

Aus der Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie  
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Etablierung der Mikrodialyse am Schweineohrhautmodell zur  
Untersuchung des Einflusses des Haarfollikels auf die  
Penetration von topisch applizierten Substanzen

Establishment of dermal microdialysis on porcine ear skin to  
investigate the influence of the hair follicle on the penetration of  
topically applied substances

zur Erlangung des akademischen Grades  
Doctor rerum medicinalium (Dr. rer. medic.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Anna Lena Klein

aus Gießen

Datum der Promotion: 03.03.2023

# Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis.....	4
Abkürzungsverzeichnis.....	5
Abstrakt.....	6
Abstract.....	7
1 Einleitung.....	8
1.1 Aufbau und Funktion der Haut.....	8
1.2 Stand der Wissenschaft und Technik.....	10
1.3 Zielsetzung.....	12
2 Methodik.....	14
2.1 Penetrationsstudien mit dermaler Mikrodialyse.....	15
2.1.1 Dermale Mikrodialyse am Schweineohrhautmodell.....	16
2.1.2 Koffeinextraktion aus den einzelnen Hautschichten.....	17
2.2 Selektiver Follikelverschluss.....	17
2.2.1 Validierung des selektiven Follikelverschlusses.....	18
2.3 Statistik.....	20
3 Ergebnisse.....	21
3.1 Dermale Mikrodialyse am Ex-vivo-Schweineohr.....	21
3.1.1 Vergleich der Penetrationskinetik von Koffein nach Applikation von gesättigtem Koffein-Gel oder Koffein-Nanokristall-Gel.....	21
3.1.2 Vergleich der Penetrationskinetik von Koffein nach Applikation eines Gels mit 700-nm- oder 200-nm-Koffein-Nanokristallen.....	22
3.2 Validierung des Follikelverschlusses am Schweineohr.....	24
3.2.1 Sicherer Follikelverschluss.....	25
3.2.2 Chemische Penetrationsverstärkung.....	26
3.2.3 Mechanische Penetrationsverstärkung.....	26
3.3 Dermale Mikrodialyse am Schweineohr mit selektivem Follikelverschluss.....	26
3.4 Alternatives Kontrollareal.....	27
4 Diskussion.....	29

5.	Zusammenfassung und Ausblick .....	34
6	Literaturverzeichnis .....	35
7	Eidesstattliche Versicherung und ausführliche Anteilserklärung .....	39
8	Druckexemplare der ausgewählten Publikationen .....	42
	<b>Klein, AL</b> , Lubda, M, Specht, D, Pyo, SM, Busch, L., Lademann, J, Meinke. MC, Beckers, I, von Hagen, J, Keck, CM, Patzelt, A (2021). <i>Microdialysis on Ex Vivo Porcine Ear Skin Can Validly Study Dermal Penetration including the Fraction of Transfollicular Penetration - Demonstrated on Caffeine Nanocrystals</i> . <i>Nanomaterials</i> , 11(9), 2387.....	42
	<b>Klein, AL</b> , Lubda, M, Taghavi, PA, Lademann, J, Beckers, I, von Hagen, J, Kolmar, H, Patzelt, A (2020). Solvent-containing closure material can be used to prevent follicular penetration of caffeine and fluorescein sodium salt on porcine ear skin. <i>Skin Pharmacology and Physiology</i> , 1-9.....	61
	<b>Klein, AL</b> , Lubda, M, Skov, PS, Vogt, A, Keck, CM, Lademann, J, Beckers, I, von Hagen, J, Patzelt, A (2020). <i>Investigation of transfollicular caffeine penetration using microdialysis on ex vivo porcine ear skin</i> . <i>European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics</i> , 157, 1-8....	73
9	Lebenslauf .....	84
10	Komplette Publikationsliste .....	85
11	Danksagung .....	87

## Abbildungsverzeichnis

**Abbildung 1:** Schematische Darstellung der Haut und des Haarfollikels. (Eigene Abbildung)

**Abbildung 2:** Übersicht Thesen mit Zuordnung zu den jeweiligen Publikationen. (Eigene Abbildung)

**Abbildung 3:** Übersicht der mittels dermalen Mikrodialyse durchgeführten Penetrationsstudien. (Eigene Abbildung)

**Abbildung 4:** Schematische Darstellung der dermalen Mikrodialyse. (Eigene Abbildung)

**Abbildung 5:** Schematische Darstellung der Separierung. (Eigene Abbildung)

**Abbildung 6:** Übersicht der durchgeführten Untersuchungen zur Prüfung der Hypothesen zum Follikelverschluss (Eigene Abbildung)

**Abbildung 7:** In allen Diagrammen werden die Gel- und die Koffein-Nanokristall-Gel (NC) verglichen. Grafik (a) zeigt den zeitabhängigen Median  $\pm$  ein Quartil der Koffeinkonzentration, die durch Mikrodialyse ermittelt wurde. Diagramm (b) bildet den Median  $\pm$  ein Quartil der Fläche unter der Kurve der Koffeinkonzentrationsdaten ab. Diagramm (c) zeigt die in den Arealen Gel und NC aufgetragene Menge an Koffein in Korrelation zur jeweils kumulativ gesammelte Koffeinemenge auf einer logarithmischen Skala (Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung). Grafik (d) zeigt die Gesamtmenge, die mittels Homogenisierung und Mikrodialyse aus der Dermis extrahiert wurde (Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung). Unterschiede zwischen den beiden Bereichen von  $p < 0,05$  wurden als signifikant angesehen (\*).  $n=5$  (aufgetragenes Koffein:  $n=3$ ) (Eigene Abbildung in Anlehnung an [1])

**Abbildung 8:** In allen Diagrammen werden zwei Koffein-Nanokristall-Gele miteinander verglichen. Grafik (a) zeigt den zeitabhängigen Median  $\pm$  ein Quartil der Koffeinkonzentration, die mittels Mikrodialyse ermittelt wurde. Diagramm (b) bildet den Median  $\pm$  ein Quartil der Fläche unter der Kurve der Koffeinkonzentrationsdaten ab. Diagramm (c) zeigt die aufgetragene Menge an Koffein in Korrelation zur kumulativen Koffeinemenge der beiden Areale (Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung). Grafik (d) zeigt die Gesamtmenge, die mittels Homogenisierung und Mikrodialyse aus der Dermis extrahiert wurde (Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung). Unterschiede zwischen den beiden Bereichen von  $p < 0,05$  wurden als signifikant angesehen (\*).  $n=5$  (aufgetragenes Koffein:  $n=3$ ) (Eigene Abbildung in Anlehnung an [1])

**Abbildung 9:** Exemplarische LSM Aufnahmen der untersuchten Haarfollikel. Nur Aufnahme a) zeigt einen sicheren Follikelverschluss durch das Auftragen von Nagellack mit Lösungsmitteln in Kombination mit dem vorsichtigen Verstreichen des Fluoreszein-HEC-Gels. Bei den Aufnahmen b) bis f) ist ein Fluoreszenzsignal innerhalb des Haarfollikels zu sehen und somit kein sicherer Haarfollikelverschluss gewährleistet. (Eigene Abbildung in Anlehnung an [2])

**Abbildung10:**In beiden Abbildungen werden Areale mit Verschlussmaterial auf der Haarfollikelöffnung, neben der Haarfollikelöffnung und ohne Verschlussmaterial verglichen. (a) Diagramm des zeitlichen Verlaufs der Koffeinkonzentration (Median  $\pm$  ein Quartil). Graphische Darstellung (b) des Mittelwerts und der Standardabweichung des Koffeins, das aus den verschiedenen Hautschichten des homogenisierten Gewebes nach 22 Stunden extrahiert wurde. Unterschiede zwischen zwei Bereichen von  $p < 0,05$  wurden als signifikant angesehen (\*); Unterschiede von  $p < 0,01$  galten als hoch signifikant (\*\*).  $n = 9$ . (Eigene Abbildung in Anlehnung an [3])

## Abkürzungsverzeichnis

<b>AUC</b>	Area Under the Curve, Fläche unter der Kurve
<b>et al.</b>	et alii, und andere
<b>HEC</b>	Hydroxyethylcellulose
<b>HPLC</b>	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
<b>LSM</b>	Laser-Scanning-Mikroskopie
<b>PBS</b>	Phosphatgepufferte Salzlösung

## Abstrakt

**Einleitung:** Die topische Applikation ist eine der gängigsten Methoden, um dem Körper Substanzen zuzuführen. Zur Überwindung der Hautbarriere, stehen den Substanzen hauptsächlich der follikuläre und der interzelluläre Penetrationsweg zur Verfügung. Die Etablierung eines Hautmodells, das zwischen den beiden Penetrationswegen unterscheidet, stellt eine große Herausforderung dar. Keine der etablierten Ex-vivo-Methoden zur Penetrationsuntersuchung von topisch applizierten Substanzen berücksichtigt die transfollikuläre Penetration angemessen. In der vorliegenden Arbeit wurde die Validität der dermalen Mikrodialyse am Ex-vivo-Schweineohrhautmodell zur Untersuchung der Penetrationskinetik von topisch applizierten Substanzen unter Berücksichtigung der transfollikulären Penetration überprüft [1]. Es wurde untersucht, ob der Follikelverschluss von in vivo auf das Ex-vivo-Schweineohrhautmodell übertragbar ist [2]. Ferner war das Ziel, eine Ex-vivo-Methode zu entwickeln, die es ermöglicht, die transfollikuläre Penetration topisch applizierter Substanzen durch eine Kombination aus Mikrodialyse und selektivem Follikelverschluss zu quantifizieren [3].

**Methodik:** Alle Penetrationsstudien wurden am Ex-vivo-Schweineohrhautmodell durchgeführt. Die follikuläre Penetration des Modellwirkstoffs Fluoreszein-Natrium wurde anhand von Dünnschnitten und Laser-Scanning-Mikroskopie ausgewertet.

Weitere Penetrationsstudien wurden mit dem Modellwirkstoff Koffein durchgeführt wobei folgende Formulierungen verglichen wurden: Koffein-Nanokristall-Gel vs. Koffein-Gel, 700 nm Koffein-Nanokristall-Gel vs. 200 nm Koffein-Nanokristall-Gel, Koffein-HEC-Gel mit und ohne Follikelverschluss. Die Sammelzeiten der Mikrodialyse variierten je nach Fragestellung. Nach Abschluss der Mikrodialyse wurden die Hautproben auf ihre Koffeinkonzentration in den einzelnen Hautschichten überprüft. Die Koffeinanalytik wurde mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) durchgeführt.

**Ergebnisse:** Mittels Mikrodialyse am Schweineohrhautmodell konnte gezeigt werden, dass der Einsatz von partikulären Formulierungen (Koffein-Nanokristall-Gel vs. Koffein-Gel), insbesondere bei optimierter Partikelgröße (700 nm vs. 200 nm Koffein-Nanokristall-Gel), zu einer erhöhten Bioverfügbarkeit führte. Nach Follikelverschluss wurde das topisch applizierte Koffein später und in geringerer Menge bioverfügbar als bei offenen Haarfollikeln.

**Zusammenfassung:** Im Rahmen dieser Arbeit ist es gelungen, den selektiven Follikelverschluss und die dermale Mikrodialyse miteinander zu kombinieren und somit den Einfluss der transfollikulären Penetration von Koffein ex vivo zu untersuchen. Der Einsatz der Mikrodialyse am der Ex-vivo-Schweineohrhautmodell stellt einen neuartigen Versuchsaufbau dar. Diese Kombination ist für weitere Untersuchungen von großem Interesse, da sie auch die Auswirkungen der follikulären und transfollikulären Penetrationskinetik erfassen kann, was bislang durch keine andere Ex-vivo-Versuchsanordnung gelungen ist.

## Abstract

**Introduction:** Topical application is one of the most common methods of delivering substances to the body. To overcome the skin barrier, substances mainly use the follicular and intercellular penetration pathways. Establishing a skin model that distinguishes between the two penetration pathways is a major challenge. None of the established ex vivo methods for penetration testing of topically applied substances adequately accounts for transfollicular penetration. In the present work, the validity of dermal microdialysis on the ex vivo porcine ear skin model to study the penetration kinetics of topically applied substances considering transfollicular penetration was tested [1]. It was tested whether follicular closing, as previously applied in vivo, is transferable to the ex vivo porcine ear [2]. Furthermore, the aim was to develop an ex vivo method to quantify the transfollicular penetration of topically applied substances by a combination of microdialysis and selective follicular closure [3].

**Methods:** All penetration studies were performed on the ex vivo porcine ear model. Follicular penetration of the model drug fluorescein sodium was evaluated using thin sections and laser scanning microscopy.

Further penetration studies were performed with the model drug caffeine comparing the following formulations: Caffeine Nanocrystal Gel vs. Caffeine Gel, 700 nm Caffeine Nanocrystal Gel vs. 200 nm Caffeine Nanocrystal Gel, Caffeine HEC Gel with and without follicle closure. Microdialysis collection times varied depending on the question. After completion of microdialysis, skin samples were checked for caffeine concentration in each skin layer. Caffeine analysis was performed by high-performance liquid chromatography (HPLC).

**Results:** Using microdialysis on the porcine ear skin model, it was shown that the use of particulate formulations (caffeine nanocrystal gel vs. caffeine gel), especially with optimized particle size (700 nm vs. 200 nm caffeine nanocrystal gel), resulted in increased bioavailability. After follicle closure, topically applied caffeine became bioavailable later and in lower amounts than in open hair follicles.

**Summary:** This work has successfully combined selective follicular closure and dermal microdialysis to investigate the influence of transfollicular penetration of caffeine ex vivo. The use of microdialysis on the ex vivo porcine ear model represents a novel experimental setup. This combination is of great interest for further studies as it can also capture the effects of follicular and transfollicular penetration kinetics, which has not been achieved by any other ex vivo experimental setup so far.

# 1 Einleitung

Topische Wirkstoffapplikationen sind essenziell in der Lokalthherapie, können jedoch auch für die systemische Therapie eingesetzt werden. Damit ein topisch applizierter Wirkstoff bioverfügbar wird, muss dieser allerdings zunächst die Hautbarriere überwinden. Da es eine der wichtigsten Aufgaben unserer Haut ist, uns vor äußeren Einflüssen zu schützen, gelangen meist nur weniger als 1 % der topisch applizierten Wirkstoffe ins lebende Gewebe [4]. Von wissenschaftlicher Seite aus gibt es daher stets Bestrebungen, diese geringe Bioverfügbarkeit von Wirkstoffen zu erhöhen. Hierfür werden immer neue Formulierungen entwickelt, die auf unterschiedliche Strukturen in der Haut oder Mechanismen abzielen. Bei der Erprobung solcher neuen Formulierungen ist es von essentieller Bedeutung, dass sowohl deren Wirkung als auch deren Wirkstoffkonzentration im verwendeten Versuchsaufbau angemessen abgebildet werden kann. Dies gilt insbesondere für Formulierungen, die den Haarfollikel als Zielstruktur anvisieren. Üblicherweise wird bei Ex-vivo-Untersuchungen mit der Franz-Diffusionszelle oder der dermalen Mikrodialyse exzidierte Haut verwendet. Diese ist jedoch nur bedingt hierfür geeignet, da es durch die Exzision der Haut zur Kontraktion der Haarfollikel bzw. sogar zur Zerstörung der follikulären Barriere kommen kann [5,6].

Für die Untersuchung von Nanopartikel-haltigen Formulierungen ist die Auswahl eines anderen, besser geeigneten Ex-vivo-Hautmodells besonders relevant. In zahlreichen *In-vivo*- und *Ex-vivo*-Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass Nanopartikel sehr gut in den Haarfollikel penetrieren und damit optimal als follikuläre Wirkstofftransporter geeignet sind [7]. Damit die Wirkstoffe aus dem Haarfollikel ins lebende Gewebe gelangen können, werden diese im Haarfollikel freigesetzt und können dann unabhängig transfollikulär, also über die follikuläre Barriere, in das lebende Gewebe übertreten und schließlich bioverfügbar werden. Aktuell existiert keine Methode, die es erlaubt, die Bioverfügbarkeit von transfollikulär penetrierten Wirkstoffen ex vivo zu untersuchen.

## 1.1 Aufbau und Funktion der Haut

Die menschliche Haut besteht aus mehreren Schichten: von innen nach außen aus der Subcutis (Unterhaut), der Dermis (Lederhaut) und der Epidermis (Oberhaut). Abbildung 1 zeigt eine schematische Abbildung der Haut und des Haarfollikels.

Die *Subcutis* besteht aus lockerem Bindegewebe und Fettzellen. Sie dient zur Wärmeisolation, polstert Stöße ab und speichert Nährstoffe. Direkt über der Subcutis befindet sich – ohne eine scharfe Abgrenzung – die *Dermis*. Sie besteht aus dichtem Bindegewebe, das für die Elastizität und mechanische Belastbarkeit der Haut verantwortlich ist. Eingebettet in die Dermis liegen

Nerven, Kapillaren, Muskelfasern, Schweißdrüsen und die Haarfollikel. Die Schweißdrüsen und Haarfollikel werden auch als Hautanhangsgebilde bezeichnet [5].

Die oberste Schicht der Haut, die *Epidermis*, lässt sich in die lebende Epidermis und das *Stratum corneum*, die Hornschicht, aufteilen. Die Epidermis und das Stratum corneum erneuern sich beständig. An der klar definierten Grenzschicht zwischen Epidermis und Dermis, der Basalmembran, bilden sich stets neue epidermale Zellen (Keratinozyten), die während ihres Alterungsprozesses weiter an die Hautoberfläche wandern und in den tieferen Schichten immer von neuen Zellen ersetzt werden. Im Laufe dieses Prozesses kommt es zur Verhornung der Zellen, wobei diese ihren Zellkern verlieren und nun nicht mehr der lebenden Epidermis, sondern dem Stratum corneum zugeordnet sind [8]. In diesem Stadium sind die Zellen starr und befinden sich in einer ‚Ziegelmaueranordnung‘, wobei zwischen den Korneozyten (den Mauersteinen) bestimmte epidermale Lipide (der Mörtel) enthalten sind [9]. Diese Lipide schützen den Körper sowohl vor erhöhtem Wasserverlust als auch vor dem Eindringen vieler körperfremder Substanzen in das lebende Gewebe. Sie bilden damit eine Barriere, die in beide Richtungen wirkt.

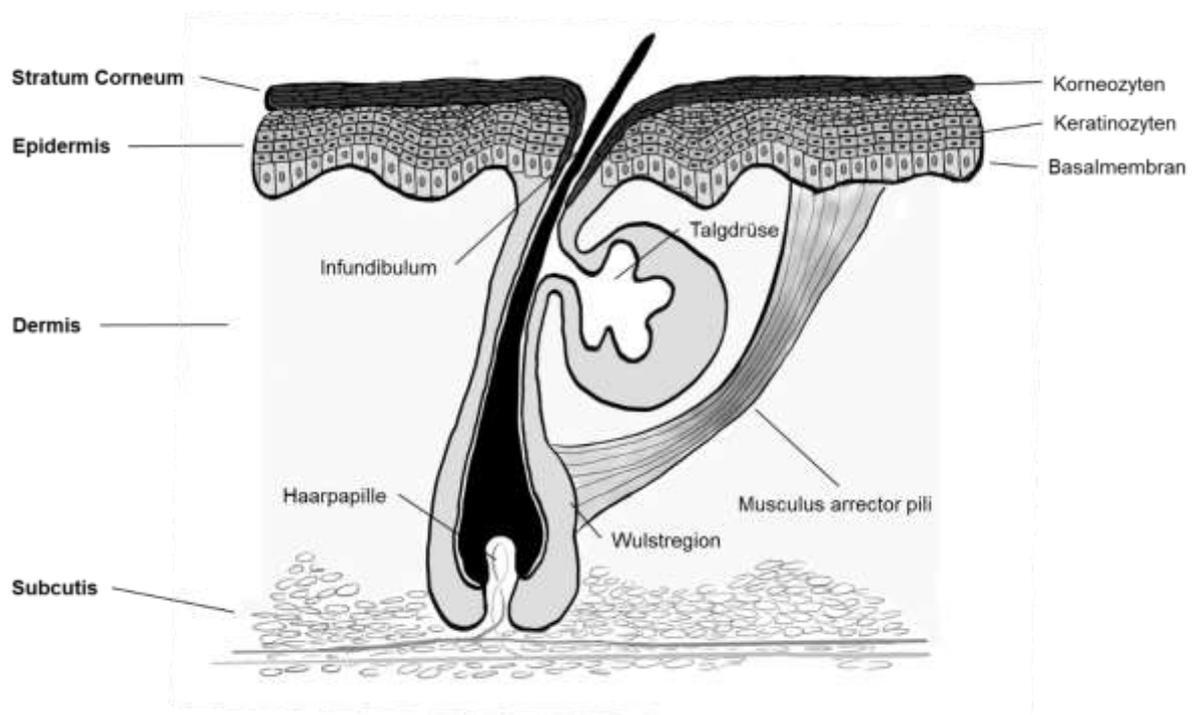


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Haut und des Haarfollikels. (Eigene Abbildung)

Diese kontinuierliche Hautbarriere wird an einigen Stellen von den *Haarfollikeln* unterbrochen. Haarfollikel sind komplexe Gebilde, die teilweise bis in die Subcutis hineinreichen können. Unterteilen lässt sich der Haarfollikel in das (1) Infundibulum, den (2) Isthmus, die (3) Wulstregion und den (4) Haarbulbus. Das Infundibulum besteht aus dem oberen und dem unteren Infundibulum und reicht bis zur Talgdrüse. Während der obere Abschnitt ein intaktes Stratum corneum aufweist, ist dies im Bereich des unteren Infundibulums nicht mehr der Fall. Die Barrierefunktion ist in diesem Bereich nicht mehr so stark ausgeprägt. Wirkstoffe, die bis in das

untere Infundibulum eindringen, können somit leichter aus dem Haarfollikel in das lebende Gewebe gelangen. Unterhalb der Talgdrüse erstreckt sich der Isthmus, der wiederum an der Wulstregion endet. Hier befinden sich die epithelialen Stammzellen. Ferner inseriert hier der Musculus arrector pili. Der Musculus arrector pili wird durch das vegetative Nervensystem gesteuert. Kommt es zu einer Kontraktion, so stellen sich die Haare auf („Gänsehaut“). Im anschließenden Haarbulbus ist die Haarpapille enthalten. Sie steuert das Erscheinungsbild sowie auch den Zyklus des Haares [10,11]. Wird der Haarfollikel im Querschnitt betrachtet, unterteilt dieser sich in den Haarschaft und die Wurzelscheide. Der Haarschaft besteht von innen nach außen aus Medulla, Kortex und Kutikula. Die Kutikulazellen bilden an der Haaroberfläche eine Schuppenstruktur, die auch für die follikuläre Penetration von Bedeutung ist. Studien und In-silico-Modellierungen konnten zeigen, dass Nanopartikel, die einen der Schuppendichte entsprechenden Durchmesser aufweisen, besonders effektiv in den Haarfollikel penetrieren. Dieses Phänomen wird als Ratscheneffekt bezeichnet [12-14]. Die Wurzelscheide gliedert sich wiederum in eine innere und eine äußere Wurzelscheide auf. Im Bereich der äußeren Wurzelscheide befinden sich *Tight junctions*, die besonders ab dem unteren Infundibulumbereich eine gewisse Barrierefunktion aufrechterhalten, obwohl hier das Stratum corneum nicht mehr so deutlich ausgeprägt ist [15].

Wie bereits in der Einleitung erwähnt, ist die Bioverfügbarkeit der meisten topisch applizierten Substanzen aufgrund der ausgeprägten Barrierefunktion der Haut sehr gering. Insgesamt werden drei *Penetrationswege in die Haut* beschrieben. Den größten Einfluss hat dabei der *interzelluläre* Penetrationsweg entlang der Lipidschichten, während der *intrazelluläre* Penetrationsweg eher von untergeordneter Bedeutung ist. Hierbei erfolgt die Penetration durch das Innere der Zellen. Der Anteil der Haarfollikel am Penetrationsprozess, die den dritten Penetrationsweg darstellen, wurde lange Zeit unterschätzt, da sie teilweise nur einen geringen Teil (Unterarm 0,1 %, Stirn 13,7 %) unserer Hautoberfläche bedecken [16,17]. Beim *follikulären* Penetrationsweg muss unterschieden werden, ob eine Substanz tatsächlich nur in den Haarfollikel penetriert oder ob auch eine transfollikuläre Penetration in das den Haarfollikel umgebende Gewebe erfolgt und die Substanz damit bioverfügbar wird.

## 1.2 Stand der Wissenschaft und Technik

Bei der Mikrodialyse handelt es sich um ein bereits über die letzten Jahrzehnte etabliertes Verfahren, das erstmals 1966 bei Untersuchungen an Nervengewebe angewandt wurde [18]. Von dort aus wurde die Mikrodialyse als Probenentnahmetechnik auf verschiedenste Gewebearten übertragen und schließlich ab 1991 für Penetrationsuntersuchungen an der Haut eingesetzt [19]. Im Rahmen der minimalinvasiven Methode wird der zu untersuchende Stoff durch eine im

Gewebe platzierte Membran diffundiert und quantifiziert. Eine exakte Beschreibung der Vorgehensweise findet sich in Kapitel 2.1.1. Die dermale Mikrodialyse wurde bereits für die Untersuchung des Penetrationsverhaltens zahlreicher Substanzen *in vivo* und *ex vivo* eingesetzt. Bei den bisherigen *Ex-vivo*-Untersuchungen wurde in den meisten Fällen auf exzidierte Humanhaut zurückgegriffen [20-25].

*Ex-vivo*-Untersuchungen unter Berücksichtigung der Beteiligung der Haarfollikel am Penetrationsprozess, wie sie im Rahmen dieser Doktorarbeit durchgeführt wurden, stellen besondere Ansprüche an das Hautmodell. Wird Haut exzidiert, kommt es unmittelbar zu einer starken Kontraktion des Hautstückes. In einer Studie konnte gezeigt werden, dass sich dabei die elastischen Fasern rund um den Haarfollikel ebenfalls stark zusammenziehen und das follikuläre Reservoir um bis zu 90 % verkleinert wird [6]. Dies bedeutet, dass die Verwendung von exzidiierter Haut eine Beurteilung der follikulären Penetration nur sehr eingeschränkt ermöglicht. Besser eignet sich hierfür das Schweineohrhautmodell. Dieses hat den Vorteil, dass die Haut während der Experimente auf dem Ohrknorpel fixiert bleibt und somit eine Kontraktion verhindert wird. Aufgrund dieser Besonderheit hat sich das Schweineohrhautmodell als *Ex-vivo*-Hautmodell zur Untersuchung der follikulären Penetration etabliert [26-28]. Zusätzlich kann mit Hilfe von Kryoschnitten und der Laser-Scanning-Mikroskopie (LSM) untersucht werden, wie tief ein Wirkstoff in den Haarfollikel penetriert.

Um den Anteil der transfollikulären Penetration zu untersuchen, wurde der selektive Follikelverschluss als *In-vivo*-Methode entwickelt, wobei der Einfluss der Haarfollikel auf den Penetrationsprozess indirekt über den Vergleich mit den Penetrationsergebnissen aus Applikationsarealen mit offenen Haarfollikeln bestimmt werden kann. Der selektive Follikelverschluss wurde bereits bei einer Vielzahl von Studien eingesetzt. Hierbei wurden als Verschlussmaterialien lösungsmittelhaltiger Nagellack, ein Silikonfett-Cyanoacrylat-Klebstoff-Gemisch, Wachse und Teflon verwendet [29-32]. Die meisten Erfahrungen konnten bislang mit dem Verschlussmaterial Nagellack gesammelt werden. Dieser beinhaltet neben Nitrozellulose auch weitere Stoffe wie Harze, Weichmacher und Lösungsmittel. Allerdings stellt sich insbesondere beim Einsatz von Nagellack die Frage, ob die Inhaltsstoffe neben dem Verschluss des Haarfollikels die Penetration weitergehend beeinflussen. Insbesondere Lösungsmittel sind für ihre penetrationsverstärkenden Eigenschaften bekannt. Bislang konnte nicht belegt werden, inwiefern dies einen Einfluss auf die Validität der Verschlussmethode hat.

In einer Studie von Otberg et al. konnte anhand von *In-vivo*-Untersuchungen an Probanden dokumentiert werden, dass Koffein wesentlich schneller penetriert, wenn die Haarfollikel offen sind. Hier war das topisch applizierte Koffein bereits nach fünf Minuten im Blut nachweisbar, während es bei geschlossenen Haarfollikeln etwa 20 Minuten dauerte [30]. Breuckmann et al. konnten 2021 *in vivo* zeigen, dass Koffein-Nanokristalle mit einer Größe von etwa 700 nm für eine höhere Bioverfügbarkeit von Koffein sorgen, als dies durch 200 nm große Nanokristalle

gelingt. Dies lässt sich vermutlich damit erklären, dass die 700 nm großen Nanokristalle deutlich tiefer in den Haarfollikel penetrieren als die 200 nm großen Nanokristalle und damit in Bereiche des Haarfollikels gelangen, in denen die folliculäre Barriere weniger stark ausgeprägt ist [14].

Der Einsatz von Nanopartikeln für die Applikation von Wirkstoffen ist in vielen medizinischen Bereichen bereits sehr gut untersucht. Das Bestreben, Nanopartikel auch als Wirkstofftransporter durch die Hautbarriere zu verwenden, verlief bislang jedoch weitestgehend erfolglos [33]. Wie bereits erwähnt, ist jedoch bekannt, dass Nanopartikel sehr gut und effektiv in die Haarfollikel penetrieren können [34]. Da bei gesunder Haut der Übergang vom Haarfollikel in das lebende Gewebe ebenfalls durch eine gewisse Barrierefunktion verhindert wird, können Nanopartikel jedoch nicht ohne Weiteres in das lebende Gewebe übergehen. Nur bei einer stark geschädigten Barriere konnte ein Übergang von Nanotransportern in das lebende Gewebe nachgewiesen werden [35]. Ein alternativer Ansatz ist es daher, die Nanopartikel nur als Transporter in den Haarfollikel zu verwenden und den Wirkstoff dann dort freizusetzen, damit dieser unabhängig in das lebende Gewebe übergehen kann [36]. Verschiedene Studien zeigen, dass dieser Ansatz durchaus vielversprechend ist [7].

Bislang existiert allerdings keine zufriedenstellende Methode, um den transfollikulären Wirkstofftransport im Ex-vivo-Hautmodell zu untersuchen. Hierfür wird sowohl ein Hautmodell mit intakten Haarfollikeln benötigt als auch die Möglichkeit, diese so zu verschließen, dass der folliculäre Penetrationsweg ausgeschlossen werden kann. Da die wenigsten Studien direkt in vivo durchgeführt werden können, ist eine solche Methodik für die Entwicklung neuer Formulierungen essentiell.

### 1.3 Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit war es, eine Ex-vivo-Methode zu entwickeln, die es erlaubt, die Bioverfügbarkeit von transfollikulär penetrierten Wirkstoffen und Substanzen quantitativ zu erfassen. Dies sollte durch die Kombination der beiden Methoden der dermalen Mikrodialyse sowie des selektiven Follikelverschlusses erfolgen. Hierfür war es notwendig, den Follikelverschluss am Schweineohrhautmodell zu etablieren und potentielle penetrationsverstärkende Effekte durch Verschlussmaterialien auszuschließen. Die Kombination beider Methoden sollte am Schweineohrhautmodell etabliert und validiert werden.

Folgende Thesen und Hypothesen wurden für die Bearbeitung der Arbeit formuliert und geprüft:

#### **Hauptthese:**

1. Die dermale Mikrodialyse am Schweineohrhautmodell ist eine valide Methode, um die Penetration von topisch applizierten Substanzen zu erfassen.

## Nebenthesen:

2. Penetrationseffekte, die auf den Haarfollikel zurückgeführt werden, können durch die dermale Mikrodialyse abgebildet werden. Hierbei werden folgende Zusammenhänge deutlich:
  - a. Wenn eine nanopartikuläre Formulierung aufgetragen wird, kann eine höhere Bioverfügbarkeit beobachtet werden als bei einer nicht partikulären Formulierung.
  - b. Durch den Einsatz von größenoptimierten Nanopartikeln um 700 nm kann eine höhere Bioverfügbarkeit als bei kleineren Partikelgrößen erreicht werden.
  - c. Wenn die Haarfollikel verschlossen sind, wird der Wirkstoff erst später und in geringerer Menge bioverfügbar.
3. Der selektive Follikelverschluss ist eine valide Methode, um die follikuläre Penetration am Ex-vivo-Schweineohrhautmodell zu verhindern.
  - a. Der selektive Follikelverschluss kann ex vivo eingesetzt werden. Wenn lösungsmittelhaltiges Verschlussmaterial (lösungsmittelhaltiger Nagellack) in Form von kleinen Tropfen auf die Follikelöffnungen aufgetragen wird, kann kein topisch applizierter Modellwirkstoff in den Haarfollikel gelangen.
  - b. Auch der Einsatz von lösungsmittelfreiem Verschlussmaterial (lösungsmittelfreier Nagellack) kann bei gleicher Applikation eine follikuläre Penetration von topisch appliziertem Modellwirkstoff in den Haarfollikel verhindern.
  - c. Das Kontrollareal, in dem in vivo eine Flächenreduktion durch Applikation von kleinen Punkten des Verschlussmaterials neben dem Haarfollikel erzielt wurde, kann ex vivo eingesetzt werden, ohne unerwünschte Nebeneffekte zu induzieren.
4. Durch die Kombination der dermalen Mikrodialyse mit dem selektiven Follikelverschluss ist es möglich, die transfollikuläre Penetration selektiv zu bestimmen.

## 2 Methodik

Die Untersuchungen zur Prüfung der oben genannten Thesen und Hypothesen wurden in drei Publikationen veröffentlicht. Welche These in welcher Publikation behandelt wurde kann Abbildung 2 entnommen werden.

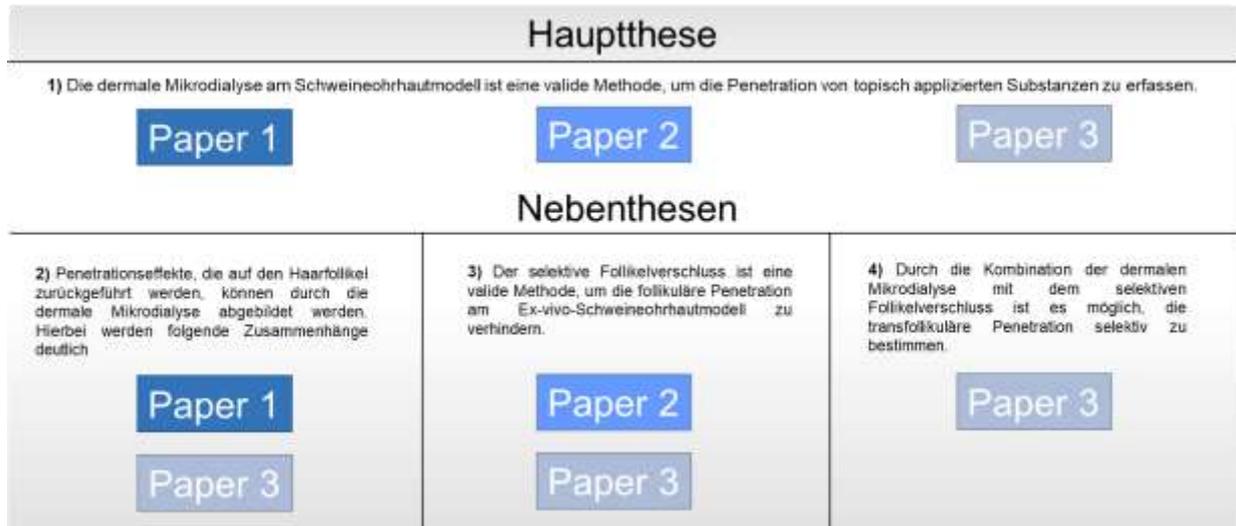


Abbildung 2: Übersicht Thesen mit Zuordnung zu den jeweiligen Publikationen. (Eigene Abbildung)

Im Folgenden werden die im Rahmen der hier vorgestellten Studien eingesetzten Materialien und Methoden kurz erläutert. Ausführliche Beschreibungen der Studiendesigns können den angehangenen Originalpublikationen entnommen werden.

## 2.1 Penetrationsstudien mit dermaler Mikrodialyse

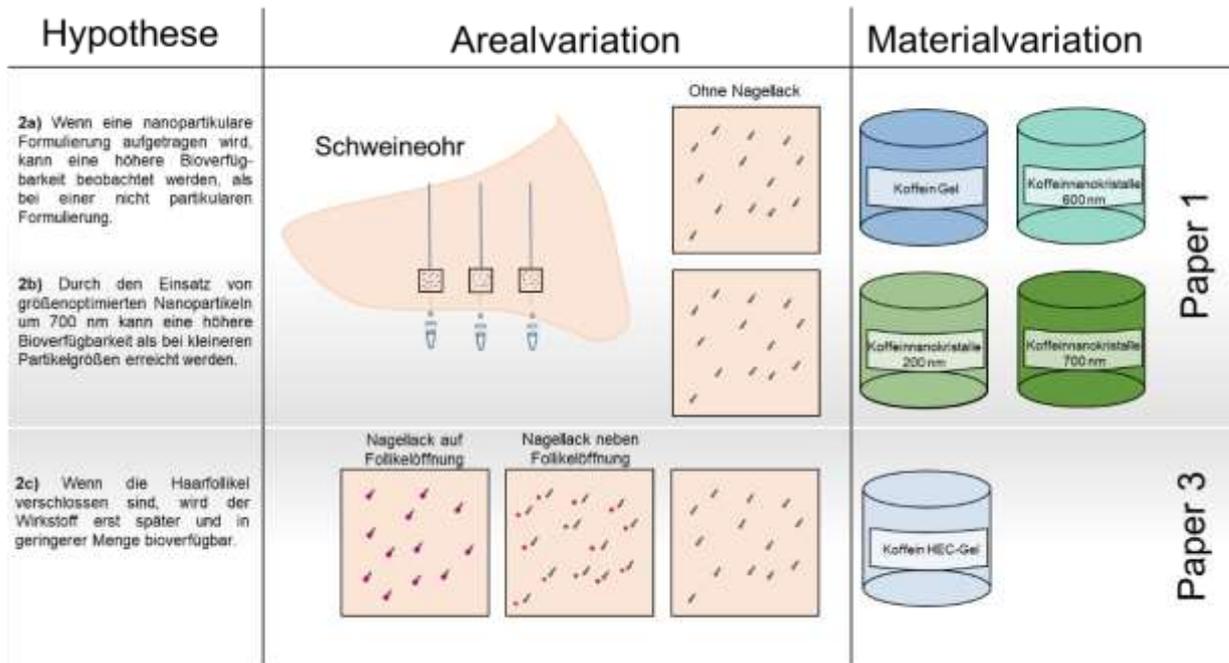


Abbildung 3: Übersicht der mittels dermalen Mikrodialyse durchgeführten Penetrationsstudien. (Eigene Abbildung)

Die im Rahmen der Arbeit durchgeführten Penetrationsuntersuchungen sollten primär den Anteil der transfollikulären Penetration am Gesamtpenetrationsprozess untersuchen. Ziel war es, Zusammenhänge, die bereits durch *In-vivo*-Studien als statistisch signifikant bewertet worden waren, *ex vivo* zu reproduzieren und zu prüfen, ob diese auch bei Verwendung der *dermalen Mikrodialyse am Ex-vivo-Schweineohrhautmodell* beobachtet werden können. Da bereits bekannt war, dass der follikuläre Penetrationsweg einen Einfluss auf die Penetrationskinetik von Koffein hat [30,37], wurden für alle Untersuchungen Koffein-Formulierungen verwendet. Ein Überblick über die durchgeführten Studien findet sich in Abbildung 3.

Es wurden insgesamt drei Penetrationsstudien durchgeführt, wobei die penetrierte Koffeinmenge sowohl mittels der dermalen Mikrodialyse als auch mittels der Koffeinextraktion aus den einzelnen separierten Hautschichten untersucht wurde.

Zunächst wurde die Penetrationskinetik eines gesättigten Koffein-Gels mit der eines Koffein-Nanokristall-Gels verglichen. Beide Gele hatten eine identische Basisformulierung. Aufgrund des höheren Koffeingehalts des Koffein-Nanokristall-Gels und der erhöhten follikulären Penetration von partikulären Substanzen wurde erwartet, eine deutlich erhöhte Bioverfügbarkeit in Arealen zu finden, in denen das Koffein-Nanokristall-Gel aufgetragen wurde.

Da bekannt war, dass Nanopartikel der Größe um 700 nm besonders gut in den Haarfollikel penetrieren (Ratscheneffekt) [13], wurden in der zweiten Penetrationsstudie sowohl 200 nm große als auch 700 nm große Koffein-Nanokristalle jeweils in einer Gelformulierung aufgetragen. Eine

Studie mit vergleichbaren Formulierungen war bereits von Breuckmann et al. [14] in vivo durchgeführt worden.

In der letzten Penetrationsstudie wurde der *Follikelverschluss mit der dermalen Mikrodialyse* kombiniert und ein Wasser-basiertes Koffein-Hydroxyethylcellulose(HEC)-Gel aufgetragen. Auch hier lag eine vergleichbare In-vivo-Studie vor, in der jedoch nicht mit einem Gel, sondern mit einer Koffeinlösung gearbeitet worden war. Um den Einfluss des Designs des Kontrollareals zu beurteilen, wurden zwei verschiedene Kontrollareale ohne Follikelverschluss mitgeführt. Während in einem der beiden Areale neben jeder Follikelöffnung ein Tropfen des Verschlussmaterials platziert wurde, wurde im zweiten Kontrollareal kein Verschlussmaterial eingesetzt. Auf das Vorgehen beim Follikelverschluss und die in diesem Zusammenhang vorhandenen Schwierigkeiten wird in Kapitel 2.2 eingegangen.

### 2.1.1 Dermale Mikrodialyse am Schweineohrhautmodell

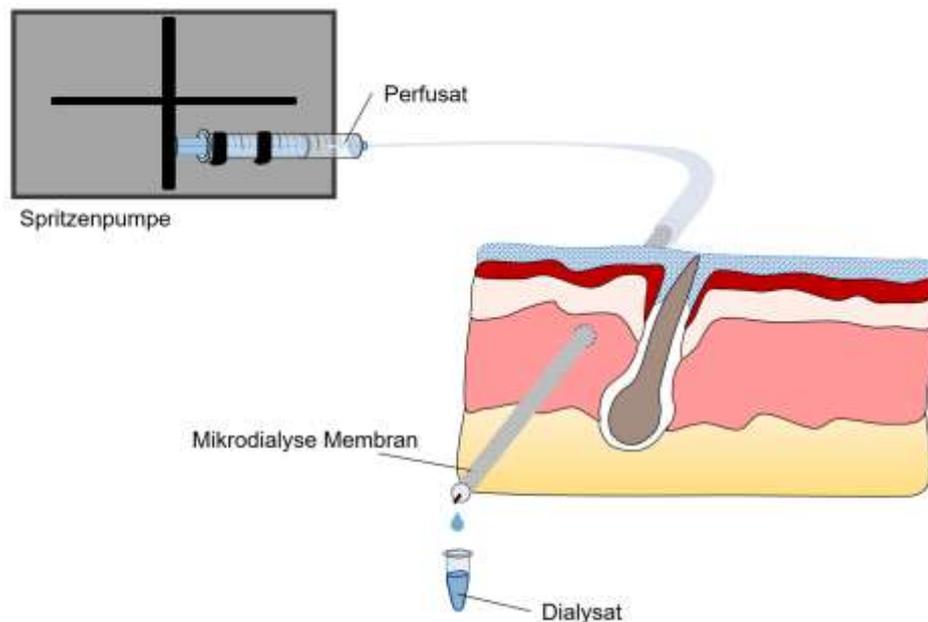


Abbildung 4: Schematische Darstellung der dermalen Mikrodialyse. (Eigene Abbildung)

In den hier vorgestellten Untersuchungen wurde die *dermale Mikrodialyse* (siehe Abbildung 4) zur Untersuchung der Pharmakokinetik verschiedener topisch applizierter Koffein-Formulierungen erstmals am *Schweineohrhautmodell* eingesetzt.

Hierfür wurde eine semipermeable Membran in den oberen Bereich der Dermis platziert. Dies gelang, indem eine Kanüle akkurat parallel zur Hautoberfläche in einer Tiefe von etwa 300  $\mu\text{m}$  eingebracht wurde. Die exakte Lage der Kanüle wurde mit der optischen Kohärenz-Tomographie überprüft. Bei korrekter Lage wurde die Membran in die Kanüle eingefädelt und die Kanüle

danach entfernt. Die zu untersuchende Formulierung wurde anschließend topisch appliziert. Das topisch applizierte Koffein gelangt aufgrund der Penetration in das von der Membran umgebende Gewebe. Über einen zuführenden Schenkel wurde die Membran kontinuierlich über eine Pumpe mit einer konstanten Geschwindigkeit von 3  $\mu\text{L}/\text{min}$  mit phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) durchspült. Aufgrund der Semipermeabilität der Membran gelangte das Koffein auch in das Perfusat. Das mit Koffein angereicherte Perfusat (Dialysat) wurde nach dem Durchlaufen der Membran aufgefangen. Die Auffanggefäße wurden in je nach Studiendesign festgelegten Abständen ausgetauscht und die Koffein-Konzentration mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) bestimmt. Anhand der Fließgeschwindigkeit des Mikrodialyse-Perfusates und der Koffeinkonzentration im Dialysat konnte die gesammelte Koffeinemenge berechnet werden.

### 2.1.2 Koffeinextraktion aus den einzelnen Hautschichten

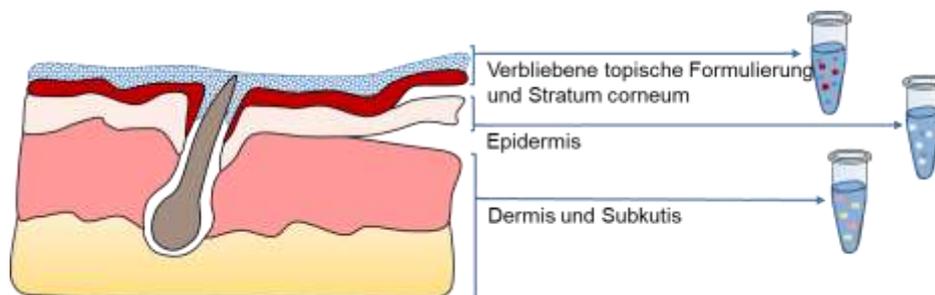


Abbildung 5: Schematische Darstellung der Separierung. (Eigene Abbildung)

Alle mittels der dermalen Mikrodialyse untersuchten Hautareale wurden nach Abschluss des Mikrodialyseexperiments zusätzlich bezüglich des absorbierten Koffeins analysiert. Hierfür wurden die Hautschichten zunächst mittels Klebestreifenabrissen und *Hitzeseparation* in (1) auf der Haut verbliebene Formulierung und oberste Schichten des Stratum corneums, (2) restliches Stratum corneum und Epidermis sowie (3) Dermis und subkutanen Fettgewebe aufgetrennt (siehe Abbildung 5). Das Gewebe wurde anschließend *homogenisiert* und das Koffein *extrahiert*. Die so gewonnenen Koffeinlösungen wurden ebenfalls mit HPLC in Bezug auf den Koffeingehalt analysiert.

## 2.2 Selektiver Follikelverschluss

Beim *selektiven Follikelverschluss* sollte durch gezielten Verschluss der Haarfollikelöffnungen die Penetration von topisch applizierten Substanzen in den Haarfollikel verhindert werden, sodass der Stofftransport ausschließlich inter- und intrazellulär erfolgte. Dieser Verschluss wurde

erzeugt, indem auf jede Haarfollikelöffnung ein Tropfen eines Verschlussmaterials aufgebracht wurde. Für eine präzise Applikation wurde das Verschlussmaterial mit einer 1-ml-Spritze aufgezogen und unter Einsatz einer Kanüle aufgetragen. Durch den Vergleich mit einem Areal ohne Haarfollikelverschluss konnte auf den Anteil des Haarfollikels an der gesamten Penetration geschlossen werden. Da durch den Follikelverschluss ein Teil der Hautoberfläche verdeckt wurde, wurde im Kontrollareal neben jede Haarfollikelöffnung ebenfalls ein Punkt des Verschlussmaterials platziert, um die gleiche Flächenreduktion zu erzeugen.

### 2.2.1 Validierung des selektiven Follikelverschlusses

Zur *Validierung eines sicheren Follikelverschlusses* wurde im Rahmen der hier vorgestellten Studien die Güte zweier Verschlussmaterialien untersucht. Eine Übersicht der durchgeführten Untersuchungen und die Vorgehensweise zur Prüfung der Hypothesen zum Follikelverschluss findet sich in Abbildung 6.

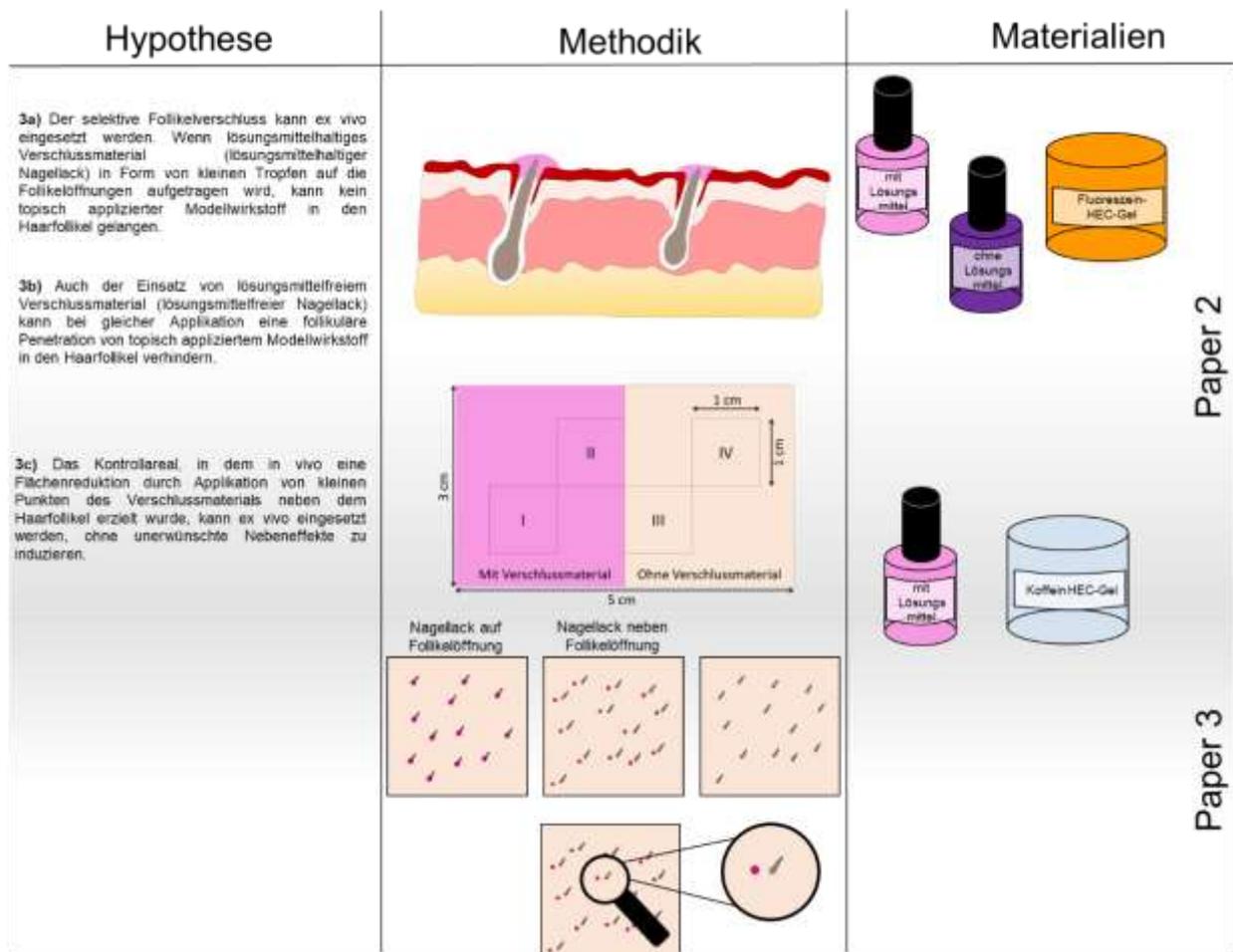


Abbildung 6: Übersicht der durchgeführten Untersuchungen zur Prüfung der Hypothesen zum Follikelverschluss (Eigene Abbildung)

Es wurde betrachtet, ob durch den Einsatz eines konventionellen, wie er schon in vielen Studien eingesetzt worden war [29,30,38], oder eines lösungsmittelfreien Nagellackes als Verschlussmaterial ein sicherer Follikelverschluss erzielt werden kann. Hierfür wurde auf Schweineohren der Follikelverschluss mit den jeweiligen Substanzen durchgeführt und nach dem Trocknen ein Fluoreszein-HEC-Gel appliziert. Da bekannt war, dass für eine erfolgreiche follikuläre Penetration eine Massage durchgeführt werden muss [13], wurden für die Applikation und Verteilung des Fluoreszein-HEC-Gels vier verschiedene Methoden eingesetzt. In einem Areal wurde das Gel lediglich vorsichtig mit der Pipettenspitze verteilt, im zweiten Areal wurde eine vorsichtige Massage mit dem Finger durchgeführt, im dritten Areal wurde eine 5-Hz-Massage mit der Fingerkuppe und im letzten Areal eine 5-Hz-Massage mit einem Massagegerät appliziert. Es konnte somit beurteilt werden, ob initial ein Follikelverschluss bestand und ob dieser robust genug war, einer Massage standzuhalten. Um dies zu analysieren, wurden Kryoschnitte der verschlossenen Haarfollikel angefertigt, die mittels Laser-Scan-Mikroskopie daraufhin untersucht wurden, ob das aufgetragene Gel trotz Verschluss in den Haarfollikel eindringen konnte.

Grundgedanke bei der Applikation verschiedener Verschlussmaterialien war es, *mögliche penetrationsverstärkende Effekte auszuschließen*. Hierfür kamen einerseits chemische Effekte, die auf das sich im Nagellack befindende Lösungsmittel zurückzuführen wären, in Frage. Andererseits wurde überprüft, ob der Lack sich durch das Trocknen womöglich zusammenzieht. Hierdurch könnte im Kontrollareal potentiell der sich neben dem Nagellacktropfen befindende Haarfollikel erweitert werden.

Der potentielle *chemische Einfluss* des lösungsmittelhaltigen Nagellackes wurde anhand eines Penetrationsversuchs in einem Randbereich eines mit lösungsmittelhaltigem Verschlussmittel bedeckten Hautareals getestet. Hierfür wurde ein Areal mit Nagellack bedeckt. Nach dem Trocknen des Lackes wurde sowohl auf dem bedeckten Hautareal als auch auf einem angrenzenden Areal ein Koffein-HEC-Gel aufgetragen. Es wurden nach Penetration sowohl ein Randareal, das direkt an den Nagellack grenzte, als auch ein 1 cm entferntes Areal mit einem Skalpell entnommen, um so die Koffeinpenetration auf vom Verschlussmaterial unbeeinflussten Gewebe zu untersuchen.

Zusätzlich wurde die Möglichkeit einer *mechanischen Einwirkung* durch das trocknende Verschlussmaterial auf der Haut bewertet. Es wurde hierfür die Veränderung der Ausdehnung des Verschlussmaterials während des Trocknens auf der Haut mikroskopisch beobachtet. Anhand des Intensitätsprofils, das sich über den Haarfollikel und den Verschlussmaterial-Tropfen erstreckte, wurde ermittelt, ob eine zeitliche Abhängigkeit der Ausdehnung vorlag.

Da es durch den Follikelverschluss zu einer Flächenreduktion des untersuchten Hautareals gekommen war, war es notwendig, die *gleiche Flächenreduktion* auch auf dem *Kontrollareal* zu

bewirken. Zu diesem Zweck wurde bislang auch im Kontrollareal neben jede Haarfollikelöffnung ein Tropfen des Verschlussmaterials platziert.

Um diesen Einsatz von Verschlussmaterial zur Flächenreduktion im Kontrollareal überflüssig zu machen, wurde nun anhand von 62 Arealen dreier verschiedener Schweineohren ermittelt, zu welcher Flächenreduktion der Einsatz des selektiven Haarfollikelverschlusses führt. Hierfür wurden alle Haarfollikel in diesen Arealen verschlossen und dahingehend ausgewertet. Die Idee dahinter war, dass die notwendige Flächenreduktion durch ein kleiner angelegtes Kontrollareal von Beginn an umgesetzt werden könnte.

## 2.3 Statistik

Für die statistische Auswertung der Studiendaten wurde SPSS® (IBM® SPSS® Statistics, Version 23.0.0.2, IBM® Corporation, New York, NY, USA) eingesetzt. Beim Vergleich zweier Gruppen wurde bei vorliegender Normalverteilung der Stichproben mit dem verbundenen Zweistichprobent-Test gearbeitet. Lag keine Normalverteilung vor, kam der Wilcoxon-Test zum Einsatz. Beim Vergleich dreier Gruppen wurde mit dem Friedman-Test sowie dem Post-hoc-Test unter Berücksichtigung der Bonferroni-Holm-Korrektur gearbeitet. P-Werte, die kleiner als 0,05 waren, wurden als signifikant abweichend eingestuft und somit wurde die jeweilige Nullhypothese verworfen. Beim Einsatz der dermalen Microdialyse kann es aufgrund des variierenden Abstandes zwischen Haarfollikel und Mikro-dialyse-Membran zu einer großen Datenvariation und Ausreißern kommen. Aus diesem Grund wird der Median bei Darstellung und Diskussion der Daten verwendet.

## 3 Ergebnisse

Im Folgenden werden die Kernergebnisse der durchgeführten Studien dargestellt. Genauere Details befinden sich jeweils in den Originalpublikationen, die am Ende jedes Abschnittes zitiert werden.

### 3.1 Dermale Mikrodialyse am Ex-vivo-Schweineohr

Die dermale Mikrodialyse wurde am Schweineohr eingesetzt, um einerseits die Penetration eines gesättigten Koffein-Gels und eines Koffein-Nanokristall-Gels zu vergleichen. Des Weiteren wurde die Penetration zweier Koffein-Nanokristall-Gele unterschiedlicher Größe miteinander verglichen.

#### 3.1.1 Vergleich der Penetrationskinetik von Koffein nach Applikation von gesättigtem Koffein-Gel oder Koffein-Nanokristall-Gel

Sowohl in den Hautarealen, auf die ein gesättigtes Koffein-Gel aufgetragen worden war, als auch in den Arealen, die mit dem Koffein-Nanokristall-Gel behandelt worden waren, war bereits nach zehn Minuten Koffein im aufgefangenen Mikrodialyse-Dialysat nachweisbar. Betrachtet man in Abbildung 7 a) den Median maximal nachgewiesener Koffeinkonzentrationen, so lag dieser beim Koffein-Nanokristall-Gel 11-mal höher (Median: 46,5 µg/ml, erstes Quartil: 35,5 µg/ml, drittes Quartil: 54,6 µg/ml) als beim gesättigten Koffein-Gel (Median: 3,8 µg/ml, erstes Quartil: 3,3 µg/ml, drittes Quartil: 4,3 µg/ml). Signifikante Unterschiede zwischen den Koffeinkonzentrationen zu bestimmten Sammelzeiten konnten beim Vergleich der beiden Applikationsformen nach zwei Stunden stets gefunden werden. Zuvor traten keine signifikanten Unterschiede zu den Sammelzeiten auf. Auch bei Betrachtung der Area under the curve (AUC) der Mikrodialysedaten in Abbildung 7 b) war die im Analysezeitraum gesammelte Koffeinmenge in den mit Koffein-Nanokristallen behandelten Arealen 12-fach größer im Vergleich zu den Arealen, die mit dem gesättigten Koffein-Gel behandelt worden waren. Abbildung 7 c) zeigt, dass in Arealen, in denen das Koffein-Nanokristall-Gel aufgetragen worden war, im Mittel etwa 10-mal mehr Koffein nachgewiesen werden konnte als in Arealen, in denen das gesättigte Koffein-Gel aufgetragen worden war ( $p < 0,05$ ). Bei der Messung der Koffeinkonzentration in den homogenisierten Dermis-Proben zeigte sich der gleiche Trend wie bei den Mikrodialysedaten (siehe Abbildung 7 d)). [1]

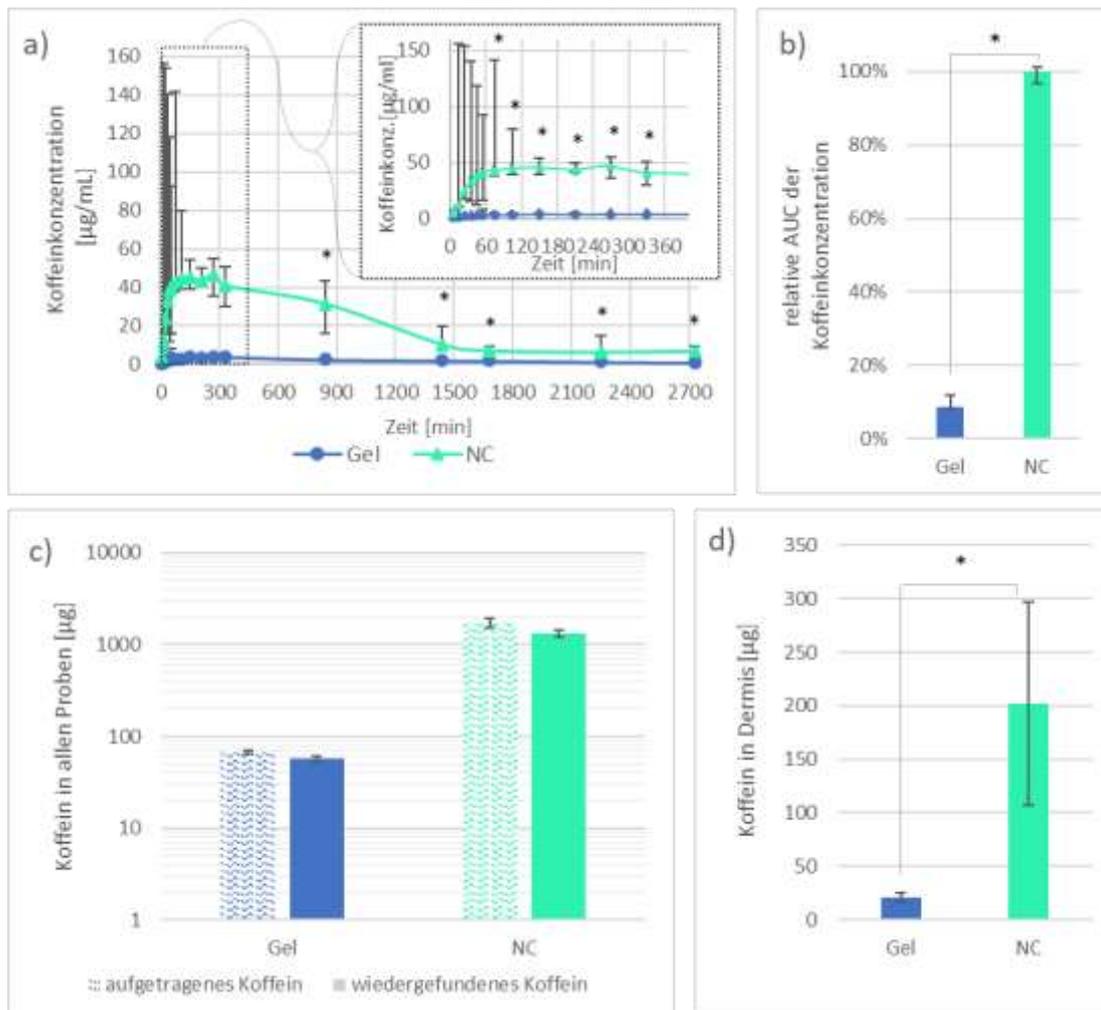


Abbildung 7: In allen Diagrammen werden die Gel- und die Koffein-Nanokristall-Gel (NC) verglichen. Grafik (a) zeigt den zeitabhängigen Median  $\pm$  ein Quartil der Koffeinkonzentration, die durch Mikrodialyse ermittelt wurde. Diagramm (b) bildet den Median  $\pm$  ein Quartil der Fläche unter der Kurve der Koffeinkonzentrationsdaten ab. Diagramm (c) zeigt die in den Arealen Gel und NC aufgetragene Menge an Koffein in Korrelation zur jeweils kumulativ gesammelte Koffeinkonzentration auf einer logarithmischen Skala (Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung). Grafik (d) zeigt die Gesamtmenge, die mittels Homogenisierung und Mikrodialyse aus der Dermis extrahiert wurde (Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung). Unterschiede zwischen den beiden Bereichen von  $p < 0,05$  wurden als signifikant angesehen (\*).  $n=5$  (aufgetragenes Koffein:  $n=3$ ) (Eigene Abbildung in Anlehnung an [1])

### 3.1.2 Vergleich der Penetrationskinetik von Koffein nach Applikation eines Gels mit 700-nm- oder 200-nm-Koffein-Nanokristallen

Im Median zeigte sich in den Hautarealen, auf die das Gel mit den 700-nm-Koffein-Nanokristallen aufgetragen worden war, stets eine höhere Koffeinkonzentration im Dialysat als in den Hautarealen, auf die das Gel mit den 200-nm-Koffein-Nanokristallen appliziert worden war (siehe Abbildung 8 a)). Die im Median maximale Koffeinkonzentration wurde bei beiden Formulierungen nach einer Sammelzeit von 30 Stunden erreicht (200 nm – Median: 0,6 µg/ml, erstes Quartil: 0,5 µg/ml, drittes Quartil: 0,8 µg/ml; 700 nm – Median: 1,3 µg/ml, erstes Quartil: 0,8 µg/ml, drittes Quartil: 1,5 µg/ml). Sie lag bei den 700-nm-Nanokristallen um 75% höher als bei den 200-nm-Nanokristallen. Signifikante Unterschiede zwischen Arealen mit Applikation von 700-nm-beziehungsweise 200-nm-Koffein-Nanokristallen konnten ab 22 h nach Sammelbeginn gefunden werden. Auch bei der Betrachtung des kumulativ gesammelten Koffeins mittels Mikrodialyse lag die Menge in Arealen mit 700-nm-Koffein-Nanokristallen 42% über den Vergleichsarealen, die mit 200-nm-Koffein-Nanokristallen behandelt worden waren (siehe Abbildung 8 b)).

Des Weiteren zeigte sich, wie in Abbildung 8 c) zu sehen ist, ein Unterschied in der absoluten Wiederfindung des applizierten Koffeins zwischen den 200-nm- und den 700-nm-Nanokristallgelen. Bei Applikation der größeren Nanokristalle wurde trotz gleicher Applikationsmenge und bei gleichem Vorgehen mit ≈ 75% signifikant weniger Koffein in allen kumulierten Proben (homogenisiertes Gewebe + Dialysat) gefunden als bei den 200-nm-Nanokristallen mit ≈ 90 %.

Abbildung 8 d) zeigt, dass bei der Messung der Koffeinkonzentration in den homogenisierten Dermis-Proben sich der gleiche Trend wie bei den Mikrodialysedaten zeigte. In Arealen, in denen das Gel mit 700-nm-Nanokristallen aufgetragen worden war, konnte signifikant mehr Koffein nachgewiesen werden als in Arealen, in denen das Gel mit 200-nm-Nanokristallen aufgetragen worden war. [1]

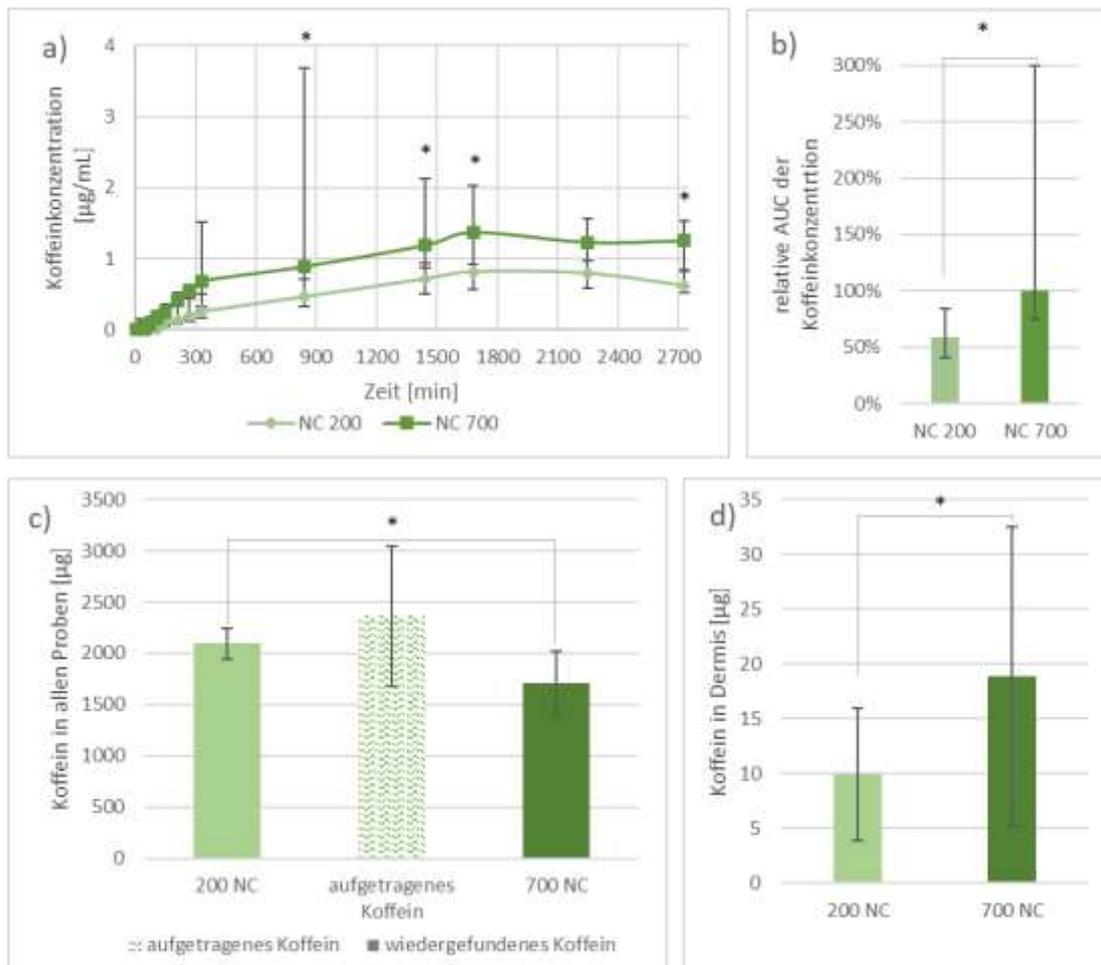


Abbildung 8: In allen Diagrammen werden zwei Koffein-Nanokristall-Gele miteinander verglichen. Grafik (a) zeigt den zeitabhängigen Median  $\pm$  ein Quartil der Koffeinkonzentration, die mittels Mikrodiyalyse ermittelt wurde. Diagramm (b) bildet den Median  $\pm$  ein Quartil der Fläche unter der Kurve der Koffeinkonzentrationsdaten ab. Diagramm (c) zeigt die aufgetragene Menge an Koffein in Korrelation zur kumulativen Koffeinmenge der beiden Areale (Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung). Grafik (d) zeigt die Gesamtmenge, die mittels Homogenisierung und Mikrodiyalyse aus der Dermis extrahiert wurde (Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung). Unterschiede zwischen den beiden Bereichen von  $p < 0,05$  wurden als signifikant angesehen (\*).  $n=5$  (aufgetragenes Koffein:  $n=3$ ) (Eigene Abbildung in Anlehnung an [1])

## 3.2 Validierung des Follikelverschlusses am Schweineohr

### 3.2.1 Sicherer Follikelverschluss

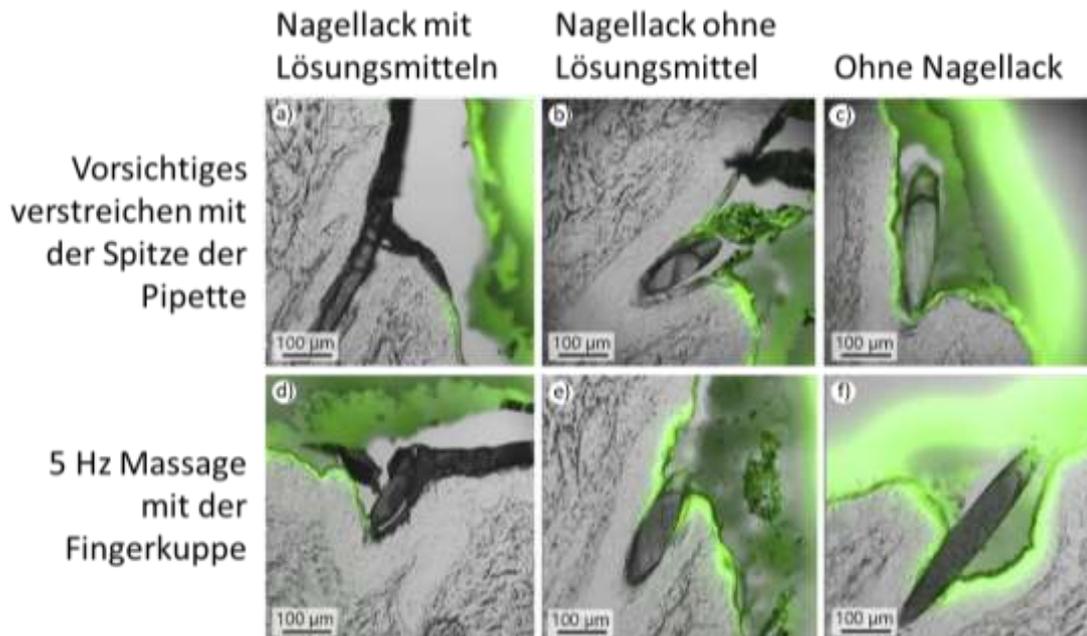


Abbildung 9: Exemplarische LSM Aufnahmen der untersuchten Haarfollikel. Nur Aufnahme a) zeigt einen sicheren Follikelverschluss durch das Auftragen von Nagellack mit Lösungsmitteln in Kombination mit dem vorsichtigen Verstreichen des Fluoreszein-HEC-Gels. Bei den Aufnahmen b) bis f) ist ein Fluoreszenzsignal innerhalb des Haarfollikels zu sehen und somit kein sicherer Haarfollikelverschluss gewährleistet. (Eigene Abbildung in Anlehnung an [2])

Die Auswertung von Kryoschnitten hat gezeigt, dass ein sicherer Follikelverschluss beim Einsatz von lösungsmittelfreiem Nagellack nicht möglich ist. Bereits beim vorsichtigen Verteilen des Fluoreszein-HEC-Gels kam es zu einer Penetration des Fluoreszein-Gels. Hingegen konnte der lösungsmittelhaltige Nagellack sowohl beim Verstreichen des Fluoreszein-Gels mit der Pipettenspitze als auch bei der vorsichtigen Fingermassage die folliculäre Penetration verhindern. Allerdings konnte auch der lösungsmittelhaltige Nagellack beiden 5-Hz-Massagen nicht standhalten, und ein Fluoreszenzsignal, das auf penetriertes Fluoreszein-HEC-Gel zurückzuführen ist, konnte innerhalb des Haarfollikels festgestellt werden. Exemplarische LSM Aufnahmen können in Abbildung 9 zu sehen. [2]

### 3.2.2 Chemische Penetrationsverstärkung

Um eine chemische Penetrationsverstärkung aufgrund des aufgetragenen Verschlussmaterials auszuschließen, wurde die Penetration eines Koffein-HEC-Gels in einem Hautareal untersucht, das direkt neben einem komplett mit dem Verschlussmaterial bedeckten Areal lag. Als Vergleichsareal diente ein Bereich, der sich in 1 cm Abstand zu dem mit Verschlussmaterial bedeckten Hautareal befand. Es konnte keine erhöhte Penetration in dem Areal festgestellt werden, das sich direkt neben dem komplett mit Verschlussmaterial bedeckten Areal befand. Somit konnte keine Penetrationsverstärkung aufgrund der Zusammensetzung des Verschlussmaterials nachgewiesen werden. [2]

### 3.2.3 Mechanische Penetrationsverstärkung

Um die Möglichkeit einer mechanischen Einwirkung des trocknenden Verschlussmaterials zu bewerten, wurde der Trocknungsprozess des Lackes auf der Haut unter dem Mikroskop beobachtet und die Ausdehnung des Lackes anhand von Intensitätsprofilen ausgewertet. Innerhalb des Trocknungszeitraums konnte eine Variation von  $\pm 1$  Pixel festgestellt werden. Da die Variation innerhalb der Messungen kleiner war als die Auflösungsgrenze des verwendeten optischen Systems, konnte ein mechanischer Einfluss des Verschlussmaterials während des Trocknens mit diesem Aufbau nicht nachgewiesen werden. [3]

## 3.3 Dermale Mikrodialyse am Schweineohr mit selektivem Follikelverschluss

Bei den Penetrationsuntersuchungen mit dermaler Mikrodialyse und selektivem Follikelverschluss am Schweineohrhautmodell wurden drei Areale pro Schweineohr untersucht. In einem Hautareal wurden die Haarfollikel verschlossen, in zwei Hautarealen blieben die Haarfollikel offen. In einem dieser Areale wurde ein Tropfen des Verschlussmaterials direkt neben jeden Haarfollikel platziert, um eine dem Areal mit Follikelverschluss entsprechende Flächenreduktion zu erlangen.

Abbildung 10 a) zeigt den zeitlichen Verlauf der Koffeinkonzentrationen. Im Areal mit verschlossenen Haarfollikeln war innerhalb der ersten Stunde im Median kein Koffeinnachweis möglich, während in beiden Arealen mit offenen Haarfollikeln Koffein direkt zu Beginn der Messung nachgewiesen werden konnte. Das Areal mit Flächenreduktion erreichte seine maximale Mediankonzentration nach 35 Minuten (Median: 6,5  $\mu\text{g/ml}$ , erstes Quartil: 0,6  $\mu\text{g/ml}$ , drittes Quartil: 7,5  $\mu\text{g/ml}$ ). Im Areal ohne Flächenreduktion wurde diese nach 105 Minuten erreicht (Median: 3,5  $\mu\text{g/ml}$ , erstes Quartil: 3,0  $\mu\text{g/ml}$ , drittes Quartil: 5,2  $\mu\text{g/ml}$ ). Nach der ersten Stunde

stieg im Areal mit Follikelverschluss die Koffeinkonzentration kontinuierlich an und erreichte nach sechs Stunden eine maximale Mediankonzentration von 1,1 µg/ml (erstes Quartil: 0,6 µg/ml, drittes Quartil: 1,3 µg/ml).

Bei allen drei Kurven konnten signifikante Unterschiede im Kurvenverlauf, insbesondere bezüglich des Zeitpunktes, der Form und der Höhe des Maximums, beobachtet werden, wobei im Areal mit verschlossenen Haarfollikeln am wenigsten Koffein nachgewiesen werden konnte. Die Standardabweichungen innerhalb der Hautareale mit offenen Haarfollikeln waren insbesondere innerhalb der ersten Stunde höher als im Hautareal mit geschlossenen Haarfollikeln.

Wie Abbildung 10 b) zu entnehmen ist, zeigte sich bei der Messung der Koffeinkonzentration in den homogenisierten Dermis-Proben, dass nach 22 Stunden in den Arealen ohne Follikelverschluss signifikant mehr Koffein in die Dermis gelangen konnte als in Arealen mit Follikelverschluss. [3]

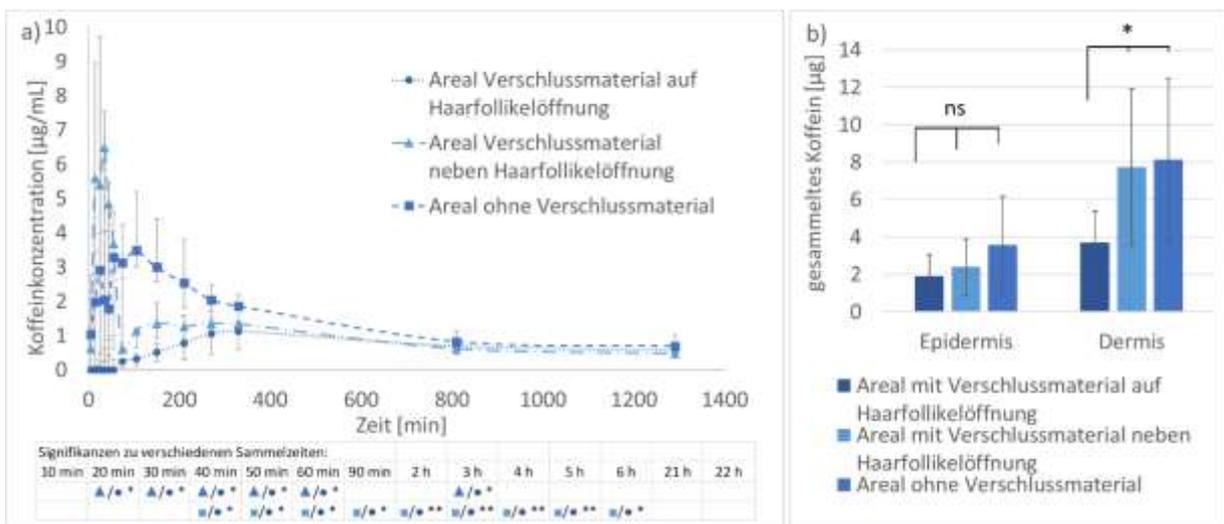


Abbildung 10: In beiden Abbildungen werden Areale mit Verschlussmaterial auf der Haarfollikelöffnung, neben der Haarfollikelöffnung und ohne Verschlussmaterial verglichen. (a) Diagramm des zeitlichen Verlaufs der Koffeinkonzentration (Median ± ein Quartil). Graphische Darstellung (b) des Mittelwerts und der Standardabweichung des Koffeins, das aus den verschiedenen Hautschichten des homogenisierten Gewebes nach 22 Stunden extrahiert wurde. Unterschiede zwischen zwei Bereichen von  $p < 0,05$  wurden als signifikant angesehen (\*); Unterschiede von  $p < 0,01$  galten als hoch signifikant (\*\*).  $n = 9$ . (Eigene Abbildung in Anlehnung an [3])

### 3.4 Alternatives Kontrollareal

Innerhalb der Penetrationsstudie traten Unterschiede in Form und Höhe des Maximums der Koffeinkonzentration zwischen den beiden Arealen ohne Follikelverschluss auf. Der Mechanismus, der sich hinter dieser Beobachtung verbirgt, konnte durch die zusätzlichen Untersuchungen zur chemischen und mechanischen Penetrationsverstärkung nicht schlüssig geklärt werden. Um die Notwendigkeit des Auftragens eines Verschlussmaterials im Kontrollareal zu vermeiden, wurde ermittelt, welche Flächenreduktion das Auftragen des Verschlussmaterials beim Follikelverschluss bewirkt, um in Zukunft von vornherein entsprechend verkleinerte Kontrollareale verwenden zu können. Hierfür wurde auf drei Schweineohren in insgesamt 62 Hautarealen der Follikelverschluss durchgeführt und die durch das Verschlussmaterial bedeckte Fläche ermittelt.

Es konnte ein Zusammenhang zwischen der Anzahl der Punkte auf einem standardisierten 1 x 1 cm großen Areal und der durchschnittlichen Größe der einzelnen Punkte gefunden werden. Es wurde eine Korrelationskurve zwischen der Anzahl der Punkte und dem Prozentsatz der abgedeckten Fläche erstellt. Anhand der Korrelationskurve konnte auf Basis der Anzahl der verschlossenen Follikel bestimmt werden, wieviel Prozent der Fläche vom Verschlussmaterial bedeckt war. Hieraus ließ sich der prozentuale Anteil der durch das Verschlussmaterial verschlossenen Fläche bestimmen, wodurch eine um diese Fläche entsprechende Verkleinerung des Kontrollareals ermöglicht wurde. [3]

## 4 Diskussion

Im Rahmen der vorliegenden Doktorarbeit wurde zunächst die dermale Mikrodialyse am Schweineohrhautmodell etabliert. Um die erste Hypothese zu überprüfen, nämlich ob die dermale Mikrodialyse am Schweineohrhautmodell eine valide Methode ist, um die Penetration von topisch applizierten Substanzen zu erfassen, wurde nach Abschluss der Probeentnahme mittels Mikrodialyse als Vergleichsmethode das entsprechende Hautareal exzidiert, die Hautschichten wurden separiert, homogenisiert und auf ihren Koffeingehalt analysiert. Hierbei wurde insbesondere die Korrelation der Mikrodialyseergebnisse mit dem Koffeingehalt der Dermis betrachtet. Bei allen Experimenten konnten die durch die Mikrodialyse ermittelten Daten durch die Vergleichsmethode bestätigt werden. Zeigten die Mikrodialysedaten, unabhängig von der Kinetik, eine erhöhte Koffeinpenetration, so konnte auch aus der Dermis mehr Koffein extrahiert werden.

Des Weiteren wurde geprüft, ob Penetrationseffekte, die auf den Haarfollikel zurückgeführt werden und durch In-vivo-Untersuchungen bekannt sind, auch bei der dermalen Mikrodialyse am Schweineohrhautmodell beobachtet werden können. Hierfür wurde zunächst die Penetration von einer Koffein-Nanokristall-Formulierung mit derjenigen eines Koffein-Gels verglichen. Ein solcher Vergleich war bis zu diesem Zeitpunkt noch nicht in vivo durchgeführt worden. In der Theorie wurde allerdings eine deutlich erhöhte Koffeinpenetration in denjenigen Arealen erwartet, in denen die Koffein-Nanokristall-Formulierung appliziert worden war. Grund dafür ist die erhöhte follikuläre Penetration von partikularen Substanzen. Die Nanokristalle lagen mit einer mittleren Größe von etwa 530 nm in einem Bereich, der für eine gute Penetration in den Haarfollikel bekannt ist [12]. Da die Formulierungen sich im Koffeingehalt deutlich unterschieden und die höher konzentrierte Formulierung zusätzlich noch Nanokristalle enthielt, war eine deutlich verstärkte Penetration der partikulären Formulierung zu erwarten. Bei dem zum Vergleich eingesetzten Gel handelte es sich um eine gesättigte Formulierung, sodass es nicht möglich war, hier eine höhere Konzentration bei gleicher Formulierungsbasis zu wählen. Die Erwartung, dass in Arealen, die mit dem Koffein-Nanokristall-Gel behandelt wurden, deutlich mehr Koffein in die Dermis und somit auch in das Mikrodialyse-Dialysat gelangen würde als in Arealen, in denen das Koffein-Gel aufgetragen wurde, bestätigte sich.

Döge et al. [25] führten 2016 eine ähnliche Mikrodialysestudie an exzidiertem Humanhaut durch, in der ein Vergleich zwischen einer Dexamethason-Nanokristall-Gelformulierung und einer Dexamethason-Cremeformulierung erfolgte. Die Dexamethason-Konzentration im Dialysat betrug nach 12 Stunden etwa das 5-Fache bei Applikation des Nanokristallgels im Vergleich zur Creme. Stellt man diese Ergebnisse den im Rahmen dieser Dissertation generierten Daten gegenüber, so fällt auf, dass beim Vergleich der Koffein-Formulierungen zum selben Zeitpunkt die Koffeinkonzentration der partikulären Formulierung etwa 15-fach über der nicht partikulären

Formulierung lag. Für die Abweichungen zwischen den beiden Studien – 5-fache im Vergleich zu 15-facher Erhöhung der Wirkstoff-Konzentration – gibt es verschiedene Erklärungsansätze. Einerseits waren die Partikel in der Studie von Döge et al. [25] kleiner und somit nicht optimal für die folliculäre Penetration geeignet. Andererseits kam exzidierte Humanhaut zum Einsatz, die ein um bis zu 90% reduziertes folliculäres Reservoir im Vergleich zu In-vivo-Humanhaut aufweist [6]. Des Weiteren war in der Studie von Döge et al. [25] kein Konzentrationsgefälle zwischen partikulärer und nicht partikulärer Formulierung vorhanden, was sicher einen nicht zu vernachlässigenden Einfluss auf die in der Höhe abweichenden Ergebnisse hatte. Die Studienergebnisse widersprechen sich dennoch nicht, sondern zeigen beide einen klaren Vorteil des Einsatzes partikulärer Formulierungen. Aus den vorliegenden Daten kann somit geschlossen werden, dass durch die Verwendung einer nanopartikulären Formulierung eine höhere Bioverfügbarkeit beobachtet werden kann als bei Verwendung einer nicht partikulären Formulierung, wodurch Hypothese 2a bestätigt werden kann.

Die zweite Penetrationsstudie wurde analog der In-vivo-Studie von Breuckmann et al. [14] durchgeführt. Es wurde die Penetration von zwei Koffein-Nanokristall-Formulierungen unterschiedlicher Größe verglichen. In der Studie von Breuckmann et al. [14] wurden die beiden Koffein-Nanokristall-Formulierungen in vivo am Menschen in einem festgelegten Areal aufgetragen. Anhand von Blutanalysen wurde ermittelt, ab wann das aufgetragene Koffein systemisch verfügbar wurde. Die In-vivo-Studie konnte insgesamt im Verlauf von fünf Tagen eine um 82% höhere Bioverfügbarkeit beim Einsatz der größeren, etwa 700 nm großen Koffein-Nanokristalle beobachten als bei den kleineren, etwa 200 nm großen Koffein-Nanokristallen. Als Ursache hierfür wurde die tiefere folliculäre Penetration der größeren Nanokristalle vermutet, die somit in Bereiche des Haarfollikels mit reduzierter Barrierefunktion vordringen und auf diese Weise das Koffein schneller und effektiver in das lebende Gewebe einbringen [34]. Um diesen Effekt auch ex vivo darstellen zu können, bedurfte es eines Hautmodells, das die folliculäre und transfolliculäre Penetration mit abbilden konnte. Es wurden die gleichen Koffein-Nanokristall-Formulierungen wie in der Studie von Breuckmann et al. [14] verwendet, jedoch wurde als Hautmodell das Schweineohr und zur Probengewinnung die dermale Mikrodialyse gewählt. Analog zur Studie von Breuckmann et al. [14] konnte beobachtet werden, dass bei den größeren Nanokristallen eine höhere Koffeinkonzentration mittels dermalen Mikrodialyse gesammelt werden konnte als bei den 200 nm großen Koffein-Nanokristallen. Somit konnte auch Hypothese 2b bestätigt werden.

Anhand des Vergleichs der Koffeinkonzentrationen, die einerseits durch das Homogenisieren und andererseits durch die Mikrodialyse gewonnen wurden, aber auch durch den Vergleich der Ergebnisse mit bereits publizierten Daten konnte die Validität der dermalen Mikrodialyse am Ex-vivo-Schweineohrhautmodell nachgewiesen werden. Es konnten somit auch die Hauptthese (1), dass die dermale Mikrodialyse am Schweineohrhautmodell eine valide Methode ist, um die

Penetration von topisch applizierten Substanzen zu erfassen, sowie die erste Nebenthese (2), dass Penetrationseffekte, die auf den Haarfollikel zurückgeführt werden, durch die dermale Mikrodialyse abgebildet werden können, bestätigt werden.

Da eine weitere Hauptaufgabe dieser Arbeit war, eine Methode zu entwickeln, die den Einfluss des Haarfollikels auf die Penetration bestimmen kann, sollte das bestehende experimentelle Setup der Mikrodialyse am Schweineohrhautmodell mit dem selektiven Follikelverschluss kombiniert werden. Aufgrund der Unsicherheit, ob das Platzieren eines Punktes des Verschlussmaterials neben jeden Haarfollikel im Kontrollareal einen Einfluss auf die Penetration ausübt, wurde dies in einem ersten Schritt untersucht. Des Weiteren wurde die Sicherheit des Follikelverschlusses mit dem Verschlussmaterial geprüft. Die Ergebnisse zur Sicherheit des Follikelverschlusses zeigten, dass der Einsatz eines lösungsmittelfreien Nagellackes nicht geeignet war, da dieser die follikuläre Penetration nicht ausreichend verhindern konnte. Der lösungsmittelhaltige Nagellack zeigte im Gegensatz dazu eine effektive Blockierung des Haarfollikels als Penetrationsweg. Lediglich bei starker Massage konnte kein sicherer Ausschluss der follikulären Penetration gewährleistet werden. Grund für die beobachteten Unterschiede könnten die abweichenden mikroskopischen Strukturen der Nagellacke sein. Auf den mikroskopischen Bildern zeigte sich, dass das aufgetragene Fluoreszein-HEC-Gel teils in Mikrorisse des lösungsmittelfreien Lackes penetrierte, was unabhängig von der Applikationstechnik zu einem ineffizienten Verschluss führte. Das Fehlen von Lösungsmitteln, die für eine verbesserte Qualität der getrockneten Lackoberfläche unerlässlich sind [39], könnte diese Beobachtung erklären. Hypothese 3a, dass durch Auftragen von lösungsmittelhaltigem Nagellack als Verschlussmaterial in Form von kleinen Punkten auf eine Haarfollikelöffnung kein topisch applizierter Modellwirkstoff in den Haarfollikel gelangen kann, konnte somit für die vorsichtige Applikation bestätigt werden. Hypothese 3b muss hingegen verworfen werden, da der lösungsmittelfreie Nagellack nicht in der Lage war, die follikuläre Penetration von topisch applizierten Substanzen zu verhindern.

Es ist bekannt, dass Lösungsmittel zu einer lockeren Packung der Stratum-corneum-Lipide [40] und damit zu einer Störung der Hautbarriere führen kann. Es wurde daher der lösungsmittelhaltige Nagellack untersucht, ob dieser möglicherweise penetrationsfördernde Wirkungen im Bereich angrenzender Hautareale ausüben könnte. Dies konnte mittels der verwendeten Methode jedoch nicht gezeigt werden. Eine mögliche Erklärung, warum durch das verwendete Lösungsmittel in diesem Fall keine wie von Friend et al. [40] beschriebene Barriestörung aufgetreten ist, könnte die in der aktuellen Studie geringere Expositionszeit der Haut gegenüber dem Lösungsmittel sein.

Als ein weiterer möglicher Mechanismus, der eine follikuläre Penetration nach Nagellackapplikation begünstigen könnte, wurde das Trocknen des Nagellackes auf der Hautoberfläche vermutet. Durch das Trocknen könnte sich der Lack zusammenziehen und

dadurch die danebenliegenden Follikelöffnungen weiten, was ebenfalls zu einer Penetrationsverstärkung führen könnte. Dieser Einfluss konnte im Rahmen der vorliegenden Studie nicht bestätigt, aber auch nicht sicher ausgeschlossen werden. Die über die Zeit beobachteten Änderungen des Durchmessers des trocknenden Nagellackes lagen innerhalb der Unsicherheit des verwendeten mikroskopischen Aufbaus. Da für das Auftreten des vermuteten Effekts auch Änderungen, die sich unterhalb dieser Unsicherheit befinden, ausreichen würden, konnte auf Basis der hier durchgeführten Untersuchungen nicht sicher ausgeschlossen werden, dass eine Größenreduktion des Lackes auf der Haut erfolgte, was wiederum eine Vergrößerung der Haarfollikelöffnung zur Folge hätte haben können. Basierend auf den hier durchgeführten Untersuchungen gab es keine Hinweise darauf, dass der selektive Follikelverschluss nicht von in vivo auf ex vivo übertragen werden kann. Es konnte weder beobachtet werden, dass an lösungsmittelhaltigen Nagellack angrenzende Areale eine höhere Penetration von topisch applizierten Substanzen aufwiesen, noch dass Nagellacktropfen, die im Kontrollareal beim selektiven Follikelverschluss aufgetragen wurden, nach dem Trocknen auf der Hautoberfläche einen reduzierten Durchmesser umfassten.

Bei der Studie zur Kombination des selektiven Follikelverschlusses mit der Mikrodialyse am Schweineohrhautmodell wurden zwei Kontrollareale mitgeführt, sodass drei Areale pro Schweineohr untersucht wurden. Im Testareal erfolgte der Follikelverschluss mittels Nagellack, im Kontrollareal 1 eine Flächenreduktion durch das Verschlussmaterial, indem neben jeden Haarfollikel ein Punkt gesetzt wurde, und das Kontrollareal 2 wurde ohne jegliche Applikation des Verschlussmaterials betrachtet. Wenn die Haarfollikel verschlossen waren, war der Wirkstoff erst zu einem späteren Zeitpunkt und in geringerer Menge bioverfügbar. Diese Ergebnisse korrelierten gut mit den Daten einer In-vivo-Studie von Otberg et al. 2008, die den Einsatz des selektiven Follikelverschlusses thematisierte [30]. Auch hier konnte bei offenen Haarfollikeln ein schnellerer und höherer Anstieg der Koffeinkonzentration im Blut festgestellt werden. Somit war es durch den Einsatz der Mikrodialyse am Ex-vivo-Schweineohrhautmodell möglich, den gleichen Effekt wie in der In-vivo-Studie zu beobachten. Es kann also auch die Hypothese 2c bestätigt werden, dass die Mikrodialyse ein geeignetes Verfahren ist, um nachzuweisen, dass bei verschlossenen Haarfollikeln erst später und weniger des Modellwirkstoffs bioverfügbar ist.

Darüber hinaus fiel auf, dass die Penetrationskinetik in den beiden Kontrollarealen nicht identisch war. In dem Areal, in dem das Verschlussmaterial neben den Haarfollikeln aufgetragen worden war, konnte ein früheres und höheres Konzentrationsmaximum des Koffeins beobachtet werden als in dem Areal ohne jegliche Applikation von Verschlussmaterial. Diese Beobachtung suggeriert, dass, obwohl in den Vorexperimenten keine durch den Nagellack induzierte Penetrationsverstärkung nachgewiesen werden konnte, ein nagellackspezifischer Einfluss vorhanden sein muss. Es stellte sich somit die Frage nach der Ursache des beobachteten Unterschieds zwischen den beiden Kontrollarealen beziehungsweise nach der Möglichkeit, einen

potentiellen Einfluss des Verschlussmaterials für zukünftige Experimente auszuschließen. Hierfür wurde analysiert, wieviel Fläche je nach Anzahl der Haarfollikel durch den Follikelverschluss verdeckt wurde und um wieviel die Kantenlänge des Kontrollareals somit reduziert werden müsste, um die gleiche Applikationsfläche wie im Areal mit Follikelverschluss zu erhalten. Es wurde daher eine Anpassung des Kontrollareals für Ex-vivo-Untersuchungen mit selektivem Follikelverschluss durchgeführt. Hypothese 3c muss somit verworfen werden.

Für die Gesamtbewertung der dermalen Mikrodialyse am Schweineohrhautmodell kann festgehalten werden, dass alle zu erwartenden Effekte, die aufgrund der bisherigen Datenlage auf die follikuläre Penetration zurückgeführt wurden, ähnlich wie in der In-vivo-Situation beobachtet werden konnten. Des Weiteren bestand eine gute Korrelation zwischen den aus der Dermis extrahierten und den durch die Mikrodialyse gesammelten Koffeinkonzentrationen. Allerdings müssen bei der dermalen Mikrodialyse am Schweineohr und der Interpretation der gewonnenen Daten einige Aspekte beachtet werden. Die durch die dermale Mikrodialyse gewonnenen zeitlichen Konzentrationsverläufe repräsentieren stets nur einen kleinen Bereich, der sich direkt um die Membran befindet. Es kann somit zu deutlichen Abweichungen zwischen den unterschiedlichen Proben kommen, obwohl sie der gleichen Gruppe (z. B. Areal ohne Follikelverschluss) angehören. Betrachtet man den oberen Bereich der Dermis mikroskopisch, wird schnell klar, dass eine eingeführte Membran nicht immer von identischen Strukturen umgeben ist. Insbesondere die Hautanhangsgebilde sorgen für eine Heterogenität in der Tiefe, in der die Mikrodialyse-Membran eingebracht wird. Dies ist von besonderer Relevanz, wenn Untersuchungen durchgeführt werden, bei denen mit einer erhöhten follikulären Penetration zu rechnen ist. Es ist möglich, dass die Dialysemembran in einem Areal näher an einem Haarfollikel platziert ist als in einem Areal der gleichen Gruppe auf einem anderen Schweineohr. Durch den geringeren Abstand zwischen Haarfollikel und Mikrodialysemembran ist eine veränderte Kinetik (früherer und höherer Anstieg) zu erwarten als in einem Areal mit einem größeren Abstand zwischen den beiden Komponenten. Die starken Schwankungen, die insbesondere zu Beginn der Sammelzeit in Arealen mit offenen Haarfollikeln beobachtet wurden, könnten hierdurch erklärt werden. Ausführlich wurden diese Zusammenhänge in der 2020 erschienenen Publikation diskutiert [3].

Nichtsdestotrotz bietet die dermale Mikrodialyse durch die Kombination mit dem Follikelverschluss eine Möglichkeit, die transfollikuläre Penetration selektiv zu bestimmen. Durch die parallele Analyse des in der Dermis absorbierten Koffeins gelingt neben der auf ein kleines Areal begrenzten Konzentrationsanalyse auch eine Betrachtung der in der gesamten Fläche vorhandenen Absorption. Der große Vorteil der dermalen Mikrodialyse liegt darin, dass diese erlaubt, ex vivo einen Einblick in die Penetrationskinetik von topisch applizierten Substanzen zu erhalten, der auch den Anteil der transfollikulären Penetration mitberücksichtigt.

Die dermale Mikrodialyse am Schweineohrhautmodell ist somit eine valide Methode, um die Penetration von topisch applizierten Substanzen unter Berücksichtigung des transfollikulären Penetrationswegs ex vivo zu untersuchen. Im Vergleich zu In-vivo-Penetrationsstudien, wie sie zuvor bei vergleichbaren Untersuchungen durchgeführt wurden [14,30], kann dies verschiedene Vorteile haben. Bei beiden Studien wurde die Konzentration des topisch applizierten Modellwirkstoffes im Blut untersucht. Sowohl die sehr aufwendige Blutanalyse für den Nachweis des Modellwirkstoffs, eventuelle ethische Bedenken durch den Einsatz anderer Modellwirkstoffe als auch die Tatsache, dass die Zielstruktur vieler topisch applizierter Substanzen nicht das Blut, sondern die Dermis ist, zeigen die Vorteile der dermalen Mikrodialyse am Schweineohrhautmodell auf.

## 5. Zusammenfassung und Ausblick

Die dermale Mikrodialyse am Schweineohrhautmodell konnte als eine Methode etabliert werden, die es ermöglicht, den Einfluss des transfollikulären Penetrationswegs mit zu berücksichtigen. Durch die Kombination mit dem selektiven Follikelverschluss ist es zudem gelungen, den transfollikulären Penetrationsweg auszuschließen und somit seinen Einfluss indirekt zu ermitteln. Der Aufbau des Kontrollareals bei solchen Untersuchungen wurde genauer beleuchtet. In Zukunft kann durch diese Betrachtungen die Größe des Kontrollareals von Beginn an entsprechend der durch den Follikelverschluss auftretenden Flächenreduktion verkleinert werden.

Beim Einsatz des Follikelverschlusses sollte in Zukunft stets vor den Untersuchungen getestet werden, ob Verschlussmaterial, zu applizierende Formulierung und Applikationsmethode miteinander kompatibel sind und nicht letztlich zur Aufhebung eines sicheren Follikelverschlusses führen.

Die bisherigen Messungen zur Penetration wurden ausschließlich mit dem Modellwirkstoff Koffein durchgeführt. Damit die Methode eine klinische Relevanz erlangt, ist es notwendig, sie auch für andere Wirkstoffe zu etablieren. Eine Herausforderung für die Mikrodialyse stellen insbesondere lipophile und große Moleküle dar; hier ist nicht immer eine ausreichende Permeabilität der Membran gegeben. Klinisch relevante Substanzen können zum Beispiel antiinflammatorische Stoffe sein, die in Form von Nanokristallen oder mit Hilfe anderer Nanopartikel gezielt in den Haarfollikel penetrieren und von dort die Wirkstoffe in das lebende Gewebe und an ihren Zielort penetrieren könnten.

Übertragbar ist die Methode der Mikrodialyse am Schweineohrhautmodell prinzipiell für jedes Molekül, das in ausreichender Menge aus dem Gewebe durch die Membran in das Perfusat penetriert und für das eine ausreichend sensitive Analytik zur Verfügung steht.

## 6 Literaturverzeichnis

1. Klein, A.L.; Lubda, M.; Specht, D.; Pyo, S.-M.; Busch, L.; Lademann, J.; Meinke, M.C.; Beckers, I.; von Hagen, J.; Keck, C.M.; Patzelt, A.; Microdialysis on ex vivo porcine ear skin can validly study dermal penetration including the fraction of transfollicular penetration - demonstrated on caffeine nanocrystals. *Nanomaterials* **2021**.
2. Klein, A.L.; Lubda, M.; Taghavi, P.A.; Lademann, J.; Beckers, I.; von Hagen, J.; Kolmar, H.; Patzelt, A. Solvent-containing closure material can be used to prevent follicular penetration of caffeine and fluorescein sodium salt on porcine ear skin. *Skin Pharmacology and Physiology* **2020**, 1-9.
3. Klein, A.L.; Lubda, M.; Skov, P.S.; Vogt, A.; Keck, C.M.; Lademann, J.; Beckers, I.; von Hagen, J.; Patzelt, A. Investigation of transfollicular caffeine penetration using microdialysis on ex vivo porcine ear skin. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **2020**, 157, 1-8.
4. Hadgraft, J.; Lane, M.E. Advanced topical formulations (ATF). *Int J Pharm* **2016**, 514, 52-57, doi:10.1016/j.ijpharm.2016.05.065.
5. McGrath, J.A.; Eady, R.A.J.; Pope, F.M. Chapter 3 Anatomy and Organization of Human Skin. 2004.
6. Patzelt, A.; Richter, H.; Buettemeyer, R.; Huber, H.J.; Blume-Peytavi, U.; Sterry, W.; Lademann, J. Differential stripping demonstrates a significant reduction of the hair follicle reservoir in vitro compared to in vivo. *Eur J Pharm Biopharm* **2008**, 70, 234-238, doi:10.1016/j.ejpb.2008.02.024.
7. Patzelt, A.; Mak, W.C.; Jung, S.; Knorr, F.; Meinke, M.C.; Richter, H.; Rühl, E.; Cheung, K.Y.; Tran, N.B.N.N.; Lademann, J. Do nanoparticles have a future in dermal drug delivery? *Journal of Controlled Release* **2017**, 246, 174-182, doi:https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2016.09.015.
8. Matsui, T.; Amagai, M. Dissecting the formation, structure and barrier function of the stratum corneum. *International immunology* **2015**, 27, 269-280, doi:10.1093/intimm/dxv013.
9. Bouwstra, J.A.; Ponc, M. The skin barrier in healthy and diseased state. *Biochimica et biophysica acta* **2006**, 1758, 2080-2095, doi:10.1016/j.bbamem.2006.06.021.
10. Paus, R.; Foitzik, K. In search of the "hair cycle clock": a guided tour. *Differentiation; research in biological diversity* **2004**, 72, 489-511, doi:10.1111/j.1432-0436.2004.07209004.x.
11. Krause, K.; Foitzik, K. Biology of the hair follicle: the basics. *Seminars in cutaneous medicine and surgery* **2006**, 25, 2-10, doi:10.1016/j.sder.2006.01.002.

12. Patzelt, A.; Richter, H.; Knorr, F.; Schafer, U.; Lehr, C.M.; Dahne, L.; Sterry, W.; Lademann, J. Selective follicular targeting by modification of the particle sizes. *J Control Release* **2011**, *150*, 45-48, doi:10.1016/j.jconrel.2010.11.015.
13. Radtke, M.; Patzelt, A.; Knorr, F.; Lademann, J.; Netz, R.R. Ratchet effect for nanoparticle transport in hair follicles. *Eur J Pharm Biopharm* **2017**, *116*, 125-130, doi:10.1016/j.ejpb.2016.10.005.
14. Breuckmann, P.; Meinke, M.C.; Jaenicke, T.; Krutmann, J.; Rasulev, U.; Keck, C.M.; Muller, R.H.; Klein, A.L.; Lademann, J.; Patzelt, A. Influence of nanocrystal size on the in vivo absorption kinetics of caffeine after topical application. *Eur J Pharm Biopharm* **2021**, *167*, 57-64, doi:10.1016/j.ejpb.2021.07.006.
15. Zorn-Kruppa, M.; Vidal-Y-Sy, S.; Houdek, P.; Wladykowski, E.; Grzybowski, S.; Gruber, R.; Gorzelanny, C.; Harcup, J.; Schneider, S.W.; Majumdar, A.; Brandner, J.M.. Tight Junction barriers in human hair follicles - role of claudin-1. *Sci Rep* **2018**, *8*, 12800-12800, doi:10.1038/s41598-018-30341-9.
16. Vogt, A.; Blume-Peytavi, U. Biology of the human hair follicle. New knowledge and the clinical significance. *Hautarzt* **2003**, *54*, 692-698, doi:10.1007/s00105-003-0562-x.
17. Otberg, N.; Richter, H.; Schaefer, H.; Blume-Peytavi, U.; Sterry, W.; Lademann, J. Variations of Hair Follicle Size and Distribution in Different Body Sites. *Journal of Investigative Dermatology* **2004**, *122*, 14-19, doi:https://doi.org/10.1046/j.0022-202X.2003.22110.x.
18. Bito, L.; Davson, H.; Levin, E.e.; Murray, M.; Snider, N. The concentrations of free amino acids and other electrolytes in cerebrospinal fluid, in vivo dialysate of brain, and blood plasma of the dog. *Journal of neurochemistry* **1966**, *13*, 1057-1067.
19. Anderson, C.; Andersson, T.; Molander, M. Ethanol absorption across human skin measured by in vivo microdialysis technique. *Acta dermato-venereologica* **1991**, *71*, 389-393.
20. Cross, S.E.; Anderson, C.; Roberts, M.S. Topical penetration of commercial salicylate esters and salts using human isolated skin and clinical microdialysis studies. *British journal of clinical pharmacology* **1998**, *46*, 29-35.
21. Boelsma, E.; Anderson, C.; Karlsson, A.M.; Ponec, M.J.P.r. Microdialysis technique as a method to study the percutaneous penetration of methyl nicotinate through excised human skin, reconstructed epidermis, and human skin in vivo. **2000**, *17*, 141-147.
22. Leveque, N.; Muret, P.; Makki, S.; Mac-Mary, S.; Kantelip, J.P.; Humbert, P. Ex vivo cutaneous absorption assessment of a stabilized ascorbic acid formulation using a microdialysis system. *Skin Pharmacol Physiol* **2004**, *17*, 298-303, doi:10.1159/000081115.
23. Holmgaard, R.; Benfeldt, E.; Bangsgaard, N.; Sorensen, J.A.; Broesen, K.; Nielsen, F.; Nielsen, J.B. Probe depth matters in dermal microdialysis sampling of benzoic acid after

- topical application: an ex vivo study in human skin. *Skin Pharmacol Physiol* **2012**, *25*, 9-16, doi:10.1159/000330491.
24. Holmgaard, R.; Benfeldt, E.; Nielsen, J.B.; Gatschelhofer, C.; Sorensen, J.A.; Hofferer, C.; Bodenlenz, M.; Pieber, T.R.; Sinner, F. Comparison of open-flow microperfusion and microdialysis methodologies when sampling topically applied fentanyl and benzoic acid in human dermis ex vivo. *Pharmaceutical research* **2012**, *29*, 1808-1820, doi:10.1007/s11095-012-0705-9.
  25. Döge, N.; Hönzke, S.; Schumacher, F.; Balzus, B.; Colombo, M.; Hadam, S.; Rancan, F.; Blume-Peytavi, U.; Schäfer-Korting, M.; Schindler, A. Ethyl cellulose nanocarriers and nanocrystals differentially deliver dexamethasone into intact, tape-stripped or sodium lauryl sulfate-exposed ex vivo human skin-assessment by intradermal microdialysis and extraction from the different skin layers. *Journal of Controlled Release* **2016**, *242*, 25-34.
  26. Mangelsdorf, S.; Vergou, T.; Sterry, W.; Lademann, J.; Patzelt, A. Comparative study of hair follicle morphology in eight mammalian species and humans. *Skin Research Technology* **2014**, *20*, 147-154.
  27. Herbig, M.E.; Houdek, P.; Gorissen, S.; Zorn-Kruppa, M.; Wladykowski, E.; Volksdorf, T.; Grzybowski, S.; Kolios, G.; Willers, C.; Mallwitz, H.; Moll, I.; Brandner, J.M. A custom tailored model to investigate skin penetration in porcine skin and its comparison with human skin. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **2015**, *95*, 99-109, doi:https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2015.03.030.
  28. Zambrano, A.; Klein, A.L.; Patzelt, A. Analysis of the morphometric parameters of pig ear hair follicles. *Skin Research and Technology* **2021**, doi:10.1111/srt.13008.
  29. Teichmann, A.; Otberg, N.; Jacobi, U.; Sterry, W.; Lademann, J. Follicular penetration: development of a method to block the follicles selectively against the penetration of topically applied substances. *J Skin Pharmacology and Physiology* **2006**, *19*, 216-223.
  30. Otberg, N.; Patzelt, A.; Rasulev, U.; Hagemeister, T.; Linscheid, M.; Sinkgraven, R.; Sterry, W.; Lademann, J. The role of hair follicles in the percutaneous absorption of caffeine. *British Journal of Clinical Pharmacology* **2008**, *65*, 488-492, doi:10.1111/j.1365-2125.2007.03065.x.
  31. Liu, X.; Grice, J.E.; Lademann, J.; Otberg, N.; Trauer, S.; Patzelt, A.; Roberts, M.S. Hair follicles contribute significantly to penetration through human skin only at times soon after application as a solvent deposited solid in man. *Br J Clin Pharmacol* **2011**, *72*, 768-774, doi:10.1111/j.1365-2125.2011.04022.x.
  32. Horita, D.; Yoshimoto, M.; Todo, H.; Sugibayashi, K. Analysis of hair follicle penetration of lidocaine and fluorescein isothiocyanate-dextran 4 kDa using hair follicle-plugging method. *Drug development and industrial pharmacy* **2014**, *40*, 345-351, doi:10.3109/03639045.2012.762653.
  33. Labouta, H.I.; Schneider, M. Interaction of inorganic nanoparticles with the skin barrier: current status and critical review. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine* **2013**, *9*, 39-54, doi:https://doi.org/10.1016/j.nano.2012.04.004.

34. Patzelt, A.; Lademann, J. Drug delivery to hair follicles. *Expert Opinion on Drug Delivery* **2013**, *10*, 787-797, doi:10.1517/17425247.2013.776038.
35. Vogt, A.; Combadiere, B.; Hadam, S.; Stieler, K.M.; Lademann, J.; Schaefer, H.; Autran, B.; Sterry, W.; Blume-Peytavi, U. 40 nm, but not 750 or 1,500 nm, nanoparticles enter epidermal CD1a+ cells after transcutaneous application on human skin. *The Journal of investigative dermatology* **2006**, *126*, 1316-1322, doi:10.1038/sj.jid.5700226.
36. Lademann, J.; Richter, H.; Knorr, F.; Patzelt, A.; Darvin, M.E.; Ruhl, E.; Cheung, K.Y.; Lai, K.K.; Renneberg, R.; Mak, W.C. Triggered release of model drug from AuNP-doped BSA nanocarriers in hair follicles using IRA radiation. *Acta biomaterialia* **2016**, *30*, 388-396, doi:10.1016/j.actbio.2015.11.052.
37. Luo, L.; Lane, M.E. Topical and transdermal delivery of caffeine. *International Journal of Pharmaceutics* **2015**, *490*, 155-164.
38. Trauer, S.; Lademann, J.; Knorr, F.; Richter, H.; Liebsch, M.; Rozycki, C.; Balizs, G.; Büttemeyer, R.; Linscheid, M.; Patzelt, A. Development of an in vitro modified skin absorption test for the investigation of the follicular penetration pathway of caffeine. *Skin Pharmacology and Physiology* **2010**, *23*, 320-327.
39. Graves, G.J., TC. Fast drying nail enamel composition and method. 1999.
40. Friend, D.; Catz, P.; Heller, J. Simple alkyl esters as skin permeation enhancers. *Journal of Controlled Release* **1989**, *9*, 33-41.

## 7 Eidesstattliche Versicherung und ausführliche Anteilserklärung

„Ich, Anna Lena Klein, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Etablierung der Mikrodialyse am Schweineohrhautmodell zur Untersuchung des Einflusses des Haarfollikels auf die Penetration von topisch applizierten Substanzen“ / „Establishment of dermal microdialysis on porcine ear skin to investigate the influence of the hair follicle on the penetration of topically applied substances“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren/innen beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) werden von mir verantwortet.

Ich versichere ferner, dass ich die in Zusammenarbeit mit anderen Personen generierten Daten, Datenauswertungen und Schlussfolgerungen korrekt gekennzeichnet und meinen eigenen Beitrag sowie die Beiträge anderer Personen korrekt kenntlich gemacht habe (siehe Anteilserklärung). Texte oder Textteile, die gemeinsam mit anderen erstellt oder verwendet wurden, habe ich korrekt kenntlich gemacht.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit der Erstbetreuerin, angegeben sind. Für sämtliche im Rahmen der Dissertation entstandenen Publikationen wurden die Richtlinien des ICMJE (International Committee of Medical Journal Editors; [www.icmje.org](http://www.icmje.org)) zur Autorenschaft eingehalten. Ich erkläre ferner, dass ich mich zur Einhaltung der Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis verpflichte.

Weiterhin versichere ich, dass ich diese Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits an einer anderen Fakultät eingereicht habe.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§§156, 161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

## Anteilerklärung an den erfolgten Publikationen

Anna Lena Klein hatte folgenden Anteil an den folgenden Publikationen:

Publikation 1: Anna Lena Klein, Markus Lubda, David Specht, Sung-Min Pyo, Loris Busch, Jürgen Lademann, Martina C. Meinke, Ingeborg Beckers, Jörg von Hagen, Cornelia M. Keck, Alexa Patzelt; Microdialysis on ex vivo porcine ear skin can validly study dermal penetration including the fraction of transfollicular penetration – demonstrated on caffeine nanocrystals, Nanomaterials, 2021

- Konzeption
- Durchführung aller Messungen (ausgenommen: Charakterisierung der Formulierungen und HPLC-Analytik; teilweise: 90 % der Probenaufbereitung)
- Statistische Auswertung
- Datenanalyse und Bewertung der Ergebnisse
- Erstellung aller Grafiken, Abbildungen, Tabellen (ausgenommen Tabelle 1)
- Verfassung des Manuskripts (ausgenommen HPLC-Methodik und Formulations: Caffeine Nanocrystals & Saturated Caffeine Gel; teilweise: 75 % der Einleitung)
- Kommunikation mit dem Journal bei der Einreichung und Hauptverantwortlichkeit für die Revision

Publikation 2: Anna Lena Klein, Markus Lubda, Paniz Akbarzadeh Taghavi, Jürgen Lademann, Ingeborg Beckers, Jörg von Hagen, Harald Kolmar, Alexa Patzelt; Solvent containing closure material can be used to prevent follicular penetration of caffeine and fluorescein sodium salt on porcine ear skin, Skin Pharmacology and Physiology, 2020 (hier liegt eine geteilte Erstautorenschaft vor)

- Konzeption
- Durchführung aller Messungen (ausgenommen: HPLC-Analytik, Anfertigung der Follikelschnitte und Laserscanning Mikroskopie)
- Statistische Auswertung
- Datenanalyse und Bewertung der Ergebnisse
- Erstellung aller Grafiken, Abbildungen
- Verfassung des Manuskripts (ausgenommen: HPLC-Methodik; teilweise: 50 % der Einleitung; 75 % der Ergebnisse und Diskussion)
- Kommunikation mit dem Journal bei der Einreichung und Hauptverantwortlichkeit für die Revision

Publikation 3: Anna Lena Klein, Markus Lubda, Per Stahl Skov, Annika Vogt, Cornelia M. Keck, Jürgen Lademann, Ingeborg Beckers, Jörg von Hagen, Alexa Patzelt; Investigation of transfollicular caffeine penetration using microdialysis on ex vivo porcine ear skin, European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 2020

- Konzeption
- Durchführung aller Messungen (ausgenommen HPLC-Analytik)
- Statistische Auswertung
- Datenanalyse und Bewertung der Ergebnisse
- Erstellung aller Grafiken, Abbildungen, Tabellen
- Verfassung des Manuskripts (ausgenommen: HPLC-Methodik)
- Kommunikation mit dem Journal bei der Einreichung und Hauptverantwortlichkeit für die Revision

---

Unterschrift, Datum und Stempel der erstbetreuenden Hochschullehrerin

---

Unterschrift der Doktorandin

## 8 Druckexemplare der ausgewählten Publikationen

**Klein, AL**, Lubda, M, Specht, D, Pyo, SM, Busch, L., Lademann, J, Meinke. MC, Beckers, I, von Hagen, J, Keck, CM, Patzelt, A (2021). *Microdialysis on Ex Vivo Porcine Ear Skin Can Validly Study Dermal Penetration including the Fraction of Transfollicular Penetration - Demonstrated on Caffeine Nanocrystals*. *Nanomaterials*, 11(9), 2387.

### Abstract:

Common ex vivo methods for penetration investigations often fail to monitor transfollicular penetration appropriately. In the present investigation, the validity of dermal microdialysis on the ex vivo porcine ear skin to investigate penetration kinetics including transfollicular penetration was studied. In setup A, a caffeine nanocrystal formulation was compared to a non-particular caffeine gel formulation. In setup B, two caffeine nanocrystal formulations of different sizes (200 nm, 19 700 nm) were compared to each other. Microdialysis samples were collected for 46 h. After sampling, the skin layers were separated, homogenized, and caffeine was quantified in all samples. In setup A the area under the curve (AUC) after crystal gel formulation application was 12 times higher than after non-particular formulation application. Setup B showed an increased AUC of 42 % in the microdialysis data when the 700 nm caffeine crystals were applied compared to the 200 nm crystals. The microdialysis data was supported by the separation, homogenization and extraction data. Microdialysis performed on ex vivo porcine ear skin is a novel experimental setup. It is of high interest for further investigations since it is able to also capture the impact of follicular and transfollicular penetration kinetics as no other ex vivo setup can.

Nanomaterials IF (2020) 5,076, "MATERIALS SCIENCE, MULTIDISCIPLINARY" 103/333

Journal Data Filtered By: **Selected JCR Year: 2020** Selected Editions: SCIE,SSCI  
 Selected Categories: **"MATERIALS SCIENCE, MULTIDISCIPLINARY"**  
 Selected Category Scheme: WoS  
**Gesamtanzahl: 333 Journale**

Rank	Full Journal Title	Total Cites	Journal Impact Factor	Eigenfactor Score
1	Nature Reviews Materials	19,887	66.308	0.056770
2	Nature Energy	28,166	60.858	0.080070
3	NATURE MATERIALS	112,429	43.841	0.130050
4	Joule	17,275	41.248	0.046240
5	PROGRESS IN MATERIALS SCIENCE	21,332	39.580	0.018870
6	Nature Nanotechnology	75,845	39.213	0.106790
7	MATERIALS SCIENCE & ENGINEERING R-REPORTS	8,652	36.214	0.004770
8	Materials Today	20,082	31.041	0.022450
9	ADVANCED MATERIALS	320,972	30.849	0.431450
10	Advanced Energy Materials	93,801	29.368	0.169490
11	InfoMat	1,460	25.405	0.001930
12	ACS Energy Letters	30,194	23.101	0.072680
13	Nano Today	10,434	20.722	0.011020
14	INTERNATIONAL MATERIALS REVIEWS	7,219	19.559	0.004410
15	ADVANCED FUNCTIONAL MATERIALS	151,020	18.808	0.206450
16	Nano Energy	74,385	17.881	0.124640
17	Energy Storage Materials	17,077	17.789	0.028130
18	Advanced Science	27,067	16.806	0.054300
19	Nano-Micro Letters	5,972	16.419	0.007680
20	Annual Review of Materials Research	9,204	16.286	0.005300

Rank	Full Journal Title	Total Cites	Journal Impact Factor	Eigenfactor Score
21	ACS Nano	195,525	15.881	0.247420
22	Matter	2,357	15.589	0.003960
23	Energy & Environmental Materials	729	15.122	0.001110
24	Small Methods	7,188	14.188	0.014280
25	Small	77,926	13.281	0.105600
26	Materials Horizons	10,285	13.266	0.017970
27	Advances in Nano Research	1,164	13.052	0.001070
28	npj Flexible Electronics	810	12.740	0.001800
29	Journal of Materials Chemistry A	193,793	12.732	0.284810
30	npj Computational Materials	4,355	12.241	0.011910
31	CURRENT OPINION IN SOLID STATE & MATERIALS SCIENCE	4,756	11.354	0.003930
32	NANO LETTERS	177,909	11.189	0.206110
33	npj 2D Materials and Applications	1,480	11.106	0.004020
34	Additive Manufacturing	12,332	10.998	0.018440
35	Nanoscale Horizons	3,434	10.989	0.006200
36	CEMENT AND CONCRETE RESEARCH	51,010	10.933	0.022560
37	NPG Asia Materials	6,650	10.481	0.010190
38	CRITICAL REVIEWS IN SOLID STATE AND MATERIALS SCIENCES	2,120	10.367	0.001560
39	Applied Materials Today	5,423	10.041	0.008070
40	Advanced Optical Materials	20,693	9.926	0.039390
41	CHEMISTRY OF MATERIALS	124,153	9.811	0.130860
42	CARBON	97,509	9.594	0.078800

Selected JCR Year: 2020; Selected Categories: "MATERIALS SCIENCE, MULTIDISCIPLINARY"

Rank	Full Journal Title	Total Cites	Journal Impact Factor	Eigenfactor Score
43	Materials Today Physics	1,508	9.298	0.002970
44	ACS Applied Materials & Interfaces	274,703	9.229	0.391730
45	JOURNAL OF POWER SOURCES	140,819	9.127	0.105400
46	Nano Research	23,150	8.897	0.034050
47	Solar RRL	5,358	8.582	0.008720
48	Nano Convergence	1,339	8.526	0.002090
49	Nanophotonics	5,284	8.449	0.011210
50	ACS Materials Letters	1,188	8.312	0.002100
51	Materials Today Chemistry	1,760	8.301	0.002570
52	Science China-Materials	4,535	8.273	0.006100
53	ACTA MATERIALIA	96,608	8.203	0.083140
54	Materials Today Nano	569	8.109	0.000930
55	Virtual and Physical Prototyping	2,098	8.092	0.002500
56	SCIENCE AND TECHNOLOGY OF ADVANCED MATERIALS	6,886	8.090	0.005870
57	JOURNAL OF MATERIALS SCIENCE & TECHNOLOGY	13,679	8.067	0.014080
58	MATERIALS & DESIGN	71,936	7.991	0.069830
59	PROGRESS IN PHOTOVOLTAICS	8,252	7.953	0.008040
60	Advanced Materials Technologies	7,102	7.848	0.013960
60	Nanotechnology Reviews	1,785	7.848	0.001270
62	Nanoscale	127,279	7.790	0.171620
63	Materials Today Advances	258	7.579	0.000390
64	ACS Photonics	17,524	7.529	0.043940

Selected JCR Year: 2020; Selected Categories: "MATERIALS SCIENCE, MULTIDISCIPLINARY"

Rank	Full Journal Title	Total Cites	Journal Impact Factor	Eigenfactor Score
65	Journal of Materials Chemistry C	62,169	7.393	0.093710
66	Materials Research Letters	3,298	7.323	0.006370
67	Materials Today Energy	2,876	7.311	0.004840
68	Advanced Electronic Materials	9,527	7.295	0.020260
69	Current Opinion in Electrochemistry	3,368	7.271	0.006610
70	SOLAR ENERGY MATERIALS AND SOLAR CELLS	35,856	7.267	0.032440
71	CORROSION SCIENCE	51,405	7.205	0.025290
72	2D Materials	9,244	7.103	0.022420
73	Batteries & Supercaps	1,167	7.093	0.001810
74	INTERNATIONAL JOURNAL OF PLASTICITY	15,431	7.081	0.012310
75	Sustainable Materials and Technologies	1,540	7.053	0.001760
76	npj Quantum Materials	1,731	7.032	0.005450
77	MRS BULLETIN	9,042	6.578	0.006650
78	Materials Chemistry Frontiers	6,266	6.482	0.010660
79	Journal of Physical Chemistry Letters	60,161	6.475	0.101870
80	Journal of Materiomics	2,117	6.425	0.003710
81	Journal of Nanostructure in Chemistry	1,580	6.391	0.001350
82	Sustainable Energy & Fuels	6,125	6.367	0.010820
83	Advanced Sustainable Systems	1,476	6.271	0.002630
84	Liquid Crystals Reviews	315	6.214	0.000530
85	Advanced Materials Interfaces	13,656	6.147	0.024620
86	CONSTRUCTION AND BUILDING MATERIALS	123,941	6.141	0.098490

Rank	Full Journal Title	Total Cites	Journal Impact Factor	Eigenfactor Score
87	ACS Applied Energy Materials	12,740	6.024	0.023300
88	Journal of Physics-Energy	288	5.967	0.000380
89	npj Materials Degradation	714	5.900	0.001430
90	SCRIPTA MATERIALIA	41,275	5.611	0.034890
91	JOURNAL OF MATERIALS PROCESSING TECHNOLOGY	41,944	5.551	0.023010
92	JOURNAL OF THE MECHANICS AND PHYSICS OF SOLIDS	24,119	5.471	0.017540
93	Journal of Science-Advanced Materials and Devices	1,542	5.469	0.001940
94	APPLIED CLAY SCIENCE	23,333	5.467	0.016280
95	MICROPOROUS AND MESOPOROUS MATERIALS	33,234	5.455	0.021850
96	3D Printing and Additive Manufacturing	1,123	5.449	0.001670
97	JOURNAL OF ALLOYS AND COMPOUNDS	152,275	5.316	0.147970
98	MATERIALS SCIENCE AND ENGINEERING A-STRUCTURAL MATERIALS PROPERTIES MICROSTRUCTURE AND PROCESSING	102,263	5.234	0.060070
99	FlatChem	645	5.227	0.000980
100	INTERNATIONAL JOURNAL OF FATIGUE	20,746	5.186	0.015320
101	ACS Applied Nano Materials	9,727	5.097	0.014810
102	APL Materials	6,849	5.096	0.011970
103	Nanomaterials	23,676	5.076	0.028510
104	Journal of Materials Research and Technology-JMR&T	7,424	5.039	0.006040
105	INTERNATIONAL JOURNAL OF DAMAGE MECHANICS	2,336	5.029	0.001780
106	Molecular Systems Design & Engineering	1,416	4.935	0.002980



Article

# Microdialysis on Ex Vivo Porcine Ear Skin Can Validly Study Dermal Penetration including the Fraction of Transfollicular Penetration—Demonstrated on Caffeine Nanocrystals

Anna Lena Klein <sup>1,4</sup>, Markus Lubda <sup>2</sup>, David Specht <sup>3</sup>, Sung-Min Pyo <sup>4</sup>, Loris Busch <sup>1,3</sup>, Jürgen Lademann <sup>1</sup>, Martina C. Meinke <sup>1</sup>, Ingeborg Beckers <sup>5</sup>, Jörg von Hagen <sup>2</sup>, Cornelia M. Keck <sup>3</sup> and Alexa Patzelt <sup>1</sup>

- <sup>1</sup> Center of Experimental and Applied Cutaneous Physiology, Department of Dermatology Venerology and Allergy, Freie Universität Berlin, Humboldt-Universität zu Berlin, and Berlin Institute of Health, Charité—Universitätsmedizin, 10117 Berlin, Germany; loris.busch@charite.de (L.B.); juergen.lademann@charite.de (J.L.); martina.meinke@charite.de (M.C.M.); alexa.patzelt@charite.de (A.P.)
- <sup>2</sup> Merck KGaA, 64293 Darmstadt, Germany; markus.lubda@merckgroup.com (M.L.); joerg.von.hagen@merckgroup.com (J.v.H.)
- <sup>3</sup> Department of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, Philipps-Universität, 35037 Marburg, Germany; david.specht@pharmazie.uni-marburg.de (D.S.); ck@ckc-berlin.de (C.M.K.)
- <sup>4</sup> BASF SE, R&D Pharma Ingredients, 67063 Ludwigshafen, Germany; sung-min.pyo@basf.com
- <sup>5</sup> Department II, Beuth University of Applied Sciences, 13353 Berlin, Germany; beckers@beuth-hochschule.de
- \* Correspondence: anna-lena.klein@charite.de; Tel: +49-30-450-618-166



**Citation:** Klein, A.L.; Lubda, M.; Specht, D.; Pyo, S.-M.; Busch, L.; Lademann, J.; Meinke, M.C.; Beckers, I.; von Hagen, J.; Keck, C.M.; et al. Microdialysis on Ex Vivo Porcine Ear Skin Can Validly Study Dermal Penetration including the Fraction of Transfollicular Penetration—Demonstrated on Caffeine Nanocrystals. *Nanomaterials* **2021**, *11*, 2387. <https://doi.org/10.3390/nano11092387>

**Academic Editor:**  
Alicia Rodríguez-Gascón

**Received:** 2 August 2021  
**Accepted:** 9 September 2021  
**Published:** 14 September 2021

**Publisher's Note:** MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Copyright:** © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

**Abstract:** Common ex vivo methods for penetration investigations often fail to monitor transfollicular penetration appropriately. In the present investigation, the validity of dermal microdialysis on the ex vivo porcine ear skin to investigate penetration kinetics, including transfollicular penetration, was studied. In setup A, a caffeine nanocrystal formulation was compared to a non-particular caffeine gel formulation. In setup B, two caffeine nanocrystal formulations of different sizes (200 nm, 700 nm) were compared to each other. Microdialysis samples were collected for 46 h. After sampling, the skin layers were separated, homogenized, and caffeine was quantified in all samples. In setup A the area under the curve (AUC) after crystal gel formulation application was 12 times higher than after non-particular formulation application. Setup B showed an increased AUC of 42% in the microdialysis data when the 700 nm caffeine crystals were applied compared to the 200 nm crystals. The microdialysis data was supported by the separation, homogenization and extraction data. Microdialysis performed on ex vivo porcine ear skin is a novel experimental setup. It is of high interest for further investigations since it is able to also capture the impact of follicular and transfollicular penetration kinetics as no other ex vivo setup can.

**Keywords:** transfollicular penetration; microdialysis; IVIVC; caffeine; drug delivery system; nanotechnology

## 1. Introduction

New topical formulations promising improved drug delivery are constantly being developed. Often, ex vivo testing of new formulations is mandatory before an ethically acceptable in vivo study can be performed. The aim of ex vivo studies is always to replicate the in vivo situation as closely as possible. Optimally, the results of such studies are well comparable with the expected in vivo results. Methods that are used in the kinetic study of topically applied substances are the Franz diffusion cell and dermal microdialysis. However, the Franz diffusion cell is the most commonly used method for such investigations and is suitable for many kinds of penetration investigations [1,2]. There are great efforts to gain a fundamental understanding of the skin barrier. This is especially true when it comes to new developments in the field of nanotechnological products [3]. Mathematical models have already been used to describe many aspects of the

penetration of small lipophilic molecules. For macromolecules, however, the mathematical models postulate lower permeation than can be observed in experiments [4]. This could be due to follicular and transfollicular penetration, which could be more important for such molecules. The influence of the hair follicle at the penetration in the simulation could be shown by Kattou et al. [5]. When it comes to mimic follicular and transfollicular penetration *ex vivo*, dermal microdialysis becomes superior in comparison to Franz diffusion cell as discussed by Klein et al. [6]. This is particularly important for formulations that are designed to specifically utilize follicular and transfollicular penetration for increased drug delivery.

More precisely this is the case for formulations that use drug vehicles, such as nanocarriers, to increase the bioavailability of the active pharmaceutical ingredient (API). Nanocarriers above a size of 20–40 nm cannot pass an intact skin barrier, but deliver APIs to their target site and increase their bioavailability [7]. Thereby follicular penetration can be enhanced to create a depot of the drug within the hair follicle. It was shown that especially particulate nanosized structures penetrated well into the hair follicle, comparable to a mechanically driven transport process known as the ratchet effect [8]. The best results were achieved by using nanoparticles, with approximately 700 nm in diameter [9]. Recently it was shown that excipients can be used to control whether the API should preferably be delivered by passive diffusion or as a drug reservoir by depositing API in the hair follicles [10]. Inside the hair follicle, the drug can be released by, e.g., diffusion or several trigger mechanisms [11] so that the API can pass the intrafollicular barrier without its vehicle [12]. This represents an effective penetration pathway as the barrier function inside the hair follicle is physiologically reduced [10].

The *in vivo* efficiency of topical formulations that target the hair follicle and penetrate transdermally is easy to quantify by measuring plasma concentrations [13]. It is a greater challenge to determine drug concentrations in dermal tissue by routine methods *in vivo* as well as *ex vivo*. To investigate the penetration kinetics of a topically applied formulation *in vivo* dermal tissue dermal microdialysis is the method of choice [14]. Dermal microdialysis represents a method for extracting endogenous and exogenous substances from different tissues, which was first used in 1966 for neurological tissue examinations [15,16]. With the help of dermal microdialysis, the penetration behavior of numerous topically applied substances has already been investigated [17–19].

Since not all studies can be performed *in vivo*, a reliable *ex vivo* sampling method to investigate transfollicular penetration is required. Additionally, for *ex vivo* penetration studies, dermal microdialysis was used and is a promising tool to also determine the kinetical impact of the transfollicular penetration. Döge et al. [20] performed a penetration study on excised human skin by microdialysis. Here the penetration of dexamethasone nanocrystals was investigated and compared to a particle-free dexamethasone cream. An increased concentration of dexamethasone was collected at sites where the nanocrystal formulation had been applied. However, excised human skin is not a well-fitting skin model to investigate transfollicular penetration since in excised human skin, the elastic fibers around the hair follicle contract and therefore reduce the follicular reservoir [21].

It was shown that porcine ear skin is a well suitable skin model for penetration studies [22,23]. This becomes superior when it comes to the investigation of follicular and transfollicular penetration since the skin remains fixed on the cartilage. Klein et al. [6] recently showed that microdialysis performed on porcine ear skin is capable to monitor the transfollicular penetration kinetics of caffeine. To investigate the effect of transfollicular penetration, caffeine can be used as an API since previous *in vivo* and *ex vivo* studies showed that the follicular penetration pathway influences the penetration kinetics of caffeine [24,25]. Furthermore, the OECD guidelines recommend caffeine for skin penetration studies [26].

In the context of the present investigation, the validity of dermal microdialysis on the *ex vivo* porcine ear skin to investigate transfollicular penetration was studied in greater detail. The study at hand was focused on the formulation-based kinetic effects on the

penetration of caffeine and the correlation between particle size and bioavailability. Doing this, identical formulations as used in an in vivo study by Breuckmann et al. [13] were investigated as well as a comparable caffeine gel formulation. The separation of the skin layers, their homogenization and the extraction of the API from the tissue were performed for all areas that were investigated by dermal microdialysis and performed after 46 h. It was investigated to what extent an ex vivo microdialysis setup is able to mimic the in vivo situation. A large difference between the formulations in setup A was expected, while a comparably small difference was expected in setup B.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Materials

#### 2.1.1. Formulations: Caffeine Nanocrystals and Saturated Caffeine Gel

The different caffeine formulations (caffeine gel, caffeine nanocrystals of small and medium particle size) were produced according to previously developed protocols [27]. The gel contained 2.5% (*w/w*) caffeine (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) dissolved in a mixture of 30% ethanol (Fisher Scientific, Loughborough, UK) and 70% propylene glycol (Caesar & Lorentz GmbH, Hilden, Germany) to which 2% Carbopol® 981 (Lubrizol Advanced Materials Europe BVBA, Brussels, Belgium) was added while mixing with mortar and pestle to obtain a highly viscous gel [13].

The caffeine nanocrystals contained 20.0% (*w/w*) caffeine, and the dispersion medium was similar to that of the caffeine gel (mixture of 30% ethanol, 70% propylene glycol with 2% Carbopol® 981 as gelling agent). The nanocrystals were produced by adding coarse caffeine crystals to the gel phase. The mixture was high speed stirred (Ultra-Turrax T25 (Janke & Kunkel GmbH, Cologne, Germany) at 5000 rpm for 30 s, and the obtained pre-suspension was subjected to bead milling at 2000 rpm (PML 2, Bühler AG, Appenzell, Switzerland). Milling was performed in discontinuous mode in a small volume milling chamber with an active volume process zone of 222 mL. The bead size was (0.4–0.6) mm (Ytria stabilized zirconium oxide beads, Hosokawa Alpine, Augsburg, Germany), the suspension to bead ratio was 50:50 (*v/v*). The milling time was set to 15 min for the medium-sized caffeine nanocrystals and to 3 h for the small-sized nanocrystals [13,28]. The particle size and size distribution of the nanocrystals were determined by dynamic light scattering (DLS; Zetasizer Nano ZS, Malvern Panalytical Ltd., Malvern, UK). DLS analyses the diffusion constant *D* of the particles, which was used to calculate the hydrodynamic diameter (*z*-average) of the particles. In addition, the particle size distribution was estimated by calculation of the polydispersity index (PDI) and by converting the DLS size results into the median volume-weighted diameters *d*(*v*)0.1–*d*(*v*)0.9. The composition of the formulations and their physico-chemical properties are summarized in Table 1.

Table 1. Overview of the formulations used in the study.

Formulations	Composition	z-Average [nm]	PDI	<i>d</i> ( <i>v</i> )0.1 [nm] <i>d</i> ( <i>v</i> )0.5 [nm] <i>d</i> ( <i>v</i> )0.9 [nm]
caffeine gel	caffeine 2.5% ( <i>w/w</i> ) gel phase * add 100.0% ( <i>w/w</i> )	n.a. (formulation contained dissolved caffeine)		
caffeine nanocrystals (setup A)	caffeine 20.0% ( <i>w/w</i> ) gel phase * add 100.0% ( <i>w/w</i> )	535	0.66	351
				462
				609
caffeine nanocrystals small size (setup B)	caffeine 20.0% ( <i>w/w</i> ) gel phase * add 100.0% ( <i>w/w</i> )	178	0.59	176
				225
				288
caffeine nanocrystals medium size (setup B)	caffeine 20.0% ( <i>w/w</i> ) gel phase * add 100.0% ( <i>w/w</i> )	689	0.74	405
				531
				691

\* Gel phase consisted of 68.6% (*w/w*) propylene glycol, 29.4% (*w/w*) ethanol and 2.0% polyacrylate as gelling agent.

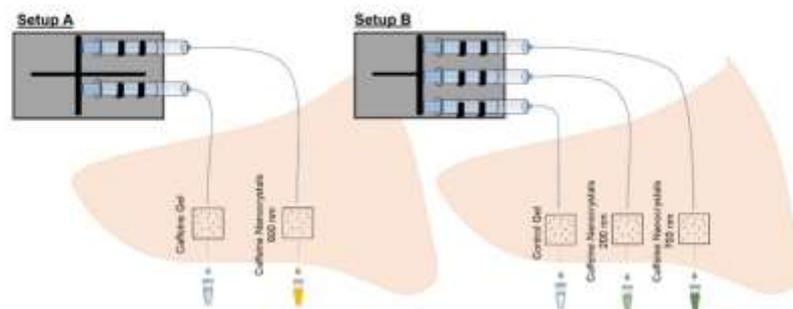
### 2.1.2. Skin Model: Porcine Ear Skin

All experiments were performed using *ex vivo* porcine ear skin (6-months old German domestic pigs) provided by a local slaughterhouse. The experiments were authorized by the Commission of Consumer Protection and Agriculture, District Dahme-Spreewald, Germany. After arrival, the porcine ears were cleaned with cold water, dried using paper towels, and stored at 8 °C in a hydrated chamber overnight. The next day, hairs were cut short, and the experiments were performed. The used porcine ears had an average follicular density of 12 follicles per cm<sup>2</sup> in the investigated areas in both setups.

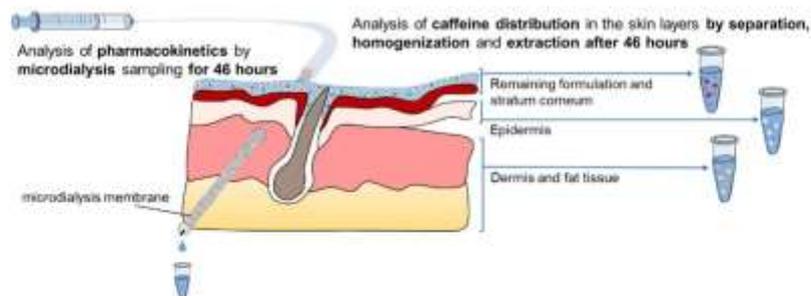
## 2.2. Methods

### 2.2.1. Experimental Setups

The study was separated into two setups. In setup A, a saturated caffeine gel formulation was compared to medium-sized caffeine nanocrystals which was expected to be superior to the gel formulation. Setup B monitored the influence of the nanocrystal size on the penetration by comparing two sizes of caffeine nanocrystals. In this setup, small nanocrystals of about 180 nm in size and medium particles of about 700 nm in size were used (c.f. Table 1). In setup B, the dispersion medium (gel phase) was used as a negative control formulation. The two setups of the study are illustrated in Figure 1. The overall penetration and the pharmacokinetics of the investigated formulations are monitored by separation, homogenization and extraction of the API after 46 h and dermal microdialysis for 46 h in both setups. Figure 2 shows the sampling methods.



**Figure 1.** Setup A: Two skin areas were prepared on each porcine ear. A gel formulation and nanocrystal gel formulation were applied. Setup B: Three skin areas were prepared on each porcine ear. A control formulation and formulations containing 200 nm nanocrystals and 700 nm nanocrystals were applied.



**Figure 2.** Dermal microdialysis and skin separation, homogenization and extraction were performed in parallel on the porcine ear skin. The dermal microdialysis is able to capture the pharmacokinetics of the applied formulations, while the skin separation, homogenization and extraction technique captures the caffeine distribution in the skin layers at one time point.

### 2.2.2. Skin Preparation and Application of Formulations

For each investigated site a  $1 \times 1 \text{ cm}^2$  area was prepared. A silicone barrier (WINDOW COLOR, Marabu GmbH & Co. KG, Bietigheim-Bissingen, Germany) was applied around the skin areas to prevent lateral spreading, according to Jacobi et al. [29]. A total of  $10 \mu\text{L}/\text{cm}^2$  of area-related formulation was applied to the skin area by a displacement pipette. A massage was executed by a glove-covered cotton swab for one minute using a massage frequency of approximately 5 Hz, as suggested by Busch et al. [30]. The tip of the pipette and the glove-covered cotton swab were collected in 1 mL phosphate-buffered saline (PBS; pH 7.4, sterile, VWR LIFE SCIENCE, Lutherville, UK) for caffeine extraction. The experiment was performed on five ears from various donors.

### 2.2.3. Dermal Microdialysis

Dermal microdialysis was used to analyze the caffeine concentration in dermal tissue. For this technique, a membrane is placed in the upper part of the dermis, constantly perfused and the perfusion medium is collected. The same material and general microdialysis setup as described by Klein et al. [6] were used. In setup A, the mean depth of the membrane was 0.32 mm with an average standard deviation of 0.05 mm while in setup B, this depth was 0.30 mm and the mean standard deviation was 0.06 mm.

Samples were collected over a period of 46 h with a total of 17 sampling times. At the beginning, the collection intervals were 10 min while at later times, they were larger and collection times up to 16 h apart. The exact intervals can be taken from Table 2. The area under the curve (AUC) was calculated based on the total caffeine collected in the dialysate within the collection time.

**Table 2.** Overview of microdialysis collection times.

Sample	Collection Time	Duration of Collecting
1	10 min	10 min
2	20 min	10 min
3	30 min	10 min
4	40 min	10 min
5	50 min	10 min
6	1 h	10 min
7	1.5 h	30 min
8	2 h	30 min
9	3 h	1 h
10	4 h	1 h
11	5 h	1 h
12	6 h	1 h
13	22 h	16 h
14	26 h	4 h
15	30 h	4 h
16	45 h	15 h
17	46 h	1 h

For the investigation of the recovered caffeine in the different skin layers, the overall collected caffeine by microdialysis was added to the collected caffeine in dermis since the membrane was placed in the upper part of the dermis.

### 2.2.4. Skin Separation, Homogenization and Extraction after 46 h

After 46 h, the skin layers were separated to analyze how much caffeine penetrated. The separation of the skin layers (tape stripping, heat separation [31]), the homogenization and extraction were performed similarly as in the study by Klein et al. [6]. The only difference between the protocols used was that in the present study, more tape strips had to be taken to remove the remaining formulation from the skin surface. All tapes were

included in the analysis. Thus, a total of 16 tapes were taken and extracted in 2 mL PBS. Furthermore, the samples were frozen until they were subjected to HPLC.

In order to determine the percentage of applied caffeine that can be recovered from the tissue, it was first measured how much caffeine of the different formulations is applied with the selected application method. For this purpose, each formulation was pipetted three times ( $n = 3$ ) into corresponding reaction vessel containing 1 mL PBS with the displacement pipette and dissolved including the formulation residues at the pipette tip. The resulting solutions were analyzed by HPLC.

#### 2.2.5. Determination of Caffeine by HPLC

The HPLC was conducted using a VWR-Hitachi ELITE LaChrom system (VWR, Darmstadt, Germany) and caffeine was quantitatively determined with a DAD I-2450 detection unit (VWR, Darmstadt, Germany) at a wavelength of 272 nm and 30 °C. A Chromolith® Performance RP-18e 100–4.6 mm (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) column was used as stationary phase and an isocratic gradient with 90% water (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) and 10% acetonitrile (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) as mobile phase at a flow rate of 2.0 mL/min. The samples were mixed in an autosampler screw vial (VWR, Darmstadt, Germany) and analyzed with an injection volume of 10 or 30 µL. An internal caffeine standard solution confirmed the linear quantification of caffeine and a calibration standard (0.5–250.0 µg/mL) in PBS buffer was determined with a linear regression conformation of  $R^2 > 0.99$  and an accepted variation of less than 2% accuracy.

#### 2.2.6. Statistical Analysis

The calculation of mean values and standard deviations of the penetration and corresponding statistical tests (t-test or Wilcoxon test depending on the normal distribution of the dataset), were carried out via SPSS® (Version 27, IBM Cooperation, New York, NY, USA). For  $p$ -values less than 0.05 the null hypothesis was rejected.

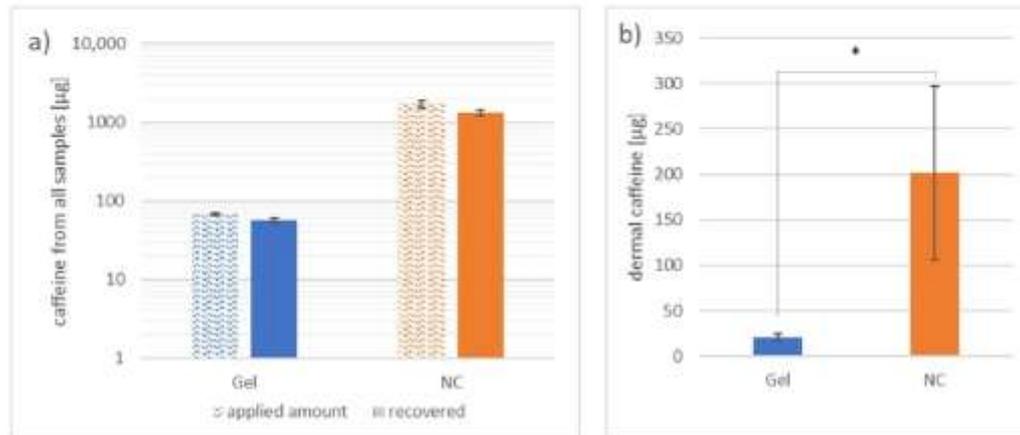
### 3. Results

#### 3.1. Setup A—Comparison of Caffeine Gel and Caffeine Nanocrystal Gel Formulation

##### 3.1.1. Investigation of Caffeine Distribution in the Skin Layers by Separation, Homogenization and Extraction after 46 h

On average, 84% of the total applied caffeine was recovered from all extracted samples from the skin areas with gel application. In areas where the nanocrystals were applied, 77% of the total applied formulation was recovered (Figure 3a). A 25 times higher amount of caffeine was applied on skin areas that were treated with the nanocrystal gel formulation.

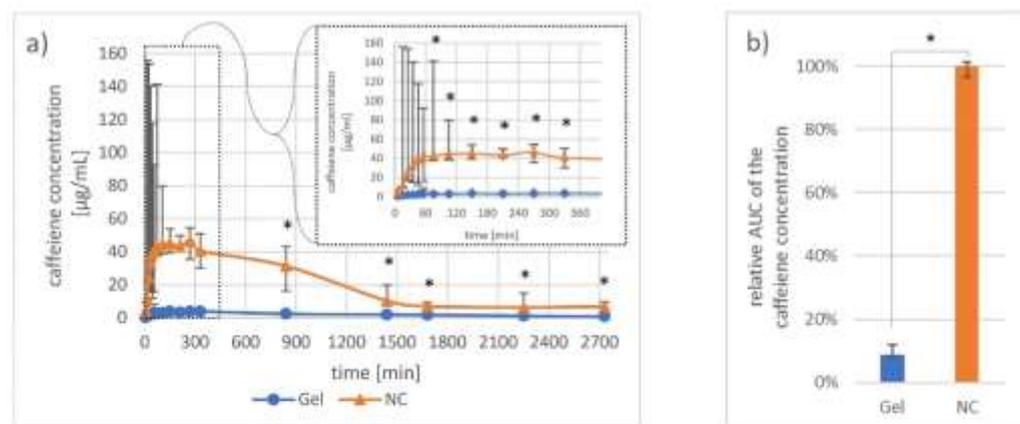
The caffeine obtained from the dermis, shown in Figure 3b, includes both the caffeine extracted from the dermal tissue by homogenization and the caffeine collected by microdialysis. While  $(21 \pm 4)$  µg caffeine was extracted from the dermal tissue in areas where the gel formulation was applied,  $(202 \pm 95)$  µg caffeine was extracted from the dermal tissue where the nanocrystals were applied ( $p < 0.05$ ).



**Figure 3.** Graph (a) shows the overall collected and extracted caffeine from areas where caffeine gel or caffeine nanocrystal gel formulation (NC) was applied in correlation to the total amount of caffeine applied on a logarithmic scale. Graph (b) presents the total amount extracted from the dermis by homogenization and microdialysis. Differences between the two areas of  $p < 0.05$  were considered significant (\*).  $n = 5$  (applied amount:  $n = 3$ ).

### 3.1.2. Investigation of Pharmacokinetics by Dermal Microdialysis for 46 h

After 10 min, caffeine was detectable in the dialysate from both formulations. However, the maximum mean caffeine concentration obtained from skin areas treated with the nanocrystal gel formulation was 11 times higher ( $46.5 \mu\text{g}/\text{mL}$ ) than the maximum mean caffeine concentration of the gel-treated skin areas ( $3.8 \mu\text{g}/\text{mL}$ ). Within the first hour, the mean caffeine concentration in the gel-treated skin areas increased to  $3.1 \mu\text{g}/\text{mL}$ , while skin areas treated with the nanocrystal gel formulation showed a mean caffeine concentration of  $40.1 \mu\text{g}/\text{mL}$ . After two hours, the differences between the two caffeine application forms always became significant (Figure 4a). Furthermore, the median AUC was 12 times larger for the nanocrystal gel formulation than for the gel formulation (Figure 4b),  $p < 0.05$ .

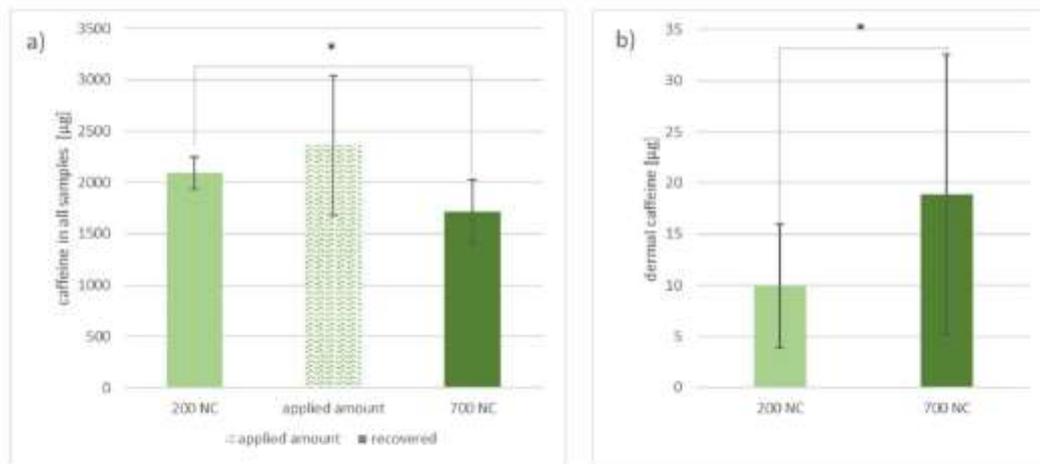


**Figure 4.** Graph (a) presents the median  $\pm$  one quartile caffeine concentration sampled by microdialysis from the two investigated areas on porcine ear skin compared at different time points. Graph (b) shows the median  $\pm$  one quartile area under the curve from the obtained caffeine concentration data. The gel- and the nanocrystal gel formulation (NC) were compared in both graphs. Differences between the two areas of  $p < 0.05$  were considered significant (\*).  $n = 5$ .

### 3.2. Setup B—Comparison of Two Sizes of Caffeine Nanocrystals

#### 3.2.1. Investigation of Caffeine Distribution in the Skin Layers by Separation, Homogenization and Extraction after 46 h

The total recovery rate of applied caffeine was 89% from skin areas where the 200 nm nanocrystals were applied, and 72% from the skin areas treated with 700 nm nanocrystals ( $p < 0.05$ ) (Figure 5a).

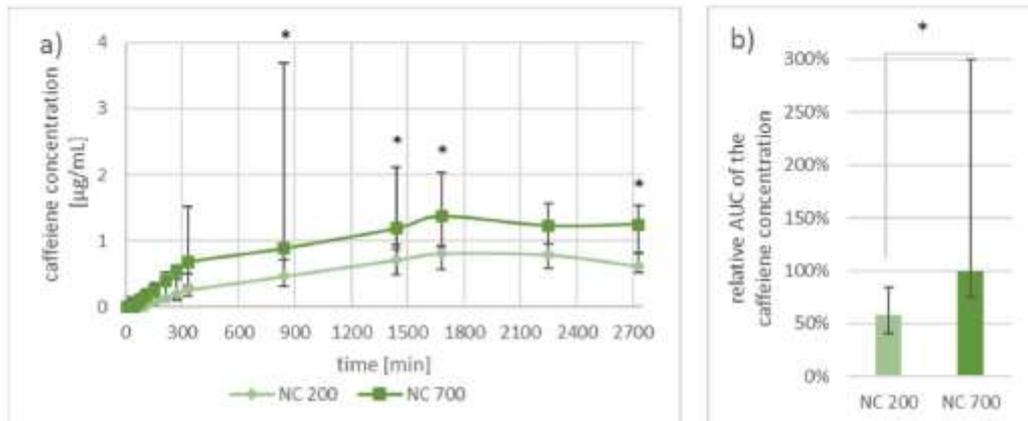


**Figure 5.** Graph (a) shows the overall collected and extracted caffeine from areas where either 200 nm nanocrystals (200 NC) or 700 nm nanocrystals (700 NC) were applied on porcine ear skin in correlation to the total amount of caffeine applied. Graph (b) presents the total amount extracted from the dermis by homogenization and microdialysis. Differences between the two areas of  $p < 0.05$  were considered significant (\*).  $n = 5$  (applied amount;  $n = 3$ ).

The amount of caffeine shown in Figure 5b includes caffeine extracted from the homogenized dermis and from the dermis by microdialysis. While  $(10 \pm 6)$  µg caffeine was extracted from the dermal tissue in areas where the 200 nm nanocrystal gel formulation was applied,  $(19 \pm 14)$  µg caffeine was extracted from the dermal tissue where the 700 nm nanocrystals were applied ( $p < 0.05$ ).

#### 3.2.2. Investigation of Pharmacokinetics by Dermal Microdialysis for 46 h

Both nanocrystal gel formulations showed a constantly slow rise of the caffeine concentration in the dialysate. At all times, the median concentration of caffeine was higher at skin areas where the 700 nm nanocrystals were applied. The maximal mean caffeine concentration was reached after collecting for 30 h (1800 min) and was 1.4 µg/mL for the 700 nm nanocrystals and 0.8 µg/mL for the 200 nm nanocrystals. After a collection time of 22 h (1320 min), the difference between the two nanocrystals is significant at all but one time points (Figure 6a). The median AUC of the 700 nm nanocrystals was 42% higher than the AUC of the 200 nm nanocrystals (Figure 6b,  $p < 0.05$ ).



**Figure 6.** Graph (a) presents the median  $\pm$  one quartile caffeine concentration sampled by microdialysis from the two investigated areas on porcine ear skin with 200 nm nanocrystals (200 NC) and 700 nm (700 NC) at different time points. Graph (b) shows the median  $\pm$  one quartile area under the curve from the obtained caffeine concentration data. Two nanocrystal gel formulations were compared to each other in both graphics. Differences between two areas of  $p < 0.05$  were considered as significant (\*).  $n = 5$ .

#### 4. Discussion

The present study investigated to what extent *ex vivo* dermal microdialysis on porcine ear skin is able to mimic an *in vivo* investigation. The penetration kinetics of topically applied caffeine formulations was investigated by microdialysis over 46 h. The separation of the skin layers, their homogenization and the extraction of the API from the tissue was also performed for all areas and performed after 46 h. In setup A, the caffeine penetration from a saturated caffeine gel formulation was compared to a caffeine nanocrystal gel formulation to investigate the general effect of using nanocrystals compared to a particle-free formulation when having the follicular pathway available. A large difference was expected in setup A when comparing a particle-free to a particle-containing formulation. The influence of the particle size on bioavailability was investigated in setup B. Two caffeine formulations containing nanocrystals of different sizes (200 nm and 700 nm) were compared. The induced effect was expected to be comparably small. Since the same formulations were used in an *in vivo* study, it is to determine how well an *ex vivo* microdialysis setup can mimic the *in vivo* situation.

The separation, homogenization and extraction data, as well as the microdialysis data from setup A, clearly demonstrate the advantage of using a particle-based formulation. More caffeine was collected in the microdialysis dialysate at every time point in areas where the nanocrystal gel formulation was applied. The AUC and the total extracted caffeine from the dermis were significantly higher at sites where the nanocrystal gel formulation was applied. It needs to be remembered that on the compared areas in setup A the amount of caffeine applied per area was not always the same. However, the applied gel formulation was saturated and therefore it would have been impossible to apply a greater amount of caffeine in the used gel base. The nanocrystals are therefore necessary to reach the desired increase in bioavailability.

Increased bioavailability of an applied API related to particle-based formulations was demonstrated before. For example, Döge et al. [20] compared a dexamethasone nanocrystal gel formulation (0.05% (*w/v*)) to a dexamethasone cream formulation (0.05% (*w/v*)) using dermal microdialysis on excised human skin. The impact of using nanocrystals was not as high as in the here presented study. The nanocrystals increased the concentration of dexamethasone approximately 5-fold in the dialysate after 12 h. In the present study, an

approximately 15-fold increase could be observed when comparing the nanocrystal gel formulation to the gel formulation at this time point. On the one hand, this could be due to the particle size since the particles Döge et al. used were 200 nm on average. Furthermore, another API was monitored, and other formulations (nanocrystal gel formulation vs. control formulation) were used in their study. On the other hand, the study was performed on excised human skin. Patzelt et al. [21] demonstrated that in excised human skin the elastic fibers around the hair follicle are contracted and therefore reduce the follicular reservoir by up to 90%. Overall, it can be stated that both, the here presented study and the study by Döge et al. [20], showed the advantage of using particle-based formulations. However, the data obtained on porcine ear skin showed the advantage of particles to a larger extent, probably since the particles could better penetrate the hair follicle on porcine ear skin than on excised human skin. Additionally, the other reported factors such as the different formulations (nanocrystal gel formulation vs. control formulation) and the different APIs could have supported the observed difference.

Abd et al. [32] compared two caffeine nanoemulsions to an aqueous caffeine control solution. The experiments were performed on Franz diffusion cells. In the Abd et al. study, a 36-fold and 42-fold increased caffeine permeation was shown over 24 h for the two nanoemulsions compared to the aqueous caffeine solution. The monitored increase in concentration was higher than the increase observed in the here presented study where the median AUC was increased 10 times, and the total caffeine in the dermis was on average 8 times higher than by using the gel formulation. A likely explanation for these differences could be the different methods used. While microdialysis was performed on intact porcine ear skin that was still attached to the cartilage, the Franz diffusion cell study required excision of the skin and removal of the fatty tissue underneath the dermis. Since hair follicles can reach deeply into the dermal tissue, the follicular barrier might be disrupted when preparing the human skin for Franz diffusion cell experiments [33,34]. If the follicular barrier is disturbed and a particulate substance is applied that uses the follicular pathway more than a non-particulate substance, it is comprehensible that the influence of a disturbed follicular barrier is more pronounced for the particulate formulation. Therefore, in the Franz diffusion cell study, the particles probably faced an even weaker barrier after penetrating into the hair follicle than in the present microdialysis study.

Even though various studies have already shown an influence of nanoparticles on penetration, this is the first ex vivo setup that is truly able to investigate transfollicular penetration without follicular contraction and potential barrier disruption by skin preparation.

When analyzing the AUC of the microdialysis data in setup B, it can be seen that more caffeine became bioavailable when the larger 700 nm caffeine nanocrystals were applied. In the in vivo study by Breuckmann et al. [13], the AUC was determined as well. There, an increase of 82% was achieved over 120 h when using the 700 nm nanocrystals instead of the 200 nm nanocrystals. In the present study, an increase of 72% was achieved over 48 h for the same scenario on ex vivo porcine ear skin. These results show that the used ex vivo setup is well comparable to the already performed in vivo study, especially when considering the different time frames and variation of methods.

The microdialysis data obtained from setup B showed that both nanocrystal sizes delivered caffeine in a similar kinetic curve. However, in the median, the absolutely collected caffeine was higher for the larger nanocrystals at every time point. The median AUC also showed that the larger nanoparticles were able to provide a higher bioavailability of the API. This result was expected in trend and in height since nanoparticles of the size around 700 nm were previously demonstrated to penetrate deeper into the hair follicles than smaller nanoparticles [9].

Furthermore, the total uptake of caffeine in the dermis (extracted from the homogenized dermis and microdialysis dialysates) is obviously a good argument for using the larger nanoparticles to enhance the transport of caffeine to dermal tissue. In addition to the observation that more caffeine could be found in the dermis after the application of the large nanocrystals, another interesting information could be obtained from the homoge-

nization data. It was analyzed how much of the total applied caffeine could be recovered. Since the same procedure was used for the separation, homogenization, and extraction of caffeine from the tissue in the areas of both nanocrystal sizes, it should be assumed that the same amount of caffeine can be extracted. Contrary to this assumption, significantly less caffeine was recovered in areas where the large nanocrystals were applied. This difference in recovery could be attributed to the fact that the setup used is an open system. It is known that caffeine can penetrate transdermally [35]. Therefore, it can be assumed that the lower recovery of caffeine in sites where the large nanocrystals were applied is correlated to an overall higher penetration and therefore also a higher transdermal penetration. This supports the advantage of using large nanocrystals.

## 5. Conclusions

In the framework of the present study, we were able to show a higher dermal bioavailability of caffeine when applied in nanocrystalline form. Furthermore, a higher dermal bioavailability was obtained with 700 nm nanocrystals in comparison to 200 nm nanocrystals. Overall, it can be stated that the expected correlation in bioavailability between the nanocrystal's sizes on the one hand, and between nanocrystals and caffeine gel formulation on the other hand, could be monitored by microdialysis itself. The respective data could be supported by the separation, homogenization, and extraction method. Therefore, it can be concluded that microdialysis performed on porcine ear skin is a valid *ex vivo* tool to investigate dermal and transfollicular penetration of topically applied formulations. Results obtained by the presented method are well comparable to *in vivo* data as well as to other *ex vivo* methods that are less suitable for transfollicular investigation than the method presented here. The method's outstanding and novel character is that it initially can capture the impact of follicular and transfollicular penetration on the overall penetration in an *ex vivo* setup. By keeping the skin on the cartilage, no shrinking of the follicles is induced, and the bottoms of the hair follicles are not cut off as can happen when performing penetration studies using Franz diffusion cells.

**Author Contributions:** Conceptualization, A.L.K., J.L., M.C.M., C.M.K., A.P.; methodology, A.L.K., M.L., D.S., S.-M.P., L.B., M.C.M., C.M.K., A.P.; validation, A.L.K., M.L., D.S., S.-M.P., L.B., J.L., M.C.M., I.B., J.v.H., C.M.K., A.P.; formal analysis, A.L.K., M.L., D.S., S.-M.P., L.B., J.L., M.C.M., I.B., J.v.H., C.M.K., A.P.; investigation, A.L.K., M.L., D.S., S.-M.P., L.B.; resources, J.L., M.C.M., I.B., J.v.H., C.M.K., A.P.; data curation, J.L., M.C.M., I.B., S.-M.P., J.v.H., C.M.K., A.P.; writing—original draft preparation, A.L.K., M.L., D.S., L.B.; writing—review and editing, A.L.K., M.L., D.S., S.-M.P., L.B., J.L., M.C.M., I.B., J.v.H., C.M.K., A.P.; visualization, A.L.K.; supervision, J.L., M.C.M., I.B., J.v.H., C.M.K., A.P.; project administration, J.L., M.C.M., I.B., J.v.H., C.M.K., A.P.; funding acquisition, J.L., A.P., M.C.M., J.v.H. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** Merck KGaA funded this research.

**Institutional Review Board Statement:** The experiments were authorized by the Commission of Consumer Protection and Agriculture, District Dahme-Spreewald, Germany.

**Informed Consent Statement:** Not applicable.

**Data Availability Statement:** The data presented in this study are available in Table 1 as well as in Figures 3–6. Further data that support the findings of this study are available from the corresponding author upon reasonable request via email.

**Acknowledgments:** For the support in performing the experiments, we want to thank Heike Richter and Victor Hugo Pacagnelli Infante.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

## References

1. Franz, T.J. Percutaneous absorption on the relevance of *in vitro* data. *J. Invest. Dermatol.* **1975**, *64*, 190–195. [CrossRef]
2. Ng, S.F.; Rouse, J.J.; Sanderson, F.D.; Meidan, V.; Eccleston, G.M. Validation of a static Franz diffusion cell system for *in vitro* permeation studies. *AAPS PharmSciTech* **2010**, *11*, 1432–1441. [CrossRef] [PubMed]

3. Baroli, B. Penetration of nanoparticles and nanomaterials in the skin: Fiction or reality? *J. Pharm. Sci.* **2010**, *99*, 21–50. [[CrossRef](#)]
4. Mitragotri, S. Engineering approaches to transdermal drug delivery: A tribute to contributions of prof. Robert Langer. *Skin Pharmacol. Physiol.* **2013**, *26*, 263–276. [[CrossRef](#)]
5. Kattou, P.; Lian, G.; Glavin, S.; Sorrell, I.; Chen, T. Development of a two-dimensional model for predicting transdermal permeation with the follicular pathway: Demonstration with a caffeine study. *Pharm. Res.* **2017**, *34*, 2036–2048. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Klein, A.L.; Lubda, M.; Skov, P.S.; Vogt, A.; Keck, C.M.; Lademann, J.; Beckers, L.; von Hagen, J.; Patzelt, A. Investigation of transfollicular caffeine penetration using microdialysis on ex vivo porcine ear skin. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2020**, *157*, 1–8. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Patzelt, A.; Lademann, J. Recent advances in follicular drug delivery of nanoparticles. *Expert Opin. Drug Deliv.* **2020**, *17*, 49–60. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
8. Radtke, M.; Patzelt, A.; Knorr, F.; Lademann, J.; Netz, R.R. Ratchet effect for nanoparticle transport in hair follicles. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2017**, *116*, 125–130. [[CrossRef](#)]
9. Patzelt, A.; Richter, H.; Knorr, F.; Schäfer, U.; Lehr, C.-M.; Dähne, L.; Sterry, W.; Lademann, J. Selective follicular targeting by modification of the particle sizes. *J. Control. Release* **2011**, *150*, 45–48. [[CrossRef](#)]
10. Pelikh, O.; Keck, C.M. Hair follicle targeting and dermal drug delivery with curcumin drug nanocrystals—Essential influence of excipients. *Nanomaterials* **2020**, *10*, 2323. [[CrossRef](#)]
11. Patzelt, A.; Mak, W.C.; Jung, S.; Knorr, F.; Meinke, M.C.; Richter, H.; Rühl, E.; Cheung, K.Y.; Tran, N.B.N.N.; Lademann, J. Do nanoparticles have a future in dermal drug delivery? *J. Control. Release* **2017**, *246*, 174–182. [[CrossRef](#)]
12. Dong, P.; Sahle, F.; Lohan, S.; Saeidpour, S.; Albrecht, S.; Teutloff, C.; Bodmeier, R.; Unbehauen, M.; Wolff, C.; Haag, R.; et al. pH-sensitive Eudragit® L 100 nanoparticles promote cutaneous penetration and drug release on the skin. *J. Control. Release* **2018**, *295*. [[CrossRef](#)]
13. Breuckmann, P.; Meinke, M.C.; Jaenicke, T.; Krutmann, J.; Rasulev, U.; Keck, C.M.; Müller, R.H.; Klein, A.L.; Lademann, J.; Patzelt, A. Influence of nanocrystal size on the in vivo absorption kinetics of caffeine after topical application. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2021**. (under review). [[CrossRef](#)]
14. Kreilgaard, M. Assessment of cutaneous drug delivery using microdialysis. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2002**, *54*, S99–S121. [[CrossRef](#)]
15. Bito, L.; Davson, H.; Levin, E.; Murray, M.; Snider, N. The concentrations of free amino acids and other electrolytes in cerebrospinal fluid, in vivo dialysate of brain, and blood plasma of the dog. *J. Neurochem.* **1966**, *13*, 1057–1067. [[CrossRef](#)]
16. Anderson, C.; Andersson, T.; Molander, M. Ethanol absorption across human skin measured by in vivo microdialysis technique. *Acta Derm. Venereol.* **1991**, *71*, 389–393. [[PubMed](#)]
17. Müller, M.; Schmid, R.; Wagner, O.; Osten, B.v.; Shayganfar, H.; Eichler, H.G. In vivo characterization of transdermal drug transport by microdialysis. *J. Control. Release* **1995**, *37*, 49–57. [[CrossRef](#)]
18. Cross, S.E.; Anderson, C.; Roberts, M.S. Topical penetration of commercial salicylate esters and salts using human isolated skin and clinical microdialysis studies. *Br. J. Clin. Pharmacol.* **1998**, *46*, 29–35. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
19. Boutsiouki, P.; Thompson, J.P.; Clough, G.F. Effects of local blood flow on the percutaneous absorption of the organophosphorus compound malathion: A microdialysis study in man. *Arch. Toxicol.* **2001**, *75*, 321–328. [[CrossRef](#)]
20. Döge, N.; Hönzke, S.; Schumacher, F.; Balzus, B.; Colombo, M.; Hadam, S.; Rancan, F.; Blume-Peytavi, U.; Schäfer-Korting, M.; Schindler, A. Ethyl cellulose nanocarriers and nanocrystals differentially deliver dexamethasone into intact, tape-stripped or sodium lauryl sulfate-exposed ex vivo human skin—assessment by intradermal microdialysis and extraction from the different skin layers. *J. Control. Release* **2016**, *242*, 25–34. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
21. Patzelt, A.; Richter, H.; Bütttemeyer, R.; Huber, H.J.R.; Blume-Peytavi, U.; Sterry, W.; Lademann, J. Differential stripping demonstrates a significant reduction of the hair follicle reservoir in vitro compared to in vivo. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2008**, *70*, 234–238. [[CrossRef](#)]
22. Mangelsdorf, S.; Vergou, T.; Sterry, W.; Lademann, J.; Patzelt, A. Comparative study of hair follicle morphology in eight mammalian species and humans. *Ski. Res. Technol.* **2014**, *20*, 147–154. [[CrossRef](#)]
23. Zambrano, A.; Klein, A.; Patzelt, A. Analysis of the morphometric parameters of pig ear hair follicles. *Ski. Res. Technol.* **2021**. [[CrossRef](#)]
24. Otberg, N.; Patzelt, A.; Rasulev, U.; Hagemeister, T.; Linscheid, M.; Sinkgraven, R.; Sterry, W.; Lademann, J. The role of hair follicles in the percutaneous absorption of caffeine. *Br. J. Clin. Pharmacol.* **2008**, *65*, 488–492. [[CrossRef](#)]
25. Trauer, S.; Patzelt, A.; Otberg, N.; Knorr, F.; Rozycki, C.; Balizs, G.; Bütttemeyer, R.; Linscheid, M.; Liebsch, M.; Lademann, J. Permeation of topically applied caffeine through human skin—a comparison of in vivo and in vitro data. *Br. J. Clin. Pharmacol.* **2009**, *68*, 181–186. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. OECD. *Skin Absorption: In Vivo Method*; OCED: Paris, France, 2004.
27. Zhai, X.; Lademann, J.; Keck, C.M.; Müller, R.H. Nanocrystals of medium soluble actives—Novel concept for improved dermal delivery and production strategy. *Int. J. Pharm.* **2014**, *470*, 141–150. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Zhai, X.; Lademann, J.; Keck, C.M.; Müller, R.H. Dermal nanocrystals from medium soluble actives—Physical stability and stability affecting parameters. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2014**, *88*, 85–91. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
29. Jacobi, U.; Weigmann, H.-J.; Baumann, M.; Reiche, A.-I.; Sterry, W.; Lademann, J. Lateral spreading of topically applied UV filter substances investigated by tape stripping. *Ski. Pharmacol. Physiol.* **2004**, *17*, 17–22. [[CrossRef](#)]

30. Busch, L.; Keziban, Y.; Dähne, L.; Keck, C.; Meinke, M.; Lademann, J.; Patzelt, A. The impact of skin massage frequency on the intrafollicular transport of silica nanoparticles: Validation of the ratchet effect on an ex vivo porcine skin model. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2020**, *158*, 266–272. [[CrossRef](#)]
31. Baumberger, J.P. Methods for the separation of epidermis from dermis and some physiologic. *J. Biomed. Opt.* **1941**, *2*, 413.
32. Abd, E.; Benson, H.A.E.; Roberts, M.S.; Grice, J.E. Follicular penetration of caffeine from topically applied nanoemulsion formulations containing penetration enhancers: In vitro human skin studies. *Ski. Pharmacol. Physiol.* **2018**, 252–260. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Stahl, J.; Niedorf, F.; Wohlert, M.; Kietzmann, M. The in vitro use of the hair follicle closure technique to study the follicular and percutaneous permeation of topically applied drugs. *Altern. Lab. Anim.* **2012**, *40*, 51–57. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Patzelt, A.; Lademann, J. Drug delivery to hair follicles. *Expert Opin. Drug Deliv.* **2013**, *10*, 787–797. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Luo, L.; Lane, M.E. Topical and transdermal delivery of caffeine. *Int. J. Pharm.* **2015**, *490*, 155–164. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

**Klein, AL, Lubda, M, Taghavi, PA, Lademann, J, Beckers, I, von Hagen, J, Kolmar, H, Patzelt, A (2020).** Solvent-containing closure material can be used to prevent follicular penetration of caffeine and fluorescein sodium salt on porcine ear skin. *Skin Pharmacology and Physiology*, 1-9.

Abstract:

**Aim:** The skin represents a drug delivery portal. The establishment of a skin model capable of distinguishing between the follicular and intercellular penetration pathways remains a challenge. The study described herein was aimed at showing the influence of two nail varnishes as closure material and four application techniques to spread the active pharmaceutical ingredient (API) on a successful follicular closure without inducing penetration-enhancing effects. **Materials and Methods:** For all experiments, ex vivo porcine ear skin was used. In study design A, a standard and a solvent-free nail varnish were compared. It was tested whether the different application techniques (spreading with pipette, careful finger massage, 5-Hz finger massage, 5-Hz automatic massage) potentially destroy an intact follicular closure. Laser scanning microscopy imaging was used to measure if the model drug (fluorescein sodium salt) penetrated into the hair follicles. Study design B investigated how the penetration is affected when applying standard nail varnish containing solvents to skin. It was tested if the varnish blocks the API (caffeine) on completely covered areas and if adjacent areas show increased penetration. Furthermore, lateral diffusion of the API was investigated. After 20 h, the skin layers were separated by tape stripping and heat separation. The tissue samples were homogenized. Caffeine was quantified by chromatography. **Results:** In study design A, the standard nail varnish showed a secure follicular closure, while the solvent-free nail varnish was not able to prevent follicular penetration. Moreover, rapid application techniques were found to destroy an intact follicular closure. Only the two most gentle application techniques kept the follicular closing intact. In study design B, no caffeine was detected in both skin areas that were completely covered. Since no significant difference in caffeine penetration between the two uncovered groups was found, any influence of the applied closure material on adjacent areas was excluded. **Conclusion:** This study clearly demonstrates that a standard nail varnish in combination with a gentle application technique of the API provides a secure follicular closure. The presented study only investigated the closure for the substances caffeine and fluorescein sodium salt. The results might not be transferable to all kinds of APIs.

Skin Pharmacology and Physiology: IF (2018) 1,892, Ranking in "DERMATOLOGY" 35/66

Journal Data Filtered By: **Selected JCR Year: 2018** Selected Editions: SCIE,SSCI  
 Selected Categories: **"DERMATOLOGY"** Selected Category Scheme: WoS  
**Gesamtanzahl: 66 Journale**

Rank	Full Journal Title	Total Cites	Journal Impact Factor	Eigenfactor Score
1	JAMA Dermatology	4,578	7.995	0.021050
2	JOURNAL OF THE AMERICAN ACADEMY OF DERMATOLOGY	27,929	7.102	0.036590
3	BRITISH JOURNAL OF DERMATOLOGY	27,173	6.714	0.031730
4	JOURNAL OF INVESTIGATIVE DERMATOLOGY	30,038	6.290	0.036990
5	CONTACT DERMATITIS	5,478	5.504	0.003510
6	JOURNAL OF THE EUROPEAN ACADEMY OF DERMATOLOGY AND VENEREOLOGY	11,252	5.113	0.020730
7	Pigment Cell & Melanoma Research	4,249	4.172	0.006340
8	JOURNAL OF DERMATOLOGICAL SCIENCE	5,066	3.986	0.007150
9	JOURNAL DER DEUTSCHEN DERMATOLOGISCHEN GESELLSCHAFT	2,750	3.924	0.003550
10	AMERICAN JOURNAL OF CLINICAL DERMATOLOGY	2,574	3.840	0.004390
11	Advances in Wound Care	2,002	3.714	0.005730
12	Dermatology and Therapy	567	3.615	0.001900
13	ACTA DERMATO-VENEREOLOGICA	6,236	3.531	0.008890
14	JOURNAL OF DERMATOLOGY	4,944	3.377	0.008420
15	LASERS IN SURGERY AND MEDICINE	5,244	3.262	0.003720
16	EUROPEAN JOURNAL OF DERMATOLOGY	2,816	3.094	0.003600
17	MYCOSES	3,919	3.065	0.005380
18	Indian Journal of Dermatology Venereology & Leprology	2,007	3.030	0.002420
19	EXPERIMENTAL DERMATOLOGY	6,677	2.868	0.009800

Rank	Full Journal Title	Total Cites	Journal Impact Factor	Eigenfactor Score
20	WOUND REPAIR AND REGENERATION	5,808	2.850	0.006110
21	DERMATOLOGIC CLINICS	2,116	2.848	0.002960
22	Journal of Tissue Viability	607	2.831	0.000910
23	Dermatitis	1,092	2.630	0.001600
24	DERMATOLOGY	5,298	2.497	0.004890
25	Burns & Trauma	357	2.493	0.001060
26	International Wound Journal	2,906	2.385	0.005830
27	MELANOMA RESEARCH	2,300	2.381	0.004040
28	PHOTODERMATOLOGY PHOTOIMMUNOLOGY & PHOTOMEDICINE	1,482	2.328	0.001280
29	ARCHIVES OF DERMATOLOGICAL RESEARCH	3,867	2.309	0.003920
30	BURNS	7,923	2.247	0.007530
31	DERMATOLOGIC SURGERY	7,360	2.190	0.007530
32	JOURNAL OF DERMATOLOGICAL TREATMENT	2,063	2.112	0.003350
33	CLINICS IN DERMATOLOGY	3,631	2.067	0.003700
34	Journal of Wound Care	2,205	1.948	0.002840
35	SKIN PHARMACOLOGY AND PHYSIOLOGY	1,628	1.892	0.001150
36	VETERINARY DERMATOLOGY	1,988	1.800	0.002390
37	INTERNATIONAL JOURNAL OF DERMATOLOGY	7,484	1.794	0.008380
38	CLINICAL AND EXPERIMENTAL DERMATOLOGY	4,870	1.771	0.004140
39	Postepy Dermatologii i Alergologii	722	1.757	0.001720
40	Dermatologic Therapy	1,753	1.740	0.002070
41	AUSTRALASIAN JOURNAL OF DERMATOLOGY	1,690	1.701	0.002570

## Solvent-Containing Closure Material Can Be Used to Prevent Follicular Penetration of Caffeine and Fluorescein Sodium Salt on Porcine Ear Skin

Anna Lena Klein<sup>a</sup> Markus Lubda<sup>b</sup> Paniz Akbarzadeh Taghavi<sup>a, c</sup>  
Jürgen Lademann<sup>a</sup> Ingeborg Beckers<sup>c</sup> Jörg von Hagen<sup>b</sup> Harald Kolmar<sup>d</sup>  
Alexa Patzelt<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Charité – Universitätsmedizin Berlin, corporate member of Freie Universität Berlin, Humboldt-Universität zu Berlin, and Berlin Institute of Health, Department of Dermatology, Venereology, and Allergology, Center of Experimental and Applied Cutaneous Physiology, Berlin, Germany; <sup>b</sup>Merck KGaA, Darmstadt, Germany; <sup>c</sup>Beuth University of Applied Sciences Berlin, Berlin, Germany; <sup>d</sup>Technische Universität Darmstadt, Darmstadt, Germany

### Keywords

Follicular closing · Follicular penetration · Skin penetration · Laser scanning microscopy · Caffeine

### Abstract

**Aim:** The skin represents a drug delivery portal. The establishment of a skin model capable of distinguishing between the follicular and intercellular penetration pathways remains a challenge. The study described herein was aimed at showing the influence of two nail varnishes as closure material and four application techniques to spread the active pharmaceutical ingredient (API) on a successful follicular closure without inducing penetration-enhancing effects. **Materials and Methods:** For all experiments, ex vivo porcine ear skin was used. In study design A, a standard and a solvent-free nail varnish were compared. It was tested whether the different application techniques (spreading with pipette, careful finger massage, 5-Hz finger massage, 5-Hz automatic massage) potentially destroy an intact follicular closure. Laser scanning microscopy imaging was used to measure if the model drug (fluorescein sodium salt) penetrated into the

hair follicles. Study design B investigated how the penetration is affected when applying standard nail varnish containing solvents to skin. It was tested if the varnish blocks the API (caffeine) on completely covered areas and if adjacent areas show increased penetration. Furthermore, lateral diffusion of the API was investigated. After 20 h, the skin layers were separated by tape stripping and heat separation. The tissue samples were homogenized. Caffeine was quantified by chromatography. **Results:** In study design A, the standard nail varnish showed a secure follicular closure, while the solvent-free nail varnish was not able to prevent follicular penetration. Moreover, rapid application techniques were found to destroy an intact follicular closure. Only the two most gentle application techniques kept the follicular closing intact. In study design B, no caffeine was detected in both skin areas that were completely covered. Since no significant difference in caffeine penetration between the two uncovered groups was found, any influence of the applied closure material on adjacent areas was excluded. **Conclusion:** This

Anna Lena Klein and Markus Lubda share first authorship.

study clearly demonstrates that a standard nail varnish in combination with a gentle application technique of the API provides a secure follicular closure. The presented study only investigated the closure for the substances caffeine and fluorescein sodium salt. The results might not be transferable to all kinds of APIs.

© 2020 S. Karger AG, Basel

## Introduction

The skin is the physical barrier to our environment [1] and accounts for approximately 16% of the human body weight, with a surface area of around 2 m<sup>2</sup> in human adults [2]. Due to its strong barrier properties, the skin represents a challenging drug delivery portal, which requires appropriate technologies for successful dermal or transdermal drug delivery. There are three main delivery routes for a percutaneous permeation of targeted pharmacological molecules through this heterogeneous organ: (I) the intercellular, (II) the transcellular, and (III) the follicular penetration pathway. For follicular penetration, two distinct penetration routes are feasible, namely the intrafollicular and the transfollicular penetration pathway. While the intercellular penetration pathway has been investigated in detail, the role of follicular penetration for transdermal drug delivery has long been underestimated due to the small surface area of hair follicles on the skin [3, 4]. As the hair follicles are heterogeneously distributed across the skin surface, shunt route penetration is different in various body regions. It is known that higher absorption rates are achieved on the forehead compared to the extremity (forearm and calf) regions [5]. The follicular epithelium can be seen as the enlargement of the skin surface with similar barrier properties at the upper portion of the hair follicle. However, the lower part is more permeable due to less differentiated corneocytes, which display reduced skin barrier properties compared to the interfollicular epithelium [4, 5].

The establishment of a skin model that is able to differentiate between the follicular and intercellular penetration pathway is a challenge. It is necessary to find a model system that safely excludes the follicular penetration shunt route but has the same structural, biochemical, and barrier properties as normal skin [6]. A relatively obvious approach is to compare skin penetration with different follicular densities or to compare hairy and hairless species [7, 8]. The problem of this approach is that skin with different hair follicle densities may also have other structural properties. Moreover, a comparison of scarred

skin [9] and normal skin is rather critical to evaluate, since the barrier properties of the skin are certainly not comparable.

The method of selective follicle closure has been developed to evaluate the impact of the follicular penetration pathway. In this approach, each hair follicle is closed selectively in the test area, whereas in the control area of the same skin probe, hair follicles are left open. A comparison of the percutaneous absorption rates of both skin areas can be used to calculate the proportion of the hair follicles to the total absorption [10].

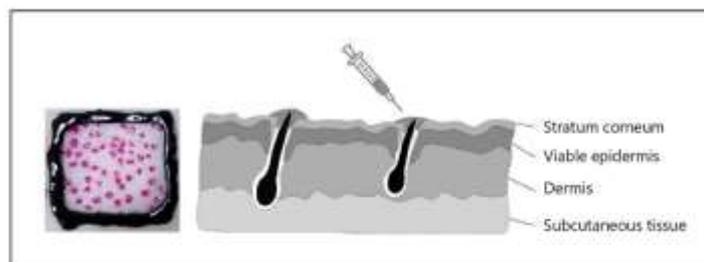
As follicular closing material, different substances like nail varnish [5, 10, 11], a silicone grease-cyanoacrylate adhesive mixture [12], waxes [13], and Teflon [10] have been proposed, with nail varnish being utilized in most of the studies. Since the use of nail varnish as a closing material in particular could have side effects such as penetration enhancement in the adjacent skin areas, the aim of the present study was, *inter alia*, to investigate this potential effect. Solvents like ethanol and acrylates, which are frequent ingredients of nail varnish, show a statistically enhanced deposition of topically applied substances in the stratum corneum [14] and are known to partially disrupt the skin barrier [15]. Due to this fact, the assessment of solvent-free closure material is of high interest and was included in our investigations.

It is known that topically applied substances do not only penetrate vertically into the skin but that a possible lateral diffusion can occur [16]. If the test substance were prone to strong lateral diffusion in the used formulation after penetration into the viable layers of the skin, the influence of the hair follicles on the penetration could not be excluded. To better understand this relationship, lateral diffusion was also considered in the experiments.

Moreover, the correct application protocol of the closing material on the follicular openings and the model drug of interest seems to play a major role for a successful sealing of the hair follicles and therefore, different options of application were assessed in this study.

The selection of an appropriate skin model has been demonstrated to have a major impact on the results of follicular penetration investigations. The method of selective follicular closure has been developed for *in vivo* studies in humans [10]. A transfer of the method to *ex vivo* skin models is difficult, as the hair follicles tend to contract vigorously in excised skin samples. In a former study, the follicular reservoir was shown to be reduced by 90% in excised human skin in comparison to *in vivo* skin [5]. As a consequence, the *ex vivo* porcine ear skin model has been established for follicular penetration studies, as

**Fig. 1.** Schematic illustration and photograph of the follicular closure technique.



porcine skin remains fixed on the cartilage during the experiments and does not contract. Moreover, porcine ear skin provides similar morphological and barrier abilities and a comparable composition of corneocytes to human skin [17]. Furthermore, it has been proven to be a suitable surrogate for *in vivo* bioequivalence studies on human percutaneous penetration [18, 19].

Stahl et al. [20] also investigated the reliability of nail varnish used for follicular closure. In this study, a variety of test substances were used. The authors found out that the efficiency of the follicular closure depends on the investigated test substance. In the presented investigations, caffeine was used as active pharmaceutical ingredient (API). With its naturally occurring purine-based alkaloid structure, caffeine is widely used for penetration studies and recommended by the OECD in their guidelines for testing percutaneous absorption [21]. As caffeine has already been shown to penetrate faster and at a higher quantity if the follicular penetration pathway is available [5], caffeine was selected as active substance in the present study. In the following, caffeine is also referred to as API.

The aim of the present study was to establish a reliable protocol for the follicular closing technique to facilitate the investigation of the follicular penetration path. This closing technique was tested for its ability to prohibit the penetration of the applied test substances.

## Materials and Methods

### Skin Model

For the experiments, ears from 6-month-old German domestic pigs were provided by a local butcher (Gerald Nusche, Königs Wusterhausen, Germany) and stored at 8 °C until use. The experiments were authorized by the Commission of Consumer Protection and Agriculture, District Dahme-Spreewald, Germany. Before starting the experiments, the ears were rinsed with cold water and dried with paper towels. The *ex vivo* porcine ear skin was used within 1 or 2 days after slaughtering. To produce a secure follicular closure by using one of the closure materials described below, the

hairs had to be cut close to skin surface level by scissors to ensure that the tips of the hairs were completely covered by the closure material.

### Follicular Closing Technique

In the present study, the hair follicles were closed either with a standard nail varnish (N°1 Nail Polish 290, trend it up, dm-drogerie markt GmbH & Co. KG) containing different alcohols, acrylates, and acetates or a solvent-free nail varnish with the film-forming agent Syntran®. The hair follicles were plugged by placing dots of the closure material precisely on top of each follicular orifice by using a cannula (26 G, Dispomed Witt oHG, Gelnhausen, Germany) and a 1-ml syringe according to Teichmann et al. [10]. After a drying time of 30 min, the model drug was applied. The method is schematically depicted in Figure 1.

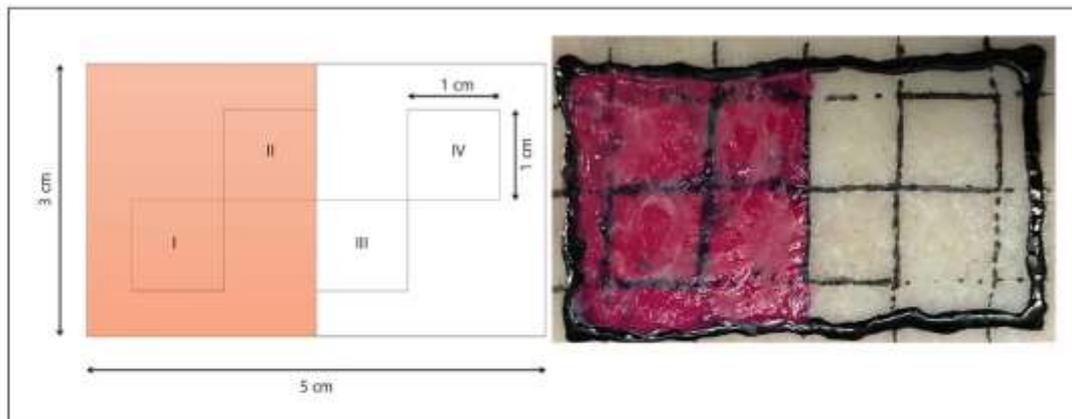
### Study Design

The study was divided into two main parts.

#### Study Design A: Comparison of the Efficiency of a Standard Nail Varnish and a Solvent-Free Nail Varnish for Selective Hair Follicle Closure and Investigation of the Impact of the Application Protocol

Study design A involved two experimental setups, hereinafter referred to as A1 and A2. In setup A1, the follicular closing technique was performed with standard nail varnish or a solvent-free nail varnish, as described above. In total, twelve skin areas (a to l) were prepared. In four skin areas, all hair follicles were closed with a standard nail varnish (areas a–d) and in another four skin areas, all hair follicles were closed with a solvent-free nail varnish (areas e–h). Four skin areas remained untreated and served as control for each application technique (areas i–l). Each skin area had a diameter of 1.5 × 1.5 cm. To prevent spreading of the applied gel across the assigned limit of the area, black window color (Art-Glass, WACO, Heinrich Wagner, Fulda, Germany) was placed around the areas. Three hair follicles of each area were investigated.

After follicular closing, 10 µL/cm<sup>2</sup> of a fluorescein gel (1% fluorescein sodium salt [Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany] in H<sub>2</sub>O and 7% hydroxyethyl cellulose [Euro OTC Pharma GmbH, Bönen, Germany], prepared 24 h before application) was applied onto each skin area. In the following, fluorescein gel is also referred to as model drug. On areas a, e, and i, the gel was carefully spread with the tip of a pipette. Areas b, f, and j were treated with a careful finger massage for 2 min. Areas c, d, g, h, k, and l were massaged for 2 min at a 5-Hz frequency with support of the smartphone applica-



**Fig. 2.** Graphic illustration and photography of the 3 × 5 cm area with four 1 × 1 cm areas to investigate the impact on substance penetration of a fully covered penetration area (orange) adjacent to a non-covered area (white).

tion "Pro Metronome" (EUMLab Xainin Technology GmbH, Berlin, Germany). While in areas c, g, and k the massage was realized by fingertips, in areas d, h, and l, a massage device (NOVAFON pro, NOVAFON GmbH, Weinstadt, Germany) was used.

After 2 min, including the massage time, skin biopsies of 0.5 × 0.5 cm were removed from all skin areas by means of a scalpel, transferred to cryotubes, and shock-frozen in liquid nitrogen. The samples were stored at -20 °C until further use. After embedding the skin biopsies in cryomedium (Tissue Freezing Medium, Leica Biosystems Richmond Inc., Richmond, IL, USA), vertical sections of 10 μm in thickness were prepared by means of a cryotome (Microm Cryo-Star HM 560, MICROM International GmbH, Waldorf, Germany) and transferred onto microscope slides. The cryosections were investigated by laser scanning microscopy (LSM 700, Carl Zeiss AG, Oberkochen, Germany) at a magnification factor of 10 in both transmission mode and fluorescence mode. By exciting the probe at a wavelength of 488 nm and applying a laser power of 1 mW, it was possible to visualize the fluorescent dye with a detection range of the emission from 492 to 700 nm on the skin and in the hair follicles. This enabled the assessment whether and to what extent the follicular closure could efficiently prevent the follicular penetration of the fluorescein gel.

In setup A2, three skin areas of 2.5 × 2.5 cm were prepared from three different pigs. Here, the complete skin areas were treated with either standard nail varnish (area m) or solvent-free nail varnish (area n). The varnish was applied by syringe. One skin area remained untreated and served as control. After a drying time of 1 h, 10 μL/cm<sup>2</sup> of a caffeine gel (2% caffeine [Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany] in H<sub>2</sub>O and 7% hydroxyethyl cellulose, prepared 24 h before application) were spread onto the center 1 × 1 cm of the larger area with the tip of a pipette. For later analysis, only this center 1 × 1 cm area was investigated. This setup ensures that no caffeine contacts the tissue without having to pass the varnish barrier.

After an incubation time of 20 h, the unabsorbed test substance and the first layers of the stratum corneum were removed by tak-

ing five tape strips (tesafilm® 4129, Beiersdorf, Hamburg, Germany). The area of interest was cut out of the tape and placed in a reaction vessel with 1 mL phosphate-buffered saline (PBS; VWR LIVE SCIENCE; pH 7.4; sterile). Furthermore, the lower layers of the stratum corneum and the epidermis were separated from the dermis and the subcutaneous tissue. This separation step was performed by removing the skin piece from the cartilage with a scalpel and placing it, dermis facing down, on a 60 °C heating plate for 60 s [22]. Afterwards the epidermis and the dermis were separated by using tweezers. The epidermis was placed in a reaction vessel with 500 μL PBS. The large amount of dermal tissue was split into two reaction vessels. To each one, 1 mL of PBS was added. Homogenization was carried out with a TissueLyser II (QIAGEN, The Netherlands) in a pre-cooled setup with 5-mm steel beads. The epidermis and the supernatant were homogenized using 1 cycle of 30 Hz and 10 min. The dermis was homogenized by applying this cycle twice. All samples were placed into an ultrasound bath (SONOREX SUPER RK 102 H, BANDELIN electronic GmbH & Co. KG, Berlin, Germany) for 10 min and were centrifuged (UNIVERSAL 320 R, Hettich AG, Bäch, Switzerland, program: 11,200 rpm; 10 min;  $r = 85; 4^{\circ}\text{C}$ ). The caffeine solution was separated and pipetted into a new reaction vessel. The samples were filtered afterwards with a Sterivex™ filter unit (Millipore, USA) and the quantification of caffeine was carried out by reverse-phase high-performance liquid chromatography (HPLC), as described below.

#### Study Design B: Investigation of the Influence of Follicular Closing Material on the Penetration of Adjacent Skin Areas

In study design B, only the standard nail varnish was tested, as study design A revealed that the solvent-free nail varnish is not able to close the hair follicles effectively.

For this experiment, one skin area of 3 × 5 cm was marked. Afterwards, one half of the skin area was completely covered with the standard nail varnish, as demonstrated in Figure 2. After 1 h, 10 μL/cm<sup>2</sup> of the same caffeine gel as was used in the second setup of study design A was applied by the tip of a pipette on the whole skin

area. In this treated space, four 1 × 1 cm areas of interest were investigated: (I) an area which was completely covered by the closure material, (II) an area which was completely covered by the closure material but located at the edge to the uncovered area, (III) an area which was not covered by the closure material but located at the edge to the covered area, and (IV) an area which was not covered by the closure material. After an incubation time of 20 h for each of these areas, the unabsorbed test material was removed from the skin surface and skin separation, homogenization, and determination of caffeine concentration were performed analogous to study design A.

#### *Determination of Caffeine in Homogenized Skin Extracts by HPLC*

The caffeine concentration in the homogenized samples was determined using a HPLC VWR-Hitachi ELITE LaChrom system. The quantity of caffeine was detected at a wavelength of 272 nm with a DAD I-2450 detection unit and a column temperature of 30 °C. The analytical determination was performed using a Chromolith® Performance RP-18e 100-4.6 mm (Merck, Darmstadt) column as stationary phase. The results were obtained with a flow rate of 2.0 mL/min and an isocratic method with a mobile phase of 90% water (Milli-Q®) and 10% acetonitrile (HPLC gradient grade, Merck, Darmstadt).

Prior to the analysis, the samples were mixed and transferred into auto-sampler screw micro-vials (VWR) and analyzed with an injection volume of 10–30 µL of each sample. The chemical stability was confirmed by analyzing the caffeine samples after 7 days at the latest. The specificity of the HPLC run was controlled with a blank injection for internal standard.

The quantification linearity for caffeine was confirmed by a caffeine standard solution and quality control of 0.5–250.0 µg/mL in the caffeine samples. A graphic linear regression conformation was determined by an  $R^2 > 0.99$ . Accuracy and precision of the HPLC run was determined within the acceptance criteria of a variation of less than 2%.

#### *Statistical Analysis*

The calculation of mean values and standard deviations of the penetration as well as corresponding statistical tests (Wilcoxon test) were carried out via SPSS® (IBM® SPSS® Statistics, version 23.0.0.2, IBM® Corporation, New York, NY, USA). Statistical outliers were determined using the "Grubbs test" via Origin (Origin-Pro, version 2019, Origin Lab Corporation, Northampton, MA, USA). A significance of  $p < 0.05$  was considered as being significantly different in this study.

## **Results and Discussion**

### *Study Design A: Comparison of the Efficacy of a Standard Nail Varnish and a Solvent-Free Nail Varnish for Selective Hair Follicle Closure and Investigation of the Impact of the Application Protocol*

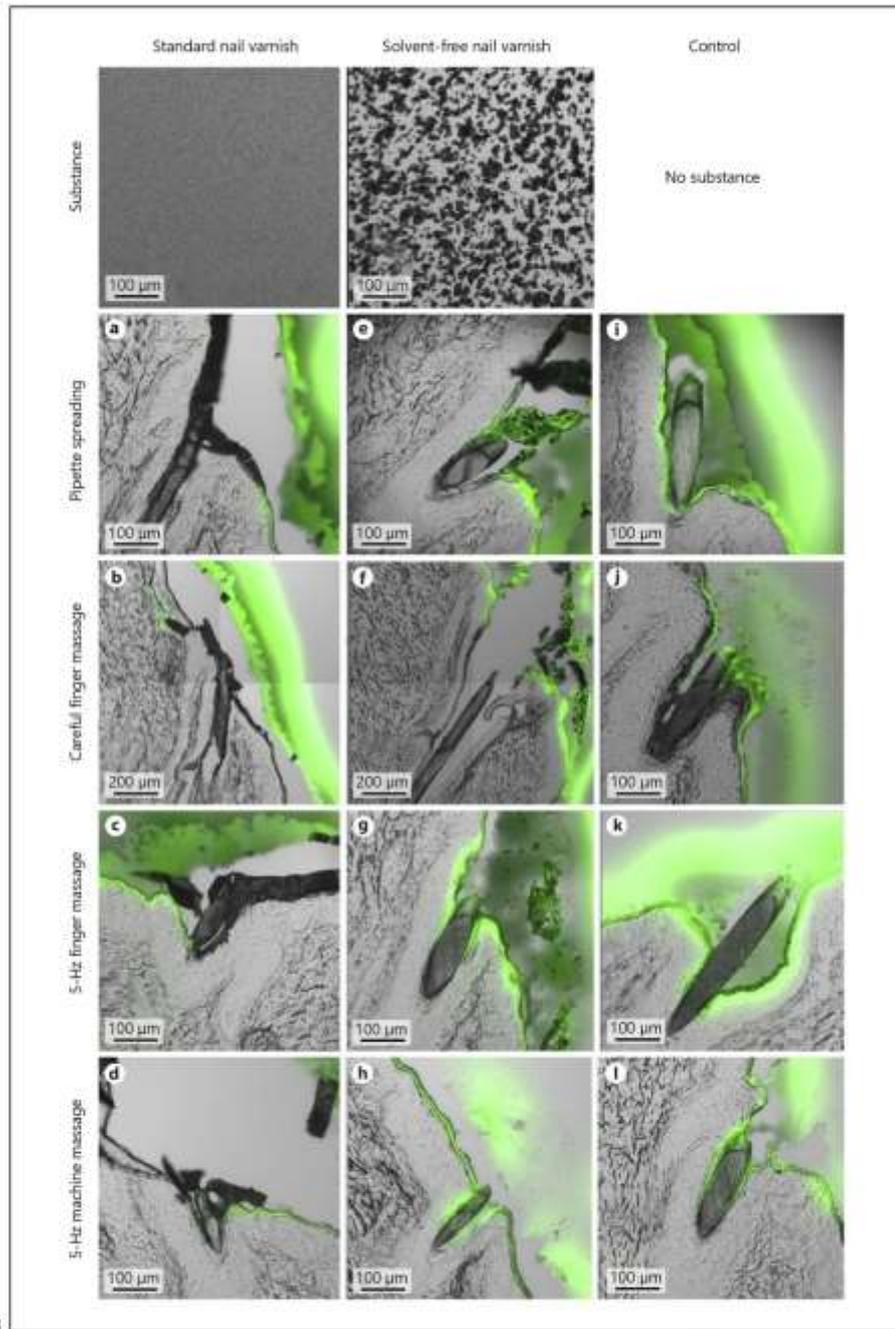
The aim of study design A was to determine an efficient hair follicle closure material that reliably inhibits substances from penetrating into the hair follicles. Teich-

mann et al. [10] established a follicular closure method where nail varnish is used to block the follicular penetration pathway. As concerns had been raised that the solvents of nail varnishes might enhance the penetration behavior of substances in adjacent skin areas, the present study compares the efficacy and potential side effects of a standard nail varnish and a solvent-free nail varnish. Moreover, different application techniques of the model drug were evaluated for their potential to destroy an intact follicular closure. A detection of fluorescein gel in the hair follicle below the nail varnish was evaluated as inefficient closure. After spreading the fluorescein gel with the tip of the pipette, the standard nail varnish was able to prevent the model drug from penetrating into the hair follicle (Fig. 3a). No fluorescent signal could be detected in the hair follicle. When the same application technique was used in combination with the solvent-free nail varnish (Fig. 3e), the nail varnish itself was penetrated by the fluorescein gel and could not provide an intact closure. The combination of the standard nail varnish and a careful finger massage (Fig. 3b) resulted in an efficient closure of the hair follicle, while the 5-Hz massage with a finger (Fig. 3c) or massage device (Fig. 3d) destroyed the nail varnish structure.

For each combination of closing material and application protocol of the model drug, similar results were obtained. In Figure 3, laser scanning microscopic images are exemplarily presented showing the efficacy of the standard nail varnish and the solvent-free nail varnish when the fluorescein gel was applied using different techniques.

The results of study design A1 clearly demonstrate that the standard nail varnish was able to prevent the model drug from penetration into the hair follicle. The solvent-free nail varnish did not ensure a full blocking of the hair follicles. This could be due to the microscopic structures of the varnishes, which are strongly different, as can be seen in Figure 3, top row. It is obvious that the standard nail varnish has an extremely fine structure, whereas the texture of the solvent-free nail varnish is rather porous. This might be the reason why the fluorescein gel was able to penetrate the solvent-free nail varnish and to fill the pores, which resulted in an inefficient closure independent of the application technique. The absence of certain solvents in the solvent-free formulations could explain this observation. Solvent systems are indispensable for an improved quality of the dried enamel surface [23].

For standard nail varnish, the application protocol of the model drug was demonstrated to have an impact on the efficiency of the follicular closure. Only spreading the model drug with the tip of a pipette or applying a careful



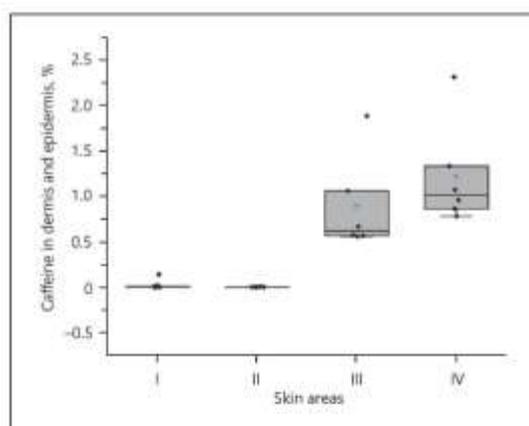
3

(For legend see next page.)

finger massage keeps the follicular closing intact, stronger mechanical manipulations such as faster finger massage or the utilization of a massage device resulted in a destruction of the follicle closure. In this case, also an enhanced follicular penetration might occur due to capillary forces. Liquids penetrate faster due to higher adhesive forces in the furrows, which are dependent on the surface tension, contact angle, and viscosity at smaller diameters [24].

In the study design using setup A2, one area was completely covered with the closing materials to clarify whether the closure material is able to reliably prevent caffeine penetration also during a longer incubation time.

The results of this experiment support the hypothesis that the standard nail varnish is able to act as an efficient barrier, as no caffeine was detectable in the epidermis and dermis. In contrast, the solvent-free nail varnish was not able to prevent caffeine penetration, as  $0.6 \pm 0.1\%$  of the totally recovered caffeine was found in the tissue, even though the area was covered with the solvent-free varnish.



**Fig. 4.** Boxplot diagram displaying the relative caffeine concentrations in epidermis and dermis in all skin areas I, II, III, and IV. No caffeine concentration was detected in epidermis and dermis of skin areas I and II, which were completely covered with the standard nail varnish. No significant differences were detected between the caffeine penetration rates of skin areas III and IV, which were not covered by the standard nail varnish, but which were at different distances to the covered skin areas ( $p = 0.138$ ).

**Fig. 3.** Laser scanning microscopic images of hair follicles closed with either a standard nail varnish or a solvent-free nail varnish and unclosed hair follicles (control).

Based on the presented results, it can be assumed that previously published data of the follicular closing technique with standard nail varnish can be considered as reliable. The nail varnish used in the study by Otberg et al. [5] and Blume-Peytavi et al. [25] for follicular penetration studies was comparable to the standard nail varnish utilized in this study. Additionally, the drug formulations under investigation in these studies were applied by careful finger massage; therefore, a disruption of the artificially created barrier has unlikely occurred during their experiments. Besides nail varnish, other researchers also utilized other materials for blocking hair follicles, such as equal amounts of silicone grease and  $\alpha$ -cyanoacrylate adhesives [26]. This plugging mixture is considered a tool for follicle closure. Several investigations analyzed the follicular penetration pathway successfully on porcine ear skin that was removed from the cartilage and placed on Franz diffusion cells. Indeed, the higher viscosity of the used closure material and the use of a 0.5-mm-diameter polypropylene stick for the application [27] could lead to a less precise follicular closure, since the closure material does not enter the follicular shunt but rather sits on top of the skin.

It is important to estimate whether certain ingredients of follicular closing material, such as solvents, might have an impact on the penetration of the drug under investigation, which was the aim of study design B.

#### *Study Design B: Investigation of the Influence of Follicular Closing Material on the Penetration of Adjacent Skin Areas*

Isopropyl alcohol, butyl, and ethyl acetates are known to increase the fluidity due to a formation of a solvation shell around the polar groups, which could lead to a loose packing of the stratum corneum lipid [28] resulting in skin barrier disruption. Therefore, study design B investigated whether nail varnish solvents could possibly have penetration-enhancing effects, e.g., on adjacent skin areas.

The caffeine concentration was determined in skin areas which were sealed completely with the standard nail varnish (I and II) or which were directly next to the sealed area (III) or at a distance of 1 cm from the sealed area (IV), as illustrated in Figure 2.

In case of a penetration-enhancing effect of the standard nail varnish, an increased concentration of caffeine in area III would be expected. Since area II was completely covered by the standard nail varnish, it was assumed that no caffeine should be detected in this area. However, due to potential effects of lateral diffusion, it

could not be excluded that area II shows a small caffeine concentration.

The results demonstrate that no caffeine could be detected in areas I and II, which were completely covered by the standard nail varnish. Lateral diffusion effects into area II were not observed. Moreover, the penetration rates of caffeine detected in areas III and IV were statistically of no significant difference ( $p > 0.05$ ). The Grubb's test revealed one statistically relevant outlier each, in three of the groups displayed in Figure 4, but they were not considered when testing differences in caffeine concentrations with the Wilcoxon test. Figure 4 shows the caffeine concentrations detected in the epidermis and dermis of each skin area (I–IV).

The experiments of study design B show that when the area is completely covered with the standard nail varnish, caffeine can be found neither in the epidermis nor in the dermis. Therefore, it can be concluded that the application of the standard nail varnish leads to a secure blocking of the hair follicles and/or the skin without affecting the penetration behavior in adjacent skin areas. The nail varnish exposure when performing the follicular closing technique is much smaller and of shorter duration than in the setup of Friend et al. [28], which was referred to earlier. Effects on stratum corneum lipids are therefore much less likely. It is therefore understandable why our study does not come to the same conclusion as the cited study.

The experiments presented in this study reveal a 1% caffeine recovery as percutaneous absorption in the tissue. In most studies, the investigation of ex vivo caffeine penetration is performed by using the Franz diffusion cell. In these studies, the penetration rates of caffeine into the epidermis and dermis of 2–5% were mostly higher than in the present study [13, 29]. One possible explanation for this variation could be the method used. For the caffeine extraction, no organic solvent was used. In other studies, the Franz diffusion cell is mostly used for quantitative measurements [13]. This study was performed on intact skin on cartilage. It would be of value to compare results directly with in vivo microdialysis or in vitro Franz cell measurements using the same techniques. Another explanation for this higher value could be explained by a hydration effect which could occur in Franz diffusion cell experiments [30], eventually leading to a loosening of the desmosomes between the corneocytes [31]. Differences in the application time on human ex vivo skin (24 h) could also account for this finding. Rubio et al. [32] reported a percutaneous absorption of caffeine into the tissue of 1% by applying a liquid caffeine formulation. It can

be summarized that the achieved recovery in the dermis is comparable to the published data.

The study confirms a benefit in follicle closure techniques with a solvent-containing nail varnish. Solvent systems containing polyvinyl acetates, acetate copolymers, and multiple acrylate-type polymers assure an acceptable product viscosity, fast drying time, and a quality of the dried enamel to ensure a non-bubbling nail enamel composition with a good water and oil resistance and a strong coating [23]. So far, the follicular closing technique by varnish has always been performed with products that were comparable to the standard nail varnish used in the present study. The results of previous studies demonstrated that the penetration is affected by excluding the follicular pathway. Otberg et al. [5] showed that by blocking the hair follicle by the varnish in vivo, caffeine becomes bioavailable later and at a smaller amount than in the control area. The same effect was monitored in further studies using the here investigated technique in vivo [25] as well as in vitro [5, 33].

## Conclusion

This study clearly demonstrates that a standard nail varnish in combination with a gentle application technique of the model drug is able to prevent follicular penetration successfully and provides a secure follicular closure. Although solvents are a standard ingredient of standard nail varnishes, this ingredient is not expected to cause penetration-enhancing effects in adjacent skin areas. Since comparable solvent-containing nail varnishes have widely been used for evaluating follicular penetration impacts, those studies can be considered to show reliable penetration data and closure of the follicle. The presented study only investigated the closure for the substances caffeine and fluorescein sodium salt. The results might not be transferable to all kinds of APIs.

## Acknowledgement

We would like to thank Mr. Gerald Nusche for providing the porcine ears for the experiments.

## Statement of Ethics

The experiments were authorized by the Commission of Consumer Protection and Agriculture, District Dahme-Spreewald, Germany.

## Disclosure Statement

The authors have no conflicts of interest to declare.

## Funding Sources

Merck KGaA funded this research.

## References

- Maibach H. Dermatological formulations: Percutaneous absorption. By Brian W. Barry. Marcel Dekker, 270 Madison Avenue, New York, NY 10016. 1983. 479 pp. 16x 23.5 cm. *J Pharm Sci*. 1984;73(4):573.
- Abd E, Yousef SA, Pastore MN, Telaprolu K, Mohammed YH, Namjoshi S, et al. Skin models for the testing of transdermal drugs. *Clin Pharmacol*. 2016 Oct;8:163–76.
- Otberg N, Richter H, Schaefer H, Blume-Peytavi U, Sterry W, Lademann J. Variations of hair follicle size and distribution in different body sites. *J Invest Dermatol*. 2004 Jan;122(1):14–9.
- Schaefer H, Lademann J. The role of follicular penetration. A differential view. *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol*. 2001;14 Suppl 1: 23–7.
- Otberg N, Patzelt A, Rasulev U, Hagemester T, Linscheid M, Sinkgraven R, et al. The role of hair follicles in the percutaneous absorption of caffeine. *Br J Clin Pharmacol*. 2008 Apr;65(4):488–92.
- Meidan VM, Bonner MC, Michniak BB. Transfollicular drug delivery – is it a reality? *Int J Pharm*. 2005 Dec;306(1–2):1–14.
- Hisoire G, Bucks D. An unexpected finding in percutaneous absorption observed between haired and hairless guinea pig skin. *J Pharm Sci*. 1997 Mar;86(3):398–400.
- Honzak L, Šentjurc M, Swartz HM. In vivo EPR of topical delivery of a hydrophilic substance encapsulated in multilamellar liposomes applied to the skin of hairless and normal mice. *J Control Release*. 2000 May;66(2–3):221–8.
- Behl CR, Wittkowsky A, Barrett M, Pierson CL, Flynn GL. Technique for preparing appendage-free skin (scar) on hairless mouse. *J Pharm Sci*. 1981 Jul;70(7):835–7.
- Teichmann A, Otberg N, Jacobs U, Sterry W, Lademann J. Follicular penetration: development of a method to block the follicles selectively against the penetration of topically applied substances. *Skin Pharmacol Physiol*. 2006;19(4):216–23.
- Liu X, Grice JE, Lademann J, Otberg N, Trauer S, Patzelt A, et al. Hair follicles contribute significantly to penetration through human skin only at times soon after application as a solvent deposited solid in man. *Br J Clin Pharmacol*. 2011 Nov;72(5):768–74.
- Horita D, Yoshimoto M, Todo H, Sugibayashi K. Analysis of hair follicle penetration of lidocaine and fluorescein isothiocyanate-dextran 4kDa using hair follicle-plugging method. *Drug Dev Ind Pharm*. 2014 Mar;40(3):345–51.
- Trauer S, Lademann J, Knorr F, Richter H, Liebsch M, Rozycki C, et al. Development of an in vitro modified skin absorption test for the investigation of the follicular penetration pathway of caffeine. *Skin Pharmacol Physiol*. 2010;23(6):320–7.
- Verma DD, Fahr A. Synergistic penetration enhancement effect of ethanol and phospholipids on the topical delivery of cyclosporin A. *J Control Release*. 2004 May;97(1):55–66.
- Denda M, Sato J, Masuda Y, Tsuchiya T, Koyama J, Kuramoto M, et al. Exposure to a dry environment enhances epidermal permeability barrier function. *J Invest Dermatol*. 1998 Nov;111(5):858–63.
- Gee CM, Nicolazzo JA, Watkinson AC, Finnis BC. Assessment of the lateral diffusion and penetration of topically applied drugs in humans using a novel concentric tape stripping design. *Pharm Res*. 2012 Aug;29(8):2035–46.
- Chapman SJ, Walsh A. Desmosomes, corneosomes and desquamation. An ultrastructural study of adult pig epidermis. *Arch Dermatol Res*. 1990;282(5):304–10.
- Herbig ME, Houdok P, Gorissen S, Zorn-Kruppa M, Wladykowski E, Volksdorf T, et al. A custom tailored model to investigate skin penetration in porcine skin and its comparison with human skin. *Eur J Pharm Biopharm*. 2015 Sep;95 Pt A:99–109.
- Franz TI, Lehmann PA, Raney SG. Use of excised human skin to assess the bioequivalence of topical products. *Skin Pharmacol Physiol*. 2009;22(5):276–86.
- Stahl J, Niedorf F, Wohlert M, Kietzmann M. The in vitro use of the hair follicle closure technique to study the follicular and percutaneous permeation of topically applied drugs. *Altern Lab Anim*. 2012 Mar;40(1):51–7.
- OECD. Test No. 427: Skin Absorption: In Vivo Method. 2004.
- Baumberger JP, Sutzteff V, Cowdry E. Methods for the separation of epidermis from dermis and some physiologic and chemical properties of isolated epidermis. *J Natl Cancer Inst*. 1942;2(5):413–23.
- Graves GG, Jacks TC. *Fast drying nail enamel composition and method*. Google Patents; 1999.
- Kwon S, Kim B, An S, Lee W, Kwak HY, Jhe W. Adhesive force measurement of steady-state water nano-meniscus: effective surface tension at nanoscale. *Sci Rep*. 2018 May;8(1): 8462.
- Blume-Peytavi U, Massoudy L, Patzelt A, Lademann J, Dietz E, Rasulev U, et al. Follicular and percutaneous penetration pathways of topically applied minoxidil foam. *Eur J Pharm Biopharm*. 2010 Nov;76(3):450–3.
- Horita D, Yoshimoto M, Todo H, Sugibayashi K. Analysis of hair follicle penetration of lidocaine and fluorescein isothiocyanate-dextran 4kDa using hair follicle-plugging method. *Drug Dev Ind Pharm*. 2014 Mar;40(3):345–51.
- Fadli AJ, Siti Nur S. J., Samer A. D., S. Budiasih, Jawad A., M. Kaleemullah. Determination of Permeation Pathway of Gentamicin into Pig Ear Skin. *International Research Journal of Pharmacy*. 2015;6(3):183–90.
- Friendl D, Catz P, Heller J. Simple alkyl esters as skin permeation enhancers. *J Control Release*. 1989;9(1):33–41.
- Gerstel D, Jacques-Jamin C, Schepky A, Cumberley B, Eilstein J, Grégoire S, et al. Comparison of protocols for measuring cosmetic ingredient distribution in human and pig skin. *Toxicol In Vitro*. 2016 Aug;34:153–60.
- Van Hal DA, Jeremiasse E, Junginger HE, Spies F, Bouwstra JA. Structure of fully hydrated human stratum corneum: a freeze-fracture electron microscopy study. *J Invest Dermatol*. 1996 Jan;106(1):89–95.
- Schaefer H, Redelmeier TE, Lademann J. *Skin penetration, Contact dermatitis*. Springer; 2011. pp. 215–27.
- Rubio L, Alonso C, Coderch L, Parra JL, Marti M, Cebrián J, et al. Skin Delivery of Caffeine Contained in Biofunctional Textiles. *Text Res J*. 2010;80(12):1214–21.
- Trauer S, Patzelt A, Otberg N, Knorr F, Rozycki C, Baliz G, et al. Permeation of topically applied caffeine through human skin – a comparison of in vivo and in vitro data. *Br J Clin Pharmacol*. 2009 Aug;68(2):181–6.

**Klein, AL**, Lubda, M, Skov, PS, Vogt, A, Keck, CM, Lademann, J, Beckers, I, von Hagen, J, Patzelt, A (2020). *Investigation of transfollicular caffeine penetration using microdialysis on ex vivo porcine ear skin*. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 157, 1-8.

Abstract:

The aim of this study was to develop an ex vivo method that allows to quantify the transfollicular penetration of topically applied substances by combining microdialysis and selective follicular closure with varnish. An experimental setup with three skin areas on ex vivo intact porcine ear skin was designed (varnish on hair follicle, varnish next to hair follicle, no varnish). On each area, 10 µl/cm<sup>2</sup> caffeine-hydroxyethyl-cellulose-gel was applied. Samples were collected for 22 h by microdialysis. After sampling, the skin layers were separated, homogenized and caffeine was quantified by high pressure liquid chromatography (HPLC) in all samples. Potential impact of the varnish placed next to the follicle by tension on the follicle during the drying process was monitored by a microscopic setup and could be excluded. The microdialysis and homogenization study showed a significantly reduced penetration of caffeine when the hair follicles were closed. In areas with open hair follicles caffeine was detected already in the first ten minutes after application. The reported novel combination of two methods is suitable to investigate ex vivo transfollicular penetration. Possible impact of the closure material in the control area can be ruled out by adjusting the design of the control area in future studies.

European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics: IF (2019) 4,604, Ranking in "PHARMACOLOGY and PHARMACY" 40/270

Journal Data Filtered By: **Selected JCR Year: 2019** Selected Editions: SCIE,SSCI  
 Selected Categories: **"PHARMACOLOGY and PHARMACY"** Selected Category  
 Scheme: WoS

**Gesamtanzahl: 270 Journale**

Rank	Full Journal Title	Total Cites	Journal Impact Factor	Eigenfactor Score
1	NATURE REVIEWS DRUG DISCOVERY	33,154	64.797	0.049170
2	PHARMACOLOGICAL REVIEWS	12,500	17.395	0.010370
3	TRENDS IN PHARMACOLOGICAL SCIENCES	13,034	13.503	0.017780
4	ADVANCED DRUG DELIVERY REVIEWS	36,796	13.300	0.033170
5	Annual Review of Pharmacology and Toxicology	7,812	11.250	0.007970
6	DRUG RESISTANCE UPDATES	3,165	11.000	0.004220
7	PHARMACOLOGY & THERAPEUTICS	16,615	10.557	0.023490
8	MEDICINAL RESEARCH REVIEWS	4,974	9.300	0.005360
9	BRITISH JOURNAL OF PHARMACOLOGY	34,040	7.730	0.031300
10	JOURNAL OF CONTROLLED RELEASE	49,132	7.727	0.051270
11	ALIMENTARY PHARMACOLOGY & THERAPEUTICS	21,233	7.515	0.032840
12	DRUG DISCOVERY TODAY	15,022	7.321	0.020720
13	Acta Pharmaceutica Sinica B	3,560	7.097	0.006580
14	NEUROPSYCHOPHARMACOLOGY	26,281	6.751	0.040680
15	European Heart Journal-Cardiovascular Pharmacotherapy	521	6.696	0.001640
16	CLINICAL PHARMACOLOGY & THERAPEUTICS	16,749	6.565	0.018290
17	DRUGS	11,128	6.189	0.014190
18	Neurotherapeutics	4,998	6.035	0.009520
19	PHARMACOLOGICAL RESEARCH	13,517	5.893	0.019090
20	EXPERT OPINION ON THERAPEUTIC PATENTS	3,350	5.611	0.005090

Rank	Full Journal Title	Total Cites	Journal Impact Factor	Eigenfactor Score
21	EXPERT OPINION ON THERAPEUTIC TARGETS	5,169	5.473	0.007470
22	JOURNAL OF ANTIMICROBIAL CHEMOTHERAPY	32,470	5.439	0.048840
23	BIODRUGS	1,803	5.313	0.002980
24	International Journal of Nanomedicine	23,279	5.115	0.028200
25	EXPERT OPINION ON INVESTIGATIONAL DRUGS	4,833	5.081	0.006230
26	ACTA PHARMACOLOGICA SINICA	9,668	5.064	0.009310
27	BIOCHEMICAL PHARMACOLOGY	27,929	4.960	0.020770
28	ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY	67,707	4.904	0.082760
29	DRUG DELIVERY	5,590	4.902	0.008420
30	Expert Opinion on Drug Discovery	3,427	4.887	0.006290
31	INTERNATIONAL JOURNAL OF PHARMACEUTICS	48,995	4.845	0.034660
32	Expert Opinion on Drug Delivery	6,690	4.838	0.007220
33	CURRENT OPINION IN PHARMACOLOGY	6,720	4.807	0.009270
34	CNS DRUGS	4,768	4.786	0.007670
35	JOURNAL OF FOOD AND DRUG ANALYSIS	3,897	4.727	0.005550
36	Biomedicines	1,156	4.717	0.002850
37	Reviews of Physiology Biochemistry and Pharmacology	805	4.700	0.000670
38	Current Neuropharmacology	4,178	4.668	0.006280
39	INTERNATIONAL JOURNAL OF ANTIMICROBIAL AGENTS	12,403	4.621	0.017890
40	CLINICAL PHARMACOKINETICS	8,919	4.604	0.008920
40	EUROPEAN JOURNAL OF PHARMACEUTICS AND BIOPHARMACEUTICS	16,822	4.604	0.014330
42	BIOMEDICINE & PHARMACOTHERAPY	25,449	4.545	0.041300

Klein, AL, Lubda, M, Skov, PS, Vogt, A, Keck, CM, Lademann, J, Beckers, I, von Hagen, J, Patzelt, A (2020). Investigation of transfollicular caffeine penetration using microdialysis on ex vivo porcine ear skin. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 157, 1-8.  
<https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2020.09.013>

Klein, AL, Lubda, M, Skov, PS, Vogt, A, Keck, CM, Lademann, J, Beckers, I, von Hagen, J, Patzelt, A (2020). Investigation of transfollicular caffeine penetration using microdialysis on ex vivo porcine ear skin. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 157, 1-8.  
<https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2020.09.013>

Klein, AL, Lubda, M, Skov, PS, Vogt, A, Keck, CM, Lademann, J, Beckers, I, von Hagen, J, Patzelt, A (2020). Investigation of transfollicular caffeine penetration using microdialysis on ex vivo porcine ear skin. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 157, 1-8.  
<https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2020.09.013>

Klein, AL, Lubda, M, Skov, PS, Vogt, A, Keck, CM, Lademann, J, Beckers, I, von Hagen, J, Patzelt, A (2020). Investigation of transfollicular caffeine penetration using microdialysis on ex vivo porcine ear skin. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 157, 1-8.  
<https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2020.09.013>

Klein, AL, Lubda, M, Skov, PS, Vogt, A, Keck, CM, Lademann, J, Beckers, I, von Hagen, J, Patzelt, A (2020). Investigation of transfollicular caffeine penetration using microdialysis on ex vivo porcine ear skin. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 157, 1-8.  
<https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2020.09.013>

Klein, AL, Lubda, M, Skov, PS, Vogt, A, Keck, CM, Lademann, J, Beckers, I, von Hagen, J, Patzelt, A (2020). Investigation of transfollicular caffeine penetration using microdialysis on ex vivo porcine ear skin. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 157, 1-8.  
<https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2020.09.013>

Klein, AL, Lubda, M, Skov, PS, Vogt, A, Keck, CM, Lademann, J, Beckers, I, von Hagen, J, Patzelt, A (2020). Investigation of transfollicular caffeine penetration using microdialysis on ex vivo porcine ear skin. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 157, 1-8.  
<https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2020.09.013>

Klein, AL, Lubda, M, Skov, PS, Vogt, A, Keck, CM, Lademann, J, Beckers, I, von Hagen, J, Patzelt, A (2020). Investigation of transfollicular caffeine penetration using microdialysis on ex vivo porcine ear skin. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 157, 1-8.  
<https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2020.09.013>

## 9 Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

## 10 Komplette Publikationsliste

### Publikationen:

1. **Klein, AL**, Lubda, M, Specht, D, Pyo, SM, Busch, L., Lademann, J, Meinke. MC, Beckers, I, von Hagen, J, Keck, CM, Patzelt, A (2021). Microdialysis on Ex Vivo Porcine Ear Skin Can Validly Study Dermal Penetration including the Fraction of Transfollicular Penetration - Demonstrated on Caffeine Nanocrystals. *Nanomaterials*, 11(9), 2387. IF (2020) 5,076
2. Breuckmann P, Meinke MC, Jaenicke T, Krutmann J, Rasulev U, Keck CM, Müller RH, **Klein AL**, Lademann J, Patzelt A. Influence of nanocrystal size on the in vivo absorption kinetics of caffeine after topical application. *Eur J Pharm Biopharm.* 167 (2021): 57-64. IF (2019) 4,604
3. Zambrano A, **Klein AL**, Patzelt A. Analysis of the morphometric parameters of pig ear hair follicles. *Skin Res Technol.* 2021 Feb 19. doi: 10.1111/srt.13008. Epub ahead of print. PMID: 33606308. IF (2019) 2,079
4. Darvin ME, Schleusener J, **Klein AL**, Richter H, Schanzer S, Meinke MC, Lademann J, Lohan SB, Targeted penetration of active ingredients into the skin using nanotransport systems - challenges and research findings (2020), *Controlled Release Society*
5. **Klein, AL**, Lubda, M, Skov, PS, Vogt, A, Keck, CM, Lademann, J, Beckers, I, von Hagen, J, Patzelt, A (2020). Investigation of transfollicular caffeine penetration using microdialysis on ex vivo porcine ear skin. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 157, 1-8. IF (2019) 4,604
6. **Klein, AL**, Lubda, M, Taghavi, PA, Lademann, J, Beckers, I, von Hagen, J, Kolmar, H, Patzelt, A (2020). Solvent-containing closure material can be used to prevent follicular penetration of caffeine and fluorescein sodium salt on porcine ear skin. *Skin Pharmacology and Physiology*, 1-9. IF (2018) 1,892

## Präsentationen:

1. **Klein AL**, Lubda M, Lademann J, von Hagen J, Beckers I, Patzelt A “Investigation of transfollicular penetration using microdialysis on ex vivo porcine ear skin “; Research-Seminar Department of Dermatology, Venereology and Allergology, Charité - Universitätsmedizin Berlin, 2020 in Berlin
2. **Klein AL**, Lubda M, Lademann J, von Hagen J, Beckers I, Patzelt A “Use of microdialysis to demonstrate the transport of active substances“; Treffen der Stiftung für Hautphysiologie 2020 in Berlin
3. **Klein AL**, Lubda M, Lademann J, von Hagen J, Beckers I, Patzelt A “Was muss beim selektiven Follikelverschluss beachtet werden?“; 23. Jahrestagung der Gesellschaft Dermopharmazie e.V. 2019 in Düsseldorf
4. **Klein AL**, Lubda M, Lademann J, von Hagen J, Beckers I, Patzelt A “What to consider when performing the follicular closing technique?“; Research-Seminar Department of Dermatology, Venereology and Allergology, Charité - Universitätsmedizin Berlin, 2018 in Berlin
5. **Klein AL**, Lubda M, Lademann J, von Hagen J, Beckers I, Patzelt A “Dermal Microdialysis“; Treffen der Stiftung für Hautphysiologie 2018 in Berlin
6. **Klein AL**, Weber A, Stark R, Heufelder J „Ermittlung eines notwendigen distalen Sicherheitsaums unter Berücksichtigung von Blickwinkeln und Gewebeeigenschaften in der Protonentherapie von Aderhautmelanomen“; 46. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Medizinische Physik e.V. 2015 in Marburg

## Poster:

1. **Shi N**, Hillmering M, Rangsten P, **Klein AL**, Vere-Ayala C, Monino-Romero S, Maurer M, Renlund M, Scheffel J; „Sub-pressure assisted application of sharp hollow microneedles for improved recovery of biomarkers from skin interstitial fluid (ISF) as compared to skin microdialysis“; Tagung der Arbeitsgemeinschaft Dermatologische Forschung 2021 in Berlin
2. **Shi N**, Hillmering M, Rangsten P, **Klein AL**, Vere-Ayala C, Maurer M, Scheffel J, Renlund M; „Sub-pressure assisted application of sharp hollow microneedles improves penetration“; 6<sup>th</sup> Microneedle Conference 2020 in Seoul, Korea
3. **Klein AL**, Lubda M, Akbarzadeh Taghavi P, Lademann J, von Hagen J, Beckers I, Patzelt A „Was muss beim selektiven Follikelverschluss beachtet werden?“; 23. Jahrestagung der Gesellschaft Dermopharmazie e.V. 2019 in Düsseldorf
4. **Klein AL**, Weber A, Stark R, Heufelder J; „Estimation of the distal safety margin for proton therapy of uveal melanoma in respect to tissue composition and patient positioning “; 55th Annual Meeting of the Particle Therapy Co. Operative Group 2016 in Prag, Tschechien

## 11 Danksagung

Die Charité – Universitätsmedizin Berlin hat mich schon während meiner Schulzeit fasziniert. Als ich 2017 das Angebot bekam, hier am Campus Mitte in der Dermatologie meine Doktorarbeit zu beginnen, war ich so unglaublich dankbar. In meiner Schulzeit hätte ich niemals geglaubt, dass ich jemals so eine Chance bekommen würde. Während meiner Promotion, aber auch in der Zeit davor, gab es einige Menschen, die mich auf meinem Weg begleitet haben und ohne die ich vermutlich heute nicht an dem Punkt stehen würde, an dem ich jetzt bin.

Mein besonderer Dank geht an meine Doktormutter PD Dr. Alexa Patzelt. Ihre Begeisterung für das Thema der follikulären Penetration war und ist immer noch ansteckend! Ich bedanke mich für die hervorragende Betreuung, insbesondere auch für die Fortführung nach dem Verlassen der Arbeitsgruppe. Ich hatte immer große Freude an der Diskussion der frisch eingetroffenen Daten der erfolgten Mikrodialyse-Experimente. Sehr wertvoll waren für mich die vielen Besprechungen und Korrekturen, für die sie sich stets viel Zeit genommen hat!

Auch danke ich meinem Zweitbetreuer Prof. Dr. Jörg von Hagen, für spannende Diskussionen sowie der Unterstützung der Zusammenarbeit mit seinem damals noch Doktoranden Dr. Markus Lubda. Der Besuch bei Merck in Darmstadt war ein Highlight und hat mir große Freude bereitet. Vielen Dank, dass das möglich war! Natürlich danke ich an dieser Stelle auch Markus direkt für die gute Zusammenarbeit. Zu Beginn hatte sich herausgestellt, dass die Probenanalyse in dieser Arbeit ein größeres Problem darstellen wird, als dies zunächst vermutet wurde. Dr. Markus Lubda konnte an dieser Stelle aushelfen und die Koffeinanalytik übernehmen. Vielen Dank dafür! Des Weiteren bedanke ich mich bei Merck und direkt bei Prof. Dr. Jörg von Hagen auch für die finanzielle Unterstützung der Promotion.

Ohne Prof. Dr. Ingeborg Beckers, meine Betreuerin seitens der Berliner Hochschule für Technik (BHT), hätte mich mein Weg wohl nicht zum CCP geführt. Hierfür schon einmal vielen Dank! Der wertvolle ‚Blick von außen‘ auf verfasste Texte hat mir oft geholfen, manche Dinge verständlicher zu erklären, wenn ich selbst zu tief im Thema steckte, um Unklarheiten zu erkennen. Des Weiteren freue ich mich sehr, dass ich auf diese Weise den Kontakt zur BHT bis heute aufrechterhalten konnte und dass diese Promotion in einer Zusammenarbeit zwischen der Charité und der BHT entstanden ist.

Mein Dank gilt auch der ehemaligen und aktuellen Leitung der Arbeitsgruppe für Hautphysiologie Prof. Dr. Dr. Jürgen Lademann und Prof. Dr. Martina Meinke. Vielen Dank für die vielfältige Unterstützung, sei es die Entwicklung neuer Ideen für fortführende Experimente, die Diskussion von Ergebnissen oder die Überarbeitung von Publikationen. In diesem Sinne möchte ich mich

auch bei Prof. Dr. Cornelia Keck bedanken, die mit tollen Ideen und kreativen Lösungsansätzen die Arbeit sehr voran gebracht hat.

Das Sammeln der Mikrodialyse-Proben sowie das Aufarbeiten der Hautareale war bezüglich des Zeitmanagements eine echte Herausforderung. Ohne die Unterstützung von Heike Richter hätte ich viele Experimente nicht so zügig durchführen können, sondern hätte sie auf mehrere Wochen ausdehnen müssen. Auch Loris Busch, Dr. Pin Dong, Dr. Victor Hugo Pacagnelli Infante und Diba Rafii danke ich für die Hilfe bei der Durchführung der Experimente.

Dem gesamten Team des CCP danke ich für die enorme Unterstützung in den vergangenen Jahren. Es war eine spannende Zeit, die mir große Freude bereitet hat. Sabine Grenz danke ich für die Englischkorrekturen meiner Publikationen. Ich freue mich, Teil der Arbeitsgruppe zu sein und dies auch zu bleiben.

Meinen Doktorandenkollegen und -kolleginnen Dr. Anja Wolf, Dr. Pin Dong und Loris Busch, die mich über weite Zeiten meiner Promotion in der Arbeitsgruppe begleitet haben, möchte ich herzlich danken. Oft haben wir uns gegenseitig geholfen, neue Ideen entwickelt und uns gegenseitig von der Arbeit abgelenkt, damit es danach wieder deutlich produktiver weitergehen konnte. An dieser Stelle möchte ich mich auch bei Dr. Silke Lohan bedanken, mit der ich im vergangenen Jahr ein Büro geteilt habe, und die mich in dieser Zeit immer wieder unterstützt und ermutigt hat diese Arbeit fertigzustellen.

An dieser Stelle möchte ich auch die vielen Menschen erwähnen, die in meinem Leben eine wichtige Rolle spielen, auch wenn sie nicht direkt an meiner Promotionsarbeit beteiligt waren. Das sind in erster Linie meine Eltern, die mich von klein auf unterstützt haben. Ich bedanke mich, dass ich die Möglichkeit hatte, eine solche Ausbildung zu erhalten. Ohne ihre Unterstützung während meiner Schulzeit oder auch die finanzielle Unterstützung wäre dieser Weg deutlich beschwerlicher gewesen.

Meiner Schwester und meinen Freunden sage ich Danke für unzählige schöne Stunden in den vergangenen Jahren, die mir sehr dabei geholfen haben, auch einmal ‚abzuschalten‘, was mir sonst oft nicht so gut gelingt.

Mein besonderer Dank gilt meinem Partner Maximilian Klein. Insbesondere im vergangenen Jahr musste er an der ein oder anderen Stelle zurückstecken, weil ich Zeit für die Fertigstellung meiner Arbeit brauchte. Ich bedanke mich für sein Verständnis und seine Unterstützung!