

Aus der Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Venerologie
An der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
(Direktor: Herr Prof. Dr. med. habil. W. Ch. Marsch)



**Zur Vehikelabhängigkeit der Penetration von
 α -Tocopherolacetat in die menschliche Haut**

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

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

von Olaf Hölsken
geboren am 02.12.1970 in Halle/Saale.

Gutachter:

1. Prof. Dr. W. Wohlrab
2. Prof. Dr. R. Neubert
3. Prof. Dr. W. I. Worret (München)

verteidigt am 16.09.2005

urn:nbn:de:gbv:3-000009087

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000009087>]

Für meine Eltern

Kurzreferat

Die therapeutische Effektivität jeder topisch auf die Haut applizierten Arzneimittelpräparation ist abhängig von den Wirkstoffeigenschaften, dem jeweiligen Hautzustand und dem verwendeten Vehikel. Mit dem Ziel, durch Modulation des eingesetzten Vehikels die Bedingungen für ein optimales Konzentrations-Zeit-Profil von α -Tocopherolacetat zu ermitteln, wurden ex vivo-Penetrationsuntersuchungen mit Standardemulsionen, kolloidalen Trägersystemen und Penetrationsmodulatoren durchgeführt. Nach 30 und 300 minütiger Inkubationszeit wurden die Konzentrationen des penetrierten Wirkstoffs in die Schichten der menschlichen Haut ermittelt und graphisch dargestellt. Dabei zeigten sich erhebliche Unterschiede im Penetrationsverhalten von α -Tocopherolacetat in Abhängigkeit vom verwendeten Vehikel.

Durch Auswahl eines Vehikels wurden die Ergebnisse der ex vivo-Untersuchungen an 12 gesunden Probanden überprüft. Das auf die Innenseite der Unterarme aufgetragene α -Tocopherolacetat-haltige Trägersystem wurde nach 30 und 300 Minuten durch Abwischen des Überstandes entfernt. Der penetrierte Anteil wurde mittels Eluation durch ein lipophiles Lösungsmittel entfernt und mittels HPLC untersucht. Die Ergebnisse ließen Rückschlüsse auf die Kinetik der α -Tocopherolacetat-Penetration in die menschliche Haut unter in vivo Bedingungen zu, die beim eingesetzten Vehikel bereits nach 30 Minuten Inkubationszeit ihren höchsten Wert erreicht hatte.

Bibliographische Beschreibung

Hölsken, Olaf: Zur Vehikelabhängigkeit der Penetration von α -Tocopherolacetat in die menschliche Haut.

Halle, Univ., Med. Fak., Diss., 80 Seiten, 2005

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1	Einleitung
1.1	Die menschliche Haut 1
1.2	Tocopherole 2
1.3	Grundlagen der dermalen Wirkstoffaufnahme 3
1.3.1	Penetrationswege 3
1.3.2	Konventionelle Vehikelsysteme 4
1.3.3	Modulation der Wirkstoffpenetration 5
1.4	Zielstellung 7
2	Material und Methoden
2.1	Geräte und Hilfsmittel 8
2.2	Chemikalien 9
2.3	Methoden 10
2.3.1	Untersuchungen zur Penetration von α - Tocopherolacetat in die humane Haut 10
2.3.2	Präparation der humanen Haut 11
2.3.3	Bestimmung der mittleren Epidermisbreite 11
2.3.4	Präparation der tocopherolhaltigen Vehikelsysteme 12
2.4	Versuchsdurchführung 17
2.4.1	Berechnung der gemessenen Werte 18
2.5	Offene Pilotstudie zur Rückstandsanalyse von α – Tocopherolacetat und Tocopherol nach topischer Applikation bei gesunden Probanden 19
2.5.1	Modellbeschreibung und Versuchsbedingungen 19
2.5.2	Tocopherol-Analytik mittels HPLC 20
2.5.3	Statistische Auswertung 20

3	Ergebnisse	
3.1	Penetration von α -Tocopherolacetat in humane Haut	22
3.1.1	Vehikelabhängige Konzentrationsverteilung von α -Tocopherolacetat in den Schichten menschlicher Haut	22
3.1.2	Vehikelabhängige Konzentrationsverteilung von α -Tocopherolacetat in den Schichten menschlicher Haut unter Einfluß von Penetrationsmodulatoren	39
3.2	Bestimmung von Tocopherolacetat nach topischer Applikation bei gesunden Probanden	55
4	Diskussion	
4.1	Biologische Funktion von Tocopherol	58
4.2	Topische Anwendung von α -Tocopherol	59
4.3	Penetration von α -Tocopherolacetat	60
4.4	O/W-Emulsion und W/O-Emulsion als Vehikel	60
4.5	Spezielle Vehikel	61
4.6	Einfluß von Penetrationsmodulatoren	63
4.7	In vitro Penetration	66
5	Zusammenfassung	68
6	Literaturverzeichnis	70
7	Thesen	78

Abkürzungen

Abb.	Abbildung
α -TPA	alpha-Tocopherolacetat
C	Kohlenstoff
CAS Nr.	<i>Chemical-Abstract-Service Registry Number</i>
$^{\circ}\text{C}$	Grad Celsius
cm^2	Quadratcentimeter
D	Dalton
DAB	Deutsches Apotheker Buch
DNA	Desoxyribonukleinsäure
Dpm	<i>detections per minute</i>
et al.	et altera
F	Fläche
g	Gramm
H	Wasserstoff
h	Stunde
HPLC	<i>High pressure liquid chromatography</i>
IE	Internationale Einheiten
m^2	Quadratmeter
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
μm	Mikrometer
mg	Milligramm
min	Minute
mm^3	Kubikmillimeter
M_r	Molekülradius
nm	Nanometer
nmol	Nanomol
O	Sauerstoff
O/W	Öl/Wasser
Ph. Eur.	Eurpäisches Arzneibuch
POPOP	1,4-bis 2-5Phenyloxalzyt
PPO	1,4-bis 2-5-Phenyloxazol
SD	Standardabweichung
SEM	Standardfehler des Mittelwertes
UVA	ultraviolett A
UVB	ultraviolett B
Vit. A	Vitamin A
Vit. E	Vitamin E
W/O	Wasser/Öl

1 Einleitung

1.1 Die menschliche Haut

Die Haut ist im Wesentlichen aus drei großen Schichten aufgebaut. Dabei bildet die Epidermis mit dem Stratum corneum die äußere Begrenzung zur Umwelt, und gleichzeitig die Penetrationsbarriere für alle topisch aufgetragene Arzneimittel. Von der Oberfläche zum Körperinneren schließen sich die Dermis und die Subcutis an. Zum Organ Haut zählen auch die Hautanhangsgebilde wie Haare, Drüsen und Nägel (Übersichten bei: Braun-Falco et al., 1997; Fritsch P, 1998).

Für die transdermale Wirkstoffpenetration ist das Stratum corneum von besonderem Interesse. Es bildet den Anfangspunkt bei der Penetration topisch applizierter Wirkstoffe und stellt durch seine Beschaffenheit ein Haupthindernis für eindringende Substanzen dar. Die Barrierefunktion der Hornschicht behindert oder verhindert dabei nicht nur das Eindringen von extern auf die Haut aufgetragene Substanzen, sie reguliert auch eine unkontrollierte Wasserabgabe und ist damit für eine ausreichende Hydratation der Hornschicht verantwortlich.

Das Stratum corneum ist je nach Körperareal ca. 10-80 µm dick. Die vorherrschende Zellpopulation ist der Corneozyt. Der Corneozyt ist nach dem Ziegelstein-Mörtel-Prinzip in eine Matrix aus Lipiden und wasserbindenden *moistruizing factors* eingebettet.

Grundlegend lässt sich der Aufbau des Stratum corneums als Zwei-Kompartiment-Modell beschreiben:

- Corneozyten (verhornte Keratinozyten)
- Intercorneozytäre, lamelläre Lipidschichten

(Elias PM, Friend DS, 1975; Grayson S, Elias PM, 1982; Elias PM, 1983). Essentiell für die Ausprägung einer intakten Barrierefunktion ist die Anwesenheit von Lipiden in der entsprechenden Zusammensetzung und deren spezifische strukturelle Organisation. Die Lipidzusammensetzung wird mit etwa gleichen Anteilen an Ceramiden, Cholesterol und Triglyceriden sowie freien Fettsäuren beschrieben (Lampe et al., 1983). Einfluss auf die Strukturgebung der Lipide als mehrschichtige *bilayer* üben pH-Wert und Temperatur aus (Elias PM, 1992).

Die Hornschicht ist in ihrer Funktion als Permeabilitätsbarriere hinsichtlich ihrer Zusammensetzung verschiedenen Einflüssen unterworfen. Neben Schwankungen, bedingt durch die Region, das Alter oder Krankheitserscheinungen, wirken sich beispielsweise Änderungen im Wasserhaushalt, der Temperatur, des pH-Wertes und der enzymatischen

Aktivität auf die Vitalität der Barrierefunktion aus (Grubauer et al., 1989; Hanley et al., 1997; Mak et al., 1991; Rawlings et al., 1993).

1.2 Tocopherole

Vitamin E ist die offizielle Bezeichnung für alle Tocol- und Tocotrienol-Derivate, die qualitativ die biologische Aktivität von RRR-alpha- Tocopherol (Cas Nr. 59-02-9, $M_r = 430,69$), dem natürlich vorkommenden Stereoisomer, besitzen. Tocopherole bestehen aus einem Chromanring mit einer Seitenkette aus 3-Isopren-Molekülen. Die einzelnen Tocopherole unterscheiden sich durch die Anzahl und Stellung der Methylgruppen am Chromanring, worauf die unterschiedliche Vitamin E-Aktivität beruht.

Tocopherole sind gelblich- braune Substanzen mit einem niedrigen Schmelzpunkt. Sie sind unlöslich in Wasser und leicht löslich in organischen Lösungsmitteln. Obwohl die Tocopherole leicht oxidieren, sind sie sehr stabil gegen Säuren und Alkalien (Bässler et al., 1997).

Der Tocopherol-Gehalt des menschlichen Organismus besteht zu annähernd 90 % aus RRR- α -Tocopherol . Tocopherol wird in den meisten Körpergeweben nachgewiesen. In Zellkompartimenten, die reich an Membranen sind, wie Mitochondrien, Mikrosomen sowie Zellkernen, ist die Konzentration von Tocopherol besonders hoch (Friedrich W, 1987).Tocopherol ist einer der wichtigsten intrazellulären Radikalfänger des menschlichen Organismus.

Bei freien Radikalen handelt es sich um kurzlebige, chemisch instabile Atome oder Moleküle mit hoher Reaktivität. Freie Radikale entstehen unter anderem bei physiologischen Stoffwechselabläufen (Schmidt KH, 1993).

Die Reaktion freier Radikale bei der Entzündungsreaktion auf eindringende Mikroorganismen und Zellen ist überlebenswichtig für den menschlichen Organismus. Chronische Entzündungen, Autoimmunkrankheiten oder eine Schwäche des Immunsystems können zur Schädigung von Zellstrukturen wie Membranen, Proteinen, Nucleinsäuren oder extrazellulärer Matrix aufgrund des gestörten Ablaufs der Entzündungsreaktion führen.

Die exogene Gefährdung durch die zunehmende Umweltverschmutzung gewinnt bei der Entstehung von freien Radikalen immer mehr an Bedeutung und stellt somit eine große Gesundheitsbedrohung dar. Strahlung wie z.B. UVA- und UVB-Strahlung kann die Bildung von elektronisch angeregten Reaktionsprodukten verursachen, die zur vorzeitigen Hautalterung oder zum Funktionsverlust der Haut führen. Bedeutsam ist der Einfluß der

UV-Strahlung auch in der Pathogenese von Hauttumoren, so bei der Entstehung des malignen Melanoms oder des Spinalioms (Kohen et al., 1995).

1.3 Grundlagen der dermalen Wirkstoffaufnahme

Die Wirkstoffaufnahme über die Haut ist kein stationärer Prozess, vielmehr ist es ein Zusammenwirken verschiedener physikochemischer Prozesse. Dabei wird die Wirkstoffaufnahme von den Stoffeigenschaften und -konzentrationen, der Applikationsfläche, der Anatomie und Physiologie des entsprechenden Hautareals (Barrierefunktion, metabolische Aktivität) und den eingesetzten galenischen Formulierungen (Vehikeleffekt) beeinflusst (Worret WI, Gehring W, 2004; Gloor M, 1982). Für die Penetration und Permeation von Wirkstoffen in und durch die menschliche Haut sind diese Faktoren jedoch nicht isoliert zu betrachten, erst die jeweilige Wechselwirkung von Wirkstoff, Vehikel und Hautzustand bedingen den Grad des Wirkstofftransportes und damit die entsprechende therapeutische Effektivität (Gloor et al., 2000)

1.3.1 Penetrationswege

Die dermale Wirkstoffaufnahme erfolgt unter Berücksichtigung der Anatomie des Hautorgans auf 2 Wegen. Den Hauptweg stellt die Penetration durch das Stratum corneum dar. Durch Zufuhr von ionischen Substanzen mittels Energie (Sonophorese, Gleichstrom-Iontophorese) oder bei Veränderung der Applikationsbedingungen, z.B. durch Occlusion oder Penetrationsmodulation, können sich neue Penetrationswege eröffnen, die unter Normalbedingungen in der Haut nicht vollständig existieren. Sie werden als lacunare Domänen des Stratum corneums bezeichnet und bilden einen Transportweg für polare, aber auch für apolare Moleküle (Menon GK, Elias PM, 1997). Der transepidermale Transport ist entsprechend der Zwei-Kompartiment-Struktur der Hornschicht auf zwei unterschiedlichen Wegen möglich – interzellulär und transzellulär (Loth H 1986, Loth H, 1987). Dabei dominiert die interzelluläre Route, während bei der transzellulären Penetration dicht gepacktes Keratin und stabile Zellmembranen überwunden werden müssen. Als weiterer Penetrationsweg muß der *Pore-Pathway* als interzellulärer Transportweg ergänzt werden (Scheuplein RJ, Blank JH, 1971).

Neben dem Hauptpenetrationsweg, der auf Grund des Konzentrationsgradienten in die tieferen Schichten der Haut gerichtet ist, existiert noch die seitliche Ausbreitung, oder laterales Spreiten. Dabei wird die Intensität des lateralen Spreitens maßgeblich durch die

Art des verwendeten Vehikels und der Filtersubstanz sowie durch individuelle Hauteigenschaften bestimmt (Weigmann et al., 1998; Baumann et al., 1999).

1.3.2 Konventionelle Vehikelsysteme

Öl-in-Wasser-Emulsion (O/W)

Bei einer Öl-in-Wasser-Emulsion handelt es sich um ein mehrphasiges flüssiges System, dessen äußere geschlossene Phase aus Wasser (Dispersionsmittel) und die innere (disperse), offene Phase aus öligen Bestandteilen besteht. Zur Herstellung von O/W-Emulsionen werden als lipophile Komponente z.B. Triglyceride, Fettsäuren oder Isopropylpalmitat sowie Emulgatoren (Tenside mit O/W-Charakter) verwendet. Zur Stabilitätserhöhung werden W/O-Emulgatoren oder Polymere an die Grenzfläche adsorbiert (Niedner R, Ziegenmeyer J, 1992).

Auf Grund ihrer flüssigen Konsistenz eignen sie sich gegenüber anderen Vehikelsystemen zur Applikation an bestimmten Hautarealen (behaarte, intertriginöse Bereiche, schmerzende Hautbereiche). O/W-Emulsionen werden bei akuten, subakuten und subchronischen Entzündungsprozessen eingesetzt. Sie wirken durch ihren hohen Wasseranteil kühlend. Die eingearbeiteten Wirkstoffe sind meist lipophil und in der Öl-Phase gelöst. In der Kosmetik werden O/W-Emulsionen als Hautmilch (z.B. *After Sun-Lotion*) bezeichnet.

Wasser-in-Öl-Emulsion (W/O)

Bei einer Wasser-in-Öl-Emulsion handelt es sich ebenfalls um ein flüssiges mehrphasiges System mit der öligen Komponente als Dispersionsmittel (äußere geschlossene Phase) und Wasser als disperse Phase. Zur Herstellung werden meist W/O-Emulgatoren (z.B. Partialfettsäureester des Sorbitans, Partialfettsäureester des Polyoxyethylensorbitans, Cholesterol, Fettalkohole) verwendet. Eine Stabilitätserhöhung kann erreicht werden, wenn das ölige Dispersionsmittel eine hohe Viskosität gegenüber Wasser besitzt (Niedner R, Ziegenmeyer J, 1992).

Hydrogele

Hydrogele sind halbfeste einphasige Systeme mit einem relativ hohen Wasseranteil (80-90%). Als Gelgrundlage können anorganische und organische Gelbildner zur Anwendung kommen. Dabei werden als anorganische Gelbildner Aluminiumsilikate (Bentonite) und hochdisperse Siliziumdioxide verwendet. Organische Gelbildner kann man in natürliche (z.B. Gelantine, Pektine, Alginate, Stärke), halbsynthetische (Cellulose-Ether) und

synthetische (Polyacrylate, Polyvinylpyrrolidone u.a.) Polymere unterteilen. Sie enthalten in der Regel Glycerol und/oder Propylenglycerol als Feuchthaltemittel und Weichmacher (Neubert et al., 2001).

1.3.3 Modulation der Wirkstoffpenetration

In der topischen Therapie dermatologischer Erkrankungen ist nicht nur die Auswahl des geeigneten Arzneimittels, sondern auch des geeigneten Vehikels entscheidend für den Therapieerfolg. Dabei müssen verschiedene Faktoren berücksichtigt werden. So sind der Zustand der Haut, beeinflusst durch Patientenalter, Körperregion, Hydratation und Durchblutung, sowie die Art der Erkrankung entscheidende Auswahlkriterien. Angestrebt wird eine möglichst hohe Wirkstoffkonzentration in der erkrankten Hautschicht, also ein optimales Konzentrations-Zeit-Profil (Wohlrab W, Lasch J, 1989). Gleichzeitig müssen mögliche Nebenwirkungen des Pharmakons minimiert werden. Immer stärker in das Interesse der dermatopharmazeutischen Forschung rückt der Einfluss des eingesetzten Vehikels auf die Penetration, Permeation und die Liberation des transportierten Wirkstoffs. Durch die Auswahl des geeigneten Vehikels ist es möglich, den Penetrations- und Liberationsvorgang des inkorporierten Wirkstoffs positiv zu beeinflussen. Gleichzeitig kann die Eigenwirkung von Vehikelbestandteilen sowohl die Verteilungsbedingungen verändern, als auch die Struktur des Stratum corneums beeinflussen (Wohlrab J, 1995). Die modifizierten Barriereigenschaften können sich günstig auf den Arzneitransport auswirken (Cornwell PA, Barry BW, 1993; Hori et al., 1992; Kadir R, Barry BW, 1991; Schückler F, Lee G, 1992).

In den Mittelpunkt der dermatopharmazeutischen Forschung sind dabei kolloidale Trägersysteme gerückt, deren Fähigkeiten sich nicht nur auf das Gebiet der Penetrationspromotoren beschränken. Auch auf die kontrollierte Wirkstofffreigabe üben sie günstige Einflüsse aus (Huschka C et al., 1996). Durch ihren Einsatz kann die Penetration von Wirkstoffen mit ungünstigen physikochemischen Eigenschaften für die topische Applikation (schlechte Löslichkeit, Hydrophilie, Hitze-, Oxidations- und Lichtempfindlichkeit) gesteigert werden (Schmalfuß U, 1997).

Liposomen

Liposomen sind kleine kugelförmige Vesikel aus amphiphilen Lipiden die einen hydrophilen Kern umschließen. Sie sind aus einer oder mehreren Lipiddoppelschichten aufgebaut. Grundsätzlich gleicht ihr Aufbau denen von biologischen Membranen. Als

Basisbausteine kommen hauptsächlich Phospholipide zum Einsatz. Zur Herstellung von Liposomen eignen sich natürliche (Lecithin, Phosphatidylcholin), modifizierte natürliche (hydriertes Phosphatidylcholin), halbsynthetische (veränderte Alkylketten), vollsynthetische und Phospholipide mit nicht nativer Kopfgruppe (Barenholz Y, Crommelin DJA, 1994). Bei Kontakt mit Wasser bilden alle diese Verbindungen spontan Lipiddoppelschichten aus. Je nach Herstellungsverfahren und chemischer Zusammensetzung entstehen Liposomen mit einer oder mehreren konzentrischen Doppelschichten. Eine Klassifikation der Liposomen wird häufig bezüglich ihrer Lamellarität und Größe vorgenommen (Crommelin DJA, Schreier H, 1987).

Nanopartikel

Mit der Vorstellung von festen Polymerpartikeln im Nanometerbereich legten BIRREBACH und SPEISER den Grundstein für die Entwicklung eines Trägersystems aus Polymer und Arzneistoff mit einer Größe von 10 bis 1000 nm (Birrebach G, Speiser P, 1976). Besteht dieses Trägersystem aus verfestigten mizellaren Systemen, verfestigten Mikroemulsionen oder Partikeln mit einer kontinuierlichen Hülle, spricht man von **Nanokapseln**. Als **Nanopartikel** werden Teilchen aus einer Polymermatrix bezeichnet, in welche ein Arzneistoff eingebettet oder außen adsorbiert sein kann (Bauer et al., 1991). Zur Herstellung dieses Trägersystems werden natürliche, halbsynthetische und synthetische Materialien verwendet. Die Verwendung natürlicher Trägermaterialien (Polysaccharide, Lipide, Biopolymere) bieten auf Grund ihrer geringen Toxizität und biologischen Abbaubarkeit Vorteile. Aber auch halbsynthetische und synthetische Materialien (Polycyanoacrylate) sowie deren Gemische eignen sich als Matrices (Couvreur et al., 1997; Gurny et al., 1981; Koosha et al., 1987; Kreuter J, Speiser P, 1976).

Mikroemulsion

Mikroemulsionen sind kolloidale Lösungen aus miteinander nicht mischbaren Flüssigkeiten. Sie sind homogen, thermodynamisch stabil, transparent bis schwach opaleszierend und bestehen hauptsächlich aus einer Wasserphase, einer Ölphase und einem Gemisch aus Tensid und Cotensid (Pfüller U, 1986; Price LM, 1977). Die Tröpfchengröße der mizellartigen Pseudophase liegt im Unterschied zur Makroemulsion im Bereich von 10-200 nm (Saint Ruth et al., 1995). Die Bildung von Mikroemulsionen erfolgt immer spontan (Friberg E, 1990). Es werden analog den Makroemulsionen Wasser-in-Öl (W/O) und Öl-in-Wasser (O/W) Emulsionen unterschieden.

1.4 Zielstellung

Die übermäßige Lichtexposition, besonders UVA- und UVB-Strahlung, führt in der Haut zu vielfältigen pathophysiologischen und pathobiochemischen Vorgängen. Dabei spielt die UV-induzierte Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) sowohl in der Hautalterung als auch in der Entstehung von Tumoren eine zentrale Rolle. Aus den Erkenntnissen, dass UV-Strahlung den endogenen Gehalt an Antioxidantien sowie die Aktivität von antioxidativ wirkenden Enzymen vermindern (Thiele et al., 1998; Shindo et al., 1993), resultierte die systemische oder topische Applikation von Radikalfängern. Das Tocopherol, als intrazellulärer Radikalfänger nimmt dabei eine zentrale Stellung ein. Entscheidend für jede Pharmakotherapie bzw. -prophylaxe ist dabei das Konzentrations-Zeit-Profil, also die Zeit, in der eine entsprechend hohe Konzentration eines Pharmakons am Wirkort zur Verfügung steht.

Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit wurde das Konzentrations-Zeit-Profil nach topischer Applikation von α -TPA in humane Mamma-Haut unter ex vivo Bedingungen untersucht. Dabei stand der Einfluß unterschiedlicher galenischer Zubereitungen bei konstanter Wirkstoffmenge auf die Penetrationskinetik nach Kurzzeit- und Langzeitapplikation, sowie die Möglichkeit der Modifikation des Penetrationsprozesses durch Zusatz unterschiedlicher Penetrationsmodulatoren im Mittelpunkt des Interesses.

Der zweite Teil sollte die Frage klären, inwieweit die ex vivo Ergebnisse auf die in vivo Penetration des α -Tocopherolacetats übertragbar sind. Dazu wurde an 12 gesunden Probanden die in das Stratum corneum penetrierte α -Tocopherolacetat-Menge als Kurz- und Langzeitapplikation bestimmt. Durch Eluation mit einem geeigneten Lösungsmittel und anschließender HPLC-Analytik wurden die in das Stratum corneum penetrierten Wirkstoffmengen bestimmt und unter Kenntnis der eingesetzten Mengen Rückschlüsse auf die penetrierte bzw. permeierte α -TPA-Menge abgeleitet.

2 Material und Methoden

2.1 Geräte und Hilfsmittel

Analysenwaage	Typ MC5-OCE, Satorius AG, Göttingen, BRD
Bildanalysesystem	Cydok, Carl H. Hilgers, Königswinter, BRD
Biopsiestanzen	Stiefel Laboratorium GmbH, Offenbach, BRD
Durchlichtmikroskop	Zetopan, Reichert AG Wien, Österreich
Brutschrank	Vitromat Typ sbs-11, Mytron Heiligenstadt, BRD
Eppendorf-Reaktionsgefäß	Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg, BRD
Flüssigkeitsszintillationszähler	WALLAC-ADL-GmbH, Freiburg, BRD WINSPECTRAL 1414 Liquid Scintillation Counter
Franz-Diffusionszelle	Crown Glass Company, Sommerville, New Jersey, USA
Füllspatel	VEB Dentalfabrik Treffurt, DDR
Gefrierbruchanlage	BAF 400D, Balzers, Lichtenstein
Gefriermikrotom	Mikrotom-Modell 1206, Frigomobil Reichert-Jung
HPLC- Anlage	JASCO 851-AS Sampler, JASCO PU 980 Pumpe, JASCO UV 975 UV/VIS Detektor, Gastor GT 1 Entgasungsmodul, Japan
Laufsäule	RP-8 UCHROMOSPHER Merck, BRD
Magnetrührer	MLW Rührerätewerk Medingen, Freital, Typ R3T Variomag® Elektronikrührer Poly 15, Laborbedarf K.J. Werner GmbH, Leipzig, BRD
Mikroliterspritze	VEB Werke für Technisches Glas, Ilmenau, DDR
Pipetten	Eppendorf -Netheler-Hinz GmbH Hamburg, BRD
Präzisionswaagen	Typ 870-13, Gottl. Kern & Sohn, Albstadt 1, BRD UMC 5, Satorius AG, Göttingen, BRD
Szintillationsmeßgefäße	Pico Glass Vial, Pony Vial, Econo Glass Vial, Canberra-Packard GmbH, Dreieich, BRD
Wasserbad	Thermostat B3-DC1, Haake, Karlsruhe, BRD
Wattetupfer 150 mm lang	neo lab, Heidelberg. BRD

2.2 Chemikalien

Ceraspheres [®] - G9505	Lipoid GmbH, Ludwigshafen, BRD
Cholesterol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen , BRD
Eosin gelblich	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen , BRD
Ethanol 96% reinst	Merck KGaA, Darmstadt, BRD
Ethanol reinst p.a.	Laborchemie Apolda GmbH, BRD
Flüssigkeitsszintillationscocktail	Ultima Gold Canberra Packard GmbH, Dreieich, BRD
Hämalaun nach Mayer für die Mikroskopie	Merck KGaA, Darmstadt, BRD
Hyaluronidase	Abteilung Experimentelle Mikrobiologie der Friedrich-Schiller-Universität Jena, BRD
Hydrophile Salbe nach DAB 9	Apotheke der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
Methanol p.a.	Merck KGaA, Darmstadt, BRD
Methanol (HPLC rein)	Fisher Chemicals, Fisher Scientific UK Limited Loughborough, Leics., Großbritannien
Natriumchlorid (NaCl) reinst p.a.	Merck KGaA, Darmstadt, BRD
Physiogel [®] -Creme	Stiefel, BRD
POPOP	Canberra-Packard GmbH, Dreieich, BRD
1,4-bis-2-(5-Phenyloxazolyl)-benzen	
PPO (2,5-Diphenyloxazol)	Canberra-Packard GmbH, Dreieich, BRD
Profutura 2000	Marbert GmbH, BRD
Sconacell [®] A	BSL Olefinverbund GmbH, Schopau, BRD
Span [®] 20	Pharma-Tentrale GmbH, Herdecke, BRD
Soluene [®] -350	Canberra-Packard GmbH, Dreieich, BRD
Tesafilm	Beiersdorf AG, Hamburg, BRD
Toluol zur Synthese	Merck-Schuchard, Hohenbrunn, BRD
Tocopherolacetat	Lipoid GmbH, BRD
(+)- α -Tocopherolacetat (acetyl-1 ¹⁴ C)	Hartmann Analytics, Braunschweig, BRD
Wollwachsalkoholsalbe nach DAB 9	Apotheke der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

2.3 Methoden

2.3.1 Untersuchungen zur Penetration von α -Tocopherolacetat in die humane Haut

Zur Untersuchung des Penetrationsverhaltens von α -Tocopherolacetat aus kolloidalen Trägersystemen und modifizierten Emulsionstypen in humane Haut *ex vivo* wurde die FRANZ-Diffusionszelle verwendet (Franz TJ, 1975) (vgl. Abb.1). Die FRANZ-Diffusionszelle besteht aus einem doppelwandigen, temperierbaren Glasteil, worin sich eine Akzeptorflüssigkeit befindet. Durch ständiges Rühren mittels Magnetrührer wird die Akzeptorflüssigkeit im homogenen Zustand gehalten und die Hautunterseite ständig gespült. Das Probematerial wird durch eine Gaze, die durch einen Glasring und eine Metallklammer stabilisiert wird, vom Akzeptormaterial getrennt. Die Apparatur wird mit einer Glasabdeckung als Verdunstungsschutz, zur Gewährleistung möglichst gleichbleibender Hydratationsbedingungen während des Untersuchungszeitraumes, verschlossen (Franz TJ, 1978).

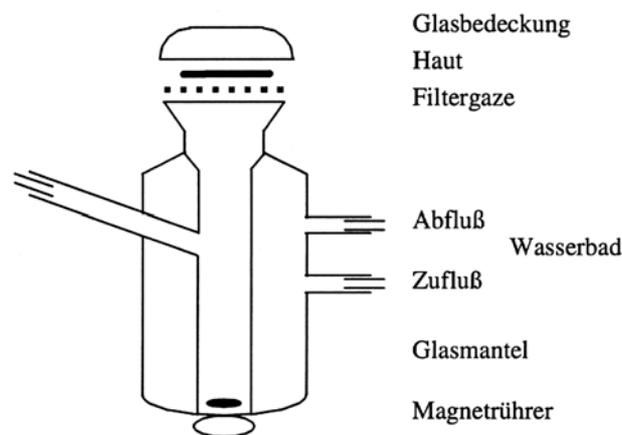


Abb. 1: Aufbau der FRANZ'schen Diffusionszelle (Franz, 1975)

Die FRANZ'sche Diffusionszelle, als Einkammersystem, eignet sich zu Penetrationsuntersuchungen von pharmakologisch relevanten Konzentrationen (1% α -Tocopherolacetat) (*finite dose*-Technik), ohne dass unendlich große Wirkstoffmengen in überdimensionierten Donatoren (*infinite dose*-Technik) verwendet werden müssen (Franz TJ, 1978). Durch den Einsatz von physiologischer Kochsalzlösung als Akzeptormedium wurden bei der einmaligen Applikation der zu untersuchenden Vehikel *sink*-Bedingungen für den hydrophilen Arzneistoff geschaffen. Die Penetrationskinetik kann bei dieser

Applikationstechnik nicht untersucht werden, da eine zeitabhängige Donatorentleerung zum Ausbleiben eines *steady state* der Wirkstoffdiffusion führt.

Um eine Konstanz in den Versuchsbedingungen zu realisieren, wurde als Untersuchungsmaterial ausschließlich humane Mammahaut mit geringen Schwankungen im Alter der Spender verwendet (Kap. 2.3.2).

Um Ergebnisse im Kurz- und Langzeitbereich zu erhalten, wurden Einwirkzeiten von 30 min und 300 min gewählt. Die Vehikeffekte wurden anhand der ermittelten Konzentrationen [nmol/mm^3] in den einzelnen Hautschichten Stratum corneum, Epidermis und Dermis getroffen.

2.3.2 Präparation der humanen Haut

Für die Penetrationsversuche wurde humane Haut von Mamma-Reduktionsplastiken verwendet. Die Haut wurde postoperativ innerhalb von 6 h aufgearbeitet. Dazu wurde das Untersuchungsmaterial mechanisch vom subkutanen Fettgewebe befreit und anschließend mit isotonischer Kochsalzlösung gesäubert. Danach wurden mit Hilfe eines Locheisens ($\varnothing = 20$ mm) kreisrunde Stücke hergestellt, diese in Aluminiumfolie verpackt und bei -25°C in einem Tiefkühlschrank gelagert. Das Alter der Patientinnen lag zwischen 23 und 40 Jahren, wobei bei der Versuchsplanung aus Standardisierungsgründen weitestgehend altersgleiche Haut verwendet wurde. Vor Versuchsbeginn wurde die Haut aus dem Tiefkühlschrank entnommen, aufgetaut und mittels Wattetupfer vom überschüssigen Gefrierwasser befreit.

2.3.3 Bestimmung der mittleren Epidermisbreite

Zur Bestimmung der mittleren Epidermisbreite mussten von jedem der verwendeten Mammapräparate histologische Schnitte angefertigt werden. Dazu wurde ein kleines Hautstück in 4%igem Formaldehyd fixiert, in der aufsteigenden Alkoholreihe entwässert und in Paraffin eingebettet. Danach wurden mit einem Mikrotom $5\ \mu\text{m}$ dicke Gewebsschnitte hergestellt, sofort in heißem Wasser auf einen Objektträger aufgezogen und zum Glätten im Brutschrank bei 60°C für 30 min aufbewahrt. Anschließend wurde das Paraffin entfernt und die Präparate mit Hämalaun-Eosin (HE) eingefärbt [Hämalaun-Färbung nach MAYER; (Romeis, 1989)]. Nach erneuter Entwässerung wurden die Präparate abschließend eingedeckt. Zur Ermittlung der mittleren Epidermisbreite wurden die HE-gefärbten histologischen Hautschnitte am Morphometrie-Unterprogramm des Bildanalyseprogramms CYDOK untersucht. Dabei erfolgte die automatische Berechnung des Mittelwertes mit Standardabweichung aus zehn Werten von verschiedenen interaktiv markierten Epidermisabschnitten.

2.3.4 Präparation der α -tocopherolhaltigen Vehikelsysteme

Standardemulsionen

Als Standardemulsionen zur Untersuchung der vehikelabhängigen Penetration von α -Tocopherolacetat wurde eine O/W-Emulsion, sowie eine W/O-Emulsion gewählt. Die Auswahl dieser Systeme erfolgte auf Grund der umfassenden Kenntnis über Mechanismen der Wechselwirkungen zwischen Haut, Vehikel und Pharmakon. Für die Penetrationsuntersuchungen wurde in beide Emulsionen eine Wirkstoffmenge von 1% α -Tocopherolacetat eingearbeitet.

O/W-Emulsion -(Öl/Wasser-Emulsion nach DAB 10)

Zusammensetzung

Lanette [®] N (Emulgierender Cetysterylalkohol DAB 10)		9,00%
Paraffinum subliquidum (Dickflüssiges Paraffin)		10,50%
Vaselinum album (Weißes Vaseline)		10,50%
Aqua bidestillata	ad	100,00%

O/W Emulsion		m [g]
α -Tocopherolacetat	Ph. Eur.	1,00
Wasserhaltige Hydrophile Salbe	DAB 10	99,00

W/O Emulsion -(Wasser/Öl-Emulsion nach DAB 9)

Alcoholes Lanae (Wollwachsalkohole)		3,00%
Alcohol cetylstearylicus (Cetylstearylalkohol)		0,25%
Vaselinum album (Weißes Vaseline)		46,75%
Aqua bidestillata	ad	100,00%

W/O Emulsion		m [g]
α -Tocopherolacetat	Ph. Eur.	1,00
Wasserhaltige Wollwachsalkoholsalbe	DAB 10	99,00

Komponenten der Standardemulsionen

Alkoholes Lanae

Die hellgelben bis bräunlichen, spröden und wachsartigen Wollwachsalkohole entstehen durch alkalische Verseifung des Wollwaxes (1-2% freie Fettsäuren, und Kohlenwasserstoffe, 3% freie Alkohole und 95% veresterte Verbindungen) (Fiedler HP, 1996) mit nachfolgender Abtrennung der Fettsäuresalze durch Extraktion des unverseifbaren Anteils mit organischen Lösungsmitteln und nachfolgender Raffination. Wollwachsalkohole sind in Ether, Petrolether und siedendem wasserfreiem Ethanol löslich, aber nur wenig löslich in Ethanol (90% Volumenkonzentration) und unlöslich in Wasser (Bauer et al., 1991). Sie dienen als W/O-Emulgatoren. Als Nachteil erweist sich das erhöhte Allergisierungspotential.

Cetylstearylalkohol (Lanette® O)

Cetylstearylalkohol ist ein Gemisch aus den höheren Fettalkoholen Cetylalkohol ($C_{16}H_{33}OH$) und Stearylalkohol ($C_{18}H_{37}OH$) und zählt zur Klasse der W/O-Emulgatoren mit geringer Tensidwirkung. Dieses Alkoholgemisch kommt als Emulsionsstabilisator und Konsistenzgeber in Salben zu Anwendung.

Lanette®N (Emulgierender Cetylstearylalkohol DAB 10)

Dieser Komplexemulgator ist ein kolloiddisperses Gemisch aus 90% Lanette® O (Cetylstearylalkohol) und 10% Lanette® E (Natrium-Cetylsulfat). Die selbstemulgierende Mischung der Fettalkohole wird hauptsächlich zur Herstellung von Creme- und Salbengrundlagen verwendet (Fiedler HP, 1996). Lanette® N zählt zu den anionischen Stoffen, was zu Wechselwirkungen im Sinne eines Ionenaustausches mit kationischen Wirkstoffen führen kann.

Paraffinum subliquidum

Paraffinum subliquidum ist eine gereinigte, dickflüssige Mischung aus gesättigten aliphatischen Kohlenwasserstoffen. Es ist klar, farb- und geruchslos. Der lipophile Charakter zeigt sich in einer guten Löslichkeit in Chloroform und Ether sowie in einer Unlöslichkeit in Wasser und Ethylalkohol (Fiedler HP, 1996). Als Bestandteil von Lipidgrundlagen wirkt Paraffin durch den okklusiven Einfluß stark hydratisierend auf die Hornschicht. In reiner Form besitzt dickflüssiges Paraffin jedoch keine therapeutische Relevanz (Niedner R, Ziegenmeyer J, 1992).

Vaseline album

Das Gemisch aus hauptsächlich gesättigten, gereinigten und gebleichten Kohlenwasserstoffen wird aus Erdöldestillaten gewonnen. Die Grundstruktur der Vaseline kann als plastisches Gel mit netzartigem Gerüst beschrieben werden, wobei sich die immobile Phase aus langkettigen und die mobile Phase aus kurzkettigen Kohlenwasserstoffanteilen zusammensetzt (Junginger HE, 1992). Die Vaseline besitzt eine hautschützende Wirkung, sie begünstigt wundheilende und regenerative Effekte bei geschädigter Haut. Das Eindringen von Vaseline in den intercorneocytären Hornschichtbereich reguliert den transepidermalen Wasserverlust (TEWL) (Ghadially et al., 1992).

Mikroemulsion

Bei der Anwendung einer Mikroemulsion wurde auf eine Standard-Mikroemulsion zurückgegriffen. Dabei wurde Tocopherolacetat in ein Gemisch aus Tagat[®] O2, Span[®] 20 (Sorbitanmonolaureat), Isopropylpalmitat und Wasser eingearbeitet.

Span[®] 20 (Sorbitanmonolaurat) – C₁₈H₃₄O₆, M_r ~ 346, ist ein Laurinsäureester des Sorbitane. Es handelt sich um eine rötlich-braune, viskose Flüssigkeit, die in Wasser dispergierbar, mischbar mit Alkoholen und löslich in Paraffin und Ethylacetat ist.

Tagat[®] O2 (Polyoxyethylenglycerolmonooleat), ein Polyoxyethylenglycerolfettsäureester, ist eine gelbe Flüssigkeit, die sich in Wasser und Alkohol gut löst. In Fetten und Paraffinöl ist der Emulgator unlöslich. Die Polyoxyglycerolfettsäureester sind gut haut- und schleimhautverträglich.

Isopropylpalmitat (Palmitinsäureisopropylester), C₁₉H₃₈O₂, M_r ~ 298,5, liegt als helle, dünnflüssige, ölige und praktisch geruchlose Substanz vor. Es ist unlöslich in Wasser und Glycerin. In pflanzlichen Fetten und Ölen ist Isopropylpalmitat klar löslich. Der Ester wird als Lösungsvermittler, Spreithilfsmittel und Penetrationsverbesserer eingesetzt. Er ist in der Lage durch Spreitung und auf Grund wirkender Kapillarkräfte in die Hornschicht zu penetrieren und dort die Löslichkeit für applizierbare Substanzen heraufzusetzen.

Mikroemulsion		m [g]
α-Tocopherolacetat	Ph. Eur.	1,00
Tagat [®] O2 / Span [®] 20 (2:3)		18,80
Isopropylpalmitat	Ph. Eur.	74,20
Wasser		6,00

Physiogel[®]

Bei dem verwendeten Physiogel[®] handelt es sich um eine gebrauchsfertige multilamelläre Creme der Firma Stiefel.

α-Tocopherolacetat-Physiogel[®]		m [g]
α -Tocopherolacetat	Ph. Eur.	1,00
Physiogel [®] Creme	Stiefel Laboratories Inc	99,00

Nanopartikel

Für die Versuche standen hochdruckhomogenisierte *solid lipid nanoparts* der Firma Lipoid GmbH Ludwigshafen zur Verfügung.

Zusammensetzung:	Hydriertes Lecithin	2,0 [g/100g]
	Cholesterin	3,5 [g/100g]
	Ceramid IIIB	0,4 [g/100g]
	Ceramid II	0,4 [g/100g]
	Ceramid VI	0,4 [g/100g]
	Palmitinsäure	0,6 [g/100g]
	Ölsäure	0,6 [g/100g]
	Vit. E-acetat	2,0 [g/100g]
	Vit.A-palmitat	4,0 [g/100g]

Physikalische und chemische Daten:

	Spezifikationen	Analytische Daten
Mittlere Teilchengröße	< 300 nm	199,5 nm
PH-Wert	6,0 \pm 1,5	6,8

O/W Emulsion + Nanopartikel		m [g]
Ceraspheres [®] -G 9505 *	Lipoid GmbH	50,00
Wasserhaltige Hydrophile Salbe	DAB 10	50,00

*Nanopartikelsuspension mit 2% α -Tocopherolacetat

W/O Emulsion + Nanopartikel		m [g]
Ceraspheres [®] -G 9505 *	Lipoid GmbH	50,00
Wasserhaltige Wollwachsalkoholsalbe	DAB 10	50,00

*Nanopartikelsuspension mit 2% α -Tocopherolacetat

Hyaluronidase

Das Enzym Hyaluronidase, im englischen auch als *spreading factor* bezeichnet, erhöht durch den Abbau von Proteoglykanen die Gewebedurchlässigkeit und wirkt so als Diffusionsfaktor. Die verwendete Hyaluronidase ist ein experimentelles Produkt der Abteilung für experimentelle Mikrobiologie der Friedrich-Schiller-Universität Jena. Die Synthese des Enzyms erfolgte bakteriell durch Streptokokken der Gruppe B. Die Einteilung der Streptokokken erfolgt nach der Lancefield-Gruppierung in serologische Gruppen A bis V. Danach wird nach dem Vorhandensein gruppenspezifischer Polysaccharid –Antigene in der Zellwand unterschieden. Die β -hämolyisierenden Streptokokken der Gruppe B zählen zu den humanpathogenen Keimen, und können Auslöser von Wund- und Harnwegsinfektionen, Meningitiden und Septikämien sein (Oethinger M, 1994). Zur Vermeidung von pathophysiologischen Reaktionen des Organismus wurde nach der Synthese das Enzym aufgearbeitet und gereinigt. Dadurch kann eine Infektion durch zurückgebliebene mikrobielle Begleitstoffe ausgeschlossen werden. Das verwendete Enzym kann wie folgt charakterisiert werden (Ozegowski et al., 2004):

Molekulargewicht	116000 D
Stabilitätsoptimum	pH-Wert = 7,0-7,5
Aufarbeitung	entpyrogenisiert, gebunden an Ovalbumin, lyophilisiert
Aussehen	weiß, flockiger Feststoff
Löslichkeitsverhalten	gut wasserlöslich

Von den 3 unter dem Begriff Hyaluronidasen zusammengefassten Hauptgruppen kam in der vorliegenden Arbeit die Hyaluronatlyase zum Einsatz. Dieses Enzym spaltet Hyaluronsäure an den β -(1-4)-Bindungen durch einen Eliminierungsmechanismus unter Bildung einer Doppelbindung in (4-5)-Stellung an der Glucuronsäure. Hyaluronatlyasen besitzen eine hohe Spezifität gegenüber Hyaluronsäure. Andere Glycosaminoglycane werden in der Regel nur in

vernachlässigbarem Ausmaß gespalten. Hyaluronatlyasen können in Endo- und Exostellung spalten (Ozegowski et al., 2004).

Die Aktivitäten der vorhandenen Hyaluronidase lagen bei 50.000IE/mg. Im Vergleich zu kommerziell erhältlichen Hyaluronidase aus Rindertestes stellt diese Konzentration eine Erhöhung um mehr als das Fünfzigfache dar. Für die Untersuchung zur modulierenden Wirkung der Hyaluronidase auf die Penetration von α -Tocopherolacetat wurde das Enzym in einer Aktivität von 10000 IE/ cm² Applikationsfläche in die Vehikel eingearbeitet.

W/O Emulsion + Hyaluronidase		m [g]
α -Tocopherolacetat	Ph. Eur.	1,00
Hyaluronidase 50000 IE / mg *	FSU Jena	6,30
Wasserhaltige Wollwachsalkoholsalbe	DAB 10	99,00

* Die eingesetzte Menge an Hyaluronidase entspricht einer Aktivität von 10000 IE/ cm² Applikationsfläche.

Hydrogel

Das verwendete Hydrogel wurde durch Herrn Dr. Ch. Huschka, esparma GmbH Osterweddingen, bereitgestellt.

Hydrogel		m [g]
α -Tocopherolacetat	Ph .Eur.	1,00
Propylenglykol	Ph. Eur.	5,00
Natriumcarboxymethylcellulose	Ph. Eur.	10,00
Wasser		84,00

2.4 Versuchsdurchführung

Die FRANZ'sche Diffusionszelle wurde ca. 30 min vor Penetrationsbeginn mit dem Akzeptormedium physiologische Kochsalzlösung gefüllt und auf 34 ° C temperiert. Zur Untersuchung kamen 6 Vehikelsysteme und deren Kombinationen (O/W-Emulsion, W/O-Emulsion, Microemulsion, Hydrogel , Nanopartikel, O/W-Emulsion mit Nanopartikeln, O/W-Emulsion mit Hyaluronidase, W/O-Emulsion mit Nanopartikeln und W/O-Emulsion mit Hyaluronidase), welche mit 0,6 % ¹⁴ C markiertem (+) - α -Tocopherolacetat versetzt wurden.

Vor der Applikation wurde auf eine homogene Vermischung mit der unmarkierten Zubereitung sowie auf das vollständige Verdunsten des Lösungsmittels geachtet. Auf die vorbereitete Mamma-Haut wurden 20 mg Vitamin E-Vehikel-Zubereitung homogen appliziert. Nach der Vehikelapplikation wurde das Untersuchungsmaterial auf einer Gaze in der FRANZ'schen-Diffusionszelle fixiert.

Gemessen wurde nach den Zeiten 30 und 300 min. Nach Ablauf der Versuchzeiten wurde die Haut der Diffusionszelle entnommen. Mit einem Watteträger wurde nun der Rückstand von der Hautoberfläche entfernt und vermessen. Zur weiteren Untersuchung wurde das Präparat auf einer mit Aluminiumfolie bespannten Polystyrolunterlage am Rand mit Stecknadeln fixiert. Mit einer Schablone ($\varnothing = 16$ mm) konnte durch 20 Tesa®-Film-Abrisse das gesamte Stratum corneum auf dieser Fläche entfernt werden, dabei wurden je 2 Abrisse gepoolt und vermessen. Aus der verbliebenen Haut wurden 3 Stanzbiopsien ($\varnothing = 6$ mm) entnommen und am Gefriermikrotom aufgefroren. Danach erfolgte die Anfertigung von Horizontalschnitten (10 Schnitte 20 μm Dicke, 15 Schnitte 80 μm Dicke). Zur quantitativen Analyse wurden die Abrisse und Gefrierschnitte mit Methanol und Szintillator [4 g PPO (2,5-Diphenyloxazol) + 0,1 g POPOP (1,4- bis 2-5-Phenyloxazolylt)] versetzt. Die Epidermis- und Dermischnitte sowie die Stanzenreste mussten vor der Vermessung zur vollständigen Gewebezersetzung mit 100 μl Soluene® behandelt und ca. 12 h inkubiert werden. Die quantitative Vermessung der Proben erfolgte im Flüssigkeitsszintillationszähler unter Doppelbestimmung eines Leerwertes.

2.4.1 Berechnung der gemessenen Werte

Der Flüssigkeitsszintillationszähler detektiert Impulse pro Minute, die nach gerätinternen Berechnungen in Absolutwerten pro Minute pro Fläche (dpm/F) ausgegeben werden. Bei bekannter Hautfläche F in cm^2 , applizierter Menge und Dosis pro Flächenmaß $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, $\mu\text{Ci}/\text{cm}^2$ des markierten α -Tocopherolacetates kommt man nach entsprechenden Umrechnungsschritten zum Ergebnis in nmol/mm^3 . Die errechneten Werte wurden dann statistisch bearbeitet (Mittelwert und Standardabweichung) und graphisch dargestellt Ergebnisse siehe unter Kap. 3).

2.5 Offene Pilotstudie zur Rückstandsanalyse von α -Tocopherolacetat und Tocopherol nach topischer Applikation bei gesunden Probanden

2.5.1 Modellbeschreibung und Versuchsbedingungen

Ziel dieser offenen Pilotstudie war es, die Konzentration an topisch applizierten α -TPA im Stratum corneum nach einer Applikationszeit von 30 und 300 min unter in vivo-Bedingungen zu bestimmen. Dabei wurden die penetrierten und die nicht penetrierten Anteile von α -TPA erfasst. Durch Eluation mit einem lipophilen Lösungsmittel wurden die lipophilen Substanzen aus dem Stratum corneum herausgelöst und mittels HPLC elektrochemisch vermessen.

Zur Durchführung der Studie wurden 12 Probanden rekrutiert, welche die Einschlusskriterien erfüllten. Diese Studie wurde von der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Martin-Luther-Universität genehmigt. Die Leitung der Studie übernahm PD Dr. med. J. Wohlrab.

Einschlusskriterien:

- freiwillige Teilnahme
- volljährige Probanden
- keine systemische Arzneimitteltherapie innerhalb 8 Wochen vor Studienbeginn (orale Kontrazeptiva ausgenommen)
- keine topische Therapie innerhalb 8 Wochen vor Studienbeginn
- keine topische Applikation von Kosmetika und/oder Pflegemitteln 4 Wochen vor Beginn der Studie im Bereich der oberen Extremitäten
- Vorliegen der schriftlichen Einverständniserklärung zur Teilnahme an der Studie, nach eingehender Aufklärung über Wesen, Risiken und Tragweite der klinischen Studie

Ausschlusskriterien:

- Vorliegen einer chronisch entzündlichen oder die Barrierefunktion des Hautorgans beeinflussenden Haut- oder Systemerkrankung
- Probanden mit Unverträglichkeit und/ oder Überempfindlichkeit gegen eine der folgenden Substanzen: - α -Tocopherolacetat
 - α -Tocopherol
 - weitere Inhaltsstoffe der Prüfpräparate
- Probanden, die an einer der folgenden Erkrankungen leiden:
 - atopische Diathese

-
- Immunsuppression
 - Transplantatträger (außer Autotransplantate)
 - Probanden, die vor weniger als 8 Wochen vor Testbeginn mit systemischen Arzneimitteln behandelt worden sind (ausgenommen orale Kontrazeptiva)
 - Probanden, die vor weniger als 8 Wochen vor Testbeginn mit topischen Arzneimitteln behandelt worden sind
 - Schwangere oder Stillende
 - Unzuverlässigkeit oder mangelnde Kooperativität des Probanden

In das verwendete Vehikelsystem Physiogel®-Creme wurde 1% Tocopherolacetat eingearbeitet. Auf die Außenseite beider Unterarme der Probanden wurden 4 Quadrate (5x5 cm) gezeichnet, wobei 3 Felder für die Prüfpräparate und ein Feld für einen Leerwert vorgesehen waren. Anschließend wurden ca. 100 mg jedes Präparates mittels Spatel gleichmäßig in den Prüfarealen aufgetragen.

Nach Ablauf der Einwirkzeiten 30 und 300 min wurde der nicht penetrierte Anteil mit einem Wattetupfer entfernt und dieser in 4 ml 96%igem Ethanol aufbewahrt. Ein gleichzeitig durchgeführter klinischer Score diente zu Verträglichkeitsbeurteilung. Der Eluationsring (\varnothing 2,8 cm) wurde zentral in dem Prüfarealen platziert und durch 5 minütiges Einwirken von 5 ml eines lipophilen Lösungsmittels (n-Hexan/Ethanol-Gemisch 1:1) der penetrierte Anteil aus dem Stratum corneum herausgelöst. Das Eluat wurde abpipettiert und in die dafür vorgesehenen Gefäße gegeben.

2.5.2 Tocopherol-Analytik mittels HPLC

Die Analyse des Eluates erfolgte mittels HPLC und UV-Detektion für die Bestimmung von Tocopherolacetat und Tocopherol. Anschließend wurde eine Eichreihe von Tocopherol in ansteigender Konzentration erstellt. An Hand dieser Eichreihe konnten die Rohdaten berechnet und graphisch dargestellt werden. Die Analytik wurde von PD Dr. rer. nat. H.-H. Rüttinger vom Fachbereich Pharmazie des Instituts für Pharmazeutische Chemie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg durchgeführt.

2.5.3 Statistische Auswertung

Die statistische Prüfung erfolgte mit der Software ORIGIN 5.0 und STATISTICA für Windows. Unterschiede wurden als statistisch signifikant bewertet, wenn die Irrtumswahrscheinlichkeit $p \leq 0,05$ betrug (Weber E, 1980).

Penetration in humane Haut ex vivo

Die Ergebnisse der Penetrationsstudien sind in Kap. 3.2 dargestellt. Die entsprechenden statistischen Kenngrößen entstammen den Rohdaten von je 3 Hautproben mit Dreifachbestimmungen, die in Tabellen aufgenommen, einer statistischen Prüfung unterzogen und in graphischer Form dargestellt wurden. Die Prüfung auf signifikante Unterschiede wurde mit dem Kruskal-Wallis- und dem Student-Newman-Keuls-Test durchgeführt. Die Ergebnisse resultieren aus Mittelwerten der Dreifachbestimmungen, die in Form von Scatter-Line und Box (SEM) und Whisker (SD) Plots graphisch dargestellt wurden.

Penetration in humane Haut in vivo

Die statistischen Berechnungen und graphischen Darstellungen der Daten der in vivo-Penetrationsuntersuchungen erfolgte mit der Software EXEL 97. Dabei wurden die entsprechenden Rohdaten tabelliert und berechnet. Die Ergebnisse wurden graphisch als Tortendiagramme dargestellt.

3 Ergebnisse

3.1 Penetration von α -Tocopherolacetat in humane Haut

Die Penetration von α -TPA in die einzelnen Schichten der Haut interessierte unter zwei unterschiedlichen Gesichtspunkten. Zunächst wurde die Abhängigkeit der α -TPA-Penetration vom eingesetzten Vehikel untersucht. Dazu wurde jeweils 1% α -TPA neben den beiden Standardvehikeln W/O- und O/W-Emulsion in eine Mikroemulsion, ein Hydrogel und ein Physiogel[®] eingearbeitet (vgl. Seite 17 bis 18). Weiterhin wurde der Einfluß von ausgewählten Penetrationsmodulatoren auf die α -TPA-Penetration bestimmt.

3.1.1 Vehikelabhängige Konzentrationsverteilung von α -Tocopherolacetat in den Schichten der menschlichen Haut

Vergleich von W/O-Emulsion und O/W-Emulsion als Vehikel

Die Penetrationsprofile von α -TPA nach Applikation der beiden tocopherolhaltigen Basisvehikel W/O-Emulsion und O/W-Emulsion in den Schichten der menschlichen Haut sind in den Abbildungen 2a und b für das Stratum corneum, und 3a und b für die darunter liegenden Hautschichten dargestellt. Dabei wurde die detektierte Anzahl der zerfallenden Teilchen pro Minute pro Fläche [dpm/cm²] in Abhängigkeit von der Hauttiefe in [μ m] dargestellt.

Daraus lässt sich eine stetige Abnahme der Wirkstoffkonzentration mit zunehmender Hauttiefe in allen Hautschichten ablesen. Betrachtet man zunächst die beiden Vehikel nach 30 min, so kann man im Stratum corneum ein nahezu identisches Verteilungsprofil des α -TPA erkennen. Diese nahezu identischen Verteilungsprofile spiegeln sich auch in der Berechnung der nach 30 min penetrierten α -TPA-Gesamtmenge in die Hornschicht wieder (Abb. 2c)

Nach prolongierter Anwendung vom 300 min werden die Unterschiede hinsichtlich der eingesetzten Vehikel bereits im Stratum corneum (Abb. 2b) deutlich, die sowohl in den Konzentrationsprofilen, als auch der erreichten Wirkstoffkonzentration (Abb. 2c) nachweisbar sind.

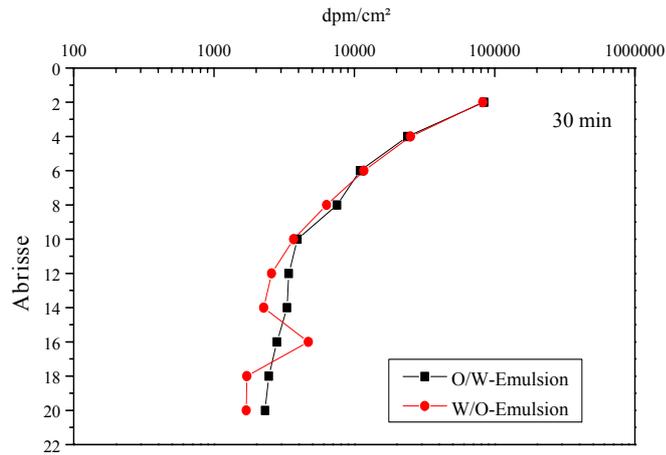


Abb. 2a

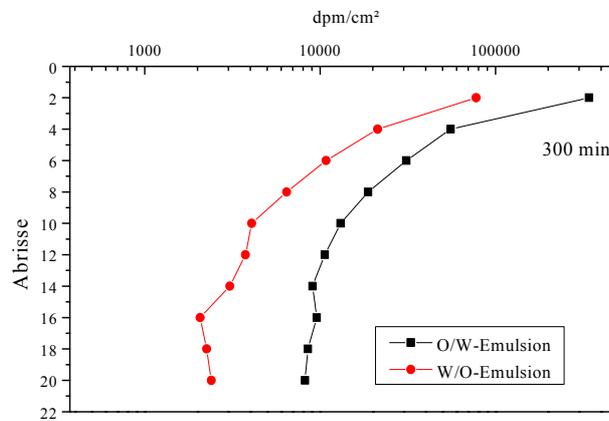


Abb. 2b

Abb. 2: Konzentrationsprofile von α -TPA im Stratum corneum humaner Haut nach Applikation einer 1%-igen Präparation in W/O- und O/W-Emulsion als Vehikel
 a) Applikationszeit: 30 min
 b) Applikationszeit: 300 min

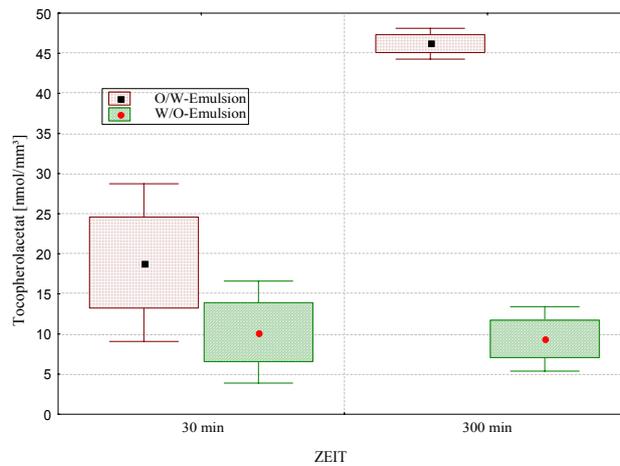


Abb. 2c: Konzentration von α -TPA im Stratum corneum humaner Haut, Applikationszeit: 30 und 300 min, Vehikel: W/O- und O/W-Emulsion, Tocopherolkonzentration im Vehikel 1%

Diese Unterschiede im Penetrationsablauf von α -TPA nach Applikation in O/W- bzw. W/O-Emulsion lassen sich auch nach Auswertung der Befunde in den tieferen Hautschichten der lebenden Epidermis und Dermis nachweisen (Abb. 3 und 4). So wurde nach einer Applikationszeit von 30 min für beide Emulsionstypen ein steiler Konzentrationsgradient von α -TPA gemessen (Abb. 3a), dem in der Epidermis eine deutlich höhere α -TPA-Konzentration nach Anwendung einer O/W-Emulsion als Vehikel entspricht (Abb. 4a). Für die tieferen Hautschichten der Dermis fallen diese Unterschiede wesentlich geringer aus. Nach einer Penetrationszeit von 300 min sind für die penetrierten α -TPA-Konzentrationen in der lebenden Epidermis und Dermis nicht nur deutliche Unterschiede für die eingesetzten Emulsionstypen nachzuweisen, nach dieser prolongierten Penetrationszeit werden mit einer W/O-Emulsion als Vehikel höhere epidermale und dermale α -TPA-Konzentrationen erreicht (Abb. 4a und 4b).

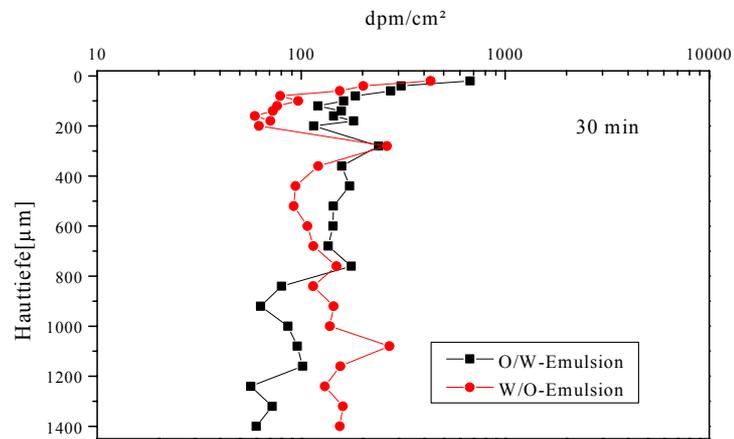


Abb.3a

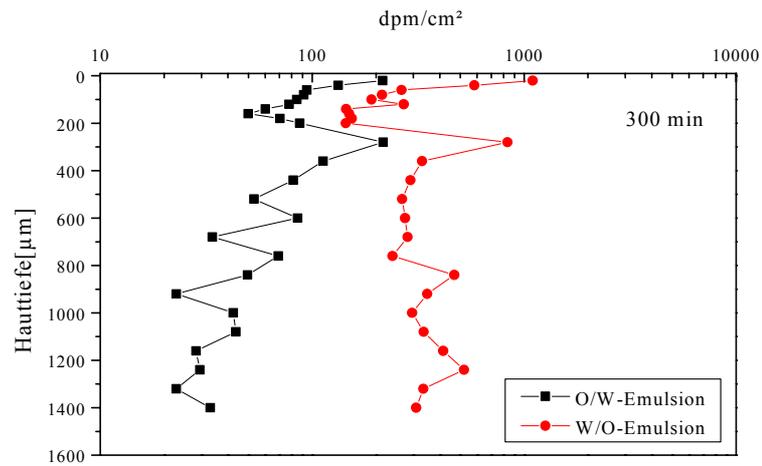


Abb. 3b

Abb. 3: Konzentrationsprofile von α -TPA in der Epidermis und Dermis humaner Haut nach Applikation einer 1%-igen Präparation in W/O- und O/W-Emulsion als Vehikel

- a) Applikationszeit: 30 min
- b) Applikationszeit: 300 min

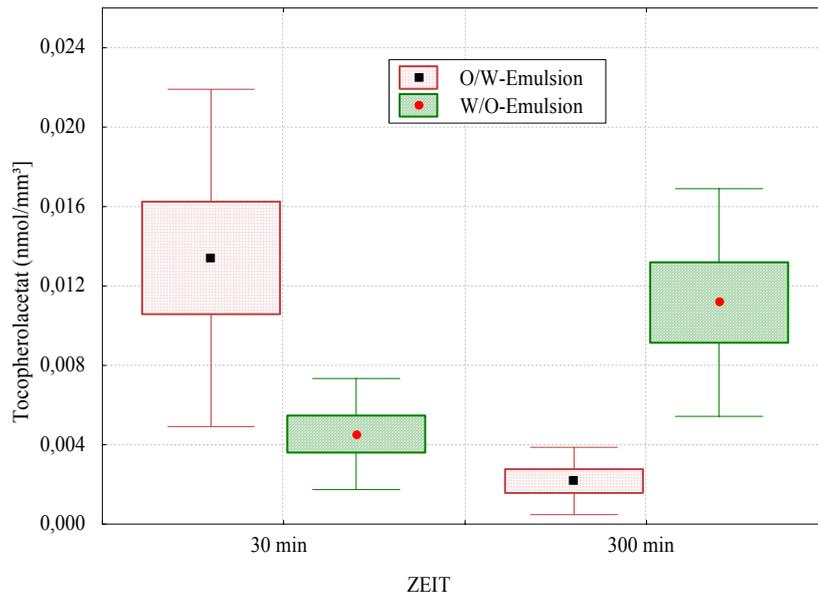


Abb. 4a

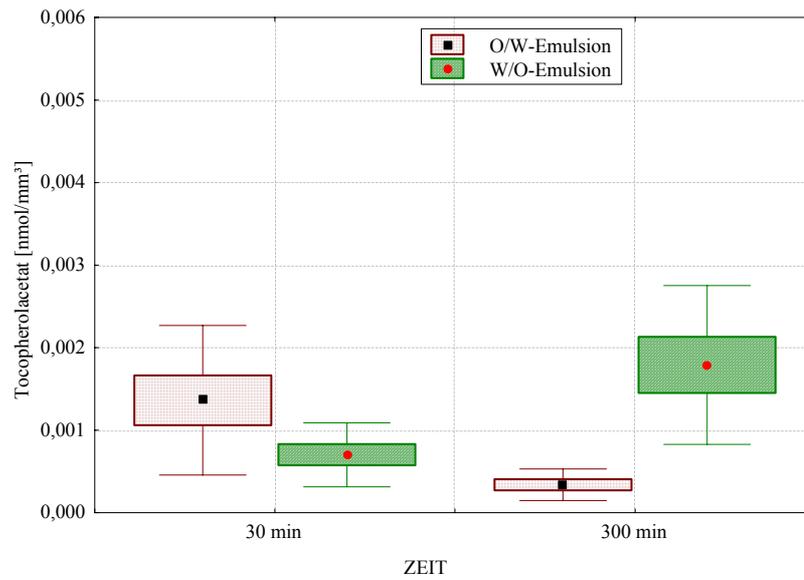


Abb. 4b

Abb. 4: Konzentration von α -TPA in der Epidermis und Dermis humaner Haut, Applikationszeit: 30 und 300 min, Vehikel: W/O- und O/W-Emulsion Tocopherolkonzentration im Vehikel 1%

- a) lebende Epidermis
- b) Dermis

Vergleich von O/W-Emulsion und Mikroemulsion als Vehikel

Beim Vergleich der Penetrationsprofile für α -TPA aus einer O/W-Emulsion und einer Mikroemulsion lässt sich eine stetige Konzentrationsabnahme des eingesetzten α -TPA mit zunehmender Hauttiefe für beide Vehikel erkennen (Abb. 5a und 5b). Dabei ist die Konzentration des im Stratum corneum wiedergefundenen α -TPA bei der Standardemulsion sowohl im Kurzzeit- als auch im Langzeitversuch höher.

Betrachtet man die Penetrationsprofile von α -TPA in der lebenden Epidermis und Dermis (Abb. 6a und 6b), so ist in diesen Hautschichten ein wesentlich steilerer Konzentrationsgradient für α -TPA im Vergleich zum Stratum corneum erkennbar. In der lebenden Epidermis wird eine höhere Wirkstoffkonzentration mit dem Standardvehikel erreicht (Abb. 5a), die nach einer Applikationszeit von 30 min in der Dermis nicht mehr so deutlich in Erscheinung tritt. Nach 300 minütiger Applikationszeit wird eine höhere α -TPA-Konzentration mit der Mikroemulsion als Vehikel erreicht (Abb. 7).

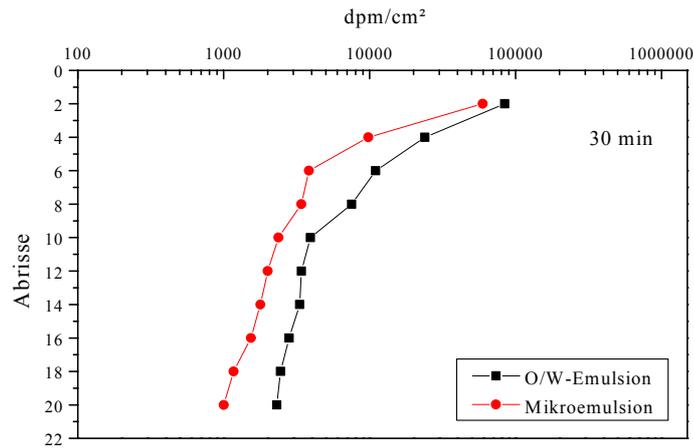


Abb. 5a

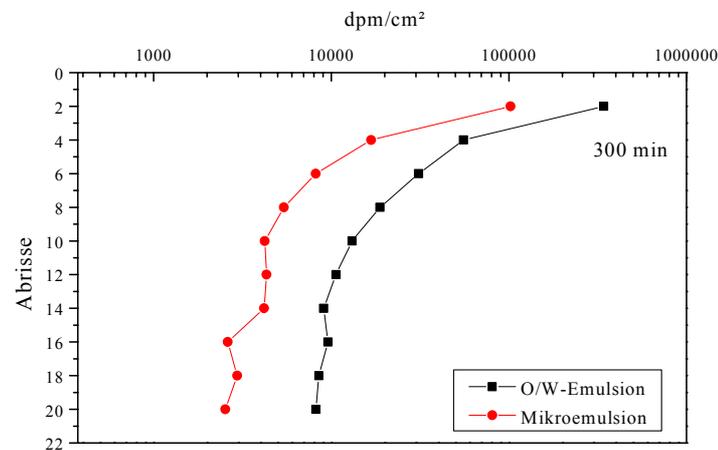


Abb. 5b

Abb. 5: Konzentrationsprofile von α -TPA im Stratum corneum humaner Haut nach Applikation einer 1%-igen Präparation in O/W-Emulsion und Mikroemulsion als Vehikel
 a) Applikationszeit: 30 min
 b) Applikationszeit: 300 min

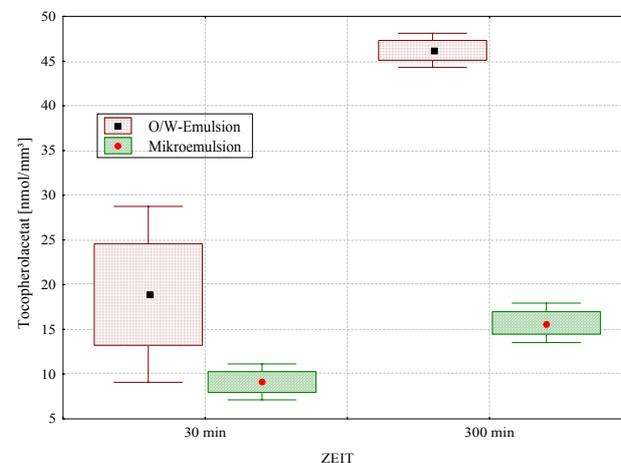


Abb. 5c: Konzentration von α -TPA im Stratum corneum humaner Haut, Applikationszeit: 30 und 300 min, Vehikel: Mikroemulsion und O/W-Emulsion, Tocopherolkonzentration im Vehikel 1%

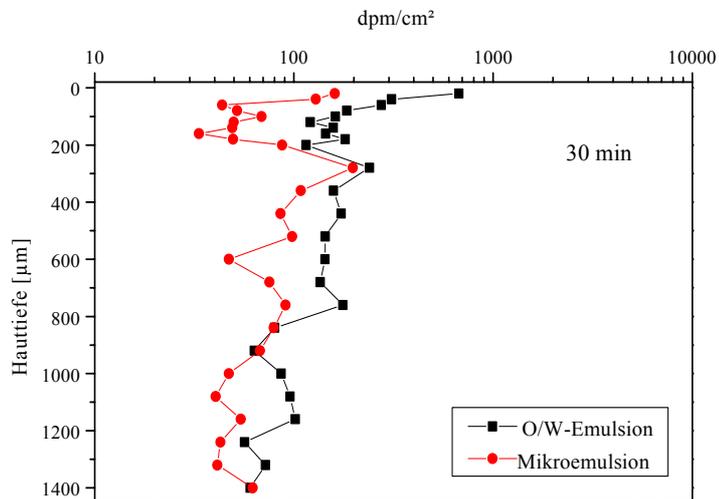


Abb. 6a

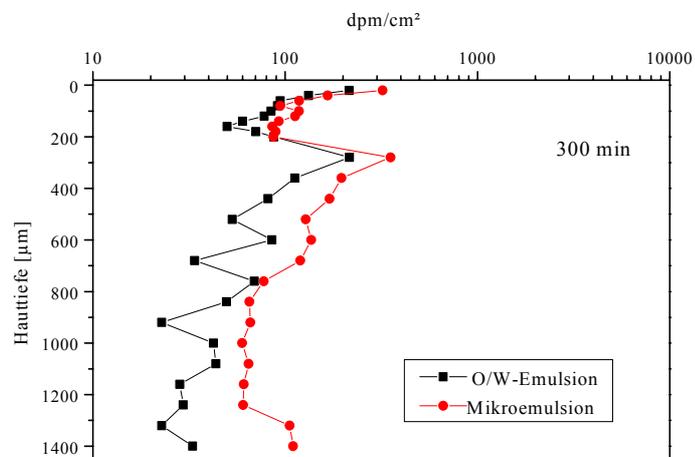


Abb. 6b

Abb. 6: Konzentrationsprofile von α -TPA in der Epidermis und Dermis humaner Haut nach Applikation einer 1%-igen Präparation in O/W-Emulsion und Mikroemulsion als Vehikel

- a) Applikationszeit: 30 min
b) Applikationszeit: 300 min

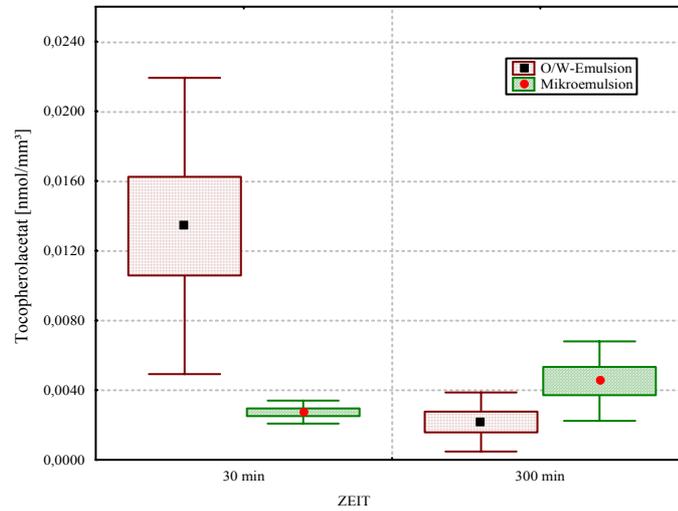


Abb. 7a

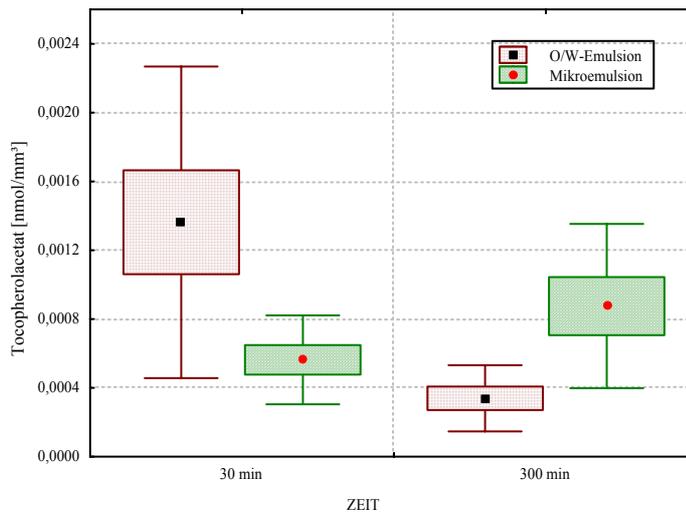


Abb. 7b

Abb. 7: Konzentration von α -TPA in der Epidermis und Dermis humaner Haut, Applikationszeit: 30 und 300 min, Vehikel: O/W-Emulsion und Mikroemulsion, Tocopherolkonzentration im Vehikel 1%

- a) lebende Epidermis
- b) Dermis

*Vergleich von O/W-Emulsion und Hydrogel**(Natriumcarboxymethylcellulose+Propylenglycol)*

In den Abb. 8a und b sind die Konzentrationsprofile des α -TPA aus dem Hydrogel und der O/W-Standardemulsion als Vehikel im Vergleich dargestellt. Das Penetrationsverhalten des α -TPA in Hydrogel ähnelt dem bei Anwendung des Standardvehikels. Im Penetrationsprofil ist eine gleichmäßig abnehmende Konzentration des α -TPA innerhalb des Stratum corneum zu erkennen. Dabei wurde nach Kurzeiteinwirkung im Stratum corneum eine höhere α -TPA-Konzentration mit dem Hydrogel als Vehikel detektiert. Nach 300 min lassen sich keine relevanten Konzentrationsunterschiede zwischen beiden Vehikeln feststellen (Abb. 8b und 8c).

Sowohl nach Kurzzeitapplikation als auch nach prolongierter Einwirkungsdauer von 300 min ist in der lebenden Epidermis und Dermis für beide Vehikel ein steiler, deutlich unterschiedlicher Konzentrationsgradient nachweisbar (Abb. 9). Hinsichtlich der penetrierten Wirkstoffkonzentration lassen sich im Kurzzeitversuch sowohl in der Epidermis als auch in der Dermis signifikante Unterschiede entsprechend der eingesetzten Vehikel nachweisen (Abb. 10). Dabei wurde mit dem Vehikel Hydrogel eine höhere α -TPA-Konzentration erreicht. Betrachtet man die Wirkstoffkonzentration in den Hautschichten nach 300 min, so lassen sich ebenfalls deutliche Effekte zwischen den applizierten Vehikeln feststellen.

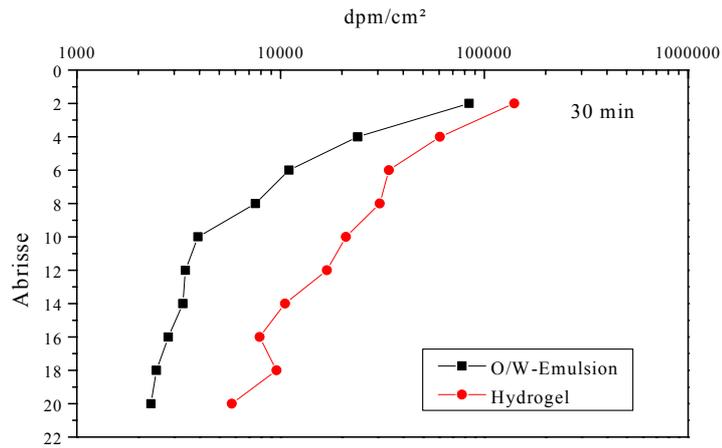


Abb. 8a

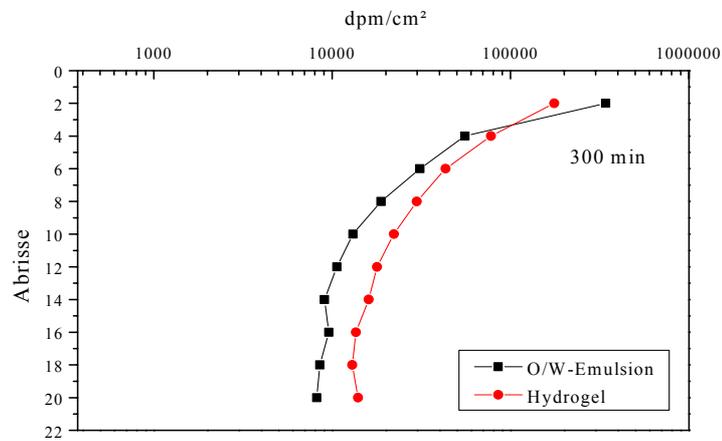


Abb. 8b

Abb. 8: Konzentrationsprofile von α -TPA im Stratum corneum humaner Haut nach Applikation einer 1%-igen Präparation in O/W-Emulsion und Hydrogel als Vehikel
 a) Applikationszeit: 30 min
 b) Applikationszeit: 300 min

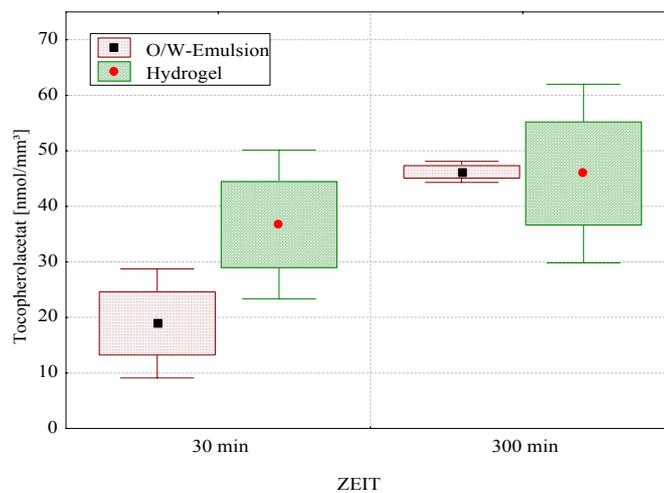


Abb. 8c: Konzentration von α -TPA im Stratum corneum humaner Haut, Applikationszeit: 30 und 300 min, Vehikel:Hydrogel und O/W-Emulsion, Tocopherolkonzentration im Vehikel 1%

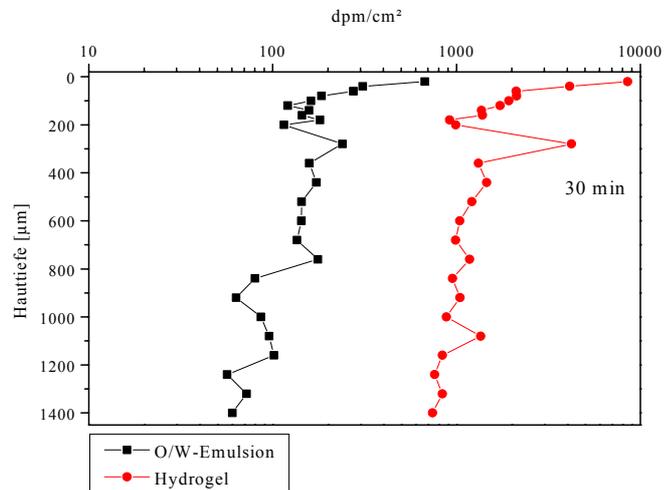


Abb. 9a

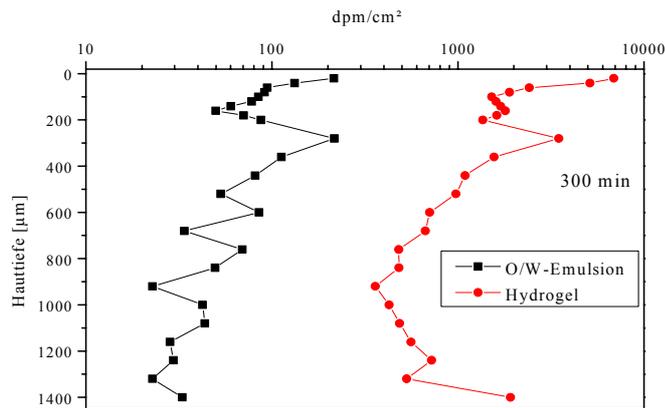


Abb. 9b

Abb. 9: Konzentrationsprofile von α -TPA in der Epidermis und Dermis humaner Haut nach Applikation einer 1%-igen Präparation in O/W-Emulsion und Hydrogel als Vehikel

- a) Applikationszeit: 30 min
- b) Applikationszeit: 300 min

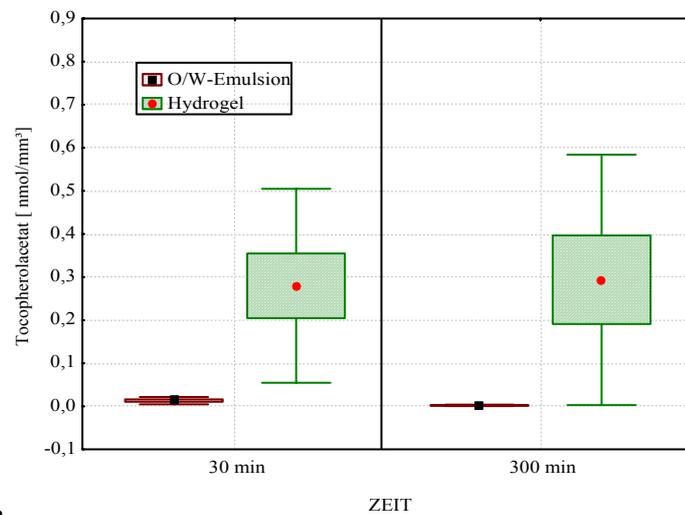


Abb. 10a

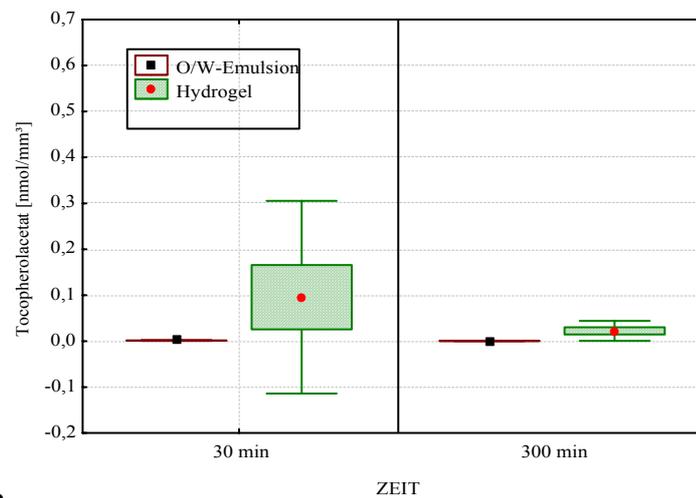


Abb. 10b

Abb. 10: Konzentrationen von α -TPA in der Epidermis und Dermis humaner Haut, Applikationszeit: 30 und 300 min, Vehikel: O/W-Emulsion und Hydrogel, Tocopherolkonzentration im Vehikel 1%

- a) lebende Epidermis
- b) Dermis

Vergleich von O/W-Emulsion und Physiogel® als Vehikel

In den Abb. 11a und 11b werden die Penetrationsprofile des α -TPA im Stratum corneum im Vergleich Physiogel® zu Standardemulsion als Vehikel dargestellt. Dabei sind weder nach Kurzzeitanwendung noch nach 300 min Einwirkungszeit wesentliche Unterschiede erkennbar. Das betrifft auch die in das Stratum corneum penetrierte α -TPA-Gesamtmenge aus beiden Vehikeln (Abb. 11c).

Dagegen sind in den tieferen Hautschichten der Epidermis und Dermis deutliche Unterschiede in der α -TPA-Penetration bei Verwendung dieser Vehikel nachweisbar. So zeigen die Penetrationsprofile neben einem steilen Konzentrationsgradienten große Unterschiede in der penetrierten Wirkstoffkonzentration, wobei unabhängig von der Einwirkungszeit für Physiogel® als Vehikel höhere Werte gemessen wurden (Abb. 12). Das spiegelt sich auch sehr deutlich in den errechneten penetrierten α -TPA-Konzentrationen in der Epidermis und Dermis nach 30 und 300 min Einwirkungszeit wieder (Abb. 13).

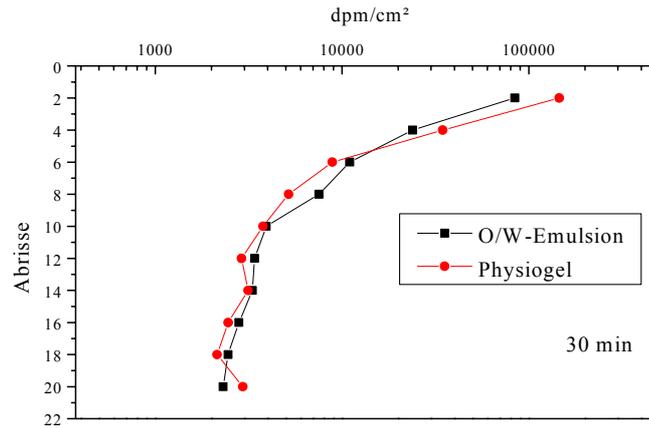


Abb. 11a

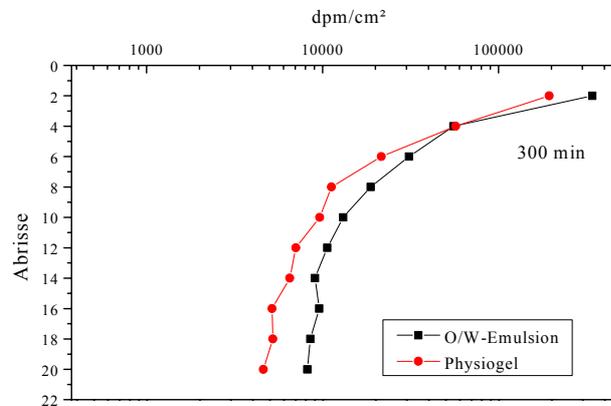


Abb. 11b

Abb. 11: Konzentrationsprofile von α -TPA im Stratum corneum humaner Haut nach Applikation einer 1%-igen Präparation in Physiogel[®] und O/W-Emulsion als Vehikel

- a) Applikationszeit: 30 min
- b) Applikationszeit: 300 min

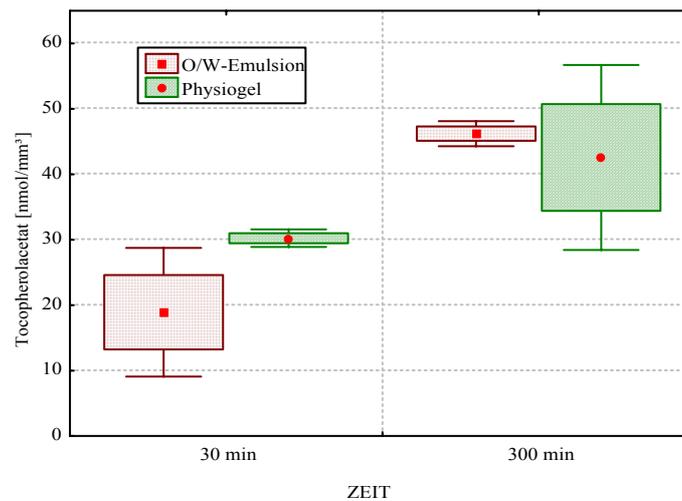


Abb. 11c: Konzentration von α -TPA im Stratum corneum humaner Haut, Applikationszeit: 30 und 300 min, Vehikel: O/W-Emulsion und Physiogel[®], Tocopherolkonzentration im Vehikel 1%

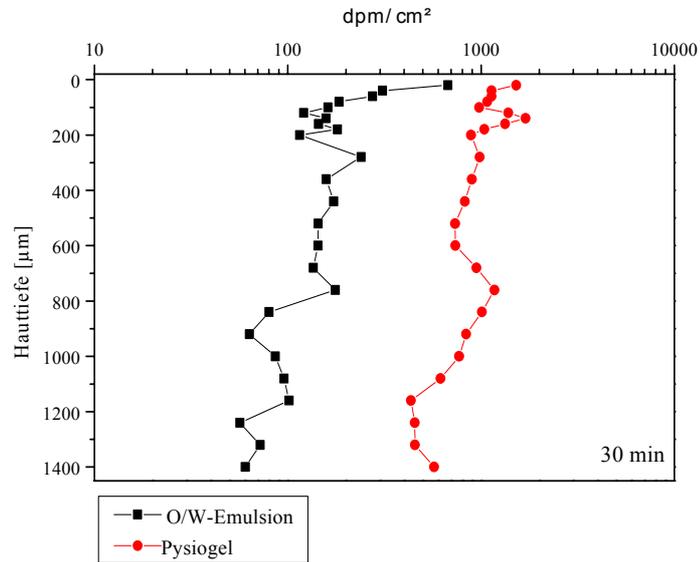


Abb. 12a

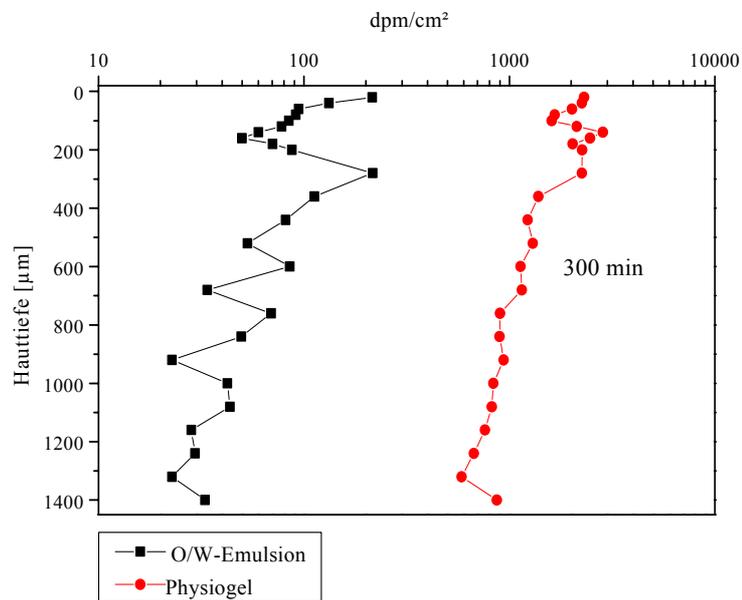


Abb. 12b

Abb. 12: Konzentrationsprofile von α -TPA in der Epidermis und Dermis humaner Haut nach Applikation einer 1%-igen Präparation in O/W-Emulsion und Physiogel[®] als Vehikel

a) Applikationszeit: 30 min

b) Applikationszeit: 300 min

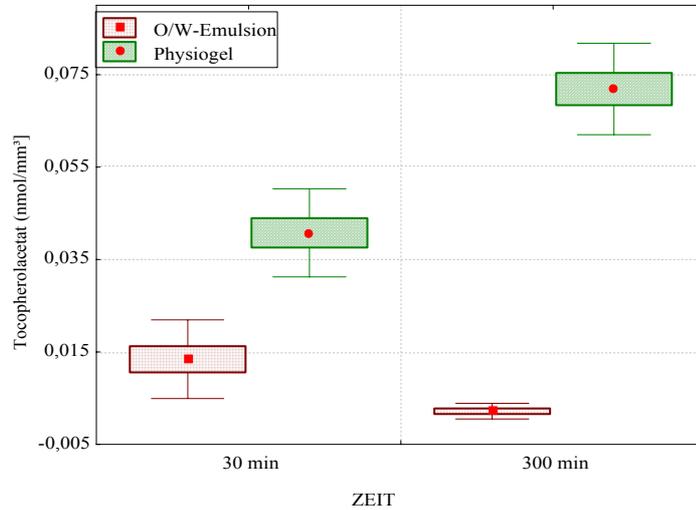


Abb. 13a

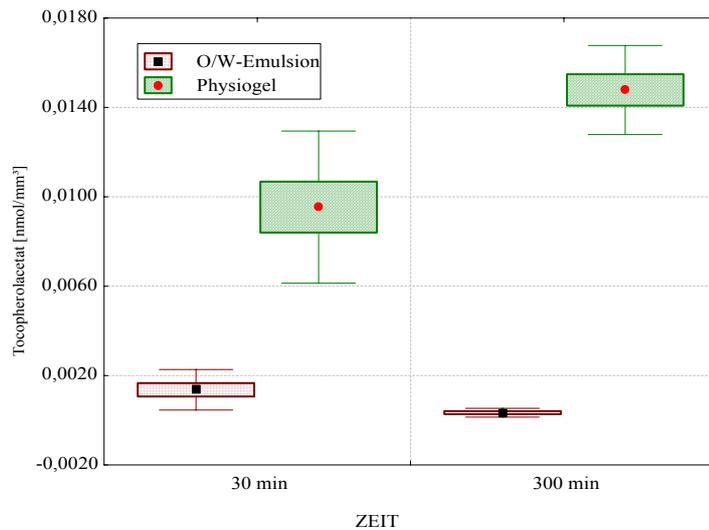


Abb. 13b

Abb. 13: Konzentrationen von α -TPA in der Epidermis und Dermis humaner Haut, Vehikel: Physiogel[®] und O/W-Emulsion und, Applikationszeit: 30 und 300 min, Tocopherolkonzentration im Vehikel 1%

- a) lebende Epidermis
- b) Dermis

3.1.2 Vehikelabhängige Konzentrationsverteilung von α -Tocopherolacetat in den Schichten der menschlichen Haut unter Einfluß von Penetrationsmodulatoren

Nach dem Vergleich der α -TPA-Penetration unter Anwendung verschiedener kolloidaler Trägersysteme und von Standardvehikeln wurde der Einfluß von potentiellen Penetrationsmodulatoren auf die α -TPA-Penetration untersucht. Als Modulatoren wurden Nanopartikel und eine mikrobielle Hyaluronidase (E.C. 4.2.2.1) in die O/W- und W/O-Standardvehikel eingearbeitet.

Vergleich von W/O-Emulsion und W/O-Emulsion +Nanopartikeln als Vehikel

Im Stratum corneum zeigen die gemessenen Konzentrationsprofile sowohl nach 30 min als auch nach 300 min Einwirkzeit eine stetige Abnahme der α -TPA –Konzentration (Abb. 14a und 14b). Dabei konnte weder im Konzentrationsprofil noch in der penetrierten α -TPA-Menge in die Hornschicht ein Einfluß von Nanopartikeln bei Verwendung einer W/O-Emulsion als Vehikel gefunden werden (Abb. 14c).

Im Wesentlichen gilt diese Aussage auch für die tieferen Hautschichten, für die lebenden Epidermisteile und für die Dermis (Abb. 15 und 16). Es konnte durch den Zusatz von Nanopartikeln die α -TPA-Penetration bei Verwendung einer W/O-Emulsion als Vehikel nicht beeinflusst werden.

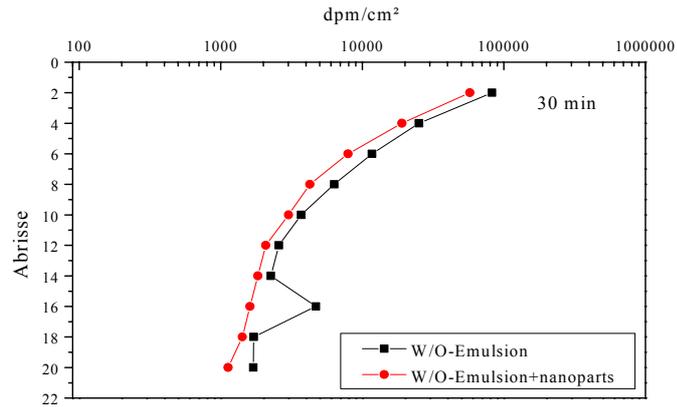


Abb. 14a

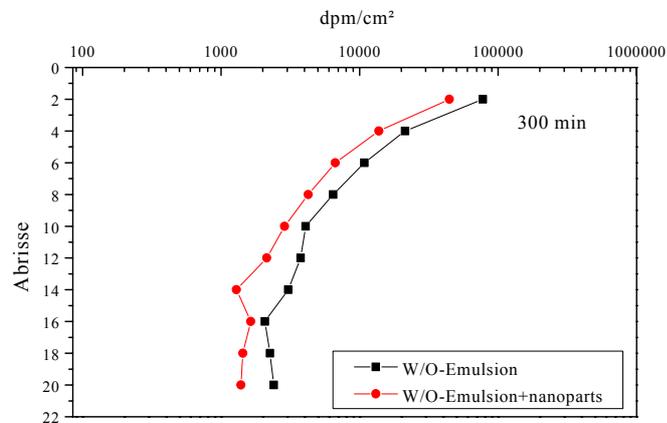


Abb. 14b

Abb. 14: Konzentrationsprofile von α -TPA im Stratum corneum humaner Haut nach Applikation einer 1%-igen Präparation in O/W-Emulsion und O/W-Emulsion+Nanoparts als Vehikel
 a) Applikationszeit: 30 min
 b) Applikationszeit: 300 min

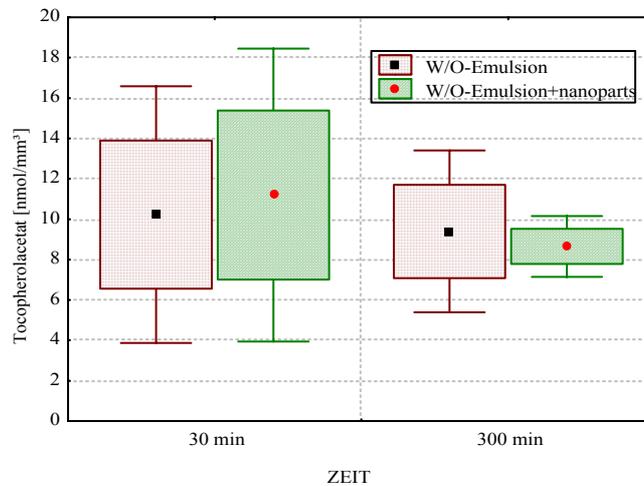


Abb. 14c: Konzentration von α -TPA im Stratum corneum humaner Haut, Applikationszeit: 30 und 300 min, Vehikel:W/O-Emulsion und W/O-Emulsion+Nanoparts, Tocopherolkonzentration im Vehikel 1%

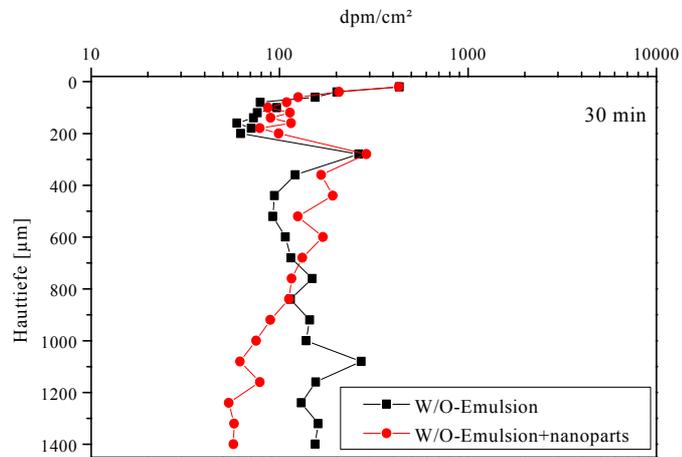


Abb. 15a

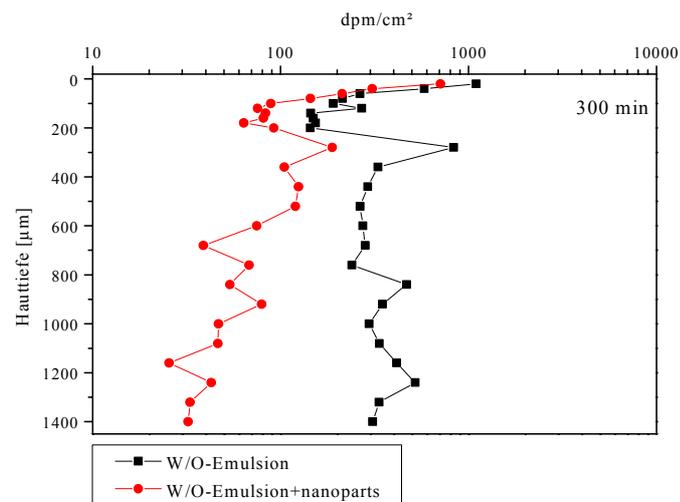


Abb. 15b

Abb. 15: Konzentrationsprofile von α -TPA in der Epidermis und Dermis humaner Haut nach Applikation einer 1%-igen Präparation in W/O-Emulsion und W/O-Emulsion + Nanoparts als Vehikel

a) Applikationszeit 30 min
b) Applikationszeit 300 min

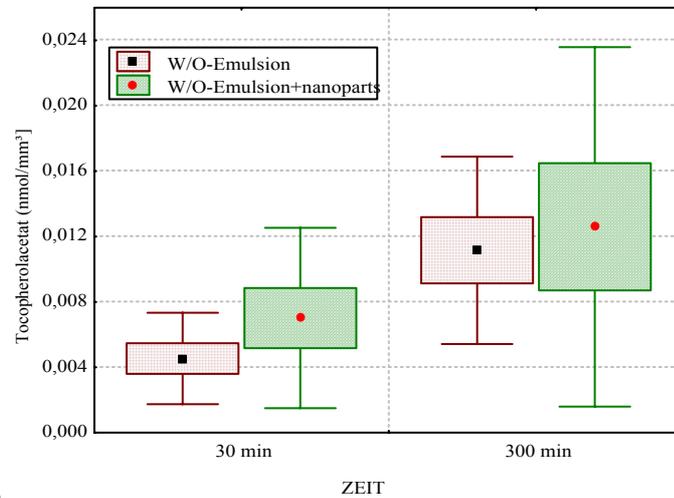


Abb. 16a

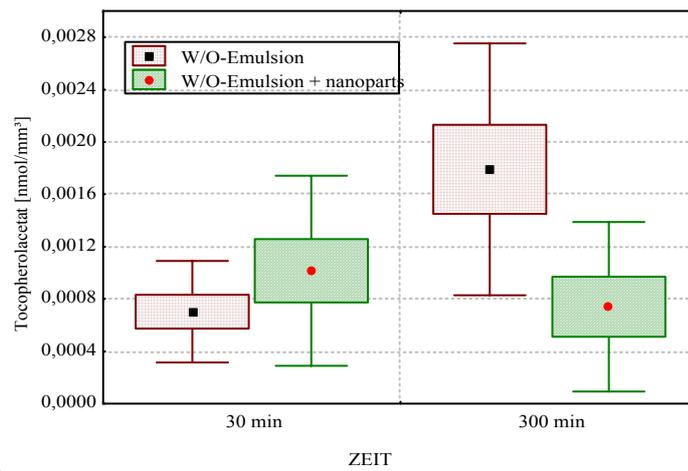


Abb. 16b

Abb. 16: Konzentrationen von α -TPA in der Epidermis und Dermis humaner Haut, Applikationszeit: 30 und 300 min, Vehikel: W/O- und W/O-Emulsion+Nanoparts, Tocopherolkonzentration im Vehikel 1%

a) lebende Epidermis
b) Dermis

Vergleich von W/O-Emulsion und W/O-Emulsion+Hyaluronidase

Aus der Profildarstellung für die Verteilung des α -TPA nach Applikation in einer W/O-Emulsion lässt sich eine gleichmäßige Abnahme der Wirkstoffkonzentration mit zunehmender Hauttiefe im Stratum corneum ablesen. Auch nach Zusatz einer mikrobiellen Hyaluronidase als Penetrationsmodulator konnten keine Änderungen im Penetrationsprofil von α -TPA nachgewiesen werden (Abb. 17a und 17b). Das gilt auch für die in das Stratum corneum penetrierten α -TPA-Mengen, unabhängig von der Applikationsdauer (Abb. 17c).

Auch die Messergebnisse in der Epidermis und Dermis lassen keinen Penetrationsvorteil für das Erreichen einer höheren α -TPA-Konzentration sowohl nach Kurzzeit- als auch nach Langzeiteinwirkung erkennen (Abb. 18 und 19).

Somit ist festzustellen, dass der Penetrationsablauf von α -TPA in die menschliche Haut bei Anwendung von einer W/O-Emulsion als Vehikel durch Zusatz von Nanopartikeln oder Hyaluronidase als potentielle Penetrationsmodulatoren nicht entscheidend beeinflusst werden kann.

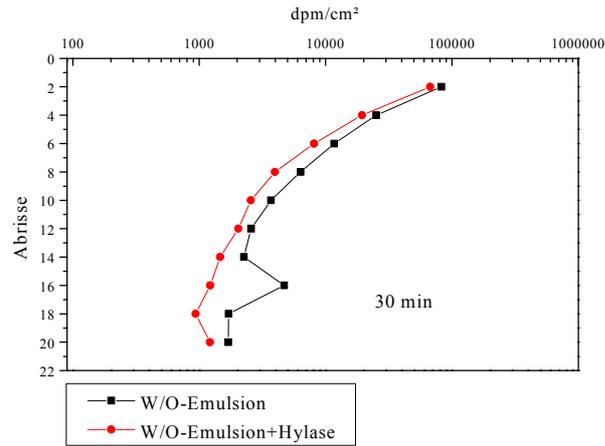


Abb. 17a

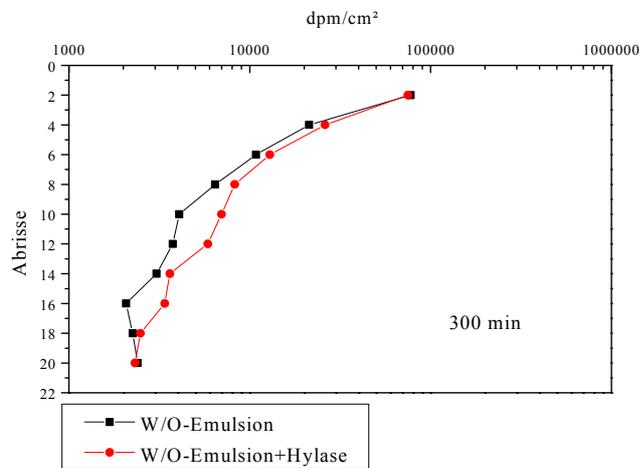


Abb. 17b

Abb. 17: Konzentrationsprofile von α -TPA im Stratum corneum humaner Haut nach Applikation einer 1%-igen Präparation in W/O-Emulsion und W/O-Emulsion+ Hyaluronidase als Vehikel

- a) Applikationszeit: 30 min
- b) Applikationszeit: 300 min

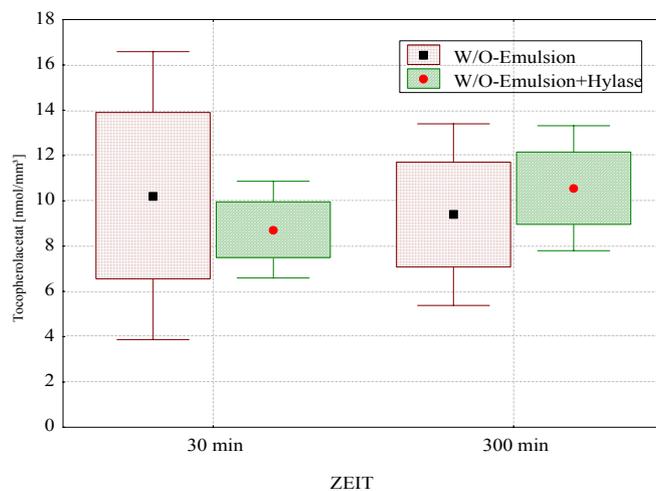


Abb. 17c:

Konzentration von α -TPA im Stratum corneum humaner Haut, Applikationszeit: 30 und 300 min, Vehikel: W/O-Emulsion und W/O-Emulsion + Hyaluronidase, α -Tocopherolkonzentration im Vehikel 1%

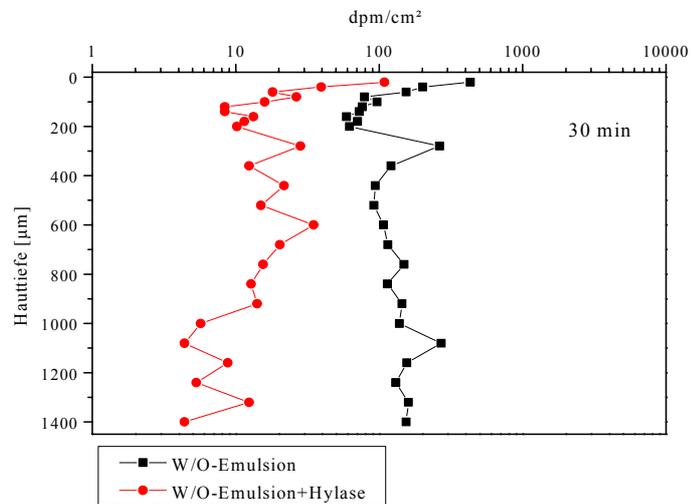


Abb. 18a

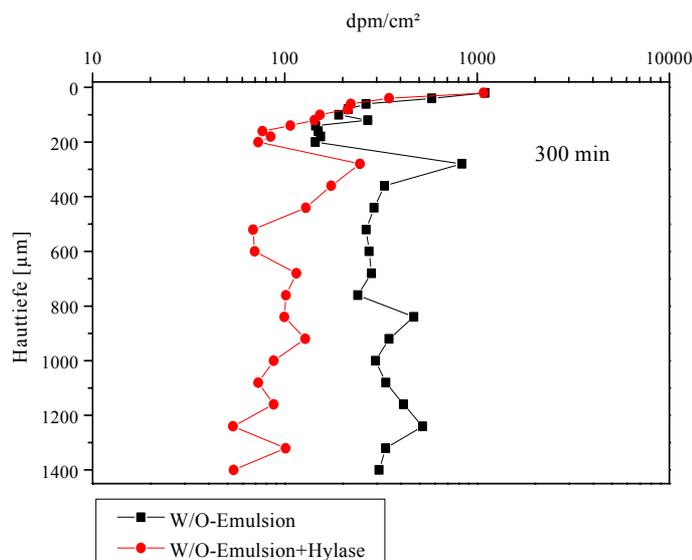


Abb. 18b

Abb. 18: Konzentrationsprofile von α -TPA in der Epidermis und Dermis humaner Haut nach Applikation einer 1%-igen Präparation in W/O-Emulsion und W/O-Emulsion + Hyaluronidase als Vehikel

- a) Applikationszeit: 30 min
 b) Applikationszeit: 300 min

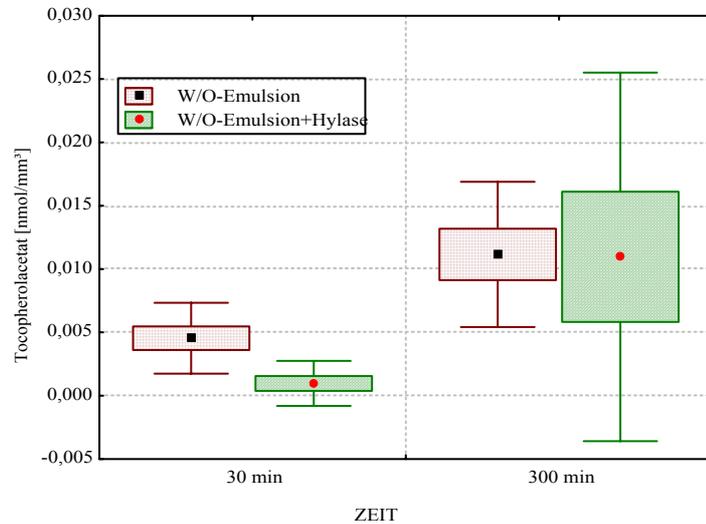


Abb. 19a

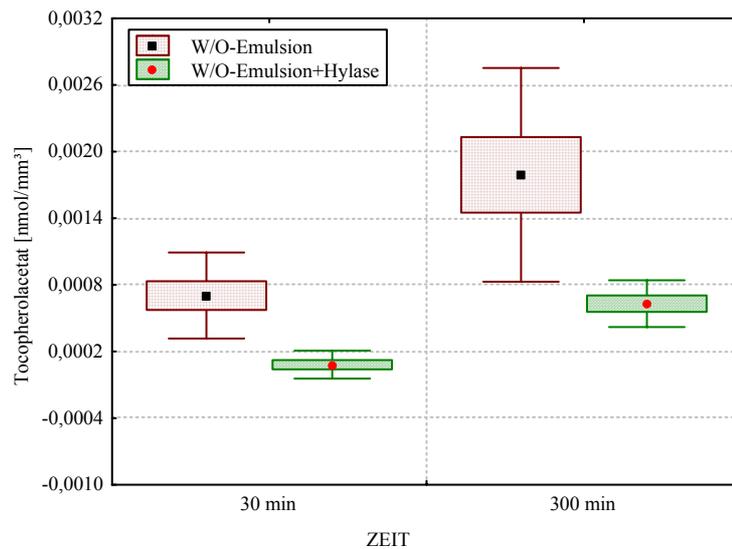


Abb. 19b

Abb. 19: Konzentrationen von α -TPA in der Epidermis und Dermis humaner Haut, Vehikel: W/O- Emulsion und W/O-Emulsion + Hyaluronidase, Applikationszeit: 30 und 300 min, α -TPA-Konzentration im Vehikel 1%

a) lebende Epidermis
b) Dermis

Vergleich von O/W-Emulsion und O/W-Emulsion+ Nanopartikel als Vehikel

Die folgenden Ergebnisse beziehen sich auf die Frage, ob beim Einsatz einer α -TPA enthaltenden O/W-Emulsion durch den Zusatz von Nanopartikeln eine Modulation der α -TPA-Penetration nachgewiesen werden kann. Die in Abb. 20a und 20b dargestellten Konzentrationsprofile im Stratum corneum zeigen, dass Unterschiede im Penetrationsablauf des Wirkstoffs nach Zugabe von Nanopartikeln sowohl nach Kurzeiteinwirkung als auch nach prolongierter Applikation erkennbar sind. Die in der Hornschicht gemessene α -TPA-Konzentration ist unter Einfluß von Nanopartikeln bereits nach 30 min Applikationszeit erhöht und steigt nach prolongierter Einwirkung noch deutlich an (Abb. 20c). Auch für die tieferen Hautschichten der Epidermis und Dermis ist ein penetrationsfördernder Effekt nach Zusatz von Nanopartikeln zur O/W-Emulsion nachzuweisen, allerdings erst nach prolongierter Applikationsdauer von 300 min (Abb. 21 und 22).

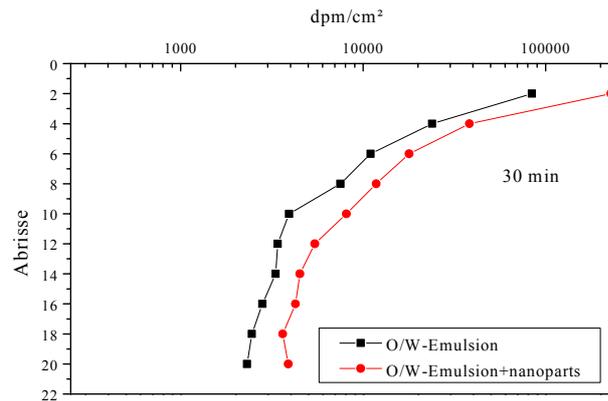


Abb. 20a

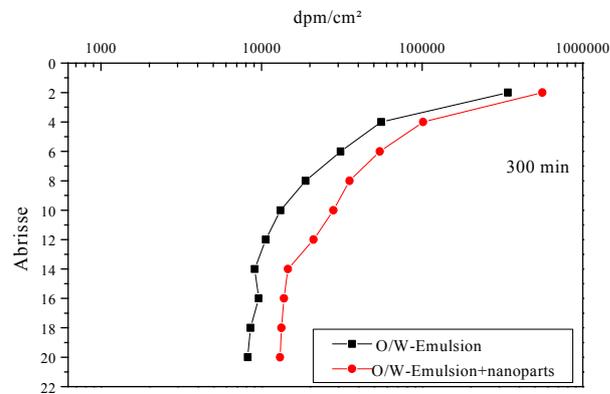


Abb. 20b

Abb. 20: Konzentrationsprofile von α -TPA im Stratum corneum humaner Haut nach Applikation einer 1%-igen Präparation in O/W-Emulsion und O/W-Emulsion + nanoparts als Vehikel
 a) Applikationszeit: 30 min
 b) Applikationszeit: 300 min

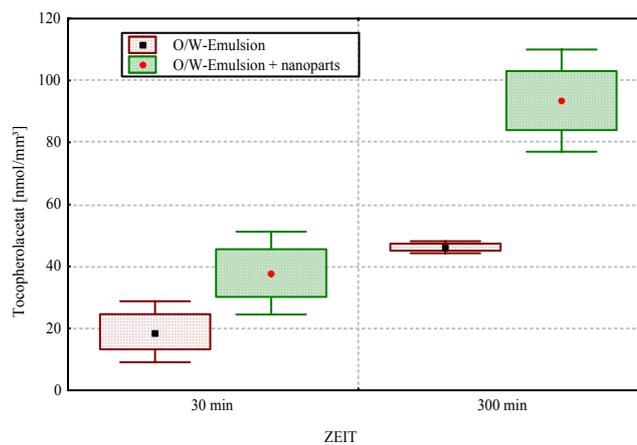


Abb. 20c: Konzentration von α -TPA im Stratum corneum humaner Haut, Applikationszeit: 30 und 300 min, Vehikel: O/W-Emulsion und O/W-Emulsion + nanoparts, α -TPA-Konzentration im Vehikel 1%

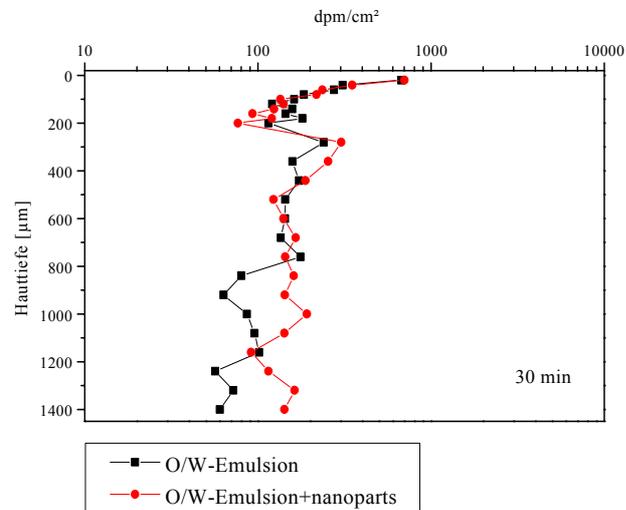


Abb. 21a

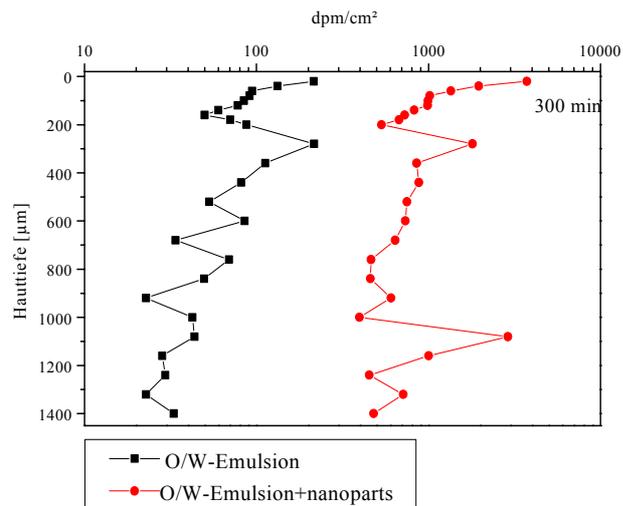


Abb. 21b

Abb. 21: Konzentrationsprofile von α -TPA in der Epidermis und Dermis humaner Haut nach Applikation einer 1%-igen Präparation in O/W- und O/W-Emulsion + nanoparts als Vehikel

- a) Applikationszeit: 30 min
b) Applikationszeit: 300 min

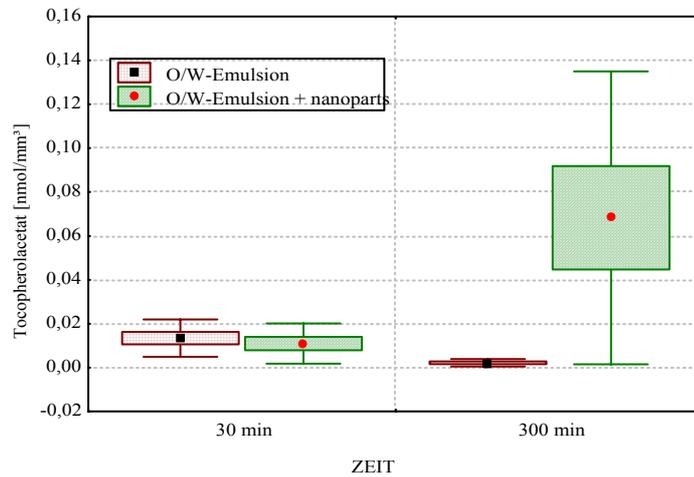


Abb. 22a

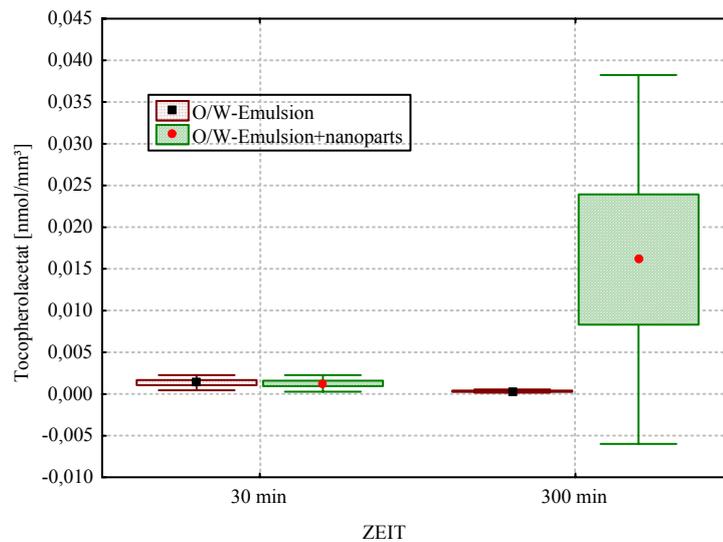


Abb. 22b

Abb. 22: Konzentration von α -TPA in der Epidermis und Dermis humaner Haut, Vehikel: O/W-Emulsion und O/W-Emulsion + nanoparticles, Applikationszeit: 30 und 300 min, α -TPA-Konzentration im Vehikel 1%

a) lebende Epidermis

b) Dermis

Vergleich von O/W-Emulsion und O/W-Emulsion+ Hyaluronidase als Vehikel

Die Inkorporation von Hyaluronidase in eine α -TPA enthaltende O/W-Emulsion übt einen fördernden Einfluß auf die Wirkstoffpenetration aus. Im Stratum corneum nimmt bei dieser Vehikelkombination die Konzentration des α -TPA mit zunehmender Tiefe ab (Abb. 23a und 23b), wobei im Penetrationsprofil nach Kurzeiteinwirkung höhere Wirkstoffkonzentrationen im Hyaluronidase-enthaltenden Vehikel erkennbar sind. Hinsichtlich der errechneten α -TPA-Konzentration in der Hornschicht ist sowohl nach einer Applikationszeit von 30 min als auch 300 min ein deutlicher Anstieg unter Einfluß von Hyaluronidase nachweisbar (Abb. 23c).

Besonders deutlich wird der penetrationsfördernde Effekt eines Hyaluronidase-Zusatzes für α -TPA in einer O/W-Emulsion in den tieferen Hautschichten der Epidermis und Dermis. Hier lassen die Penetrationsprofile eine deutliche Penetrationspromotion erkennen (Abb. 24), ebenso die gemessenen epidermalen und dermalen α -TPA-Konzentrationen, wenn auch mit erheblicher individueller Streuung (Abb. 25). Im Gegensatz zu den Befunden über das Ausbleiben einer Veränderung der α -TPA-Penetration beim Einsatz einer W/O-Emulsion als Vehikel und Zusatz von Nanopartikeln oder Hyaluronidase ist bei Anwendung einer O/W-Emulsion unter sonst gleichen experimentellen Bedingungen für beide Modulatoren ein deutlicher penetrationsfördernder Effekt nachweisbar.

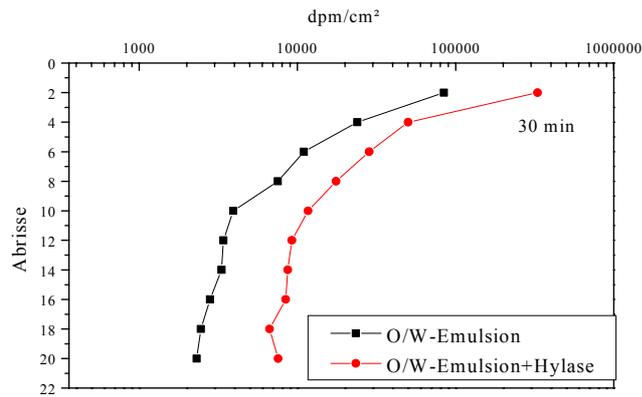


Abb. 23a

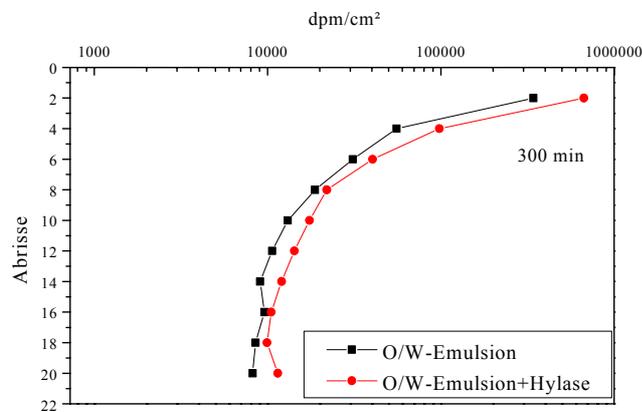


Abb. 23b

Abb. 23: Konzentrationsprofile von α -TPA im Stratum corneum humaner Haut nach Applikation einer 1%-igen Präparation in O/W-Emulsion und O/W-Emulsion + Hyaluronidase als Vehikel

- a) Applikationszeit: 30 min
- b) Applikationszeit: 300 min

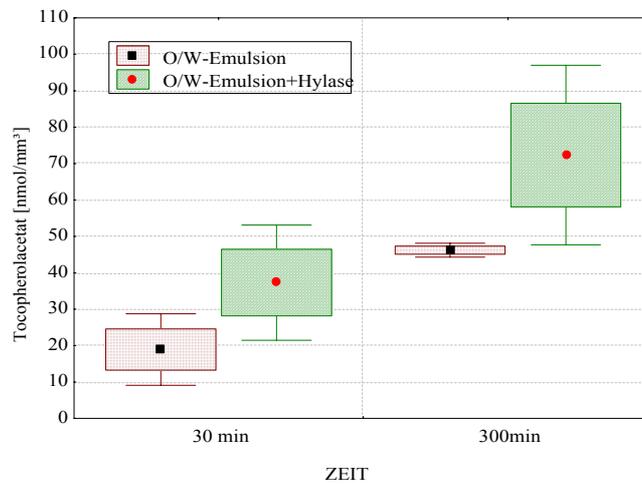


Abb. 23c: Konzentration von α -TPA im Stratum corneum humaner Haut, Applikationszeit: 30 und 300 min, Vehikel: O/W -Emulsion und O/W-Emulsion + Hyaluronidase, Tocopherolkonzentration im Vehikel 1%

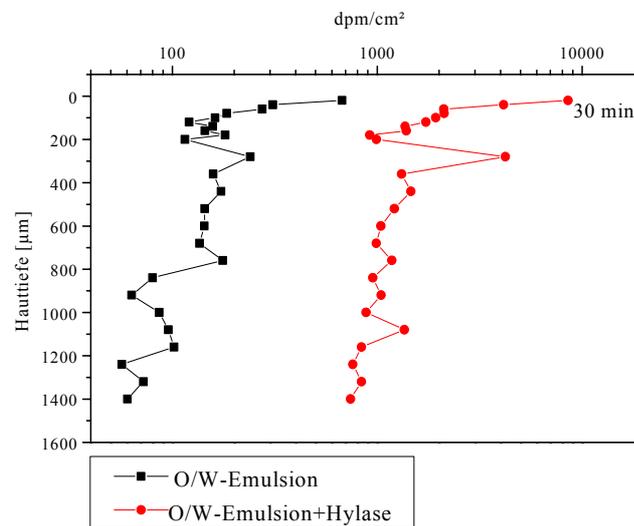


Abb. 24a

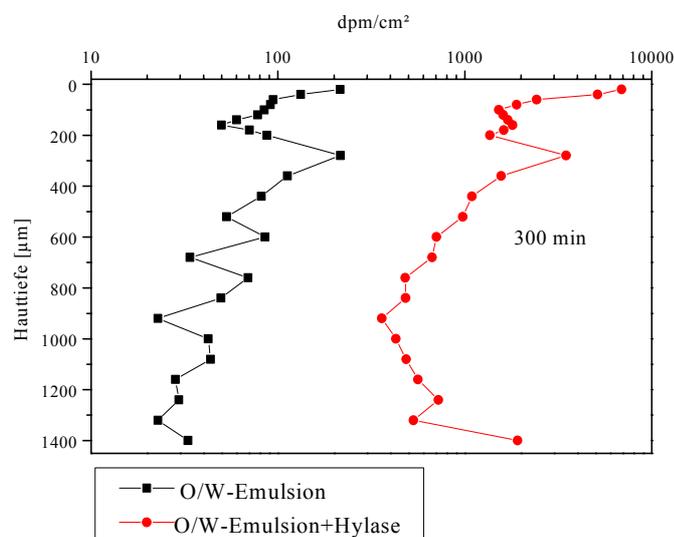


Abb. 24b

Abb. 24: Konzentrationsprofile von α -TPA in der Epidermis und Dermis humaner Haut nach Applikation einer 1%-igen Präparation in O/W-Emulsion und O/W-Emulsion + Hyaluronidase als Vehikel

a) Applikationszeit 30 min

b) Applikationszeit 300 min

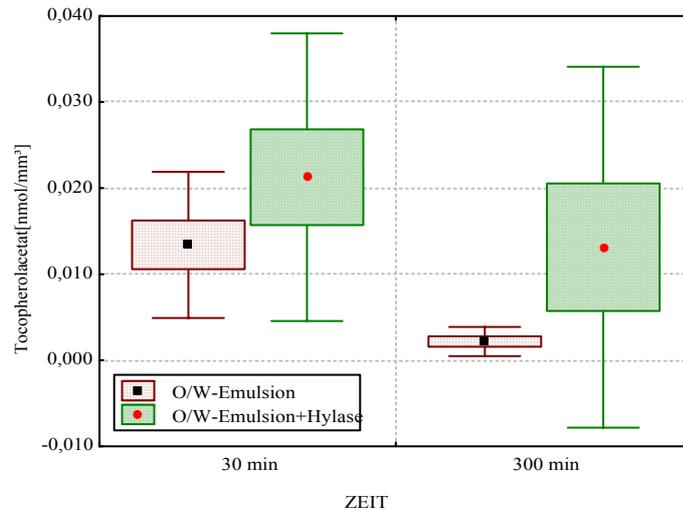


Abb. 25a

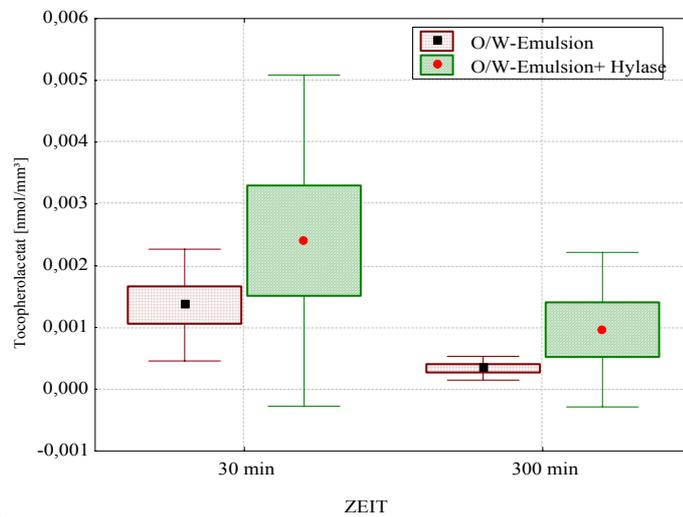


Abb. 25b

Abb. 25: Konzentration von α -TPA in der Epidermis und Dermis humaner Haut, Vehikel: O/W-Emulsion und O/W-Emulsion + Hyaluronidase, Applikationszeit: 30 und 300 min, α -TPA-Konzentration im Vehikel 1%

a) lebende Epidermis
b) Dermis

3.2 Bestimmung von α -Tocopherolacetat nach topischer Applikation bei gesunden

Probanden

Die Untersuchungen zur Konzentrationsverteilung von α -TPA in der menschlichen Haut in Abhängigkeit vom eingesetzten Vehikel und unter Einfluß von potentiellen Penetrationsmodulatoren (Kap. 3.1) wurden an Präparaten humaner Mammahaut unter ex vivo Bedingungen durchgeführt (Methodik vgl. S. 10 - 18). Zum Vergleich und der Bewertung der Übertragbarkeit der Ergebnisse für in vivo Bedingungen wurde am Beispiel des handelsüblichen Präparates Physiogel[®] als Vehikel an 12 hautgesunden Probanden die Bestimmung von α -TPA im Stratum corneum menschlicher Haut nach unterschiedlicher Einwirkdauer vorgenommen. Entsprechend den beschriebenen methodischen Bedingungen (vgl. Kap. 2, S 19 -21) wurde nach der entsprechenden Applikationszeit mit einem Tupfer die auf der Hautoberfläche verbliebene Präparatmenge entfernt und das darin enthaltene α -TPA bestimmt. Anschließend wurden die Lipide mittels eines n-Hexan/Ethanol-Gemisch aus einer definierten Hautfläche herausgelöst und die darin enthaltene α -TPA-Menge gemessen. Durch Kenntnis der applizierten Gesamtmenge konnte nach Subtraktion der auf der Hautoberfläche verbliebenen Restmenge und des im Stratum corneum gemessenen α -TPA-Anteils die in die Epidermis und Dermis penetrierte Wirkstoffmenge als Orientierungsgröße errechnet werden (vgl. Abb. 26 und 27).

Dabei konnten für die Applikationszeiten von 30 min (Abb. 26) und 300 min (Abb. 27) nahezu identische Messdaten erhoben werden. Der auf der Hautoberfläche verbliebene Wirkstoffanteil ist mit 7% bzw. 6% sehr gering. Der α -TPA-Gehalt im Stratum corneum mit 26% bzw. 25% der aufgetragenen Gesamtmenge ist Ausdruck eines beträchtlichen Wirkstoffreservoirs. Der aus diesen Daten ableitbare in die Epidermis und Dermis penetrierte Wirkstoffanteil von 67% bzw. 69% stellt eine Orientierungsgröße dar und lässt keine Aussage über die Verteilung innerhalb dieser Hautschichten zu. Außerdem ist für diesen Anteil die resorbierte α -TPA-Menge zu berücksichtigen.

Von besonderer Bedeutung erscheint, dass bei Verwendung von Physiogel[®] als Vehikel bereits nach 30 min ein Konzentrations-Zeit-Profil des α -TPA erreicht wird, welches bis zu einer Einwirkdauer von 300 min nahezu unverändert beibehalten wird.

Abb. 26: Penetration von α -TPA aus Physiogel[®] in das Stratum corneum menschlicher Haut nach einer Applikationsdauer von 30 min

a) Messdaten

n =12 Pobanden		Mittelwert in [mg]	Standard-abweichung	Prozent
	applizierte Gesamtmenge α -TPA	0,2380	0,005990	100
gemessene Werte	α -TPA im Tupfer	0,0158	0,000419	6,62
	α -TPA im Stratum corneum	0,0609	0,001370	25,25
berechnete Werte	α -TPA in Epidermis/ Dermis	0,1620	0,006520	67,90

b) Graphische Darstellung

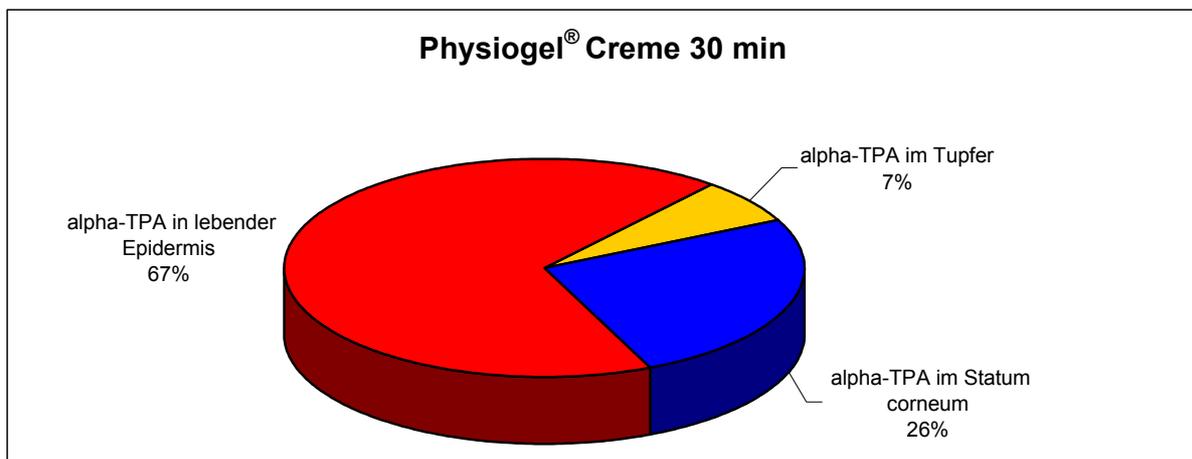
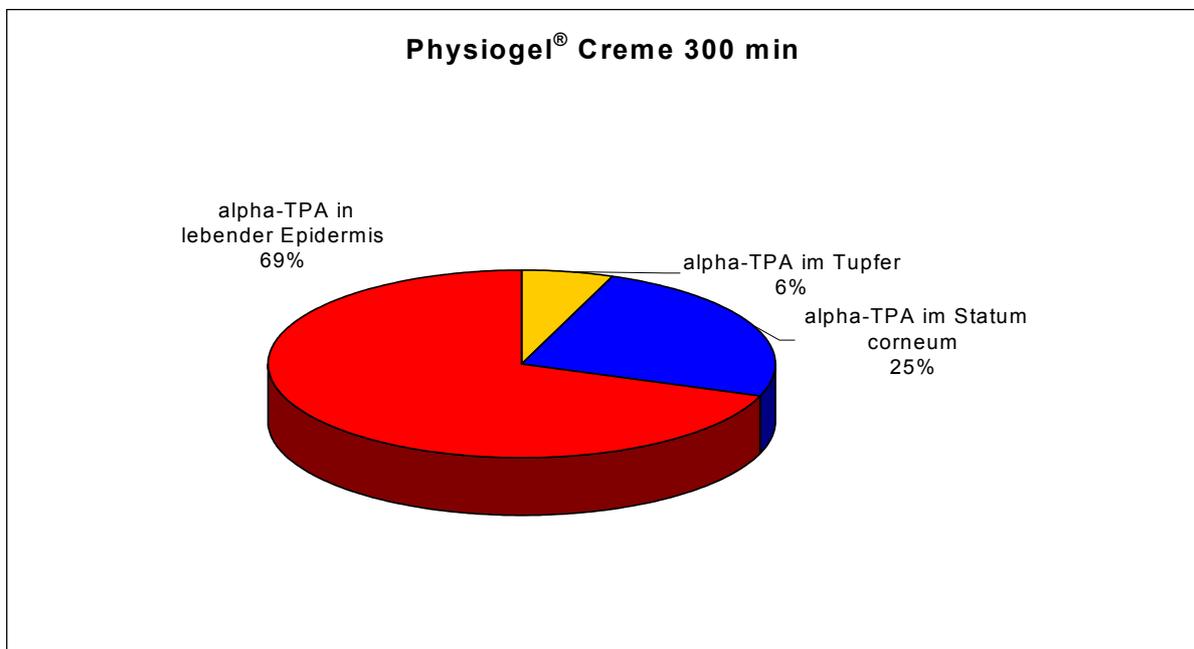


Abb. 27: Penetration von α -TPA aus Physiogel[®] in das Stratum corneum menschlicher Haut nach einer Applikationsdauer von 300 min

a) Messdaten

n =12 Pobanden		Mittelwert in [mg]	Standard-abweichung	Prozent
	applizierte Gesamtmenge α -TPA	0,2400	0,004050	100
gemessene Werte	α -TPA im Tupfer	0,0142	0,018200	5,93
	α -TPA im Stratum corneum	0,0589	0,001090	24,55
berechnete Werte	α -TPA in Epidermis/Dermis	0,1670	0,004350	69,51

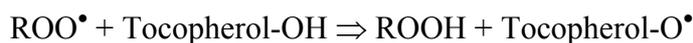
b) Graphische Darstellung



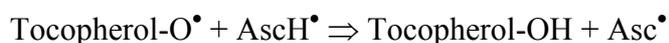
4 Diskussion

4.1 Biologische Funktion von α -Tocopherol

In biologischen Systemen kommt dem α -Tocopherol in seiner Wirkung als Antioxidans eine besondere Bedeutung zu. Dabei sind für die Lipidphase Tocopherole eine der wichtigsten Antioxidantien (Traber MG, Sies H, 1996; Tappel AL, 1962). Tocopherol besitzt die Fähigkeit, aggressive Sauerstoffradikale zu eliminieren. Besonders oxydationsempfindlich sind Polyensäure-haltige Lipide in Membranen und anderen Zellstrukturen. Die Autooxidation von mehrfach ungesättigten Fettsäuren verläuft durch chemische oder physikalische Einwirkung (Hitze, Licht, ionisierende Strahlung) in einem autokatalytischen Prozess (Schmidt KH, 1993). Dabei kann z.B. ein Wasserstoffatom aus einer labilen Methylengruppe abgespalten werden. Das entstandene freie Radikal reagiert mit Sauerstoff unter Bildung eines Peroxyl-Radikals welches mit einem anderen Polyensäure-Molekül das Hydroperoxid bildet, wobei ein neues freies Radikal entsteht. So können in einer Kettenreaktion aus einem freien Radikal eine große Zahl von Hydroperoxiden gebildet werden, aus denen wieder freie Radikale entstehen können. Tocopherol führt zum Abbruch der Kettenreaktion, indem es mit der phenolischen Hydroxyl-Gruppe reagiert (Mc Cay PB, King MM, 1980). Ein phenolisches Wasserstoffatom wird an das Lipidperoxyl-Radikal abgegeben und geht dabei selbst in ein resonanzstabilisiertes, sehr reaktionsträges Semichinonradikal, das Tocopherol-Chinon, über



Dabei wird das Semichinon-Radikal verbraucht, soweit es nicht durch Ascorbat (AscH^\bullet) reduziert wird (Mc Cay P, 1985).



Das hierbei gebildete Ascorbinsäure-Derivat (Asc^\bullet) wird durch eine glutathionhaltige Reduktase wieder in Ascorbat überführt (Meister A, 1994). Überwiegend in der wässrigen Matrix ist die Ascorbinsäure außerdem in der Lage, eine Reihe aktiver Sauerstoff-Formen, wie z.B. Wasserstoffperoxid, Superoxidanion-Radikal und Hydroxyl-Radikale, zu entschärfen (Golumbic C, Mattill H, 1941; Dobra et al., 1985; Niki E, 1987; Wefers H, Sies H, 1988; Maiorino et al., 1989; Bowry V, Stocker R, 1993).

Des Weiteren hemmt Tocopherol die Aggregation der Blutplättchen, indem es die Phospholipase A₂-Aktivität und damit die Thromboxanbiosynthese hemmt. Ferner reduziert Tocopherol die Freisetzung von Thromboxan A₂ aus den Blutplättchen (Steiner M, Anastasi J, 1976). Unter dem Einfluß von Tocopherol wird die Prostacyclinbiosynthese in den Endothelzellen stimuliert, die in vivo den physiologischen Inhibitormechanismus der Thrombozytenaggregation darstellt (Chan et al., 1989).

Tocopherol besitzt eine antiarteriosklerotische Wirkung. In vitro-Untersuchungen zeigten, dass durch physiologische Konzentrationen von Tocopherol die Proliferation von glatten Muskelzellen gehemmt und die Lipoxygenase blockiert wird (Janero DR, 1991; Boscoboinik et al., 1991).

Jedoch hat sich die Einnahme von α -Tocopherol zur Prophylaxe von kardiovaskulären Erkrankungen unwirksam erwiesen (Kris-Etherton, PM et al., 2004).

Ein weiterer Effekt des Tocopherol ist die direkte stabilisierende Wirkung auf biologische Membranen. So wurde in vitro der Schutz der Erythrozyten vor Hämolyse und die Erhöhung der Erythrozytenlebensrate nachgewiesen (Mino et al., 1981).

Tocopherol greift wie schon erwähnt in den Arachidonsäure-Metabolismus durch Inhibition der Cyclooxygenase (COX) ein und verhindert auf diese Weise die Biosynthese verschiedener proinflammatorisch wirkender Eicosanoide, unter anderem von Prostaglandin E₂ (Wu et al., 1998). Durch diese Wirkung und seine Eigenschaft als Radikalfänger kann Tocopherol das Hautkrebs-Risiko senken (Naylor MF, 1997).

4.2 Topische Anwendung von α -Tocopherol

Entsprechend der beschriebenen biologischen Funktionen ist die Anwendung von Tocopherol von großer dermatologischer Relevanz. Der Einsatz von α -Tocopherol in unterschiedlichen topisch zu applizierenden Präparaten geschieht überwiegend unter prophylaktischen Gesichtspunkten. Dabei steht die Photoprotektion, der Schutz vor Hautalterung und die Hydratation des Stratum corneum im Vordergrund (Mayer P, Pittermann W, 1993). Durch akute oder chronische Einwirkung von UV-A und UV-B Strahlung kommt es nicht nur zu morphologischen Veränderungen von Keratinozyten, Melanozyten, Langerhans- und Merkelzellen, sondern auch zur Beeinflussung von dermalen Prozessen wie die Reduktion der Immunabwehr innerhalb der Epidermis sowie UV-induzierte Mutationen mit entsprechender Aktivierung von Onkogenen bzw. Tumorsuppressorgenen (Kohen et al., 1995). Hauptursache dieser pathophysiologischen und pathobiochemischen Prozesse ist der oxidative Stress mit der Bildung hochreaktiver Sauerstoff-Spezies, welche diese zellulären Schäden hervorrufen.

Topisch appliziertem α -Tocopherolacetat konnte im Tierversuch ein signifikanter Schutz vor DNA-Photoschädigung nachgewiesen werden (Mc Vean M, Liebler DC, 1999). Die Wirkung als Photoprotektivum beruht nicht nur auf seinen Radikalfängereigenschaften, sondern auch auf der Fähigkeit, UV-Strahlung mit einem Maximum von 295 nm zu absorbieren (Kagan et al., 1992). Des Weiteren verhindert α -Tocopherol die Biosynthese proinflammatorischer Eicosanoide und wirkt somit antientzündlich.

Die Licht-Alterung der Haut durch chronische Lichtexposition beruht wesentlich auf der UVB-induzierten Bildung von Zytokinen innerhalb der Epidermis. Diese regen ihrerseits Fibroblasten an, Matrix-Metalloproteinasen zu bilden, welche Kollagen spalten. Diese Kollagen-Bruchstücke werden als wesentliche Faktoren der Licht-Alterung angesehen (Fisher et al., 1996).

GEHRING und Mitarbeiter konnten in Untersuchungen mit O/W- und W/O-Emulsionen und Tocopherolacetat nachweisen, dass α -Tocopherolacetat die Hydratation des Stratum corneum signifikant erhöht. Ursächlich dafür war eine konzentrationsabhängige Steigerung der Wasserbindungskapazität (Gehring et al., 1998).

4.3 Penetration von α -Tocopherolacetat

Grundlage für die Wirksamkeit jedes auf die Haut aufgetragenen Wirkstoffs ist, inwieweit es gelingt, in der erkrankten Haut ein optimales Konzentrations-Zeit-Profil des Wirkstoffs zu erreichen, d.h. seine Penetrationskinetik. Die Penetrationskinetik ist dabei abhängig von:

- der eingesetzten Konzentration der Wirksubstanz
- dem Hautzustand
- dem eingesetzten Vehikel

Die Wahl eines geeigneten Trägersystems und damit der Grundlage richtet sich nach der zu behandelnden Körperregion, der beabsichtigten Anwendung und nach dem Hautzustand. Dabei ist der Zustand des Stratum corneum mit seiner Lipidbarriere von entscheidender Bedeutung (Schaefer H, Redelmeier TE, 1996; Gloor et al., 2000; Neubert et al., 2001). Bei intakter Hornschicht und Lipidbarriere erzielen lipophile Grundlagen zur Vermittlung von lipophilen Wirkstoffen die beste Tiefenwirkung. Hydrophile Trägersysteme zur Vermittlung hydrophiler Wirkstoffe besitzen bei nässenden Dermatosen eine höhere Effektivität (Jung EG, 1995).

4.4 O/W- und W/O-Emulsion als Vehikel

Auf Grund der Eigenschaften von O/W- und W/O-Emulsionen ist ihr Einsatz fester Bestandteil in der Therapie dermatologischer Erkrankungen. Bei der O/W-Emulsion handelt es sich um eine hydrophile Emulsion, in dessen äussere hydrophile Phase Fetttropfen emulgiert sind und damit unbegrenzt in Wasser mischbar sind. Anders verhält es sich mit der lipophilen W/O-Emulsion, in dessen lipophiler äusserer Phase Wassertröpfchen emulgiert sind und somit mit Fett unbegrenzt mischbar sind. Zusätzlich zur Eigenwirkung können sie als Vehikel für Pharmaka fungieren, in dem Wirkstoffe in die ölige oder wässrige Phase eingearbeitet werden können.

In Untersuchungen von GLOOR und Mitarbeiter wiesen sie eine statistisch signifikante Verbesserung der Hydrokortison-Penetration bei Verwendung einer O/W-Emulsion nach (Gloor et al. 2003). Hinsichtlich der Penetrationskinetik von α -Tocopherol konnten in der vorliegenden Untersuchung bei der Anwendung in O/W- und W/O-Emulsionen deutliche Unterschiede nachgewiesen werden. Während nach Kurzzeitapplikation bei Verwendung einer O/W-Emulsion als Vehikel eine höhere α -TPA-Konzentration in allen Hautschichten nachgewiesen werden konnte, war im Gegensatz dazu nach prolongierter Anwendung eine höhere epidermale und dermale α -TPA-Konzentration bei Anwendung einer W/O-Emulsion erreichbar.

4.5 Spezielle Vehikel

Mikroemulsion

Auf Grund der Eigenschaften von Mikroemulsionen ergeben sich vielfältige Anwendungsmöglichkeiten in der topischen Applikation sowohl als Trägersysteme für Arzneistoffe als auch in ihrer Eigenwirkung auf die Haut. Durch Modifikation des Systems ist es möglich, problematisch zu applizierende Pharmaka (hydrophile, lichtempfindliche oder schlecht lösliche Moleküle) einzusetzen. Mikroemulsionen mit vollständiger Elimination des Wasseranteils erscheinen besonders als Träger für hydrolyseempfindliche Substanzen geeignet. Die einfache Herstellung, die hohe Stabilität und damit verbunden die unkomplizierte Lagerungsfähigkeit (Constantinides P, Seang HY, 1995) sprechen für den Einsatz von Mikroemulsionen als Trägersysteme. Ein weiterer Vorteil im Vergleich zu konventionellen Emulsionen ist in einem erhöhten Spreitvermögen und der hohen Penetrationskraft zu sehen (Leung R, Shah DO, 1989).

In umfangreichen dermalen Studien wurde insbesondere die Enhanceraktivität von Mikroemulsionen für verschiedene systemisch wirksame Pharmaka, Beta-Blocker,

Calciumantagonisten und Lokalanästhetika, untersucht (Carlfors et al., 1991; Kemken et al., 1991; Gallarate et al., 1993; Boltri et al., 1994; Thacharodi D, Panduranga Rao K, 1994). Dabei beeinflusst der Vehikelaufbau die Enhancerwirkung, wobei die lipophilen Bestandteile in der Lage sind, die Lipidstruktur der Haut (Fluiditätsveränderungen der Bilayer) zu beeinflussen und damit die Permeation zu erhöhen (Fridberg E, Podzimek P, 1984). Durch hydrophile Bestandteile der Mikroemulsion wird das Stratum corneum hydratisiert und somit für hydrophile Moleküle permeabel (Linn EE et al., 1986). Deutliche Penetrationseffekte gegenüber einer Creme und einer Lotion als Vergleichsvehikel brachte die Kombination von hydrophilen und lipophilen Vehikelbestandteilen (Linn EE et al., 1990).

SCHMALFUß nahm durch Inkorporation von verschiedenen Fettsäuren, Cholesterol und Harnstoff Einfluss auf die Penetrationstiefe und das Ausmaß der Penetration des wasserlöslichen Arzneistoffs Diphenhydramin (Schmalfuß U, 1997)

Für die Penetration von α -TPA in die menschliche Haut konnte durch Einsatz einer Mikroemulsion als Vehikel keine deutlichen Änderungen gegenüber den Ergebnissen bei Anwendung von Standardemulsionen gemessen werden. Für Kurzzeitapplikation von 30 min waren bei Anwendung einer Mikroemulsion die penetrierten α -TPA-Mengen im Wesentlichen mit den Ergebnissen bei Standardemulsionen vergleichbar. Nach prolongierter Applikation konnte auch bei Einsatz von Mikroemulsionen ein Konzentrationsanstieg von α -TPA in den einzelnen Hautschichten nachgewiesen werden, jedoch ohne Unterschied zu den bisher beschriebenen Befunden. Dieser Befund gilt ausschließlich für die angewandte Mikroemulsion. Welche Bedeutung eine Modifikation der Zusammensetzung der Mikroemulsion für die α -TPA-Penetration zukommt, müssen weitere Untersuchungen klären.

Hydrogel

Als Hydrogel wurde eine Zubereitung aus Natriumcarboxymethylcellulose, Propylenglycol und eingearbeitetes Wasser verwendet. In den Penetrationsuntersuchungen erwies sich die Verwendung des Hydrogels gegenüber den Standardemulsionen als vorteilhaft. So konnten sowohl bei Kurzzeitapplikation als auch bei prolongierter Einwirkung signifikant höhere Wirkstoffkonzentrationen mit dem Hydrogel in allen untersuchten Hautschichten erreicht werden. Dieser Effekt konnte auf die Zusammensetzung des Hydrogels aus organischem Gelbildner, Feuchtmacher und Weichmacher und einem hohen Wasseranteil zurückzuführen sein.

Physiogel®

Mit der gebrauchsfertigen multilamellären Creme Physiogel® (Stiefel, Offenbach) stand ein Vehikel zur Verfügung, dessen Herstellung und Zusammensetzung der deutschen Kosmetikverordnung entspricht. Es handelt sich um eine Derma Membran Struktur (DMS®) Creme. Grundbaustein dieses Vehikels sind spezifisch zusammengesetzte Membranlipide mit lamellaren Strukturen, die sich in ihrer Zusammensetzung und Struktur an der natürlichen Lipidbarriere der Haut orientiert (Produktinformation Firma Stiefel).

Durch Einsatz dieser Galenik bei Patienten mit atopischer Dermatitis konnte eine gute Penetration erreicht werden. Durch Verzicht auf Emulgatoren, Konservierungsmittel, Mineralöle, sowie Duft- und Farbstoffe besitzt diese Creme eine gute Verträglichkeit, die bei Atopikern relevant sein können (Kutz G, Peltner D, 1999; Schlippe G, Ständer M, 2003).

Als Vehikel für die α -TPA-Penetration konnten im Vergleich mit den Standardemulsionen bereits nach Kurzzeitapplikation höhere Wirkstoffkonzentrationen in den epidermalen und dermalen Hautschichten erreicht werden, die in den lebenden Epidermisanteilen und der Dermis auch nach prolongierter Applikation nachweisbar waren. Auch im Stratum corneum war ein deutlicher Reservoir-effekt für α -TPA erkennbar.

4.6 Einfluß von Penetrationsmodulatoren

Liposomen

Der erste Einsatz von Liposomen erfolgte in Kosmetika zur allgemeinen Verbesserung des Hautzustandes (Lautenschläger et al., 1988; Lautenschläger H, 1989, Lautenschläger H, 1990). Dabei wurde primär eine Hydratisierung und Ergänzung des Lipidhaushaltes der Haut angestrebt.

Zur Behandlung von chronischen Dermatosen erwiesen sich Externa, in deren Gelgrundlage Liposomen eingearbeitet wurden, als dermatopharmazeutisch interessant (Korting HC, 1995). Da liposomenhaltige Hydrogele gut in die Haut eindringen, kann in der Therapie eine hohe Akzeptanz durch den Patienten erzielt werden.

Schon eine Mono-Therapie von atopischen trockenen Hautzuständen mit Leerliposomen aus nativen Hautlipiden kann zu einer Verbesserung des Hautzustandes führen (Schreier H, Bouwstra J, 1994).

Es existieren umfangreiche Untersuchungen zur Steigerung der Penetration von Wirkstoffen für die dermale Applikation nach deren Einarbeitung in Liposomen. So wurden neben der Applikation von liposomal eingeschlossenen Lokalanästhetika (Foldvari M, 1994; Sharma et al. 1994), Vitaminen (Schäfer-Korting et al., 1994) und nicht steroidalen Antiphlogistika

(Michel et al., 1991) auch der liposomale Transport von Glucocorticoiden (Wohlrab W, Lasch J, 1989; Wohlrab et al., 1992) untersucht. Wohlrab und Lasch setzten in Liposomen eingeschlossenes Hydrocortison ein und konnten bereits nach kurzer Einwirkzeit eine 9-fache Erhöhung der Konzentration von Hydrocortison in der Epidermis und Dermis zeigen (Wohlrab et al., 1992).

Bei Untersuchungen mit dem in Liposomen eingearbeiteten Antipsoriatikum Dithranol konnten keine signifikanten Effekte hinsichtlich des Schutzes vor Oxidation bzw. eine Steigerung des therapeutischen Effektes erreicht werden (Mahrle et al., 1991; Gehring et al., 1994).

Der penetrationsfördernde Effekt von topisch applizierten Liposomen ist auf eine Interaktion zwischen den lipophilen Bestandteilen der Liposomenmembran und den Lipiden des Stratum corneum zurückzuführen. Die Folge ist eine Desintegration der geordneten Lipidstrukturen, wobei der Einfluß des Wassers aus der hydrophilen Phase des Vehikels synergistisch wirkt.

Bezüglich der Penetrationstiefe intakter Liposomen existieren unterschiedliche Ergebnisse und Auffassungen. Treten Liposomen, die in das Stratum corneum humaner Haut eindringen, mit den dort vorhandenen Lipiden in Wechselwirkung und geben sie dabei ihre eigenen Strukturen auf, sind intakte Liposomen in den tieferen Hautschichten nicht mehr nachweisbar (Hofland et al., 1995; Kriwet K, Müller-Goymann Ch, 1995; Kirjavainen et al., 1996).

Nanopartikel

Es existieren wenige Untersuchungen, die sich mit der Nutzung der kontrollierten Freigabe von potenten Wirkstoffen aus dem Trägersystem Nanopartikel bei topischer Applikation beschäftigen. Bei Verwendung unterschiedlicher Polycyanoacrylatderivate können sowohl hydrophile als auch lipophile Moleküle zur topischen Applikation verwendet werden (Cappel M, Kreuter J, 1991). Untersuchungen an haarloser Mäusehaut sowie an künstlichen Membranen zeigten eine Permeabilitätserhöhung für Methanol, jedoch keinen steigernden Effekt für den lipophileren Alkohol Octanol. Als weiteres Resultat wurde eine deutliche Abhängigkeit der Permeation von der Lipophilie des eingesetzten Polymermaterials beschrieben.

HANDJANI und Mitarbeiter patentierten bereits 1991 biologisch abbaubare Nanopartikel für die topische Applikation von Externa und Kosmetika. Die Verwendung eines wässrigen Partikelsystems aus Poly-(butylcyanoacrylat) und Tocopherol zeigte im Vergleich zu tocopherolhaltigen Emulsionen geringere irritative Erscheinungen an der Haut und am Auge (Handjani R, Ribier A, 1991).

Nachdem Partikel aus Collagen-Glucosaminoglycan-Gemischen in der Zellkultur an Fibroblasten (Ratten) und nach subcutaner Injektion in Rattenhaut eine gute Biokompatibilität und keine Zytotoxizität zeigten, wurden an humaner Haut Penetrationsuntersuchungen durchgeführt (Huc et al., 1991). Die Penetrationsergebnisse variierten in Abhängigkeit von der Partikelgröße. Partikel, die kleiner waren als 20 μm , gelang es, in die obersten Schichten des Stratum corneum einzudringen. Größere Vesikel verblieben an der Oberfläche und nahmen durch Wasch- und Wischeffekte nicht an der Penetration teil.

Nach Applikation von Collagen als Trägermaterial für Retinol auf haarlose Mäusehaut wurde im Vergleich zum Standardvehikel, O/W-Creme, eine schnellere Penetration des Wirkstoffs in tiefere Hautschichten nachgewiesen. Dabei konnte die Gesamtmenge an penetriertem Retinol gesteigert werden (Rössler et al., 1994).

Die vorliegenden Untersuchungen ergaben unterschiedliche Ergebnisse bei der Verwendung von Nanopartikeln in den untersuchten Standardvehikeln. Die Inkorporation von Nanopartikeln in die W/O-Emulsion erbrachte sowohl bei Kurz- als auch bei Langzeiteinwirkung keine Vorteile in der α -TPA-Penetration in die einzelnen Hautschichten. Im Gegensatz dazu zeigen die Ergebnisse der α -TPA-Penetration nach Nanopartikel-Inkorporation in die O/W-Emulsion bereits nach Kurzeinwirkung penetrationsfördernde Einflüsse, die sich nach prolongierter Anwendung auch in den tieferen Hautschichten darstellten. Die hier dargestellten Ergebnisse können als synergistischer Penetrationseffekt von O/W-Emulsion und Nanopartikeln gewertet werden.

Hyaluronidase

Von den drei existierenden Hauptgruppen des Enzyms Hyaluronidase, die testiculäre Hyaluronat-4-glycohydrolase, die Blutegel-Hyaluronatglycanohydrolase sowie die bakterielle Hyaluronatlyase wurde in dieser Arbeit das bakterielle Enzym von *Streptococcus agalactiae* verwendet (siehe Kap. Material und Methoden). Dieses Enzym spaltet Chondroitinsulfat-Ketten und ermöglicht dem Bakterium ein effizientes Eindringen in das Gewebe.

In dieser Untersuchung wurde das Enzym in die beiden Standardemulsionen, O/W- und W/O-Emulsion, eingearbeitet und als Penetrationenhancer verwendet. Die Einflüsse auf die α -TPA-Penetration wurden durch Vergleich mit der enzymlosen Standardemulsion untersucht. Zunächst wurden die Wiederfindungsraten der einzelnen Vehikel im Stratum corneum, der Hauptpenetrationsbarriere, untersucht. Nach 30 min wurden die höchsten Wirkstoffkonzentrationen bei Verwendung der O/W-Emulsion mit Hyaluronatlyase gemessen. Diese Werte unterscheiden sich signifikant von der Standardemulsion ohne

Penetrationsmodulator. Anhand dieser Ergebnisse werden penetrationsbeeinflussende Effekte durch den *enhancer* deutlich. Diese Effekte sind möglicherweise Kombinationen aus der fluiditätsmodulierenden Wirkung des Standards und der Eigenwirkung des Penetrationenhancers. Allerdings ist bei der Beurteilung der Wirkung der Hyaluronatlyase zu bedenken, dass die Hyaluronsäuren als Substrat dieses Enzyms erst in den tieferen Hautschichten, der lebenden Epidermis und Dermis, lokalisiert sind (Tammi et al., 1988).

Für die W/O-Emulsion konnte sowohl im Kurzzeit- als auch im Langzeitversuch kein penetrationsfördernder Effekt durch Inkorporation von Hyaluronatlyase nachgewiesen werden.

4.7 In vitro Penetration

Die bisher vorgestellten und diskutierten Ergebnisse zur Vehikelabhängigkeit der α -TPA-Penetration in die menschliche Haut lassen Aussagen zu, wie für diesen Wirkstoff ein günstiges Konzentrations-Profil über längere Zeit erreicht werden kann. Allerdings ist dabei zu bedenken, dass diese Untersuchungen an humaner Mammahaut unter **ex vivo** Bedingungen durchgeführt wurden. Ob diese Ergebnisse schließlich aber den **in vivo** Verhältnissen entsprechen, lässt sich mit letzter Konsequenz nicht nachweisen. Zur Beantwortung dieser Frage wurde deshalb die α -TPA-Penetration an einem einzelnen Vehikel unter in vivo Bedingungen untersucht. Die Auswahl des entsprechenden Vehikels orientierte sich an den Ergebnissen der ex vivo Untersuchungen. Allerdings wurde aus Kapazitätsgründen auf ein Vehikel beschränkt.

Die Konzentration des eingesetzten Arzneistoffs wurde konstant gehalten, um eine Vergleichbarkeit der Ergebnisse zu gewährleisten. Gemessen wurden die wiedergefundenen Mengen des eingesetzten Wirkstoffs im Stratum corneum. Durch Kenntnis der applizierten Gesamtmenge konnte daraus die penetrierte α -TPA-Menge in die lebende Epidermis und Dermis berechnet werden. Diese Ergebnisse lassen keine Rückschlüsse über mögliche Metabolisierungsprozesse, die Permeation oder Mengen des durch das Gefäßsystem der Haut abtransportierten Wirkstoffes zu.

Auf Grund der günstigen Penetrationsbedingungen unter ex vivo Bedingungen wurde für die in vivo Anwendung Physiogel[®] als Vehikel eingesetzt, um mittels Eluation und HPLC-Analytik die Penetration von α -TPA am gesunden Probanden im Stratum corneum zu bestimmen. Die Beurteilung des Penetrationsverhaltens des mit α -TPA behandelten Physiogel's[®] erfolgte in Kurzzeitanwendung (30 min) und in Langzeitanwendung (300 min). Nach Kurzzeitanwendung wurden 26 % des eingesetzten Wirkstoffs im Stratum corneum

wiedergefunden, 67 % des Wirkstoffs mussten nach Berechnung in tiefere Hautschichten penetriert sein. Das Ergebnis änderte sich auch nach längerer Einwirkzeit nicht. Dieses Ergebnis lässt die Vermutung zu, dass bereits nach 30 minütiger Einwirkzeit die Penetration des mit α -TPA beladenen Physiogels[®] abgeschlossen war. Der genaue Penetrationsabschluss konnte aber auf Grund des großen Zeitfensters nicht bestimmt werden.

Ein direkter Nachweis von Tocopherol im Eluat gelang mit der verwendeten Analytik nicht.

5 Zusammenfassung

Die Haut ist wie kein anderes Organ des menschlichen Körpers extremen Umwelteinflüssen ausgesetzt, die schädigend auf sie wirken. Eine bedeutende Rolle kommt dabei dem Licht, insbesondere dessen UV-Anteil, zu. Eine Folge übermäßiger UV-Einwirkung ist die vorzeitige Alterung der Haut. Dabei kommt es zu Veränderungen im Aufbau und damit zum Verlust ihrer Funktion. Durch die Einwirkung von energiereicher UVA- und UVB-Strahlung auf die Haut wird die Bildung von freien Radikalen induziert. Diese chemisch instabilen, hochreaktiven Atome und Moleküle sind sowohl an der vorzeitigen Hautalterung, an Entzündungsreaktionen, als auch an der Entstehung von Hauttumoren beteiligt.

Zum Schutz vor diesen hochreaktiven Molekülen existiert ein System von Radikalfängern, die durch chemische Reaktionen die Energie aufnehmen. Dabei spielt das Tocopherol, als intrazellulärer Radikalfänger eine große Rolle.

Tocopherol ist ein natürlich vorkommendes Stereoisomer, bestehend aus einem Chromanring mit einer Seitenkette aus 3 Isopren-Molekülen. Tocopherol wird in den meisten Körpergeweben nachgewiesen, in Zellkompartimenten wie Membranen, Mitochondrien, Mikrosomen und Zellkernen ist die Konzentration besonders hoch.

Die topische Applikation von Tocopherol geschieht ausschließlich unter prophylaktischen Gesichtspunkten. Dabei wirkt sich der Einsatz der geeigneten Galenik und der Hautzustand entscheidend auf das Konzentrations-Zeit-Profil des Pharmakons aus.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Penetration von α -Tocopherolacetat an humaner Mammahaut unter ex vivo Bedingungen untersucht. Dabei wurde bei konstanter α -TPA-Konzentration nur die Galenik verändert. Die eingesetzten galenischen Zubereitungen wurden mit Standardemulsionen (Öl/Wasser- und Wasser/Öl-Emulsion) verglichen.

So sind nach Kurzzeitapplikation von 30 Minuten bei Verwendung einer O/W-Emulsion als Vehikel gegenüber W/O-Emulsionen in allen Hautschichten höhere α -TPA-Konzentrationen nachweisbar, dagegen werden nach prolongierter Anwendung von 300 Minuten mit W/O-Emulsionen als Träger höhere Wirkstoffkonzentrationen erreicht. Modulation der Vehikel durch Zusatz von Mikroemulsionen oder Nanopartikeln ergab bei beiden Emulsionstypen keine entscheidende Verbesserung der α -TPA-Penetration. Dagegen konnte nach Zumischung von Hydrogel oder Physiogel zu beiden Standardemulsionen eine erhöhte α -TPA-Konzentration in allen Hautschichten sowohl nach kurzer als auch nach prolongierter Applikationszeit erreicht werden. Nach Zusatz von Hyaluronidase als Penetrationenhancer konnte bei Anwendung einer W/O-Emulsion als Vehikel eine deutlich gesteigerte α -TPA-

Penetration nachgewiesen werden, nicht jedoch bei Anwendung von O/W-Emulsionen als Arzneistoffträger.

Ob diese Ergebnisse auch unter in vivo Verhältnissen gelten, wurde an 12 Probanden am Beispiel von Physiogel[®] als Vehikel untersucht, wobei mittels einer Eluationsmethodik und HPLC-Analytik die in das Stratum corneum penetrierte α -TPA-Menge 30 und 300 Minuten nach Applikation gemessen wurde. Bereits nach 30 Minuten Einwirkung waren nahezu 94 % der applizierten α -TPA-Menge in die Haut penetriert, wobei bis 300 Minuten ein Wirkstoffreservoir im Stratum corneum von etwa 26 % der aufgetragenen Menge nachweisbar war.

Damit ergibt sich durch Modulation der galenischen Bedingungen für die topische Anwendung von α -TPA die Möglichkeit, ein optimales Konzentrations-Zeit-Profil des Wirkstoffs sowohl als Soforteffekt zu erreichen, als auch über ein Reservoir in der Hornschicht über längere Zeit aufrecht zu halten.

6 Literaturverzeichnis

1. Bässler KH, Golly I, Loew D, Pietrzik K: Vitamin-Lexikon. 2 Aufl. Gustav Fischer Verlag Stuttgart, Jena, Lübeck, usw 1997
2. Barenholz Y, Crommlin DJA: Liposomes as pharmaceutical dosage formes. In: Swarbrick J (Hrsg): Encyclopedia or Pharmaceutical Technology. Marcel Dekker, New York, Basel, Hongkong 1994
3. Bauer KH, Frömmling KH, Führer C: Pharmazeutische Technologie. Georg Thieme Verlag Stuttgart 1991
4. Baumann M, Weigmann HJ, Lademann J: Determination of UV filter concentration in relation to the tape number - determination of the recovery rate. In: Report EC Project SMT4-CT-2152, Measurements to assess sunscreen efficacy in industrial research. Berlin 1999 74 – 79
5. Birreback G, Speiser P: Polymerized micelles and their use as adjuvants in immunology. J Pharm Sci 65 (1976) 1763-1766
6. Boltri L, Morel S, Trotta M, Gasco MR: In vitro transdermal permeation of nifedipine from thickened microemulsions. J Pharm Belg 49 (1994) 315-320
7. Boscoboinik D, Szewczyk A, Hensey C, Azzi A: Inhibition of cell proliferation by α -tocopherol. J Biol Chem 266 (1991) 6188-6194
8. Bowry V, Stocker R: Tocopherol-mediated peroxidation. The prooxidant effect of vitamin E on the radical-initiated oxidation of human low-density lipoprotein. J Am Chem Soc 115 (1993) 6029-6043
9. Braun-Falco O, Plewig G, Wolff HH: Dermatologie und Venerologie. 4 Aufl. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York 1997
10. Cappel M, Kreuter J: Effect of nanoparticles on transdermal drug delivery. J Microencapsulation 8 (1991) 369-374
11. Carlfors J, Blute I, Schmidt V: Lidocaine in microemulsions- a dermal delivery system. J Dispersion science and technology 12 (5-6) (1991) 467-482
12. Chan AC, Tran K, Pyke D, Powell W: Effect of dietary vitamin E on the biosynthesis of 5-lipoxygenase products by rat polymorphonuclear leukocytes (PMNL). Biochim Biophys Acta 1005 (1989) 265-269
13. Constantinides P, Seang HY: Particles size determination of phase-inverted water in oil microemulsions under different dilution and storage condition. Int J Pharm 115 (1995) 225-234
14. Cornwell PA, Barry BW: The routes of penetration of ions and 5-fluorouracil across human skin and the mechanism of action of terpene skin penetration enhancers. Int J Pharm 94 (1993) 189-194

15. Couvreur P, Kante B, Roland M, Guiot P, Baudhin P, Speiser P: Polycyanoacrylate nanocapsules as potential lysosomotropic carriers: Preparation, morphological and sorptive properties. *J Pharm Pharmacol* 31 (1997) 331-332
16. Crommelin DJA, Schreier H: Liposomes. In: Kreuter J: Colloidal drug delivery systems. Marcel Dekker, New York, Basel, Honkong 1987
17. Dobra T, Burton GW, Ingold KU: Antioxidant and co-antioxidant activity of vitamin C either alone or in the presence of vitamin E or a water soluble vitamin E analogue, upon the peroxidation of aqueous multilamellar phospholipid liposomes. *Biochem Biophys Acta* 835 (1985) 298-302
18. Elias PM, Friend DS: The permeability barrier in mammalian epidermis. *J Cell Biol* 65 (1975) 180-191
19. Elias PM: Epidermal lipids, barrier function and desquamation. *J Invest Dermatol* 80 (1983) 44-49
20. Elias PM: Lipids and the epidermal water barrier: Metabolism, regulation and pathophysiology. *Semin Dermatol* 11 (1992) 176-182
21. Fiedler HP: Lexikon der Hilfsstoffe für Pharmazie, Kosmetik und angrenzende Gebiete. Editio Cantor Verlag, Aulendorf, 1996
22. Fisher GJ, Datta SC, Talwar HS, Wang ZQ, Varani J, Kang S, Voorhees JJ: Molecular basis of sun-induced premature skin aging and retinoid antagonism. *Nature* 379 (1996) 335-339
23. Foldvari M: In vitro cutaneous and percutaneous delivery and in vivo efficacy of tetracaine from liposomal and conventional vehicles. *Pharm Res* 11 (1994) 1593-1598
24. Franz TJ: Percutaneous absorption. On the relevance of in vitro data. *J Invest Dermatol* 64 (1975) 190-195
25. Franz TJ: The finite dose technique as a valid in vitro model for the study of percutaneous absorption in man. *Curr Prob Dermatol* 7 (1978) 58-68
26. Friberg E: Micelles, microemulsions, liquid crystals and the structure of stratum corneum lipids. *J Soc Cosmet Chem* 41 (1990) 155-171
27. Friberg E, Podzimek P: A nonaqueous microemulsion. *Coll Polym Sci* 262 (1984) 252-253
28. Friedrich W: Handbuch der Vitamine. Urban u. Schwarzenberg, München, Wien, Baltimore 1987
29. Fritsch P: Dermatologie und Venerologie. Lehrbuch und Atlas. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 1998

30. Gallarate M, Gasco MR, Trotta M, Chetoni P, Saettone MF: Preparation and evaluation in vitro of solutions and o/w microemulsions containing levobunolol as ion pair. *Int J Pharm* 100 (1993) 219-225
31. Gehring W, Fluhr J, Gloor M: Influence of vitamin E acetate on stratum corneum hydration. *Arzneimittelforschung* 48 (1998) 772-775
32. Gehring W, Klein M, Gloor M: Liposomen als Träger von Dithranol bei der Behandlung der Psoriasis vulgaris. *Z Hautkr.* 70 (1994) 419-425
33. Ghadially R, Halkier-Sorensen L, Elias PM: Effekts of petrolatum on stratum corneum structure and function. *J Am Acad Dermatol* 26 (1992) 387-396
34. Gloor M: *Pharmakologie dermatologischer Externa*. Springer Verlag Berlin, Heidelberg, New York 1982
35. Gloor M, Thoma K, Fluhr J: *Dermatologische Externatherapie. Unter besonderer Berücksichtigung Marginalrezeptur*. Springer Verlag Berlin, Heidelberg, New York 2000
36. Gloor M, Hauth A, Gehring W: O/W emulsions compromise the stratum corneum barrier and improve drug penetration. *Pharmazie* 58 (2003) 709-715
37. Golumbic C, Mattill H: Antioxidants and the antioxidation of fats. XIII. The antioxygenic action of ascorbit acid in assoziation with tocopherols, hydroquinones and related compounds. *J Am Chem Soc* 63 (1941) 1279-1280
38. Grayson S, Elias PM: Isolation and lipid biochemical characterization of stratum corneum cell membran complexes: implications for the cutaneous permeability barrier. *J Invest Dermatol* 78 (1982) 128-135
39. Grubauer G, Feingold KR, Harris RM, Elias PM: Lipid content and lipid type as determinants of the epidermal permeability barrier. *J Lipid Res* 30 (1989) 89-96
40. Gurny R, Peppas N, Harrington DD, Baker GS: Development of biogegradable and injectable latices for controlled release of potent drugs. *Drug Dev Ind Pharm* 7 (1981) 1-25
41. Handjani R, Ribier A: Topical pharmaceuticals and cosmetics containing biodegradable nanoparticles for skin treatment. *Eur Pat Appl*, 20 pp, EP 91-400684
42. Hanley K, Jiang Y, Holleran WM, Elias PM, Williams ML, Feingold KR: Glycosylceramide metabolism is regulated during normal and hormonally stimulated epidermal barrier development in the rat. *J Lipid Res* 38 (1997) 576-584
43. Hofland HEJ, Bouwstra JA, Boddé HE, Spies F, Junginger HE: Interactions between liposomes and human stratum coeneum in vitro: Freeze fracture electron microskopical visualization and small angle X-ray scattering studies. *Br J Dermatol* 132 (1995) 853-866

44. Hori M, Maibach HI, Guy RH: Enhancement of propranolol hydrochloride and diazepam skin absorption in vitro. II Drug, vehicle, and enhancer penetration kinetics. *J Pharm Sci* 81 (1992) 330-333
45. Huc A, Buffevant C, Anselme K, Levy MC, Andry, MC: A new encapsulation system: collagen-glycosaminoglycans-based capsules. *Seifen-Fette-Wachse* 117 (1991) 180-6
46. Huschka C, Schmalfuß U, Wohlrab W, Neubert R: Kolloidale Trägersysteme für die topische Applikation. *Kosmet Med* 1 (1996) 34-41
47. Janero DR: Therapeutic potential of vitamin E in the pathogenesis of spontaneous atherosclerosis. *Free Rad Biol Med* 11 (1991) 129-144
48. Jung EG: *Dermatologie*. 3. Aufl. Hippokrates Verlag, Stuttgart 1995, S 462-463
49. Junginger HE: Systematik der Dermatika- Kolloidchemischer Aufbau. In: Niedner R, Ziegenmeyer J (Hrsg.) *Dermatika*. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, 1992
50. Kadir R, Barry BW: α -Bisabolol, a possible safe penetration enhancer for dermal and transdermaltherapeutics. *Int J Pharm* 70 (1991) 87-94
51. Kagan V, Witt E, GoldmanR, Scita G, Packer L: Ultraviolet light induced generation of vitamin E radicals and their recycling. A possible photosensitizing effect of vitamin E in skin. *Free Radic Res Commun* 16 (1992) 51-64
52. Kemken J, Ziegler A, Müller BW: Investigations into the pharmacodynamic effects of dermaly administered microemulsions containing beta-blockers. *J Pharm Pharmacol* 43 (1991) 679-684
53. Kirjavainen M, Urtti A, Jaaskelainen I, Suhonen TM, Paronen P, Valjakka-Koskela R, Kiesvaara J, Monkkonen J: Interaction of liposomes with human skin in vitro-the influence of lipid composition and structure. *Biochim Biophys Acta* 1304 (1996) 179-189
54. Kohen E, Santus R, Hirschberg JG: *Photobiology*. Academic Press San Diego New York usw., 1995
55. Koosha F, Müller RH, Washington C: Production of polyhydroxybutyrate (PHB) nanoparticles for drug targeting. *J Pharm Pharmacol* 39 (1987) 136
56. Korting HC: *Dermatotherapie*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 1995
57. Kreuter J, Speiser P: In vitro studies of poly(methylmetacrylate)adjuvans. *J Pharm Sci* 65 (1976) 1624-1627
58. Kris-Etherton PM, Lichtenstein AH, Howard BV, Steinberg, D, Witztum JL: Antioxidant Vitaminsupplements and Cardiovascular Disease. *Circulation* 110 (2004) 637-641

-
59. Kriwet K, Müller-Goymann C: Diclofenac release from phospholipid drug systems and permeation through excised human stratum corneum. *Int J Pharm* 125 (1995) 231-242
 60. Kutz G, Peltner D: Aktuelle Formulierungskonzepte moderner Hautkosmetika am Beispiel der trockenen Haut. *Kosmetische Medizin* 20 (1999) 244-249
 61. Lampe MA, Burlingame AL, Whitney J, Williams MJ, Brown BE, Roitman E, Elias PM: Human stratum corneum lipids: Characterization and regional variations. *J Lipid Res* 24 (1983) 120-130
 62. Lautenschläger H, Röding J, Ghyczy M: Über die Verwendung von Liposomen aus Soja-Phospholipiden in der Kosmetik. *Seifen-Öle-Fette-Wachse* 114 (1988) 531-534
 63. Lautenschläger H: Kosmetische Formulierungen mit Liposomen und Phospholipiden-Umfeld und Zusammenhänge. *Seifen-Öle-Fette-Wachse* 115 (1989) 662-663
 64. Lautenschläger H: Liposomes in dermatological preparations-Part.1. *Cosmetics Toiletries* 105 (1990) 89-96
 65. Leung R, Shah DO: Microemulsions: An evolving technology for pharmaceutical applications. In Rosoff, M. (Hrsg.) *Controlled release of drugs: Polymers and aggregated systems*. VCH Publishers, Inc.; New York, 1989
 66. Linn EE, Pohland RC, Byrd TK: Mikroemulsion for intradermal delivery of cetyl alcohol and octyl dimethyl PABA. *Drug Dev Ind Pharm* 16 (6) (1990) 899-920
 67. Linn EE, West MP, York TO: Skin moisturizing microemulsions. *Eur. Pat. Appl.* 51 pp. EP 86-308852 (1986)
 68. Loth H: Grundlagen des intra- und transdermalen Transportes von Arzneistoffen, I. *Acta Pharm Technol* 32 (1986) 109-114
 69. Loth H: Grundlagen des intra- und transdermalen Transportes von Arzneistoffen, II. *Acta Pharm Technol* 33 (1987) 3-14
 70. Mahrle G, Bonnekoh B, Ghyczy M, Wiegand W: Stability of anthralin in liposomal phospholipids. *Arch Dermatol Res* 283 (1991) 483-484
 71. Maiorino M, Crassin M, Roveri A, Ursini F: Microsomal lipid peroxidation: Effect of Vit. E and its functional interaction with phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase. *Lipids* 24 (1989) 721-726
 72. Mak VHW, Cumpstone MB, Kennedy AH, Harmon CS, Guy RH, Potts RO: Barrier function of human keratinocyte cultures grown at the air-liquid interface. *J Invest Dermatol* 96 (1991) 323-327
 73. Mayer P, Pittermann W: The effects of vitamin E on the skin. *Cosmet Toiletr* 108 (1993) 99-109

74. Mc Cay PB, King MM: Vit.E:-a comprehensive treatise. In Malchli LJ (ed), Marcel Dekker, New York, Basel 1980
75. Mc Cay P: Vit. E: Interactions with free radicals and ascorbate. *Ann Rev Nutr* 5 (1985) 323-340
76. Mc Vean M, Liebler DC: Prevention of DNA photodamage by vitamin E compounds and sunscreens: role of ultraviolet absorbance and cellular uptake. *Mol Carcinog* 24 (1999) 169-176
77. Meister A: Gluthadione-ascorbic acid antioxidant system in animals. *J Biol Chem* 269 (1994) 9397-9400
78. Menon GK, Elias PM: Morphologic basis for a pore-pathway in mammalian stratum corneum. *Skin Pharmacol* 10 (1997) 235-246
79. Michel C, Purmann T, Mentrup E, Michel G, Kreuter E: Topical application of an antiphlogistic drug in liposomes. *Proc. Program Int Symp Controlled Release Bioact Mater*, 18th, 485-6. Editor(s):Kellaway, Ian W. publisher: Controlled Release Soc, Deerfield, III. 1991
80. Mino M, Kitiagawa M, Nakagawa S: Changes of alpha-tocopherol levels in red blood cells and plasma with respect to hemolysis induced by dialuric acid in vitamin E deficient rats. *J Nutr Sci Vitaminol* 27 (1981) 199-207
81. Naylor MF: Erythema, skin cancer risk, and sunscreens. *Arch Dermatol* 133 (1997) 373-375
82. Neubert R, Wohlrab W, Marsch W: *Dermatopharmazie*. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart 2001
83. Niedner R, Ziegenmeyer J: *Dermatika*. 2.Aufl. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart, 1992
84. Niki E: Antioxidants in relation to lipid peroxidation. *Chem Phys Lipids* 44 (1987) 227-253
85. Oethinger M: *Mikrobiologie und Immunologie*. 8. Aufl. Jungjohann Verlagsgesellschaft, Neckarsulm, Lübeck, Ulm, 1994
86. Ozegowski JH, Hertel W, Müller PJ, Peschel G: Enzyme des Hyaluronsäuremetabolismus. In: Wohlrab W, Neubert RHH, Wohlrab J (Hrsg.): *Hyaluronsäure und Haut*. Shaker Verlag Aachen, 2004
87. Pfüller U: *Mizellen, Vesikel, Mikroemulsionen*. (Tensidassoziate und ihre Anwendung in Analytik und Biochemie), Verlag Volk und Gesundheit, Berlin 1986
88. Price LM: *Microemulsions. Theory and practice*. Academic press Inc., NewYork, San Francisco, London, 1977
89. Produktinformation Firma Stiefel, Mai 2003

-
90. Rawlings AV, Mayo AM, Rogers J, Scott IR: Aging and the seasons influence stratum corneum lipid levels. *J Invest Dermatol* 101 (1993) 483
 91. Rössler B, Kreuter J, Ross G: Effect of collagen microparticeles on the stability of retinol and is asorption into hairless mouse skin. *Pharmazie* 49 (1994) 175-179
 92. Romeis B, Böck P (Hrsg.): *Mikroskopische Technik*. Urban &. Schwarzenberg München, Wien, Baltimore, 1989
 93. Saint Ruth H, Attwood D, Ktistis G, Taylor CJ: Phase studies and particle sizes analysis of oil-in-water phospholipid microemulsions. *Int J Pharm* 116 (1995) 253-261
 94. Schäfer-Korting M, Korting HC, Ponce-Poschl E: Liposomal tretinoin for uncomplicated acne vulgaris. *Clin Invest* 72 (1994) 1086-1091
 95. Schäfer H, Redelmeier TE: *skin barrier. principes of percutaneous absorption*. Karger Verlag, Basel, 1996
 96. Scheuplein RJ, Blank JH: Permeability of the skin. *Physiol Rev* 51 (1971) 702-747
 97. Schlippe M, Ständer M: Anwendung einer Crème mit membranbildenden Lipiden bei Patienten mit atopischer Dermatitis. *Haut* 17 (2003) 33-35
 98. Schmalfuß U: Untersuchungen zur Modulation der Penetration eines hydrophilen Arzneistoffes aus Mikroemulsionssystemen in humane Haut unter ex vivo-Bedingungen. Dissertation, Math.-Nat.-Tech. Fak., Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, 1997
 99. Schmidt, KH: Durch freie Radikale verursachte Krankheiten - Ätiologie und Prävention. In: Schmidt KH, Wildmeister W (Hrsg.): *Vitamin E in der modernen Medizin*. Schriftenreihe der Nordrheinischen Akademie für ärztliche Fort- und Weiterbildung, MKM Verlagsgesellschaft Lenggries/Obb. 8, 1993, S 67-76
 100. Schreier H, Bouwstra J: Liposomes and niosomes as topical drug carriers: dermal and transdermal delivery. *J Contol Rel* 30 (1994) 1-15
 101. Schückler F, Lee G: Relating the concentration-dependent action of Azone and dodecyl-L-pyroglutamate on the structure of excised human stratum corneum to changes in drug diffusivity, artition coefficient and flux. *Int J Pharm* 80 (1992) 81-89
 102. Sharma BB, Jain SK, Yyas SP: Topical Liposome system bearing local anaesthetic lidocaine: preparation and evaluation. *J Mikrocapsulation* 11 (1994) 279-286
 103. Shindo Y, Witt E, Packer L: Antioxidant defense mechanisms in murine epidermis and dermis and their response to ultraviolet light. *J Invest Dermatol* 100 (1993) 260-265
 104. Steiner M, Anastasi J: Vit. E: An inhibitor of the platelet release reaction. *J Clin Invest* 57 (1976)

105. Tammi R, Ripellino JA, Margolis RU, Tammi M: Localization of epidermal hyaluronic acid using the hyaluronate binding region of cartilage proteoglycan as a specific probe. *J Invest Dermatol* 90 (1988) 412-4
106. Tappel AL: Vitamin E: a biological antioxidant. *Vitam Horm (N.Y.)* 20 (1962) 439-510
107. Thacharodi D, Panduranga Rao K: Transdermal absorption of nifedipine from microemulsions of lipophilic skin penetration enhancers. *Int J Pharm* 111 (1994) 235-240
108. Thiele JJ, Traber MG, Packer L: Depletion of human stratum corneum vitamin E: an early and sensitive in vivo marker of UV induced photo-oxidation. *J Invest Dermatol* 110 (1998) 756-761
109. Traber MG, Sies H: Vit.E in humans- Demand and delivery. *Annu Rev Nutr* 16 (1996) 321-347
110. Weber E: Grundriss der Biologischen Statistik. Anwendungen der mathematischen Statistik in Forschung, Lehre und Praxis. Gustav Fischer Verlag, Jena, 1980
111. Wefers H, Sies H: The protection by ascorbate and glutathione against microsomal lipid peroxidation is dependent on vitamin E. *Eur J Biochem* 174 (1988) 353-357
112. Weigmann HJ, Lademann J, v.Pelchrzim R, Sterry W, Hagemeister T, Molzahn R, Schäfer M, Linscheid M, Schaefer H: Bioavailability of clobetasol propionate - quantification of drug concentrations in the stratum corneum by dermatopharmacokinetics using tape stripping. *Skin Pharm* 12 (1998) 46-53
113. Wohlrab J: Der Einfluß liposomaler Lipide auf das Proliferationsverhalten humaner Keratinozyten. Dissertation, Med. Fak., Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, 1995
114. Wohlrab W, Lasch J: Penetration kinetics of liposomal hydrocortisone in human skin. *Dermatologica* 174 (1989) 18-22
115. Wohlrab W, Lasch J, Laub R, Taube CM, Wellner K: Distribution of liposomal-encapsulated ingredients in human skin ex vivo. In: Braun-Falco O, Korting HC, Maibach HI: Liposome Dermatics Griesbach Conference, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, 1992
116. Worret WI, Gehring W: Kosmetische Dermatologie. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg 2004
117. Wu D, Mura C, Beharka AA, Han SN, Paulson KE, Hwang D, Meydani SN: Age-associated increase in PGE2 synthesis and COX activity in murine macrophages is reversed by vitamin E. *Am J Physiol* 275 (1998) 661-668

7 Thesen

1. Das Stratum corneum ist aufgrund seiner struktur-funktionellen Gegebenheiten die Hauptpenetrationsbarriere für topisch applizierte Wirkstoffe.
2. UV-Strahlung ist maßgeblich sowohl an der vorzeitigen Hautalterung als auch an der Entstehung von Hauttumoren beteiligt.
3. Durch die UV-Strahlung wird die Bildung von hochreaktiven Sauerstoffspezies induziert, die entscheidend für diese Prozesse verantwortlich sind.
4. Tocopherol ist einer der wichtigsten intrazellulären Radikalfänger.
5. Die prophylaktische Applikation von α -Tocopherolacetat reduziert oder verhindert die schädigende Radikalwirkung.
6. Neben der Eigenschaft als Radikalfänger besitzt Tocopherol eine antiinflammatorische Wirkung, sowie eine stabilisierende Wirkung auf Membranen.
7. Entscheidend für jede therapeutische Wirkung einer Pharmakotherapie ist die Erreichung eines günstigen Konzentrations-Zeit-Profiles des Wirkstoffs in der zu behandelnden Hautschicht.
8. Bei der topischen Applikation von Pharmaka ist die Konzentration des verwendeten Wirkstoffes, der Zustand der zu behandelnden Haut, sowie die eingesetzte Galenik von Bedeutung.
9. Durch den Einsatz verschiedener Vehikel kann die Penetrationskinetik eines topisch applizierten Pharmakons, bei Konstanz der Konzentration und des Hautzustandes, unterschiedlich beeinflusst werden.
10. Bei Anwendung von α -TPA in einer O/W-Emulsion lassen sich in allen Hautschichten nach Kurzzeitapplikation von 30 Minuten die höchsten Wirkstoffkonzentrationen erreichen.

-
11. Bei prolongierter Applikation von 300 Minuten sind W/O-Emulsionen als Vehikel für α -TPA zur Erreichung eines günstigen Konzentrations-Zeit-Profiles vorzuziehen.
 12. Die Modulation der Vehikel durch Zusatz von Mikroemulsionen oder Nanopartikel ergab bei beiden Emulsionstypen keine Verbesserung der α -TPA-Penetration.
 13. Der Zusatz von Hydrogel oder Physiogel[®] zu den Standardemulsionen ergab eine erhöhte α -TPA-Konzentration in allen Hautschichten sowohl nach 30 als auch nach 300 Minuten Penetrationszeit.
 14. Durch Zusatz von Hyaluronidase als Penetrationsenhancer konnte bei Anwendung einer W/O-Emulsion eine deutliche Steigerung der α -TPA-Penetration nachgemessen werden, nicht jedoch bei Anwendung einer O/W-Emulsion als Wirkstoffträger.
 15. Nach Auswahl eines Vehikels wurde am Beispiel von Physiogel unter in vivo Bedingungen die Penetrationskinetik von topisch appliziertem α -Tocopherolacetat an 12 gesunden Probanden untersucht.
 16. Durch Eluation der lipophilen Anteile des Stratum corneums und anschließender Analytik des Eluates lässt sich die penetrierte α -Tocopherolacetat- Menge ermitteln.
 17. Mit der Kenntnis der in das Stratum corneum penetrierten Wirkstoffmenge und unter Berücksichtigung des auf der Hautoberfläche verbliebenen Rückstandes lassen sich die Wirkstoffmengen berechnen.
 18. Nach 30 minütiger Einwirkzeit waren mit Physiogel[®] als Vehikel bereits 93% des eingesetzten Wirkstoffs in die Haut penetriert. Davon wurden auch nach 300 Minuten ein Reservoir von 26% des eingesetzten Wirkstoffs im Stratum corneum wiedergefunden.
 19. Auch nach prolongierter Anwendung kam es zu keiner wesentlichen Änderung der im Stratum corneum wiedergefundenen oder in tiefere Hautschichten penetrierten Wirkstoffmenge.

-
20. Für die topische Anwendung von α -TPA ergibt sich damit die Möglichkeit, durch Variation der eingesetzten Vehikel oder/und durch Modulation der galenischen Bedingungen eine optimale Wirkstoffkonzentration in der Haut sowohl als Soforteffekt als auch über längere Zeit zu erreichen.

Lebenslauf

Name: Olaf Hölsken
Geurtsdatum: 02. Dezember 1970
Geburtsort: Halle/Saale
Nationalität: deutsch
Familienstand: verheiratet mit Antje Hanni Hilde Hölsken,
1 Tochter (geb. am 26.01.02) und 1 Sohn (geb. am 25.09.03)

Ausbildung

1977-1987 Polytechnische Oberschule „ Hans Beimler“ in Halle-Neustadt
1987-1990 Berufsausbildung zum Facharbeiter für chemische Produktion
mit Abitur an der Betriebsberufsschule der Leuna-Werke in
Leuna
1990-1993 Ausbildung zum Krankenpfleger an der Medizinischen
Fachschule der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
1993-1994 Tätigkeit als Krankenpfleger
1994-2000 Studium der Humanmedizin an der Martin-Luther-Universität
Halle-Wittenberg
Ärztliche Vorprüfung 09/96
1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung 09/98
2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung 09/99
3. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung 10/00
01.12.2000-31.05.2002 Arzt im Praktikum an der Klinik für Anästhesiologie und
Intensivmedizin des Universitätsklinikums der Martin-Luther-
Universität Halle-Wittenberg
Seit 01.06.2002 Ausbildung zum Facharzt für Anästhesie an der Klinik für
Anästhesiologie und Intensivmedizin des Universitätsklinikums
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

Halle/Saale, den

Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässig Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die von mir verwendeten Quellen, Daten und Konzepte sind unter Angabe ihrer Herkunft gekennzeichnet.

Ich versichere, dass ich für die inhaltliche Erstellung der vorliegenden Arbeit keine entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- und Beratungsdiensten (Promotionsberater oder andere Personen) in Anspruch genommen habe. Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Halle/Saale, den

Olaf Hölsken

Danksagung

Die vorliegende Arbeit entstand an der Universitätsklinik und Poliklinik für Dermatologie und Venerologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.

Vor allem möchte ich meinem Betreuer, Herrn Prof. Dr. rer. nat. habil. W. Wohlrab, dem Leiter der Arbeitsgruppe Experimentelle Dermatologie, für die freundliche Überlassung des Themas und die kontinuierliche und zeitaufwendige Betreuung dieser Arbeit danken.

Des weiteren danke ich Herrn Dr. Ch. Huschka, Herrn PD Dr. med. habil. J. Wohlrab sowie den MTA's der Arbeitsgruppe Experimentelle Dermatologie, Frau U. Schramm und Frau K. Hölsken, für die tatkräftige Unterstützung während des praktischen Teils dieser Arbeit.

Besonderer Dank gilt auch Herrn PD Dr. rer. nat. habil. H.-H. Rüttinger vom Institut für Pharmazeutische Chemie am Fachbereich Pharmazie für die Durchführung der HPLC-Analytik.