

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

DISSERTATION

Die Reservoirkapazität des Stratum corneum –
ein Vergleich von vier Methoden in vitro

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Helen Taube

aus Halle an der Saale

Gutachter/in: 1. Prof. Dr. Dr. J. Lademann
 2. Prof. Dr. med. M. Fartasch
 3. Prof. Dr. R. Neubert

Datum der Promotion: 08.04.2011

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	5
1 Einleitung.....	6
1.1 Der anatomische Aufbau der Haut	7
1.2 Die Haut aus funktioneller Sicht	8
1.3 Das Reservoir des Stratum corneum (SC)	10
1.4 Penetrationswege.....	11
1.5 Penetrationsbeeinflussende Faktoren	14
1.5.1 Okklusion	16
1.5.2 Lipophilität / Hydrophilität	18
1.6 Tierhautmodell: Vergleich mit menschlicher Haut	19
1.7 Methoden zur Untersuchung der Penetration oberflächlich aufgetragener Substanzen	22
1.7.1 In-vivo-Experimente	23
1.7.2 In-vitro-Experimente	25
1.8 Ziel der Arbeit	28
2 Material und Methoden.....	31
2.1 Material.....	31
2.1.1 Die Hautpräparation	31
2.1.2 Herkunft und Aufbereitung des Gewebes Schweineohr	32
2.1.3 Modellschubstanz der Penetration.....	32
2.1.4 Auftragen der Modellschubstanz.....	33
2.1.5 Weitere Untersuchungsmaterialien	33
2.2 Methoden	34
2.2.1 Das Abrissverfahren.....	35
2.2.2 Saarbrückenmodell (SBM)	36
2.2.3 Direkthautmodell (DHM).....	37
2.2.4 Modell der Vollhaut in der Franz-Diffusionszelle (V-FDZ)	37
2.2.5 Modell der Spalthaut in der Franz-Diffusionszelle (S-FDZ)	39
2.2.6 Materialaufbereitung	40
2.2.7 Bestimmung von Flufenaminsäure mittels HPLC	40
2.2.8 Beziehung zwischen Schubstanzmenge und Hautschicht	41
2.2.9 Statistische Auswertung	42

3	Ergebnisse	43
3.1	Saarbrückenmodell (SBM)	43
3.2	Direkthautmodell (DHM)	46
3.3	Modell der Vollhaut in der Franz-Diffusionszelle (V-FDZ)	48
3.4	Modell der Spalthaut in der Franz-Diffusionszelle (S-FDZ)	51
3.5	Vergleich der Ergebnisse	54
4	Diskussion	56
4.1	Saarbrückenmodell (SBM)	58
4.2	Direkthautmodell (DHM).....	62
4.3	Modell der Vollhaut in der Franz-Diffusionszelle (V-FDZ)	64
4.4	Modell der Spalthaut in der Franz-Diffusionszelle (S-FDZ)	68
4.5	Thesenauswertung.....	70
5	Zusammenfassung	80
	Literaturverzeichnis	84
	Abbildungsverzeichnis	94
	Tabellenverzeichnis	95
	Publikationen	96
	Lebenslauf	97
	Erklärung	98
	Danksagung	99

Abkürzungsverzeichnis

ATR-FTI	Abgeschwächte Totalreflexion (englisch Attenuated Total Reflection) - Fouriertransformierte Infrarotspektroskopie
DHM	Direkthautmodell
DSL	tiefere Hautschichten (englisch: Deeper Skin Layers)
FDZ	Franz-Diffusionszelle
FS	Flufenaminsäure
h	Stunden
HPLC	Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie (englisch: High Pressure Liquid Chromatography)
MW	Mittelwert
NaOH	Natriumhydroxid
SBM	Saarbrückenmodell
SC	Stratum corneum
SD	Standardabweichung
S-FDZ	Modell der Spalthaut in der Franz-Diffusionszelle
Tab.	Tabelle
TEWL	transepidermaler Wasserverlust (englisch: Transepidermal Water Loss)
V-FDZ	Modell der Vollhaut in der Franz-Diffusionszelle

1 Einleitung

Die Untersuchung der Penetration von topisch applizierten Substanzen in und durch die menschliche Haut ist besonders unter zwei Gesichtspunkten wichtig: zum einen kann herausgefunden werden, ob Schadstoffe in die menschliche Haut eindringen, zum anderen lässt sich ermitteln, in welcher Menge und Geschwindigkeit Wirkstoffe und Medikamente in und durch die Haut gelangen. Damit ist das Wissen darüber sowohl aus arbeitsmedizinischen oder umwelttoxikologischen Gesichtspunkten als auch zur Beurteilung topischer Therapien wertvoll.

Die Haut ist das größte menschliche Organ. Sie schließt den gesamten Körper ein und ist damit einerseits seine Hülle und andererseits das Grenzorgan zu seiner Umwelt.

Aufbau und Funktionen der Haut sind heute gut bekannt. Sie beeinflussen auf unterschiedliche Weise das Eindringen von Wirk- und Schadstoffen in den Körper.

Die topische Therapie durch Applikation von Stoffen ist so alt wie die menschliche Entwicklung. Heute weiß man, dass Hautkrankheiten - neben eigenständigen Krankheiten - auch Symptome innerer Leiden sein können. Wenige Dermatosen beruhen ausschließlich auf Störungen in der Haut. Viele Hauterscheinungen können daher auch systemisch behandelt werden.

Für die externe Behandlung ist es ausschlaggebend zu wissen, in welche Hautschicht der Wirkstoff gelangt, wie er verstoffwechselt wird und ob er durch die Hautbarriere hindurch in den Blutkreislauf gelangen kann. Penetrationsuntersuchungen geben zu diesen Fragen Aufschluss.

Während bei der externen Therapie von Krankheiten oft eine Wirkstoffaufnahme in die Haut gewünscht wird, soll dagegen das Eindringen von Schadstoffen aus der Umwelt oder der Arbeitswelt vermieden werden. Auch der Wunsch der Kosmetikindustrie zunehmenden Einfluss auf Glätte, Frische, Farbe und Feuchtigkeit der Haut nehmen zu können und einen gleichzeitigen Schutz vor dem Eindringen von Schadstoffen zu bieten, hat die Penetrationsuntersuchungen an der Haut gleichermaßen vorangetrieben.

Um die Wirkung verschiedener Substanzen, die aus medizinischen und kosmetischen Gründen auf die Haut aufgetragen werden, richtig einschätzen zu

können, sind Kenntnisse über die Physiologie und die Penetrationseigenschaften der Haut notwendig.

Ziel dieser Arbeit war es, mit Flufenaminsäure als Modellsubstanz das Wirkstoff-Zeitprofil in den verschiedenen Hautschichten anhand von vier In-vitro-Penetrationsmodellen zu untersuchen, sowie Vor- und Nachteile dieser Modelle näher zu charakterisieren und gegenüberzustellen.

1.1 Der anatomische Aufbau der Haut

Die menschliche Haut besteht aus drei Schichten: Epidermis, Dermis und Subkutis. Der Epidermis kommt dabei eine besondere Bedeutung als Reservoir und Barriere zu. Über der äußeren Schicht der Epidermis (=Hornschicht) liegt ein dünner Film von Lipiden. Diese von Talgdrüsen produzierte Mischung hält die Haut geschmeidig und dehnbar und schützt vor dem Eindringen von Krankheitserregern und Chemikalien. Der Talg besteht hauptsächlich aus Triglyceriden, freien Fettsäuren, Wachsestern, Squalenen, Cholesterin und abgestorbenen Zellen. Die auf der Hautoberfläche spreitenden Lipide sind mit Schweißdrüsenbestandteilen vermischt und bilden eine Emulsion.

Die Epidermis besteht aus einem vitalen und einem abgestorbenen, verhornten Anteil von Zellen. Die unterste Schicht der Epidermis ist die Basalzellschicht. Hier werden Epidermiszellen durch Mitose ständig neu gebildet und wandern durch den Zellverband der Epidermis nach außen an die Grenzschicht zur Umwelt. Auf das einschichtige Stratum basale, der Matrixschicht, folgt das zwei bis fünf Zelllagen starke Stratum spinosum (Stachelzellschicht), in dem das Zellvolumen zunimmt und die Zellachse sich horizontal formiert. Hieran schließt sich das Stratum granulosum (Körnerschicht) an, das aus ein bis drei Zelllagen besteht. Die Körnerschicht besitzt basophile Keratohyalinkörperchen und membranumhüllte lamelläre Granula, welche Sphingomyelin, Glucosylceramide, Cholesterin und freie Fettsäuren enthalten [Schäfer 2001] und einen wichtigen Teil der Barriere übernehmen [Elias 1996]. Keramide sind vitale Komponenten der Wasserbarriere der Haut und zudem ebenfalls ein wichtiger Bestandteil bei der Aufrechterhaltung der epidermalen Barriere [Jennemann 2007]. Die Wasserpermeabilität scheint im Wesentlichen von der lamellären Ordnung der Lipiddoppelschichten zwischen den Korneozyten

abzuhängen [Fartasch 1993, 1997]. Auch die strukturierten interzellularen Lipide des Stratum corneum (SC) spielen eine wichtige Rolle in der Aufrechterhaltung der Barrierefunktion der Haut. Der Interkorneozytenraum enthält komplexe unpolare Lipide, die eine Wasserbarriere bilden [Marks 2004].

Im Stratum granulosum laufen folgende Zelldifferenzierungsvorgänge ab: das Abplatten der Zellen, der Verlust der Zellkerne, die Dehydratation, die Ausbildung einer zementartigen Lipidsubstanz im Interzellularraum und schließlich die Verhornung. Das Stratum granulosum geht in das SC über, das aus zehn bis dreißig Zelllagen kernloser Korneozyten besteht. Es konnte bei In-vivo-Versuchen am Menschen gezeigt werden, dass bis zur Abschilferung der Zellen und während ihrer Wanderung an die Oberfläche des SC die Korneozyten zunehmend ihre Adhäsionskräfte verlieren [King 1979]. An Handflächen und Fußsohlen befindet sich zusätzlich noch das Stratum lucidum.

Außer den regulären Zellorganellen wie Golgi-Apparat, Endoplasmatisches Retikulum oder Mitochondrien besitzen die Keratinozyten charakteristische Strukturen wie:

- Zytoplasmatische Filamente: intrazelluläres Fasernetz,
- Keratinfilamente (intermediäre Fasern),
- Aktinfilamente (Mikrofilamente, die der Zellfestigkeit dienen),
- Adhäsionsorganellen (interzelluläre Befestigungsstrukturen) und
- Desmosomen (Haftplatten der interzellulären Adhärens).

1.2 Die Haut aus funktioneller Sicht

Mit der Applikation von Wirkstoffen auf die Haut werden verschiedene Ziele verfolgt: manche Substanzen sollen möglichst auf der Hautoberfläche verbleiben [Brain 2007, Chatelain 2003, Lademann 1999, Mavon 2007, Teichmann 2006] und die Haut schützen oder abdecken (z.B. bei Sonnencreme), andere sollen in die Haut penetrieren, um sich dort auszubreiten und ihre Wirkung zu entfalten [Herai 2007]. Dies ist bei der Behandlung von Hautkrankheiten der Fall, bei denen topische Wirkstoffe appliziert werden. Soll eine Substanz systemisch wirken, kann der Wirkstoff ebenfalls auf die Haut aufgetragen werden, um so den entero-hepatischen

Kreislauf zu umgehen [Suzuki 2002]. In diesem Fall sollte die Haut für die entsprechende Substanz gut permeabel sein. Nach dem Auftragen des Substanzgemisches erfolgt die Freisetzung des Wirkstoffes daraus (Liberation). Die Substanz diffundiert durch die durchschnittlich 12-15 Zellschichten des sauren und überwiegend lipidhaltigen SC und kann anschließend intrazellulär [Hadgraft 2004], durch die interstitiellen Zwischenräume [Albery 1978] bzw. durch die Drüsen und Follikel [Hueber 1994, Lademann 2001, 2004, Otberg 2004, Schäfer 2001, Tenjarla 1999] dringen, bis sie auf die dermalen Gefäßnetze trifft.

Die Barrierefunktion der Haut ist entscheidend für ihr Penetrationsverhalten [Jakasa 2007, Kalbitz 1996]. Sie befindet sich in erster Linie in der obersten Schicht der Epidermis, dem SC. Das SC ist die Barriere zur passiven Diffusion von Wasser aus dem Inneren des Körpers durch die Haut, was uns erlaubt, an der Luft zu leben ohne zu dehydrieren oder auszukühlen [Marks 2004]. Sie ist gleichzeitig die Barriere für Reizstoffe oder Mikroorganismen aus der Umwelt in die Haut. Die Haut besitzt zudem immunologische Funktionen. Sie zeichnet sich durch komplexe Abwehrfunktionen aus [Elias 2005].

Das SC besteht aus zwei sehr unterschiedlichen Phasen: die interzelluläre und in multiplen Phasen angeordnete komplexe Mischung von Lipiden (Keramide, Fettsäuren, Cholesterolester) sowie die keratingefüllten Korneozyten, deren verhornte Hüllen eng mit dem umgebenden Gittergerüst interagieren [Bouwstra 1992, 2003]. Diese beiden Phasen, die kristalline und die flüssige, scheinen entscheidend für die Barrierefunktion des SC zu sein. Es konnte gezeigt werden, dass diese Lipidzusammensetzungen in hohem Maße das SC-Barriereverhalten beeinflussen. Das beweist, dass Proteine keinen großen Anteil an diesem Verhalten haben.

Außerdem befinden sich in diesem Netzwerk die Haarfollikel, Schweißzelldrüsen und andere Hautanhangsgebilde, die die Membranstruktur unterbrechen. Trotzdem zeigen Untersuchungsergebnisse, dass sich diese heterogene Membran des SC wie eine homogene Barriere für den Wassertransport in vivo verhält [Kalia 1996].

Der transepidermale Wasserverlust TEWL, die Infrarotspektroskopie, die Impedanzspektroskopie und die Hautblutflussmessung wurden genutzt, um die SC-Barrierefunktion beurteilen zu können [Curdy 2001, Fang 2003, Rosado 2003a]. Außerdem wurden zur Beurteilung die SC-Hydratation, die Hautfarbe und der

oberflächliche Haut-pH-Wert untersucht [Breternitz 2007]. So fand sich nach Irritation der Barriere des SC ein erhöhter TEWL [Fartasch 1997]. Signifikante Unterschiede im TEWL zeigten sich an verschiedenen anatomischen Stellen nach gezielter Manipulation der SC-Barriere durch Abrisse der Kerneozyten mit Hilfe eines adhesiven Films [Breternitz 2007]. Auch atopische Haut, welche keine intakte SC-Barriere aufweist, wies einen erhöhten TEWL auf [Fartasch 1992]. In einer weiteren Arbeit zeigte mehrmaliges Abreißen der obersten Kerneozyten des SC eine höhere Diffusionsrate von Flufenaminsäure aber noch keine Veränderung im TEWL [Netzlaff 2006a]. So wurde geschlossen, dass der TEWL zwar verschiedene Störungen des SC wahrnehmen kann, jedoch für geringe Veränderungen nicht sensibel genug ist, die auf die Wirkstoffdiffusionsrate schon einen Einfluss haben können.

Weiterhin wurde untersucht, ob vom Blutfluss in der Haut auf die Dicke der Epidermis geschlossen werden kann, aber diese beiden Werte wiesen keine Korrelation auf [Monteiro-Riviere 1990]. Ein Zusammenhang zwischen Anzahl der Zellschichten, SC Dicke und Permeabilität in vivo am Menschen wurde festgestellt [Holbrook 1974]. Es zeigte sich, dass die Dicke des SC mit der Anzahl der Zellschichten korrelierte und beide umgekehrt proportional zur Permeabilität dieser Hautschicht waren.

1.3 Das Reservoir des Stratum corneum (SC)

Das SC stellt für die Penetration von Stoffen die größte Hürde dar und übernimmt gleichzeitig auch eine Speicherfunktion für Stoffe, die auf die Hautoberfläche aufgetragen wurden [Rougier 1983, Hadgraft 2005]. Die Reservoirfunktion des SC ist schon lange bekannt und wurde anfangs mit Hilfe des Blanchingeffektes bei einem topischen Glukokortikoid [Vickers 1963 und 1972] beziehungsweise einer Hautfarbenmessung (Chromatometrie) bestimmt [Clarys 1999]. Die Reservoirfunktion ist wichtig für die Pharmakokinetik eines Wirkstoffes [Schäfer 1978]. Ist die Hornschicht gestört, so sind auch Reservoirfunktion und Barrierefunktion gestört. Mit zunehmender Tiefe der Hornschicht nehmen die Reservoirfunktion ab- und die Barrierefunktion zu [Stoughton 1965].

Furchen und Falten als typische Strukturen der menschlichen Haut repräsentieren ein eigenes Reservoir für topisch applizierte Substanzen [Lademann 2005b]. Dieses Reservoir kann die Penetration der Substanzen ins SC beeinflussen. Die

Abristechnik mittels einseitigen Klebefilms erlaubte die Bestimmung des Hornschichtprofils und der lokale Verteilung der topisch applizierten Substanz ungestört der Charakteristik der normalen Hautstruktur. So können die Penetration und die Bioverfügbarkeit von Wirkstoffen und Kosmetika im SC im Verhältnis zum Hornschichtprofil quantitativ dargestellt werden. Die Pseudoabsorption der Korneozyten war dabei das Maß für die Menge der entfernten Korneozyten jedes einzelnen Abrisses im sichtbaren Bereich (430 nm) und wurde verglichen mit der Proteinabsorption im UV Bereich bei 278 nm [Lindemann 2003].

Weitere Untersuchungen beschäftigten sich mit der Bestimmung der Gesamtabsorption einer Substanz durch das Reservoir des SC [Rougier 1983]. Dabei fand sich eine lineare Beziehung zwischen dem Reservoireffekt des SC nach 30 Minuten und dem Gesamtwert des radioaktiv markierten Wirkstoffes nach 96 Stunden Einwirkzeit im Harn und Kot der haarlosen Ratten.

Eine In-vivo-Methode an der menschlichen Haut wurde entwickelt, um die Reservoirfunktion des SC quantitativ bestimmen zu können [Teichmann 2005]. Dazu wurde eine Öl-in-Wasser-Emulsion mit einem UV-Filter mehrfach in zunehmender Menge auf die Haut aufgetragen. Nach einer und nach sechs Stunden wurde mit Hilfe von Klebefilm-Abrissen des SC die Sättigung des Reservoirs bestimmt. Die maximale Aufnahmefähigkeit des Stoffes im SC-Reservoir ergab 2,7 mg/cm². Zudem wurde eine Korrelation zwischen Aufnahmefähigkeit des SC und dem TEWL festgestellt. Eine Verlängerung der Zeit zwischen Auftragung und SC Entfernung erbrachte keinen weiteren Anstieg der Konzentration im SC. Das zeigt, dass das Reservoir des SC limitiert ist. Die Sättigungsmenge entsprach einem individuellen Maß der Haut und war zusätzlich von Substanz und Zubereitung abhängig.

1.4 Penetrationswege

Eine oberflächlich aufgetragene Substanz kann theoretisch auf diesen Wegen in oder durch die Haut gelangen [Scott 1988, Ring 1985]:

1. die interzelluläre Penetration durch das Stratum corneum [Albery 1978];
2. die transzelluläre Penetration durch die Korneozyten und
3. die Penetration über die Hautanhangsgebilde [Essa 2002].

Lange ging man davon aus, dass die Penetration von topisch applizierten Substanzen ausschließlich interzellulär erfolgt. In jüngster Zeit konnte jedoch gezeigt werden, dass es auch einen follikulären Penetrationsweg gibt. Eine transzelluläre Penetration konnte bisher nicht nachgewiesen werden.

Den Shuntwegen der transkutanen Penetration, die durch Haarfollikel, Schweißdrüsen und Talgdrüsen gebildet werden, kommt mehr und mehr Bedeutung zu [Hadgraft 2004, Jamouille 1990, Lademann 2005a, Otberg 2004, Schäfer 2001, Tenjarla 1999]. Dabei spielen die Haarfollikel unter diesen Shuntwegen eine besonders wichtige Rolle [Lieb 1997]. Im Fall der Arbeit von Jamouille konnten die radioaktiv markierten Testsubstanzen, die in vivo auf die menschliche Haut aufgetragen wurden, mittels Autoradiographie in den Haarfollikeln und teilweise in den Talgdrüsen nachgewiesen werden. Je perfekter die Barrierefunktion der Hornschicht ist, umso größer ist die relative Rolle die die „Imperfektionen“ der Haut in ihrer Funktion als Abwehrorgan (Barriere) spielen [Schäfer 2001]. Drei Arten der „Imperfektion“ wurden betrachtet: der Follikelapparat der Haarfollikel, die Schweißdrüsen, sowie Mikroläsionen in der zwischenfollikulären Hornschicht. Jeder dieser Strukturen kann einen vertikalen Weg für perkutane Absorption repräsentieren - einen Shunt.

Die Rolle der Haarfollikel in der transdermalen Freisetzung ist durch Tiermodelle zum Teil schwierig zu erklären. Die meisten Versuchstiere haben eine wesentlich höhere Follikeldichte als der Mensch [Bronaugh 1982, Otberg 2004, Toll 2004, Scott 1991]. Eine neue Technik wurde an menschlicher Haut präsentiert, um Shuntroutenfreisetzung von transepidermalen Bestandteilen abzugrenzen [Barry 2002]. Verglichen wurden menschliche Epidermis und ein „Sandwich“ aus SC und Epidermis miteinander. Bei diesem Sandwich-Modell entstehen durch Überlagerung höchstens 0,1% Öffnungen und es hat sich als sinnvolles Modell für die Untersuchung der Bedeutung der Hautanhangsgebilde erwiesen [Essa 2002]. Durch ein Elektronenmikroskop wurde die Penetration bei 400, 600, 960 und 1200 µm Tiefe sichtbar gemacht [Lieb 1995]. Liposomalbasierte Formulierungen gingen gezielt in die Haarfollikel, alkoholbasierte Zusammensetzungen hingegen nicht.

In einer Arbeit mit Schlangenhaut, welche keine Hautanhangsgebilde besitzt, wurden die Permeationseigenschaften einer stark polaren und einer unpolaren Substanz an dieser und 15 anderen Spezies miteinander verglichen [Panchagnula 1997]. Die

höchste Permeabilität beider Testsubstanzen zeigte sich hier jedoch bei der follikelfreien Schlangenhaut. Ein Zusammenhang zwischen Anzahl der Haarfollikel und Permeabilität bei den anderen Spezies wurde in dieser Arbeit nicht gefunden.

In einer weiteren Untersuchung fanden sich hohe Korrelationen zwischen Sebumproduktion und Haarwachstum auf der einen Seite und Sebumproduktion und Permeation auf der anderen Seite [Lademann 2001]. Es zeigten sich **passive** Follikel in Bezug auf die Penetration, die kein Sebum produzieren und kein Haarwachstum besitzen und **aktive** Follikel mit Sebumproduktion und Haarwachstum, wobei letztere für die Penetration topisch applizierter Substanzen besonders relevant sind [Toll 2004]. Die SC-Entfernung mittels differentiellen Abrissen in Kombination mit Laserscanning-Mikroskopie zeigte sich geeignet, um die Penetration topisch applizierter Substanzen in Follikeln zu bestimmen [Teichmann 2006].

Durch die unteren Abschnitte der Haarfollikel, die mehrschichtiges verhorntes Plattenepithel aufweisen, gelangten verschiedene Partikel $> 3 \mu\text{m}$, nicht hindurch [Lademann 1999]. Dieser Partikel konnten damit nicht in die lebenden Schichten der Haut eindringen. Mikropartikel mit diesem Durchmesser gelangten somit nur in die Follikelöffnungen [Lademann 2004], was für den klinisch-therapeutischen Bereich große Bedeutung haben kann.

Durch Oberflächenbiopsien mit Cyanoakrylat an sieben verschiedenen Hautregionen des Menschen wurden die Follikelgröße und die Follikeldichte der Vellushaare bestimmt und mit einer anderen Arbeit verglichen [Otberg 2004]. Es zeigte sich, dass die Hautanhangsgebilde, besonders die Haarfollikel, einen höheren Anteil der gesamten Hautoberfläche ausmachten als 0,1%, wie bis dahin angenommen wurde, und dass ihnen daher eine größere Bedeutung bei Penetrationsuntersuchungen zukommt. Die aktuell erhaltenen Werte variierten stark zwischen den verschiedenen Körperregionen und erweitern die Hautoberfläche und damit die Penetrationsoberfläche und das Reservoir des SC um maximal 13,7% an der Stirn und minimal 1% am Unterarm [Otberg 2004]. Diese hohe Varianz ergibt sich durch das unterschiedliche Volumen und die unterschiedliche Anzahl der Haarfollikeln an den verschiedenen Körperstellen.

1.5 Penetrationsbeeinflussende Faktoren

Geschwindigkeitsbestimmend für die Wirkstoffaufnahme eines Stoffes in die Haut ist dessen Penetrationsvermögen durch das SC [Ring 1985]. Die Dicke der Hornschicht, pathologische Veränderungen der Haut, die Lokalisation mit Anzahl und Größe der Haarfollikel, das Alter und die Hautdurchblutung beeinflussen ebenfalls die Penetration.

Manche Wirkstoffe können die Haut allein schwer durchqueren und sind deshalb an eine Trägersubstanz gebunden, ein Vehikel. Der Penetrationsfluss von topisch applizierten Substanzen hängt von der Aktivität der Substanz in der Haut und von der Interaktion zwischen Vehikel und Haut ab [Rosado 2003b]. Dieser kann die Aktivität und damit die Hautbarriereigenschaften verändern.

Die Aufnahme eines Wirkstoffes und seiner Trägersubstanz wird somit größtenteils durch die Barrierefunktion des SC limitiert. Um eine klinisch relevante Wirkstoffmenge in den einzelnen Hautschichten zu erreichen gibt es eine große Anzahl an Penetrationsbeschleunigern [Tenjarla 1999]. Die Effekte, die sie auslösen, sind sehr vielfältig: sie erhöhen die Hydratation der Haut, weiten die Desmosomen zwischen den Kerneozyten auf [Walters 1988], interagieren mit der interzellulären Lipiddomäne oder den Proteinen [Goodman 1988], ändern die Löslichkeitseigenschaften des SC oder verändern die thermodynamische Aktivität des Vehikels oder die Lösungseigenschaften der Substanz im SC [William 2004]. Einen optimalen Penetrationsverstärker gibt es nicht. Er muss immer auf das Vehikel, den Wirkstoff und dessen Konzentration abgestimmt werden [Surber 2005]. In klinischen und experimentellen Situationen verändern sich die Trägersubstanzen nach dem Auftragen deutlich (Vehikel-Metamorphosis).

Der hauptsächliche Transfer durch das SC ist kontrolliert durch Verteilung, Diffusion und Löslichkeit des Wirkstoffes im SC. In den meisten Fällen beruht die Erhöhung der Penetration auf der Erhöhung einer dieser drei Kriterien. Die Wirkungsweise besteht darin, die Löslichkeit oder Diffusionsfähigkeit des Wirkstoffes im SC reversibel zu verändern [Suzuki 2002]. Es ist wichtig zwischen Modulatoren zu unterscheiden, die den Lipidweg beeinflussen und solchen, die den polaren Weg verändern [Kalbitz 1996].

Die Penetrationsfähigkeit der epidermalen Barriere kann durch folgende Stoffe gesteigert werden:

1. durch Anstieg der Wirkstoffdurchgängigkeit, indem man die SC-Lipidstruktur verändert, z. B. durch den Zusatz von Fettsäuren [Bouwstra 1998, Moser 2001],
2. durch Anstieg der Wirkstofflöslichkeit in der Haut, z. B. durch Propylenglyzerol, Glykol oder Ethanol [Moser 2001, Stinchcomb 2004, Takahashi 2001] und
3. durch Anstieg des Sättigungsgrades des Wirkstoffes in der Formulierung, durch Erhöhung des Wirkstoffgehaltes in der Trägersubstanz oder durch die Löslichkeit des Wirkstoffes in der Trägersubstanz [Dias 2004, Dupuis 1986, Moser 2001].

Die Penetration einer Substanz kann aber auch auf physikalische Weise (z.B. Iontophorese) [Barry 2002, Edwards 1994], der Phonophorese [Alvarez-Román 2004] oder durch Okklusion [Feldmann 1965] erhöht werden.

Um systemische Nebenwirkungen zu vermeiden, können auch Stoffe einem topisch applizierten Substanzgemisch hinzugefügt werden, die die Wirkung des Wirkstoffes verzögern oder abschwächen [Coderch 1999, Kalbitz 1996, William 2004]. Bei Insektenschutzmitteln oder Sonnenschutzcremes ist die Wirkung auf der Oberfläche erwünscht und eine Reduktion der Permeation erforderlich [Hadgraft 2001].

Auch die anatomische Lokalisation hat einen großen Einfluss auf das Penetrationsverhalten. Es zeigte sich, dass die Haut der Handfläche, trotz der sehr viel dickeren Hornschicht, genauso permeabel ist wie die des Unterarmes [Maibach 1971]. Die Haut am Abdomen und Handrücken erwies sich als doppelt so durchgängig wie die am Unterarm. Follikelreiche Stellen wie Kopf, Wange, postaurikuläre Haut und Stirn zeigten eine vierfach, die Axilla eine vier- bis siebenfach höhere Penetrationsrate im Vergleich zur Haut des Unterarmes. Das Skrotum zeigte sogar eine totale Absorption der getesteten lipophilen Pestizide.

Wenn man den pH-Wert bei wiederholten Korneozytenabrissen misst, so findet man auf der natürlichen Oberfläche einen Wert von 4,5-5 und einen durchschnittlichen pH-Wert von 6,9 in den tiefsten Schichten des SC [Öhmann 1994]. Durch die Veränderung des pH-Wertes findet auch eine Veränderung im Penetrationsverhalten des Wirkstoffes statt [Elias 1996]. Die Schicht der Korneozyten quillt bei alkalischem pH auf. Der Effekt des pH-Wertes auf die Permeabilität an exzidiierter Haut wurde in einer anderen Arbeit an zwei lipophilen Modellsubstanzen untersucht und zeigte keine Beeinflussung des lipoidalen Weges der Penetration von Lösungen mit einem

pH von 1,0-11,0 [Sznitowska 2001]. In einer weiteren Untersuchung zeigte sich ein niedrigerer Penetrationskoeffizient bei einem pH-Wert von 5,5 als bei einem pH-Wert von 7,4 bei verschiedenen Substanzen, die an menschlicher hitzeseparierter Epidermis getestet wurden.

Eine Erhöhung der Hauttemperatur beispielsweise durch externe Temperaturerhöhung (hohe Raumtemperatur), bei Okklusion oder durch interne Temperaturerhöhung (körperliche Aktivität) steigerte die Permeabilität der Haut [Kalbitz 1996]. Erklärt wird diese Permeabilitätssteigerung durch eine Vasodilatation, bei der die Haut stärker durchblutet wird und dadurch ein stärkerer Abtransport des Wirkstoffes stattfindet. Manche transdermalen Wirkstoffabgaben zeigen jedoch weder eine Temperatur- noch ein pH-Wert-Abhängigkeit [Lopez 2005].

Die Penetration ist ebenfalls steigerungsfähig durch Substanzen, die die Barriere des SC teilweise auflösen [Coderch 1999]. Die Abrissmethode, bei der die Dicke des SC vermindert wird, kann somit eine Steigerung der Penetration hervorrufen, wobei oft nicht das gesamte SC entfernt wird. So wird die Reservoirfunktion durch das Abreißen überwiegend zerstört [Vickers 1963]. Die Abrissmethode, die sowohl für In-vivo- als auch für In-vitro-Experimente genutzt wird, ist in der Literatur außer zum Substanznachweis auch zur Steigerung der Permeabilität [van der Valk 1990] oder zur Untersuchung akuter Barrierestörungen [Breternitz 2007] angewandt worden.

Bei Krankheiten wie Psoriasis und vielen Ekzemen kann eine Änderung der Penetrationsfähigkeit durch Entzündung und Hyperproliferation des SC auftreten [Elias 1996]. Es zeigte sich jedoch, dass das Ausmaß der Erkrankung, gemessen am TEWL und histologischen Beobachtungen, nicht immer mit der Erhöhung der Penetration korreliert [Fang 2003].

1.5.1 Okklusion

Eine Okklusion der Haut erfolgt durch eine wasserundurchlässige Abdeckung und bewirkt eine Reihe von tiefgreifenden Veränderungen am Hydratationsstatus, der Barrierepermeabilität, der epidermalen Lipide, der DNA-Synthese, der mikrobiellen Flora und zahlreichen molekularen und zellulären Prozessen [Zhai 2001]. Oft steigt dabei die perkutane Absorption aufgetragener Substanzen. Okklusion blockiert den transdermalen Wasserverlust, wodurch die Hydratation des SC steigt, die Kerneozyten anschwellen und die Aufnahme von Wasser in interzelluläre

Lipiddomänen erreicht wird. So kann der Wassergehalt im SC von normalerweise 10-20% auf 50% und die Temperatur von 32°C auf 37°C ansteigen. Okklusion verhindert gleichzeitig die Verdunstung der aufgetragenen Substanz und führt somit zu einer höheren Verfügbarkeit.

Eine andere Arbeit über die physiologischen Veränderungen der Hautbarrierefunktion in Relation zum Level der Okklusion, der Auftragungszeit und der klimatischen Bedingungen wurde vorgestellt [Schäfer 2002]. Bei 25°C und 50% relativer Luftfeuchtigkeit waren Hauthydratation, Oberflächenverdunstung und relative Luftfeuchtigkeit zwischen Hautoberfläche und Okklusionsverband bei einem luftdurchlässigen Verband im Gegensatz zum luftundurchlässigen Verband reduziert. Bei höherer Temperatur und Luftfeuchtigkeit (30°C und 75%) stiegen die drei Größen unter beiden Verbänden an. Bei niedrigerer relativer Luftfeuchtigkeit und Temperatur (20°C und 30%) hingegen stieg keine der Größen an.

Eine Hydratation des SC durch einen Okklusionsverband oder den Okklusionseffekt einer Salbengrundlage wurde schon bei früheren Untersuchungen beobachtet [Ring 1985]. Die Tiefenwirksamkeit einer dermatologischen Behandlung wurde durch die Verhinderung der Abdunstung unterstützt. Angeborene Anhidrose verminderte die Permeation um den Faktor 100. Maximales Schwitzen erhöht sie um den Faktor 10. Eine Salbengrundlage kann durch die erhöhte Hydratation der Haut, die durch die Okklusion erreicht wird, ähnliche Effekte erzeugen.

Die Effekte der Okklusion an perkutaner Absorption von zwei Zusammensetzungen mit verschiedenen physiochemischen Eigenschaften wurden *in vitro* untersucht [Treffel 1992]. Die Absorption menschlicher abdomineller Haut wurde in einer Franzdiffusionszelle und einer Teflondiffusionszelle jeweils mit und ohne Okklusion gemessen. Die Permeation der lipophilen Substanz unter Okklusion war 1,6x höher, während die Permeation der amphiphilen Zusammensetzung unverändert blieb. Die fehlende Penetrationserhöhung unter Okklusion galt besonders den hydrophilen und nur leicht lipophilen Stoffen.

Verglichen wurde die freie Auftragung von Östradiol aus Liposomen mit der Auftragung unter Okklusion mit dem Ziel, den Einfluss der Hydratation der Haut zu beobachten [Maghraby 2001]. Die Okklusion, die mit einer erhöhten Hydratation der Haut einherging, verminderte die Freisetzungswirksamkeit aus den Vesikeln. Penetration durch die Hautanhangsgebilde spielte eine sehr geringe Rolle bei der

liposomalen Freisetzung. Die vollständige Hydratation der Haut, wie sie durch Okklusion erreicht wird, verminderte die Östradiolfreisetzung aus Liposomen. Die „Shuntrouten“ stellen somit nicht den Hauptweg der Freisetzung aus Liposomen dar.

1.5.2 Lipophilität / Hydrophilität

Die Penetration von Stoffen ins SC, die tieferen Hautschichten oder deren Permeation ist unter anderem von den Stoffeigenschaften abhängig.

Die Permeationsrate vergrößert sich mit steigender Löslichkeit der Substanz im SC [Ring 1985]. Geschwindigkeitsbestimmend für die Wirkstoffaufnahme ist das Durchdringen des SC. Um eine systemische Wirkung zu erreichen, ist eine Steigerung der Permeation und der Absorptionsquote mit Sorptionsvermittlern möglich. Diese beschleunigen die Aufnahme der Wirkstoffe in die Haut durch Hydratation bzw. Herauslösen von Lipoproteinen aus dem SC. Organische Lösungsmittel wie Chloroform, Methanol oder Ethanol steigern die Wasserpermeabilität durch Herauslösen von Phospholipiden aus der Hornschicht, während Aceton diese nicht lösen kann.

Eine weitere Möglichkeit, die transdermale topische Wirkstofffreisetzung zu steigern, ist die Nutzung von „bläschenförmigen“ Systemen wie Liposomen und Niosomen [Choi 2005, Coderch 1999]. Kolloide oder Tröpfchen einer wässrigen Lösung können die Barrierschicht nur über hydrophile Wege passieren [Cevc 2004]. Dazu muss der Wirkstoff genug formbar sein, um durch diese Mikroporen hindurchgelangen zu können. Es wurden verschiedene Träger in Form von Vesikeln und Kolloiden entwickelt, die auch durch sehr kleine Poren kommen und somit eine sehr viel höhere Verfügbarkeit der verwendeten Wirkstoffe darstellen.

Es wurde keine Beziehung zwischen der Hautstruktur und der Permeabilität bei den schnell penetrierenden Stoffen wie Wasser und Ethanol gefunden [Scott 1991]. Hautstruktur, Dicke des SC, Anzahl der Zellschichten, epidermale und dermale Dicke und Anzahl und Fläche der Haarfollikelöffnungen pro mm² wurden mit der Permeabilität korreliert. Die Follikelfläche/cm² variierte am meisten zwischen den Spezies und den verschiedenen Körperstellen. Trotzdem hatten diese Kriterien keinen Einfluss auf die Penetrationsrate der schnell penetrierenden lipophilen Teststoffe. Die Absorption des hydrophilen Mannitols und des hydrophilen Paraquats hingegen hing von der Follikeldichte ab. Polare Elektrolyte und ionisierte Salze

drangen nur sehr schwer in die Haut ein. Die Hautdicke zeigte nur bei polaren Substanzen einen Einfluss auf die Penetration, nicht aber bei unpolaren Stoffen [Panchagnula 1997].

Der Effekt des pH-Wertes auf die Permeabilität von zwei lipophilen Modellsubstanzen Hydrokortison und Testosteron wurde untersucht [Sznitowska 2001]. Die verschiedenen Hautmodelle waren intakt, delipidisiert und mit Azeton getränkt. In dem untersuchten pH-Bereich bis 11,0 zeigte sich keine Änderung im Penetrationsverhalten und somit keine Beeinflussung von Lösungen mit einem pH-Wert zwischen 1,0 und 11 auf den lipoidalen Weg der Penetration. Ein 3-4facher signifikanter Anstieg der Penetration von Testosteron bei einem pH von 12 wurde hingegen ermittelt.

Unabhängig von den physiochemischen Eigenschaften der aufgetragenen Substanz wurde eine lineare Korrelation zwischen TEWL und Penetration festgestellt [Lotte 1987]. Besonders von lipophilen Substanzen weiß man, dass die follikuläre Penetration bei der perkutanen Absorption eine Rolle spielt.

Hydratation lässt die Penetration von lipidlöslichen, unpolaren Molekülen stärker ansteigen als die von polaren Molekülen [Zhai 2001]. Die Absorption von lipophileren Steroiden wurde bei einem erhöhten Hydratationsgrad der Haut durch Okklusion erhöht, die von mehr wasserlöslichen Steroiden hingegen nicht.

1.6 Tierhautmodell: Vergleich mit menschlicher Haut

Verschiedene Häute von Tieren (Miniaturschweine, Osborne-Mendel Ratten, haarlose Maus und Schweizer Maus, Schlange) sind als Penetrationsmodelle untersucht und vorgestellt worden [Bronaugh 1982, Harada 1992], wobei sich die Schweinehaut als besonders ähnlich zur menschlichen Haut erwies [Schmook 2001, Simon 2000]. Insbesondere hinsichtlich der Penetrationseigenschaften konnte dies bestätigt werden [Bartek 1972, Benech-Kieffer 2000, Dick 1992, Netzlaff 2006b], was vor allem auf einen vergleichbaren anatomischen Aufbau zurückzuführen ist [Jacobi 2007, Meyer 1996, 2001a, 2001b, 2002].

Wenn ein Tierhautmodell verwendet wird, sollte entweder die Absorptionsrate mit menschlicher Haut vergleichbar sein oder einen konstanten Umrechnungsfaktor zu

dieser aufweisen. Die vollständigen Informationen über das Versuchstier und die untersuchte Region müssen genau angegeben werden, da es Unterschiede in Alter, Geschlecht, Rasse, Größe, Gewicht und Körperregion gibt [Simon 1998].

Bartek verglich in einer In-vivo-Studie die perkutane Penetration von radioaktiven Substanzen bei Ratten, Minischweinen, Hasen und Menschen und fand heraus, dass sich die Permeabilität der Größe nach dabei folgendermaßen verhielt:

Hase > Ratte > Schwein > Mensch [Bartek 1972].

Basierend auf den heute verfügbaren Daten ist die Permeabilität beim haarlosen Hausschwein, dem Rhesusaffen und der haarlosen Ratte qualitativ und quantitativ durchweg ähnlich zu menschlichen Daten [Shah 1991].

Sogenannte Diffusionszellen wurden genutzt, um tierische Hautmodelle (Miniaturschweine, Osborne-Mendel Ratten, haarlose Maus und Schweizer Maus) mit menschlicher Haut zu vergleichen, wobei die Dicke des SC und die Haarfollikel in die Betrachtungen mit einbezogen wurden [Bronaugh 1982]. Das dickste SC wurde beim Schwein, das dünnste bei der Maus gefunden. Oft jedoch korrelierte die Dicke des SC nicht mit der Permeabilität, da es noch weitere beeinflussende Strukturunterschiede der Haut gibt.

Die Hornschicht der Schweinehaut zeigt eine gleichmäßige Anordnung der Hornzellen mit einer vergleichbaren Anzahl von Zellschichten zu menschlicher Haut, welche jedoch je nach Körperregion variiert. Der Verhornungsgrad der Haut des Ohres ist beim Schwein vergleichsweise geringer als jener der Rumpfhaut. Im Vergleich zum restlichen Körper des Hausschweins besitzt das Ohr ein signifikant dünneres SC (19 μm) [Meyer 2002]. Es trägt mit 24-38 % zur Gesamtdicke der Epidermis bei. In einer anderen Arbeit beträgt die Dicke des SC des Schweineohrs 17-28 μm [Jacobi 2007], vergleichbar zu der des Menschen mit 16,8 μm [Bronaugh 1982]. Da die Diffusion für langsam absorbierende Stoffe wie Harnsäure bevorzugt durch Hautanhangsgebilde stattfindet [Bronaugh 1982], wird die Vergleichbarkeit der Haut von haarlosen Tieren mit menschlicher Haut somit bei ihrer Nutzung in Penetrationsstudien für solche Substanzen schwierig.

Die äußere Seite der Ohrmuschel des Schweins besitzt eine recht einheitliche Haarfollikeldichte und eine konstante absolute sowie relative Dicke der Epidermis und ist daher für In-vitro-Untersuchungen besonders geeignet [Meyer 2002]. Am Ohr des Deutschen Edelschweins gibt es an der Innenseite Plicae, große, vom Knorpel

geformte Falten, die man bei Untersuchungen besser meiden sollte, weil sie Veränderungen im Aufbau der Haut, besonders der Hypodermis, aufweisen. Das Dorsum aurikulae besitzt 20-35 Primärfollikel/cm² und 0-5 Sekundärhaare/cm² und somit wesentlich weniger als die meisten anderen Regionen des Edelschweins. Die Ohrhaut des Schweins kommt damit bzgl. der Dichte der Haarfollikel der menschlichen Haut am nächsten.

Auch die Untersuchungen von Bronaugh [Bronaugh 1981] ergaben eine ähnliche Dimension der Anzahl der Haarfollikel von Schweinehaut und menschlicher Haut von 11/cm². Der Durchmesser der Haarfollikel beim Schwein ist jedoch fast doppelt so groß wie beim Menschen, was bezeichnend ist für den kräftigeren Haarbefund beim Schwein. In der neusten Arbeit zu diesem Thema zeigte sich eine SC-Dicke von 17-28 µm, während die lebende Epidermis eine Dicke von 60-85 µm aufwies [Jacobi 2007]. Auf einem cm² wurden an der äußeren Seite des Schweineohrs 20-35 Primärfollikel [Meyer 2001a] bzw. 11-25 Haare bestimmt [Jacobi 2007]. Bei Scott wird die durchschnittliche Anzahl der Follikel mit 6,3/cm² angegeben, allerdings wurden nur vier Messungen durchgeführt und ausschließlich das Abdomen untersucht [Scott 1991]. Die erhaltenen Resultate einer weiteren Arbeit sind mit 14-32 Haarfollikel/cm² am Rumpf bzw. Extremitäten menschlicher Haut ähnlich den Resultaten von Schweinehaut und zeigen ebenfalls, dass diese ein geeignetes Modell für menschliche Haut ist [Otberg 2004].

Wenn man das SC mit 19-20 µm und die lebende Epidermis des Hausschweins mit einer Dicke von 52-56 µm zusammen betrachtet, liegt die gesamte Epidermis im Rahmen der Dicke der menschlichen Epidermis (75-150 µm), was wiederum grundlegend ist für die Verwendung als Penetrationsmodell [Meyer 2001a]. Auf der inneren Seite der Ohrmuschel fiel beim Hausschwein die fehlende bis spärliche Behaarung der tiefen Bereiche – Scaphae - zwischen den Plicae auf, die aber zur Ohrspitze und den freien Rändern hin dichter wurde.

Die absolute Dicke der Dermis des Menschen liegt zwischen 1-4 mm [Meyer 2002]. Das entspricht der absolute Dicke der Dermis der Ohrhaut des Deutschen Edelschweins, allerdings sind die peripheren Bereiche der Aurikula wesentlich dünner und daher für Experimente ungeeignet.

Dicke und Struktur des SC sind nicht allein ausschlaggebend für die Permeabilität.

Die hydrophilen Stoffe durchdrangen die Epidermis der Schweineohrhaut in einer Studie schneller als die der menschlichen Haut [Meyer 1996]. Zwei große Hautdrüsentypen (große Talgdrüsen und sekretorische Endstücke der apokrinen Schweißdrüsen) wurden in dieser Arbeit am Schweineohr beschrieben, durch die sich eventuelle Unterschiede im Vergleich zu menschlicher Haut ergeben. Das Sekretgemisch dieser Drüsen könnte das Oberflächenmilieu und die Speicherkapazität der Epidermis verändern.

Die In-vitro-Permeabilität der Haut des Schweineohres wurde mit humaner abdomineller Haut und Rattenhaut mit verschiedenen hydro- und lipophilen Substanzen verglichen [Dick 1992]. Schweinehaut zeigte im Vergleich zur menschlichen Haut, insbesondere für lipophile Substanzen, ähnlichere Werte der Permeabilität als Rattenhaut. Hinsichtlich der Unterschiede zwischen den verschiedenen Schweinerassen stellte sich das Deutsche Edelschwein als besonders geeignetes Modell für menschliche Haut heraus [Meyer 2001b].

Es wurden viele Studien über den Aufbau und das Penetrationsverhalten der Haut des Schweins durchgeführt und man kann zusammenfassen, dass das Deutsche Hausschwein und im Besonderen die Haut des Ohres sich besonders gut eignet, um Penetrationsuntersuchungen als Vergleich zu menschlicher Haut in vitro vorzunehmen [Sekkat 2002].

1.7 Methoden zur Untersuchung der Penetration oberflächlich aufgetragener Substanzen

In-vivo-Penetrationsuntersuchungen am Menschen wären die „optimale“ Methode, um die dermale und transdermale Freisetzung von Wirkstoffen zu untersuchen. Untersuchungen, bei denen bspw. die Substanzkonzentrationen in tieferen Hautschichten durch Biopsien bestimmt werden müssten, sind aus ethischen Gründen limitiert. Eine Alternative dazu könnte menschliche Haut sein, die z.B. bei kosmetischen Operationen notwendigerweise entnommen worden ist. Doch auch diese Quelle steht nicht unbegrenzt oder planbar zur Verfügung.

Theoretisch-mathematische Modelle für die Permeabilität von Chemikalien in wässriger Lösung durch die Haut wurden vorgestellt [Edwards 1994, Frasch 2002]

und zeigten eine gute Übereinstimmung von Konzentrations-Tiefenprofilen des SC mit experimentell erhaltenen Werten [Naegel 2008]. Ebenso wurde ein strukturbasiertes, voraussagendes Permeabilitätsmodell vorgestellt [Buchwald 2001]. Zeitabhängige SC-Tiefenprofile konnten mathematisch simuliert werden und ließen sich gut mit experimentell ermittelten Profilen vergleichen [Hansen 2008].

Zu einer nicht-invasiven und schnellen Mengenbestimmung einer ins SC aufgenommenen Substanz wurde die ATR-FTI-Spektroskopie verwendet [Pirrot 1997]. Im Folgenden soll eine kritische Übersicht über existierende In-vivo- und In-vitro-Modelle gegeben werden.

1.7.1 In-vivo-Experimente

Die anfänglichen Untersuchungen zur Penetration von topisch applizierten Stoffen durch die Haut von Feldmann mit radioaktiv markierten Substanzen (z.B. Kortison), die aufgetragen und anschließend in Urin und Stuhl bestimmt wurden, stellen eine indirekte In-vivo-Nachweismethode dar [Feldmann 1967]. Weitere Studien mit Hilfe radioaktiv markierter Substanzen zur totalen Penetration von Stoffen wurden durchgeführt [Feldmann 1970, Guy 1986, Maibach 1971, Moor 2003, Rougier 1987, Schäfer 1993]. Einerseits wurden Klebefilm-Abrisse des SC genommen und andererseits die Substanz über vier Tage hinweg im Urin gemessen. Es gab eine lineare Korrelation zwischen den Werten der wiedergefundenen Substanz beider Experimente ($r = 0,97$, $p < 0,001$) [Rougier 1987]. Dies ist eine sehr aufwändige Methode, bei deren Ergebnissen nicht zwischen der Ausgangssubstanz und den Metaboliten unterschieden werden kann. Es stellte aber eine effektive Methode dar, um Substanzen in vivo zu messen, die durch die Haut in den menschlichen Kreislauf gelangen und anschließend ausgeschieden werden.

Eine weitere indirekte In-vivo-Methode für die Penetration von Kortikosteroiden in die Dermis ist der Abblasseffekt an der Haut durch Vasokonstriktion, welche durch das bloße Auge festgestellt wird und durch den Nachweis der Testsubstanz in Serum und Urin quantitativ ergänzt werden kann [Wohlrab 1989].

Ebenfalls gehören die Tiermodelle an lebenden Tieren, z.B. an Schweinen zu den indirekten In-vivo-Methoden [Zurdo-Schroeder 2007].

Auch die Abrissmethode am SC mittels eines Klebefilms [Weigmann 1999], die Ablösung des SC durch Vereisung [Toll 2004] oder die Hitzeseperation der

Epidermis [Wagner 2001] zur Untersuchung der Konzentration eines Wirkstoffs je entnommener Probe sind indirekte In-vivo-Methoden. Mittels Cyanoakrylat kann ebenfalls eine dünne Schicht der oberflächlichen Hornschicht abgerissen und untersucht werden [Marks 1971, Otberg 2004, Rosado 2003a, Urano-Suehisa 1985].

2004 wurde eine Methode mit einer außerordentlich hohen Auflösung von 2-10 µm vorgestellt, die einzelne Zellen und Zellverbände sichtbar machen kann [Alvarez-Román 2004]. Die „konfokale Laserscanning-Mikroskopie“ wurde in einer In-vivo-Studie genutzt, um die verschiedenen Methoden der Penetrationserhöhung, wie Mikroemulsionen, Liposome, Kolloide oder aktive Methoden wie Iontophorese, Elektrophorese oder Phonophorese im Detail zu beurteilen. Mit ihrer Möglichkeit der dreidimensionalen Darstellung konnten die fluoreszierenden Substanzen in der Hautstruktur lokalisiert und aufgezeigt werden. Allerdings sind nur semiquantitative Momentaufnahmen möglich und die Darstellungen bleiben auf fluoreszierende Substanzen beschränkt. Ebenso konnte durch eine spezielle MRT-Methode der Eintritt von Substanzen in die Haut nachverfolgt werden [Backhaus 2004].

Das schichtweise Abtragen des SC mit Hilfe eines Tesafilmes ist eine weit verbreitete Methode, um die Kinetik, die Penetrationstiefe und die Absorptionseigenschaften einer topisch applizierten Substanz zu untersuchen [Rougier 1987, Lotte 1993, Schwarb 1999]. Bei einer vergleichenden Studie von In-vivo- und In-vitro-Methoden konnte gezeigt werden, dass mit der Abrissmethode über 90% der in der Epidermis befindlichen Substanzen nachgewiesen werden können [Pershing 1992]. Daher ist diese Methode geeignet für Voraussagen über die „totale Absorption“ von Substanzen. Der absolute Wert einer topisch applizierten Substanz und die Menge der Kerneozyten, welche bei einem einzelnen Klebefilmabriss entfernt wurden, konnten bestimmt werden [Lademann 2006, Lindemann 2003].

Das Verfahren der Mikrodialyse ist ein direktes In-vivo-Verfahren, dessen Prinzip auf passiver Diffusion durch eine Membran in ein Lumen beruht und inzwischen in nahezu allen Organen angewandt wurde [Schnetzer 2001]. Dabei wird die Wiederfindungsrate betrachtet, die von der Molekülgröße der Substanz und von der Wahl des Dialysematerials beeinflusst wird. Die Schwierigkeiten dieser Methode lagen bei der Messung von lipophilen und stark proteingebundenen Substanzen.

Ein Vergleich zwischen menschlicher Haut in der Franzdiffusionszelle (FDZ) und der Mikrodialyse zeigten, dass die Permeationsprofile beider Methoden vergleichbar waren, der Penetrationsfluss allerdings pH-abhängig war [Leveque 2004].

Bei einer weiteren indirekten In-vivo-Methode wurde anhand des TEWL und der SC Hydratation das Ausmaß einer provozierten Barrierestörung beurteilt [Berndt 2001]. Dabei wurde wiederholt eine Testsubstanz, die eine irritative Kontaktdermatitis auslösen kann, auf die menschliche Haut aufgetragen und beobachtet, welche Schutzmaßnahmen am effektivsten der Irritation vorbeugen.

Eine andere Methode verfolgte das Prinzip, dass die Differenz zwischen der aufgetragenen und der nachher wiedergefundenen Menge durch oberflächliches Abwaschen des Überstandes berechnet wird [Shah 1991]. Diese Ein-Punkt-Bestimmung hat den Nachteil, unter diesen Bedingungen nicht wiederholt werden zu können. Außerdem wird die Verdunstung der Substanz hier vernachlässigt.

Des Weiteren gibt es das Modell des menschlichen Hautlappens oder eines Hautersatzes, welche an ein Tier transplantiert wurden [Shah 1991, Scott 1988]. Hier können zwar die Bioverfügbarkeit, der dermale Metabolismus und der Effekt des Blutflusses gut beobachtet werden, aber es ist eine sehr teure und aufwendige Methode.

1.7.2 In-vitro-Experimente

Modelle zur Untersuchung der Penetration von Wirkstoffen wurden an exzidierte menschlicher Haut [Wagner 2001], an lebenden Versuchstieren [Bartek 1972], an Tierhautmodellen [Wagner 2007, Pongjanyakul 2002] oder an Modellen mit Kunststoffmembranen [Zghoul 2001] vorgestellt. Die Anzahl der Tierexperimente, besonders in der Kosmetik-, Toilettenartikel- und Haushaltsproduktindustrie soll mehr und mehr verringert werden [Indans 2002]. Eindeutig schädigende und toxische Experimente sollen ausschließlich an In-vitro-Untersuchungen stattfinden und vor Tierexperimenten sollten möglichst immer In-vitro-Tests stehen. Anzunehmen ist, dass In-vitro-Untersuchungen auch in Zukunft in verschiedenen Bereichen an Bedeutung gewinnen werden.

Einige In-vitro-Modelle beruhen auf Hautrekonstruktionen mit Hilfe von menschlichen Epidermiszellen, aus denen eine Epidermis- oder eine SC-Membranpräparation hergestellt wird [Golden 1985]. Andere Modelle wie Graftskin™, LSE™ (lebende

Hautäquivalente), SkinEthic™ HRE (human reconstructed epidermis) und Episkin wurden vorgestellt, die allerdings bisher nur sehr eingeschränkt für die In-vitro-Penetration geeignet sind [Schmook 2001, Netzlaff 2007]. Die HRE wies unter denselben experimentellen Bedingungen bei histologischen Untersuchungen und der Bewertung des TEWL ähnliche physiologische Eigenschaften hinsichtlich der Barrierefunktion auf wie normale Haut [Regnier 1993, Reymermier 2003]. Qualitativ zeigte sie sich allerdings permeabler. „EpiDerm“ wurde mit menschlicher Haut verglichen, wobei die errechnete Flussgeschwindigkeit des Äquivalents fünfmal höher lag [Zghoul 2001]. Als Modellsubstanz wurde dazu Flufenaminsäure in Wollwachs und in Phosphatpuffer gelöst verwendet und in der FDZ getestet. In einer neueren Arbeit zeigten sich diese Hautäquivalente (EPISKIN, EpiDerm und SkinEthic) als gut vergleichbar mit menschlicher Haut und Schweinehaut bei hydrophilen Substanzen [Schäfer-Korting 2008a]. Sie zeigten allerdings wiederum eine überdurchschnittliche Permeationsrate jedoch mit gleicher Rangfolge für die Testsubstanzen [Schäfer-Korting 2006, 2008b]. Die HRE-Modelle zeigten nicht wie erwartet eine signifikant höhere Reproduzierbarkeit gegenüber exzidierte menschlicher Haut oder Schweinehaut. Eine andere Arbeit fand bei diesen Modellen das Problem einer wesentlich schlechter ausgeprägten Barrierefunktion gegenüber lebender oder entnommener Haut, aber die Möglichkeit zur Testung an phototoxischen, korrosiven oder toxischen Substanzen [Netzlaff 2005].

Modelle aus künstlichen Membranen wie z.B. ein Silikonmembranmodell [Cross 2001, Chilcott 2005, Kurosaki 1991, Leveque 2006] wurden mit menschlicher Haut in vitro verglichen. Die Penetrationsraten beider Modelle waren nur sehr eingeschränkt vergleichbar.

Auch verschiedene Tierhäute wurden imitiert, um Tierexperimente einzuschränken. So wurde z.B. ein Hundehautäquivalent vorgestellt [Serra 2007], welches eine vergleichbare morphologische Struktur zur gesunden Hundehaut aufwies, die jedoch zur menschlichen Haut große Differenzen zeigte.

Abgeworfene Schlangenhaut stellt unter diesem Aspekt ein tierexperimentalfreies Modell für In-vitro-Permeationsstudien dar, da alle zwei bis drei Monate ein physiologisches Häuten stattfindet. Verglichen wurde dieses Modell mit menschlicher Haut und einem gängigen Versuchstiermodell, dem der haarlosen Maus. Die

Schlangehaut reagierte ähnlicher zur menschlichen Haut als die der haarlosen Maus [Rigg 1990].

Ein anderes In-vitro-Modell ist das perfundierte Schweineohr aus Schlachtabfällen [de Lange 1992, Lange 1994]. Dabei wurde untersucht, ob das Perfusionsmedium einen Einfluss auf die Perfusionsrate nimmt. Es zeigte sich, dass die Perfusionsrate in hohem Maße vom genutzten Medium und dessen Proteingehalt abhängt. Des Weiteren wurden ein Modell an einem perfundierten Schweinehautlappen [Riviere 1991] und einem perfundierten Rindereuter vorgestellt [Heise 2003]. Bei Letzterem stieg die Oxygenierung des Blutes in der Epidermis nach mehrfachen SC-Abrissen an und deutete damit auf eine Barrierestörung hin. Bei diesen Methoden wird Haut mit unveränderter Anatomie und funktionierender Mikrozirkulation verwendet. Damit kommen diese Methoden nahe an In-vivo-Modelle heran.

Ein weiteres In-vitro-Modell an der Haut des Schweineeuters zeigte keine gute Übereinstimmung in der Permeabilität zu menschlicher Epidermis, wobei besonders die Unterschiede in der Lipidzusammensetzung und der Dichte der Haarfollikel als Ursache genannt wurden [Netzlaff 2006b]. Schweineohren wurden auch bereits als ein Direkthautmodell in vitro, wie in der vorliegenden Arbeit für die Penetration von Pollenallergenen in die Haut genutzt und zeigten eine gute Vergleichbarkeit zur menschlichen Haut [Jacobi 2003].

Im Allgemeinen zeigen In-vitro- und In-vivo-Untersuchungen eine gute Übereinstimmung [Auton 1994, Benech-Kieffer 2000, Buchwald 2003, Chatelain 2003, Franz 1975, 1978, Hadgraft 2005, Wagner 2002b, Wagner 2003]. Dabei muss darauf geachtet werden, dass die vergleichenden Studien stets unter denselben Bedingungen und an denselben Versuchstieren durchgeführt werden [Simon 1998]. In-vitro-Untersuchungen an menschlicher Haut haben gezeigt, dass unter gleichen Bedingungen durchaus ähnliche Werte zu In-vivo-Untersuchungen erhalten werden können [Auton 1994, Benech-Kieffer 2000, Buchwald 2003, Chatelain 2003, Franz 1975, 1978, Hadgraft 2005, Wagner 2002b, Wagner 2003]. Obwohl frisch entnommene Haut von frisch verstorbenen Personen am besten geeignet scheint, zeigen Untersuchungen, dass keine relevanten Unterschiede entstehen, wenn die Haut bis zum Beginn der Experimente direkt schockgefroren wird [Franz 1993].

1.8 Ziel der Arbeit

Die Bedeutung der Penetration an der menschlichen Haut dokumentiert sich in der Vielzahl der in der Fachliteratur vorgestellten In-vitro- und In-vivo-Modelle. Dabei zeigt sich, dass mit jedem Modell nur ein begrenztes Spektrum an Fragen beantwortet werden kann. Vergleichende Untersuchungen wären hilfreich, um die bisherigen Ergebnisse gegenüberstellend werten zu können.

Mit der vorliegenden Arbeit soll daher diese Lücke geschlossen werden. An einem Tierhautmodell, der mit der menschlichen Haut besonders gut vergleichbaren Schweinehaut [Simon 1998], sollen vier aus der Literatur bekannte In-vitro-Penetrationsmodelle [Franz 1972, Jacobi 2005, Wagner 2002b] unter standardisierten Bedingungen (Konzentration der Testsubstanz, Temperatur, Einwirkzeit, Untersuchungsperson) verglichen werden. Pro Serie, die jedes Modell zu drei Zeitpunkten umfasste, wurde ein und dasselbe Hautpräparat (Schweineohr) genutzt, um die interindividuellen Unterschiede innerhalb einer Serie auszuschließen.

Als Testsubstanz wurde Flufenaminsäure in Wollwachs verwendet. Flufenaminsäure ist ein nicht-steroidaler Entzündungshemmer mit schmerzlindernder Wirkung. Er fand in vielen Studien zu Penetration topisch applizierter Substanzen Anwendung und ließ sich in den einzelnen Hautschichten gut nachweisen [Hansen 2008, 2009, Henning 2008, Jacobi 2005, Kaca 2008, Luengo 2006, Netzlaff 2006a, 2006b, Wagner 2000, 2001, 2002a, 2002b, 2004, Zghoul 2001].

Aus den folgenden Gründen wurde eine undefinierte sättigende Menge verwendet:

1. um den Einfluss der ausgewählten Dosis zu minimieren (standardisierte Bedingung),
2. um ein Sättigungsniveau des Wirkstoffwertes im SC innerhalb einer Stunde zu erreichen,
3. um eine möglichst hohe Konzentration der Substanz in den verschiedenen Hautschichten zu erhalten, die ohne Probleme nachgewiesen werden kann.

Die in der vorliegenden Arbeit zu erwartenden Ergebnisse sollen die Reservoirkapazität des SC aufzeigen. Jedes Modell wurde mit jedem anderen verglichen. Bewusst wurden vier methodisch unterschiedliche Modelle zur Anwendung gebracht, die differenzierte Interpretationen zulassen:

1. **Saarbrückenmodell** (SBM): Diffusionskammer, (Druck auf der Salbe mit Okklusion),
2. **Direkthautmodell** (DHM): Vollhaut, am Ohrknorpel des Schweins befindlich, offene Penetration der Salbe,
3. Modell der **Vollhaut** in der **Franz-Diffusionszelle** (V-FDZ): Permeation durch die Haut und
4. Modell der **Spalthaut** in der **Franz-Diffusionszelle** (S-FDZ): Permeation durch die Epidermis.

Daher lassen die Penetrationsergebnisse folgende Thesen zu, die durch die Untersuchungen beantwortet werden sollen:

- die Penetrationsrate des SBM soll die Bezugsgröße darstellen, da dieses Modell gut etabliert ist,
- es wird erwartet, dass die Penetrationsrate im SBM durch die Einflussfaktoren Druck und Okklusion gegenüber den anderen Modellen erhöht ist,
- im Modell der V-FDZ werden geringere Wirkstoff-Konzentrationen als im SBM und DHM in den Hautschichten erwartet, da der Wirkstoff in eine Akzeptorflüssigkeit diffundieren kann und
- im Modell der S-FDZ müsste dagegen die Wirkstoffkonzentration in der Akzeptorflüssigkeit höher ausfallen als im Modell der V-FDZ, da sie auch die Menge der Testsubstanz mit aufnehmen muss, die sonst in die Dermis diffundiert. In der Epidermis müssten die FS-Konzentrationen etwa denen der anderen Modelle entsprechen, da die Reservoirfunktion im Wesentlichen in der Epidermis, genauer im SC zu suchen ist. Dabei ist jedoch eine Einflussgröße noch schwer vorhersehbar: inwieweit können die angeschnittenen Haarfollikel und die Schweißdrüsen einer Spalthaut das zu erwartende Penetrationsergebnis beeinflussen?

Folgende Fragestellungen sollen zusammenfassend am Ende der vorliegenden Arbeit beantwortet werden:

1. In welcher Weise können Druck und/oder Okklusion die Penetration beeinflussen?
2. In welchem Ausmaß reduziert die Permeation (Abfluss) die Wirkstoffkonzentration in den verschiedenen Hautschichten?
3. Welcher Anteil an der Barriere fällt der Epidermis zu?

4. Spielen die angeschnittenen Follikelöffnungen für die Penetration am Spalthautmodell eine Rolle?
5. Welchen Einfluss hat die Akzeptorflüssigkeit durch die Hydratation der Modellhaut von dermalen Seite?
6. Lassen sich diese In-vitro-Ergebnisse mit menschlicher Haut in vivo vergleichen?

2 Material und Methoden

Im Folgenden sollen die vier In-vitro-Penetrations- bzw. Permeationsmodellen vorgestellt werden.

Als Testsubstanz wurde Flufenaminsäure (FS) verwendet. Diese lipophile Substanz zeigte sich als gut geeignet, da sie in und durch die Haut penetrierten und sich nach Extraktion gut durch HPLC-Messung (High Pressure Liquid Chromatography) bestimmen ließ [Kimura 1989, Kurosaki 1991, Wagner 2001].

Die Haut vom Schweineohr ist ein häufig genutztes In-vitro-Modell für menschliche Haut [Jacobi 2005, 2007, Meyer 1996, 2001a, 2001b, 2002, Simon 1998], da sie ähnliche Penetrationseigenschaften für topisch applizierten Substanzen zeigt [Benech-Kieffer 2000, Schmook 2001].

2.1 Material

2.1.1 Die Hautpräparation

In dieser Studie wurden verschiedene Aufbereitungen der Haut eines Schweineohrs verwendet:

1. Haut, die direkt am Ohrknorpel verblieb (DHM)
2. ausgestanzte Hautscheiben, die aus Epidermis und Dermis bestanden (Vollhaut) und im Saarbrückenmodell sowie dem Franz-Diffusionszellmodell verwendet wurden und
3. ausgestanzte Spalthaut mit einer Dicke von 300 µm, die mit einem Dermatom geschnitten und ebenfalls in der Franz-Diffusionszelle untersucht wurde.

Insgesamt wurden damit vier Modelle an sechs Schweineohren zu drei verschiedenen Zeitpunkten (nach Auftragung) untersucht, sodass die Ergebnisse aus 72 Untersuchungen miteinander verglichen werden konnten.

2.1.2 Herkunft und Aufbereitung des Gewebes Schweineohr

Die hier vorgestellten Untersuchungen wurden an der Haut von Schweineohren durchgeführt, die von frisch geschlachteten sechs Monate alten weiblichen Tieren der Rasse Deutsches Hausschwein stammten. Die Borsten wurden behutsam mit der Schere entfernt, um die Epidermis nicht zu beschädigen. Die Ohren wurden vorsichtig mit lauwarmem Wasser gewaschen und mit Zellstoff trocken getupft. Danach wurden sie entweder sofort verwendet oder bei 4-8°C maximal vier Tage lang aufbewahrt. Für das Saarbrücken-Penetrationsmodell; die Franzdiffusionszelle mit Vollhaut sowie mit Spalthaut wurden jeweils drei Proben von der dorsalen äußeren Seite eines Ohres entnommen. Die Innenseite des jeweiligen Ohres blieb für das Direkthaut-Modell. Diese wurde neben der Außenseite genutzt, um alle vier Modelle an einem Versuchstier durchführen zu können. Dabei wurde darauf geachtet, die Plicae (s. Kap. 1.6; S. 21) zu meiden [Meyer 2001a, 2002].

Am Tag der Durchführung wurde einerseits Haut des gesamten Hautquerschnittes vom Knorpel der Außenseite des Ohres mit Hilfe eines Skalpell entfernt und andererseits die Spalthaut durch das Dermatom gewonnen. Genehmigt wurden diese Experimente durch die tierärztliche Kontrollbehörde Berlin Treptow-Köpenick.

2.1.3 Modellschubstanz der Penetration

Flufenaminsäure wurde als Modellschubstanz gewählt, da diese lipophile Schubstanz bei In-vivo- [Wagner 2002b] und In-vitro-Experimenten [Henning 2008, Kaca 2008, Kimura 1989, Kurosaki 1991, Netzlaff 2006b, Zghoul 2001] im Allgemeinen und an Schweinehaut und an menschlicher Bauchhaut im Besonderen im SBM und der FDZ-V Anwendung fand [Hansen 2008, Wagner 2000, 2001, 2002a]. Wegen der gut definierten kinetischen Bedingungen wurde das Sättigungsniveau stets nach einer Stunde erreicht. Im Gegensatz zur definierten Wirkstoffmenge bewirkte die undefinierte Wirkstoffmenge einen Verschluss der Haut, welcher wahrscheinlich die perkutane Absorption beeinflusste. Um diesen Effekt so gering wie möglich zu halten, wurde die Schubstanz nach einer Stunde Einwirkzeit wieder entfernt. Dadurch war es möglich, die Umverteilung von Flufenaminsäure in den verschiedenen Hautschichten nach verlängerten Einwirkzeiten zu untersuchen.

Flufenaminsäure (kristalline Modifikation I, Kali-Chemie Pharma, Hannover, Deutschland) wurde zu 0,9% in Wollwachs (WAO; German Pharmacopoeia, Deutschland) eingearbeitet und in einer undefinierten, sättigenden Menge [Franz 1993, Teichmann 2005, Wagner 2001] auf die Testflächen aufgetragen.

Eine sättigende Menge bedeutete, dass auch beim Auftragen größerer Mengen oder höherer Konzentrationen des Substanzgemisches kein zusätzlicher Wirkstoff in die Haut eindrang, was an Voruntersuchungen belegt werden konnte [Jacobi 2005, Teichmann 2005].

Die lipophile Substanz (FS) war vollständig in der Salbengrundlage Wollwachs aufgelöst. Um eine Kristallisierung zu verhindern, wurde die Substanz bei 32°C gelagert. Unter diesen Bedingungen bleibt das Substanzgemisch sechs Monate lang unverändert [Wild 1988]. Flufenaminsäure hat ein Molekulargewicht von 281,2 g/mol, der Siedepunkt liegt bei 132,8°C, der Oktan / Wasser-Teilungskoeffizient beträgt 4,8 und der pK(a)-Wert 3,9. Die Sättigungskonzentration im Soerensen Phosphatpuffer, welcher in der FDZ verwendet wurde (mit einem pH-Wert von 7,4) beträgt 0,205%.

2.1.4 Auftragen der Modells substanz

Die 0,9%ige Flufenaminsäure in Wollwachs wurde in einer undefinierten Menge von ca. 60 mg Salbe (entspricht 540 µg Flufenaminsäure) pro Quadratzentimeter auf jede Hautprobe aufgetragen. Dabei wurden von jedem der vier Modelle drei Proben gleichzeitig begonnen. Diese 12 Hautproben stammten alle vom selben Schweineohr. Nach einer Stunde Einwirkungszeit wurde der Überschuss der Substanz, d.h. der Anteil, der bis dahin nicht in die Haut eingezogen war, von der Oberfläche jeder Hautprobe mit einem Wattebausch entfernt. Jeweils eine Probe jedes Modells wurde nach einer Stunde aufgearbeitet und analysiert. Die anderen beiden Proben jedes Versuchsaufbaus verblieben weitere drei bzw. 20 Stunden im Brutschrank. Im Falle des DHM wurde dabei die 2 x 2 cm große Probefläche mit Hilfe eines Skalpell aus dem Rest des Ohres in ihrer gesamten Stärke samt Knorpel entnommen.

2.1.5 Weitere Untersuchungsmaterialien

Substanzen: Salbengrundlage (Wollwachs), tesa®-Film Multifilm kristall-klar (Nr. 5529, Beiersdorf, Hamburg, Deutschland), Glasperlen mit einem Durchmesser von

0,5 mm, Aluminiumfolie (0,04 mm dick, neoLab Migge Laborbedarfs-Vertrieb, Berlin, Deutschland), Soerensen Phosphat-Pufferlösung (9,55 g PBS Dubelco und 40 g Brij (ACROS) auf 1 l destilliertes Wasser; 0,2004 g KH_2PO_4 + 0,7342 g Na_2HPO_4 in 100 ml destilliertes Wasser pH 7,4), Ringer Lösung, 0,05% NaOH (Merck, Darmstadt, Deutschland), Vaseline (Apotheke, Charité, Berlin, Deutschland), Methanol, Ethanol (Uvasol, Firma Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland).

Geräte: Franz-Diffusionszellen vom Typ 4G-01-00-20 (Perme Gear, Riegelsville, PA, USA), Reagenzgläser (Oak Ridge Centrifuge Tube, PPCO, Firma Nalge Nunc International, USA), Thermometer mit Infrarotlicht, Ultraschallwasserbad (Sonorex Super RK 102H, Firma Bandelin electronic GmbH & CoKG, Berlin, Deutschland), Schüttler (Bühler, Tübingen, Deutschland) Zentrifuge (4 rpm x 1000 in der High-Speed-Tischzentrifuge MR 18.12, Firma Jouan GmbH, Unterhaching, Deutschland), Küvette, Doppelstrahlspektrophotometer (Lambda 20, Perkin Elmer, Überlingen, Deutschland), Spalthautmesser (Dermatom Aesculap® Typ GA 140, Aesculap Werke AG 72, Tuttlingen), Handrolle, Cryomikrotom (HR Mark II, Modell 1978, SLEE, Mainz, Deutschland), Dickenmesser (Modell 5041, Typ VZR, Heidenhain, Traunreut, Deutschland), HPLC mit 655 A 40 Autosampler, L 4250 Detektor, L 6220 Pumpe, 6000 K Daten interface, 5 μm LiChrospher 100/RP-18 Säule, 12,5 cm Länge und 4 mm Durchmesser (Merck-Hitachi, Darmstadt, Deutschland).

2.2 Methoden

Es wurden vier verschiedene Modelle verwendet, um das Penetrationsverhalten der Testsubstanz in Zeitabhängigkeit zu vergleichen: das Direkthautmodell und das Saarbrückenmodell als Penetrationsmodell und das Modell der Franz-Diffusionszelle mit Vollhaut und mit Spalthaut als Permeationsmodelle. Die Messungen an allen vier Modellen wurden nach einer Stunde, nach vier Stunden und nach 21 Stunden durchgeführt.

Das Experiment wurde an sechs Ohrpräparaten von sechs Schweinen vorgenommen.

2.2.1 Das Abrissverfahren

Bei diesem Verfahren zur Separierung der einzelnen horizontalen Schichten des SC, die 1971 zum ersten Mal beschrieben wurde, wird die Gesamtheit der oberflächlichen Korneozyten mit Hilfe eines Klebefilms abgerissen [Hadgraft 2005, Yosipovich 2004]. Benutzt wurde ein durchsichtiger tesa[®]-Film mit einer Breite von 19 mm. Dieser einseitig klebende Film wurde mit der klebenden Seite mittig auf die Hautprobe aufgebracht und mit einem Handroller aus Kunststoff zehnmal mit mäßiger Kraft angedrückt. Das Andrücken mit der Rolle war wichtig, da so der Einfluss der Hautfurchen, der die homogene Entfernung der oberflächlich applizierten Substanz beeinträchtigen könnte, vernachlässigt werden kann [Lademann 2005].

Zwischen Rolle und Klebefilm wurde bei jeder Nutzung ein neuer Papierstreifen gelegt, um die Rolle nicht mit der Substanz zu kontaminieren. Danach wurde das Papier verworfen und der Klebefilm mit Hilfe einer Pinzette mit einem schnellen Ruck immer in gleicher Richtung von der Haut entfernt. Anschließend wurde der Klebestreifen in ein Gefäß mit Glasperlen getaucht, um das Zusammenkleben der Klebefilme während der Extraktion zu verhindern. Somit konnte das Lösungsmittel die Testsubstanz optimal von dem Klebefilm lösen. In Vorversuchen der eigenen Arbeitsgruppe wurde festgestellt, dass sich nach dem 30. Abriss keine Korneozyten der Hautoberfläche mehr auf dem Klebefilm befanden.

Um einschätzen zu können, ob die Masse der Korneozyten auf Klebefilm-Abriss in gleichmäßiger Größenordnung vorlag, wurden die Abrisse einer Serie zusätzlich in einem Spektrometer vermessen [Lademann 2006, Weigmann 2001, 2003, 2005]. Dazu wurde jeder Abriss auf einen Metallring geklebt, der einen inneren Durchmesser von 21 mm hatte, sodass die spätere Messfläche frei blieb. Anschließend wurde der Metallring in einen dafür vorgesehenen Probehälter im Spektrometer gesetzt. Nach dem Abreißen wurde in einem Doppelstrahlspektrophotometer mit einem quadratischen Strahlengang im sichtbaren Bereich die Korneozytengesamtmenge jedes einzelnen Abrisses bestimmt. Das Spektrum wurde für den Bereich der Wellenlängen zwischen 230 und 500 nm aufgenommen. Die Extinktion wurde von allen von der Haut entfernten tesa[®]-Filmstreifen mit einem leeren tesa[®]-Filmstreifen als Referenz verglichen. Die Ermittlung der Korneozytenmenge erfolgte bei 430 nm, wobei die Pseudoabsorption der entfernten Korneozyten das Maß der Menge der entfernten Korneozyten

darstellte [Lindemann 2003, Weigmann 1999]. Eine gleichmäßige Verteilung konnte beobachtet werden.

2.2.2 Saarbrückenmodell (SBM)

In jeder Serie wurde der Versuchsaufbau an drei Modellen gleichzeitig begonnen, da neben den drei Messzeitpunkten alle anderen Variablen so klein wie möglich gehalten werden sollten. Die drei kreisrunden Proben mit einem Durchmesser von 2,5 cm wurden aus der Haut mit all ihren Schichten ausgestanzt. Die Dicke wurde mit Hilfe eines Dickenmessers gemessen, um sicher zu gehen, dass relativ einheitliche Hautdicken verwendet werden. Jedes der ausgestanzten Hautstücke wurde im Saarbrücken-Penetrationsmodell in die Vertiefung der unteren Teflongrundplatte direkt auf ein kreisrundes Filterpapier mit denselben Maßen (2,5cm) gelegt (Abb. 1). Das Filterpapier wurde zuvor mit Ringerlösung getränkt, um die Austrocknung der Haut während der Untersuchung zu verhindern.

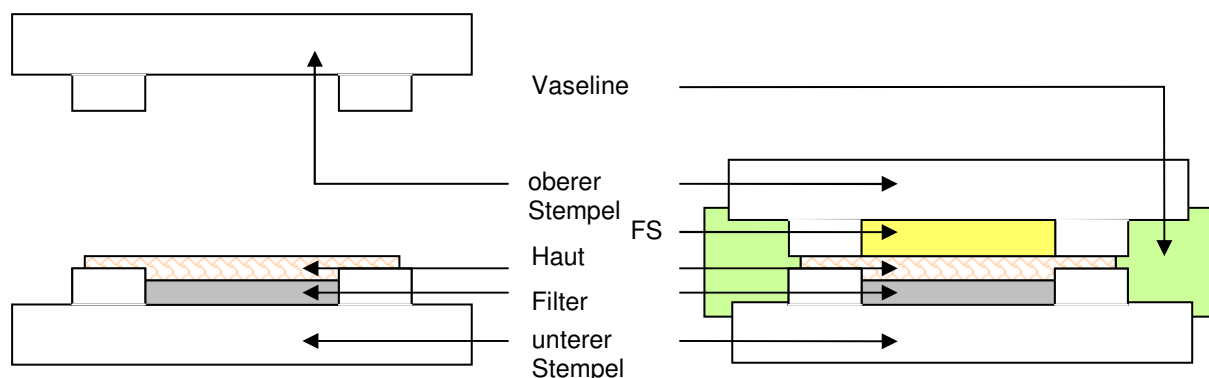


Abbildung 1: Schematische Darstellung des Saarbrückenmodells vor und nach Auftragen der Testsubstanz (FS) in Wollwachs

Das Substanzgemisch wurde in die kreisrunde Vertiefung des oberen Teflonblockes mit einem Durchmesser von 22 mm und einer Tiefe von 2 mm bis zum Rand gefüllt und mit einem Spatel abgestrichen. Außerdem wurde das Substanzgemisch auf die Oberfläche der Hautprobe aufgetragen. Der untere Teflonblock wurde eine Minute lang mit dem Gewicht von 500 g beschwert (oberer Stempel), um einen Kontakt zwischen dem Substanzgemisch in der Vertiefung und dem der Hautoberfläche herzustellen. Anschließend wurde der Teflonstempel in dieser Position fixiert und der Spalt zwischen beiden Teflonblöcken rundherum mit Vaseline versiegelt, um eine

Austrocknung zu verhindern. Dieser Aufbau wurde in einem Brutschrank bei 32° C gelagert. Nach einer Stunde wurden die drei Saarbrücken-Penetrationsmodelle aus dem Brutschrank geholt, die Vaseline entfernt und der Stempel von der Grundplatte gelöst. Dann wurde das überstehende Substanzgemisch aus dem Stempel entfernt und von der Haut vorsichtig mit Watte abgetupft. Bei den beiden Hautproben, die nicht nach einer Stunde verarbeitet wurden, wurde der obere Stempel wieder auf die Haut gesenkt und zum Schutz vor Austrocknung der Spalt um den oberen und unteren Teflonblock erneut mit Vaseline verschlossen. Die Modelle blieben dann bis zur Aufarbeitung der Hautproben im Brutschrank.

2.2.3 Direkthautmodell (DHM)

Bei diesem Modell wurde Haut untersucht, die direkt am Schweineohr auf dem Knorpel verblieb. Das gesamte Schweineohr wurde eine Stunde bei 32°C im Brutschrank temperiert. Dabei wurde es in eine verschlossene Plastikbox gelegt, um einen Wasserverlust zu vermeiden. An drei Arealen von 2 x 2 cm wurde zuvor die Testsubstanz aufgetragen. Hierzu wurden drei Stellen an der Innenseite des Ohres gewählt, welche zwischen den Plicae lagen, und das Substanzgemisch dort in einer ca. 2 mm dicken Schicht mit Hilfe eines Holzspatels optisch gleichmäßig aufgetragen. Es wurde davon ausgegangen, dass die Substanz damit in einer sättigenden Menge vorlag (s. Kap. 2.1.3). Nach einer Stunde Einwirkungszeit wurden die Überstände der Substanz mit Watte vorsichtig von der Haut entfernt, wobei besonders darauf geachtet wurde, das SC nicht zu verletzen. Als Überstand wurde bezeichnet, was nach Ablauf der Stunde noch an sichtbarer Substanz auf der Oberfläche der Haut verblieben war. Die Probe der Haut, die nach einer Stunde aufgearbeitet werden sollte, wurde mit einem Skalpell samt Knorpel in dem 2 x 2 cm großen Quadrat der Auftragung ausgeschnitten und wie in Kap. 2.2.6 beschrieben aufgearbeitet.

2.2.4 Modell der Vollhaut in der Franz-Diffusionszelle (V-FDZ)

Die Franz-Diffusionszelle bestand aus einem doppelwandigen Glasgefäß, zu dem ein einwandiger Deckel mit zentraler Öffnung gehörte (Abb. 2).

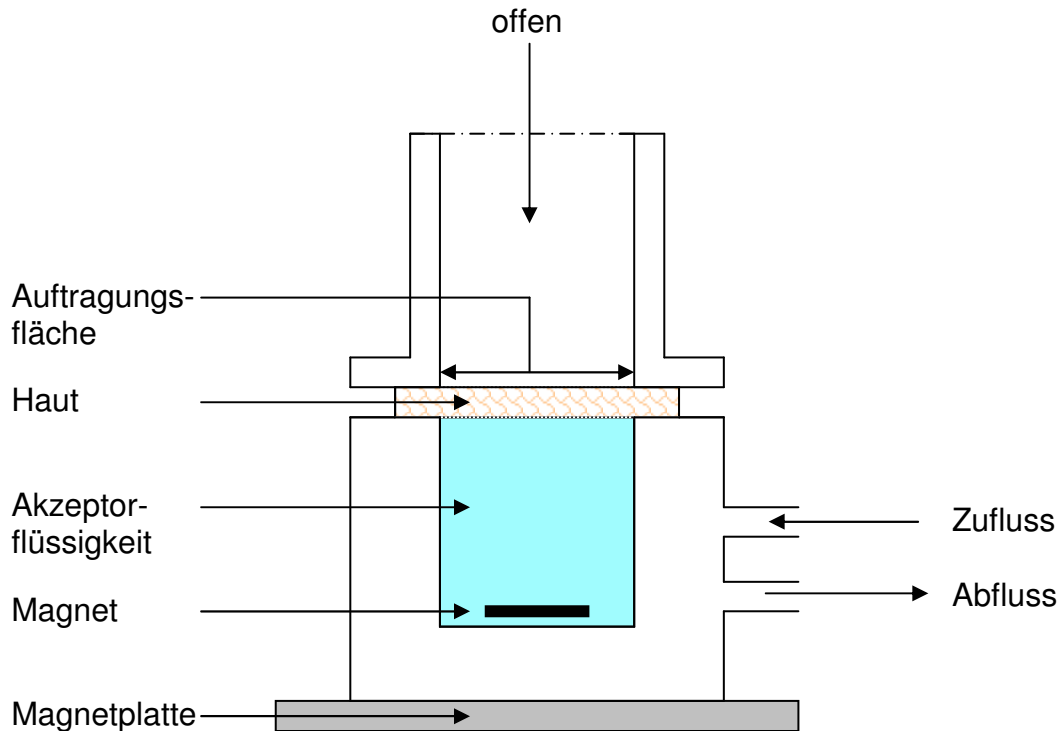


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Franz-Diffusionszelle

Die Zelle besaß ein inneres Lumen, welches nach oben hin offen war und ein zweites Lumen, welches zwischen den beiden Wandschichten lag. Das Wandlumen einer Zelle war durch zwei nach außen gerichtete Fortsätze über einen Gummischlauch mit dem Wandlumen der nächsten Franz-Diffusionszelle verbunden. So bildeten alle beteiligten Franz-Diffusionszellen ein geschlossenes System, welches in einem Becken mit temperiertem Wasser begann und endete. Dieses Wasser, das auf einer konstanten Temperatur von 32°C gehalten wurde, zirkulierte während des Experiments ständig durch die Außenwände der Franz-Diffusionszelle, und wurde dabei durch eine Pumpe angetrieben. Das System wurde eine Stunde vor Beginn der Auftragung der Testsubstanz in diese Konditionen gebracht.

Drei runde Gewebeproben mit einem Durchmesser von 3,6 cm wurden aus der Vollhaut ausgestanzt. Die Dicke der Haut wurde auch bei diesem Modell mit einem Dickenmesser bestimmt, um Hautproben mit einheitlicher Dicke zu verwenden. Die Franz-Diffusionszelle, deren Akzeptorlumen mit 3 ml des Soerensen-Phosphatpuffers gefüllt war, wurde so mit der ausgestanzten Gewebeprobe bedeckt, dass zwischen Puffer und Haut keine Luftblase entstand. Dabei wurde die Haut vorsichtig von einer Seite zur anderen ausgebreitet. Das SC war dabei der Außenseite zugewandt und die dermale Seite hatte direkten Kontakt zur

Akzeptorflüssigkeit. Dann wurde der Deckel mit der zentralen runden Öffnung auf die Ränder der Hautprobe aufgesetzt und an der unteren Kammer mit Hilfe einer Klammer befestigt. Jede Zelle stand dazu auf einer magnetischen Grundplatte. Die Akzeptorflüssigkeit wurde während des gesamten Experimentes ununterbrochen von einem magnetischen Stab von ca. 1 x 2 mm gerührt, welcher sich in der Akzeptorflüssigkeit befand. Damit wurde der Puffer in der Franz-Diffusionszelle in ständiger Bewegung gehalten, um den Abtransport des penetrierten Wirkstoffes aus Haut in den systemischen Kreislauf in vivo zu simulieren. Die Haut stand nun in Kontakt mit der Puffersubstanz und wurde eine Stunde temperiert bevor eine Temperaturmessung mit Hilfe eines Infrarot-Thermometers stattfand. Betrug die Temperatur 31-32°C, wurde die Testsubstanz mit Hilfe eines Glasspatels durch die Öffnung im Deckel in einer ebenfalls sättigenden Menge auf die Hautoberfläche aufgetragen. Die Auftragungsfläche betrug 0,64 cm².

Nach Ablauf einer Stunde wurden die Deckel aller Zellen entfernt. Die Menge an Substanzgemisch, welche nicht innerhalb dieser Stunde in die Haut penetriert war, verblieb als sichtbarer Überstand auf der Hautoberfläche. Vorexperimente zeigten, dass wenn die aufgetragene Menge an FS erhöht wurde, die wiedergefundenen Konzentrationen an FS im SC annähernd konstant blieb: der Sättigungsbereich war somit erreicht [Teichmann 2005].

Mit Hilfe von Watte wurden die Überstände der Substanzen vorsichtig von der Hautoberfläche abgetupft. Die Haut einer der drei Zellen wurde zur direkten Weiterverarbeitung entnommen. Bei den restlichen zwei Franz-Diffusionszellen wurde der Deckel wieder auf der Zelle befestigt, so dass diese Haut nach weiteren drei bzw. 20 Stunden aufgearbeitet werden konnte. Die Zellen wurden während des gesamten beschriebenen Vorgangs nicht von der Magnetplatte oder aus dem Pumpsystem entfernt.

2.2.5 Modell der Spalthaut in der Franz-Diffusionszelle (S-FDZ)

Die Spalthaut wurde mit Hilfe eines Dermatomes vom Schweineohr geschnitten, so dass daraus drei Hautproben mit dem Durchmesser von je 36 mm ausgestanzt werden konnten.

Diese Hautproben wurden direkt auf die Diffusionszelle über die Akzeptorflüssigkeit gelegt, die 3 ml Soerensen-Phosphatpuffer enthielt. Der Versuch wurde

anschließend unter denselben Bedingungen durchgeführt, wie bereits bei der Vollhaut in der Franz-Diffusionszelle beschrieben (s. Kap. 2.2.4).

2.2.6 Materialaufbereitung

Die aus den verschiedenen Modellen entnommenen Hautproben wurden auf eine stabile Unterlage gelegt und die Hautoberfläche jeder Probe wurde mit einer einseitig selbstklebenden Aluminiumfolie bedeckt, in die zuvor ein Loch mit einem Durchmesser von 18 mm (Saarbrückenmodell), 13 mm (beiden Franzzellmodelle) oder 20 mm (Direkthautmodell) gestanzt worden war. Dabei wurde die Folie so angebracht, dass der Mittelpunkt des Kreisausschnittes der Aluminiumfolie über dem Zentrum der Auftragsfläche lag und somit die Auftragsfläche der Probe freigab. So ergab sich eine sichere Fixierung der Hautprobe auf der Unterlage. Dann wurden von der freiliegende Hautoberfläche 30 tesa®-Film-Abrisse entnommen.

Beim DHM wurde nach Abschluss der Abrisse eine Stanzbiopsie der Auftragsfläche von 18 mm Durchmesser einschließlich aller tieferen Hautschichten und des Knorpels entnommen. Die tieferen Hautschichten (lebende Epidermis und Dermis) wurden nun mit Hilfe eines Skalpells vom Knorpel entfernt und anschließend in einem Wasserbad von 70 °C für 90 Sekunden erhitzt. Daraufhin ließ sich die Epidermis leicht mit Hilfe eines Skalpells und einer Pinzette von der Dermis trennen. Mit diesem Verfahren wurde auch bei der Hautprobe der V-FDZ die Epidermis von der Dermis getrennt. Im SBM ließ sich die Epidermis von der Dermis auf diese Weise nicht trennen. So wurde von der Hautprobe nach den 30 Abrissen eine Stanzbiopsie von 13 mm Durchmesser entnommen und mit einem Strahl aus Stickstoffdioxid schockgefroren. Anschließend wurden parallel zur Oberfläche 24 Schichten einer Stärke von 25 µm mit Hilfe eines Cryometers geschnitten. Jeweils vier aufeinanderfolgende Schnitte à 25 µm wurden in ein Gefäße getan. Die übrige Haut des SBM wurde in ein anderes Gefäß gegeben, das Filterpapier in ein weiteres.

2.2.7 Bestimmung von Flufenaminsäure mittels HPLC

In die verschiedenen Gefäße wurden zwischen 2 und 4 ml 0,05% NaOH-Lösung gegeben. Anschließend wurden die Gefäße zwei Stunden lang bei Raumtemperatur geschüttelt (Bühler, Tübingen, Deutschland) und danach 10 Minuten bei 800 Umdrehungen/Sekunde zentrifugiert. Die Konzentration von Flufenaminsäure in

diesen Lösungen und in der Akzeptorflüssigkeit der Franzdiffusionszelle wurde durch „isocratic high-performance liquid chromatography“ (HPLC) bestimmt. Das HPLC-System besteht aus einem Autosampler 655 A 40, einem Detektor L 4250, einer Pumpe L6220, einer Datenanzeige 6000 K und einer 5 µm LiChrospher 100/RP-18 Säule mit einer Länge von 12,5 cm und einem Durchmesser von 4 mm.

2.2.8 Beziehung zwischen Substanzmenge und Hautschicht

Die maximale Substanzkonzentration, die im SC eine Stunde nach Auftragen einer ausreichenden Menge erreicht wurde, spiegelte das Sättigungsreservoir des SC wider [Teichmann 2005]. An Vorversuchen zeigte sich, dass nach dieser Zeit keine weitere Substanzaufnahme in die Haut stattfand. Deshalb wurde in der vorliegenden Arbeit die erwähnte Testsubstanz nach einer Stunde Einwirkungszeit von der Hautoberfläche entfernt, um die Umverteilung der Substanz innerhalb der einzelnen Hautschichten bei zunehmender Zeit untersuchen zu können (s. Abbildung 3).

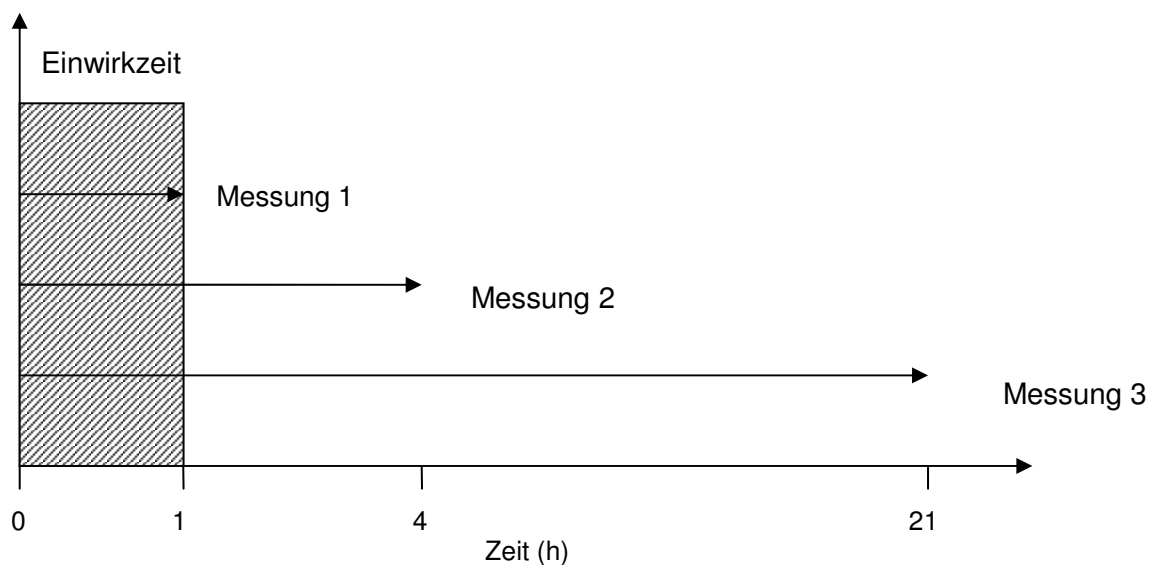


Abbildung 3: Schematische Darstellung der Messabfolge

Der Anteil der FS, der mit den ersten beiden Abrissen entfernt wurde, wurde als nicht penetriert interpretiert und deshalb verworfen. Somit repräsentieren die Abrisse Nummer 3 bis 30 die Substanzmenge, die sich im SC befand. Die Konzentration in Epidermis und Dermis wurden isoliert voneinander und vom SC bestimmt aber als tiefere Hautschichten (DSL) zusammen ausgewertet. Beim SBM wurde nach 30

Abrissen die Haut mittels Cryometer horizontal in Scheiben geschnitten. Dabei wurden die ersten 100 µm der geschnittenen Haut als lebende Epidermis interpretiert, da ihre Dicke in der Literatur mit 52-56 µm bzw. 140-160 µm, wenn man die Epidermisleisten mit einbezieht, beschrieben wird [Meyer 2002]. Die bestimmte Konzentration in ng/ml wurde mit dem extrahierten Gewebe in Beziehung gesetzt. Als Endergebnis wurde der Wert von FS in ng/cm³ umgerechnet. Die relative Konzentration einer Hautschicht wurde unter der Bedingung errechnet, dass die absoluten Werte aller Schichten einer Hautprobe zusammen 100 % ergaben.

2.2.9 Statistische Auswertung

Die Datenerfassung, die statistische Auswertung sowie die Präsentation wurden mit MS Office XP Version 10.0, dem „Statistical Package for the Social Sciences“ (SPSS) - Programmpaket Version 7.5 für Windows (SPSS-PC+, Chicago, Illinois, USA), Sigma Plot 4.0 (Rock Ware, USA) und Origin 6.0 (USA) durchgeführt.

Für alle Experimente wurden die Mittelwerte, der Median und die Standardabweichungen der Absolutwerte berechnet. Die Darstellung der relativen Konzentrationen aller Modelle erfolgte in Säulendiagramme inklusive der Standardabweichungen. Die Absolutwerte der Hautschichten aller Ohren wurden einer linearen Regressionsanalyse unterzogen und grafisch aufgearbeitet. Die Regressionsgerade, der Pearson'sche Korrelationskoeffizient r und das Bestimmtheitsmaß r^2 wurden berechnet und angegeben.

Zur Überprüfung der Signifikanz der FS-Konzentrationsdifferenzen der verschiedenen Modelle wurde jeweils der Test nach Wilcoxon für verbundene Stichproben angewandt. In dieser klinischen Studie wurde ein Signifikanzniveau von $P < 0,05$ gewählt.

Zur Überprüfung der Auswertung fand eine statistische Beratung durch die Mitarbeiter des biomathematischen Institutes der Charité statt.

3 Ergebnisse

Bei allen vier Modellen wurde beobachtet, dass Flufenaminsäure in Wollwachs das SC durchdrang und in die Epidermis und Dermis gelangte. Schon nach einer Stunde Einwirkungszeit waren messbare Konzentrationen der Substanz in den tieferen Hautschichten darstellbar.

3.1 Saarbrückenmodell (SBM)

Einen Überblick über die mit diesem Modell gewonnenen absoluten Daten zeigt Tabelle 1. Die maximale Konzentration von Flufenaminsäure befand sich nach einer Stunde in den tieferen Hautschichten (DSL) und lag deutlich über der Konzentration im Stratum corneum (SC).

Im SC zeigten sich eine Abnahme der Konzentration der Testsubstanz von einer Stunde zu vier Stunden sowie eine weitere deutliche Abnahme nach 21 Stunden Einwirkungszeit. Die maximale FS-Konzentration (Epidermis/Dermis) nach einer Stunde in den tieferen Hautschichten nahm mit weiterer Einwirkungszeit (vier Stunden, 21 Stunden) weiter deutlich zu. Im Filter zeigten sich nur sehr geringe FS-Konzentrationen nach einer Stunde, die allerdings ebenfalls zu den späteren Zeitpunkten zunahmten.

Tabelle 1: Saarbrückenmodell. Absolute Konzentration (Mittelwert \pm SD) von FS in ng/cm³ in unterschiedlichen Hautschichten und Filter nach verschiedenen Einwirkungszeiten.

Zeit nach Applikation	Stratum corneum	Epidermis/Dermis	Filter
1h	3057 \pm 894	7263 \pm 4637	66 \pm 69
4h	2141 \pm 1304	8180 \pm 3539	221 \pm 301
21h	710 \pm 856	11333 \pm 5379	363 \pm 201

Da es sich aufgrund des komplexen Versuchsaufbaus um eine Anzahl von sechs untersuchten Präparaten handelte, ist eine Gegenüberstellung von arithmetischem Mittelwert und Median sinnvoll, um mögliche „Ausreißer“ zu erkennen (Tab. 2). Es zeigten sich hierbei übereinstimmende Tendenzen.

Tabelle 2: Saarbrückenmodell. Vergleich von Mittelwert (MW) mit Median bei einer, vier und 21 Stunden Einwirkungszeit in ng/cm³.

Hautschicht	MW 1h	Median 1h	MW 4h	Median 4h	MW 21h	Median 21h
SC	3057	2995	2141	1971	710	380
DSL	7263	9074	8180	7690	11333	11984
Filter	66	53	221	96	363	345

Die Ergebnisse der Penetrationsversuche, die mittels Saarbrückenmodell gewonnen wurden, sind für die unterschiedlichen Hautschichten in Abbildung 4 dargestellt.

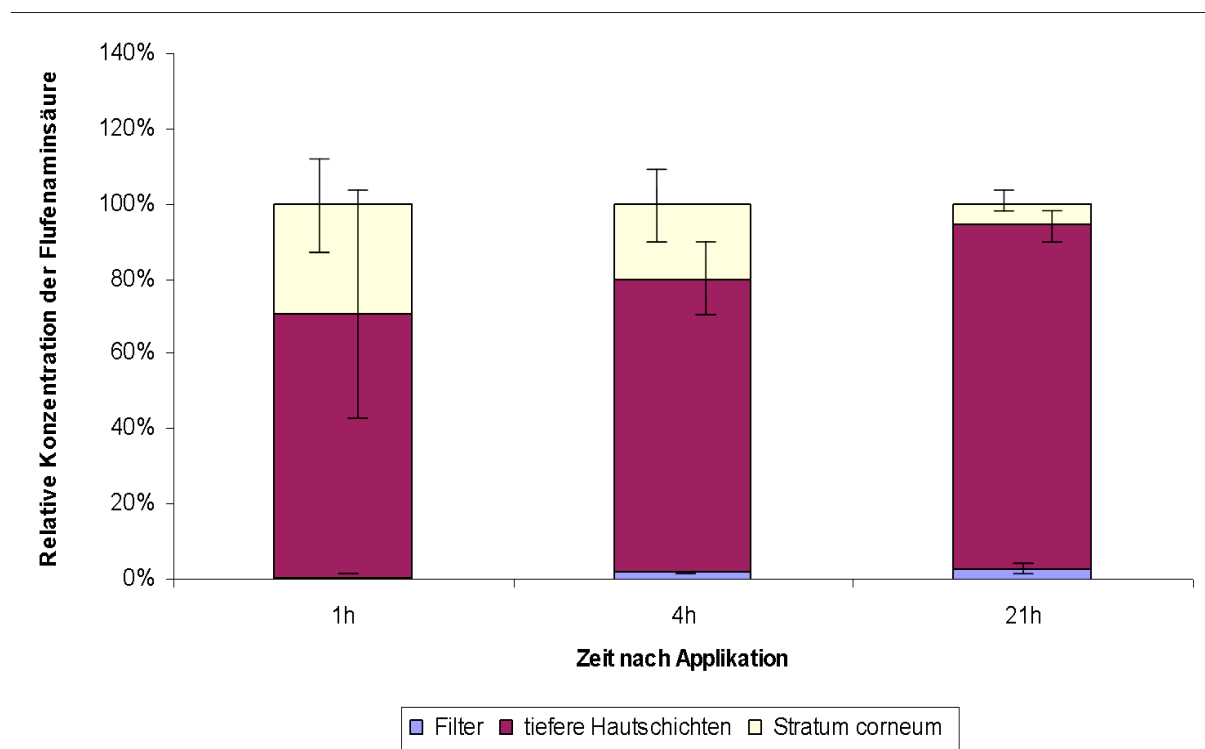


Abbildung 4: Saarbrückenmodell. Relative Verteilung der FS-Konzentrationen (Mittelwerte \pm SD) in SC, DSL (tiefere Hautschichten), Filter nach verschiedenen Einwirkungszeiten (1h, 4h und 21h).

Jede Säule repräsentiert ein Zeitmodell, wobei die FS-Konzentration im Filter den unteren hellblauen, die Konzentration in den tieferen Hautschichten den darüber liegenden roten und die Konzentration im SC den gelben Säulenanteil entsprechen.

Schon nach einer Stunde stellte sich eine deutliche Penetration der Testsubstanz sowohl in das SC, als auch in die DSL (Epidermis/Dermis) und in geringer Konzentration in den darunter liegenden Filter dar. Nach vier Stunden nahm die Konzentration im SC ab und in den DSL sowie auch im Filter zu. Nach 21 Stunden befand sich noch eine geringe Menge der Testsubstanz im SC während die Konzentration in den DSL und im Filter weiter zunahm. In diesem Modell zeigten sich schon nach einer Stunde ganz besonders deutliche Konzentrationen der FS in den DSL im Vergleich zu den anderen Modellen.

Die lineare Regressionsanalyse zeigt Abbildung 5. Hierbei sind die Konzentrationen von Flufenaminsäure der tieferen Hautschichten gegen die des Stratum corneum aufgetragen. Es zeigte sich mit $r=-0,98$ ($r^2=0,967$) eine sehr hohe negative Korrelation der Testsubstanzkonzentration in diesen beiden Hautschichten.

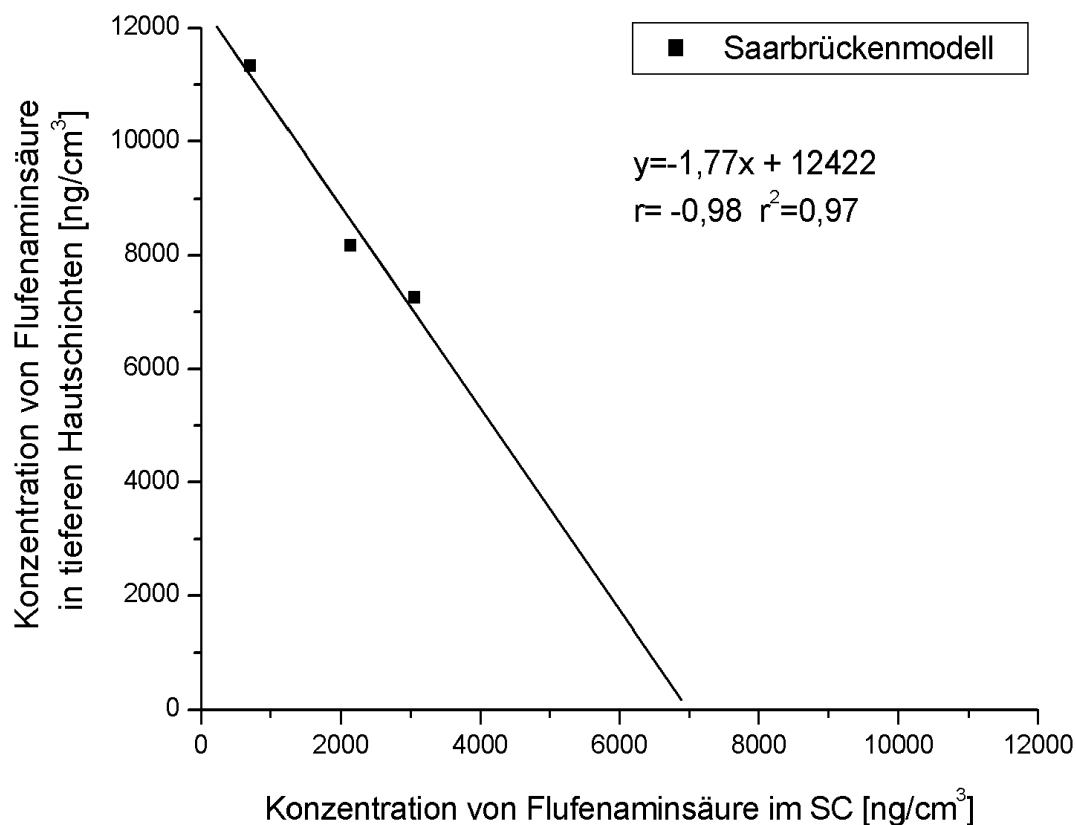


Abbildung 5: Saarbrückenmodell. Korrelation der absoluten FS-Konzentrationen von SC und DSL mit Regressionsgleichung.

3.2 Direkthautmodell (DHM)

Einen Überblick über die absoluten Konzentrationen von Flufenaminsäure, die mittels Direkthautmodell gewonnen wurden, gibt Tabelle 3. Es zeigt sich deutlich, dass sich im Gegensatz zum SBM die maximale FS-Konzentration nach einer Stunde im SC befand. Die absoluten Konzentrationen des SC entsprechen denen des SBM. Die absoluten Konzentrationen der DSL (Epidermis/Dermis) hingegen liegen deutlich unter den Werten des SBM.

Tabelle 3: Direkthautmodell. Absolute Konzentration (Mittelwert \pm SD) von FS in ng/cm³ in unterschiedlichen Hautschichten und Knorpel nach verschiedenen Einwirkungszeiten.

Zeit nach Applikation	Stratum corneum	Epidermis/Dermis	Knorpel
1h	3590 \pm 1627	1297 \pm 732	0 \pm 0
4h	1804 \pm 1395	2493 \pm 801	17 \pm 38
21h	433 \pm 537	6625 \pm 8398	89 \pm 198

Darüber hinaus erfolgte in Tabelle 4 eine Gegenüberstellung von arithmetischem Mittel und Median. Diese Resultate zeigen, dass die Tendenz der Ergebnisse in absoluten Werten im Mittelwert und Median übereinstimmen.

Tabelle 4: Direkthautmodell. Vergleich von Mittelwert (MW) und Median bei einer, vier und 21 Stunden Einwirkungszeit in ng/cm³.

Hautschicht	MW 1h	Median 1h	MW 4h	Median 4h	MW 21h	Median21h
SC	3590	3282	1804	1625	433	307
DSL	1297	1197	2493	2791	6625	3529
Knorpel	0	0	17	0	89	0

In der Abbildung 6 sind die relativen Konzentrationen an Flufenaminsäure, die beim DHM in den Hautschichten bestimmt worden sind graphisch in drei Säulen dargestellt. Jeweils eine Säule entspricht einem Zeitmodell. Ähnlich wie beim SBM, repräsentiert der mittlere rote Abschnitt die tieferen Hautschichten und der obere

gelbe Abschnitt das SC. Der untere Anteil jeder Säule steht hierbei jedoch für den Knorpel.

Die Tendenz der relativen Verteilung entspricht dabei derjenigen der absoluten Verteilung und zeigt die maximalen Werte nach einer Stunde im SC. Es wird deutlich, dass nach einer Stunde ein, im Vergleich zum SBM, geringeren Anteil an FS in den tieferen Hautschichten zu finden war. Im Knorpel konnte zu diesem Zeitpunkt keine FS nachgewiesen werden. Nach vier Stunden war eine Verschiebung aus dem SC zugunsten der tieferen Hautschichten zu beobachten, die bei der dritten Messung nach 21 h weiter zunahm. Dabei befand sich nur noch ein geringer Teil der FS im SC, selbst im Knorpel konnte dann eine geringe Menge der Testsubstanz nachgewiesen werden. Wie im SBM befand sich nach 21 Stunden die überwiegende Menge in den tieferen Hautschichten. Je länger die Einwirkungszeit betrug, desto mehr nähert sich die Verteilung der des SBM an.

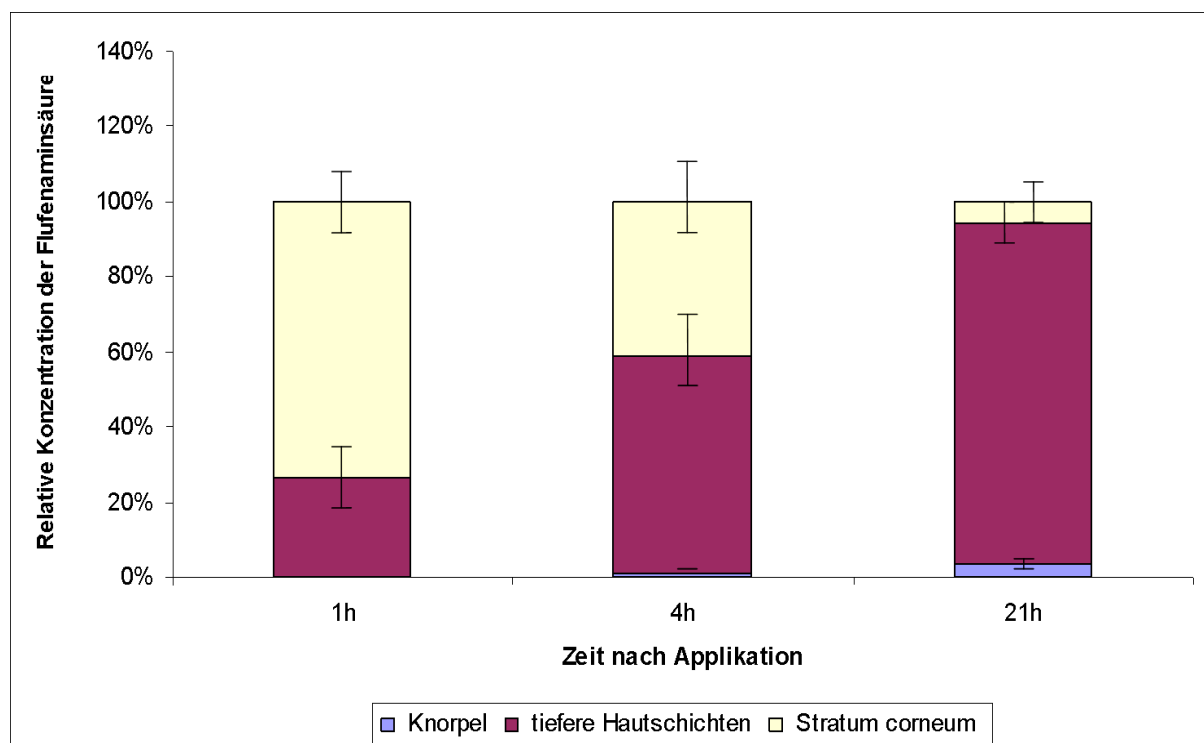


Abbildung 6: Direkthautmodell. Relative Verteilung der FS-Konzentrationen (Mittelwerte \pm SD) in SC, DSL (tiefe Hautschichten), Knorpel nach verschiedenen Einwirkungszeiten (1h, 4h und 21h).

In Abbildung 7 ist die lineare Regression für das DHM dargestellt. Es zeigte sich mit $r=-0,93$ ($r^2=0,87$) auch bei diesem Modell, wie schon zuvor beim SBM, eine hohe

negative Korrelation zwischen der Konzentration der Flufenaminsäure des SC und der FS-Konzentration der tieferen Hautschichten. Je mehr die Konzentration der Testsubstanz im SC abnahm, desto höher wurde sie in den tieferen Hautschichten.

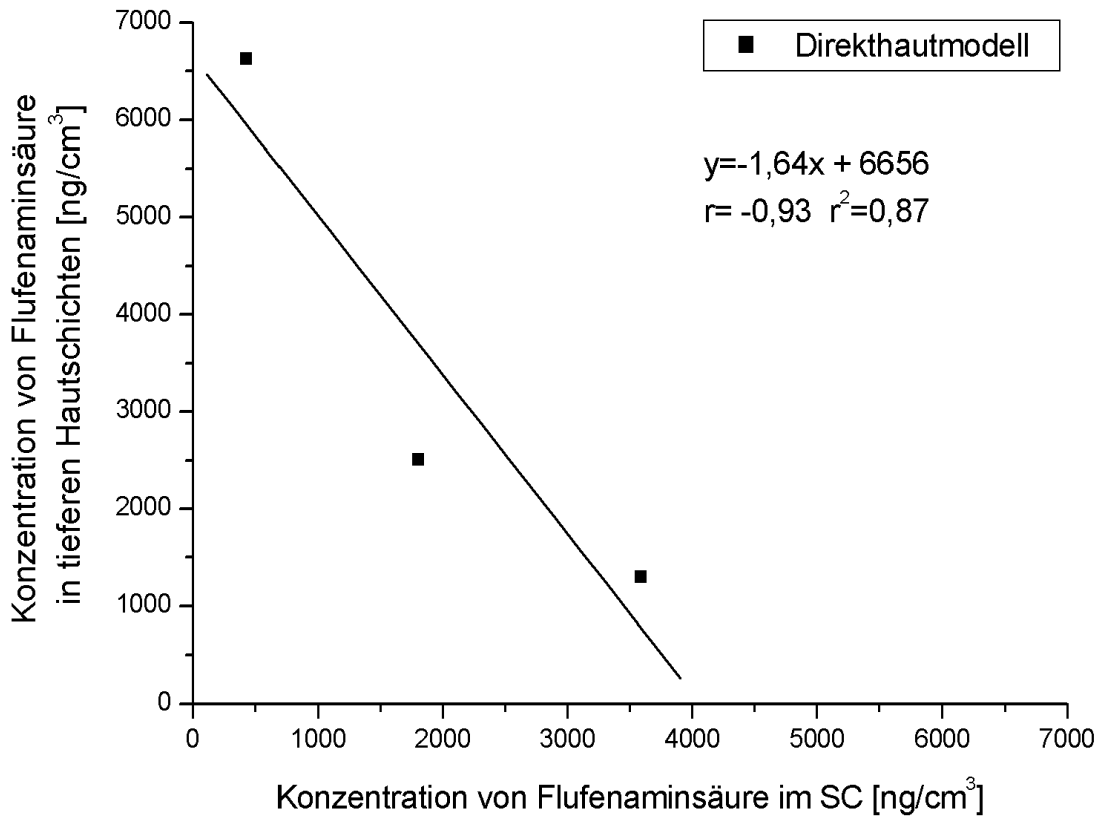


Abbildung 7: Direkthautmodell. Korrelation der absoluten FS-Konzentrationen von SC und DSL mit Regressionsgleichung.

3.3 Modell der Vollhaut in der Franz-Diffusionszelle (V-FDZ)

Tabelle 5 zeigt die Mittelwerte der FS-Konzentrationen des Modells Vollhaut in der Franzdiffusionszelle mit den Standardabweichungen. Das Maximum der FS-Konzentration befand sich nach einer Stunde wie beim DHM im SC. Es ließ sich, wie in den beiden Modellen zuvor, eine Abnahme der FS-Konzentration im SC mit zunehmender Zeit beobachten. In den tieferen Hautschichten nahm die Konzentration an FS mit ansteigender Einwirkungszeit zu. Gleichzeitig war ein deutlicher Konzentrationsanstieg von FS in der Akzeptorflüssigkeit zu registrieren,

der den Anteil der FS im Filter beim SBM oder im Knorpel beim DHM deutlich überstieg.

Tabelle 5: Modell der Vollhaut in der Franz-Diffusionszelle. Absolute Konzentration (Mittelwert \pm SD) von FS in ng/cm³ in unterschiedlichen Hautschichten und Akzeptorflüssigkeit nach verschiedenen Einwirkungszeiten.

Zeit nach Applikation	Stratum corneum	Epidermis/Dermis	Akzeptorflüssigkeit
1h	4172 \pm 1531	1845 \pm 1274	6 \pm 8
4h	2943 \pm 2148	2197 \pm 1238	129 \pm 100
21h	1329 \pm 305	7979 \pm 9872	4026 \pm 3825

Tabelle 6 stellt Median und Mittelwert der absoluten FS-Konzentration im Modell der V-FDZ bei einer Stunde, vier Stunden und 21 Stunden gegenüber.

Tabelle 6: Modell der Vollhaut in der Franz-Diffusionszelle. Vergleich von Mittelwert (MW) und Median bei einer, vier und 21 Stunden Einwirkungszeit in ng/cm³. Komp. = Kompartment

Hautschicht	MW 1h	Median 1h	MW 4h	Median 4h	MW 21h	Median 21h
SC	4172	3634	2943	2366	1329	1364
DSL	1845	1350	2197	2035	7979	4231
Komp.	6	0	129	151	4026	2050

Abbildung 8 zeigt die relative Verteilung der FS-Konzentration in den verschiedenen Hautschichten des Modells V-FDZ. Wie bei den zuvor dargestellten Modellen wurden die Mittelwerte der relativen Konzentration von FS für eine Stunde, vier Stunden und 21 Stunden jeweils in einer Säule dargestellt.

Die Testsubstanz war nach einer Stunde in das SC und auch die tieferen Hautschichten penetriert. Die maximale FS-Konzentration in der Hornschicht wurde nach einer Stunde gefunden. Nach vier Stunden hatte die Konzentration von FS in der Hornschicht mäßig, nach 21 Stunden deutlich abgenommen. In den DSL erkennt man einen geringen, aber kontinuierlichen Anstieg der FS-Konzentration mit zunehmender Einwirkungszeit. Nach einer Stunde zeigte sich noch keine FS in der unter der Haut liegenden Akzeptorflüssigkeit. Erst nach vier Stunden konnte eine geringe Konzentration von FS in der Akzeptorflüssigkeit verzeichnet werden, die

nach 21 Stunden deutlich angestiegen war. Eine Verschiebung der FS aus dem SC in die tieferen Hautschichten, wie in den beiden vorangegangenen Modellen, aber ebenso eine deutliche Verschiebung aus dem SC in die darunter liegenden Akzeptorflüssigkeit fand mit zunehmender Zeit statt.

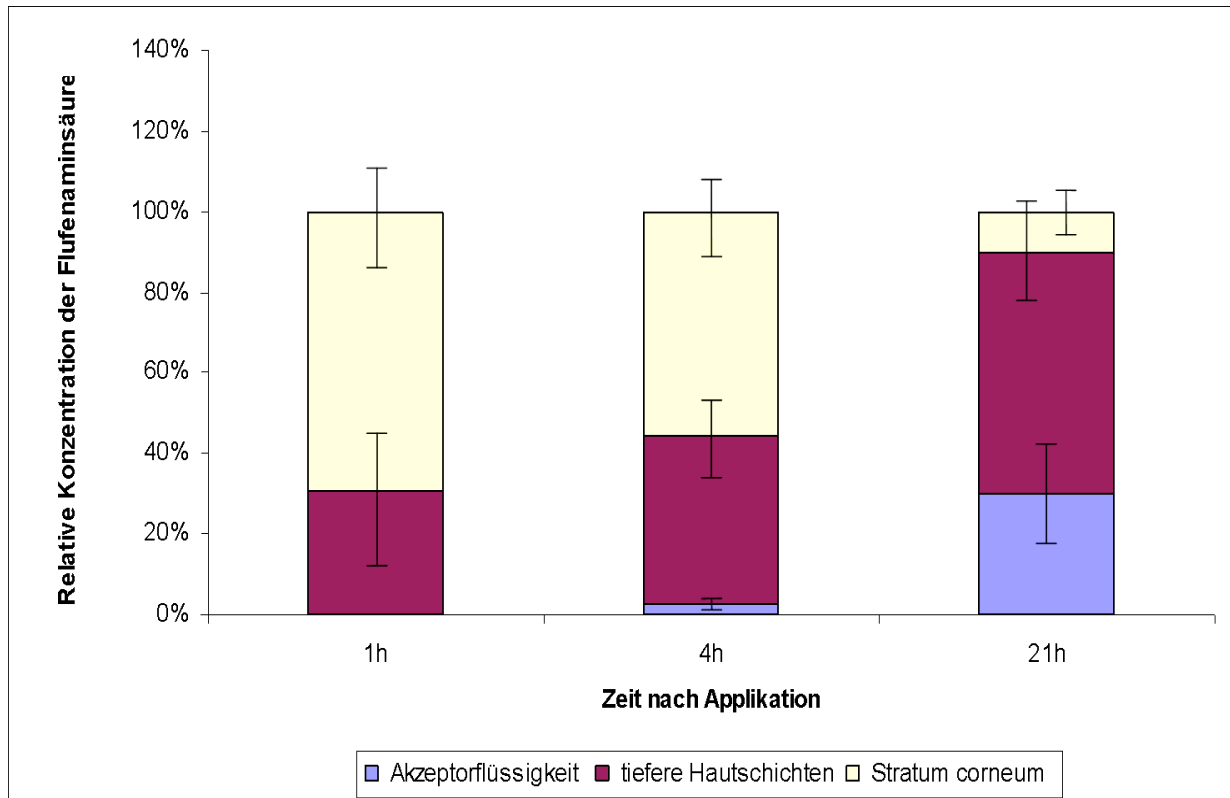


Abbildung 8: Modell der Vollhaut in der Franz-Diffusionszelle. Relative Verteilung der FS-Konzentrationen (Mittelwerte \pm SD) in SC, DSL (tiefere Hautschichten), Akzeptorflüssigkeit nach verschiedenen Einwirkungszeiten (1 Stunde, 4 Stunden und 21 Stunden).

Die Regressionsgerade für das Modell V-FDZ für die FS-Konzentration im SC und den tieferen Hautschichten wird durch die Abbildung 9 repräsentiert. Mit $r=-0,92$ ($r^2=0,85$) fand sich auch hier eine hohe negative Korrelation zwischen der FS-Konzentration im SC und den DSL.

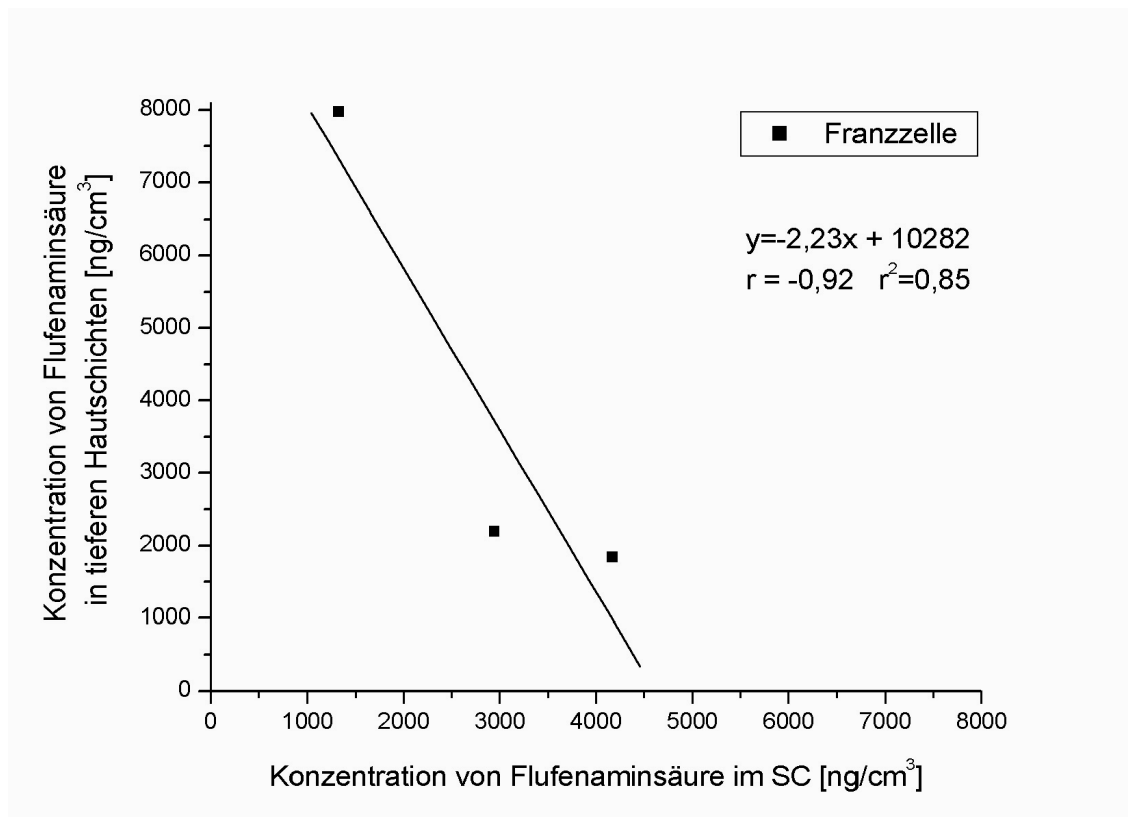


Abbildung 9: Modell der Vollhaut in der Franz-Diffusionszelle. Korrelation der absoluten FS-Konzentrationen von SC und DSL mit Regressionsgleichung.

3.4 Modell der Spalthaut in der Franz-Diffusionszelle (S-FDZ)

Tabelle 7 zeigt die absoluten FS-Konzentrationen mit den Standardabweichungen in SC, DSL und Akzeptorflüssigkeit, die nach verschiedenen Einwirkungszeiten in dem Modell der Spalthaut in der Franz-Diffusionszelle gemessen wurden. Die maximale Konzentration an FS wurde wie im DHM und bei Vollhaut in der FDZ nach einer Stunde im SC gemessen. Die Konzentration im SC nahm auch mit zunehmender Zeit ab. In der lebenden Epidermis und der verbleibenden Dermis zeigten sich nach einer Stunde ebenfalls maximale Konzentrationen die nach vier Stunden Einwirkungszeit wieder abnahmen und nach 21 Stunden wieder gering zunahmen. In der Akzeptorflüssigkeit konnten im Gegensatz zum V-FDZ nach einer Stunde deutliche FS-Konzentrationen gemessen werden, die mit ansteigender Einwirkungszeit stark anstiegen. Die Spalthaut zeigte, genauso wie die Vollhaut in der FDZ, keine so

deutliche Entleerung des SC nach 21 Stunden wie die Haut im SBM oder DHM. Die absoluten Werte der FS-Konzentration des SC stimmten zwischen Vollhaut und Spalthaut im Modell der FDZ sehr gut überein.

Tabelle 7: Modell der Spalthaut in der Franz-Diffusionszelle. Absolute Konzentration (Mittelwert \pm SD) von FS in ng/cm^3 in unterschiedlichen Hautschichten und Akzeptorflüssigkeit nach verschiedenen Einwirkungszeiten.

Zeit nach Applikation	Stratum corneum	Epidermis/Dermis	Akzeptorflüssigkeit
1h	5172 \pm 1997	3849 \pm 3078	869 \pm 755
4h	2824 \pm 1095	1520 \pm 964	3131 \pm 2121
21h	1690 \pm 556	2124 \pm 1225	8850 \pm 6609

Tabelle 8 zeigt die Mittelwerte der absoluten FS-Konzentration in den verschiedenen Hautschichten des Modells S-FDZ nach den verschiedenen Einwirkungszeiten neben den Medianen der absoluten FS-Konzentrationen.

Tabelle 8: Modell der Spalthaut in der Franzdiffusionszelle. Vergleich von Mittelwert (MW) mit Median bei einer, vier und 21 Stunden in ng/cm^3 . Komp. = Kompartment

Hautschicht	MW 1h	Median 1h	MW 4h	Median 4h	MW 21h	Median 21h
SC	5172	4951	2824	2735	1690	1763
DSL	3849	3098	1520	1132	2124	1631
Komp.	869	791	3131	3000	8850	6072

Abbildung 10 zeigt die relative Verteilung der Konzentration von Flufenaminsäure in den verschiedenen Hautschichten des Modells der Spalthaut in der Franzdiffusionszelle. Die Mittelwerte der FS-Konzentration sind bei einer Stunde, vier Stunden und 21 Stunden dargestellt. Bereits nach einer Stunde wurden FS-Konzentrationen in der Akzeptorflüssigkeit nachgewiesen, wobei das Maximum der Konzentration auch hier im SC lag. In den tieferen Hautschichten lag das Maximum der Konzentration diesmal ebenfalls bei einer Stunde. Bei vier Stunden und 21 Stunden stellte sich für die tieferen Hautschichten eine Art Gleichgewicht ein. Die FS-Konzentration der Akzeptorflüssigkeit stieg mit zunehmender Zeit deutlich an.

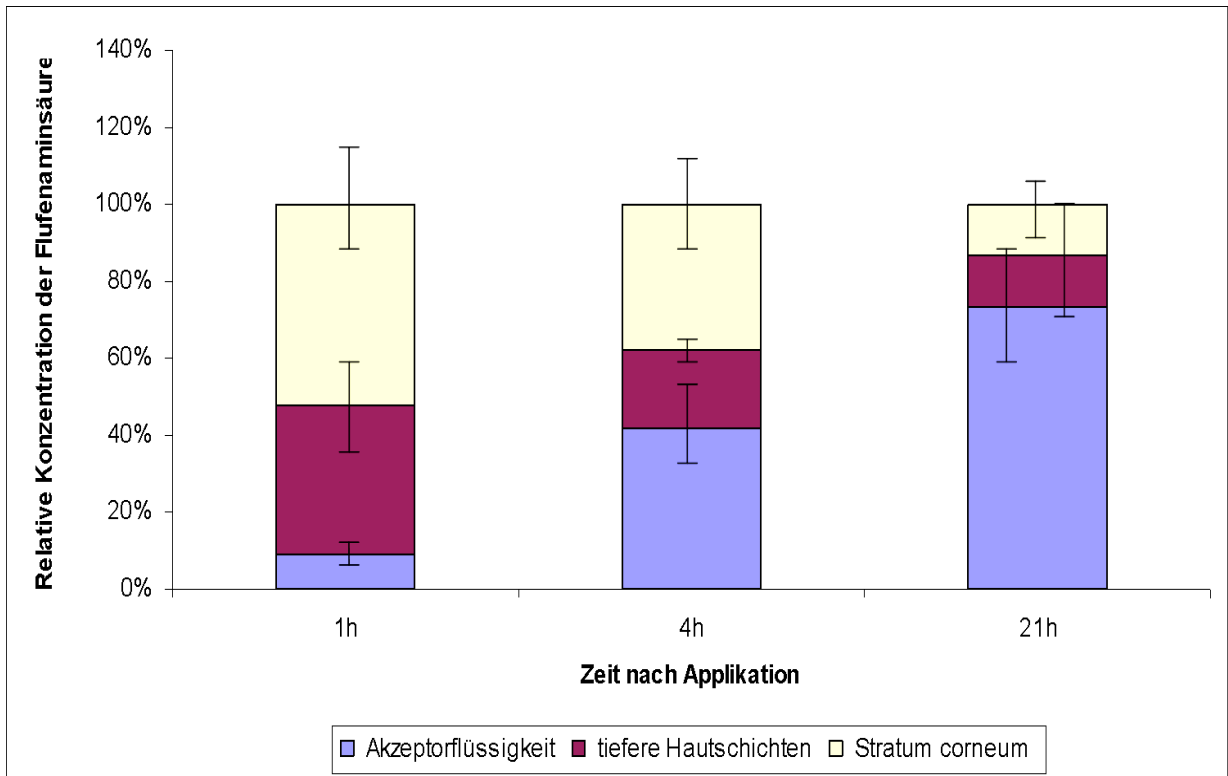


Abbildung 10: Modell der Spalthaut in der Franz-Diffusionszelle. Relative Verteilung der FS-Konzentrationen (Mittelwerte \pm SD) in SC, DSL (tiefere Hautschichten), Akzeptorflüssigkeit nach verschiedenen Einwirkungszeiten (1h, 4h und 21h).

Abbildung 11 zeigt die Regressionsgerade dieses Modells. Mit $r=0,83$ ($r^2=0,69$) fand sich bei diesem Modell eine schwache positive Korrelation.

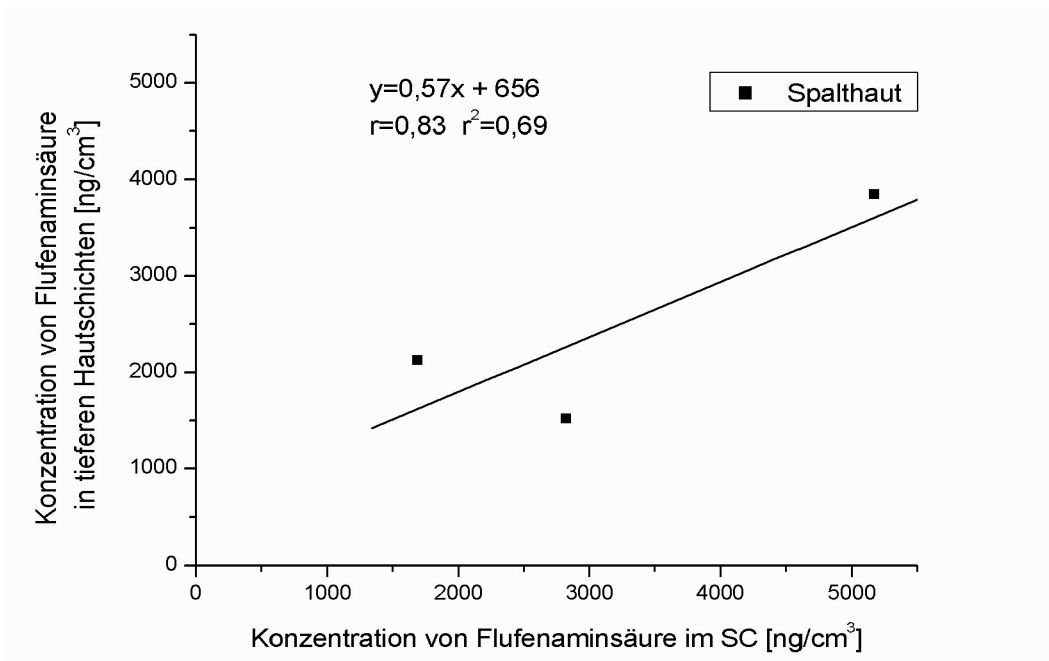


Abbildung 11: Modell der Spalthaut in der Franz-Diffusionszelle. Korrelation der absoluten FS-Konzentrationen von SC und DSL mit Regressionsgleichung.

3.5 Vergleich der Ergebnisse

Das Saarbrückenmodell wurde als Basismodell betrachtet, da es aus der Literatur gut bekannt ist [Wagner 2000, 2002b, 2004]. Die Ergebnisse der anderen 3 Modelle wurden zu diesem Modell in Bezug gesetzt.

Es zeigte sich, dass nach einer Stunde in den tieferen Hautschichten des SBM deutlich höhere Konzentrationen gefunden wurden, als in den anderen 3 Modellen. Dennoch erhöhten sich diese Werte mit zunehmender Einwirkungszeit, während sich das SC gleichzeitig entleerte, ähnlich wie es sich in den anderen 3 Modellen zeigte. Die Umverteilung aus dem SC in die tieferen Hautschichten war jedoch nicht so ausgeprägt wie beim DHM.

Die Menge der FS-Konzentration in der Akzeptorflüssigkeit nach einer und nach vier Stunden beim S-FDZ überstieg die prozentuale und absolute Menge, die nach diesen Zeiten beim V-FDZ gemessen wurde. Im SC ergab sich beim S-FDZ eine maximale FS-Konzentration nach einer Stunde, die wie beim V-FDZ bei ca. 60% lag. Auch bei den relativen Konzentrationen nach vier und 21 Stunden zeigten sich ähnliche Werte bei der Spalthaut und der Vollhaut in der FDZ.

Statistisch signifikante Unterschiede bestanden hinsichtlich der Konzentration der Testsubstanz nach einer Stunde im SC lediglich zwischen DHM und S-FDZ (siehe Tab. 9), nach 21 Stunden dann zusätzlich zwischen DHM und V-FDZ (siehe Tab. 10). In den tieferen Hautschichten konnte nach einer Stunde zwischen allen Modellen außer DHM/V-FDZ ein signifikanter Unterschied der FS-Konzentration nachgewiesen werden (siehe Tab. 11), nach 21 h unterschieden sich allerdings die Konzentrationen in keinem der Modelle mehr signifikant in den DSL (siehe Tab. 9).

Tabelle 9: Signifikanzprüfung der FS-Konzentration nach einer Stunde im SC .

SBM/DHM	SBM/V-FDZ	SBM/S-FDZ	DHM/V-FDZ	DHM/S-FDZ	V-FDZ/S-FDZ
P = 0,463	P = 0,345	P = 0,173	P = 0,463	P = 0,046	P = 0,917

Tabelle 10: Signifikanzprüfung der FS-Konzentrationen nach 21 Stunden im SC

SBM/DHM	SBM/V-FDZ	SBM/S-FDZ	DHM/V-FDZ	DHM/S-FDZ	V-FDZ/S-FDZ
P = 0,249	P = 0,249	P = 0,075	P = 0,046	P = 0,028	P = 0,116

Tabelle 11: Signifikanzprüfung der FS-Konzentration nach einer Stunde in den tieferen Hautschichten (DSL).

SBM/DHM	SBM/V-FDZ	SBM/S-FDZ	DHM/V-FDZ	DHM/S-FDZ	V-FDZ/S-FDZ
P = 0,028	P = 0,028	P = 0,046	P = 0,249	P = 0,046	P = 0,046

Tabelle 12: Signifikanzprüfung der FS-Konzentrationen nach 21 Stunden in den tieferen Hautschichten (DSL)

SBM/DHM	SBM/V-FDZ	SBM/S-FDZ	DHM/V-FDZ	DHM/S-FDZ	V-FDZ/S-FDZ
P = 0,249	P = 0,345	P = 0,345	P = 0,249	P = 0,753	P = 0,463

4 Diskussion

Penetrationsuntersuchungen an der Haut sind zur Testung neuer topisch applizierbarer Substanzen aus medizinischer Sicht, in der Kosmetikindustrie, aber auch zur Einschätzung von Substanzen, die aus der Umwelt auf uns einwirken, wichtig. Viele In-vitro-Modelle sind in der Literatur beschrieben worden. In dieser Arbeit wurden vier dieser Modelle zur Untersuchung der Hautpenetration und -permeation, die in aktuellen wissenschaftlichen Publikationen zu finden sind [Benech-Kieffer 2000, Breternitz 2007, Chilcott 2005, Lademann 2005b], unter standardisierten Bedingungen miteinander verglichen. Dazu wurde der lipophile Wirkstoff Flufenaminsäure (FS), ein nicht-steroidales Antiphlogistikum, verwendet, welches zuvor bereits in anderen Studien in vivo und in vitro an menschlicher Haut und Schweinehaut getestet und verglichen worden ist [Wagner 2000, 2001, 2002a, 2002b]. Dabei zeigten sich gute Übereinstimmungen der In-vivo- und In-vitro-Ergebnisse. Die Haut des Schweins weist sehr ähnliche Penetrationseigenschaften zu menschlicher Haut auf [Bartek 1972, Benech-Kieffer 2000, Dick 1992, Jacobi 2007, Meyer 1996, 2001a, 2001b, 2002, Netzlauff 2006b, Schmook 2001, Simon 2000] und wurde deshalb in dieser Arbeit verwendet.

Untersucht wurde die Umverteilung der Testsubstanz aus dem Reservoir des Stratum corneum (SC) in die tieferen Hautschichten (DSL) in Abhängigkeit von der Zeit und dem jeweiligen Untersuchungsmodell.

Nach einer Stunde war das Reservoir des SC gesättigt, wie sich bereits in Voruntersuchungen zeigte, und es wurde der Überstand der Testsubstanz entfernt, um die Umverteilung der FS in die verschiedenen Hautschichten untersuchen zu können. Außerdem konnte so der Effekt der Okklusion, der die perkutane Absorption einer Substanz verändern kann, weitgehend vermieden werden. Die Steigerung der Penetrationsrate durch den Verschluss der Haut (Okklusion) spielt besonders bei lipophilen Stoffen, wie hier verwendet, eine Rolle [Treffel 1992]. Die Sättigung des SC hängt aber auch von der Trägersubstanz ab [Chambin-Remoussenard 1993]. So konnte bei einer Untersuchung in vivo am Menschen unterschiedliche Konzentrationen der Testsubstanz im SC durch die Änderung der Trägersubstanz erreicht werden. Nach 30minütiger Einwirkungszeit zeigte sich mit Hilfe der Abrissmethode und einer Bestimmung mittels HPLC eine fünffach erhöhte

Penetration ins SC von der Testsubstanz Koffein in Emulsion gegenüber der Zusammensetzung in Azeton.

Die gewählte Untersuchungssubstanz FS eignete sich für jedes der vier Untersuchungsmodelle und die vergleichenden Studien, denn sie ließ sich bei allen Untersuchungen in gut messbarer Konzentration bei der Aufarbeitung der Hautproben bestimmen.

Der technische Aufbau ließ es zu, eine Serie (drei Zeitmodelle an vier Untersuchungsmodellen) gleichzeitig zu beginnen. Das ermöglichte gut vergleichbare Aussagen innerhalb dieser Serie. Die Varianz, die durch verschiedene Personen, Labore, Messgeräte und Zeiten entstünde, darf keinesfalls unterschätzt werden. Das zeigte sich in einer Studie, die die Unterschiede von In-vitro-Diffusionszellmessungen, die nicht auf der Hautvarianz basierten, innerhalb eines Labors und zwischen 18 verschiedenen Laboren untersuchte [Chilcott 2005]. Standardisierte Methoden und Materialien wie die Bereitstellung einer Silikonmembran, einer Testsubstanz und Anweisungen über die Analyse wurden vorgegeben. Der mittlere Variationskoeffizient der Konzentrationen der Testsubstanz aller Labore betrug etwa 35%. Zwischen dem niedrigsten und dem höchsten Mittelwert fand sich eine vierfache Differenz, zwischen dem niedrigsten und dem höchsten absoluten Wert sogar eine sechsfache Differenz. Allein durch verschiedene Personen betrug die Differenz immerhin ca. 10%.

Deshalb wurde in dieser Arbeit jeder Arbeitsschritt immer wieder von ein und derselben Person verrichtet, was gerade bei der Abrissmethode die Differenz der pro Abriss entfernten Korneozytenmenge so gering wie möglich hielt. In Studien stellte sich die Abrissmethode als sehr empfindlich gegenüber dem Druck des Handrollers und der Kraft des Abreißen dar [Breternitz 2007]. Beides hatte erkennbare Auswirkungen auf die Menge der abgerissenen Korneozyten und damit auch auf die wiedergefundene Menge der Untersuchungssubstanz. Bei der Aufarbeitung der Hautproben und der horizontalen Teilung zur Messung der FS wurden deshalb die jeweiligen Arbeitsschritte ebenfalls immer von ein und derselben Person ausgeführt, um die Varianz der Einflussgrößen so gering wie möglich zu halten. Es wurde festgestellt, dass es signifikante Unterschiede in den Ergebnissen gab bei Anwendung der Abrissmethode mit Benutzung eines Handrollers, eines Stempels, Zuhilfenahme des Daumens oder durch Strecken der Haut [Breternitz 2007].

Ebenfalls hatten die Einwirkungszeit der Testsubstanz, der Klebefilmtyp und die anatomische Stelle Einfluss auf die Menge der entfernten Korneozyten und somit der Testsubstanz. Deshalb wurde in dieser Arbeit der Versuchsablauf auch in diesen Punkten klar definiert.

Alle vier verwendeten Modelle zeigten charakteristische Penetrationsprofile. Bei jedem dieser Untersuchungsmodelle erreichte die Flufenaminsäure die lebende Epidermis nach einer Stunde. Bei allen Modellen stellte sich außerdem eine Abnahme der Konzentration im SC mit zunehmender Zeit dar. In den drei Modellen, in denen tiefere Hautschichten vorhanden waren (Direkthautmodell = DHM, Saarbrückenmodell = SBM, Modell der Franz-Diffusionszelle mit Vollhaut = V-FDZ), konnte man eine Zunahme der FS-Konzentration in den tieferen Hautschichten und gleichzeitig eine Abnahme der Konzentration im SC beobachten.

4.1 Saarbrückenmodell (SBM)

Die Ergebnisse des Saarbrückenmodells (SBM) wurden in dieser Arbeit als Bezugswerte für die anderen drei Modelle verwendet, da es sich um ein etabliertes Modell handelt [Luengo 2006, Wagner 2004].

Die lebende Epidermis und die Dermis wurden in dieser Arbeit als tiefere Hautschichten (Deeper Skin Layers = DSL) zusammengefasst. Die Werte des SBM im SC lagen absolut - wie in Tabelle 3 erkennbar - aber auch prozentual unter den Werten im SC des DHM (s. Kap. 3.1). Im Vergleich zum DHM wurde auch schon nach einer Stunde eine sehr hohe FS-Konzentration in den tieferen Hautschichten erreicht, welche sich im prozentualen Vergleich bei vier Stunden an die Werte des DHM annäherte und bei 21 Stunden fast mit diesem übereinstimmte. Dieser Anstieg der FS-Konzentration konnte auch in anderen Arbeiten beobachtet werden und fand sich ebenfalls mit ansteigender Einwirkungszeit im SBM in den tieferen Hautschichten im Gegensatz zum Modell der FDZ [Wagner 2000]. Vermutet wurde, dass der Eigendruck des oberen Stempels von 500 g diese rasche Penetration in die tieferen Hautschichten und eine Kompression des SC verursachte. Zusammen mit einer Okklusion durch die Vaseline, die die Hautproben vollständig zirkulär umgab, und einer Okklusion durch das Wirkstoffgemisch selbst wurde die Penetration zusätzlich gesteigert. So konnte in einer anderen Arbeit der Effekt der prolongierten

Okklusion zwischen 24 und 96 Stunden und eine dadurch auftretende Barriestörung beobachtet werden [Fluhr 1999]. Dabei kam es zu einer vermehrten Neigung, Wasser aufzunehmen, sowie zu einer Zunahme des TEWL über die Okklusion hinaus. Beide Effekte erreichten nach 48 Stunden ein Plateau.

Auch Zhai und Schäfer fassten zusammen, dass die Okklusion eine Reihe von tiefgreifenden Veränderungen (Hydratationsstatus, Barrierepermeabilität, epidermale Lipide, mikrobielle Flora) produziert [Zhai 2001, Schäfer 2002]. Dadurch steigt häufig die perkutane Absorption aufgetragener Wirkstoffe an. Okklusion verändert auch die direkte Wirkung des transdermalen Wasserverlustes, dadurch steigt die Hydratation des SC, die Korneozyten schwellen an [Zhai 2001]. So stiegen bei dieser Untersuchung der Wassergehalt des SC von den physiologischen 10-20 % auf 50 % und die äußere Hauttemperatur von 32°C auf 37° C an. Okklusion schützt auch vor dem Verdunsten der aufgetragenen Substanz und führt somit zu einer höheren Verfügbarkeit dieser in der Haut. Hydratation lässt die Penetration von lipidlöslichen, unpolaren Molekülen ansteigen, die von polaren Molekülen jedoch weniger.

Auf die Penetration hat eine Okklusion somit große Auswirkungen. Hinsichtlich der Freisetzung eines Wirkstoffes in der Haut aus Liposomen spielt Okklusion hingegen eine untergeordnete Rolle [Maghraby 2001].

Das Filterpapier beim SBM, welches ausschließlich der Dehydratation vorbeugen soll, könnte eventuell durch einen Saugeffekt verstärkend auf die Penetration der Substanz wirken und somit die schnelle Penetration in tiefere Hautschichten begünstigen. Weiterer Ausdruck für die Beeinflussung durch Okklusion und Druck sind die hohen Standardabweichungen nach einer Stunde und die geringen Standardabweichungen nach 21 Stunden. Sowohl beim DHM als auch beim SBM zeigte sich eine fast völlige Entleerung des SC nach 21 Stunden. Obwohl vermutet werden kann, dass bei diesen beiden Modellen eine Art „Stau“ der Substanz in den tieferen Hautschichten stattfand, da kein Abtransport erfolgen konnte, kann genauso vermutet werden, dass die Sättigung der tieferen Hautschichten mit FS auch nach 21 Stunden noch nicht vollständig erreicht wurde. Es konnte beim SBM eine Entleerung des SC zugunsten den tieferen Hautschichten in Abhängigkeit der Zeit beobachtet werden.

Die Aufbereitung des SBM in den tieferen Hautschichten wurde anders vollzogen als bei den anderen drei Modellen. Grund hierfür waren Schwierigkeiten bei der

Trennung von Epidermis und Dermis besonders nach vier und 21 Stunden. Eine Erklärung wäre die Kompression der Haut durch den oberen Stempel. In den anderen Modellen wurde die Epidermis von der Dermis durch Erhitzen in einem 70 °C warmem Wasserbad getrennt. Eine Hydratation, wie sie bei der FDZ vorlag, hat durch Wassereinlagerung zwischen Epidermis und Dermis wahrscheinlich zusätzlich zu einer leichteren Trennung dieser beiden Schichten beigetragen.

Beim SBM wurden die Hautproben nach Entnahme des SC durch die Abrisse in einem Strahl von flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend mit einem Cryometer horizontal zur Hautoberfläche in 25 µm dicke Schichten geschnitten. Vier Schnitte wurden jeweils zusammen extrahiert, wobei die ersten 100 µm der Epidermis - deren Dicke in der Literatur mit 60-85 µm [Jacobi 2007], bzw. ca. 66 µm [Bronaugh 1982] bzw. 71-76 µm [Meyer 2002] beschrieben wird - und der Rest der Dermis zugeschrieben wurde. Für die Dicke der Dermis wurden 600 µm angenommen. Wenn sich nach den 600 µm noch Resthaut fand, so wurde sie - wie auch bei den anderen Modellen - der Dermis zugerechnet. Das Penetrieren einer Substanz bis in die Dermis und durch deren venösen Gefäßnetze kann dem Eintritt dieser Substanz in den systemischen Kreislauf gleichgesetzt werden.

Zusammenfassend kann für das Saarbrückenmodell gesagt werden, dass es ein geeignetes Modell ist, um das Reservoir des SC und deren Umverteilung in tiefere Hautschichten in Abhängigkeit der Zeit zu untersuchen. Der Versuchsaufbau ist im Vergleich zur Franzdiffusionszelle wesentlich einfacher. Beim Saarbrückenmodell kann durch die diskrete Befeuchtung der Haut von dermalen Seite durch das mit 0,9%iger NaCl-Lösung getränkte Filterpapier und durch den völligen Verschluss der Haut während der gesamten Einwirkzeit von keiner zusätzlichen Hydratation oder Dehydratation der Hautprobe oder des Substanzgemischs ausgegangen werden. Daher eignet sich das Modell besonders für die Untersuchung von einer leicht verdunstenden Substanz und deren Penetration in die Haut. Besonders beachtet werden muss das verstärkte Eindringen der Substanz in tiefere Hautschichten schon nach kurzer Einwirkungszeit. Beim Vergleich mit In-vitro-Untersuchungen an menschlicher Haut kann ein Unterschiedlichkeitsfaktor berechnet werden, der sich aus der Absorptionsrate Tierhaut/Absorptionsrate menschlicher Haut ergibt [Dick 1992]. Ein Tiermodell, welches einen kleineren Unterschiedlichkeitsfaktor als drei hat, scheint geeignet für die Vorhersagbarkeit der Permeabilität der menschlichen Haut. Bei Schweinehaut lag der Unterschiedlichkeitsfaktor für Vollhaut (Epidermis

und Dermis) je nach Testsubstanz zwischen 0,6 und 1,2. Interessanterweise lagen die Unterschiedlichkeitsfaktoren für Spalthaut niedriger, zwischen 0,4 und 0,9. Die höhere Penetrationsrate durch Schweinehaut wird hier vor allem mit der größeren Follikeloberfläche erklärt.

Es zeigten sich für das SBM mit exzidierte menschlicher Haut vom selben Probanden fast doppelt so hohe Werte in den tieferen Hautschichten in vitro im Vergleich zu in vivo bei Einwirkungszeiten zwischen 35 und 190 Minuten [Wagner 2002b]. Der Abstand zu den In-vivo-Ergebnissen vergrößerte sich mit zunehmender Einwirkungszeit. Die Messwerte des V-FDZ lagen teils unter den Werten in vivo, teils darüber. Eine Erklärung hierfür wurde in der Veränderung des pH-Wertes durch den Phosphatpuffer vermutet, welcher eine verminderte Löslichkeit der Untersuchungssubstanz in der Haut im Gegensatz zum SBM oder zu den In-vivo-Untersuchungen verursachte. Für beide In-vitro-Modellergebnisse wurde eine direkte lineare Korrelation zu den In-vivo-Ergebnissen gefunden und ein Faktor präsentiert, mit welchem In-vivo- und In-vitro-Ergebnisse gegeneinander verrechnet werden können.

Im SC der Schweinehaut fand sich eine etwas höhere FS-Konzentration als in menschlicher Haut in vitro [Jacobi 2005]. Die Werte des DHM und des SBM waren sehr ähnlich. Sie entsprachen ungefähr dem Doppelten der Werte in vivo. Beim SBM und der FDZ wurden in den tieferen Hautschichten höhere Konzentrationen an FS in der Schweinehaut als in menschlicher Haut gefunden. Der Wirkstoffgehalt in den tieferen Hautschichten des DHM unterschied sich kaum von denen des SBM bei der Nutzung menschlicher Haut. Deren In-vitro-Daten waren doppelt so hoch wie die In-vivo-Daten. Bei der Nutzung von Schweinehaut waren die Werte des DHM signifikant niedriger als die des SBM ($p < 0,05$).

Eine andere Arbeit zeigt eine Abhängigkeit des Permeationskoeffizienten von der Testsubstanz auf [Schäfer-Korting 2006]. So lag dieser bei Testosteron bei menschlicher Epidermis über dem von Schweinehaut. Bei Koffein war es umgekehrt.

Tabelle 11 (s. Seite 55) zeigt einen signifikanten Unterschied im prozentualen Anteil der FS-Konzentration nach langer Einwirkzeit (21 Stunden) in den DSL vom SBM zu den anderen drei Modellen. Der Effekt der Okklusion und des zusätzlichen Drucks des oberen Stempels in dem speziellen Versuchsaufbau des Saarbrückenmodells können die eine Ursache sein.

Eine Vaselineexposition, wie sie bei SMB als einzigem Modell vorliegt, oder aber okklusive Salbengrundlagen können die Penetration als weitere Ursache beeinflussen [Ring 1985]. Bei In-vivo-Untersuchungen wurden durch Vaselineexposition und andere Faktoren sogar eine Veränderung der Genexpression der Epidermis und damit eine mögliche Veränderung des Penetrationsverhaltens beobachtet [Marionett 2003].

4.2 Direkthautmodell (DHM)

Im Direkthautmodell wurden nach einer Stunde die höchsten FS-Konzentrationen im SC gefunden und damit sehr viel weniger in den tieferen Hautschichten als im SBM. Diese Ergebnisse sind gut vergleichbar mit der Verteilung in der Franzdiffusionszelle mit Vollhaut nach einer Stunde. Außerdem ließ sich im DHM kaum FS im darunter liegenden Knorpel nachweisen. Die Ohrmuschel besteht aus elastischem Knorpel [Thews 1999]. Die Ernährung des Knorpels erfolgt ausschließlich durch Diffusion. Blutgefäße sind nicht vorhanden. Somit findet in dieses Gewebe kaum eine Substanzaufnahme statt, da es sich um umsatzarmes Gewebe handelt. Auch nach 21 Stunden fand sich hier nahezu keine FS. Es ist davon auszugehen, dass sich die nach vier und nach 21 Stunden gefundene geringe Substanzmenge im Perichondrium - der gut durchbluteten Knorpelhaut - befand, die eng mit dem Knorpel verbunden ist [Thews 1999].

Ein Vorteil des DHM ist die Vermeidung einer unnatürlichen Hydratation des Gewebes, wie sie durch die Kompartmentflüssigkeit bei der FDZ entsteht [Wagner 2002]. Vor allem nach längerer Einwirkungszeit zeigte sich bei der FDZ eine erhebliche Diffusion von Flüssigkeit ins Gewebe, die eine Veränderung im Penetrationsverhalten hervorrufen kann [Schäfer 2002, Ring 1985]. Der Versuchsaufbau ohne Okklusions- oder Hydratationseffekt, wie beim DHM, entspricht demnach vermutlich am besten den Bedingungen der dermatologischen Praxis. Ebenfalls entfallen aufwendige Vorbereitungsarbeiten, wie die Entfernung der Haut vom Knorpel, die Spalthautentnahme oder das Stanzen der passenden Hautscheibe für das jeweilige Untersuchungsmodell, was jeweils die Haut schädigen und somit zu einem systematischen Fehler führen könnte.

Als Nachteil dieses Modells könnte man, besonders nach längeren Versuchszeiten, eine mögliche Dehydratation nennen. Aus diesem Grund wurde der Versuchsaufbau stets im Brutschrank in einem verschlossenen Plastikbehälter verpackt. Eine Dehydratation oder Verflüchtigung der Untersuchungssubstanz kann bei zukünftigen Untersuchungen ebenfalls eine Rolle spielen [Shah 1991], auch wenn diese in der vorliegenden Studie bei der lipophilen FS in Wollwachs zu gering erschien, als dass sie Einfluss auf das Penetrationsverhalten zeigen könnte. Dieser Aspekt soll dennoch erwähnt werden, da die Untersuchungen dieser Arbeit das Ziel verfolgen, diese Modelle mit klinisch relevanten und gegebenenfalls hydrophilen Substanzen in die dermatologische Praxis zu übertragen. Untersuchungen mit FS an menschlicher Haut in vivo wurde durchgeführt und mit In-vitro-Untersuchungen in der FDZ und dem SBM verglichen [Wagner 2001, 2002a, 2002b]. In beiden In-vitro-Modellen wurde in diesen Arbeiten ebenfalls ein Anstieg der totalen FS-Konzentration im SC mit ansteigenden Einwirkungszeiten gemessen. Für die FS-Konzentrationen, die im SC gemessen wurden, konnte eine hohe Korrelation zu den In-vivo-Daten festgestellt werden. Der Anstieg der FS-Konzentrationen nach 30 und 60 Minuten in den tieferen Hautschichten verlief in der FDZ wesentlich langsamer als im SBM und stimmt mit den Beobachtungen dieser Arbeit überein.

Beim Vergleich von In-vivo-Daten mit In-vitro-Ergebnissen im Allgemeinen kommt hin, dass besonders in vivo bei der Abrissmethode eine zusätzliche Provokation der metabolischen Aktivität durch die Produktion und Freisetzung von Zytokinen und kostimulierenden Molekülen festgestellt wurde, welche die humorale und zelluläre Immunantwort auf Peptide, Proteine und DNA-Antigene erhöht [Choi 2003].

Beim DHM kann es zum lateralen Spreiten kommen, welches in Vorversuchen beobachtet wurde und die Ergebnisse ebenfalls beeinflussen kann. Je nach Größe der Auftragungsfläche, Einwirkungszeit, Wirkstoff und vor allem Trägersubstanz kann sich das Ausmaß des lateralen Spreitens stark unterscheiden, wie Untersuchungen in vivo am Menschen zeigten [Chambin-Remoussenard 1993, Jacobi 2004].

Bei der Verwendung von Penetrationserhöhern unter klinischen Aspekten kann der Effekt an tierischer Haut höher sein kann als beim Menschen [William 2004]. Besonders, wenn bei einem Modell bekannt ist, dass es auch ohne Penetrationserhöher eine erhöhte Penetrationsrate gegenüber menschlicher Haut aufweist, wie es bei Schweinehaut der Fall ist [Jacobi 2005].

Das DHM ist außerdem auf die Untersuchung der Penetration in die Haut begrenzt. Ob der Wirkstoff gleichzeitig permeabel ist, kann mit diesem Modell nicht untersucht werden, da kein Abtransport aus der Dermis möglich ist. Wenn aber bedeutende Mengen die Dermis erreicht haben, ist davon auszugehen, dass der Wirkstoff permeabel ist, denn in der Dermis befinden sich wichtige Gefäßnetze, die den Stoff abtransportieren und so dem Blutkreislauf zuführen [Thews 1999]. Ebenso muss ein großer Teil des Metabolismus der Untersuchungssubstanz in der Haut vernachlässigt werden, der bei In-vivo-Experimenten eine Rolle spielt. Je frischer das Hautmaterial einer In-vitro-Untersuchung ist, desto mehr ist von einem noch stattfindenden Metabolismus auszugehen [Holland 1984].

Zusammenfassend kann zu diesem Modell gesagt werden, dass es sich um eine in der Literatur bisher selten beschriebene Methode handelt. In dieser Arbeit wird das DHM als gut praktikabel bewertet, da wenig störende Einflüsse bei der Durchführung beachtet werden müssen. Es ist gut geeignet für Untersuchungen von Substanzen, die in den oberen Hautschichten wirken sollen, nicht aber für Substanzen, die überwiegend permeabel sind und ihre hauptsächliche Wirkung systemisch zeigen.

Studien haben gezeigt, dass die In-vitro-Daten dieser vier Untersuchungsmodelle mit In-vivo-Daten von menschlicher Haut verglichen, die beste Übereinstimmung beim DHM fanden [Jacobi 2005].

4.3 Modell der Vollhaut in der Franz-Diffusionszelle (V-FDZ)

Die Franzdiffusionszelle (FDZ) wurde in der vorliegenden Arbeit sowohl mit Vollhaut als auch mit Spalthaut als Permeationsmodell gewählt und untersucht. Bei den Messungen der FS-Konzentration der Vollhaut zeigten sich nach einer Stunde vergleichbare prozentuale Werte zu allen drei anderen Modellen im SC und vergleichbare Konzentrationen an FS zum DHM in den tieferen Hautschichten. Signifikante höhere Werte zeigen sich nach 21 Stunden im SC in der V-FDZ im Gegensatz zum DHM. Ursache hierfür könnte ein leicht verminderter Abfluss der FS aus dem Reservoir des SC in die DSL aufgrund deren Hydratation sein, der sich erst bei sehr prolongierter Einwirkungszeit bemerkbar macht und sich auch im Modell der S-FDZ zeigt. Nach einer Stunde zeigen sich weder im SC noch in den DSL signifikante Unterschiede der FS-Konzentration zwischen DHM und V-FDZ. Das

zeigt, dass der Quelleffekt der Haut, durch die andauernde Hydratation der Haut von dermalen Seite in den Modellen der FDZ erst nach sehr langer Einwirkungszeit einen beeinflussenden Effekt auf die Umverteilung einer Substanz zeigt.

Die FS-Konzentration der tieferen Hautschichten lag nach einer Stunde signifikant unter den FS-Konzentrationen der tieferen Hautschichten des SBM, welches durch die druckbedingte zusätzliche Penetration im SBM erklärt werden könnte.

In der Akzeptorflüssigkeit wurde nach einer Stunde noch keine FS-Konzentration gemessen. Auch nach vier Stunden war der Anteil in diesem Kompartiment gering. Es wurde, wie bei den beiden vorher diskutierten Modellen, eine Abnahme der Wirkstoffkonzentration im SC über die zunehmende Zeit hin ersichtlich. Gleichzeitig wurde allerdings keine so deutliche Zunahme der FS-Konzentration in den tieferen Hautschichten, wie beim DHM und SBM, beobachtet. Das könnte daran liegen, dass bei der V-FDZ sich die FS im Gegensatz zu den beiden vorher beschriebenen Modellen zusätzlich noch in die Kompartimentflüssigkeit verschieben kann.

Trotz dem das Modell der FDZ durch die Möglichkeit des Abflusses in die Akzeptorflüssigkeit das Modell zu sein scheint, welches der Haut in vivo mit Anschluss an den zirkulierenden Blutkreislauf am nächsten kommt, unterscheidet es sich von In-vivo-Versuchen in einigen entscheidenden Punkten wie:

- der fehlenden Mikrozirkulation im Untersuchungsgewebe,
- dem Metabolismus der Substanz innerhalb der Haut, welcher bei allen In-vitro-Modellen fehlt und
- dem Quelleffekt, der sich umso stärker bemerkbar macht, je länger die Untersuchungszeit in der FDZ beträgt [Benfeld 1999, Wagner 2000].

Die Penetration bei Versuchen in der Franzdiffusionszelle (FDZ) unterscheidet sich von In-vivo-Versuchen in einigen entscheidenden Punkten [Müller 2003]:

- *die fehlende Mikrozirkulation im Untersuchungsgewebe;*
- *der fehlende Metabolismus der Substanz innerhalb der Haut und*
- *der Quelleffekt der Haut, der proportional zur Untersuchungszeit in der FDZ auftaucht. Dabei ist zu beachten, dass der Hydratationsgrad der Haut Einfluss auf die Quantität der SC-Zellen hat, die pro Abriss entfernt werden.*

Ein Aufquellen der Haut besonders nach 21 Stunden konnte schon makroskopisch festgestellt werden. Eine präzise Hautdickenmessung nach längerer Einwirkungszeit in der FDZ wurde in einer anderen Arbeit vorgenommen und zeigte eine kontinuierliche Zunahme der Hautdicke mit ansteigender Zeit in der FDZ [Wagner 2000]. Welche Hautschichten jedoch in hohem Grade eine Veränderung durch Hydratation erfahren, wird in der Literatur kontrovers diskutiert. An menschlicher Haut wurde in einer In-vivo-Studie gezeigt, dass die oberflächliche Hornschicht viel weniger Wasser anzieht und weniger fähig ist, Wasser zu speichern, als die darunter liegenden Hautschichten [Tagami 1982]. Eine In-vitro-Untersuchung des menschlichen SC ergab keine Veränderung der Lipiddoppelschichten des SC bei einer Erhöhung des Hydratationsgrades von 6% auf 40% und somit kein Eindringen von Wasser ins SC [Bouwstra 1992]. Bei einer In-vivo-Studie der SC-Dicke des durch Raman-Spektroskopie gemessenen Wasserkonzentrationsprofils stieg die scheinbare SC-Dicke unter 90minütiger Hydratation jedoch auf das Zweifache an, was auf ein Eindringen von Wasser ins SC hindeutet, während ein geringerer Anstieg bei kürzerer Hydratationszeit beobachtet wurde [Egawa 2007]. Eine übermäßige Hydratation der Haut, wie sie in der FDZ mit zunehmender Einwirkzeit stattfindet, lässt die Penetration von lipidlöslichen, unpolaren Molekülen ansteigen, die von polaren Molekülen weniger [Zhai 2001]. Der Grad der Hydratation des SC ist einer der entscheidenden Faktoren der Barrierefunktion der Haut [Bommannan 1990].

In den durchgeführten Untersuchungen stellten sich mit zunehmender Einwirkungszeit in der FDZ Probleme bei der Abrissmethode ein. Manchmal blieb schon nach wenigen Abrissen das gesamte SC am Klebefilm hängen und wurde so vollständig oder in Teilen von der Auftragungsfläche entfernt. Vermutet wird, dass sich zwischen Stratum granulosum und Stratum corneum Wasser einlagerte, welches die Adhäsionskräfte der untersten Korneozytenschicht außer Kraft setzte. Da die Auswertung der 30 Abrisse des SC bei der grafischen Darstellung nur als Gesamtwert dargestellt wurde, hatte dieses Phänomen keine weiteren Auswirkungen auf die Darstellung.

Fraglich ist, ob sich bei einer höheren Wirkstoffkonzentration einer aufgetragenen sättigenden Menge ein Gleichgewicht in der Umverteilung zwischen SC, DSL und Akzeptorflüssigkeit einstellen würde. Es ist eine deutliche Verschiebung der FS zwischen vier und 21 Stunden vom SC in die DSL und die Kompartimentflüssigkeit darstellbar. Es sollte beachtet werden, dass trotz der Möglichkeit des Abflusses die

Akzeptorflüssigkeit begrenzt ist und der Stoff nicht wie im menschlichen Kreislauf abtransportiert werden kann. Es ist also davon auszugehen, dass die Gesamtmenge der Substanz, die in den Blutkreislauf gelangen würde, über derjenigen liegt, die sich in der Akzeptorflüssigkeit der FDZ wieder finden lässt.

Zusammenfassend kann über das Franz-Diffusionszell-Modell bemerkt werden, dass es eine entscheidende Rolle spielt für die Untersuchungen von Wirkstoffen, bei denen eine systemische Wirkung erwünscht ist. Beachtet werden muss dabei, dass im Vergleich mit anderen In-vitro-Modellen ein unnatürlicher Hydratationszustand der Hautprobe mit zunehmender Zeit entsteht.

Dadurch fand vermutlich der verminderte Abfluss aus dem Reservoir des SC in die tieferen Hautschichten statt. Da die Hydratation offensichtlich die Grenze zwischen Stratum corneum und Stratum granulosum nicht überschritt, zeigte sich, dass die Intaktheit der SC-Barriere auch bei diesem In-vitro-Modell von innen nach außen funktionierte. Ein vermehrter Abfluss der FS mit zunehmender Zeit besonders aus der Epidermis, aber auch der Dermis in die Kompartimentflüssigkeit sind neben einem verminderten Abfluss aus dem SC in die DSL im Vergleich zum SBM und DHM deutlich.

Ein Vergleich von menschlicher Haut mit Schweinehaut in der FDZ wurde mit Hilfe von Lichtschutzmitteln durchgeführt und mit Daten von l`Oreal und Hoffmann-La Roche verglichen [Benech-Kieffer 2000]. Sie wiesen eine gute Reproduzierbarkeit der Ergebnisse unter standardisierten Bedingungen auf. Die Korrelation der quantitativen Daten zwischen Schweinehaut und menschlicher Haut war hoch und ließ sich mit einem Umrechnungsfaktor, der sich aus der Absorptionsrate der tierischen Haut durch die Absorptionsrate der menschlichen Haut errechnen ließ, gut vergleichen [Dick 1992].

Nachteilig am Modell der FDZ war der komplizierte und kostenintensive Versuchsaufbau, der einen besonderen Arbeitsplatz mit Magnetplatte, Wasserbad, Pumpe und Temperieranlage verlangte. Aufwendiger und zeitintensiver als bei den anderen beiden Modellen war darüber hinaus auch die Vorbereitung der Hautproben.

Kritisch wird die Benutzung der FDZ ebenfalls aufgrund der Akzeptorflüssigkeit beschrieben, die eine Verschiebung des pH-Wertes verursachen kann [Wagner 2003]. Somit kann sich der Ionisierungsgrad der Fettsäuren im SC verändern und eine Umorganisation der SC-Lipide verursachen, was die Permeation von

Wirkstoffen stark beeinflussen kann [Bouwstra 1998, Bommannan 1990, Hadgraft 2004]. Eine andere Arbeit bestätigte die Abhängigkeit der Permeation vom pH-Wert des SC [Elias 1996]. Mit zunehmender Einwirkzeit glichen sich der pH-Wert der Akzeptorflüssigkeit und der pH-Wert der Dermis an [Wagner 2002a].

Eine Arbeit, die die Vergleichbarkeit der In-vitro-Ergebnisse aus der FDZ mit In-vivo-Ergebnissen unter Ausschluss der interindividuellen Unterschiede untersuchte, hat Penetrationsuntersuchungen mit FS an menschlicher Haut in vivo und in vitro nach plastischen Operationen mit Hautentnahme am SBM und der FDZ durchgeführt [Wagner 2002b]. Für beide Modelle wurden direkte lineare Korrelationen zu den In-vivo-Daten gefunden, wobei überbewertete Konzentrationen von FS in vitro (SBM > FDZ) gefunden wurden, die durch andere Arbeiten bestätigt werden konnten [Benech-Kieffer 2000, Jacobi 2005, Schmook 2000, Wagner 2000, 2002a].

4.4 Modell der Spalthaut in der Franz-Diffusionszelle (S-FDZ)

Das Modell der Spalthaut in der Franzdiffusionszelle (S-FDZ) stellte eine Besonderheit unter den vier Untersuchungsmodellen dar, denn hier wurde ein Hautschnitt verwendet, der neben der Epidermis einschließlich des SC nur einen unbedeutenden Teil der Dermis enthält. Die Dicke der Hautproben lag bei 300 µm. Untersucht werden sollte, ob ähnliche Werte erhalten werden können wie bei den anderen Modellen und ob die gesamte Dicke der Dermis eine entscheidende Rolle im Permeationsverhalten von FS spielt. Bei der Auswertung wurden folgende Beobachtungen gemacht:

- im SC wurden vergleichbare Werte zur V-FDZ nach allen drei Zeitintervallen gemessen;
- in den tieferen Hautschichten kam es nach vier Stunden zu einem Abfall und nach 21 Stunden wieder zu einem leichten Anstieg der Konzentration von FS, was mit einem rasch eingetretenen Gleichgewicht interpretiert wurde und
- es fand sich schon nach einer Stunde eine deutliche FS-Konzentration in der Akzeptorflüssigkeit, die selbst nach vier Stunden bei der V-FDZ in solch hoher

Konzentration weder in absoluten Werten noch im prozentualen Vergleich erreicht wurde.

Erklärt werden kann diese hohe Permeabilität der Spalthaut für die Testsubstanz durch die Umgehung der epidermalen interzellulären Penetrationswege und somit einem Teil der Barriere des SC. Möglich ist dies durch die Poren in der Haut, die durch die Anschnitte von Follikeln und Drüsen bei der Hautspaltung entstanden. Das basale Epithel der Haarfollikel weist unter Bedingungen einer intakten Vollhaut seine eigenen Barriereeigenschaften durch eine ebenfalls mehrschichtige Hornschicht auf [Lademann 1999]. Ein 10fach längerer Verbleib von Nanopartikeln in den Haarfollikeln konnte im Gegensatz zum Verbleib dieser im SC nachgewiesen werden, welches auf die Freisetzung eines Wirkstoffes einen bedeutenden Einfluss ausübt [Lademann 2006b]. Die Haarfollikel erreichen eine Tiefe zwischen 500 und 1500 μm in der Haut [Whiting 2004]. Das bedeutet, dass die Follikel und die Schweißdrüsen bis in die subepidermalen Schichten reichen können. Somit wird das untere Ende der Drüsen, Drüsengänge und Follikel bei der Entnahme der Spalthaut entfernt [Vogt 2005]. In der Spalthaut gleichen die angeschnittenen Drüsen winzigen Löchern, durch die das Substanzgemisch direkt nach Auftragen in die Akzeptorflüssigkeit gelangen kann.

Obwohl zwischen den tieferen Hautschichten und der Akzeptorflüssigkeit ein Gleichgewicht eingetreten zu sein schien, blieb die Entleerung des SC davon unbeeinflusst und verhielt sich genauso wie die Vollhaut in der FDZ. Diese Vergleichbarkeit in den einzelnen Schichten zwischen Spalthaut und Vollhaut in der FDZ konnte auch in einer anderen Arbeit beobachtet werden [Benech-Kieffer 2000]. Diese Arbeit bestätigt auch die sehr viel höheren Konzentrationen in der Akzeptorflüssigkeit bei Spalthaut im Gegensatz zur Vollhaut.

Vergleicht man die graphischen Darstellungen von S-FDZ mit V-FDZ fällt auf, dass der FS-Anteil, der bei Vollhaut mit zunehmender Zeit in die Dermis penetrierte, sich bei Spalthaut in der Kompartmentflüssigkeit ansammelte. Das deutet darauf hin, dass auch die Dermis eine Speicherfunktion besitzt, zumindest in vitro unter den hier vorliegenden Bedingungen. Angenommen werden kann auch, dass die Epidermis und der Rest an Dermis der Spalthaut bereits nach einer Stunde gesättigt waren und so eine Umverteilung aus dem Reservoir nur in das Kompartment erfolgen konnte.

Die Vergleichbarkeit zu menschlicher Haut ist das eigentliche Ziel jedes Tierhautmodells. In einigen Vergleichsstudien der Permeabilität, in denen eine gute Übereinstimmung zwischen Schweinehaut und menschlicher Haut gefunden wurde, wurde durch Hitze separierte menschliche Epidermis verwendet [Netzlaff 2006b].

Eine 600 µm breite Spalthautentnahme an Schweinehaut wurde genutzt, um die Permeabilität verschiedener Teststoffe in der FDZ zu untersuchen und sie mit menschlicher Haut zu vergleichen [Schmook 2001]. Eine gute Übereinstimmung beider Hautmodelle mit einer 7-fach erhöhten Flussrate durch Schweinehaut wurde für Salizylsäure gefunden. Hydrophobere Zusammensetzungen zeigten jedoch bei der Spalthaut vom Schwein eine 800-fach höhere Permeation als bei menschlicher Spalthaut.

Das Modell der Spalthaut in der FDZ erwies sich als geeignetes Modell zur Messung oberflächlich verbleibender Substanzen, wie bei Sonnenschutzcremes [Benech-Kieffer 2000], da mehr als 90% beider Sonnencremes in den ersten 15 Abrissen wiedergefunden wurden [Mavon 2007]. Außerdem konnte gezeigt werden, dass die verbleibenden 10% nicht den lebenden Teil der Epidermis oder Dermis erreichten, sondern in Furchen und Einwölbungen wieder zu finden waren. Für Untersuchungen von Stoffen, die in tiefere Hautschichten penetrieren können, ist die Spalthaut hingegen ungeeignet, ebenso wie für die Permeation von Wirkstoffen in den menschlichen Kreislauf, da diese durch die Poren fälschlicherweise erhöht ist. Für diese begrenzten Anwendungsmöglichkeiten bietet das DHM jedoch wesentlich einfachere Versuchsbedingungen. Je follikelreicher die Haut des Versuchstieres, desto weniger scheint eine Spalthautentnahme zu Versuchszwecken sinnvoll.

Zusammenfassend kann zur Benutzung von Spalthaut in der FDZ bemerkt werden, dass sie zur Untersuchung des Reservoirs des SC ausreichend ist, da sie für das SC die gleichen Penetrationseigenschaften und Entleerungstendenzen zeigt wie die Vollhaut in der FDZ.

4.5 Thesenauswertung

In jedem Testsystem wurde eine abnehmende Konzentration an FS im SC mit zunehmender Umverteilungszeit beobachtet. Für die Modelle V-FDZ, DHM und SBM ging diese Abnahme der FS Konzentration im SC mit einer Zunahme in den tieferen Hautschichten einher. Beim Modell S-FDZ wurde lediglich ein Anstieg der

Konzentration in der Kompartimentflüssigkeit beobachtet. Eine vergleichbare Umverteilung wurde bei der Untersuchung von UV-Filtern und Salizylsäure in den Modellen V-FDZ und S-FDZ beobachtet [Benech-Kieffer 2000].

In allen Untersuchungen penetrierte die Untersuchungssubstanz bereits nach einer Stunde durch die lebende Epidermis. Nach dieser Zeit wurden die niedrigste Konzentration im SC beim SBM und die höchste im DHM gefunden. Die beiden Modelle der FDZ zeigten annähernd gleiche Werte in den obersten Hautschichten und in der Umverteilung mit zunehmender Zeit. Als Grund hierfür wird die Hydratation der Haut durch die Akzeptorflüssigkeit angenommen, die an menschlicher Haut nach drei Stunden in der FDZ beobachtet wurde [Wagner 2000].

Die Ergebnisse zeigen, dass das SC als Reservoir für FS bei allen Testmodellen funktioniert und eine Umverteilung der Testsubstanz in die DSL aufweist. Die größte Umverteilung in die tieferen Hautschichten wurde in den nicht hydrierten Hautmodellen des DHM und SBM beobachtet. Die wiedergefundene FS-Menge im Knorpel oder Filterpapier war minimal im Gegensatz zu den deutlichen Mengen in der Akzeptorflüssigkeit der FDZ, welches durch die Möglichkeit des Abflusses und das Phänomen der vollen Hydratation der Haut und der dadurch geringeren Aufnahmefähigkeit in diesem Modell erklärt werden kann [Wagner 2000].

Beim DHM korrelierte die Abnahme des FS-Wertes im SC linear mit der Zunahme des FS-Wertes in den tieferen Hautschichten ($R^2 \pm SD = 0,98 \pm 0,02$) [Jacobi 2005]. Eine solche Korrelation konnte beim SBM nicht festgestellt werden, welches durch den hohen Druck nach Auftragung der Testsubstanz und einer dadurch erhöhten Penetrationsrate erklärt wurde. Höhere FS-Konzentrationen in den tieferen Hautschichten schon nach einer Stunde waren das Ergebnis.

Betrachtet man die Ergebnisse der vier Modelle nebeneinander so stellt man fest, dass sie von einer Serie zur nächsten gut reproduzierbar sind und sich zwar in den Absolutwerten unterscheiden, nicht jedoch im Verhältnis der prozentualen Verteilung in den verschiedenen Schichten der Haut. Durch diese vorhandenen interindividuellen Unterschiede der Serien kommen hohe Standardabweichungen der absoluten Werte zustande. Daher wurden Prozentwerte verglichen, um die Frage zu klären, wie die Verteilung und Umverteilung der FS in den einzelnen Schichten zueinander im Verhältnis stehen. Diese Art der Auswertung ließ die interindividuellen Unterschiede im Penetrationsverhalten der verschiedenen Schweinehäute nicht so

stark ins Gewicht fallen. Bei Tieren, bei denen bereits nach einer Stunde vergleichsweise hohe Werte im SC gemessen wurden, fanden sich nach längerer Umverteilungszeit auch vergleichsweise hohe Werte in den tieferen Hautschichten. Dies kann mit der unterschiedlichen Struktur und Dicke der Haut, der Dicke des SC, der Lipidzusammensetzung und vor allem der Follikelporendichte und -größe der Tiere zusammenhängen [Bommannan 1990, Bouwstra 1992, Bronaugh 1982, Jacobi 2008, Meyer 1996, 2001a, 2001b, 2002, Panchagnula 1997, Scott 1991]. Bei einer anderen Studie hingegen, bei der rekonstruierte Platten lebender menschlicher Epidermis in einer Diffusionszelle untersucht und gleichzeitig einer Lipidanteilmessung unterzogen wurden, korrelierte die Penetration der beiden Testsubstanzen zwar indirekt mit dem Lipidgewicht, aber sie blieb unbeeinflusst von der Anzahl der Zellschichten oder der Dicke des SC [Elias 1981]. Auch in vivo beim Menschen zeigten sich große interindividuelle und auch intraindividuelle Schwankungen der Hautstruktur [Holbrook 1974, Otberg 2004, Pirot 1998, Rougier 1987, Schwindt 1998].

Bei den Untersuchungen der vorliegenden Arbeit wurden alle zwölf Versuche einer Serie an einem Ohr durchgeführt, um interindividuelle Unterschiede auszuschließen. Da die Haut eines Schweineohres begrenzt ist, wurde für das DHM die Innenseite der Schweineohren benutzt, wobei darauf geachtet wurde, die Plicae zu meiden [Meyer 2002]. Durch die Plicae scaphae werden deutliche Wölbungen der Ohrhaut hervorgerufen, in denen eine verstärkte fettreiche Hypodermis auftaucht. Die Dicke der vitalen Epidermis der beiden Seiten der Ohrmuschel wurde untersucht und dabei kaum ein Unterschied festgestellt (innere Seite 53-56 μm , äußere Seite 51-52 μm).

Diese Auswahl der Innenseite des Ohrs für das DHM könnte jedoch möglicherweise einen Einfluss auf das Penetrationsverhalten gezeigt haben, welcher hier nicht untersucht worden ist.

In der prozentualen Verteilung zeigte sich in allen Modellen eine gute Vergleichbarkeit unter den Hautproben der verschiedenen Tiere. Dadurch, dass die 72 Untersuchungen an nur 6 Schweineohren stattfanden, ergaben sich zum Teil deutliche Unterschiede zwischen Median und Mittelwert. Die Tendenzen einer starken oder mäßigen Entleerung des SC-Reservoirs in den verschiedenen Hautmodellen blieben davon jedoch unberührt.

Abhängig ist die Reservoirfunktion nicht nur vom SC, sondern auch von den vorhandenen Hautanhangsgebilden. In einer In-vitro-Studie war die Absorption von Steroiden in die normale Haut von haarlosen Ratten signifikant höher als in die Haut ohne Hautanhangsgebilde (Narbenhaut) [Hueber 1994a]. In vivo fand sich in der Haut ohne Hautanhangsgebilden eine zweifach erhöhte Reservoirkapazität und eine stark erniedrigte Wiederfindungsrate in tieferen Hautschichten [Hueber 1994b]. Dieses Phänomen schien unabhängig von der Einwirkzeit zu sein [Hueber 1992]. Bei der normalen Haut stiegen die Werte in Epidermis und Dermis für die Steroide mit zunehmender Zeit deutlich an. Bei der Narbenhaut war der Anstieg geringer. Den höchsten Konzentrationsunterschied fand man in der Tiefe zwischen 60 und 400 µm, wo die Talgdrüsen lokalisiert sind. Diese Ergebnisse stehen somit im Gegensatz zu der Beobachtung der vorliegenden Arbeit, dass sich das Reservoir der Spalthaut, deren Hautanhangsgebilde teilweise beim Anschnitt zerstört wurden, genauso in der Wirkstoffaufnahme und -abgabe verhielt, wie das Reservoir der Vollhaut. Angenommen wird, dass noch andere Veränderungen, neben den fehlenden Hautanhangsgebilden, in der Narbenhaut die erhöhte Speicherfähigkeit und die verminderte Abgabefähigkeit ausmachen.

Haarfollikel und Schweißdrüsen können bevorzugte Wege für einige Zusammensetzungen oder Moleküle sein, die schneller in diese Umgehungswege gelangen als durch das SC [Illel 1997]. Da die Follikel jedoch ein mehrschichtiges Epithel aufweisen, wirken sie ebenfalls als Barriere und Speicher für lokale Wirkstoffe [Lademann 1999]. Allerdings ist nicht jeder Follikel für die Penetration zugänglich [Lademann 2001]. Es gibt aktive Follikel und solche, die Sebum produzieren und keine Rolle bei der Penetration spielen, so genannte passive Follikel.

Zu allen vier Modellen kann gleichermaßen gesagt werden, dass folgende Besonderheiten bei der Verwendung von In-vitro-Modellen zu beachten sind:

- das Fehlen des vollständigen Metabolismus der Haut oder des Wirkstoffes in der Haut [Jahn 2001] und

- die Durchblutung und die Sauerstoffaufnahme durch die Atmosphäre [Heise 2003].

In der Praxis kommt hinzu, dass Krankheiten der Haut meistens Barrierestörungen [Jakasa 2007] und eine Erhöhung der Immunmodulatoren mit sich bringen [Ito 2003, Kobayashi 2003].

Auf die Ergebnisse des DHM kann das laterale Spreiten einen besonderen Einfluss haben, welches in vivo am Menschen durch die Abrissmethode untersucht wurde

[Jacobi 2004]. Abhängig ist laterales Spreiten durch die Größe der Auftragungsfläche und durch die Zeit zwischen Auftragung und Abriss. Signifikant höhere Werte wurden angrenzend an die Auftragungsfläche gefunden. Das Spreiten spielt sich an der obersten Fläche ab. Dieses Phänomen muss bei der Auftragung von Substanzen und bei der Wiederfindungsrate in der Auftragungsfläche mit einbezogen werden. Das laterale Spreiten scheint ein symmetrischer Prozess zu sein. Beim SBM und den Modellen der FDZ ist der Hautausschnitt begrenzt im Gegensatz zum DHM. So könnte sich beim DHM die FS nach der erweiterten Einwirkungszeit außer in die tieferen Hautschichten auch lateral verteilt haben. Da hier bei undefinierter Auftragsmenge keine Wiederfindungsrate ermittelt werden konnte, ist es möglich, dass es eine zusätzliche, nicht ermittelte Entleerung des SC in laterale Gebiete gab, die besonders beim DHM eine Rolle spielten.

Für die klinische Anwendung in vivo am Menschen müssen einige Punkte bei der Wirkstoffpenetration beachtet werden, die in vitro keine Rolle spielen:

- Es kommt zu einer Veränderung der Genexpression in der Epidermis unter äußerem Stresseinfluß [Marionett 2003].
- Eine dermatologische Behandlung ist umso tiefenwirksamer, je stärker die Abdunstung verhindert wird [Ring 1985]. Das kann z.B. durch eine okklusive Salbengrundlage entstehen.
- Ist die Hornschicht - wie bei vielen Krankheiten - zerstört, so sind auch die Reservoirfunktion und die Barrierefunktion gestört. Resultat davon ist, dass sich die Wirkstoffkonzentration in kranker Haut stark erhöht und aufgetragene Substanzen bevorzugt in kranke Gebiete einziehen [Schäfer 1978]. Nebenwirkungen, auch bei lokaler Behandlung, resultieren oft aus zu hohen Dosen und langer Behandlungszeit, die bei gestörter Barrierefunktion und Reservoirfunktion bei der erkrankten Haut oft nicht nötig sind.
- Die Art der gewählten Salbengrundlage hat außerdem großen Einfluss auf die Wirkung.

Die eingangs aufgestellten Thesen sollen im Folgenden zusammenfassend diskutiert werden:

These 1: Die Penetrationsrate des SBM sollte die Bezugsgröße darstellen.

Das SBM konnte gut als Bezugsmodell verwendet werden, da sich die vermuteten Tendenzen der Umverteilung klar darstellen lassen.

These 2: Es wurde erwartet, dass die Penetrationsraten in den Hautschichten im SBM durch die Einflussfaktoren Druck und Okklusion gegenüber den anderen Modellen erhöht sind.

Bewahrheitet hat sich diese These nur für die tieferen Hautschichten, nicht jedoch für das SC. Im SC wurden beim SBM zu allen drei Zeiten niedrigere Werte als im DHM gemessen, was mit einer Kompression des SC begründet werden kann.

These 3: Im Modell der Vollhaut in der FDZ wurden geringere Wirkstoffkonzentrationen als im SBM und DHM in den einzelnen Hautschichten erwartet, da der Wirkstoff in eine Akzeptorflüssigkeit abdiffundieren kann.

Die niedrigeren Werte an FS-Konzentration in den Hautschichten der FDZ im Gegensatz zum SBM, die wegen der Möglichkeit des Abtransportes in die Akzeptorflüssigkeit erwartet wurden, bestätigten sich bei der längsten Einwirkungszeit von 21 Stunden. Es wurden sogar durchweg höhere Werte in der V-FDZ im SC gemessen, was durch den Hydratationsdruck und der dadurch geringeren Aufnahme in die DSL erklärt werden kann. Die absolute FS-Konzentration der Epidermis und Dermis bei einer Stunde und bei vier Stunden lag in einem vergleichbaren Bereich zum DHM und SBM. V-FDZ besaß im Gegensatz zum SBM und DHM die Möglichkeit zur Permeation. Nach 21 Stunden ließ sich erkennen, dass eine deutliche Abnahme der FS-Konzentration in den tieferen Hautschichten zugunsten des Kompartments in der V-FDZ stattgefunden hatte, aber keineswegs eine verstärkte Abnahme im SC. Das beweist, dass die Entleerung des SC-Reservoirs von der Abflussmöglichkeit relativ unbeeinflusst blieb. Da die Entleerung des SC-Reservoirs in allen 4 Modellen ähnlich verlief ist es denkbar, dass die Sättigung der Dermis im SBM und DHM nach 21 Stunden noch nicht erreicht war und somit die Abflussmöglichkeit keine entscheidende Veränderung für die Entleerung des SC brachte.

These 4: Für das Modell der Spalthaut in der FDZ wurde dagegen angenommen, dass die Wirkstoffkonzentration in der Akzeptorflüssigkeit höher ausfallen als im V-FDZ und die FS-Konzentrationen etwa denen der anderen Modelle entsprechen. Dabei war unklar inwieweit die angeschnittenen Haarfollikel und die Schweißdrüsen in einer Spalthaut das zu erwartende Penetrationsergebnis beeinflussen können?

Es konnte eine deutlich höhere Konzentration von FS im S-FDZ im Vergleich zum V-FDZ in der Akzeptorflüssigkeit gemessen werden. Dabei wird angenommen, dass sich die angeschnittenen Follikel wie Löcher verhielten, durch welche die Substanz direkt in die Akzeptorflüssigkeit gelangen konnte. Schon nach einer Stunde fielen deutliche FS-Konzentrationen in der Akzeptorflüssigkeit beim S-FDZ auf. Die angeschnittenen Schweißdrüsen und Haarfollikel haben also großen Einfluss auf die Ergebnisse der S-FDZ gezeigt. Bemerkenswert ist, dass keine deutlichen Unterschiede der FS-Konzentration der Epidermis in allen drei Zeitmodellen zwischen V-FDZ und S-FDZ festzustellen waren. Das bestätigt, dass die Reservoirfunktion und deren Entleerung hauptsächlich vom SC und von der lebenden Epidermis abhängen.

Zusammenfassend zeigte sich das Saarbrückenmodell als geeignetes Modell, um das Reservoir des SC und deren Umverteilung in die tieferen Hautschichten in Abhängigkeit der Zeit zu untersuchen. Besonders günstig erscheint es für die Untersuchung einer leicht zu verdunstenden Substanz und deren Penetration in die Haut. Beachtet werden muss der Effekt der Okklusion, der zu einem verstärkten Eindringen der Substanz in tiefere Hautschichten führt. Dies machte sich schon nach kurzer Einwirkungszeit bemerkbar.

Das Direkthautmodell ist gut geeignet für Untersuchungen von Substanzen, die in den unterschiedlichen Hautschichten wirken sollen. Hautschädigende Einflussfaktoren wie Hydratation, Druck, Beschädigung der Hautstruktur durch zuvor stattfindende Aufbereitung des Gewebes sind beim DHM am geringsten. Die beste Übereinstimmung der Reservoirfunktion des SC und seiner Entleerung wurde beim Vergleich dieser Daten mit In-vivo-Untersuchungen beim DHM gefunden [Jacobi 2005].

Die bewährte Franzdiffusionszelle zeigte sich als wichtiges Modell für die Untersuchung von Wirkstoffen, bei denen eine systemische Wirkung erwünscht ist. Beachtet werden muss dabei, dass im Vergleich mit anderen In-vitro-Modellen ein unnatürlicher Hydratationszustand der Hautprobe mit zunehmender Zeit entsteht.

Für die Spalthaut gilt dabei im Besonderen, dass sie zur Untersuchung des Reservoirs des SC ausreicht, da sie für das SC die selben Penetrationseigenschaften und Entleerungstendenzen zeigt wie die Vollhaut in der FDZ. Für diese begrenzten Anwendungsmöglichkeiten bietet das DHM jedoch

wesentlich einfachere Versuchsbedingungen. Es konnte zudem gezeigt werden, dass sich bei den drei gewählten Zeitmodellen die Umverteilung aus dem Reservoir des SC in die tieferen Hautschichten nicht wesentlich zwischen den vier Modellen unterschied und die Möglichkeit des Abflusses in die Kompartimentflüssigkeit keine zusätzliche Entleerung des SC brachte. Einen Vergleich der vier Modelle hinsichtlich verschiedener für die tägliche Praxis relevanter Parameter liefert Tabelle 13.

Tab. 13: Vergleich der vier Untersuchungsmodelle auf Speichermöglichkeit der verschiedenen Hautschichten, Kosten, Praktikabilität und Aufwand, Schwierigkeiten und Beeinflussung der Penetration, sowie Vergleichbarkeit mit Daten von menschlicher Haut in vivo.

Modell	SC-Reservoir-Kapazität	Epidermis Speicherfähigkeit	Dermis Speicherfähigkeit	Kosten	Versuchsaufbau	Penetrationsbeeinflussende Faktoren	Vergleich mit menschl. Haut in vivo
SBM	++ (komprimiert)	++ (komprimiert)	+++	gering	einfach	Okklusion, Druck	++
DHM	+++	+++	+++	gering	sehr einfach	Dehydratation, Spreiten	+++
V-FDZ	+++	++ (hydriert)	++ (hydriert)	hoch	kompliziert	Hydratation= Aufquellung, pH-Wert-Verschiebung	++
S-FDZ	+++	++ (hydriert)	nicht vorhanden	hoch	kompliziert	angeschnittene Follikelöffnungen, Hydratation= Aufquellung, pH-Wert-Verschiebung	++

Die absoluten Konzentrationen an FS, die in vorhergehenden Studien im SC und in den DSL in vivo [Wagner 2000, 2002b] und in vitro [Wagner 2000, 2001] an menschlicher Haut gemessen wurden, wurden mit den Daten dieser Untersuchung verglichen.

Im SC des Schweins war die Substanzkonzentration leicht erhöht zu menschlicher Haut in vitro. Der Unterschied zwischen In-vivo-Daten menschlicher Haut zu In-vitro-

Daten von Schweinehaut betrug etwa 1:2 [Jacobi 2005]. Diese Unterschiede können durch die unterschiedliche SC-Dicke erklärt werden. Das SC des Schweins wies eine durchschnittliche Dicke von 19 μm auf [Meyer 2002], während das menschliche SC eine Dicke zwischen 5,5 und 9,8 μm an der Bauchhaut zeigte, welche in den In-vitro-Studien genutzt wurde, und 5,5 bis 22 μm am Unterarm [Holbrook 1974, Pirot 1998, Schwindt 1998], welcher für die In-vivo-Untersuchungen genutzt wurde.

Trotz der größeren SC-Dicke des Schweins wurden auch in den tieferen Hautschichten des Schweins größere Substanzmengen im Gegensatz zur menschlichen Bauchhaut in der FDZ und dem SBM gefunden [Wagner 2000]. Eine Erklärung kann in der Größe und Dichte der Follikel und der Lipidzusammensetzung des SC gesucht werden. Am menschlichen Rumpf ist die Dichte der Follikel mit 22-29/cm² angegeben [Otberg 2004], während sie am Schweineohr durchschnittlich 30/cm² [Meyer 2001] beträgt. Der Durchmesser eines menschlichen Haares am Rumpf beträgt 17-18 μm [Otberg 2004], wohingegen beim Haar des Schweins ein Durchmesser von 38-71 μm gemessen wurde [Meyer 1986]. Da die Follikel beim Schwein größer sind als beim Menschen wird angenommen, dass sie bei der Schweinehaut eine bedeutendere Rolle bei der Penetration von topisch applizierten Substanzen spielen.

Ein anderer wichtiger Penetrationsweg ist der interzelluläre Weg, der durch die Lipide bestimmt wird, welche die Korneozyten umgeben. Die Zusammensetzung der Lipide beim Schwein und beim Menschen und deren Organisationsstruktur zeigen Gemeinsamkeiten und Unterschiede. Das menschliche SC zeigt höhere Werte von Cholesterolestern und Keramid 6 und niedrigere Konzentrationen von Triglyzeriden und Keramid 2 im Gegensatz zum SC des Schweins [Jacobi 2005]. Außerdem unterscheiden sie sich deutlich in der Zusammensetzung und Anordnung der freien Fettsäuren [Bouwstra 1992]. Diese Unterschiede im follikulären und interzellulären Penetrationsweg könnten der Grund für die höhere Substanzkonzentration in vitro bei Schweinhaut im Gegensatz zu menschlicher Bauchhaut sein.

Der FS-Wert der tieferen Hautschichten war beim DHM ähnlich dem des SBM bei der Verwendung von menschlicher Bauchhaut. Die Werte beider In-vitro-Modelle entsprachen ungefähr dem Doppelten derjenigen in vivo [Wagner 2002b]. Bei der Verwendung von Schweinehaut in vitro zeigten sich deutlich höhere Werte in den tieferen Hautschichten beim SBM im Gegensatz zum DHM, was durch den erhöhten

Druck des SBM erklärt werden konnte, der bei der Hautstruktur des Schweins mit höherer Follikeldichte und Follikelgröße eine größere Rolle zu spielen scheint [Hueber 1994a und 1994b, Maibach 1971, Tenjarla 1999].

5 Zusammenfassung

Ziel der Arbeit war es, die Penetration mittels vier unterschiedlicher In-vitro-Modelle an Schweineohrhaut miteinander zu vergleichen. Dafür wurden Faktoren untersucht, die bei jeder dieser Methoden Einfluss auf das Penetrationsverhalten der verwendeten Modellschubstanz Flufenaminsäure (FS) nehmen. Verwendet wurde dazu das Saarbrücken-Penetrationsmodell, welches hier die Bezugsgröße für die anderen Modelle (das Direkthautmodell und das Modell der Franz-Diffusionszelle mit Vollhaut und mit Spalthaut) darstellte.

Untersucht wurde die Reservoirkapazität des Stratum corneum (SC) in Abhängigkeit von der Zeit. Dafür wurden die Konzentrationen der FS nach einer Stunde, nach vier Stunden und nach 21 Stunden gemessen, da diese Zeitintervalle für die dermatologische Praxis relevant erschienen.

Insgesamt wurden die Versuche an sechs Präparaten durchgeführt. An einem Ohr konnte die Haut für eine Serie, die jeweils 3 Zeitmodelle an jeweils 4 Untersuchungsmodellen entspricht, entnommen werden. Eine Stunde nach Aufbringen der Untersuchungssubstanz Flufenaminsäure, wurde das Substanzgemisch von jeder Hautprobe entfernt und die Hautproben nach einer, vier oder 21 Stunden horizontal in SC, Epidermis, Dermis und Kompartiment, Filter oder Knorpel unterteilt. In jedem dieser Schichten wurde die FS-Konzentration gemessen und auf ng/cm^2 berechnet. Anschließend wurden die Modelle miteinander verglichen und diskutiert. Eine prozentuale Verteilung in den verschiedenen Hautschichten schien angebracht, um die Umverteilung der Substanz in den Modellen einander am besten gegenüberstellen zu können.

Die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit sollten folgende Fragestellungen klären:

In welcher Weise können Druck und/oder Okklusion die Penetration beeinflussen?

Während der Untersuchungen wurde der Einfluss der Okklusion bei allen Modellen so gering wie möglich gehalten, indem die Testsubstanz stets nach einer Stunde entfernt wurde. Dennoch gab es ein Modell, bei welchem Druck und Okklusion eine deutliche Rolle spielten. Das Saarbrückenmodell ist durch den oberen Stempel und die umgebende Vaseline luftdicht abgeschlossen. Auch nach Entfernen des

Substanzgemisches spielten Okklusion und Druck bei der Umverteilung offensichtlich weiterhin eine wichtige Rolle. Es zeigten sich tatsächlich deutliche Unterschiede in den Ergebnissen zu den anderen drei Modellen, die dem Einfluss von Okklusion und Druck nicht ausgesetzt waren. So fanden sich schon nach kurzer Zeit (eine Stunde) höhere Werte der Testsubstanz in den tieferen Hautschichten und sogar darunter im Filter. Der Druck, der über den Stempel auf die Testsubstanz einwirkte, hatte dabei insofern Einfluss, als dass er das SC komprimiert, sein Reservoir dadurch herabsetzt und seine Entleerung beschleunigt.

In welchem Ausmaß reduziert die Möglichkeit der Permeation (Abfluss) die Wirkstoffkonzentration in den Hautschichten?

Eine niedrigere FS-Konzentration in den einzelnen Hautschichten mit zunehmender Einwirkungszeit bei Verwendung der Franzdiffusionszelle (FDZ) im Gegensatz zu Modellen bei denen kein Abfluss möglich ist zeigte sich sehr viel weniger ausgeprägt als anfänglich vermutet. Der stärkere Abfluss der FS aus der Epidermis und der Dermis bestätigte sich nur bei einer sehr langen Umverteilungsdauer von 21 Stunden. Einerseits könnte dies auch dadurch erklärt werden, dass die Sättigung der Dermis auch in den anderen Modellen nicht erreicht war und daher keine Behinderung für den Abfluss aus oberen Hautschichten darstellte. Andererseits kann es zeigen, dass bei zunehmender Hydratation der Dermis durch die Akzeptorflüssigkeit, die nach 21 Stunden deutlich ausgeprägt war, eine Abnahme der Speicherkapazität der Dermis hervorruft, die nach einer oder vier Stunden noch nicht so deutlich ins Gewicht fällt. Dieser mit der Zeit zunehmende Hydratationsdruck von dermalen Seite kann auch erklären, warum höhere Werte von FS im SC bei der FDZ im Gegensatz zu den anderen Modellen gefunden worden sind.

Welcher Anteil an der Barriere fällt der Epidermis zu?

Die Ergebnisse bestätigen, dass der größte Anteil an der Barriere der oberen Epidermis zufällt. Eine Barrierefunktion der Epidermis ließ sich an vielen Ergebnissen der Arbeit erkennen. Erstens zeigte der Vergleich zwischen den Modellen der Vollhaut- und der Spalthaut in der FDZ, dass dem lebenden Anteil der Epidermis und dem SC als Speicher und Reservoir die hauptsächliche Bedeutung zukommen, da die FS-Konzentrationen des SC und der Epidermis trotz Verlust großer Teile der Dermis gut übereinstimmten. Auch im Gegensatz zum Direkthautmodell (DHM) zeigte sich bei der FDZ kein verstärkter Abfluss aus dem SC trotz erweiterter

Umverteilungsmöglichkeit in die Akzeptorflüssigkeit. Bestätigt wird ebenfalls, dass die größte Penetrationsbarriere im SC liegt. Wie die Ergebnisse der FDZ deutlich zeigten, funktioniert diese Barriere in beide Richtungen, da sich Flüssigkeit unter dem SC bei permanenter Hydratation von Kompartimentseite ansammelte und die Durchführung der Abrisse dadurch behinderte.

Spielen die angeschnittenen Follikelöffnungen für die Penetration am Spalthautmodell eine Rolle?

Bei dem Modell der Spalthaut in der FDZ wurde Haut einer Stärke von 300 µm verwendet. Es wurde angenommen, dass Haarfollikel und Drüsen angeschnitten waren und wie Löcher in der Haut wirkten. Da sich schon, im Gegensatz zum Modell der Vollhaut in der FDZ, nach einer Stunde beachtliche Mengen an FS in der Akzeptorflüssigkeit wiederfinden ließen, wurde diese Vermutung bestätigt.

Welchen Einfluss hat die Akzeptorflüssigkeit durch die Hydratation der Modellhaut von dermalen Seite?

Die Akzeptorflüssigkeit zeigte durch die Hydratation der Hautprobe einen Einfluss auf die Penetrationsergebnisse. Zwar waren die FS-Konzentrationen zwischen dem Modell der Vollhaut in der FDZ und DHM erstaunlich ähnlich, jedoch fanden sich durchweg höhere Werte im Modell der Vollhaut in der FDZ im SC, welches mit dem Hydratationsdruck erklärt wurde. Eventuell fand dadurch auch ein verminderter Abfluss aus der Epidermis in die Dermis statt. Die absolute FS-Konzentration in der Epidermis und Dermis bei einer Stunde und bei vier Stunden lagen im vergleichbaren Bereich zum DHM und Saarbrückenmodell (SBM). Außerdem machte sich die Hydratation der Haut bei den SC-Abrissen bemerkbar, bei denen sich oft das gesamte SC nach wenigen Abrissen ablöste, da sich vermutlich durch die Hydratation die Kohäsionskräfte zwischen den Zellen des Stratum corneum und Stratum granulosum gelockert hatten.

Es sollte ein Vergleich der erhaltenen Daten mit menschlichen Daten in vivo erfolgen.

Dieser Vergleich wurde an menschlicher Haut in vivo und in vitro durchgeführt [Jacobi 2005, Wagner 2000, 2002b]. Die Werte in vitro waren durchgehend höher als in vivo, was mit den Ergebnissen aus anderen Studien übereinstimmt [Benech-Kieffer 2000, Schmook 2000, Wagner 2002a]. Die Konzentrationen an FS im DHM zeigten an menschlicher Haut ca. doppelt so hohe Werte zu in vivo, die des SBM waren an Schweinehaut zusätzlich erhöht. Die Entleerung des Reservoirs von FS in

vivo korreliert besonders gut mit den In-vitro-Ergebnissen des DHM. Daher zeigte sich dieses Modell am besten geeignet für die Untersuchung der Reservoirkapazität und der Umverteilung der lipophilen Substanz FS in die verschiedenen Hautschichten. Ob dies auch für hydrophile Substanzen der Fall ist, wird sich in weiteren Untersuchungen feststellen lassen.

Zusammenfassend kann man sagen, dass die Haut des Schweineohrs und die Modellschicht Flufenaminsäure gut geeignet waren, um die Reservoirkapazität des SC darzustellen. Die Umverteilung in die tieferen Schichten in den vier gewählten Modellen ließ sich gut beobachten und miteinander vergleichen. Dabei hat sich für die praktische Anwendung der vier In-vitro-Modelle gezeigt, dass sie alle denkbar sind, um die Penetration durch menschliche Haut in vivo zu simulieren. Bei der vorliegenden vergleichenden Arbeit haben sich besonders die Nachteile der FDZ durch zusätzliche Hydratation bei prolongierter Einwirkungszeit und der große Einfluss des Drucks und der Okklusion nach minimaler Einwirkungszeit beim SBM herauskristallisiert. Das DHM zeigte sich als günstiges, wenig aufwendiges und einflussgrößenarmes Modell zur Untersuchung von topisch applizierbaren Substanzen und zeigte die beste Übereinstimmung zu In-vivo-Ergebnissen.

Literaturverzeichnis

1. Albery WJ, Hadgraft J. Percutaneous absorption: in vivo experiments. *J Pharm Pharmacol* 1979; 31:140-147
2. Auton TR, Westhead DR, Woollen BH, Scott RC, Wilks MF. A physiologically based mathematical model of dermal absorption in man. *Hum Exp Toxicol* 1994; 13:51-60
3. Backhouse L, Dias M, Gorce JP, Hadgraft J, McDonald PJ, Wiechers JW. GARFiels magnetic resonance profiling of the ingress of model skin-care product ingredients into human skin in vitro. *J Pharm Sci.* 2004; 93:2274-2283
4. Barry BW. Drug delivery routes in skin: a novel approach. *Adv Drug Deliv Rev* 2002; 54:31-40 Review
5. Bartek MJ, LaBudde JA, Maibach HI. Skin permeability in vivo: Comparison in rat, rabbit, pig and man. *J Invest Dermatol* 1972; 58:114-123
6. Benech-Kieffer F, Wegrich P, Schwarzenbach R, Klecak G, Weber T, Leclaire J, Schaefer H. Percutaneous absorption of sunscreens in vitro: interspecies comparison, skin models and reproducibility aspects. *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol* 2000; 13:324-335
7. Benfeld E. In vivo microdialysis for the investigation of drug levels in the dermis and the effect of barrier perturbation on cutaneous drug penetration. *Studies in hairless rats and human subjects. Acta Derm Venerol Suppl* 1999; 206:1-59
8. Berndt U, Gabard B, Schliemann-Willers S, Wigger-Alberti W, Zitterbart D, Elsner P. Integrated skin protection from workplace irritants: a new model for efficacy assessment. *Exog Dermatol* 2002; 1:45-48
9. Bouwstra JA, Gooris GS, Bras W, Downing DT. Lipid organisation in pig stratum corneum. *J Lipid Res* 1995; 36:685-695
10. Bouwstra JA, Gooris GS, Salomons-de Vries MA, van der Spek JA, Bras W. Structure of human stratum corneum as a function of temperature and hydration: a wide angle X-ray diffraction study. *Int J Pharm* 1992; 84:205-216
11. Bouwstra JA, Gooris GS, Dubbelaar FE, Weerheim A, Ponc M. PH, cholesterol sulfate, and fatty acids affect the stratum corneum lipid organization. *J Investig Dermatol Symp Proc.* 1998; 3:69-74
12. Bouwstra JA, Honeywell-Nguyen PL, Gooris GS, Ponc M. Structure of the skin barrier and its modulation by vesicular formulations. *Prog Lipid Res* 2003; 42:1-36
13. Brain KR, Green DM, Lalko J, Api AM. In-vitro human skin penetration of the fragrance material geranyl nitrile. *Toxicol In Vitro* 2007; 21(1):133-8
14. Breternitz M, Flach M, Präbeler J, Elsner P, Fluhr JW. Acute barrier disruption by adhesive tapes is influenced by pressure, time and anatomical location: integrity and cohesion assessed by sequential tape stripping; a randomized, controlled study. *Br J Dermatol.* 2007; 156(2):231-40
15. Bronaugh RL, Stewart RF, Congdon ER. Methods for in vitro percutaneous absorption studies II. Animal models for human skin. *Toxicol Appl Pharmacol* 1982; 62:481-488
16. Bronaugh RL, Stewart RF, Simon M. Methods for in vitro percutaneous absorption studies VII: Use of excised human skin. *J Pharm Sci* 1986; 75:1094-1097
17. Buchwald P, Bodor N. A simple, predictive, structure-based skin permeability model. *J Pharm Pharmacol* 2001; 53:1087-1098 Review

18. Buchwald P. Direct, differential-equation-based in-vitro-in-vivo correlation (IVIVC) method. *J Pharm Pharmacol* 2003; 55:495-504
19. Cevc G. Lipid vesicles and other colloids as drug carriers on the skin. *Adv Drug Deliv Rev* 2004; 56:675-711 Review
20. Chambin-Remoussenard O, Treffel P, Bechtel Y, Agache P. Surface recovery and stripping methods to quantify percutaneous absorption of caffeine in humans. *J Pharm Sci* 1993; 82(11):1099-101
21. Chatelain E, Gabard B, Surber C. Skin penetration and sun protection factor of five UV filters: Effect of the vehicle. *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol* 2003; 16:28-35
22. Chilcott RP, Barai N, Beezer AE, Brain SI, Brown MB, Bunge AL, Burgess SE, Cross S, Dalton CH, Dias M, Farinha A, Finnin BC, Gallagher SJ, Green DM, Gunt H, Gwyther RL, Heard CM, Jarvis CA, Kamiyama F, Kasting GB, Ley EE, Lim ST, McNaughton GS, Morris A, Nazemi MH, Pellett MA, Du Plessis J, Quan YS, Raghavan SL, Roberts M, Romonchuk W, Roper CS, Schenk D, Simonsen L, Simpson A, Traversa BD, Trottet L, Watkinson A, Wilkinson SC, Williams FM, Yamamoto A, Hadgraft J. Inter- and intralaboratory variation of in vitro diffusion cell measurements: an international multicenter study using quasi-standardized methods and materials. *J Pharm Sci.* 2005; 94(3):632-8.
23. Choi MJ, Zhai H, Löffler H, Dreher F, Maibach HI. Effect of tape stripping on percutaneous penetration and topical vaccination. *Exog Dermatol* 2003; 2:262-269
24. Choi MJ, Maibach HI. Liposomes and niosomes as topical drug delivery systems. *Skin Pharmacol Physiol* 2005; 18:209-219
25. Clarys P, Gabard B, Barel AO. A qualitative estimate of the influence of halcinonide concentration and urea on the reservoir formation in the stratum corneum. *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol* 1999; 12:85-89
26. Coderch L, de Pera M, Perez-Cullell N, Estelrich J, de la Maza A, Parra JL. The effect of liposomes on skin barrier structure. *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol* 1999; 12:235-246
27. Cross SE, Pugh WJ, Hadgraft J, Roberts MS. Probing the effect of vehicles on topical delivery: understanding the basic relationship between solvent and solute penetration using silicone membranes. *Pharm Res* 2001; 18:999-1003
28. Curdy C, Kalia YN, Guy RH. Non-invasive assessment of the effects of iontophoresis on human skin in-vivo. *J Pharm Pharmacol* 2001; 53:769-777
29. Dias M, Hadgraft J, Raghavan SL, Tetteh J. The effect of solvent on permeant diffusion through membranes studies using ATR-FTIR and Chemometric data analysis. *J Pharm Sci* 2004; 93:186-194
30. Dick IP, Scott RC. Pig ear as an in-vitro model for human skin permeability. *J Pharm Pharmacol* 1992; 44:640-645
31. Dupuis D, Rougier A, Roquet R, Lotte C. The measurement of the stratum corneum reservoir: a simple method to predict the influence of vehicles on in vivo percutaneous absorption. *Br J Dermatol* 1986; 115:233-238
32. Edwards DA, Langer P. A linear theory of transdermal transport phenomena. *J Pharm Sci* 1994; 83:1315-1330
33. Egawa M, Hirao T, Takahashi M. In vivo estimation of stratum corneum thickness from water concentration profiles obtained with Raman spectroscopy. *Acta Derm Venereol.* 2007; 87:4-8
34. Elias PM. Stratum corneum architecture, metabolic activity and interactivity with subjacent cell layers. *Exp Dermatol* 1996; 5:191-201 Review

-
35. Elias PM; Choi EH. Interactions among stratum corneum defensive functions. *Exp Dermatol* 2005; 14:719-726 Review
 36. Essa EA, Bonner MC, Barry BW. Human skin sandwich for assessing shunt route penetration during passive and iontophoretic drug liposom delivery. *J Pharm Pharmacol* 2002; 54:1481-1490
 37. Fang JY, Hung CF, Chiu HC, Wang JJ, Chan TF. Efficacy and irritancy of enhancers on the in-vitro and in-vivo percutaneous absorption of carcumin. *J Pharm Pharmacol* 2003; 55:593-601
 38. Fartasch M, Diepgen TL. The barrier function in atopic dry skin. Disturbance of membrane-coating granule exocytosis and formation of epidermal lipid. *Acta Derm Venereol Suppl (Stockh)*. 1992; 176:26-31
 39. Fartasch M, Bassukas ID, Diepgen TL. Structural relationship between epidermal lipid lamellae, lamellar bodies and desmosomes in human epidermis: an ultrastructural study. *Br J Dermatol* 1993; 128(1):1-9
 40. Fartasch M. Ultrastructure of the epidermal barrier after irritation. *Microsc Res Tech* 1997; 37(3):193-9
 41. Fartasch M. Epidermal barrier in disorder of the skin. *Microsc Res Tech* 1997; 38(4):361-72
 42. Feldmann RJ, Maibach HI. Absorption of some organic compounds through the skin in man. *J Invest Dermatol* 1970; 54:399-404
 43. Fluhr JW, Lazzerini S, Distante F, Gloor M, Berardesca E. Effects of prolonged occlusion on stratum corneum barrier function and water holding capacity. *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol* 1999; 12:193-198
 44. Franz TJ, Lehman PA, Franz SF, North-Root H, Demetrulias JL, Kelling CK, Moloney SJ, Gettings SD. Percutaneous penetration of N-nitrosodiethanolamine through human skin (in vitro): Comparison of finite and infinite dose application from cosmetic vehicles. *Fundam Appl Toxicol* 1993; 21:213-221
 45. Frasch HF. A random walk model of skin permeation. *Risk Anal* 2002; 22(2):265-76
 46. Goodman M, Barry BW. Action of penetration enhancers on human skin as assessed by the permeation of model drugs 5-fluorouracil and estradiol. I. Infinite dose technique. *J Invest Dermatol* 1988; 91(4):323-7
 47. Golden GM, Guzek DB, Harris RR, McKie JE, Potts RO. Lipid thermotropic transition in human stratum corneum. *J Invest Dermatol* 1986; 86:255-259
 48. Guy RH, Carlstroem EM, Bucks DA, Hinz RS, Maibach HI. Percutaneous penetration of nicotines: In vivo and in vitro measurements. *J Pharm Sci* 1986; 75:968-972
 49. Hadgraft J. Modulation of the barrier function of the skin. *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol* 2001; 14:72-81 Review
 50. Hadgraft J. Skin deep. *Eur J Pharm Biopharm* 2004; 58:291-299 Review
 51. Hadgraft J, Lane ME. Skin permeation: the years of enlightenment. *Int J Pharm* 2005; 305:2-12
 52. Hansen S, Henning A, Naegel A, Heisig M, Wittum G, Neumann D, Kostka KH, Zbytovska J, Lehr CM, Schaefer UF. In-silico model of skin penetration based on experimentally determined input parameters. Part I: experimental determination of partition and diffusion coefficients. *Eur J Pharm Biopharm* 2008; 68(2):352-67
 53. Hansen S, Naegel A, Heisig M, Wittum G, Neumann D, Kostka KH, Meiers P, Lehr CM, Schaefer UF. The role of corneocytes in skin transport revised - a combined computational and experimental approach. *Pharm Res* 2009; 26(6):1379-97

54. Harada K, Murakami T, Yata N, Yamamoto S. Role of intercellular lipids in stratum corneum in the percutaneous permeation of drugs. *J Invest Dermatol* 1992; 99:278-282
55. Harrison SM, Barry BW, Dugard PH. Effects of freezing on human skin permeability. *J Pharm Pharmacol* 1984; 36:261-262
56. Henning A, Neumann D, Kostka KH, Lehr CM, Schaefer UF. Influence of human skin specimens consisting of different skin layers on the result of in vitro permeation experiments. *Skin Pharmacol Physiol* 2008; 21:81-88
57. Herai H, Gratieri T, Thomazine JA, Bentley MV, Lopez RF. Doxorubicin skin penetration from monoolein-containing propylene glycol formulations. *Int J Pharm* 2007; 329(1-2):88-93
58. Holbrook KA, Odland GF. Regional differences in the thickness (cell layers) of the human stratum corneum: an ultrastructural analysis. *J Invest Dermatol* 1974; 62(4):415-22
59. Holland JM, Kao JY, Whitaker MJ. A multisample apparatus for kinetic evaluation of skin penetration in vitro: The influence of viability and metabolic status of the skin. *Toxicol Appl Pharmacol* 1984; 72:272-280
60. Hueber F, Schaefer H, Wepierre J. Role of transepidermal and transfollicular routes in percutaneous absorption of steroids: in vitro studies on human skin. *Skin Pharmacol* 1994; 7:237-244
61. Indans I. The use and interpretation of in vitro data in regulatory toxicology: cosmetics, toiletries and household products. *Toxicol Lett* 2002; 127:177-182
62. Jacobi U, Weigmann HJ, Baumann M, Reiche AI, Sterry W. Lateral spreading of topically applied UV filter substances investigated by tape stripping. *Skin Pharmacol Physiol* 2004; 17:17-22
63. Jacobi U, Wilken K, Tribus S, Schaefer H, Sterry W, Lademann J, Worm M. Penetration von Pollenallergenen durch die Haut - Entwicklung einer neuen Nachweismethode. *Akt Dermatol* 2003; 29:202-205
64. Jacobi U, Taube H, Schäfer UF, Sterry W, Lademann J. Comparison of four different in vitro systems to study the reservoir capacity of the stratum corneum. *J Control Release* 2005; 103:61-71
65. Jacobi U, Kaiser M, Mangelsdorf S, Audring H, Otberg N, Sterry W, Lademann J. Porcine ear skin: an in vitro model for human skin. *Skin Res Technol* 2007; 13(1):19-24
66. Jakasa I, Verberk MM, Esposito M, Bos JD, Kezic S. Altered penetration of polyethylene glycols into uninvolved skin of atopic dermatitis patients. *J Invest Dermatol* 2007; 127:129-134
67. Jamouille JC, Grandjean L, Lamaud E, Shroot B, Schaefer BH. Follicular penetration and distribution of topically applied CD 271, a new naphthoic acid derivative intended for topical acne treatment. *J Invest Dermatol* 1990; 94(5):731-2
68. Jennemann R, Sandhoff R, Langbein L, Kaden S, Rothermel U, Gallala H, Sandhoff K, Wiegandt H, Grone HJ. Integrity and barrier function of the epidermis critically depend on glucosylceramide synthesis. *J Biol Chem* 2007; 282:3083-94
69. Kaca M, Bock U, Tawfik Jalal M, Harms M, Hoffmann C, Müller-Goymann C, Netzlaff F, Schäfer U, Lehr CM, Haltner-Ukomadu E. The physicochemical parameters of marker compounds and vehicles for use in in vitro percutaneous absorption studies. *Altern Lab Anim*. 2008; 36:189-200
70. Kalbitz J, Neubert R, Wohlrab W. Modulation of drug penetration in the skin. *Pharmazie* 1996; 51:619-637

71. Kalia YN, Pirot F, Guy RH. Homogenous transport in a heterogenous membran: water diffusion across stratum corneum in vivo. *Biophys J* 1996; 71:2692-2700
72. Kimura T, Nagahara N, Hirabayashi K, Kurosaki Y, Nakayama T. Enhanced percutaneous penetration of flufenamic acid using lipid disperse systems containing glycosylceramides. *Chem Pharm Bull* 1989; 37:454-457
73. King CS, Barton SP, Nicholls S, Marks R. The change in properties of the stratum corneum as a function of depth. *Br J Dermatol* 1979; 100:165-172
74. Kurosaki Y, Nagahara N, Tanizawa T, Nishimura H, Nakayama T, Kimura T. Use of lipid disperse systems in transdermal drug delivery: Comparative study of flufenamic acid permeation among rat abdominal skin, silicon rubber membran and stratum corneum sheet isolated from hamster cheek pouch. *Int J Pharm* 1991; 67:1-9
75. Lademann J, Weigmann H, Rickmeyer C, Barthelmes H, Schaefer H, Mueller G, Sterry W. Penetration of titanium dioxide microparticles in a sunscreen formulation into the horny layer and the follikular orifice. *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol* 1999; 12:247-256
76. Lademann J, Otberg N, Richter H, Weigmann HJ, Lindemann U, Schaefer H, Sterry W. Investigation of follicular penetration of topically applied substances. *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol* 2001; 14:17-22
77. Lademann J, Schaefer H, Otberg N, Teichmann A, Blume-Peytavi U, Sterry W. Penetration von Mikropartikeln in die menschliche Haut. *Hautarzt*. 2004; 55:1117-9
78. Lademann J, Otberg N, Jacobi U, Hoffmann RM, Blume-Peytavi U. Follicular penetration and targeting. *J Investig Dermatol Symp Proc* 2005a; 10:301-303
79. Lademann J, Weigmann HJ, Schanzer S, Richter H, Audring H, Antoniou C, Tsirikas G, Gers-Barlag H, Sterry W. Optical investigations to avoid the disturbing influences of furrows and wrinkles quantifying penetration of drugs and cosmetics into the skin by tape stripping. *J Biomed Opt* 2005b; 10:054015
80. Lademann J, Ilgevicus A, Zurbau O, Liess HD, Schanzer S, Weigmann HJ, Antoniou C, Pelchrzim RV, Sterry W. Penetration studies of topically applied substances: Optical determination of the amount of stratum corneum removed by tape stripping. *J Biomed Opt* 2006; 11(5): 054026
81. Lademann J, Richter H, Schaefer UF, Blume-Peytavi U, Teichmann A, Otberg N, Sterry W. Hair follicles – a long term reservoir for drug delivery. *Skin Pharmacol Physiol* 2006; 19(4):232-6
82. de Lange J, van Eck P, Elliott GR, de Kort WLAM, Wolthuis OL. The isolated blood perfused pig ear: an inexpensive and animal-saving model for skin penetration studies. *J Pharmacol Toxicol Methods* 1992; 27:71-77
83. Leveque N, Makki S, Hadgraft J; Humbert P. Comparison of Franz cells and microdialysis for assessing salicylic acid penetration through human skin. *Int J Pharm* 2004; 269:323-328
84. Leveque N, Raghavan SL, Lane ME, Hadgraft J. Use of a molecular form technique for the penetration of supersaturated solutions of salicylic acis across silicone membranes and human skin in vitro. *Int J Pharm* 2006; 318(1-2):49-54
85. Lieb LM, Liimatta AP, Bryan RN, Brown BD, Krueger GG. Description of the intrafollicular delivery of large molecular weight molecules to follicles of human scalp skin in vitro. *J Pharm Sci* 1997; 86(9):1022-9
86. Lindemann U, Weigmann HJ, Schaefer H, Sterry W, Lademann J. Evaluation of the pseudo-absorption method to quantify human stratum corneum removed by tape stripping using the protein absorption. *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol* 2003; 16:228-236

-
87. Lopez VC, Hadgraft J, Snowden MJ. The use of colloidal microgels as a (trans)dermal drug delivery system. *Int J Pharm* 2005; 292:137-147
 88. Lotte C, Rougier A, Wilson DR, Maibach HI. In vivo relationship between transepidermal water loss and percutaneous penetration of some organic compounds in man: effect of anatomic site. *Arch Dermatol Res* 1987; 279:351-156
 89. Lotte C, Wester RC, Rougier A, Maibach HI. Racial differences in the in vivo percutaneous absorption of some organic compounds: a comparison between black, Caucasian and Asian subjects. *Arch Dermatol Res* 1993; 284(8):456-459
 90. Luengo J, Weiss B, Schneider M, Ehlers A, Stracke F, König K, Kostka KH, Lehr CM, Schaefer UF. Influence of nanoencapsulation on human skin transport of flufenamic acid. *Skin Pharmacol Physiol* 2006; 19(4):190-7
 91. El Maghraby GM, Williams AC, Barry BW. Skin hydration and possible shunt route penetration in controlled estradiol delivery from ultradeformable and standard liposomes. *J Pharm Pharmacol*. 2001; 53(10):1311-22
 92. Maibach HI, Feldman RJ, Milby TH, Serat WF. Regional variations in percutaneous penetration in man. *Arch Environ Health* 1971; 23:208-211
 93. Marionnet C, Bernerd F, Dumas A, Verrecchia F, Mollier K, Compan D, Bernard B, Lahfa M, Leclaire J, Medaiko C, Mehul B, Seité S, Mauviel A, Dubertret L. Modulation of gene expression induced in human epidermis by environmental stress in vivo. *J Invest Dermatol* 2003; 121(6):1447-58
 94. Marks R. The stratum corneum barrier: the final frontier. *J Nutr* 2004; 134: 2017S-2021S. Review
 95. Marks R, Dawber RP. Skin surface biopsy: An improved technique for the examination of the horny layer. *Br J Dermatol* 1971; 84:117-123
 96. Mavon A, Miquel C, Lejeune O, Payre B, Moretto P. In vitro percutaneous absorption and in vivo stratum corneum distribution of an organic and mineral sunscreen. *Skin Pharmacol Physiol* 2007; 20(1):10-20
 97. Melero A, Garrigues TM, Almudever P, Villodre AM, Lehr CM, Schäfer U. Nortriptyline hydrochloride skin absorption: development of a transdermal patch. *Eur J Pharm Biopharm* 2008; 69(2):588-96
 98. Meyer W. Bemerkungen zur Eignung der Schweinehaut als biologisches Modell für die Haut des Menschen. *Hautarzt* 1996; 47:178-182
 99. Meyer W, Zschemisch NH. Die Hautschichtdicken am Ohr des Hausschweins, mit besonderer Berücksichtigung der Nutzung des Ohrinteguments in der humandermatologischen Forschung. *Berl Munch Tierarztl Wschr* 2002; 115:401-406
 100. Meyer W, Zschemisch NH, Neurand K. Untersuchungen zur Struktur der Ohrhaut beim Hausschwein, unter besonderer Berücksichtigung einer Verwendung in der humandermatologischen Forschung: 1. Makroskopische Aspekte und Haarkleid. *Berl Munch Tierarztl Wschr* 2001a; 114:92-99
 101. Meyer W, Zschemisch NH, Godynicki S, Neurand K. Untersuchungen zur Struktur der Ohrhaut beim Hausschwein, unter besonderer Berücksichtigung einer Verwendung in der humandermatologischen Forschung: 2. Spezielle Histologie des Integuments. *Berl Munch Tierarztl Wschr* 2001b; 114:100-11
 102. Monteiro-Riviere NA, Bristol DG, Manning TO, Rogers RA, Riviere JE. Interspecies and interregional analysis of the comparative histologic thickness and laser doppler blood flow measurement at five cutaneous sites in nine species. *J Invest Dermatol* 1990; 95:582-586

-
103. Moore PN, Puvvada S, Blankschtein D. Challenging the surfactant monomer skin penetration model: penetration of sodium dodecyl sulfate micelles into the epidermis. *J Cosmet Sci* 2003; 54:29-46
 104. Mueller B, Anissimov YG, Roberts MS. Unexpected clobetasol propionate profile in human stratum corneum after topical application in vitro. *Pharm Res* 2003; 20:1835-1837
 105. Naegel A, Hansen S, Neumann D, Lehr CM, Schaefer UF, Wittum G, Heising M. In-silico model of skin penetration based on experimentally determined input parameters Part II mathematical modelling of in-vitro diffusion experiments. Identification of critical input parameters. *Eur J Pharm Biopharm* 2008; 68:368-79
 106. Netzlaff F, Lehr CM, Wertz PW, Schaefer UF. The human epidermis models EpiSkin, SkinEthic and EpiDerm: an evaluation of morphology and their suitability for testing phototoxicity, irritancy, corrosivity, and substance transport. *Eur J Pharm Biopharm* 2005; 60:167-78
 107. Netzlaff F, Kostka KH, Lehr CM, Schaefer UF. TEWL measurements as a routine method for evaluating the integrity of epidermis sheets in static Franz type diffusion cells in vitro. Limitations shown by transport data testing. *Eur J Pharm Biopharm* 2006a; 63(1):44-50
 108. Netzlaff F, Schaefer UF, Lehr CM, Meiers P, Stahl J, Kiezmann M, Niedorf F. Comparison of bovine udder skin with human and porcine skin in percutaneous permeation experiments. *Altern Lab Anim* 2006b; 34:499-513
 109. Netzlaff F, Kaca M, Bock U, Haltner-Ukomadu E, Meiers P, Lehr CM, Schaefer UF. Permeability of the reconstructed human epidermis model EpiSkin in comparison to various human skin preparations. *Eur J Pharm Biopharm* 2007; 66:127-34
 110. Öhman H, Vahlquist A. In vivo studies concerning a pH gradient in human stratum corneum and upper epidermis. *Acta Derm Venereol* 1994; 74:375-9
 111. 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; 122:14-19
 112. Panchagnula R, Stemmer K, Ritschel WA. Animal models for transdermal drug delivery. *Methods Find Exp Clin Pharmacol* 1997; 19:335-341
 113. Pershing LK. New approaches to assess topical corticosteroid bioequivalence: pharmacokinetic evaluation. *Int J Dermatol*. 1992; 31:14-20
 114. Pirot F, Kalia YN, Stinchcomb AL, Keating G, Bunge A, Guy RH. Characterisation of the permeability barrier of human skin in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; 94:1562-1567
 115. Pongjanyakul T, Prakongpan S, Panomsuk S, Puttipipatkachorn S, Priprem A. Shed king cobra and cobra skins as model membranes for in-vitro nicotine permeation studies. *J Pharm Pharmacol* 2002; 54:1345-1350
 116. Regnier M, Caron D, Reichert U, Schaefer H. Barrier function of human skin and human reconstructed epidermis. *J Pharm Sci* 1993; 82:404-407
 117. Reymermier C, Guezennec A, Branka JE, Guesnet J, Perrier E. In vitro stimulation of synthesis of key DEJ constituents in a reconstructed skin model: a quantitative study. *Int J Cosm Sci* 2003; 25:55-62
 118. Rigg PC, Barry BW. Shed snake skin and hairless mouse skin as model membranes for human skin during permeation studies. *J Invest Dermatol* 1990; 94(2):235-40
 119. Ring J, Fröhlich HH. *Wirkstoffe in der dermatologischen Therapie*. Springer Verlag Berlin Heidelberg New York Tokyo, 1985
 120. Riviere JE, Monteiro-Riviere NA. The isolated perfused porcine skin flap as an in-vitro model for cutaneous toxicology. *Crit Rev Toxicol* 1991; 21:329-344

121. Rosado C, Rodrigues LM. In vivo studies of the physiological impact of stratum corneum sampling methods. *Int J Cosmet Sci* 2003a; 25:37-44
122. Rosado C, Cross SE, Pugh WJ, Roberts MS, Hadgraft J. Effect of vehicle pretreatment on the flux, retention, and diffusion of topically applied penetrants in vitro. *Pharm Res* 2003b; 20:1502-1507
123. Rougier A, Dupuis D, Lotte C, Schaefer H. In vivo correlation between stratum corneum reservoir function and percutaneous absorption. *J Invest Dermatol* 1983; 81:275-278
124. Rougier A, Lotte C, Maibach HI. In vivo percutaneous penetration of some organic compounds related to anatomic sites in humans: Predictive assessments by the stripping method. *J Pharm Sci* 1987; 76:451-455
125. Schaefer H, Stüttgen G, Zesch A, Schalla W, Gazith J. Quantitative determination of percutaneous absorption of radiolabeled drugs in vitro and in vivo by human skin. *Curr Probl Dermatol* 1978; 7:80-94
126. Schaefer H, Redelmeier TE. In: *Skin Barrier: Principles of Percutaneous Absorption*, S. Karger AG, Basel, 1996: 134-136
127. Schaefer H, Lademann J. The role of follicular penetration. A differential view. *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol* 2001; 14:23-27 Review
128. Schäfer P, Bewick-Sonntag C, Capri MG, Berardesca E. Physiological changes in skin barrier function in relation to occlusion level, exposure time and climatic conditions. *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol* 2002; 15:7-19
129. Schäfer-Korting M, Bock U, Gamer A, Haberland A, Haltner-Ukomadu E, Kaca M, Kamp H, Kietzmann M, Korting HC, Krächter HU, Lehr CM, Liebsch M, Mehling A, Netzlaff F, Niedorf F, Rübhelke MK, Schäfer U, Schmidt E, Schreiber S, Schröder KR, Spielmann H, Vuia A. Reconstructed human epidermis for skin absorption testing: results of the German prevalidation study. *Altern Lab Anim* 2006; 34:283-94
130. Schäfer-Korting M, Mahmoud A, Lombardi Borgia S, Brüggner B, Kleuser B, Schreiber S, Mehnert W. Reconstructed epidermis and full-thickness skin for absorption testing: influence of the vehicles used on steroid permeation. *Altern Lab Anim* 2008a; 36(4):441-52
131. Schäfer-Korting M, Bock U, Diembeck W, Düsing HJ, Gamer A, Haltner-Ukomadu E, Hoffmann C, Kaca M, Kamp H, Kersen S, Kietzmann M, Korting HC, Krächter HU, Lehr CM, Liebsch M, Mehling A, Müller-Goymann C, Netzlaff F, Niedorf F, Rübhelke MK, Schäfer U, Schmidt E, Schreiber S, Spielmann H, Vuia A, Weimer M. The use of reconstructed human epidermis for skin absorption testing: Results of the validation study. *Altern Lab Anim* 2008; 36(2):161-87
132. Schmook FP, Meingassner JG, Billich A. Comparison of human skin or epidermal models with human and animal skin in in-vitro percutaneous absorption. *Int J Pharm* 2001; 215 (1-2):51-56
133. Schnetz E, Fartasch M. Microdialysis for the evaluation of penetration through the human skin barrier - a promising tool for future research? *Eur J Pharm Sci* 2001; 12:165-174 Review
134. Schwarb FP, Gabard B, Rufli T, Surber C. Percutaneous absorption of salicylic acid in man after topical administration of three different formulations. *Dermatology* 1999; 198:44-51
135. Scott RC, Rhodes C. The permeability of grafted human transplant skin in athymic mice. *J Pharm Pharmacol* 1988; 40:128-129
136. Scott RC, Corrigan MA, Smith F, Mason H. The influence of skin structure on permeability: an intersite and interspecies comparison with hydrophilic penetrants. *J Invest Dermatol* 1991; 96(6):921-5

-
137. Sekkat N, Kalia YN, Guy RH. Biophysical study of porcine ear skin in vitro and its comparison to human skin in vivo. *J Pharm Sci* 2002; 91:2376-2381
 138. Shah VP, Flynn GL, Guy RH, Maibach HI, Schaefer H, Skelly JP, Wester RC, Yacobi A. In vivo percutaneous penetration/absorption. *Pharm Res* 1991; 8:1071-1075
 139. Simon GA, Maibach HI. Relevance of hairless mouse as an experimental model of percutaneous penetration in man. *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol* 1998; 13:229-234 Review
 140. Stinchcomb AL, Valiveti S, Hammell DC, Ramsey DR. Human skin permeation of Δ^8 -tetrahydrocannabinol, cannabidiol and cannabinol. *J Pharm Pharmacol* 2004; 56:291-297
 141. Stoughton RB. Dimethylsulfoxide (DMSO) induction of a steroid reservoir in human skin. *Arch Dermatol* 1965; 91:657-60
 142. Surber C, Smith EW. The mystical effects of dermatological vehicles. *Dermatology* 2005; 210:157-168 Review
 143. Suzuki A, Yamaguchi T, Kawasaki K, Hase T, Tokimitsu I. α -Monoisostearyl glyceryl ether enhances percutaneous penetration of indometacin in-vivo. *J Pharm Pharmacol* 2002; 54:1601-1607
 144. Sznitowska M, Janicki S, Baczek A. Studies on the effect of pH on the lipoidal route of penetration across stratum corneum. *J Control Release* 2001; 76:327-335
 145. Tagami H, Kanamaru Y, Inoue K, Suehisa S, Inoue F, Iwatsuki K, Yoshikuni K, Yamada M. Water sorption-desorption test of the skin in vivo for functional assessment of the stratum corneum. *J Invest Dermatol* 1982; 78:425-428
 146. Takahashi K, Rytting JH. Novel approaching to improve permeation of ondansetron across shed snake skin as a model membrane. *J Pharm Pharmacol* 2001; 53:789-794
 147. Teichmann A, Jakobi U, Weigmann HJ, Sterry W, Lademann J. Reservoir function of the stratum corneum: development of an in vivo method to quantitatively determine the stratum corneum reservoir for topically applied substances. *Skin Pharmacol Physiol* 2005; 18:75-80
 148. Teichmann A, Pissavini M, Ferrero L, Dehais A, Zastrow L, Richter H, Lademann J. Investigation of the homogeneity of the distribution of sunscreen formulations on the human skin: characterization and comparison of two different methods. *J Biomed Opt* 2006; 11(6):064005
 149. Tenjarla SN, Kasina R, Puranajoti P, Omar MS, Harris WT. Synthesis and evaluation of N-acetylproline esters - Novel skin penetration enhancers. *Int J Pharm* 1999; 192:147-158
 150. Thews G, E. Mutschler, P. Vaupel In: *Anatomie, Physiologie, Pathophysiologie des Menschen*, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart 1999:40-44
 151. Toll R, Jacobi U, Richter H, Lademann J, Schaefer H, Blume-Peytavi U. Penetration profil of microspheres in follicular targeting of terminal hair follicles. *J Invest Dermatol* 2004; 123:168-176
 152. Treffel P, Muret P, Muret-D'Aniello P, Coumes-Marquet S, Agache P. Effect of occlusion on in vitro percutaneous absorption of two compounds with different physiochemical properties. *Skin Pharmacol* 1992; 5:108-113
 153. van der Valk PG, Maibach HI. A functional study of the skin barrier to evaporative water loss by means of repeated cellophane-tape stripping. *Clin Exp Dermatol* 1990; 15(3):180-2
 154. Vickers CF. Existence of reservoir in the stratum corneum. Experimental Proof. *Arch Dermatol* 1963; 88:20-3
 155. Vickers CF. Stratum corneum reservoir for drugs; *Adv Biol Skin* 1972; 12:177-89 Review

-
156. Wagner H, Kostka KH, Lehr CM, Schaefer UF. Drug distribution in human skin using two different in vitro test systems: comparison with in vivo data. *Pharm Res* 2000; 17:1475-1481
 157. Wagner H, Kostka KH, Lehr CM, Schaefer UF. Interrelation of permeation and penetration parameters obtained from in vitro experiments with human skin and skin equivalents. *J Control Release* 2001; 75:283-295
 158. Wagner H, Kostka KH, Lehr CM, Schaefer UF. Correlation between stratum corneum/water-partition coefficient and amounts of flufenamic acid penetrated into the stratum corneum. *J Pharm Sci* 2002b; 91(8):1915-21
 159. Wagner H, Kostka KH, Lehr CM, Schaefer UF. Human skin penetration of flufenamic acid: in vivo/in vitro correlation (deeper skin layers) for skin samples from the same subject. *J Invest Dermatol* 2002a; 118(3):540-4
 160. Wagner H, Kostka KH, Lehr CM, Schaefer UF. PH profiles in human skin: influence of two in vitro test systems for drug delivery testing. *Eur J Pharm Biopharm* 2003; 55:57-65
 161. Wagner H, Kostka KH, Adelhardt W, Schaefer UF. Effects of various vehicles on the penetration of flufenamic acid into human skin. *Eur J Pharm Biopharm* 2004; 58:121-9
 162. Wagner S, Merfort I. Skin penetration behaviour of sesquiterpene lactones from different Arnica preparations using a validated GC-MSD method, *J Pharm Biomed Anal* 2007; 43:32-38
 163. Weigmann H, Lademann J, Meffert H, Schaefer H, Sterry W. Determination of the horny layer profile by tape stripping in combination with optical spectroscopy in the visible range as a prerequisite to quantify percutaneous absorption. *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol* 1999; 12:34-45
 164. Weigmann H, Lademann J, Schanzer S, Lindemann U, von Pelchrzim R, Schaefer H, Sterry W, Shah V. Correlation of the local distribution of topically applied substances inside the stratum corneum determined by tape-stripping to differences in bioavailability. *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol* 2001; 14(suppl 1):98-102
 165. Weigmann HJ, Lindemann U, Antoniou C, Tsikrikas GN, Stratigos AI, Katsambas A, Sterry W, Lademann J. UV/VIS absorbance allows rapid, accurate and reproducible mass determination of corneocytes removed by tape stripping. *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol* 2003; 16:217-227
 166. Weigmann HJ, Ulrich J, Schanzer S, Jacobi U, Schaefer H, Sterry W, Lademann J. Comparison of transepidermal water loss and spectroscopic absorbance to quantify changes of the stratum corneum after tape stripping. *Skin Pharmacol Physiol* 2005; 18:180-185
 167. Williams AC, Barry BW. Penetration enhancers. *Adv Drug Delivery Rev* 2004; 56:603-618 Review
 168. Wohlrab W, Lasch J, Taube KM, Wozniak KD. Skin permeation of liposomal incorporated hydrocortisone. *Pharmazie* 1989; 44(5):333-5
 169. Yosipovitch G, Meredith G, Chan YH, Goh CL. Do ethnicity and gender have an impact in pain thresholds in minor dermatologic procedures? A study on thermal pain perception thresholds in Asian ethnic groups. *Skin Res Technol* 2004; 10:38-42
 170. Zghoul N, Fuchs R, Lehr CM, Schaefer U. Reconstructed skin equivalents for assessing percutaneous drug absorption from pharmaceutical formulations. *ALTEX* 2001; 18:103-106
 171. Zhai H, Maibach HI. Effects of skin occlusion on percutaneous absorption: an overview. *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol* 2001; 14:1-10
 172. Zurdo Schroeder I, Franke P, Schaefer UF, Lehr CM. Delivery of ethinylestradiol from film forming polymeric solutions across human epidermis in vitro and in vivo in pigs. *J Control Release* 2007; 118:196-203

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung des Saarbrückenmodells vor und nach Auftragen der Testsubstanz (FS) in Wollwachs	36
Abbildung 2: Schematische Darstellung der Franz-Diffusionszelle	38
Abbildung 3: Schematische Darstellung der Messabfolge	41
Abbildung 4: Saarbrückenmodell. Relative Verteilung der FS-Konzentrationen (Mittelwerte \pm SD) in SC, DSL (tiefere Hautschichten), Filter nach verschiedenen Einwirkungszeiten (1h, 4h und 21h).	44
Abbildung 5: Saarbrückenmodell. Korrelation der absoluten FS-Konzentrationen von SC und DSL mit Regressionsgleichung.	45
Abbildung 6: Direkthautmodell. Relative Verteilung der FS-Konzentrationen (Mittelwerte \pm SD) in SC, DSL (tiefere Hautschichten), Knorpel nach verschiedenen Einwirkungszeiten (1h, 4h und 21h).	47
Abbildung 7: Direkthautmodell. Korrelation der absoluten FS-Konzentrationen von SC und DSL mit Regressionsgleichung.	48
Abbildung 8: Modell der Vollhaut in der Franz-Diffusionszelle. Relative Verteilung der FS-Konzentrationen (Mittelwerte \pm SD) in SC, DSL (tiefere Hautschichten), Akzeptorflüssigkeit nach verschiedenen Einwirkungszeiten (1 Stunde, 4 Stunden und 21 Stunden).	50
Abbildung 9: Modell der Vollhaut in der Franz-Diffusionszelle. Korrelation der absoluten FS-Konzentrationen von SC und DSL mit Regressionsgleichung.	51
Abbildung 10: Modell der Spalthaut in der Franz-Diffusionszelle. Relative Verteilung der FS-Konzentrationen (Mittelwerte \pm SD) in SC, DSL (tiefere Hautschichten), Akzeptorflüssigkeit nach verschiedenen Einwirkungszeiten (1h, 4h und 21h).	53
Abbildung 11: Modell der Spalthaut in der Franz-Diffusionszelle. Korrelation der absoluten FS-Konzentrationen von SC und DSL mit Regressionsgleichung.	53

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Saarbrückenmodell. Absolute Konzentration (Mittelwert \pm SD) von FS in ng/cm^3 in unterschiedlichen Hautschichten und Filter nach verschiedenen Einwirkungszeiten.	43
Tabelle 2: Saarbrückenmodell. Vergleich von Mittelwert (MW) mit Median bei einer, vier und 21 Stunden Einwirkungszeit in ng/cm^3 .	44
Tabelle 3: Direkthautmodell. Absolute Konzentration (Mittelwert \pm SD) von FS in ng/cm^3 in unterschiedlichen Hautschichten und Knorpel nach verschiedenen Einwirkungszeiten.	46
Tabelle 4: Direkthautmodell. Vergleich von Mittelwert (MW) und Median bei einer, vier und 21 Stunden Einwirkungszeit in ng/cm^3 .	46
Tabelle 5: Modell der Vollhaut in der Franz-Diffusionszelle. Absolute Konzentration (Mittelwert \pm SD) von FS in ng/cm^3 in unterschiedlichen Hautschichten und Akzeptorflüssigkeit nach verschiedenen Einwirkungszeiten.	49
Tabelle 6: Modell der Vollhaut in der Franz-Diffusionszelle. Vergleich von Mittelwert (MW) und Median bei einer, vier und 21 Stunden Einwirkungszeit in ng/cm^3 . Komp. = Kompartment	49
Tabelle 7: Modell der Spalthaut in der Franz-Diffusionszelle. Absolute Konzentration (Mittelwert \pm SD) von FS in ng/cm^3 in unterschiedlichen Hautschichten und Akzeptorflüssigkeit nach verschiedenen Einwirkungszeiten.	52
Tabelle 8: Modell der Spalthaut in der Franzdiffusionszelle. Vergleich von Mittelwert (MW) mit Median bei einer, vier und 21 Stunden in ng/cm^3 . Komp. = Kompartment	52
Tabelle 9: Signifikanzprüfung der FS-Konzentration nach einer Stunde im SC .	54
Tabelle 10: Signifikanzprüfung der FS-Konzentrationen nach 21 Stunden im SC	55
Tabelle 11: Signifikanzprüfung der FS-Konzentration nach einer Stunde in den tieferen Hautschichten (DSL).	55
Tabelle 12: Signifikanzprüfung der FS-Konzentrationen nach 21 Stunden in den tieferen Hautschichten (DSL)	55
Tab. 13: Vergleich der vier Untersuchungsmodelle auf Speicherfähigkeit der verschiedenen Hautschichten, Kosten, Praktikabilität und Aufwand, Schwierigkeiten und Beeinflussung der Penetration, sowie Vergleichbarkeit mit Daten von menschlicher Haut in vivo.	77

Publikationen

U. Jacobi, H. Taube, U.F. Schäfer, W. Sterry, J. Lademann; Comparison of four different in vitro systems to study the reservoir capacity of the stratum corneum; Journal of Controlled Release 2005; 103: 61-71

Lebenslauf

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

Erklärung

„Ich, Helen Taube, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Die Reservoirkapazität des Stratum corneum – ein Vergleich von vier Methoden in vitro“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Berlin, 19.05.2010

Danksagung

Hiermit danke ich meinem Doktorvater Prof. Lademann für seine umfangreiche und stets persönliche Betreuung bei der Erstellung dieser Arbeit, sowie Ute Jacobi für ihre engagierte Beratung und kompetente Hilfe in allen Fragen.

Ganz besonders möchte ich auch Dr. UF Schäfer aus Saarbrücken Dank sagen für die freundliche und hilfsbereite Zusammenarbeit.

Darüber hinaus danke ich dem gesamten Team der Abteilung für Hautphysiologie der Charité für die schöne und angenehme Zeit und die Unterstützung.

Herzlichen Dank auch meinen Eltern und Carsten, die mir in jeder Situation mit Zeit und Beratung zur Seite standen und ohne die diese Arbeit nie möglich gewesen wäre.