Hautschichten | 14 |
| 3.2.1. | Epidermis | 14 |
| 3.2.2. | Dermis | 16 |
| 3.2.3. | Hypodermis | 17 |
| 3.3. | Die Permeation von Arzneistoffen durch die Haut | 17 |
| 4. | Licht und seine Effekte auf die Haut | 18 |
| 4.1. | Das Licht als elektromagnetische Welle | 18 |
| 4.2. | Allgemeine Effekte von Licht auf Haut | 18 |
| 4.2.1. | Akute UV-Schäden | 19 |
| 4.2.2. | Chronische UV-Schäden | 20 |
| 4.3. | Spezielle Effekte von Licht auf Haut: Photosensibilisierung, Phototoxizität und Photoallergie | 20 |
| 4.3.1. | Begriffsdefinitionen | 20 |
| 4.3.2. | Abgrenzung Phototoxizität und Photoallergie | 22 |
| 4.3.3. | Generelle Mechanismen der Phototoxizität | 23 |
| 4.3.4. | Einflussfaktoren | 25 |
| 4.3.5. | Klinisches Bild und Bewertung | 26 |
| 4.3.6. | Prophylaxe | 27 |
| 4.3.7. | Spezielle Anwendungen: PUVA-Therapie | 28 |
| 5. | Methoden zur Untersuchung von Phototoxizität | 30 |
| 5.1. | Lichtquellen für die Untersuchung von Phototoxizität | 30 |
| 5.2. | Präklinische <i>in vivo</i> -Studien | 32 |
| 5.2.1. | Allgemeines | 32 |
| 5.2.2. | Photo Hen's Egg Test | 32 |
| 5.2.3. | Acute Phototoxicity Assay in Guinea Pigs | 34 |
| 5.2.4. | Integrated Model For The Differentiation Of Chemical - Induced Allergic and Irritant Skin Reactions (IMDS) | 35 |

| | | |
|--------|--|----|
| 5.3. | <i>In vitro</i> -Studien | 37 |
| 5.3.1. | Allgemeines | 37 |
| 5.3.2. | 3T3 Neutral Red Uptake Phototoxicity Test..... | 37 |
| 5.3.3. | Red blood cell Phototoxicity test (RBC PT)..... | 42 |
| 5.3.4. | Human 3D Skin Model (Humane 3D-Hautmodelle)..... | 44 |
| 5.4. | <i>Ex vivo</i> -Studien an Human- und Schweinehaut..... | 47 |
| 5.4.1. | Allgemeines | 47 |
| 5.4.2. | Durchführung | 48 |
| 5.4.3. | Beurteilung des Testsystems..... | 48 |
| 5.5. | Klinische Studien..... | 48 |
| 5.5.1. | Allgemeines | 48 |
| 5.5.2. | Photopatch-Test | 50 |
| 5.5.3. | UV-Erythemtest..... | 52 |
| 5.5.4. | Mexameter | 55 |
| 5.6. | <i>In silico</i> -Studien | 57 |
| 5.6.1. | Allgemeines | 57 |
| 5.6.2. | Übersicht über <i>in silico</i> -Modelle | 58 |
| 5.6.3. | Allgemeine Beurteilung der <i>in silico</i> -Testsysteme | 60 |
| 6. | Diskussion zu den Testmethoden | 62 |
| 6.1. | Allgemeines | 62 |
| 6.2. | Methodenvergleich | 62 |
| 6.2.1. | Präklinische <i>in vivo</i> -Methoden..... | 62 |
| 6.2.2. | <i>In vitro</i> -Methoden | 67 |
| 6.2.3. | <i>Ex vivo</i> -Studien an Schweinehaut | 71 |
| 6.2.4. | Klinische Studien | 71 |
| 7. | Conclusio..... | 73 |
| 8. | Quellenverzeichnis..... | 75 |

1. Kurzbeschreibung / Abstract

Die Effekte von Sonnenlicht auf den Menschen sind seit Jahrzehnten Gegenstand wissenschaftlicher Untersuchungen. In Kombination mit Arzneimitteln kann Sonnenlicht bei oraler, aber auch dermaler Anwendung zu phototoxischen Effekten führen. Die klinische Ausprägung von Phototoxizität reicht von Erythemen bis Hautkrebs. Phototoxische Effekte werden durch verschiedenste präklinische und klinische Methoden untersucht, problematisch ist dabei häufig die schlechte Vergleichbarkeit der Daten aufgrund uneinheitlicher Messparameter. Die systematische Beurteilung des Phototoxizitätspotenzials von Xenobiotika wird dadurch erschwert. Das Ziel dieser Literaturarbeit war daher eine umfassende Analyse der vorhandenen wissenschaftlichen Literatur zur Untersuchung von Phototoxizität bei oral und dermal verabreichten Arzneistoffen. Durch eine systematische Evaluierung der verschiedenen Methoden sollte eine standardisierte Vorgehensweise für zukünftige Studien abgeleitet werden. Alle relevanten präklinischen und klinischen Methoden wurden analysiert. Der theoretische Hintergrund, die experimentelle Vorgehensweise sowie die Vorteile und Nachteile jeder Methode wurden diskutiert. Es zeigte sich, dass der 3T3 NRU-Test mit standardisierten Bedingungen nach wie vor Goldstandard bei ersten Untersuchungen und Screening-Verfahren sein sollte. Für die Nutzung des Schweineohrenmodells bestehen kaum einheitliche Versuchsparameter – hier wird ein zukünftiges Ziel sein, eine einheitliche Methodik zu etablieren und den Nutzen dieses Modells für Phototoxizitätsstudien *ex vivo* zu ermitteln. Den Abschluss zukünftiger Studien sollten klinische Untersuchungen an gesunden Probanden mittels Photopatchtest und Erythemtest bilden.

The effects of sunlight on the human organism have been the focus of scientific investigation for many decades. In combination with the application of pharmaceutical products sunlight can induce phototoxic effects, in particular after oral or dermal application. Clinical symptoms range from erythema to skin cancer. Phototoxic effects have been investigated using various preclinical and clinical methods. However, comparability of data is often limited due to inconsistent experimental parameters. Thus, it was the aim of this work to address this issue by conducting a comprehensive literature analysis. By reviewing past and current literature dealing with the analysis of phototoxic effects, a systematic evaluation of the different deployed methods was performed and a standardized procedure for future studies is being proposed. All relevant preclinical and clinical methods were taken into consideration and their respective theoretical background, experimental set-ups and specific advantages or shortcomings were discussed. It could be shown that the 3T3 NRU-test performed under standardized conditions is still the gold standard for preliminary investigations and screening. For examinations using pig ear skin, consistent methodical parameters do not exist. Here, a future goal will be to establish a standardized procedure for general evaluation of this *ex vivo* model in context with phototoxicity studies. As last step for future studies, clinical examination of healthy volunteers via photopatch-test or erythema-test should be implemented.

2. Einleitung und Zielsetzung

Sonnenlicht hat eine Reihe von Effekten auf die menschliche Haut. Abgesehen von akuten und chronischen Schäden durch übermäßige Einwirkung von Sonnenlicht gibt es auch eine Reihe von unerwünschten Effekten, die in Kombination mit verabreichten Arzneistoffen auftreten können. Es handelt sich hierbei um die sogenannte Phototoxizität, die auch bei mäßiger Sonnenbestrahlung auftreten kann. Die beobachteten Effekte reichen von leichten Rötungen bis zum Hautkrebs. Phototoxische Effekte von Arzneistoffen sind in der klinischen Praxis äußerst relevant - Patienten und Patientinnen müssen auf Probleme, die mit ihren Arzneimitteln assoziiert werden, hingewiesen werden. Bereits vor der Zulassung von Arzneistoffen müssen Studien durchgeführt werden, um das phototoxische Potential von Wirkstoffen zu ermitteln. Auch nach der Marktzulassung ist es notwendig, in der Anwendung beobachtete Effekte von Arzneimitteln auf die Haut zu untersuchen. Hierbei kommt eine große Anzahl an verschiedenen präklinischen und klinischen Methoden zum Einsatz. Obgleich international akzeptierte Normen existieren, finden sich in der wissenschaftlichen Literatur unterschiedlichste Daten, und der Vergleich der beobachteten phototoxischen oder photoallergischen Effekte für verschiedene Arzneistoffe ist daher ein beschwerliches Vorhaben.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war eine systematische Analyse der vorhandenen wissenschaftlichen Literatur zum Thema Phototoxizität von oral oder dermal verwendeten Arzneistoffen im Hinblick auf die verwendeten präklinischen und klinischen Untersuchungsmethoden. Die wissenschaftlichen Methoden als Schwerpunkt dieser Literaturarbeit sollten systematisch geordnet präsentiert werden. Neben einer kurzen Beschreibung von theoretischem Hintergrund und praktischer Vorgehensweise war es das Ziel dieser Arbeit, die Methoden in Hinblick auf Aktualität, wissenschaftliche Relevanz, Spezifität und Sensibilität kritisch zu hinterfragen und zu bewerten. Durch den direkten Vergleich der zur Verfügung stehenden Methoden sollte in einer abschließenden Diskussion ermittelt werden, welche Forschungsmethoden für aktuelle Projekte zur Untersuchung von Phototoxizität pharmazeutischer Wirkstoffe, Hilfsstoffe oder kompletter Formulierungen herangezogen werden sollten. Diese Erkenntnisse sollen als Basis für weiterführende Projekte dienen, die an der Forschungseinrichtung durchgeführt werden.

3. Die Haut

3.1. Funktion und Aufbau der Haut

Die Haut ist das größte und schwerste Organ des Menschen, sie umfasst ungefähr 10% des Körpergewichts und ist fast 2 m² groß^{1,2}. Die Haut als Sinnesorgan erfüllt ihre Funktion über Sinnesrezeptoren für Reize wie Berührung, Schmerz und Temperatur. Weitere Aufgaben des Hautorgans sind verschiedene Schutzfunktionen. Neben der Barrierefunktion im eigentlichen Sinn, also dem überwiegenden Verhindern des Stoffaustausches zwischen dem Organismus und der Außenwelt, bietet die Haut mechanischen Schutz, UV-Lichtschutz durch Melaninpigmentierung und Schutz gegenüber Hitze und Kälte. Sie bietet Schutz gegenüber Mikroorganismen und immunologischen Schutz¹. Außerdem ist die Haut für die Steuerung des Wasserhaushaltes zuständig³.

Die Haut gliedert sich von außen nach innen in drei Schichten: Die Epidermis (Oberhaut), die Dermis (Lederhaut) und die Hypodermis oder Subkutis (Unterhaut). Dabei können Epidermis und Dermis zur Cutis zusammengefasst werden^{2,4}.

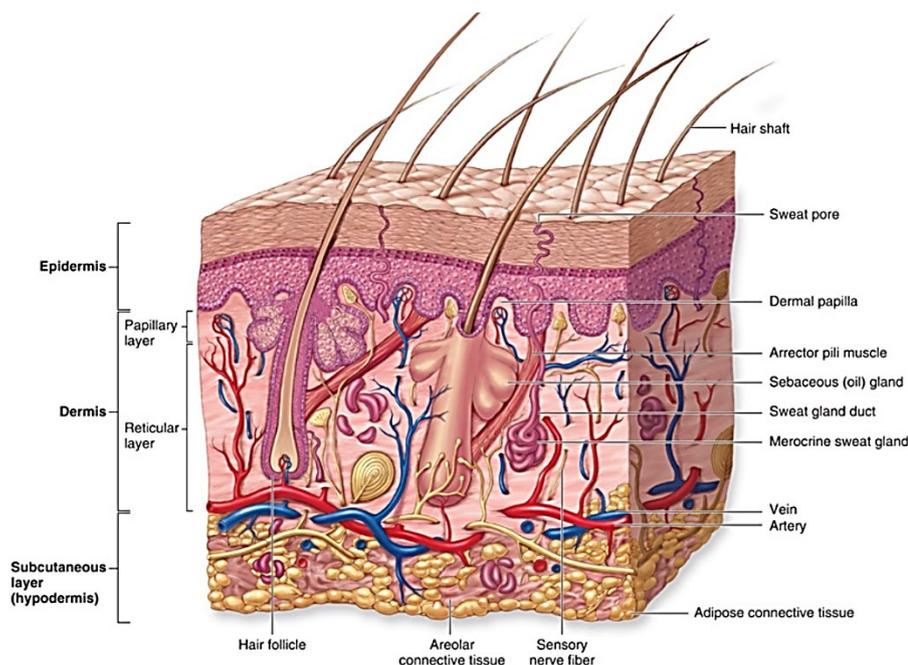


Abbildung 1: schematischer Aufbau der Haut nach de Freitas Maciel⁵.

3.2. Anatomie und Funktion der einzelnen Hautschichten

3.2.1. Epidermis

Die Epidermis besteht aus vier horizontalen Ebenen und bildet die äußerste Barriere der Haut. Ganz außen befindet sich das Stratum corneum, die Hornschicht. Darunter liegen, von außen nach innen betrachtet, das Stratum granulosum, das Stratum spinosum (Stachelzellschicht) und das Stratum basale (Matrixschicht)¹. Zwischen der Hornschicht und

dem Stratum granulosum liegt bei besonders dick ausgeprägter Epidermis, wie an der Handfläche oder der Fußsohle, eine zusätzliche Schicht, das Stratum lucidum⁶.

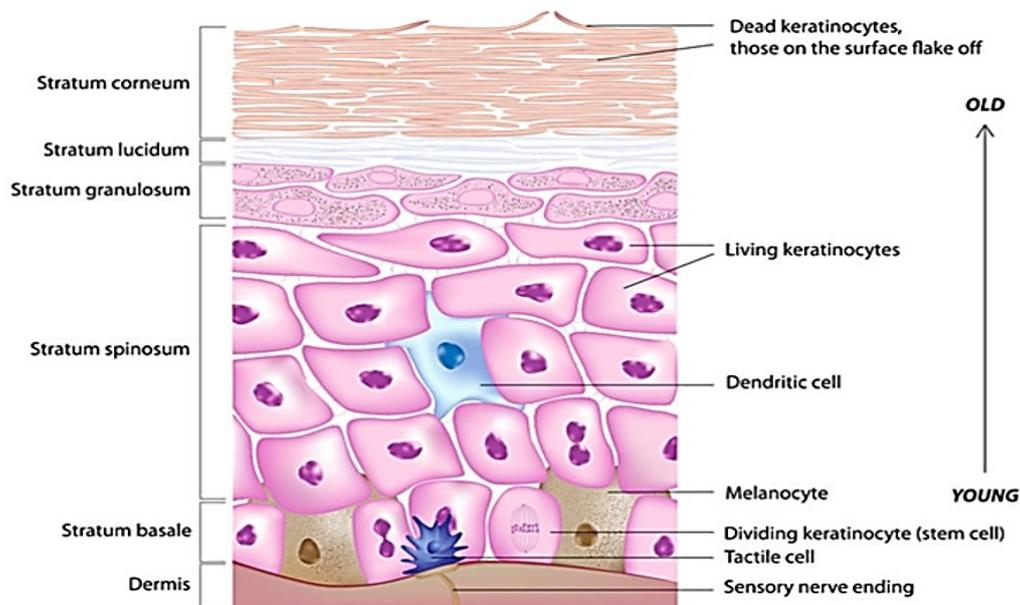


Abbildung 2: schematischer Aufbau der Epidermis. Die Richtung des Differenzierungsverlaufs der Keratinozyten wird verdeutlicht nach de Freitas Maciel⁵.

Von innen nach außen gesehen herrscht vorerst ein ungeordneter Aufbau aus Keratinozyten. Diese entstehen in den Stammzellen der Basalschicht (Stratum basale) und wandern nach oben, dabei erfolgt die Differenzierung. Im Stratum spinosum erhöht sich schließlich das Zellvolumen. Im Stratum granulosum erfolgt die Abplattung der Zellen sowie das Verschwinden von Zellkernen und Zellorganellen. Es kommt zur Verhornung. Die Hornzellen sind die größten Zellen des Körpers, sie weisen einen Durchmesser von ungefähr 30 µm auf. Die Schichten der Epidermis bestehen zu 90% aus Keratinozyten und enthalten auch Langerhans-Zellen und Melanozyten¹. Die Melanozyten produzieren Melanin, einen braunen Farbstoff, der Strahlung absorbieren kann. Die Bildung von Melanin wird durch UV-Strahlung, aber auch durch Röntgen- und Gammastrahlung und Licht anderer Wellenlängen angekurbelt^{1,4}. Die Pigmentierung der Haut erfolgt durch die Überführung von Melanosomen in die angrenzenden Keratinozyten¹.

Da die Hornschicht, das Stratum corneum, die äußerste Barriere darstellt, sollte näher auf diese Schicht der Epidermis eingegangen werden. Sie ist typischerweise 10 bis 20 µm dick². Das Stratum corneum ist aus meist zwei Lagen aufgebaut, dem Stratum disjunctum, einer loseren, oberflächlichen Schicht und dem Stratum compactum, einer dichter gewobenen und tiefer gelegenen Schicht⁷.

Die Hornschicht besteht aus 10 bis 15 Keratinozytenschichten. Bei Keratinozyten handelt es sich um tote Zellen, die sich aus den terminal differenzierten Keratinozyten ableiten, die ihren Ursprung in tieferen Epidermisschichten haben. Statt einer Plasmamembran enthalten Keratinozyten ein „*cornified envelope*“, das von einem Lipidmantel umhüllt ist².

Der Aufbau des Stratum corneums gleicht einer Art „Ziegelmauer“ aus gleichmäßig angeordneten „Backsteinen“, die durch das „*cornified envelope*“ versteift sind und mit hochmolekularem Keratin in einer elektronendichten Matrix befüllt werden. Diese „Backsteine“ sind mit dem Lipid-„Zement“ undurchlässig zu einer Lamelle vereinigt¹.

Das Stratum corneum verfügt über wasserlösliche Substanzen. Diese können Wasser binden, wodurch die Hornschicht weicher wird. Der Fettfilm an der Oberfläche der Haut schützt vor dem Verlust der wasserlöslichen Substanzen, zudem macht er die Epidermis dadurch durchlässiger. Wenn Hornlagen entfernt werden, steigt die Durchlässigkeit der Haut gegenüber Wasser und Ionen. Auch ein kleiner Einschnitt in das Stratum corneum reicht, um die Permeabilität für manche Substanzen zu erhöhen. Bei einer Neubildung des Stratum corneums kommt es zur Wiederherstellung der ursprünglichen Durchdringbarkeit⁷.

Da die Diffusion durch das Stratum corneum hauptsächlich als Weg bei der Hautpermeation genutzt wird, wurden die strukturellen Funktionen dieser Schicht umfangreich erforscht. Bei Untersuchungen legte man besonderes Augenmerk auf die Lipide des Stratum corneums, da die mit Lipiden angereicherte extrazelluläre Matrix die einzige durchgehende Domäne im Stratum Corneum ist und daher wahrscheinlich für ihre Barrierefunktion von entscheidender Bedeutung ist⁸. Dies wird durch empirische Daten gestützt, die zeigen, dass die Haut vorwiegend durch die extrazelluläre Matrix durchdrungen wird.⁹ Es konnte gezeigt werden, dass die Barrierefunktion der Haut nach der Extraktion der Stratum Corneum-Lipide deutlich verringert wird¹⁰ und dass Chemikalien, die die Organisation der Stratum Corneum-Lipide stören, die Hautpermeation erhöhen².

3.2.2. Dermis

Die Hauptaufgabe der Dermis ist es, die Epidermis zu versorgen³. Bei der Dermis handelt es sich um ein fibroelastisches Gewebe, das sich durch hohe Dehnbarkeit auszeichnet⁴. Die gelartige Grundsubstanz der Dermis setzt sich aus Proteoglykanen und eingelagerten, kollagenen Fasern zusammen⁶. Zudem stellt die Dermis den Träger der Gefäße und Nerven dar, die die Haut versorgen. Die Dermis setzt sich aus locker ineinander verwobenen Bündeln aus Kollagenfasern, die sich tendenziell parallel ausrichten, und elastischen Fasern zusammen. Die Dermis besteht aus zwei Schichten, zum einen aus dem Stratum papillare, der oberen Dermis und zum anderen aus dem Stratum reticulare, der unteren Dermis. Die Kollagenfasern beim Stratum papillare zeichnen sich durch eine losere Webung aus, als es beim Stratum reticulare der Fall ist. Bei letzterem können die Kollagenfasern auch gebündelt vorliegen¹. Das Bindegewebe der Dermis ist reich an Plasmazellen und Mastzellen. Die große Zahl an vorhandenen Plasmazellen weist darauf hin, dass das Gewebe eine Sensibilisierung entwickeln kann. Die vermehrte Anwesenheit von Mastzellen macht die Entstehung von allergischen Reaktionen vom Soforttyp möglich. An der Haut zeigt sich dies häufig durch die Ausbildung von Quaddeln. Zudem können durch Mastzellen biologisch aktive Substanzen, wie Histamin, gespeichert werden. Weiters liegt im Bindegewebe der Haut eine große Zahl an Nerven vor, die entweder zu den Nervenendkörperchen führen oder frei enden. Dadurch kommt es zur Schmerzempfindung.

Die Haut kann durch ihr Nervensystem Regungen wie Berührung, Druck, Hitze, Schmerz oder Juckreiz weiterleiten³.

3.2.3. Hypodermis

Die Hypodermis, auch Subcutis oder Unterhautfettgewebe genannt, besteht aus läppchenartig aufgebautem Fettgewebe. Dieses ist je nach Region unterschiedlich stark ausgeprägt. Die bindegewebigen Septen des Fettgewebes kommunizieren mit der Dermis und sind für die Nerven- und Gefäßversorgung verantwortlich. Außerdem stellen sie das feste Grundgerüst der Fettläppchen dar. Eine Aufgabe der Hypodermis ist die Wärmeisolation. Außerdem dient die Hypodermis als Schutzpolster vor mechanischen Einflüssen und als Energiespeicher¹.

3.3. Die Permeation von Arzneistoffen durch die Haut

Die Haut stellt eine selektiv permeable Barriere dar. Die Permeation eines Wirkstoffs durch die Haut kann durch den Flux, oft abgekürzt durch J , beschrieben werden. Gemeint ist damit die Menge eines Wirkstoffs, die pro Fläche und pro Zeiteinheit durch die Haut dringt. Der Flux wird einerseits durch die Permeabilität der Haut gegenüber dem eindringenden Stoff und andererseits durch den Konzentrationsgradienten des eindringenden Stoffes durch die Haut bestimmt. Generell gilt, dass Moleküle, die die Haut sehr schnell durchdringen, eine molekulare Masse von weniger als 500 Dalton aufweisen, in Maßen hydrophil sind und einen Oktanol-Wasser-Verteilungskoeffizienten von 1 bis 3 haben. Weitere Faktoren, die eventuell Einfluss auf die Hautpermeation haben, sind die Wasserstoffbrückenbindungsaktivität, das molekulare Volumen, der Schmelzpunkt und die Löslichkeit². Moleküle können die Haut entweder über den transepidermalen Weg oder den Pfad über Haarfollikel oder Schweißkanäle durchdringen².

Im Zuge des transepidermalen Weges wandert das Molekül durch die Epidermis, die Dermis und die Hypodermis. Der transzelluläre Weg führt den eindringenden Stoff durch die alternierenden Schichten der Zellen und durch die extrazelluläre Matrix. Das inkludiert auch die Aufteilung und Diffusion in die hydrophilen und lipophilen Domänen. Der interzelluläre Weg leitet den eindringenden Stoff durch die extrazelluläre Matrix, ohne die Zellen zu durchqueren. Kleine hydrophile Moleküle bevorzugen die transzelluläre Route, lipophile Moleküle hingegen ziehen den interzellulären Weg vor².

Es ist heute allgemein anerkannt, dass der transepidermale Weg - und hierbei die interzelluläre Route entlang der Lipidmatrix - die vorherrschende Permeationsform durch die Haut bildet. Unter Abflussbedingungen bildet die Diffusion durch das Stratum Corneum den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt, der den gesamten Massefluss der eindringenden Substanz bestimmt.

4. Licht und seine Effekte auf die Haut

4.1. Das Licht als elektromagnetische Welle

Das Licht, das die Erdoberfläche in Form von elektromagnetischen Wellen erreicht, schließt die Region von ungefähr 290 nm über den ultravioletten Bereich (UV-Bereich) und das sichtbare Licht bis zum Infrarotbereich (IR-Bereich) ein. UVC-Strahlung, sprich kurzwelliges UV-Licht unter 290 nm, trifft aufgrund der filternden Ozonschicht der Stratosphäre nicht auf die Erdoberfläche. Dementsprechend spielt die UVC-Strahlung keine Rolle bei der Entstehung von Sonnenbrand^{1,3,5}. Biologische Wirksamkeit in der Haut zeigen vorrangig mittel- und langwelliges UV-Licht im Bereich von 290 bis 400 nm. Zwischen diesen Grenzen liegen zum einen die UVB-Strahlung im Wellenlängenbereich von 290 bis 320 nm, diese Region wird auch als „Sonnenbrandspektrum“ bezeichnet, und zum anderen die UVA-Strahlung, die von 320 bis 400 nm reicht. Die UVA-Region kann in die langwelligere UVA₁-Strahlung, die den Wellenlängenbereich von 340 bis 400 nm abdeckt, und in die kurzwelligere UVA₂-Strahlung, die zwischen 320 und 340 nm liegt, unterteilt werden.

UVA- und UVB-Strahlung weisen große Unterschiede bezüglich ihrer physikalischen Eigenschaften und biologischen Aktivität auf. Allgemein gilt: umso kurzwelliger die Lichtstrahlung, desto energiereicher ist sie - und desto stärker wird sie absorbiert¹. Jede Wirkung von elektromagnetischer Strahlung setzt die Absorption der Strahlungsenergie durch einen Chromophor voraus. Jeder Chromophor zeichnet sich durch ein eigenes Absorptionsspektrum aus. Dieses bezieht sich auf die Wellenlängen, die es absorbiert. Das Charakteristikum des Absorptionsspektrums ist also das Absorptionsmaximum¹.

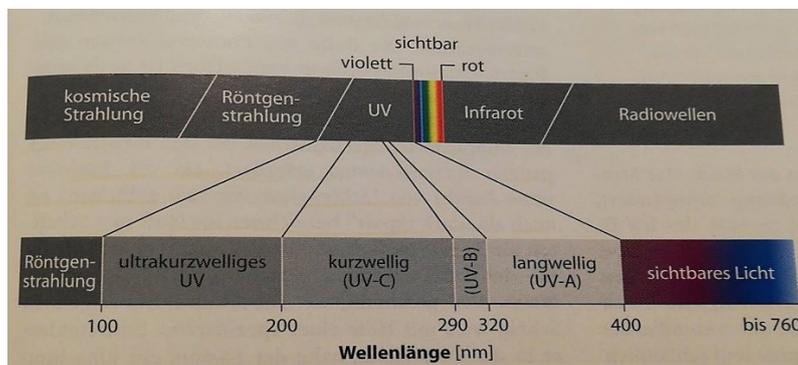


Abbildung 3: Elektromagnetisches Spektrum mit aufgefächelter UV-Skala nach Fritsch¹.

4.2. Allgemeine Effekte von Licht auf Haut

Licht kann positive Effekte auf unseren Organismus haben. Neben psychologischen sind auch physiologische Aspekte der Sonnenbestrahlung von Bedeutung, wie die Bildung von Vitamin D in der Haut. Jedoch ist Licht auch eine nicht zu unterschätzende Umweltnoxe. Insbesondere UV-Licht hat eine schädigende Wirkung auf die Haut als unsere Barriere zur Umwelt.

Die Wirkung von UV-Licht auf die Haut ist vielfältig und komplex. Trifft künstlich generiertes UVC-Licht auf die Haut, so erreicht sie nur die Epidermis als äußerste Schicht. UVB-Strahlung hingegen kann durch die Epidermis hindurch bis zum Stratum papillare, dem oberen Bereich der Dermis, vordringen. UVA-Strahlung durchdringt die Haut sogar bis zum Stratum reticulare, also der unteren Dermis. Das sichtbare Licht mit Wellenlängen von 400 bis 760 nm gelangt bis zur Unterhaut, der Subcutis¹¹. Die Zusammensetzung des sichtbaren Lichts ist je nach Tageszeit, Wetter, Jahreszeit, Höhe und geographischer Breite sehr verschieden¹².

Entsteht durch die Lichteinstrahlung ein Schaden, so kann die Haut diesen durch Adaptions- und Reparaturmechanismen reduzieren. Dazu gehört beispielsweise die Induktion der Melaninpigmentierung. Im Folgenden sind die verschiedenen akuten und chronischen Schädigungen der Haut, die durch Sonnenlicht entstehen können, zusammengefasst.

4.2.1. Akute UV-Schäden

Akute UV-Schäden entstehen sofort während beziehungsweise unmittelbar nach übermäßiger Sonnenexposition. Es kommt zu einem Erythem, gefolgt von Pigmentierung und Hyperplasie der Epidermis. Man spricht von einer „Sonnenschwiele“¹. Beim Erythem infolge von Sonnenbrand (*Erythema solare*, *Dermatitis solaris*) handelt es sich um eine akute Entzündungsreaktion nach UV-Belastung. Es kann durch Sonnenlicht oder durch künstliche Lichtquellen ausgelöst werden.

Hauptauslöser für den akuten Sonnenbrand unter natürlichen Bedingungen ist UVB-Strahlung, beziehungsweise unter Laborbedingungen auch künstlich generierte UVC-Strahlung. Von UVA-Strahlung ist eine bis zu 1000 Mal höhere Dosis notwendig, um eine entsprechende Hautreaktion hervorzurufen. Allerdings ist die UVA-Strahlung aufgrund ihres hohen Anteils im Sonnenlicht auch zu 15% für die Auslösung von UV-Erythemen verantwortlich¹.

Das UV-Erythem entsteht wenige Stunden nach der Strahlenexposition. Sein Maximum ist nach 12 bis 24 Stunden erreicht, nach 48 bis 72 Stunden klingt es wieder ab. Die Zellschädigung wird durch das Auftreten von apoptotischen Keratinozyten, den sogenannten *sunburn cells*, sichtbar¹. Dabei handelt es sich um vorzeitig verhornte Keratinozyten mit verdickten, zusammengeschrumpften Kernen. Das Zytoplasma erscheint dabei erblasst und leer¹³. Bei hoher Intensität kommt es zu vakuolisierender Zelldegeneration¹.

Beim akuten UV-Erythem kommt es zu einem hellroten Hautbild, das auf den Ort der Lichteinstrahlung scharf begrenzt und schmerzhaft ist. Typisch für das klinische Bild sind auch Hitze, Juckreiz und Schwellung¹³. Bei erhöhter UV-Strahlung droht Blasenbildung. Diese Symptomatik entspricht einer Verbrennung zweiten Grades. Eventuell kommt es auch zur Nekrose. Bei schweren Sonnenbränden empfinden Betroffene ein allgemeines Krankheitsgefühl, dieses kann sich durch Fieber äußern. Klingt der Sonnenbrand ab, so kommt es zur Pigmentierung und Hautablösung. Bei sehr schweren Sonnenbränden können Narben zurückbleiben^{1,6}.



Abbildung 4: Erythem mit beginnender Bläschenbildung nach Sonnenbestrahlung nach Steigleder¹⁴.

4.2.2. Chronische UV-Schäden

Zu den chronischen UV-Schäden gehören die Lichtalterung und die Karzinogenese. Sie beruhen auf der Akkumulation von molekularen Schäden und treten mit einer Latenzzeit von 20 bis 30 Jahren auf. UV-induzierte Karzinogenese ist die wichtigste Auswirkung einer chronischen UV-Belastung. Ihr folgen Präkanzerosen und Plattenepithelkarzinome¹.

In Hinblick auf mögliche Therapien gibt es neben chirurgischen Methoden auch nicht-invasive Verfahren, wie die Photodynamische Therapie (PDT). Hier werden durch die Behandlung mit einem Photosensibilisator die Krebszellen lichtsensibilisiert, da sie die photosensibilisierten Substanzen schneller aufnehmen als die gesunden Zellen. Bei der anschließenden Bestrahlung mit Rotlicht gehen die nun lichtempfindlichen Krebszellen zugrunde. Durch die Raman-Spektroskopie lassen sich tote von lebenden Keratinozyten *in vitro* unterscheiden¹⁵. Die Raman-Spektroskopie stellt ein erfolgreiches Werkzeug in der Krebsdiagnose dar, dies konnte durch *in vitro*-, aber auch durch *in vivo*-Versuche gezeigt werden¹⁶.

4.3. Spezielle Effekte von Licht auf Haut: Photosensibilisierung, Phototoxizität und Photoallergie

Bei diesen Phänomenen handelt es sich um Hautreaktionen, die nach Applikation eines Arzneistoffes über verschiedene Routen und nachfolgender Sonnenexposition auftreten. Sie unterscheiden sich unter anderem durch den Zeitpunkt des Auftretens und die immunologischen Grundlagen.

4.3.1. Begriffsdefinitionen

Der Begriff Phototoxizität wurde bereits 1985 von Marzulli und Maibach definiert¹⁷. Dabei handelt es sich um eine akute Reaktion, die nach einmaliger Anwendung eines dermal oder systemisch verabreichten photosensibilisierenden Stoffes und der darauffolgenden Bestrahlung durch UV- oder sichtbares Licht auftritt. *In vivo* kann die Reaktion bei jedem Individuum hervorgerufen werden, da es sich um eine nicht immunologische Reaktion handelt - vorausgesetzt die Konzentration des Arzneimittels und die Dosis des UV-Lichts oder sichtbaren Lichts liegen in einem geeigneten Bereich.

Es gibt zwei Typen von Phototoxizität, die sauerstoffabhängige (photodynamische) Reaktion und die sauerstoffunabhängige (nicht-photodynamische) Reaktion¹⁸⁻²⁰.

Weiters ist noch der Begriff der Photoirritation zu nennen. Dieser beschreibt Phototoxizität, die ausschließlich im Zeitraum zwischen 0 und 72 Stunden nach der Belastung durch sichtbares Licht oder UV-Licht auftritt. Gemeint sind also „akute“ Reaktionen¹⁸.

Von einer phototoxischen Reaktion abzugrenzen ist die Photoallergie, eine spezielle Form von allergischer Reaktion auf Licht. Dabei handelt es sich um eine erworbene immunologische Reaktion, die nicht sofort beim ersten Kontakt mit dem photosensibilisierenden Stoff und dem UV-/sichtbaren Licht auftritt. Es bedarf einer Induktionszeit von ein bis zwei Wochen, bevor die Haut bei wiederholter Gabe des Photosensibilisators und der Lichtexposition reagiert¹⁸. Es handelt sich um eine verzögerte, zellvermittelte Reaktion oder Überempfindlichkeitsreaktion vom Typ IV²¹.

Damit eine Photosensibilisierungsreaktion auftreten kann, muss die Lichtstrahlung in einem relevanten Bereich in die Haut eindringen und durch Biomoleküle absorbiert werden. Dadurch werden chemische Reaktionen ausgelöst. Typischerweise handelt es sich bei relevanter Lichtstrahlung um Wellenlängen, die die Haut tief durchdringen können, also Wellenlängen im Bereich über 310 nm.

Die lichtabsorbierenden Moleküle nennt man *Chromophore* oder Photosensibilisatoren²¹. Dabei handelt es sich um niedermolekulare, mehrzyklische Verbindungen mit einigen Doppelbindungen, die meist langwelliges Licht, also UVA-Strahlung oder sichtbares Licht, absorbieren und oft fluoreszieren¹. In den Hautzellen sind es vor allem Nukleinsäuren, Lipide und Proteine, die das UV-Licht absorbieren. Auch andere Moleküle wie Porphyrine, Vitamine und Arzneistoffe sind dazu fähig, UV- oder sichtbares Licht zu absorbieren.

Lichtempfindlichkeitsreaktionen resultieren im Allgemeinen aus der Wechselwirkung von Lichtstrahlung und Chromophoren, die entweder konstitutiv in der menschlichen Haut vorhanden sind (endogene Chromophore wie Melanin und Keratinozyten), oder die auf topischem beziehungsweise systemischem Weg appliziert werden (exogene Chromophore wie photosensibilisierende Arzneistoffe oder andere Chemikalien)^{11,21}.

Photosensibilisierung bedeutet, dass Lichtstrahlung, die normalerweise ungefährlich ist, durch den zuvor applizierten Photosensibilisator photochemische und photobiologische Reaktionen auslöst, die dann zu phototoxischen und photoallergischen Effekten führen²². Das klinische und histologische Bild dieser Effekte ist oft sehr ähnlich und kann zum Teil nur schwer voneinander unterschieden werden. Zudem lösen photosensibilisierende Stoffe häufig sowohl phototoxische als auch photoallergische Reaktionen aus²².

Beim Erythem, das infolge einer phototoxischen Reaktion auftritt, unterscheidet man zwischen Soforterythem, verstärktem Sonnenbrand und verzögertem Erythem.

Das Soforterythem ist eine Form des Erythems, die noch während der Bestrahlung entsteht. Sie ist gekennzeichnet durch Brennen und Stechen. Bei höheren Dosen des photosensibilisierenden Medikaments kann es auch zu Ödembildung kommen, wie es zum

Beispiel bei Teeren, Farbstoffen auf Anthrachinonbasis, Amiodaron, Hydrochlorothiazid, und Chlorpromazin der Fall ist^{20,23}.

Der verstärkte Sonnenbrand hingegen entwickelt sich 8 bis 24 Stunden nach der Strahlungsexposition. Typisch für das klinische Bild sind die scharfe Abgrenzung gegenüber den nicht bestrahlten Körperstellen und die eventuelle Blasenbildung sowie Schmerzen an den betroffenen Hautstellen. Diese Reaktionen treten nach Verabreichung von nicht steroidal Antiphlogistika wie Piroxicam, Naproxen und Ketoprofen, Fibraten (Fenofibrat), Zytostatika (Dacarbazin, 5-Fluorouracil), Amiodaron, Chinidin, Hydrochlorothiazid, Chlorpromazin und Promethazin, Tetracyclinen oder Flourochinolonen wie Enoxacin auf^{20,23}.

Beim verzögerten Erythem als dritte Form handelt es sich um eine Form des Erythems, bei der - bei höheren Dosen der photosensibilisierenden Substanz - nach zwei bis drei Tagen das Maximum erreicht ist. Typisch für das verzögerte Erythem sind brennende Schmerzen und Blasenbildung. Substanzen, die diese Erythemform auslösen, sind Psoralene und Fluorochinolone^{20,23}.

4.3.2. Abgrenzung Phototoxizität und Photoallergie

Phototoxische Effekte treten deutlich häufiger auf als photoallergische Reaktionen. Sie können bei jedem Individuum entstehen, wohingegen photoallergische Effekte nur bei einer Minderheit ausgelöst werden. Allerdings sind bei photoallergischen Reaktionen deutlich geringere Mengen an Photosensibilisatoren nötig als bei phototoxischen Effekten.

Das häufigste klinische Erscheinungsbild von phototoxischen Reaktionen ist der Sonnenbrand. Nach dem Abheilen des Sonnenbrands kommt es häufig zu einer Hyperpigmentation, da an der betroffenen Körperregion die Melaninsynthese angekurbelt wird. Eine weitere typische klinische Manifestation der Phototoxizität ist die verzögert oder sofort auftretende urtikarielle Reaktion, bei der es zu Juckreiz, Erythem- und Quaddelbildung kommt. Auch die verzögerte Reaktion mit Erythem- und Blasenbildung sowie die Pseudoporphyrie sind häufig vorkommende klinische Auswirkungen¹.

Im Gegensatz zu den akut auftretenden phototoxischen Reaktionen entstehen photoallergische Effekte erst nach der ersten Sensibilisierung. Das klinische Erscheinungsbild tritt verzögert, nach bis zu 72 Stunden, auf. Anders als bei phototoxischen Reaktionen sind Pigmentänderungen bei photoallergischen Reaktionen kaum vorhanden. Allerdings sind Kontaktdermatitis-ähnliche Symptome bei photoallergischen Reaktionen ein häufig vorkommendes Erscheinungsbild. Zudem sind bei photoallergischen Effekten nicht nur die lokalen, lichtbelasteten Körperstellen betroffen, sondern auch Regionen des Körpers, die nicht bestrahlt wurden. Weiters kommt es bei photoallergischen Effekten oft zu Erythemen, dermalen Infiltraten, Schuppungen und Papulovesikeln, gekoppelt mit starkem Juckreiz²².

Tabelle 1: Vergleich der Eigenschaften von Photoallergie und Phototoxizität nach Gould et al.¹¹.

| Eigenschaft | Photoallergie | Phototoxizität |
|---|---|----------------------------|
| relatives Vorkommen | niedrig | hoch |
| Dosisabhängigkeit | nein | ja |
| Beginn der Reaktion nach Exposition mit dem Licht und dem Photosensibilisator | 24 Stunden und mehr | Minuten bis Stunden |
| relative benötigte Menge des Arzneistoffes | niedrig | hoch |
| Distribution | exponierte Haut, teilweise nicht exponierte Haut | Exponierte Haut |
| Pigmentveränderungen | selten | häufig |
| Histopathologie | epidermale Spongiose, Hautentzündung | epidermale Nekrose |
| Kreuzreaktionen mit ähnlichen Stoffen | ja | nein |
| Entwicklung einer persistierenden Lichtempfindlichkeit | ja | nein |
| Kovalente Bindung an Proteine | ja | nein |

4.3.3. Generelle Mechanismen der Phototoxizität

Wie bereits erwähnt, müssen die Photonen des Lichts von einem Chromophor absorbiert werden, damit es zu einer phototoxischen Reaktion kommt. Das charakteristische Absorptionsspektrum eines Moleküls wird durch seine chemische Struktur festgelegt, insbesondere durch das Vorhandensein von Einzelbindungen, Doppelbindungen oder halogenierten aromatischen Ringen. Durch das absorbierte Photon werden die Elektronen im Inneren des Moleküls vom stabilen Grundzustand zum angeregten Zustand, dem sogenannten Singlet- oder Tripletzustand, übergeführt. Dabei handelt es sich um Zustände höherer Energie, die sich durch den Spinzustand der beiden energiereichsten Elektronen definieren lassen. Haben diese beiden Elektronen entgegengerichtete Spins, so ist der elektronische Zustand ein Singletzustand. Wenn die Spins der beiden Elektronen gleichgerichtet vorliegen, so handelt es sich um einen Tripletzustand²¹. Der Singletzustand ist kurzlebiger und energiereicher als der Tripletzustand²². Um vom angeregten Zustand wieder zum Grundzustand zu gelangen, muss Energie abgegeben werden. Dies geschieht durch Innere Umwandlung (*Internal Conversion*), Fluoreszenz, Phosphoreszenz oder durch chemische Reaktionen^{21,22}.

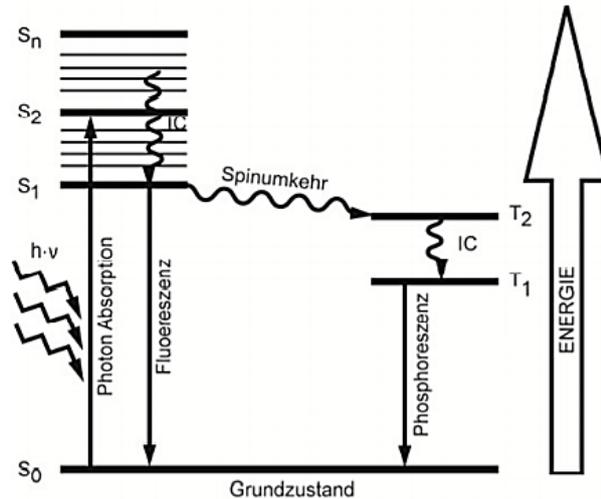


Abbildung 5: Jablonski Diagramm: Darstellung des Grundzustandes beziehungsweise des angeregten Zustandes nach Schulze²².

Im angeregten Tripletzustand gibt es diverse Möglichkeiten, wie Photosensibilisatoren reagieren können. In der Literatur werden häufig nur Typ I- und Typ II-Reaktionen voneinander unterschieden^{19,22}. Diese beiden Reaktionstypen zählen zu den photodynamischen (sauerstoffabhängigen) Mechanismen. Krutmann stellt den photodynamischen Mechanismen außerdem noch die nicht-photodynamischen (sauerstoffunabhängigen) Mechanismen gegenüber, wobei er die nicht-photodynamischen Reaktionen in Typ III und IV unterteilt²¹.

Da die Differenzierung nach Krutmann umfangreicher ist, werden im Folgenden die phototoxischen Reaktionsmechanismen nach diesem Modell erläutert:

Bei einer Typ I-Reaktion erzeugt ein Energietransfer vom angeregten Photosensibilisator zum Sauerstoff einen angeregten Singlet-Sauerstoff. Dieser kann an der Lipid- und/oder Proteinoxidation beteiligt sein oder DNA-Schäden induzieren.

Bei einer Typ II-Reaktion führt der Transfer von Elektronen oder Wasserstoff zur Bildung von freien Radikalen. Diese greifen Biomoleküle direkt an. Auf anderem Weg kann die Wechselwirkung dieser freien Radikale mit Sauerstoff im Grundzustand zur Erzeugung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) wie Superoxidanionen, Singletsauerstoff, Hydroxylradikale und Wasserstoffperoxide führen. Zwischenprodukte von reaktivem Sauerstoff, die durch diesen Prozess erzeugt werden, können subzelluläre Organellen schädigen, was wiederum zu Gewebeerkrankungen und Entzündungen führen kann.

Bei einer Typ III-Reaktion handelt es sich im Gegensatz dazu um eine nicht-photodynamische (sauerstoffunabhängige) Reaktion. Diese führt als direkte Reaktion unabhängig von Sauerstoff zur Erzeugung stabiler Photoprodukte. Ein Paradebeispiel für eine nicht-photodynamische Typ III-Reaktion ist eine durch Psoralen induzierte Lichtempfindlichkeitsreaktion.

Bei einer Typ IV-Reaktion durchläuft der Photosensibilisator eine Zersetzung. Das resultierende Photoprodukt kann entweder als Toxin oder als neuer Photosensibilisator wirken²¹.

4.3.4. Einflussfaktoren

Phototoxische Reaktionen können in Art und Ausprägung von Patient zu Patient variieren. Die phototoxische Reaktion ist abhängig von den individuellen Hauteigenschaften, der Art des Photosensibilisators und dessen Metabolismus im Körper sowie der Art der elektromagnetischen Strahlung.

Die Eigenschaften der Haut selbst können die Wirkungen eines Photosensibilisators und das klinische Bild beeinflussen. Maßgebliche Aspekte sind hierbei Hauttyp, Bräunungsgrad, Hautdicke, Behaarung, Temperatur und Hautfeuchtigkeit.

Die Wirkung einer photosensibilisierenden Substanz ist stark abhängig von der applizierten Konzentration der Substanz und ihren spezifischen chemisch - physikalischen Eigenschaften. Ein hydrophiler Photosensibilisator schädigt hauptsächlich die Zellmembran. Dagegen diffundieren lipophile Substanzen in die Zelle und zerstören Komponenten innerhalb der Zelle, einschließlich Lysosomen, Mitochondrien und Zellkern. Eine Schädigung der Zellen führt zu einer Freisetzung von löslichen Mediatoren, wodurch Entzündungen entstehen. Zu diesen Mediatoren gehören Eicosanoide, Histamin und das Komplementsystem. Diese Botenstoffe sind an der Erzeugung von Entzündungsreaktionen beteiligt, die durch Photosensibilisatoren induziert werden.

Der Metabolismus eines Photosensibilisators kann sowohl durch die Haut als auch durch andere Organe beeinflusst werden. Eine wichtige Rolle spielen perkutane und gastrointestinale Absorption, Bindung an zelluläre Strukturen sowie Retention beziehungsweise Metabolisierung in Leber, Darm und Niere. Entscheidend sind auch die Anflutungs- und Ausschwemmungsphase.

Die Wirkung der elektromagnetischen Strahlung, die auf die photosensibilisierte Haut auftrifft, ist abhängig vom Aktionsspektrum, also der Eindringtiefe. Mit höherer Wellenlänge nimmt auch die Eindringtiefe zu^{19,20}. Dementsprechend gelangt UVB-Licht, mit dem Wellenlängenbereich von 290 bis 320 nm, bis zum oberen Teil der Dermis. Die UVA-Strahlung hingegen gelangt aufgrund ihrer höheren Wellenlänge von 320 bis 400 nm bis zum unteren Bereich der Dermis. Weiters ist die Wirkung der elektromagnetischen Strahlung abhängig von der Zeitspanne zwischen der Verabreichung der photosensibilisierenden Substanz und der Strahlungseinwirkung^{19,20}.

Zudem spielen natürlich die Applikationsart und das verwendete Vehikel beziehungsweise die verwendeten Hilfsstoffen eine bedeutende Rolle. Ein Photosensibilisator, der topisch zugeführt wird, schädigt aufgrund des Konzentrationsgefälles in erster Linie die oberen Hautschichten. Aufgrund der hohen lokalen Konzentration in der Epidermis werden die dort lokalisierten Keratinozyten angegriffen beziehungsweise zerstört.

Die Zerstörung von tieferen Hautschichten wird weitgehend durch photosensibilisierende Substanzen verursacht, die über den Blutweg von innen in die unteren Hautschichten eindringen. Systemisch verabreichte Arzneimittel verursachen vor allem gegenüber Bestandteilen der tiefer liegenden Dermis, insbesondere Mastzellen und Endothelzellen, phototoxische Effekte.

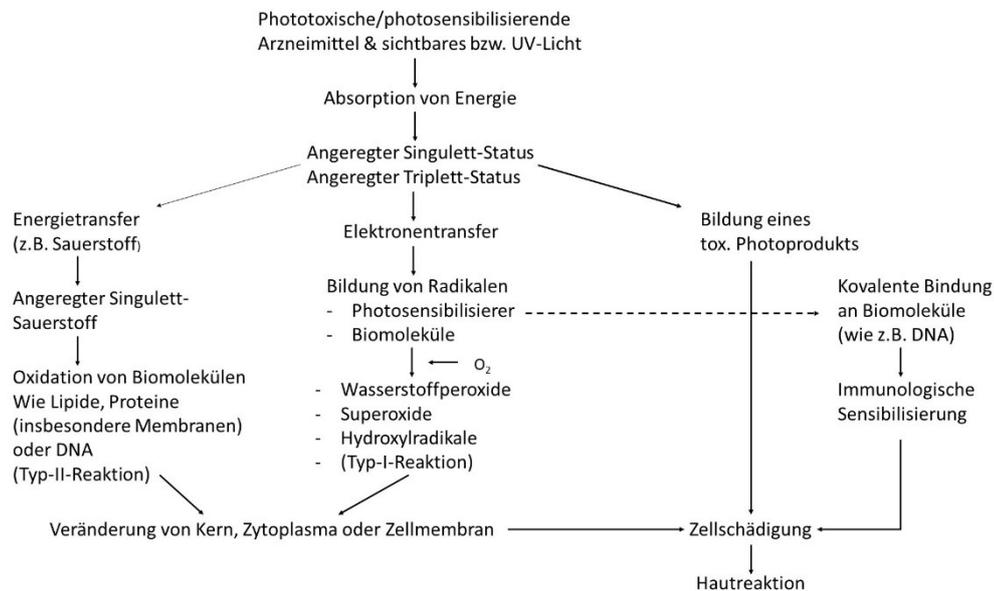


Abbildung 6: schematische Darstellung von phototoxischen Mechanismen^{18,19} (nach Spielmann et al. 2000, von Menzel 2014 bearbeitet).

4.3.5. Klinisches Bild und Bewertung

Das klinische Bild von phototoxischen und photoallergischen Reaktionen kann aufgrund der oben diskutierten vielschichtigen Einflussfaktoren stark variieren.

4.3.5.1. Phototoxische Reaktionen

Bei den phototoxischen Reaktionen ist zwischen lokalen und systemischen Reaktionen zu unterscheiden. Zu ersteren zählen die Photokontaktdermatitis und die Phytophotodermatitis als spezielle Unterform. Es handelt sich um Hautreaktionen infolge eines Hautkontakts mit einem Photosensibilisator. Im Gegensatz dazu handelt es sich bei einer systemischen Reaktion um eine Hautreaktion infolge von systemischer Einnahme eines Photosensibilisators, beispielsweise eines Arzneimittels.

Zu einer Photokontaktdermatitis kommt es durch direkten Hautkontakt mit der photosensibilisierenden Substanz und gleichzeitiger oder anschließender Bestrahlung. Das typische Erscheinungsbild ist eine blasige Erythemreaktion, der eine längerfristig anhaltende Pigmentierung folgt. Welche dieser beiden Auswirkungen stärker vertreten ist, hängt vom Photosensibilisator ab. Bei 8-Methoxypsoralen ist dies etwa die Entzündung, bei 5-Methoxypsoralen ist es die Pigmentierung¹.

Bei der Phytophotodermatitis handelt es sich um eine akut phototoxische Dermatitis, die durch direkten Hautkontakt mit bestimmten Pflanzen hervorgerufen wird. Die Substanzen, die diesen Effekt auslösen sind die in vielen Pflanzen und Früchten vorkommenden Furocumarine, wie zum Beispiel Psoralene. Man unterscheidet in Bezug auf das klinische Bild zwischen Handekzem (bei Kontakt mit Sellerie, Feigen oder Dill), Gesichtsekzem, ausgelöst durch die von Wind verwehten Pollen oder Pflanzenteile, und Gräserdermatitis (*Dermatitis pratensis*). Bei letzterem handelt es sich um eine streifige, teilweise vesikulös-bullöse Dermatitis, diese heilt im Zuge einer monatelang persistierenden Pigmentierung ab¹.

Bei den systemischen phototoxischen Reaktionen handelt es sich um sonnenbrandähnliche Reaktionen, die durch systemische Applikation von photosensibilisierenden Substanzen und anschließender (UV)-Bestrahlung ausgelöst werden. Die Reaktionen sind streng auf die bestrahlten Areale begrenzt. Das Aktionsspektrum liegt fast ausschließlich im UVA-Bereich, was auch bedeutet, dass diese Reaktionen nicht durch Fensterglas abschirmbar sind¹.

4.3.5.2. Photoallergische Reaktionen

Photoallergischen Reaktionen liegt eine Immunreaktion vom Spättyp zugrunde. Sie präsentieren sich als photoallergisches Kontaktekzem. Das Photoallergen gelangt entweder auf direktem Weg auf die Haut, oder über den systemischen Weg nach anderweitiger Einnahme. Auslöser von photoallergischen Substanzen sind Duftstoffe, Sulfonamide oder halogenierte Salizylanilide. Klinisch zeigt sich ein, abhängig von der momentanen Sonnenbelastung, subakutes oder chronisches Ekzem, das an lichtexponierten Stellen entsteht. Diese Kontaktekzeme sind mäßig scharf begrenzt, sie zeichnen sich durch Lichenifikation, einen protrahierten Verlauf und Streuphänomene aus¹.

4.3.6. Prophylaxe

Während der Einnahme eines phototoxisch wirksamen Medikaments ist Sonnenlicht zwischen 11 und 17 Uhr unbedingt zu meiden. Neben der Verwendung von Sonnencremen mit hohem UVA-Schutz bewährt sich auch textiler Sonnenschutz. Bei langfristiger Medikamenteneinnahme gibt es zudem die Möglichkeit Fenster, zum Beispiel im Haus oder im Auto, mit UV-abweisender Folie zu versehen. Falls es möglich ist, sollte vom behandelnden Arzt versucht werden, die Einnahmedosis des phototoxisch wirkenden Medikaments zu senken. Bei Arzneimittel mit kurzer Halbwertszeit empfiehlt sich eine abendliche Einnahme. Besuche von Solarien müssen in der Zeit der Einnahme unbedingt vermieden werden. Außerdem wäre die vermehrte Kennzeichnung von phototoxischen Gefahren in Form von Warnhinweisen auf Beipackzetteln beziehungsweise auf der Sekundärverpackung des Medikaments hilfreich.

Da dem Sonnenschutz eine besonders wichtige Rolle zukommt, wird hier kurz gesondert darauf eingegangen. Beim Sonnenschutz handelt es sich um eine präventive Maßnahme, durch die akute sowie chronische UV-Schäden vermieden werden sollen.

Systemischer Lichtschutz ist nicht möglich, daher werden lokal anwendbare Lichtschutzmittel verwendet. Ihre Wirkung ist stark von der Wirksubstanz, dem verwendeten Vehikel, der applizierten Menge sowie der Einwirkzeit abhängig.

Grundsätzlich unterscheidet man zwischen chemischen und physikalischen UV-Filtern. Bei chemischen UV-Filtern handelt es sich um Substanzen, die das eintretende UV-Licht absorbieren können und so die Haut davor schützen. Absorbierende Lichtfilter sind je nach ihrem Absorptionsspektrum für den UVB- oder den UVA-Bereich geeignet. Letzterer ist bei Lichtdermatosen, deren Mechanismen die phototoxischen und photoallergischen Reaktionen darstellen, besonders wichtig. Beispiele für UVA-Filter sind Dibenzoylmethane und Benzophenone. An UVB-Filtern wären beispielsweise Paraaminobenzoessäure und ihre Derivate sowie Zimtsäureester zu nennen.

Bei physikalischen UV-Filtern handelt es sich um Pigmente, die die eintretenden UV-Strahlen reflektieren und auf diese Weise die Haut schützen. An Pigmenten werden unter anderem Titanoxid oder Zinkoxid verwendet. Die Wirksamkeit eines Lichtschutzmittels kann durch den Lichtschutzfaktor (LSF) beschrieben werden¹. Dieser kann als eine Art zeitlicher Verlängerungsfaktor bezüglich der Exposition gegenüber der Sonnenbestrahlung gesehen werden⁶. Der LSF lässt sich wie folgt berechnen:

$$\text{LSF} = \frac{\text{MED unter Verwendung eines Lichtschutzes}}{\text{MED ohne Verwendung eines Lichtschutzes}}$$

Je höher der Lichtschutzfaktor ist, desto größer ist auch der Schutz gegenüber der Bestrahlung. Ein LSF von zum Beispiel 8 bedeutet, dass eine achtmal längere Exposition gegenüber Strahlung ohne Erythembildung möglich ist³.

Weiters ist noch der Begriff der minimalen Erythemdosis (MED) von Bedeutung. Es handelt sich dabei um diejenige individuell wirksame UV-Strahlendosis, die ohne Vorbestrahlung die schwächste gerade noch sichtbare Rötung der Haut auslöst, die aber scharf gegenüber der Umgebung abgegrenzt ist³. Die MED kann als Maß der Toleranz der Haut gegenüber UVB-Strahlung gesehen werden. Hierbei wird allerdings keine Aussage über die UVA-Wirkung getroffen^{1,3}. Insofern ist die Bezeichnung „Lichtschutzfaktor“ falsch und sollte durch den Begriff „UVB-Schutzfaktor“ ersetzt werden³. In der Praxis werden Breitbandfilter angewendet, die auch den UVA-Bereich abdecken.

Wichtiger als ein hoher Lichtschutzfaktor sind allerdings die ausreichende Menge und die Häufigkeit der Anwendung eines Sonnenschutzmittels¹.

4.3.7. Spezielle Anwendungen: PUVA-Therapie

Im Forschungsbereich Phototoxizität sollte weiters der Begriff der PUVA-Therapie bekannt sein. Bei der PUVA-Therapie (Psoralen und UVA-Strahlungstherapie) handelt es sich um eine Photochemotherapie, bei der man auf kontrollierte Weise die phototoxischen Effekte von Psoralenen ausnutzt, um therapeutische Eigenschaften zu erreichen³.

Psoralene sind heterocyclische aromatische Verbindungen, die aus der Kondensation eines Furanrings mit einem Cumarinring stammen²¹. Durch Psoralene induzierte phototoxische Reaktionen bilden das grundlegende therapeutische Prinzip der PUVA-Therapie. Bei dieser Therapie werden meist lineare Psoralene wie 8-Methoxypsoralen, 5-Methoxypsoralen und Trimethylpsoralen in Kombination mit UVA-Strahlung eingesetzt. Es können Psoriasis vulgaris, kutane T-Zellen-Lymphome und mehrere andere entzündliche Hauterkrankungen behandelt werden²¹. Die Einnahme der Psoralene kann oral oder topisch erfolgen, wobei bei beiden Zufuhrwegen ein zeitlicher Abstand von zwei Stunden zwischen Applikation und Bestrahlung vorhanden sein muss³, nach Kurt Mach hingegen ist eine Stunde Wartezeit zwischen Arzneimittelverabreichung und Bestrahlungsbeginn zu empfehlen⁶.

Psoralene sind in der Lage, Photomodifikationen in verschiedenen Biomolekülen zu erzeugen. Im Gegensatz zu den meisten anderen photosensibilisierenden Verbindungen vermitteln Psoralene ihre phototoxische Wirkung zum größten Teil durch nicht-sauerstoffabhängige Photoreaktionen, obwohl sauerstoffabhängige Reaktionen zusätzlich dazu beitragen können. Im Gegensatz zu anderen phototoxischen Mitteln zielt Psoralen hauptsächlich auf DNA ab. Dabei kann der nicht angeregte Grundzustand von Psoralen innerhalb des Nukleinsäuredoppelstrangs wechselwirken²¹. Es bildet sich also ein Komplex zwischen DNA und Psoralenderivat, dieser Komplex geht bei UVA-Bestrahlung in ein Cyclobutan-derivat über. Die Reduplikation und somit auch die Zellteilung können durch die Cyclobutanverknüpfung zwischen den Pyrimidinbasen der DNA und dem Psoralenderivat verhindert werden. Wenn Psoralen mit den Pyrimidinbasen von zwei benachbarten DNA-Strängen wechselwirkt, kommt es zum *Cross-linking*, bei dem die Einzelstränge verknüpft werden. Dieser Mechanismus kann die antiproliferativen Wirkungen von Psoralenen erklären.

Bei Psoriasis vulgaris, der Schuppenflechte, sind die therapeutischen Erfolge, die durch die PUVA-Behandlung erzielt werden konnten, sehr groß. Allerdings sind viele Sitzungen mit länger werdenden Intervallen notwendig³. Ein Vorteil ist die Reduktion der topischen Applikationen. Zudem lassen sich durch die Intervallbehandlungen Rückfälle verhindern⁶. Neben der PUVA-Therapie lösen Psoralen-induzierte Photosensibilisierungsreaktionen auch unerwünschte Nebenwirkungen aus, wie Berloque-Dermatitis, bei der es zu lange anhaltenden Hyperpigmentierungen kommt. Weiters kann eine akute phototoxische Dermatitis, wie die Gräserdermatitis, ausgelöst werden. Auch chronische Lichtschäden und Malignomentstehung können die Folge sein³.

5. Methoden zur Untersuchung von Phototoxizität

In den letzten 30 bis 50 Jahren hat sich das Forschungsgebiet der Phototoxizität sehr stark entwickelt. Tierversuche unterlagen damals keinen regulativen Richtlinien, was dazu führte, dass es keine standardisierten Methoden zur Prüfung von Substanzen auf Phototoxizität gab. Dementsprechend schwierig war es, die Ergebnisse der einzelnen Studien zu vergleichen, da sie unter völlig verschiedenen Bedingungen durchgeführt wurden. Es kamen unterschiedliche Tiere, Lichtquellen, Bestrahlungsdosen, Applikationswege und auch unterschiedliche Zeitabstände zwischen den einzelnen Behandlungen zum Einsatz. Die Bestrahlungsdosen beispielsweise schwankten zwischen 0,5 und 100 J/cm². Auch die Bestrahlungszeiten waren zu diesem frühen Zeitpunkt der Entwicklung dieses Forschungsgebiets teilweise sehr fragwürdig und oft nicht praxisrelevant. Bezüglich der Testung von Phototoxizität am Menschen wurde 1968 durch Klingman und Breit die Nützlichkeit diverser Lichtquellen und Applikationswege evaluiert. 1978 wurden die Methoden durch Kaidbey und Klingman weiterentwickelt. Dabei wurde die interdermale Verabreichung involviert. Erst 1985 wurde der Begriff „Phototoxizität“ durch Marzuli und Maibach geprägt. 1987 war es zwar möglich, phototoxische Substanzen ausfindig zu machen, aber man scheiterte daran, Voraussagen über die exakte Häufigkeit von phototoxischen Reaktionen treffen zu können, die eventuell von einer einzelnen Komponente ausgingen¹⁷.

Heute werden aus Gründen des Tierschutzes weit weniger Versuche am Tier durchgeführt. Falls diese unvermeidbar sind, gibt es genaue Richtlinien über die Handhabung der Versuchstiere.

In der aktuellen Forschung ist es üblich, zunächst die Ergebnisse von vergangenen Untersuchungen zu einem bestimmten Medikament oder einer Medikamentengruppe bezüglich seiner Phototoxizität zu erfassen, bevor man dieses Arzneimittel auf Phototoxizität prüft. Vorhandene Daten können sowohl aus präklinischen als auch klinischen Studien stammen. Die angewandten Prüfungen müssen valide sein und wissenschaftlich anerkannt. Das ist entscheidend für die Risikominimierung von unerwünschten Reaktionen der Haut während des Zeitraums der Behandlung mit dem Arzneimittel und der Phototherapie¹⁹.

Präklinisch erfolgt die Prüfung durch *in vivo*-, *in vitro*-, *ex vivo*-, und/oder *in silico*-Methoden.

5.1. Lichtquellen für die Untersuchung von Phototoxizität

Die Lichtquelle, die zur Messung der Phototoxizität herangezogen wird, muss einige Voraussetzungen erfüllen. Sie muss jene Wellenlängen abgeben, die von der Testchemikalie absorbiert werden. Die Lichtintensität muss ausreichend hoch sein, um Phototoxizität induzieren zu können. Sie sollte aber keinen oder nur sehr geringen Schaden auslösen. Solarsimulatoren, die das natürliche Sonnenlicht simulieren können, gelten als ideale künstliche Lichtquelle für die Prüfung von Testsubstanzen auf Phototoxizität²⁴. Solarsimulatoren sind mit Xenonbögen oder (dotierten) Quecksilbermetallhalogenidbögen ausgestattet. Außerdem sollten Lichtquellen, die bei der Prüfung auf Phototoxizität

verwendet werden, auch geeignet gefiltert werden, um UVC-Strahlung zu entfernen und die stark zytotoxischen UVB-Wellenlängen abzuschwächen (Note for Guidance on Photosafety Testing, 2002). Das unter diesen Filtern aufgezeichnete Spektrum sollte dem standardisierten Tageslicht entsprechen. Auch andere UVA-Lichtquellen wie UVA-Lampen können mit einem geeigneten UV-Dosimeter ausgestattet werden, um die Intensität und Wellenlänge zu überprüfen. Die Intensität des Lichts (also die Bestrahlungsstärke) variiert je nach Lichtquelle und sollte regelmäßig vor jedem Phototoxizitätstest mit einem geeigneten Breitband-UV-Meter überprüft werden. Dieses UV-Messgerät muss vor jeder Messung kalibriert werden.

Die Bestrahlungszeit ist abhängig von der Intensität der Lichtquelle; zum Beispiel sind für eine Lichtquelle von $1,7 \text{ mW/cm}^2$ 50 Minuten Belichtungszeit erforderlich, um 5 J/cm^2 zu erreichen²⁴. Beträgt die Bestrahlung 10 J/cm^2 oder mehr, so können phototoxische Reaktionen sichtbar gemacht werden. Dagegen kann die Bestrahlung unter 1 bis 2 J/cm^2 im UVA-Bereich zu falsch negativen Ergebnissen führen⁵.

Je nach angewandter Testmethode variiert die Bestrahlungszeit. Eine Dosis von 5 J/cm^2 , gemessen im UVA-Bereich, wurde als nicht zytotoxisch, aber ausreichend wirksam bestimmt, um Chemikalien anzuregen und so phototoxische Reaktionen im 3T3 NRU PT (3T3 Neutral Red Uptake Phototoxicity test) auszulösen²⁴.

Am häufigsten werden als Lichtquellen solche mit Emissionsspektren benutzt, die auf UV-Strahlung begrenzt sind, zum Beispiel Leuchtstofflampen für UVA- oder UVB-Strahlung oder Quecksilberbogenlampen. Auch die Emissionsspektren des Sonnenlichtsimulators werden verwendet, da sie ein reproduzierbares UVA-Spektrum mit hoher Stabilität emittieren und außerdem leicht zugänglich sind⁵. Die phototoxische Prüfung von Substanzen zur topischen Anwendung wird hauptsächlich mit Hilfe von UVA-Strahlung evaluiert⁵. UVA-Dosen im Bereich von 5 bis 20 J/cm^2 werden aktuell erfolgreich bei *in vitro*- und *in vivo*-Phototoxizitätstests eingesetzt¹².

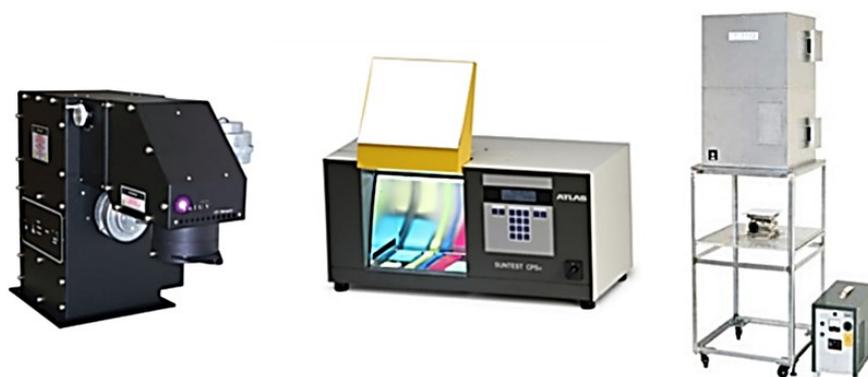


Abbildung 7: Solarsimulator: Newport, Suntest CPS+ oder CPS (Atlas), SXL-2500V2 (Seric) nach Kim et al.²⁴.

Das Vergleichen der Parameter innerhalb der einzelnen Studien zur Prüfung von Substanzen auf Phototoxizität ist teilweise schwierig, da des Öfteren grundlegende Parameter wie die verwendete Lichtquelle, die Bestrahlungsintensität, die Bestrahlungsdauer oder die

Anzahl der Wiederholungen der Bestrahlungen in den Studien nicht im Detail angegeben werden^{25,26}. Manche Daten sind fragwürdig und sollten daher nicht in Vergleiche miteinbezogen werden. Ein Beispiel wäre hier die Bestrahlung von Zellkulturplatten mit natürlichem Sonnenlicht, was eine Standardisierung der Versuche und den Vergleich zwischen verschiedenen Laboren schwierig macht²⁷.

5.2. Präklinische *in vivo*-Studien

5.2.1. Allgemeines

Zur Reflexion von pathologischen Prozessen durch Phototoxizität beim Menschen sind *in vivo*-Tests am Versuchstier gut geeignet. Allerdings müssen dafür viele Versuchstiere aufgewendet werden und außerdem sind *in vivo*-Methoden meist zeitintensiv, kostspielig und aus ethischer Sicht zu hinterfragen²⁴. Systemische Einflüsse erhöhen oft die Variationsbreite, wodurch Ergebnisse stärker voneinander abweichen und exakte Aussagen schwierig werden¹⁹. Meist werden für *in vivo*-Studien Ratten, Meerschweinchen oder Mäuse verwendet. Durch diese Labortiere ist es möglich, Phototoxizität an einem lebenden Organismus zu beobachten. Sowohl topische als auch systemische Applikation ist möglich. Die Tiere werden der entsprechenden Dosis der Testchemikalie ausgesetzt und mit UVA-Licht bestrahlt^{24,28}.

5.2.2. Photo Hen's Egg Test

5.2.2.1. Allgemeines

Der *Photo Hen's Egg Test* (PHET) kann als eine Methode gesehen werden, die zwischen *in vivo*- und *in vitro*-Test liegt²⁹. Es handelt sich um eine Weiterentwicklung des Hühnereitests (HET)³⁰. Diese Testmethode wurde entwickelt, um ein anspruchsvolleres Testsystem als die herkömmlichen *in vitro*-Methoden, wie Hefekulturen, Bakterien oder Zellen verschiedenen Ursprungs, zu erarbeiten. Außerdem wollte man Versuche am lebenden Tier verhindern. Dabei wurde das extraembryonale Gefäßsystem von inkubierten Hühnereiern erforscht. Ursprünglich sollte durch dieses Modell der *Draize Test* (Kaninchen-Augentest), der der Untersuchung der mukokutanen Toxizität dient, ersetzt werden. Nicht toxische Konzentrationen der zu testenden Chemikalie werden in das Blutgefäßsystem des Dottersackes des Embryos eingebracht, es folgt die Bestrahlung mit UVA-Licht. Diese Testmethode ist im Allgemeinen kostengünstig und valide^{19,29}.

5.2.2.2. Durchführung

Weißer, befruchteter Leghorneier werden in horizontaler Lage bei 37,5 °C und 65% relativer Luftfeuchtigkeit im Brutapparat bebrütet. Die Bebrütung dauert 3 Tage, danach werden alle Eier durchleuchtet und die defekten Eier aussortiert. Ein Loch wird in die Eierschale gebohrt ohne dabei die Membran der Eierschale zu zerstören. Durch das Loch werden 5 ml Eiweiß abgesaugt, wodurch der Embryo und das ihn umgebende Blutgefäßsystem

des Dottersacks abgesenkt werden. Eine Art „Fenster“ mit den Maßen 1,5 x 2,5 cm wird aus der Schale ausgeschnitten. Die Eier werden mit einem Wachstuch umhüllt und noch einmal für einen weiteren Tag in den Inkubator gelegt. Zur Prüfung auf Phototoxizität werden nur die Eier verwendet, die am vierten Inkubationstag normal entwickelte Embryos und Blutgefäßsysteme aufweisen können³⁰.

Der PHET hat ein 2x2-faktorielles Testsystem, bei dem die Faktoren „Bestrahlung“ und „Substanzapplikation“ und die Levels „ja“ und „nein“ einfließen³¹.

Bis zum Beginn der Prüfung auf Phototoxizität wird das Blutgefäß des Dottersackes ausschließlich nicht toxischen Konzentrationen der Testchemikalien ausgesetzt. Auch die UVA-Strahlung muss hierbei im nicht toxischen Bereich liegen. Am vierten Tag der Bebrütung werden die Eier nach der Verabreichung der Testsubstanz einer UVA-Belastung ausgesetzt. Als Vehikel dient eine NaCl-Lösung. Drei weitere Testgruppen dienen der Kontrolle³⁰. Die Kontrollgruppen sind aufgrund der spontan auftretenden morphologischen Veränderungen des inkubierten Eies verpflichtend durchzuführen²⁹. Sie werden entweder NaCl, NaCl und UVA-Strahlung oder der Testsubstanz ausgesetzt. Die Beurteilung erfolgt 24 Stunden nach der Strahlenbelastung³⁰.

Die Parameter der phototoxischen Zerstörung sind der Tod des Embryos und die morphologischen Parameter MD (*membrane discoloration*, Membranverfärbung) und HR (Hämorrhagie). Sie können während einer Beobachtungszeit von 24 Stunden erfasst werden²⁹. Die Erfassung erfolgt mit Hilfe eines Makroskops. Die Parameter werden anschließend in einer Skala eingetragen. Dabei unterscheidet man Level 0, 1, 2, und 3 (Tabelle 2).

Tabelle 2: PHET Skala nach Menzel¹⁹.

| | MD | HR |
|---------|----------------|--|
| Level 0 | nicht sichtbar | Nicht sichtbar |
| Level 1 | Kaum sichtbar | Kaum sichtbar |
| Level 2 | sichtbar | Sichtbar, teilweise bedeckte Strukturen |
| Level 3 | sichtbar | Sichtbar, vollkommen bedeckte Strukturen |

Außerdem wird die Embryonensterblichkeit beurteilt. Die drei Parameter MD, HR und Sterblichkeit der Embryonen werden in einem Morphologie- und Letalitätsindex vereint. Das relative phototoxische Potenzial einer eventuellen photosensibilisierenden Substanz kann durch die Gegenüberstellung von der strukturellen Zerstörung der Zelle, der Membran und des Kerns mit den Indizes von geläufigen Photosensibilisatoren ermittelt werden^{19,30}.

5.2.2.3. Beurteilung des Testsystems

Der PHET ist ein preiswertes, empfindliches und zuverlässiges Verfahren, durch das die Phototoxizität von lokal sowie systemisch applizierten Arzneimitteln erfasst werden kann. Die Funktionsweise des Tests ist unkompliziert, der Zeitaufwand ist gering. Es können Erkenntnisse über phototoxische Reaktionen von unterschiedlichen Testchemikalien erworben werden^{29,31}. PHET widerspricht den Tierschutzgesetzen nicht. Zwar kann dieser Test andere Phototoxizitätstests nicht ersetzen, aber er kann hilfreich sein, Versuche an Säugetieren zu reduzieren²⁹.

5.2.3. Acute Phototoxicity Assay in Guinea Pigs

5.2.3.1. Allgemeines

Im Jahr 1992 wurde das Meerschweinchen-Testverfahren in die *Testguideline 406* der OECD aufgenommen³². Heute werden die meisten Tests zur Bestimmung eines (Photo)-Kontakt-Sensibilisierungspotentials von Testsubstanzen an Meerschweinchen oder Mäusen vorgenommen. Es handelt sich dabei um Modelle mit langwierigen, biphasischen Protokollen, die eine Induktionsphase oder Sensibilisierungsphase und eine Herausforderungs- oder Erhebungsphase umfassen. Beim Meerschweinchenmodell wird die Photo-Kontaktreaktion anhand lokaler Erytheme abgeschätzt und durch die Häufigkeit der positiven Reaktionen bestimmt³³.

5.2.3.2. Durchführung

Orale Einzeldosen der Testsubstanz werden den Tieren mit Hilfe einer Sonde verabreicht. Die Versuchstiere werden danach in Gruppen von einigen wenigen Exemplaren eingeteilt. Nach der Substanzgabe und einer kurzen Ruhephase werden die Tiere mit UVA-Licht bestrahlt. Dann wird kontrolliert, ob die haarlose (rasierte) Rückenhaut, die Ohren, die Nase und die Augenlider auf die Irritation reagiert haben. Das ist anhand eventueller Rötungen, Schwellungen, Ödeme oder Nekrose ersichtlich. Diese Untersuchung erfolgt in regelmäßigen Abständen innerhalb der nächsten Stunden bis Tage nach der Bestrahlung und wird wie folgt bewertet³¹:

Tabelle 3: Bewertung der Hautschädigung beim Meerschweinchentest nach Neumann et al.³¹.

| | |
|---|---------------------------------------|
| 0 | keine Reaktion |
| 1 | gerade sichtbare Rötung |
| 2 | Rötung |
| 3 | starke Sonnenbrandreaktion |
| 4 | extreme Reaktion, Schwellung der Haut |

Täglich werden die Untersuchungsergebnisse jedes einzelnen Tieres festgehalten. Daraufhin wird der Mittelwert berechnet. Das Körpergewicht der Tiere wird ebenfalls

dokumentiert, weil die Darmflora der Meerschweinchen gegenüber dem antibakteriellen Effekt der antiinfektiösen Substanzen empfindlich reagiert. Zur Bestrahlung wird zum Beispiel ein Hönle H1 UV-Filtersystem verwendet, wobei das Emissionsspektrum sichtbares Licht, UVA- und UVB-Strahlung umfasst. Die UVA Strahlung liegt im Bereich 320-400 nm mit einem Emissionspeak bei 380 nm. UVB Licht ist aufgrund des H1-Filters zu weniger als 1% vertreten. Die Emission wird ebenfalls regelmäßig an der Hautoberfläche beobachtet³¹.

5.2.3.3. Beurteilung des Testsystems

Diese Methode wurde früher zur Testung von pharmazeutischen, agrochemischen und anderen industriellen Produkten verwendet. Das Meerschweinchen-Verfahren weist einige Nachteile auf. Es ist eine kosten- und zeitintensive Testmethode³², bei der eine genaue Vorgehensweise notwendig ist. Eine große Anzahl an Versuchstieren ist notwendig. Außerdem können keine differenzierten Informationen über die photosensibilisierenden Eigenschaften von Arzneimitteln durch die Beurteilung von Erythemen und Ödemen an der Haut in Erfahrung gebracht werden. Statt objektiven Parameter, wie beim IMDS, werden subjektive Parameter bestimmt³². Dadurch ergibt sich eine gewisse Ungenauigkeit dieses Testsystems.

5.2.4. Integrated Model For The Differentiation Of Chemical - Induced Allergic and Irritant Skin Reactions (IMDS)

5.2.4.1. Allgemeines

1989 wurde der *Local Lymph Node Assay* (LLNA) von Kimber und Weisenberger entwickelt, um das kontaktsensibilisierende Potenzial von Chemikalien in Mäusen zu erkennen³². Dadurch sollte der Meerschweinchentest ergänzt beziehungsweise ersetzt werden^{32,34}. 1992 wurde diese Testmethode von der OECD (*Organisation for Economic Cooperation and Development*) für die immuntoxikologische Risikoanalyse neu entwickelter Formulierungen akzeptiert. Substanzen, die eine positive Reaktion im Lymphknoten auslösen, werden als Allergene erkannt. Ist das Ergebnis negativ, so ist dennoch ein *Guinea-Maximisationstest* zur Bestätigung notwendig³⁵.

Scholes testete 1992 erstmals mithilfe des LLNA Photokontaktallergene. Allerdings gelang das nur für topische und nicht für orale Applikation. Die Differenzierung zwischen photoirritativen und photoallergischen Potenzial gelang auch bei diesem Testsystem nicht. Um diese Unterscheidung zu ermöglichen, wurde der (UV)-LLNA weiterentwickelt. Besonderes Augenmerk wurde dabei auf die immunologisch relevanten Zellpopulationen im lokal drainierenden Lymphknoten gelegt, die CD4⁺-T Zellen und die AP-Zellen. Dieses modifizierte System kann auch photoreaktive Chemikalien untersuchen. Zur Vereinfachung stellte man immunologische Endpunkte von kontaktallergischen und irritativen Reaktionen der Haut in den Mittelpunkt³⁵.

IMDS ist ein modifizierter, lokaler Lymphknotentest an der Maus, der es ermöglicht, mit Hilfe von einfachen Parametern zwischen irritativen und allergischen Hautreaktionen zu unterscheiden. Dieser Test beruht auf einem simplen System, das sich durch Zuverlässigkeit

und Reproduzierbarkeit auszeichnet³². Im Gegensatz zu „klassischen“ Hautsensibilisierungstests in Meerschweinchen ist der IMDS um einiges schneller, zudem basiert er nicht auf der subjektiven Bewertung der Haut, sondern auf objektiven Messungen der entsprechenden Areale^{32,34}. Es handelt sich um eine Kombination der Messung der Zellproliferation in drainierenden Lymphknoten und der primären Ohrenschwellung nach der topischen oder oralen Verabreichung der Testchemikalie an drei aufeinanderfolgenden Tagen^{32,34}.

5.2.4.2. Durchführung

30 Minuten nach der topischen oder systemischen Substanzapplikation folgt die UV-Bestrahlung. 24 Stunden nach der Lichtbelastung und der Tötung der Maus werden, zum Zweck histopathologischer Untersuchungen, die Ohren und die Lymphknoten an den Ohren entfernt^{31,33,35}.

Man kann durch IMDS zwischen verschiedenen Typen von Photoreaktionen, wie Photoallergie und Photoirritation, unterscheiden. Die Schwellung der Ohren ist als Maß der Entzündung der Haut zu sehen. Dies stellt ein Charakteristikum von (photo)-irritativen Reaktionen dar. In den ersten vier Tagen proliferieren die lokal drainierenden Lymphknoten bei (photo)-irritativen Prozessen auch bei starker Entzündung der Haut nur sehr schwach. Bei (photo)-allergischen Reaktionen findet allerdings eine starke Lymphknotenproliferation statt. Es kommt dabei aber nur zu einer schwachen oder zu keiner Entzündung der bestrahlten Hautflächen. Der Index aus der Lymphknotenzellzahl der getesteten Gruppe und der Vehikelgruppe ergibt das Maß für die Lymphknotenaktivierung. Durch IMDS kann das photoreaktive Verhalten einer Chemikalie innerhalb von vier Tagen bestimmt werden³⁵. Ein Differenzierungsindex (DI) wurde festgelegt, der das Verhältnis zwischen der Aktivierung der Haut-drainierenden Lymphknoten, der Lymphknotenzellzahl, und der Entzündung der Haut (Ohrenschwellung) beschreibt³⁴. Ein $DI < 1$ bedeutet, dass die Testsubstanz ein irritierendes Potenzial aufweist. Ist der $DI > 1$, so liegt eine allergische beziehungsweise photoallergische Reaktion vor^{19,34}.

5.2.4.3. Beurteilung des Testsystems

Bei IMDS handelt es sich um ein schnelles, einfach zu verwendendes Modell, das kostengünstig durchgeführt werden kann. Es ist möglich, topisch sowie oral verabreichte Substanzen dosisunabhängig zu testen. Die Parameter sind objektiv, im Gegensatz zum *Acute Phototoxicity Assay In Guinea Pigs*-Test. Nur wenige Untersuchungen und somit wenige Labortiere sind notwendig. Außerdem ist die Unterscheidung zwischen photoallergisch und photoirritativ möglich, da der IMDS-Test die immunologischen und pathologischen Prozesse begreiflich macht^{19,32}.

5.3. *In vitro*-Studien

5.3.1. Allgemeines

In vivo-Tests weisen einige Nachteile, wie begrenzte Vergleichbarkeit gegenüber menschlichem Gewebe und einen hohen Bedarf an Versuchstieren, auf. Aus ethischen Gründen möchte man soweit wie möglich auf Tierversuche verzichten, daher werden diese immer seltener praktiziert⁵. Das Prinzip der 3 Rs spielt hier eine große Rolle: *replacement*, *reduction* und *refinement*. Man möchte folglich Tierversuche durch *in vitro*-Methoden ersetzen, reduzieren, beziehungsweise möglichst wenige Tiere durch möglichst geringe Schmerzen belasten³⁶. Seit dem Jahr 2000 sind *in vivo*-Methoden bei Testungen des akut phototoxischen Potenzials in Europa nicht mehr zulässig³⁷. Bei *in vitro*-Studien werden ganze Zellen, Teile von Zellen oder rekonstruierte Gewebe verwendet, um eine breit gefächerte Reihe an Tests durchführen zu können. Die Entwicklung der Gewebetechnik, zur molekularen Biologie gehörend, hat dazu geführt, dass die *in vitro*-Zellkulturmodelle die *in vivo*-Bedingungen nachahmen³⁶.

In vitro-Methoden sind besser standardisierbar als *in vivo*-Tests, da nur ein ausgewählter Reaktionsmechanismus der Testsubstanz geprüft wird¹⁹. Durch *in vitro*-Tests kann geklärt werden, ob ein Arzneimittel in therapeutischen Dosen phototoxisch wirkt. Wenn ja, wird untersucht welche Wellenlängenbereiche für das Entstehen von phototoxischen Effekten verantwortlich sind²⁰.

1991 stimmten die EC (Europäische Kommission) und COLIPA (The European Cosmetic Toiletry and Perfumery Association) zu, ein gemeinsames Programm für *in vitro*-Studien zu entwickeln und zu validieren. In Phase 1, von 1992 bis 1993, wurde an einer Prävalidationsstudie gearbeitet, um entsprechende *in vitro*-Testmethoden für verblindete formale Validationsstudien zu finden. Die besten Ergebnisse lieferte der 3T3 NRU PT, der im Folgenden erläutert wird (Kapitel 4.3.2.).

In Phase 2, die im Zeitraum zwischen 1994 und 1995 stattfand, wurden die dreißig Chemikalien von elf Laboren durch die *in vitro*-Methoden getestet, die in Phase 1 am besten abgeschnitten hatten. Dabei sollten die Relevanz und Verlässlichkeit der *in vitro*-Methoden bezüglich des Voraussagens und Erkennens von phototoxisch wirkenden Chemikalien festgestellt werden. Die Ergebnisse von 3T3 NRU PT waren hierbei reproduzierbar, außerdem war die Vergleichbarkeit zwischen *in vitro* und *in vivo* sehr hoch³⁸.

5.3.2. 3T3 Neutral Red Uptake Phototoxicity Test

5.3.2.1. Allgemeines

Im Jahr 2002 wurde der 3T3 NRU PT von der EMEA (European Medicines Agency, Europäische Arzneimittelagentur) und 2003 auch von der FDA (Food and Drug Administration) anerkannt¹⁹ (OECD, 2004). Bald darauf wurde der Test als erster *in vitro*-Phototoxizitätstest offiziell von der Expertenkommission der OECD als Prüfmethode (*Test Guideline 432*) akzeptiert (OECD, 2004). Außerdem wurde dieser Test als offizielle weltweite Methode zur Testung von Substanzen auf Phototoxizität anerkannt^{19,36,37}.

Dementsprechend ist der 3T3 NRU PT die erste *in vitro*-Testmethode, die nach erfolgter Validation global angewendet werden darf¹⁹. Die EU-Regulation für die Sicherheitsbewertung von Chemikalien (REACH) nahm die 3T3 NRU Phototoxizitätstestmethode 2008 auf¹⁹. Zudem wurde der 3T3 NRU PT auch von der EU Kommission und den EU-Mitgliedsstaaten in der *Directive 2010/63/EU* akzeptiert⁵. Die aktuelle Version der *OECD Guidelines* stammt aus dem Jahr 2019.

Grundlage des Tests ist der Vergleich der Zytotoxizität von chemischen Substanzen in Anwesenheit beziehungsweise Abwesenheit von nicht zytotoxischer UVA/VIS-Belastung bei Wellenlängen über 290 nm. Dadurch kann das phototoxische Potenzial anhand des angeregten Zustandes nach der Strahlenbelastung erkannt werden^{5,19,37}. Verwendet wird eine murine Balb/c 3T3 Fibroblastenzelllinie. Die Zytotoxizität wird 24 Stunden nach der Strahlenbelastung anhand der konzentrationsbezogenen Abnahme der Absorption des Vitalfarbstoffes Neutralrot bewertet. Dieser schwach kationische Farbstoff zeichnet sich durch die Markierung von lebenden Zellen aus. Er kann die Zellmembranen von lebenden Zellen durch aktiven Transport leicht durchdringen und lagert sich an den Lysosomen an⁵. Durch die Färbung von lebenden Zellen können diese folglich von den nicht lebenden Zellen unterschieden werden. Die Abkürzung 3T3 steht dabei für „3-tägiger Transfer, Inokulum von 3x10⁵ Zellen“ auf 20 cm² großen Platten. Die verwendeten Zellen sind recht stabil, schnell verfügbar und unkompliziert in der Handhabung²⁴.

Bei diesem Test können zum einen murine Zellen (BALB/c 3T3 Fibroblasten), zum anderen humane Zellen (menschliche Keratinozyten Zelllinie, HaCaT) verwendet werden.

Da Keratinozyten in der Epidermis eine zentrale Rolle spielen und bei den Effekten durch Hautirritationen im Zuge einer Bestrahlungsbelastung die wichtigsten Zellen darstellen, macht es Sinn, diese Zelllinie für *in vitro*-Versuche zur Ermittlung der Phototoxizität einzusetzen³⁹. Durch die Verwendung von Zelllinien menschlichen Ursprungs resultiert eine bessere Voraussagekraft der Phototoxizität. Davon abgesehen konnten Maciel et al. 2019 zeigen, dass diese Zellen resistenter gegenüber zytotoxischer Effekte der Testsubstanzen bei einer UVA-Bestrahlung der Dosis 1,7 mW/cm² im Vergleich zu der 3T3-Maus-Fibroblastenzelllinie sind³⁹. Der HaCaT-NRU PT (Humane Keratinozytenzelllinie-*Neutral Red Uptake Test*) bietet daher ein realistischeres experimentelles Modell, das nicht die beim 3T3 NRU-PT häufig auftretende Überempfindlichkeit aufweist, was zu einer höheren Übereinstimmung mit der menschlichen *in vivo*-Situation führt. Das OECD-Protokoll wurde bereits erfolgreich an den primären, humanen Keratinozyten durchgeführt. Dies fand im Zuge einer EU/COLIPA-Validationsstudie statt³⁹. In einige Studien wird die HaCaT-Zelllinie zur Ermittlung von Phototoxizität verwendet, viele dieser Studien arbeiten mit dem 3T3 NRU-Testprinzip^{39,40,41}. Bei Maciel et al., 2019 wurde mit, wie von der OECD empfohlen, 1,7 mW/cm² bestrahlt³⁹, bei anderen Studien weicht die Dosis der Bestrahlung allerdings von diesem Wert ab^{40,41}. In manchen Studien beschränkt man sich auf reine UVA-Bestrahlung^{39,40}, wohingegen andere Studien die Testsubstanzen mit UVA- und UVB-Strahlung belasten⁴¹.

5.3.2.2. Durchführung

Der Ablauf des 3T3 NRU Phototoxizitätstests ist schematisch in Abbildung 8 dargestellt:

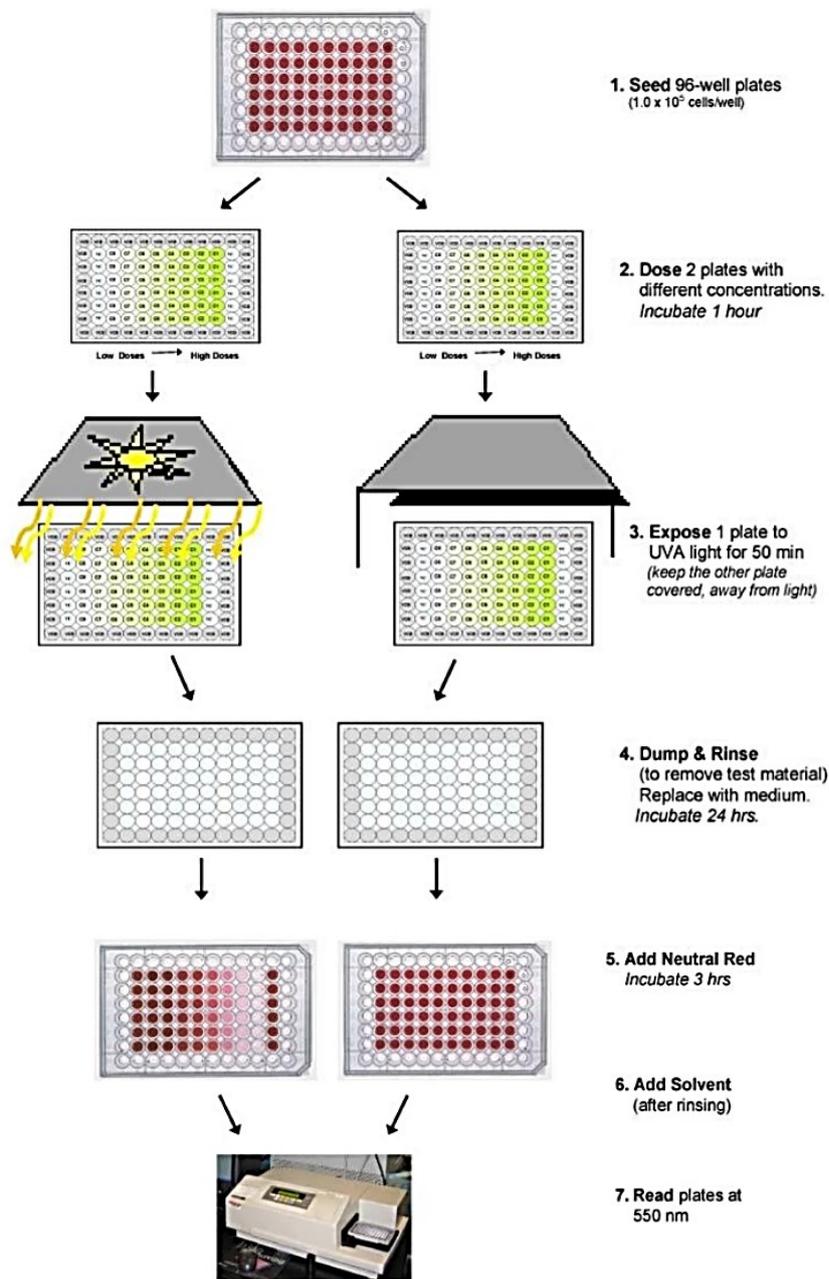


Abbildung 8: Schematischer Ablauf des 3T3 NRU PT nach Maciel^F.

Die Zellen (zum Beispiel Balb/c 3T3) werden auf 96-Mikrotiter Platten kultiviert. Nach 24 Stunden wird das Medium entfernt und die Zellen werden gewaschen. Anschließend folgt die Zugabe von verschiedenen Konzentrationen der Testsubstanz. Die applizierten Testsubstanzen müssen im gelösten Zustand vorliegen. Nach einer einstündigen Präinkubation folgt eine 50-minütige UVA-Bestrahlung. Anschließend wird der eingesetzte Puffer durch frisches Kulturmedium ersetzt. Nach einer 24-stündigen Inkubation wird die

Zellviabilität durch die Aufnahme an Neutralrot beim Messen der optimalen Dichte bei 540 nm bestimmt (MTT-Test zur Eruiierung der Zellviabilität). Parallel dazu wird ein zweiter Satz Platten mit den gleichen Chemikalien behandelt, allerdings im Dunklen^{42,43}.

Es folgt die Berechnung des IC50-Wertes (*half maximum inhibitory concentration*). Dieser Wert gibt die Konzentration einer Testsubstanz an, die einen 50-prozentigen Niedergang der Lebensfähigkeit der Zelle auslöst. Wenn es nicht möglich ist auf den IC50-Wert zu schließen, kann der MPE (*Mean Photo Effect*) bestimmt werden. Zur Auswertung der Daten wird der *Photo-Irritation-Factor* (PIF) oder der MPE berechnet. Der Photoirritationsfaktor (PIF) wird mit dem Wert von IC50 festgelegt, damit man zwischen photoirritierenden und nicht photoirritierenden Substanzen differenzieren kann. Durch das Verhältnis der 3T3-Zellen in Abwesenheit und Anwesenheit von UVA-Strahlung lässt sich der PIF darstellen:

$$PIF = IC50 [-UV]: IC50 [+UV]$$

Der MPE wird durch den Vergleich der Konzentrations-Wirkkurve der Testsubstanz in Anwesenheit beziehungsweise Abwesenheit von UV-Belastung bestimmt^{5,19}.

$$MPE = \frac{\sum_{i=1}^n w_i PE_{C_i}}{\sum_{i=1}^n w_i}$$

Tabelle 4: Beurteilung der Phototoxizität mithilfe des PIF und des MPE nach Maciel⁵.

| | PIF | MPE |
|---------------------------|-----|----------|
| Keine Phototoxizität | <2 | <0,1 |
| Eventuelle Phototoxizität | 2-5 | 0,1-0,15 |
| Phototoxizität | >5 | >0,15 |

Anhand der Differenz (IC50) zwischen bestrahlten und nicht bestrahlten Zellen kann man auf die Phototoxizität schließen. Wie in Abbildung 9 dargestellt ist die konzentrationsbezogene Reduktion der Farbstoffaufnahme von Neutralrot ein Maß für die Phototoxizität der Prüfsubstanz in Anwesenheit beziehungsweise Abwesenheit von UVA-Belastung¹⁹.

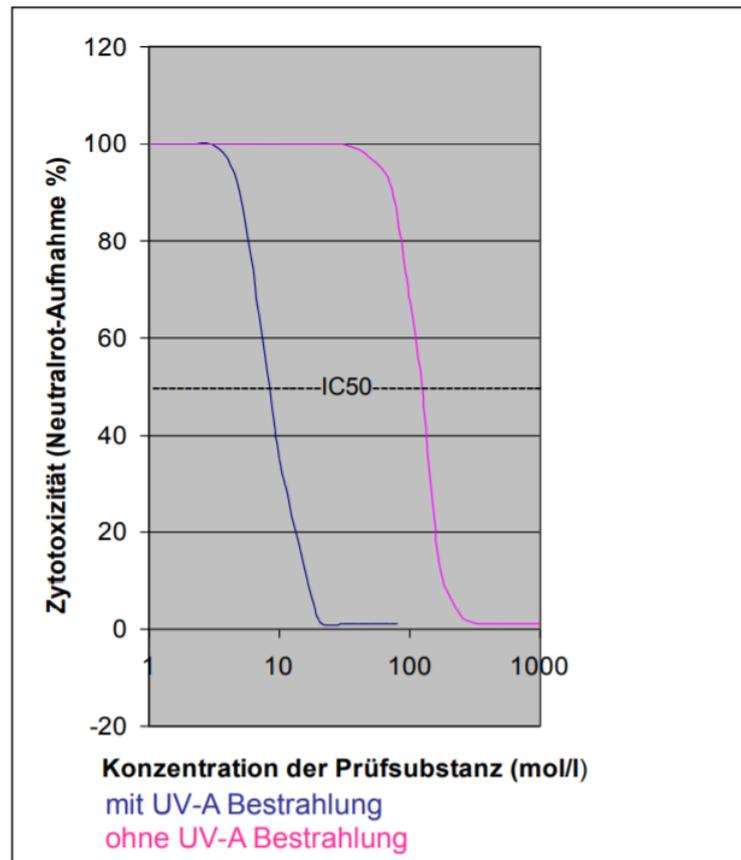


Abbildung 9: Die Phototoxizität wird durch den Abstand (IC50) zwischen den bestrahlten und unbestrahlten Zellen wiedergegeben. In Anwesenheit beziehungsweise Abwesenheit von UVA-Licht ist die konzentrationsbezogene Reduktion der Aufnahme von Neutralrot ein Maß für die phototoxischen Eigenschaften der geprüften Substanz. Die Abbildung stammt von Peters B., Holzhuetter HG 2002 und wurde 2014 von Menzel bearbeitet¹⁹.

5.3.2.3. Beurteilung des Testsystems

Obwohl der 3T3 NRU PT der einzige *in vitro*-Test ist, der von der OECD anerkannt wurde, weist er doch einige Nachteile auf. Eine Testchemikalie, die durch den 3T3 NRU PT als phototoxisch identifiziert wurde, muss nicht zwangsläufig auch bei *in vivo*-Modellen zu Phototoxizität führen. Es besteht also die Gefahr von falsch positiven Ergebnissen⁴⁴. Bei diesem Test werden Monolayer-Zellkulturen verwendet, deren Resultate eventuell bei topischem Gebrauch und geringeren Konzentrationen nicht relevant sind^{45,46}. Das Fehlen des Stratum corneums muss bezüglich der Permeabilität bei 3T3 NRU PT stets berücksichtigt werden⁴⁷. In diesem Fall ist das H3D-Hautmodell eine bessere Alternative^{45,46}.

Der 3T3 NRU PT ist hochempfindlich, seine Spezifität wird meist als gering beschrieben²⁴, wobei es widersprüchliche Angaben in der Literatur gibt^{37,47}. Aufgrund der Empfindlichkeit der Fibroblastenzellen ist es nicht möglich, den Test im UVB-Bereich zu nutzen¹⁹.

Wie in der *OECD Testguideline TG 432* beschrieben, kann der 3T3 NRU PT weder Photogenotoxizität noch Photoallergie oder Photokarzinogenität aufzeigen. Er beschränkt sich

auf die Voraussage der Phototoxizität. Weiters können keine wasserunlöslichen Substanzen oder vollständige Medikamente geprüft werden¹⁹, was in der Praxis eine wichtige Einschränkung bedeutet.

Der Test bietet die Möglichkeit, Phototoxizität zu erkennen. Allerdings garantiert seine Anwendung nicht die korrekte Beurteilung des phototoxischen Potenzials. Metabolische Aktivität wird nicht berücksichtigt, was ein Problem bei der Manifestation von systemisch wirkenden Substanzen darstellt. Daher wird bei systemisch wirkenden Chemikalien, wie Monocrotaline, Riddelliine und Heliotrine (Pyrrolizidinalkaloide), die eine metabolische Aktivität erfordern, auf *in vivo*-Tests verwiesen⁴⁸.

Der 3T3 NRU PT weist aber auch Vorteile auf: Er ist ein preiswerter Test mit einfachem Ablauf und guter Reproduzierbarkeit. Er eignet sich besonders gut dazu, eine große Anzahl an Substanzen auf Phototoxizität zu testen⁴⁵. Auch ist die Vergleichbarkeit mit *in vivo*-Ergebnissen im Allgemeinen sehr hoch⁴⁹, auch wenn es in der Literatur abweichende Daten gibt⁴⁵. Eine mögliche schlechte Vergleichbarkeit zwischen *in vivo*- und *in vitro*-Ergebnissen kann durch die Unfähigkeit des Systems, die Bioverfügbarkeit beziehungsweise die Biokinetik zu modellieren, begründet werden⁴⁵.

5.3.3. Red blood cell Phototoxicity test (RBC PT)

5.3.3.1. Allgemeines

Die Photohämolyse ist eine der einfachsten und ältesten *in vitro*-Methoden, die zur Erkennung von eventuellen photosensibilisierenden Substanzen genutzt werden. Es handelt sich um ein kostengünstiges und effektives Verfahren, das 1905 durch Sacharoff und Sachs bekannt wurde¹⁹. Hetherington und Johnson etablierten 1984 ein Photohämolyse-Verfahren, das ermöglichte, die Phototoxizität von Chemikalien zu eruieren. Anhand der Fähigkeit der Chemikalien, unter Belastung von Sonnenlicht RBC-Membranen aufzulösen und/oder Hämoglobin zu oxidieren, kann durch diese Methode auf das phototoxische Potential geschlossen werden²⁷. Wichtige Endpunkte der Phototoxizität von roten Blutzellen sind die Produktion von freien Radikalen und die Oxidation von Hämoglobin³⁷.

Das aktuelle Protokoll für den RBC PT wurde von Pape und Mitarbeitern in Beiersdorf, Deutschland, entworfen³⁷. Das Verfahren wurde an die Labore der europäischen Kosmetikindustrie weitergeleitet. COLIPA und das *European Center for the Validation of alternative methods* (ECVAM) führten in den Jahren 1992 bis 1998 entsprechende Prävalidations- und formale Validationsstudien von *in vitro*-Phototoxizitätstests durch¹⁹. Erste Ergebnisse der Prävalidationsstudie waren vielversprechend. Verstärkt wurde diese Ansicht durch die Resultate der drei unzusammenhängenden Blindstudien der Validationsphase, die durch COLIPA beziehungsweise ECVAM erschlossen wurden. Die Ergebnisse zeigten eine vollständige Übereinstimmung der Resultate des RBC PT mit denen der *in vivo*-Tests. Klassischerweise werden menschliche Erythrozyten für solche Untersuchungen verwendet⁵⁰. Es können aber auch Erythrozyten von anderen Säugetieren, wie zum Beispiel von Kälbern⁵⁰ oder Schafen⁵¹, zum Einsatz kommen. Auch die Erythrozyten von Albinomäusen werden oft

verwendet, da sie eine höhere Sensitivität aufweisen als die menschlichen Erythrozyten^{25,26}, dadurch erhofft man sich, potenzielle phototoxische Effekte verstärkt zu detektieren.

5.3.3.2. Durchführung

Es gibt zwei Endpunkte, anhand derer im Zuge des Tests auf die photosensibilisierende Wirkung von Substanzen geschlossen wird: Photohämolysen und Hämoglobinoxidation⁵⁰. In Anwesenheit von phototoxischen Substanzen und bei Bestrahlung von RBC kommt es zur Hämoglobin-Oxidation, anfänglicher Met-Hämoglobin-Bildung gefolgt von Photohämolysen²⁷. Die Photohämolysen wird konzentrationsabhängig als Grad der Hämolysen gemessen. Die Hämoglobinoxidation wird als Menge des entstandenen Met-Hämoglobins verstanden⁵⁰. Beide Endpunkte werden durch Messen der Änderung der optischen Dichte bei 525 nm (bei der Photohämolysen) und 630 nm (bei der Hämoglobinoxidation) bestimmt. Ein Voraussageprotokoll kann benutzt werden:

- Photohämolysen-Faktor (PHF) > 3,0 bedeutet: phototoxisch
- Optische Dichte (OD) $OD_{max} > 0,05$ bedeutet: phototoxisch

Bei Chemikalien, die nicht phototoxisch sind, müssen beide Parameter negativ sein. Bei Substanzen, die phototoxisch wirken, muss zumindest einer der Parameter positiv sein⁵⁰.

Das neue Protokoll enthält im Vergleich zum Photohämolysentest als weiteres Kriterium auch das photochemisch induziert gebildete Methämoglobin, als Ergebnis von photodynamischen Prozessen bei starker Sonnenlichtbelastung⁵⁰.

5.3.3.3. Beurteilung des Testsystems

Der RBC PT ist ein einfaches, preiswertes und effektives Konzept¹⁹. Erythrozyten von Säugetieren sind leicht verfügbar - im Gegensatz zu den beim 3T3 NRU PT verwendeten Fibroblasten oder Keratinozyten¹⁸.

Erythrozyten können aufgrund ihrer zellulären Abwehrmechanismen auch hoher Belastung durch langwellige UVB-Strahlung, wie sie im Spektrum des natürlichen Sonnenlichts vorkommt, ausgesetzt werden⁵⁰. Zudem kann dieser Test Informationen über den Phototoxizitätsmechanismus liefern^{18,37}, zum Beispiel Informationen zu photodynamischen Reaktionen wie der Methämoglobinbildung. Zudem können Substanzen, die hauptsächlich an der Zellmembran und auf Proteinebene wirken anstatt auf DNA-Ebene, identifiziert werden⁵⁰.

Die Gefahr von photogenotoxischen Effekten ist ebenfalls nicht vorhanden, weil Erythrozyten, aufgrund ihres fehlenden Zellkerns, diesen gegenüber nicht anfällig sind⁵⁰. Allerdings kann dieser Test nur zur Unterstützung und nicht unabhängig als Einzeltest angewendet werden⁵. Er weist nur eine geringe Spezifität und eine geringe Fähigkeit zur Voraussage von negativen Ergebnissen auf⁵.

5.3.4. Human 3D Skin Model (Humane 3D-Hautmodelle)

5.3.4.1. Allgemeines

Beim Human 3D Skin Model (H3D Skin-Modell) wird ein dreidimensionales Modell der menschlichen Haut verwendet. Solche Modelle gestatten es, *in vivo*-Bedingungen zu imitieren. Sie werden entweder kommerziell erworben oder von sachkundigen Laboren zur Verfügung gestellt.

Die Bildung des ersten rudimentären epidermalen Äquivalents, entwickelt von Rheinwald und Green im Jahr 1975, gelang durch die Entwicklung von kultivierten Keratinozyten in mehreren Schichten mit Verhornungsprozessen in den obersten Schichten.

Heute gibt es Modelle von Gewebekulturen, die von einer einzelnen Zelle mit *Monolayer*-Zellkultur bis zu viel umfangreicheren epithelialen und mesenchymalen Zell-Co-Kulturen reichen. Auch organotypische Kulturen mit 3D Hautäquivalenten sind möglich, diese bilden ein hoch organisiertes Epithelium, das die Zellen und Gewebe des menschlichen Körpers nahezu perfekt imitiert³⁶.

Man unterscheidet 3 Modelltypen:

- **Dermale Modelle**, die aus den Fibroblasten der Haut bestehen
- **Epidermale Modelle**, bestehend aus menschlichen Keratinozyten und dem Stratum corneum
- **Vollhaut-Modelle**, diese enthalten Fibroblasten, Keratinozyten und ein Stratum corneum³⁷

Besonders die beiden zuletzt genannten Modelle erfahren große Bedeutung, da es sich dabei um lebensfähige, metabolisierende primäre Hautzellen handelt. Außerdem zeichnen sie sich durch eine Hautbarriere aus³⁷.

1994 und 1995 wurden die ersten aussichtsreichen Resultate des Vollhaut-Modells SKIN² (durch Liebsch et al.) und des epidermalen Modells, EPISKIN (durch Roguet et al.) dokumentiert. Die kommerzielle Vermarktung des Skin²TM, ein Vollhaut-Modell, wurde 1996 beendet, daraufhin wurde das Testprotokoll ein Jahr später dem epidermalen Modell, EpiDermTM, angeglichen. Danach wurde EpiDermTM in der Prävalidationsstudie der ECVAM beurteilt, was zu erfolversprechenden Ergebnissen von 3 Laboren führte. Seit dem Jahr 2000 wird dieser Test in den Laboren der europäischen Kosmetikindustrie verwendet¹⁸. Er wurde dem epidermalen Modell, SKINETHICTM, angeglichen. Bei Versuchen, die Protokolle des Vollhaut-Modells und des epidermalen Modells zu verbessern, zeigte sich, dass das nicht notwendig war^{18,19}.

Anschließend an die Einführung des Skin²-Modells wurde der H3D-PT in der Phase 1 der EC/COLIPA-Phototoxizitäts-Validationsstudie durch ZEBET (Zentralstelle zur Erfassung und Bewertung von Ersatz- und Ergänzungsmethoden zum Tierversuch) beurteilt. Dies geschah mit Hilfe von 20 Chemikalien in einer nicht verblindeten Studie. Zu einem späteren Zeitpunkt wurde der H3D PT nochmals von ZEBET bewertet, dieses Mal allerdings wurde eine Blindstudie mit 30 Chemikalien durchgeführt. Die Beurteilung erfolgte in der Phase 2 der EC/COLIPA Validationsstudie und lieferte vielversprechende Resultate. Das Ergebnis wurde allerdings nie

veröffentlicht, da das Skin²-Modell nach Beendigung der Studie nicht mehr verfügbar war. Das epidermale Modell EpiDermTM wurde an das Protokoll des H3D-PT angepasst. Sehr gute Ergebnisse waren die Folge, die in einer Blindstudie in 3 Laboren erbracht werden konnten. Man kam zu dem Schluss, dass Verbesserungen nicht notwendig waren. Der H3D PT konnte somit als zulässig und ausreichend standardisiert angesehen werden. Somit kann der H3D PT als Unterstützung beim 3T3 NRU PT verwendet werden³⁷.

Die Nationalen Koordinatoren des *OECD-Test-Guideline*-Programms verabschiedeten eine neue *Draft Test Guideline TG 431 (Human Skin Model)* im Jahr 2002, diese wurde im Jahr 2004 anerkannt^{19,52}.

5.3.4.2. Durchführung

Untersucht wird einerseits die Wirkung der Dosis auf die Zellviabilität von Hautzellen (MTT Reduktion) und andererseits die Wirkung der Dosis auf Gewebe im Dunkeln beziehungsweise unter Strahlenbelastung mit der höchsten nicht-zytotoxischen UVA-Dosis.

Bei Episkin und dem Vollhaut-Modell SKIN² verläuft das Testdesign gleich ab: Die *dose-response* bezüglich der Hautzellviabilität, die MTT-Reduktion, wird ermittelt. Das Voraussagemodell ist bei den beiden Testmethoden allerdings unterschiedlich. Bei Roguet et al., die das Episkin-Modell beschreiben, werden die IC50 Werte, die bei Belastung durch Licht beziehungsweise ohne Belastung durch Licht zustande kommen, verglichen. Bei Liebsch et al., 2005, die das Vollhautmodell Skin² beschreiben, wird die niedrigste Dosis, bei der ein signifikanter phototoxischer Effekt beobachtet wird, bestimmt. Man spricht vom LOEL (*lowest observed adverse effect*)^{19,37}.

Beim Episkin-Modell werden die Testsubstanzen topisch appliziert. Nach einer einstündigen Inkubation werden die Kulturen mit einer nicht-zytotoxischen UVA-Bestrahlung belastet. Nach weiteren 18 Stunden Inkubation führt man den MTT-Vitalitätstest durch. Dabei kommt es bei der Kombination von phototoxischen Substanzen mit UVA-Strahlung zu erhöhter Zellmortalität; phototoxische Substanzen können identifiziert werden⁵³.

Beim EpiDerm-Modell werden fünf verschiedene Testsubstanzen topisch appliziert. Daraufhin wird die Reaktion mit beziehungsweise ohne die nicht-zytotoxische Dosis von UVA-Strahlung und sichtbarem Licht evaluiert. Einen Tag nach der Bestrahlung erfolgt der MTT-Test, wodurch phototoxische Substanzen identifiziert werden⁵³. Liegt eine Reduktion der Gewebsvitalität von 50% oder weniger vor, so gilt die getestete Chemikalie als irritierend. Bei einer Gewebsvitalität von mehr als 50% geht man von einer nicht irritierenden Testsubstanz aus⁵⁴.

Das Testen auf Phototoxizität mit Hilfe des Skin Ethic-Modells verläuft ähnlich. Die Zellkulturen werden 18 Stunden mit den Testsubstanzen behandelt. Danach folgt die UV-Belastung beziehungsweise werden die Kontrollplatten ins Dunkle verfrachtet. Anschließend erfolgt die Inkubation über Nacht (meist ungefähr 18 Stunden). Anschließend wird ein MTT-Zellviabilitätstest vollzogen. Als phototoxisch werden Substanzen angesehen, die eine Toxizität von über 30% in Anwesenheit von UV-Licht aufweisen⁵⁵.

5.3.4.3. Beurteilung des Testsystems

Humane 3D-Hautmodelle weisen einige Nachteile auf. Sie sollten nicht als alleiniger eigenständiger Test herangezogen werden, sondern als Ergänzungstest betrachtet werden³⁷. Es sind nur wenige Modelle kommerziell verfügbar; als Beispiel sind Modelle von MatTek™, SKINETHIC, EPISKIN™ und CellSystems™ zu nennen.

Da Haarfollikel, Talg oder Schweißdrüsen in dem Modell nicht vorhanden sind, diese Elemente aber *in vivo* sensitiv reagieren könnten, wäre es möglich, dass dadurch ein Nachteil entsteht. Allerdings konnte das durch Experimente noch nicht festgestellt werden.

Bis jetzt gibt es noch keine überzeugenden Beweise dafür, dass photoallergische Effekte von Chemikalien durch H3D Modelle erkannt werden können. Zudem ist diese Methode nach wie vor sehr teuer, außerdem kann sie nicht in groß angelegten Routine-Tests verwendet werden^{5,18}. Es besteht die Gefahr, dass die humanen 3D-Hautmodelle Phototoxine, die oral oder parenteral in den Körper gelangen, nicht erkennen, obwohl sie eine ausreichend hohe Bioverfügbarkeit in der Haut aufweisen. Außerdem kann es sein, dass dieser Test schwach photoreaktive Chemikalien, die erst nach wiederholter Applikation photoallergisch wirken, nicht wahrnimmt³⁷.

Eventuell kann die Testsubstanz direkt die MTT reduzieren und die Dehydrogenase-Aktivität der zellulären Mitochondrien imitieren. Das ist aber nur dann ein Problem, wenn zur Zeit des MTT Tests, also 24 Stunden nach der Exposition der Testsubstanz, immer noch ausreichend große Mengen der Testsubstanz in oder auf dem Gewebe vorhanden sind. In diesem Fall kann sich die (wahre) metabolische MTT Reduktion von der (falschen) direkten MTT Reduktion unterscheiden³⁷.

Humane 3D-Hautmodelle weisen allerdings auch wichtige Vorteile auf. Anders als bei der Fibroblastenzelllinie der Maus beim 3T3 NRU PT ist es hier möglich, topische Applikationen diverser Testchemikalien und Präparate zu verwenden³⁷. Die Hautmodelle reflektieren die Parameter der Hautpenetration und die der Barrierefunktion des Stratum corneums. Es werden realistische Belastungsbedingungen simuliert. Zudem sind Zelllinien von menschlichem Ursprung gegenüber zytotoxischen Effekten unter UVA-Belastung resistenter als 3T3 NRU PT-Zellen³⁹. Die Bioverfügbarkeit von phototoxischen Substanzen wird bei humanen 3D-Hautmodellen besser reflektiert⁴⁶. Daher wird der H3D PT zusätzlich zum 3T3 NRU PT als Prüfmodell in der Kosmetik- und Chemieindustrie verwendet³⁷.

Der H3D PT kann eingesetzt werden, um mögliche falsch-positiv-Ergebnisse des 3T3 NRU PT zu korrigieren, dies ist vor allem durch das Stratum corneum möglich¹⁹. Dieser Ansatz wird auch von der OECD unterstützt. Allerdings gilt das nur für den topischen Gebrauch. H3D PT imitiert hierbei die *in vivo*-Situation besser als es der 3T3 NRU PT vermag.

Humane 3D-Hautmodelle sind für die Bewertung von phototoxischen Gefahren geeignet, doch dieser Aspekt ist mit Vorsicht zu betrachten, da die Penetrationsbarriere von *in vitro*-Hautmodellen dünner ist als die der Haut *in vivo*. Durch die erhöhte Permeabilität könnten bei Studien falsch positive Ergebnisse entstehen^{19,53}. Vorteilhaft ist, dass Studien aufgrund der relativen Unempfindlichkeit der Hautmodelle mit Suspensionen und Lösungen

durchgeführt werden können; es können also unlösliche wie auch unverdünnte Testchemikalien verwendet werden, auch extreme pH-Werte sind kein Problem^{19,37}.

5.4. *Ex vivo*-Studien an Human- und Schweinehaut

5.4.1. Allgemeines

Ex vivo-Studien bezeichnen Versuche an exzidiertem Haut verschiedener Organismen. Schweinehaut ist physiologisch und morphologisch mit der menschlichen Haut vergleichbar⁵⁶. Besonders die epidermalen und dermalen Schichten der Schweinehaut haben strukturelle, funktionelle und biochemische Ähnlichkeiten mit der menschlichen Haut⁵⁷. Die Epidermis ist dabei besonders interessant, bildet sie doch den ersten Bereich der Haut, in dem Reaktionen von exogenen Verbindungen und UVA-Strahlung die lebenden, proliferierenden Zellen stören können⁵⁸.

Die Haut des Menschen lässt sich mit der vom Schwein besser vergleichen als mit der Haut von Nagetieren^{56,59}. Besonders die Barriereigenschaften der Haut von Nagetieren unterscheiden sich stark von den menschlichen Bedingungen⁶⁰. Das ist der Grund, warum viele *ex vivo*-Studien am Schwein, wie zum Beispiel dem Hausschwein, vollzogen werden^{56,57,61}. In einigen Studien wurden durch *in vivo*-Modelle am Hausschwein phototoxische Effekte bei topischer Kurzzeit-Belastung und UVB-Strahlung erforscht^{62,63}.

In vivo-Versuche am Hausschwein sind aufgrund der schwierigen praktischen Durchführbarkeit nicht zu empfehlen. Die Größe dieser Tiere und die notwendigen Haltungsbedingungen lassen sich nicht mit den Arbeitsbedingungen in einem Labor vereinen. Zudem sind *in vivo*-Studien am Schwein weder ethisch noch finanziell vertretbar. Um auf die Vorzüge der Schweinehaut dennoch nicht verzichten zu müssen, greift man auf *in vitro*- beziehungsweise *ex vivo*-Versuche zurück. Hautkulturmodelle sind von Relevanz, da die Epidermis zur Zeit der Biopsie vollständig differenziert vorliegt. Außerdem ist Schweinehaut billig und einfach zu beschaffen, da es sich um Schlachtabfälle handelt. Mittlerweile gibt es viele *ex vivo*-Kulturmodelle, bei denen die Hautbiopsien von Menschen, Meerschweinchen, Mäusen oder Schweinen stammen. Diesen Modellen gehen häufig orale oder topische *in vivo*-Anwendungen voraus. Trotz dieser Entwicklungen werden die meisten der *ex vivo*-Hautmodelle für weitere klinische Zwecke, wie menschliche Gewebsexpansionen, Hautkrankheiten und für pharmakologische oder toxikologische Zwecke genutzt⁵⁶.

In vivo-Modelle von menschlicher Haut werden als Goldstandard bezeichnet, da hier eine hundertprozentige Übereinstimmung von Modell und Realität vorliegt. Allerdings sind *in vivo*-Modelle am Menschen aus ethischen und praktischen Gründen, besonders bei Untersuchungen von neuartigen Arzneiformen, nicht möglich. *Ex vivo*-Modelle am Menschen sind der beste Ersatz für humane *in vivo*-Modelle. Diese sind allerdings nicht leicht zu beschaffen, da menschliche Haut nur bei chirurgischen Abfällen oder Organspenden zur Verfügung steht und eine ethische Genehmigung notwendig ist. Aufgrund ihrer großen Fläche werden meist Hautareale von Rücken, Bauch und Brust verwendet. Wichtig ist dabei, die unterschiedlichen Absorptionsraten der unterschiedlichen Hautareale, die sich durch die

Hydratation, die Lipidkomposition und die Dicke des Stratum corneums ergeben, miteinzubeziehen.⁶⁰

5.4.2. Durchführung

Ein Stück Schweinehaut wird zunächst von Haaren beziehungsweise von Borsten befreit. Die verwendeten Hautstücke variieren in ihrer Größe von ungefähr fünf bis fünfzehn cm. Nach der Rasur wird das Unterhautfettgewebe der Rückseite der Hautstücke entfernt. Die Hautstücke werden gewaschen und können mit einem Netz fixiert werden, dadurch kann sich später die Probe gleichförmig ausbreiten. Es folgt die Applikation der Testsubstanz. Danach wird für 30 Minuten inkubiert. Darauf folgend wird für 15, 30, 45, 60 und eventuell auch für 90 Minuten bestrahlt^{57,61}. Kontrollgruppen bilden einerseits die Hautflächen, die nicht gereizt werden und andererseits Hautflächen, die zwar mit der Testsubstanz behandelt werden, aber nicht der UV-Strahlung ausgesetzt werden. Nach der Bestrahlung wird die Schweinehaut in Streifen geschnitten, entsprechend der Bereiche der verwendeten UV-Bestrahlung. Es folgt die Inkubation. Danach können die entsprechenden Ergebnisse bewertet werden^{56,61,64}.

5.4.3. Beurteilung des Testsystems

Aufgrund des ähnlichen Aufbaus der Hautschichten von Schweinehaut und menschlicher Haut lassen sich phototoxische Effekte an der Haut des Schweins besonders gut mit den entsprechenden Effekten an der menschlichen Haut vergleichen. Zudem ist es eine kostengünstige Methode, durch die sich *in vivo*-Versuche reduzieren lassen^{56,57}. Es muss natürlich beachtet werden, dass keine metabolischen Aspekte berücksichtigt werden.

5.5. Klinische Studien

5.5.1. Allgemeines

Zur Erforschung von Risiken, die davor durch *in vivo*- oder *in vitro*-Tests festgestellt wurden, werden Studien an Menschen abgewickelt (IV. *Guidance for Industry* (2003)). Das Arzneimittelgesetz (AMG), das laufenden Ergänzungen unterliegt, regelt unter anderem auch die Vorschriften von klinischen Studien. Dies gilt auch für die Untersuchung von Phototoxizität.

Besonders wichtig ist es, die Bedingungen bei klinischen Studien zu standardisieren, damit vergleichbare Ergebnisse erhalten werden. Internationale Richtlinien und nationale Gesetze müssen streng befolgt werden. Außerdem steht die Patientensicherheit im Vordergrund. Die Deklaration von Helsinki des Weltärztebundes (*World Medical Association*, 2000) ist für alle ethischen Aspekte von klinischen Studien zuständig. Dabei sind vor allem die *ICH-Guidelines (International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use)* zu erwähnen. Besonderes Augenmerk wird auf die 1996 festgelegte ICH6-Richtlinie zu „*Good Clinical Practice*“ gelegt. Auch die ICH9-Richtlinie zu „*statistical principles for clinical trials*“ ist hervorzuheben. Zudem sind auch die entsprechenden Richtlinien der EMEA und FDA Folge zu leisten¹⁹.

Die Ergebnisse der präklinischen und klinischen Studien sind entscheidend für die Beurteilung von Nutzen und Risiken eines Arzneimittels. Dabei ist das Verhältnis des Sicherheitsrisikos des Medikaments und des therapeutischen Nutzens wichtig. Außerdem wird geklärt, ob die Möglichkeit besteht, Alternativen mit besseren Sicherheitsprofilen einzusetzen¹⁹.

Im Folgenden werden die verschiedenen Phasen klinischer Studien erläutert:

Der Zweck von Phase I ist es vor allem zu eruieren, wie hoch die maximal verträgliche Dosis (*maximum tolerated dose*, MTD) einer Substanz ist. Zudem werden Bestimmungen zu Nebenwirkungen, Toxizitäten und Pharmakokinetik durchgeführt und dokumentiert. Bei den Testpersonen handelt es sich normalerweise um gesunde Freiwillige. Sie werden anhand entsprechender Einschluss- und Ausschlusskriterien in die Studie einbezogen oder nicht zur Studie zugelassen. Ein Studiendesign muss vereinbart werden. Bereits in dieser frühen Phase der Arzneimittelzulassung wird die Phototoxizität untersucht. Die MED wird an den Testpersonen vor und nach der Einnahme des Medikaments placebokontrolliert geprüft. Die MED ist die UV-Belastung, die ein gerade noch erkennbares Erythem mit scharfem Rand hervorruft. Als Strahlungsquelle kommt normalerweise ein gefilterter Sonnensimulator zum Einsatz. Vergleiche von Arzneimitteln innerhalb einer Stoffgruppe können durch den phototoxischen Faktor erfolgen²⁰.

$$\text{Phototoxischer Faktor} = \frac{\text{MED vor Medikamenteneinnahme}}{\text{MED nach Medikamenteneinnahme}}$$

Phase II dient der Prüfung auf Wirksamkeit und Verträglichkeit. Meist erfolgt die Durchführung mit nur einer Stichprobe, das bedeutet, alle Testpersonen erhalten die Behandlung, die in der entsprechenden Studie analysiert wird. Auch hier muss man sich auf ein Studiendesign einigen, damit es möglich ist, Vergleiche anzustellen. Angaben wie die Dauer der Behandlung und die Verwertbarkeit der Testpersonen müssen festgelegt und im Studienprotokoll vermerkt werden. Die Analyse der Ergebnisse verläuft deskriptiv^{19,20}.

In der Phase III, der randomisierten Phase, werden Substanzen in der Standardtherapie oder mit Placebos verglichen²⁰.

Meldungen und Publikationen von phototoxischen Reaktionen, die durch Medikamente ausgelöst werden, sind nach der Zulassung unerlässlich. Sinnvolle Folgen davon sind Warnhinweise, Änderungen des Beipacktextes, ein Chargenrückruf oder die Aufhebung der Marktzulassung, die sogenannte „*post marketing surveillance*“, wie sie zum Beispiel bei Nalidixinsäure, Benoxapofen und Demethylchlortetracyclin notwendig war^{19,20}.

5.5.2. Photopatch-Test

5.5.2.1. Allgemeines

Der Photopatch-Test (PPT, belichteter Epikutantest) ist ein Screeningtest, mit dem Photosensibilisatoren erkannt werden können. Es handelt sich um ein standardisiertes Photoprovokationsverfahren^{1,65}.

Bis in die frühen 1980er Jahre gab es keine Standardisierung des Photopatchtestverfahrens. Die erste standardisierte Methode entwickelte die *Scandinavian Photodermatitis Research Group* im Jahr 1982⁶⁵. Daran angelehnt wurde 1984 die *multicenter Photopatch Test Group*, Deutschsprachige Arbeitsgemeinschaft Photopatch-Test (DAPT), die von deutschen, österreichischen und schweizerischen Dermatologiezentren gegründet wurde. Die Bestimmung von photosensibilisierenden Substanzen, Bestrahlungsquellen und passenden Testverfahren folgte in der ersten Periode zwischen 1985 und 1990. In dieser Phase wurden 32 potentiell photosensibilisierende Substanzen getestet. Nach der Beurteilung wurden einige Substanzen entfernt und andere Chemikalien wurden stattdessen in das Testverfahren aufgenommen. Das war notwendig, da sich einige der getesteten Chemikalien als nicht relevant herausstellten. Andere Substanzen, wie Tiaprofensäure, sensibilisierten die Testpersonen während der Prozedur. Manche der Substanzen konnten topisch nicht untersucht werden, wie zum Beispiel Furosemid. Auch falsch negative Ergebnisse stellten ein Problem dar. Sie traten bei systemisch wirksamen Photosensibilisatoren wie topisch verabreichtem Furosemid, ausgelöst durch Metabolite, auf. Substanzen, die stattdessen in das Testverfahren aufgenommen wurden, waren Lichtfiltersubstanzen. Nach dieser Modifikation eröffnete sich die zweite Periode der Photopatchtestung von 1991 bis 1997. In dieser Zeit wurden 26 Substanzen untersucht. Die Ergebnisse wurden mit denen der ersten Periode verglichen. Daraus ergab sich der dritte, modifizierte Photopatchtest^{65,66}.

Aufgrund der vielen positiven Ergebnisse konnten zusätzlich zu den bekannten Reaktionsmustern, dem phototoxischen und dem photoallergischen Potenzial, zwei weitere Verläufe, nämlich *kombinierte Reaktionsmuster* und *plateauartige Reaktionsmuster*, differenziert werden. Bei ersteren sind sowohl phototoxisches als auch photoallergisches Potenzial vorhanden, bei letzteren kann ein Erythem und ein Infiltrat beobachtet werden. Es könnte sich hierbei um eine verzögerte phototoxische Reaktion handeln⁶⁵.

5.5.2.2. Durchführung

Am Rücken der Testperson werden beidseitig entlang der Wirbelsäule die Testsubstanzen beziehungsweise die Kontrollen angebracht. Die Testkonzentrationen werden mittels EpiDerm-Phototoxizitätstest bestimmt. Zur Applikation der Chemikalien sind lichtundurchlässige Aluminiumkammern (*Finn-Chambers Scanpor™*) nötig, damit keine kontaktallergische Dermatitis vorgetäuscht werden kann. Dies könnte zu einer Maskierung einer potenziellen photoallergischen Dermatitis führen. 24 Stunden später erfolgt die Entfernung der Substanzen. Die Hautfläche wird mit UVA-Strahlung belastet. Im Fall einer pathologisch erniedrigten UVA-Sensibilität kann die Bestrahlungsintensität individuell, entsprechend der MEDUVA (die UVA-Belastung, die zur MED führt) reduziert werden. Die

Reaktionen der bestrahlten Hautareale werden sofort ausgewertet. 24, 48 und 72 Stunden nach der Lichtbelastung erfolgen weitere Messungen der Reaktionen. Die bestrahlten Hautareale werden zum jeweiligen Zeitpunkt auch mit den Kontroll-Hautarealen verglichen, die zwar bestrahlt, aber nicht mit den Testsubstanzen behandelt wurden. Dadurch lassen sich Reaktionen, die allein durch UVA-Strahlung entstanden sind, sofort ausschließen. 48 Stunden nach der Behandlung mit den Testsubstanzen wird die Haut von den unbelichteten Kontrollgruppen befreit. Die Ergebnisse werden sofort optisch beurteilt (Tabelle 5, Abbildung 10) und dann noch einmal 24, 48 und 72 Stunden nach der Beseitigung der Testsubstanzen. Dadurch werden kontaktallergische Reaktionen gegenüber den Substanzen verhindert⁶⁵⁻⁶⁷.

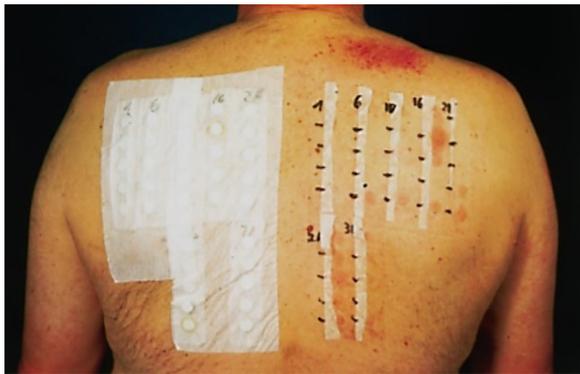


Abbildung 10: Photopatch Test: links: abgeklebte Kontrollgruppen und rechts: 24 Stunden nach der Applikation der Probesubstanzen und Lichtirritation nach Neumann et al.⁶¹.

Tabelle 5: Beurteilung der Testreaktionen beim Photopatchtest nach Neumann et al.⁶⁵.

| | |
|---|-----------------------------------|
| 0 | Keine Reaktion |
| 1 | Erythem |
| 2 | Erythem und dermales Infiltrat |
| 3 | Erythem und Papulovesikel |
| 4 | Erythem und Blasen oder Erosionen |

Bei einer unmittelbaren oder verzögerten Reaktion in Form eines Erythems und Infiltrats liegt eine phototoxische Reaktion vor. Bei einer verzögerten Reaktion als Erythem und Infiltrat, Papulovesikel, Blasen oder Erosionen handelt es sich um eine photoallergische Reaktion⁶⁵.

Unter den Modellen des Photopatchtests gibt es zwei Weiterentwicklungen, nämlich den Photoscratch- und den Photoprick-Test. Anders als beim Photopatchtest kommt es hier zu einer Perforation des Stratum corneums. Es folgt die Applikation der Testchemikalien auf die perforierten Hautareale. Dadurch können die Testsubstanzen mit der Epidermis in Kontakt treten ohne vorher das Stratum corneum durchdringen zu müssen.

Als Ergänzung zum Photopatchtest gibt es weiters die systemische Photoprovokation (SPP). Ein Problem von systemisch wirkenden Arzneimitteln ist, dass sie beim Photopatchtest oft zu falsch negativen Ergebnissen führen. Um dem entgegen zu wirken, gibt es die systemische Photoprovokation. Dabei wird eine bestimmte Hautfläche zur Kontrolle mit 10 J/cm² UVA-Licht bestrahlt. Es folgt die systemische Applikation des Arzneimittels. Wenn die höchste Plasmakonzentration erreicht ist wird ein weiteres Areal der Haut mit derselben Dosis belastet⁶⁵.

5.5.2.3. Beurteilung des Testsystems

Ein Vorteil dieser Phototoxizitätstests ist, dass sie die Situation am Menschen direkt widerspiegeln. Es ist möglich, phototoxisches von photoallergischem Potential zu unterscheiden. Ein Nachteil besteht allerdings in Bezug auf die Standardisierung^{46,67,68}. Es gibt viele Variationen bei der Vorgangsweise der Testprozedur. Zudem kann es zu inter-individuellen Unterschiedlichkeiten kommen. Mitunter sind auch ethische Aspekte problematisch^{5,47}.

5.5.3. UV-Erythemtest

5.5.3.1. Allgemeines

Das Erythem ist eine akut entzündliche Reaktion der Epidermis und tritt nach der Bestrahlung mit UVB-Licht auf. Der UV-Erythemtest bildet eine wissenschaftlich etablierte^{13,69}, einfache und nicht invasive Möglichkeit, ein Erythem nachzuahmen und zu quantifizieren⁷⁰. Dadurch kann das entzündungshemmende Potenzial lokal applizierter Arzneimittel ermittelt werden⁷¹.

5.5.3.2. Durchführung

Die Testung erfolgt auf zuvor definierten Testfeldern. Diese Areale erstrecken sich gleichmäßig zu beiden Seiten des Rückens, der die beste Lokalisation für die Bestrahlung darstellt, da er genügend Platz für die Ausführung der Testung bietet und gleichmäßig auf die UVB-Strahlung anspricht^{13,71}. Der Rücken ist zwar allgemein als die günstigste Lokalisation beim UV-Erythemtest bekannt, allerdings macht es laut Bruckner-Tuderman sehr wohl einen Unterschied, ob die Messung am oberen oder am unteren Teil des Rückens stattfindet⁶⁹, da die MED am unteren Rücken höher ist^{69,72}.

Der Erythemindex ist der Wert, den man durch die Subtraktion von den Werten der Ablesungsfelder vor der Bestrahlung und Testsubstanzapplikation (T_0) und den Werten nach 24 Stunden (T_1), beziehungsweise nach 48 Stunden (T_2) erhält^{73,74}. Der Erythemindex ist am oberen Rücken nach der Bestrahlung größer und weist eine stärkere Erythemantwort im Vergleich zum unteren Rücken auf⁶⁹.

Die parallele Ausrichtung der Testfelder ist von Bedeutung, da man so eventuelle physiologisch-anatomische Schwankungen des Körpers ausgleichen kann¹³. Bei der

Bestrahlung muss darauf geachtet werden, dass stets ein einheitlicher Abstand zwischen der Lichtquelle und der bestrahlten Haut eingehalten wird¹³.

Zunächst wird die minimale Erythemdosis, die MED, die die individuelle UVB-Dosis in mJ/cm^2 darstellt, berechnet. Das geschieht durch das Prinzip der Lichttreppe. Dabei wird die Testperson einer kontinuierlich steigenden Dosis von UVB-Strahlung ausgesetzt. Um exakter bestrahlen zu können, sowie zum Abdecken der Felder, die nicht bestrahlt werden sollen, werden dabei Hauttestschablonen benutzt, deren Felder entsprechend der zum Einsatz kommenden Testpflaster in Form geschnitten werden⁷¹. Die Fenster der Schablone können durch Klappen zu bestimmten Zeiten (zum Beispiel nach 10, 18, 35, 52, 69 und 86 Sekunden) geschlossen werden. Dadurch erhält man eine unterschiedliche Bestrahlungsdosis der Felder, die in mJ/cm^2 angegeben wird⁶⁹.

Nach 24 Stunden kann das Erythem visuell anhand der Krutmannskala beurteilt werden. Dieses Prinzip der Beurteilung ist ein numerisches, subjektives Verfahren, das ungenauer ist als die Messung durch das Mexameter. Es dient eher der Erueierung von Rötungen und unerwünschten Reaktionen, vor allem auf der unbestrahlten Haut, wie starken Rötungen oder Ekzemen.

Danach erfolgt die Messung mittels Mexameter, dabei wird jedes Feld dreimal gemessen. Anschließend wird der Mittelwert berechnet, um eventuelle Schwankungen möglichst ausschließen zu können⁷¹. Anhand der Lichttreppe (Abbildung 11) kann die Strahlungsdosis für jeden Studienteilnehmer individuell festgelegt werden⁷⁵. Man spricht von der T_0 -Wertbestimmung, diese liefert den Ausgangswert für die Messung der Hautfarbe¹³.



Abbildung 11: Beispiel einer Lichttreppe nach 24 Stunden nach Kessler⁷¹.

Im nächsten Schritt werden die Testfelder auf der einen Seite des Rückens meist mit der 1,5-fachen Menge der individuellen MED bestrahlt^{71,73}, wodurch das Erythem entsteht¹³. Dies geschieht mit Hilfe einer UVB-Lampe^{73,75}, einer optisch gefilterten Xenonbogenlampe⁶⁹ oder einer fluoreszierenden Lampe⁶⁹. Die 1,5-fache Menge der MED hat sich in früheren Studien als optimale Bestrahlungsdosis herausgestellt¹³, wenn die Testsubstanzen mit mäßiger antiinflammatorischer Wirkung nach der Bestrahlung appliziert werden⁷⁵. Die Testareale auf der anderen Seite des Rückens bleiben unbelichtet. Anschließend werden die Testsubstanzen auf das künstlich hervorgerufene Erythem topisch appliziert¹³. Zum erleichterten Auftragen der Testsubstanzen können spezielle Testpflaster mit Kammern verwendet werden⁷¹.

Nach 23 Stunden wird das Pflaster entfernt. Um Hautirritationen, die durch das Abziehen des Pflasters hervorgerufen werden, abklingen lassen zu können, ist eine Ruhephase

von einer Stunde zu empfehlen^{13,71}. Dann werden die bestrahlten sowie die unbestrahlten Testfelder zunächst anhand der Krutmannskala (Tabelle 6) beurteilt.

Tabelle 6: Die Krutmannskala zur Bewertung des Erythems. Die Stufe 1 entspricht der MED. Die Abbildung wurde der Arbeit von Kessler entnommen⁷¹.

| | |
|---|--|
| 0 | kein Erythem |
| 1 | gerade noch erkennbares Erythem mit scharfen, deutlichen Rändern |
| 2 | hellrosa Erythem |
| 3 | deutliches Erythem, keine Ödeme, keine Schmerzhaftigkeit |
| 4 | feuerrotes Erythem, leichtes Ödem, geringe Schmerzhaftigkeit |
| 5 | livides Erythem, starkes Ödem, starke Schmerzhaftigkeit, eventuell mit Blasenbildung |

Danach folgt die Mexametermessung, die wiederum drei Mal pro Testfeld vorgenommen wird, wodurch der T_1 -Wert eruiert wird¹³. Zur Kontrolle werden Positiv- sowie Negativkontrollen durchgeführt. Durch die Positivkontrollen ist es möglich, die entzündungshemmende Wirkung der Testsubstanz gegenüber eines erwartbar positiven Ergebnisses durch eine inflammatorisch wirkende Substanz zu veranschaulichen¹³. Bei Negativkontrollen handelt es sich um unbehandelte Kontrollfelder. Bei einigen Studien werden daraufhin noch einmal Testsubstanzen auf dem Erythem platziert und 24 Stunden später, zum Zeitpunkt T_2 , wird wiederum mit dem Mexameter gemessen und bewertet¹³.

Allgemein ist zu beachten, dass die Erythembildung durch Beleuchtung und Temperatur beeinflusst werden kann. Entsprechende Maßnahmen wie Lokalität und Raumbedingungen sind also einheitlich zu gestalten. Auch die Tageszeit spielt bei den Messungen eine Rolle, da die Durchblutung der Haut variieren kann. Allgemein lässt sich also sagen, dass die Bedingungen, unter denen die Messungen vonstattengehen, unbedingt zeitlich und örtlich einheitlich sein müssen, um vergleichbare Ergebnisse zu erhalten⁷¹, zusätzlich zur ohnehin notwendigen Einheitlichkeit bei der Anzahl der Studienteilnehmer, der Größe der Bestrahlungsfläche sowie der Strahlungsintensität⁷¹.

Wie oben schon erwähnt erfolgt beim UV-Erythemtest die Angabe der Bestrahlungsintensität mithilfe der MED. Die MED liefert allerdings aufgrund der Subjektivität der Ablesung der Erythemstärke oft recht ungenaue Werte. Daher wurde der Begriff der SED (Standard Erythemdosis) eingeführt. Die SED ist im Vergleich zur MED stärker standardisiert. Es handelt sich um eine festgelegte Dosis von 100 J/m^2 , die durch das CIE-Erythem-Aktionsspektrum und das Emissionsspektrum der Strahlungsquelle biologisch gewichtet ist. Somit ist die SED unabhängig von der Strahlungsquelle. Durch die SED ist eine klare Unterscheidung der Hauttypen möglich⁷⁶. Daher findet die SED in einigen Studien Verwendung⁷⁶⁻⁸⁰.

5.5.3.3. Beurteilung des Testsystems

Der UV-Erythemtest bietet die Möglichkeit, Tierversuche zu vermeiden und Ergebnisse direkt auf menschlicher Haut studieren zu können^{13,71}. Außerdem werden nur kleine Hautareale belastet, dadurch kann man systemisch unerwünschte Wirkungen weitgehend ausschließen^{13,71}. Ein weiterer Vorteil ist die kombinierte Anwendung der visuellen Bewertung und der objektiv gemessenen Beurteilung der Erythembildung. Denn dadurch ergibt sich eine höhere Qualität der Charakterisierung des Erythems. Auf Nebenwirkungen oder Reizungen der Haut kann so besser eingegangen werden⁷¹.

Wie bereits erwähnt, kann man die Stärke der Ausprägung eines Erythems mittels Krutmannskala visuell bewerten. Diese Methode bringt allerdings einige Nachteile mit sich, da sie auf subjektiver Wahrnehmung beruht. So spielt beim Wahrnehmen der Farbe des Erythems die Beleuchtung der Umgebung eine Rolle. Auch die Hautfarbe der Studienteilnehmer, der Blickwinkel und die Erfahrung der testenden Person sowie ihre visuelle Fähigkeit sind von Bedeutung. Außerdem sind entzündliche Prozesse wie die Vasodilatation noch nicht sichtbar und können folglich auch nicht visuell wahrgenommen werden⁶⁹.

Daher kommt dem Reflex-Spektrometer eine große Bedeutung zu, denn bei diesem handelt es sich um ein Messverfahren, das objektiv und sensitiv den Grad der Rötung der Haut eruieren kann. Bei den Haut-Reflex-Messgeräten wird zwischen dem Chromameter⁶⁹, das das CIE L*a*b* Farbsystem zur Bewertung nutzt, wobei L* für die Helligkeit und a* und b* für die Hautfarbe beziehungsweise den Farbton stehen⁸¹, und den simpleren DermaSpektrometer und Mexameter, die auf der Verwendung des Erythem-Melanin-Index beruhen, unterschieden⁶⁹.

5.5.4. Mexameter

5.5.4.1. Allgemeines

Beim Mexameter handelt sich um eine rasche, genaue und einfache Messmethode¹³. Sie dient der Beurteilung der Farbintensität und der Pigmentierung der Haut über die Bestimmung der Anteile von Melanin und Hämoglobin in der Haut⁶⁹. Bei Melanin und Hämoglobin handelt es sich um die Hauptchromophore der Haut, die zu einem großen Teil für die Färbung der Haut verantwortlich sind⁶⁹.

Das Prinzip der Messung beruht auf der Fähigkeit einzelner Strukturen des menschlichen Organismus, Licht unterschiedlicher Wellenlänge unterschiedlich stark zu absorbieren und zu reflektieren. Durch die Erweiterung der Gefäße kommt es zu einer gesteigerten Durchblutung und folglich zur Rötung der Haut⁴. Hämoglobin zeigt im grünen Spektrum eine besonders hohe Absorption, im roten Wellenlängenbereich hingegen absorbiert es sehr wenig. Melanin absorbiert Wellenlängen aus dem gesamten Spektrum, besonders im kurzwelligen Bereich. Beim Erythem wird grünes Licht vermehrt absorbiert und weniger reflektiert⁸². Eine Erythembildung und die damit verbundene Hautrötung hat somit eine veränderte Absorption von grünem Licht zur Folge, nicht aber von rotem Licht⁴. Das erklärt warum bei Hellhäutigen das Erythem eine rote Färbung annimmt.

Durch das Verhältnis der Reflexion von rotem und grünem Licht lässt sich der Erythemindex errechnen. Der Melaninindex ergibt sich auch aus der Ratio der Reflexion von rotem Licht zu der von grünem Licht, allerdings ändert sich dabei im Zuge der Hautrötung bei beiden Wellenlängenbereichen das Ausmaß der Reflexion. Es gilt, je stärker die Pigmentierung, desto mehr wird in beiden Wellenlängenbereichen absorbiert. Die digitale Sonde der Messeinheit besteht aus Leuchtdioden, welche Wellenlängen von 568 nm, 660 nm und 880 nm aussenden und einem Empfänger, der das Licht, das die Haut reflektiert, misst. Aufgrund der Anordnung von Sender und Empfänger ist nur die Erfassung von diffus reflektiertem und gestreutem Licht möglich.

Der Melaningehalt ergibt sich aus der Berechnung der Absorption von den Wellenlängen 660nm und 880 nm. Für die Erfassung des Hämoglobingehaltes ist die Berechnung der Absorption bei der Wellenlänge 568 nm nötig. Sendet man eine weitere Wellenlänge von 660 nm aus, so können Farbeinflüsse weitgehend verhindert werden. Der Melaninindex sowie der Erythemindex werden digital am Bildschirm angezeigt (Abbildung 12)^{4,13}.



Abbildung 12: Moxameter mit digital angezeigtem Melanin- und Erythemindex nach Stump¹³.

5.5.4.2. Durchführung

Es gibt einige Richtlinien, die durch Fullerton et al. 1996 und E. Pierard 1998 eingeführt und empfohlen wurden^{82,83}. Durch diese allgemeinen Regeln zur Durchführung ist es einfacher die Messergebnisse zu vergleichen. Dabei werden vor allem Unterschiede der einzelnen Testpersonen bezüglich Alter, Geschlecht und Hauttyp thematisiert. Auch auf Variablen wie Luftfeuchtigkeit, Temperatur und allgemeine Raumbedingungen wird eingegangen. Besonders die Dauer der Messung und der Druck durch die Messsonde auf die Haut sind von Bedeutung. Der Abstand zwischen der eingesetzten Lichtquelle und der bestrahlten Hautfläche muss einheitlich sein¹³. Messungen sollten bei 19-23 °C und 40-60% relativer Luftfeuchtigkeit erfolgen. Die zur Testung ausgewählten Hautareale sollten für zumindest 30 Minuten ohne Bedeckung vorliegen und möglichst wenig behaart sein⁴. Zudem wird eine liegende Position der zu testenden Person empfohlen. Der Proband sollte 5 Minuten vor Beginn der Messung ruhen⁷¹. Außerdem sollte man Kontrollfelder in die Messung

miteinbeziehen sobald die Haut medikamentös behandelt oder chemisch beziehungsweise mechanisch irritiert wird^{4,69,82,83}.

Im Zuge des UV-Erythemtests kommt das Mexameter meist drei Mal zum Einsatz. Zunächst werden die Testareale vor der Bestrahlung gemessen und dann erneut nach 24 Stunden (Tag 1) und nach 48 Stunden (Tag 2). Es gibt auch Studien, bei denen noch ein viertes Mal nach 72 Stunden (Tag 3) gemessen wird¹³. Wie oben schon erwähnt werden jeweils drei Messungen⁶⁹ pro Testfeld vorgenommen und anschließend wird aus den drei Ergebnissen der Mittelwert berechnet¹³. Durchblutungsschwankungen kann man vermeiden, indem man die Messungen immer zur selben Uhrzeit durchführt⁷¹. Die Sonde wird senkrecht auf das zu prüfende Hautareal aufgesetzt (Abbildung 13). Durch eine Feder, die ein Element des Messkopfes darstellt, kann ein konstanter Druck auf die Hautfläche ausgeübt werden. Das Einfallen von natürlichem sowie künstlichem Licht muss während der Messung vermieden werden. Nach beendetem Messvorgang ertönt ein akustisches Signal und die Messwerte werden digital angezeigt¹³.



Abbildung 13: Messung mittels Mexameter. Hier wird nur die Sonde gezeigt. Die Abbildung wurde der Arbeit von Stump entnommen¹³.

5.6. In silico-Studien

5.6.1. Allgemeines

Bei *in silico*-Studien handelt es sich um Prozesse, die am Computer ablaufen und für die Bestimmung von Phototoxizität genutzt werden. „*Silico*“ steht hierbei für Silizium, ein wichtiger Stoff in der Halbleiterindustrie. Diese Bezeichnung ist als Anspielung daran zu verstehen, dass es sich bei *in silico*-Testverfahren um computerunterstützte Berechnungen handelt.

Diese Methode bildet mit *in vivo*- und *in vitro*-Versuchen das dritte Standbein von toxikologischer Forschung. Durch *in silico*-Testmethoden können toxikologische Erkenntnisse mit computergestützten Verfahren verbunden werden⁸⁴, da es von großem Interesse ist, ressourcenschonend zu arbeiten und bereits vor den 3T3 NRU P-Testungen computergestützt sinnvolle Vorauswahlen unter den zu untersuchenden Verbindungen zu treffen.

Computerunterstützte Methoden machen die molekulare Photochemie und Photostabilität, die stark mit der Photosicherheit verbunden sind, immer zugänglicher. Maschinelles Lernen, also das Wissen, das von Computern generiert wird, bewährt sich als brauchbare Technik zur Verarbeitung von großen Datenmengen. Auch für die Interpretation von Daten bezüglich der Gefahr, die Arzneimittel darstellen, ist es geeignet. Es gibt deutliche Anzeichen, dass phototoxisch wirkende Stoffe einige kausale Eigenschaften gemeinsam haben, dies kann bei der Beschreibung von Phototoxizität durch Computermodelle genützt werden⁸⁵.

In der ersten Phase der Erforschung von Arzneimitteln ist die multidimensionale Optimierung von ADME-Tox-Parametern (Absorption, Verteilung, Metabolismus, Exkretion und Toxikologie) besonders wichtig. Dabei werden Tests verwendet, die einen hohen Durchsatz bewältigen können. Dagegen werden bei Arzneimittelsicherheitsprüfungen Tests mit geringerem Durchsatz benutzt, um Substanzen auswählen zu können, die ein optimales präklinisches Sicherheitsprofil vorweisen. Für die Beurteilung der Photosicherheit kann diese Lücke durch Kaskaden von *in silico*- beziehungsweise *in vitro*-Ansätzen gefüllt werden. Dadurch ist es möglich, nicht phototoxische Arzneimittel in Übereinstimmung mit anderen ADME-Tox-Kriterien zu identifizieren, um *in vivo*-Photosicherheitsstudien zu verhindern.

Der Computertest kann hunderte Komponenten gleichzeitig bearbeiten. Suggestiert durch *in silico*-Methoden, löst eine positive Voraussage die quantitative Bestimmung von UV-Extinktionskoeffizienten für typischerweise ein bis fünf Komponenten bei passender Wellenlänge aus. Der *in vitro*-Test 3T3 NRU PT wird bei bis zu fünf Komponenten durchgeführt, die beim *in silico*-Test positiv waren, um das phototoxische Potenzial zu bestätigen⁸⁵. Da der 3T3 NRU PT Ressourcen verbraucht, besteht der Bedarf, die Zahl der zu testenden Komponenten zu reduzieren⁸⁶. Ein positives Ergebnis in einem der *in vitro*-Verfahrensschritte löst die mechanistische Beurteilung und weiterführend chemische Optimierungszyklen aus.

5.6.2. Übersicht über *in silico*-Modelle

5.6.2.1. OSIRIS

Das OSIRIS (*optimized strategies for risk assessment of industrial chemicals through integration of non-test and test information*) ist ein Projekt mit dem Ziel integrierte Teststrategien weiterzuentwickeln, die für REACH (*registration, evaluation, authorisation and restriction of chemicals*) geeignet sind. Weiters soll dabei vermehrt auf den Nutzen von „*non-testing-information*“ gesetzt werden. Bei REACH handelt es sich um eine Verordnung, die die Registrierung, Evaluierung, Genehmigung und Beschränkung von Chemikalien betrifft. REACH basiert auf einem Vorbeugeprinzip, das auch das Ziel verfolgt Tierversuche zu reduzieren⁸⁶.

5.6.2.2. SAR und QSAR

Bei den Strukturaktivitätsbeziehungen (Structure Activity Relationships, SAR) wird durch qualitative Angaben dargestellt, ob eine Chemikalie toxikologisches Potenzial aufweist. Man bezieht sich auf Strukturen, die die entsprechende Wirkung (Phototoxizität) auslösen.

Die Quantitativen Strukturaktivitätsbeziehungen (quantitative structure activity relationships, QSAR) sind die weiterentwickelte Form der SAR, die auf mathematischen Modellen basiert. Sie dient der Quantifizierung der Beziehung zwischen Struktur und Wirkung⁸⁴. QSAR folgt der Ansicht, dass sich die Wirkung eines Moleküls aus seiner Struktur ergibt. Das bedeutet, dass man aus der Struktur eines Moleküls Voraussagen zu seiner Toxizität treffen kann. Bisher war das nur durch *in vivo*- und *in vitro*-Versuche möglich. QSAR ist somit eine nützliche Methode um Tierversuche zu reduzieren. Dadurch sinken sowohl der Aufwand als auch die Kosten⁸⁴. Es wird also vorhandenes Wissen genutzt um ohne Tierversuche Voraussagen treffen zu können.

Zur Bewertung von Phototoxizität können die eben geschilderten Rechenmodelle herangezogen werden. Sie basieren auf PAHs sowie den Grenzflächenorbitalen HOMO und LUMO.

PAHs (*polycyclic aromatic hydrocarbons*, polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe) werden wahrscheinlich von gesättigten Kohlenwasserstoffen unter sauerstoffarmen Bedingungen gebildet. Kohlenwasserstoffe mit sehr geringer molekularer Masse fungieren wahrscheinlich als Vorläufer von polyzyklischen, aromatischen Komponenten. Mit Hilfe von Pyrosynthese kann aus Kohlenwasserstoffen mit geringer molekularer Masse PAH entstehen. Das ist bei einer Temperatur von über 500 °C möglich. Dabei brechen C-C und C-H Bindungen und freie Radikale werden gebildet. Diese Radikale durchlaufen eine Dehydrierung und formen aromatische Ringe. Die meisten der großen PAHs, die aus mindestens vier Ringen bestehen, sind karzinogen, mutagen und resistent gegenüber enzymatischer Zersetzung. Auch Phototoxizität kann so durch sichtbares Licht oder UV-Bestrahlung induziert oder verstärkt werden.

Die Grenzorbitale HOMO (*highest occupied molecular orbital*) und LUMO (*lowest unoccupied molecular orbital*) können respektiv für die Messung der molekularen Kapazität, die notwendig ist, um ein Elektronenpaar abzugeben oder aufzunehmen, verwendet werden. Der Energieunterschied zwischen ihnen, GAP, zeigt wie viel Energie notwendig ist, um ein Elektron von HOMO zu LUMO anzuregen. Diese Energie ist proportional zur Häufigkeit des absorbierten Photons (GAP_{fn}). Außerdem zeigt die Energiedifferenz zwischen HOMO und LUMO auch die Energie, die Phototoxizität in den Molekülen induziert. Komponenten mit größerer GAP bei konstanter Lichtintensitätsbelastung absorbieren bei niedrigeren Wellenlängen und weisen eventuell größere Reaktivität, also höhere Phototoxizität, auf. Die absolute Härte η hat, ebenso wie GAP, großen Einfluss auf photoinduzierte Toxizität. Die absolute Härte η ist als $GAP/2$ definiert, sie ist das Maß der Stabilisierungsenergie von aromatischen Systemen und direkt proportional zu der Stabilität von PAHs⁸⁷.

Phototoxische Effekte von bestimmten Stoffgruppen, die durch (Q)SAR vorausgesagt wurden, sind zum Beispiel Fluoroquinolone durch Hayashi im Jahr 2005, Chinin-Derivate durch

Waddell et al. im Jahr 1997, Phenyl- und Benzoylpyrrole durch Laatsch et al. im Jahr 1995, trizyklische Thiophene durch Marles et al. im Jahr 1992 und wie oben schon erwähnt polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe (PAHs)⁸⁶.

5.6.3. Allgemeine Beurteilung der *in silico*-Testsysteme

Ein besonderer Vorteil von *in silico*-Analysen besteht darin, dass bereits vor der Synthese durch virtuelle Vorhersagen von Verbindungen Ansätze für sinnvolles *Drug Design* ermöglicht werden. Durch diese Vorgangsweise wird ein deutlich verbreitertes Feld an Arzneistoffen für Testungen zugänglich. Wenn auf diesem Weg keine passenden Kandidaten gefunden werden können, ist eine erhöhte Risikoabschätzung notwendig und *in vivo*-Tests beziehungsweise Studien am Menschen müssen durchgeführt werden. Dies erfolgt unter Abwägung der Nutzen-Risiko-Ratio, gemäß der therapeutischen Indikation und der Behandlungsdauer.

Durch die Rationalisierung und Voraussage von Phototoxizität durch maschinelles Lernen wird auch die Vermeidung von Tierversuchen unterstützt, wenn eine angemessene Genauigkeit der zugrundeliegenden Modelle vorliegt. Schmidt und Wenzel konnten zeigen, dass maschinelles Lernen einige Vorteile mit sich bringt⁸⁵: Mit Empfindlichkeiten von 90% und 86% gegenüber externen phototoxischen Substanzen zeigten sowohl die Phototoxizität-*in vitro*-Modelle (PIV) als auch der Datensatz der klinischen Photosensitivierungsmodelle (PIH) eine hohe statistische Voraussagekraft bezüglich der Deduktion von phototoxischen Stoffen. Dabei war die falsch-positiv-Rate relativ niedrig mit Spezifitäten von 77% und 82% für externe PIV- und PIH-Sets. Dieses Ergebnis zeigt die Fähigkeit kombinierter Struktur- und Spektralinformationen, phototoxische Effekte auf realistische und genaue Weise zu beschreiben.

In einem Bewertungsbaum zur Bestimmung von nicht phototoxischen Arzneimitteln bietet es sich an, mit *in silico*-Methoden zu beginnen, gefolgt von der Bestimmung der Absorption von UV-Licht beziehungsweise sichtbarem Licht und dem 3T3 NRU PT. Nur wenn man durch diese Verfahren keinen Erfolg hat, werden *in vivo* präklinische Studien und/oder klinische Studien durchgeführt. Das computergestützte Verfahren stellt folglich ein zentrales Element für die (Vor-)Einteilung der Substanzen dar.

Computergestützte Modelle können bei synthetisierten Molekülen, aber auch bei virtuellen Molekülen, eingesetzt werden und so früh Informationen dazu liefern, ob Bedenken hinsichtlich der Phototoxizität vorliegen.

Im Gegensatz zu toxischen Nebenwirkungen, die durch *off-target*-Pharmakologie hervorgerufen werden, ist die Phototoxizität von Molekülen in den meisten Fällen unabhängig vom Wirkmechanismus des Arzneimittels und der Indikation der Erkrankung. Stattdessen ergibt sich die Phototoxizität aus spezifischen molekularen, physikalischen und chemischen Eigenschaften, die der photochemischen Reaktivität unter Bestrahlung mit UV/VIS-Licht ähneln.

Bei Schmidt und Wenzel konnten durch die Modelle, die unabhängig für *in vitro*-3T3 NRU-PT und klinische Photosensibilisierungsdaten gebildet wurden, bei externen chemodiversen Daten hervorragende Rechengenauigkeiten von 86% und 89% erreicht werden. Bemerkenswert ist auch, dass die Modelle sich zudem durch Empfindlichkeiten von 90% und 86% für phototoxische Substanzen auszeichnen.

Da der 3T3-Datensatz aus verschiedenen Klassen von phototoxisch wirkenden Substanzen über Arzneimittel hinaus zusammengestellt wurde, können die abgeleiteten Berechnungsmethoden allgemein zur Vorhersage der Photosicherheit von Verbindungen über die Klasse von Arzneimitteln hinweg angewendet werden.

Moderne Computertechnik kann UV-Absorption zu angemessenen Kosten modellieren. Um eine visuelle Analyse und chemische Interpretation von Voraussagemodellen zur Verfügung zu stellen, haben Schmidt et al. 2019 ein einfaches Konzept, das „*Split Response Maps*“-Konzept, ins Leben gerufen. Dieses Konzept erlaubt das rückläufige Bestimmen der Anteile der Substanzen oder molekularer Fragmente bei einer modellierten Eigenschaft, hier Phototoxizität⁸⁵.

Die Anwendung von Schmidt et al. 2019 auf den Glucocorticoidrezeptoragonisten 1 führte zur Identifizierung eines neuen phototoxisch wirkenden Stoffes, Piperazinylisochinolon, und ermöglichte dessen rational gesteuerte synthetische Eliminierung, zu einem nicht phototoxischen Derivat⁸⁵.

Zusammenfassend lässt sich erwähnen, dass *in silico*-Testmethoden, im Vergleich zu *in vitro*-Verfahren, kosteneffektiv arbeiten und biologische Aktivitäten in kurzer Zeit voraussagen können. Dadurch sind *in silico*-Methoden in der Lage die Zahl der *in vitro*-Testungen, wie zum Beispiel durch 3T3 NRU PT, zu senken⁸⁶. Bei *in silico*-Messmethoden handelt es sich um ein recht neues Konzept, das noch einiger Forschung und Weiterentwicklung bedarf. Es ist anzunehmen, dass im Bereich der *in silico*-Verfahren in den nächsten Jahren große Fortschritte erreicht werden und entsprechende Methoden folglich verstärkt etabliert werden. *In silico*-Versuche stellen ein zukunftsorientiertes Modell dar, das das Potenzial hat, schnell, effektiv und effizient zu arbeiten.

6. Diskussion zu den Testmethoden

6.1. Allgemeines

Bei der wissenschaftlichen Untersuchung des phototoxischen Potentials von Substanzen sollten mehrere verschiedene Testmethoden kombiniert werden. Durch Verwendung verschiedener Methoden kann man einzelne Zufallsbefunde ausschließen und das Risiko falscher Schlussfolgerungen senken. Durch den Vergleich aussagekräftiger Ergebnisse verschiedener Methoden und eine sorgfältige Bewertung der verschiedenen Einflussfaktoren können Schlussfolgerungen von allgemeiner Gültigkeit gezogen werden¹⁹. Es gibt keinen einzelnen *in vivo*- oder *in vitro*-Test, der als einziger Maßstab herangezogen werden kann. Erschwert wird eine systematische Analyse zusätzlich durch die Tatsache, dass phototoxische Substanzen unterschiedliche Effekte in den *in vivo*- beziehungsweise *in vitro*-Methoden auslösen können. *In vitro* können phototoxische Substanzen sowohl UVA- als auch UVB-Strahlung absorbieren. *In vivo* ist aber meist nur die UVA-Strahlung für phototoxische Effekte verantwortlich¹⁹. Dieser Aspekt muss bei der Studienplanung miteinbezogen werden, beispielsweise durch den Einsatz von UVB-Filtern.

6.2. Methodenvergleich

Die *ICH-Guideline 10* aus dem Jahr 2012 gibt einige Empfehlungen für die Durchführung von klinischen Phototoxizitätsstudien, um sinnvolle Ergebnisse und höhere Vergleichbarkeit zu erzielen. Aussagekräftige Methoden sollten eine hohe Sensitivität sowie Spezifität aufweisen. Die Falsch-positiv- und die Falsch-negativ-Rate sollten also niedrig sein. Besonders das Erreichen einer hohen Sensitivität, also das geringe Vorkommen von Falsch-negativ-Ergebnissen, ist von Bedeutung, da bei Falsch-negativ-Resultaten normalerweise keine weiteren Photosicherheitsevaluierungen vollzogen werden. Eine weitere Empfehlung betrifft die Bestrahlungsintensität bei *in vitro*- und *in vivo*-Phototoxizitätsstudien. Diese sollte im Bereich von 5 bis 20 J/cm² liegen¹².

6.2.1. Präklinische *in vivo*-Methoden

Die Phototoxizitätsprüfung von Testsubstanzen *in vivo* am Tier ist äußerst relevant für eine präklinische Prognose von arzneimittelinduzierter Phototoxizität im Menschen. Dennoch gibt es keine einzelne Standardmethode, die sich flächendeckend etabliert hat^{88,89}. Im Folgenden wird darauf eingegangen, welche Labortiere häufig verwendet werden und in welchen Größenbereichen sich die experimentellen Parameter bewegen.

6.2.1.1. Photo Hen`s Test

Der Photo Hen`s Test wurde entwickelt, um Tierversuche am lebenden Organismus zu reduzieren. Die Methodik liegt zwischen *in vivo*- und *in vitro*-Methode. Der Test erlaubt eine grobe Unterscheidung zwischen stark, moderat, schwach und nicht-phototoxischen Chemikalien. Er wird für lokal und systemisch applizierte Arzneimittel verwendet^{19,31}. Der

Versuchsaufbau besteht aus Inkubation, Behandlung von Eiern mit Testsubstanzen, Bestrahlung und Bewertung der Phototoxizität^{31,90}.

Der exakte Versuchsaufbau variiert in der Literatur. Verwendete Lampenmodelle sind Philips TL 09/40W^{29-31,91} und Philips TL 12 W/09⁹². Die am häufigsten eingesetzte Bestrahlungsdosis ist 5 J/cm^2 ^{29-31,91,93}. Die Beurteilung der experimentellen Endpunkte (Hämorrhagie, Membranverfärbung und Tod des Embryos) erfolgt meist in einem Beobachtungszeitraum von 24 Stunden nach Bestrahlung^{30,31,93}. In weiterentwickelten Modellen des PHET wird auch Koagulation als zusätzlicher Parameter bewertet⁹³. Die Bewertung der Effekte wird in Studien direkt nach Verabreichung der Testsubstanz, nach 5, 15, 30 und 45 Minuten, einer Stunde, 2, 4, 6, 8, 10 und maximal 24 Stunden nach Bestrahlung durchgeführt²⁹, wobei 24 Stunden die gängigste Variante ist^{29,91,94}. Diese Methode wurde vorrangig in den späten 90er-Jahren zur Datenerhebung verwendet²⁹. Es existieren aber auch aktuellere Studien^{91,93,94}.

6.2.1.2. Phototoxizitätstests an Ratten

Ratten sind nach Meerschweinchen die am häufigsten für *in vivo*-Phototoxizitätstests verwendeten Versuchstiere^{88,95}. Hierzu ist anzumerken, dass die Haut von Nagetieren eine schwächere Barrierefunktion aufweist als Humanhaut, was die Übertragbarkeit von an Rattenhaut gewonnenen Daten auf die Situation am Menschen einschränkt. Es besteht die Möglichkeit einer Überschätzung des Risikos für den Menschen, wenn man lediglich die an Nagetieren gewonnene Daten für eine Risikoabschätzung betrachtet⁹⁶. Phototoxizitätstests an Ratten sind relativ schnell und mit einer relativ kleinen Zahl an Versuchstieren durchführbar⁹⁷.

Der Ablauf von Phototoxizitätsstudien an Ratten variiert in der Literatur¹². Grundsätzlich sind bei der Tierhaltung während der gesamten Studiendauer die bei Tierversuchen vorgeschriebenen Regeln einzuhalten. Die Haltungsbedingungen müssen angemessen sein und müssen dokumentiert werden, beispielsweise Temperatur, Zeiten von Dunkelheit und Licht, Zugang zu Wasser sowie Futter und adäquate Käfiggröße. Hierfür maßgebliche Richtlinien sind beispielsweise *Guidelines from the Institution Animal Care and Ethical Committee of University of Shizuoka*⁹⁸⁻¹⁰⁰, *Standard Guidelines of the National Organization for Drug Control & Research (NODCAR)*¹⁰¹ oder *Guideline of Kaken Pharmaceutical Co. Ltd*^{95,102,103}.

Die genaue Durchführung der Studien variiert, jedoch kann das Vorgehen wie folgt grob zusammengefasst werden: Nach der Akklimatisierung der ausgewählten Ratten werden die Testsubstanzen oral^{97,101,103-109} oder dermal^{98-100,110} verabreicht. Auch beide Applikationsarten können innerhalb einer Studie in unterschiedlichen Gruppen von Ratten durchgeführt werden^{95,102}. Die Applikation kann entweder als *single-dose*^{88,89,97,102,104} oder *repeated-dose*^{101,105,106,109} erfolgen. In manchen Studien kommen beide Vorgehensweisen zum Einsatz^{102,103}. Danach folgt entweder eine Erholungsphase von 30 Minuten^{89,95,102,104} bis zu einigen Stunden^{89,97,99,100,108} oder die ausgewählten rasierten Hautstellen werden sofort bestrahlt¹⁰⁷. Dabei werden Hautareale, die nicht bestrahlt werden sollen, meist mit Folie

geschützt^{99,102,103,106}. Die Tiere werden häufig anästhesiert, um die Rasur durchführen zu können sowie eine exakte Bestrahlung zu garantieren^{99,103,106,107}. Das ist vor allem nötig, wenn die abdominale Haut das Ziel der Bestrahlung ist^{98,108,110}. Die Abstände zwischen der Lampe und der zu bestrahlenden Hautfläche liegen meist zwischen 10 und 30 cm^{95,101,102}.

Für die Bestrahlung werden verschiedene Leuchtmittel herangezogen. Innerhalb von Arbeitsgruppen wird meist ein Lampentyp beibehalten, doch zwischen unterschiedlichen Arbeitsgruppen kann man keine favorisierten Modelle erkennen. Seto et al. arbeiteten 2009 - 2019 mit Schwarzlicht als UVA-Quelle (Modell FL20S BL/DMR)^{98-100,107,108,110}. Yonezawa et al. benutzten 2015 - 2019 das FL 20S/ BL/DMR-Gerät als UVA-Lichtquelle^{95,97,102,103} und das TL20W/12RS-Modell als UVB-Lichtquelle^{97,102,103}. In anderen Studien wird eine Xenon-Bogenlampe verwendet^{88,106}. Als Bestrahlungsdosis bei UVA-Bestrahlung wird häufig 10 J/cm² gewählt^{89,95,97,102,103,105,106}, aber auch 18 J/cm² wird verwendet^{88,97,103}. 30 J/cm² ist ebenfalls eine oft gewählte Bestrahlungsdosis^{98-100,107,108,110}.

Bei der Bestrahlung mit UVB-Licht gibt es wenig Einklang zwischen verschiedenen Studien. Die entsprechenden Werte liegen aber in einem sehr niedrigen Bereich. Bei Yonezawa et al. wurden die Werte 0,031 J/cm beziehungsweise 0,36 J/cm verwendet^{88,95,97,102,103}. Die Bestrahlungsdauer variiert, liegt aber meist im Bereich von 30 Minuten^{88,89,97,101} bis zu einer Stunde^{88,97,101,106}, vereinzelt bis zu zwei Stunden^{88,97}.

Die Bewertung der Hautreaktionen erfolgt meist 24, 48 sowie 72 Stunden nach der Bestrahlung^{88,89,95,97,102,103,106,109}. Zusätzlich wird oft bereits nach 15 - 30 Minuten bewertet^{88,106,109}. Wie stark das Erythem ausgebildet wird kann durch das Punktesystem nach Draize^{97,103} (1959) oder durch Absorptionsmessung mittels Mexameter¹⁰⁴ oder Colorimeter^{98-100,107,108,110} beurteilt werden. Beim Draize-System wird Erythemstärkegrad sowie Ödembildung optisch beurteilt und anhand von Stufen eingeteilt (Tabelle 7, Tabelle 8).

Tabelle 7: Erythembewertungsmethode nach Draize. Die Tabelle wurde von Yonezawa et al. übernommen¹⁰³.

| | |
|---|--|
| 0 | Kein Erythem |
| 1 | Leichtes Erythem (kaum sichtbar) |
| 2 | Eindeutiges Erythem |
| 3 | Mäßiges bis schweres Erythem |
| 4 | Schweres Erythem (starke Rötung), leichte Schorfbildung, tiefere Schäden |

Tabelle 8: Ödembewertungsmethode nach Draize. Die Tabelle wurde von Yonezawa et al. übernommen¹⁰³.

| | |
|---|--|
| 0 | Kein Ödem |
| 1 | Schwaches Ödem, kaum sichtbar |
| 2 | Schwaches Ödem (mit definierten Rändern durch definierte Erhöhung) |
| 3 | Moderate Ödeme (Erhöhung fast 1 Millimeter) |
| 4 | Schwere Ödeme (Erhöhung mehr als 1 Millimeter und über den Bereich der Bestrahlungsbelastung hinaus) |

Der Durchschnitt der Hautreaktionspunkte wird berechnet, indem man den Gesamtwert der Erythempunkte und Ödempunkte von allen Labortieren zu jedem Bewertungszeitpunkt durch die Anzahl der Versuchstiere dividiert. Die Summe der durchschnittlichen Hautreaktionspunkte zu allen Beurteilungszeitpunkten ist definiert als *“total mean skin reaction score“*^{97,103}. Es gibt auch Studien, die zwar ebenfalls ein Punktesystem für die makroskopische Bewertung der Erythemausprägung verwenden, aber dennoch von der Draize Methode abweichen^{105,106}. Häufig werden nach Abschluss der *in vivo*-Phototoxizitätsprüfung die Tiere getötet und epidermale Zellen entnommen, um ergänzende histopathologische Untersuchungen durchzuführen^{88,104,105}.

In der Literatur der letzten 10 Jahre finden sich gehäuft Phototoxizitätsstudien an Ratten^{88,89,95,97,101,103–107,109,110}. Es handelt sich also um eine immer noch häufig genutzte Methode.

6.2.1.3. Phototoxizitätstests an Meerschweinchen

Meerschweinchen sind die am häufigsten verwendeten Versuchstiere bei Phototoxizitäts-Studien⁹⁵. Die Applikation von Testsubstanzen kann topisch oder systemisch erfolgen²⁴. Nach der Applikation werden die rasierten Testareale der Meerschweinchen bestrahlt. Die Bewertung des Stärkegrades der Erythembildung wird durch ein Punktesystem gewährleistet (siehe Kapitel 4.2.3.2.) Bei der Lichtbelastung werden UVA- oder UVB-Strahlung separat oder in Kombination verwendet.

Die Bestrahlung erfolgt meist 30 Minuten nach der Verabreichung der Testsubstanz^{31,111,112}. Häufig verwendete Leuchtmittel sind UV-Lampen^{111,113–118} das Modell FL 20 SBL/DMR wird als UVA-Lichtquelle benutzt^{95,119}. Auch Xenon-Lampen werden verwendet³¹. Der Abstand zwischen der verwendeten Lampe und der bestrahlten Haut beträgt meist 10 cm^{95,113,114} - 30 cm^{120,121}. Die Bestrahlungsdosis beträgt meist wie bei Kim et al.²⁴ erwähnt 10 J/cm²^{95,111,112,115,121–124}, aber auch Bestrahlungsintensitäten von 20 J/cm²^{31,111} oder 15 J/cm²^{116,125} kommen vor. Die Beurteilung der Erytheme erfolgt meist 24, 48 und 72 Stunden nach der Bestrahlung^{31,95,115,116,118,120,122–125}. Häufig werden zusätzliche Untersuchungen zu weiteren Zeitpunkten vorgenommen, zum Beispiel eine Stunde^{31,118,120}, drei Stunden³¹ oder 96 Stunden³¹ nach der letzten Bestrahlung. Die Beurteilung der Erytheme kann durch die

Draize-Methode^{95,115,120,122,125} oder ähnliche Stufensysteme^{24,31,113} erfolgen. Phototoxizitätsstudien am Meerschweinchen findet man vermehrt in älterer Literatur der 90er Jahre^{31,111,117,119,121}. Aber auch in den letzten 5 Jahren fanden sie immer wieder Anwendung^{24,95,125,126}.

6.2.1.4. Phototoxizitätstests an Mäusen

Auch Mäuse eignen sich aufgrund ihrer geringen Körpergröße, der unkomplizierten Haltung und den überschaubaren Kosten gut als Versuchstiere für *in vivo*-Phototoxizitätsstudien¹²⁷. Sowohl topische als auch systemische Applikation ist möglich²⁴. Zum Einsatz kommen der IMDS-Test oder Abwandlungen des IMDS-Tests. Es handelt sich hierbei um eine Weiterentwicklung des lokalen Lymphknotentests, der an der Maus durchgeführt wird und durch den man zwischen irritativen und allergischen Reaktionen der Haut unterscheiden kann^{32,34}. Bei diesem Test wird die Messung der Zellproliferation in den drainierenden Lymphknoten und die Ohrenschwellung nach Applikation der Testsubstanz an drei aufeinanderfolgenden Versuchstagen kombiniert^{32,34}. 30 Minuten nach der Applikation der Testsubstanz wird bestrahlt. 24 Stunden nach der Bestrahlung und Tötung der Maus werden Ohren und Lymphknoten an den Ohren zwecks histopathologischer Untersuchungen entfernt. Die Ohrenschwellung wird mithilfe eines Messgerätes, zum Beispiel eines Oditest Mikrometers, bestimmt^{31–35}. Es existieren auch weitere Tests mit abweichenden Parametern, die aber im Allgemeinen recht ähnlich ablaufen^{28,128–133}.

Bezüglich der Applikation der Testsubstanzen sind *multi-dose*^{32,33,131,134–136}-Anwendungen üblich, es kommen aber auch *single-dose*²⁸-Anwendungen vor. Meistens folgt nach der Substanzapplikation eine Ruhephase von 30 Minuten, bevor die Bestrahlungsbehandlung beginnt^{28,31–33,128,133}. Manchmal wird auch direkt nach der Gabe der Testsubstanzen bestrahlt³⁴.

Häufig verwendete Lampenarten sind UV-Lampen^{31,32,128,133,137}, Xenonlampen^{33,34}, Schwarzlichtröhrenlampen^{130,136,138} und Sonnenlichtsimulatoren wie zum Beispiel das Oriell-Modell^{129,132}, die Psorisan 900 H1 Lampe^{44,131} oder die Quecksilberlampe^{28,134,138}.

Der Abstand zwischen Lampe und bestrahlter Haut liegt meist zwischen 15^{128,139} und 40 cm^{32–34,129,134}.

Die von Kim et al. empfohlene Bestrahlungsdosis von 20 J/cm² wird oft eingehalten^{24,28,31–33,130,136,137}. Auch 10 J/cm² ist eine häufig angewandte Bestrahlungsdosis^{34,44,131}. Häufig wird mehrmals an aufeinander folgenden Tagen bestrahlt^{128,129,132,133}. Die Bestrahlungszeit liegt zwischen 30 Minuten^{32,130,131} und zwei Stunden^{28,128,136–138}. Es gibt verschiedene Systeme bei denen (mehrmals) täglich¹³² oder wöchentlich¹³⁴ über einen gewissen Zeitraum von einigen Tagen^{128,132,133} bis Monaten¹³⁴ regelmäßig bestrahlt wird. Aber es gibt aber auch Modelle, bei denen nur einmal bestrahlt wird^{28,33}. Die Bewertung der Hautreaktion erfolgt nach 24 und 48 Stunden¹⁴⁰. Ergänzt wird dies häufig durch Untersuchungen nach einer Stunde^{28,138}, nach 72 und 168 Stunden¹³⁷.

Die Bewertung der Reaktion der bestrahlten Haut kann mithilfe eines Punktesystems erfolgen. Dabei wird die lokale Hautrötung visuell und subjektiv bewertet^{28,44,136}. Es gibt auch Messgeräte, wie den Oditest Mikrometer, mit dem die Messung der Ohrendicke erfolgen kann³¹⁻³⁴. 24 Stunden nach Beendigung der letzten Bestrahlung und Tötung der Mäuse werden Ohren und zugehörige Lymphknoten herausgeschnitten und histopathologisch untersucht^{32,128,129,132,133}. Der IMDS gilt als wenig zeitaufwändige Methode, die - abhängig vom Expositionsweg - das Risiko einer Photosensibilisation beziehungsweise Photoirritation gut voraussagen kann³³.

In der Literatur findet man Phototoxizitätsstudien an Mäusen stark gehäuft in den 90er Jahren^{34,137,140}. Aber auch heutzutage finden sie durchaus Anwendung^{44,128-130}.

6.2.2. *In vitro*-Methoden

Aus ethischen Gründen ist es notwendig und sinnvoll, vor Phototoxizitätsstudien am Menschen präklinische Studien durchzuführen. Hier wird zur Abschätzung von Phototoxizität mit *in vitro*- oder *ex vivo*-Methoden gearbeitet. Nach Angaben wissenschaftlich fundierter Validationsstudien und industrieller Labordaten entstand der internationale Konsens, dass *in vitro*-Methoden dazu in der Lage sind, die Testung auf akute Phototoxizität abzudecken⁴⁷. Insbesondere 3D-Zellkulturmodelle zur Simulation von Humanhaut werden häufig für Tests herangezogen. Die Extrapolation solcher *in vitro*-Daten auf den Zustand in menschlichem Gewebe ist allerdings immer nur bedingt möglich, da die meisten Hautmodelle (3D-Humanhautmodelle¹⁴¹, aber auch Schweine¹⁴² - oder Nagetierhautmodelle¹⁴³) eine geringere Barrierefunktion aufweisen.

6.2.2.1. 3T3 Neutral Red Uptake Phototoxicity Test

Der 3T3 Neutral Red Uptake Phototoxizitätstest (3T3 NRU-PT) bietet eine gute Möglichkeit, um ein erstes Screening auf phototoxische Substanzen *in vitro* durchzuführen. Zur Bestätigung empfiehlt sich im Anschluss ein Photopatchtest am Menschen⁴⁷. Der 3T3 NRU PT ist die einzige Prüfungsmethode auf Phototoxizität, die von der OECD akzeptiert und empfohlen wird - sie gilt als der Goldstandard. Aufgrund seiner hohen Spezifität und Sensibilität kann der 3T3 NRU PT als alleinstehender Test verwendet werden^{37,47}. Bei einem negativen Ergebnis kann man sich auf die Exaktheit des 3T3 NRU PT verlassen⁴⁷, nur bei positiven Resultaten sollte auf eine andere, zusätzliche Testmethode verwiesen werden, da beim 3T3 NRU PT die Gefahr von falsch-positiv-Ergebnissen besteht⁴⁴. Beispiele für geeignete Zusatztests sind der Human 3D-Skin-Test und der Photopatchtest⁴⁷.

Das Konzept des Tests ist der Vergleich der Zytotoxizität von Substanzen bei Anwesenheit nicht zytotoxischer UVA-Strahlung mit der Zytotoxizität der Substanzen ohne Bestrahlung. Verwendete Zellkulturlinien sind die humanen Fibroblasten oder die murine Balb/c Fibroblastenzelllinie^{43,47}.

Die Versuchsparameter der meisten Studien orientieren sich an der OECD *Guideline* 432. Bei der Wahl der Lampe wird meist auf eine Quecksilbermetallhalogenidlampe

zurückgegriffen, meist Typ SOL500^{28,38,42,44,67,144-146}. Auch der Typ HPW125 Philips wird häufig verwendet^{25,26,147}, wobei die Emission hier hauptsächlich bei 365 nm erfolgt. Auch Xenonlampen¹⁴⁸⁻¹⁵⁰ werden verwendet. Beide Arten von Strahlungsquellen werden von der OECD empfohlen. Bezüglich der Strahlungsintensität werden von der OECD 5J/cm² empfohlen, was weitgehend die Norm darstellt^{28,38,42,44,45,47,145,146,148,150,151}. Bei manchen Studien werden abweichende Strahlungsdosen benutzt, die im Bereich 1,5 J/cm² - 9 J/cm² liegen^{25,26,40,45,147}. Die Angabe zur Dauer der Bestrahlung seitens der OECD beträgt 50 Minuten. Meist wird diese Zeitangabe auch eingehalten^{28,38,42,44,47,49,145,146,149,151}. Es gibt aber Ausnahmen, wie zum Beispiel bei Okamoto et al. 1999, wo eine verkürzte Bestrahlungsdauer von nur 10 Minuten angegeben wird¹⁵⁰. Im Allgemeinen erfolgt die Bestrahlung als einmalige Behandlung (*single dose*-Modell). Es finden sich in der Grundlagenforschung selten Fragestellungen, bei der mit *repeated dose*, also wiederholter Bestrahlung, gearbeitet wird.

Bezüglich der Lampenauswahl wurde festgestellt, dass eine UVA/UVB-Lampe von Vorteil ist, da sie das solare Spektrum besser simuliert als die häufig verwendeten UVA-Lampen¹⁵². Bei der Untersuchung von *in vitro* phototoxischen Effekten von Levofloxacin durch Dwivedi et al. 2012 wurde festgestellt, dass unter Sonnenlicht die Zellviabilität am stärksten sinkt, gefolgt von ausschließlicher UVA-Bestrahlung und ausschließlicher UVB-Bestrahlung. Daraus lässt sich schließen, dass die Gesamtdosis der Strahlungsbelastung ein bestimmender Faktor bei der Voraussage von Phototoxizität ist³⁹.

Beim 3T3 NRU-Phototoxizitätstest handelt es sich um die heute am häufigsten angewandte Methode zur Messung von Phototoxizität, da konkrete Richtlinien zur Durchführung vorhanden sind. In der Literatur wird daher häufig damit gearbeitet, besonders im letzten Jahrzehnt^{40,44,45,47,145,149}.

6.2.2.2. Red Blood Cell-Phototoxicity Test

Der Red Blood Cell Phototoxicity Test (RBC PT) beruht auf der Verwendung von Erythrozyten zur Beurteilung von lichtinduzierten toxischen Effekten. Dieser Test ist in der Literatur als Prüfmethode beschrieben, die eine gute Gesamtanpassung einschließlich hoher Genauigkeit, Sensitivität und guter Voraussagekraft aufweist⁵⁰. Dieser Test kann daher als zweite *in vitro*-Methode zur Testung von Phototoxizität verwendet werden, da er den Mechanismus der phototoxischen Effekte veranschaulicht und Informationen zu den photodynamischen Prozessen von zellulären Proteinen und Biomembranen liefert⁵⁰.

Die Methode beruht auf der Fähigkeit von Substanzen, unter Bestrahlung mit simuliertem Sonnenlicht die Membran von Erythrozyten aufzulösen und/oder Hämoglobin zu oxidieren. Dadurch kann auf das phototoxische Potenzial beziehungsweise auf das Potenzial zur Photosensibilisierung geschlossen werden. Es werden Hämolyse und Hämoglobinoxidation getrennt voneinander mit dem gleichen experimentellen Ansatz unter Strahlungsbelastung oder im Dunkeln beurteilt⁵⁰.

Ein Beispiel für eine umfassende Arbeit zu dieser Testmethode bieten Pape et al., 2001. Dabei erfolgt die Bestrahlung mit einer Dosis von 15 J/cm² (UVA-Strahlung) und 1 J/cm² (UVB-Strahlung). Die Gesamtbestrahlungszeit beträgt 150 Minuten. Gleichzeitig werden die

Testungen im Dunkeln unter Inkubation durchgeführt. Darauf folgt eine 30-minütige Inkubation im Dunkeln, bevor man nach der Zentrifugation mit den Messungen beginnt⁵⁰. Beim RBC-PT wird bezüglich der Wiederholungen der Bestrahlungen meist auf das Prinzip *single dose* gesetzt. Als Kontrolle dient eine 100%-Lyse-Probe mit destilliertem Wasser, eine Fragilitätskontrolle mit PBS sowie eine chemische Blindwertprobe ohne Zellen für jede Testkonzentration. Für die Qualitätsprüfung der Erythrozyten und der Prüfung ihres Stoffwechselzustands ist auch eine bestrahlte Kontrollgruppe von Bedeutung⁵⁰.

Im Gegensatz zum 3T3 NRU PT fällt beim RBC-PT auf, dass in der Literatur keine standardisierten Versuchsparameter verwendet werden. Entscheidende Parameter sind zudem mitunter nicht angegeben, was eine Beurteilung der Studien erschwert^{116,153,154}. Bei der Auswahl der Lampe wird häufig auf Phosphorlampen^{155–157} oder Quecksilbermetallhalogenidlampen¹⁵⁵, wie das Modell SOL500^{50,154} oder auch die HPW 125 Philips Lampe^{26,158} zurückgegriffen. Auch UV-Lampen werden verwendet. Dabei unterscheidet man UVA-Lampen^{51,116,150,159} und UVA/UVB- kombinierte Lichtquellen^{153,160,161}. Die Dauer der Bestrahlung variiert stark zwischen einzelnen Studien. Sie bewegt sich in einem Bereich von 10 Minuten¹⁵⁵ bis zu 200 Minuten^{27,50,150,155–157,160,161}. Auch die Bestrahlungsdosis variiert. Teilweise wird UVA- und UVB-Strahlung verwendet^{50,154,160,161}, häufig aber auch nur UVA-Strahlung^{26,51,116,150,153,159}. Bei der verwendeten UVB-Strahlung kommt eine Strahlungsdosis von 1 - 4 J/cm² zum Einsatz, bei UVA-Strahlung 7 - 30 J/cm². Auch hier wird meist nach dem Prinzip *single dose* gearbeitet. Der RBC-Phototoxizitätstest wurde vor allem in den 2000er Jahren eingesetzt^{27,50,116,158–160,162}. Vereinzelt findet er auch heute Anwendung^{93,163}.

6.2.2.3. Human Threedimensional Skin Model

Mit Hilfe des Human Threedimensional Skin Models (Human-3D-Hautmodell) ist es möglich, Phototoxizität am Menschen mittels humaner Hautmodelle zu untersuchen. Man unterscheidet zwischen dem dermalen Modell aus Fibroblasten, dem epidermalen Modell aus menschlichen Keratinozyten und Stratum corneum sowie dem Vollhautmodell aus Fibroblasten, Keratinozyten und Stratum corneum¹⁹.

Anhand dieses Modells wird die Lebensfähigkeit von Zellen unter der angewendeten Dosis untersucht, sowie die Auswirkungen derselbigen auf das Gewebe ohne und mit Bestrahlung mit der höchsten, gerade noch nicht phototoxischen UVA-Dosis erforscht¹⁹.

Ein häufig verwendetes Modell ist das EpiDermTM-Modell. Dieses Voraussagemodell basiert auf der Bestimmung der Viabilität von Gewebe, das Chemikalien beziehungsweise Bestrahlung ausgesetzt wird – es werden also Zytotoxizitätstests durchgeführt, beispielsweise der MTT-Test⁵⁴. Bei dieser Testmethode werden diverse Konzentrationen der Testchemikalie topisch auf dem Modell appliziert. Daraufhin folgt die Evaluierung der Reaktion mit und ohne der nicht-zytotoxischen Dosis von UVA-Strahlung und sichtbarem Licht. In der Regel wird die Zytotoxizität einen Tag nach der Bestrahlung mit Hilfe des MTT-Tests bestimmt. Durch dieses Modell können phototoxische Komponenten identifiziert werden⁵³. Die verwendete UVA-Strahlungsdosis ist meist 6 J/cm²^{45,46,54,67,146}. Bei der Lampenwahl wird sehr häufig auf die Quecksilbermetallhalogenidlampe vom Typ SOL500 zurückgegriffen^{46,54,67,146}. Die

Bestrahlungszeit wird selten explizit genannt; lediglich bei Jirova et al. findet sich die Angabe 60 Minuten nach einer Vorbestrahlungszeit von 15 Minuten⁵⁴. Meist werden die Bestrahlungen einmal wiederholt (*repeated dose*)^{45,54,67}.

Ein weiteres Modell ist das EpiskinTM-Modell. Nach Applikation der Testsubstanz folgt die Inkubation und danach die Belastung der Zellkulturen durch eine nicht-zytotoxische Dosis UVA-Strahlung. Es folgt eine weitere Inkubationsphase und anschließend der MTT-Test. Phototoxisch wirkende Substanzen führen in Kombination mit UVA-Strahlung zu einer erhöhten Zellmortalität, wodurch phototoxische Substanzen identifiziert werden können⁵³.

Es werden dabei häufig UVA-Lampen verwendet^{164,165}. Die Bestrahlungsdosen sind nicht einheitlich¹⁶⁴⁻¹⁶⁶. Es fällt jedoch auf, dass die angewandten Dosen der Bestrahlung bei EpiskinTM grundsätzlich in einem höheren Bereich liegen als es beim EpiDermTM-Modell der Fall ist.

Ein weiteres Beispiel ist das Skin EthicTM-Modell, das aus humanen epidermalen Keratinozyten besteht. Es handelt sich um ein gut differenziertes *multi-layer*-Modell der menschlichen Epidermis⁵², bestehend aus Stratum corneum, Stratum granulosum und Stratum spinosum⁵³.

Nach Behandlung der Kulturen mit der Testsubstanz erfolgt die Strahlungsbelastung beziehungsweise die Verfrachtung der Zellkulturen ins Dunkle. Nach einer Inkubation über Nacht wird der MTT-Test durchgeführt⁵³. Häufig wird eine Quecksilbermetallhalogenidlampe vom Typ SOL500 verwendet^{55,167,168}. Die Bestrahlungsdosis liegt zwischen 5 und 10 J/cm²^{55,167-169}, die Dauer der Bestrahlung ist häufig eine Stunde^{55,167} oder weniger¹⁶⁹.

Weiters gibt es Hautmodelle, die neben Keratinozyten auch Melanozyten miteinbeziehen. Bei phototoxischen Reaktionen und Experimenten, die von UV-Bestrahlung abhängig sind, sind Melaningehalt und Pigmentempfindlichkeit wichtige Parameter, die zur Bestimmung des minimalen Maßes von Phototoxizität notwendig sind. Dies wird in anderen künstlichen Hautmodellen nicht berücksichtigt¹⁷⁰. Es konnte gezeigt werden, dass die Anwesenheit von Melanozyten die morphologischen und funktionellen Aspekte von künstlichen Hautmodellen deutlich verbessert. Melanozyten könnten eine wichtige Rolle bei der Bildung von epidermaler Struktur spielen. Darüber hinaus wäre es möglich, dass sie zur Verringerung der zytotoxischen Effekte von UVA-Strahlung auf die Epidermis beitragen. Erhöhte Melaninsynthese und Aktivierung von Melanozyten in künstlichen Hautmodellen mit Melanozyten nach der UVA-Bestrahlung zeigt ähnliche Reaktionen wie in der natürlichen menschlichen Haut *in vivo*. Frühere Studien haben gezeigt, dass die epidermale Differenzierung, insbesondere des Stratum corneums, nicht zum *in vitro* Schutz vor UVA-Schäden führt. Daraus folgt, dass die Resistenz gegenüber UVA-Strahlung bei *in vitro*-Phototoxizitätstests, die künstliche Hautmodelle verwenden, hervorgehoben werden sollte¹⁷⁰. Melanin kann, neben seinen lichtschützenden und antioxidativen Eigenschaften, in Kombination mit Medikamenten auch zu unerwünschten Reaktionen in der Haut führen, wie Hyperpigmentationsstörungen oder phototoxischen Reaktionen. Darüber hinaus haben Melanine die Fähigkeit zur Bildung eines Arzneimittel-Melanin-Komplexes, der zur Ablagerung des Arzneimittels oder seiner Metaboliten in pigmentierten Geweben führt.

Komplexe aus Chemikalien und Melanozyten unter UVA-Bestrahlung können zu einer Verringerung der Zellviabilität führen, proportional zur Konzentration der Testsubstanz und der Bestrahlungszeit¹⁷¹. Hautmodelle zur Messung von Phototoxizität fanden in den 2000er Jahren gehäuft Anwendung^{54,55,67,165–167,169,170,172}, aber auch in der Literatur der letzten Jahre können sie vereinzelt gefunden werden^{45,146,164,171,173}.

6.2.3. *Ex vivo*-Studien an Schweinehaut

Ex vivo-Studien an Humanhaut werden im Bereich der Phototoxizität faktisch nicht durchgeführt. An Schweinehaut werden *ex vivo*-Studien allerdings sehr wohl vollzogen, da die epidermalen und dermalen Schichten der Schweinehaut denen der menschlichen Haut in struktureller, funktionaler sowie biochemischer Sicht stark ähneln^{57,59}. Die Haut des Schweins weist gegenüber der menschlichen Haut mehr Ähnlichkeiten auf als Nagetierhaut. Die Schweinehaut bietet sich als Hautmodell an, da sie zur Zeit der Biopsie vollständig differenziert vorliegt. Auch die unkomplizierte Beschaffung der Schweinehaut, die durch Schlachthöfe ermöglicht wird, macht eine Anwendung von Schweinehaut im Forschungsbereich attraktiver⁵⁶.

Nach der Entfernung von Haaren und Borsten wird das Unterhautfettgewebe abgelöst. Anschließend an das Waschen der Hautstücke und ihrer Befestigung durch ein Netz werden die Testsubstanzen appliziert. Darauf folgt die Inkubationsphase und danach die Bestrahlung. Die Haut wird nach der Beendigung der Strahlenbelastung entsprechend ihrer UV-Belastung in Streifen geschnitten. Nach einer weiteren Inkubationsphase werden die Ergebnisse bewertet^{56,57}. Für Phototoxizitätsstudien findet dieser Ansatz in der Literatur Anwendung, aber nicht in einheitlicher Form^{56,57,61,173–178}.

6.2.4. Klinische Studien

6.2.4.1. *Photopatchtest*

Mittels Photopatchtest (PPT) kann man nicht nur Photosensibilisatoren identifizieren⁶⁵, sondern auch photoallergische von phototoxischen Reaktionen unterscheiden. Dazu werden die zu testenden Substanzen am Rücken von Probanden appliziert. 24 Stunden später folgt die Entfernung der Testsubstanzen und Bestrahlung mit UVA-Licht. Es erfolgt eine sofortige Hautanalyse, die nach 24, 48 und 72 Stunden wiederholt wird. Zur Beurteilung werden die Werte mit Kontrollgruppen verglichen^{66,67}.

Photopatchtests werden oft über einen längeren Zeitraum an einer größeren Zahl von Probanden durchgeführt^{66,179–182}. Es finden sich aber auch Studien mit kleineren Probandengruppen^{46,47,54,67,144,183–186}. Die Teilnehmerzahl ist hierbei sehr variabel^{144,187–191}. Es werden Quecksilbermetallhalogenidlampen, zum Beispiel Typ SOL500, verwendet^{46,54,67,144}. Meist kommen UVA-Lampen zum Einsatz^{181,183,187,190}, wie die UVA 100W-R-Lampe^{179,186} oder die UVA-Philips TL/10R Röhren^{184,185}. In den meisten Studien wird mit einer Bestrahlungsintensität von 5 J/cm² gearbeitet^{54,67,144,179,180,182,183,186,187,189,191}, gelegentlich

auch mit 10 J/cm^2 ^{66,185,190}. Photopatchtests wurden in den 2000er-Jahren ^{54,67,180,181,190,191}, aber auch in den letzten 10 Jahren häufig angewandt ^{47,183,184,187,188}.

6.2.4.2. UV-Erythemtest

Der UV-Erythemtest ist eine Testmethode, mit der ein Erythem, das als inflammatorische Antwort auf UVB-Bestrahlung entsteht, analysiert werden kann. Das entzündungshemmende Potenzial von topisch applizierten Arzneistoffen kann durch diesen Test bestimmt werden¹³. Mithilfe einer Lichttreppe wird zunächst die individuelle MED des jeweiligen Versuchsteilnehmers bestimmt⁷¹. 24 Stunden später erfolgt die Bewertung des entstandenen Erythems nach der Krutmannskala und die anschließende Messung des Erythems mit dem Mexameter. Es folgt die Bestrahlung von einer Seite des Rückens mit der 1,5-fachen Dosis der MED. Die andere Seite des Rückens bleibt unbelichtet. Umgehend werden die Testsubstanzen topisch appliziert. Nach 23 Stunden wird das Pflaster entfernt; nach einer weiteren Stunde Wartezeit werden bestrahlte und unbestrahlte Kontrollfelder anhand der Krutmannskala analysiert. Bei einigen Studien werden noch einmal die Testsubstanzen aufgetragen und nach weiteren 24 Stunden mithilfe der Mexametermessung bewertet^{13,69,71,73}. Die Art der Durchführung wird in der Literatur einheitlich beschrieben^{13,71,73,75,192–196}. Bei der Auswahl der Lampe fällt die Wahl meist auf fluoreszierende Lampen^{73,75,173,193,195–201}. Es werden aber auch Xenonlampen^{202–204} und UV-800-Geräte^{205,206} verwendet. In den meisten Studien wird mit der 1,5-fachen^{73,74,173,194,195,200,201} MED bestrahlt. Häufig wird zusätzlich mit der einfachen^{192,196,202} oder doppelten^{75,196} MED bestrahlt. Es gibt auch Studien, bei denen ausschließlich mit der einfachen^{197,205,206} oder doppelten^{205–208} MED bestrahlt wurde.

Die bestrahlte Stelle ist meist der Rücken^{73–75,173,192,195,197,200,201,209}, seltener das Gesäß^{197,202,206,208} oder die Unterarme^{197,203}. Die Anzahl der Studienteilnehmer ist variabel und liegt häufig bei zehn^{75,199,208} beziehungsweise vierzig^{73,75,195,197,200,201} Teilnehmern oder dazwischen^{173,197,202,203,205,207,209}. Auch eine Teilnehmerzahl über 40 kann vorkommen^{193,194,198}.

Die Messung des Erythems erfolgt meist mittels Mexameter^{73–75,194,195,201,202}, gelegentlich auch mittels Spektrophotometer^{192,196,207,209}.

Die Methode fand häufig in den 2000-Jahren Anwendung^{192,195–197,200,206,208}, aber auch in den letzten Jahren wurde sie praktiziert^{73,74,194,202,209}.

7. Conclusio

Das Ziel dieser Arbeit war eine umfassende Analyse und Bewertung der unterschiedlichen Methoden zur Untersuchung von Phototoxizität. Meine Literaturrecherche umfasste sämtliche in der wissenschaftlichen Literatur der letzten Jahrzehnte aufscheinende präklinische Studien (*in vivo*, *ex vivo*, *in vitro*, *in silico*) sowie klinischen Studien am Menschen. Die experimentellen Parameter und Endpunkte sollten herausgearbeitet werden, um ein einheitliches, optimiertes Versuchsprotokoll für zukünftige Studien zur Beurteilung von Phototoxizität dermal und oral verwendeter Wirkstoffe zu entwickeln. Eine Kombination mehrerer Techniken ist meiner Meinung nach in Studien generell anzuraten, um die potentiellen Fehler beziehungsweise Mängel einzelner Methoden aufzuzeigen.

Bei meiner Recherche bin ich zu dem Schluss gekommen, dass bei der Bestimmung der Phototoxizität eines bestimmten Arzneimittels definitiv mit *in vitro*-Untersuchungen, also Studien an Zellkulturmodellen, begonnen werden sollte. Dabei ist der 3T3 NRU Phototoxizitätstest der Goldstandard. Aufgrund seiner einheitlichen Parameter und häufigen Anwendung ist er die erste Wahl und die aktuellste Methode zur Bestimmung von Phototoxizität. Bei Verwendung dieses Tests besteht eine relativ gute Chance auf Vergleichbarkeit mit Literaturdaten aus vergangenen Studien. Bei anderen Prüfmethode befinden sich die Parameter zwar teilweise in ähnlichen Bereichen, aber Ergebnisse von Studien, die mithilfe des 3T3 NRU-Tests durchgeführt werden, sind eindeutig am besten vergleichbar. Die Strahlungsintensität beim standardisierten 3T3 NRU-Test beträgt so gut wie immer 5 J/cm^2 und die Zeit der Bestrahlung meist 50 Minuten. Durch den 3T3 NRU-Test lassen sich sehr viele Substanzen testen, was gerade bei initialen Screening-Prozessen wichtig ist. Nicht relevante Substanzen können so zu Beginn bereits ausgeschlossen werden. Als Ergänzung zum 3T3 NRU-Test eignet sich meiner Meinung nach der RBC-Test, da durch diese zweite Prüfmethode eventuelle fehlerhafte Ergebnisse des 3T3 NRU-Tests aufgezeigt werden können.

Wenig relevant für zukünftige Phototoxizitätsstudien sind meines Erachtens nach Untersuchungen nach dem Prinzip des Photo Hen's Test, da die Durchführung aufwändig und die Aussagekraft der Ergebnisse begrenzt ist. Präklinische *in vivo*-Studien an Nagetieren wie Ratten sind zwar nach wie vor präsent, allerdings in Bezug auf Aufwand, ethische Standpunkte und Aussagekraft in meinen Augen fragwürdig.

Ein interessanter Aspekt sind weiters präklinische Studien an *ex vivo*-Hautmodellen wie dem Schweineohr. Die Durchführung ist möglich, es findet sich wissenschaftliche Literatur dazu – allerdings häufig von mangelhafter Qualität und infolgedessen fragwürdiger Aussagekraft. Hauptproblem ist hierbei die mangelnde Standardisierung – von rund einem Dutzend in der Literatur aufscheinender Studien war keinerlei einheitliche Vorgehensweise abzuleiten. Dadurch gibt es wenig Anhaltspunkt für einheitliche Messparameter und die Vergleichbarkeit der bisher erhobenen Daten ist nicht gegeben. Dadurch ist es kaum möglich, eine allgemeingültige Aussage über die Sinnhaftigkeit des Schweineohrmodells für Phototoxizitätsstudien abzuleiten. Es sollte daher in zukünftigen präklinischen Studien das erste Ziel sein, standardisierte Arbeitsprotokolle für solche Studien am Schweineohr zu etablieren, inklusive geregelter Zeitabläufe, Applikationsart von Testsubstanzen oder

-formulierungen sowie Bestrahlungsquelle und -intensitäten. Weiters muss erhoben werden, welche biophysikalischen Messmethoden geeignet sind, potenziell durch Bestrahlung ausgelöste Effekte zu charakterisieren und gegebenenfalls zu quantifizieren. Da das Schweineohrenmodell grundsätzlich eine hohe Vergleichbarkeit zur menschlichen Haut bezüglich Morphologie und Funktionsweise aufweist, wäre es interessant herauszufinden, ob dieses Modell die Möglichkeit zu sinnvollem Erkenntnisgewinn bietet. Die geringere Barrierefunktion im Vergleich zur Humanhaut ist dabei in Evidenz zu halten.

Abgesehen von diesem potenziell lohnenden Unterfangen bieten natürlich klinische Studien an Probanden die höchste Aussagekraft bei Untersuchung von Phototoxizität aufgrund der direkten Vergleichbarkeit. Hier bieten sich der Photopatchtest und der Erythemtest als die führenden Untersuchungsmethoden für zukünftige Studien an. In Hinblick auf Literaturdaten sind hier jeweils relativ einheitliche Studienprotokolle zu finden, beispielsweise in Bezug auf die verwendete Strahlungsintensität, welche beim Photopatchtest mit 5 J/cm^2 meist jener beim 3T3 NRU-Test entspricht, beim Erythemtest grundsätzlich meist der 1,5-fachen MED entspricht. Diese Werte entsprechen also in der wissenschaftlichen Praxis einem de-facto-Standard, der zur Orientierung herangezogen werden kann. Ziel sollte in jedem Fall langfristig sein, möglichst einheitliche Studienprotokolle zu verwenden.

8. Quellenverzeichnis

1. Fritsch, P., *Dermatologie und Venerologie Lehrbuch und Atlas*. Springer-Verlag (1998).
2. Ng, K. W. & Lau, W. M., Skin Deep: The Basics of Human Skin Structure and Drug Penetration. In: *Percutaneous Penetration Enhancers*, Eds. Dragicevic, N. & Maibach, H. I., 3–11. Springer Verlag (2015).
3. Kindl, G. & Raab, W., *Licht und Haut*. Govi-Verlag (1998).
4. Krull, K., Untersuchung von Hautrötung und Helligkeit mittels verschiedener Farbmessverfahren in vitro und in vivo. Dissertation, Friedrich-Schiller-Universität Jena, Deutschland (2010).
5. de Freitas Maciel, B. C., Implementation and validation of in vitro methodologies for phototoxicity evaluation of raw materials of pharmaceutical and cosmetic products. Dissertation, Faculdade de Farmacia universidade do Porto, Portugal (2016).
6. Mach, K., *Dermatologie*. Ferdinand Enke Verlag (1995).
7. Steigleder, G. K., *Dermatologie und Venerologie*. Thieme Verlag (1979).
8. Bouwstra, J. A., Gooris, G. S., Dubbelaar, F. E. R. & Ponec, M., Phase behavior of stratum corneum lipid mixtures based on human ceramides: the role of natural and synthetic ceramide 1. *J. Invest. Dermatol.* **118**, 606–617 (2002).
9. Labouta, H. I., El-khordagui, L. K., Kraus, T. & Schneider, M., Mechanism and determinants of nanoparticle penetration through human skin. *Nanoscale* **3**, 4989–4999 (2011).
10. Sweeney, T. M. & Downing, D. T., The role of lipids in the epidermal barrier to water diffusion. *J. Invest. Dermatol.* **55**, 135–140 (1970).
11. Gould, J. W., Mercurio, M. G. & Elmets, C. A., Cutaneous photosensitivity diseases induced by exogenous agents. *J. Am. Acad. Dermatol.* **33**, 551–573 (1995).
12. European Medicines Agency: *Guidance on photosafety evaluation of pharmaceuticals, ICH guideline S10* (2012).
13. Stump, J., Antiinflammatorische Wirkung von Aloe vera Gel (97, 5%) im UV-Erythemtest, eine monozentrische, randomisierte, placebokontrollierte Doppelblindstudie. Dissertation, Albert-Ludwigs-Universität Freiburg im Breisgau, Deutschland (2006).
14. Steigleder, G. K., *Taschenatlas der Dermatologie*. Georg Thieme Verlag (1987).
15. Kluger, P., In vitro-Hauttestsysteme zur Untersuchung lichtassoziierter Hautschädigung. *BIOspektrum* **21**, 172–174 (2015).
16. Brauchle, E., Johannsen, H., Nolan, S., Thude, S. & Schenke-Layland, K., Design and analysis of a squamous cell carcinoma in vitro model system. *Biomaterials* **34**, 7401–7407 (2013).
17. Maurer, T. H., Phototoxicity testing—in vivo and in vitro. *Food Chem. Toxicol.* **25**, 407–414 (1987).

18. Spielmann, H., Müller, L., Averbek D., Balls M., Brendler Schwaab, S. et al., The second ECVAM workshop on phototoxicity testing: the report and recommendations of ECVAM workshop 42. *Altern. to Lab. Anim.* **28**, 777–814 (2000).
19. Menzel, H., Über Phototoxizität Klinik–Testmethoden–Richtlinien. Dissertation, Philipps-Universität Marburg, Deutschland (2014).
20. Schauder, S., Phototoxische Reaktionen der Haut durch Medikamente. *Dtsch. Arztebl.* **34–35**, 2314–2320 (2005).
21. Mang, R., Stege, H. & Krutmann, J., Mechanisms of Phototoxic and Photoallergic Reactions. In: *Contact Dermatitis*, Eds. Frosch, P. J., Menne, T. & Lepoittevin, J.-P., 97–104, Springer-Verlag (2006).
22. Schulze, T., Entwicklung einer In-Vitro-Methode zur Beurteilung des photosensibilisierenden Potentials von Arzneistoffen. Dissertation, Freie Universität Berlin, Deutschland (2013).
23. Hölzle, E., Lehmann, P. & Neumann, N., Phototoxische und photoallergische Reaktionen. *J. der Dtsch. Dermatologischen Gesellschaft* **7**, 643–649 (2009).
24. Kim, K., Park, H. & Lim, K.-M., Phototoxicity: Its mechanism and animal alternative test methods. *Toxicol. Res.* **31**, 97–104 (2015).
25. Elisei, F., Latterini, L., Aloisi, G., Mazzucato, U., Giampietro, V. et al., Excited-state properties and in vitro phototoxicity studies of three phenothiazine derivatives. *Photochem. Photobiol.* **75**, 11–21 (2002).
26. Viola, G., Miolo, G., Vedaldi, D. & Dall’Acqua, F., In vitro studies of the phototoxic potential of the antidepressant drugs amitriptyline and imipramine. *Farmacologia* **55**, 211–218 (2000).
27. Hans, R. K., Agrawal, N., Verma, K., Misra, R. B., Ray, R. S. et al., Assessment of the phototoxic potential of cosmetic products. *Food Chem. Toxicol.* **46**, 1653–1658 (2008).
28. Matsumoto, N., Akimoto, A., Kawashima, H. & Kim, S., Comparative study of skin phototoxicity with three drugs by an in vivo mouse model. *J. Toxicol. Sci.* **35**, 97–100 (2010).
29. Neumann, N. J., Hölzle, E., Lehmann, P., Rosenbruch, M., Klauic, A. et al., Photo hen’s egg test: A model for phototoxicity. *Br. J. Dermatol.* **136**, 326–330 (1997).
30. Neumann, N. J., Hanneken, S., Ruzicka, T. & Lehmann, P., Phototoxicity of exogenous protoporphyrin IX and δ -aminolevulinic acid in the photo hen’s egg test. *Photodermatol. Photoimmunol. Photomed.* **20**, 224–229 (2004).
31. Neumann, N. J., Blotz, A., Wasinska-Kempka, G., Rosenbruch, M., Lehmann, P. et al., Evaluation of phototoxic and photoallergic potentials of 13 compounds by different in vitro and in vivo methods. *J. Photochem. Photobiol. B.* **79**, 25–34 (2005).
32. Vohr, H. W., Blümel, J., Blotz, A., Homey, B. & Ahr, H. J., An intra-laboratory validation of the integrated model for the differentiation of skin reactions (IMDS): discrimination between (photo) allergic and (photo) irritant skin reactions in mice. *Arch. Toxicol.* **73**, 501–509 (2000).
33. Blotz, A., Michel, L., Moysan, A., Blümel, J., Dubertret, L., et al., Analyses of cutaneous

- fluoroquinolones photoreactivity using the integrated model for the differentiation of skin reactions. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* **58**, 46–53 (2000).
34. Homey, B., Schilling, C., Blümel, J., Schuppe, H. C., Ruzicka, T. *et al.*, An integrated model for the differentiation of chemical-induced allergic and irritant skin reactions. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **153**, 83–94 (1998).
 35. Blotz, A., Etablierung und Evaluation des IMDS-Modells zur prädiktiven Erfassung und Differenzierung photoreaktiver Substanzen. Dissertation, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf, Deutschland (2001).
 36. Luco, D. P., Leite-Silva, V. R., Benson, H. A. E. & Lopes, P. S., In Vitro Methods: Alternatives to Animal Testing. In: *Cosmetic Formulation: Principles and Practice*, Eds. Benson, H. A. E., Roberts, M. S., Leite-Silva, V. R. & Walters, K. A., 447–457. CRC Press (2019).
 37. Liebsch, M., Spielmann, H., Pape, W., Kril, C., Deguercy, A. *et al.*, UV-induced Effects. *Altern. to Lab. Anim.* **33**, 131–146 (2005).
 38. Spielmann, H., Balls, M., Dupuis, J., Pape, W., Pechovitch, G. *et al.*, The international EU/COLIPA in vitro phototoxicity validation study: results of phase II (blind trial). Part 1: the 3T3 NRU phototoxicity test. *Toxicol. In Vitro.* **12**, 305–327 (1998).
 39. Maciel, B., Moreira, P., Carmo, H., Goncalo, M., Sousa-Lobo, J. M. *et al.*, Implementation of an in vitro methodology for phototoxicity evaluation in a human keratinocyte cell line. *Toxicol. In Vitro* **61**, 104618 (2019).
 40. Rosa, P., Friedrich, M. L., dos Santos, J., Librelotto, D. R. N., Maurer, L. H. *et al.*, Desonide nanoencapsulation with açai oil as oil core: Physicochemical characterization, photostability study and in vitro phototoxicity evaluation. *J. Photochem. Photobiol. B.* **199**, 111606 (2019).
 41. Genç, H., Barutca, B., Koparal, A. T., Özögüt, U., Sahin, Y. *et al.*, Biocompatibility of designed MicNo-ZnO particles: Cytotoxicity, genotoxicity and phototoxicity in human skin keratinocyte cells. *Toxicol. In Vitro.* **47**, 238–248 (2018).
 42. Spielmann, H., Balls, M., Brand, M., Döring, B., Holzhütter, H. G. *et al.*, EEC/COLIPA project on in vitro phototoxicity testing: First results obtained with a Balb/c 3T3 cell phototoxicity assay. *Toxicol. In Vitro.* **8**, 793–796 (1994).
 43. OECD: *In Vitro 3T3 NRU phototoxicity test. OECD Guideline for the testing of chemicals No. 432.* 1–19 (2004).
 44. Schümann, J., Boudon, S., Ulrich, P., Loll, N., Garcia, D. *et al.*, Integrated Preclinical Photosafety Testing Strategy for Systemically Applied Pharmaceuticals. *Toxicol. Sci.* **139**, 245–256 (2014).
 45. Kim, S. Y., Seo, S., Choi, K. H. & Yun, J., Evaluation of phototoxicity of tattoo pigments using the 3 T3 neutral red uptake phototoxicity test and a 3D human reconstructed skin model. *Toxicol. In Vitro* **65**, 104813 (2020).
 46. Jírová, D., Kejlová, K., Bendová, H., Ditrichová, D. & Mezuláníková, M., Phototoxicity of bituminous tars—correspondence between results of 3T3 NRU PT, 3D skin model and experimental human data. *Toxicol. In Vitro.* **19**, 931–934 (2005).

47. Benevenuto, C. G., Guerra, L. O. & Gaspar, L. R., Combination of retinyl palmitate and UV-filters: phototoxic risk assessment based on photostability and in vitro and in vivo phototoxicity assays. *Eur. J. Pharm. Sci. Off. J. Eur. Fed. Pharm. Sci.* **68**, 127–136 (2015).
48. Wang, C.-C., Xia, Q., Li, M., Wang, S., Zhao, Y. *et al.*, Metabolic Activation of Pyrrolizidine Alkaloids Leading to Phototoxicity and Photogenotoxicity in Human HaCaT Keratinocytes. *J. Environ. Sci. Heal. Part C* **32**, 362–384 (2014).
49. Yanga, Y., Xiong, X., Yang, X., Huan, J., Tan, X. *et al.*, Establishment and use of 3T3 NRU assay for assessment of phototoxic hazard of cosmetic products. *AATEX* **14**, 515–518 (2009).
50. Pape, W. J. W., Maurer, T., Pfannenbecker, U. & Steiling, W., The red blood cell phototoxicity test (photohaemolysis and haemoglobin oxidation): EU/COLIPA validation programme on phototoxicity (phase II). *Altern. to Lab. Anim.* **29**, 145–162 (2001).
51. Yamamoto, T., Tsurumaki, Y., Takei, M., Hosaka, M. & Oomori, Y., In vitro method for prediction of the phototoxic potentials of fluoroquinolones. *Toxicol. In Vitro.* **15**, 721–727 (2001).
52. Kandárová, H., Liebsch, M., Spielmann, H., Genschow, E., Schmidt, E. *et al.*, Assessment of the human epidermis model SkinEthic RHE for in vitro skin corrosion testing of chemicals according to new OECD TG 431. *Toxicol. In Vitro.* **20**, 547–559 (2006).
53. Netzlaff, F., Lehr, C.-M., Wertz, P. W. & Schaefer, U. F., The human epidermis models EpiSkin[®], SkinEthic[®] and EpiDerm[®]: An evaluation of morphology and their suitability for testing phototoxicity, irritancy, corrosivity, and substance transport. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **60**, 167–178 (2005).
54. Jirova, D., Liebsch, M., Basketter, D., Spiller, E., Kejlova, K. *et al.*, Comparison of human skin irritation and photo-irritation patch test data with cellular in vitro assays and animal in vivo data. *AATEX* **14**, 359–365 (2007).
55. Jones, P. A., King, A. V, Earl, L. K. & Lawrence, R. S., An assessment of the phototoxic hazard of a personal product ingredient using in vitro assays. *Toxicol. In Vitro.* **17**, 471–480 (2003).
56. Rijnkels, J. M., Whiteley, L. O. & Beijersbergen van Henegouwen, G. M., Time and dose-related ultraviolet B damage in viable pig skin explants held in a newly developed organ culture system. *Photochem. Photobiol.* **73**, 499–504 (2001).
57. Moser, J., Sarabia, Z., Minter, H., Lovell, W. W. & van Henegouwen, G. M. J. B., Photobinding of ketoprofen in vitro and ex vivo. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* **58**, 37–45 (2000).
58. de Vries, H., Encinas, S., Miranda, M. A., Castell, J.V., Beijersbergen an Henegouwen, G. M., Photodegradation and photobinding of tiaprofenic acid: in vitro versus in vivo. *Photochem. Photobiol.* **66**, 432–435 (1997).
59. Zhang, Z. & Monteiro-Riviere, N. A., Comparison of Integrins in Human Skin, Pig Skin, and Perfused Skin: An In Vitro Skin Toxicology Model. *J. Appl. Toxicol.* **17**, 247–253 (1997).
60. Abd, E., Yousef, S. A., Pastore, M. N., Telaprolu, K., Mohammed, Y. H. *et al.*, Skin models

- for the testing of transdermal drugs. *Clin. Pharmacol. Adv. Appl.* **8**, 163–176 (2016).
61. Sarabia, Z., Hernández, D., Castell, J. V & Beijersbergen van Henegouwen, G. M. J., Photoreactivity of tiaprofenic acid and suprofen using pig skin as an ex vivo model. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* **58**, 32–36 (2000).
 62. Hashimoto, Y., Tsutsui, M., Matsuo, S. & Iizuka, H., Flow cytometric analysis of pig epidermal keratinocytes: effects of ultraviolet B irradiation (UVB) and topical PUVA treatment. *J. Dermatol. Sci.* **10**, 16–24 (1995).
 63. Kawagishi, N., Hashimoto, Y., Takahashi, H., Ishida-Yamamoto, A. & Iizuka, H., Epidermal cell kinetics of pig skin in vivo following UVB irradiation: Apoptosis induced by UVB is enhanced in hyperproliferative skin condition. *J. Dermatol. Sci.* **18**, 43–53 (1998).
 64. Wenk, F., Evaluierung neuer Photosensibilisatoren zur Inaktivierung humanpathogener Mikroorganismen in vitro/ex vivo. Dissertation, Universität Regensburg, Deutschland (2017).
 65. Neumann, N. J., Fritsch, C. & Lehmann, P., Photodiagnostische Testverfahren. *Der Hautarzt* **51**, 113–125 (2000).
 66. Neumann, N. J., Hölzle, E., Plewig, G., Schwarz, T., Panizzon, R. G. *et al.*, Photopatch testing: The 12-year experience of the German, Austrian, and Swiss Photopatch Test Group. *J. Am. Acad. Dermatol.* **42**, 183–192 (2000).
 67. Kejlová, K., Jirova, D., Bendova, H., Kandarova, H., Weidenhoffer, Z. *et al.*, Phototoxicity of bergamot oil assessed by in vitro techniques in combination with human patch tests. *Toxicol. In Vitro* **21**, 1298–1303 (2007).
 68. Hölzle, E., Plewig, G., Hofmann, C. & Braun-Falco, O., Photopatch testing. Results of a survey on test procedures and experimental findings. In: *Neue Entwicklungen in der Dermatologie*, Eds. Hornstein, O. P., Hundeiker, M. & Schönfeld, J., 56–61, Springer Verlag (1987).
 69. Schönfeld, B., Effekte von pflanzlichen Antiphlogistika auf UV-induzierte Erytheme bei gesunden Probanden. Dissertation, Albert-Ludwigs-Universität Freiburg im Breisgau, Deutschland (2006).
 70. Hruza, L. L. & Pentland, A. P., Mechanisms of UV-Induced Inflammation. *J. Invest. Dermatol.* **100**, 35–41 (1993).
 71. Kessler, S., Untersuchung der antiinflammatorischen Wirkung von Pflanzenextrakten im UV-Erythemtest. Dissertation, Albert-Ludwigs-Universität Freiburg, Deutschland (2006).
 72. Farr, P. M. & Diffey, B. L., Quantitative studies on cutaneous erythema induced by ultraviolet radiation. *Br. J. Dermatol.* **111**, 673–682 (1984).
 73. Beikert, F. C., Schönfeld, B. S., Frank, U. & Augustin, M., Antiinflammatorische Wirksamkeit von 7 Pflanzenextrakten im Ultraviolett-Erythemtest: Eine randomisierte, placebokontrollierte Studie: A randomized, placebo-controlled study. *Der Hautarzt* **64**, 40–46 (2013).
 74. Hoffmann, J., Wölfle, U., Schempp, C. M. & Casetti, F., Gerbstoffe aus *Potentilla*

- officinalis wirken entzündungshemmend im UV-Erythem-Test und bei Anwendung auf atopischer Haut. *J. der Dtsch. Dermatologischen Gesellschaft* **14**, 917–923 (2016).
75. Casetti, F., Jung, W., Wölfle, U., Reuter, J., Neumann, K. *et al.*, Topical application of solubilized Reseda luteola extract reduces ultraviolet B-induced inflammation in vivo. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* **96**, 260–265 (2009).
 76. Harrison, G. I. & Young, A. R., Ultraviolet radiation-induced erythema in human skin. *Methods* **28**, 14–19 (2002).
 77. Narbutt, J., Philipsen, P. A., Harrison, G.I., Morgan, K. A., Lawrence, K. P. *et al.*, Sunscreen applied at ≥ 2 mg cm⁻² during a sunny holiday prevents erythema, a biomarker of ultraviolet radiation-induced DNA damage and suppression of acquired immunity. *Br. J. Dermatol.* **180**, 604–614 (2019).
 78. Diffey, B. L., Sources and measurement of ultraviolet radiation. *Methods* **28**, 4–13 (2002).
 79. Sola, Y., Baeza, D., Gómez, M. & Lorente, J., Ultraviolet spectral distribution and erythema-weighted irradiance from indoor tanning devices compared with solar radiation exposures. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* **161**, 450–455 (2016).
 80. De Fine Olivarius, F., Wulf, H. C., Crosby, J. & Norval, M., Isomerization of urocanic acid after ultraviolet radiation is influenced by skin pigmentation. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* **48**, 42–47 (1999).
 81. Tian, Y., Wang, Y. X., Gu, W.J., Zhang, P., Sun, Y. *et al.*, Physical measurement and evaluation of skin color changes under normal condition and post-ultraviolet radiation: a comparison study of Chromameter CM 2500d and Maxmeter MX18. *Skin Res. Technol.* **17**, 304–308 (2011).
 82. Fullerton, A., Fischer, T., Lahti, A., Wilhelm, K.-P., Takiwaki, H. *et al.*, Guidelines for measurement skin colour and erythema A report from the Standardization Group of the European Society of Contact Dermatitis. *Contact Dermatitis* **35**, 1–10 (1996).
 83. Piérard, G. E., EEMCO guidance for the assessment of skin colour. *J. Eur. Acad. Dermatology Venereol.* **10**, 1–11 (1998).
 84. Partosch, F., Computergestützte Analysen in der Toxikologie. Dissertation, Universität Potsdam, Deutschland (2015).
 85. Schmidt, F., Wenzel, J., Halland, N., Güssregen, S., Delafoy, L. *et al.*, Computational Investigation of Drug Phototoxicity: Photosafety Assessment, Photo-Toxophore Identification, and Machine Learning. *Chem. Res. Toxicol.* **32**, 2338–2352 (2019).
 86. Ringeissen, S., Marrot, L., Note, R., Labarussiat, A., Imbert, S. *et al.*, Development of a mechanistic SAR model for the detection of phototoxic chemicals and use in an integrated testing strategy. *Toxicol. In Vitro.* **25**, 324–334 (2011).
 87. de Lima Ribeiro, F. A. & Ferreira, M. M. C., QSAR model of the phototoxicity of polycyclic aromatic hydrocarbons. *J. Mol. Struct. THEOCHEM* **719**, 191–200 (2005).
 88. Kuga, K., Yasuno, H., Sakai, Y., Harada, Y., Shimizu, F. *et al.*, The abdominal skin of female Sprague-Dawley rats is more sensitive than the back skin to drug-induced phototoxicity. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods* **88**, 46–55 (2017).

89. Adachi, T., Satou, Y., Satou, H., Shibata, H., Miwa, S. *et al.*, Assessment of 8-methosypsoralen, lomefloxacin, sparfloxacin, and Pirfenidone phototoxicity in Long-Evans rats. *Int. J. Toxicol.* **34**, 16–23 (2015).
90. Neumann, N. J., Hanneken, S., Ruzicka, T. & Lehmann, P. Phototoxicity of exogenous protoporphyrin IX and δ -aminolevulinic acid in the photo hen's egg test. *Photodermatol. Photoimmunol. Photomed.* **20**, 224–229 (2004).
91. Bafteh, P. R., Siegesmund, M., Hanneken, S. & Neumann, N. J., Protective effects of β -carotene and melanin against protoporphyrine IX-induced phototoxicity in the photo hen's egg test. *Photodermatol. Photoimmunol. Photomed.* **28**, 12–16 (2012).
92. Neumann, N. J., Hölzle, E., Wallerand, M., Vierbaum, S., Ruzicka, T. *et al.*, The photoprotective effect of ascorbic acid, acetylsalicylic acid, and indomethacin evaluated by the photo hen's egg test. *Photodermatol. Photoimmunol. Photomed.* **15**, 166–170 (1999).
93. Tang, Y., Cai, R., Cao, D., Kong, X. & Lu, Y., Photocatalytic production of hydroxyl radicals by commercial TiO₂ nanoparticles and phototoxic hazard identification. *Toxicol.* **406–407**, 1–8 (2018).
94. Bafteh, P. R., Siegesmund, M., Kuerten, V. & Neumann, N. J., Phototoxicity of narrowband ultraviolet (UV) B (311 nm) compared with broadband UVB in the photo hen's egg test. *Br. J. Dermatol.* **172**, 462–466 (2015).
95. Yonezawa, Y., Ohsumi, T., Miyashita, T., Kataoka, A., Hashimoto, K. *et al.*, Evaluation of skin phototoxicity study using SD rats by transdermal and oral administration. *J. Toxicol. Sci.* **40**, 667–683 (2015).
96. Van Ravenzwaay, B. & Leibold, E., A comparison between in vitro rat and human and in vivo rat skin absorption studies. *Hum. Exp. Toxicol.* **23**, 421–430 (2004).
97. Kuga, K., Yonezawa, Y. & Katou, H., Multi-site study of an in vivo phototoxicity evaluation in Sprague-Dawley rats: skin site and sex differences in sensitivity to drug-induced phototoxicity. *Fundam. Toxicol. Sci.* **6**, 171–179 (2019).
98. Iyama, Y., Sato, H., Seto, Y. & Onoue, S., A new photosafety screening strategy based on in chemico photoreactivity and in vitro skin exposure for dermally-applied chemicals. *Toxicol. Lett.* **317**, 45–52 (2019).
99. Seto, Y., Ohtake, H., Sato, H. & Onoue, S., Phototoxic risk assessment of dermally-applied chemicals with structural variety based on photoreactivity and skin deposition. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* **113**, 104619 (2020).
100. Seto, Y., Onoue, S. & Yamada, S., In vitro/in vivo phototoxic risk assessments of griseofulvin based on photobiochemical and pharmacokinetic behaviors. *Eur. J. Pharm. Sci.* **38**, 104–111 (2009).
101. Yahia, R., Masoud, M. A., Sheded, M. S. & Mansour, H. A., The possible neurobehavioral protective effects of natural antioxidant against phototoxicity attenuation of antimicrobial quinolone group in rats. *J. Biochem. Mol. Toxicol.* **34**, 1–10 (2020).
102. Yonezawa, Y., Miyashita, T., Ashizawa, H., Hashimoto, K., Nejishima, H. *et al.*, Evaluation of a general toxicity study incorporating phototoxicity assessments in Sprague-Dawley rats. *J. Toxicol. Sci.* **42**, 145–157 (2017).

103. Yonezawa, Y., Katou, H. & Kuga, K., Multi-site study of an in vivo phototoxicity evaluation in Sprague-Dawley (SD) rats aimed at incorporating the phototoxicity assessments: effects of repeated administration and toxicokinetic blood collection on drug-induced phototoxicity. *Fundam. Toxicol. Sci.* **6**, 197–206 (2019).
104. Reus, A. A., Usta, M., Kenny, J. D., Clements, P. J., Pruijboom-Brees, I., Aylott, M., Lynch, A. M., Krul, A.M.C., The in vivo rat skin photomicronucleus assay: phototoxicity and photogenotoxicity evaluation of six fluoroquinolones. *Mutagenesis* **27**, 721–729 (2012).
105. Turnock, S., Gerbeix, C., Thirion-Delalande, C., Pearson, N. & Forster, R., Assessment of phototoxicity in pigmented Long-Evans rat: sparfloxacin and 8-methoxypsoralen. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* **92**, 303–314 (2018).
106. Learn, D. B. & Elliott, M. W., Cutaneous phototoxicity: Clinical observations versus histopathological findings. *Toxicol. Pathol.* **44**, 545–551 (2016).
107. Seto, Y., Inoue, R., Kato, M., Yamada, S. & Onoue, S., Photosafety assessments on pifendone: photochemical, photobiological, and pharmacokinetic characterization. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* **120**, 44–51 (2013).
108. Onoue, S., Kato, M., Inoue, R., Seto, Y. & Yamada, S., Photosafety screening of phenothiazine derivatives with combined use of photochemical and cassette-dosing pharmacokinetic data. *Toxicol. Sci.* **137**, 469–477 (2014).
109. Reinen, J., van Sas, P., van Huygevoort, T., Rubio, L., Scase, K. *et al.*, Development of a Phototoxicity Testing Strategy for Accurate Photosafety Evaluation of Pharmaceuticals Based on the Assessment of Possible Melanin-Binding Effects. *Int. J. Toxicol.* **37**, 296–307 (2018).
110. Iyama, Y., Sato, H., Seto, Y. & Onoue, S., Strategic photosafety screening system consisting of in chemico photoreactivity and in vitro skin exposure for quinolone derivatives. *Eur. J. Pharm. Sci.* **146**, 105257 (2020).
111. Okumura, Y., Yamauchi, H., Takayama, S., Kato, H. & Kokubo, M., Phototoxicity study of a ketoprofen poultice in guinea pigs. *J. Toxicol. Sci.* **30**, 19–28 (2005).
112. Nagasawa, M., Nakamura, S., Miyazaki, M., Nojima, Y., Hayakawa, H. *et al.*, Phototoxicity studies of pazufloxacin mesilate, a novel parenteral quinolone antimicrobial agent-in vitro and in vivo studies. *Jpn. J. Antibiot.* **55**, 259–269 (2002).
113. Kim, M.-A., Son, H.-U., Yoon, C.-S., Nam, S.-H., Choi, Y.-C. *et al.*, Comparison of in vitro and in vivo phototoxicity tests with S-(–)-10,11-dihydroxyfarnesic acid methyl ester produced by *Beauveria bassiana* KACC46831. *Biomed. Reports* **2**, 659–663 (2014).
114. Lee, S.-H., Evaluation of acute skin irritation and phototoxicity by aqueous and ethanol fractions of *Angelica keiskei*. *Exp Ther Med* **5**, 45–50 (2013).
115. Choi, Y.-G., Lee, J.-H., Bae, I.-H., Ah, Y.-C., Ki, H.-M. *et al.*, Titanium dioxide inclusion in backing reduce the photoallergenicity of ketoprofen transdermal patch. *Arch. Toxicol.* **85**, 219–226 (2010).
116. Nam, C., An, S., Lee, E., Moon, S., Kang, J. *et al.*, An in vitro phototoxicity assay battery (photohaemolysis and 3T3 NRU PT test) to assess phototoxic potential of fragrances. *Altern. to Lab. Anim.* **32**, 693–697 (2004).

117. Conconi, M. T., Montesi, F. & Parnigotto, P. P., Antiproliferative Activity and Phototoxicity of some Methyl Derivatives of 5-Methoxypsoralen and 5-Methoxyangelicin. *Pharmacol. Toxicol.* **82**, 193–198 (1998).
118. Rauterberg, A. D., Jung, E. G., Burger, R. & Rauterberg, E. W., Phototoxic erythema following PUVA treatment: independence of complement. *J. Invest. Dermatol.* **94**, 144–149 (1990).
119. Nakazawa, T., Shimo, T., Chikamatsu, N., Igarashi, T., Nagata, O. *et al.*, Study on the mechanism of photosensitive dermatitis caused by ketoprofen in the guinea pig. *Arch. Toxicol.* **80**, 442–448 (2006).
120. Ferreira, A. S., Barbosa, N. R. & Silva, S. S., In vivo xylitol primary dermal irritation and phototoxicity evaluation. *Lat. Am. J. Pharm.* **28**, 192–195 (2009).
121. Akter, U., Niwa, M., Nose, T., Kaida, T., Matsuno, H. *et al.*, Effects of several agents on UVB-and UVA plus systemic fluoroquinolone-induced erythema of guinea pig skin evaluated by reflectance colorimetry. *Free Radic. Biol. Med.* **24**, 1113–1119 (1998).
122. Park, Y.-H., Jeong, S. H., Yi, S. M., Choi, B.H., Kim, Y. R. *et al.*, Analysis for the potential of polystyrene and TiO₂ nanoparticles to induce skin irritation, phototoxicity, and sensitization. *Toxicol. In Vitro.* **25**, 1863–1869 (2011).
123. Lee, B.-S., Choi, Y.-G., Son, W.-C., Jung, K.-M., Kim, J.J. *et al.*, Ketoprofen: experimental overview of dermal toxicity. *Arch. Toxicol.* **81**, 743–748 (2007).
124. Sugiura, M., Hayakawa, R., Xie, Z., Sugiura, K., Hiramoto, K. *et al.*, Experimental study on phototoxicity and the photosensitization potential of ketoprofen, suprofen, tiaprofenic acid and benzophenone and the photocross-reactivity in guinea pigs. *Photodermatol. Photoimmunol. Photomed.* **18**, 82–89 (2002).
125. Han, S. M., Hong, I.P., Woo, S. O., Kim, S.G., Jang, H.R. *et al.*, Evaluation of the skin phototoxicity and photosensitivity of honeybee venom. *J. Cosmet. Dermatol.* **16**, 68–75 (2017).
126. Padmavathi, T., Johnley, I. I. R. & Jeyabaskaran, P., Efficacy of topical soy Isoflavonoid extract in prevention and reversal of photo-ageing in guinea pig model. *Panacea J. Med. Sci.* **10**, 108–113 (2020).
127. Godin, B. & Touitou, E., Transdermal skin delivery: predictions for humans from in vivo, ex vivo and animal models. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **59**, 1152–1161 (2007).
128. Ge, L., Chen, L., Mo, Q., Zhou, G., Meng, X. *et al.*, Total phenylethanoid glycosides and magnololide I a from *Magnolia officinalis* var. *biloba* fruits inhibit ultraviolet B-induced phototoxicity and inflammation through MAPK/NF- κ B signaling pathways. *RSC Adv.* **8**, 4362–4371 (2018).
129. Hossy, B. H., da Costa Leitao, A. A., Dos Santos, E.P., Matsuda, M., Rezende, L. B., *et al.*, Phototoxic assessment of a sunscreen formulation and its excipients: An in vivo and in vitro study. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* **173**, 545–550 (2017).
130. De Ávila, R. I., de Sousa Vieira, M., Gaeti, M. P. N., Moreira, L.C., Rodrigues, L. D. B. *et al.*, Toxicity evaluation of the photoprotective compound LQFM048: eye irritation, skin toxicity and genotoxic endpoints. *Toxicology* **376**, 83–93 (2017).

131. Boudon, S. M., Plappert-Helbig, U., Odermatt, A. & Bauer, D. Characterization of vemurafenib phototoxicity in a mouse model. *Toxicol. Sci.* **137**, 259–267 (2014).
132. Hossy, B. H., da Costa Leitao, A. A., Luz, F. B., dos Santos, E. P., Allodi, S. *et al.*, Effects of a sunscreen formulation on albino hairless mice: a morphological approach. *Arch. Dermatol. Res.* **305**, 535–544 (2013).
133. Filip, G. A., Postescu, I. D., Bolfa, P., Catoi, C., Muresan, A. *et al.*, Inhibition of UVB-induced skin phototoxicity by a grape seed extract as modulator of nitrosative stress, ERK/NF- κ B signaling pathway and apoptosis, in SKH-1 mice. *Food Chem. Toxicol.* **57**, 296–306 (2013).
134. Langner, A., Wolska, H., Marzulli, F. N., Jablonska, S., Jarzabek-Chorzelska, M. *et al.*, Dermal toxicity of 8-methoxypsoralen administered (by gavage) to hairless mice irradiated with long-wave ultraviolet light. *J. Invest. Dermatol.* **69**, 451–457 (1977).
135. Athar, M., An, K. P., Tang, X., Morel, K. D., Kim, A. L. *et al.*, Photoprotective effects of sulindac against ultraviolet B-induced phototoxicity in the skin of SKH-1 hairless mice. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **195**, 370–378 (2004).
136. He, Q., Fang, G., Wang, Y., Wei, Z., Wang, D. *et al.*, Experimental evaluation of cyadox phototoxicity to Balb/c mouse skin. *Photodermatol. Photoimmunol. Photomed.* **22**, 100–104 (2006).
137. Owen, K., Comparative grepafloxacin phototoxicity in mouse skin. *J. Antimicrob. Chemother.* **42**, 261–264 (1998).
138. Konrad, K., Hönigsmann, H., Gschnait, F. & Wolff, K., Mouse model for protoporphyria II. Cellular and subcellular events in the photosensitivity flare of the skin. *J. Invest. Dermatol.* **65**, 300–310 (1975).
139. Kerdel, F. A., Soter, N. A. & Lim, H. W., In vivo mediator release and degranulation of mast cells in hematoporphyrin derivative-induced phototoxicity in mice. *J. Invest. Dermatol.* **88**, 277–280 (1987).
140. Selvaag, E. & Thune, P., Phototoxicity to sulphonamide-derived oral antidiabetics and diuretics: investigations in hairless mice. *Photodermatol. Photoimmunol. Photomed.* **13**, 4–8 (1997).
141. Netzlaff, F., Kaca, M., Bock, U., Haltner-Ukomadu, E., Meiers, P. *et al.*, Permeability of the reconstructed human epidermis model Episkin® in comparison to various human skin preparations. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **66**, 127–134 (2007).
142. Choe, C., Schleusener, J., Lademann, J. & Darvin, M. E., Human skin in vivo has a higher skin barrier function than porcine skin ex vivo—comprehensive Raman microscopic study of the stratum corneum. *J. Biophotonics* **11**, e201700355 (2018).
143. Jung, E. C. & Maibach, H. I., Animal models for percutaneous absorption. *J Appl Toxicol* **35**, 1–10 (2015).
144. Kejlová, K., Jírová, D., Bendová, H., Gajdoš, P. & Kolářová, H., Phototoxicity of essential oils intended for cosmetic use. *Toxicol. In Vitro* **24**, 2084–2089 (2010).
145. Toyoda, A., Sugiyama, M., Furihata, S., Nishizumi, K., Omori, T. *et al.*, Development of a modified 3T3 Neutral Red Uptake Phototoxicity Test protocol for evaluation of poorly

- water-soluble substances. *J. Toxicol. Sci.* **42**, 569–577 (2017).
146. Gaspar, L. R., Tharmann, J., Maia Campos, P. M. B. G. & Liebsch, M., Skin phototoxicity of cosmetic formulations containing photounstable and photostable UV-filters and vitamin A palmitate. *Toxicol. In Vitro.* **27**, 418–425 (2013).
 147. Salvador, A., Vedaldi, D., Brun, P. & Dall'Acqua, S., Vandetanib-induced phototoxicity in human keratinocytes NCTC-2544. *Toxicol. In Vitro* **28**, 803–811 (2014).
 148. Seto, Y., Inoue, R., Ochi, M., Gandy, G., Yamada, S. *et al.*, Combined use of in vitro phototoxic assessments and cassette dosing pharmacokinetic study for phototoxicity characterization of fluoroquinolones. *AAPS J.* **13**, 482–492 (2011).
 149. Zgadzaj, A., Giebultowicz, J., Gubernator, J., Podbielska, M., Sommer, S. *et al.*, Multi- and unilamellar liposomal encapsulation of ciprofloxacin as ways to modify its phototoxicity and photodegradation. *Eur. J. Pharm. Sci. Off. J. Eur. Fed. Pharm. Sci.* **129**, 181–189 (2019).
 150. Okamoto, Y., Ryu, A. & Ohkoshi, K., In vitro alternatives and phototoxicity testing. I. Evaluation of in vitro phototoxicity assays. *Altern. Lab. Anim.* **27**, 639–664 (1999).
 151. Draper, M. P., Bhatia, B., Assefa, H., Honeyman, L., Garrity-Ryan, L. K. *et al.*, In vitro and in vivo antimalarial efficacies of optimized tetracyclines. *Antimicrob. Agents Chemother.* **57**, 3131–3136 (2013).
 152. Dwivedi, A., Mujtaba S. F., Kushwaha, H. N., Ali, D., Yadav, N. *et al.*, Photosensitizing Mechanism and Identification of Levofloxacin Photoproducts at Ambient UV Radiation. *Photochem. Photobiol.* **88**, 344–355 (2012).
 153. Sugiyama, M., In vitro assay to predict phototoxicity of chemicals:(1) Red blood cell hemolysis assay. *AATEX* **2**, 183–191 (1994).
 154. Pape, W. J. W., Brandt, M. & Pfannenbecker, U., Combined in vitro assay for photohaemolysis and haemoglobin oxidation as part of a phototoxicity test system assessed with various phototoxic substances. *Toxicol. In Vitro.* **8**, 755–757 (1994).
 155. Vargas, F., Fuentes, A., Sequera, J., Mendez, H., Fraile, G. *et al.*, In Vitro Approach to investigating the phototoxicity of the diuretic drug triamterene. *Toxicol. In Vitro.* **12**, 661–667 (1998).
 156. Pignatello, R., Ferro, M., De Guidi, G., Salemi, G., Vandelli, M. A. *et al.*, Preparation, characterisation and photosensitivity studies of solid dispersions of diflunisal and Eudragit RS100® and RL100®. *Int. J. Pharm.* **218**, 27–42 (2001).
 157. Vargas, F., Rivas, C., Zoltan, T., Fuentes, A., Padron, L. *et al.*, Photodegradation and in vitro phototoxicity of aceclofenac. *Die Pharmazie.* **62**, 337–341 (2007).
 158. Miolo, G., Viola, G., Vedaldi, D., Dall'Acqua, F., Fravolini, A. *et al.*, In vitro phototoxic properties of new 6-desfluoro and 6-fluoro-8-methylquinolones. *Toxicol. In Vitro.* **16**, 683–693 (2002).
 159. Yu-Ying, H., Ramirez, D., Detweiler, C., Mason, R. & Chignell, C. UVA-ketoprofen-induced hemoglobin radicals detected by immuno-spin trapping[para]. *Photochem. Photobiol.* **77**, 585–591 (2003).
 160. Benavides, T., Martinez, V., Mitjans, M., Infante, M. R., Moran, C. *et al.*, Assessment of

- the potential irritation and photoirritation of novel amino acid-based surfactants by in vitro methods as alternative to the animal tests. *Toxicology* **201**, 87–93 (2004).
161. Singh, B., Vasishth, A., Nagaveni, S. & Singh, S., In vitro red blood cells photohemolytic studies by antidiabetics, antihypertensives and their combinations. *Int. J. Pharm. Sci. Heal. Care* **6**, 40–48 (2016).
 162. Vargas, A., Pegaz, B., Debefve, E., Konan-Kouakou, Y., Lange, N. *et al.*, Improved photodynamic activity of porphyrin loaded into nanoparticles: an in vivo evaluation using chick embryos. *Int. J. Pharm.* **286**, 131–145 (2004).
 163. Wright, C. Y., Karsten, A.E., Wilkes, M., Singh, A., du Plessis, J. *et al.*, Diffuse Reflectance Spectroscopy Versus Mexameter® MX18 Measurements of Melanin and Erythema in an African Population. *Photochem. Photobiol.* **92**, 632–636 (2016).
 164. Rozman, B., Gosenca, M., Falson, F. & Gašperlin, M., The influence of microemulsion structure on their skin irritation and phototoxicity potential. *Int. J. Pharm.* **499**, 228–235 (2016).
 165. Portes, P., Pygmalion, M. J., Popovic, E., Cottin, M. & Mariani, M., Use of human reconstituted epidermis Episkin® for assessment of weak phototoxic potential of chemical compounds. *Photodermatol. Photoimmunol. Photomed.* **18**, 96–102 (2002).
 166. Roguet, R., The use of reconstructed human epidermis EPISKIN in the assessment of local tolerance of cosmetics and chemicals. *Altern. to Lab. Anim.* **32**, 83–91 (2004).
 167. Bernard, F.-X., Barrault, C., Deguercy, A., De Wever, B. & Rosdy, M., Development of a highly sensitive in vitro phototoxicity assay using the SkinEthic™ reconstructed human epidermis. *Cell Biol. Toxicol.* **16**, 391–400 (2000).
 168. Cohen, C., Dossou, K. G., Rougier, A. & Roguet, R., Episkin: an in vitro model for the evaluation of phototoxicity and sunscreen photoprotective properties. *Toxicol. In Vitro.* **8**, 669–671 (1994).
 169. Medina, J., Elsaesser, C., Picarles, V., Grenet, O., Kolopp, M. *et al.*, Assessment of the phototoxic potential of compounds and finished topical products using a human reconstructed epidermis. *In Vitro. Mol. Toxicol.* **14**, 157–168 (2001).
 170. Lee, J. H., Kim, J. E., Kim, B. J. & Cho, K. H., In vitro phototoxicity test using artificial skin with melanocytes. *Photodermatol. Photoimmunol. Photomed.* **23**, 73–80 (2007).
 171. Rok, J., Rzepka, Z., Respondek, M., Beberok, A. & Wrześniok, D., Chlortetracycline and melanin biopolymer - The risk of accumulation and implications for phototoxicity: An in vitro study on normal human melanocytes. *Chem. Biol. Interact.* **303**, 27–34 (2019).
 172. Lelièvre, D., Justine, P., Christiaens, F., Bonaventure, N., Coutet, J. *et al.*, The EpiSkin phototoxicity assay (EPA): development of an in vitro tiered strategy using 17 reference chemicals to predict phototoxic potency. *Toxicol. In Vitro.* **21**, 977–995 (2007).
 173. Meinke, M. C., Schanzer, S., Haag, S. F., Casetti, F., Müller, M. L. *et al.*, In vivo photoprotective and anti-inflammatory effect of hyperforin is associated with high antioxidant activity in vitro and ex vivo. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **81**, 346–350 (2012).
 174. Yao, M., Yaroslavsky, A., Henry, F. P., Redmond, R. W. & Kochevar, I. E., Phototoxicity is not associated with photochemical tissue bonding of skin. *Lasers Surg. Med. Off. J. Am.*

- Soc. Laser Med. Surg.* **42**, 123–131 (2010).
175. Maisch, T., Bosl, C., Szeimies, R.-M., Love, B. & Abels, C., Determination of the antibacterial efficacy of a new porphyrin-based photosensitizer against MRSA ex vivo. *Photochem. Photobiol. Sci. Off. J. Eur. Photochem. Assoc. Eur. Soc. Photobiol.* **6**, 545–551 (2007).
 176. Bacqueville, D. & Mavon, A., Comparative analysis of solar radiation-induced cellular damage between ex vivo porcine skin organ culture and in vitro reconstructed human epidermis. *Int. J. Cosmet. Sci.* **31**, 293–302 (2009).
 177. Moison, R. M. W., Topically applied vitamin C and cysteine derivatives protect against UVA-induced photodegradation of suprofen in ex vivo pigskin. *Photochem. Photobiol.* **77**, 343–348 (2003).
 178. Bacqueville, D. & Mavon, A., Caspase-3 Activation and DNA Damage in Pig Skin Organ Culture After Solar Irradiation. *Photochem. Photobiol.* **84**, 1164–1171 (2008).
 179. The European Multicentre Photopatch Test Study (EMCPPTS) Taskforce: A European multicentre photopatch test study. *Br. J. dermatology* **166**, 1002–1009 (2012).
 180. Pigatto, P. D., Guzzi, G., Schena, D., Guarrera, M., Foti, C. *et al.*, Photopatch tests: an Italian multicentre study from 2004 to 2006. *Contact Dermatitis* **59**, 103–108 (2008).
 181. Bryden, A. M., Moseley, H., Ibbotson, S. H., Chowdhury, M. M. U., Beck, M. H. *et al.*, Photopatch testing of 1155 patients: results of the U.K. multicentre photopatch study group. *Br. J. Dermatol.* **155**, 737–747 (2006).
 182. Bruynzeel, D. P., Ferguson, J., Andersen, K., Goncalo, M., English, J. *et al.*, Photopatch testing: a consensus methodology for Europe. *J. Eur. Acad. Dermatology Venereol.* **18**, 679–682 (2004).
 183. Aerts, O., Goossens, A., Marguery, M. C., Castelain, M., Boursault, L. *et al.*, Photoaggravated allergic contact dermatitis and transient photosensitivity caused by methylisothiazolinone. *Contact Dermatitis* **78**, 241–245 (2018).
 184. Rai, R. & Thomas, M., Photopatch and UV-irradiated patch testing in photosensitive dermatitis. *Indian Dermatol. Online J.* **7**, 12–16 (2016).
 185. Jindal, N., Sharma, N. L., Mahajan, V. K., Shanker, V., Tegta, G. R. *et al.*, Evaluation of photopatch test allergens for Indian patients of photodermatitis: Preliminary results. *Indian J. Dermatology, Venereol. Leprol.* **77**, 148–155 (2011).
 186. Avenel-Audran, M., Dutartre, H., Goossens, A., Jeanmougin, M., Comte, C. *et al.*, Octocrylene, an emerging photoallergen. *Arch. Dermatol.* **146**, 753–757 (2010).
 187. Subiabre-Ferrer, D., Esteve-Martinez, A., Blasco-Encinas, R., Sierra-Talamantes, C., Perez-Ferriols, A. *et al.*, European photopatch test baseline series: A 3-year experience. *Contact Dermatitis* **80**, 5–8 (2019).
 188. Valbuena Mesa, M. C. & Hoyos Jiménez, E. V., Photopatch testing in Bogota (Colombia): 2011–2013. *Contact Dermatitis* **74**, 11–17 (2016).
 189. Kerr, A. C., Niklasson, B., Dawe, R. S., Escoffier, A., Krasteva, M. *et al.*, A double-blind, randomized assessment of the irritant potential of sunscreen chemical dilutions used in photopatch testing. *Contact Dermatitis* **60**, 203–209 (2009).

190. De la Cuadra-Oyanguren, J., Perez-Ferriols, A., Lecha-Carrelero, M., Gimenez-Arnau, A. M., Fernandez-Redondo, V. *et al.*, Results and assessment of photopatch testing in Spain: towards a new standard set of photoallergens. *Actas Dermo-Sifiliográficas (English Ed.)* **98**, 96–101 (2007).
191. Cardoso, J. C., Canelas, M. M., Gonçalo, M. & Figueiredo, A., Photopatch testing with an extended series of photoallergens: A 5-year study. *Contact Dermatitis* **60**, 325–329 (2009).
192. Kornhauser, A., Wei, R.R., Yamaguchi, Y., Coelho, S. G., Kaidbey, K. *et al.*, The effects of topically applied glycolic acid and salicylic acid on ultraviolet radiation-induced erythema, DNA damage and sunburn cell formation in human skin. *J. Dermatol. Sci.* **55**, 10–17 (2009).
193. Hughes-Formella, B. J., Filbry, A., Gassmueller, J. & Rippke, F., Anti-inflammatory efficacy of topical preparations with 10% hamamelis distillate in a UV erythema test. *Skin Pharmacol. Physiol.* **15**, 125–132 (2002).
194. Seiwerth, J., Tasiopoulou, G., Hoffmann, J., Wölfle, U., Schwabe, K. *et al.*, Anti-Inflammatory Effect of a Novel Topical Herbal Composition (VEL-091604) Consisting of Gentian Root, Licorice Root and Willow Bark Extract. *Planta Med.* **146**, 608–614 (2019).
195. Reuter, J., Jocher, A., Stump, J., Grossjohann, B., Franke, G. *et al.*, Investigation of the anti-inflammatory potential of Aloe vera gel (97.5%) in the ultraviolet erythema test. *Skin Pharmacol. Physiol.* **21**, 106–110 (2008).
196. Kollias, N., Stamatas, G. N. & Youn, J., Suppression of UVB-induced Cutaneous Erythema by a Previous UVB Exposure. *Photochem. Photobiol.* **74**, 471–476 (2001).
197. Jocher, A., Kessler, S., Hornstein, S., Mönning, J. S. & Schempp, C. M., The UV erythema test as a model to investigate the anti-inflammatory potency of topical preparations—reevaluation and optimization of the method. *Skin Pharmacol. Physiol.* **18**, 234–240 (2005).
198. Jeon, S.-Y., Lee, C.-Y., Song, K.-H. & Kim, K.-H., Spectrophotometric measurement of minimal erythema dose sites after narrowband ultraviolet B phototesting: clinical implication of spetrophotometric values in phototherapy. *Ann. Dermatol.* **26**, 17–25 (2014).
199. Bjerring, P., Comparison of the bioactivity of mometasone furoate 0.1% fatty cream, betamethasone dipropionate 0.05% cream and betamethasone valerate 0.1% cream in humans. *Skin Pharmacol. Physiol.* **6**, 187–192 (1993).
200. Reuter, J., Jocher, A., Hornstein, S., Mönning, J. S. & Schempp, C. M., Sage Extract Rich in Phenolic Diterpenes Inhibits Ultraviolet-Induced Erythema in Vivo. *Planta Med.* **73**, 1190–1191 (2007).
201. Reuter, J., Huyke, C., Casetti, F., Theek, C., Frank, U. *et al.*, Anti-inflammatory potential of a lipolotion containing coriander oil in the ultraviolet erythema test. *JDDG J. der Dtsch. Dermatologischen Gesellschaft* **6**, 847–851 (2008).
202. Wan, M., Hu, R., Xie, X., Gong, Z., Yi, J. *et al.*, Skin Erythema, Pigmentation and Hydration Kinetics after Ultraviolet Radiation-induced Photodamage in Southern Chinese Women. *Photochem. Photobiol.* **93**, 1276–1281 (2017).

203. Wilson, P. D., Kaidbey, K. H. & Kligman, A. M., Ultraviolet light sensitivity and prolonged UVR-erythema. *J. Invest. Dermatol.* **77**, 434–436 (1981).
204. Farr, P. M., Diffey, B. L. & Humphreys, F. A., Quantitative Study of the Effect of Terfenadine on Cutaneous Erythema Induced by UVB and UVC Radiation. *J. Invest. Dermatol.* **87**, 771–774 (1986).
205. Hughes-Formella, B. J., Bohnsack, K., Rippke, F., Benner, G., Rudolph, M. *et al.*, Anti-inflammatory effect of hamamelis lotion in a UVB erythema test. *Dermatology* **196**, 316–322 (1998).
206. Lee, J. H., An, H.T., Chung, J.H., Kim, K.H., Eun, H.C. *et al.*, Acute effects of UVB radiation on the proliferation and differentiation of keratinocytes. *Photodermatol. Photoimmunol. Photomed.* **18**, 253–261 (2002).
207. Park, S., Huh, C., Choe, Y. & Youn, J., Time course of ultraviolet-induced skin reactions evaluated by two different reflectance spectrophotometers: DermaSpectrophotometer® and Minolta spectrophotometer CM-2002. *Photodermatol. Photoimmunol. Photomed.* **18**, 23–28 (2002).
208. Grundmann, J.-U., Böckelmann, R., Bonnekoh, B. & Gollnick, H. P. M., UV Erythema Reducing Capacity of Mizolastine Compared to Acetyl-salicylic Acid or both Combined in Comparison to Indomethacin. *Photochem. Photobiol.* **74**, 587–592 (2001).
209. Brugière, C., Stefan, A., Morice, C., Cornet, E., Moreau, A. *et al.*, Vemurafenib skin phototoxicity is indirectly linked to ultraviolet A minimal erythema dose decrease. *Br. J. Dermatol.* **171**, 1529–1532 (2014).