# Ergebnisse

#### 4.1 Penetration von Natriumfluoreszein

### 4.1.1 Vergleich der Penetrationsprofile

Anhand der Versuchsergebnisse mit Natriumfluoreszein wurden für jeden Probanden Penetrationsprofile im Modus A, B und C erstellt. Die Penetrationsprofile stellen einen Schnitt durch das Stratum corneum dar und zeigen die Verteilung von Natriumfluoreszein in der Hornschicht. Exemplarisch sind im Folgenden die errechneten Penetrationsprofile von Proband 1 dargestellt. Die Abbildung 22, Abbildung 24 und Abbildung 26 zeigen das jeweilige Gesamtprofil, während Abbildung 23, Abbildung 25 und Abbildung 27 einen Ausschnitt hieraus zeigen, in welchem die Konzentration deutlicher zu erkennen ist:



Proband 1 – Modus A

Abbildung 22: Gesamtprofil: Verteilung von Natriumfluoreszein / Modus A

Proband 1 - Modus A



Abbildung 23: Ausschnitt: Verteilung von Natriumfluoreszein / Modus A



Abbildung 24: Gesamtprofil: Verteilung von Natriumfluoreszein / Modus B





Abbildung 25: Ausschnitt: Verteilung von Natriumfluoreszein / Modus B



Abbildung 26: Gesamtprofil: Verteilung von Natriumfluoreszein / Modus C





Abbildung 27: Ausschnitt: Verteilung von Natriumfluoreszein / Modus C



Bei einem visuellen Vergleich der drei Penetrationsprofile (Modus A, B, C) eines Probanden lassen sich Unterschiede im Penetrationsverhalten erkennen:

Bei Modus A (keine wIRA-Strahlung) ist der Farbstoff, verglichen mit den Modi B und C, nur in geringem Ausmaß in die Tiefe des Stratum corneum penetriert. Der Großteil des applizierten Farbstoffes findet sich in den obersten Hautschichten.

Bei Modus B findet sich, verglichen mit Modus A, ein größerer Teil der applizierten Farbstoffmenge in tieferen Schichten des Stratum corneum. Eine Vorbehandlung der Haut mit wIRA hat hier zu einer verstärkten Penetration des Farbstoffes geführt. Vergleicht man jedoch die erreichte Penetration bei Modus B (wIRA-Bestrahlung vor Applikation) mit der erreichten Penetration bei Modus C (Applikation der Testsubstanz bei zeitgleicher Bestrahlung mit wIRA), so hat in Modus B eine geringere Penetration als in Modus C stattgefunden.

Bei Modus C hat, verglichen mit den Modi A und B, die stärkste Penetration stattgefunden: In den tieferen Schichten des Stratum corneum besteht eine höhere Konzentration des applizierten Farbstoffes. Ähnliche Ergebnisse wurden für alle Probanden erzielt.

#### 4.1.2 Vergleich der Penetrationsquotienten

Bei allen Probanden und bei allen Modi (A, B, C) reicherte sich Natriumfluoreszein in den oberen 20 % des Stratum corneum an, es kam hier zur Bildung eines Reservoirs. Innerhalb dieser oberen Schichten kam es jedoch zu signifikanten Unterschieden in der Verteilung, abhängig vom jeweiligen Versuchsmodus. Wurde die Haut nicht mit wIRA bestrahlt, war die Testsubstanz hauptsächlich innerhalb der oberflächlichsten Hornhautschichten lokalisiert. Kam es hingegen zu einer Bestrahlung mit wIRA, penetrierte der Farbstoff in tiefere Schichten des Stratum corneum. Dies bedeutet, dass die Penetration effizienter ist, wenn die Haut vor oder nach Applikation der Testsubstanz mit wIRA bestrahlt wird.

Um die Unterschiede in der Penetrationstiefe quantifizieren zu können, wurden die obersten 20 % des Stratum corneum analysiert. Lademann et al. zeigten, dass sich topisch applizierte Substanzen hauptsächlich in den oberen 20% der Hornschicht verteilen [97] [98]. Ein Quadratzentimeter des untersuchten Hautareals wurde auf seinen Farbstoffgehalt hin untersucht. Der Farbstoffgehalt in den obersten, oberflächlichen (1.) 10 % und der Farbstoffgehalt der darunter liegenden (2.) 10 % des Stratum corneum wurden bestimmt. Anschließend wurde ein Quotient aus tiefen und oberflächlichen 10 % errechnet, der

Penetrationsquotient. Je größer dieser Quotient, desto mehr Farbstoff findet sich in den tiefer liegenden Anteilen des Stratum corneum und desto tiefer ist der Farbstoff in die Haut eingedrungen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 28 für alle 12 Probanden in Form eines Box-Whisker-Graphs (Minimum, 25 %-Perzentile, Median, 75 %-Perzentile, Maximum, Interquartil Abstand (IQR)) zusammengefasst. Tabelle 2 zeigt neben den Mittelwerten für die Verteilungsquotienten zusätzlich die Standardabweichung für jeden Modus sowie Median, Maximal- und Minimalwerte.

Der Vergleich der Modi A, B und C zeigt deutliche Unterschiede: Es gab einen signifikanten Unterschied zwischen den Modi (p=0,0177 im Friedman-Test). Mittels Wilcoxon Wilcox Test als Post Hoc Test wurde ein signifikanter Unterschied zwischen Modus A und Modus C festgestellt, der eine signifikant tiefere Penetration von Modus C verglichen mit Modus A zeigte. Modus B zeigte als Trend eine tiefere Penetration verglichen mit Modus A.



Abbildung 28: Ratio der Menge an Natriumfluoreszein, gefunden in den tieferen (2.) 10 % des Stratum corneum zu der Menge an Natriumfluoreszein, gefunden in den oberen (1.) 10 % des Stratum corneum; n=12

	Mittelwert	Standardabweichung	Maximalwert	Median	Minimalwert
Modus A	0,027	0,03	0,1	0,017	0
Modus B	0,076	0,046	0,137	0,084	0
Modus C	0,122	0,073	0,25	0,104	0,009

Tabelle 2: Verteilungsquotienten von Natriumfluoreszein für die Probanden 1-12

Natriumfluoreszein penetrierte am effizientesten in das Stratum corneum, wenn die Applikationsfläche während der Penetrationszeit mit Infrarot A bestrahlt wurde (= Modus C). Auch eine Bestrahlung vor der Applikation konnte die Eindringtiefe von Natriumfluoreszein erhöhen (= Modus B). Wenn es zu keiner Bestrahlung der Haut (= Modus A) kam, wurde die Testsubstanz zumeist in den obersten Zellschichten der Hornhaut lokalisiert.

#### 4.2 Penetration von Curcumin

#### 4.2.1 Vergleich der Penetrationsprofile

Analog zu den Penetrationsuntersuchungen für hydrophiles Natriumfluoreszein wurden für das lipophile Curcumin für jeden Probanden und jeden Modus A, B und C Penetrationsprofile erstellt. Die Penetrationsprofile stellen einen Schnitt durch das Stratum corneum dar und zeigen die Verteilung von Curcumin in der Hornschicht am Beispiel von Proband 7. Abbildung 29, Abbildung 31 und Abbildung 33 zeigen das jeweilige Gesamtprofil, während Abbildung 30, Abbildung 32 und Abbildung 34 einen Ausschnitt hieraus zeigen, welcher die jeweilige Konzentration deutlicher erkennen lässt.



Proband 7 – Modus A

Abbildung 29: Gesamtprofil: Verteilung von Curcumin / Modus A



Proband 7 – Modus A

Abbildung 30: Ausschnitt: Verteilung von Curcumin / Modus A



Proband 7 – Modus B





Proband 7 – Modus B

Abbildung 32: Ausschnitt: Verteilung von Curcumin im Stratum / Modus B



Proband 7 – Modus C

Abbildung 33: Gesamtprofil: Verteilung von Curcumin im Stratum corneum / Modus C



Proband 7 – Modus C

Abbildung 34: Ausschnitt: Verteilung von Curcumin im Stratum / Modus C

Der visuelle Vergleich der Penetrationsprofile für Curcumin zeigt keine eindeutigen Unterschiede in der Penetrationstiefe für die Modi A, B und C. Ähnliche Ergebnisse wurden für alle Probanden erzielt.

#### 4.2.2 Vergleich der Penetrationsquotienten

Der Curcumingehalt in den obersten 10 % und den darunter liegenden 10 % der Hornschicht wurde errechnet und ein Quotient aus tiefen und oberflächlichen 10 % errechnet. Die Konzentration von Curcumin in den tieferen (2.) 10 % des Stratum corneum steht im Zähler, die Konzentration in den oberflächlichen (1.) 10 % des Stratum corneum im Nenner. Abbildung 35 zeigt die Mittelwerte der Quotienten für die Probanden 1-12 in Form eines Box-Whisker-Graphs (Minimum, 25 %-Perzentile, Median, 75 %-Perzentile, Maximum, Interquartil Abstand (IQR)). Tabelle 3 gibt neben den Mittelwerten für die Verteilungsquotienten zusätzlich die Standardabweichung für jeden Modus sowie Median, Maximal- und Minimalwerte.



Abbildung 35: Ratio der Menge an Curcumin, gefunden in den tieferen (2.) 10 % des Stratum corneum zu der Menge an Curcumin, gefunden in den oberen (1.) 10 % des Stratum corneum; n=12

	Mittelwert	Standardabweichung	Maximalwert	Median	Minimalwert
Modus A	0,025	0,027	0,07	0,012	0
Modus B	0,027	0,02	0,068	0,032	0
Modus C	0,023	0,016	0,061	0,022	0

Tabelle 3: Verteilungsquotienten von Curcumin für die Probanden 1-12

Der Vergleich der Modi A, B und C zeigt keine signifikanten Unterschiede (p = 0,86 im Friedman Test), bei einem Signifikanzniveau von  $\alpha$  = 0,05. Curcumin ist bei allen drei Behandlungsmodi, unabhängig von der Infrarot-Bestrahlung, ähnlich stark in das Stratum corneum eingedrungen.

### 4.3 Hautparameter

Neben der Erstellung von Penetrationsprofilen wurden physiologische Messungen der Haut durchgeführt. Gemessen wurden der transepidermaler Wasserverlust (TEWL) als Variable für die Barrierefunktion der Haut, die Hautfeuchte mittels Korneometrie und die Hauttemperatur. Die Daten wurden für alle 12 Probanden im Modus B und C vor und unmittelbar nach der Bestrahlung erfasst. Die Ergebnisse sind in den Abbildungen 36, 37 und 38 dargestellt. Durch die Bestrahlung mit wIRA stiegen an:

- die Temperatur der Hautoberfläche in Modus B und C von 32,8°C auf 36,4°C
- die Hautfeuchte (in relativen Einheiten) in Modus B und C von 67 auf 87
- der transepidermale Wasserverlust in Modus B und C von ungefähr 8,8 g/m<sup>2</sup>/h auf 14,2 g/m<sup>2</sup>/h

#### 4.3.1 Ergebnisse der Hauttemperaturmessung

Die Hauttemperatur wurde für alle 12 Probanden im Modus B und C vor und unmittelbar nach der Bestrahlung mit einem Infrarot-Handthermometer gemessen. Es zeigte sich ein Temperaturanstieg in beiden Modi von durchschnittlich 32,8 °C auf 36,4°C. Die Temperaturdifferenz (ΔT) betrug demzufolge 3,6°C.



Abbildung 36: Temperatur der Hautoberfläche (Minimum, 25%-Perzentile, Median, 75%-Perzentile, Maximum) Box und Whiskers Plot, wobei die Box den Interquartil (IQR) Abstand darstellt; n=12

#### 4.3.2 Ergebnisse der Korneometrie

Die Korneometrie ermöglicht Messungen der Hautfeuchtigkeit. Dabei wird über eine Kapazitätsmessung über dem Stratum corneum der Wassergehalt der Haut vor allem in den Korneozyten bestimmt. Die Hautfeuchte wurde für alle 12 Probanden im Modus B und C vor und unmittelbar nach der Bestrahlung in einem Hautareal nahe der Applikationsfläche gemessen.



Abbildung 37: Hydratation der Haut (Korneometrie) (Minimum, 25%-Perzentile, Median, 75%-Perzentile, Maximum) Box und Whiskers Plot, wobei die Box den Interquartil (IQR) Abstand darstellt; n=12

Der durchschnittliche Wert der Hautfeuchte liegt bei 67 wenn keine Bestrahlung erfolgte, bei 87 wenn mit wIRA bestrahlt wurde. Der durchschnittliche Anstieg der Hautfeuchte ( $\Delta$ ) nach Bestrahlung in den Modi B und C betrug 20. Durch die Infrarot-A Bestrahlung erfolgte eine Hydratation der Epidermis.

#### 4.3.3 Ergebnisse der TEWL- Messung

Der transepidermale Wasserverlust (TEWL) ist ein Maß für die Barrierefunktion der Haut. Der TEWL wurde für alle 12 Probanden im Modus B und C vor der Bestrahlung und unmittelbar nach der Bestrahlung gemessen. Nach der Infrarotbestrahlung zeigt sich ein signifikanter Anstieg des transepidermalen Wasserverlustes von durchschnittlich 8,8 g/m2/h auf 14,2 g/m2/h.



Abbildung 38: Transepidermaler Wasserverlust, TEWL (Minimum, 25%-Perzentile, Median, 75%-Perzentile, Maximum) Box und Whiskers Plot, wobei die Box den Interquartil (IQR) Abstand darstellt); n=12

#### 4.4 In vivo-Untersuchung mittels Laser - Scan - Mikroskopie

Für die Visualisierung der Fluoreszenzfarbstoffe auf der Hautoberfläche und in den oberen Schichten des Stratum corneum wurde ein konfokales Laser-Scan-Mikroskop eingesetzt. Diese neuartige Methode ermöglicht es, in vivo die Verteilung von Fluoreszenzfarbstoffen innerhalb der Epidermis zu visualisieren und zu beurteilen.

Die Untersuchungen am Laser-Scan-Mikroskop wurden für alle 12 Probanden im Modus A, B und C durchgeführt. Die Applikation der Farbstoffformulierungen erfolgte in jedem Modus auf 2 Hautarealen pro Unterarm. In unmittelbarem Anschluss an die 30-minütige Penetrationszeit wurde das erste Hautareal laser-scan-mikroskopisch untersucht. Anschließend fand die Behandlung des zweiten Hautareals mit Hilfe der Abrissmethode statt.

## 4.4.1 Natriumfluoreszein-Formulierung

Abbildung 39, Abbildung 40 und Abbildung 41 zeigen die Verteilung von Natriumfluoreszein am Beispiel von Proband 1. In der unbestrahlten Hornschicht findet sich der Farbstoff ausschließlich in den oberen 1 – 2 Korneozytenlagen. Nach der Infrarot-A Bestrahlung ist deutlich eine Fluoreszenz in den oberen 4 Korneozytenlagen zu erkennen. Die Bestrahlung hat folglich zu einer Penetrationsverstärkung geführt.



Abbildung 39: LSM – Verteilung von Natriumfluoreszein / Modus A



Abbildung 40: LSM - Verteilung von Natriumfluoreszein / Modus B



Abbildung 41: LSM - Verteilung von Natriumfluoreszein / Modus C

#### 4.4.2 Curcumin-Formulierung

Abbildung 42 zeigt die Verteilung von Curcumin in den oberen Schichten des Stratum corneum am Beispiel von Proband 5 Modus C. Es zeigten sich keine wesentlichen Unterschiede in der Verteilung des Farbstoffes in den verschiedenen Modi. Fluoreszenzsignale ließen sich in den oberen 1 - 2 Korneozytenlagen beobachten, unabhängig davon, ob eine Bestrahlung stattgefunden hatte oder nicht. Die Bestrahlung mit wIRA verursachte somit keinen Unterschied in der Penetrationskinetik. Insgesamt zeigte sich eine schwächere Fluoreszenz verglichen mit Natriumfluoreszein.



Abbildung 42: LSM - Verteilung von Curcumin / Modus C

#### 4.4.3 Fluoreszenzsignale in Hautspalten und Haarfollikeln

Die Fluoreszenzfarbstoffe lagerten sich um die Zellhülsen, reicherten sich innerhalb der Interzellularspalten an und wurden von Korneozyten aufgenommen. Größere Ansammlungen von Fluoreszenzfarbstoffen fanden sich in Haarfollikeln und Hautspalten. Entlang der Hautspalten ließen diese sich auch in tiefere Hornhautschichten verfolgen. Abbildung 43 zeigt fluoreszierende Hautspalten, Abbildung 44 ein fluoreszierendes Haar.



Abbildung 43: LSM – Anreicherung der Fluoreszenzfarbstoffe innerhalb von Hautspalten



Abbildung 44: LSM – fluoreszierendes Haar

#### 4.4.4 Messergebnisse mittels Laser-Scan-Mikroskopie

Indem die Fokusebene des Laser-Scan-Mikroskops schrittweise von der Hautoberfläche in die Tiefe bewegt wird, kann das Vorhandensein von Fluoreszenzsignalen einer jeden Hornhautschicht beurteilt und in die Tiefe verfolgt werden.

Richtet man die Fokusebene auf das am tiefsten in der Haut liegende Fluoreszenzsignal der Testsubstanz, so entspricht die Distanz zwischen Hautoberfläche und Fokusebene der Penetrationstiefe. Die exakte Bestimmung des tiefsten Fluoreszenzsignals erweist sich jedoch als erschwert durch die Tatsache, dass die Fluoreszenzen apikal gelegener Hautschichten zu Streusignalen auch in tieferen Hautschichten führen. Von uns wurde daher als tiefstes Fluoreszenz-Signal das Signal der tiefsten, noch scharf abbildbaren Korneozytenlage definiert. Für alle 12 Probanden wurde im Modus A, B und C mittels LSM die Dicke der Schicht ausgemessen, in welcher Fluoreszenz-Signale nachgewiesen wurden. Der Vergleich dieser Daten (siehe nachfolgende Tabellen) ermöglichte, Unterschiede in der Penetrationstiefe festzustellen. Hierbei gilt es zu beachten, dass die Tiefenskala des Geräts "Stratum" nicht in absoluten Einheiten kalibriert ist, sondern mit einer Skala aufwartet, welche 4096 relative Einheiten besitzt. Innerhalb dieses Messintervalls arbeitet der Sensor jedoch linear.

#### Natriumfluoreszein



Abbildung 45: Tiefe des tiefsten Fluoreszenzsignal in relativen Einheiten des Gerätes "Stratum" (Minimum, 25%-Perzentile, Median, 75%-Perzentile, Maximum) Box und Whiskers Plot, wobei die Box den Interquartil (IQR) Abstand darstellt; n=12

	Mittelwert	Standardabweichung	Maximalwert	Median	Minimalwert
Modus A	312	73,15	400	330	150
Modus B	458,5	141,14	580	500	80
Modus C	519,5	105,74	650	537,5	260

# Tabelle 4: Penetrationstiefe für Natriumfluoreszein für die Probanden 1-12, gemessen in relativen Einheiten des LSM "Stratum"

Auch hier zeigt sich, dass wassergefilterte Infrarot-A-Strahlung einen Einfluss auf den Penetrationsprozess des hydrophilen Natriumfluoreszeins besitzt: der Vergleich der Modi A, B und C zeigt deutliche Unterschiede: Bei Modus B und deutlicher noch bei Modus C findet sich das tiefste Fluoreszenzsignal in einer tieferen Schicht, als dies bei Modus A ohne wIRA-Strahlung der Fall ist. Es gab einen signifikanten Unterschied zwischen den Modi (p=0,0034 im Friedman-Test). Mittels Wilcoxon Wilcox Test wurde des Weiteren ein signifikanter Unterschied zwischen Modus A und Modus C festgestellt.



Abbildung 46: Tiefe des tiefsten Fluoreszenzsignal in relativen Einheiten des Gerätes "Stratum" (Minimum, 25%-Perzentile, Median, 75%-Perzentile, Maximum) Box und Whiskers Plot, wobei die Box den Interquartil (IQR) Abstand darstellt; n=12

	Mittelwert	Standardabweichung	Maximalwert	Median	Minimalwert
Modus A	338	158,66	480	338	20
Modus B	333	160,26	540	333	70
Modus C	388	153,31	590	388	80

Tabelle 5: Penetrationstiefe für Curcumin für die Probanden 1-12, gemessen in relativen Einheiten des LSM "Stratum"

Betrachtet man hingegen die Penetration des lipophilen Curcumin, so zeigt sich auch anhand der LSM-Messungen, dass es zu keinerlei Unterschied in den Modi A, B und C kommt. Der Vergleich der Modi A, B und C zeigt keine signifikanten Unterschiede (p=0,83 im Friedman-Test). wIRA zeigt hier keinen Einfluss auf das Penetrationsverhalten.