

**Medizinische Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg**

**Präklinische Validierung der Sicherheit von  
topisch appliziertem Chloralhydrat**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Medizin (Dr. med.)

vorgelegt

der Medizinischen Fakultät

der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Friedrich Karsten Gilbrich

geboren am 18. Februar 1993 in Havelberg

Betreuer: apl. Prof. Dr. med. habil. Johannes Wohlrab

Gutachter: Prof. Dr. med. habil. Cord Sünderkötter

Prof. Dr. med. habil. Matthias Fischer, Cottbus

Prof. Dr. med. habil. Martin Metz, Berlin

Prof. Dr. med. habil. Bernd Bonnekoh, Magdeburg

04.05.2021

25.11.2021



Für meinen Vater Dr.med. Karsten Gilbrich

## Referat

Juckreiz ist ein Symptom einer komplexen neurosensorischen Dysregulation, wird durch unterschiedliche pathogenetische Vorgänge ausgelöst und tritt bei einer Vielzahl von Haut- und Systemerkrankungen auf. Wegen der starken Beeinträchtigung der Lebensqualität insbesondere bei chronischem Juckreiz besteht ein großer Bedarf an effizienten Therapien. Auch bei der Psoriasis, einer chronisch-entzündlichen Systemerkrankung, finden sich am Hautorgan juckende, entzündliche Effloreszenzen. Die Pathogenese des psoriatischen Pruritus ist bisher nicht vollständig verstanden, wird allerdings im Zusammenhang mit einer Dysfunktion des GABAergen Systems gesehen. Zur topischen Therapie des psoriatischen Juckreizes wird Chloralhydrat in einem Rezepturarzneimittel eingesetzt. Da zur Einschätzung der Sicherheit bisher keine klinischen Studien vorliegen, wurde in der vorliegenden Arbeit anhand präklinischer Untersuchungsmethoden (HET-CAM-Test, Scratch-Assay) die kutane Verträglichkeit untersucht und durch eine ausführliche Literaturrecherche die kutane und systemische Bioverfügbarkeit anhand toxikologischer Daten bewertet. Die Ergebnisse zeigen, dass die topische Anwendung von Chloralhydrat in einer 3%-igen Formulierung in der Indikation Psoriasis sowohl bezüglich der kutanen Verträglichkeit als auch systemischen Sicherheit als unbedenklich eingestuft werden kann. Allerdings kann aufgrund fehlender klinischer Daten ein Restrisiko nicht ausgeschlossen werden. Aus regulatorischer Sicht kann durch die nun vorgelegten Ergebnisse und Analysen eine Plausibilitätsprüfung sowohl durch den Apotheker als auch durch den verordnenden Arzt erfolgen, um Chloralhydrat in Rezepturarzneimitteln für die topische Applikation einsetzen zu können. Um die antipruriginöse Wirksamkeit von Chloralhydrat in definierten Indikationen belegen zu können, sind kontrollierte klinische Studien unverzichtbar.

Gilbrich, Friedrich Karsten: Präklinische Validierung der Sicherheit von topisch appliziertem Chloralhydrat, Halle (Saale), MLU Halle-Wittenberg, Med. Fak., Diss., 53 Seiten, 2021

## Inhaltsverzeichnis

	Seite
Referat	I
Inhaltsverzeichnis	II
Verzeichnis der Abkürzungen und Symbole	III
<b>1 Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1 Physiologische und pathophysiologische Grundlagen des Pruritus	1
1.2 Psoriasis als Systemerkrankung	2
1.3 GABA <sub>A</sub> -Rezeptoren bei psoriatischem Pruritus	3
1.4 Chloralhydrat	4
1.4.1 Hintergrund	4
1.4.2 Pharmakologie und Toxikologie	4
1.4.3 Physikochemische Eigenschaften von Chloralhydrat	7
1.4.4 Topische Anwendung von Chloralhydrat	7
1.4.5 Toxikologische Betrachtung	7
1.4.6 Optionen für die präklinische Validierung der Sicherheit	8
<b>2 Zielstellung</b>	<b>10</b>
<b>3 Material und Methoden</b>	<b>11</b>
3.1 HaCaT-Zellen	11
3.2 Dermale Fibroblasten	12
3.3 Scratch-Assay	12
3.4 HET-CAM-Test	13
3.5 Laser-Doppler-Fluxmetrie	17
3.6 Biometrische Auswertung	18
3.7 Pharmakokinetisches Modell zur Schätzung der systemischen Bioverfügbarkeit nach epikutaner Applikation	18
<b>4 Ergebnisse</b>	<b>20</b>
4.1 Scratch-Assay	20
4.1.1 Verschlussrate an HaCaT-Zellen	20
4.1.2 Verschlussrate an dermalen Fibroblasten	21
4.2 HET-CAM-Test	22
4.2.1 Visueller Score	22
4.2.2 Laser-Doppler-Fluxmetrie	25
4.3 Pharmakokinetische Modellrechnung zur systemischen Bioverfügbarkeit	26

---

<b>5</b>	<b>Diskussion</b>	27
5.1	Ergeben sich auf zytotoxikologischer Ebene Hinweise für Sicherheitsbedenken in Bezug auf eine topische Applikation?	27
5.2	Erfüllen der Wirkstoff und das Rezepturarzneimittel die regulatorischen Voraussetzungen in einem präklinischen Verträglichkeitsmodell für Topika?	30
5.3	Ergänzen die Ergebnisse die bisher vorliegenden Daten zur Pharmakologie und Toxikologie von Chloralhydrat?	32
5.4	Welche Bewertungen lassen sich für die praktische Anwendung von Chloralhydrat in Topika formulieren?	36
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung</b>	39
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	40
<b>8</b>	<b>Thesen</b>	52
	Tabellarischer Lebenslauf	V
	Selbstständigkeitserklärung	VI
	Erklärung über frühere Promotionsversuche	VII
	Danksagung	VIII

## Verzeichnis der Abkürzungen und Symbole

Abkürzung	Bedeutung
A	Flächeninhalt
Abb.	Abbildung
ADH	Alkoholdehydrogenase
AMG	Arzneimittelgesetz
AMK	Arzneimittelkommission der deutschen Apotheker
AKDÄ	Arzneimittelkommission der deutschen Ärzteschaft
At0	Läsionale Fläche
Atx	Läsionale Fläche zum Zeitpunkt x
AU	Arbiträre Einheiten
C	Koagulation/Stagnieren der Perfusion/Intravasale Gerinnung
CAM	Chorion-Allantois-Membran
CH	Chloralhydrat
CYP2E1	Cytochrom-P450
D	Dosis/Dosiskoeffizient
DAB	Deutsches Arzneibuch
DAC	Deutscher Arzneimittel Codex
DSMO	Dimethylsulfoxid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ET-1	Endothelin
FV	Verdünnungskoeffizient
GABA	Gamma-Aminobuttersäure
H	Hämorrhagie
HaCaT	Human adult low Calcium high Temperature Keratinocytes
H1R	Histaminrezeptor
HET-CAM	Hen's egg test der Chorion-Allantois-Membran
HWS	Halbwertszeit
IPSP	Inhibitorische postsynaptische Potentiale
IS	Irritationsscore
KOF	Körperoberfläche
L	Gefäßlyse
LDF	Laser-Doppler-Fluxmetrie
LD50	Dosis letalis media
LOAEL	Lowest-observed-adverse-effect level
NAD	Nicotinamidadenindinucleotid
NHDF	Native humane dermale Fibroblasten
NRF	Neues Rezepturformularium
PAD	Primary afferent depolarization
PAR-2	Protease activated receptor 2
PBS	Phosphat gepuferte Salzlösung
SCR	Scratch closure rate
SLS	Natriumlaurylsulfat
TCA	Trichloracetat
TCE	Trichlorethanol
TRPV1	Transient Receptor potential vanilloid-1
WHS	Wasserhaltige Salbe
Z	Zellzahl pro ml Suspension
ZA	Anzahl gezählter Zellen
ZNS	Zentrales Nervensystem
5-HAT	5-Hydroxytryptamin/Serotonin

## 1. Einleitung

### 1.1 Physiologische und pathophysiologische Grundlagen des Pruritus

Chronischer Pruritus ist ein häufiges, gleichwohl subjektives Symptom einer eigenständigen Sinneswahrnehmung, welches auf einer gestörten neurosensorischen Aktivität beruht (Yosipovitch G, Rosen JD et al. 2018). Das neuronale Signal wird über primär afferente Fasern, die auch als Prurizeptoren bezeichnet werden, von der Peripherie über das Rückenmark ins Gehirn geleitet (Najafi P, Carre JL et al. 2020). Nach biophysikalischen Kriterien werden diese pseudounipolaren und polymodalen Prurizeptoren in dünne myelinisierte A $\delta$ -Fasern (Durchmesser 2-5  $\mu$ m, Leitgeschwindigkeit bis zu 8 m/s) und nichtmyelinisierte C-Fasern (Durchmesser 0,2-1,5  $\mu$ m, Leitgeschwindigkeit geringer als 2 m/s) unterteilt. Diese Fasern sind in ein interaktives Milieu eingebettet, welches durch molekulare, chemische, physikalische und zelluläre Faktoren bestimmt und geprägt wird (Van Laarhoven AIM, Marker JB et al. 2019). Diese Zusammenhänge machen deutlich, dass insbesondere entzündliche Reaktionsmuster des Hautorgans Einfluss auf den Funktionszustand der Prurizeptoren nehmen können. Vor diesem Hintergrund werden zwei funktionelle Grundmuster und daraus abgeleitet vier molekulare Kaskaden der Juckreizvermittlung unterschieden (Nakagawa H und Hiura A 2013). So wird ein histaminerges von einem nicht-histaminergen Grundmuster differenziert, was auf die hohe klinische Bedeutung der über Histaminrezeptoren (H1R-H4R) vermittelten pruritogenen Effektivität von Histamin hinweist (Fermont DC, Haggie SJ et al. 1976; Belcheva A und Zhelyazkova M 1988; Grossmann M, Jamieson MJ et al. 1999). Allerdings können Histamin bzw. Endothelin-1 (ET-1) auch über den *transient receptor potential vanilloid-1* (TRPV1) ebenfalls Juckreiz induzieren (Gopinath P, Wan E et al. 2005; Shim WS, Tak MH et al. 2007; Kittaka H und Tominaga M 2017). Für das nicht-histaminerge Grundmuster wird eine Aktivierung von *protease activated receptor 2* (PAR-2) und eine Aktivierung von 5-Hydroxytryptamin/Serotonin (5-HAT) unterschieden (Akiyama T, Carstens MI et al. 2010; Kempkes C, Buddenkotte J et al. 2014). Die genannten Grundmuster und Kaskaden dürfen dabei nicht als feste Funktionsabläufe, sondern vielmehr als Funktionsmuster mit vielen möglichen und zum Teil noch unbekanntem Variablen verstanden werden. Zudem sind auch weiterführende Mechanismen für die Aktivierung von Prurizeptoren bekannt, die durch die vereinfachte Systematik nicht abgedeckt werden (Rinaldi G 2019). Für das Verständnis der Physiologie und Pathophysiologie des Juckreizes ist es essentiell, dass die Funktionsebenen Haut, Prurizeptoren (inklusive Rückenmark) sowie Gehirn als Funktions- und Signalverarbeitungseinheit betrachtet werden müssen. Insgesamt liegt dem Symptom Juckreiz und insbesondere



bei chronischem Auftreten eine komplexe Fehlregulation auf neurosensorischer und molekularer/immunologischer Ebene zugrunde. Diese durch Emotionen, Gedächtnis und individuelle Verarbeitungsstrategien modulierte Komplexität macht es im klinischen Kontext häufig sehr schwierig Ursachenkonstellationen zu erkennen bzw. therapeutische Konzepte zu entwickeln und zu validieren (Yosipovitch G, Rosen JD et al. 2018; Najafi P, Carre JL et al. 2020).

Insbesondere im Gehirn, aber auch in anderen Organen, findet sich ein durch Glutamatdecarboxylase aus Glutamat synthetisierter inhibitorischer Neurotransmitter, die Gamma-Aminobuttersäure (GABA) (Chebib M und Johnston GA 1999; Watson AH 2003). Die Wirkung von GABA erfolgt über unterschiedliche Rezeptoren, die aus Untereinheiten bestehen und in drei GABA-Rezeptor-Typen unterteilt werden können ( $GABA_{A-C}$ ) (Sarto-Jackson I und Sieghart W 2008).  $GABA_A$  und  $GABA_C$  gelten als ionotrope (Ionenkanäle) und  $GABA_B$  als metabotrope (G-Protein-vermittelte Aktivierung der Adenylatzyklase) Rezeptoren. So konnten auch an unmyelinisierten Prurizeptoren in der Haut  $GABA_A$ -Rezeptoren nachgewiesen werden, die mit Immuneffektorzellen (Makrophagen, Neutrophile, Lymphozyten) interagieren. Daraus wurde eine Hypothese entwickelt, die eine GABA-erge neuroimmunologische Entzündungsantwort als Teil eines  $T_H17$ -medierten psoriatischen Entzündungsmusters postuliert. Später konnte eine Überexpression von  $GABA_A$ -Rezeptoren in psoriatischer Haut nachgewiesen werden, so dass ein funktionales Bindeglied zwischen entzündlicher und neurosensitiver Aktivität identifiziert wurde (Sarto-Jackson I und Sieghart W 2008; Nigam R, El-Nour H et al. 2010). Mittlerweile werden ähnliche Zusammenhänge auch bei anderen Entzündungsmustern des Hautorgans vermutet (Lee YJ, Kim JE et al. 2014). Dies bietet bei entzündlichen Dermatosen die Möglichkeit GABA-erge Agonisten therapeutisch via systemischer und topischer Administration zu validieren (Bryson E, Asbill S et al. 2014; Matsuda KM, Sharma D et al. 2016).

## 1.2 Psoriasis als Systemerkrankung

Die Psoriasis vulgaris wird heute als eine  $T_H1/T_H17$ -Zell-vermittelte, chronisch-entzündliche Systemerkrankung auf dem Boden einer polygenen genetischen Disposition verstanden (Armstrong AW und Read C 2020; Gran F, Kerstan A et al. 2020; Perez-Chada LM, Balak D et al. 2020). Neben dem Hautorgan können Gelenke, Enthesien und gelenknaher Knochen betroffen sein, was man zusammenfassend als Psoriasisarthritis bezeichnet (Alinaghi F, Calov M et al. 2019). Insbesondere bei schwerem Krankheitsverlauf bzw. langer Krankheitspersistenz können zudem durch die hohe entzündliche Last Komorbiditäten ausgelöst, unterhalten bzw. verstärkt werden (Owczarczyk-Saczonek A und Nowicki R 2014; Gerdes S, Mrowietz U et al.

2016). Die häufigsten und klinisch bedeutsamsten Komorbiditätsmuster sind kardiovaskuläre Erkrankungen, metabolisches Syndrom und psychopathologische Belastungs- und Erkrankungsgeschehen (Egeberg A, Bruun LE et al. 2016; Snast I, Reiter O et al. 2018; Peralta C, Hamid P et al. 2019). Am Hautorgan manifestiert sich die Erkrankung in Form von erythemosquamösen Plaques an sogenannten Prädilektionsstellen, also Streckseiten der Extremitäten, Kopfhaut, Rima ani, Stamm, gluteal und an den Nagelorganen (Jiaravuthisan MM, Sasseville D et al. 2007; Pasch MC 2016; Wang TS und Tsai TF 2017). Darüber hinaus werden auch inverse Formen beobachtet. Die typischen klinischen Effloreszenzen in Form von kombinierten Papeln weisen bereits auf eine epidermale Differenzierungsstörung in Form einer Proliferationshyperkeratose und Akanthose, als auch auf ein entzündliches Geschehen hin. Letzteres ist neben Lymphozyten vor allem durch neutrophile Granulozyten geprägt und kann auch pustulöse klinische Bilder bedingen.

### **1.3 GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren bei psoriatischem Pruritus**

Häufig berichten Patienten mit entzündlich aktiven psoriatischen Läsionen über Juckreizzustände, die deren Lebensqualität erheblich reduzieren können. In den letzten Jahren wurden die Komplexität und die individualpathologischen Einflussfaktoren von Juckreiz bei Psoriatikern immer umfänglicher verstanden (Komiya E, Tominaga M et al. 2020). Zudem wurde eine Vielzahl von Verstärkungs- (Winterklima, Nachtruhe, heißes Wasser und körperliche Anstrengung) und Unterdrückungsfaktoren (Schlaf, kaltes Duschen) dieser Sinneswahrnehmung identifiziert (Yosipovitch G, Goon A et al. 2000). Es konnte gezeigt werden, dass das Auftreten und die Schwere des Juckreizes mit der Schwere der Psoriasis korrelieren (Szepietowski JC, Reich A et al. 2002; Lebwohl MG, Bachelez H et al. 2014). Gleichwohl finden sich auch Hinweise, die diese Korrelation in Frage stellen (Yosipovitch G, Goon A et al. 2000; Roblin D, Wickramasinghe R et al. 2014). Für die Pathophysiologie des Juckreizes bei Psoriasis werden neuronale (Neuropeptide, Opiode, Neutrophine), immunologische (Zytokine), endokrine (Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse), vaskuläre (z.B. Prostanoiden, Zelladhäsionsmoleküle, Wachstumsfaktoren) und enzymatische (Peptidasen) Vorgänge verantwortlich gemacht (Komiya E, Tominaga M et al. 2020).

Zu den immunologischen Juckreizfaktoren bei Psoriasis wird auch der Umstand einer Vermehrung GABA-positiver Makrophagen sowie die erhöhte Expression von GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren auf Lymphozyten im psoriatischen Hautgewebe gezählt (Nigam R, El-Nour H et al. 2010). GABA ist ein bekannter inhibierender Neurotransmitter, der als Aktivitätsmodulator für verschiedene Immunzellen und potentieller Stimulator der

Sekretion pruritogener Mediatoren (IL-31, IL-2) fungiert (Szepietowski JC und Reich A 2016). Auch in der zentralen Juckreizwahrnehmung und -verarbeitung ist GABA als ein relevanter Neurotransmitter identifiziert worden (Chen L, Wang W et al. 2016). Diese Zusammenhänge begründen die Sinnhaftigkeit, GABA-erge Substanzen wie Gabapentin bzw. Pregabalin präklinisch und klinisch zur Therapie von Juckreizzuständen bei Psoriasis (Boyd ST, Mihm L et al. 2008) und darüber hinaus bei unterschiedlichen Pruritusformen zu validieren (Manenti L und Vaglio A 2007; Tsukumo Y, Matsumoto Y et al. 2011; Rayner H, Baharani J et al. 2012; Solak Y, Biyik Z et al. 2012; Matsuda KM, Sharma D et al. 2016; Akiyama T, Andoh T et al. 2018; Kaul I, Amin A et al. 2018). Zudem gelang es bei anderen stark juckenden Dermatosen, insbesondere bei der atopischen Dermatitis, die Bedeutung von GABA für die Pathogenese ebenfalls nachzuweisen. Hier wurden Agonisten von GABA<sub>A</sub>- (Muscimol) und GABA<sub>B</sub>-Rezeptoren (Baclofen) im Mausmodell untersucht und ein Zusammenhang mit der vermehrten Expression des pruritogenen Zytokins IL-31 nachgewiesen (Cevikbas F, Braz JM et al. 2017; Heimall J und Spergel JM 2017). Diese Beobachtungen machen deutlich, dass GABA-erge Arzneistoffe für die Therapie von Juckreizzuständen bei mehreren Indikationen geeignet sein könnten.

## **1.4 Chloralhydrat**

### **1.4.1 Hintergrund**

Einer dieser Arzneistoffe könnte Chloralhydrat (CH) sein. CH wurde erstmals im 19. Jahrhundert durch Justus von Liebig hergestellt und war seinerzeit das erste synthetisch produzierte Schlafmittel der Welt (Kaude JV 1997; Oehme P 2019). Damals nahm man fälschlicher Weise an, CH würde im Körper nach systemischer Applikation schnell zu Chloroform umgewandelt werden, da bekannt war, dass CH in Gegenwart von Alkalien in Chloroform und Ameisensäure zerfällt (Oehme P 2019). Später wurde dann der Metabolismus von CH an Mäusen, Ratten, Hunden, Affen und schließlich im Menschen aufgeklärt (Mishchikhin VA und Felitsyn FP 1988; U.S. Environmental Protection Agency 2000). CH besitzt eine molare Masse von 165,42 g/mol und ist sehr gut wasserlöslich. Es wird nach oraler Gabe vollständig und nach topischer Applikation zu einem sehr hohen Anteil resorbiert (Zimmermann T, Wehling M et al. 1998).

### 1.4.2 Pharmakologie und Toxikologie

Sowohl in hepatischem, als auch extrahepatischem Gewebe (Erythrozyten, Keratinozyten, Fibroblasten) erfolgt die Elimination von CH über zwei wesentliche metabolische Routen (Petersen BJ, Cornell NW et al. 1980; Cheung C, Smith CK et al. 1999). Durch Alkoholdehydrogenase (ADH) wird CH zu Trichlorethanol (TCE) und von einer UDP-Glucuronosyl-Transferase zu TCE-Glucuronid umgewandelt, welches renal eliminiert wird (Friedman PJ und Cooper JR 1960; Kaplan HL, Forney RB et al. 1967). Bei Personen mit einem UDP-Glucuronosyltransferase-Mangel kann TCE im Körper kumulieren und toxikologisch relevante Gewebespiegel erreichen. Die Halbwertszeit von TCE wird mit ca. 10 Stunden angegeben und liegt damit um den Faktor 11 niedriger als bei Trichloracetat (TCA) (Hobara T, Kobayashi H et al. 1987). TCA wird durch NAD<sup>+</sup>-abhängige Oxidation in der Leber gebildet, unterliegt keiner Glucuronierung und wird ebenfalls über den Urin ausgeschieden (Abb. 1) (Kawamoto T, Hobara T et al. 1988). Alternativ kann auch in sehr geringem Ausmaß eine hepatische Elimination durch Reduktion von TCA zu Dichloracetat oder eine direkte renale Elimination von CH erfolgen (Owen BE und Taberner PV 1980; Abbas RR, Seckel CS et al. 1996).

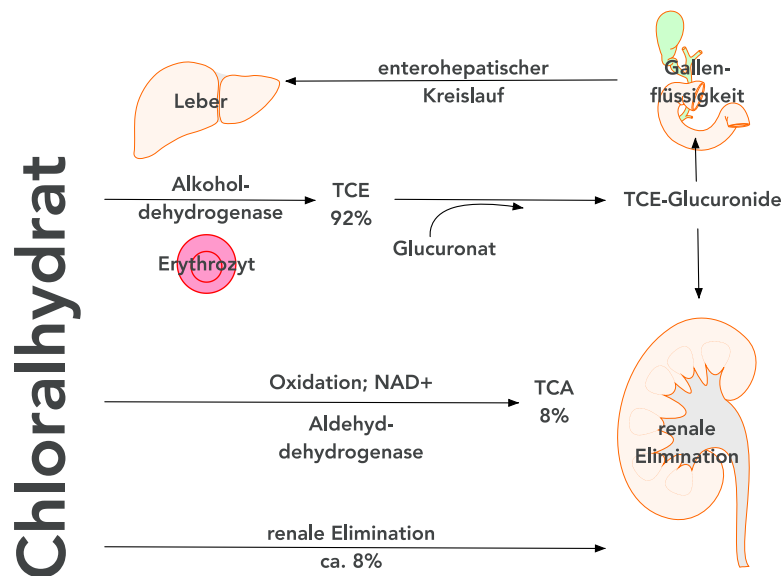


Abb. 1: Eliminationswege von Chloralhydrat, TCE=Trichlorethanol, TCA=Trichloracetat, NAD=Nicotinamidadenindinukleotid

Die Wirkung von CH beruht aber im Wesentlichen auf dem Einfluss des Metaboliten Trichlorethanol (TCE) auf  $\gamma$ -Aminobuttersäure (GABA)-induzierte Chloridströme an neuronalen Zellen und damit einer Verstärkung der neuroinhibitorischen Effekte von GABA (Chebib M und Johnston GA 1999; Sarto-Jackson I und Sieghart W 2008). TCE als aktiver Metabolit von CH bindet an GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren und induziert einen

Chloridioneneinstrom in die anliegende Nervenzelle, sodass vermehrt inhibitorische postsynaptische Potentiale (IPSP) entstehen und die hemmende Wirkung von GABA erhöht wird (Watson AH 2003). Daraus erklärt sich die zentralnervös inhibierende Wirkung von CH, wobei auch geringfügig atemdepressive Effekte resultieren können (Mackay FJ und Cooper JR 1962; Van Heijst AN, Zimmerman AN et al. 1977; Fong CY, Tay CG et al. 2017; Mataftsi A, Malamaki P et al. 2017). Die antipruriginösen Wirkungen von CH werden zudem durch ein paradoxes Phänomen der Depolarisation afferenter sensorischer Neurone (primary afferent depolarization – PAD) erklärt (Abb. 2) (Chen HT und Kandasamy SB 1996; Wohlrab J, Gilbrich F et al. 2017). Den Effekten von CH über GABA<sub>A</sub>-Rezeptor exprimierende Entzündungs- und Gewebezellen, also nichtneuronaalem Gewebe, wird eine geringe Bedeutung eingeräumt (Nigam R, El-Nour H et al. 2010).

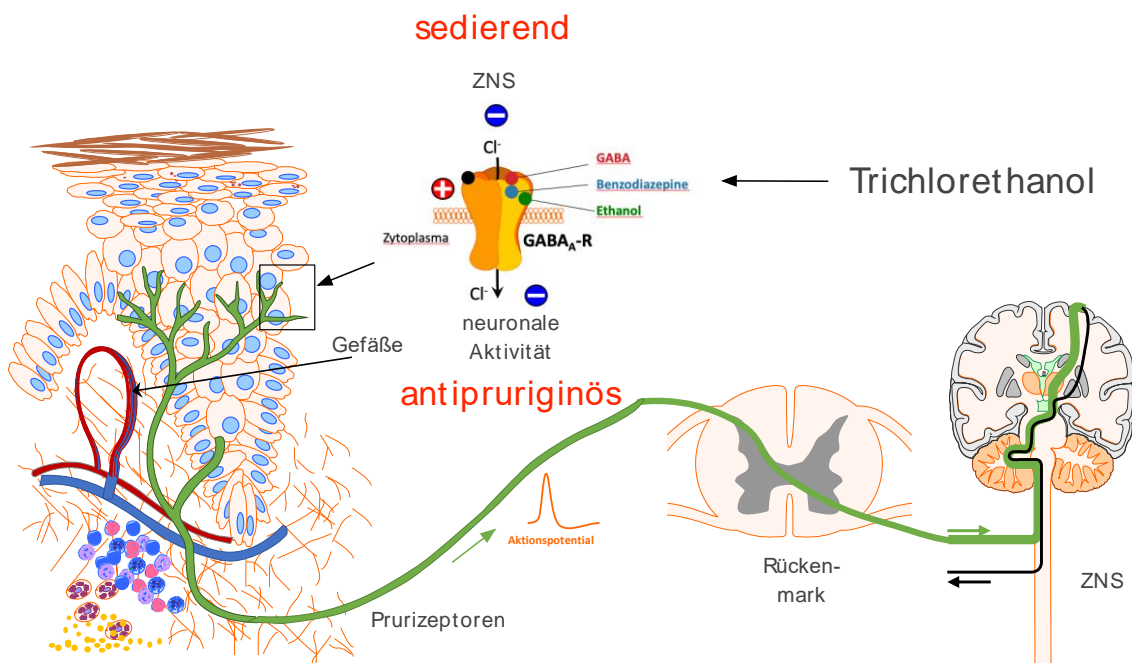


Abb. 2: Pharmakodynamik von Chloralhydrat über den Metaboliten Trichlorethanol, ZNS=zentrales Nervensystem

Nach peroraler Applikation wird CH als kleinmolekulare Substanz und Prodrug rasch resorbiert und metabolisiert (Buur T, Larsson R et al. 1988; Abbas RR, Seckel CS et al. 1996; Dao K, Ivanyuk A et al. 2013). Deshalb wurde CH früher vermehrt als rasch wirksames Sedativum bzw. Hypnotikum eingesetzt (Lichenstein R, King JC et al. 1993; Keidan I, Gozal D et al. 2004). Im Gegensatz zu den Barbituraten beeinflusst CH die REM-Schlafphasen nur gering und wurde deshalb bevorzugt (Almeyda J und Levantine A 1972). Allerdings unterliegt der Einsatz von CH auch dem hohen Risiko der Tachyphylaxie, so dass es bereits nach wenigen Tagen der Anwendung zu einem

deutlichen Wirkverlust kommt (Hijazi OM, Haidar NA et al. 2005). Darüber hinaus tritt häufig eine psychische Abhängigkeit ein, die als Chloralismus bezeichnet wird (Condouris GA und Bonnycastle DD 1961; Graham SR, Day RO et al. 1988; Pershad J, Palmisano P et al. 1999). Wegen der sich daraus für die systemische Applikation ergebenden Risiken und pharmakologisch im Nutzen-Risiko-Potential günstigeren Sedativa ist die Häufigkeit des klinischen Einsatzes in den letzten Jahren deutlich zurückgegangen.

#### **1.4.3 Physikochemische Eigenschaften von Chloralhydrat**

CH wird chemisch den Aldehydhydraten zugeordnet und entsteht aus der Reaktion von Chloral mit Wasser. Unter Standardbedingungen ist CH ein weißer, stechend riechender kristalliner Feststoff, der aufgrund seiner Polarität sehr gut wasserlöslich ist und seinen Schmelzpunkt bei 52°C bzw. seinen Siedepunkt bei 96°C erreicht. Die Dichte beträgt bei einem Dampfdruck von 13 mbar und 20°C 1,91 g/cm<sup>3</sup> (U.S. Environmental Protection Agency 2000).

#### **1.4.4 Topische Anwendung von Chloralhydrat**

Die topische Applikation von CH geht auf Neisser zurück, der eine 5%ige halbfeste Zubereitung (Chloralhydrat-Campher-Salbe nach Neisser) zur Wundantiseptik und eine 10%ige Salbe zur Juckreizhemmung propagierte und einsetzte (Bruck C 1925; Kaude JV 1997). Darüber hinaus waren alkoholische Lösungen, Cremes und Lacke im Konzentrationsbereich von 0.5% bis 1.0% CH im Gebrauch (Messer S 2014). CH wird nach topischer Applikation rasch resorbiert (Bryson E, Asbill S et al. 2014). Allerdings liegen bisher keine Daten zur kutanen Bioverfügbarkeit nach topischer Applikation vor (Wohlrab J, Gilbrich F et al. 2017).

Auf den historischen Erfahrungen aufbauend, wurde eine CH-haltige halbfeste Formulierung vom Neuen Rezepturformularium (NRF) als Rezepturarzneimittel aufgenommen (Neues Rezepturformularium 2015). In Kombination mit D-Campher (2%) und L-Menthol (1%) wurde CH 3%ig in einer amphiphilen Creme (Basiscreme DAC) beschrieben. Aufgrund des prozentualen Gehalts der genannten Inhaltsstoffe wird diese Magistralrezeptur umgangssprachlich auch als 1-2-3-Creme bezeichnet. Weiterhin findet sich im NRF eine 3%ige CH-haltige anionische hydrophile Cremezubereitung als wasserhaltige hydrophile Salbe (DAB) und einer 10%ige lipophile Salbe unter Verwendung von weißem Vaseline. Der enthaltene Campher dient in den Rezepturen in erster Linie als Hilfsstoff, damit sich CH und Menthol verflüssigen und als eutektische Mischung homogen verarbeiten lassen (Messer S 2014).

### 1.4.5 Toxikologische Betrachtung

Zur toxikologischen Bewertung von CH gibt es eine umfangreiche Datenlage, die insbesondere wegen der klinisch beobachteten Gefährdung bei oraler Anwendung im Kindesalter erarbeitet wurde (Paret G, Kassem R et al. 1996; Beland FA, Schmitt TC et al. 1998; World Health Organization 2000; Seng JE, Agrawal N et al. 2003; Dao K, Ivanyuk A et al. 2013). Mit Bezug auf die Anwendung von CH als Sedativum wurden insbesondere neurotoxische Effekte bei Vergiftungsszenarien beobachtet, beschrieben und pathogenetisch diskutiert (Clarke MJ 1988; Goldsmith JP 1994; Ludwigs U, Divino Filho JC et al. 1996; Nordt SP, Rangan C et al. 2014). Auch kardiologische Intoxikationssymptome wurden bei Überdosierung beobachtet (Wiseman HM und Hampel G 1978; Gerretsen M, De Groot G et al. 1979). Wegen der klinischen Relevanz, insbesondere bei Anwendung von CH im Kindesalter bzw. bei Suizidversuchen, wurden auch Therapien zur Behandlung von Intoxikationen diskutiert (Payne LC 1954; Vaziri ND, Kumar KP et al. 1977; Stalker NE, Gambertoglio JG et al. 1978; Riabinin VE und Lifshits RI 1991; Ludwigs U, Divino Filho JC et al. 1996). Darüber hinaus ist aus Tierversuchen bekannt, dass unter Hochdosisanwendung von CH hepatozelluläre Tumoren und Hypophysenadenome auftreten können (George MH, Moore T et al. 2000; Von Tungeln LS, Yi P et al. 2002). Aus dermatologischer Sicht von Interesse sind nach Unfällen mit systemischer Aufnahme von CH beobachtete Reizungen an Mund- und Magenschleimhaut sowie Konjunktiven (Ogino K, Hobara T et al. 1990; Caksen H und Odabas D 2001).

Aus Tierversuchen sind eine orale Dosis letalis media (LD<sub>50</sub>) von 479 mg/kg KG sowie nach dermalen Applikation eine LD<sub>50</sub> von 3,030 mg/kg KG bekannt (Sanders VM, Kauffmann BM et al. 1982). Die niedrigste letale Oraldosis für den Menschen wird mit 4 mg/kg KG (LDL<sub>0</sub>) angegeben (U.S. Environmental Protection Agency 2000). Daten aus kutanen Expositionsstudien bezüglich der transkutanen Permeation von CH aus Tierstudien sowie am Menschen mit chloriertem Trink- bzw. Schwimmbadwasser lassen die Penetrationseigenschaften von CH an der Haut abschätzen (Poon R, Nadeau B et al. 2000; Poon R, Nakai J et al. 2002; Trabaris M, Laskin JD et al. 2012). Die ermittelten Permeationsindices sind dennoch so niedrig, dass auch eine wiederholte topische Applikation unbedenklich erscheint, zumal kumulative Effekte aufgrund der kurzen Halbwertszeit von ca. 8 Stunden ebenfalls sehr unwahrscheinlich sind (Breckenridge A, Orme ML et al. 1971; Shroads AL, Coats BS et al. 2015). Eine relevante systemische Bioverfügbarkeit ist vor diesem Hintergrund bei sachgerechter Anwendung von 3%-igen topischen Zubereitungen somit nahezu ausgeschlossen. Neuere zytotoxische Daten an verschiedenen kutan relevanten Zelltypen weisen eine IC<sub>50</sub> von ca. 5 mmol/l (ca. 1 mg/g) für die Proliferationshemmung und eine IC<sub>50</sub> von ca.

2 mmol/l (ca. 0,4 mg/g) zur Reduktion der Vitalität aus (Wohlrab J, Gilbrich F et al. 2017). Allerdings ist die Bewertung dieser toxikologischen Daten zur kutanen Verträglichkeit schwierig, da keine pharmakokinetischen Untersuchungen zur kutanen Bioverfügbarkeit nach epikutaner Applikation vorliegen.

#### **1.4.6 Optionen für die präklinische Validierung der Sicherheit**

Grundsätzlich sind Daten aus randomisierten, Referenz-kontrollierten klinischen Studien in der Anwendungsindikation die regulatorisch sicherste Methode, die Verträglichkeit eines Topikums nachzuweisen. Allerdings können auch hier Fehler aus der Selektionierung von Studienteilnehmern entsprechend der Ein- und Ausschlusskriterien resultieren (Miranda M, Cardoso C et al. 2020). Für den Zulassungsprozess von Fertigarzneimitteln ist es grundsätzlich vorgeschrieben, dass Sicherheitsdaten in allen klinischen Studienphasen im Rahmen des Studienprogramms erhoben und mit geeigneten biometrischen Methoden ausgewertet werden. Dies gilt auch dann, wenn die Unbedenklichkeit in besonders konzipierten Studienprotokollen (z.B. hRIPT) untersucht wurde (Mcnamee PM, Api AM et al. 2008). Besondere Bedingungen liegen allerdings bei generischen Zulassungsverfahren vor (European Medicines Agency 2018). Hier werden Bioäquivalenzuntersuchungen gefordert, die auch Sicherheitsdaten einbeziehen. In Abhängigkeit vom Risikopotential des betreffenden Arzneistoffs und der Zulassungsstrategie werden hier auch nichtklinische Verfahren zum Nachweis der Äquivalenztestung diskutiert und unter besonderen Bedingungen regulatorisch akzeptiert (Ema-Chmp 1987; Fda 1995). Gleiches gilt für den Nachweis der kutanen Bioverfügbarkeit von Arzneistoffen (Herkenne C, Naik A et al. 2007; Herkenne C, Alberti I et al. 2008). Da Rezepturarzneimittel kein Zulassungsverfahren durchlaufen, wird der Verkehr des vom Apotheker hergestellten Arzneimittels von den beteiligten Professionen, also vom Apotheker und vom verordnenden Arzt verantwortet (Wohlrab J, Klauk D et al. 2014). Dazu führt der Apotheker zur Sicherstellung der pharmazeutischen Qualität eine Plausibilitätsprüfung durch, die sich auch auf pharmakologische Aspekte (z.B. Dosisbereich des Arzneistoffs) bezieht. Der verordnende Arzt ist für die medizinische Sinnhaftigkeit und Sicherheit ebenso wie für die Aufklärung des Patienten verantwortlich. Für beide Professionen ist für die Plausibilitätsbewertung eine entsprechende Datenlage in der Fachliteratur deshalb von großer Bedeutung.

Da im vorliegenden Fall für die topische Anwendung von CH sowohl empirische Daten zur Wirksamkeit und zur pharmazeutischen Qualitätssicherung der Magistralrezeptur vorliegen, ist vor allem eine auf objektiven Daten basierende Sicherheitsbewertung im Rahmen der epikutanen Anwendung von ausschlaggebender praktischer Bedeutung.



Diese Bewertung orientiert sich neben den pharmakokinetischen Daten aus der systemischen Anwendung vor allem an Daten zur kutanen Bioverfügbarkeit, zytotoxikologischen Erhebungen an relevanten humanen Zelltypen und präklinischen Modellen zur Haut- und Schleimhautverträglichkeit, insbesondere dem HET-CAM-Modell (ICCVAM 2006).

## 2 Zielstellung

Auf der Grundlage einer umfangreichen Literaturrecherche zur Pharmakologie von CH wurde eine Strategie zur Vervollständigung und Bewertung der für die topische Applikation relevanten Sicherheitsbewertung erarbeitet. Dazu wurden die verfügbaren zytotoxikologischen Daten durch eigene Untersuchungen mit hoher Standardisierung ergänzt und mit einem regulatorisch anerkannten Verfahren zur präklinischen Bewertung der Haut- und Schleimhautverträglichkeit erweitert. Darüber hinaus wurde durch ein pharmakokinetisches Modell die kutane Bioverfügbarkeit geschätzt. Durch dieses Verfahren sollte eine solide Datenbasis für die apothekenbezogene Plausibilitätsprüfung der Sicherheit von CH in der topischen Anwendung bereitgestellt werden.

Insbesondere befasst sich die vorliegende Arbeit mit der Beantwortung folgender Fragen:

1. Ergeben sich auf zytotoxikologischer Ebene Hinweise für Sicherheitsbedenken in Bezug auf eine topische Applikation von Chloralhydrat?
2. Erfüllen der Wirkstoff und das Rezepturazneimittel die regulatorischen Voraussetzungen in einem präklinischen Verträglichkeitsmodell für Topika?
3. Ergänzen die Ergebnisse die bisher vorliegenden Daten zur Pharmakologie und Toxikologie von Chloralhydrat?
4. Welche Bewertungen lassen sich für die praktische Anwendung von Chloralhydrat in Topika formulieren?

### 3 Material und Methodik

#### 3.1 HaCaT-Zellen

Bei den verwendeten Keratinozyten handelt es sich um eine standardisierte Zelllinie, die in den 1980er Jahren aus der Peripherie eines malignen Melanoms isoliert und am Deutschen Krebsforschungszentrum Heidelberg (AG Fusenig) validiert wurde (Boukamp P, Petrussevska RT et al. 1988; Van De Sandt J, Roguet R et al. 1999). Wegen ihrer besonderen Eigenschaften erhielt sie die Bezeichnung „Human adult low Calcium high Temperature (HaCaT) Keratinocytes“. Die permanente, also immortalisierte Zelllinie wurde phänotypisch als spontan transformiert, aber nicht tumorigen charakterisiert. HaCaT-Zellen werden in Abhängigkeit vom extrazellulären Kalziumgehalt in ihrem terminalen Differenzierungsverhalten reguliert und weisen eine hohe Immortalität auf (>140 Passagen) ohne morphologische Veränderungen zu entwickeln. Dadurch eignen sie sich als standardisierte Zelllinie für kutan-toxikologische Untersuchungen.

Die verwendeten HaCaT-Zellen der 31. Passage (p31) wurden in fetalem Kalbsserum (FKS) (Biochrom GmbH, Berlin, Deutschland) bei -150°C gelagert. Als Einfriermedium diente 10%iges Dimethylsulfoxid (DMSO) (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland), welches bei Temperaturen unter 0°C die Entstehung von Eiskristallen verhindert und somit die Zellen vor irreversiblen Schäden bei der Kryokonservierung (Gram bioline, Gram Commercial A/S, Vojens, Dänemark) schützt. Nach dem Auftauprozess (Wasserbad Typ 1013, GFL GmbH, Burgwedel, Deutschland) wurde das DMSO-Medium mit Kulturmedium (Keratinocyte-SFM, Gibco Life Technologies Ltd., Carlsbad, USA) verdünnt, um zytotoxische Effekte zu minimieren. Dazu wurden die Zellen im Wasserbad bis 37°C aufgetaut und anschließend zentrifugiert (5 min, 1450 rpm) (Biofuge primo R, Hereaus GmbH, Hanau, Deutschland), um die Reste von DMSO und FKS von den Zellen zu trennen. Der Überstand wurde abgegossen, sodass eine Zellsuspension entstand, die mit 5-10 ml vom ebenfalls im Wasserbad auf 37°C erwärmten Nährmedium resuspendiert wurde. Unter einem Durchlichtmikroskop (Olympus U-LH100L-3, Olympus Ltd. Tokio, Japan) wurde nach Tyrode-Eosin-Markierung (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) avitaler Zellen die Zellzahl in einer Verdünnung der Suspension von 1:5 mit Medium abgeschätzt und anschließend in einer Fuchs-Rosenthal-Zählkammer exakt bestimmt. Dabei wurden 5 Gruppenquadrate (je 0,2 mm<sup>3</sup>) standardisiert ausgezählt und die Zellzahl pro ml Suspension mit Formel 1 berechnet.

$$Z = \frac{(ZA * Fv * 1000)}{(A * hKammer)}$$

Formel 1: Formel zur Berechnung der Zellzahl pro ml Suspension (Z=Zellenanzahl pro ml Suspension; ZA=Anzahl der gezählten Zellen; FV=Verdünnungsfaktor (0,2); A=Flächeninhalt der Gruppenquadrate (5\*0,2mm<sup>2</sup>); hKammer= Kammerhöhe (0,2mm))

Die Zellen wurden nun auf 75 cm<sup>2</sup> Kulturflaschen (Cellstar® T75, Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland) überführt und in einer Dichte von 700.000 bis 1.000.000 Zellen mit 10 ml Nährmedium eingesät. Die Kultur erfolgte bei 37°C im Brutschrank mit 5% CO<sub>2</sub> über 48 Stunden. Anschließend wurden 5 ml vorgewärmtes Medium ergänzt und nach weiteren 48 Stunden erfolgte ein Mediumwechsel von 10 ml. Nach Erreichen einer 90% Konfluenz des Zellrasens erfolgte ein Passagewechsel durch Entfernen des Mediums, Waschen mit 3-4 ml PBS und Ablösen der Zellen zu einer Zellsuspension mit 2 ml Trypsin-EDTA-Lösung (0,05%) (Gibco Life Technologies Ltd., Carlsbad, USA) für 5 min bei 37 °C im Brutschrank. Durch Mediumzugabe (3 ml) und Überführung der Suspension in ein Zentrifugenröhrchen mit anschließender Zentrifugation wurde eine erneute Aussaat der neuen Passage nach gleichem Schema wie oben beschrieben ermöglicht.

### 3.2 Dermale Fibroblasten

Native humane dermale Fibroblasten (NHDF) aus Vorhautgewebe gesunder Spender wurden in Petrischalen mit Fibroblast-Growth-Medium (Promocell GmbH, Heidelberg, Deutschland) bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Alle 48 bis 72 Stunden erfolgte bis zu einer Konfluenz des Zellrasens von ca. 80% ein Mediumwechsel. Zur Herstellung einer Zellsuspension wurde das Medium entfernt, mittels 3 ml Puck-EDTA-Lösung gespült und anschließend mittels 1,5 ml Trypsin-Lösung (0,05%) abgelöst. Durch Zugabe von 5 ml Medium und Zentrifugation (Biofuge primo R, Hereaus GmbH, Hanau, Deutschland) bei 1250 rpm für 5 Minuten in einem Zentrifugenröhrchen wurden durch Abgießen des Überstandes die Zellen isoliert, standardisiert gezählt (siehe 3.1) und anschließend in einer Zelldichte von 5000 Zellen/cm<sup>3</sup> weiter kultiviert.

### 3.3 Scratch-Assay

Für den Scratch-Assay wurden HaCaT-Zellen (33. Passage) bzw. NHDF (2. Passage) nach Beschichtung mit Laminin/Fibronectin/Kollagen IV (4:50:1) in PBS (27,5:72,5) auf 6-Well Platten (0,2 Mill. Zellen/well in 4 mL) ausgesät und unter den o.g. Kulturbedingungen bis zur vollständigen Konfluenz über 72 Stunden kultiviert (Cory G

2011). Mit Hilfe einer sterilen Pipettenspitze (Carl Roth GmbH + Co.KG, Karlsruhe, Deutschland) wurde ein gerader Scratch in jedem Well zur Simulation eines Defektes des Zellrasens gesetzt (Felice F, Zambito Y et al. 2015). Anschließend wurde der Zelldebris abpipetiert und ein Waschvorgang mit serumfreiem Medium durchgeführt. Die Kulturen wurden mit DMSO (Lösungsmittelkontrolle) sowie 0 (Mediumkontrolle); 0,01; 0,05; 0,1; 0,5; 1,0 und 5,0 mmol/l CH (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) über 48 Stunden inkubiert, nach 0, 2, 4, 8, 12, 24 sowie 48 Stunden standardisiert fotografisch erfasst und die digitalen Bilder anschließend bildanalytisch ausgewertet (Cell'R ImageJ®, V1.49m, National Institutes of Health, USA). Als Maß der Migrationsrate wurde die prozentuale Abnahme der läSIONalen Fläche zum initialen Ausgangswert entsprechend folgender Formel ermittelt:

$$\text{scratch closure rate} = \left[ \frac{(At_0 - At_x)}{At_0} \right] \times 100$$

Formel 2: Formel zur Berechnung der Verschlussrate.  $At_0$  = läSIONale Fläche zum Zeitpunkt 0;  $At_x$  = läSIONale Fläche zum Zeitpunkt x

Für jeden Zelltyp und jedes experimentelle Setting wurden 3 unabhängige Versuche gemacht und Mittelwerte der Ergebnisse gebildet.

### 3.4 HET-CAM-Test

Der „hen's egg test der Chorion-Allantois-Membran“ (HET-CAM) ist ein Testverfahren zur Bewertung der Haut- und Schleimhautverträglichkeit von chemischen Substanzen, Substanzgemischen und Feststoffen (Gilleron L, Coecke S et al. 1996). Der Test wurde Mitte der 1980er Jahre durch den Osnabrücker Pharmakologen und Toxikologen Niels-Peter Lüpke entwickelt (Luepke N 1985). Die Chorion-Allantois-Membran (CAM) ist die Aderhaut eines Eis. Chorion und Allantois sind Fruchthüllen, die den Embryo bei Wirbeltieren umgeben. Die Membran ist von Blutgefäßen durchzogen und schmerzunempfindlich. Der Test wird an bebrüteten Eiern vor Ende des 10. Bebrütungstages durchgeführt. Damit ist gewährleistet, dass der Hühnerembryo noch kein Schmerzempfinden besitzt (Luepke N 1985). Für den Test wird die zu prüfende Substanz auf die CAM aufgetragen. Die Reaktionen der Membran auf toxische Noxen (Blutungen, Mikrothrombosen, Lyse der Blutgefäße oder Trübung des Eiklars) werden beobachtet und standardisiert ausgewertet.

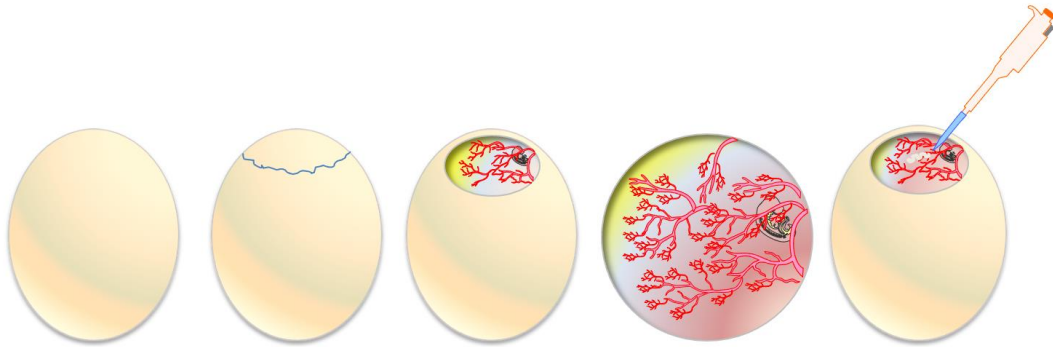


Abb. 3: Darstellung des Präparationsprozesses und der Applikation einer flüssigen bzw. halbfesten Probe.

Mit Hilfe des HET-CAM konnte die Häufigkeit des umstrittenen Draize-Testes zur Validierung der Augenschleimhautreizwirkung von Noxen am Kaninchenauge weitgehend ersetzt werden (Gilleron L, Coecke S et al. 1997). Das Verfahren ist anerkannt und gilt mittlerweile als validiert. Regulatorisch ist der Test als präklinischer Test für die Prüfung der Haut- und Schleimhautverträglichkeit anerkannt (Spielmann H und Reinhardt C 1996).

Zunächst erfolgt eine Beobachtung der Eier über insgesamt 5 min (300 sek). Während dieser Zeit werden Veränderungen der CAM nach definierten Kriterien hinsichtlich des Zeitpunkts des Auftretens (Irritationsscore, IS) sowie des Schweregrades am Ende der Beobachtungszeit dokumentiert. Als Scoreparameter werden erfasst: H=Blutungen als Extravasation von Erythrozyten (Hämorrhagien), L=Gefäßlyse/Transparentwerden von Gefäßen; C=Stagnieren des Blutflusses und Zeichen der intravasalen Gerinnung.

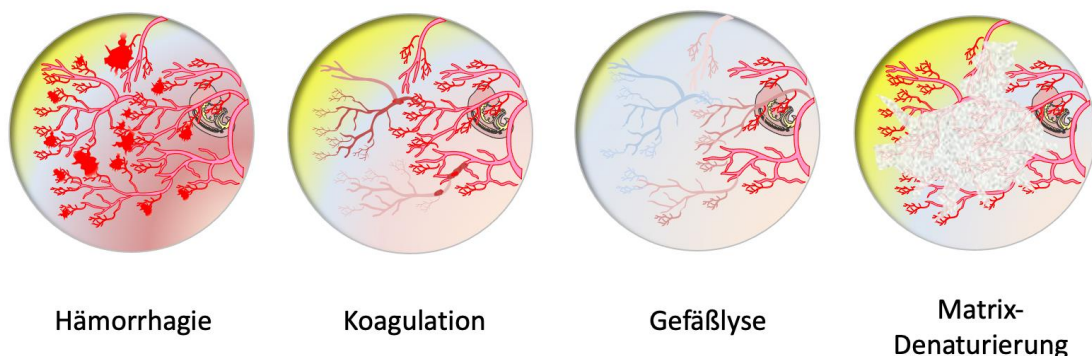


Abb. 4: Darstellung irritativer Reaktionsmuster als Bewertungskriterien für die Haut- und Schleimhautverträglichkeit (Matrix-Denaturierung kann optional bewertet werden).

Die Berechnung des Irritationsscores (IS) erfolgt nach den ICCVAM-Kriterien durch folgendes Verfahren (ICCVAM 2006):

$$IS = \left( \frac{301 - \text{sek}H}{300} * 5 \right) + \left( \frac{301 - \text{sek}L}{300} * 7 \right) + \frac{301 - \text{sek}C}{300} * 9$$

Formel 3: IS=Irritationsscore; sek= Sekunden bis Beginn des Ereignisses; H=Hämorrhagie; L=Lyse; C=Koagulation

Als Bewertungskriterien des IS werden folgende Grenzwerte definiert:

- IS ≤ 1 = kein Hinweis für irritatives Potential
- IS > 1 und < 4 = leichtes irritatives Potential
- IS > 4 und ≤ 9 = mäßiges irritatives Potential
- IS > 9 = starkes irritatives Potential

Der Schweregrad von Veränderungen zum Ende des Beobachtungszeitraums wird nach den folgenden Kriterien eingestuft:

- 0=keine Reaktion
- 1=leichte Reaktion
- 2=mäßige Reaktion
- 3=starke Reaktion

Hämorrhagie (H) wird entsprechend des Ausmaßes von Erythrozytenextravasaten den Kategorien halbquantitativ wie folgt zugeordnet: Einzelne Kapillarblutungen bei morphologisch intakten Kapillaren werden als leichte, multiple Kapillarblutungen bei morphologisch intakten Kapillaren als mäßige und morphologisch geschädigte Kapillaren mit Kapillarblutung oder Massenblutung als schwere H eingestuft. Vereinzelt transparente Kapillarabschnitte werden als leichte, die Transparenz von ganzen Kapillaren als mäßige und das Auftreten von kompletten Gefäßlysen (L) als schwere Lyse bewertet. Die Koagulation (C) wird entsprechend des Ausmaßes von Koagulationsphänomenen den Kategorien halbquantitativ wie folgt zugeordnet: einzelne Kapillarthrombosen bei morphologisch intakten Kapillaren werden als leichte, multiple Kapillarthrombosen bei morphologisch intakten Kapillaren als mäßige und geschädigte Kapillaren mit langstreckigen Kapillarthrombosen als schwere Koagulation eingestuft.

Zur Sicherstellung der Testbedingungen und Standardisierung der Testabläufe finden die Untersuchungen in einem klimatisierten Raum mit konstanten

Temperaturbedingungen statt. Die Präparation wird von geschultem und geübtem Fachpersonal vorgenommen. Die Messungen und Score-Ablesungen werden jeweils durch eine fachkundige Person an einem Tag durchgeführt. Die Untersuchung der Proben sollte, wenn möglich, geblindet erfolgen. Der Versuchsansatz wird nur als valide angesehen, wenn die Negativkontrolle mit Aqua destilata (Aqua dest.) einen Irritationsscore (IS)  $\leq 1$  und die Positivkontrolle mit 1% Natriumlaurylsulfat (SLS) (Pharmacia Biotech, Dübendorf, Schweiz) einen IS  $> 10$  und  $< 19$  aufweisen (ICCVAM 2006).

Für die vorliegenden Untersuchungen wurden je Versuchsansatz 6 natürlich befruchtete Hühnereier der Rasse „New Hampshire“ (50-60g) (Nutztierwissenschaftliches Zentrum der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Merbitz, Deutschland) 8 Tage lang bei 37°C und 55% Luftfeuchtigkeit im Brutschrank (Brutschrank INCO2, Memmert GmbH, Schwalbach, Deutschland) gelagert und bis auf die letzten 24 Stunden vor Versuchsbeginn alle 12 Stunden gewendet. Nachdem die Brutzeit abgelaufen war, wurden die Eier aus dem Brutschrank entnommen und für den Versuch präpariert. Zunächst wurden die Eier noch einmal gewendet und nach einigen Sekunden wieder zurückgedreht. Mit Hilfe eines Airbrush-Kompressors (Rowi GmbH, Ubstadt-Weiher, Deutschland) konnte der obere Pol jedes verwendeten Hühnereies eröffnet werden (Griffpistole EggPunch 14004, Schuett-biotec GmbH, Göttingen, Deutschland). Um die restliche Eierschale des Pols zu entfernen und um freien Zugang zur CAM zu ermöglichen, wurde mit einer Pinzette gearbeitet. Für die Untersuchungen wurden nur Eier verwendet, die über einen gut ausgebildeten Gefäßplexus auf der CAM verfügten. Bis zur Probenapplikation lagerten die präparierten Eier wieder im Brutschrank. Um eine Verunreinigung zu verhindern, wurden die eröffneten Pole mit einer kreisrunden Aluminiumfolie abgedeckt.

Vor Applikation der Testpräparationen wurden die Eier unter einer Fotoeinrichtung und einem Laser-Doppler-Fluxgerät standardisiert platziert und der Ausgangszustand mit einer hochauflösenden Digitalkamera (Canon PC 1234, Canon Ltd., Tokio, Japan) dokumentiert, sowie anschließend die Perfusion mittels Laser-Doppler-Fluxmetrie erfasst. Dann erfolgte die Applikation der Messproben entweder in Form von 200  $\mu$ l flüssiger oder von 200 mg halbfesten Proben. Dabei wurde die Startzeit durch einen digitalen Countdown Timer gestartet.

Appliziert wurden als Negativkontrolle Aqua dest., als Positivkontrolle eine 1% SLS-Lösung, in Aqua dest. gelöstes CH in Konzentrationen von 0,01; 0,05; 0,1; 0,5; 1,0; und 5,0 mmol/l. Zudem wurden die halbfesten Zubereitungen: 1-2-3 Creme= L-Menthol (1%), D-Campher (2%) und Chloralhydrat (3%) in Basiscreme DAC; 1-2 Creme= Chloralhydrat-freie Zubereitung enthaltend L-Menthol (1%) und D-Campher (2%) in



Basiscreme DAC; Vaseline-haltige Creme= Chloralhydrat (10%) in Vaseline (NRF); hydrophile Salbe= Chloralhydrat (3%) in wasserhaltiger Salbe (NRF) untersucht (Herstellung der halbfesten Zubereitungen in Universitätsapotheke Halle (Saale), Deutschland). Mit Beginn der Inkubation wurde für 5 Minuten die Perfusion mittels eindimensionaler Laser-Doppler-Fluxmetrie gemessen. Nach dem Ablauf der Messzeit wurden die Eier erneut fotodokumentiert. Die Eier wurden nach Versuchsende über 24 Stunden bei -80°C gelagert und anschließend als biologischer Sondermüll entsorgt.

### **3.5 Laser-Doppler-Fluxmetrie**

Die Laser-Doppler-Fluxmetrie (LDF) ermöglicht die nichtinvasive Bestimmung von Parametern der kutanen Mikrozirkulation. Bereits 1842 beschrieb der österreichische Physiker Christian Doppler das nach ihm benannte Phänomen der Frequenzverschiebung, wenn sich Sender und Empfänger einer Schallquelle relativ zueinander bewegen (Bagno A und Martini R 2015). Bei der LDF kommt das Prinzip des optischen Doppler-Effektes zum Tragen, dass sich anders als beim akustischen Doppler-Effekt nicht auf Schallwellen, sondern auf elektromagnetische Wellen bezieht. Entscheidend dafür ist die Relativgeschwindigkeit zwischen Lichtquelle (Sender) und Beobachter (Empfänger) sowie die Lichtgeschwindigkeit selbst, welche ineinander in Beziehung gebracht werden. Das Verfahrensprinzip beruht darauf, dass Laserlicht an sich bewegenden Erythrozyten anteilig reflektiert wird und eine Verschiebung der Wellenlänge proportional zur Bewegungsgeschwindigkeit erfährt (Wohlrab J, Korting R et al. 2001). Das oberflächennahe gefäßführende Gewebe (CAM) wird hierbei mit Laserlicht eines engen Wellenlängenspektrums stark fokussiert bestrahlt. Das dabei reflektierte Licht wird von einem Photodetektor proportional dessen Intensität in ein elektrisches Signal umgewandelt. Verwendet wurde ein Laser-Doppler-Fluxmetrie-Gerät (DRT-4, Moor Instruments Ltd., Axminster, England) mit einem Helium-Neonlaser und einer Eindringtiefe von ca. 6-8 mm. Der Einsatz der LDF im HET-CAM ist messtechnisch schwierig zu handhaben, da das Fluxsignal durch die Bewegung des Hühnerembryos starken Schwankungen unterliegt und sich der Messbereich, der wesentlich durch die Eindringtiefe des Lasers bestimmt wird, nach der Applikation der Probe ändern kann. Die Fluxwerte sind komplexe dimensionslose, technische Werte, die in arbiträren Einheiten angegeben (AU) werden.

Für die vorliegenden Untersuchungen wurde nach der Erfassung des Ausgangsflux über einen Messzeitraum von 5 min ein peripheres CAM-Gefäß pro Ei alle ca. 10 Sekunden vom automatisiert gesteuerten Laser vermessen. Die Auswertung und der Vergleich des Fluxverlaufs erfolgte als Perfusions-Indices. Diese wurden rechnerisch ermittelt aus den Messwerten eines jeden Eis zum Zeitpunkt x im Verhältnis zum

Ausgangswert. Der Ausgangswert wiederum wurde als Mittelwert aus 10 Einzelmessungen vor Applikation der Probe ermittelt. Aus den Perfusions-Indices einer Messreihe bestehend aus 6 Eiern wurde eine Mittelwertkurve ermittelt und grafisch gefittet im zeitlichen Verlauf dargestellt. Als Toleranzbereich wurde ein Perfusions-Index von  $1 \pm 0,5$  definiert.

### 3.6 Biometrische Auswertung

Für die biometrischen Testverfahren zur Auswertung der Daten wurde die Software XLSTAT V2014.5.02 (Addinsoft, New York, USA) Add-on für MS Excel für MAC 2011 V14.6.3 (Microsoft Corporation, Redmond, USA) verwendet. Die deskriptive Statistik wurde aus den Ergebnissen der unabhängigen Einzelexperimente erstellt. Der Vergleich der unabhängigen Stichproben wurde nach Prüfung der Normalverteilung und der Varianzhomogenität mittels einfacher Varianzanalyse, mit dem Student-Newman-Keuls-Test oder Bonferoni-Test bzw. verteilungsunabhängig mit dem Kruskal-Wallis-Test durchgeführt. Der Bewertung der Testergebnisse im Vergleich zur Kontrolle lag eine Irrtumswahrscheinlichkeit von  $p \leq 0,05$  zugrunde und wurde im Ereignisfall mit \* markiert (Amrhein V, Greenland S et al. 2019; Kennedy-Shaffer L 2019; Wasserstein RLS, A. L. Lazar, N. A. 2019).

### 3.7 Pharmakokinetisches Modell zur Schätzung der systemischen Bioverfügbarkeit nach epikutaner Applikation

Entscheidend für die Wirkung von CH ist in erster Linie, wieviel und wie schnell der Wirkstoff nach epikutaner Applikation resorbiert wird und wieviel davon im gewünschten Milieu zur Verfügung steht. Als pharmakologische Messgröße hängt die Bioverfügbarkeit in diesem Falle im Wesentlichen vom Permeationskoeffizienten, Körperoberfläche, Einwirkzeit, Körpergewicht, Dichte und Donorkonzentration des Wirkstoffs ab. Diese Faktoren wurden für eine Beurteilung der Risiken, welche durch eine topische Applikation in Erscheinung treten könnten, auf der Basis bereits bestehender Daten zur perkutanen Absorption in folgendes Rechenmodell formuliert. Der dabei zu ermittelnde Dosiskoeffizient (D) gibt Auskunft über die entsprechende systemische Dosisverfügbarkeit.

$$D \left( \frac{mg}{kg \text{ KG}} \right) = \frac{Kp \left( \frac{cm}{h} \right) * Donorkonzentration \left( \frac{mg}{g} \right) * \frac{Körperoberfläche (cm^2)}{10} * Einwirkzeit (h) * Dichte(\rho) \left( \frac{g}{cm^3} \right)}{Körpergewicht (kg)}$$

- LOAEL (lowest observed adverse effect level) bei 10,7 mg/kg Körpergewicht (KG) / Tag.

- NOAEL (no observed adverse effect level) ist beim Menschen nicht bekannt
- Perfusionsindex (Kp) für Vollhaut bei 0,0017 cm/h und für Spalthaut bei 0,0039 cm/h.

Das Modell bezieht sich auf die einmalige Gabe der Substanz, sodass kein Anfluten des Wirkstoffes berücksichtigt wird. Unter der Annahme, dass CH vollständig in der wässrigen Phase gelöst ist, wird die Dichte mit der von Wasser gleichgesetzt ( $\rho = 1 \text{ g/cm}^3$ ). Bei einem Körpergewicht von 70 kg und einer Größe von 180 cm wird von einem normal großen und schweren, jungen erwachsenen Probanden ausgegangen, dessen Körperoberfläche (KOF) von  $1,89 \text{ m}^2$  (nach DuBois) beträgt. In diesem Modell wird weiterhin davon ausgegangen, dass 10% der KOF, also  $1890 \text{ cm}^2$  behandelt werden, und es wird von einer 1-stündigen Einwirkzeit ausgegangen.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Scratch-Assay

Die Daten aus den Scratch-Assays zeigen an beiden untersuchten Zelltypen weitgehend dosisabhängige Ergebnisse mit angemessenen und versuchsüblichen Streuungen, sodass zunächst konsterniert werden kann, dass die Experimente aussagefähige Ergebnisse geliefert haben.

#### 4.1.1 Verschlussrate an HaCaT-Zellen

Betrachtet man zunächst die Mediumkontrolle (Abb. 5) wird deutlich, dass nach ca. 48 Stunden Kulturdauer ein fast vollständiger Verschluss des Zellrasens (ca. 95%) erreicht war. Die in steigender Konzentration von CH dargestellten Daten zeigen insbesondere zu den Messzeitpunkten mit hoher praktischer Relevanz bis 12 Stunden einen Schwelleneffekt (ab einer Konzentration von > 1 mmol/l) mit deutlicher Abnahme der SCR.

Ab 24 Stunden zeigt sich ebenfalls eine (im Ausmaß allerdings deutlich geringere) Abnahme der SCR im Konzentrationsbereich >0,1 mmol/l und ab 48 Stunden >0,05 mmol/l.

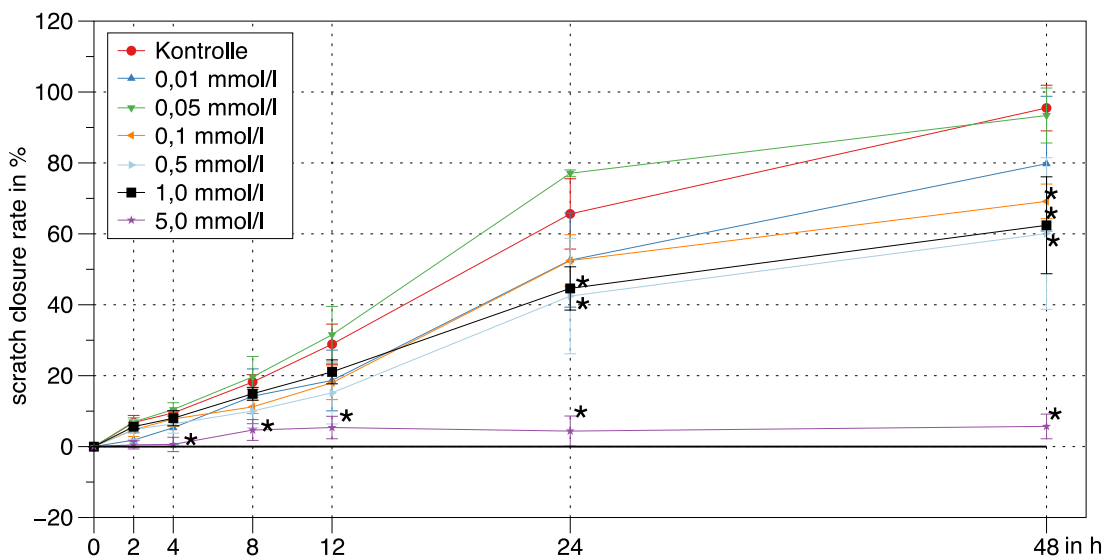


Abb. 5: Darstellung der konzentrationsabhängigen Effekte von Chloralhydrat auf die scratch closure rate an Keratinozyten (HaCaT-Zellen) über insgesamt 48 Stunden. (Kontrolle=Mediumkontrolle; \*=Differenz zur Kontrolle mit Irrtumswahrscheinlichkeit von  $p \leq 0,05$ )

#### 4.1.2 Verschlussrate an dermalen Fibroblasten

Die Darstellung der Mediumkontrollen der Fibroblastenkultur weist nach 48 Stunden eine Verschlussrate von ca. 85 % auf (Abb. 6). Unter dem Einfluss steigender CH-Konzentrationen zeigt sich nach 8 Stunden ein Schwelleneffekt bei Konzentrationen > 1,0 mmol/l. Für alle anderen Konzentrationen finden sich keine relevanten Effekte auf die SCR.

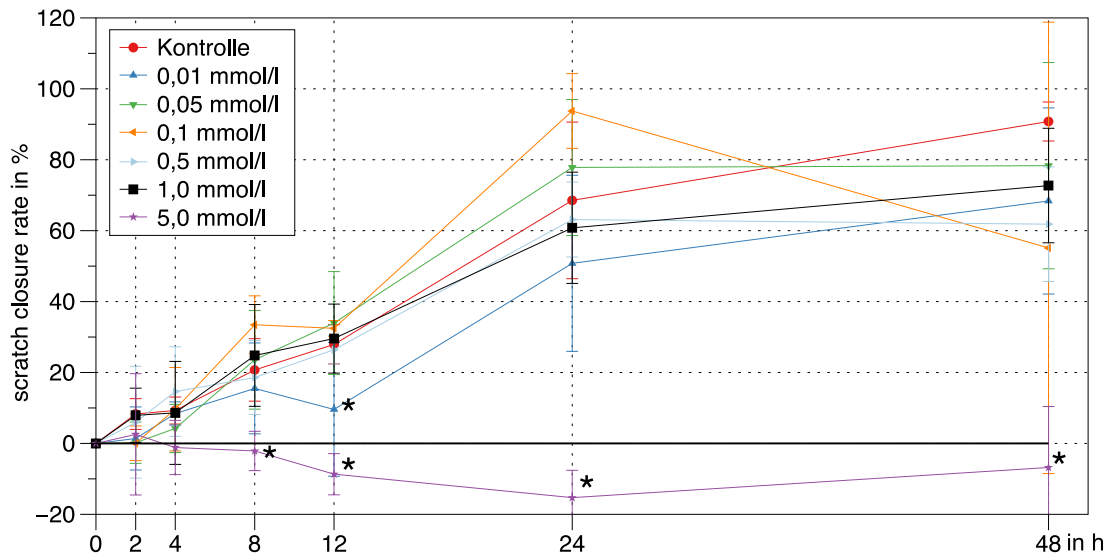


Abb. 6: Darstellung der konzentrationsabhängigen Effekte von Chloralhydrat auf die scratch closure rate an dermalen Fibroblasten (NHDF) über insgesamt 48 Stunden. (Kontrolle=Mediumkontrolle; \*=Differenz zur Kontrolle mit Irrtumswahrscheinlichkeit von  $p \leq 0,05$ )

## 4.2 HET-CAM-Test

Die Beobachtungen im HET-CAM-Test wurden in Versuchsprotokollen einzeln dokumentiert und die Messdaten in Dateien archiviert. Im Anschluss werden die relevanten Ergebnisse und deren Auswertung dargestellt.

### 4.2.1 Visueller Score

Im Folgenden werden die HET-CAM-Bilder in Bilddatenreihen dargestellt. Dabei werden die 6 Eier eines jeden Versuches sowohl vor (oben) als auch 5 min nach der Applikation der jeweiligen Prüfsubstanz (darunter) dargestellt, um einen visuellen Vergleich zu ermöglichen.

In Abbildung 7 sind die Bilddaten der Kontrollen (Negativkontrolle= Aqua dest.; Positivkontrolle=Natriumlaurylsulfat) dargestellt. Während sich bei der Negativkontrolle keine relevanten Veränderungen zeigen, finden sich bei der Positivkontrolle typische Veränderungen, die sich bei toxisch-irritativen Substanzen darstellen. Hier zeigen sich vor allem Gefäßabbrüche im Rahmen von Koagulationsprozessen und Gefäßlyse. In geringerem Umfang finden sich auch Punkthämorrhagien (Abb. 7 grüne Pfeile). Vor diesem Hintergrund kann festgestellt werden, dass die Kontrollen im Rahmen der Referenzbewertung der Beobachtungen der Prüfsubstanz geeignet sind.

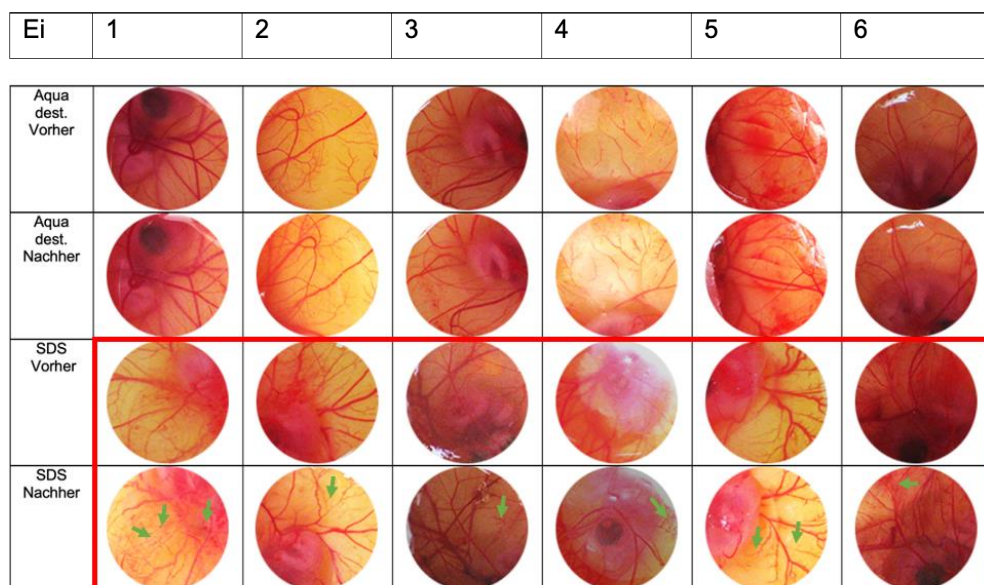


Abb. 7: HET-CAM Bilddaten zu den Referenzen (oben: Negativreferenz=Aqua dest.; unten: Positivreferenz=Natriumlaurylsulfat); grüne Pfeile zeigen Phänomene der irritativen Effektivität

Ei	1	2	3	4	5	6
CH 0,01 vorher						
CH 0,01 Nachher						
CH 0,05 Vorher						
CH 0,05 Nachher						
CH 0,1 Vorher						
CH 0,1 Nachher						
CH 0,5 vorher						
CH 0,5 Nachher						
CH 1,0 Vorher						
CH 1,0 Nachher						
CH 5,0 Vorher						
CH 5,0 Nachher						

Abb. 8: HET-CAM Bilddaten einer aufsteigenden Konzentrationsreihe von Chloralhydrat (CH) gelöst in Aqua dest. in mmol/l; grüne Pfeile zeigen Phänomene der irritativen Effektivität



In Abbildung 9 zeigen sich ab einem Konzentrationsniveau von 5,0 mmol/l Chloralhydratlösung erste Punkthämorrhagien und Gefäßlysen, die einen geringen irritativen Effekt ausweisen. Im Konzentrationsbereich  $\leq 1,0$  mmol/l Chloralhydrat finden sich keine Hinweise für relevante Veränderungen an der CAM.

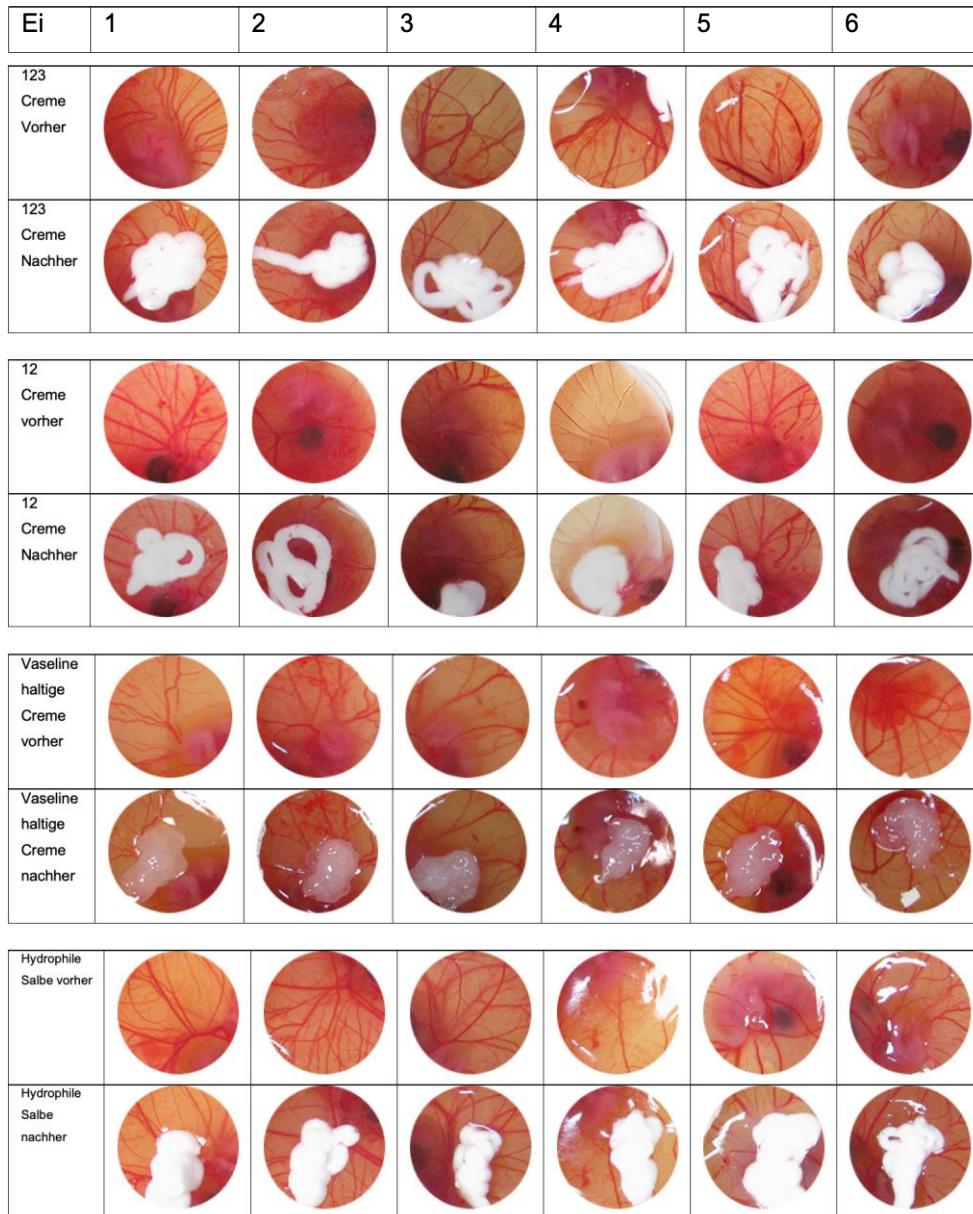


Abb. 9: HET-CAM Bilddaten unterschiedlicher halbfester Zubereitungen enthaltend Chloralhydrat; 1-2-3 Creme= L-Menthol (1%), D-Campher (2%) und Chloralhydrat (3%) in Basiscreme DAC; 1-2 Creme= Chloralhydrat-freie Zubereitung enthaltend L-Menthol (1%) und D-Campher (2%) in Basiscreme DAC; Vaseline-haltige Creme= Chloralhydrat (10%) in Vaseline (NRF); hydrophile Salbe= Chloralhydrat (3%) in wasserhaltiger Salbe (NRF)

Die Untersuchung der halbfesten Präparationen in Form der 1-2-3 Creme, deren chloralhydratfreiem Vehikel (1-2 Creme) sowie einer 10% Vaselinezubereitung (NRF)



und einer 3%igen Chloralhydrathaltigen wasserhaltigen Salbe (NRF) zeigten keine relevanten Veränderungen im Sinne irritativer Effekte (Abb. 9).

#### 4.2.2 Laser-Doppler-Fluxmetrie

Der Perfusionsindex der Laser-Doppler-Fluxmetrie zeigte zunächst bei den Kontrollen den erwarteten Verlauf. Für die Positivkontrolle zeigt sich ein deutlich über das Limit ansteigender Perfusions-Index, während die Negativkontrolle innerhalb des Toleranzbereiches nachweisbar war. Nach Applikation der wässrigen Chloralhydratlösungen zeigte sich lediglich für 5,0 mmol/l eine Erhöhung des Perfusions-Index mit Werten außerhalb des Toleranzbereiches (Abb. 10).

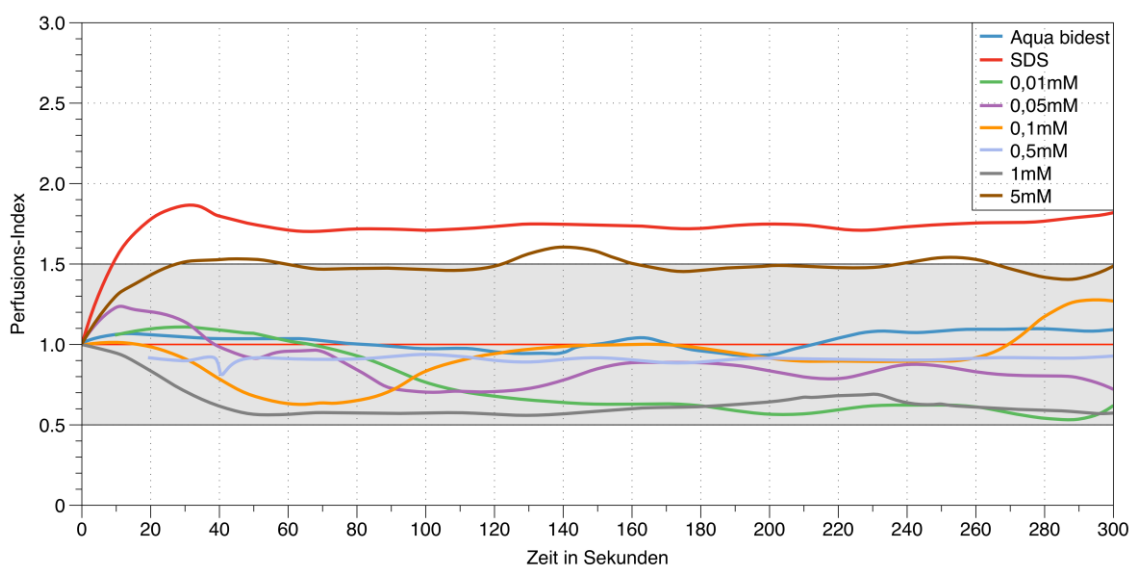


Abb. 10: Darstellung des mittleren Perfusions-Index im zeitlichen Verlauf für die wässrigen Chloralhydratlösungen entsprechend der Konzentration (farbliche Zuordnung siehe Legende)

Die Perfusions-Indices der halbfesten Präparationen zeigten, mit Ausnahme der Vaseline-Zubereitung, keine Veränderungen außerhalb des Toleranzbereiches. Die Vaseline-Zubereitung zeigte insbesondere am Anfang und am Ende des Messzeitraums einen deutlichen Anstieg des mittleren Perfusions-Index mit Werten außerhalb der Toleranz (Abb. 11).

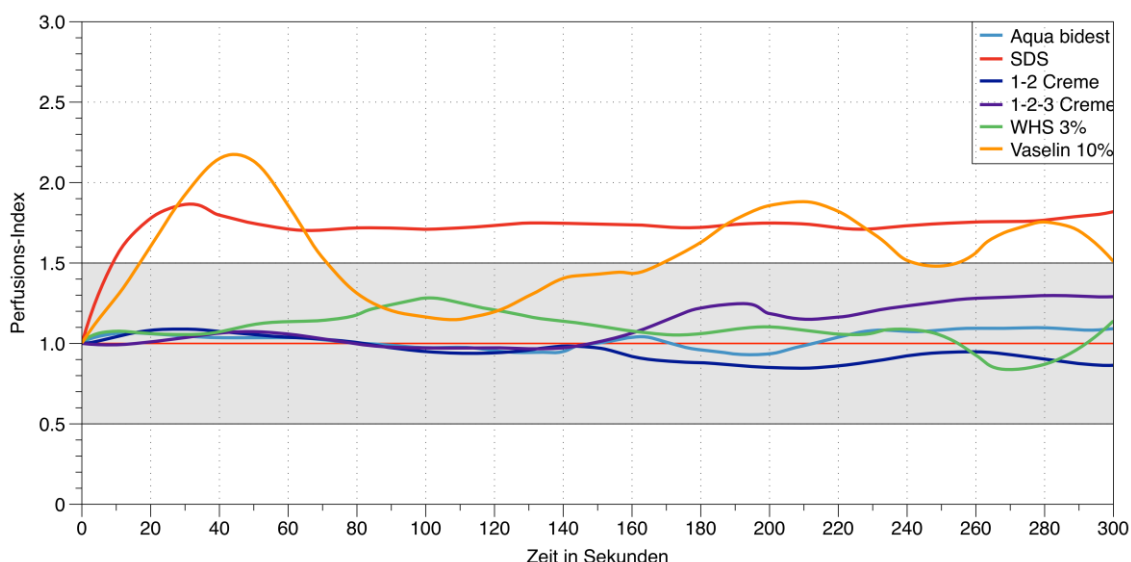


Abb. 11: Darstellung des mittleren Perfusions-Index im zeitlichen Verlauf für die halbfesten Zubereitungen; 1-2 Creme= Chloralhydrat-freie Zubereitung enthaltend L-Menthol (1%) und D-Campher (2%) in Basiscreme DAC; 1-2-3 Creme= L-Menthol (1%), D-Campher (2%) und Chloralhydrat (3%) in Basiscreme DAC; WHS= Chloralhydrat (3%) in wasserhaltiger Salbe (NRF); Vaseline= Chloralhydrat (10%) in Vaseline (NRF); (farbliche Zuordnung siehe Legende)

### 4.3 Pharmakokinetische Modellrechnung zur systemischen Bioverfügbarkeit

Auf der Basis der unter 3.7 beschriebenen Annahmen ergab sich für die Bestimmung der kutan applizierten Dosis folgende Berechnung:

$$D \left( \frac{mg}{kg KG} \right) = \frac{0,0039 \left( \frac{cm}{h} \right) * 30 \left( \frac{mg}{g} \right) * \frac{18900 \left( cm^2 \right)}{10} * 1 \left( h \right) * 1 \left( \frac{g}{cm^3} \right)}{70 \left( kg \right)} = 3,159 \left( \frac{mg}{kg KG} \right)$$

Formel 5: Berechnung der applizierten Dosis von Chloralhydrat anhand definierter Annahmen.

Daraus ergibt sich ein Schätzwert der applizierten Dosis von ca. 3,2 mg/kg Körpergewicht Chloralhydrat für eine idealgewichtige Person bei Behandlung von ca. 10% der Körperoberfläche mit einer 3%igen topischen Formulierung.

## 5 Diskussion

### 5.1 Ergeben sich auf zytotoxikologischer Ebene Hinweise für Sicherheitsbedenken in Bezug auf eine topische Applikation von Chloralhydrat?

Nach epikutaner Applikation eines Wirkstoffs ergeben sich im Vergleich zur systemischen Administration relevante Unterschiede bezüglich dessen kutaner Bioverfügbarkeit und damit auch bezüglich dessen kutaner Toxikologie. Die dabei relevanten Effekte setzen sich aus pharmako-toxikologischen Wirkungen des betrachteten Arzneistoffs an sich und den Eigenschaften aller Bestandteile der Grundlage des Topikums zusammen. Aus therapeutischer Perspektive werden dieser Grundlage eine „Vehikelfunktion“ für den oder die Wirkstoffe sowie eine „Eigenwirkung“ zugeschrieben (Wohlrab J 2014). Dabei ist von Bedeutung, dass die Eigenwirkung der Grundlage nicht vordergründig durch die Applikationsmatrix an sich (molekulares Gemisch des applizierten Topikums), sondern vielmehr durch die Segregationsmatrix (Matrix nach molekularer Neuordnung auf der Haut) vermittelt wird. Diese Umwandlung wird auch als Metamorphose eines Topikums bezeichnet und wesentlich durch die Freisetzung volatiler Anteile bedingt (Surber C und Knie U 2018; Wohlrab J, Staubach P et al. 2018). Die Eigenwirkungen kommen vordergründig durch physikochemische Effekte, durch Okklusion, Hydratisierung, Emulgierung und pH-Beeinflussung zum Tragen (Wohlrab J, Staubach P et al. 2018). Für die vorliegenden Betrachtungen wurde insbesondere auf die pharmako-toxikologischen Effekte fokussiert, die unmittelbar durch CH an kutan relevanten Zellen dosisabhängig induziert werden. Die Auswahl relevanter kutaner Zelltypen in diesem Zusammenhang richtete sich nach dem postulierten therapeutischen Zielkompartiment von CH nach epikutaner Applikation (Wohlrab J, Gilbrich F et al. 2017). Durch die bekannten pharmakodynamischen Wirkungen ist ein Effekt vor allem an nervalen Strukturen intraepidermal sowie korial zu erwarten (Neues Rezepturformulatrium 2015). Vor diesem Hintergrund sind sowohl Keratinozyten als auch Fibroblasten die wichtigsten potentiellen Akzeptoren zytotoxischer Effekte durch CH.

Durch Voruntersuchungen der Arbeitsgruppe wurde eine umfangreiche zytotoxikologische Validierung von CH an Keratinozyten, epidermalen Stammzellen, dermalen Fibroblasten, mesenchymalen Stammzellen, mikrohämo- und -lymphovaskulären Endothelzellen vorgenommen (Wohlrab J, Gilbrich F et al. 2017).

Dabei wurden die IC<sub>50</sub>/EC<sub>50</sub>-Werte ermittelt, die zelltypabhängig variierend bei ca. 5 mmol/l (= ca. 1 mg/g) für die Vitalität und bei ca. 2 mmol/l (= 0,4 mg/g) für die proliferative Aktivität lagen.

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit ergänzend im Scratch-Assay durchgeführten Untersuchungen an Keratinozyten (HaCaT-Zellen) und Fibroblasten (NHDF) zeigen vergleichbare Konzentrationsniveaus für die beobachteten Effekte. Da im Scratch-Assay die Verschlussrate durch Vitalität, Proliferation und Migration der betrachteten Zelltypen bestimmt wird, überlagern sich hier mehrere zellbiologische Vorgänge, so dass Effekte eines komplexen Zusammenspiels eines zweidimensionalen Zellverbandes zum Tragen kommen (Bobadilla AVP, Arevalo J et al. 2019). Dennoch ist es bemerkenswert, dass sich auch hier eine Effektgrenze im Konzentrationsbereich zwischen 1,0 und 5,0 mmol/l darstellt. Damit ergänzen die Daten des Scratch-Assays die Voruntersuchungen und bieten somit eine gute Ausgangsdatenlage für eine kutanzytotoxikologische Bewertung (Wohlrab J, Gilbrich F et al. 2017).

Aus umfangreichen toxikologischen Dossiers zu CH gehen keine Daten zur kutanen Toxikologie hervor (Beland FA 1999; U.S. Environmental Protection Agency 2000). Lediglich in Untersuchungen zur perkutanen Absorption von CH nach Kontakt mit chloriertem Schwimmbadwasser sind Betrachtungen zur kutanen Toxikologie hinterlegt (Trabaris M, Laskin JD et al. 2012). Dabei zeigen Messungen, dass pro Liter Schwimmbadwasser bis zu 45 µg CH enthalten sein können. Die Autoren schätzen in einer Monte-Carlo-Simulation die dermal aufgenommene Dosis auf ca. 0,24 µg/kg pro Monat und messen diesem Umstand in Kombination mit Ingestion von chloriertem Trinkwasser toxikologische Relevanz zu. Sie weisen deshalb auf eine Beachtung dieser Zusammenhänge bei der Chlorierung von Wasser hin (Trabaris M, Laskin JD et al. 2012; Trabaris M, Laskin JD et al. 2012). Diese Betrachtungen machen deutlich, dass die perkutane Absorption von CH grundsätzlich Relevanz besitzt.

Zudem finden sich Berichte, dass bei Patienten mit sedativ-hypnotischen Dosen von CH in der Systemtherapie unerwünschte kutane Effekte beobachtet wurden (Ogino K, Hobara T et al. 1990; Caksen H und Odabas D 2001; Lin YC und Ma JY 2006). So werden Läsionen an der Mundschleimhaut, im Gastrointestinalbereich und der perioralen Haut beschrieben. Allerdings kann nur vermutet werden, ob es sich dabei tatsächlich um spezifische kutane bzw. mukokutane Reaktionsmuster auf der Basis Substanz-spezifischer Effekte handelt. Auch wenn die Evidenz diesbezüglich sehr

gering erscheint, ist es nicht ausgeschlossen, dass kutan-toxikologisch relevante Mechanismen vorliegen.

Bezüglich der direkten epikutanen Applikation von CH zur Therapie von Hauterkrankungen finden sich keine Berichte zu unerwünschten Effekten. Nach der Publikation pharmakologischer Grundlagen von CH durch den Berliner Pharmakologen Oskar Liebreich im Jahr 1869 wurden bereits rasch nach systemischer Gabe Intoxikationen beobachtet und beschrieben (Rohde GF 1871; Oehme P 2019). Später werden dann in Rezepturbüchern Formeln zur kutanen Anwendung von Besnier zur Behandlung der Alopecia areata und von Neisser als juckreizstillende Salbe beschrieben (Bruck C 1925). Die hierbei empfohlene CH-Konzentration wird mit 10% angegeben. Auch hier findet sich, wie in späteren Darstellungen zum Einsatz von CH in der Wundbehandlung, kein Bezug zu möglichen Unverträglichkeitsreaktionen (Messer S 2014).

Geht man von einer Donorkonzentration von CH in einem Topikum von ca. 30 mg/g (3%) aus, könnte die ermittelte  $IC_{50}$  von 0,1 mg/g für Proliferation sowie von 0,4 mg/g für Vitalität im Grenzbereich zur toxikologisch relevanten Schwellendosis der kutanen Bioverfügbarkeit liegen (Wohlrab J, Gilbrich F et al. 2017). Bedenkt man aber, dass ca. 0,25 g eines Topikums auf 1 % der Körperoberfläche (entspricht einer Handinnenfläche, ca. 25-30 cm<sup>2</sup>) appliziert werden, würde dies 0,01 g Topikum/cm<sup>2</sup> Haut entsprechen, also 0,3 mg CH/cm<sup>2</sup> Haut (Wohlrab J, Staubach P et al. 2018). Legt man die Schätzdaten zur kutanen Absorption von CH aus Schwimmbadwasser zugrunde, ist nicht von einer vollständigen Penetration auszugehen, sodass man basierend auf den genannten Annahmen schätzungsweise keine toxikologisch relevante Bioverfügbarkeit erwarten kann (Trabaris M, Laskin JD et al. 2012; Wohlrab J, Gilbrich F et al. 2017). Ein sicherer Ausschluss ist aber anhand der vorliegenden Daten nicht möglich. Hierzu wären Untersuchungen zur Validierung der Penetrationskinetik von CH aus der betrachteten Zubereitung sowie klinische Verträglichkeitsuntersuchungen z.B. im „human repeated insult patch (hRIPT)“-Verfahren notwendig (Bormann JL und Maibach HI 2021).

## **5.2. Erfüllen der Wirkstoff und das Rezepturzneimittel die regulatorischen Voraussetzungen in einem präklinischen Verträglichkeitsmodell für Topika?**

Für die Bewertung der regulatorischen Eignung von CH und der untersuchten Magistralrezeptur muss zunächst festgestellt werden, dass wegen der pharmakologischen Wirksamkeit von Chloralhydrat das Topikum dem Arzneimittelgesetz (AMG) unterliegt und somit die Qualitätskriterien von Rezepturzneimitteln gelten (Wohlrab J, Klauck D et al. 2014; Wohlrab J, Staubach P et al. 2018). Demnach müssen alle Inhaltstoffe der Rezeptur in Arzneibuchqualität vorliegen sowie die Rezeptur durch einen Apotheker plausibilitätsgeprüft und hergestellt werden (Wohlrab J 2016).

Um Aussagen zur Haut- und Schleimhautverträglichkeit in einem präklinischen Modell erarbeiten zu können, wurde auf den HET-CAM-Test zurückgegriffen. Vorteil dieses Verfahrens ist die Nutzung einer standardisierten Methodik mit regulatorisch vorgegebenem Validierungsprozedere (Spielmann H, Kalweit S et al. 1993; ICCVAM 2006). Zudem wurde das visuelle Scoring-Verfahren um einen objektiven zweiten Parameter, die Laser-Doppler-Fluxmetrie, ergänzt (Wohlrab J, Gilbrich F et al. 2017). Nachteil des Verfahrens ist die letztlich begrenzte Aussagefähigkeit, und dass der HET-CAM-Test eine klinische Validierung nicht vollständig ersetzen kann (Mcnamee PM, Api AM et al. 2008; Bormann JL und Maibach HI 2021). Zudem werden durch den HET-CAM-Test ausschließlich irritative bzw. toxische Effekte erfasst, sodass keine Aussagen zum Sensibilisierungspotential getroffen werden können. Setzt man sich kritisch mit dem HET-CAM-Test auseinander, so wird deutlich, dass die Auswertung einer gewissen Subjektivität unterliegt (Tavaszi J und Budai P 2007; Bender C, Partecke LI et al. 2011; Mckenzie B, Kay G et al. 2015). Die Parameter werden visuell beurteilt und im zeitlichen Verlauf des Tests sowie im Ausmaß des Eintretens vom Untersucher bewertet. Da die Bewertung und Erfassung der Ereignisse für die Versuchsanordnung von 6 Eiern synchron erfolgt, ist Erfahrung bei der Versuchsdurchführung, sowie ein standardisiertes Vorgehen notwendig. Für die vorliegenden Untersuchungen erfolgte die Begutachtung im Vieraugenprinzip durch den Verfasser der Arbeit und einen erfahrenen Untersucher. Gleichzeitig wurde in Ergänzung zum regulatorisch empfohlenen Vorgehen eine Fotodokumentation etabliert, die eine Objektivierung der Ergebnisse im Vergleich vor und nach Ende der Versuchszeit von 5 min ermöglicht. Diese aufwendige, aber transparente Dokumentation der Versuchsdaten trägt zur sorgfältigen Bewertung von Ereignissen bei und reduziert die Subjektivität (Mckenzie B, Kay G et al. 2015). Als weitere Variable

hat sich der Präparationsvorgang, insbesondere die händische Freilegung der CAM erwiesen, da hier die Gefahr einer Verletzung der CAM sehr hoch ist. Vor diesem Hintergrund wurde die Präparation der Eier von geübten technischen Mitarbeitern umgesetzt, um die Anzahl der durch Präparation beschädigten und damit versuchsungeeigneten Eiern gering zu halten. Dennoch kann man zusammenfassend feststellen, dass der HET-CAM-Test eine regulatorisch anerkannte und im Kontext mit anderen Testverfahren aussagefähige präklinische Untersuchung der Verträglichkeit darstellt.

Der ergänzend zu den zytotoxikologischen Untersuchungen mit Ermittlung der  $IC_{50}/EC_{50}$ -Werte durchgeführte Scratch-Assay hat regulatorisch nur ergänzende Bedeutung und wird alleinig nicht als zytotoxikologisch aussagefähig angesehen (European Medicines Agency 2018). In Zusammenschau mit den bereits publizierten Daten zur kutanen Zytotoxizität von CH liefern sie aber eine Bestätigung der dort gefundenen Daten und getroffenen Aussagen (Wohlrab J, Gilbrich F et al. 2017). Vor diesem Hintergrund können sie für die präklinische Bewertung der Verträglichkeit von CH in Topika als verzichtbar, aber dennoch wertvoll betrachtet werden.

### 5.3 Ergänzen die Ergebnisse die bisher vorliegenden Daten zur Pharmakologie und Toxikologie von Chloralhydrat?

Für die toxikologische Bewertung der Daten müssen zwei inhaltliche Aspekte unterschieden werden. Neben Betrachtungen zur kutanen Bioverfügbarkeit von CH nach topischer Applikation ist vor allem auch die systemtoxikologische Relevanz nach lokaler Anwendung von CH von Bedeutung. Zur kutan-toxikologischen Bewertung (kutane Verträglichkeit) wurde bereits unter 5.1. Stellung bezogen. Vor diesem Hintergrund ist nach einer individuellen Nutzen-Risiko-Abwägung die topische Anwendung von CH als weitgehend unproblematisch zu bewerten. Für die systemische Sicherheit unter lokaler Anwendung von CH ist aber vor allem die Abschätzung der Pharmakokinetik in systemrelevanten Organsystemen von Bedeutung.

Die anhand der unter 4.3. berechnete systemrelevante Dosis von 3,2 mg/kg Körpergewicht Chloralhydrat für eine Einmalapplikation kann ins Spannungsfeld mit den umfangreichen toxikologischen Daten aus Tierversuchen und aus Analysedaten von Vergiftungssituationen bei Patienten gesetzt werden. Der lowest-observed-adverse-effect level (LOAEL) zur Sedierung beim Menschen wird mit 10,7 mg/kg Körpergewicht angegeben (Thompson TKM, M.G.; Nies, A.S. 1983; U.S. Environmental Protection Agency 2000). Somit wäre bei sachgemäßer Anwendung des beschriebenen Topikums eine sedierende Wirkung nahezu ausgeschlossen. Berücksichtigt man die Halbwertszeit (HWZ) von CH von ca. 7 Stunden, wäre selbst bei wiederholter Anwendung des Topikums nicht von einer Gefährdung auszugehen (Mcbay AJ, Boling VR, Jr. et al. 1980; World Health Organization 1995). Zudem wurde mittels Spektrophotometrie nach oraler Applikation von CH bereits nach 10 min kein Wirkstoff mehr im Blut nachgewiesen (Mcbay AJ, Boling VR, Jr. et al. 1980). Dies weist auf einen hohen „first pass“-Effekt im Sinne einer raschen Metabolisierung von CH sowie auch von Trichlorethanol hin. Dadurch erscheinen kumulative Effekte aus pharmakokinetischer Sicht sehr unwahrscheinlich.

Dagegen wäre eine Behandlung größerer Hautareale durchaus geeignet, Dosislevel mit sedierenden Effekten zu erzielen. So ergeben sich bei Applikation der 3%-igen CH-Zubereitung auf >30% der Körperoberfläche durchaus Schätzwerte, die an das LOAEL zur Sedierung heranreichen. Betrachtet man die für den Menschen ermittelte LD<sub>50</sub> von 480 mg/kg Körpergewicht, so wäre selbst bei unsachgemäßer Ganzkörperbehandlung rechnerisch maximal 1/10 der LD<sub>50</sub> zu erwarten. In der Literatur finden sich zudem Angaben zum gentoxischen Potential von CH, welches in Dosen >0,1 mg/kg



Körpergewicht bei Metabolisierung durch Cytochrom-P450 (CYP2E1) durch Peroxisomenproliferation im Tiermodell Lebertumore und Hypophysenadenome induzieren kann (Mcbay AJ, Boling VR, Jr. et al. 1980; Humans IWGOTEOCRT 2004). Legt man die berechnete systemische Bioverfügbarkeit nach topischer Applikation von 3,2 mg/kg Körpergewicht zugrunde, würde dies den im Tiermodell beschriebenen Grenzwert deutlich übersteigen. Untersuchungen von CH in Lymphozytenkulturen von Kindern weisen allerdings ein sehr geringes genotoxisches Potential nach (Ikbal M, Tastekin A et al. 2004). Angesichts des bereits erwähnten hohen „first pass“-Effektes von CH und der in der Systemtherapie deutlich höheren Dosierungen ist eine klinische Relevanz für die topische Applikation deshalb sehr unwahrscheinlich.

Auswertung von kalifornischen Versicherungsdaten zur Objektivierung des kanzerogenen Potentials von CH haben die Anzahl der systemischen CH-Verordnungen ins Verhältnis zur Morbidität bezüglich verschiedener Malignome gesetzt (Haselkorn T, Whittemore AS et al. 2006). Dabei konnten mit Bezug auf Lungen-, Magen- und Prostatakarzinom sowie Melanom keine erhöhten Inzidenzen gefunden werden. In diesem Punkt kann aber ein Risikopotential nicht grundsätzlich ausgeschlossen werden (Wohlrab J, Gilbrich F et al. 2017). Insgesamt erscheint aber die topische Anwendung von CH auch bezüglich der systemischen Sicherheit als weitgehend sicher.

Aus dermatopharmakologischer Sicht kann zudem noch angeführt werden, dass die mikromorphologischen Besonderheiten von psoriatischer Haut, für die die topische Anwendung validiert wurde, durch epidermale Hyperplasie (Hyperkeratose und Akanthose) einer Diffusion von CH entgegenstehen (Wohlrab J 2014). Insbesondere durch die verlängerte Diffusionsstrecke und den sich dadurch ändernden Diffusionskoeffizienten ergeben sich, den Fick'schen Diffusionsgesetzen folgend, ungünstigere Penetrationsbedingungen im Vergleich zu gesunder Haut. Darüber hinaus ist von einer deutlich erhöhten Reservoirfunktion durch das verdickte Stratum corneum als primärem Akzeptor auszugehen, so dass von einer verlängerten Diffusionskinetik mit verringerter maximaler kutaner Konzentration ( $C_{max.}$ ) auszugehen ist. Dies lässt auch eine verminderte Permeation von CH erwarten, so dass ein Bruchteil der berechneten Systemdosis von 3,2 mg/kg Körpergewicht bei der topischen Anwendung zur Juckreizstillung bei Psoriatikern *in realitas* wahrscheinlich ist.

Aus der Systemtherapie ist bekannt, dass Intoxikationen mit CH im Kindesalter häufiger beobachtet werden (Laptook AR und Rosenfeld CR 1984; Reimche LD,

Sankaran K et al. 1989; Anyebuno MA und Rosenfeld CR 1991; Kirimi E, Caksen H et al. 2002; Caksen H, Odabas D et al. 2003; Allegaert K, Daniels H et al. 2005; Litman RS, Soin K et al. 2010; Ozsoylu S 2010; Chen ML, Chen Q et al. 2017). Dies hängt zunächst auch damit zusammen, dass CH hier häufiger zur Sedierung vor kleineren invasiven Eingriffen bzw. vor bildgebenden Untersuchungstechniken zum Einsatz kommt. Allerdings wird die Anwendung von CH im Spannungsfeld zu anderen Sedativa zunehmend kritisch bewertet (Dallefeld SH, Smith PB et al. 2020). Dabei konnte insbesondere bei Kleinkindern durch Metaanalyse der Vorteil anderer Sedativa nachgewiesen werden (Li L, Zhou J et al. 2020). Insbesondere bei Früh- und Neugeborenen müssen Einschränkungen in der hepatischen Elimination vermutet werden, die durch Kumulation von CH bzw. dessen verzögerter Elimination das Risiko einer Intoxikation steigern können (Laptook AR und Rosenfeld CR 1984; Anyebuno MA und Rosenfeld CR 1991; Kirimi E, Caksen H et al. 2002). Insgesamt ergibt sich daraus auch für die topische Anwendung von CH ein verändertes Risikopotential bei der Anwendung im Kindesalter. Insbesondere bei Säuglingen, Klein- und Schulkindern kann ein vermehrter Penetrationsfluss von CH nach epikutaner Applikation nicht ausgeschlossen werden (Ludriksone L, Garcia Bartels N et al. 2014). Zudem ergibt sich aus der gegenüber Erwachsenen anderen Relation aus Körperoberfläche zu -volumen ein verändertes pharmakokinetisches Schätzmodell, so dass die im Rahmen dieser Arbeit berechneten Daten nicht unkorrigiert übertragen werden können. Vor diesem Hintergrund sollte eine topische Anwendung von CH im Kindesalter aufgrund toxikologischer Risiken nicht erfolgen.

Ein weiterer toxikologischer Aspekt ergibt sich durch die mögliche Entwicklung einer Abhängigkeit nach wiederholter systemischer Anwendung von CH, die als „Chloralismus“ bezeichnet wird (Kirn L 1873; Chatagnon C und Chatagnon P 1960; Poon R, Nakai J et al. 2002). Zunächst wurde das Suchtphänomen vor allem im Zusammenhang mit dem unsachgemäßen Gebrauch bzw. chronischen Missbrauch von Chloral beschrieben (Rehm 1886). Später erkannte man die neuropsychiatrischen Effekte von Chloral nach chronischer Exposition und das sich daraus ableitende Suchtpotential (Moore FJ 1953; Pranjic N, Sinanovic O et al. 2002). Zudem finden sich in der Literatur auch wiederkehrende Berichte von akuten Intoxikationen, die als Vergiftung oder auch in suizidaler Absicht mittels CH beobachtet wurden (Kirn L 1873; Tizard H 1878; Gray G 1880; Nagel S und Schmechta H 1970; Lansky LL 1974; Van Heijst AN, Zimmerman AN et al. 1977; Jensen IL, Frederiksen B et al. 1984; Ludwigs U, Divino Filho JC et al. 1996; Nordt SP, Rangan C et al. 2014). Deshalb wurden auch Methoden zum analytischen Nachweis von CH aus Biomaterialien sowie Verfahren zur

Detoxikation entwickelt und publiziert (Payne LC 1954; Gerretsen M, De Groot G et al. 1979; Riabinin VE und Lifshits RI 1991; Delinsky AD, Bruckner JV et al. 2005). Diese Berichte machen deutlich, dass CH bei unsachgemäßer Anwendung durchaus ein toxikologisch relevantes Potential besitzt. Dennoch kann zusammenfassend festgestellt werden, dass dieses Risiko bei der topischen Anwendung einer 3%-igen Formulierung als äußerst gering einzuschätzen ist.

#### **5.4 Welche Bewertungen lassen sich für die praktische Anwendung von Chloralhydrat in Topika formulieren?**

Da Juckreiz ein häufiges Symptom bei verschiedenen, meist entzündlichen oder metabolischen Erkrankungen darstellt und zudem wesentlich die Krankheitslast durch massive Beeinträchtigung der Lebensqualität bestimmt, besteht ein großer Bedarf an effizienten Behandlungsmöglichkeiten (Weisshaar E 2016; Steinke S, Zeidler C et al. 2018; Kremer AE, Mettang T et al. 2020). Die Bedeutung von Juckreiz als Krankheitssymptom für die Lebensqualität der Betroffenen wird auch dadurch deutlich, dass chronischer Juckreiz in der „Global Burden of Diseases-Study“ als eine der 50 häufigsten Erkrankungen mit besonderer Last benannt wird (Cohen AJ, Brauer M et al. 2017). Wie bereits in der Einleitung ausführlich dargelegt, verbirgt sich hinter dem Symptom Juckreiz kein einheitlicher Pathomechanismus, sondern eine komplexe, eigenständige Sinneswahrnehmung durch eine gestörte neurosensorische Aktivität auf verschiedenen Verarbeitungsebenen (Yosipovitch G, Rosen JD et al. 2018). Dabei können eine Vielzahl molekularer Faktoren den Juckreiz auslösen oder unterhalten. Da die pathogenetischen Kategorien klinisch nicht sicher zu identifizieren sind, ist ein therapeutisches Konzept häufig von Empirie geprägt. In der topischen Therapie sind die antipruriginösen Auswahlmöglichkeiten grundsätzlich sehr begrenzt (Hercogova J 2005; Yosipovitch G, Misery L et al. 2019). Am häufigsten werden antihistaminerge Zubereitungen eingesetzt, die allerdings nur in einem schmalen und eher seltenen Spektrum von Juckreizzuständen eine Wirkung zeigen (Thurmond RL, Kazerouni K et al. 2015). Darüber hinaus kommt häufig Polidocanol, als Monotherapie oder in Kombination mit Harnstoff, als schwach wirksame lokalanästhetische Substanz zur Anwendung (Castello M und Milani M 2011; Hawro T, Fluhr JW et al. 2014). Auch wenn es durch die neueren Erkenntnisse zur Pathogenese des Juckreizes eine Vielzahl neuer Ansätze für die Therapie gibt, sind aktuell keine weiteren spezifisch antipruriginösen Therapieoptionen für die topischen Anwendung verfügbar (Yosipovitch G, Rosen JD et al. 2018). Vor diesem Hintergrund kommt CH als pharmakologisch gut charakterisierte Substanz eine relevante Bedeutung zu. Die vorliegenden Untersuchungsergebnisse leisten dazu einen entscheidenden Beitrag, da nun auch eine evidenzbasierte Bewertung der kutanen Verträglichkeit und der Risiken einer systemischen Bioverfügbarkeit nach topischer Applikation möglich sind (Wohlrab J, Gilbrich F et al. 2017).

Da für die topische Anwendung von CH eine standardisierte Rezeptur (Magistralrezeptur) vorliegt und durch Rezepturbücher eine pharmazeutische Plausibilitätsbewertung diesbezüglich publiziert ist, wird durch die nun erarbeitete

Sicherheitsbewertung eine rechtskonforme Anwendung ärztlicherseits ermöglicht (Neues Rezepturformularium 2015). Die Grundanforderungen an Arzneimittel sind im Arzneimittelgesetz (AMG) festgeschrieben. Dabei werden eine Wirksamkeit sowie die Unbedenklichkeit und eine definierte pharmazeutische Qualität gefordert. Bei Rezepturarzneimitteln ist anders als bei Fertigarzneimitteln zum Nachweis der Wirksamkeit und Unbedenklichkeit nicht zwingend eine klinische Studie notwendig. Damit werden Rezepturarzneimittel auch nicht zugelassen, sondern unterliegen der genannten verpflichtenden Plausibilitätsprüfung durch Arzt (§ 5, 8, 21 AMG) und Apotheker (§ 7 ApBetrO). Alle für die Herstellung des Rezepturarzneimittels verwendeten Ausgangsstoffe müssen deshalb Arzneibuchqualität besitzen, die durch den Hersteller bzw. Lieferanten durch Prüfsertifikate nachzuweisen ist (§ 6 Abs. 3 ApBetrO) und vom Apotheker vor Herstellung der Rezeptur überprüft werden muss. Dabei werden für kritische Qualitätsstandards bestimmte Spezifikationen verwendet, die die Herstellung und Prüfung der Rezepturen regeln. Als unbedenklich sind Rezepturarzneimittel nur anzusehen, wenn ausgeschlossen werden kann, dass „nach dem jeweiligen Stand der wissenschaftlichen Erkenntnisse der begründete Verdacht besteht, dass sie bei bestimmungsgemäßem Gebrauch schädliche Wirkungen haben, die über ein nach den Erkenntnissen der medizinischen Wissenschaft vertretbares Maß hinausgehen“ (§ 5 AMG Abs.2). Um Ausgangsstoffe mit relevantem Schädigungspotential auszuschließen, wird eine Liste der bedenklichen Rezepturarzneimittel von der Arzneimittelkommission der deutschen Ärzteschaft (AKdÄ) zusammen mit der Arzneimittelkommission der deutschen Apotheker (AMK) publiziert (Apotheker ADD 2015). CH wird in diesen Listen nicht als bedenklich geführt, so dass auch diesbezüglich grundsätzlich keine Hindernisse für den Einsatz in Rezepturarzneimitteln bestehen.

Auch wenn der Apotheker für ein fehlerhaft hergestelltes Rezepturarzneimittel haftet, so obliegt dem ärztlichen Verordner die Haftung für die Unschädlichkeit der Rezeptur im Einsatz beim individuellen Patienten. Dabei müssen die Bedingungen des Patientenrechtegesetzes berücksichtigt werden, die vorschreiben, dass neben der Einhaltung allgemein anerkannter medizinischer Standards eine umfassende Aufklärungspflicht des Patienten seitens des Arztes besteht (§ 630 a BGB, §5 AMG) (Gesundheit BF 2013). Dabei muss der behandelnde und verordnende Arzt auch über alternative Maßnahmen und Therapiemethoden sowie deren Belastungen, Risiken und Heilungschancen informieren (§ 630 e BGB) sowie für das Rezepturarzneimittel eine schriftliche Gebrauchsanweisung aushändigen (§2 Abs.1 Nr.7 AMVV).

Der Einsatz von Rezeptur Arzneimitteln ist aus verschiedenen Gründen ein gängiges Verfahren. So ergab eine Untersuchung des Ordnungsverhaltens im Zeitraum von 2011 bis 2014, dass etwa drei von zehn Ordnungen von Rezeptur Arzneimitteln (30,54%) von Dermatologen stammen, obwohl diese im kassenärztlichen Versorgungssystem nur 2,7% aller Ärzte stellen. Von allen dermatologischen Ordnungen sind mehr als die Hälfte (53,6%) Rezeptur Arzneimitteln (Staubach P, Salzmann S et al. 2018). Diese aktuellen Daten verdeutlichen die Relevanz von Rezeptur Arzneimitteln im dermatologischen Versorgungsalltag (Staubach P 2014; Staubach P, Melhorn S et al. 2016).

Für die topische Anwendung von CH sind bereits mehrere Rezepturformulierungen beschrieben. Allerdings findet sich im Neuen Rezepturformularium (NRF) vor allem die bereits unter 1.4.4. beschriebene 1-2-3 Creme. Die darin enthaltenen aktiven Inhaltsstoffe CH, Menthol und Campher vermitteln alle antipruriginöse Effekte. Die Pharmakodynamik von CH wurde bereits unter 1.4 beschrieben. Menthol wirkt über Bindung an den *transient receptor potential cation channel subfamily M (melastatin) member 8* (TRPM8) antipruriginös und Campher vermittelt parasympholytische Effekte durch Blockade nikotischer Cholin-Rezeptoren (Haught JM, Jukic DM et al. 2008; Cal K 2009; Nakashimo Y, Takumida M et al. 2010). Bei der Anwendung der 1-2-3 Creme können die Effekte auf den psoriatischen Pruritus aller drei aktiven Inhaltsstoffe nicht voneinander getrennt werden, allerdings wird die vordergründige Wirkung der Formulierung CH zugeschrieben. Dies wird vor allem mit der Pharmakodynamik von CH, aber auch mit dessen höherer kutaner Bioverfügbarkeit durch die höhere Einsatzkonzentration begründet.

Ob der Einsatz von 1-2-3 Creme als topisches Antipruriginosum auch aus gesundheitsökonomischer Sicht von Vorteil ist, kann derzeit nur abgeschätzt werden. Sollten sich die Erfahrungen zur Wirksamkeit auch in kontrollierten klinischen Studien bestätigen, wäre der Preis von ca. 100 -150 EUR pro 50 g Zubereitung angesichts fehlender effektiver Alternativen im Spannungsfeld zur systemischen Anwendung von Antipruriginosa als günstig zu bewerten (Pereira MP und Stander S 2016).

## 6 Zusammenfassung

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass der topische Einsatz von CH durch die vorliegenden Untersuchungsergebnisse mittels HET-CAM-Test und ergänzend der Laser-Doppler-Fluxmetrie an der CAM sowie durch die zytotoxikologischen Untersuchungen im Scratch-Assay in Verbindung mit einer umfassenden Literatur- und Datenrecherche und -analyse als weitgehend unbedenklich angesehen werden kann. Die empirisch beobachtete antipruriginöse Wirkung von CH in einer Konzentration von 3% in einer Magistralrezeptur kann bestätigt werden. Die vorgelegten Ergebnisse und Analysen ermöglichen sowohl dem Apotheker als auch dem verordnenden Arzt eine evidenzbasierte Plausibilitätsprüfung zur kutanen Verträglichkeit und systemischen Sicherheit von CH-haltigen Topika bei sachgerechter Anwendung. Aus regulatorischer Sicht steht dabei der Verwendung von CH in Rezeptur Arzneimitteln für die epikutane Anwendung nichts im Weg. Dennoch muss der verordnende Arzt die besonderen rechtlichen Rahmenbedingungen des Einsatzes von Rezeptur Arzneimitteln bedenken und insbesondere eine individuelle Nutzen-Risiko-Abschätzung, eine besondere Aufklärungspflicht sowie die Verpflichtungen zur Wirtschaftlichkeit der Verordnung berücksichtigen.

Aus Betrachtungen der Systempharmakologie von CH kann gemutmaßt werden, dass die GABAerge Wirkung auch bei topischer Applikation verantwortlich für die beobachteten Effekte auf den Juckreiz bei Psoriatikern ist. Zur Bewertung der antipruriginösen Wirksamkeit von topisch appliziertem CH müssen kontrollierte klinische Studien in der Indikation Psoriasis bzw. in weiteren Indikationen durchgeführt werden.

**Literaturverzeichnis**

Abbas RR, Seckel CS, Kidney JK, Fisher JW (1996) Pharmacokinetic analysis of chloral hydrate and its metabolism in B6C3F1 mice. *Drug Metab Dispos* 24:1340-1346.

Akiyama T, Andoh T, Ohtsuka E, Nojima H, Ouchi H, Takahata H, Kuraishi Y (2018) Peripheral gabapentin regulates mosquito allergy-induced itch in mice. *Eur J Pharmacol* 833:44-49.

Akiyama T, Carstens MI, Carstens E (2010) Enhanced scratching evoked by PAR-2 agonist and 5-HT but not histamine in a mouse model of chronic dry skin itch. *Pain* 151:378-383.

Alinaghi F, Calov M, Kristensen LE, Gladman DD, Coates LC, Jullien D, Gottlieb AB, Gisondi P, Wu JJ, Thyssen JP, Egeberg A (2019) Prevalence of psoriatic arthritis in patients with psoriasis: A systematic review and meta-analysis of observational and clinical studies. *J Am Acad Dermatol* 80:251-265 e219.

Allegaert K, Daniels H, Naulaers G, Tibboel D, Devlieger H (2005) Pharmacodynamics of chloral hydrate in former preterm infants. *Eur J Pediatr* 164:403-407.

Almeyda J, Levantine A (1972) Drug reactions. XVII. Cutaneous reactions to barbiturates, chloral hydrate and its derivatives. *Br J Dermatol* 86:313-316.

Amrhein V, Greenland S, Mcshane B (2019) Scientists rise up against statistical significance. *Nature* 567:305-307.

Anyebuno MA, Rosenfeld CR (1991) Chloral hydrate toxicity in a term infant. *Dev Pharmacol Ther* 17:116-120.

Armstrong AW, Read C (2020) Pathophysiology, Clinical Presentation, and Treatment of Psoriasis: A Review. *JAMA* 323:1945-1960.

Arzneimittelkommission der Deutschen Apotheker (2015). "Bedenkliche Rezepturazneimittel." Retrieved 09.01., 2017, from <http://www.akdae.de/Arzneimittelsicherheit/Weitere/Bedenkliche-Rezepturazneimittel.pdf>.

Bagno A, Martini R (2015) Wavelet analysis of the Laser Doppler signal to assess skin perfusion. *Annu Int Conf IEEE Eng Med Biol Soc* 2015:7374-7377.

Beland FA (1999) NTP technical report on the toxicity and metabolism studies of chloral hydrate (CAS No. 302-17-0). Administered by gavage to F344/N rats and B6C3F1 mice. *Toxic Rep Ser* 1-66, A61-E67.

Beland FA, Schmitt TC, Fullerton NF, Young JF (1998) Metabolism of chloral hydrate in mice and rats after single and multiple doses. *J Toxicol Environ Health A* 54:209-226.

Belcheva A, Zhelyazkova M (1988) On the interaction between H1- and H2-histaminergic receptors in the histamine release and the realization of its vascular effects in rat skin. *Acta Physiol Pharmacol Bulg* 14:49-54.

Bender C, Partecke LI, Kindel E, Doring F, Lademann J, Heidecke CD, Kramer A, Hubner NO (2011) The modified HET-CAM as a model for the assessment of the inflammatory response to tissue tolerable plasma. *Toxicol In Vitro* 25:530-537.



Bobadilla AVP, Arevalo J, Sarro E, Byrne HM, Maini PK, Carraro T, Balocco S, Meseguer A, Alarcon T (2019) In vitro cell migration quantification method for scratch assays. *J R Soc Interface* 16:20180709.

Bormann JL, Maibach HI (2021) Draize human repeat insult patch test (HRIPT): Seven decades of pitfalls and progress. *Regul Toxicol Pharmacol* 121:104867.

Boukamp P, Petrussevska RT, Breitkreutz D, Hornung J, Markham A, Fusenig NE (1988) Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line. *J Cell Biol* 106:761-771.

Boyd ST, Mihm L, Causey NW (2008) Improvement in psoriasis following treatment with gabapentin and pregabalin. *Am J Clin Dermatol* 9:419.

Breckenridge A, Orme ML, Thorgeirsson S, Davies DS, Brooks RV (1971) Drug interactions with warfarin: studies with dichloralphenazone, chloral hydrate and phenazone (antipyrine). *Clin Sci* 40:351-364.

Bruck C: Rezepturtaschenbuch für Dermatologen. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 1925, pp. 31

Bryson E, Asbill S, Sweitzer S (2014) Skin permeation and antinociception of topical gabapentin formulations. *Int J Pharm Compd* 18:504-511.

Bundesministerium für Gesundheit (2013) Patientenrechtegesetz. *Bundesgesetzblatt Teil I*:277-282.

Buur T, Larsson R, Norlander B (1988) Pharmacokinetics of chloral hydrate poisoning treated with hemodialysis and hemoperfusion. *Acta Med Scand* 223:269-274.

Caksen H, Odabas D (2001) Perioral skin and mucosal lesions due to chloral hydrate. *Pediatr Dermatol* 18:454-455.

Caksen H, Odabas D, Uner A, Tuncer O, Ata B (2003) Respiratory arrest due to chloral hydrate in an infant. *J Emerg Med* 24:342-343.

Cal K (2009) Skin disposition of d-camphor and l-menthol alone and together. *Methods Find Exp Clin Pharmacol* 31:237-240.

Castello M, Milani M (2011) Efficacy of topical hydrating and emollient lotion containing 10% urea ISDIN(R) plus dexpanthenol (Ureadin Rx 10) in the treatment of skin xerosis and pruritus in hemodialyzed patients: an open prospective pilot trial. *G Ital Dermatol Venereol* 146:321-325.

Cevikbas F, Braz JM, Wang X, Solorzano C, Sulk M, Buhl T, Steinhoff M, Basbaum AI (2017) Synergistic antipruritic effects of gamma aminobutyric acid A and B agonists in a mouse model of atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol* 140:454-464 e452.

Chatagnon C, Chatagnon P (1960) [Chloralism and bromism. Their association. Biologico-psychiatric aspects]. *Ann Med Psychol (Paris)* 118(2):285-310.

Chebib M, Johnston GA (1999) The 'ABC' of GABA receptors: a brief review. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 26:937-940.

Chen HT, Kandasamy SB (1996) Effect of chloral hydrate on in vivo KCl-induced striatal dopamine release in the rat. *Neurochem Res* 21:695-700.

Chen L, Wang W, Tan T, Han H, Dong Z (2016) GABA(A) Receptors in the Central Nucleus of the Amygdala Are Involved in Pain- and Itch-Related Responses. *J Pain* 17:181-189.

Chen ML, Chen Q, Xu F, Zhang JX, Su XY, Tu XZ (2017) Safety and efficacy of chloral hydrate for conscious sedation of infants in the pediatric cardiovascular intensive care unit. *Medicine (Baltimore)* 96:e5842.

Cheung C, Smith CK, Hoog JO, Hotchkiss SA (1999) Expression and localization of human alcohol and aldehyde dehydrogenase enzymes in skin. *Biochem Biophys Res Commun* 261:100-107.

Clarke MJ (1988) Chloral hydrate: medicine and poison? *Pharm Hist (Lond)* 18:2-4.

Cohen AJ, Brauer M, Burnett R, Anderson HR, Frostad J, Estep K, Balakrishnan K, Brunekreef B, Dandona L, Dandona R, Feigin V, Freedman G, Hubbell B, Jobling A, Kan H, Knibbs L, Liu Y, Martin R, Morawska L, Pope CA, 3rd, Shin H, Straif K, Shaddick G, Thomas M, Van Dingenen R, Van Donkelaar A, Vos T, Murray CJL, Forouzanfar MH (2017) Estimates and 25-year trends of the global burden of disease attributable to ambient air pollution: an analysis of data from the Global Burden of Diseases Study 2015. *Lancet* 389:1907-1918.

Condouris GA, Bonnycastle DD (1961) A pharmacological investigation of the hypnotic action of a new derivative of chloral hydrate, chlorhexadol. *Am J Med Sci* 242:574-578.

Cory G (2011) Scratch-wound assay. *Methods Mol Biol* 769:25-30.

Dallefeld SH, Smith PB, Crenshaw EG, Daniel KR, Gilleskie ML, Smith DS, Balevic S, Greenberg RG, Chu V, Clark R, Kumar KR, Zimmerman KO (2020) Comparative safety profile of chloral hydrate versus other sedatives for procedural sedation in hospitalized infants. *J Neonatal Perinatal Med* 13:159-165.

Dao K, Ivanyuk A, Buclin T, Beck-Popovic M, Diezi M (2013) Pharmacokinetic interaction between methotrexate and chloral hydrate. *Pediatr Blood Cancer* 60:518-520.

Delinsky AD, Bruckner JV, Bartlett MG (2005) A review of analytical methods for the determination of trichloroethylene and its major metabolites chloral hydrate, trichloroacetic acid and dichloroacetic acid. *Biomed Chromatogr* 19:617-639.

Egeberg A, Bruun LE, Mallbris L, Gislason GH, Skov L, Wu JJ, Hansen PR (2016) Family history predicts major adverse cardiovascular events (MACE) in young adults with psoriasis. *J Am Acad Dermatol* 75:340-346.

EMA-CHMP (1987). "Clinical investigation of corticosteroids intended for use on the skin (Directive 75/318/EEC)." Retrieved 11. Januar 2021, from [https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/clinical-investigation-corticosteroids-intended-use-skin\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/clinical-investigation-corticosteroids-intended-use-skin_en.pdf).

European Medicines Agency (2018). "Draft guideline on quality and equivalence of topical products." Retrieved 09.12., 2020, from <https://www.ema.europa.eu/en/>

Documents/scientific-guideline/draft-guideline-quality-equivalence-topical-products\_en.pdf.

Felice F, Zambito Y, Belardinelli E, Fabiano A, Santoni T, Di Stefano R (2015) Effect of different chitosan derivatives on in vitro scratch wound assay: a comparative study. *Int J Biol Macromol* 76:236-241.

Fermont DC, Haggie SJ, Wyllie JH (1976) Proceedings: Histamine receptors in human skin. *Br J Surg* 63:160.

Fong CY, Tay CG, Ong LC, Lai NM (2017) Chloral hydrate as a sedating agent for neurodiagnostic procedures in children. *Cochrane Database Syst Rev* 11:CD011786.

Food and Drug Administration (1995). "FDA-Guidance for industry "Topical dermatologic corticosteroids: in vivo Bioequivalence." Retrieved 11. Januar 2021, from <https://www.gmp-compliance.org/files/guidemgr/old098fn.pdf>.

Friedman PJ, Cooper JR (1960) The role of alcohol dehydrogenase in the metabolism of chloral hydrate. *J Pharmacol Exp Ther* 129:373-376.

George MH, Moore T, Kilburn S, Olson GR, Deangelo AB (2000) Carcinogenicity of chloral hydrate administered in drinking water to the male F344/N rat and male B6C3F1 mouse. *Toxicol Pathol* 28:610-618.

Gerdes S, Mrowietz U, Boehncke WH (2016) [Comorbidity in psoriasis]. *Hautarzt* 67:438-444.

Gerretsen M, De Groot G, Van Heijst AN, Maes RA (1979) Chloral hydrate poisoning: its mechanism and therapy. *Vet Hum Toxicol* 21 Suppl:53-56.

Gilleron L, Coecke S, Sysmans M, Hansen E, Van Oproy S, Marzin D, Van Cauteren H, Vanparys P (1996) Evaluation of a modified HET-CAM assay as a screening test for eye irritancy. *Toxicol In Vitro* 10:431-446.

Gilleron L, Coecke S, Sysmans M, Hansen E, Van Oproy S, Marzin D, Van Cauteren H, Vanparys P (1997) Evaluation of the HET-CAM-TSA method as an alternative to the draize eye irritation test. *Toxicol In Vitro* 11:641-644.

Goldsmith JP (1994) Ventilatory management casebook. Chloral hydrate intoxication. *J Perinatol* 14:74-76.

Gopinath P, Wan E, Holdcroft A, Facer P, Davis JB, Smith GD, Bountra C, Anand P (2005) Increased capsaicin receptor TRPV1 in skin nerve fibres and related vanilloid receptors TRPV3 and TRPV4 in keratinocytes in human breast pain. *BMC Womens Health* 5:2.

Graham SR, Day RO, Lee R, Fulde GW (1988) Overdose with chloral hydrate: a pharmacological and therapeutic review. *Med J Aust* 149:686-688.

Gran F, Kerstan A, Serfling E, Goebeler M, Muhammad K (2020) Current Developments in the Immunology of Psoriasis. *Yale J Biol Med* 93:97-110.

Gray G (1880) Attempted Suicide by Strychnia Successfully Treated by Hydrate of Chloral. *Br Med J* 1:476-477.

- Grossmann M, Jamieson MJ, Kirch W (1999) Histamine response and local cooling in the human skin: involvement of H1- and H2-receptors. *Br J Clin Pharmacol* 48:216-222.
- Haselkorn T, Whittemore AS, Udaltsova N, Friedman GD (2006) Short-term chloral hydrate administration and cancer in humans. *Drug Saf* 29:67-77.
- Haught JM, Jukic DM, English JC, 3rd (2008) Hydroxyethyl starch-induced pruritus relieved by a combination of menthol and camphor. *J Am Acad Dermatol* 59:151-153.
- Hawro T, Fluhr JW, Mengeaud V, Redoules D, Church MK, Maurer M, Metz M (2014) Polidocanol inhibits cowhage - but not histamine-induced itch in humans. *Exp Dermatol* 23:922-923.
- Heimall J, Spergel JM (2017) New pathways for itching in patients with atopic dermatitis? *J Allergy Clin Immunol* 140:393-394.
- Hercogova J (2005) Topical anti-itch therapy. *Dermatol Ther* 18:341-343.
- Herkenne C, Alberti I, Naik A, Kalia YN, Mathy FX, Preat V, Guy RH (2008) In vivo methods for the assessment of topical drug bioavailability. *Pharm Res* 25:87-103.
- Herkenne C, Naik A, Kalia YN, Hadgraft J, Guy RH (2007) Dermatopharmacokinetic prediction of topical drug bioavailability in vivo. *J Invest Dermatol* 127:887-894.
- Hijazi OM, Haidar NA, Al-Eissa YA (2005) Chloral hydrate. An effective agent for sedation in children with age and weight dependent response. *Saudi Med J* 26:746-749.
- Hobara T, Kobayashi H, Kawamoto T, Iwamoto S, Sakai T (1987) Extrahepatic metabolism of chloral hydrate, trichloroethanol and trichloroacetic acid in dogs. *Pharmacol Toxicol* 61:58-62.
- Humans IWGOTEOCRT (2004) Some drinking-water disinfectants and contaminants, including arsenic. Monographs on chloramine, chloral and chloral hydrate, dichloroacetic acid, trichloroacetic acid and 3-chloro-4-(dichloromethyl)-5-hydroxy-2(5H)-furanone. *IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum* 84:269-477.
- ICCVAM (2006). "Recommended HET-CAM test method protocol. Appendix G.", from [https://ntp.niehs.nih.gov/iccvam/docs/ocutox\\_docs/oteval/appg-508.pdf](https://ntp.niehs.nih.gov/iccvam/docs/ocutox_docs/oteval/appg-508.pdf).
- Ikbal M, Tastekin A, Dogan H, Pirim I, Ors R (2004) The assessment of genotoxic effects in lymphocyte cultures of infants treated with chloral hydrate. *Mutat Res* 564:159-164.
- Jensen IL, Frederiksen B, Topp MW, Bjaeldager PA (1984) [Chloral hydrate poisoning]. *Ugeskr Laeger* 146:964-967.
- Jiaravuthisan MM, Sasseville D, Vender RB, Murphy F, Muhn CY (2007) Psoriasis of the nail: anatomy, pathology, clinical presentation, and a review of the literature on therapy. *J Am Acad Dermatol* 57:1-27.
- Kaplan HL, Forney RB, Hughes FW, Jain NC (1967) Chloral hydrate and alcohol metabolism in human subjects. *J Forensic Sci* 12:295-304.

- Kaude JV (1997) Chloral hydrate: a historical note. *AJR Am J Roentgenol* 169:1195.
- Kaul I, Amin A, Rosenberg M, Rosenberg L, Meyer WJ, 3rd (2018) Use of gabapentin and pregabalin for pruritus and neuropathic pain associated with major burn injury: A retrospective chart review. *Burns* 44:414-422.
- Kawamoto T, Hobara T, Aoki T, Kobayashi H, Iwamoto S, Sakai T, Takano T, Miyazaki Y, Imamura A, Ogino K (1988) Metabolism of chloral hydrate in the anoxic perfused liver. *Toxicol Lett* 40:225-231.
- Keidan I, Gozal D, Minuskin T, Weinberg M, Barkaly H, Augarten A (2004) The effect of fasting practice on sedation with chloral hydrate. *Pediatr Emerg Care* 20:805-807.
- Kempkes C, Buddenkotte J, Cevikbas F, Buhl T, Steinhoff M (2014). Role of PAR-2 in Neuroimmune Communication and Itch. *Itch: Mechanisms and Treatment*. E. Carstens and T. Akiyama. Boca Raton (FL).
- Kennedy-Shaffer L (2019) Before  $p < 0.05$  to Beyond  $p < 0.05$ : Using History to Contextualize p-Values and Significance Testing. *Am Stat* 73:82-90.
- Kirimi E, Caksen H, Cesur Y, Odabas D, Ozkaya E, Ceylan N (2002) Chloral hydrate intoxication in a newborn infant. *J Emerg Med* 22:104-105.
- Kirn L (1873) On Chronic Poisoning with Chloral Hydrate. *Edinb Med J* 19:76-79.
- Kittaka H, Tominaga M (2017) The molecular and cellular mechanisms of itch and the involvement of TRP channels in the peripheral sensory nervous system and skin. *Allergol Int* 66:22-30.
- Komiya E, Tominaga M, Kamata Y, Suga Y, Takamori K (2020) Molecular and Cellular Mechanisms of Itch in Psoriasis. *Int J Mol Sci* 21:
- Kremer AE, Mettang T, Weisshaar E (2020) Non-dermatological Challenges of Chronic Itch. *Acta Derm Venereol* 100:adv00025.
- Lansky LL (1974) An unusual case of childhood chloral hydrate poisoning. *Am J Dis Child* 127:275-276.
- Laptook AR, Rosenfeld CR (1984) Chloral hydrate toxicity in a preterm infant. *Pediatr Pharmacol (New York)* 4:161-165.
- Lebwohl MG, Bachelez H, Barker J, Girolomoni G, Kavanaugh A, Langley RG, Paul CF, Puig L, Reich K, Van De Kerkhof PC (2014) Patient perspectives in the management of psoriasis: results from the population-based Multinational Assessment of Psoriasis and Psoriatic Arthritis Survey. *J Am Acad Dermatol* 70:871-881 e871-830.
- Lee YJ, Kim JE, Kwak MH, Go J, Kim DS, Son HJ, Hwang DY (2014) Quantitative evaluation of the therapeutic effect of fermented soybean products containing a high concentration of GABA on phthalic anhydride-induced atopic dermatitis in IL-4/Luc/CNS-1 Tg mice. *Int J Mol Med* 33:1185-1194.
- Li L, Zhou J, Yu D, Hao X, Xie Y, Zhu T (2020) Intranasal dexmedetomidine versus oral chloral hydrate for diagnostic procedures sedation in infants and toddlers: A systematic review and meta-analysis. *Medicine (Baltimore)* 99:e19001.

- Lichenstein R, King JC, Bice D (1993) Evaluation of chloral hydrate for pediatric sedation. *Clin Pediatr (Phila)* 32:632-633.
- Lin YC, Ma JY (2006) Severe esophageal burn following chloral hydrate overdose in an infant. *J Formos Med Assoc* 105:235-237.
- Litman RS, Sooin K, Salam A (2010) Chloral hydrate sedation in term and preterm infants: an analysis of efficacy and complications. *Anesth Analg* 110:739-746.
- Ludriksone L, Garcia Bartels N, Kanti V, Blume-Peytavi U, Kottner J (2014) Skin barrier function in infancy: a systematic review. *Arch Dermatol Res* 306:591-599.
- Ludwigs U, Divino Filho JC, Magnusson A, Berg A (1996) Suicidal chloral hydrate poisoning. *J Toxicol Clin Toxicol* 34:97-99.
- Luepke N (1985) Hen's egg chorioallantoic membrane test for irritation potential. *Food Chem Toxicol* 23:287-291.
- Mackay FJ, Cooper JR (1962) A study on the hypnotic activity of chloral hydrate. *J Pharmacol Exp Ther* 135:271-274.
- Manenti L, Vaglio A (2007) Gabapentin use in chronic uraemic itch is in line with emerging pathogenetic hypothesis. *Nephrol Dial Transplant* 22:3669-3670.
- Mataftsi A, Malamaki P, Prousalis E, Riga P, Lathyris D, Chalvatzis NT, Haidich AB (2017) Safety and efficacy of chloral hydrate for procedural sedation in paediatric ophthalmology: a systematic review and meta-analysis. *Br J Ophthalmol* 101:1423-1430.
- Matsuda KM, Sharma D, Schonfeld AR, Kwatra SG (2016) Gabapentin and pregabalin for the treatment of chronic pruritus. *J Am Acad Dermatol* 75:619-625 e616.
- McBay AJ, Boling VR, Jr., Reynolds PC (1980) Spectrophotometric determination of trichloroethanol in chloral hydrate poisoning. *J Anal Toxicol* 4:99-101.
- McKenzie B, Kay G, Matthews KH, Knott RM, Cairns D (2015) The hen's egg chorioallantoic membrane (HET-CAM) test to predict the ophthalmic irritation potential of a cysteamine-containing gel: Quantification using Photoshop(R) and ImageJ. *Int J Pharm* 490:1-8.
- McNamee PM, Api AM, Basketter DA, Frank Gerberick G, Gilpin DA, Hall BM, Jowsey I, Robinson MK (2008) A review of critical factors in the conduct and interpretation of the human repeat insult patch test. *Regul Toxicol Pharmacol* 52:24-34.
- Messer S (2014) Revival für Chloralhydrat. *Pharmazeutische Zeitschrift online* 05: <https://www.pharmazeutische-zeitung.de/ausgabe-052014/revival-fuer-chloralhydrat/>
- Miranda M, Cardoso C, Vitorino C (2020) Quality and equivalence of topical products: A critical appraisal. *Eur J Pharm Sci* 148:105082.
- Mishchikhin VA, Felitsyn FP (1988) [Gas chromatographic detection of chloroform, carbon tetrachloride, dichloroethane, trichloroethane and chloral hydrate in biological material]. *Sud Med Ekspert* 31:30-33.
- Moore FJ (1953) Chloral hydrate: a resume. *W V Med J* 49:292-294.

- Nagel S, Schmechta H (1970) [Fatal chloral hydrate poisoning]. *Dtsch Gesundheitsw* 25:1039-1042.
- Najafi P, Carre JL, Ben Salem D, Brenaut E, Misery L, Dufor O (2020) Central mechanisms of itch: A systematic literature review and meta-analysis. *J Neuroradiol* 47:450-457.
- Nakagawa H, Hiura A (2013) Four Possible Itching Pathways Related to the TRPV1 Channel, Histamine, PAR-2 and Serotonin. *Malays J Med Sci* 20:5-12.
- Nakashimo Y, Takumida M, Fukuiri T, Anniko M, Hirakawa K (2010) Expression of transient receptor potential channel vanilloid (TRPV) 1, 4, melastin (TRPM) 5 and 8, and ankyrin (TRPA1) in the normal and methimazole-treated mouse olfactory epithelium. *Acta Otolaryngol* 130:1278-1286.
- Neues Rezepturformularium (2015). "DAC/NRF-Rezepturhinweise, Chloralhydrat." from [http://dacnrf.pharmazeutische-zeitung.de/index.php?id=rh-ausgabe&nrf\\_id=213#anker236519](http://dacnrf.pharmazeutische-zeitung.de/index.php?id=rh-ausgabe&nrf_id=213#anker236519).
- Neues Rezepturformularium: Standardisierte Rezepturen. Govi-Verlag, Eschborn, 2015, pp.
- Nigam R, El-Nour H, Amatya B, Nordlind K (2010) GABA and GABA(A) receptor expression on immune cells in psoriasis: a pathophysiological role. *Arch Dermatol Res* 302:507-515.
- Nordt SP, Rangan C, Hardmaslani M, Clark RF, Wendler C, Valente M (2014) Pediatric chloral hydrate poisonings and death following outpatient procedural sedation. *J Med Toxicol* 10:219-222.
- Oehme P (2019) Oscar Liebreich und sein Chloralhydrat. *Deutsche ApothekerZeitung* 4:56.
- Ogino K, Hobara T, Kobayashi H, Iwamoto S (1990) Gastric mucosal injury induced by chloral hydrate. *Toxicol Lett* 52:129-133.
- Owczarczyk-Saczonek A, Nowicki R (2014) [Psoriasis and comorbidity--literature review]. *Wiad Lek* 67:512-519.
- Owen BE, Taberner PV (1980) Studies on the hypnotic effects of chloral hydrate and ethanol and their metabolism in vivo and in vitro. *Biochem Pharmacol* 29:3011-3016.
- Ozsoylu S (2010) Did the infant have respiratory depression after sedation with chloral hydrate? *Turk J Pediatr* 52:560; author reply 560-561.
- Paret G, Kassem R, Vardi A, Ben Zeev B, Barzilay Z (1996) [Chloral hydrate--is it safe?]. *Harefuah* 130:14-15, 71.
- Pasch MC (2016) Nail Psoriasis: A Review of Treatment Options. *Drugs* 76:675-705.
- Payne LC (1954) The detoxification of chloral hydrate. *Am J Vet Res* 15:468-471.
- Peralta C, Hamid P, Batool H, Al Achkar Z, Maximus P (2019) Psoriasis and Metabolic Syndrome: Comorbidities and Environmental and Therapeutic Implications. *Cureus* 11:e6369.

- Pereira MP, Stander S (2016) Itch Management: Treatments under Development. *Curr Probl Dermatol* 50:71-76.
- Perez-Chada LM, Balak D, Cohen JM, Ogdie A, Merola JF, Gottlieb AB (2020) Measurement properties of instruments assessing psoriatic arthritis symptoms for psoriasis clinical trials: a systematic literature review. *Expert Rev Clin Immunol* 16:267-283.
- Pershad J, Palmisano P, Nichols M (1999) Chloral hydrate: the good and the bad. *Pediatr Emerg Care* 15:432-435.
- Petersen BJ, Cornell NW, Veech RL (1980) Alcohol dehydrogenase in cultured human skin fibroblasts. Human fibroblast alcohol dehydrogenase. *Adv Exp Med Biol* 132:533-541.
- Poon R, Nadeau B, Chu I (2000) Biochemical effects of chloral hydrate on male rats following 7-day drinking water exposure. *J Appl Toxicol* 20:455-461.
- Poon R, Nakai J, Yagminas A, Benoit F, Moir D, Chu I, Valli VE (2002) Subchronic toxicity of chloral hydrate on rats: a drinking water study. *J Appl Toxicol* 22:227-236.
- Pranjic N, Sinanovic O, Karamehic J, Jakubovic R (2002) Assessment of chronic neuropsychological effects of mercury vapour poisoning in chloral-alkali plant workers. *Bosn J Basic Med Sci* 2:29-34.
- Rayner H, Baharani J, Smith S, Suresh V, Dasgupta I (2012) Uraemic pruritus: relief of itching by gabapentin and pregabalin. *Nephron Clin Pract* 122:75-79.
- Rehm A (1886) Chronischer Chloralmissbrauch. *Archiv für Psychiatrie und Nervenkrankheiten* 17:36-62.
- Reimche LD, Sankaran K, Hindmarsh KW, Kasian GF, Gorecki DK, Tan L (1989) Chloral hydrate sedation in neonates and infants--clinical and pharmacologic considerations. *Dev Pharmacol Ther* 12:57-64.
- Riabinin VE, Lifshits RI (1991) [Use of chloral hydrate for assessing the detoxifying function of the liver in experimental pathology]. *Vopr Med Khim* 37:52-53.
- Rinaldi G (2019) The Itch-Scratch Cycle: A Review of the Mechanisms. *Dermatol Pract Concept* 9:90-97.
- Roblin D, Wickramasinghe R, Yosipovitch G (2014) Pruritus severity in patients with psoriasis is not correlated with psoriasis disease severity. *J Am Acad Dermatol* 70:390-391.
- Rohde GF (1871) Eigene Erfahrungen über subcutane Injection excitierender Mittel. *Berliner Klinische Wochenschrift* 116-120.
- Sanders VM, Kauffmann BM, White KL, Jr., Douglas KA, Barnes DW, Sain LE, Bradshaw TJ, Borzelleca JF, Munson AE (1982) Toxicology of chloral hydrate in the mouse. *Environ Health Perspect* 44:137-146.
- Sarto-Jackson I, Sieghart W (2008) Assembly of GABA(A) receptors (Review). *Mol Membr Biol* 25:302-310.



- Seng JE, Agrawal N, Horsley ET, Leakey TI, Scherer EM, Xia S, Allaben WT, Leakey JE (2003) Toxicokinetics of chloral hydrate in ad libitum-fed, dietary-controlled, and calorically restricted male B6C3F1 mice following short-term exposure. *Toxicol Appl Pharmacol* 193:281-292.
- Shim WS, Tak MH, Lee MH, Kim M, Kim M, Koo JY, Lee CH, Kim M, Oh U (2007) TRPV1 mediates histamine-induced itching via the activation of phospholipase A2 and 12-lipoxygenase. *J Neurosci* 27:2331-2337.
- Shroads AL, Coats BS, Langaee T, Shuster JJ, Stacpoole PW (2015) Chloral hydrate, through biotransformation to dichloroacetate, inhibits maleylacetoacetate isomerase and tyrosine catabolism in humans. *Drug Metabol Personal Ther* 30:49-55.
- Snast I, Reiter O, Atzmony L, Leshem YA, Hodak E, Mimouni D, Pavlovsky L (2018) Psychological stress and psoriasis: a systematic review and meta-analysis. *Br J Dermatol* 178:1044-1055.
- Solak Y, Biyik Z, Atalay H, Gaipov A, Guney F, Turk S, Covic A, Goldsmith D, Kanbay M (2012) Pregabalin versus gabapentin in the treatment of neuropathic pruritus in maintenance haemodialysis patients: a prospective, crossover study. *Nephrology (Carlton)* 17:710-717.
- Spielmann H, Kalweit S, Liebsch M, Wirnsberger T, Gerner I, Bertram-Neis E, Krauser K, Kreiling R, Miltenburger HG, Pape W, Steiling W (1993) Validation study of alternatives to the Draize eye irritation test in Germany: Cytotoxicity testing and HET-CAM test with 136 industrial chemicals. *Toxicol In Vitro* 7:505-510.
- Spielmann H, Reinhardt C (1996) [OECD ist accepting test guidelines for validated in vitro toxicity tests in 1996]. *ALTEX* 13:167-174.
- Stalker NE, Gambertoglio JG, Fukumitsu CJ, Naughton JL, Benet LZ (1978) Acute massive chloral hydrate intoxication treated with hemodialysis: a clinical pharmacokinetic analysis. *J Clin Pharmacol* 18:136-142.
- Staubach P (2014) [Sense and nonsense of extemporaneous formulations]. *Hautarzt* 65:180-185.
- Staubach P, Melhorn S, Hunerbein A, Peveling-Oberhag A (2016) [New developments in extemporaneous formulations]. *Hautarzt* 67:833-844.
- Staubach P, Salzmann S, Peveling-Oberhag A, Weyer V, Zimmer S, Gradl G, Lang BM (2018) Dermatologische Rezepturen in Deutschland - Relevanz für die Versorgung. *J Dtsch Dermatol Ges* 16:567-576.
- Steinke S, Zeidler C, Riepe C, Bruland P, Soto-Rey I, Storck M, Augustin M, Bobko S, Garcovich S, Legat FJ, Lvov A, Misery L, Osada N, Reich A, Savk E, Serra-Baldrich E, Streit M, Szepietowski JC, Weger W, Dugas M, Stander S (2018) Humanistic burden of chronic pruritus in patients with inflammatory dermatoses: Results of the European Academy of Dermatology and Venereology Network on Assessment of Severity and Burden of Pruritus (PruNet) cross-sectional trial. *J Am Acad Dermatol* 79:457-463 e455.
- Surber C, Knie U (2018) Metamorphosis of Vehicles: Mechanisms and Opportunities. *Curr Probl Dermatol* 54:152-165.
- Szepietowski JC, Reich A (2016) Pruritus in psoriasis: An update. *Eur J Pain* 20:41-46.

- Szepietowski JC, Reich A, Wisnicka B (2002) Itching in patients suffering from psoriasis. *Acta Dermatovenerol Croat* 10:221-226.
- Tavaszi J, Budai P (2007) The use of HET-CAM test in detecting the ocular irritation. *Commun Agric Appl Biol Sci* 72:137-141.
- Thompson TKM, M.G.; Nies, A.S. (1983) Psychotropic Drug Use in the Elderly. *NEJM* 134-138.
- Thurmond RL, Kazerouni K, Chaplan SR, Greenspan AJ (2015) Antihistamines and itch. *Handb Exp Pharmacol* 226:257-290.
- Tizard H (1878) Attempted Suicide by Chloral-Hydrate: Recovery. *Br Med J* 2:437-438.
- Trabaris M, Laskin JD, Weisel CP (2012) Effects of temperature, surfactants and skin location on the dermal penetration of haloacetonitriles and chloral hydrate. *J Expo Sci Environ Epidemiol* 22:393-397.
- Trabaris M, Laskin JD, Weisel CP (2012) Percutaneous absorption of haloacetonitriles and chloral hydrate and simulated human exposures. *J Appl Toxicol* 32:387-394.
- Tsukumo Y, Matsumoto Y, Miura H, Yano H, Manabe H (2011) Gabapentin and pregabalin inhibit the itch-associated response induced by the repeated application of oxazolone in mice. *J Pharmacol Sci* 115:27-35.
- U.S. Environmental Protection Agency (2000). Toxicological review of chloral hydrate (CAS No. 302-17-0).
- Van De Sandt J, Roguet R, Cohen C, Esdaile D, Ponc M, Corsini E, Barker C, Fusenig N, Liebsch M, Benford D, De Fraissinette Ade B, Fartasch M (1999) The use of human keratinocytes and human skin models for predicting skin irritation. *Altern Lab Anim* 27:723-743.
- Van Heijst AN, Zimmerman AN, Pikaar SA (1977) [Chloralhydrate--the forgotten poison]. *Ned Tijdschr Geneesk* 121:1537-1539.
- Van Laarhoven AIM, Marker JB, Elberling J, Yosipovitch G, Arendt-Nielsen L, Andersen HH (2019) Itch sensitization? A systematic review of studies using quantitative sensory testing in patients with chronic itch. *Pain* 160:2661-2678.
- Vaziri ND, Kumar KP, Mirahmadi K, Rosen SM (1977) Hemodialysis in treatment of acute chloral hydrate poisoning. *South Med J* 70:377-378.
- Von Tungeln LS, Yi P, Bucci TJ, Samokyszyn VM, Chou MW, Kadlubar FF, Fu PP (2002) Tumorigenicity of chloral hydrate, trichloroacetic acid, trichloroethanol, malondialdehyde, 4-hydroxy-2-nonenal, crotonaldehyde, and acrolein in the B6C3F(1) neonatal mouse. *Cancer Lett* 185:13-19.
- Wang TS, Tsai TF (2017) Managing Scalp Psoriasis: An Evidence-Based Review. *Am J Clin Dermatol* 18:17-43.
- Wasserstein RL, Schirm AL, Lazar NA (2019) Moving to a World Beyond „p < 0.05“. *Am Statist* 73:1-19.

- Watson AH (2003) GABA- and glycine-like immunoreactivity in axons and dendrites contacting the central terminals of rapidly adapting glabrous skin afferents in rat spinal cord. *J Comp Neurol* 464:497-510.
- Weisshaar E (2016) Epidemiology of Itch. *Curr Probl Dermatol* 50:5-10.
- Wiseman HM, Hampel G (1978) Cardiac arrhythmias due to chloral hydrate poisoning. *Br Med J* 2:960.
- Wohlrab J (2014) [Basics of topical therapy]. *Hautarzt* 65:169-174.
- Wohlrab J (2016) Topical preparations and their use in dermatology. *J Dtsch Dermatol Ges* 14:1061-1070.
- Wohlrab J, Gilbrich F, Wolff L, Fischer M, Philipp S (2017) Preclinical safety evaluation of chloral hydrate after topical application using the example of psoriatic itch. *Hautarzt* 68:217-223.
- Wohlrab J, Klauck D, Savtcheva E (2014) Regulatory requirements for topical preparations. *Hautarzt* 65:175-179.
- Wohlrab J, Korting R, Helmbold P, Marsch WC (2001) The NO release test as a functional reference standard for laser Doppler fluxmetry in cutaneous microangiology. *Skin Res Technol* 7:172-175.
- Wohlrab J, Staubach P, Augustin M, Eisert L, Hunerbein A, Nast A, Reimann H, Stromer K, Mahler V (2018) S2k guidelines for the use of topical preparations on the skin. *J Dtsch Dermatol Ges* 16:376-392.
- World Health Organization (1995) Chloral and chloral hydrate. *IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum* 63:245-269.
- World Health Organization (2000). Concise international chemical assessment document 25, Chloral hydrate.
- Yosipovitch G, Goon A, Wee J, Chan YH, Goh CL (2000) The prevalence and clinical characteristics of pruritus among patients with extensive psoriasis. *Br J Dermatol* 143:969-973.
- Yosipovitch G, Misery L, Proksch E, Metz M, Stander S, Schmelz M (2019) Skin Barrier Damage and Itch: Review of Mechanisms, Topical Management and Future Directions. *Acta Derm Venereol* 99:1201-1209.
- Yosipovitch G, Rosen JD, Hashimoto T (2018) Itch: From mechanism to (novel) therapeutic approaches. *J Allergy Clin Immunol* 142:1375-1390.
- Zimmermann T, Wehling M, Schulz HU (1998) [The relative bioavailability and pharmacokinetics of chloral hydrate and its metabolites]. *Arzneimittelforschung* 48:5-12.

**Thesen**

1. Chloralhydrat ist ein lange bekannter Arzneistoff, dessen Wirkung im Wesentlichen auf dem Einfluss des Metaboliten Trichlorethanol (TCE) auf  $\gamma$ -Aminobuttersäure (GABA)-induzierte Chloridströme an neuronalen Zellen und damit einer Verstärkung der neuroinhibitorischen Effekte von GABA beruht.
2. Chloralhydrat wird in einer Konzentration von 3% in topischen Rezepturarzneimitteln zur Behandlung des psoriatischen Pruritus verwendet. Um die regulatorischen Voraussetzungen für eine evidenzbasierte Plausibilitätsprüfung für Apotheker und Arzt zu ermöglichen, sind Daten zur kutanen Verträglichkeit und systemischen Sicherheit notwendig.
3. Mittels des „hen´s egg test der Chorion-Allantois-Membran (HET-CAM)“ Testverfahrens wurde die Haut- und Schleimhautverträglichkeit untersucht. Ergänzend dazu wurde mittels Laser-Doppler-Fluxmetrie die Methodik erweitert, um die Ergebnisse zu objektivieren. Die erhobenen Daten zeigen übereinstimmend, dass im Konzentrationsbereich  $\leq 1,0$  mmol/l Chloralhydrat als unbedenklich angesehen werden kann.
4. Mittels Scratch-Assay wurden ergänzend zytotoxikologische Daten erhoben. Auch diese zeigen einen Schwelleneffekt und im Konzentrationsbereich  $\leq 1,0$  mmol/l keine Hinweise für toxische Effekte.
5. Berechnungen zur Pharmakokinetik von Chloralhydrat, insbesondere bezüglich der systemischen Bioverfügbarkeit mit Bezug auf die topische Anwendung einer 3%-igen Chloralhydrat-haltigen Formulierung lassen ebenfalls keine grundsätzlichen Bedenken erkennen. Dennoch können Restrisiken aufgrund fehlender klinischer Daten nicht vollständig ausgeschlossen werden.
6. Aus regulatorischer Sicht ergeben sich somit keine Bedenken bei der topischen Applikation von Chloralhydrat als Antipruriginosum in der Psoriasisstherapie.
7. Zur Bewertung der antipruriginösen Wirksamkeit von Chloralhydrat sind zwingend kontrollierte klinische Studien notwendig.

## **Selbstständigkeitserklärung**

Ich, Friedrich Karsten Gilbrich, erkläre ehrenwörtlich, dass ich die der Medizinischen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel „Präklinische Validierung der Sicherheit von topisch appliziertem Chloralhydrat“ unter der Leitung von apl. Prof. Dr. med. habil. Johannes Wohlrab selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertationsschrift aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet. Die Regeln zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis wurden beachtet (Amtsblatt der MLU Nr. 5, 02.07.09).

Ich versichere, dass ich für die inhaltliche Erstellung der vorliegenden Arbeit nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- und Beratungsdiensten (Promotionsberater oder andere Personen) in Anspruch genommen habe. Insbesondere liegen die Bildrechte der gezeigten Abbildungen bei mir. Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

Halle (Saale), den 28.02.21



### **Erklärung über frühere Promotionsversuche**

Ich habe bisher an keiner in- oder ausländischen Universität ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht, noch die vorliegende oder eine andere Arbeit als Dissertationsschrift vorgelegt.

Halle 28.02.2021

**Danksagung**

An dieser Stelle möchte ich mich ganz besonders bei meinem akademischen Lehrer, Herrn Professor Dr. med. Johannes Wohlrab bedanken, der mir durch die Überlassung des Themas diese Dissertation überhaupt ermöglicht hat. Ich bedanke mich für seine Hilfestellung, seinen Rat, seinen Zuspruch und seine Geduld. Ich bin froh über die Bekanntschaft und langjährige Verbundenheit mit Herrn Prof. Wohlrab. Darüber hinaus möchte ich erwähnen, dass er für mich in meinem Arztberuf ein Vorbild darstellt, an dem ich mich stets orientieren möchte.

Weiterhin möchte ich mich bei Frau Claudia Bruhne und Frau Sylke Fasshauer für ihre exzellente Arbeit an den Zellversuchen im Labor bedanken.

Mein Dank gilt auch dem An-Institut für Dermatopharmazie IADP e.V. für die Bereitstellung der Räumlichkeiten sowie für die Benutzung der Geräte, wodurch die experimentelle Arbeit ermöglicht wurde.

Herzlichen Dank.