

Aus der Universitätsklinik und Poliklinik für Dermatologie und Venerologie
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
Direktor: Prof. Dr. med. Wolfgang Ch. Marsch

Präklinische Validierung barriereprotektiver Effekte eines Niacinamid-haltigen Kosmetikums

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Medizin (Dr. med.)

vorgelegt
der Medizinischen Fakultät
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von

DANIELA CHRISTINE KREFT

geboren am 07.04.1976 in Olsberg

Betreuer: apl. Prof. Dr. med. habil. J. Wohlrab

Gutachter: 1. apl. Prof. Dr. med. habil. J. Wohlrab
2. Prof. Dr. med. Ulrike Blume-Peytavi
3. Prof. Dr. med. Lutz Kowalzik

Eröffnung des Verfahrens: 07.07.2015
Datum der Verteidigung: 11.01.2016

Meiner Familie

Referat

Niacinamid ist ein Vitamin B, kommt natürlich vor und ist als Bestandteil der Coenzyme NAD und NADP auch in der Haut vorhanden. Es wurde als einer der Induktoren der keratinozytären Lipid- und Ceramidsynthese identifiziert. Durch Induktion der Aktivität der Serinpalmitoyltransferase (SPT), dem Schrittmacherenzym des Sphingolipidsyntheseweges, sowie der Synthese freier Fettsäuren und des Cholesterols wird ein komplexer Einfluss auf die Quantität der Bestandteile des Stratum corneum vermittelt. Die praktische Relevanz dieser biochemischen Wirkungen auf die Barrierefunktionalität des Stratum corneum wurde bereits belegt und Wirkeffekte auf atopischer Haut nachgewiesen. Die topische Anwendung von Niacinamid wird in kosmetischen Präparaten bereits seit längerer Zeit praktiziert. Meistens liegen zu den eingesetzten Präparaten aber keine galenischen Untersuchungen vor, die das Penetrationsprofil des Wirkstoffes belegen und die kutane Bioverfügbarkeit nachweisen.

Zielsetzung: Es sollte gezeigt werden, dass die Zusammensetzung einer neu entwickelten kosmetischen Präparation die präklinischen Voraussetzungen zur funktionellen Substitution trockener Haut erfüllt.

Material und Methoden: Unter Verwendung eines 4%-igen Niacinamid-haltigen Prüfpräparates wurden Konzentrations-Zeit-Profile von Niacinamid an gesunder, geschädigter und überhydratisierter Haut bestimmt, sowie die Interaktion der lipophilen Phasen des Prüfpräparates mit dem Stratum corneum charakterisiert.

Ergebnisse: Aus dem Prüfpräparat wird ausreichend Niacinamid liberiert und diffundiert in die vitalen Hautschichten, vorzugsweise in die Epidermis. Die lipophile Phase wird, auch unter pathologischen Bedingungen, gleichmäßig im Stratum corneum verteilt.

Schlussfolgerungen: Anhand der vorliegenden Daten lässt sich eine ausreichende Bioverfügbarkeit des Wirkstoffes Niacinamid in der Epidermis belegen. Somit sind die präklinischen Voraussetzungen für eine barriereprotektive Wirksamkeit zur Therapie von trockener Haut durch das Prüfpräparat gegeben. Ebenso lässt sich eine Interaktion der enthaltenen Fette, insbesondere der Sheabutter, mit der lipophilen Phase des Stratum corneum nachweisen.

Inhaltsverzeichnis

Referat

Inhaltsverzeichnis

Verzeichnis der Abkürzungen und Symbole

1 Einleitung

1.1	Aufbau und Funktion der epidermalen Barriere	1
1.1.1	Trockene Haut als Ausdruck eines epidermalen Barrieredefektes	2
1.1.2	Möglichkeiten der Substitution der Barrierefunktion	3
1.2	Niacinamid – ein bedeutsames Vitamin	5
1.2.1	Topische Anwendung von Niacinamid	6
1.3	Sheabutter	8

2 Zielstellung 11

3 Material und Methodik

3.1	Material	12
3.1.1	Biologisches Material	12
3.1.2	Chemisches und biochemisches Material	12
3.1.3	Laborgeräte und Labormaterialien	13
3.1.4	Zusammensetzung der Prüfpräparation	14
3.2	Methodik	16
3.2.1	Allgemeine Versuchsdurchführung	16
3.2.2	Franz´sche Diffusionszelle	16
3.2.3	Radioaktive Markierung der Prüfpräparate	17
3.2.4	Ermittlung des Konzentrations-Zeit-Profiles	18
3.2.5	Fluoreszenzmarkierung der Prüfpräparate	19
3.2.6	Penetrationsversuche	20
3.2.7	Fluoreszenzmikroskopie	20
3.2.8	Digitale Auswertung der Fluoreszenzmikroskopiebilder	20

4 Ergebnisse

4.1	Permeationsverhalten von Niacinamid	22
4.1.1	Konzentrations-Zeit-Profil	22
4.2	Interaktion von Sheabutter mit dem Stratum corneum	26
4.2.1	Fluoreszenzverteilung bei intakter Haut	26

4.2.2	Fluoreszenzverteilung bei artifiziell vorgeschädigter Haut	27
4.2.3	Fluoreszenzverteilung bei gewässerter Haut	27
4.3	Penetrationsverhalten der lipophilen Phase der Prüfpräparation	29
4.3.1	Penetration bei intakter Haut	29
4.3.2	Penetration bei artifiziell vorgeschädigter Haut	29
4.3.3	Penetration bei gewässerter Haut	30
5 Diskussion		
5.1	Welches Verteilungsverhalten weist der Inhaltsstoff Niacinamid nach epikutaner Applikation auf?	33
5.1.1	Stratum corneum	34
5.1.2	Vitale Epidermis	34
5.1.3	Korium	35
5.2	In welchem Kompartiment der Haut lagern sich die enthaltenen lipophilen Phasen der Sheabutter ein?	36
5.3	Wie interagiert die kosmetische Präparation als galenisches Gesamtsystem mit dem Stratum corneum?	38
5.4	Einschränkungen der Aussagekraft der vorliegenden Daten	39
5.5	Ausblick	40
6 Zusammenfassung		42
7 Literaturverzeichnis		43
8 Thesen der Dissertation		49

Verzeichnis der Abkürzungen und Symbole

Abkürzung (alph.)	Bedeutung
AUC	Area under the curve
cpm	counts per minute
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
Dil	1,1'-Dioctadecylic-3,3,3',3'-tetramethylindo-carbocyaninperchlorat
CE	cornified envelope
dpm	desintegration per minute
fm	fluoreszenzmikroskopisch
NAD	Nicotin-adenin-dinucleotid
NADP	Nicotinamidadenindinucleotidphosphat
NCA	Niacinamid
NOS	Stickstoffmonoxid-Synthase
SC	Stratum corneum
SPT	Serinpalmitoyltransferase
TEWL	transepidermaler Wasserverlust

1 Einleitung

1.1 Aufbau und Funktion der epidermalen Barriere

Eine der wichtigsten Funktionen der Haut des Menschen ist die Bildung einer wirksamen Barriere zwischen der Umwelt und dem menschlichen Organismus. Unterschieden wird dabei zwischen physikalischer, chemischer/biochemischer und immunologischer Barriere (Proksch et al., 2008). Sie verhindert einerseits einen übermäßigen transepidermalen Wasserverlust (TEWL), andererseits wird der Eintritt von Noxen aus der Umwelt, wie Irritantien, Allergenen und Mikroorganismen, erschwert (Segre, 2006). Man geht heute davon aus, dass für die Hautbarriere zwei wesentliche Strukturen verantwortlich sind: das Stratum corneum und die sogenannten „tight junctions“ als interzelluläre Verbindungen in den epidermalen Schichten unterhalb des Stratum corneum (De Benedetto et al., 2011). Letztere wiederum sind abhängig von einer ausreichenden Bildung und Funktion von E-Cadherinen, also transmembranösen Glykoproteinen aus der Gruppe der Adhäsionsproteine, welche entscheidend an der Funktion von Zell-Zell-Kontakten und somit an der Gewebearchitektur beteiligt sind (Tunggal et al., 2005). Ebenso wirken auch Desmosomen als Zell-Zell-Adhäsionsstrukturen und die in den weiter basal gelegenen dermo-epidermalen, junktionalen Schichten der Haut befindlichen hemidesmosomalen Strukturen am Aufbau der Barrierefunktion mit (Niessen, 2007). Für diese ist jedoch das Stratum corneum, bestehend aus proteinreichen Korneozyten und einem lipidangereicherten Interzellularraum, von ganz entscheidender Bedeutung. Das Stratum corneum wird während der unter normalen Bedingungen ca. 28 Tage dauernden epidermalen Differenzierung ausgehend vom Stratum basale und insbesondere beim Vorgang des Zelluntergangs im Rahmen der Verhornung gebildet (Proksch et al., 2009). Im oberen Stratum spinosum und im Stratum granulosum werden dabei zum einen die von den Keratinozyten synthetisierten Lipide in sogenannten lamellar bodies (Odland-Körperchen) gespeichert und im Stratum granulosum durch Exozytose in die Interzellularspalten freigesetzt (Roop, 1995). Der Inhalt der lamellar bodies besteht dabei überwiegend aus Phospholipiden, Sterolen und Glykosylceramiden (Stachowitz, 2000). Zum anderen entstehen in diesen Hautschichten die flachen, kernlosen Korneozyten des Stratum corneum, die mit Keratinfilamenten beladen sind und an deren Innenseite sich das „cornified envelope“ (CE) ausbildet (Madison, 2003). Das CE ist eine dichte protein- und lipidreiche Polymerstruktur, welche aus unterschiedlichen Proteinen besteht, wie z.B. Involucrin, Filaggrin und Loricrin (Hohl, 1990). Es entsteht während der Verhornung (Keratinisierung), also der Umwandlung der vitalen Epithelzellen der Epidermis in avitales Hornmaterial (Keratin), und trägt damit zu einer Schutzschicht gegenüber der

Umwelt bei. Dadurch entsteht eine breite, lamellär angeordnete Lipidschicht, die den Interzellularraum zwischen den durch den CE ummantelten Korneozyten vollständig ausfüllt (Wohlrab et al., 2010).

Die Strukturproteine des CE, insbesondere Keratinintermediärfilamente und Filaggrin, bilden miteinander Komplexe, werden mit dem CE vernetzt und stellen den Hauptanteil der terminal differenzierten Keratinozyten dar (Proksch et al., 2009). Filaggrin als kationisches, histidinreiches Protein besitzt somit eine strukturbildende Funktion für die Epidermis (Houben, 2007).

Die Abbauprodukte des Filaggrin sind an der Wasserbindungsfähigkeit des Stratum corneum beteiligt und bilden zusammen mit Laktat und Harnstoff, welche überwiegend aus dem Schweiß in die Hornschicht gelangen, den sogenannten Natural-Moisturizing-Faktor (natürlichen Feuchthaltefaktor) (Proksch et al., 2009). Aus Untersuchungen ist bekannt, dass der atopischen Dermatitis offenbar Mutationen im Filaggrin-Gen zugrunde liegen, die dazu führen, dass das Filaggrin in den äußeren Hautschichten mangelhaft zusammengesetzt ist und somit eine gestörte Barrierefunktion der Haut resultiert (Palmer et al., 2006). Man kann sogar davon ausgehen, dass in Europa heutzutage die heterozygote Mutation im Filaggrin-Gen eine der häufigsten menschlichen monogenen Störungen darstellt (Segre, 2006).

Die lipophile Komponente der epidermalen Barriere wird vorwiegend von Ceramiden (ca. 40%), aber auch Cholesterol, freien Fettsäuren (je ca. 25%), Cholesterolsulfat sowie Triglyceriden gebildet, wobei insbesondere der heterogenen Mischung der bisher neun bekannten Ceramide (Sphingolipide) eine essentielle Bedeutung beim Aufbau der Barriere zukommt (Skolová, 2014). Zudem stabilisieren diese Ceramide die interzellulären Lipidlamellen und besitzen die Fähigkeit zur Speicherung von Wasser. Fettsäuren dienen auch als wichtige Energiequelle (Schneider und Wohlrab, 1997).

1.1.1 Trockene Haut als Ausdruck eines epidermalen Barrieredefektes

Das wichtigste klinische Symptom für ein Funktionsdefizit der epidermalen Barriere ist die „trockene Haut“. Für das Grundverständnis der Pathogenese von trockener Haut ist bedeutsam, dass mehrere, zum Teil sehr differente strukturelle bzw. funktionelle Veränderungen innerhalb des Stratum corneum diesen pathologischen Zustand begründen können. Häufig sind es Veränderungen der epidermalen Differenzierung und der Lipidzusammensetzung des Stratum corneum, die mit einem erhöhten TEWL einhergehen und das Eindringen von Umweltantigenen erleichtern (Fartasch, 1997). Trockene Haut kann isoliert als klinisches Symptom auftreten, kann aber auch die pathogenetische Grundlage verschiedener Dermatosen sein. Außerdem kann dieses

Symptom auch bei Systemerkrankungen mit direkter oder indirekter Einflussnahme auf die Barrierefunktion beobachtet werden, welche dann in der Regel erworbene Funktionsdefizite sind. Daneben existieren angeborene Formen, die auf der Grundlage einer genetischen Disposition durch eine komplexe funktionsstrukturelle Veränderung zum Symptom der trockenen Haut führen. Die wichtigsten in diesem Zusammenhang zu erwähnenden Erkrankungen sind die Atopische Dermatitis, die Psoriasis vulgaris und die Gruppe der Ichthyosen (Madison, 2003). Entzündliche Erkrankungen wie die Atopische Dermatitis und die Psoriasis vulgaris weisen eine ausgeprägte Barriestörung auf, die bei der Atopischen Dermatitis auch in nicht-läsionalen Hautarealen evident ist (Proksch et al., 2009). Bei der atopischen Dermatitis lassen sich – wie bereits oben beschrieben - häufig Mutationen im Filaggrin-Gen nachweisen. Da Filaggrinpeptide für eine intakte epidermale Barriere von entscheidender Bedeutung sind, führen Mutationen im Filaggrin-Gen mit daraus resultierender verminderter Filaggrinsynthese in den äußeren Hautschichten zu einer gestörten Barrierefunktion mit erhöhtem TEWL (Palmer et al., 2006). Die gestörte Hautbarriere erleichtert Typ-IV-Allergenen das Eindringen in die Haut (Jensen und Proksch, 2009) und kann über immunologische Prozesse unter anderem durch eine Bindung an epidermale Langerhanszellen ein allergisches Kontaktekzem hervorrufen.

Weiterhin gibt es Funktionsdefizite, die mit dem Symptom der trockenen Haut einhergehen und auch unter physiologischen Bedingungen entstehen können. Ursachen hierfür können vielfältig sein. So können eine individuelle Veranlagung, der natürliche Alterungsprozess oder exogene physikalische und chemische Triggerfaktoren, wie zum Beispiel der übermäßige Gebrauch von Detergenzien, zu einer relevanten Exsikkation der Haut führen.

1.1.2 Möglichkeiten der Substitution der Barrierefunktion

Die epidermalen Lipide spielen für die Haut und somit für die Barrierefunktion eine entscheidende Rolle. Hautschutz und Hautpflege zielen deshalb darauf ab, die Lipidschichten zwischen den Korneozyten

- a) möglichst in einem intakten Zustand zu erhalten oder
- b) wieder in einen intakten Zustand zu versetzen.

Ist die Barrierefunktion gestört, bedingt dies auch eine Regenerations- und Differenzierungsstörung der Haut. Um den Regenerationsprozess von außen zu unterstützen, versucht man, hautidentische oder -verwandte Stoffe in die Epidermis

einzuschleusen, welche die physiologische Ordnung der Lipide wiederherstellen (Wohlrab et al., 2010).

Die Ursachen für eine gestörte Barrierefunktion sind sehr vielfältig, weshalb nicht nur ein einziges Präparat für alle pathologischen Veränderungen geeignet sein kann. So gibt es mehrere Anforderungen an topisch applizierte pharmazeutische oder kosmetische Wirksubstanzen, welche insbesondere für trockene und empfindliche Haut entwickelt wurden. Die erwünschten Wirkungen dieser Substanzen gehen von einer Substitution von Fett und Wasser aus, um einen Mangel auszugleichen. Zudem soll die Geschmeidigkeit der Haut wiederhergestellt und die Barrierefunktionalität verbessert werden, um die Haut vor weiterer Austrocknung zu schützen. Dabei ist der interzelluläre Weg bei der Wirkstoffpenetration quantitativ am wichtigsten (Neubert und Wepf, 2007). Weiterhin begünstigt eine hohe Lipophilie eines Stoffes sein Eindringen in die Haut (Worret und Gehring, 2004).

Die Grundlage der meisten Hautpflegepräparate ist eine Emulsion und somit ein Gemisch aus Fett, Wasser und Emulgatoren. Die klassischen W/O (Wasser in Öl)-Emulsionen erzeugen einen Lipidfilm auf der Haut, der eine okklusive Wirkung ausübt und somit einem übermäßigen Wasserverlust entgegenwirkt. Durch den erniedrigten TEWL ergibt sich ein zeitlich befristeter positiver Barriereeffekt (Prosch et al., 2008).

Entscheidend für das Wirkprofil eines jeden topisch angewandten Produktes sind die Art seiner Zubereitung, die Zusammensetzung der Inhaltsstoffe sowie die zugesetzten Pflegesubstanzen. Allerdings sind die Wechselwirkungen lipophiler Bestandteile von Pflegeprodukten mit dem Stratum corneum und deren Einfluss auf die Barrierefunktion hochkomplexe Vorgänge, die bisher nur ansatzweise verstanden sind (Sheu et al., 1999). Dennoch zeigen bisherige Untersuchungen, dass substituierte Lipidmischungen, wie z.B. raffinierte Sheabutter, zumindest eine anteilige Interaktion mit der lipophilen Phase des Stratum corneum aufweisen.

Lipide, die als Grundlage von Hautpflegeprodukten verwendet werden, sind durch die Zusammensetzung ihrer Fettsäuren charakterisiert. Die Fettsäurestruktur einiger natürlich gewonnener Lipidmischungen, wie z.B. raffinierte Sheabutter (Extrakt aus der Sheabutter-Nuss), ist der hauteigenen Lipidstruktur recht ähnlich und somit als barriereprotektiver bzw. -reparativer Zusatz interessant (Lodén und Andersson, 1996). Emulgatoren hingegen besitzen das Risiko, hauteigene Lipide aus dem Stratum corneum herauszulösen. Emulgatoren können somit die Hornschicht schädigen und zu Exsikkation und letztendlich zur Barrierschädigung führen (Gloor und Gehring, 2003).

1.2 Niacinamid – ein bedeutsames Vitamin

Niacinamid (NCA) (synonym: Nicotinamid, Nikotinsäureamid, Vitamin B₃, Pyridin-3-carboxamid, Pyridin-3-carbonsäureamid) kommt in freier und gebundener Form in Pflanzen und tierischen Geweben meist als Bestandteil der Pyridinnucleotide Nicotinadenin-dinucleotid (NAD) und Nicotinamid-adenin-dinucleotid-phosphat (NADP) vor, welche als Coenzyme in vielen biochemischen Reaktionen mitwirken (Otte et al., 2005). Das hydrophile Molekül gehört zur Gruppe der B-Vitamine und wird im Organismus aus Nicotinsäure gebildet, welche die gleiche Wirksamkeit aufweist wie ihr Amid (Burgess, 2008). Etwa 40-50 % des benötigten Niacinamids wird über die Nahrung zugeführt (Wohlrab und Kreft, 2014). Der größere Anteil des Tagesbedarfs wird durch die körpereigene Synthese aus Tryptophan bereitgestellt (Krauss und Knorr, 2009). Bei ausgeprägten Vitamin-B₃-Mangelzuständen infolge tryptophanarmer oder einseitiger überwiegend pflanzlicher Ernährung kann das Krankheitsbild der Pellagra entstehen, bei der klinisch sonnenbrandartige Hautveränderungen, Durchfall, dementielle Syndrome und letztendlich vital bedrohliche Zustände auftreten können. Heutzutage ist dieses Krankheitsbild sehr selten. Niacinamid wurde nach Entdeckung seiner gegen Pellagra schützenden Wirkung als Vitamin PP oder PP-(Pellagra Preventive) Faktor bezeichnet und gehört zur Gruppe der wasserlöslichen Vitamine. Für die pharmazeutische oder kosmetische Anwendung wird es als weißes, kristallines Pulver oder in Form farbloser Kristalle bereitgestellt, welche ausschließlich synthetisch hergestellt werden.

NCA ist entscheidend am zellulären Energiestoffwechsel und bei Syntheseprozessen im Körper beteiligt (Bissett, 2002; Soma et al., 2005). In verschiedenen Studien, in denen in vivo oder in vitro Niacinamid verabreicht wurde, konnten vielfältige biologische Effekte nachgewiesen werden. Diese Effekte sind dann besonders auffällig, wenn die physiologischen Niacinamidkonzentrationen überschritten werden, wie sie bei epikutaner Anwendung von Niacinamid-enthaltenden galenischen Systemen erreicht werden (Sivapirabu et al., 2009).

Erste Berichte über die orale Verwendung von Niacinamid gibt es aus den 1930er Jahren bezüglich der Therapie von Pellagra. Die erfolgreiche Behandlung der dementiellen Pellagrasymptome führte nachfolgend zur Ausdehnung des Einsatzes von Niacinamid auch bei der Behandlung anderer psychiatrischer Erkrankungen (Hoffer et al., 1954). Die damals beschriebenen Behandlungserfolge konnten in späteren Arbeiten nicht repliziert werden, weshalb dieser Therapieweg nicht weiter verfolgt wurde.

Jedoch wurde die orale Anwendung von Niacinamid aufgrund seiner pellagraprotektiven Wirkung insoweit ausgedehnt, dass es als Nahrungsergänzungsmittel frei zugänglich wurde und vielen Nahrungsmitteln in geringer Konzentration zugesetzt wird.

1.2.1 Topische Anwendung von Niacinamid

Die topische Anwendung von Niacinamid wird in kosmetischen Präparaten bereits seit längerer Zeit praktiziert. Galenische Untersuchungen zum Penetrationsprofil und zur Bioverfügbarkeit des Wirkstoffs in der Haut liegen für niacinamidhaltige Präparate aber meist nicht vor. Dennoch konnten diverse klinische Studien belegen, dass die topische Anwendung von Niacinamid dermatologisch interessante Effekte hervorrufen kann.

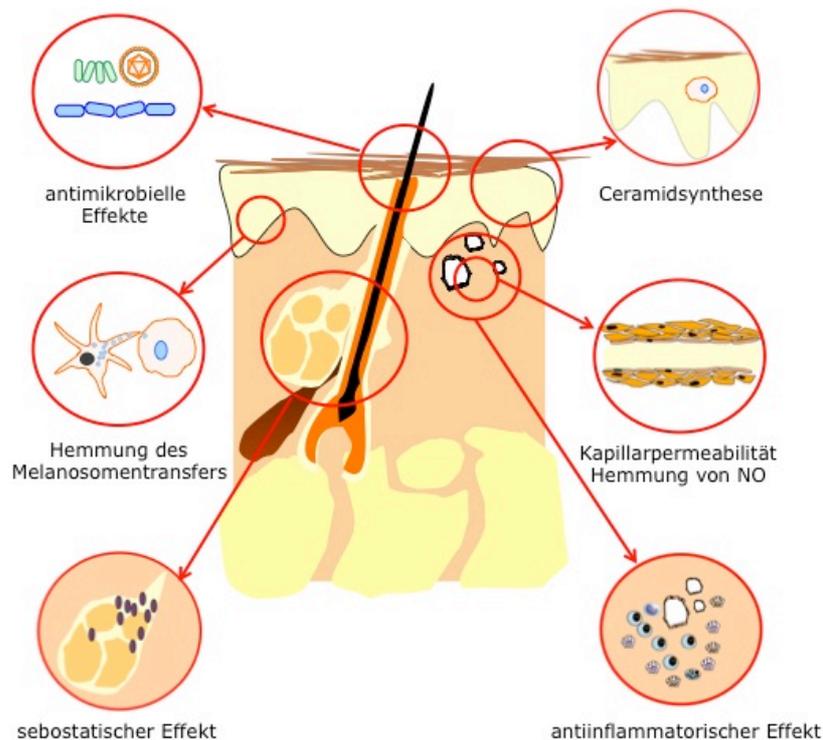


Abb. 1: Effekte von topisch angewendetem Niacinamid

Durch Induktion der Aktivität der Serinpalmitoyltransferase (SPT) (Tanno et al., 2000), dem Schlüsselenzym der Sphingolipidsynthese, sowie der Synthese freier Fettsäuren und Cholesterol wird ein komplexer Einfluss auf die Quantität der Bestandteile des Stratum corneum ausgeübt. Niacinamid stimuliert somit die endogene Lipidsynthese,

insbesondere die Ceramidsynthese in vitalen Keratinozyten und hat damit direkten Einfluss auf die Barrierefunktion der Haut (Bissett, 2002).

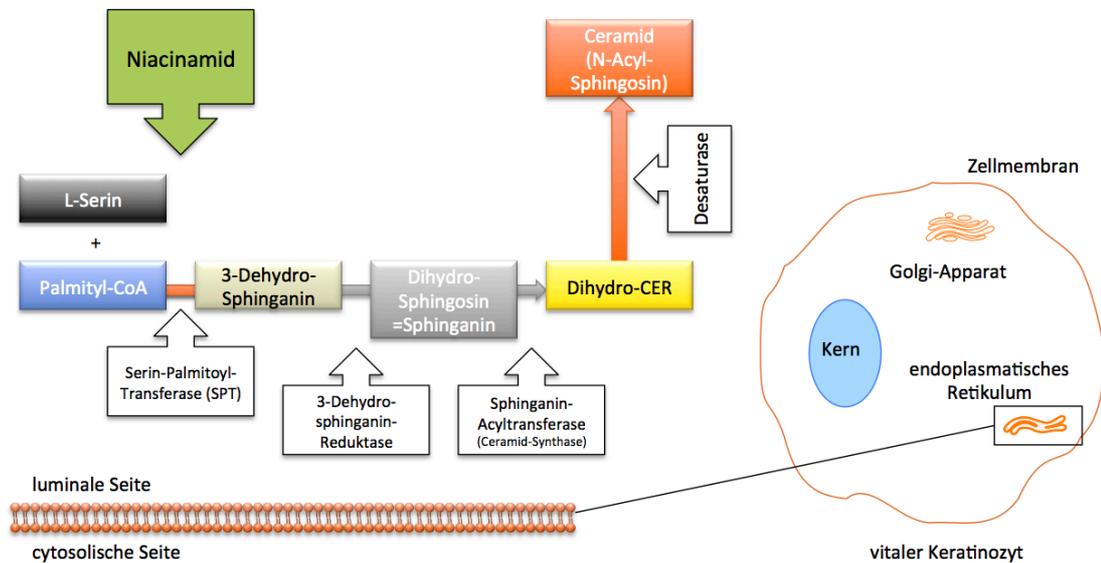


Abb. 2: Induktion der Serin-Palmitoyl-Transferase (SPT) in der keratinozytären Ceramidsynthese durch Niacinamid

Zudem besitzt Niacinamid eine antipruriginöse Wirkung, die damit erklärt werden kann, dass bei vielen Juckreizzuständen eine TH1-Mediation beobachtet wird, welche durch Niacinamid als Induktion einer TH2-Antwort neutralisiert werden kann (Namazi, 2007). Außerdem ist Niacinamid ein potenter Inhibitor der cAMP-Phosphodiesterase, wirkt mastzellstabilisierend und reduziert damit die Histaminfreisetzung (Szukiewicz, 2010).

Niacinamid besitzt eine antientzündliche Wirkung, da es die Expression von MHC-II und die Produktion von IL-12, TNF- α und IL-1 hemmen kann (Namazi, 2007). Des Weiteren kann es die B-Zell-Differenzierung hemmen, was bisher am besten für CD38 untersucht wurde. Dieser Sachverhalt lässt sich dadurch erklären, dass Niacinamid mit den Glycosylphosphatidylinositol-verankerten ADP-Ribosyltransferasen an der Zellmembran von Lymphozyten interagiert (Fivenson, 2006). Außerdem wird beschrieben, dass Niacinamid regulierende Effekte auf neutrophile Granulozyten aufweist (Khanna-Gupta und Berliner, 2009).

Mittlerweile ist auch belegt, dass Niacinamid den Melanosomentransfer von den Melanozyten zu den Keratinozyten reversibel und konzentrationsabhängig beeinträchtigen bzw. verhindern kann (Hakozaki et al., 2002; Greatens et al., 2005), ohne die Melaninsynthese direkt zu beeinflussen. Niacinamid besitzt somit hautaufhellende (Kimball et al., 2010) und photoprotektive Eigenschaften und kann offenbar das Risiko der durch UV-Licht bedingten Immunsuppression und

Photocarcinogenese verringern (Gensler, 1997; Damian et al., 2008; Damian, 2010; Surjana und Damian, 2011). Hierbei dürften ebenso die oben erwähnten antiinflammatorischen und antioxidativen Eigenschaften eine Rolle spielen, wie auch von anderen Vitaminen wie Alpha-Tocopherol (Vitamin E), L-Ascorbinsäure (Vitamin C) und Retinol (Vitamin A) bekannt ist (Burgess, 2008).

In klinischen Versuchen mit einer 2%igen Niacinamid-Zubereitung, die halbseitig bei Patienten mit Rosazea aufgetragen wurde, konnten nach 2 bis 4 Wochen deutliche sebostatische Effekte der behandelten Seite nachgewiesen werden (Draelos et al., 2005).

Soma et al. (Soma et al., 2005) führten eine Studie an 28 Atopikern durch und konnten zeigen, dass die Anwendung einer Niacinamid-haltigen Zubereitung in einer 2%igen Konzentration den transepidermalen Wasserverlust verringern konnte. Draelos (Draelos, 2012) wies dies anhand einer 5%igen niacinamidhaltigen Zubereitung zur Anwendung als post-shave moisturizer (Feuchthaltefaktor) an 90 männlichen Probanden nach. Christmann et al. (Christmann et al., 2012) führten vergleichende Untersuchungen für verschiedene kosmetische Feuchtigkeitsspender (moisturizer) zur Anwendung bei trockenen Hautzuständen durch und konnten zeigen, dass der Zusatz von Niacinamid vorteilhaft gegenüber nicht Niacinamid-enthaltenden Zubereitungen war. Sie konnten vor allem anhand des TEWL und durch Messungen mittels Corneometrie zeigen, dass es zu einer Verbesserung der Hydratation und Integrität des Stratum corneum kam. Auch konnte in anderen Studien gezeigt werden, dass sich das Hautbild von Patienten mit Akne vulgaris deutlich verbesserte, wenn sie regelmäßig Zubereitungen mit Niacinamid äußerlich anwendeten (Morganti et al., 2011; Khodaeiani et al., 2013).

Insgesamt liegen aber nur begrenzte Studiendaten vor, sodass weitere klinische Untersuchungen erforderlich sind, um eine therapeutische Wirksamkeit von niacinamidhaltigen Präparaten zu belegen.

1.3 Sheabutter

Aus den Früchten des im tropischen Afrika beheimateten Sheanussbaumes, auch Karitébaum (*Butyrospermum parkii*) genannt, wird Sheabutter gewonnen. Diese findet neben der Verwendung als Ersatzfett für Kakaobutter bei der Schokoladenherstellung auch vermehrt Einsatz in kosmetischen Zubereitungen (Di Vincenzo, 2005; Akihisa et al., 2010). Die Sheabutter, auch als Karitéfett bezeichnet, weist einen hohen Anteil an unverseifbaren Bestandteilen auf - etwa 75% Triterpene (diese wiederum bestehen zum größten Teil aus 4,4-Dimethylsterolen), daneben Ölsäure, Triterpenalkohole,

Vitamin E und Allantoin (Krist et al., 2008). Sie wirkt sich bei topischer Anwendung vorteilhaft auf die Haut aus, macht sie geschmeidig, verhindert das Austrocknen und bindet Feuchtigkeit in der Oberhaut. Zudem enthält Sheabutter hauptsächlich langkettige, ungesättigte Fettsäuren wie Ölsäure (40-55%), Stearinsäure (35-45%), Linolensäure (3-8%) und Palmitinsäure (3-7%) (Krist et al., 2008), wobei diese Angaben nur als Richtwerte zu verstehen sind, da, wie bei Naturprodukten häufig, eine hohe biologische Variabilität beobachtet wird. So nehmen vielfältige Faktoren Einfluss auf die Zusammensetzung, wie etwa die klimatische Zone, in der die Bäume wachsen, die Wetterlage zum Zeitpunkt der Ernte oder die lokalen, traditionellen Verarbeitungs- und Lagerungsmethoden (Honfo et al., 2010).

Die in der Sheabutter enthaltenen Fettsäuren haben einen vorteilhaften Effekt auf die Regeneration von geschädigter sowie trockener Haut und fördern damit die Barrierefunktion. Ebenso reguliert Sheabutter den Feuchtigkeitsgehalt der Haut und wirkt rückfettend (Earl et al., 2002). Es ist zudem bekannt, dass die raffinierte Sheabutter Charakteristika der hauteigenen Lipide zeigt und somit wechselseitige Interaktionen mit den Oberflächenlipiden der Haut begünstigt (Neubert und Wepf, 2007).

Neben den lipophilen Bestandteilen sind in der Sheabutter auch Phenole und Tocopherol enthalten. Tocopherolacetat (syn. Vitamin E), ein fettlösliches Vitamin, kann je nach klimatischen Bedingungen zur Erntezeit der Sheabutternuss Konzentrationen von bis zu 805 µg/g erreichen (Maranz und Wiesman, 2004). Es ist ein bekannter Radikalfänger, der in Kosmetika häufig eingesetzt wird, sehr effektiv und gut hautverträglich ist (Tsai et al., 2012). Durch den Anteil an diesen Bestandteilen werden der Sheabutter antioxidative Eigenschaften zugeschrieben (Maranz et al., 2003).

Seit langer Zeit werden Lipide zur Pflege der Haut und zur Unterstützung der Barrierefunktion verwendet. Lipophile Anteile von applizierten Externa interagieren in der Regel mit der lipophilen Phase des Stratum corneum (Neubert und Wepf, 2007). Dabei führt ein partieller Okklusionseffekt, der Wirkstoffe leichter in die Haut eindringen lässt, zu einer Abnahme des TEWL und zu einer vermehrten Hydratation der Haut. Optimal wäre, die im Stratum corneum vorhandenen Lipide, die in Form interzellulärer Lipidlamellen als trilamelläre Wiederholungseinheiten (broad-narrow-broad-sequences) organisiert sind und zusammen mit einer hydrophilen Phase durch hydrophobe Wechselwirkungen und die membranbildenden Lipide stabilisiert sind, in der Form und Struktur zu ersetzen, wie sie in der Haut vorkommen, z.B. in Form von Liposomen oder Membransystemen (Wohlrab, 2014).

Zu berücksichtigen ist, dass die Grundlage von Externa wegen der Eigenwirkung nach Applikation dem Hautzustand angepasst sein muss. Ob bei Applikation von Externa auf die Haut eine eher hydrophile oder lipophile Zubereitung bzw. eine Öl-in-Wasser- (O/W-) oder eine Wasser-in-Öl- (W/O-) Emulsion zu bevorzugen ist, ist unter Berücksichtigung der verschiedenen Aspekte der Barrierefunktionsstörung abzuwägen.

2 Zielstellung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es nachzuweisen, dass die Zusammensetzung einer neu entwickelten kosmetischen Präparation die präklinischen Voraussetzungen zur funktionellen Substitution der epidermalen Barriere erfüllt.

Dabei wurden folgende Fragestellungen untersucht:

1. Welches Verteilungsverhalten weist der Inhaltsstoff Niacinamid nach epikutaner Applikation auf?
2. In welchem Kompartiment der Haut lagern sich die enthaltenen lipophilen Phasen der Sheabutter ein?
3. Wie interagiert die kosmetische Präparation als galenisches Gesamtsystem mit dem Stratum corneum?

Sämtliche Versuche wurden an exzidiierter humaner Haut (ex vivo) durchgeführt. Dabei wurden Untersuchungen an nativer, an durch Stripping sowie durch Überhydratisierung artifiziell geschädigter Haut durchgeführt.

3 Material und Methodik

3.1 Material

3.1.1 Biologisches Material

Die Penetrationsversuche wurden an exzidierte menschlicher Haut von Mammareduktionsplastiken durchgeführt. Die Gewebeproben wurden nach der Entnahme mechanisch vom subkutanen Fettgewebe befreit und mit Mullplatten und physiologischer Kochsalzlösung gesäubert. Mit einer Lochstanze wurden 20 mm im Durchmesser betragende kreisrunde Hautstücke zugeschnitten, luftdicht in Aluminiumfolie verpackt und bei einer Temperatur von -20°C in einem verschließbaren Polyethylenbeutel für 2-3 Wochen aufbewahrt. Vor Versuchsbeginn wurde die Haut aus dem Tiefkühlschrank genommen, bei Raumtemperatur vollständig aufgetaut und vom überschüssigen Gefrierwasser befreit. In gleicher Weise wurde die Haut für sämtliche Versuche vorbereitet.

3.1.2. Chemisches und biochemisches Material

Tabelle 1: Chemikalien, Lösungen

lipophiler Fluoreszenzfarbstoff 1,1'-Diocetadecyl-3,3,3', 3'-tetramethylindocarbocyaninperchlorat (Dil)	Firma Sigma- Aldrich Co., St. Louis, USA
isotonischer Phosphatpuffer pH 7,4 (PBS) (10x)	Firma GIBCO, Grand Island, USA
4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)	Firma Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
TexasRed	Firma Sigma- Aldrich Co., St. Louis, USA
radioaktives Isotop ^{14}C , Nicotinamid C^{14} , Aktivität: 50,0 μCi in 0,5 ml Ethanol, MG: 122,1	Hartmann Analytic GmbH, Braunschweig, Deutschland
Protosol, jeweils 0.2 ml (= Soluene)	Firma Perkin Elmer, Massachusetts, USA
Methanol	Firma Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland

Szintillationsflüssigkeit (4 g PPO [2,5-Diphenoloxazol; 221,25 g/mol] + 0,1 g POPOP [1,4- bis 2-(5-Phenyloxazolylt)-Benzen; 364,39 g/mol] auf 1l Toluol)	United Technologies Packard, Zürich, Schweiz (PPO); United Technologies Packard, Zürich, Schweiz (POPOP); Firma Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland (Toluol)
physiologische Kochsalzlösung	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Methylenblau	Firma Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Sudanrot	Firma Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland

3.1.3 Laborgeräte und Labormaterialien

Tabelle 2: Verbrauchsmaterial

Tesafilm® (Größe: 15x20mm)	Beiersdorf, Hamburg, Deutschland
Tupfer/Wattestäbchen	NOBA Verbandmittel Danz GmbH & Co. KG, Wetter, Deutschland

Tabelle 3: Laborgeräte

Lochstanzen: <ul style="list-style-type: none"> • Stanze von 2,0 cm Durchmesser (3,1416 cm²) • Stanze von 0,6 cm Durchmesser (0,2827 cm²) 	Kleinbongartz & Kaiser oHG, Hilden, Deutschland Stiefel (GSK Company), Research Triangle Park, North Carolina, USA
Franz'sche Diffusionszelle	SES GmbH, Bechenheim, Deutschland
Fluoreszenzmikroskop, Olympus IX-81	Olympus Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland
Gefriermikrotom	Firma Jung/ Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Wetzlar, Deutschland
Filterwürfel U-MDAFITR Excitation 403 nm (für DAPI)	Olympus Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland

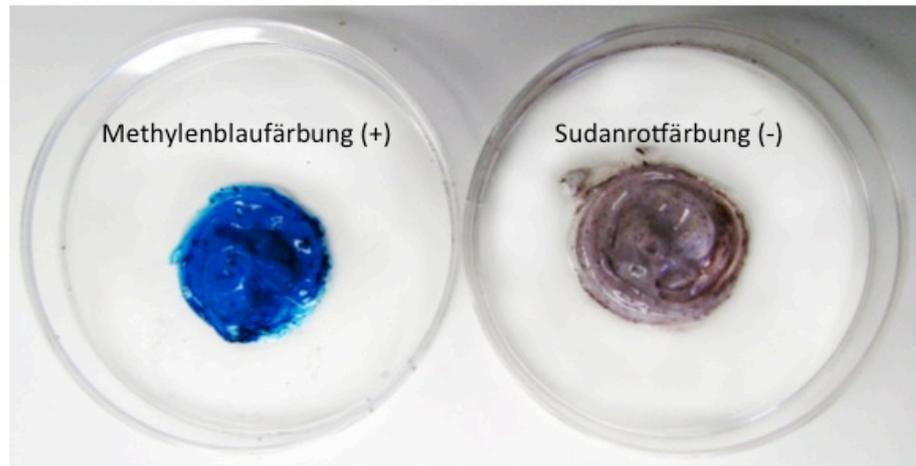
Filterwürfel U-MDAFITR Excitation 572 nm (für TexasRed)	Olympus Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland
Kamera Olympus IX-81	Olympus Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland
Objektive: LUCPLFLN 20x UPLAPO 40x oil	Olympus Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland

3.1.4 Zusammensetzung der Prüfpräparation

Die Prüfpräparation SKIN-727 ist eine intensiv rückfettende Pflegecreme zur Anwendung bei trockener Haut und Juckreiz. Aufgrund der Zusammensetzung zeichnet sie sich durch eine sehr gute Hautaffinität aus, wirkt hautberuhigend und besitzt eine schnell einziehende Textur. Wegen dieser Eigenschaften, die auch deutlich die Compliance der Patienten erhöht, ist die Prüfpräparation besonders zur unterstützenden Behandlung der trockenen Haut, wie beispielsweise bei der atopischen Dermatitis, geeignet.

Die Prüfpräparation setzt sich aus einer wässrigen und einer lipophilen Phase zusammen. Der wässrigen Phase ist in hoher Konzentration (4 %) Niacinamid zugesetzt, welches die Regeneration der Hautbarriere unterstützen soll. Die lipophile Phase besteht im Wesentlichen aus 20% Sheabutter (Karitéfett), 10% Glycerin und 5% Rapsöl. Rapsöl soll irritationsmildernd und antioxidativ wirken. Glycerin bindet Wasser und verbessert nachhaltig den Feuchtigkeitsgehalt der Hornschicht und ist somit ein natürlicher Feuchthaltefaktor (Moisturizer).

Es handelt sich bei der Prüfpräparation um eine O/W-Emulsion. Zur Abgrenzung verschiedener Emulsionstypen voneinander wird die Farbstoffmethode nach Robertson (Robertson, 1910) angewendet, die darauf basiert, dass nur die jeweils äußere Phase, also entweder die lipophile oder die hydrophile Phase einer Emulsion, mit einem lipophilen oder hydrophilen Farbstoff angefärbt werden kann. Das bedeutet, dass sich eine O/W-Emulsion nur mit einem wasserlöslichen Farbstoff und eine W/O-Emulsion nur mit einem lipophilen Farbstoff anfärben lassen. Dafür wird üblicherweise Methylblau als hydrophiler und Sudanrot als lipophiler Farbstoff verwendet. Das Ergebnis dieses Versuchs ist in Abbildung 3 zu erkennen. Die deutliche und homogene Blaufärbung des Präparates lässt auf eine O/W-Emulsion schließen, mit dem anderen Farbstoff Sudanrot erfolgte keine Färbung, sondern lediglich eine Vermischung mit der Präparation.



entspricht einer O/W-Zubereitung

Abb. 3: Farbstoffmethode nach Robertson; (+)= positiv, (-)= negativ (Robertson, 1910)

Tabelle 4: Inhaltsstoffe der Prüfpräparation (alphabetisch geordnet)

Ammonium Polyacryldimethyltauramide
Cetearyl Alkohol
Glycerin (10%)
Niacinamide (4%)
Paraffinum liquidum
PEG-100 Stearate
Rapsöl (5%)
Sheabutter (20%)
Wasser

3.2 Methodik

3.2.1 Allgemeine Versuchsdurchführung

Folgende experimentelle Strategien wurden umgesetzt:

1. Ermittlung des Konzentrations-Zeit-Profiles von **Niacinamid** aus einer topisch applizierten Zubereitung in Humanhaut (radioaktive Markierung)
2. Messung der Penetration der lipophilen Phase der **Sheabutter** (Fluoreszenzmarkierung)
3. Validierung der Penetration der lipophilen Phase der Prüfpräparation (Fluoreszenzmarkierung)

3.2.2 Franz'sche Diffusionszelle

Bei allen Experimenten wurden die verwendeten Hautproben über einen definierten Zeitraum in der Franz'schen Diffusionszelle inkubiert.

Die Franz'sche Diffusionszelle besteht aus einem doppelwandigen, temperierbaren Glasteil, worin sich eine Akzeptorflüssigkeit befindet. Als Akzeptormedium dient isotonischer Phosphatpuffer pH 7,4 (PBS). Das Probenmaterial (Hautprobe) wird durch eine Gaze, die durch einen Glasring und eine Metallklammer stabilisiert wird, vom Akzeptormedium getrennt. Durch ständiges Rühren mittels Magnetrührer wird die Akzeptorflüssigkeit im homogenen Zustand gehalten und die auf der Filtergaze aufgebraute Hautunterseite ständig gespült, wodurch die Voraussetzungen für den Abtransport permeierter Wirkstoffmengen geschaffen wird. Die Apparatur wird mit einer Glasabdeckung als Verdunstungsschutz verschlossen, um möglichst gleichbleibende Hydratationsbedingungen während des Untersuchungszeitraumes zu gewährleisten (Franz TJ, 1975).

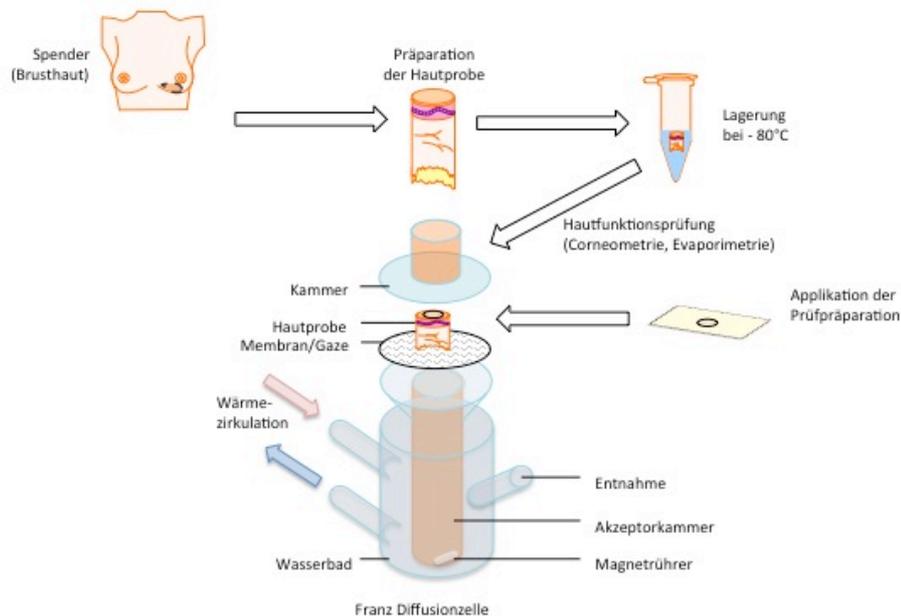


Abb. 4: Schematische Darstellung des Versuchsablaufs; Aufbau der Franz'schen Diffusionszelle

3.2.3 Radioaktive Markierung der Prüfpräparate

Zum Nachweis von Niacinamid wurde ein radioaktives Isotop (^{14}C) mit einer bekannten spezifischen Aktivität verwendet. Zur Einstellung der Testpräparation auf eine definierte Radioaktivität wurden 50 μl des radioaktiven Tracers auf eine Aluminiumfolie gegeben, mit 20 mg der Präparation aufgenommen und homogen vermengt.

Die aufbereiteten Hautproben wurden auf eine Filtergaze gelegt und anschließend auf die jeweiligen Hautproben 6 mg der radioaktiv markierten Zubereitung je cm^2 Haut aufgetragen. Nach der Applikation wurde das Untersuchungsmaterial auf der Filtergaze in die auf 32°C vorgewärmte Franz'sche Diffusionszelle eingespannt, so dass die Hautunterseite mit der Filtergaze direkt an das Akzeptormedium grenzte. Als Akzeptorflüssigkeit wurde isotonischer Phosphatpuffer (PBS-Lösung) mit einem pH-Wert von 7,4 verwendet. Die Akzeptorflüssigkeit wurde zur Verringerung der Diffusionsschichtdicke ständig gerührt. Damit waren die Voraussetzungen für den Abtransport permeierter Wirkstoffmengen gewährleistet und physiologische Verhältnisse simuliert.

3.2.4 Ermittlung des Konzentrations-Zeit-Profiles

Die Aufbereitung der Hautproben erfolgte wie unter 3.2.3 beschrieben.

Untersucht wurden Hautproben von 3 Spenderinnen, von denen jeweils 3 Hautstückchen pro Testpräparation entsprechend der festgelegten Applikationszeiten von 30, 300 und 1000 min verwendet wurden.

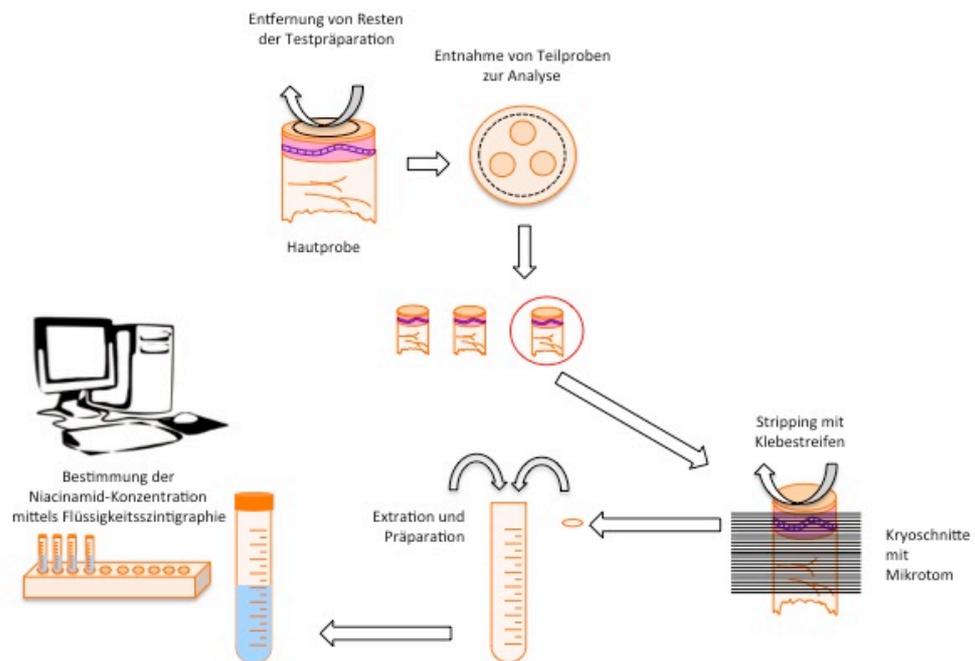


Abb. 5: Schematische Darstellung des Versuchsablaufs zur Aufarbeitung der Hautproben

Nach Ablauf der jeweiligen Applikationszeit wurde die zu untersuchende Hautprobe aus der Diffusionszelle entnommen. Mit einem Wattestäbchen (Tupfer) wurden die nicht penetrierten Anteile der Präparationen vorsichtig von der Oberfläche entfernt. Anschließend erfolgte eine Abtrennung der einzelnen Hautschichten horizontal zur Epidermis, um das Konzentrations-Zeit-Profil zu untersuchen. Die Abtrennung der Hautschichten erfolgte nach folgendem Schema:

Nichtpenetrierter Rest:	Tupfer (Wattestäbchen)
Stratum corneum:	20 Tesafilmabrisse
Vitale Epidermis:	4-10 Schnitte à 20 µm (je nach Epidermisdicke)
Korium:	15 Schnitte à 80 µm + Reststumpf
Permeierter Anteil:	Akzeptorflüssigkeit

Die schichtenweise Entfernung des Stratum corneum erfolgte in einer 2,0106 cm² großen Hautfläche mittels einer Schablone mit einem 16 mm im Durchmesser betragenden kreisrunden Fenster. Dabei wurden 20 Tesafilmbabrisse durchgeführt und jeweils zwei aufeinander folgende Abrisse zusammengefasst. Aus dem Zentrum des Hautstückes wurden jeweils 3 Biopsien mit 6 mm (0.848 cm²) Durchmesser Hautstanzen entnommen und mit einem Gefriermikrotom bei -40 °C tiefgefroren horizontal zur Epidermis in der angegebenen Dicke geschnitten.

Die so erstellten Hautschichtfraktionen wurden zur Messung der Radioaktivität einzeln in Probengläser überführt und zur Gewebeauflösung mit jeweils 0.2 ml Protosol für ca. 12 Stunden bei Zimmertemperatur inkubiert. Anschließend wurde zur Herstellung einer Lösung 1ml Methanol hinzugefügt. Zu jeder Probe wurden zudem für die Szintillationsmessung im Liquid-Szintillations-Counter 10 ml Szintillationsflüssigkeit hinzugegeben. Als Leerprobe wurde in derselben Art und Weise mit unbehandelter Haut verfahren. Nach der Vermessung durch das softwaregesteuerte Gerät wurden jeweils 10 unmittelbar hintereinander bestimmte Messwerte arithmetisch gemittelt, gegen die Eigenszintillation des Probengefäßes und der Szintillationsflüssigkeit mathematisch korrigiert und als counts-per-minute (cpm)-Werte ausgegeben. Ebenfalls softwaregesteuert wurden die ermittelten cpm-Werte gegen einen durch Geräteichung ermittelten Korrekturfaktor des Messsystems abgeglichen und als desintegration-per-minute (dpm)-Wert (radioaktive Zerfälle/min) für die Auswertung verwendet. Über die Bezugskurven wurden die dpm in µCi umgerechnet.

Aus der ursprünglich applizierten Menge des zu untersuchenden Wirkstoffes, der spezifischen Aktivität, der Schnittfläche und Dicke der einzelnen Hautschnitte sowie der molaren Masse der Testsubstanz konnte die Menge des in die einzelnen Hautschichten penetrierten Wirkstoffs in mmol/l berechnet werden. Diese Ergebnisse wurden als Prozentsatz der applizierten Wirkstoffmenge dargestellt.

3.2.5 Fluoreszenzmarkierung der Prüfpräparate

Die Markierung der lipophilen Phase erfolgte mit dem lipophilen Fluoreszenzfarbstoff 1,1'-Dioctadecyl-3,3',3'-tetramethylindo-carbocyaninperchlorat (DiI) der Firma Aldrich Chem. Co., USA. Dieser Farbstoff wurde in einer Konzentration von 0.20 % in die Prüfpräparation homogen eingearbeitet. Das Präparat wurde anschließend bis zur Verwendung über einen Zeitraum von maximal 4 Wochen bei + 3 °C im Kühlschrank gelagert.

3.2.6 Penetrationsversuche

Die vorbereiteten Gewebeprobe wurden in der Franz'schen Diffusionszelle bei 32 °C mit 20 mg der Prüfpräparation (lipophiler Fluoreszenzfarbstoff) über einen Zeitraum von 300 min inkubiert (vgl. Abb.2).

Die Versuche wurden jeweils an intakter, gestrippter und gewässerter Haut durchgeführt.

Intakte Haut: Wie oben beschrieben wurde die Prüfpräparation aufgetragen und anschließend in der Franz'schen Diffusionszelle inkubiert.

Gestrippte Haut: Das Stripping der Haut erfolgte durch 20 Tesafilmabrisse, wodurch das Stratum corneum zu ca. 2/3 entfernt wurde. Danach wurde die Prüfpräparation aufgetragen und anschließend inkubiert.

Gewässerte Haut: Zunächst wurde auf die intakte Haut die Prüfpräparation aufgetragen. Anschließend erfolgte das Wässern der Haut durch Inkubation mit physiologischer Kochsalzlösung über 300 min. Danach wurde in der Franz'schen Diffusionszelle inkubiert.

Anschließend wurden aus den jeweiligen Hautproben 6 mm Stanzbiopsien gewonnen. Jeweils 3 Proben wurden durch vertikale Kryostatschnitte von 5 µm aufgearbeitet.

3.2.7 Fluoreszenzmikroskopie

Die Prüfpräparation wurde topisch appliziert und zur Beurteilung der Verteilung wurden Penetrationsversuche vorgenommen. Um eine verbesserte Kontrastierung zu erhalten, wurde mittels des blauen Farbstoffes 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) eine Kerngegenfärbung durchgeführt. In einem hochauflösenden Fluoreszenzmikroskop wurden dann je Versuchsdurchgang und Präparat drei Einzelbilder aufgenommen und visuell analysiert. Die Mikroskopaufnahmen wurden mit einer Olympus IX-81 durchgeführt.

3.2.8 Digitale Auswertung der Fluoreszenzmikroskopiebilder

Zur digitalen Analyse der quantitativen Verteilung des roten lipophilen Fluoreszenzfarbstoffes Dil wurden die in standardisierter Vergrößerung aufgenommenen mikroskopischen Bilder der Fluoreszenzmikroskopie herangezogen. Je Bild wurden fünf vertikale Messbereiche als repräsentative Areale definiert, an denen softwaregestützt (analySIS V5.0, Olympus Soft Imaging Solution GmbH) die

Intensitätsverteilung im roten Farbbereich gemessen und entsprechend der Tiefenausdehnung als Kurve dargestellt wurde.

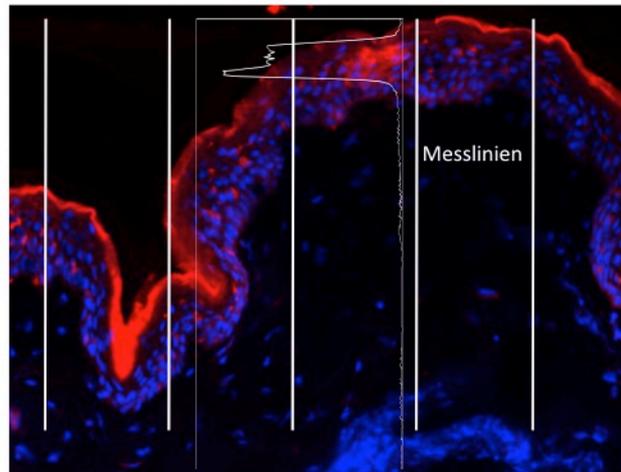


Abb. 6: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen mit eingezeichneten vertikalen Messlinien

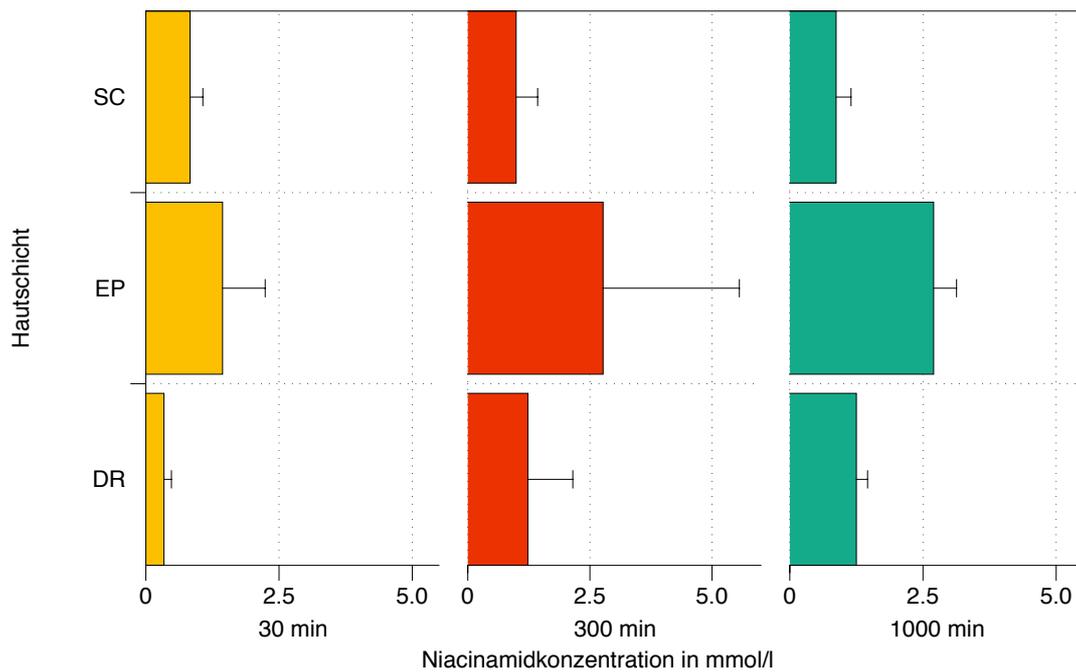
Die so erhaltenen Kurven wurden auf den Bezugspunkt der Oberfläche des Stratum corneum justiert. Die Zuordnung zu den Hautschichten erfolgte anhand der bildlich definierten Tiefenausdehnung entsprechend der anatomischen Schichten je Einzelmessung. Aus den Einzelkurven wurden je Bild eine Mittelwertkurve und die entsprechenden Standardabweichungen ermittelt. Zur quantitativen Auswertung wurde die Fläche unter der Kurve (area under the curve, AUC) als Maß für die Fluoreszenzintensität softwaregestützt (SigmaPlot V 8.0.2, SPSS Science Software GmbH) berechnet.

4 Ergebnisse

4.1 Permeationsverhalten von Niacinamid

4.1.1 Konzentrations-Zeit-Profil

Anhand der vorliegenden Daten ist zu erkennen, dass Niacinamid aus dem Prüfpräparat freigesetzt wird und in die vitalen Hautschichten diffundiert.



(SC= Stratum corneum, EP= Epidermis, DR= Dermis)

Abb. 7: penetrierte Niacinamidmengen in mmol/l in den verschiedenen Hautkompartimenten in Abhängigkeit von der Zeit

Tabelle 5: Werte der NCA-Konzentrationen in den einzelnen Hautschichten in mmol/l

Hautschichten	30 min	±SD	300 min	±SD	1000 min	±SD
SC	0.83	0.24	0.99	0.44	0.87	0.28
EP	1.44	0.80	2.77	2.79	2.70	0.43
DR	0.34	0.14	1.23	0.92	1.25	0.21

(SC= Stratum corneum, EP= Epidermis, DR= Dermis)

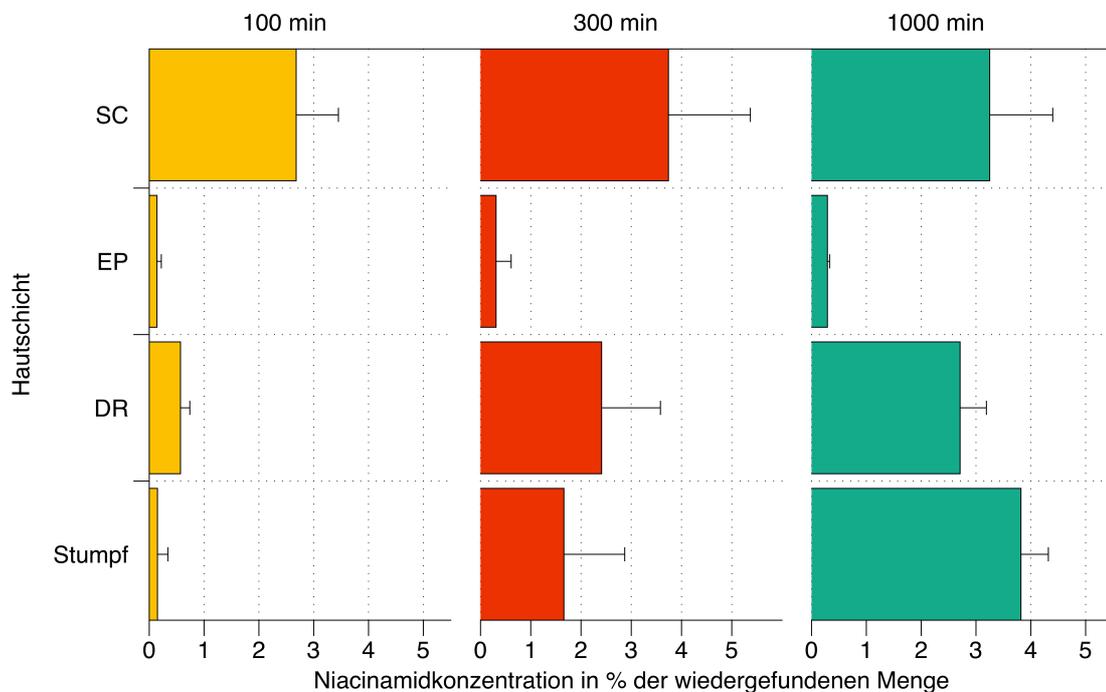
In den einzelnen Hautschichten ist folgendes zu erkennen:

Stratum corneum: Im Stratum corneum ist eine rasche Aufsättigung erfolgt, die bereits nach 30 min eingetreten ist und sich auch durch längere Einwirkzeit nicht mehr

verändert. In dieser Schicht hat sich nur ein geringes Depot gebildet. Niacinamid ist rasch in die tieferen Hautschichten penetriert.

Vitale Epidermis: In der vitalen Epidermis findet sich bereits nach 30 min ein deutlicher Wirkspiegel von Niacinamid, der nach 300 min sein Maximum erreicht und auch nach 1000 min nur wenig abgenommen hat. Es hat sich in diesem Kompartiment ein rasches Diffusionsgleichgewicht eingestellt und eine Depotbildung hat stattgefunden.

Dermis: Auch in der Dermis ist eine Anreicherung nachzuweisen, die aber deutlich geringer ist als in den vitalen Epidermisanteilen. Ebenso hat hier nur eine geringe Depotbildung stattgefunden.



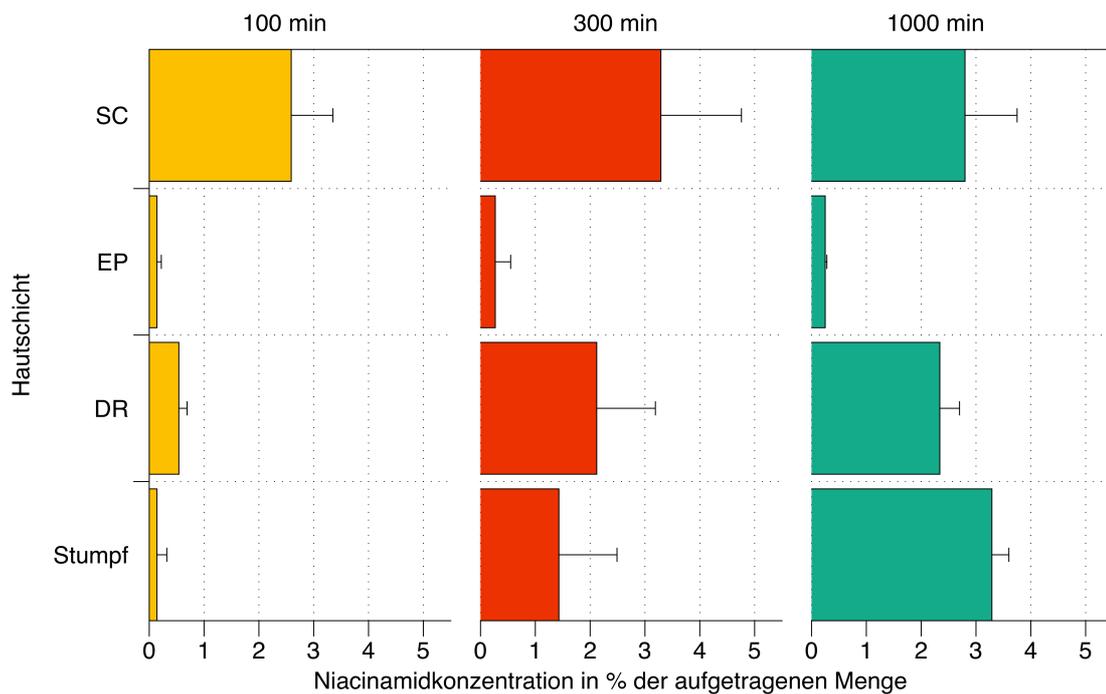
(SC= Stratum corneum, EP= Epidermis, DR= Dermis)

Abb. 8: NCA-Konzentration in Prozent der wiedergefundenen Menge in den verschiedenen Hautkompartimenten

Tabelle 6: Niacinamidkonzentration in Prozent der wiedergefundenen Menge

Schichten	30 min	±SD	300 min	±SD	1000 min	±SD
SC	2.68	0.77	3.74	1.63	3.25	1.15
EP	0.14	0.08	0.31	0.30	0.29	0.04
DR	0.57	0.17	2.41	1.17	2.71	0.48
Stumpf	0.15	0.19	1.66	1.21	3.82	0.50

(SC= Stratum corneum, EP= Epidermis, DR= Dermis)



(SC= Stratum corneum, EP= Epidermis, DR= Dermis)

Abb. 9: NCA-Konzentration in Prozent (%) der aufgetragenen Menge in den verschiedenen Hautkompartimenten

Tabelle 7: Niacinamidkonzentration in Prozent der aufgetragenen Menge

Hautschichten	30 min	±SD	300 min	±SD	1000 min	±SD
SC	2.59	0.76	3.29	1.47	2.80	0.95
EP	0.14	0.08	0.27	0.28	0.25	0.03
DR	0.54	0.15	2.12	1.07	2.34	0.36
Stumpf	0.14	0.18	1.43	1.06	3.29	0.31

(SC= Stratum corneum, EP= Epidermis, DR= Dermis)

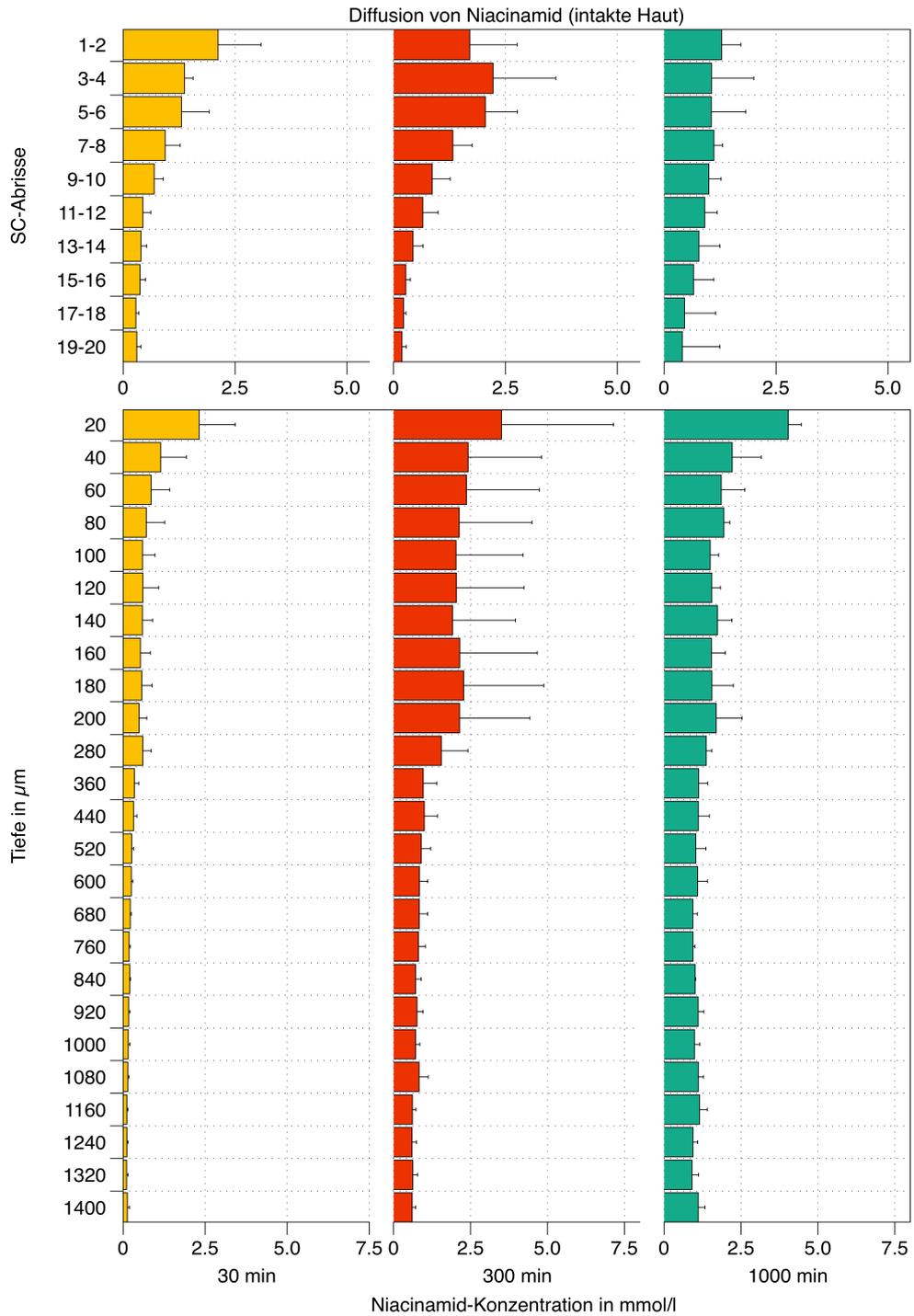


Abb. 10: NCA-Konzentration in Abhängigkeit von der Eindringtiefe in die Haut und der Zeit

Tabelle 8: NCA-Konzentrationen in den einzelnen horizontalen Hautschnitten nach den unterschiedlichen Applikationszeiten

Tiefe in μm	30 min	$\pm\text{SD}$	300 min	$\pm\text{SD}$	1000 min	$\pm\text{SD}$
1-2	2.1213	0.9590	1.7017	1.0589	1.2849	0.4267
3-4	1.3726	0.1931	2.2221	1.4018	1.0614	0.4190
5-6	1.3050	0.6177	2.0509	0.7154	1.0543	0.3021
7-8	0.9418	0.3324	1.3248	0.4311	1.1129	0.4173
9-10	0.6960	0.2003	0.8616	0.4028	0.9995	0.3089
11-12	0.4436	0.1741	0.6513	0.3430	0.9084	0.4151
13-14	0.4011	0.1260	0.4350	0.2257	0.7788	0.3148
15-16	0.3766	0.1210	0.2730	0.1028	0.6596	0.2855
17-18	0.2858	0.0623	0.2239	0.0519	0.4574	0.2088
19-20	0.3061	0.0902	0.1878	0.0928	0.4084	0.1729
20	2.3193	1.1011	3.5084	3.6361	4.0325	0.4293
40	1.1460	0.7853	2.4201	2.3905	2.2136	0.9411
60	0.8526	0.5696	2.3692	2.3652	1.8564	0.7687
80	0.7061	0.5603	2.1342	2.3621	1.9432	0.1921
100	0.5899	0.3819	2.0287	2.1784	1.4977	0.2740
120	0.6038	0.4827	2.0430	2.1974	1.5502	0.2793
140	0.5876	0.3098	1.9144	2.0446	1.7357	0.4691
160	0.5280	0.3036	2.1480	2.5193	1.5409	0.4501
180	0.5667	0.3145	2.2797	2.6012	1.5534	0.6956
200	0.4842	0.2389	2.1444	2.2823	1.6952	0.8387
280	0.5985	0.2545	1.5505	0.8635	1.3707	0.1822
360	0.3425	0.1329	0.9641	0.4358	1.1232	0.2916
440	0.3238	0.0954	0.9986	0.4246	1.1114	0.3588
520	0.2618	0.0574	0.9016	0.3061	1.0314	0.3283
600	0.2502	0.0478	0.8433	0.2650	1.0890	0.3218
680	0.2189	0.0302	0.8336	0.2723	0.9363	0.1428
760	0.1852	0.0328	0.8101	0.2225	0.9401	0.0664
840	0.1989	0.0258	0.7165	0.1823	1.0108	0.0166
920	0.1668	0.0435	0.7610	0.1979	1.1068	0.1833
1000	0.1570	0.0512	0.7161	0.1352	0.9893	0.1720
1080	0.1420	0.0394	0.8282	0.2943	1.1120	0.1694
1160	0.1140	0.0312	0.6115	0.1150	1.1532	0.2538
1240	0.1144	0.0394	0.5999	0.1419	0.9395	0.1513
1320	0.1074	0.0433	0.6220	0.1612	0.9077	0.2121
1400	0.1314	0.0610	0.6040	0.1163	1.1095	0.2176

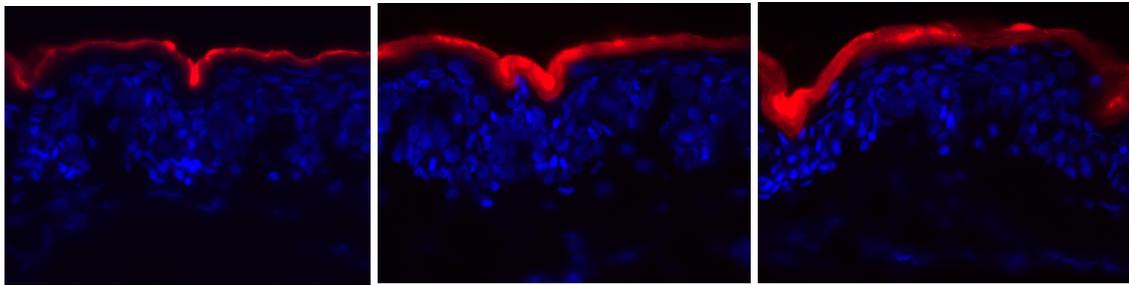
Insgesamt lässt sich aus den gewonnenen Daten feststellen, dass das Niacinamid, welches aus dem Prüfpräparat freigesetzt wird, rasch in die vitalen Hautschichten diffundiert und sich dort deutlich anreichert.

4.2 Interaktion von Sheabutter mit dem Stratum corneum

4.2.1 Fluoreszenzverteilung bei intakter Haut

Die digitale Bildanalyse der fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen (fm-Aufnahmen) zeigt, dass bei intakter Haut die lipophile Phase der Sheabutter in großer Menge in das Stratum corneum aufgenommen wird und sich dort verteilt. Die Intensitätsverteilung im roten Farbbereich ist in den kompakten tieferen Schichten am intensivsten. Dies bedeutet, dass sich die Sheabutter dort am höchsten angereichert hat. Aus den

Diagrammen ist zu entnehmen, dass die lipophile Phase nur in sehr geringem Umfang in die vitalen Epidermisanteile und nicht ins Korium penetriert.



A1

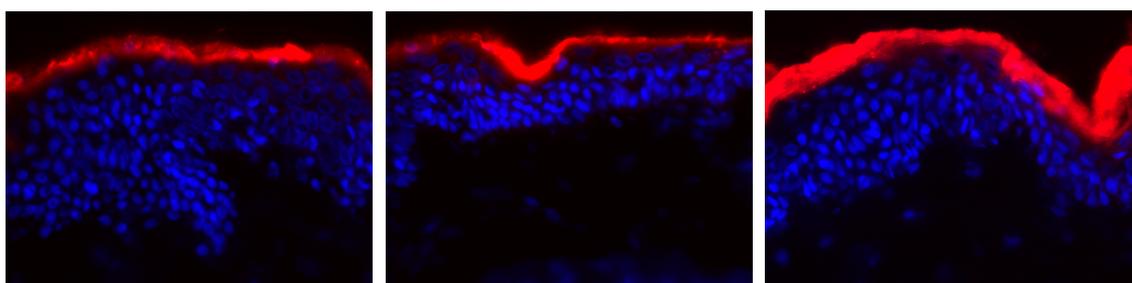
A2

A3

Abb. 11: fm-Aufnahmen von drei Hautproben (A1-A3) (intakte Haut)

4.2.2 Fluoreszenzverteilung bei artifiziiell vorgeschädigter Haut

Bei der Haut mit reduziertem Stratum corneum ist anhand der fluoreszenzmikroskopischen Bilder und der daraus gewonnenen Graphik zu erkennen, dass das Maximum der aufgenommenen Sheabutter in etwas tiefer gelegenen Schichten des Stratum corneum zu finden ist, da die oberen Schichten entfernt wurden. Es wird trotzdem in großer Menge aufgenommen und verteilt sich gut im verbliebenen Stratum corneum, in geringem Maße in den vitalen Epidermisanteilen und ebenso wie bei den anderen Untersuchungen nicht im Korium.



B1

B2

B3

Abb. 12: fm-Aufnahmen von drei Hautproben (B1-B3) (reduziertes Stratum corneum)

4.2.3 Fluoreszenzverteilung bei gewässertter Haut

Die mikroskopischen Bilder der gewässerten Hautproben zeigen eine hohe Fluoreszenzintensität in allen Präparationen. Die digitale Bildanalyse belegt eine sehr gute Verteilung der lipophilen Phase im Stratum corneum, die trotz Wässerung nicht

abgenommen hat, also keinen „wash-out-effect“ aufweist. Ebenso wie bei der intakten und der gestrippten Haut penetriert die Sheabutter nur in geringem Ausmaß in die vitalen Epidermisanteile und nicht ins Korium.

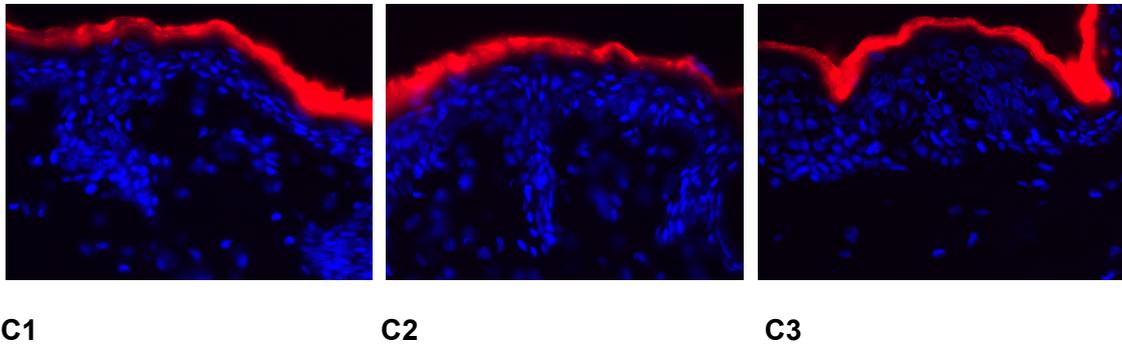
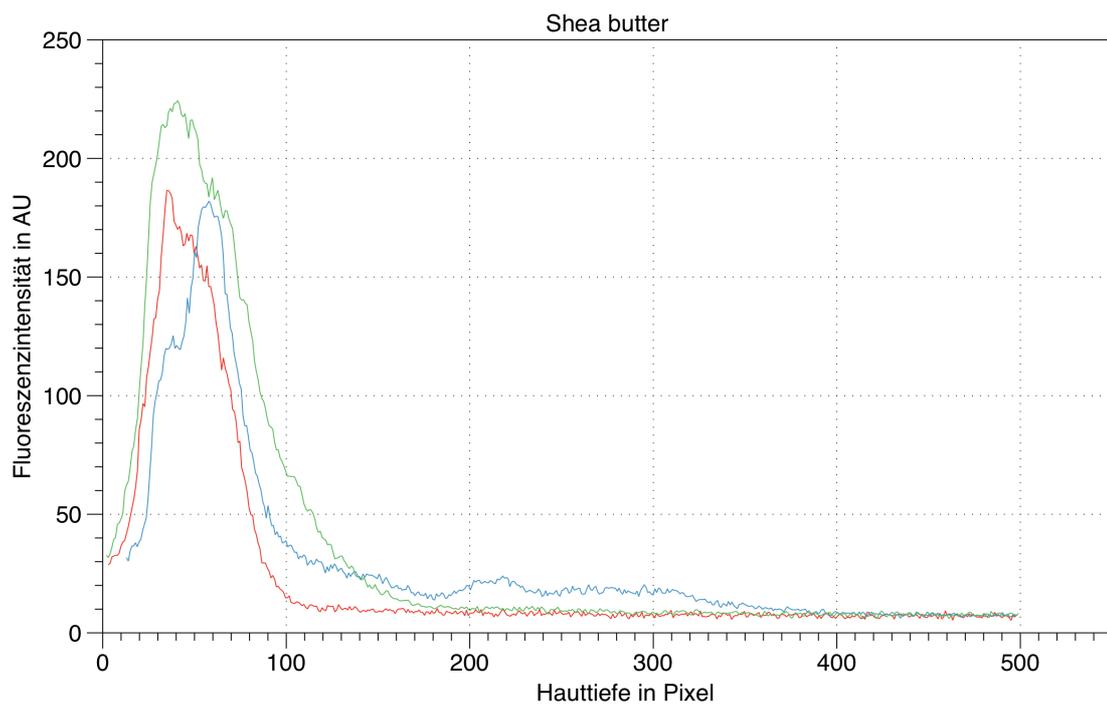


Abb. 13: fm-Aufnahmen von drei Hautproben (C1-C3) (gewässerte Haut)



rot = intakte Haut, blau = gestrippte Haut, grün = gewässerte Haut

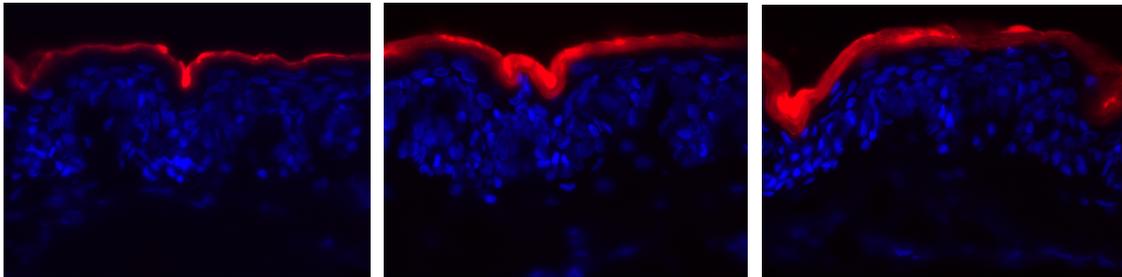
AU= Arbitrary unit

Abb. 14: Daten der Fluoreszenzintensität von Sheabutter in Abhängigkeit von der Hauttiefe

4.3 Penetrationsverhalten der lipophilen Phase der Prüfpräparation

4.3.1 Penetration bei intakter Haut

Die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen der intakten Haut zeigen, dass die Prüfpräparation in großer Menge in das Stratum corneum aufgenommen wird und sich dort verteilt.



A1

A2

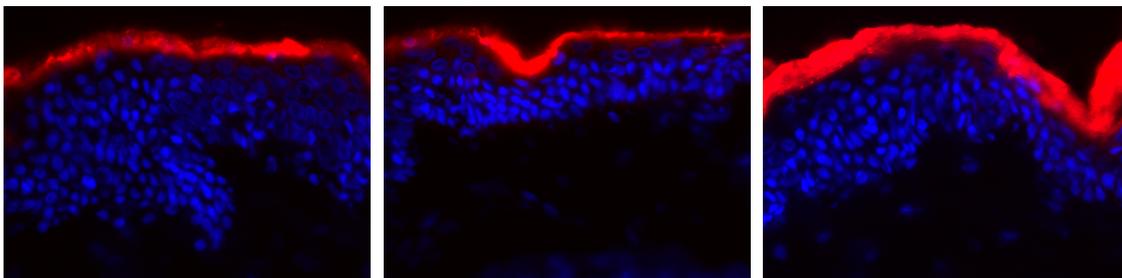
A3

Abb. 15: fm-Aufnahmen von drei Hautproben (A1-A3) (intakte Haut)

Die größte Anreicherung der lipophilen Phase findet sich besonders in den kompakten tieferen Schichten des Stratum corneum. Die Rotintensität nimmt in den tieferen Schichten der Epidermis rasch ab, was bedeutet, dass die Prüfpräparation nur in sehr geringem Umfang in die vitalen Anteile der Epidermis und nicht ins Korium penetriert.

4.3.2 Penetration bei artifiziell vorgeschädigter Haut

Die mikroskopischen Bilder zeigen auch bei Haut mit reduziertem Stratum corneum ein deutliches Anreichern der lipophilen Phase in den verbliebenen Anteilen der Epidermis.



B1

B2

B3

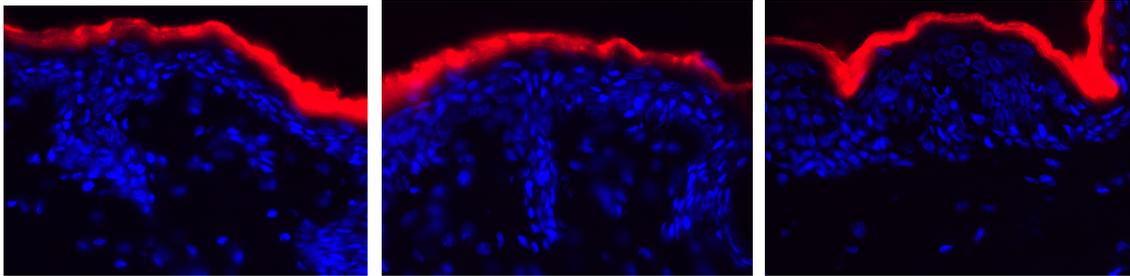
Abb. 16: fm-Aufnahmen von drei Hautproben (B1-B3) (reduziertes Stratum corneum)

Ebenfalls ist hier das Maximum der substituierten lipophilen Phase in den kompakten tieferen Schichten des Stratum corneum zu finden. Analog zur intakten Haut penetriert

die Prüfpräparation auch bei gestrippter Haut nur in sehr geringem Maße in die vitalen Epidermisanteile und nicht ins Korium.

4.3.3 Penetration bei gewässerter Haut

Auch die Haut, die nach Auftragen von der Prüfpräparation gewässert wurde, hat im Stratum corneum deutlich die lipophile Phase aufgenommen.



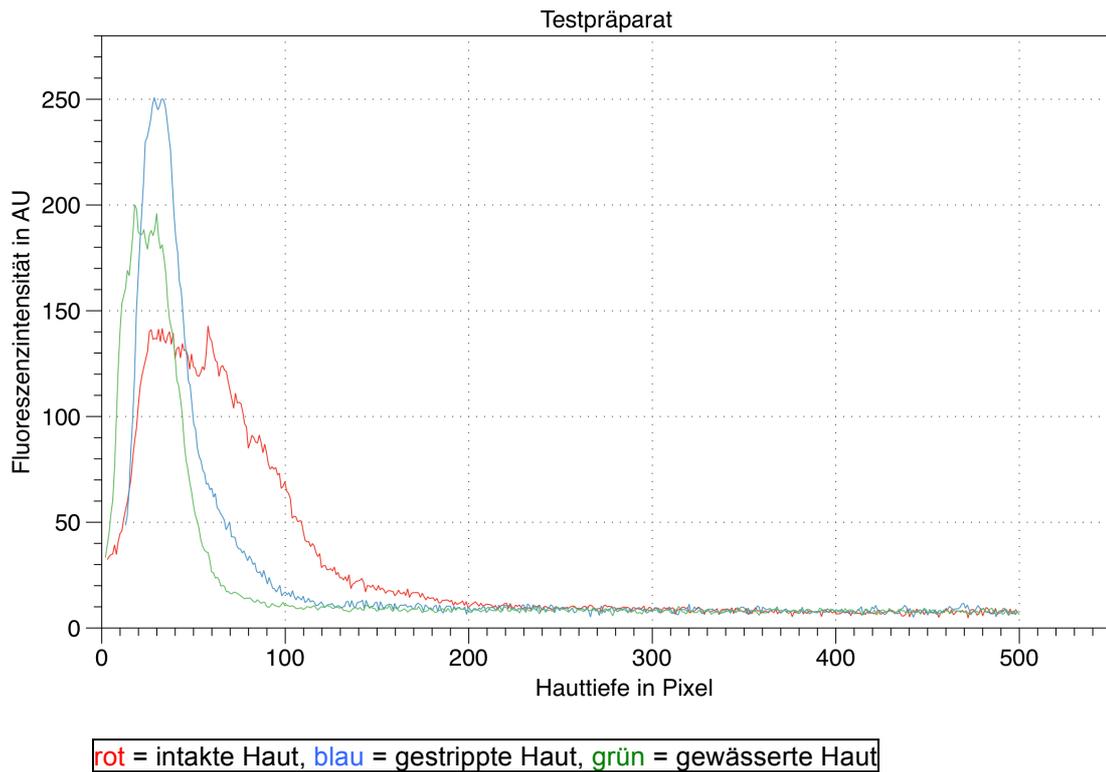
C1

C2

C3

Abb. 17: fm-Aufnahmen von drei Hautproben (C1-C3) (gewässerte Haut)

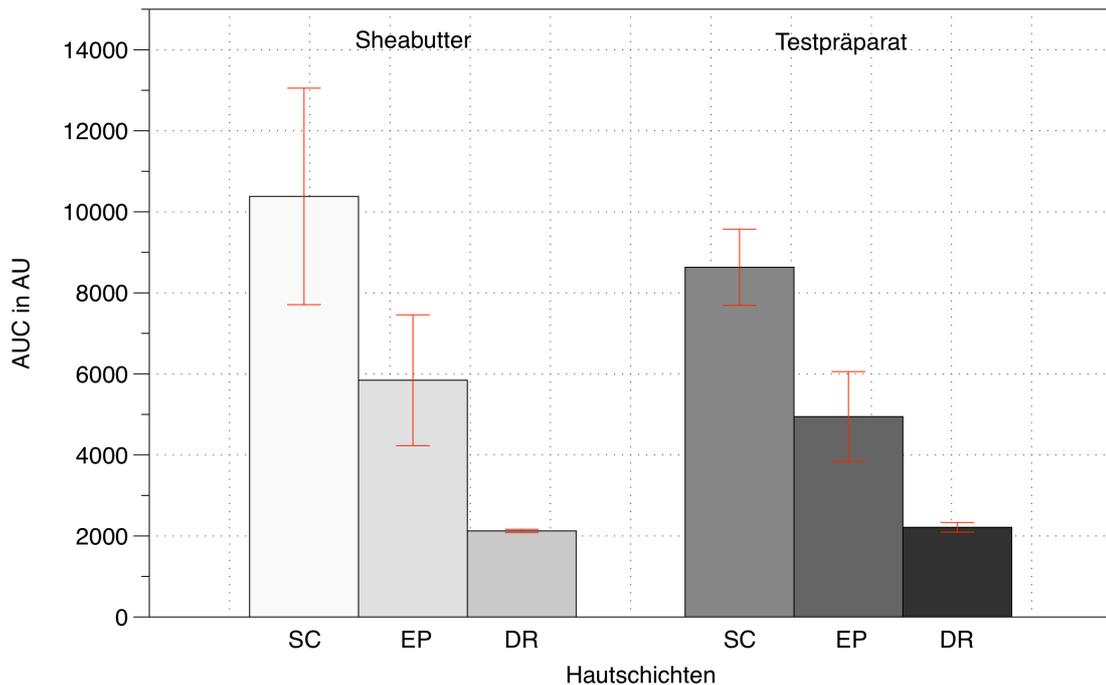
Bemerkenswert ist, dass trotz der Wässerung die lipophile Phase im Stratum corneum nur gering abgenommen hat. Dies bedeutet, dass kein relevanter „wash-out-effect“, also ein Herauslösen der Lipide durch das Wässern, nachzuweisen ist. Analog zu intakter und gestrippter Haut ist die Testpräparation nur in sehr geringem Umfang in die vitalen Anteile der Epidermis und nicht ins Korium penetriert.



AU= Arbitrary unit

Abb. 18: Daten der Fluoreszenzintensität der Testpräparation

In der digitalen Bildanalyse der fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen wurde softwaregestützt die Intensitätsverteilung im roten Farbbereich gemessen und entsprechend der Tiefenausdehnung, also der vertikalen Pixelanzahl, dargestellt. Daraus ist erkennbar, dass die lipophile Phase gut ins Stratum corneum aufgenommen wurde.



(SC= Stratum corneum, EP= Epidermis, DR= Dermis, AUC= area under the curve, AU= Arbitrary unit)

Abb. 19: AUC-Daten von Sheabutter und der Testpräparation im Vergleich

Tabelle 9: AUC-Daten von Sheabutter und der Testpräparation

AUC Sheabutter

SC	Epi	DR	Mean	Std Dev
9178,33	4042,50	2076,83	10380,72	2672,16
8521,00	7160,50	2152,50	5843,61	1614,42
13442,83	6327,83	2143,83	2124,39	41,41

AUC

Prüfpräparat

SC	Epi	DR	Mean	Std Dev
9499,33	6207,50	2350,00	8631,50	940,70
8763,33	4510,50	2151,67	4945,50	1110,36
7631,83	4118,50	2139,17	2213,61	118,28

(SC= Stratum corneum, Epi= Epidermis, DR= Dermis, AUC= area under the curve,)

Die AUC (area under the curve) als quantitatives Maß der Penetration der lipophilen Phase der Testpräparation zeigt bei intakter, gestrippter und gewässerter Haut nur geringfügige Unterschiede in Bezug auf die einzelnen Schichten.

5 Diskussion

5.1 Welches Verteilungsverhalten weist der Inhaltsstoff Niacinamid nach epikutaner Applikation auf?

In der topischen Anwendung in kosmetischen Präparaten wird NCA bereits seit den 1990er Jahren verwendet. Galenische Untersuchungen zum Penetrationsprofil und zur Bioverfügbarkeit des Wirkstoffs in der Haut liegen für diese Präparate aber nicht vor. In diversen Studien wurde *in vitro* die Wirkungsweise von NCA in der Haut untersucht. Allerdings gibt es bisher keine validen Daten zur kutanen Bioverfügbarkeit nach epikutaner Anwendung. Dabei ist es jedoch entscheidend zu wissen, in welchem Kompartiment der Haut sich NCA anreichert und welcher Dynamik die Verteilung des Wirkstoffs unterliegt, um so die Wirkungen bei verschiedenen Hautzuständen abschätzen zu können.

Im Jahre 1970 wurden erste Untersuchungen zur Absorption von topisch applizierten Stoffen, unter anderem von NCA, durchgeführt (Feldmann und Maibach, 1970). Damals ließ sich zeigen, dass etwa 10% des applizierten NCA durch die Haut permeiert. Diese Untersuchungen wurden *in vivo* mit Hilfe radioaktiv markierter Substanzen durchgeführt, die auf eine definierte Fläche auf die Unterarme gesunder Probanden aufgetragen wurden und anschließend wurde anhand der im Urin ausgeschiedenen Metabolite Rückschlüsse über die permeierte Menge der Testsubstanz getroffen. Bei diesen Untersuchungen wurde jedoch nicht berücksichtigt, dass die Ausscheidung über die Niere nur einen von mehreren möglichen Stoffwechselwegen darstellt. Somit könnten die tatsächlich permeierten Mengen der topisch applizierten Substanzen von den Mengen der über die Niere ausgeschiedenen Metabolite abweichen. Auch konnte über die Penetration und die quantitative Verteilung der Substanz in den unterschiedlichen Hautkompartimenten noch keine Aussage getroffen werden. 1975 entwickelte Franz eine später nach ihm benannte Diffusionskammer und konnte damit erste genauere Aussagen über die permeierten Mengen verschiedener Stoffe, so auch bezüglich des NCA, treffen (Franz, 1975). Er fand heraus, dass im Gegensatz zu den *in vivo* Untersuchungen von Feldmann und Maibach (Feldmann und Maibach, 1970) deutlich mehr NCA (28,8%) unter *In-vitro*-Bedingungen durch die Haut permeiert. Bei den hier vorgelegten Untersuchungen ist deutlich weniger (etwa 8%) des applizierten NCA als bei Franz permeiert. Dies lässt sich aber durch die Tatsache erklären, dass in den vorliegenden Untersuchungen NCA in eine O/W-Emulsion eingearbeitet wurde und Franz den Wirkstoff in Aceton gelöst und auch in einer deutlich höheren Konzentration aufgetragen hat. Dass das

Vehikelsystem wichtig für das Penetrationsverhalten von NCA ist, konnte Franz selbst in seinen Untersuchungen belegen (Franz, 1975). Dabei stehen dem oben genannten 28,8% permeierten, in Aceton gelöstem NCA 10% permeiertes NCA gegenüber, wenn es in einer Emulsion appliziert wurde. Diese Ergebnisse wurden von Franz eingehend analysiert, allerdings formulierte er keine Hypothese zum Penetrationsverhalten in die verschiedenen Schichten der Haut. Die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchungen stellen somit die ersten kinetischen Vollprofile von NCA in humaner Haut dar.

Die Wirkungen von NCA sind davon abhängig, in welchem Kompartiment sich die Substanz anreichert (Wohlrab und Kreft, 2014). Die vorliegenden Ergebnisse lassen sich deshalb besonders anschaulich demonstrieren, wenn man die drei Zielkompartimente Stratum corneum, vitale Epidermis und Korium isoliert betrachtet und diskutiert.

5.1.1 Stratum corneum

Im SC kommt es zu einer raschen Aufsättigung sowie zu einer geringen Depotbildung von NCA. Dies bedeutet, dass dieses Kompartiment rasch von NCA permeiert wird und nur in geringem Umfang als Reservoir fungiert. Direkte barriereprotektive Effekte werden somit vordergründig durch die Eigenwirkung des Vehikels vermittelt. Diese Zusammenhänge werden auch durch Untersuchungen von Nicoli et al. (Nicoli et al., 2008a; Nicoli et al., 2008b) und Simonsen et al. (Simonsen und Fullerton, 2007) gestützt, die anhand eines in vitro Hautmodells, durch welches eine atopische Dermatitis simuliert wurde, Penetrationsuntersuchungen durchführten. Sie verwendeten dazu lipophile und hydrophile Modellsubstanzen, denen NCA zugesetzt wurde. Beide Forschergruppen beobachteten, dass der Zusatz von NCA die Tiefenpenetration der Modellsubstanzen hemmt. Daraus wurde geschlossen, dass die Effekte von NCA-haltigen Formulierungen im SC vordergründig durch das Vehikel vermittelt werden. Auch wenn durch die angeführten Publikationen lediglich indirekte Aussagen zu den Effekten von NCA im SC möglich sind, ist davon auszugehen, dass NCA selbst keine oder nur in geringem Umfang direkte barriereprotektive Wirkungen vermittelt. Allerdings wird durch die Induktion der keratinozytären Ceramidsynthese in den vitalen Epidermisschichten indirekt die Barrierefunktion substituiert (Bissett, 2002, Tanno et al., 2000).

5.1.2 Vitale Epidermis

In der vitalen Epidermis, die im wesentlichen aus Keratinozyten der unterschiedlichen epidermalen Differenzierungsstufen aufgebaut ist, konnte eine deutliche Anreicherung von NCA nachgewiesen werden. Somit scheint zunächst eine ausreichende Bioverfügbarkeit von NCA zur Induktion der endogenen Lipidsynthese gegeben. Unklar ist jedoch, wie rasch NCA intrazellulär und anschließend zytosolisch diffundiert, um metabolisch aktiv zu werden. Tanno et al. haben in vitro an Keratinozytenkulturen zeigen können, dass NCA die Serin-Palmitoyl-Transferase als Schrittmacherenzym der Ceramidsynthese induziert und damit die endogene Lipidsynthese gesteigert werden kann (Tanno et al., 2000). Dietrich et al. führten mit C14-markiertem NCA Uptake-Untersuchungen an Aszites-Zellen durch und stellten für die unpolare Substanz eine nahezu freie Permeabilität durch die Zellmembran fest (Dietrich und Ahuja, 1963). Für NCA werden zudem Effekte in Bezug auf die Reduktion von Hyperpigmentierungen beschrieben (Greatens et al., 2005; Kimball et al., 2010). Hakozaki et al. identifizierten die hemmende Wirkung von NCA auf den Melanosomentransfer als Ursache des „brightening“ Effekts (Hakozaki et al., 2002). Dabei werden ebenfalls Effektkonzentrationen unter 1 mmol/l beschrieben.

Bezüglich der Sicherheit ergeben sich zudem für die ermittelte lokale Bioverfügbarkeit von ca. 2-5 mmol/l NCA innerhalb der vitalen Epidermis keine Bedenken. Im OECD-Sicherheitsreport zu NCA (CAS no: 98-92-0) lassen sich auch bei Konzentrationen von über 15 mmol/l an verschiedenen Zelltypen keine Hinweise für Zytotoxizität feststellen (Karlagnis, 2002).

5.1.3 Korium

Die Anreicherung von NCA im Korium ist eher gering. So werden durchweg lediglich Konzentrationen zwischen 1-2 mmol/l erreicht. Dennoch zeigen Untersuchungen von Hirumatsu et al., dass Effekte an Fibroblasten bereits bei Konzentrationen unter 1 mmol/l beobachtet werden können (Hirumatsu et al., 1998). Allerdings wiesen Studien von Andrade et al. auf, dass die Aktivität der Stickstoffmonoxid-Synthase (NOS) relevant erst durch NCA-Konzentrationen von 10 mmol/l und mehr gehemmt werden kann (Andrade et al., 1997). Vor diesem Hintergrund ist die Relevanz möglicher klinischer Wirkungen, insbesondere in Bezug auf das antiinflammatorische Potenzial, wie sie von Sivapirabu et al. beschrieben werden, für die topische Applikation von NCA als fraglich zu bewerten (Sivapirabu et al., 2009). Bemerkenswert ist, dass die aufgrund der anatomischen Besonderheiten erleichterten Diffusionsbedingungen im Gesichtsbereich hier offenbar eine relevante Bioverfügbarkeit bedingen. So konnte in klinischen Studien eine Wirksamkeit bei Acne vulgaris und Rosazea nachgewiesen

werden (Shalita et al., 1995; Draelos et al., 2005). Durch die veränderten pharmakokinetischen Bedingungen nach systemischer Applikation von NCA werden ebenfalls klinisch relevante antiinflammatorische Effekte beobachtet. Diese werden beispielsweise zur Therapie bullöser Autoimmunerkrankungen genutzt (Fivenson, 2006). Für die toxikologische Bewertung ist aber festzustellen, dass sich hieraus keine relevanten Bedenken ableiten lassen (Gehring, 2004; Otte et al., 2005). Grundsätzlich wären diese nur bei sehr hohen NCA-Konzentrationen zu erwarten (Damian, 2010). Die von Kerr et al. in einer klinischen Studie mit verschiedenen NCA-Konzentrationen (0,1–0,0001%) an gesunden Probanden vereinzelt beobachteten Erytheme führen die Autoren auf eine Ausschüttung von Prostaglandin D₂ aus den Mastzellen und einer dadurch vermittelten histaminergen Reaktion mit Vasodilatation und erhöhter Gefäßpermeabilität zurück (Kerr et al., 2008; Morrow et al., 1998). In anderen Studien mit NCA-Präparationen wurden allerdings keine derartigen Effekte beobachtet und die Anwendung als unbedenklich, sicher und nebenwirkungsarm beschrieben (Hakozaki et al., 2002; Greatens et al., 2005; Navarrete-Solís et al., 2011). Auch hinsichtlich potentieller allergischer Reaktionen ergeben sich keine Verdachtsmomente (Chawla et al., 2011).

Zusammenfassend bleibt somit festzustellen, dass klinisch relevante Effekte der Prüfpräparation vor allem durch die Induktion der keratinozytären Ceramidsynthese und möglicherweise durch Bleicheffekte (Depigmentation) zu erwarten sind. Andere NCA-Wirkungen, insbesondere durch Interaktionen mit Endothelzellen, erscheinen aufgrund der gemessenen lokalen Bioverfügbarkeit als unwahrscheinlich.

5.2 In welchem Kompartiment der Haut lagern sich die enthaltenen lipophilen Phasen der Sheabutter ein?

Sheabutter kann aufgrund der Zusammensetzung als wasserfreie Absorptionsgrundlage verstanden werden. Die lipophilen Bestandteile des natürlichen Gemisches, insbesondere die verschiedenen ungesättigten Fettsäuren (Ölsäure, Stearinsäure, Linolensäure und Palmitinsäure) müssen vor allem als strukturelle Bausteine zur Integration in die interkorneozytäre Lipidmatrix aufgefasst werden (Krist et al., 2008; Roop, 1995; Schneider und Wohlrab, 1997; Segre, 2006). Hier dienen sie der Modulation der Fluidität der Membranbestandteile und nehmen damit Einfluss auf die Permeabilität des Gesamtsystems (Nicollier et al., 1986). Durch das hohe Molekulargewicht und die erhebliche Kettenlänge erscheint es unwahrscheinlich, dass die Fettsäuren in relevanter Konzentration in die vitalen Keratinozyten gelangen und als Bausteine für die Synthese komplexer Lipide bioverfügbar werden. Nach der epikutanen Applikation ist somit vor allem von teilokklusiven Effekten auszugehen, die

eine Retardierung des transepidermalen Wasserflusses der freien Wasserphase des Stratum corneums vermitteln und somit barriereprotektiv wirken (Hafeez und Maibach, 2013; Williams und Elias, 1987). Arbeiten von Jungersted belegen zudem, dass durch okklusive Wirkungen auch weitere Effekte vermittelt werden können (Jungersted et al., 2010). So wurde auch eine Einflussnahme auf die Regulation der kutanen Mikrozirkulation beobachtet.

Die direkte Interaktion von Sheabutter mit dem Stratum corneum ist auf molekularer Ebene bisher nicht untersucht. Dennoch lassen sich durch die Kenntnis der zwar variablen, aber dennoch qualitativ und quantitativ abschätzbaren Bestandteile definierte Verhältnisse beschreiben. Neben den Fettsäuren üben hygroskopische Substanzen Einfluss auf die molekulare Ordnung der asymmetrischen Bilayer der Ceramide im Stratum corneum aus (Feingold, 2007). Die barriereprotektiven Effekte sind dabei auf die Verschiebung von Wasser innerhalb des Stratum corneums zurückzuführen (Blank et al. 1984). Dabei kommt der lipophile Charakter der Sheabutter zum Tragen, der verantwortlich für einen okklusiven Effekt nach epikutaner Applikation ist (Fluhr et al. 1999). Darüber hinaus sind hygroskopische Bestandteile wie Allantoin enthalten, die wasserbindende Kräfte ausüben (Ata und Fejer, 1975). Die vorliegenden Untersuchungen zeigen zudem, dass sich die lipophilen Bestandteile rasch und weitgehend gleichmäßig innerhalb des Stratum corneums verteilen und damit also günstige Voraussetzungen für eine relevante Barriereprotektion bieten (Neubert und Wepf, 2007). Dies gilt auch für barrieregeschädigte Haut (Schneider und Wohlrab, 1997). Zhou et al. konnten dies, allerdings für andere lipophile Zubereitungen, klinisch belegen (Zhou und Banga, 2011). Zudem ist davon auszugehen, dass enthaltene Moleküle mit tensidischen Eigenschaften (z.B. Phosphatidylcholine) die Permeation von weiteren Inhaltsstoffen begünstigen. Lodén et al. verglichen verschiedene Lipide im Hinblick auf die Barriereeffekte und konnten für Sheabutter im Vergleich zu anderen Lipiden keine signifikanten Unterschiede feststellen (Lodén und Andersson, 1996). Anhand der vorliegenden Messungen lässt sich zudem belegen, dass die lipophile Phase der Sheabutter nach epikutaner Applikation überwiegend durch die oberen Epidermisschichten aufgenommen wird und sich dabei im Stratum corneum anreichert. Eine Penetration in vitale Epidermisanteile oder tiefer zeigte sich nur in sehr geringem Umfang. Auch durch eine intensive Hyperhydratation durch artifizielles Wässern der Haut konnten keine relevanten Änderungen der direkten Wechselwirkungen von Sheabutter mit dem Stratum corneum beobachtet werden. Durch den geringen Gehalt an tensidischen Bestandteilen blieb ein relevanter Wash-out-Effekt aus. Es lässt sich also schlussfolgern, dass das untersuchte Prüfpräparat nach epikutaner Applikation auf der Haut insgesamt günstige

galenische Voraussetzungen für die kosmetische Anwendung bietet und auch für erkrankte Haut grundsätzlich geeignet erscheint.

5.3 Wie interagiert die kosmetische Präparation als galenisches Gesamtsystem mit dem Stratum corneum?

Im Verständnis, dass eine topische Formulierung ein komplexes galenisches System darstellt, welches unter Berücksichtigung der physikochemischen Eigenschaften der Wirk- und Hilfsstoffe und im Hinblick auf den Zustand des Applikationsorgans ein Vehikelsystem (Grundlage) integriert, ist die klinische Wirkung als Summationseffekt verschiedener Teilwirkungen zu verstehen. Dabei ist die Eigenwirkung der Grundlage ebenso von Bedeutung wie die Bioverfügbarkeit und Wirkung des oder der Inhaltsstoffe (Wohlrab et al., 2014). Hier sind für die Interaktion der Formulierung mit der Haut zwei überlappende Funktionalitäten von Bedeutung. Neben einer physikalischen Barrierefunktion, die wesentlich durch die molekulare Ordnung der Lipide des Stratum corneums vermittelt wird, fungiert das System als Reservoir, also als Akzeptor für epikutan applizierte Substanzen (Wohlrab, 2014). Insgesamt stellt sich ein semipermeables System für eine regulierte Passage dar, welches auf einem komplexen Zusammenspiel zwischen unterschiedlichen physikochemischen Molekülgruppen und zellulären Bestandteilen basiert.

Die vorliegenden Untersuchungsergebnisse zeigen, dass NCA, begünstigt durch die okklusiven und hygroskopischen Effekte der Sheabutter, eine rasche Permeation des Stratum corneums aufweist und insbesondere in der vitalen Epidermis eine relevante Bioverfügbarkeit erreicht. Die lipophilen Bestandteile der Zubereitung verteilen sich (fast ausschließlich) im Stratum corneum und stehen hier für eine direkte barriereprotektive Interaktion zur Verfügung. Das sich so darstellende galenische Gesamtkonzept der Prüfpräparation vereint somit Bedingungen der direkten (Sheabutter) und der indirekten (Induktion der Ceramidsynthese durch NCA) Barriereprotektion und –substitution (Tanno et al., 2000).

Aus pharmazeutischer Sicht wäre darüber hinaus eine Penetrationspromotion von NCA durch den Fettsäureanteil der Sheabutter zu diskutieren. Neubert und Wepf haben diesen Effekt für Ölsäure beschrieben (Neubert und Wepf, 2007). Sie führen die erleichterte Diffusion auf einen Verflüssigungseffekt zurück, der durch bestimmte Fettsäuren konzentrationsabhängig in der Interaktion mit den Membranen des Stratum corneums induziert wird. Allerdings könnte die Störung der molekularen Ordnung des Systems, insbesondere kumulativ bei repetitiver Anwendung, auch eine funktionelle Beeinträchtigung des Systems bedingen. Ähnliche Effekte wurden durch Wohlrab für

tensidische Inhaltsstoffe nachgewiesen, denen aber, wegen der geringen Konzentration, im vorliegenden Zusammenhang keine Bedeutung zukommt (Wohlrab et al. 2010). Dennoch müssen für das untersuchte Prüfpräparat auch Emulgatoreffekte diskutiert werden. Die hier eingesetzten Emulgatoren Cetearylalkohol und PEG-100-stearat gelten als inert und gut hautverträglich. Dennoch sind bei Anwendung auf bereits stark barrieregestörter Haut (z.B. akute Phase einer atopischen Dermatitis) bzw. bei wiederholter oder übermäßiger Anwendung in anatomischen Regionen mit dünnem Stratum corneum (z.B. Gesicht, Intertrigines) kumulierende irritative Effekte nicht auszuschließen. Gleiches gilt auch für Emulgator-induzierte Sensationen im Sinne von Kribbelparästhesien, die in der Literatur als „stinging effect“, auch direkt für NCA, beschrieben werden (Cosmetic Ingredient Review Expert Panel, 2005). Auch wenn das vorliegende Prüfpräparat als O/W-System eine äußere kontinuierliche wässrige Phase besitzt, muss wegen der lipophilen Rückstandsphase der Sheabutter, vor allem bei der Langzeitanwendung, an okklusive Effekte gedacht werden (Wohlrab, 2014). Deshalb wäre die Eignung der Prüfpräparation insbesondere im Gesicht noch klinisch zu überprüfen. Da die Formulierung aber für die Körperhaut („body lotion“) konzipiert ist, ergeben sich durch die bewusst reichhaltig gewählte Textur Vorteile für die Anwendung bei xerotischen Hautzuständen (z.B. chronische Phase der atopischen Dermatitis, Ichthyosen) (Wohlrab, 2012). Diese Zusammenhänge wurden im Anschluss an die vorliegenden präklinischen Untersuchungen durch Wohlrab in einem kontrollierten multizentrischen Studienkonzept bei Patientinnen mit Xerosis als unerwünschte Wirkung im Rahmen einer zytostatischen Chemotherapie des Mammakarzinoms untersucht (Wohlrab et al, 2014). Hierbei wurde die barriereprotektive Wirksamkeit der Prüfpräparation nachgewiesen und der klinische Nutzen in Bezug auf Lebensqualität sowie subjektive (z.B. Pruritus) und objektive Symptome (z.B. Schuppung) belegt.

Insgesamt ergibt sich aus den vorliegenden präklinischen Daten eine Eignung der Formulierung für den klinischen Einsatz, insbesondere bei trockenen Hautzuständen. Auch wenn bereits erste klinische Daten vorliegen, sind weitere Studien erforderlich, um eine klare Evidenz für den klinisch relevanten Nutzen insbesondere in der Pflēgetherapie bei chronischen Hauterkrankungen zu erarbeiten.

5.4 Einschränkungen der Aussagekraft der vorliegenden Daten

Die vorliegenden Daten sind aus wissenschaftlicher Sicht in ihrer Aussagekraft, insbesondere durch methodische Gegebenheiten, begrenzt. Dennoch ist der

präklinische Nachweis der Verfügbarkeit des Wirkstoffs NCA und der lipophilen Phase (Sheabutter) entsprechend den regulatorischen Erfordernissen für die Entwicklung eines kosmetischen Präparates als weit überdurchschnittlich zu bewerten (Wohlrab, 2014).

Aus methodischer Sicht ergibt sich durch die Verwendung eines radioaktiven Tracers (C^{14} -NCA) eine gewisse Ungenauigkeit, da kein direkter Nachweis von NCA erfolgt und somit letztlich nicht ausgeschlossen werden kann, dass Abbau- oder Reaktionsprodukte des NCA erfasst werden. Dennoch zeigen Daten zur Stabilität von NCA, dass im vorliegenden Zeitmaß und bei der Interaktion mit Hilfsstoffen der Formulierung keine relevanten Bedenken hinsichtlich der chemischen bzw. metabolischen Stabilität bestehen (Cosmetic Ingredient Review Expert Panel, 2005). Die für die pharmakokinetischen Untersuchungen eingesetzten Humanhautproben stellen zwar den Standard für die Ex-vivo-Untersuchung des kutanen Konzentrations-Zeit-Profils dar, müssen dennoch als Modell gelten, da keine Sink-Bedingungen herrschen und insbesondere die Elimination durch Lymphe und Blut nicht erfasst wird. Auch die Simulationen geschädigter Haut (Stripping und Wässerung) spiegeln artifizielle Bedingungen wieder und sind als Modell lediglich zur Abschätzung der veränderten Pharmakokinetik anzusehen (Wohlrab et al., 2015). Dennoch bilden die Daten eine fundierte Basis für die Bewertung der klinischen Relevanz bestimmter Parameter.

Kritischer sind die bildanalytischen Daten zur Verteilung der lipophilen Phase anzusehen. Hier erfolgt der Nachweis ebenfalls indirekt über die Detektion des Fluoreszenztracers. Da die Bindung des Tracers an die markierten Bestandteile auf Ladungsunterschieden beruht, also keine chemische Bindung darstellt, ist zumindest von einer anteiligen Freisetzung und Umverteilung des Tracers nach Applikation des markierten Prüfpräparates im Stratum corneum auszugehen (Wohlrab et al., 2010). Auch die semiquantitative Fluoreszenzmikroskopie ist methodisch nur bedingt geeignet, um Aussagen über die Fluoreszenzverteilung in den Hautschichten zu machen. Insgesamt liefern die Daten aber einen Überblick zu den Interaktionen und damit eine fundierte Grundlage für eine präklinische Bewertung zur Eignung der Testpräparation im klinischen Kontext.

5.5 Ausblick

Die in dieser Arbeit untersuchte Prüfformulierung erfüllt aufgrund der vorliegenden Ergebnisse die präklinischen Voraussetzungen für eine barriereprotektive Wirksamkeit

zur Anwendung bei trockenen Hautzuständen. Mögliche praktische Einsatzgebiete sind neben Pflegeeffekten bei chronisch entzündlichen Hauterkrankungen auch klinische Behandlungssituationen mit direkter prophylaktischer Relevanz. In diesem Zusammenhang wurde, basierend auf den vorliegenden Daten, in einem klinischen Studienkonzept die Wirksamkeit und Sicherheit der Formulierung in der supportiven Anwendung bei Zytostatikaapplikation untersucht. Hierbei treten, durch die unspezifischen antiproliferativen Effekte des Zytostatikums, häufig trockene Hautzustände auf, die dann mit Juckreiz und Irritationen gepaart, die Lebensqualität der betroffenen Patienten erheblich reduzieren. Die Studienergebnisse zeigten, dass eine prophylaktische Anwendung des niacinamid-haltigen Präparates die Nebenwirkungen der zytostatischen Therapie an der Haut verringert und somit die Lebensqualität der Patienten deutlich verbesserte (Wohlrab et al., 2014).

Darüber hinaus bieten sich vielfältige weitere Pflegeindikationen für klinische Untersuchungsszenarien an. Insbesondere stehen hierbei Effekte bei atopischen Patienten bzw. Psoriatikern im Fokus des Interesses. Um das Spektrum der NCA-Effekte bezüglich der klinischen Relevanz besser bewerten zu können, wären zudem Dosisvariationen bzw. Dosisfindungsstudien von Bedeutung. Insgesamt bietet die aktuelle Datenlage zu NCA eine gute und sichere Basis für die Entwicklung topischer Präparationen in einem breiten Kontext.

6 Zusammenfassung

Trockene Haut (Xerosis cutis) kann die Ursache für dermatologische Erkrankungen sein oder als Symptom von vielfältigen Erkrankungen auftreten. Insbesondere Hautkrankheiten mit Barriestörung verursachen häufig trockene Hautzustände mit klinischer Relevanz.

Es gibt mannigfaltige Ansätze und galenische Formulierungen, um trockene Haut zu behandeln. NCA, ein hydrophiles Molekül aus der Gruppe der B-Vitamine, bewirkt in der topischen Anwendung vielfältige supportive Effekte. So werden barriereprotektive, antiinflammatorische und immunmodulatorische Effekte beschrieben. Außerdem ist es in Form von NAD/NADP entscheidend am zellulären Energiestoffwechsel und an Syntheseprozessen beteiligt.

Die vorliegenden pharmakokinetischen Untersuchungen sind ein starkes Indiz dafür, dass NCA überwiegend in der vitalen Epidermis angereichert wird und Barriereeffekte im SC indirekt durch Induktion der Ceramidsynthese in Keratinozyten bedingt werden. Darüber hinaus werden antiinflammatorische und immunmodulatorische Effekte des NCA beobachtet, deren klinische Relevanz aufgrund des Konzentrations-Zeit-Profiles von NCA in der Dermis aber fraglich erscheinen.

Die in der verwendeten Testpräparation enthaltene Sheabutter vermittelt bekanntlich Effekte, die denen der hauteigenen Lipide ähneln sowie die wechselseitigen Interaktionen mit den Oberflächenlipiden der Haut begünstigen. Durch fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass Sheabutter nach epikutaner Applikation, auch bei Simulation von pathologischen Hautzuständen durch Stripping bzw. Wässerungsexperimente, gut in den oberen Epidermisschichten aufgenommen wird und sich dabei vorwiegend im Stratum corneum anreichert. Durch diesen Effekt lassen sich die bekannten barriereprotektiven Effekte der Sheabutter erklären.

Insgesamt zeigen sowohl die präklinischen Untersuchungen zur Pharmakokinetik von NCA als auch die Verteilungsexperimente zur Sheabutter-dominierten lipophilen Emulsionsphase einer Testformulierung, dass bei epikutaner Applikation auf gesunder Haut protektive und auf barrieregeschädigter Haut reparative Effekte mit klinischer Relevanz zu erwarten sind. Dies muss in klinischen Studien überprüft und belegt werden.

7 Literaturverzeichnis

Akihisa T, Kojima N, Katoh N, Ichimura Y, Suzuki H, Fukatsu M, Maranz S, Masters ET (2010) Triterpene alcohol and fatty acid composition of shea nuts from seven African countries. *J Oleo Sci* 59:351-360.

Andrade J, Ramirez R, Conde M, Sobrino F, Bedoya FJ (1997) Nicotinamide inhibits inducible nitric oxide synthase enzyme activity in macrophages by allowing nitric oxide to inhibit its own formation. *Life Sci* 61:1843-1850.

Ata JKBA, Fejer D (1975) Allantoin in Shea Kernel. *Ghana J Agricult Sci* 8:149–152.

Bissett D (2002) Topical niacinamide and barrier enhancement. *Cutis* 70: 8-12.

Burgess C (2008) Topical vitamins. *J Drugs Dermatol* 7:2-6.

Chawla KK, Bencharitiwong R, Ayuso R, Grishina G, Nowak-Wegrzyn A (2011) Shea butter contains no IgE-binding soluble proteins. *J Allergy Clin Immunol* 127:680-682.

Christmann JC, Fix DK, Lucus SC, Watson D, Desmier E, Wilkerson RJ, Fixler C (2012) Two randomized, controlled, comparative studies of the stratum corneum integrity benefits of two cosmetic niacinamide/glycerine body moisturizers vs. conventional body moisturizers. *J Drugs Dermatol* 11:22-29.

Cosmetic Ingredient Review Expert Panel (2005) Final report of the safety assessment of niacinamide and niacin. *Int J Tox* 24 Suppl 5:1-31.

Damian DL, Patterson CRS, Stapelber M, Park J, Barnetson RS, Halliday GM (2008) UV radiation-induced immunosuppression is greater in men and prevented by topical nicotinamide. *J Invest Dermatol* 128:447-454.

Damian DL (2010) Photoprotective effects of niacinamide. *Photochem Photobiol Sci* 9:578-585.

Di Vincenzo D, Maranz S, Serraiocco, Vito R, Wiesmann Z, Bianchi G (2005) Regional variation in shea butter lipid and triterpene composition in four African countries. *J Agric Food Chem* 53:7473-7479.

Dietrich LS, Ahuja JN (1963) Uptake of nicotinic acid-C¹⁴ and nicotinamide-C¹⁴ by acites cells in vitro. *J Biol Chem* 238:1544-1547.

Draelos ZD, Ertel K, Berge C (2005) Nicotinamide-containing facial moisturizer improves skin barrier and benefits subjects with rosacea. *Cutis* 76:135-141.

Draelos ZD (2012) Male skin and ingredients relevant to male skin care. *Br J Dermatol* 166:13-16.

Earl LK, Baldrick P, Hepburn PA (2002) Studies to investigate the absorption and excretion of sheal oleine sterols in rat and man. *Int J Toxicol* 21:353-359.

Fartasch M (1997) Epidermal Barrier in Disorders of the Skin. *Microsc Res Tech* 38:361-372.

Feldmann RJ, Maibach HI (1970) Absorption of some organic compounds through the skin in man. *J Invest Dermatol* 54: 399-404.

- Feingold KR (2007) Thematic review series: skin lipids. The role of epidermal lipids in cutaneous permeability barrier homeostasis. *J Lipid Res* 48:2531-2546.
- Fivenson DP (2006) The mechanisms of action of nicotinamide and zinc in inflammatory skin disease. *Cutis* 77: 5-10.
- Fluhr JW, Lazzerini S, Distante F (1999) Effects of prolonged occlusion on stratum corneum barrier function and water holding capacity. *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol* 12:193-198.
- Franz TJ (1975) Percutaneous absorption: on the relevance of in vitro data. *J Invest Dermatol* 64:190-5.
- Gehring W (2004) Nicotinic acid/niacinamid and the skin. *J Cosmet Dermatol* 3:88-93.
- Gensler HL (1997) Prevention of photoimmunosuppression and photocarcinogenesis by topical nicotinamide. *Nutr Cancer* 29:157-162.
- Gloor M, Gehring W (2003) Eigenwirkungen von Emulsionen auf die Hornschichtbarriere und –hydratation. *Hautarzt* 54:324-330.
- Greatens A, Hakozaki T, Koshoffer A, Epstein H, Schwemberger S, Babcock G, Bissett D, Takiwaki H, Arase S, Wickett RR, Boissy RE (2005) Effective inhibition of melanosome transfer to keratinocytes by lectins and niacinamide is reversible. *Exp Dermatol* 14:498-508.
- Hafeez F, Maibach H (2013) Occlusion Effect on in vivo Percutaneous Penetration of Chemicals in Man and Monkey: Partition Coefficient Effects. *Skin Pharmacol Physiol* 26:85-91.
- Hakozaki T, Minwalla L, Zhuang J, Chhoa M, Matsubara A, Miyamoto K, Greatens A, Hillebrand GG, Bissett DL, Boissy RE (2002) The effect of niocinamide on reducing cutaneous pigmentation and suppression of melanosome transfer. *Br J Dermatol* 147:20-31.
- Hinomatsu Y, Yang D, Miyake I, Koga M, Kameo J, Sato M, Inoue Y, Nonaka K (1998) Nicotinamide decreases cytokine-induced activation of orbital fibroblasts from patients with thyroid-associated ophthalmopathy. *J Clin Endocrinol Metabol* 83:121-124.
- Hoffer A, Osmond H, Smythies J (1954) Schizophrenia: a new approach. II. Results of a year's research. *J Ment Sci* 100: 29-45.
- Hohl D (1990) Cornified cell envelope. *Dermatologica* 180: 201-11.
- Honfo F, Hell K, Akissoé N, Coulibaly O, Fandohan P, Hounhouigan J (2010) Effect of storage conditions on microbiological and physicochemical quality of shea butter. *J Food Sci Technol* 48(3):274-279.
- Houben E, De Paepe K, Rogiers V (2007) A Keratinocyte's course of life. *Skin Pharmacol Physiol* 20:122-132.
- Jensen JM, Proksch E (2009) The skin's barrier. *G Ital Dermatol Venereol* 144(6):689-700.
- Jungersted JM, Hogh JK, Hellgren LI (2010) Skin barrier response to occlusion of healthy and irritated skin: differences in trans-epidermal water loss, erythema and stratum corneum lipids. *Contact Dermatitis* 63:313-319.

Karlaganis G (2002) SIDS initial assessment report of swiss agency for the environment, forest and landscape. OECD SIDS 3-pyridinecarboxamide (nicotinamide). UNEP Publications.

Kerr M, Cotton S, Proffitt T, McConchie M, Markulev C, Smesny S, McGorry P, Berger G (2008) The topical niacin sensitivity test: an inter- and- intra-rater reliability study in healthy controls. *J PLEFA* 79:15-19.

Khanna-Gupta A, Berliner N (2009) Vitamin B3 boosts neutrophil counts. *Nat Med* 15: 139-41.

Khodaeiani E, Fouladi RF, Amirnia M, Saeidi M, Karimi ER (2013) Topical 4% nicotinamide vs. 1% clindamycin in moderate inflammatory acne vulgaris. *Int J Dermatol* 52: 999-1004.

Kimball AB, Kaczvinsky JR, Robinson LR, Matts PJ, Berge CA, Miyamoto K, Bissett DL (2010) Reduction in the appearance of facial hyperpigmentation after use of moisturizers with a combination of topical niacinamide and N-acetyl glucosamine: results of a randomized, double-blind, vehicle-controlled trial. *Br J Dermatol* 162: 435-441.

Krist S, Buchbauer G, Klausberger C: Sheabutter. Aus: *Lexikon der pflanzlichen Fette und Öle*. Springer Vienna, 2008, S. 420-428.

Lodén M, Andersson AC (1996) Effect of topically applied lipids on surfactant-irritated skin. *Br J Dermatol* 134:215-220.

Madison KC (2003) Barrier function of the skin: "La raison d'être" of the epidermis. *J invest dermatol* 121:231-241.

Maranz S, Wiesman Z, Garti N (2003) Phenolic constituents of shea (*Vitellaria paradoxa*) kernels. *J Agric Food Chem* 51:6268-6273.

Maranz S, Wiesman Z (2004) Influence of climate on the tocopherol content of shea butter. *J Agric Food Chem* 52:2934-2937.

Morganti P, Berardesca E, Guarneri B, Guarneri F, Fabrizi G, Palombo P, Palombo M (2011) Topical Clindamycin 1% vs. linoleic acid-rich phosphatidylcholine and nicotinamide 4 % in the treatment of acne: a multicentre-randomized trial. *Int J Cosmetic Sci* 33: 467-476.

Morrow JD, Parsons WG 3rd, Roberts LJ 2nd (1998) Release of markedly increased quantities of prostaglandin D2 in vivo in humans following the administration of nicotinic acid. *Prostaglandins* 38 (2): 263-74.

Namazi MR (2007) Nicotinamide in dermatology: a capsule summary. *Int J Dermatol* 46:1229-1231.

Navarrete-Solís J, Castanedo-Cázares JP, Torres-Álvarez B, Oros-Ovalle C, Fuentes-Ahumada C, González FJ, Martínez-Ramírez JD, Moncada B (2011) A Double-Blind, Randomized Clinical Trial of Niacinamide 4% versus Hydroquinone 4% in the Treatment of Melasma. *Dermatol Res Pract.* 2011:379173.

Neubert RH, Wepf R (2007) Stratum corneum: Struktur und Morphologie einer Barriere. *PZ* 17: 21-28.

- Nicollier M, Massengo T, Remymartin JP, Laurent R, Adessi GL (1986) Free Fatty-Acids and Fatty-Acids of Triacylglycerols in Normal and Hyperkeratotic Human Stratum-Corneum. *J Invest Dermatol* 87:68-71.
- Nicoli S, Padula C, Aversa V, Vietti B, Wertz PW, Millet A, Falson F, Govoni P, Santi P (2008) Characterization of rabbit ear skin as a skin model for in vitro transdermal permeation experiments: histology, lipid composition and permeability. *Skin Pharmacol Physiol* 21:218-226. **a**
- Nicoli S, Zani F, Bilzi S, Bettini R, Santi P (2008) Association of nicotinamide with parabens: effect on solubility, partition and transdermal permeation. *Eur J Pharm Biopharm* 69:613-621. **b**
- Niessen CM (2007) Tight junctions/ Adherens junctions: basic structure and function. *J invest dermatol* 127:2525-2532.
- Otte N, Borelli C, Korting HC (2005) Nicotinamide – biologic actions of an emerging cosmetic ingredient. *Int J Cosmetic Sci* 27:255-261.
- Palmer CN, Irvine AD, Terron-Kwiatkowski A, Zhao Y, Liao H, Lee SP, Goudie DR, Sandilands A, Campbell LE, Smith FJ, O'Regan GM, Watson RM, Cecil JE, Bale SJ, Compton JG, DiGiovanna JJ, Fleckman P, Lewis-Jones S, Arseculeratne G, Sergeant A, Munro CS, El Houate B, McElreavey K, Halkjaer LB, Bisgaard H, Mukhopadhyay S, McLean WH (2006) Common loss-of-function variants of the epidermal barrier protein filagrin are a major predisposing factor for atopic dermatitis. *Nat Genet* 38:441-446.
- Proksch E, Brandner JM, Jensen JM (2008) The skin: an indispensable barrier. *Exp Dermatol* 17:1063-1072.
- Proksch E, Fölster-Holst R, Bräutigam M, Sepehrmanesh M, Pfeiffer S, Jensen JM (2009) Die Rolle der epidermalen Barriere beim atopischen Ekzem. *JDDG* 7:899-911.
- Robertson TB (1910) Notiz über einige Faktoren, welche Bestandteile von Öl-Wasseremulsionen bestimmen. *Z Chem Ind Koll (Kolloid Z)* 7:7-10.
- Roop D (1995) Defects in the barrier. *Science* 267:474-475.
- Schneider IM, Wohlrab W (1997) Fettsäuren und Epidermis. *Hautarzt* 48:303-310.
- Segre JA (2006) Epidermal barrier formation and recovery in skin disorders. *J Clin Invest* 116:1150-1158.
- Shalita AR, Smith JG, Parish LC, Sofman MS, Chalker DK (1995) Topical nicotinamide compared with clindamycin gel in the treatment of inflammatory acne vulgaris. *Int J Dermatol* 34:434-437.
- Sheu HM, Chao SC, Wong TW, Yu-Yun Lee J, Tsai JC (1999) Human skin surface lipid film: an ultrastructural study and interaction with corneocytes and intercellular lipid lamellae of the stratum corneum. *Br J Dermatol* 140:385-391.
- Simonsen L, Fullerton A (2007) Development of an in vitro skin permeation model stimulating atopic dermatitis skin for the evaluation of dermatological products. *Skin Pharmacol Physiol* 20:230-236.

Sivapirabu G, Yiasemides E, Halliday GM, Park J, Damian DL (2009) Topical nicotinamide modulates cellular energy metabolism and provides broad-spectrum protection against ultraviolet radiation-induced immunosuppression in humans. *Br J Dermatol* 161:1357-1364.

Skolová B, (2014) The role of the trans double bond in skin barrier sphingolipids: permeability and infrared spectroscopic study of model ceramide and dihydroceramide membranes. *Langmuir* 30:5527-5535.

Soma Y, Kashima M, Imaizumi A, Takahama H, Kawakami T, Mizoguchi M (2005) Moisturizing effects of topical nicotinamide on atopic dry skin. *Int J Dermatol* 44:197-202.

Stachowitz S: Morphologie und Biochemie des Stratum corneum der menschlichen Haut. In: Braun-Falco O, Gloor M, Korting HC (Hrsg.): Nutzen und Risiko von Kosmetika. 1. Auflage, Springer, Berlin-Heidelberg, 2000, S. 3-7.

Surjana D, Damian DL (2011) Nicotinamide in dermatology and photoprotection. *SKIN med* 9:360-365.

Szukiewicz D, Szewczyk G, Mittal TK, Rongies W, Maslinski S (2010) Involvement of histamine and histamine H2 receptors in nicotinamide-induced differentiation of human amniotic epithelial cells into insulin-producing cells. *Inflamm Res* 59 Suppl 2: 209-11.

Tanno O, Ota Y, Kitamura N, Katsube T, Inoue S (2000) Nicotinamide increases biosynthesis of ceramides as well as other stratum corneum lipids to improve the epidermal permeability barrier. *Br J Dermatol* 143:524-531.

Tsai FJ, Wang YD, Chen CC, Hsieh C, Cheng ZJ, Wu YJ (2012) Evaluation of the antioxidative capability of commonly used antioxidants in dermocosmetics by in vivo detection of protein carbonylation in human stratum corneum. *J Photochem Photobiol B* 112:7-15.

Tunggal JA, Helfrich I, Schmitz A, Schwarz H, Günzel D, Fromm M, Kemmler R, Krieg T, Niessen CM (2005) E-Cadherin is essential for in vivo epidermal barrier function by regulating tight junctions. *EMBO mol med* 24:1146-1156.

Williams ML, Elias PM (1987) The extracellular matrix of stratum corneum: role of lipids in normal and pathological function. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst* 3:95-122.

Wohlrab J, Klapperstück T, Reinhardt HW, Albrecht M (2010) Interaction of Epicutaneously Applied Lipids with Stratum Corneum Depends on the Presence of either Emulsifiers or Hydrogenated Phosphatidylcholine. *Skin Pharmacol Physiol* 23:298-305.

Wohlrab J: Update on Ichthyosis with Special Emphasis on Dryness and the Impact of Moisturizers. In: Lodén M, Maibach H (Hrsg.): Treatment of Dry Skin Syndrome. Springer, Berlin-Heidelberg, 2012, S. 279-84.

Wohlrab J, Kreft D (2014) Niacinamide- Mechanisms of action and its topical use in Dermatology. *Skin Pharmacol Physiol* 27:311-315.

Wohlrab J (2014) Grundlagen der topischen Therapie. *Hautarzt* 65:169-174.

Wohlrab J, Bangemann N, Kleine-Tebbe A, Thill M, Kümmel S, Grischke EM, Richter R, Seite S, Lüftner D (2014) Barrier protective use of skin care to prevent chemotherapy-induced cutaneous symptoms and to maintain quality of life in patients with breast cancer. *Breast Cancer* 6:115-122.

Wohlrab J, Neubert RH, Heskamp ML, Michael J (2015) Cutaneous drug delivery of capsaicin after in vitro administration of the 8% capsaicin dermal patch system. *Skin Pharmacol Physiol* 28:65-74.

Worret WI, Gehring W: *Kosmetische Dermatologie*. 1. Aufl. Springer, Heidelberg, 2004, S.42-46.

Zhou Y, Banga AK (2011) Enhanced delivery of cosmetics by microdermabrasion. *J Cosmet Dermatol* 10:179-184.

8 Thesen der Dissertation

1. Niacinamid, ein hydrophiles Molekül aus der Gruppe der B-Vitamine, ist entscheidend am zellulären Energiestoffwechsel und bei Syntheseprozessen im Körper beteiligt.
2. Die topische Anwendung von Niacinamid bewirkt vielfältige Effekte im Hautorgan.
3. Niacinamid reichert sich überwiegend in der vitalen Epidermis an und steht hier als Induktor der keratinozytären Lipidsynthese für barriereprotektive Wirkungen zur Verfügung.
4. Darüber hinaus können weitere Effekte von Niacinamid auf Melanozyten (Hemmung des Melanosomentransfers) zur Hautbleichung genutzt werden.
5. Eine Verfügbarkeit von Niacinamid im Korium kann antiinflammatorische und immunmodulatorische Effekte erklären.
6. Aus den Früchten des Karitébaums gewonnene Sheabutter hat positive Effekte auf den Feuchtigkeitsgehalt der Epidermis und wirkt rückfettend.
7. Sheabutter zeigt Charakteristika der hauteigenen Lipide und begünstigt wechselseitige Interaktionen mit den Oberflächenlipiden der Haut.
8. Sheabutter wird nach epikutaner Applikation gut in die oberen Epidermisschichten aufgenommen und reichert sich dabei ganz überwiegend im Stratum corneum an.
9. Die Applikation von Sheabutter führt zu einer Interaktion mit dem Stratum corneum, wodurch sich die bereits bekannten barriereprotektiven Effekte ableiten lassen.
10. Die applizierten lipophilen Bestandteile der Prüfpräparation sammeln sich im Stratum corneum an und erfüllen damit die Voraussetzungen für eine klinische Anwendung im Rahmen der Pflgeherapie barrieregestörter Hautzustände.

Tabellarischer Lebenslauf

Angaben zur Person

Geburtsdatum: 07.04.1976
Familienstand: verheiratet, 2 Kinder
Nationalität: deutsch

Berufsausbildung

April 1996 - März 1999 Hebammenschule des Kreiskrankenhauses Hameln- Pyrmont
Oktober 2002 Immatrikulation (Humanmedizin) an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
August 2004 Physikum
Oktober 2007 - Oktober 2008 Elternzeit
August 2008 - Dezember 2008 Erster Teil des Praktischen Jahres im Krankenhaus St. Elisabeth, Halle/Saale (Innere Medizin)
Dezember 2008 - März 2009 Zweiter Teil des Praktischen Jahres im Krankenhaus St. Elisabeth, Halle/Saale (Gynäkologie/Geburtshilfe)
März 2009 - Juli 2009 Dritter Teil des Praktischen Jahres im BG Klinikum Bergmannstrost, Halle/Saale (Chirurgie)
Oktober 2009 2. Abschnitt der ärztlichen Prüfung

Hochschulstudium

Oktober 2002 – Oktober 2009 Studium der Humanmedizin an der Martin-Luther-Universität Halle/Wittenberg

Berufstätigkeit

September 1999 - Oktober 2000 Tätigkeit als Hebamme im Kreißaal des Diakoniewerks Kaiserswerth, Krankenanstalten „Florence Nightingale“
September 2001- Januar 2002 Hebammentätigkeit im Kreißaal des Klinikum am Urban, Berlin-Kreuzberg
März 2002- Oktober 2002 Hebammentätigkeit im Kreißaal des Klinikums Neukölln, Berlin
Dezember 2012- Dezember 2013 Ärztin in Weiterbildung, Fachbereich Gynäkologie und Geburtshilfe am Krankenhaus St. Elisabeth und St. Barbara, Halle

Wissenschaftliche Beiträge

Kreft D, Wohlrab J (2011) Bioverfügbarkeit von Niacinamid nach topischer Applikation. JDDG 9(Suppl. 1): 244.
Kreft D.: Barriereprotektive Effekte eines Niacinamid-haltigen Prüfpräparates nach epikutaner Applikation; Doktorandenkongress MLU Halle 23.11.2011; Gewinnerin des Posterpreises
Kreft D, Wohlrab J (2014) Niacinamide- Mechanisms of action and its topical use in Dermatology. Skin Pharmacol Physiol 27:311-315.

Selbstständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, die vorliegende Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe angefertigt zu haben. Dabei habe ich mich von keiner anderen als der von mir angegebenen Quellen und Hilfen bedient.

Halle, den 24.06.2015

Daniela Kreft

Erklärung über frühere Promotionsversuche

Hiermit erkläre ich, bisher an keiner in- und ausländischen Medizinischen Fakultät ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht, noch die vorliegende Arbeit als Dissertation vorgelegt zu haben.

Halle, den 24.06.2015

Daniela Kreft

Danksagung

Ich danke allen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben!

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Johannes Wohlrab für die Betreuung der Promotion.

Dankbar bin ich ebenfalls den Mitarbeitern der Arbeitsgruppe "Experimentelle Dermatologie" für die Einarbeitung in die Methodik der Arbeit und Unterstützung bei der Durchführung der Untersuchungen.

Zu guter Letzt danke ich meiner Familie, die mich während der Arbeit an der Promotion stets unterstützt und ermutigt hat.