

2. Material und Methoden

2.1 Probandenkollektiv und Vorbereitung der Probanden

Die Untersuchungen für die vorliegende Arbeit wurden an sechs hautgesunden Männern im Alter zwischen 22 und 27 Jahren durchgeführt. Die drei verwendeten Methoden (Laser-Scan-Mikroskopie, Laser-Doppler-Blutflussmessung, Abrissmethode) wurden von der Ethik-Kommission der Charité genehmigt.

Die Probanden wurden schriftlich und mündlich über die bei ihnen anzuwendenden Methoden informiert. Sie erklärten schriftlich ihr Einverständnis.

Vor Beginn der Untersuchung fand eine Bestimmung verschiedener Hautparameter statt. Es wurden der pH-Wert der Haut mit dem Skin-pH-Meter[®] PH 900, die Hautfeuchte mit dem Corneometer[®] CM 820, der Hauttalg mit dem Sebumeter[®] SM 810 und der transepidermale Wasserverlust (TEWL) mit dem Tewameter[®] TM 210 gemessen. Alle genannten Geräte stammen von der Firma Courage + Khazaka electronic GmbH, Köln, Deutschland.

Die Probanden wurden zu drei verschiedenen Zeitpunkten untersucht und angewiesen, sich an diesen Tagen der Untersuchungen weder die Unterarme zu waschen noch Cremes oder andere Kosmetika aufzutragen. Unmittelbar vor Beginn jeder Untersuchung wurden die Unterarme unter fließendes lauwarmes Wasser für 8 sec abgespült, um eventuell vorhandene exogene Störfaktoren zu entfernen. Anschließend wurden die Unterarme mittels eines Zellstofftuches vorsichtig trocken getupft und sichtbare Haare an der Innenseite der Unterarme mit Hilfe einer Schere abgeschnitten. An beiden Unterarminnenseiten wurden je Versuchstag jeweils zwei 4 x 5 cm² große Areale (Areale A, B, C, D) mit einem wasserfesten Stift (STABILO OHPen universal, Deutschland) markiert und mit Window-Color-Farbe (Art-Glass, WACO, Heinrich Wagner, Fulda, Deutschland) begrenzt, um das laterale Spreiten der aufgetragenen Substanz zu verhindern [56, 57] (Abb. 4).

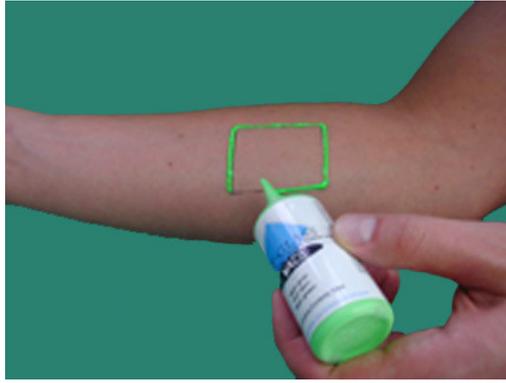


Abb. 4: Applikationsfläche (schwarz) umgeben von der Window-Color-Begrenzung (grün)

2.2 Barrierecremes

Zur Evaluierung der Laser-Scan-Mikroskopie, Laser-Doppler-Blutflussmessung und der Abrissmethode wurden drei verschiedene Barrierecremes ausgewählt. Zusätzlich fanden die Untersuchungen auch an nicht vorbehandelter Haut, dem Referenzareal (Areal A), statt.

Barrierecreme B: Vaseline (H. Hagner GmbH & Co., Freudenstadt, Deutschland) zum Schutz vor rissiger Haut und Eindringen von Flüssigkeit in die Haut. Bestandteile: Petrolatum.

Barrierecreme C: 3M™ Cavilon™ (3M Medica, 3M Deutschland GmbH, Neuss, Deutschland) ist ausgewiesen, nach Applikation auf gesunde oder geschädigte Haut eine wasserfeste Langzeit-Barriere zu bilden. Bestandteile: Dimethicone, Wasser, Dikapryladipat, Kokosnußöl, PPG(15) Stearyläther, Dipropylenglykol, Isopropylpalmitat, Mineralöl, Äthylen/ Acrylsäure-Kopolymer, Akrylat-Terpolymer, Paraffin, Magnesiumsulfat, Propylenglykol, Duftstoffe, Diazolidinyl Urea, Methylparaben, Propylparaben.

Barrierecreme D: Lindesa (FAWECO Hautschutz GmbH & Co.KG, Ludwigshafen, Deutschland) ist eine Barrierecreme, welche geeignet sei für den Umgang mit Lacken, Ölen, Benzenen, Harzen und organischen Lösungsmitteln. Bestandteile: Wasser, Talk, Paraffinum Liquidum, Stearic Acid, Glycerin, Cetearyl Alcohol, Octyldecanol, Cera Alba, Cellulose Gum, Sodium Cetearyl Sulfate, Ascorbic Acid, Sodium Hydroxide, Methylparaben, Propylparaben, PEG-8, Tocopherol, Ascorbyl Palmitate, Parfum, Amyl Cinnamal, Benzyl Benzoate, Benzyl Salicylate, Citronellol, Coumarin, Limonene, Geraniol, Hydroxyisohexyl 3-Cyclohexenecarboxaldehyde, Isoeugenol, Linalool, Cinnamyl Alcohol, Alpha- Isomethyl Ionone, Butylphenyl Methylpropional.

Mittels einer stumpfen Spritze wurden je 4 mg/cm^2 der Barrierecremes in die zugehörigen Areale (B, C bzw. D) aufgetragen (Abb. 5). Die Barrierecremes wurden mit Hilfe eines in der entsprechenden Barrierecreme gesättigten Fingerlings homogen verteilt (Abb. 6). Die Einwirkzeit betrug jeweils 15 min. Bei den Probanden wurden im Abstand von je einer Woche mit drei verschiedenen Methoden vier Hautareale untersucht, von denen drei mit unterschiedlichen Barrierecremes vorbehandelt wurden. Mit Hilfe der Laser-Scan-Mikroskopie und der Abrissmethode wurde die Penetration von Natriumfluoreszein untersucht, mittels der Laser-Doppler-Blutflussmessung die Penetration von Glyceroltrinitrat.

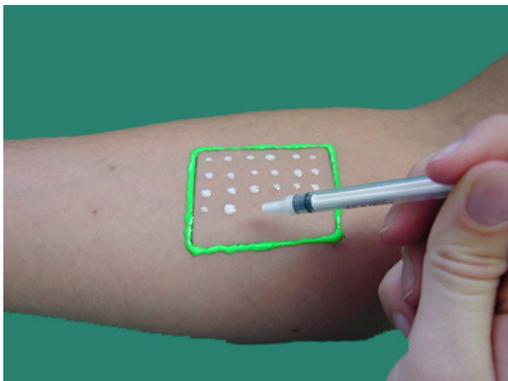


Abb. 5: Applikation der Barrierecreme

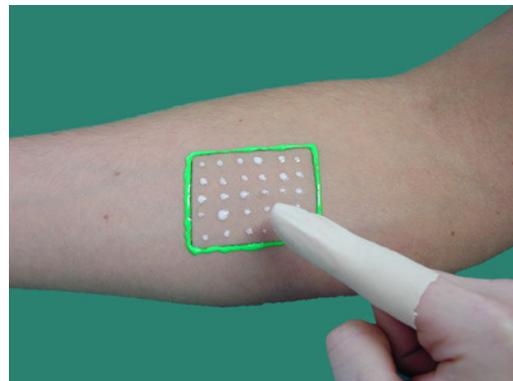


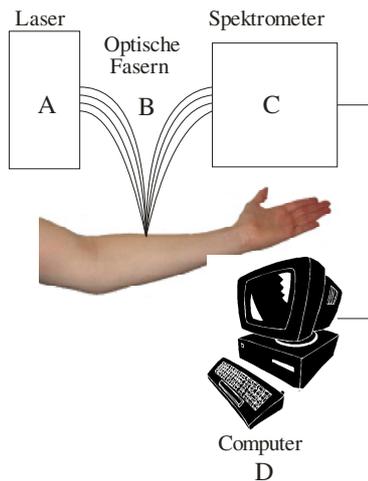
Abb. 6: Homogene Verteilung mit einem gesättigten Fingerling

2.3 Methode 1: Laser-Scan-Mikroskopie

2.3.1 Aufbau und Funktionsweise des Laser-Scan-Mikroskops

Die Untersuchungen wurden mit dem dermatologischen Laser-Scan-Mikroskop „Stratum“ (OptiScan, Medizinelektronik Fred Lawrenz Vertriebs GmbH, Bad Soden, Deutschland) durchgeführt. Der Aufbau des Laser-Scan-Mikroskops ist in Abb. 7 schematisch dargestellt. Um den Fluoreszenzfarbstoff Natriumfluoreszein anzuregen, wird die Strahlung eines Ar^+ -Lasers (A) mit einer Wellenlänge 488 nm verwendet. Die Strahlung des Argon-Lasers wird über optische Fasern (B) dem Scannig-System der Handsonde zugeführt, welches ein Hautareal von $200 \mu\text{m} \times 200 \mu\text{m}$ homogen ausleuchtet. Das Fluoreszenz-Signal wird durch eine Linse gesammelt und anschließend durch optische Fasern (B) einem Spektrometer (C) zugeführt. Das Spektrometer ist

mit einem Mess- und Steuercomputer (D) verbunden. Der Tiefenscan wurde mit Hilfe einer manuellen Änderung der Fokusposition durch Verwendung der Belichtungstiefensteuerung des Handstücks durchgeführt [37, 43].



a) Schematischer Aufbau



b) Laser-Scan-Mikroskop

Abb. 7: Laser-Scan-Mikroskop „Stratum“

2.3.2 Auftragen von Natriumfluoreszein

Am ersten Untersuchungstag wurden nach dem Auftragen der drei verschiedenen Barrierecremes B, C und D auf die entsprechenden Hautareale und einer Einwirkzeit von 15 min vier mit 1,5%iger Natriumfluoreszeinlösung gesättigte Filterpapiere mit einer Größe von 1,5 x 1,5 cm² auf die Areale A, B, C und D aufgelegt. Auf das Referenzareal A wurde das gesättigte Filterpapier ohne Vorbehandlung mit einer Barrierecreme aufgelegt, um so den normalen Penetrationsweg von Natriumfluoreszein darzustellen. Nach einer Einwirkzeit von fünf Minuten erfolgte die Entfernung der Filterpapiere und der Randwalle.

Aus Vorversuchen ging hervor, dass es nötig war, den Überstand der Barrierecreme und des Natriumfluoreszeins zu entfernen, um eine optimale Bildqualität zu erreichen. Für diesen Vorgang kamen zwei Möglichkeiten in Betracht:

1. das Entfernen des Überstands mit Hilfe eines Zellstofftuches durch mehrmaliges Abwischen,
2. das Entfernen des Überstand mittels eines Zellstofftuches durch einmaliges Wischen mit geringem Druck.

Es konnte in Vorversuchen gezeigt werden, dass durch mehrmaliges Wischen die durch die Barrierecreme hergestellte Schutzbarriere beeinträchtigt wird und so Natriumfluoreszein in die Hornschicht eindringen kann. Hingegen konnte für das einmalige Wischen keine Beeinträchtigung der Wirkung der Barrierecreme festgestellt werden und wurde so als optimale Methode zur Entfernung des Überstands in das Versuchsprotokoll aufgenommen.

2.3.3 Messung mit dem Laser-Scan-Mikroskop

Die Handsonde des Laser-Scan-Mikroskops wurde auf die vorbehandelten Hautareale A, B, C und D aufgebracht (Abb. 8). Die Schichten des Stratum corneum wurden in verschiedenen Tiefen und auch in unterschiedlichen Gebieten der Natriumfluoreszein-Applikationsfelder auf Penetration von Natriumfluoreszein untersucht und die Bilder digital auf dem Computer gespeichert.



Abb. 8: Aufbringen der Handsonde des Laser-Scan-Mikroskops

2.3.4 Darstellung der Ergebnisse

a) Bearbeitung der digitalen Bilder

Mit Hilfe des Computerprogramms Adobe® Photoshop® CS 8.0.1 erfolgte die Auswertung der digitalen Laser-Scan-Mikroskopie-Bilder.

b) Auswertung der digitalen Bilder

Die Bildanalyse wurde anhand des Vorhandenseins und der Stärke des Fluoreszenzsignals durchgeführt. Für den statistischen Vergleich der gewonnenen Ergebnisse war es nötig, eine Skala zu entwerfen, welche die Wirksamkeit der jeweiligen Barrierecreme numerisch wiedergibt. In Tabelle 1 sind die Skalenwerte und ihre entsprechenden Beschreibungen wiedergegeben.

Tab. 1: Bewertungsskala zur Beschreibung der digitalen Laser-Scan-Mikroskopie-Bilder

Skalenwert	Beschreibung des entsprechenden Wertes
1	absolute Barriere, es kann kein Natriumfluoreszenzsignal nachgewiesen werden, Wirksamkeit der Barrierecreme sehr gut
2	Zellkomplexe und Hautfurchen weisen ein deutliches Fluoreszenzsignal auf, Wirksamkeit der Barrierecreme gering
3	Starkes Fluoreszenzsignal innerhalb und außerhalb der Korneozyten und in den Furchen, normales Penetrationsverhalten bzw. keine Wirksamkeit der Barrierecreme

2.4 Methoden 2: Laser-Doppler-Blutflussmessung

2.4.1 Aufbau des Laser-Doppler-Messsystems

Zur Messung der Mikrozirkulation der Dermis wurde das Laser-Doppler-Messsystem der Firma Laser Messtechnik Berlin GmbH (LMTB GmbH) verwendet, welches an einen Laptop angeschlossen ist. Das Laser-Doppler-Messsystem besteht aus einem Messkopf mit einem Durchmesser von 3 cm und einer Höhe von 1,5 cm. Der Messkopf enthält eine Laserdiode, die einen Lichtstrahl mit einer Wellenlänge $\lambda = 685 \text{ nm}$ erzeugt. Der Lichtstrahl ist senkrecht in das Gewebe fokussiert und bestrahlt eine Fläche von 7 mm^2 . Das reflektierte Licht enthält die Dopplerverschiebung und wird von zwei ebenfalls im Messkopf enthaltenen Photodioden registriert. Im Messkopf und in der PC-Einsteckkarte erfolgt eine Verstärkung des empfangenen Signals. Dieses wird im Bereich von 0,2 – 40 kHz digitalisiert und mit Hilfe der Fast-Fourier-Transformation ein Frequenzspektrum von 0 – 30 kHz berechnet. Zur Unterscheidung des relativen Blutflusses im Stratum papillare (repräsentiert vorwiegend den

Mikrokapillarbereich) und Stratum retikulare (repräsentiert vorwiegend den Makrokapillarbereich) wurde das Frequenzspektrum in zwei Bereiche unterteilt, 0 – 5 kHz (Mikrokapillarbereich) und 5 – 30 kHz (Makrokapillarbereich) [58]. Der Wert für den relativen Blutfluss ergibt sich aus den gemittelten Messwerten der separierten Frequenzspektren über die Messdauer. Die Berechnung hierfür erfolgte durch ein von der Laser und Medizintechnik GmbH (Berlin, Deutschland) erstelltes Softwareprogramm zur Steuerung und Darstellung der Messwerte des Laser-Doppler-Messsystems.

In Vorversuchen wurde untersucht, inwieweit die zwei Frequenzbereiche zur Analyse der Beeinflussung der oberflächlichen Hautdurchblutung durch Glyceroltrinitrat geeignet sind. Hierbei stellte sich heraus, dass der Mikrokapillarbereich (0 – 5 kHz) große Abweichungen innerhalb der Messwerte in wiederholten Messungen zeigte. Dies beruht möglicherweise darauf, dass der Mikrokapillarbereich leicht durch Umwelteinflüsse beeinträchtigt werden kann. Der Makrokapillarbereich hingegen zeigte auch in wiederholten Messungen reproduzierbare Messwerte. Aus diesem Grunde wurden für die vorliegende Arbeit nur die Messwerte des Makrokapillarbereichs (5 – 30 kHz) näher betrachtet.

An der Unterseite des Messkopfes wurde ein Metallring mit einem Außendurchmesser von 3 cm, einem Innendurchmesser von 2 cm und einer Höhe von 2 mm angebracht, um einen direkten Kontakt des Messkopfes mit der Haut zu vermeiden.

Ein Messzyklus bestand aus 30 sec Messung und 30 sec Pause. Während der Pause wurde der Messkopf vom Messareal abgenommen und auf die Messkopfhalterung gelegt, um einen okklusiven Effekt und damit eine eventuell auftretende erhöhte Penetration des Glyceroltrinitrats zu vermeiden [59, 60].

2.4.2 Vorbereitungen für die Laser-Doppler-Blutflussmessung

Für den zweiten Untersuchungstag wurden die Probanden angewiesen, sich nicht stark körperlich zu betätigen. Die Probanden wurden für die Messungen auf einer Liege in Rückenlage gelagert. Diese Position nahm jeder Proband mindestens 15 min vor Beginn des Versuches ein, um eine Akklimatisierung der Probanden an die konstanten Raumbedingungen (Temperatur: 23°C, Luftfeuchtigkeit: 55%) zu ermöglichen. Zuvor wurden die Unterarme, wie unter 2.1 beschrieben, gewaschen. Um reproduzierbare Messwerte zu erhalten, wurden vor der eigentlichen Messung Probemessungen an der Unterarminnenseite der Probanden zum Auffinden von vier geeigneten Messarealen durchgeführt. Hierbei wurde darauf geachtet, dass der Messkopf gleichmäßig und flach der Haut auflag (Abb. 9) und sich nicht auf einer großen

oberflächlichen Vene befand. Ein Areal konnte als Messareal erklärt werden, wenn die oben genannten Bedingungen erfüllt waren und drei aufeinander folgende Messintervalle reproduzierbare Messwerte für unbehandelte Haut ergaben. Anschließend wurde dieses Areal (Messkopfareal) mit einem wasserfesten Stift markiert. Um dieses kreisrunde Feld erfolgten die Markierung des Barrierecremeareals und eine Umzäunung mit Window-Color-Farbe entsprechend des unter 2.1 angegebenen Verfahrens.

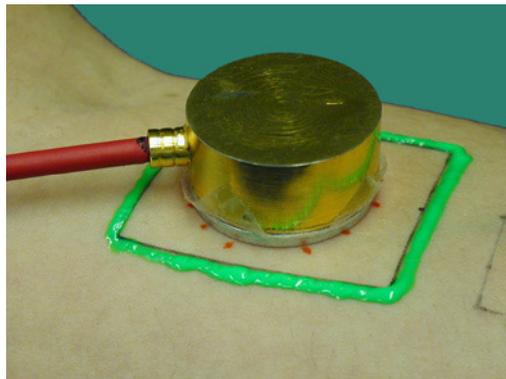


Abb. 9: Auflegen des Messkopfes

2.4.3 Messung der basalen Blutmikrozirkulation

Zu Beginn wurde die basale Blutzirkulation bestimmt. Hierfür wurde der Messkopf auf das Messkopfareal aufgelegt und es erfolgten 15 Messzyklen.

2.4.4 Auftragen von Glyceroltrinitrat

Das Auftragen der Barrierecremes erfolgte wie unter 2.1 beschrieben. Nach einer Penetrationszeit von 15 Minuten erfolgte die Applikation von Glyceroltrinitrat (Aquo-Trinitrosan[®], Merck KgaA, Darmstadt, Deutschland). Auf dem Referenzareal erfolgte nur das Auftragen von Glyceroltrinitrat.

Bei dem verwendeten Produkt handelt es sich um in Wasser gelöstes Glyceroltrinitrat, welches die Durchblutung fördert. Im klinischen Alltag wird es intravenös zur Behandlung von Angina pectoris eingesetzt. Ein Auftragen des Glyceroltrinitrats auf die Haut herzgesunder Probanden ist ohne kardiale Nebenwirkungen möglich, da die systemisch wirksame Konzentration, die über die Haut aufgenommen wird, zu gering ist.

Das Applizieren des Glyceroltrinitrat erfolgte analog des Natriumfluoreszeins mit Hilfe von runden Filterpapieren mit einem Durchmesser von 1,5 cm. Die Filterpapiere wurden für 10 min in Glyceroltrinitrat gesättigt und mittels einer Pinzette auf die kreisrunde für den Messkopf markierte Fläche für fünf Minuten gelegt. Danach wurde das Filterpapier wieder abgenommen und Überstand mit Hilfe eines Zellstofftuches entfernt.

2.4.5 Messung der Blutmikrozirkulation

Es erfolgten 20 Messzyklen auf jedem Messkopfareal zur Bestimmung der Mikrozirkulation nach dem Auftragen des Glyceroltrinitrat. Im Anschluss an jede Messung wurde die Messkopfunterfläche beziehungsweise die Unterlegscheibe mit einem Papiertuch gereinigt, um ein Verrutschen des Messkopfes auf der Creme zu verhindern.

Nach Abschluss der Messungen für ein Messareal wurden die Unterlegscheibe und der Messkopf mit einem Desinfektionsmittel (Softasept[®]N, B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) gereinigt.

2.4.6 Darstellung der Ergebnisse

a) Erstellung von Grafiken

Die Darstellung der Ergebnisse erfolgte mit Hilfe der Computerprogramme Excel[®]2000 und SPSS 12.0 für Windows.

2.5 Methode 3: Abrissmethode

2.5.1 Auftragen von Natriumfluoreszeins

Am dritten Untersuchungstag erfolgte nach dem Auftragen der drei verschiedenen Barrierecremes B, C und D auf die entsprechenden Hautareale und der Penetrationszeit von 15 min das Auflegen von vier mit Natriumfluoreszeinlösung gesättigten Filterpapieren mit einer Größe von je $1,4 \times 3 \text{ cm}^2$ auf die zu untersuchenden Areale A, B, C und D. Nach 5 min wurden die Filterpapiere wieder entfernt und noch vorhandener Überstand mit Hilfe eines Zellstofftuchs vorsichtig entfernt. Anschließend wurde der Window-Color-Randwall entfernt.

2.5.2 Abrissmethode

Es wurden von jedem Untersuchungsareal 20 Abrisse mittels eines durchsichtigen Klebefilms (tesa[®]-Film, Nr. 5529, Beiersdorf, Hamburg, Deutschland) mit einer Breite von 19 mm entnommen. Der Klebefilm wurde auf die vorbehandelten Flächen aufgebracht und mit einem wasserfesten Stift markiert, um sicher zu sein, dass alle 20 Abrisse von der gleichen Stelle entnommen wurden. Danach wurde eine Zwischenlage aus Papier aufgebracht. Mit einem Kunststoffroller (Abb. 10) wurde der tesa[®]-Film durch zehnmaliges Rollen angedrückt. Dies ist von besonderer Bedeutung, da dieses Verfahren die Hautoberfläche glättet und der Abriss mit der gesamten Hautoberfläche in Kontakt kommt und der Einfluss der Furchen auf das Verfahren entsprechend der von Lademann et al. [61]. beschriebenen Methode vernachlässigt werden kann. Anschließend wurde der Klebestreifen immer in die gleiche Richtung in einem Zug abgerissen (Abb. 11) und auf einen rechteckigen Plastikrahmen fixiert.



Abb. 10: Andrücken des tesa[®]-Filmstreifens mit dem Kunststoffroller

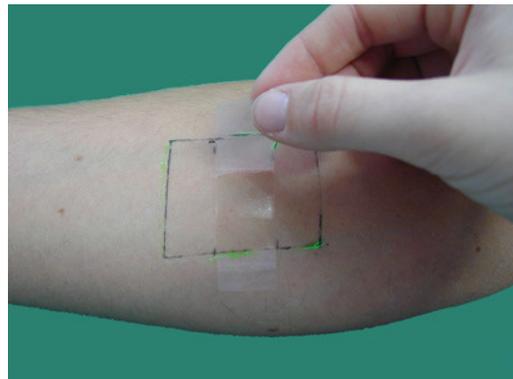


Abb. 11: Abreißen des tesa[®]-Filmstreifens

2.5.3 Bestimmung der Menge an Korneozyten auf den Abrissen

Mittels eines Doppelstrahlspektrometers (Lambda 20, Perkin Elmer, Überlingen, Deutschland) mit einem quadratischen Strahlengang von $10 \times 10 \text{ mm}^2$ wurde anschließend die Menge an entfernten Korneozyten auf jedem einzelnen Abriss bestimmt. Die rechteckigen Plastikrahmen mit dem darauf befestigten Klebefilm wurden für die Messung in eine dafür vorgesehene Halterung gesetzt. Bei einer Wellenlänge von 850 nm [20] wurde die Menge an Korneozyten pro Abriss, mit einem leeren tesa[®]-Filmstreifen als Referenz, bestimmt. In die Messungen gingen

nur Abrisse ein, auf denen optisch eine Korneozytenschicht eindeutig identifiziert werden konnte.

2.5.4 Bestimmung der Konzentration an Natriumfluoreszein auf den Abrissen

Zur Bestimmung der Konzentration von Natriumfluoreszein auf den Abrissen wurden diese ca. 24 Stunden nach der Bestimmung der Korneozytenmenge gelöst. Hierfür wurden die tesa®-Filmstreifen auf eine Größe von 3 x 1,5 cm² zurechtgeschnitten und mit Hilfe einer Pinzette in ein Zentrifugenröhrchen (Oak Ridge centrifuge Tube, PPCO, Firma Nalge Nunc International, USA) gegeben. Die Größe der zurechtgeschnittenen Klebestreifen entsprach einer Fläche von 4,5 cm² und somit einer Füllhöhe von 4,5 cm in einer 1 cm dicken Küvette (Quarzglas Suprasil®, Firma Hellma, Jena, Deutschland). Die Zentrifugenröhrchen wurden mit 4,5 ml Ethanol (Uvasol, Firma Merck KgaA, Darmstadt, Deutschland) gefüllt, für zehn Minuten im Ultraschallwasserbad (Sonorex Super RK 102H, Firma Bandelin electronic GmbH & CoKG, Berlin, Deutschland) und anschließend 10 Minuten in der Zentrifuge (MR 18.12, Firma Jouan GmbH, Unterhaching, Deutschland) behandelt. Teile der überstehenden Lösungen wurde jeweils in eine Küvette gegeben. Die Bestimmung der Natriumfluoreszeinkonzentration erfolgte spektroskopisch anhand des Absorptionsmaximums bei ca. 480 nm. Zuvor wurde eine Eichkurve mit Natriumfluoreszein-Lösung erstellt.

2.5.5 Darstellung der Ergebnisse

a) Erstellung von Penetrationsprofilen

Die Darstellung der Ergebnisse erfolgte mit Hilfe von Penetrationsprofilen, wobei sowohl die Menge an Korneozyten, als auch die ermittelte Konzentration an entferntem Natriumfluoreszein auf jedem einzelnen Abriss in einer gemeinsamen graphischen Darstellung berücksichtigt werden konnten. Anhand der bestimmten Menge an Korneozyten auf den einzelnen Abrissen konnte ein Hornschichtprofil erstellt werden. Die gemessenen Konzentrationen an Natriumfluoreszein wurden hierfür mit der entsprechenden Schicht der Hornschicht in Beziehung gesetzt. Die Breite des Balkens entsprach der Konzentration an Natriumfluoreszein, welches mit dem entsprechenden Abriss entnommen wurde.

b) Erstellung von Grafiken

Die Darstellung der Ergebnisse erfolgte anhand des Computerprogramms Excel[®]2000.

2.6 Statistische Auswertung der erhobenen Daten

Mit Hilfe des Computerprogramms SPSS 12.0[®] wurden die Mittelwerte und Standardabweichungen der Ergebnisse der Laser-Doppler-Blutflussmessung und der Abrissmethode berechnet. Des Weiteren wurden mit diesem Programm die Ergebnisse statistisch bewertet. Es wurde der Blutflussanstieg und der Basalwert der Hautdurchblutung auf einen signifikanten Unterschied untersucht und die durch die Abrissmethode ermittelten Wiederfindungsraten des topisch applizierten Natriumfluoreszeins nach der Applikation der verschiedenen Barrierecremes verglichen. Hierfür wurde der nicht-parametrische Wilcoxon-Test für verbundene Daten verwendet, um die Signifikanz p zu ermitteln. Werte für $p < 0,05$ wurden als signifikant unterschiedlich interpretiert.