

Material und Methodik

Im folgenden Abschnitt werden verwendete Chemikalien und Gerätschaften, die Versuchsdurchführung sowie das Vorgehen bei der Auswertung der gewonnenen Informationen detailliert geschildert.

3.1 Testsubstanzen und Formulierungen

Folgende Bedingungen wurden bei der Auswahl der Testsubstanzen gestellt:

- der Ausschluss eines gesundheitlichen Gefährdungspotentials für die Probanden bei topischer Applikation
- eindeutige Absorptionsmaxima im UV/VIS-Spektrum zwecks Quantifizierung
- Fluoreszenz hinsichtlich einer in-vivo-Detektion mittels konfokaler Laser-Scan-Mikroskopie
- eine hydrophile Substanz sowie eine lipophile Substanz

3.1.1 Curcumin

Curcumin ($C_{21}H_{20}O_6$; MW = 368,4) ist der Farbstoff der Gelbwurzelgewächse *Curcuma xanthorrhiza* und *Curcuma domestica*. Es ist ein wichtiger Bestandteil des indischen Curry und wird als Lebensmittelfarbe bei Gebäck, Kartoffelflocken, Margarine, Senf, aber auch als Farbstoff für Salben verwendet.

Die Verwendung des lipophilen Curcumin bot sich an, da dieses quantum satis als Lebensmittelzusatzstoff mit der Nummer E 100 verwendet wird und folglich gefahrlos auf die Haut aufgetragen werden kann. Zudem eignet sich Curcumin aufgrund seiner spektralen Eigenschaften. Das Absorptionsmaximum liegt bei einer Wellenlänge von 421 nm (siehe Abbildung 10) und ermöglicht eine einfache Detektion mittels UV-/VIS-Spektroskopie. Nach Anregung mit Licht bei einer Wellenlänge von 488 nm (die vom Absorptionsmaximum abweichende Wellenlänge ergibt sich aufgrund der Verwendung eines Argon-Lasers) kann mittels Laser-Scan-Mikroskopie eine deutliche Fluoreszenz im Bereich von 500 bis 640 nm bei einem Fluoreszenzmaximum von 540 nm detektiert werden. Curcumin kann so auf der Haut und in den obersten Hautschichten in vivo mit der konfokalen Laser-Scan-Mikroskopie nachgewiesen werden.

3.1.2 Natriumfluoreszein

Natriumfluoreszein ($C_{20}H_{10}Na_2O_5$, MW = 376,3) ist ein Xanthenfarbstoff. Das leicht wasserlösliche Alkalisalz des Fluoreszein findet in der Humanmedizin Anwendung zur Diagnose von Hornhautschäden, Durchblutungsstörungen sowie bei Gallenblasen- und Darmoperationen. Als Farbstoff wird Natriumfluoreszein zum Färben von Seifen, Badesalzen und Badeextrakten verwendet.

Das Absorptionsmaximum von Natriumfluoreszein liegt bei einer Wellenlänge von 500 nm (siehe Abbildung 10) und ermöglicht eine einfache Detektion mittels UV-/VIS-Spektrometrie. Auch Natriumfluoreszein kann aufgrund seiner fluoreszierenden Eigenschaften in vivo innerhalb der Haut mittels konfokaler Laser-Scan-Mikroskopie nachgewiesen werden.

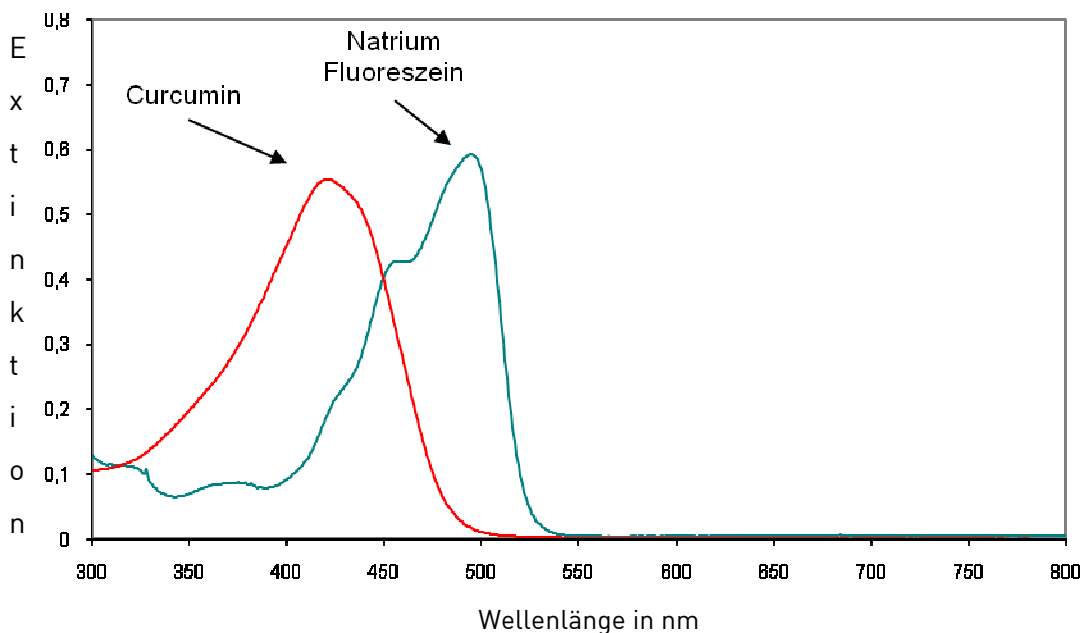


Abbildung 10: Absorptionsmaxima von Natriumfluoreszein und Curcumin

3.1.3 verwendete Formulierungen

- 2-prozentige Curcumin-Emulsion (Eucerin cum aqua): bei der Applikation von 50 mg Emulsion auf 25 cm² Haut entspricht dies einer applizierten Curcuminmenge von 40 µg/cm².
- 0,2-prozentige Natriumfluoreszein-Emulsion (Eucerin cum aqua): bei der Applikation von 50 mg Emulsion auf 25 cm² Haut entspricht dies einer applizierten Natriumfluoreszein-Menge von 4 µg/cm².

3.2 wassergefilterte Infrarot-A-Strahlung

Wassergefilterte Infrarot-A-Strahlung ist eine der natürlichen Sonnenstrahlung nachempfundene Wärmestrahlung. Im Gegensatz zur ausgeprägt oberflächlichen Absorption von IR-B und IR-C vermag Infrarot-A-Strahlung tiefer in das Gewebe einzudringen. Folglich zeichnet sich IR-A durch eine höhere Tiefenwirksamkeit aus. Da selbst ungefilterte Infrarot-A-Strahlung noch Wellenlängenbereiche besitzt, welche durch eine Erregung der in Körperflüssigkeiten vorhandenen OH-Gruppen Schmerzen erzeugen, wird eine spezielle Hydrokuvette in den Strahlengang gesetzt. Diese vermag, besagte Wellenlängen herauszufiltern und somit die Verträglichkeit der Infrarot-A-Strahlung zu verbessern.

3.2.1 wassergefilterte Infrarotlicht-Lampe

Zur Erzeugung der wassergefilterten Infrarot-A-Strahlung wurde der hydrosun®-Strahler 501 der Firma Hydrosun Medizintechnik GmbH, Müllheim, verwendet. Siehe Abbildung 11.

Der homogene Teil des Bestrahlungsfeldes hat einen Durchmesser von 10 cm. Bei 25 cm Bestrahlungsabstand beträgt die Bestrahlungsstärke $E = \text{ca. } 230 \text{ mW/cm}^2 \pm 10\%$ (= VIS + wIRA), hiervon entfallen ca. 135 mW/cm^2 auf wIRA. Durch einen hermetisch geschlossenen Wasserfilter (Hydrokuvette, 10mm) im Strahlengang werden die Wasserbanden des Infrarot-A zu wesentlichen Teilen herausgefiltert.



Abbildung 11: hydrosun®-Strahler 501 der Firma Hydrosun Medizintechnik GmbH, Müllheim

Abbildung 12 zeigt das Wellenlängenspektrum, kalkuliert für den hier verwendeten wIRA-Strahler Hydrosun® 501 mit einer 10 mm Wasserküvette und dem Orange-Filter OG590 bei einer gesamten Strahlungsintensität (VIS + wIRA) von 210 mW/cm² (= 2,1 * 10³ W/m²).

Hiervon beträgt der Anteil an wIRA ca. 150 mW/cm². Distanz: 25cm. Die Abbildung zeigt eine Messung der Universität der angewandten Wissenschaft München, vom 30. Juni 1999.

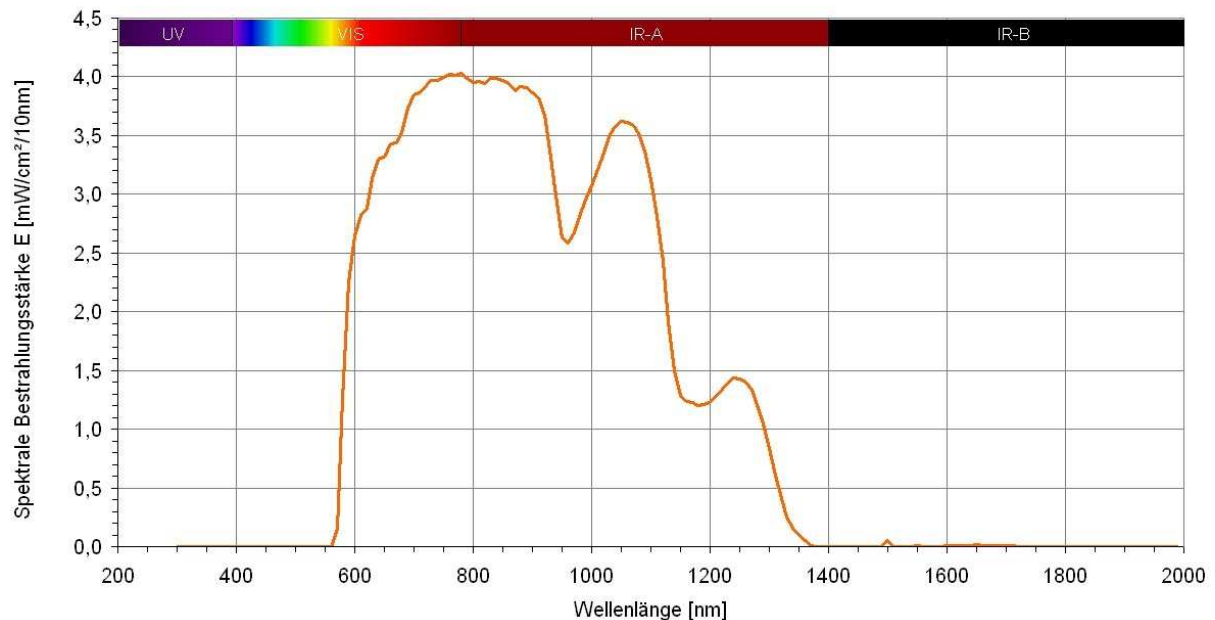


Abbildung 12: Spektrum des wIRA-Strahlers (Hydrosun® 501).

3.2.2 Bestrahlungsmessgerät

Zur Messung der erzielten Bestrahlungsstärke wurde das Bestrahlungsmessgerät hydrosun® HBM 1 verwendet. Dieses misst die gesamte eingestrahlte Leistung pro Quadratcentimeter.

3.3 Probandenkollektiv

Die Untersuchungen wurden an gesunden männlichen Probanden kaukasischer Abstammung durchgeführt. Das Alter der Probanden lag zwischen 19 und 30 Jahren.

Ausschlusskriterien bei der Auswahl der Probanden waren:

- dermatologische Erkrankungen
- lokale Therapien im Bereich der Arme innerhalb der letzten 4 Wochen
- Neigung zu Hyperpigmentierung
- Übermäßiger Haarwuchs auf den Armen

Vor Beginn der Versuche fand ein ausführliches Aufklärungsgespräch über die geplanten Experimente und mögliche Risiken statt. Auch wurde den Probanden mitgeteilt, dass sie jederzeit das Recht haben, von Ihrer Einwilligung ohne Angabe von Gründen zurückzutreten. Die verwendete Abrissmethode ist eine etablierte Methode und ist für die Anwendung am lebenden Menschen zugelassen. Ein positives Votum der Ethikkommission der Charité lag zu Beginn der Untersuchungen vor.

3.4 Studiendesign

Die Untersuchungen werden als kontrollierte, randomisierte Studie an den Unterarm-Innenseiten von 12 Probanden durchgeführt.

Es werden 3 Untersuchungstermine (Modus A, Modus B, Modus C,) für den einzelnen Probanden in randomisierter Reihenfolge (zum Ausschluss systematischer Fehler) im Abstand von je einer Woche festgelegt.

3.4.1 Hautareale

Für jeden Untersuchungstag (Modus A, Modus B, Modus C) müssen Hautareale definiert werden: Zwei Hautareale für die Untersuchungen mit Curcumin auf dem einen Unterarm, zwei Hautareale für die Untersuchungen mit Natriumfluoreszein auf dem anderen Unterarm: Auf den jeweiligen Unterarm werden hierzu zwei Hautareale mit einer Fläche von insgesamt 25 cm² (5 x 5 cm) mit einem wasserfesten Stift markiert. Abbildung 13 skizziert die Hautareale eines Unterarms. Die so gewählten Hautareale können durch das homogene Bestrahlungsfeld des wIRA-Strahlers (ca. 10 cm Durchmesser) komplett ausgeleuchtet werden.

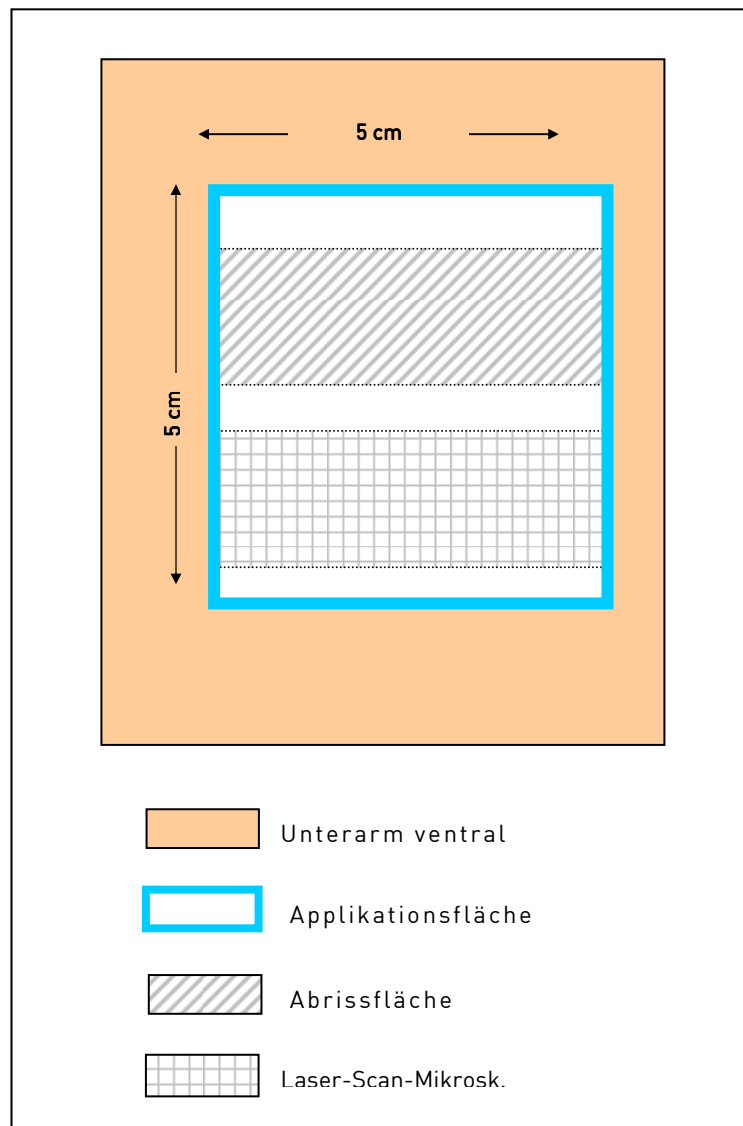


Abbildung 13: Beispiel des Vorgehens an einem Unterarm

3.4.2 Modus A ohne wIRA

Im Modus A erfolgt die Untersuchung der Penetration von Curcumin und Natriumfluoreszein ohne den Einfluss von wIRA. Die Versuche werden in einem klimatisierten Raum mit gleich bleibender Luftfeuchtigkeit und einer Raumtemperatur von 21°C durchgeführt. Die Probanden haben sich vor Beginn der Experimente eine Stunde in dem Versuchsraum aufzuhalten. Vor Applikation der Emulsionen wird die Hauttemperatur bestimmt. Hierzu wird ein Infrarot-Handthermometer (Raytek®, Schlender Messtechnik, Berlin) verwendet.

An jeder Unterarminnenseite werden je zwei Hautareale mit einer Fläche von insgesamt 25 cm² (5 x 5 cm) markiert. Die beiden Hautareale eines Unterarms sind so gewählt, dass beide Areale gemeinsam vom homogenen Bestrahlungsfeld des wIRA-Strahlers erreicht werden

können. Auf die beiden Hautareale an einem Unterarm werden 50 µg einer der beiden Emulsionen aufgetragen (2-%ige Curcumin-Wasser-in-Öl-Standardemulsion oder 0,2-%ige Natriumfluoreszein-Emulsion). Nach einer Penetrationszeit von 30 min wird mit Hilfe der Laser-Scan-Mikroskopie auf einem der beiden Hautareale die Verteilung der Fluoreszenzfarbstoffe bestimmt. Anschließend werden von dem anderen Hautareal desselben Unterarms 20 Klebestreifen-Abrisse entnommen. Ein vollständiges Hornschichtprofil (100 %) wurde für alle Modi und beide Fluoreszenzfarbstoffe bei Proband 1 bestimmt. Anhand dieser vollständigen Profile kann berechnet werden, wie viel Prozent des Stratum corneum mit 20 Abrissen entfernt wird. Nach Abschluss des Procedere am einen Unterarm erfolgt am gleichen Untersuchungstag ein analoges Procedere am anderen Unterarm mit der zweiten Emulsion. Abbildung 14 zeigt das Vorgehen in Form einer Skizze.

Die Menge der Korneozyten je Klebestreifen wird UV-/VIS spektroskopisch bestimmt. Anschließend wird eine definierte Fläche der Tapes ausgeschnitten, in Ethanol gelöst und die Konzentration der Farbstoffe je Klebestreifen UV-/VIS spektroskopisch ermittelt. Für die Penetration von Natriumfluoreszein und Curcumin werden so für jeden Probanden für jeden Modus Penetrationsprofile erstellt.

3.4.3 Modus B - Vorbestrahlung mit wIRA

An einem anderen Tag werden an jedem Unterarm 2 weitere Hautareale markiert.

Nachdem sich die Probanden 1 Stunde in dem klimatisierten Versuchsraum aufgehalten haben, wird die Hauttemperatur bestimmt. Zusätzlich wird (im Bestrahlungsfeld, aber außerhalb der Applikationsfläche) der Feuchtigkeitsgehalt des Stratum corneum bzw. der Korneozyten mit Hilfe der Korneometrie bestimmt sowie der transepidermale Wasserverlust (TEWL), als Maß für die Hautbarrierefunktion, gemessen.

Anschließend werden die Hautareale des einen Unterarms für 30 min mit VIS + wIRA bestrahlt (Spezifikationen und Anwendungsmodalitäten des hydrosun®-Strahlers wie in 3.2.1 beschrieben). Hauttemperatur, Hautfeuchte und TEWL werden erneut bestimmt und es erfolgt unmittelbar *nach* Bestrahlungsende die Applikation einer Emulsion und der weitere Versuchsablauf wie in 3.4.2 dargestellt.

Nach Abschluss des Procedere am einen Unterarm erfolgt am gleichen Untersuchungstag ein analoges Procedere am anderen Unterarm mit der zweiten Emulsion: die Hauttemperatur, Hautfeuchte und TEWL werden bestimmt, es werden die Hautareale des

anderen Unterarms für 30 min mit VIS + wIRA bestrahlt, die Hautparameter werden erneut bestimmt und es erfolgt unmittelbar nach Bestrahlungsende die Applikation der anderen Emulsion und der analoge weitere Versuchsablauf wie am ersten Unterarm.

3.4.4 Modus C - zeitgleiche Bestrahlung mit wIRA

An einem anderen Tag werden an jedem Unterarm zwei bisher nicht genutzte Hautareale markiert. Nachdem sich die Probanden eine Stunde in dem klimatisierten Versuchsraum aufgehalten haben, werden Hauttemperatur, Hautfeuchte und TEWL bestimmt und es erfolgt die Applikation einer Emulsion auf die beiden Hautareale des einen Unterarms. Während der Penetrationszeit von 30 min wird das Hautareal *zeitgleich* mit VIS + wIRA bestrahlt. Unmittelbar nach Bestrahlungsende werden nochmals die Hautparameter bestimmt. Der weitere Versuchsablauf erfolgt wie in 3.4.2 dargestellt.

Nach Abschluss des Procedere am einen Unterarm erfolgte am gleichen Untersuchungstag ein analoges Procedere am anderen Unterarm: es werden die Hautparameter bestimmt und es erfolgt die Applikation der anderen Emulsion am anderen Unterarm. Während der Penetrationszeit von 30 min werden die Hautareale *zeitgleich* mit VIS + wIRA bestrahlt. Der weitere Versuchsablauf erfolgt analog wie am ersten Unterarm.

Eine vorhergehende Studien hat die penetrationsverbessernden Eigenschaften von VIS und wIRA untersucht. Hierbei zeigte sich, dass die penetrationsverbessernde Wirkung vorwiegend der wIRA Strahlung zuzuschreiben ist. Daher wurde bei der hier vorliegenden Versuchsreihe darauf verzichtet, eine Kontroll-Bestrahlung ausschließlich mit VIS in die Untersuchungen mit einzuplanen [95].

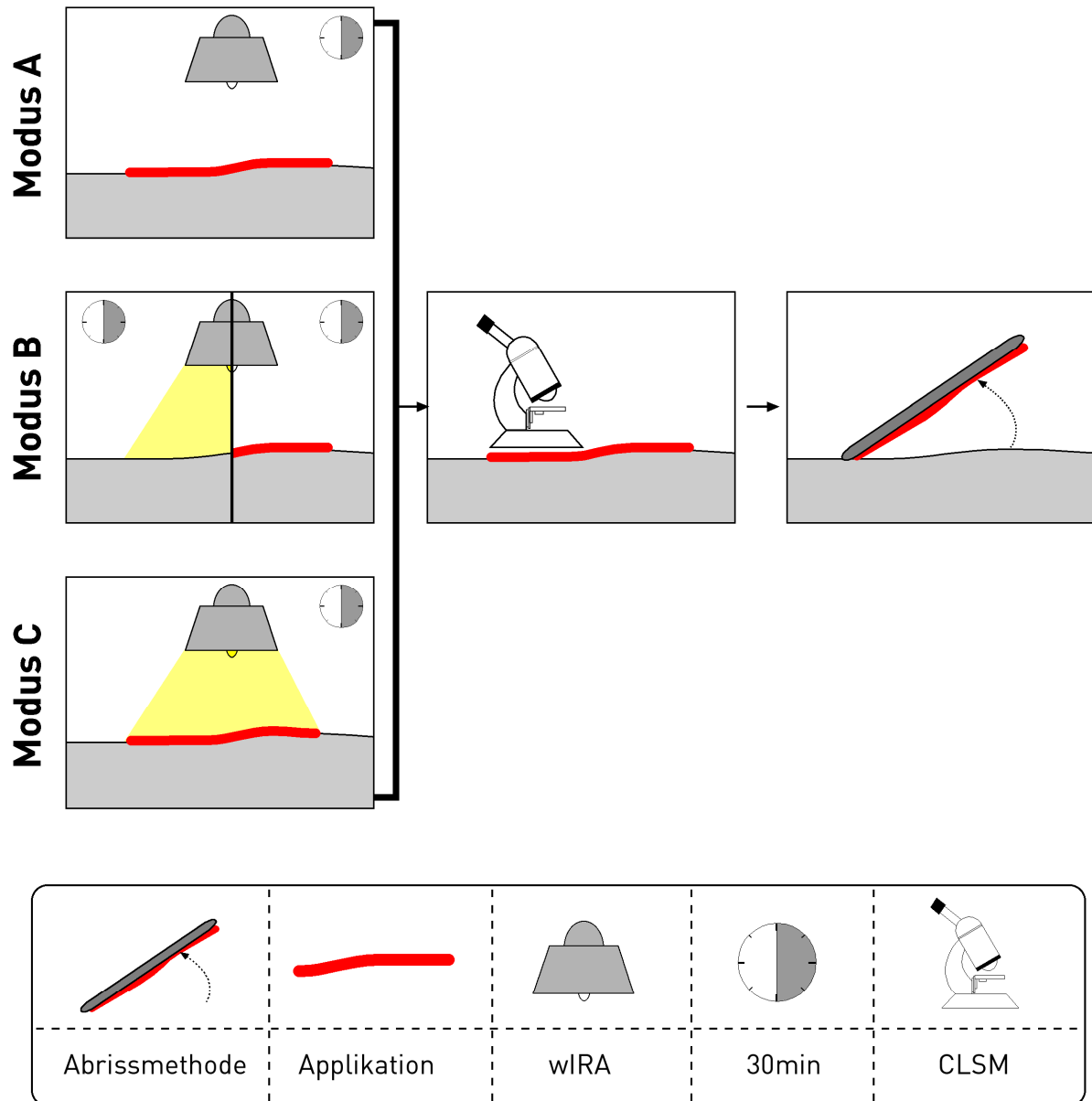


Abbildung 14: Skizze: Unterschied Modus A, Modus B, Modus C

3.4.5 Randomisierung

Die Randomisierung erfolgte mit Blockbildung (2 Zeitblöcke mit jeweils 6 Probanden). Neben dieser Hauptrandomisierung wurde für jeden Probanden - mit einheitlicher Gültigkeit für alle drei Untersuchungstage - randomisiert festgelegt, welche Substanz rechts und welche links aufgetragen wird sowie außerdem, mit welchem Arm innerhalb des Untersuchungstages begonnen wird. Auch diese Randomisierung mit Blockbildung (Vierer-Blöcke) diente dem Ausschluss systematischer Fehler. Zugleich war die Randomisierung so gewählt, dass beim selben Probanden eine bestimmte Substanz an allen drei Untersuchungstagen am selben Arm und etwa zur gleichen Tageszeit untersucht wurde.

3.5 Abrissmethode in Kombination mit UV-VIS-Spektroskopie

Die verwendete Abrissmethode wurde im Bereich für Experimentelle und Angewandte Physiologie der Haut der Dermatologischen Klinik der Charité entwickelt [96]. Sie ermöglicht die Messung einer Substanzkonzentration sowie deren Konzentrationsgefälle entlang des Stratum corneum. Das Stratum corneum wird hierbei sukzessive mittels adhäsiver Klebestreifen (tesa®-Film, Nr. 5529, Beiersdorf, Hamburg, Deutschland) entfernt. Ein jeder Klebestreifen wird nun auf die ihm anhaftende Menge an Testsubstanz sowie Korneozytenmenge hin untersucht. Die Korneozytenmenge wird der Dicke der abgerissenen Stratum-corneum-Schicht gleichgesetzt. Die so gewonnenen Informationen dienen zur Erstellung eines Penetrationsprofils, welches in Absatz 3.5.4 detaillierter beschrieben wird.

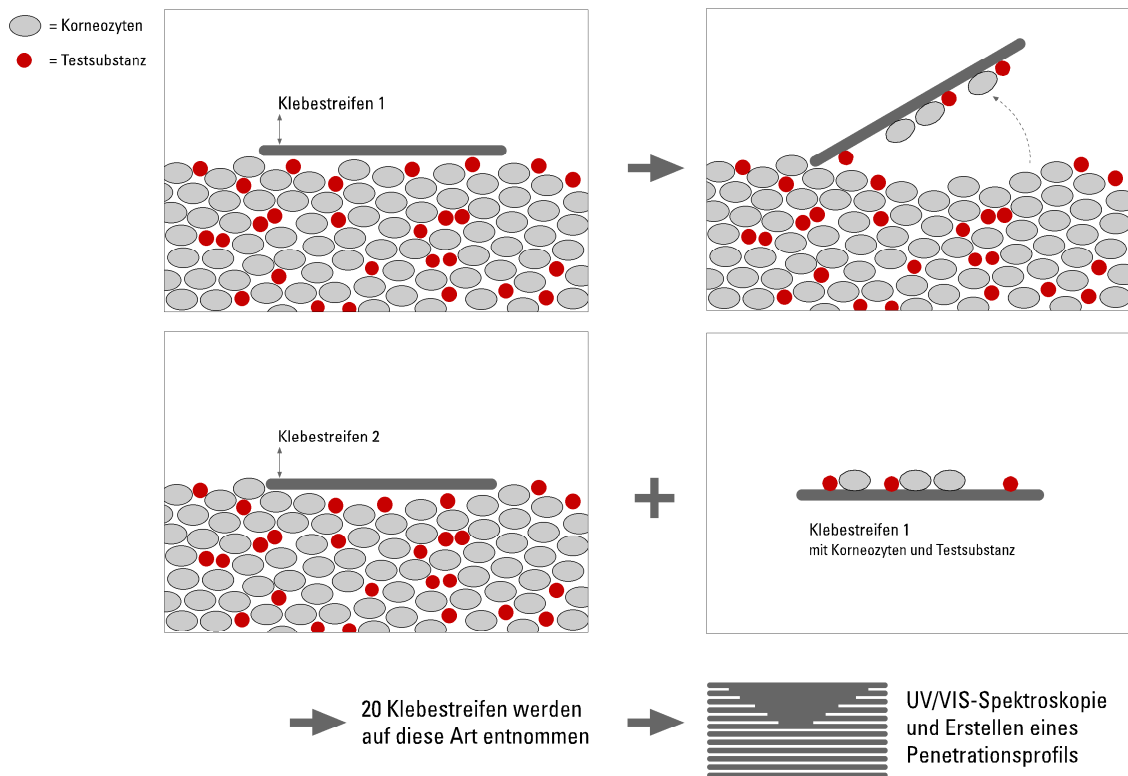


Abbildung 15: schematische Darstellung der Abrissmethode

3.5.1 Entnahme der Klebestreifen

Mittels durchsichtiger Klebestreifen (tesa®-Film, Nr. 5529, Beiersdorf, Hamburg, Deutschland) werden in mehreren Zyklen die oberen Zellschichten des Stratum corneum eines definierten Hautareals abgetragen. Das Hautareal wird mit einem wasserfesten Stift markiert, um zu garantieren, dass die nachfolgenden Abrisse stets von der gleichen Stelle entnommen werden. Mittels eines Kunststoffrollers wird der der Haut aufgelegte

Klebestreifen unter konstantem Druck zehnmalig an die Haut gepresst. Hierdurch wird eine gleichmäßige Anheftung des Klebefilms an die jeweils oberste Zellschicht des Stratum corneum gewährleistet, eventuell vorhandene Hautfurchen werden geglättet und können somit vernachlässigt werden.

Anschließend wird mittels eines zügigen Abrissvorganges der Klebestreifen von der Haut gelöst. Diese Bewegung wird stets in gleicher Richtung (monodirektional) und in gleicher Intensität ausgeführt. Der abgerissene Klebestreifen enthält nun die jeweilig oberen Zellschichten des Stratum corneum sowie die bis hierhin penetrierten Probesubstanzen. Anschließend können Korneozytenmenge und Substanzkonzentration mittels der UV/VIS-spektroskopischen Messung bestimmt werden.

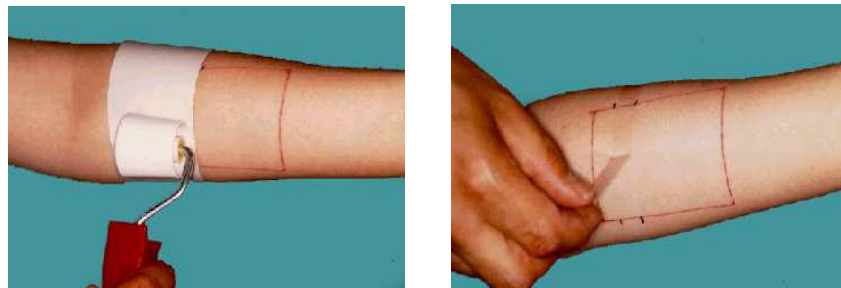


Abbildung 16: Anrollen und Abriss des Klebestreifens

3.5.2 Bestimmung der Korneozytenmenge je Klebestreifen

Zur Quantifizierung der Korneozyten je Abriss wird der Klebestreifen bei 800 nm im Zweistrahlphotometer gegen einen Leerstreifen als Referenz vermessen. Dafür wird ein modifiziertes Lambda 20 UV-/VIS-Spektrometer von Perkin Elmer (Überlingen, Deutschland) verwendet. Die Fläche des Mess-Spots beträgt 1 cm^2 . Das Signal wird durch Streuung, Reflexion und Absorption der Korneozyten hervorgerufen. Anhand der mittels UV/VIS-Spektrometrie bestimmten Extinktion kann nun die Korneozytenkonzentration berechnet werden, wodurch die Menge der mit dem Abriss entfernten Korneozyten bestimmt werden kann. In einer graphischen Darstellung werden Klebestreifen-Nummer und entsprechende Korneozytenkonzentration gegenübergestellt, wodurch ein Hornschichtprofil erstellt wird.

3.5.3 Bestimmung der Farbstoffkonzentration je Klebestreifen

Aufbereitung: Um eine quantitative Bestimmung der auf dem Klebestreifen haftenden Substanz zu ermöglichen, werden die Klebestreifen wie folgt aufbereitet: Jeder Klebestreifen wird mittels Skalpell auf eine Fläche von $4,35 \text{ cm}^2$ zurechtgeschnitten. Der zurechtgeschnittene Klebestreifen wird nun mit $4,35 \text{ ml}$ Ethanol versetzt, wodurch eine

Lösung von Klebstoff, Korneozyten und Testsubstanz vom Trägerfilm erzielt wird. Der Lösevorgang wird durch ein 10-minütiges Ultraschallwasserbad (Sonorex Super) unterstützt. Im Anschluss wird diese Lösung, ein Gemisch aus Klebstoff, Korneozyten und Testsubstanz, für die Dauer von 10 Minuten zentrifugiert (Zentrifuge „MR 1812“; Jouan). Dies bewirkt eine Auftrennung der Lösungsbestandteile entsprechend ihrer Dichte. Der Klebstoff wird verworfen.

Messung der substanzspezifischen Extinktion: Zur Quantifizierung der Substanzen wird nun der Überstand der gewonnenen Lösung im Zweistrahlenspektrometer in einem Wellenlängenbereich von 300 bis 800 nm gegen eine Leerreferenz vermessen. Dafür wird ein modifiziertes Lambda 20 UV-/VIS-Spektrometer von Perkin Elmer (Überlingen, Deutschland) verwendet. Die Fläche des Mess-Spots beträgt 1 cm^2 . Anhand der gemessenen substanzspezifischen Absorption kann nun eine Bestimmung der Testsubstanzkonzentration erfolgen.

3.5.4 Erstellen eines Penetrationsprofil

Die Darstellung der Ergebnisse in einem Penetrationsprofil berücksichtigt sowohl die gemessenen Mengen der Korneozyten als auch die ermittelten Konzentrationen der applizierten Modellsubstanzen auf den einzelnen Abrissen in einer gemeinsamen graphischen Abbildung:

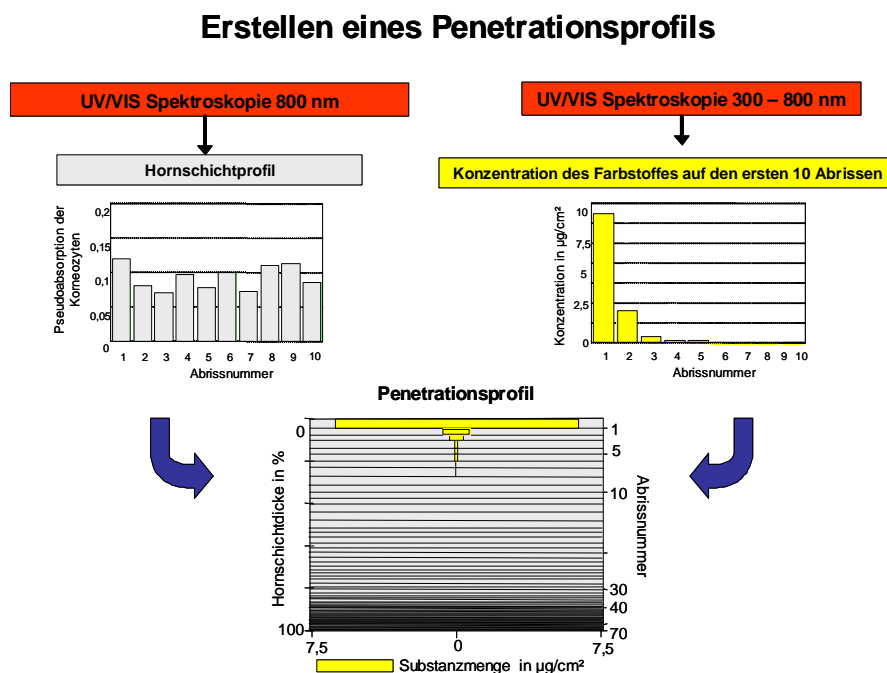


Abbildung 17: Erstellen eines Penetrationsprofils

Die Menge der Korneozytenaggregate auf den einzelnen Abrissen wird zur Darstellung eines Hornschichtprofils genutzt. Dieses Hornschichtprofil wird mit den Modellsubstanz-

Konzentrationen der jeweiligen Hornhautschicht in Beziehung gesetzt. Die Breite des Balkens entspricht der mit dem selben Abriss entnommenen Konzentration an Modellschicht („Masse pro Fläche Tesafilm“). Siehe Abbildung 17.

3.5.5 Erstellen eines Penetrationsquotienten

Um die Unterschiede in der Penetrationstiefe quantifizieren zu können, wurde der Farbstoffgehalt in den obersten (1.) 10 % und den darunter liegenden (2.) 10 % der Hornschicht errechnet. Lademann et al. zeigten, dass sich topisch applizierte Substanzen hauptsächlich in den oberen 20 % der Hornschicht verteilen [97] [98]. Ein Quotient aus tiefen und oberflächlichen 10 % gibt Informationen über die Penetrationstiefe. Abbildung 18 verdeutlicht dies in einer Skizze.

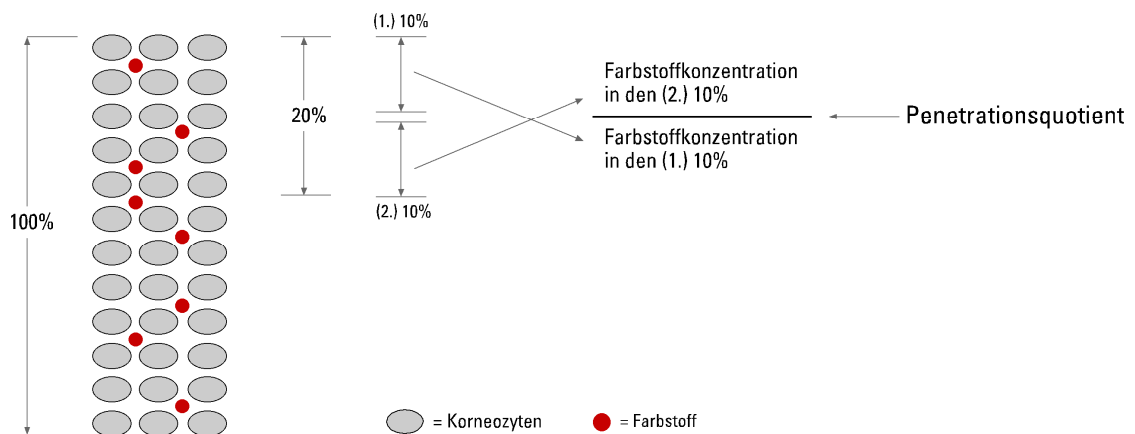


Abbildung 18: Erstellung eines Penetrations-Quotienten

Dieser Penetrationsquotient ermöglicht eine schnelle und genaue Beurteilung der erfolgten Penetrationstiefe: Je größer der Quotient, desto mehr Farbstoff findet sich in den tiefer liegenden Anteilen des Stratum corneum und desto besser ist der Farbstoff zuvor in die Haut penetriert.

3.6 Messung der Hautparameter

3.6.1 Korneometrie

Die Korneometrie wurde mit dem Corneometer CM 820[®], Courage + Khazaka electronic GmbH, Köln, durchgeführt. Mittels der Korneometrie wird die „Durchfeuchtung“ des Stratum corneum gemessen. Hierbei gewonnene Messwerte gestatten semiquantitative Aussagen, welche Verlaufsuntersuchungen ermöglichen.

Das Messprinzip der Korneometrie basiert auf einer kapazitiven Bestimmung der unterschiedlichen Dielektrizitätskonstanten von Wasser und anderen Stoffen. Zur Messung wird die Membran eines axial beweglichen Messkopfes durch eine Feder mit einem konstanten Anpressdruck von 3,5 N auf die Hautoberfläche angedrückt. Je nach Feuchtigkeitsgrad des Stratum corneum ändert sich die Leitfähigkeit dieses geschlossenen Systems. Über eine Verbindungsleitung wird der jeweilige Wert von einer Rechneinheit ausgewertet und angezeigt.

3.6.2 Messung des transepidermalen Wasserverlustes

Als Maß für die Beurteilung der Barrierefunktion der Haut wurde die Messung des transepidermalen Wasserverlustes herangezogen. Die Messungen erfolgten mit dem TEWAMETER TM 210®, Courage + Khazaka Electronic GmbH, Köln. Der transepidermale Wasserverlust wird durch die von der Hautoberfläche freigesetzte Menge an Wasser in Gramm pro Quadratmeter pro Stunde definiert. Der hautnah aufgebrachte Sondenkopf enthält zwei Sensorpaare, welche jeweils Feuchtigkeit und Temperatur messen. Die beiden Sensorpaare befinden sich in einem unterschiedlichen Abstand senkrecht zur Hautoberfläche.

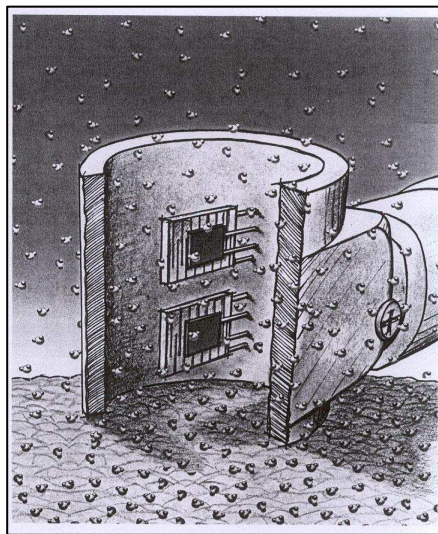


Abbildung 19: Skizze der Tewameter-Sonde

Der Sondenkopf ist ummantelt von einem 20 mm hohen Hohlzylinder mit einem Durchmesser von 10 mm. Mittels des Zylinders wird eine Beeinflussung durch externe Störfaktoren wie beispielsweise Luftturbulenzen möglichst gering gehalten. Das von der Hautoberfläche verdunstende Wasser tritt durch die Tewameter-Sonde aus, der dabei auftretende Dichtegradient wird von den Sensoren gemessen und von einem Mikroprozessor ausgewertet. Der Partialdruck des Wasserdampfes wird nun für die zwei verschiedenen übereinander liegenden Ebenen errechnet. Über den Gradienten des Partialdruckes wird die

Verdunstungsrate bestimmt. Unter idealen Raumbedingungen von 22 – 24 °C und 40 – 60 % Luftfeuchtigkeit kann das Tewameter TM210® den TEWL mit einer Auflösung von 0,1g/hm² bestimmen. Vor jeder Messung betrug die Akklimatisationszeit der Versuchsperson mindestens zehn Minuten.

Physikalische Grundlage für die Beschreibung des Wassertransportes durch das Stratum corneum ist das 1855 von Fick entwickelte erste Diffusionsgesetz. Dieses Gesetz ist nur in einer homogenen Diffusionszone gültig. Untersuchungen haben jedoch gezeigt, dass sich das Stratum corneum bezogen auf den transepidermalen Wasserverlust, trotz seiner heterogenen Struktur, wie eine homogene Membran verhält. Vor dem Hintergrund des Fick'schen Diffusionsgesetzes lässt sich der Wasserverlust über die Haut wie folgt beschreiben.

$$TEWL = \frac{(K \cdot \Delta C) \bar{D}}{H} = K_p \cdot \Delta C$$

K ist dabei der SC-gewebeabhängige Verteilungskoeffizient von Wasser, \bar{D} ist das mittlere Diffusionsvermögen von Wasser durch die gesamte Hornschicht; H stellt die Schichtdicke des Stratum corneum dar und ΔC ist die Konzentrationsdifferenz des Wassers über der Membran (Hornschicht). K_p ist der Permeabilitätskoeffizient des Wassers durch das Stratum corneum.

3.6.3 Temperaturmessung

Vor und nach Einsatz der wassergefilterten Infrarot-A-Strahlung wurde mit einem berührungsfreien Laser-Haut-Thermometer (Raynger® MX™, Raytek®, Schlender Messtechnik INS, Berlin, Germany) die Hauttemperatur bestimmt.

3.7 Konfokale Laser-Scan-Mikroskopie

Die konfokale Laser-Scan-Mikroskopie gestattet eine *in vivo* Visualisierung organischen Gewebes auf zellulärer Ebene. Diese Visualisierung ist nicht nur auf die Oberfläche des zu untersuchenden Gewebes beschränkt, eine Darstellung unterhalb der Oberfläche gelegener zellulärer Strukturen ist ebenfalls möglich. Die konfokale Mikroskopie stellt somit ein nicht-invasives Verfahren zur optischen Schnittdarstellung dar.

Die konfokale Laser-Scan-Mikroskopie ist ein lichtmikroskopisches Verfahren, das in seiner Grundeinheit zunächst auf einem gängigen Forschungsmikroskop beruht. Dieses wird durch eine Laser-Scan-Einheit und einen Detektor erweitert. Der integrierte Argon-Laser erzeugt ein monochromatisches Laserlicht mit einer Wellenlänge von 488 nm. Dieses Laserlicht wird über optische Faserelemente einer bikonvexen Linse zugeführt, durch welche der Strahl fokussiert und stark gebündelt auf das zu untersuchende Gewebe projiziert wird. Fluoreszenzfarbstoffe innerhalb des Gewebes werden durch den Laserstrahl angeregt. Aus der Fokusebene emittierte Fluoreszenz-Signale werden durch das Mikroskop detektiert und zur Bildverarbeitung (via Spektrometer) verwendet. Da sowohl der die Probe abrasternde Laserstrahl als auch das von der Fokusebene emittierte Licht durch eine kleine Blende („pinhole“) geführt werden, stammt das jeweils detektierte Licht aus einer sehr dünnen Schmitzebene. Dadurch ergibt sich eine optische Schnittdarstellung der ausgeleuchteten Ebene mit hoher Bildschärfe. Durch progressive Verlagerung der Fokusebene in die Tiefe gestattet die CLSM, Blicke unterhalb die Oberfläche zu werfen und somit beispielsweise die verschiedenen dermalen Schichten *in vivo* darzustellen. Dabei liefert die konfokale Mikroskopie Echtzeitbilder in einer hohen Detailauflösung. Die Ansicht entspricht hierbei einer horizontalen Draufsicht, parallel zur Gewebsoberfläche (*en face*).

Die konfokale Darstellungstechnik ermöglicht eine Bewahrung des nativen Gewebezustands während gleichzeitig die physiologischen Strukturen studiert und dynamische Prozesse in Echtzeit betrachtet werden können. Der Hauptvorteil zur konventionellen Histologie besteht demnach in der *in vivo* Darstellung des Gewebes. Die hier vorliegenden Untersuchungen wurden mit dem dermatologischen konfokalen Laser-Scan-Mikroskop „Stratum“ (OptiScan Ltd., Melbourne, Australien) durchgeführt.



Abbildung 20: konfokales Laser-Scan-Mikroskops „Stratum“ (OptiScan Ltd., Melbourne, Australien)

Dieses beinhaltet einen blauen Argon-Laser mit einer Wellenlänge von 488nm bei einer Energie von 3 mW. Das Laserlicht wird in einer Lichtquelle erzeugt, in einen faser-optischen Leiter eingekoppelt und zu einem tragbaren, miniaturisierten Handscanner geführt. Der Handscanner ermöglicht einen mobilen und flexiblen klinischen Gebrauch der konfokalen Mikroskopie. Das optische Fenster des Handstücks kann direkt auf das zu untersuchende Hautareal aufgebracht werden. Durch das Laserlicht wird ein 250 x 250 µm großes Hautareal homogen ausgeleuchtet und visuell erfasst.

Die fluoreszierende Emission des zuvor applizierten und vom Laserlicht angeregten Kontrastmittels wird simultan durch den Handscanner detektiert. Über optische Fasern wird das Lichtsignal einem Spektrometer zur Visualisierung zugesandt. Ein Tiefenscan wird durch manuelle Änderung der Fokusebene mittels Kontrollrad, welches auf dem Handstück angebracht ist, realisiert. Durch Drehung des Rades wird die Lage der Objektlinse im Handstück variiert. Daraus resultiert eine Veränderung der Tiefenposition der Fokusebene im Zielgewebe. Abbildung 21 zeigt schematisch die Funktionsweise des Mikroskops.

Der Argon-Laser hat bei einer Wellenlänge von 488 nm und einer Energie von 3mW eine maximale Penetrationstiefe von ungefähr 110 µm in das menschliche Hautgewebe. Die Tiefenskala des Geräts „Stratum“ ist nicht in absoluten Einheiten kalibriert. Die angezeigte Skala gibt die relativen Einheiten (rE) des Analog-Digital-Konverters des Linsen-Positions-Sensors wieder. Die Skala umfasst einen Bereich von 4096 relativen Einheiten. Anzumerken ist, dass der Sensor in diesem Messintervall linear arbeitet.

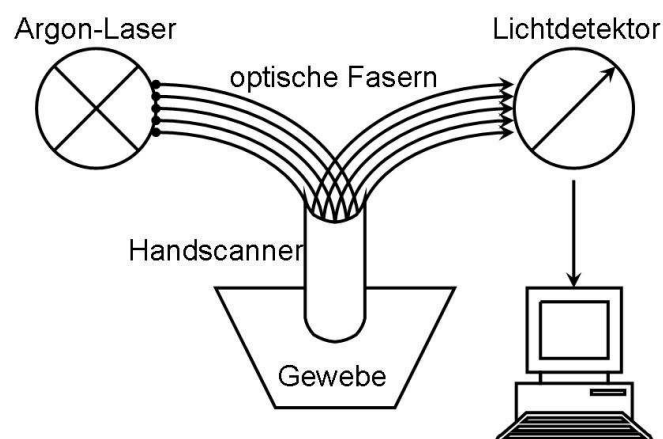


Abbildung 21: schematische Darstellung der Funktionsweise des CLSM

Für eine hohe digitale Auflösung (1024x1024 Pixel) wurde eine Bildfrequenz von einem Bild pro 1,4 Sekunden gewählt. Durch diese Darstellungstechnik wird eine annähernd 1000 fache Vergrößerung gewährt. Dabei wird eine laterale optische Auflösung von weniger als 2,5 µm und axial von unter 4 µm (Schichtdicke) erreicht. Dies entspricht ungefähr der Schichtdicke von 5 µm bei der konventionellen Histologie. Nach der digitalen Umwandlung der Lichtsignale durch das Spektrometer wird das Bild des ausgeleuchteten Hautareals auf einem 19 Zoll durchmessenden Computermonitor wiedergegeben. Die konfokale Laser-Scan-Mikroskopie liefert kontinuierlich Echtzeitbildersequenzen, welche digital gespeichert werden können.

3.8 Statistik

Für alle Experimente wurden die Mittelwerte und die Standardabweichung mit dem Programm Graph Pad Prism 4.0 (San Diego, USA) für Windows berechnet. Die erzielten Ergebnisse der vorliegenden Arbeit wurden statistisch mittels des Programme SPSS 11.0® und BiAS® für Windows-Software bewertet.

Schon in der Planungsphase wurde entschieden, dass neben der Möglichkeit, individuelle Penetrationsprofile exemplarisch zu zeigen, ausschließlich nicht-parametrische statistische Methoden verwendet werden. Neben den individuellen Penetrationsprofilen werden daher nicht-parametrische *deskriptive* Statistik sowie nicht-parametrische *testende* Statistik verwendet.

Die nicht-parametrische deskriptive Statistik wird zum Zusammenführen der Daten eines Behandlungsmodus (z.B. 12 Probanden im Behandlungsmodus A) einer Substanz verwendet und ermöglicht das Erstellen eines Penetrationsprofils eines Behandlungsmodus einer Substanz. Dargestellt werden Median, 25 %-Perzentile, 75 %-Perzentile, Minimum und Maximum in Form eines Box-Whisker-Graph.

Der Vergleich der drei Behandlungsmodi erfolgt durch visuelle Gegenüberstellung der drei pro Substanz erstellten Penetrationsprofile: so kann festgestellt werden, inwieweit die Behandlung mit wIRA den Penetrationsprozess beeinflusst hat. Ergänzend zur visuellen Gegenüberstellung ist beabsichtigt, nicht-parametrische testende Statistik mit Alpha-Fehler-Korrektur für den Vergleich einzusetzen.

Die absolute Alpha-Fehler-Wahrscheinlichkeit wurde auf 0,05 (5 %) gesetzt. Der Friedman-Test wird verwendet, um die drei Bestrahlungsmodi A, B und C bzgl. der Hauptvariable

(Penetrationsquotienten) zu vergleichen. Im Falle eines signifikanten Ergebnisses soll der Wilcoxon-Wilcox-Test als Post-Hoc-Test verwendet werden. Da die Analyse der Hauptvariable separat für die zwei Testsubstanzen durchgeführt wird, ist beabsichtigt, eine Korrektur des Alpha-Fehlers nach Bonferroni zu tätigen: $\text{Alpha}^* = \alpha/2$.

Es wird eine Penetrationsverbesserung durch wIRA erwartet, bei Modus C stärker als bei Modus B. Die statistische Nullhypothese lautet: „die drei Modi A, B und C unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Penetrationskinetik nicht voneinander“.