

Diskussion

Die Haut, größtes Organ unseres Körpers, umgibt nahezu den gesamten Zellverband des menschlichen Organismus. Als besonders einfach und frei zugänglich ist die Haut sowohl experimentell als auch therapeutisch von großem Interesse für die medizinische Forschung. Der äußersten Hautschicht, dem Stratum corneum, kommt eine herausragende Bedeutung zu, da sie maßgeblich für die penetrationslimitierende Barrierefunktion der Haut verantwortlich ist. Die hier vorliegende Arbeit ging der Frage nach, inwiefern die Barrierefunktion des Stratum corneum durch wassergefilterte Infrarot-A-Strahlung beeinflussbar ist. Hierzu wurde die Penetrationskinetik verschiedener topisch applizierter Probesubstanzen mit und ohne Einwirkung von wIRA erforscht. Die beiden gewählten Modellschubstanzen unterschieden sich hinsichtlich ihrer Polarität: Natriumfluoreszein als hydrophile Testsubstanz, Curcumin als lipophile Testsubstanz. Für die Untersuchungen wurden zwei verschiedene nicht-invasive Untersuchungstechniken angewandt: Zum einen die Abriss-Methode kombiniert mit UV/VIS-Spektroskopie, zum anderen die *in vivo* Laser-Scan-Mikroskopie.

Während es bei den Versuchen mit dem hydrophilen Natriumfluoreszein durch wassergefilterte Infrarot-A-Strahlung zu einer veränderten, verstärkten Penetrationskinetik kam, hatte eine Infrarotbestrahlung bei dem lipophilen Curcumin keinerlei Auswirkungen auf dessen Penetrationskinetik.

5.1 Penetrationsprofil und Penetrationsquotient

Durch die Kombination von Abrissmethode und UV-VIS-Spektroskopie war es möglich, das Penetrationsverhalten der applizierten Testsubstanzen detailliert zu erfassen und in einem Penetrationsprofil abzubilden. Anhand des Penetrationsprofils ließ sich ablesen, welche Menge an Testsubstanz sich in den einzelnen Schichten des Stratum corneum befindet. Dies gestattete eine Beurteilung der stattgefundenen Penetration.

Die quantitative Erfassung der Penetrationsvorgänge ermöglichte zudem den gezielten Vergleich standardisierter Versuchsdurchläufe. Wird bei der Versuchsdurchführung ein Faktor abgeändert, so sind entsprechende Unterschiede in den Versuchsergebnissen auf diesen abgeänderten Faktor zurückzuführen. In der hier vorliegenden Versuchsreihe galt es, einen möglichen Einfluss von wassergefilterter Infrarot-A-Strahlung auf die Penetrationskinetik lipophiler oder hydrophiler Substanzen zu untersuchen. wIRA wurde

entweder gar nicht, vor der Applikation oder nach der Applikation eingesetzt. Erfolgt unter Einfluss von wIRA als einzig abgeändertem Faktor eine Änderung der Penetrationseigenschaften einer Testsubstanz, so war dies der Wirkung der Infrarotstrahlung zuzuschreiben.

Um die Unterschiede in der Penetrationstiefe quantifizieren zu können, wurde der Farbstoffgehalt in den obersten 10 % und den darunter liegenden 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: Je größer der Quotient, desto mehr Farbstoff findet sich in den tiefer liegenden Anteilen des Stratum corneum und desto besser war der Farbstoff in die Haut hinein penetriert.

5.1.1 Natriumfluoreszein

Bei den Versuchsreihen mit Natriumfluoreszein als topisch applizierter Testsubstanz zeigte sich, dass die Penetration effizienter ist, wenn die Haut vor oder nach Applikation des Natriumfluoreszein mit wIRA bestrahlt wird: Bei Vorbehandlung mit wIRA (Modus B) bzw. bei zeitgleicher Behandlung mit wIRA (Modus C) kam es zu einer deutlichen Zunahme der Penetration im Gegensatz zur Penetration bei unbestrahlter Haut (Modus A). Dies zeigt sich durch die errechneten Penetrationsquotienten.

5.1.2 Curcumin

Im Gegensatz zum hydrophilen Natriumfluoreszein zeigt sich bei den Versuchsreihen mit Curcumin kein Unterschied der Penetrationskinetik im Vergleich von unbestrahlter Haut zu mit wIRA bestrahlter Haut.

5.1.3 Schlussfolgerung

Die Ergebnisse unserer Versuchsreihe zeigen deutlich, dass wIRA im Hinblick auf das Stratum corneum eine penetrationsfördernde Wirkung besitzt. Diese Wirkung jedoch ist unseren Ergebnissen zufolge ausschließlich auf hydrophile Stoffe beschränkt. Lipophile Substanzen erfahren durch wIRA keine Beeinflussung ihrer Penetrationsraten. Der penetrationsfördernde Effekt der wassergefilterten Infrarotstrahlung ist in ihrer Wirkung auf die Hautparameter zu suchen:

5.2 Hautparameter unter wIRA

Innerhalb des Stratum Corneum kommt es durch wIRA zu Erwärmung, Hydratation sowie einem erhöhten transepidermalen Wasserverlust. Bei der vorliegenden Versuchsreihe hat die hydrophile Substanz (Natriumfluoreszein) unter diesen Bedingungen eine erhöhte Penetrationsrate erfahren. Diese Veränderungen sind daher als ursächlich für die penetrationsverbessernden Eigenschaften der wassergefilterter Infrarotstrahlung zu sehen:

5.2.1 Hauttemperatur

Erhöht man bei einem Diffusionsprozess durch eine homogene Membran die Temperatur, so erhöht sich die Diffusionskonstante [100]. In Konsequenz dessen kann davon ausgegangen werden, dass es eine positive Korrelation zwischen der Hauttemperatur und der perkutanen Penetration topisch applizierter Substanzen gibt. Mehrere Studien widmeten sich dieser These und bestätigten den positiven Einfluss der Temperatur auf den Penetrationsprozess, in vivo als auch in vitro [100] [101]. Clarys et al. [102] führen diese erhöhten Penetrationsraten auf eine durch hohe Temperaturen verminderte Barrierefunktion der Hornhaut zurück. Gay et al. stellten in ihren Experimenten fest, dass bereits ab Temperaturen von 35°C Veränderungen an den interzellulären Lipiden des Stratum corneum („SC lipid transitions“) stattfinden. Eine herabgesetzte Viskosität des interzellulären „Mörtels“ vereinfache den Diffusionsprozess durch das nun flüssigere Medium.

Mit der durch die wIRA-Bestrahlung erhöhten Hauttemperatur lassen sich die gesteigerten Penetrationsraten unserer hydrophilen Testsubstanz, Natriumfluoreszein, begründen. Fraglich hingegen ist, warum sich die Penetrationskinetik der lipophilen Testsubstanz, Curcumin, nicht durch die erhöhte Temperatur beeinflusst zeigt.

5.2.2 Hautfeuchte

Der Feuchtigkeitsgehalt des Stratum corneum ist, verglichen zu den darunter liegenden lebenden Schichten der Epidermis, ausgesprochen gering. Während im Stratum granulosum noch einen Wassergehalt von ca. 70 % beobachtet wird, fällt dieser mit Erreichen des Stratum corneum schlagartig ab und erreicht in den äußersten Hornhautschichten, dem Stratum disjunctum, Werte um 15 % [7]. Der Wassergehalt des Stratum corneum unterliegt einer gewissen Dynamik und wird hauptsächlich durch folgende 3 Variablen beeinflusst:

- Struktur und Zusammensetzung des Stratum corneum
- Wassergehalt der Epidermis
- Äußere Temperatur und Luftfeuchtigkeit

Eine deutliche Zunahme des Feuchtigkeitsgehaltes erfährt das Stratum corneum insbesondere bei längerfristigem Kontakt mit Wasser oder bei Okklusionsverbänden.

Mit Zunahme seines Wassergehaltes nimmt die Permeabilität des Stratum corneum zu. Dies wird verschiedenen durch die Hydratation hervorgerufenen Veränderungen zugeschrieben, doch sind die genaueren Zusammenhänge bislang nicht vollends geklärt. Innerhalb des Stratum corneum führt Hydratation zu:

- einem veränderten Löslichkeitskoeffizient, so dass ein auf die Haut aufgetragener Stoff schneller in das Stratum corneum diffundiert
- einem Anschwellen der Korneozyten, hervorgerufen durch die Wasseraufnahme
- der Bildung von Wasserdomains („cisternae“) innerhalb des Stratum corneum [103] [104]
- Veränderungen an den interzellulären Lipidstrukturen bis hin zu einer „Aufspaltung“ ihrer spezifischen Anordnung [104]

Mit der durch die Bestrahlung mit wIRA hervorgerufenen Hydratation des Stratum corneum lassen sich die gesteigerten Penetrationsraten unserer hydrophilen Testsubstanz, Natriumfluoreszein, begründen. Fraglich hingegen ist, warum sich die Penetrationskinetik der lipophilen Testsubstanz, Curcumin, nicht durch die erhöhte Hydratation beeinflusst zeigt. Ein Erklärungsansatz ist folgender: Der Löslichkeitskoeffizient erhöht sich bei den hier vorliegenden Versuchen nur für die hydrophile Substanz: Durch die Hydrierung des Stratum corneum mittels wIRA wird die Hautoberfläche hydrophiler; der Übertritt der hydrophilen Substanz in die hydrierte, hydrophile Haut vereinfacht sich. Der Löslichkeitskoeffizient der lipophilen Testsubstanz verringert sich hingegen, so dass hier der Übertritt in die hydrierte Haut erschwert wird. Ein weiterer Erklärungsansatz für die unterschiedlichen Versuchsergebnisse ist in den so genannten „polar pathways“ zu suchen, Penetrationsrouten speziell für hydrophile Stoffe. So plädiert Sznitowska [50] für die Existenz polarer Mikrokanäle, die bei der Diffusion hydrophiler Komponenten durch das lipidreiche Stratum corneum wirken. Andere Autoren [103] [104] sprechen den bei Hydratation innerhalb des Stratum corneum entstehenden Wasserdomains („Cisternae“) die Funktion von Wasserkanälen zu, durch welche hydrophile Stoffe bei verkürzter Diffusionsstrecke einfacher diffundieren können.

5.2.3 Transepidermaler Wasserverlust

Wie zuvor beschrieben, korreliert der transepidermale Wasserverlust mit dem Grad der Barrierefunktion; je höher die TEWL-Werte, desto geringer die Barrierefunktion des Stratum corneum. Im Rahmen der hier vorliegenden Versuche konnte gezeigt werden, dass es durch wIRA zu einer Reduzierung der Barrierefunktion kommt. Eine reduzierte Barrierefunktion würde erwarten lassen, dass Substanzen ungeachtet ihrer Polarität ein Plus an Penetration erfahren. In der hier vorliegenden Untersuchung erfuhr jedoch nur das hydrophile Natriumfluoreszein eine Erhöhung seiner Penetrationsraten, nicht hingegen das lipophile Curcumin. Ein erhöhter TEWL-Wert bedeutet jedoch ebenfalls, dass der Wassergehalt des Stratum corneum erhöht ist. Dies wiederum schafft bessere Penetrationsbedingungen für hydrophile Substanzen.

5.3 Penetrationskinetik in Abhängigkeit vom Zeitpunkt der Bestrahlung

Die drei Versuchsmodi unterschieden sich hinsichtlich ihrer Bestrahlungsmodalitäten: Bei Modus A kam keinerlei Bestrahlung mit Infrarotstrahlung zum Einsatz. Bei den Modi B und C fand eine Bestrahlung mit wassergefilterter Infrarot-A-Strahlung statt, doch zu einem jeweils anderen Zeitpunkt: Bei Modus B wurde das Hautareal vor dem Applizieren der Probesubstanz dreissigminütig mit wIRA bestrahlt. Erst mit Abschluss der Bestrahlung wurde die Probesubstanz aufgetragen. Bei Modus C hingegen fand zuerst die Applikation der Probesubstanz und unmittelbar darauf die Bestrahlung mit wIRA statt, die dreissigminütige Einwirkzeit der Probesubstanz wurde hier zeitgleich durch die Strahlung begleitet.

5.3.1 Natriumfluoreszein

Wird die Haut vor dem Auftragen des Farbstoffes dreissigminütig mit Infrarotlicht bestrahlt, so finden sich verbesserte Penetrationsbedingungen im Vergleich zu unbestrahlter Haut. Da jedoch die Diffusion innerhalb des lipidreichen Stratum corneum ein langsamer Prozess ist, kann eine Vorbestrahlung der Haut, welche nur bis zum Applikationszeitpunkt reicht (= Modus B) die verbesserten Penetrationsbedingungen nicht in dem Maße aufrechterhalten, wie es eine Bestrahlung bewirkt, welche erst nach der topischen Applikation (= Modus C) des Farbstoffes beginnt, jedoch während der gesamten Einwirkperiode anhält. Abbildung 47 stellt in Form einer Skizze den Temperaturverlauf der drei Modi dar.

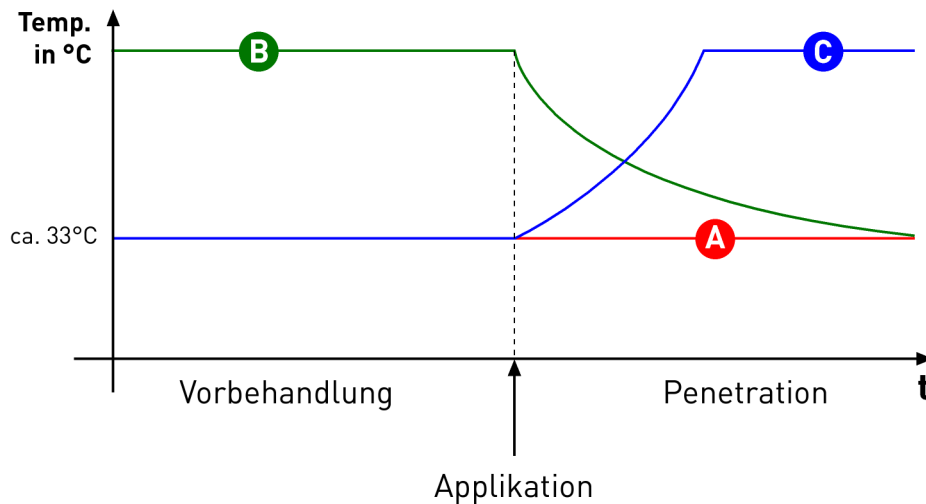


Abbildung 47: Skizze - Temperaturverlauf der 3 Modi

Um therapeutisch für hydrophile Substanzen erhöhte Penetrationsraten zu erzielen, bietet sich folglich ein Vorgehen nach Modus C an: Auftragen des Wirkstoffes und anschließende Bestrahlung der Haut mit wassergefilterter Infrarot-A-Strahlung. Eine Vorbehandlung der Haut mit wIRA (entsprechend Modus B) kombiniert mit einer die Penetration des Wirkstoffes begleitenden Bestrahlung (entsprechend Modus C) dürfte die höchsten Penetrationsresultate erbringen, für diese Konstellation fanden jedoch keine Versuche statt. Ein mögliches Einsatzgebiet für die Vorbestrahlung der Applikationsfläche mit wIRA (= Modus B) ist der Einsatz thermolabiler Substanzen.

5.3.2 Curcumin

Da wassergefilterte Infrarot-A-Strahlung die Penetrationskinetik des lipophilen Curcumin nicht beeinflusst, lassen sich keine vergleichenden Überlegungen bzgl. des Bestrahlungszeitpunktes machen.

5.4 Penetrationskinetik in Abhängigkeit von der Polarität

Die Ergebnisse unserer Versuchsreihe zeigen, dass eine penetrationsverstärkende Wirkung der Infrarotstrahlung entscheidend von der Polarität der verwendeten Modellschubstanz abhängt. Bei der Verwendung des hydrophilen Natriumfluoreszeins verursachte wIRA eine signifikante Verstärkung der Penetration, so dass sich hier auch tiefere Schichten des Stratum corneum mit Natriumfluoreszein anreicherten. Bei der Verwendung des lipophilen Curcumin hingegen führte wIRA keinesfalls zu einer verstärkten Penetration.

Bereits in früheren Arbeiten wurde gezeigt, dass die Penetration topisch applizierter Stoffe entscheidend von deren Polarität abhängt. Hierbei ergab die Mehrzahl der Studien, dass lipophile Substanzen stärker in das Stratum corneum penetrieren als hydrophile Studien. Auch bei unserer Studie zeigte sich, dass das lipophile Curcumin im Modus A, also ohne jegliche Bestrahlung, tiefer in die Hornhaut penetriert als das hydrophile Natriumfluoreszein.

Weitere Studien untersuchten, wie sich die Penetrationskinetik von hydrophilen bzw. lipophilen Substanzen unter einer Hydratation des Stratum corneum verändert: Hierbei kam die Mehrzahl der Studien zu dem Ergebnis, dass eine Hydratation des Stratum corneum insbesondere zu einer gesteigerten Penetration von lipophilen Stoffen führt, wohingegen hydrophile Stoffe in ihrer Penetration nicht oder nur geringfügig gefördert werden. Beispielsweise seien hier Bucks und Maibach angeführt [106], die postulierten, dass es unter Hydratationsbedingungen einen positiv-proportionalen Zusammenhang zwischen der Lipophilität eines Stoffes und seinen Absorptionsraten gibt. Die hier vorliegende Studie führte diesbezüglich zu konträren Resultaten:

Erfährt das Stratum corneum vermittels der Infrarotstrahlung eine Hydratation sowie einen Temperaturanstieg (Modus B, Modus C), so profitierte in unseren Versuchsreihen ausschließlich das hydrophile Natriumfluoreszein hiervon, indem es im Vergleich zu Modus A stärker in die Hornhaut penetrierte. Zur Klärung dieser unterschiedlichen Ergebnisse dient das folgende Kapitel.

5.4.1 Vergleich mit Hydratationsstudien

Bei der Okklusionstechnik kommt es, wie auch bei unseren Versuchsreihen, zu einer erhöhten Hydratation des Stratum corneum. Daher ist es nahe liegend, die Ergebnisse von Okklusionsstudien mit den unsrigen zu vergleichen:

Viele Studien haben sich der pharmakokinetischen Wirkung von Okklusiv-Verbänden gewidmet und deren penetrationsfördernden Eigenschaften gelten als gesichert. Doch nicht alle Substanzen erfahren durch die Okklusionstechnik eine verstärkte Penetration. So untersuchten Guy et al. [105] den Effekt von Okklusion auf die perkutanen Absorption von Steroiden am Menschen. Vier Steroide (Progesteron, Testosteron, Östrogen und Hydrokortison) wurden radioaktiv markiert und dann sowohl mittels Okklusiv-Verbandstechnik als auch ungeschützt topisch auf den ventralen Unterarm männlicher Probanden appliziert. Die Penetrationsraten wurden anhand der im Urin detektierten radioaktiv markierten ^{14}C -Atome bestimmt. Bis auf Hydrocortison erfuhren alle Steroide

eine gesteigerte Penetrationsrate. Guy stellte die Ergebnisse in Form einer Funktion dar, in welcher er die Absorptionsraten in Abhängigkeit vom Löslichkeitskoeffizienten $\text{Log } K_o/w$ des jeweiligen Steroids abbildete. Siehe Abbildung 48.

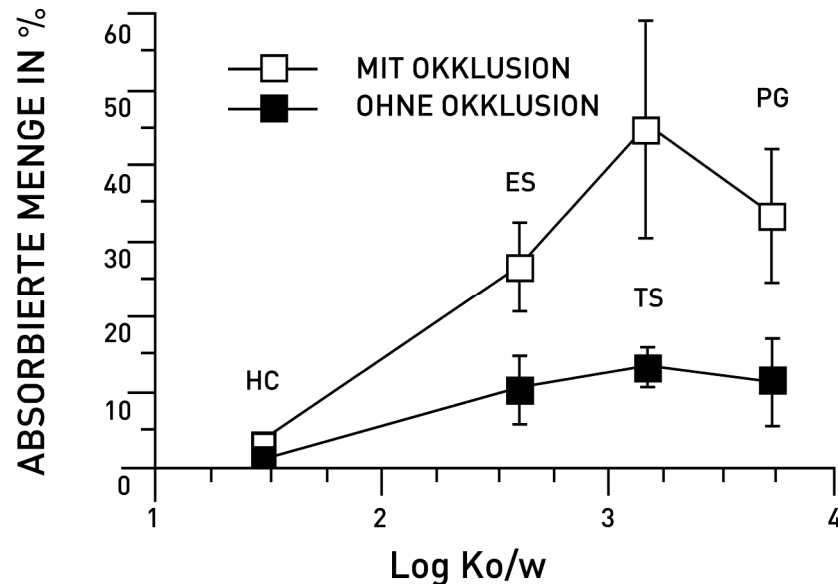


Abbildung 48: Perkutane Absorption von 4 Steroiden in Abhängigkeit des Octanol/Wasser-Löslichkeitskoeffizienten, nach [105]

In Abbildung 36 verwendete Abkürzungen:

HC = Hydrokortison ES = Östrogen

TS = Testosteron PG = Progesteron

Aufgrund der Studienergebnisse schloss Guy, dass die perkutane Absorptionsrate unter Okklusion mit zunehmenden Löslichkeitskoeffizienten $\text{Log } K_o/w$ zunimmt.

Bucks und Maibach kamen zu ähnlichen Ergebnissen: Sie untersuchten die perkutane Absorption von Phenolen unter Okklusionsbedingungen und es zeigte sich, dass die beiden Testsubstanzen mit dem geringsten $\text{Log } K_o/w$ auch die geringste Penetrationsverbesserung erfuhren. Aufgrund dieser Ergebnisse postulierten sie, dass es unter Okklusion / Hydratation einen positiv-proportionalen Zusammenhang zwischen der Lipophilität eines Stoffes und seinen Absorptionsraten gibt. Okklusion hydriert das Stratum corneum. Wäre der Effekt dieser Hydratation ausschließlich, die Viskosität der interzellulären Lipide zu variieren, so müssten alle Substanzen, unabhängig von ihrer Polarität, durch Okklusion eine gesteigerte Penetration erfahren. Dies jedoch widerspricht ihren Beobachtungen. Daher postulieren sie, dass durch die Hydratation des Stratum corneum der Penetrationsschritt vom ansonsten eher lipophilen Stratum corneum in die lebende Epidermis, eher hydrophil, erleichtert wird. Beide Zonen werden bzgl. ihrer Polarität ähnlicher, hydrophiler [106].

Unsere Versuchsergebnisse zeigen im Vergleich zu eben genannten Studien konträre Ergebnisse: Durch die Hydratation des Stratum corneum kam es zu einer erhöhten Penetration der hydrophilen Testsubstanz, nicht jedoch zu einer erhöhten Penetration der lipophilen Substanz. Begründen ließe sich dies mit einem durch die Hydratation erniedrigten Löslichkeitskoeffizienten zwischen hydrophiler Testsubstanz und normalerweise eher lipophilem, nun aber hydrophilerem Stratum corneum. Der Übertritt der hydrophilen Substanz von außen in das Stratum corneum wird hierdurch erleichtert. Da unsere Versuchsreihe sich ausschließlich auf die Penetrationskinetik innerhalb des Stratum corneum und nicht auf die lebende Epidermis bezieht, können keine Aussagen zum Übertritt der Testsubstanz in die lebende Epidermis gemacht werden.

Als Erklärung für die konträren Ergebnisse daher folgende These: wIRA beschleunigt den Eintritt von hydrophilen Substanzen ins Stratum corneum (unsere Studie) und beschleunigt den Übertritt lipophiler Substanzen in die lebende Epidermis (Okklusionsstudien von Guy, Buck & Maibach).

5.4.2 Vergleich mit weiteren wIRA-Studien

Bankova et al. [94] untersuchten den Einfluss wassergefilterter Infrarot-A-Strahlung auf die Penetration topisch applizierter Glukokortikoide. Die durch die Glukokortikoide hervorgerufene Vasokonstriktion maßen sie anhand der Hautbleichung, was ihnen Rückschlüsse auf die Stärke der transdermalen Penetration gestattete. So konnten sie beweisen, dass wIRA-Strahlung die Penetration des lipophilen Glukokortikoids verstärkte. Da lipophiles Curcumin bei unserer Versuchsreihe keinerlei penetrationsverstärkenden Effekt durch wIRA erfuhr, stellt sich die Frage, wieso es hier zu unterschiedlichen Ergebnissen kam. Die Untersuchungen von Bankova nutzten die Vasokonstriktion zur Beurteilung der stattgefundenen Penetration. Um jedoch eine solche biologische Antwort hervorzurufen, muss das von ihm verwendete Glukokortikoid zuvor die gesamte Epidermis durchdrungen haben, um die Blutgefäße zu erreichen. Unsere Messungen bezogen sich ausschließlich auf die Verteilung des lipophilen Curcumins innerhalb des Stratum corneum. Ein Erklärungsansatz für die unterschiedlichen Ergebnisse hinsichtlich lipophiler Substanzen wäre, ähnlich dem vorangegangenen Kapitel, folgender: Die durch wIRA hervorgerufene Hydratation führt zu einem „hydrophileren“ Stratum corneum. Dies erschwert den Übertritt der lipophilen Testsubstanz in das Stratum corneum. Folglich fanden wir keine gesteigerten Penetrationsraten für das lipophile Curcumin. Betrachtet man jedoch zusätzlich noch den Übertritt der lipophilen Testsubstanz vom Stratum corneum hin zur lebenden Epidermis, wie bei Bankovas Versuch, könnte folgendes gelten: Das ansonsten

eher lipophile Stratum corneum wird durch die Hydratation „hydrophiler“. Es ähnelt nun in seiner Polarität stärker der „hydrophilen“, lebenden Epidermis. Hierdurch könnte der Eintritt des Glukokortikoids in die lebende Epidermis erleichtert werden: Der Übertritt vom hydrophilen Stratum corneum zu hydrophilem Stratum granulosum ist für lipophile Substanzen einfacher als der Übertritt von lipophilem Stratum corneum zu hydrophilem Stratum graunulosum. Dies könnte die im Vergleich zu unseren Ergebnissen konträren Resultate Bankovas erklären.

5.4.3 Polare Penetrationsrouten

Wie in der Einleitung geschildert, gibt es das Modell spezieller polarer Routen, welche polaren Penetranten die Diffusion durch die lamelläre Lipidmatrix des Stratum corneum erleichtern. Wäre es denkbar, dass durch die wIRA-Strahlung insbesondere diese polaren Routen förderlich beeinflusst werden? Dies wäre ein weiterer Erklärungsansatz, den penetrationsfördernden Effekt der wIRA-Strahlung auf das hydrophile Natriumfluoreszein zu erklären.

Viele Forschungsarbeiten widmen sich mathematischen Modellen, mit Hilfe derer sich quantitativ die Penetration einer Substanz vorhersagen lässt. Eine der führenden Gleichung, von Potts und Guy entwickelt [110], berücksichtigt insbesondere das Molekulargewicht sowie den Oktanol-Wasser-Verteilungskoeffizient des Penetranten. Diesem Modell liegt die Annahme zugrunde, dass alle Moleküle, ungeachtet ihrer spezifischen chemischen Eigenschaften, entlang einer identischen Route penetrieren. Andere Modelle hingegen berücksichtigen die Vorstellung gesonderter Routen für hydrophile Substanzen: Für diese oftmals als „polar pathways“ bezeichneten Penetrationsrouten gibt es verschiedene Erklärungsmodelle: Die Hornhaut besteht aus 10 bis 15 einzelnen Korneozyten-Schichten, zwischen welchen sich jeweils ca. 10 lamelläre Lipidmembranen nachweisen lassen. Dass eine hydrophile Substanz auf ihrer interzellulären Passage durch das Stratum corneum ungefähr 100 dieser Lipidschichten vermittels Diffusion durchdringt, wie dies für hydrophobe Substanzen angenommen wird, scheint unwahrscheinlich. Die Existenz spezieller „Poren“ innerhalb der Lipidmembranen, durch welche hydrophile Substanzen vereinfacht diffundieren können, wird daher angenommen. Sznitowska [50] entwickelte ein Modell polarer Mikrokanäle, welche innerhalb der interzellulären Lipidmatrix angesiedelt sind und somit deren Kontinuität durchbrechen.

Denkbar wäre folglich, dass durch den Einsatz der wassergefilterten Infrarot-A-Strahlung innerhalb unserer Versuche insbesondere diese gesonderten Penetrationsrouten beeinflusst werden.

Bouwstra untersuchte 2003 [21] die Verteilung des zusätzlichen Wassers bei einer Hydratation der Hornhaut: Bei niedrigen Hydratationsraten wird Wasser in die einzelnen Keratinozyten aufgenommen, woraus eine Schwellung dieser resultiert; es findet sich kein extrazelluläres Wasser. Bei höheren Hydratationsraten hingegen kommt es zusätzlich innerhalb der interzellulären Regionen zur Ausbildung von Wasserdomänen (siehe Abbildung 49). Diese Wasserdomänen, welche auf elektronenmikroskopischen Fotos gut zu erkennen sind [103], weisen eine ovale Form auf, um die Kontaktfläche zur hydrophoben Nachbarschaft gering zu halten. Das solche Wasseransammlungen ähnlich den Mikrokanälen als polare Routen fungieren, scheint möglich, wurde jedoch bislang nicht bestätigt. Im Hinblick auf unsere Versuche könnte argumentiert werden, dass durch die Hydratation mittels wIRA eben solche Wasserdomänen vermehrt entstanden sind, welche den verstärkten Fluß der polaren Substanz Natriumfluoreszein erklären.

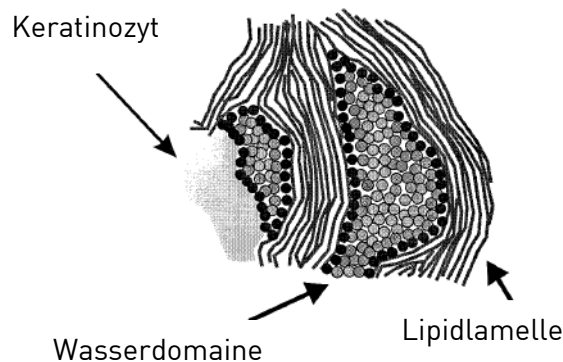


Abbildung 49: durch Hydratation verursachte Wasserdomänen

5.5 Reservoirfunktion

Das Stratum corneum ist ein effizientes Reservoir für topisch applizierte Substanzen. Das Reservoir ist charakterisiert durch eine spezifische Verteilung einer Substanz innerhalb des Stratum corneum. Diese Verteilung korreliert mit der Effizienz der applizierten Substanz, die Barriere zu durchdringen, also, die lebenden Zellen zu erreichen. Wurde das hydrophile Natriumfluoreszein ohne Bestrahlung auf die Haut appliziert, so wurde nahezu die gesamte Menge nur innerhalb der obersten Keratinozytenzellschichten gefunden. Nur geringe Mengen an Natriumfluoreszein wurden auf den Klebestreifen Nr. 4 bis 10 gefunden, wobei vorhergehende Studien gezeigt haben, dass diese kleinen Mengen hauptsächlich in den Haarfollikeln lokalisiert sind [97]. Die Penetration in tiefere Zellschichten war nicht effizient und benötigt eine lange Zeit. Doch Zeit ist bei dieser oberflächlichen Reservoirbildung ein limitierender Faktor, da die oberste Schicht des Stratum corneum innerhalb von 24 Stunden aufgrund von Desquamation abgestoßen wird. Daher wird der größte Teil des topisch

applizierten Natriumfluoreszein verloren gehen, ohne zuvor die lebenden Zellen erreicht zu haben. Eine biologische Antwort kann in diesem Fall nicht erwartet werden. Ganz anders ist die Situation, wenn die Haut mit wIRA bestrahlt wird. In diesem Falle penetriert die hydrophile Testsubstanz deutlich effizienter in das Stratum corneum. Innerhalb von 30 Minuten wird das Reservoir bis zur 5. Zellschicht der Hornhaut aufgebaut. In diesem Fall ist die Penetration schnell und wird nicht sonderlich durch Desquamation beeinträchtigt. Im Bezug auf eine Medikamentenapplikation darf eine biologische Antwort erwartet werden.

Im Kontrast zum hydrophilen Natriumfluoreszein zeigte das lipophile Curcumin keinerlei Unterschied im Penetrationsverhalten, ob eine Bestrahlung stattfand oder nicht.

5.6 Laser-Scan- Mikroskopie versus Abrisstechnik

Die Laser-Scan-Mikroskopie (LSM) ermöglicht es, die Penetration topisch applizierter Fluoreszenz-Farbstoffe in vivo zu beurteilen. Für die hier vorliegende Versuchsreihe waren daher explizit Testsubstanzen mit fluoreszierenden Eigenschaften ausgewählt worden, welche innerhalb der Haut mittels Laser-Scan-Mikroskopie detektiert werden können. Indem der Laser die Farbstoffe intrakutan anregte, konnte simultan das hierdurch emittierte, aus der Fokusebene stammende Fluoreszenzsignal vom Mikroskop erfasst und zur Bilddarstellung verwendet werden. Die Verteilung der Testsubstanzen innerhalb der Haut konnte somit an den Probanden in-vivo visualisiert werden. Durch die progressive Verlagerung der Fokusebene in die Tiefe konnte zudem die Penetrationstiefe der applizierten Testformulierungen beurteilt werden. Indem das tiefste Fluoreszenz-Signal aufgesucht wurde, konnte die Stärke der stattgefundenen Penetration beurteilt werden. Die Ergebnisse der Laser-Scan-Mikroskopie (LSM) stimmten mit jenen überein, die mit Hilfe der Abrisstechnik gewonnenen wurden: So konnte Natriumfluoreszein in tieferen Hornhautschichten nachgewiesen werden, wenn es zu einer Bestrahlung der Haut mit wIRA kam. Wurden hier die Modi B und C miteinander verglichen, so verursachte Modus C (Applikation, dann Bestrahlung) eine tiefere Penetration als Modus B (Bestrahlung, dann Applikation).

Wurden hingegen die Penetrationsprozesse von Curcumin mittels LSM untersucht, so ließ sich keine veränderte Penetrationskinetik unter Infrarotbestrahlung feststellen, die 3 Modi A, B und C unterschieden sich nicht voneinander.

Eine absolute Quantifizierung der detektierten Fluoreszenz-Stoffe war mittels LSM-Technik nicht möglich, hier lieferte ausschließlich die Abrisstechnik mit anschließender Spektroskopie Messwerte.

Das Laser-Scan-Mikroskop erwies sich als geeignete Methode zur Visualisierung von Hautstrukturen, der Lokalisation fluoreszierender Proben sowie der Beurteilung von Penetrationsvorgängen innerhalb des Stratum corneum. Der nicht-invasive Charakter der Methode sowie die Tatsache, dass es wenig oder keiner Vorbereitung des zu untersuchenden Gewebes bedarf, waren Vorteile der Methode. Darüber hinaus belohnte der Einsatz des LSM mit spektakulären Einsichten in das zelluläre Gefüge des Stratum corneum. Schnell und unkompliziert war eine vertikale Verlagerung der Fokusebene möglich, so dass eine dreidimensionale Visualisierung des Gewebes möglich war. In kürzester Zeit konnten somit Ergebnisse in vivo erzielt werden, während die bei der Abrisstechnik gewonnenen Zell-Farbstoff-Gemische im Labor erst aufwändig aufbereitet werden mussten.

Nichtsdestotrotz weist die Laser-Scan-Mikroskopie Einschränkungen auf, die bei der Versuchsplanung bedacht werden müssen: Die LSM-Methode ergibt bestenfalls semiquantitative Ergebnisse, da es nicht möglich ist, Fluoreszenz-Signale auf ihre Intensität hin zu untersuchen. Die Abrisstechnik mit anschließenden spektroskopischen Messungen bietet hier exakte Mengenangaben. Des Weiteren ist die Laser-Scan-Mikroskopie an fluoreszierende Testsubstanzen gebunden. Dies schränkt die Auswahl der Testformulierungen ein. Es ist zwar möglich, Fluoreszenz-Stoffe an eine gewünschte Testsubstanz zu koppeln, doch könnte dies zu Änderungen der Penetrationskinetik führen und das Ergebnis verfälschen. Kam es bei den hier vorliegenden Versuchen zu einer besonders dichten Ansammlung der fluoreszierenden Testsubstanzen, beispielsweise an der Hautoberfläche oder in Haarfollikeln, so erschwerte dies die Beurteilung der Penetration. Hier waren die Fluoreszenzsignale so stark, dass sie in benachbarte Hautareale „strahlten“ und es infolgedessen hier nicht immer gelang, Fluoreszenz-Signale eindeutig einer entsprechenden Tiefe zuzuordnen.

Die Auswahl zweier optischer Untersuchungsmethoden kann resümierend als gelungen bezeichnet werden. Sowohl konfokale Laser-Scan-Mikroskopie als auch Abrisstechnik waren gut geeignet, das Penetrationsverhalten topisch applizierte Stoffe zu beurteilen. Miteinander kombiniert ermöglichten die Untersuchungsmethoden sowohl Visualisierung als auch Quantifizierung des untersuchten Prozesses.