

3. Ergebnisse

3.1 Methode 2: Laser-Scan-Mikroskopie

Die Laser-Scan-Mikroskopie wurde eingesetzt, um die Penetration von Natriumfluoreszein nach Applikation von verschiedenen Barrierecremes zu untersuchen. Hierfür wurden, wie unter 2.2 bzw. 2.3 beschrieben, bei den Probanden die Barrierecremes B, C und D auf die Areale B, C und D aufgetragen. Areal A diente als Referenzareal. Anschließend wurden die in Natriumfluoreszein gesättigten Filterpapiere aufgelegt und nach 5 min entfernt. Danach erfolgten die Laser-Scan-Mikroskopie-Messungen.

Die Abbildungen 12a-c zeigen beispielhaft für einen Probanden das Penetrationsverhalten von Natriumfluoreszein ohne vorherige Behandlung mit einer Barrierecreme (Referenzareal). Mit Hilfe des Tiefenscans konnte hier das Stratum corneum auf ein Fluoreszenz-Signal untersucht werden. Abbildung 12a zeigt eine oberflächliche Aufnahme des Stratum corneum. Es ist eine deutliche Fluoreszenz der Korneozyten zu erkennen, wobei die Zellgrenzen auf Grund des starken Fluoreszenzsignals nicht immer eindeutig zu identifizieren sind. In den Hautfurchen (roter Pfeil) konnte in dieser Zellaufnahme keine Fluoreszenz nachgewiesen werden.

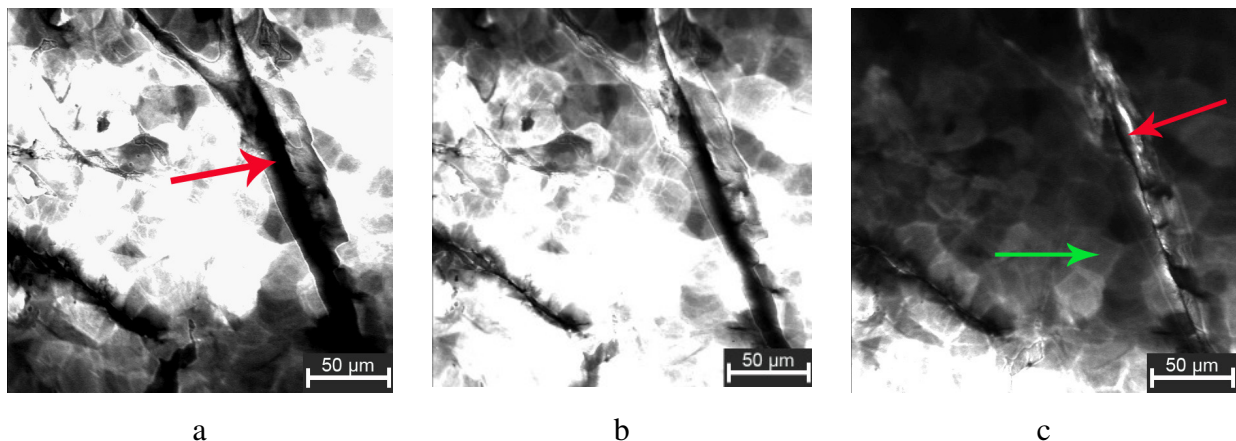


Abb. 12: Laser-Scan-Mikroskopie-Aufnahmen der a) oberflächlichen, b) mittleren und c) tieferen Schicht des Stratum corneum, Areal A, Referenzareal des Probanden 1

Auch in der Abbildung 12b war eine deutliche Fluoreszenz erkennbar. Die Zellgrenzen der Korneozyten waren zum großen Teil nicht zu erkennen. Die Hautfurchen sind im Gegensatz zur

Abbildung 12a verschmälert. Einen Einblick in tiefere Schichten des Stratum corneum ermöglicht die Abbildung 12c. Auf diesem Bild ist die Fluoreszenz der Korneozyten weniger stark, die Korneozyten (grüner Pfeil) sind deutlich voneinander abgrenzbar und als einzelne Zellen sichtbar. Die Hautfurchen (roter Pfeil) sind weiter verschmälert und weisen eine leichte Fluoreszenz auf. Bei allen Probanden wurden für dieses Areal ähnliche Ergebnisse erzielt. Die Abbildungen 13a-c stellen die Penetration von Natriumfluoreszein nach Vorbehandlung mit Vaseline (Areal B) beispielhaft für einen Probanden dar. In den Abbildungen 13a bis c konnte keine Fluoreszenz nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis konnte für die Probanden 3, 4 und 5 bestätigt werden.

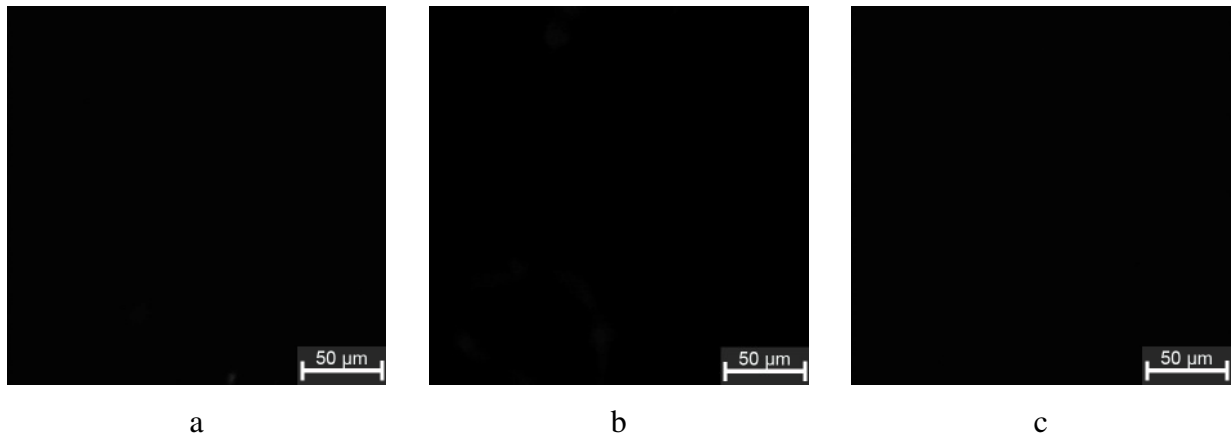


Abb. 13: Laser-Scan-Mikroskopie-Aufnahmen der a) oberflächlichen, b) mittleren und c) tieferen Schicht des Stratum corneum, Areal B, Vorbehandlung der Haut mit Vaseline, Proband 1

Bei Proband 2 war, wie in Abbildung 14a zu sehen, in der oberflächlichen Aufnahme der Hornschicht keine Fluoreszenz nachweisbar, jedoch konnte in einer tieferen Schicht eine schwache Fluoreszenz (roter Pfeil) nachgewiesen werden (Abb. 14 b). Ein ähnliches Bild zeigte sich bei Proband 6.

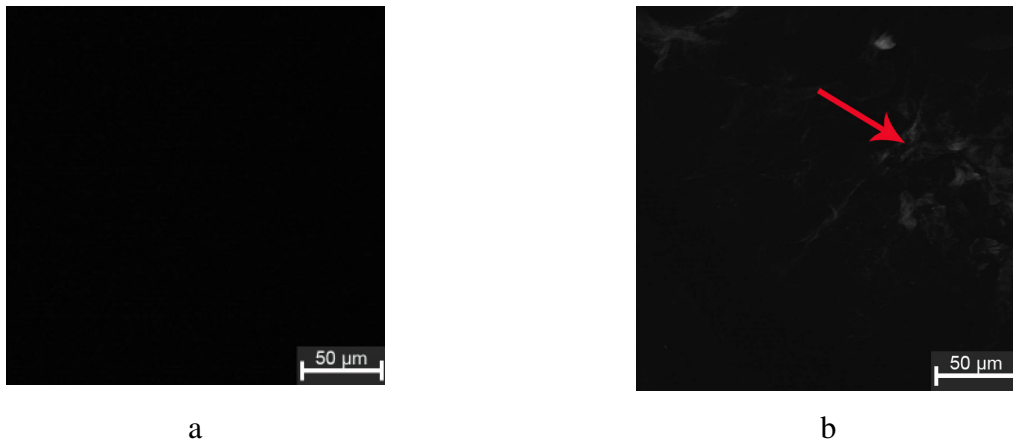


Abb. 14: Laser-Scan-Mikroskopie-Aufnahmen der a) oberflächlichen, b) tieferen Schicht des Stratum corneum, Areal B, Vorbehandlung der Haut mit Vaseline, Proband 2

Die Abbildungen 15a-c spiegeln das Eindringen von Natriumfluoreszein nach der Vorbehandlung der Haut mit Cavilon (Areal C). In den drei Bildern ist zu erkennen, dass das Stratum corneum nur eine geringe Fluoreszenz aufweist. Abbildung 15a stellt eine oberflächliche Schicht des Stratum corneum dar. Die einzelnen Zellen (roter Pfeil) sind nur an ihren zarten Umrisssen zu erkennen. Ein stärkeres Fluoreszenz-Signal ist an den Rändern (grüner Pfeil) von Zellkomplexen, die hier an Hautfurchen grenzen, zu erkennen.

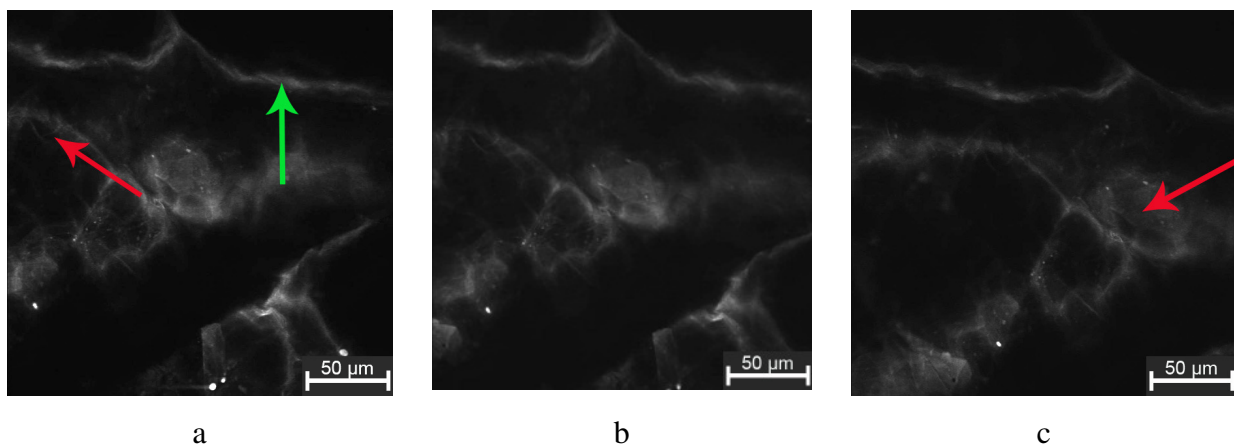


Abb. 15: Laser-Scan-Mikroskopie-Aufnahmen der a) oberflächlichen, b) mittleren und c) tieferen Schicht des Stratum corneum, Areal C, Vorbehandlung der Haut mit Cavilon, Proband 1

In Abb.15b zeigen die Zellgrenzen der Korneozyten eine noch schwächere Fluoreszenz, während die Ränder der Zellkomplexe besser fluoreszieren. In weiterer Tiefe (Abb. 15c) fluoreszieren die Zellgrenzen der Korneozyten zum größten Teil nicht, mit Ausnahme des kleinen Zellkomplexes (roter Pfeil), der schon in den Bildern 15a und b deutlich erkennbar war. Wiederum sind die Ränder der Zellkomplexe gut dargestellt. Für dieses Areal wichen einzig die Ergebnisse des Probanden 6 von den hier aufgezeigten ab. Bei diesem Probanden wurde ein stärkeres Fluoreszenzsignal nachgewiesen.

Die Abbildungen 16a-c geben die Penetration von Natriumfluoreszein nach der Vorbehandlung der Haut mit Lindesa (Areal D) wieder. Auch hier stellt Bild 16a eine oberflächliche Schicht und Bild 16c eine tiefere Schicht des Stratum corneums dar. In der Abbildung 16a ist eine gute Fluoreszenz der Korneozyten und ihrer Zellgrenzen erkennbar. An den Randzonen der Zellkomplexe, zur Hautfurche hin, nimmt das Fluoreszenz-Signal an Stärke ab. Die Hautfurchen selbst fluoreszieren nicht.

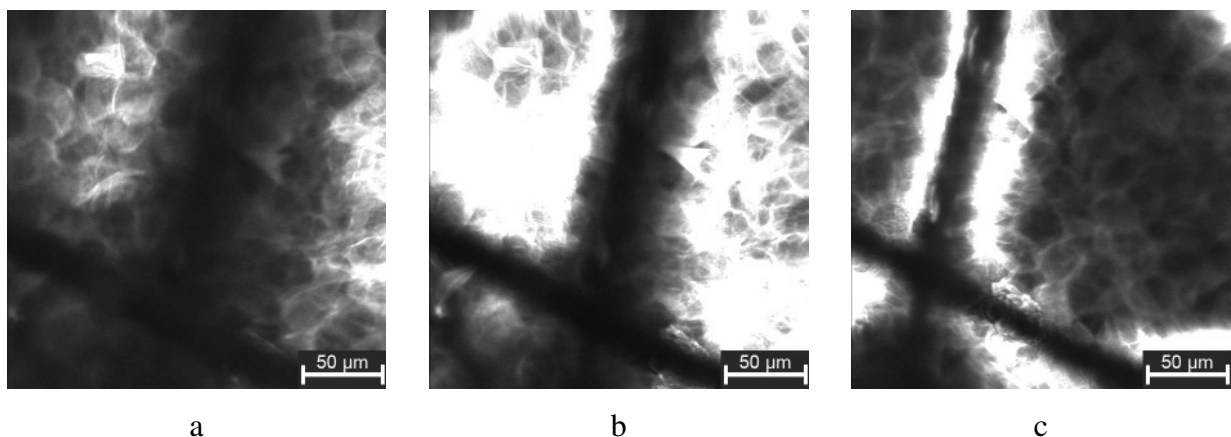


Abb. 16: Laser-Scan-Mikroskopie-Aufnahmen der a) oberflächlichen, b) mittleren und c) tieferen Schicht des Stratum corneum, Areal D, Vorbehandlung der Haut mit Lindesa, Proband 1

In der nächsten Abbildung (Abb. 16b) ist das Fluoreszenz-Signal deutlich stärker. In einigen Bereichen der Abbildung sind die Zellgrenzen der Korneozyten auf Grund der starken Anfärbung nicht zu erkennen. Auch hier nimmt die Intensität des reflektierten Signals zur Hautfurche hin ab. Die Hautfurchen weisen ein leichtes Fluoreszenz-Signal auf. In der Abbildung 16c sind die Korneozyten geringer angefärbt und als zarte einzelne Zellen erkennbar. Der an die Hautfurchen

angrenzende Bereich zeigt eine starke Fluoreszenz in dieser Abbildung. Für alle Probanden konnten ähnliche Ergebnisse erzielt werden.

Tab. 2: Bewertung des Fluoreszenzsignals der Laser-Scan-Mikroskopie-Bilder und dementsprechend der Wirksamkeit der Barrierecremes (1= kein Signal, sehr gute Barrierewirkung – 3= starkes Signal, schlechte/ keine Barrierewirkung)

	Areal A	Areal B	Areal C	Areal D
Proband 1	3	1	2	3
Proband 2	3	1	2	3
Proband 3	3	1	2	3
Proband 4	3	1	2	3
Proband 5	3	1	2	3
Proband 6	3	1	3	3

In Tabelle 2 sind die Ergebnisse der Bildanalysen aller Probanden, in numerischer Form bewertet, dargestellt. Die Bewertung der Bilder fand anhand der in Kapitel 2.3.4 beschriebenen Methode statt (Tab. 1). Es ist deutlich zu erkennen, dass zwischen dem Areal A (Referenzareal) und dem Areal D (Lindesa) kein Unterschied in der Signalstärke nachgewiesen werden konnte. Das mit Vaseline vorbehandelte Areal B weist, wie oben schon beschrieben, kein Fluoreszenzsignal bzw. nur vereinzelt fluoreszierende Zellen auf. Für Areal C (Cavilon) ist zu erkennen, dass vermehrt Zellen und auch Hautfurchen dargestellt werden konnten.

3.2 Methode 2: Laser-Doppler-Blutflussmessung

Mit Hilfe der Laser-Doppler-Blutflussmessung wurde nach dem Auftragen der Barrierecremes auf die Areale B, C und D und dem Applizieren von mit Glyceroltrinitrat gesättigten Filterpapieren auf die Areale A bis D die Veränderung der oberflächlichen Hautdurchblutung gemessen.

In der Abbildung 17 sind, exemplarisch für Proband 1, die Messwerte für das Referenzareal A (keine Vorbehandlung der Haut mit einer Barrierecreme) im Verlauf dargestellt.

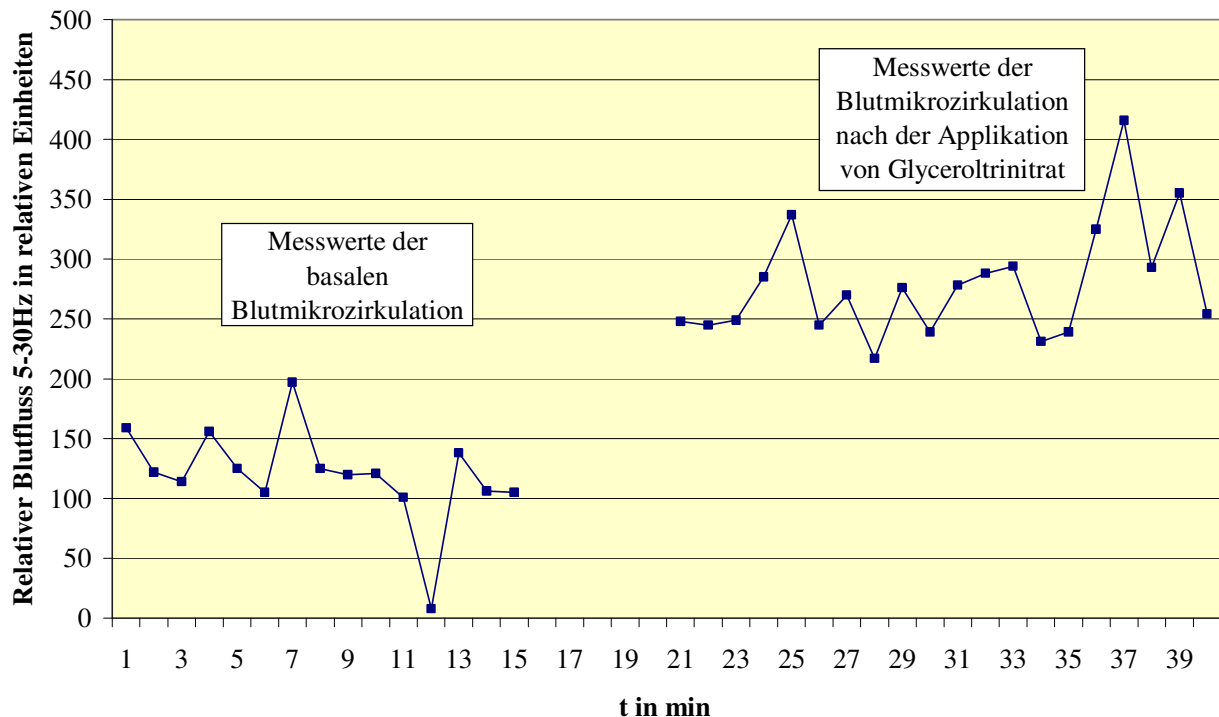
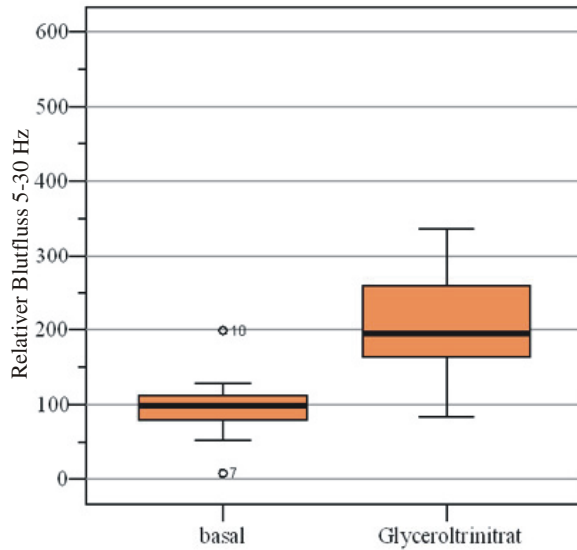


Abb. 17: Darstellung der basalen Blutmikrozirkulation und der Wirkung von Glyceroltrinitrat auf die Blutmikrozirkulation der Haut (Referenzareal A, Proband 1)

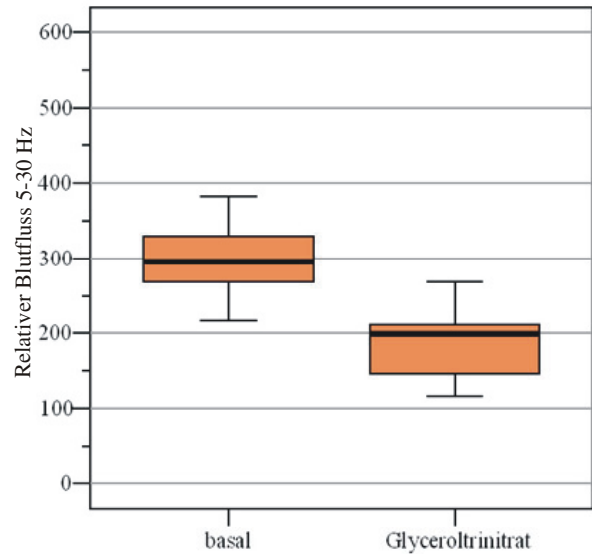
Wie in der Grafik zu erkennen, entsprechen die ersten 15 Messwerte der basalen Blutmikrozirkulation, welche bei durchschnittlich $120 (\pm 40)$ relativen Einheiten liegen. Nach der Applikation von Glyceroltrinitrat und 5 Minuten Penetrationszeit wurden weitere 20 Messwerte ermittelt. Hier lag der Mittelwert bei durchschnittlich $280 (\pm 48)$ relativen Einheiten.

Für die Probanden 2-6 konnten ähnliche Ergebnisse gemessen werden.

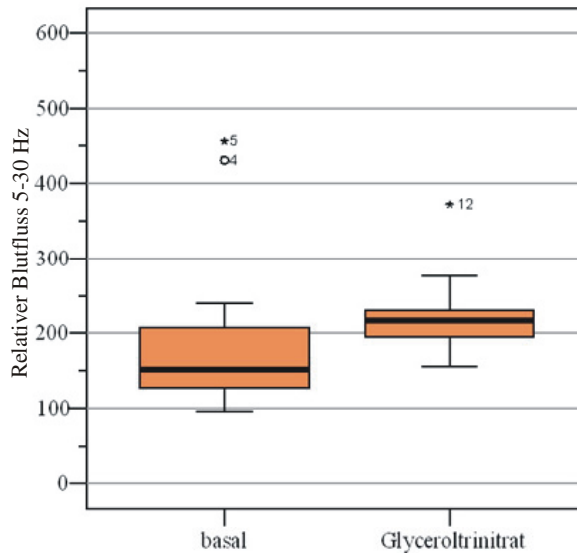
Die Ergebnisse der Laser-Doppler-Blutflussmessung sind für den Probanden 3 beispielhaft in Abbildung 18 als Boxplots dargestellt. In den Abbildungen sind zugleich der Median (Querlinie innerhalb der Box), die mittleren 50% (Box), als Antennen die kleinsten Beobachtungen ($< 50\%$ - $> 25\%$ entsprechen der unteren Antenne, $> 50\%$ - $< 75\%$ entsprechen der oberen Antenne) und Ausreißer als Einzelwerte außerhalb dieser Intervalle aufgezeigt. Der Boxplot der basalen Blutmikrozirkulation gibt jeweils die ermittelten Messwerte der oberflächlichen Hautdurchblutung ohne Applikation von Barrierecreme und Glyceroltrinitrat wieder. Mit Hilfe des zweiten Boxplot wurden die Werte der Blutmikrozirkulation nach der Applikation der Barrierecremes (mit Ausnahme des Referenzareals) und des Glyceroltrinitrat aufgezeigt.



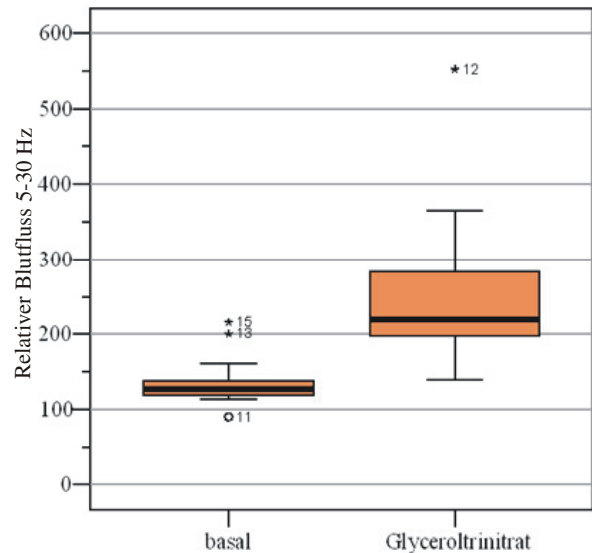
a) Referenzareal: unbehandelte Haut



b) Areal B: Vaseline



c) Areal C: Cavilon



d) Areal D: Lindesa

Abb. 18: Darstellung der Blutmikrozirkulation vor und nach Auftragen von Glyceroltrinitrat: a) ohne Barrierecreme, b)- d) nach Auftragen der Barrierecremes B-D (Proband 3)

Nach der alleinigen Behandlung der Haut mit Glyceroltrinitrat erfolgte ein Anstieg des dermalen Blutflusses (Abb. 18a, Areal A). Wurde vor dem Glyceroltrinitrat Vaseline aufgetragen (Abb. 18b, Areal B), fand ein Abfall der Blutmikrozirkulation statt. Fand vor dem Auftragen von Glyceroltrinitrat die Applikation von Cavilon (Abb. 18c, Areal C) statt, stiegen die Werte der Blutmikrozirkulation gering an. Nach vorheriger Applikation von Lindesa (Abb. 18d, Areal D)

lagen die gemessenen Werte der Blutmikrozirkulation über den Basalwerten. Für alle Probanden konnten für die Areale A und D ähnliche Ergebnisse gemessen werden (Tab. 3). Für das Areal B wurde bei den Probanden 1, 2, 4, und 6 jeweils ein geringer Anstieg gemessen (Tab. 3). Die Ergebnisse für das Areal B des Probanden 5 (Tab. 3) ähnelten den in Abbildung 18 dargestellten Messwerten. Wie aus Tabelle 3 hervorgeht, wurde für das Areal C für die Probanden 1 und 5 ein leichter Abfall der dermalen Mikrozirkulation ermittelt. Die Ergebnisse der verbleibenden Probanden ähnelten denen des Probanden 3 (Tab. 3). Zusätzlich sind aus Tabelle 3 die interindividuellen Unterschiede der basalen Mikrozirkulation der Haut und der Reaktion des Blutflusses auf die Applikation des Glyceroltrinitrat ersichtlich. So liegt zum Beispiel die basale Mikrozirkulation der vier Areale aller Probanden in einer Spannweite von 75-290 Einheiten.

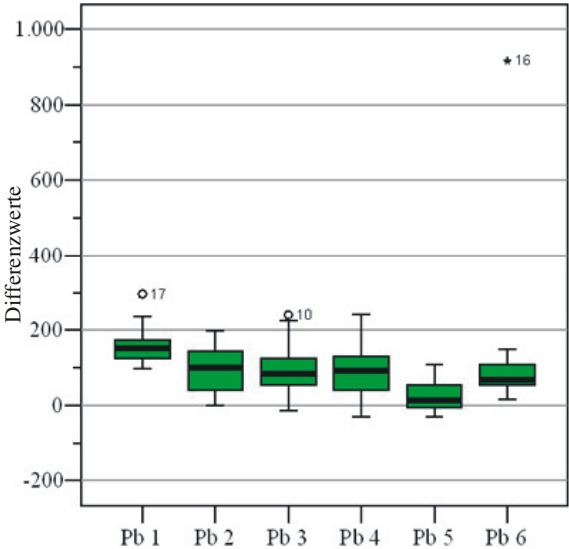
Zur Ermittlung eines statistisch signifikanten Unterschieds zwischen den Basalwerten und den Messwerten der Blutmikrozirkulation nach der Applikation von Glyceroltrinitrat je Areal wurden zuerst die jeweiligen Mittelwerte (Tab. 3) für jeden Probanden errechnet.

Mit Hilfe der statistischen Auswertung konnte für die Areale A (Referenzareal) und D (Vorbehandlung mit Lindesa) ein signifikanter Anstieg ($p < 0,05$) der Blutmikrozirkulation nach dem Auftragen von Glyceroltrinitrat festgestellt werden. Für die Areale B (Vorbehandlung mit Vaseline) und C (Vorbehandlung mit Cavilon) konnte kein signifikanter Unterschied ($p > 0,05$) zwischen den Basalwerten und den Werten nach der Applikation von Glyceroltrinitrat ermittelt werden.

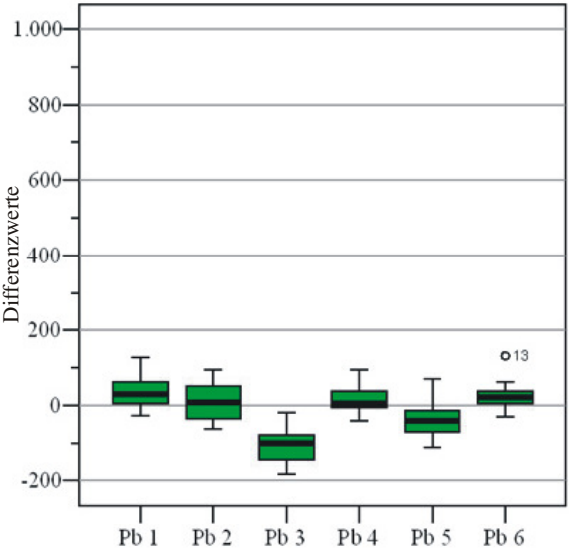
Tab. 3: Mittelwerte der basal gemessenen Werte (*basal*) und der Messwerte nach der Applikation von Glyceroltrinitrat (*Appl.*) der Blutmikrozirkulation

	Areal A		Areal B		Areal C		Areal D	
	<i>basal</i>	<i>Appl.</i>	<i>basal</i>	<i>Appl.</i>	<i>basal</i>	<i>Appl.</i>	<i>basal</i>	<i>Appl.</i>
Proband 1	120	279	117	154	191	177	190	305
Proband 2	97	190	146	157	115	121	105	213
Proband 3	97	196	290	193	193	232	137	271
Proband 4	89	181	106	120	84	100	75	118
Proband 5	92	116	226	190	173	164	109	181
Proband 6	131	202	131	156	147	173	109	186

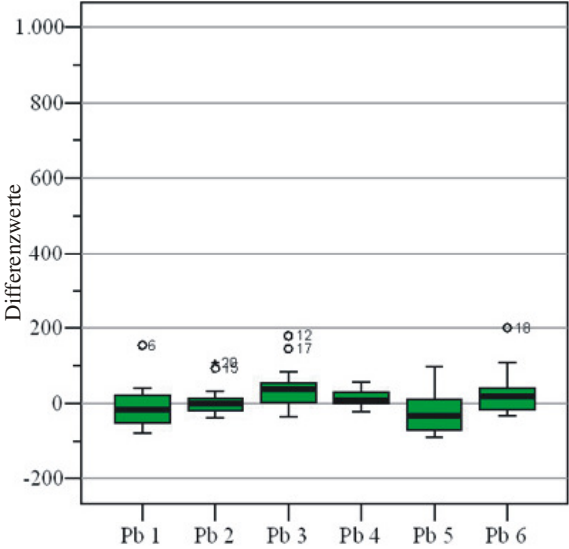
Zur Veranschaulichung der Streuung der ermittelten Messwerte der Probanden im Vergleich erfolgte eine Darstellung der Differenzen der Messwerte in Abbildung 19. Hierfür wurde von den gemessenen Werten nach der Applikation der Barrierecremes und des Glyceroltrinitrat der Mittelwert der basalen Blutmikrozirkulation jeweils abgezogen.



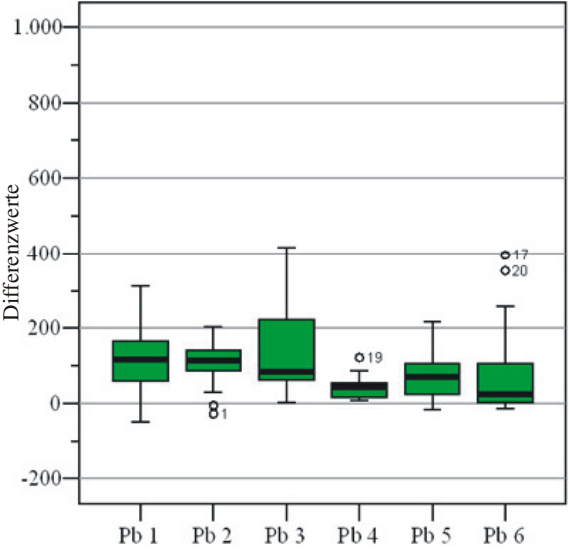
a) Areal A: Referenzareal



b) Areal B: Vaseline



c) Areal C: Cavilon



d) Areal D: Lindesa

Abb. 19: Darstellung der Differenzen der ermittelten Werte der Blutflussmessung der Probanden für die Areal A-D

Diese Berechnung wurde für jedes Areal durchgeführt. Die so ermittelten Werte wurden wiederum als Boxplots dargestellt. Anhand der Höhe der Boxen und der Länge der Antennen kann die Streuung der Messwerte abgelesen werden. Abbildung 19a zeigt die Unterschiede der Differenzen der Probanden für das Referenzareal auf. Es konnte für jeden Probanden ein Anstieg der Blutmikrozirkulation im Referenzareal festgestellt werden. Die Boxen der Probanden liegen zwischen 0 und 200 mit Ausnahme der Werte des Probanden 5, dessen Werte der mittleren 50% zum geringen Teil auch unter 0 liegen. Die Ergebnisse für das Areal B sind in der Abbildung 19b abgebildet. Bei den Probanden 1, 2, 4 und 6 liegen die Boxen im Bereich von null, die der Probanden 3 und 5 deutlich unter 0. Für das Areal C (Abb. 19c) konnten ähnliche Resultate wie für das Areal B festgestellt werden. In dieser Abbildung liegen die Boxplots annähernd auf einer Linie im Bereich von 0. Die Abbildung 19d spiegelt die Werte des Areal D wieder. Hier ist ein deutlicher Anstieg der Durchblutung der Haut zu erkennen. Die Boxen mit den mittleren 50% liegen zwischen 0 und 220.

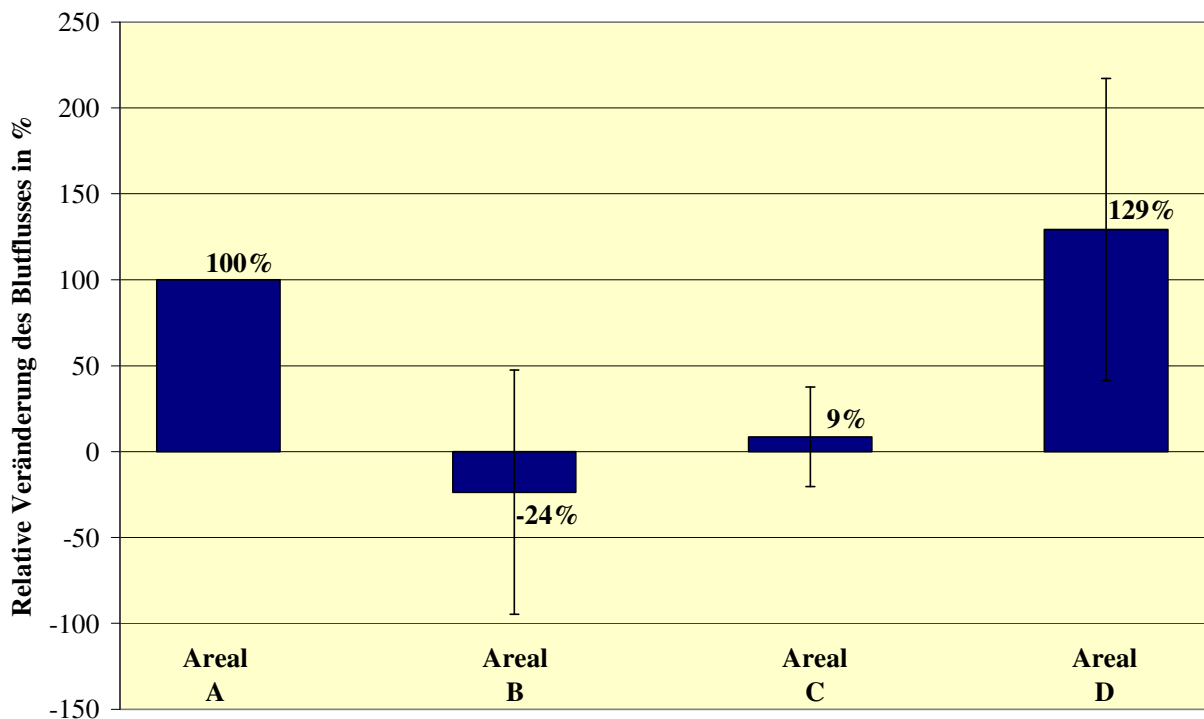


Abb. 20: Mittlere prozentuale Veränderung der Blutmikrozirkulation der Areale A-D aller Probanden (Areal A: ohne Vorbehandlung; Areal B: Vaseline; Areal C: Caviol; Areal D: Lindesa)

Abbildung 20 gibt einen Vergleich des prozentualen Anstiegs bzw. Abfalls der Blutmikrozirkulation der vier untersuchten Areale wieder. Hierfür wurde der mittlere Anstieg der Blutmikrozirkulation des Referenzareals als 100% Anstieg festgelegt. Für Areal B, C und D wurde die mittlere basale Zirkulation von der mittleren Blutmikrozirkulation nach der Applikation von Glyceroltrinitrat abgezogen und die Mittelwerte und Standardabweichung für alle sechs Probanden berechnet. Die Angaben in Prozent bezogen sich auf die Blutmikrozirkulation des Referenzareals.

Für die Areale B und C zeigte sich im Vergleich zum Referenzareal eine deutlich verminderte Blutmikrozirkulation (Areal B: $p < 0,05$; Areal C: $p < 0,05$). In Areal D zeigte sich kein signifikanter Unterschied der Blutmikrozirkulation ($p > 0,05$) im Vergleich zum Referenzareal.

3.3 Methode 3: Abrissmethode

Die Abrissmethode wurde eingesetzt, um die Penetration von Natriumfluoreszein nach der Applikation von verschiedenen Barrierecremes zu untersuchen. Die Substanzmenge des Natriumfluoreszeins ist hier relativ dargestellt, da keine absoluten Mengen bilanzierbar waren.

Die im Folgenden aufgezeigten Penetrationsprofile stammen von Proband 5. Vergleichbare Ergebnisse konnten für alle sechs Probanden gezeigt werden.

In Abbildung 21 ist das Penetrationsprofil für das Referenzareal abgebildet. Es findet sich eine hohe Konzentration an Natriumfluoreszein vor allem auf den ersten vier Abrissen. Mit zunehmender Entnahmetiefe nimmt die Konzentration des Farbstoffes ab, bleibt auf den Abrissen 5-20 jedoch annähernd gleich. Die Verteilung des Natriumfluoreszeins gleicht einem schmalen Trichter.

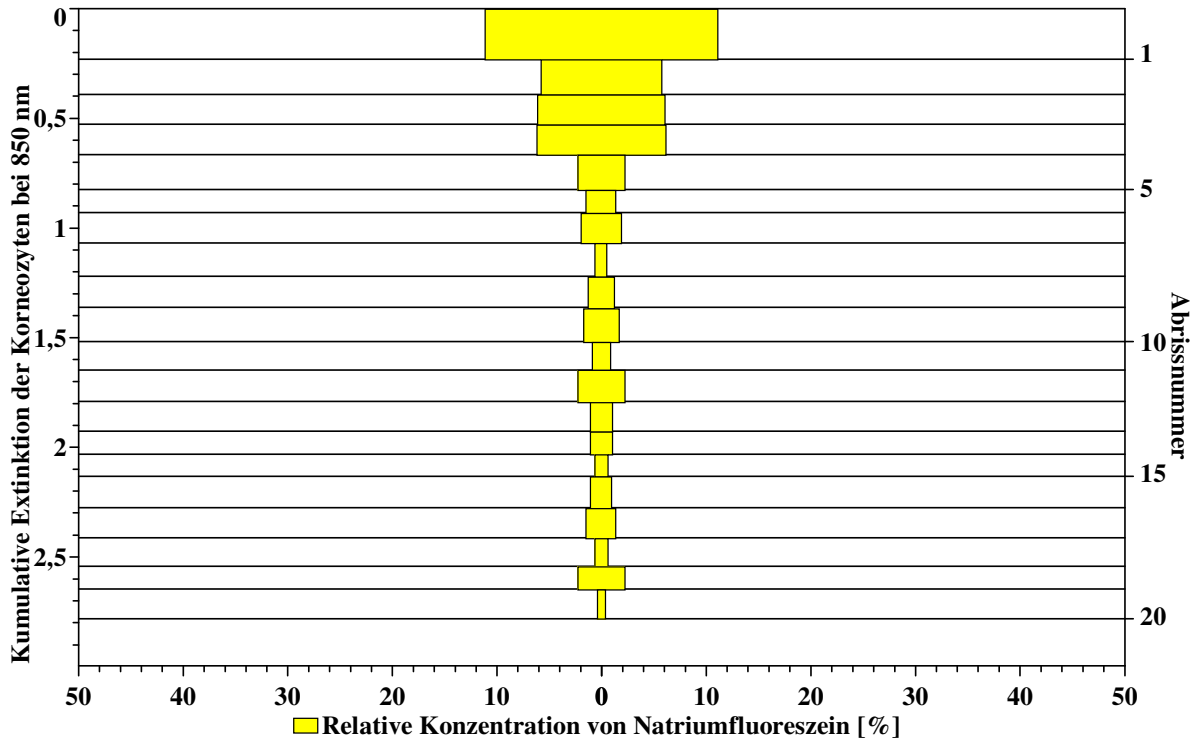


Abb. 21: Referenzareal: Penetrationsprofil von Natriumfluoreszein ohne Vorbehandlung der Haut (Proband 5)

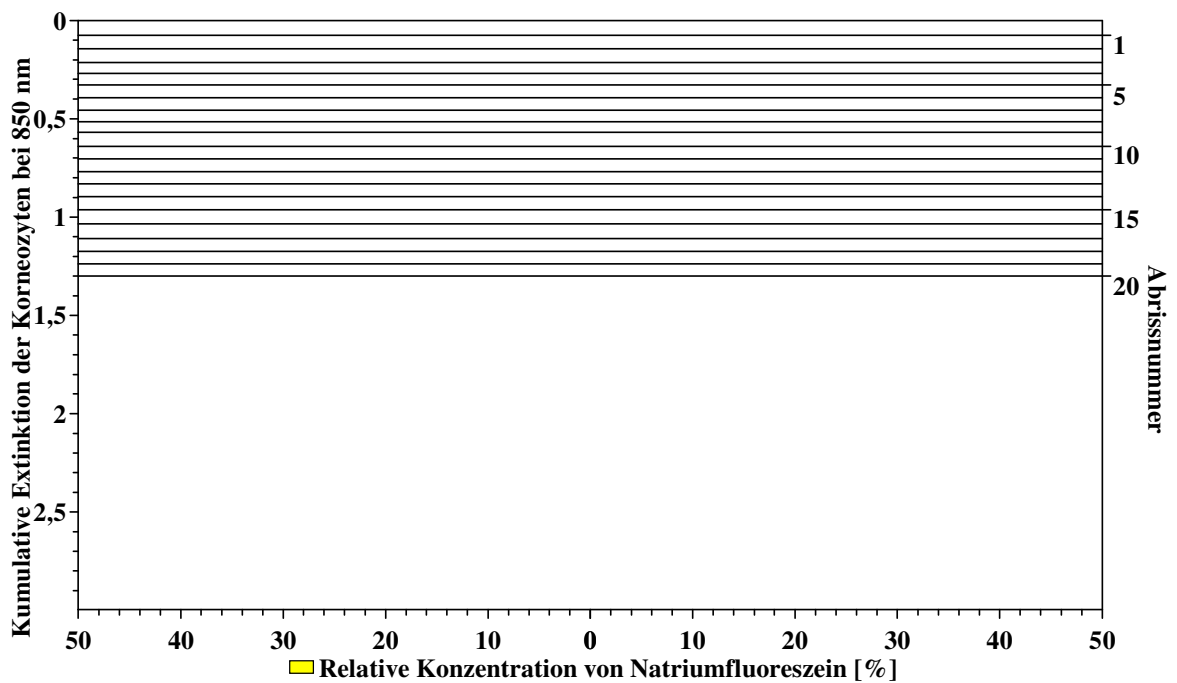


Abb. 22: Areal B: Penetrationsprofil von Natriumfluoreszein nach Vorbehandlung mit Vaseline (Proband 5)

Das in Abbildung 22 dargestellte Profil zeigt das Penetrationsverhalten von Natriumfluoreszein nach vorheriger Behandlung mit Vaseline (Areal B). Mittels der Abrissmethode konnte kein Farbstoff im Stratum corneum nachgewiesen werden.

Die Abbildung 23 zeigt das Penetrationsprofil von Natriumfluoreszein nach der Vorbehandlung mit Cavilon. Auf den ersten vier Abrissen konnten relativ hohe Konzentrationen an Natriumfluoreszein nachgewiesen werden. Das Profil entspricht einem breiten, aber kurzen Trichter.

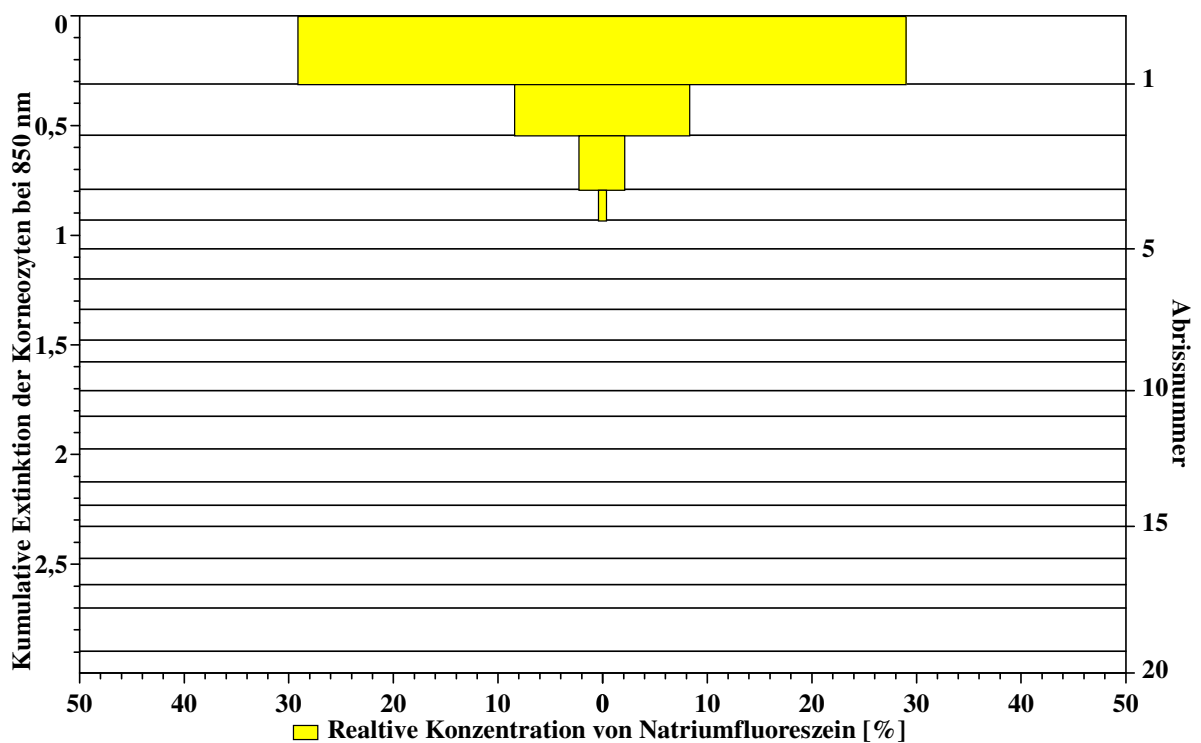


Abb. 23: Areal C: Penetrationsprofil von Natriumfluoreszein nach Vorbehandlung mit Cavilon (Proband 5)

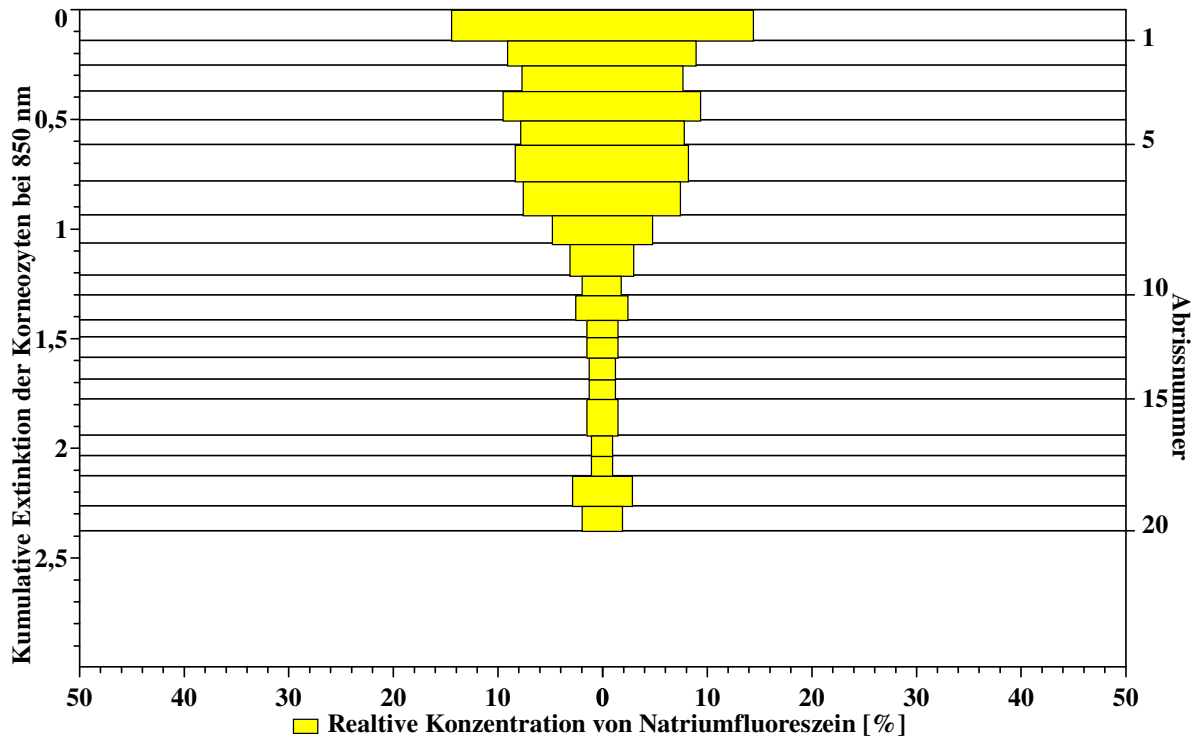


Abb. 24: Areal D: Penetrationsprofil von Natriumfluoreszein nach Vorbehandlung mit Lindesa (Proband 5)

Das in der Abbildung 24 dargestellte Penetrationsprofil zeigt die Penetration von Natriumfluoreszein nach Applikation von Lindesa. Es findet sich eine hohe Konzentration an Natriumfluoreszein vor allem auf dem ersten Abriss. Die Konzentration des Farbstoffes nimmt mit zunehmender Entnahmetiefe kontinuierlich, aber nur wenig ab. Der Verlauf des Profils ähnelt einem breiten, tiefen Trichter.

Zum Vergleich der mit den Penetrationsprofilen ermittelten Ergebnisse des Probanden 5 wurden die wieder gefundenen Mengen an Natriumfluoreszein bezüglich ihres prozentualen Anteils in den 20 Abrissen in Abbildung 25 als Balkendiagramm dargestellt. Das Referenzareal entspricht der ungehemmten Penetration von Natriumfluoreszein in das Stratum corneum und wurde mit 100% gleichgesetzt. Nach Auftragen von Vaseline im Areal B ist kein Natriumfluoreszein in das Stratum corneum eingedrungen ($p < 0,05$). Im Areal C (Vorbehandlung mit Cavilon) sind im Vergleich zum Referenzareal nur 80% Natriumfluoreszein penetriert, diese Ergebnis wies jedoch keinen signifikanten Unterschied ($p > 0,05$) zum Vergleichsareal auf. Im Areal D konnte im Vergleich zum Referenzareal A mit 180% Wiederfindungsrate signifikant ($p < 0,05$) mehr Natriumfluoreszein nachgewiesen werden.

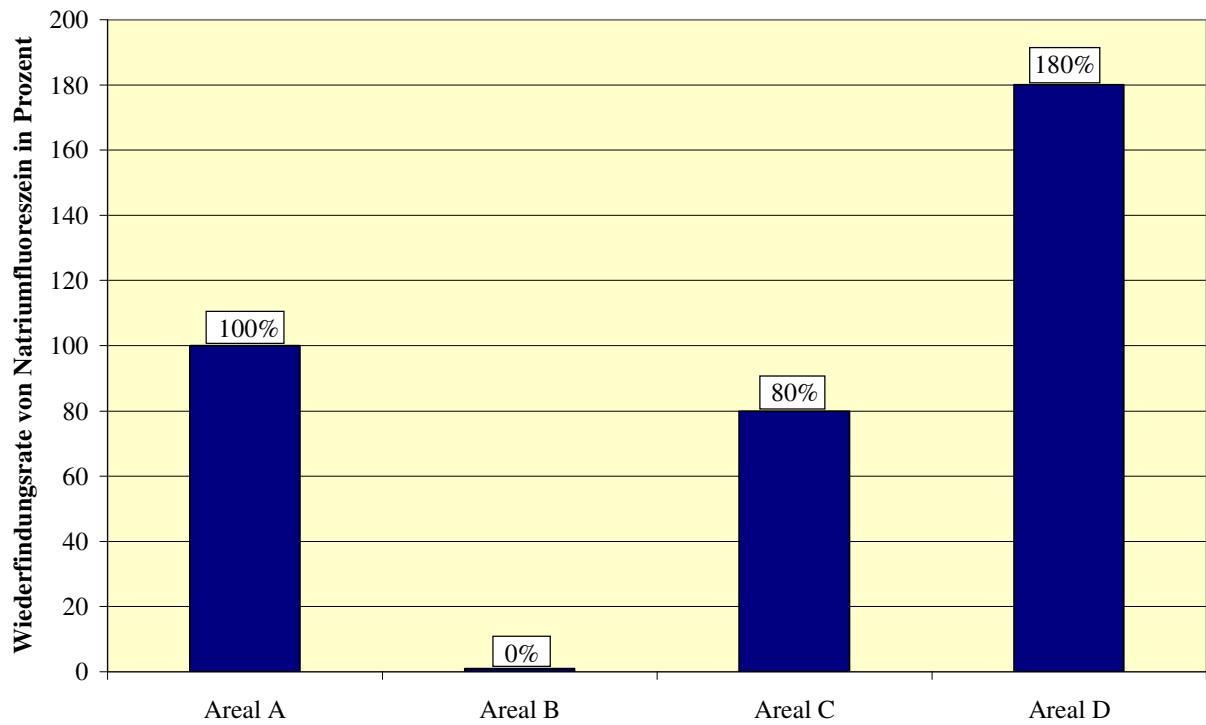


Abb. 25: Prozentualer Anteil von in 20 Abrissen wieder gefundenem Natriumfluoreszein, Proband 5, ohne Applikation einer Barrierecreme (Areal A) und mit vorheriger Applikation einer Barrierecreme (Areal B - D)