

**Untersuchungen zur Wirkung von Biotin auf humane Keratinozyten
und zur Modulation der Biotinpenetration in humane Haut**

Dissertation



zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

vorgelegt der

Mathematisch-Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät
(mathematisch-naturwissenschaftlicher Bereich)
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Herrn Dipl.-Pharm. Christoph Huschka
geboren am 08.02.1969 in Naumburg

Gutachter:

1. Prof. Dr. rer.nat. W. Wohlrab
2. Prof. Dr. rer.nat. R. Neubert
3. Prof. Dr. med. W.-I. Worret

Halle (Saale), den 27.11.1998

Abstract:

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluß von Biotin auf humane kultivierte Keratinozyten untersucht. Dabei bestand das vorrangige Ziel in der Klärung des Wirkungsmechanismus bzw. der zellulären Reaktion des Keratinozyten auf verschiedene Wirkstoffkonzentrationen. Die Ergebnisse zeigten eine hohe Toleranz der Zellsystems gegenüber dem Vitamin. Sowohl die Proliferation als auch der Ablauf der Differenzierung der Keratinozyten können frei vom Einfluß des Biotins gewertet werden. Gleiches gilt für den regulative Einfluß auf die Apoptose, die durch Fettsäuren induziert wurde. Nach Überschreiten einer notwendigen Schwellkonzentration war eine steigernde Wirkung von Biotin auf die Synthese von Lipiden im Kerationzyten nachweisbar.

Aufbauend auf die ermittelten epidermal wirksamen Biotinkonzentrationen schloß sich eine Studie zum Penetrationsverhalten von topisch appliziertem Biotin in humane Haut *ex vivo* an. Innerhalb dieser Untersuchungen lag der Schwerpunkt auf der systematischen Penetrationsbeeinflussung. Dabei galt das Interesse neben der Vehikelmodulation durch die Anwendung verschiedener kolloidaler Arzneistoffträgersysteme auch der gezielten Modulation von standardisierten Emulsionen. Nach den vorliegenden Ergebnissen eignen sich die Modulatoren Hyaluronidase und Harnstoff besonders für den effektiven Transport von Biotin in die lebenden Schichten der Haut.

In the present study the influence of biotin on human cultured keratinocytes was examined. The prior-ranking aim was to characterize the effect mechanism and the cellular reaction of the keratinocytes to different drug concentrations. The human epidermal cells have shown a high tolerance of the vitamin. Both the proliferation and the differentiation of the keratinocytes can be judged to be free of the influence of biotin. No regulatory influence on the apoptosis, which was induced by fatty acids, could be detected. After exceeding a necessary swelling concentration an increasing effect of biotin on the lipid synthesis in the kerationcytes was provably.

Following the results from the cell culture and the known necessary effective concentration of biotin we determined the penetration behavior of topical applied biotin into human skin *ex vivo*. Within these examinations the main interest lay on the systematic modulation of the penetration behavior. So we compared the biotin penetration from standardized emulsions with modulated emulsions and with different types of biotin containing colloidal drug carriers too. Our results particularly recommend the use of the modulators hyaluronidase and urea for an effective enhancement of biotin into the living layers of the skin.

Keywords:

biotin, human keratinocytes, fatty acid synthesis, proliferation, differentiation, apoptosis, topical application, modulation of penetration, hyaluronidase, urea

Die vorliegende Arbeit entstand in der Arbeitsgruppe Experimentelle Dermatologie der Klinik und Poliklinik für Hautkrankheiten der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg unter Anleitung von Herrn Professor Dr. W. Wohlrab, dem ich herzlichst für die freundliche Überlassung des Themas, die ständige Diskussionsbereitschaft, die hilfreiche Unterstützung und die Freiheit bei der Bearbeitung der Aufgaben danken möchte.

Mein besonderer Dank gilt weiterhin Herrn Professor Dr. R. Neubert vom Institut für Pharmazeutische Technologie und Biopharmazie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg für die wertvollen Gespräche, Hinweise und Anregungen bei der Lösung von galenischen Problemen.

Herrn Dr. Ozegowski von der Friedrich-Schiller-Universität Jena möchte ich meinen Dank für die Bereitstellung der Hyaluronidase aussprechen.

Für die Synthese des Trägermaterials Sconacell® A bin ich Herrn Dr. Pluder von der BSL Olefinverbund GmbH (Schkopau) zu Dank verpflichtet.

Frau Dr. U. Schmalfuß (Institut für Pharmazeutische Technologie und Biopharmazie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg), der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. W. Meyer (Institut für Ultrastrukturforschung Friedrich-Schiller-Universität Jena) und der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. H. Graener (Fachbereich Physik Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg) danke ich für die konstruktive und hilfreiche Zusammenarbeit bei der Entwicklung und Charakterisierung der kolloidalen Arzneistoffträgersysteme.

Frau K. Hölsken, Frau U. Schramm und Frau H. Schmidt aus dem Labor der Klinik und Poliklinik für Hautkrankheiten danke ich sehr herzlich für die angenehme Arbeitsatmosphäre sowie die umfangreiche und unermüdliche Zusammenarbeit bei der experimentellen Durchführung der Untersuchungen an humaner Haut ex vivo und an humanen Keratinozyten in vitro.

Ebenso sei Herrn Dipl.-Biochem. D. Fröde und Herrn Dipl.-Phys. T. Klapperstück (Arbeitsgruppe Experimentelle Dermatologie) herzlichst für die hilfreiche Unterstützung bei den flowzytometrischen Untersuchungen gedankt.

Weiterhin bedanke ich mich bei Frau M. Woigk, Herrn Dipl.-Chem. R. Wolf und Herrn Dipl.-Pharm. K. Raith vom Institut für Pharmazeutische Technologie und Biopharmazie für die Durchführung der GC-MS- und HPLC-MS-Messungen.

Nicht zuletzt danke ich allen ungenannten Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Experimentelle Dermatologie, der Klinik und Poliklinik für Hautkrankheiten, des Fachbereiches Pharmazie, des Graduiertenkolleges "Transport von Wirkstoffen in biologischen Systemen" und des SFB-197 "Bio- und Modellmembranen", die durch ihr fachliches oder auch freundschaftliches Engagement mit zum Gelingen der Arbeit beigetragen haben.

INHALTSVERZEICHNIS

Seite

1 EINLEITUNG UND ZIELSTELLUNG.....	1
2 THEORETISCHE GRUNDLAGEN.....	3
2.1 Das Organ menschliche Haut.....	3
2.1.1 Aufbau und Funktion.....	3
2.1.2 Die Barrierefunktion des Stratum corneum.....	4
2.1.3 Der Keratinozyt.....	6
2.1.3.1 Proliferation des Keratinozyten.....	8
2.1.3.2 Differenzierung des Keratinozyten.....	8
2.2 Zellkultur humaner Keratinozyten.....	9
2.3 Grundlagen der dermalen Wirkstoffaufnahme.....	10
2.3.1 Passiver Transport - Diffusion.....	10
2.3.2 Solvent drag - Konvektion.....	11
2.3.3 Verteilungsverhalten und Thermodynamische Aktivität.....	11
2.4 Modulation der Wirkstoffpenetration.....	13
2.4.1 Kolloidale Trägersysteme.....	13
2.4.1.1 Nanopartikel.....	13
2.4.1.2 Liposomen.....	15
2.4.1.3 Mikroemulsionen.....	17
2.4.2 Konventionelle Penetrationsmodulation.....	19
2.5 Biotin.....	22
2.5.1 Physikochemische Eigenschaften.....	22
2.5.2 Pharmakologie des Vitamins.....	22
2.5.3 Dermatologische Relevanz von Biotin.....	23
3 IN VITRO-UNTERSUCHUNGEN ZUM EINFLUß VON BIOTIN AUF HUMANE KERATINOZYTEN..	24
3.1 Einfluß auf die Proliferation von Keratinozyten.....	24
3.1.1 Untersuchungen zum ³ [H]-Thymidin-Einbau in die DNA.....	24
3.1.2 Durchflußzytometrische Untersuchungen zum Proliferationsverhalten.....	26
3.2 Einfluß von Biotin auf die Differenzierung von Keratinozyten.....	29
3.2.1 Durchflußzytometrische Untersuchungen zur Involucrin-Expression.....	29
3.2.2 Durchflußzytometrische Untersuchungen zum intrazellulären Calciumgehalt.....	30
3.3 Untersuchungen zur Beeinflussung der Apoptose von HaCaT-Keratinozyten.....	33
3.4 Fettsäuresynthese von Keratinozyten.....	35
3.4.1 Untersuchungen zum Fettsäuregehalt von Keratinozyten unter Einwirkung von Biotin.....	35

4 CHARAKTERISIERUNG DER BIOTINHALTIGEN FORMULIERUNGEN.....	39
4.1 Biotinhaltige kolloidale Trägersysteme	39
4.1.1 Nanopartikel.....	39
4.1.1.1 Komponenten der Partikelsysteme	39
4.1.1.2 Charakterisierung der Partikelsysteme.....	40
4.1.2 Liposomen.....	40
4.1.2.1 Komponenten der liposomalen Systeme	40
4.1.2.2 Charakterisierung der liposomalen Systeme.....	41
4.1.3 Mikroemulsionen.....	42
4.1.3.1 Komponenten der Mikroemulsionen	42
4.1.3.2 Charakterisierung der Mikroemulsionen	43
4.2 Biotinhaltige Emulsionen.....	44
4.2.1 Standardemulsionen.....	44
4.2.2 Modifizierte Emulsionen.....	46
5 UNTERSUCHUNGEN ZUR LIBERATION VON BIOTIN AUS VERSCHIEDENEN VEHIKELSYSTEMEN IN KÜNSTLICHE MEMBRANEN.....	48
5.1 Modellbeschreibung.....	48
5.2 Liberation von Biotin aus kolloidalen Trägersystemen.....	49
5.2.1 Nanopartikel.....	49
5.2.2 Liposomen.....	50
5.2.3 Mikroemulsionen.....	51
5.3 Liberation von Biotin aus modifizierten Emulsionen	52
5.3.1 O/W-Vehikel	52
5.3.2 W/O-Vehikel	53
6 UNTERSUCHUNGEN ZUR PENETRATION VON BIOTIN IN HUMANE HAUT EX VIVO	55
6.1 Modellbeschreibung und Versuchsbedingungen	55
6.2 Modulation der Penetration durch kolloidale Arzneistoffträger	56
6.2.1 Nanopartikel.....	56
6.2.2 Liposomen.....	58
6.2.3 Mikroemulsionen.....	60
6.3 Penetration von Biotin aus modifizierten Emulsionen.....	63
6.3.1 Hyaluronidasehaltige O/W-Emulsionen.....	63
6.3.2 Hyaluronidasehaltige W/O-Emulsionen.....	66
6.3.3 Harnstoffhaltige O/W-Emulsionen	68
6.3.4 Harnstoffhaltige W/O-Emulsionen	70
6.3.4.1 Eigenpenetration des Modulators Harnstoff in humane Haut ex vivo.....	72

7 ZUSAMMENFASSUNG	76
7.1 In vitro-Untersuchungen zum Einfluß von Biotin auf humane Keratinozyten	76
7.2 Untersuchungen zur Liberation von Biotin in artifizielle Lipidmembranen.....	77
7.3 Untersuchungen zur Penetration von Biotin in humane Haut ex vivo.....	78
8 EXPERIMENTELLER TEIL.....	80
8.1 Zellkultur	80
8.1.1 Herstellung der Biotin-Lösungen.....	80
8.1.2 Kulturbedingungen humaner Keratinozyten (HaCaT, native Keratinozyten).....	80
8.1.3 Proliferationsverhalten von Keratinozyten	81
8.1.3.1 Bestimmung des ³ [H]-Thymidin-Einbaus in die DNA	81
8.1.3.2 Durchflußzytometrische Bestimmung der Wachstumsfraktion.....	81
8.1.4 Differenzierungsverhalten von Keratinozyten	82
8.1.4.1 Durchflußzytometrische Bestimmung von Involucrin	82
8.1.4.2 Durchflußzytometrische Bestimmung der intrazellulären Ca ²⁺ -Konzentration	84
8.1.5 Durchflußzytometrische Bestimmung der Apoptose.....	84
8.1.6 Durchführung der Untersuchungen zum Lipidstoffwechsel	85
8.1.6.1 Durchführung der Lipid-Extraktion.....	85
8.1.6.2 Bestimmung des Proteingehaltes.....	85
8.1.6.3 Analytik der Fettsäuren mittels GC-MS.....	85
8.2 Herstellung und Charakterisierung der Vehikelsysteme.....	86
8.2.1 Nanopartikel.....	86
8.2.2 Liposomen.....	87
8.2.3 Mikroemulsionen.....	88
8.2.4 Emulsionen.....	89
8.2.4.1 Standardemulsionen.....	89
8.2.4.2 Modifizierte Emulsionen	89
8.3 Liberationsuntersuchungen am Mehrschichtmembranmodellsystem.....	90
8.3.1 Glycerol-Collodium-Membranen.....	90
8.3.2 Versuchsdurchführung.....	90
8.4 Penetrationsuntersuchungen an humaner Haut ex vivo	91
8.4.1 Versuchsvorbereitung und -durchführung.....	91
8.4.1.1 Präparation des biologischen Materials.....	91
8.4.1.2 Versuche mit radioaktiv markierten Substanzen.....	91
8.4.1.3 Chromatographieversuche.....	92
8.4.2 Histologische Untersuchungen zur Bestimmung der mittleren Epidermisbreite.....	92
8.4.3 Biotin-Analytik mittels HPLC-MS	92
8.5 Statistische Auswertung der Versuchsergebnisse.....	94

Inhaltsverzeichnis

8.6 Verwendete Substanzen.....95

8.7 Verwendete Geräte und Hilfsmittel.....97

Literaturverzeichnis

Anhang

Lebenslauf

ABKÜRZUNGS- UND SYMBOLVERZEICHNIS

α	thermodynamische Aktivität
Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
BA	Benzalkoniumchlorid
bidest.	bidestillata
bzw.	beziehungsweise
Chol.	Cholesterol
cpm	counts per minute
c_0	Ausgangskonzentration
c_s	Sättigungskonzentration
DAB	Deutsches Arzneibuch
DFG	Deutsche Forschungsgemeinschaft
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DMSO	Dimethylsulfoxid
dpm	desintegration per minute
et al.	und Mitarbeiter
FL1	Fluoreszenz 1
Fluo-3/AM	{1-[2-Amino-5-(2,7-dichloro-6-hydroxy-3-oxo-3H-xanthen-9-yl)]-2-(2'-amino-5'-methylphenoxy)ethane-N,N,N',N'-tetraaceticacid-pentaacetoxymethylester}
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
γ -LA	γ -Linolensäure
GC-MS	Gaschromatographie-Massenspektrometrie
HaCaT	Human adult low Calcium high Temperatur Keratinocytes
HBSS-Lösung	HEPES buffered salt solution
HEPES	2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]-ethan-sulfonsäure
HLB	Hydrophilic Lipophilic Balance
HPLC	High-Performance Liquid Chromatography
HPLC-MS	High-Performance Liquid Chromatography-Mass Spectroscopy
IE	Internationale Einheiten
INT	2-(4-Iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-phenyltetrazoliumchlorid
Kap.	Kapitel
LA	Linolensäure
LDH	Lactatdehydrogenase
m	Masse
M	Molmasse
ME	Mikroemulsion
MFI	mittlere Fluoreszenzintensität
MSMM	Mehrschichtmembranmodell
MTT	3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazoliumbromid

Abkürzungs- und Symbolverzeichnis

n	Anzahl der Stichproben
p	Irrtumswahrscheinlichkeit
p.a.	pro analysi
PA	Palmitinsäure
PC	Phosphatidylcholin
PCNA	proliferation associated nuclear antigen
PCS	Photonenkorrelationsspektroskopie
OA	Ölsäure
ORS	outer root sheath
O/W	Öl-in-Wasser
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCNA	Proliferating Cell Nuclear Antigen
PI	Propidiumiodid
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
SA	Stearinsäure
STA	Stärkeacetat
SD	standard deviation (Standardabweichung)
SDS	Natriumdodecylsulfat
SEM	standard error of means (Standardfehler des Mittelwertes)
SFB	Sonderforschungsbereich
Tab.	Tabelle
TEWL	transepidermaler Wasserverlust
TRU	Turbidity reducing units
U. S. P.	The Pharmacopoeia of the United States of America
vs	versus
W/O	Wasser-in-Öl

1 EINLEITUNG UND ZIELSTELLUNG

Die Zunahme der Studien über die Wirksamkeit von Biotin-Präparaten bei Haut-, Haar- und Nagelerkrankungen in den letzten Jahren zeigt das rege Interesse an einem für die Haut relevanten Wirkstoff. Durch eine kontrollierte Biotintherapie konnte die Bedeutsamkeit bei weichen, brüchigen und splitternden Nägeln, unterschiedlichen Formen der Alopezie sowie atopischer und seborrhoischer Dermatitis nachweislich aufgezeigt werden (Bitsch und Bartel, 1994; Colombo et al., 1990; Floersheim, 1989; Gehring, 1996). Der therapeutische Erfolg nach oraler Applikation von Biotin (Vitamin H = Hautvitamin) kann zwar als frei von Nebenwirkungen eingestuft werden, er bleibt jedoch an die Notwendigkeit eines ausgedehnten Behandlungszeitraums (mehrere Monate) gebunden (Siebert und Schneeweiß, 1996).

Über erste Erfahrungen der Auswirkungen topisch applizierter biotinhaltiger Formulierungen mit einem Biotingehalt von 0,25% und 0,50% berichteten GILLI und FLOERSHEIM (1995). Sie wiesen durch die Anwendung von Biotin eine sichtbare Reduktion der Fältchenausprägung an der Altershaut nach. Dabei konnten keinerlei epitheliale und histopathologische Veränderungen der behandelten Areale aufgezeigt werden.

Ungeachtet der positiven klinischen Erfahrungen mit diesem Vitamin erscheint die Klärung des Wirkungsmechanismus unvollständig. Der bisherige Kenntnisstand weist Biotin als Coenzym einer Reihe von Carboxylasen aus, die in verschiedene lebenswichtige Stoffwechselfunktionen (Ablauf der Gluconeogenese, Fettsäure- und Aminosäuresynthese) eingebunden sind. Hierbei fungiert das Vitamin als biochemischer Carboxylgruppenüberträger (Bitsch und Bartel, 1994).

Neben seiner Funktion als Coenzym sind die eigenständigen pharmakologischen Effekte des Biotins, z. B. die Beeinflussung der Keratinstruktur, für den therapeutischen Einsatz von Interesse (Floersheim, 1989; Floersheim 1992; Schmidt, 1993). Der zugrundeliegende Mechanismus des Einflusses auf das Wachstums- und Differenzierungsverhalten der Keratinozyten wird jedoch kontrovers diskutiert (Fritsche, 1990; Fritsche et al., 1991; Limat et al., 1996). Diese Differenzen über die unterschiedlichen Reaktionen des zellulären Systems gaben den Anlaß zu gezielten Untersuchungen zum Einfluß von Biotin auf den Keratinozyten. Von besonderer Bedeutung waren hierbei neben der Charakterisierung von Proliferation und Differenzierung, Effekte des Vitamins auf grundlegende Stoffwechselfunktionen, wie die Fettsäuresynthese. Zur umfassenden Klärung dieser Fragestellungen standen verschiedene in vitro-Kulturen in Form der HaCaT-Zelllinie und nativer Primärkulturen von Keratinozyten zur Verfügung (Boukamp et al., 1988).

Bedingt durch seine hydrophilen Eigenschaften kann Biotin zu den Problemarzneistoffen gezählt werden. Für diese Substanzklasse stellt das Stratum corneum mit seiner Lipophilie und der geringen Hydratation im Normalzustand eine Penetrationsbarriere von besonderer Dimension dar. Mit dem zusätzlich schlechten Löslichkeitsverhalten gegenüber den meisten dermatologisch relevanten Lösungsmitteln stellen sich bei diesem Wirkstoff besondere galenische Anforderungen an die Vehikelkomposition.

Ein Hauptschwerpunkt der Arbeit lag deshalb in der Variation und Optimierung der Vehikel für die Applikation von Biotin. Ein Teil der galenischen Entwicklung eines effektiven Vehikels für den gezielten Transport von Biotin in die epidermalen Schichten der Haut bestand in der klassischen Modulation des Vehikels. Die Realisierung der Vehikeloptimierung wurde durch Inkorporation

einerseits von bewährten Penetrationsmodulatoren, andererseits von spezifischen Enzymen zur Beeinflussung der Barrierefunktion des Stratum corneum angestrebt.

Im Vergleich zu den sogenannten klassischen Vehikeln ist eine fortschreitende Entwicklung auf dem Gebiet der dermalen Anwendung der kolloidalen Arzneistoffträgersysteme wie Nanopartikel, Liposomen und Mikroemulsionen zu verzeichnen (Huschka et al., 1996; Schmalfuß, 1997). Aus diesem Grund wurde ein besonderes Augenmerk auf deren Verwendung für die Applikation von Biotin gerichtet.

Zur Untersuchung der Effektivität dieser modernen Vehikelsysteme wurden diese in bezug auf Standardvehikel (O/W- und W/O-Emulsion) verglichen. Zunächst galt es, die Veränderungen der Liberation des Biotins unter Nutzung des Mehrschichtmembranmodells nach FÜRST-NEUBERT zu erfassen (Neubert et al., 1991). Im Anschluß daran erfolgte die Charakterisierung der Systeme hinsichtlich der Penetration. Die Erstellung der Penetrationsprofile von Biotin in die humane Haut ex vivo sollte unter Verwendung der Diffusionszelle nach FRANZ geschehen (Franz, 1975).

In der vorliegenden Arbeit wurde folgenden Fragestellungen schwerpunktmäßig nachgegangen.

1. Welchen Einfluß übt Biotin auf die Proliferation und Differenzierung humaner Keratinozyten aus? (Kap. 3)
2. Gibt es einen direkten Zusammenhang zwischen der Einwirkung von Biotin und der Lipidsynthese des epidermalen Zellsystems? (Kap. 3)
3. Wie ist die Wirkung von verschiedenen Modulatoren (Einzelstoffe, komplexe Systeme) hinsichtlich der Liberation von Biotin aus unterschiedlichen Vehikeln zu bewerten? (Kap. 5)
4. Welche Bedeutung besitzen kolloidale Arzneistoffträgersysteme (Mikroemulsion, Liposomen, Nanopartikel) für die topische Applikation des verwendeten hydrophilen Arzneistoffs? (Kap. 6)
5. Inwieweit kann die Penetration von Biotin in die humane Haut durch die Verwendung von spezifischen Modulatoren beeinflusst werden? (Kap. 6)

2 THEORETISCHE GRUNDLAGEN

2.1 Das Organ menschliche Haut

Als Applikationsort für topische Zubereitungen und als reaktives Erfolgsorgan steht die Haut im zentralen Interesse diverser Fragestellungen in der dermatopharmazeutischen Forschung. Zum Verständnis des dermalen Wirkstofftransportes und der Reaktion der Haut auf die Exposition mit Xenobiotika ist die Kenntnis von Struktur und Funktion vorzusetzen.

2.1.1 Aufbau und Funktion

Die Haut umgibt den menschlichen Organismus als äußere Grenze zu seiner Umwelt. Dabei übt sie, gebunden an ihre spezifische Struktur, verschiedene lebenswichtige Funktionen aus.

Grundsätzlich kann man sie nach ihrem mehrschichtigen Aufbau in die Epidermis, die Dermis und die Subcutis unterteilen. Eingebunden in diese Matrix befinden sich die zu den Hautanhangsgebilden zählenden Haare und Nägel, die Schweiß- und Talgdrüsen.

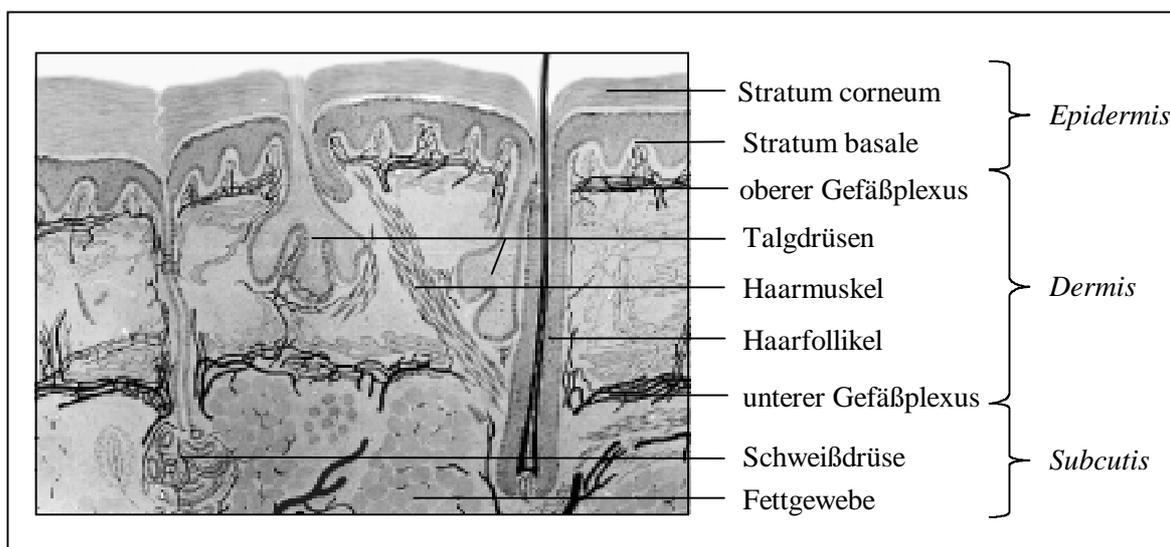


Abb. 2-1 Aufbau der menschlichen Haut (modifiziert nach Grüneberg)

Die hauptsächlich aus Lipozyten und lockerem Bindegewebe bestehende Subcutis erfüllt vorwiegend eine Energiespeicher- und Kälteschutzfunktion. Die darüber liegenden Kollagen-Elastin-Retikulin-Fasern der Dermis sind für die Elastizität und Stabilität des Organs verantwortlich. Eingelagert in diesen Verband befinden sich wasserhaltige Proteoglykane, die zur Hohlraumfüllung beitragen. Das Gewebe ist reichlich mit Gefäßen durchzogen und sorgt somit für einen regen Stoffaustausch. Außerdem befinden sich in der Dermis sensible Nervenfasern, die für die hautvermittelten Empfindungen von Bedeutung sind.

Durch eine scharfe Abgrenzung zeichnet sich der Übergang von der Dermis zur Epidermis ab. Die Epidermis umfaßt mit ca. 90% die bestimmende Zellpopulation, die Keratinozyten (Wokalek, 1992). Ausgehend vom proliferativ aktiven Stratum basale durchläuft der Keratinozyt im Zuge der Differenzierung die einzelnen Schichten der Epidermis, bis er schließlich als toter, kernloser und keratinreicher Corneozyt im Stratum corneum endet (Abb. 2-1).

Neben dem Keratinozyten zählen die dendritischen Melanozyten und Langerhans-Zellen sowie die Merkel-Zellen zu weiteren Zelltypen der Epidermis. Die zur Melaninsynthese befähigten Melanozyten tragen hierbei wesentlich zum Schutz vor der aggressiven Wirkung des UV-Lichtes bei. In ihrer Makrophagenfunktion wird die Langerhans-Zelle auch als Abwehrzelle der Haut eingeordnet. Hingegen fungiert die Merkel-Zelle ausschließlich als Sensor bei der Übertragung von Berührungseizen.

2.1.2 Die Barrierefunktion des Stratum corneum

Die entdifferenzierten Epithelzellen der Epidermis bilden im Gefüge mit einem komplexen Gemisch an Hautlipiden das Haupthindernis für eindringende Substanzen aus. Man bezeichnet diese je nach Körperareal variable Schicht (10-80 µm) als *Stratum corneum* - Hornschicht. Hinsichtlich der Packungsdichte und der Dicke der einzelnen Hornlagen (ca. 20) läßt sich eine Klassifizierung vornehmen (Bowser und White, 1985). So wird zwischen den oberen, locker gelagerten, der Desquamation unterliegenden Zellschichten (3-5 Lagen) - *Stratum corneum disjunctum* und dem kompakteren Zellverband - *Stratum corneum conjunctum* unterschieden.

Grundlegend läßt sich der Aufbau des Stratum corneum als Zwei-Kompartiment-Modell beschreiben (Elias, 1983; Elias und Friend, 1975; Grayson und Elias, 1982). Corneozyten als entdifferenzierte, keratinreiche Keratinozyten, befinden sich nach dem Ziegelstein-Mörtel-Prinzip in eine Matrix aus Lipiden und wasserbindenden *moisturizing factors* eingebettet (Abb. 2-3).

Die Lipidzusammensetzung wurde mit etwa gleichen Anteilen an Ceramiden, Cholesterol und Cholesterolestern sowie freien Fettsäuren ermittelt (Lampe et al., 1983). Die Anwesenheit der Lipide in der entsprechenden Zusammensetzung und deren spezifische strukturelle Organisation kann als essentiell für die Ausprägung einer intakten Barrierefunktion angesehen werden.

Die kontinuierliche Bildung und Erneuerung der Lipide steht im Zusammenhang mit der Differenzierung des Keratinozyten von der Basalzelle bis hin zum Corneozyten (Proksch et al., 1993; Wertz und Downing, 1982; Williams und Elias, 1987). Ursprünglich sind diese Matrixbildner als Biosyntheseprodukte des Keratinozyten zu betrachten. Bedingt durch ihre Toxizität für die lebende Epidermis erfolgt der Einschluß in Lamellargranula (*Odland bodies*), welche aus dem Golgi-Apparat hervorgehen. Im Laufe des Differenzierungsprozesses vollzieht sich der aufsteigende Transport der Syntheseprodukte in Richtung Grenze *Stratum granulosum* - *Stratum corneum* (Abb. 2-5). Dort erfolgt die Sekretion des Materials aus den Lamellargranula in die Zwischenräume der Corneozyten. In der Anwesenheit von Wasser kann jetzt die Strukturgebung der Lipide in Form von mehrschichtigen Bilayern realisiert werden (Curatolo, 1987; Landmann, 1991). Mit dem pH-Wert und der Temperatur sind noch weitere Faktoren für diesen Prozeß verantwortlich (Elias, 1992).

In ihrer Funktion als Permeabilitätsbarriere ist die Hornschicht hinsichtlich der Zusammensetzung der Lipide 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). Der Barriereintegrität nach als souverän können Schwankungen in Anzahl und Dicke der keratinhaltigen Corneozyten eingeordnet werden (Elias et al., 1981).

Entsprechend den strukturellen Gegebenheiten der Haut können Stoffe das Stratum corneum oder die Hautanhangsgebilde permeieren (Abb. 2-2). Die Resorption via *Glandulae* oder *Folliculi* kann, bedingt durch die geringe Fläche (0,1 bis 0,5% der Haut) als sekundär eingestuft werden (Ziegenmeyer, 1992).

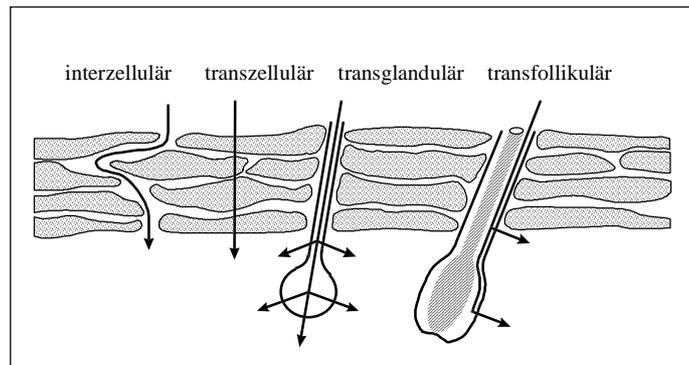


Abb. 2-2 Penetrationswege in die menschliche Haut (modifiziert nach Lippold, 1981)

Primär ist der transepidermale Transport auf zwei unterschiedlichen Wegen nachvollziehbar - *interzellulär* und *transzellulär* (Abb. 2-3) (Loth, 1986; Loth, 1987). Ergänzend für den interzellulären Transport muß aus aktueller Sicht der *Pore-Pathway* angeführt werden. Unter Einwirkung von Energie (Sonophorese, Iontophorese) oder unter veränderten Applikationsbedingungen (Okklusion, Penetrationsmodulatoren) können sich neue Permeationswege eröffnen, die im Normalzustand der Haut nicht vollständig existent sind. Diese *lacunaren Domänen* des Stratum corneum konnten als eindeutiger Transportweg für polare als auch apolare Stoffe identifiziert werden (Menon und Elias, 1997). Während man früher eine Differenzierung für unpolare (laterale Diffusion entlang der lipophilen Anteile innerhalb der Bilayer) und polare Stoffe (Druchdringung des Corneozyten) vornahm (Scheuplein, 1972), erscheint heute auch für polare Substanzen die Permeation via interzellulärer Route (entlang der hydratisierten Kopfgruppen der Bilayerlipide) und durch die Poren der lacunaren Domänen als gesichert (Boddé et al., 1991).

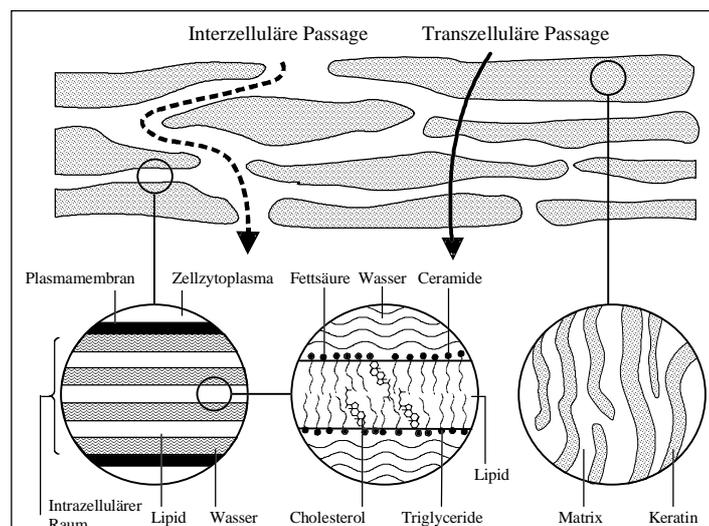


Abb. 2-3 Transportwege durch das Stratum corneum (modifiziert nach Barry, 1987)

2.1.3 Der Keratinozyt

Der bestimmende Zelltyp der lebenden Epidermis sind die Keratinozyten. Diese germinative Zelle ändert während des Wachstums und der Reifung, gebunden an ihre Funktion, mehrfach ihre Morphologie. Die im einlagigen *Stratum basale* lokalisierte Zelle ist in der Lage, sich in zwei Tochterzellen zu teilen. Während dieses Teilungsvorganges des Keratinozyten durchläuft dieser verschiedene Phasen des Zellzyklus (G_0 -, G_1 -, S-, G_2 -, und M-Phase) (Abb. 2-4).

Mit dem Eintritt der Zelle in den Zyklus werden in der zweistufigen G_1 -Phase die Vorbereitungen zur DNA-Synthese getroffen. Dies geschieht durch eine gesteigerte biosynthetische Aktivität, verbunden mit einem Anstieg der RNA- und Proteinsynthese sowie des Ausbaues des Zytoskeletts (Wright und Alison, 1984). Der nachfolgende Eintritt in die S-Phase führt zur Synthese, der Replikation der DNA. Im Anschluß an den Synthesevorgang wird die Zelle in der prämitotischen G_2 -Phase auf die eigentliche Zellteilung in der M-Phase vorbereitet. Werden jetzt die verschiedenen Mitosephasen (Pro-, Meta-, Ana- und Telophase) durchlaufen, so kann die Trennung der zuvor verdoppelten Chromosomen erfolgen. Die Dauer der gesamten Teilungsphase wird mit etwa 60-90 min beschrieben (Christophers, 1980).

Über den Mitosevorgang hinaus wird die Zelle vor die Entscheidung eines Wiedereintritts in den Zellzyklus, den Weg der Entwicklung zum Corneozyten (über Apo-Phase A_1 und A_2) oder den Eintritt in die Ruhephase G_0 gestellt. Keratinozyten, die sich in der G_0 -Phase befinden, sind unter bestimmten Voraussetzungen befähigt, wieder in den Zyklus einzutreten (Reaktivierung durch Cytokine) oder als permanent ruhende Zellen im Zelltod zu enden. Zusätzlich zur Ruhephase G_0 sind in den Vorbereitungsphasen G_1 und G_2 Ruhepunkte eingerichtet. Diese dienen der beschleunigten Bereitstellung von teilungsfähigen Zellen bei Dysregulationen oder bei Erfordernis, wie beispielsweise Verletzungen der Epidermis.

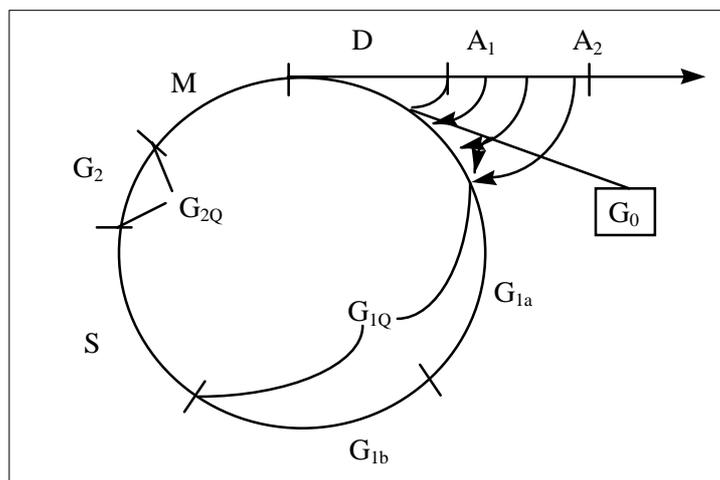


Abb. 2-4 Zellzyklus der Proliferation und Differenzierung des humanen Keratinozyten (nach Wohlrab, modifiziert nach Bullough, 1973)

Die noch undifferenzierte Basalzelle unterliegt während ihres Teilungsprozesses Einflüssen intrinsischer und extrinsischer Faktoren (Eckert, 1989; Eckert, 1993; Gibbs et al., 1996). An den Checkpoints im Zellzyklus, die sich an den Übergängen zwischen G_1 - und S-Phase sowie zwischen G_2 - und M-Phase befinden, finden wesentliche Eingriffe in den regulatorischen Mechanismus des

Zyklus statt (Kamb, 1995). Die Einflüsse von Cyclin-abhängigen Kinasen, die ihrerseits durch die Cycline aktiviert oder durch p15, p16, p21 oder p27 inhibiert werden können, Tumorsuppressoren wie p53, der Tumornekrosefaktor TNF α und der transformierende Wachstumsfaktor TGF β tragen somit zur Steuerung der Proliferation bei (Funk und Kind, 1997; Inohara et al., 1995).

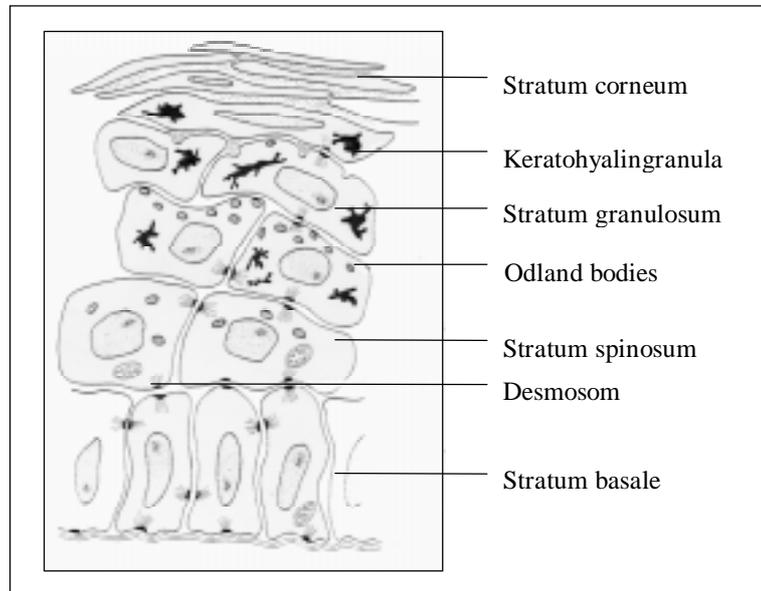


Abb. 2-5 Aufbau der Epidermis (modifiziert nach Fritsch, 1990)

Beschreibt eine Tochterzelle den Weg der terminalen Differenzierung, einer speziellen Form des programmierten Zelltodes (Apoptose), so entfernt sie sich aus der Basalschicht (Paus et al., 1995; Polakowska et al., 1994). Im Zuge der anschließenden Reifung vollzieht sich im *Stratum spinosum* eine Zunahme an plasmatischem Volumen und der Anzahl der Organellen (Abb. 2-5). Mit dem Beginn der Synthese von Profilaggrin und Involucrin beginnt ein weiterer Schritt zur Ausdifferenzierung des Keratinozyten (Ishida-Yamamoto et al., 1997). Bedingt durch die desmosomale Verbindung der einzelnen Zellen erhalten diese eine stachelartige Form (Stachelzelle). Auf dem Weg der fortschreitenden Differenzierung zum Corneozyten prägen sich im *Stratum granulosum* Keratohyalingranula (Aggregation zwischen Profilaggrin und Keratinfilamenten) aus, wodurch auch die Namensgebung Granularzelle zu begründen wäre. Die Spezifität dieses Zelltyps liegt in der Umwandlung der Vorstufe Profilaggrin in Filaggrin und der Modifikation ehemals basaler Zytokeratine zu hochmolekularen Molekülen. Am Übergang vom Stratum granulosum zum Stratum corneum vollzieht sich unter Einwirkung Calcium-abhängiger Transglutaminase die Quervernetzung von Involucrin (Watt und Phil, 1983). Schließlich wird, ausgelöst durch spezifische Faktoren, der lebende Keratinozyt zum toten Corneozyten transformiert und dieser in die Lipidmatrix des *Stratum corneum* eingebettet. Mit diesem Prozeß einhergehend vollzieht sich der Übergang von der keratinozytären Membran zur *cornified envelope* des Corneozyten. Diese kompakte Membran ist aus den Hüllproteinen Cystatin A, Loricrin, Involucrin, Elafin und kleineren, an Prolin reichen Proteinen zusammengesetzt (Steinert und Marekow, 1996). In diesem Netzwerk sind wiederum die Keratinfilamente des Corneozyten eingebunden, die ebenfalls im Zellinneren durch Filaggrin

aneinander geknüpft werden. Das zeitliche Ausmaß bis zur Entwicklung des Corneozyten umfaßt eine Dauer von ca. 30 Tagen.

2.1.3.1 Proliferation des Keratinozyten

Zur Bestimmung der Art und Weise der Einflußnahme eines Xenobiotikums auf das Wachstumsverhalten des Keratinozyten können verschiedene Verfahren der Proliferationsmessung herangezogen werden. Die folgenden Methoden sollen dazu einen Überblick geben:

- Bestimmung der Zellanzahl durch Auszählung der Zellen am Mikroskop oder automatisiert durch Verwendung eines Coulter Counters
- Bestimmung Zellzyklus-assoziiierter Markerproteine (Proliferating Cell Nuclear Antigen)
 - Ki-67
 - p15, p16, p21, p27, p53
- Bestimmung der DNA-Syntheseleistung nach Einbau verschiedener Pyrimidin-Analoga in die DNA, $^3\text{[H]}$ -Thymidin (Flüssigkeitsszintillationmessungen), Bromdesoxyuridin (Absorptions- oder Fluoreszenzmessung)
- Anfärbung der DNA durch fluoreszierende Farbstoffe (Propidiumiodid, Ethidiumbromid) und nachfolgender Fluoreszenzmessung (Flowzytometer oder Bildanalyse)
- Bestimmung der RNA-Syntheseleistung nach Einbau von $^3\text{[H]}$ -Uridin in die RNA (Auswertung via Flüssigkeitsszintillation)
- Bestimmung von Enzymaktivitäten z.B. Lactat-Dehydrogenase, durch Reduktion von Tetrazoliumsalzen (INT, MTT) zur farbigen Formazanverbindung (Absorption)
- Bestimmung des Gehaltes an Proteinmasse durch Proteinanalytiken (via Absorptionsmessung nach Verwendung von Bradford- oder Lowry-Reagenz)

2.1.3.2 Differenzierung des Keratinozyten

Über die Erfassung von Veränderungen im Proliferationsverhalten hinaus ist die Kenntnis der Beeinflussung der Differenzierung des reifenden Keratinozyten notwendig. Erst im Komplex mit der Beschreibung der Proliferation lassen sich vollständige Aussagen über die Wachstumscharakteristik treffen. Folgende Methoden sind zur Erfassung des Differenzierungsverhaltens geeignet.

- Erfassung von exprimierten Differenzierungsmarkern (Involucrin, Filaggrin, Loricrin ...) bzw. deren mRNA, Auswertung unter Nutzung von Elektrophoresetechniken oder immunhistochemischen Methoden nach Kopplung mit enzym- oder fluoreszenzmarkierten Antikörpern
- Beurteilung der Ausprägung der *cornified envelope* unter Nutzung von bildgebenden Verfahren (Laserscanning-Mikroskopie, Bildanalyse)
- Bestimmung des intra- und extrazellulären Calciumgehaltes als Marker der fortschreitenden Differenzierung (Flowzytometrie, Fluoreszenzmessung)

2.2 Zellkultur humaner Keratinozyten

Die Abkürzung *HaCaT* steht für **h**uman **a**dult **l**ow **c**alcium **h**igh **t**emperature keratinocytes. Diese permanente epitheliale humane Zelllinie kann als phänotypisch spontan transformiert, aber nicht tumorigen eingestuft werden. Ihrer Herkunft nach stammt sie aus der Peripherie eines primären malignen Melanoms, welches im oberen Bereich der Rückenhaut eines 62 Jahre alten Patienten lokalisiert war. Einen wesentlichen Anteil zur Etablierung dieser Linie leistete die Arbeitsgruppe um FUSENIG am Deutschen Krebsforschungszentrum in Heidelberg (Boukamp et al., 1988).

Schlußfolgernd aus der spontanen Transformation ergibt sich eine Immortalität des Stammes, die durchaus mehr als 140 Passagen zuläßt. Das Wachstum der kontinuierlichen Zelllinie vollzieht sich nach einem bestimmtem Schema. Dies gliedert sich nach dem Einsäen der Zellen zunächst in eine *lag-Phase* verzögerten Wachstums (Anpassung an die Kulturbedingungen), in eine sich anschließende *log-Phase* mit exponentiellem Anstieg der Zellanzahl bis hin zum siebenten Tag der Kulturdauer und endet mit der Ausbildung eines *Plateaus* bzw. dem Einstellen des Wachstums. Zur Fortsetzung der Kultur über eine länger Kulturperiode empfiehlt sich deshalb die Durchführung einer Subkultivierung.

Schlußfolgernd aus dieser Wachstumscharakteristik, die durch eine Passageunabhängigkeit bei Proliferation und Differenzierung gekennzeichnet ist, kann die HaCaT-Zelllinie verglichen mit nativen Keratinozyten als stabileres *in vitro*-Modellsystem angesehen werden. In grundlegenden Untersuchungen zur Vergleichbarkeit der Eigenschaften von HaCaT und nativen Keratinozyten konnten Gemeinsamkeiten im biochemischen Verhalten, jedoch Unterschiede in der Differenzierungsfähigkeit aufgezeigt werden (Geilen et al., 1996; Grabbe et al., 1996; Neuner et al., 1996; Schürer et al., 1993).

Aufgrund der aufgezeigten Eigenschaften eignet sich diese keratinozytäre Zelllinie hervorragend für Studien zum Proliferations- und Differenzierungsverhalten unter dem Einfluß von verschiedenen chemischen Substanzen, als auch von umweltbedingten Noxen. Die ähnlichen Verhaltensmuster der HaCaT-Zelllinie im Vergleich zu nativen Keratinozyten lassen weiterhin Hinweise auf *in vivo* Reaktionen zu.

Die Entdeckung der Expression von Tumormarkern bei einer HaCaT-Subpopulation war das Resultat von Untersuchungen von DERER et al. (1996). Gekennzeichnet durch ein untypisches Proliferationsverhalten spricht man auch von HaCaT-rapid. Wahrscheinlich sind die Anomalien im Wachstumsverhalten auf abweichende Kulturbedingungen zurückzuführen

Zur besseren Korrelation von *in vitro*- und *in vivo*-Untersuchungen ist die Auswahl eines Modellsystems, welches den *in vivo*-Bedingungen möglichst nahekommt, empfehlenswert. Gegenwärtig finden bei der Bewertung von Wirk- und Hilfsstoffen hinsichtlich der Dermatotoxizität besonders Kulturen primärer humaner Keratinozyten zunehmende Verwendung. Aus diesem Grund wurden bei der Bearbeitung der Fragestellungen nach der Wirkung von Biotin auf den proliferierenden und sich differenzierenden Keratinozyten analog Daten an nativen humanen Kulturen erfaßt.

2.3 Grundlagen der dermalen Wirkstoffaufnahme

Die Aufnahme von Arzneistoffen in die Haut wird maßgeblich durch die Stoffeigenschaften und -konzentration, die Fläche der Applikation, deren Morphologie und Physiologie (Barrierefunktion, metabolische Aktivität) und von eingesetzten galenischen Formulierungen (Vehikeleffekt) beeinflusst. Im folgenden Abschnitt sollen die Einflüsse und Wechselwirkungen zwischen Wirkstoff, Vehikel und dem Applikationsorgan besprochen werden.

2.3.1 Passiver Transport - Diffusion

Ausgehend von der Option eines Akzeptors mit sink-Bedingungen läßt sich der Arzneistofftransport des Wirkstoffs durch die einzelnen Schichten der Haut als ein passiver Prozeß charakterisieren, welcher mit dem 1. FICK'schen Diffusionsgesetz beschrieben werden kann (Lippold, 1981; Pfeifer et al., 1995). Aktive Transportvorgänge waren für das Organ Haut noch nicht nachweisbar.

FICK'sches Diffusionsgesetz (Diffusion)

$$\frac{dm}{dt} = -D \cdot F \cdot \frac{dc}{dx} \quad \text{GL. 2-1}$$

$\frac{dm}{dt}$	Massestrom (steady state)
D	Diffusionskoeffizient
F	Applikationsfläche
$\frac{dc}{dx}$	Konzentrationsgradient

Betrachtet man das Stratum corneum als isotrope Verteilungsmembran, so findet diese vereinfachte Beschreibung des Diffusionsprozesses ihre Anwendung. Verantwortlich für den voranschreitenden Prozeß des Transfers von Substanzen ist der Konzentrationsgradient innerhalb der Hornschicht (Ziegenmeyer, 1992). Im Zusammenhang damit sind als Randbedingungen der Ausschluß von Einwirkungen durch Vehikelkomponenten (z.B. Lipidzusammensetzung, Hydratation) und Interaktionen mit Hautbestandteilen (z.B. Affinität, Metabolisierung) zu erfüllen (Ziegenmeyer, 1992). Unter der Voraussetzung einer konstanten Applikationsfläche wirkt sich der Diffusionskoeffizient D als Proportionalitätsfaktor des Massestroms im *steady state* aus (GL. 2-1). Der Diffusionskoeffizient wird neben der Viskosität des Diffusionsmediums und dem Molekülradius des diffundierenden Materials auch von der Temperatur und dem Druck beeinflusst (GL. 2-2) (Stricker, 1987). Diese Abhängigkeiten des Diffusionskoeffizienten werden in der folgenden Beziehung verdeutlicht:

$$D = \frac{R \cdot T}{6 \cdot \pi \cdot \eta \cdot r \cdot N} \quad \text{GL. 2-2}$$

R	Gaskonstante
T	absolute Temperatur
η	dynamische Viskosität
r	Teilchenradius
N	Avogadrozahl

2.3.2 Solvent drag - Konvektion

Neben dem passiven Transport, der bedingt durch einen Konzentrationsgradienten vorangetrieben wird, kann ein Stoff ebenfalls Strömungskräften coapplizierter Lösungsmittel folgen (solvent drag). Der Cotransport des applizierten Stoffes mit einem Lösungsmittel ist nach folgender Gleichung an einen hydrodynamischen Druckgradienten gebunden.

Gesetz nach HAGEN-POISSEULLE (Konvektion)

$$\frac{dm}{dt} = \frac{n \cdot \pi \cdot r^4}{8 \cdot \eta} \cdot \frac{dp}{dx} \quad \text{GL. 2-3}$$

- n Porenzahl
 r Porenradius
 η Viskositätskonstante (Widerstand der Lösung gegen konvektive Verschiebung)
 $\frac{dp}{dx}$ hydrodynamischer Druckgradient

2.3.3 Verteilungsverhalten und Thermodynamische Aktivität

Im Verlaufe des Penetrationsvorgangs wird ein dermal applizierter Arzneistoff mehrfach unterschiedlichen Verteilungsprozessen unterworfen. In diesen Ablauf fließen die physikochemischen Eigenschaften des Stoffes ein und bestimmen deren Fortgang. Betrachtet man die Verteilung des Wirkstoffes zwischen dem verwendeten Vehikel (Donatorkompartiment) und der Hornschicht (Akzeptorkompartiment) als einen Teilprozeß, so läßt sich dieser nicht experimentell ermitteln. Als vereinfachtes Modell bietet sich deshalb die Verwendung eines Phasensystems aus zwei miteinander nicht mischbaren Lösungsmitteln an. Im allgemeinen hat sich zur Bestimmung des Verteilungskoeffizienten die Verwendung von Octanol als lipophile und Wasser als hydrophile Komponente durchgesetzt.

$$Vk = \frac{c_{lipophil}}{c_{hydrophil}} \quad \text{GL. 2-4}$$

- Vk Verteilungskoeffizient
 $c_{lipophil}$ Löslichkeit des Wirkstoffs im lipophilen Lösungsmittel
 $c_{hydrophil}$ Löslichkeit des Wirkstoffs im hydrophilen Lösungsmittel

In Gleichung 2-4 zeigt sich gewissermaßen der Endzustand des Verlaufes der Verteilung. Der Verteilungskoeffizient ist nicht nur Ausdruck des Verteilungsverhaltens des Wirkstoffes, sondern verkörpert gleichzeitig seine Lipophilie, woraus sich entscheidende Aussagen für den Penetrationsvorgang ableiten lassen (Menczel und Touitou, 1989; Stüttgen, 1990). Bedingt durch die Anwesenheit lipophiler als auch hydrophiler Areale im Stratum corneum (Kap. 2.1.2) kann ein Verteilungskoeffizient um 1 als ideal für einen zügigen Fortgang der Penetration eingestuft werden.

Im direkten Zusammenhang mit dem Verteilungskoeffizienten steht die thermodynamische Aktivität α . Sie beschreibt das Bestreben eines Wirkstoffes, seine Umgebung (Lösungsmittel, Vehikel) zu verlassen, um sich bei minimalem Aufwand von Energie in einer anderen (Lösungsmittel, Akzeptor) zu verteilen. In Abhängigkeit vom Molenbruch (x) und einem effektiven lösungsmittelspezifischen Aktivitätskoeffizienten (γ) wird die thermodynamische Aktivität α durch folgende Gleichung ausgedrückt.

$$\alpha = x \cdot \gamma \qquad \text{GL. 2-5}$$

Betrachtet man diese Gleichung unter der Option, daß der Aktivitätskoeffizient $\gamma = 1$ ist, so wächst die thermodynamische Aktivität mit der Konzentration, wobei die Maximalkonzentration dem Molenbruch der gesättigten Lösung entspricht. Somit repräsentiert die thermodynamische Aktivität das Verhältnis der Substanzkonzentration (C_{Vehikel}) zu ihrer Sättigungskonzentration ($C_{\text{S Vehikel}}$) ($C_{\text{Vehikel}}/C_{\text{S Vehikel}}$) (Bendas, 1993).

2.4 Modulation der Wirkstoffpenetration

2.4.1 Kolloidale Trägersysteme

Eine wesentliche Voraussetzung für die Wirksamkeit eines Arzneistoffes ist seine Anreicherung am gewünschten Wirkort. Dazu besteht die Notwendigkeit der Überwindung der Penetrationsbarriere Stratum corneum. Je nach Zustand dieser kompakten Hautschicht sind unterschiedliche Bedingungen für das Eindringen von Substanzen gegeben (Kap. 2.1.2).

Aus therapeutischer Sicht ist meist der schnellstmögliche Wirkungseintritt eines Arzneistoffes angestrebt. Diese Tatsache trägt dazu bei, initial schnell freisetzende Vehikel mit optimiertem Konzentrations-Zeit-Profil des Wirkstoffs am Wirkort zu entwickeln (Wohlrab und Lasch, 1989). Soll der gewünschte Effekt kontinuierlich aufrecht erhalten werden, so empfiehlt sich die Auswahl eines Trägers mit zusätzlicher Retardfunktion.

Untersuchungen kolloidaler Trägersysteme haben gezeigt, daß ihre Fähigkeiten nicht nur auf dem Gebiet der Penetrationspromotoren, sondern auch im Bereich der kontrollierten Freigabe angesiedelt sind (Huschka et al., 1996). Die Möglichkeit der Steuerung von Freigabe und Penetration lassen sie gegenüber den herkömmlichen Arzneiformen bedeutsam erscheinen. Selbst Wirkstoffe mit ungünstigen Voraussetzungen für die dermale Applikation (schlechte Löslichkeit, hydrophile Moleküle, hitze-, oxidations- oder lichtempfindliche Substanzen) können mit gesteigerter therapeutischen Effektivität eingesetzt werden (Schmalfuß, 1997).

Von zunehmender Bedeutung sind die Eigenwirkungen der Vehikelbestandteile der Trägersysteme. Einerseits fungieren sie als Modulatoren der Penetration, daneben läßt sich durch ihre Wechselwirkungen mit dem Keratinozyten ein gezielter therapeutischen Nutzen erzielen (Wohlrab, 1995). Je nach Zusammensetzung lassen sich mit Hilfe von Vehikeln ohne Wirkstoff beachtliche Erfolge bei der Therapie von Hautkrankheiten (Proliferationsbeeinflussung, Verbesserung der Barrierefunktion) oder auch in kosmetischer Absicht erzielen (Hydratation der Hornschicht).

Insgesamt scheinen diese Träger von Arzneistoffen eine zunehmende Berechtigung für die dermale Applikation zu erlangen.

2.4.1.1 Nanopartikel

Struktur und Eigenschaften

Nanopartikel sind im weiteren Sinne Feststoffsysteme aus Polymer und Arzneistoff mit einer Größe von 10 bis 1.000 nm. Handelt es sich hierbei um verfestigte Mizellare Systeme, verfestigte Mikroemulsionen oder Partikel mit einer kontinuierlichen Hülle, so spricht man von **Nanokapseln**. Besteht das Teilchen aus einer Polymermatrix, in welche ein Arzneistoff eingebettet oder außen adsorbiert sein kann, so bezeichnet man es als **Nanopartikel** (Bauer et al., 1991) (Abb. 2-6).

Mit der Idee von festen Polymerpartikeln im Nanometerbereich legten BIRRENBACH und SPEISER den Grundstein der Entwicklung dieses Trägersystems (1976). Als Basismaterialien für die Herstellung von Mikro- und Nanopartikeln kommen natürliche und synthetische Stoffe in Frage. Die Verwendung der natürlichen Trägermaterialien (Biopolymere, Lipide) erscheint hinsichtlich ihrer geringen Toxizität und ihrer biologischen Abbaubarkeit vorteilhaft, doch auch halbsynthetische und synthetische Produkte sind durchaus als relevante Matrices zu betrachten (Couvreux et al., 1979; Gurny et al., 1981; Koosha et al., 1987; Kreuter et al., 1976).

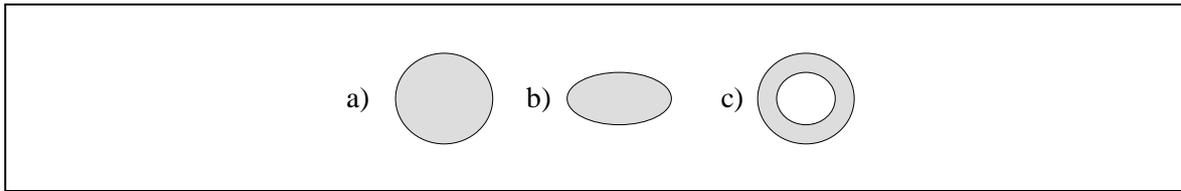


Abb. 2-6 a) sphärischer Nanopartikel
b) elliptischer Nanopartikel
c) Nanokapsel

Dermale Anwendung

Der Umfang der Untersuchungen, die einer möglichen Nutzung der kontrollierten Freigabe von potenten Wirkstoffen aus dem Trägersystem Nanopartikel für die topische Applikation nachgehen, ist als sehr gering einzustufen. Erste Schritte auf diesem Gebiet sollen hier im folgenden aufgeführt werden.

Unter Verwendung unterschiedlicher Derivate von Polycyanoacrylaten lassen sich hydrophile als auch lipophile Moleküle für die transdermale Anwendung einsetzen (Cappel et al., 1991). An haarloser Mäusehaut sowie an künstlichen Membranen konnte eine Erhöhung der Permeabilität für Methanol, jedoch kein steigernder Effekt für den lipophileren Alkohol Octanol gefunden werden. Dabei wurde eine deutliche Abhängigkeit der Permeation von der Lipophilie des eingesetzten Polymermaterials festgestellt.

HANDJANI und Mitarbeiter patentierten bereits 1991 biologisch abbaubare Nanopartikel für die topische Anwendung von Externa und Kosmetika. Die Verwendung eines wäßrigen Partikelsystems aus Poly-(butylcyanoacrylat) und Tocopherol erbrachte im Vergleich zu tocopherolhaltigen Emulsionen weniger irritative Erscheinungen an der Haut und am Auge.

Partikel aus Collagen-Glucosaminglycan-Gemischen, die in der Zellkultur an Fibroblasten (Ratten) und nach subkutaner Injektion in Rattenhaut hervorragende Biokompatibilität und keine Zytotoxizität zeigten, waren Gegenstand von Penetrationsuntersuchungen an humaner Haut (Huc et al., 1991). In Abhängigkeit von der Partikelgröße ergaben sich unterschiedliche Penetrationsergebnisse. Partikel unterhalb von 20 µm waren in der Lage, in die oberen Schichten des Stratum corneum einzudringen. Größere Vesikel, die an der Oberfläche verblieben, standen durch Wasch- und Wischeffekte nicht für die Penetration zur Verfügung.

Um die Effekte von Collagenpartikeln auf das Penetrationsverhalten von lipophilen Substanzen zu untersuchen, wurden diese auf haarlose Mäusehaut appliziert (Rössler et al., 1994; Rössler et al. 1995). Im Vergleich mit einer O/W-Creme erbrachte die Verwendung von Collagen als Trägermaterial für Retinol ein schnelleres Eindringen des Wirkstoffes in tiefere Hautschichten. Gleichzeitig konnte die Gesamtmenge an penetriertem Retinol erhöht werden.

2.4.1.2 Liposomen

Struktur und Eigenschaften

Liposomen stellen kugelförmige Vesikel dar, die aus einer oder mehreren Lipiddoppelschichten aufgebaut sind (Abb. 2-7). Sie lassen sich ihrer Struktur nach in ein hydrophiles und ein lipophiles Kompartiment unterteilen. Ihr grundsätzlicher Aufbau gleicht dem von biologischen Membranen. Die Grundbausteine für die Herstellung der Vesikel sind die Phospholipide. Nach BARENHOLZ et al. können fünf Gruppen von Phospholipiden für die Herstellung von Liposomen eingesetzt werden (1994). So eignen sich natürliche (Lecithin, Phosphatidylcholin), modifizierte natürliche (hydriertes Phosphatidylcholin), halbsynthetische (veränderte Alkylketten), vollsynthetische und Phospholipide mit nicht nativer Kopfgruppe. Alle diese Verbindungen bilden beim Kontakt mit Wasser spontan flüssigkristalline Aggregate von unterschiedlicher Stabilität.

Eine Klassifizierung der Liposomen kann nach der Anzahl der Lipiddoppelschichten und ihrer Größe bzw. nach der Art und Weise der Herstellung erfolgen (Crommelin und Schreier., 1994).

Dermale Anwendung

Erste liposomale Zubereitungen wurden als Kosmetika für die allgemeine Verbesserung des Hautzustandes auf den Markt gebracht (Lautenschläger et al., 1988; Lautenschläger, 1989; Lautenschläger, 1990). So standen eine Hydratisierung und Ergänzung des Lipidhaushaltes der Haut im Vordergrund der Anwendung.

Pharmazeutisch und medizinisch interessant erscheinen in Gelgrundlagen eingearbeitete Liposomen als Externa zur Behandlung diverser Dermatosen (Korting, 1995). Da liposomenhaltige Hydrogele gut in die Haut eindringen, kann in der Therapie eine hohe Akzeptanz durch den Patienten erzielt werden.

Bemerkenswert ist ebenfalls der Aspekt, daß schon die alleinige Therapie von atopischen trockenen Hautzuständen mit Leerliposomen aus nativen Hautlipiden zu einer Verbesserung des Hautzustandes führen kann (Schreier et al., 1994).

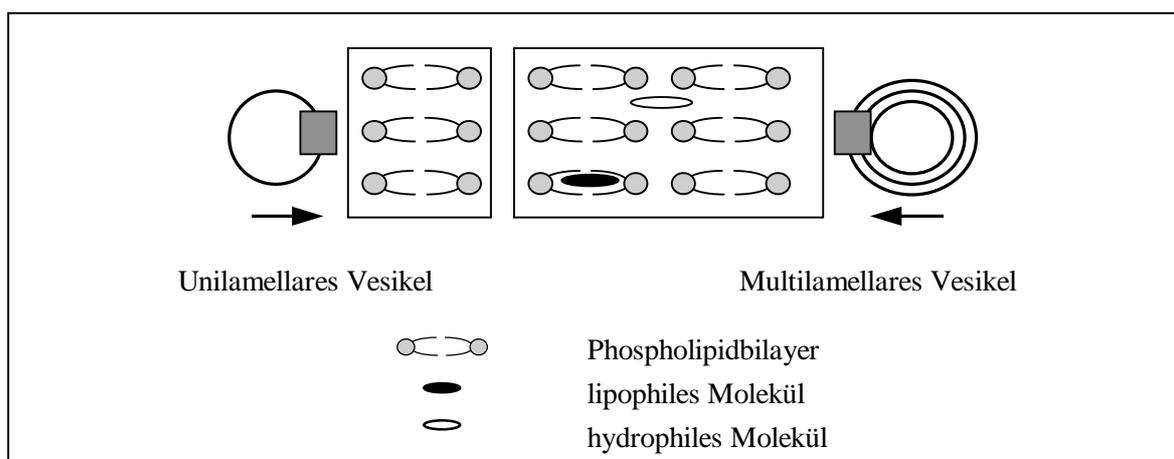


Abb. 2-7 Grundstrukturen von Liposomen (nach Crommelin und Schreier, 1994)

Umfangreiche Untersuchungen existieren zur Modulation der Penetration unter Verwendung von phospholipidhaltigen Zubereitungen (Martin, 1992; Mezei und Gulaschkaram, 1980).

Im Mittelpunkt des Interesses stand dabei neben der Applikation von liposomal eingeschlossenen Lokalanästhetika (Foldvari, 1994; Sharma et al., 1994), Vitaminen (Schäfer-Korting et al., 1994) und nichtsteroidalen Antiphlogistika (Michel et al., 1991) vor allem der liposomale Transport von Glucocorticoiden (Wohlrab et al., 1989; Wohlrab et al., 1992).

Eine aus der Sicht des Dermatologen wünschenswerte Steigerung der epidermalen Konzentration von problematisch zu handelnden Wirkstoffen erscheint durch die Verwendung liposomaler Formulierungen möglich. In den Untersuchungen von WOHLRAB und LASCH wurde in Liposomen eingeschlossenes Hydrocortison an humaner Haut ex vivo eingesetzt (1989). Bereits nach kurzer Einwirkdauer zeigte sich eine 9-fache Erhöhung der Konzentration von Hydrocortison in Epidermis und Dermis (Wohlrab et al., 1992).

Mit dem Ziel des Schutzes vor oxidativem Angriff wurden Arbeiten mit dem Antipsoriatikum Dithranol durchgeführt (Gehring et al., 1994; Mahrle et al., 1991). Der gewünscht Effekt der Stabilisierung des Wirkstoffes war jedoch nicht realisierbar. Trotzdem erscheint die Anwendung zur Minutentherapie empfehlenswert, da die liposomale Formulierung im Vergleich zu einer konventionellen Grundlage bereits nach kurzer Zeit in die Haut eindringen kann.

Die Frage nach einem Zusammenhang zwischen der penetrationsfördernden Wirkung von Phospholipiden und dem Vorliegen liposomaler Strukturen war Gegenstand weiterführender Untersuchungen. GEHRING et al. konnten eine direkte Abhängigkeit bei der Applikation von Dithranol nachweisen (1995). Bezogen auf das hydrophile Molekül Heparin ließ sich dieser Sachverhalt nicht bestätigen (Schütze, 1997).

Die Mechanismen der Vesikel-Haut-Wechselwirkungen und des gezielten Transportes wurden ausführlich mit Hilfe von mikroskopischen Techniken und mit radioaktiv- oder fluoreszenzmarkierten Molekülen oder auch Arzneistoffen untersucht (Lasch et al., 1992; Lasch und Bouwstra, 1995). Grundsätzlich ist der penetrationsfördernde Effekt von topisch applizierten Liposomen auf eine Interaktion zwischen Vehikelsystem und Haut zurückzuführen. Die lipophilen Bestandteile der Liposomenmembran entfalten ihre Wirkung durch die Interaktion mit den Lipiden des Stratum corneum. Eine Desintegration der geordneten Lipidstrukturen ist die Folge, wobei der Einfluß des Wassers aus der hydrophilen Phase des Vehikels dabei als synergistisch einzustufen ist.

Über die Penetrationstiefe intakter Liposomen existieren sehr unterschiedliche Ergebnisse und Auffassungen. Geht man von dem Fakt aus, daß Liposomen, die in das Stratum corneum humaner Haut eindringen, dort mit den vorhandenen Lipiden in Wechselwirkung treten und dabei ihre eigene Struktur aufgeben, so sind intakte Liposomen in tieferen Hautschichten nicht mehr nachweisbar (Hofland et al., 1995; Kirjavainen et al., 1996; Kriwet und Müller-Goymann, 1995).

Im direkten Gegensatz dazu stehen Untersuchungen, die von der Permeation intakter liposomaler Strukturen berichten (Cevc et al., 1995; Fleisher et al., 1995). Unterstützung findet diese Theorie durch den Nachweis eines intakten Übertritts von Liposomen aus dem Medium von Keratinozytenkulturen in das Zellinnere (Schaller et al., 1996). Kritisch anzumerken ist jedoch die Möglichkeit der spontanen Wiederausbildung liposomaler Strukturen in hydrophiler Atmosphäre nach erfolgter Passage der Zellmembran oder auch der Lipidmixture des Stratum corneum. Möglicherweise sind die gefundenen Effekte im Zusammenhang mit der Ausbildung des *pore-pathways* zu sehen, der die Permeation von diversen Substanzen durch die Barriere der Hornlagen ermöglicht (Menon und Elias, 1997).

2.4.1.3 Mikroemulsionen

Mikroemulsionen sind homogene transparente, thermodynamisch stabile Systeme niedriger Viskosität, die spontan gebildet werden (Pfüller, 1986). Sie setzen sich aus miteinander nicht mischbaren Flüssigkeiten, hauptsächlich aus einer Wasserphase, einer Ölphase und einem Gemisch aus Tensid und Cotensid zusammen (Prince, 1977). Im Unterschied zur Makroemulsion liegt die Tröpfchengröße der mizellartigen Pseudophase der Mikroemulsion im Bereich von 10-200 nm (Saint Ruth et al., 1995). Die Bildung von Mikroemulsionen kann auf zwei verschiedenen Wegen, jedoch immer spontan erfolgen (Friberg, 1990).

Die Unterscheidung von Wasser-in-Öl (W/O) und Öl-in-Wasser (O/W) Emulsionen analog den Makroemulsionen soll durch Abb. 2-8 deutlich gemacht werden. Des weiteren werden hier die Strukturmerkmale der Mikroemulsion von mizellartigem Charakter sichtbar.

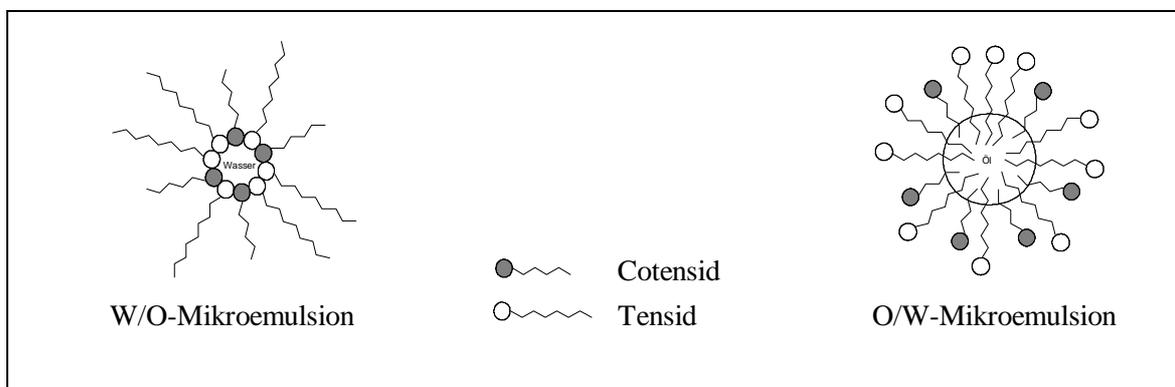


Abb. 2-8 Grundstrukturen von Mikroemulsionen (modifiziert nach Pfüller, 1986)

Die Entstehung von Mikroemulsionen wird in der Literatur unterschiedlich beschrieben. Einige Autoren berichten über keinerlei Abhängigkeit von der Reihenfolge des Zusammenmischens der Komponenten (Leung und Shah, 1989). Im Gegensatz dazu steht die vom Weg abhängige Herstellungsweise, bei der eine bestimmte Ordnung des Zusammenfügens der Bestandteile eingehalten werden muß, um die Barriere der Aktivierungsenergie zu überwinden (Rosano und Clause, 1987).

Als Orientierungshilfe bei der Herstellung von Mikroemulsionen lassen sich verschiedene Schemata verwenden. Das HLB-Schema (Hydrophilic-Lipophilic-Balance) trägt mit seiner Graduierung für hydrophile und lipophile Emulgatoren wesentlich zur Vorauswahl für den zu schaffenden Emulsionstyp bei (Voigt, 1997). Hierbei unbeachtet bleiben jedoch weitere Einflüsse auf die Entstehung der Emulsion (lipophile Phase, Temperatur, Tensidkonzentration...) (Prince, 1977).

Komplexere Aussagen für die Emulsionsbildung lassen sich aus dem PIT-Phasendiagramm (Phaseninversionstemperatur) entnehmen. Die Phaseninversionstemperatur beschreibt den Umkehrpunkt der Phasenbildung vom O/W- zum O/W-Typ und umgekehrt. Im Bereich dieses Punktes liegen die einzelnen Phasen entmischt vor. Entscheidend für den Herstellungsprozeß ist die Tatsache, daß bei geringerer Temperatur und einem erhöhten Wasseranteil auf Grund besserer Emulgierfähigkeit für die lipophile Phase eine erleichterte Bildung von O/W-Systemen auftritt. Im umgekehrten Fall einer Temperaturerhöhung und einem erhöhten Anteil an lipophilen Bestandteilen,

besteht die Tendenz einer Begünstigung der Solubilisation von Wasser und somit der Ausprägung von W/O-Systemen (Prince, 1977; Voigt, 1997).

Dermale Anwendung

Bedingt durch ihre grundlegenden Eigenschaften ergeben sich vielfältige Anwendungen für die topische Applikation von Mikroemulsionen. Je nach modifiziertem System erscheint der Einsatz von problematisch zu verabreichenden Arzneistoffen (hydrophilen, lichtempfindlichen oder auch Molekülen mit schlechter Löslichkeit) realisierbar. Grundlegend gelten Mikroemulsionen als äußerst stabile und lagerungsfähige Systeme (Constantinides und Seang, 1995). Ein wesentlicher Vorteil beim Vergleich mit konventionellen Emulsionen ist in einer verstärkten Oberflächenreaktion mit der Applikationsfläche und der hohen Penetrationskraft zu sehen. Dies beruht auf dem erhöhten Spreitvermögen und einer verringerten Grenzflächenspannung (Leung und Shah, 1989).

Umfangreiche dermale Untersuchungen stellten bisher insbesondere die Enhanceraktivität von Mikroemulsionen in den Vordergrund. So gelten Mikroemulsionen als effektive Vehikel für die transdermale Anwendung verschiedener systemisch wirksamer Arzneistoffe (Betablocker - Gallarate et al., 1993; Kemken et al., 1991; Calciumantagonisten - Boltri et al. 1994; Thacharodi und Panduranga Rao, 1994; Lokalanästhetika - Carlfors et al., 1991). Auf Grund des hohen Tensidanteils in der Mikroemulsion erfolgte bisher nur eine zögerliche Anwendung in der dermalen Therapie. Um möglichen Irritationen durch Eigenpenetration des Tensides vorzubeugen, ist die Auswahl hochmolekularer Verbindungen empfehlenswert (Kemken et al. 1992; Malcomson und Lawrence, 1993). Ebenfalls sinnvoll erscheint die gezielte Entwicklung tensidfreier bzw. tensidarmer Mikroemulsionen, wie sie auch in den Untersuchungen von DREHER et al. ihren Einsatz fanden (1995).

Bezüglich der Enhanceraktivität lassen sich Zusammenhänge zwischen dem Vehikelbau und der Wirkungsweise knüpfen. Während man gezielt Wechselwirkungen zwischen dem Stratum corneum und einer Mikroemulsion mit überwiegend hydrophiler (Linn et al., 1986) bzw. lipophiler (Friberg und Podzimek, 1984) Struktur anstrebte, zeigten sich jedoch gerade in Vehikeln mit beiden strukturgebenden Komponenten synergistische Effekte bei der Penetrationsförderung (Thacharodi und Panduranga Rao, 1994).

Die Vorteile von Mikroemulsionen bei der Applikation von lipophilen Stoffen konnten LINN et al. Festhalten (1990). Gegenüber einer Creme und einer Lotion als Vergleichsvehikel waren eine deutliche penetrationsfördernde Wirkung für Cetylalkohol und Octyl-dimethyl-p-aminobenzoensäure sichtbar. Beide Substanzen penetrierten insgesamt tiefer und in größerem Umfang in die Haut. Als Ursache der Penetrationsmodulation nach Applikation der Mikroemulsion sahen die Autoren auch hier synergistische Wechselwirkungen hydrophiler als auch lipophiler Vehikelbestandteile mit der Haut (Linn et al., 1990).

Von einer gezielten Modulation der Penetration des wasserlöslichen Arzneistoffs Diphenhydramin wird bei Schmalfuß et al. berichtet (Schmalfuß et al., 1997). Durch die Inkorporation von verschiedenen Fettsäuren, Cholesterol und Harnstoff war es möglich, Einfluß auf die Penetrationstiefe und das Ausmaß des Arzneistoffes in den untersuchten Hautschichten zu nehmen.

2.4.2 Konventionelle Penetrationsmodulation

Eine erfolgreiche Therapie setzt ein ausreichendes Konzentrations-Zeit-Profil am Zielort voraus. Aus den Stoffeigenschaften der meisten topisch applizierbaren Arzneistoffe folgernd, läßt sich dieses Ziel nur unzureichend verwirklichen. Ursache dafür ist das intakte Stratum corneum, welches für die meisten Moleküle eine nicht zu überwindende Barriere darstellt.

Gegenstand vielfältiger Untersuchungen war der kontrollierte Einsatz von Modulatoren der Penetration. Hierbei erscheint eine Einteilung nach ihren unterschiedlichen Auswirkungen auf das Konzentrations-Zeit-Profil des Wirkstoffs in Enhancer und Reducer bzw. Retarder sinnvoll. Im speziellen Fall kann ein Modulator in verschiedenen Vehikeln durch spezifische Modulator-Vehikel-Wechselwirkungen unterschiedliche Effekte (Enhancement als auch Retardierung der Wirkstoffpenetration) erzielen (Neubert et al., 1996).

Neben Wechselwirkungen zwischen Modulator und Vehikel lassen sich auch gezielte Interaktionen zwischen dem Modulator und den interzellulären Lipidschichten des Stratum corneum für eine Penetrationsmodulation ausnutzen. Dabei erscheint das Anstreben von direkten Modulatorwirkungen auf die hydrophilen Bereiche (Kopfgruppen der Lipide, lacunare Domänen, Keratinstuktur) und/oder die lipophilen Domänen (lipophile Anteile der Lipid) innerhalb der Hornschicht sinnvoll. Im Resultat dieser Wechselbeziehungen kommt es zu deutlichen Veränderungen (z.B. Fluidität, Hydratation) der Barriereintegrität der Hornschicht.

Im folgenden sollen wesentliche Vertreter der Penetrationsmodulatoren und ihre Mechanismen der Beeinflussung der Barrierefunktion vorgestellt werden.

Azone®

Das 1-Dodecylazacycloheptan-2-on (Azone®) dessen hydrophobe Seitenkette in der Dimension dem Cholesterolskelett entspricht, kann sich zwischen die Alkylketten der Bilayer einlagern und dort die Wechselwirkungen zwischen Ceramiden und Cholesterol vermindern. Eine Erhöhung der Permeationsrate des Wirkstoffs durch Fluiditätserhöhung der Interzellulärlipide ist somit die Folge der Azone®-Wirkung (Hadgraft, 1996).

Glykole und andere Alkohole

Aus der Gruppe der mehrwertigen Alkohole finden Glycerol und Propylenglycol weit verbreitete Anwendung in der Dermatologie (Møllgaard und Hoelgaard, 1983a). Die veränderte Permeation steht bei Verwendung dieser Cosolventien in engem Zusammenhang mit einem abweichenden Transport der untersuchten Wirkstoffe und wird als *Solvent drag-Effekt* beschrieben (Bendas et al., 1995). Bei der Anwendung von Polyethylenglycolen wurden, aus einer Dehydratisierung der Hornschicht resultierend, retardisierende Einflüsse auf den Stofftransport ermittelt (Møllgaard und Hoelgaard, 1983b). Für diesen Prozeß gilt weiterhin indirekte Proportionalität von Molekülgröße und Wirkstoffpenetration.

Unter den kurzkettigen einfachen Alkoholen zählt der Ethanol zu den am häufigsten eingesetzten Alkoholen. Seine Anwendung und Wirkung ist in der Literatur umfassend dokumentiert und bereits untersucht. Durch die Eigenpenetration des Moleküls und die intensiven Wechselwirkungen mit den Interzellulärlipiden kommt es zur erleichterten Aufnahme von topisch applizierten Wirkstoffen (Krill

et al., 1992; Polano und Ponec, 1976). Unterschiedliche Effektivität der permeationsfördernden Wirkung von kurzkettigen Alkoholen fanden HORI et al. bei der Applikation ethanolischer Vehikel von lipophilen als auch hydrophilen Wirkstoffen (Hori et al., 1992).

Fettsäuren

Aus dem Bereich der effektiven Vertreter der Enhancer sind neben den Tensiden die Fettsäuren umfangreich untersucht worden (Schneider, 1997). Die Aktivität der Fettsäuren ist durch die Länge der Kohlenstoffkette sowie die Anzahl und den Typ der Doppelbindungen charakterisiert. Unter den gesättigten Fettsäuren werden die Vertreter mit einer Kettenlänge von C₁₀-C₁₂ als effektive Enhancer beschrieben. Kürzere als auch längere Moleküle führen zur Verringerung der Wirksamkeit (Aungst et al., 1986; Hsu et al., 1994).

Einfach ungesättigte Fettsäuren mit der Doppelbindung in der Mitte der Alkylkette weisen einen starken Fluidisierungseffekt auf (Golden et al., 1987). Somit kommt der Ölsäure, bedingt durch ihre thermodynamisch günstige Kinkenstruktur, hinsichtlich der Effektivität eine Sonderstellung zu (Yamada et al., 1987). Gegensätzliche Ergebnisse existieren über eine Abhängigkeit vom Isomer. Während beispielsweise für Naloxon kein Unterschied in bezug auf die Enhanceraktivität beider Isomere über einen Kettenlängenbereich von C₁₆-C₁₈ gefunden wurde (Aungst et al., 1986), schreiben verschiedene Arbeitsgruppen dem cis-Isomer eine größere Aktivität zu (Cooper, 1984; Golden et al., 1987).

Harnstoff

Das für die menschliche Haut physiologische Molekül Harnstoff nimmt eine besondere Stellung in der Dermatopharmazie ein. Es findet sowohl in der dermatologischen Rezeptur als auch in der Kosmetik zunehmende Akzeptanz und Verbreitung (Müller und Pflugshaupt, 1989).

Neben seinen Eigenschaften als anerkannter Hilfsstoff für Externa sind die eigenen pharmakologischen Effekte für die Therapie diverser Dermatosen von Interesse. Bisher wurde Harnstoff erfolgreich bei Exsikkationsdermatosen, Altershaut, atopischen und trockenen Hautzuständen sowie zur adjuvanten Therapie bei der Psoriasis eingesetzt. Neben der hohen Wasserbindungskapazität des Harnstoffs (Wohlrab, 1988), welche bei definierter Konzentration zu einer verbesserten Hydratation der Hornschicht (Serup, 1992) und somit zur Stabilisierung der Barrierefunktion beitragen kann (Lodén, 1996), seiner antiproliferativen (Wohlrab, 1989), keratoplastischen (Baden et al., 1976), antimikrobiellen (Raab, 1989) und antipruriginösen Wirksamkeit (Stüttgen, 1992; Wohlrab, 1992) dient der Harnstoff in unterschiedlichen Konzentrationen als ein potenter Penetrationsmodulator. Zur permeationsfördernden Wirkung des Harnstoffs auf die Resorption von Glucocorticoiden wurden umfangreiche Untersuchungen angefertigt (Feldmann und Maibach, 1974; Wohlrab, 1984).

Sulfoxid-Derivate

Dimethylsulfoxid (DMSO) ist als ein hydrophiler Penetrationsbeschleuniger bekannt (Barry und Bennett, 1987). Er ist in der Lage, Wasser aus den polaren Kopfgruppen der Bilayerschichten zu verdrängen, um somit die Diffusion vornehmlich polarer Moleküle entlang ausgedehnter Solvathüllen zu erleichtern (Barry, 1987). Für die Entfaltung seiner Wirkung sind jedoch hohe Konzentrationen erforderlich (Woodfort und Barry, 1986).

Wirkungsvollere Effekte bei geringerer Modulatorkonzentration sind durch die Verwendung von Decylmethylsulfoxid (DCMS) gewährleistet (Woodfort und Barry, 1986). Der Mechanismus der Beeinflussung der Arzneistoffresorption wird einerseits durch die Wechselwirkung zwischen Modulator und der Keratinstruktur der Hornschicht (Hadgraft, 1984), als auch durch die Veränderung der Fluidität deren Lipide beschrieben (Goodman und Barry, 1985).

Tenside

Tenside sind weitverbreitete Bestandteile von Kosmetika und Dermatika. Neben ihrer Grundfunktion als Emulgatoren von topischen Formulierungen besitzen sie permeationsmodulierende Wirkungen. Diese entfalten sich jedoch konzentrationsabhängig und weisen ein biphasisches Profil für die Eigenpenetration des Modulators auf (Ziegenmeyer, 1992).

Die penetrationsfördernde Wirkung der Tenside steht im Zusammenhang mit ihrer Ladung, wobei die Effektivität in der Reihenfolge nichtionisch, kationisch, anionisch zunimmt. Aus der Reihe der anionischen Tenside konnten Vertreter mit einer unverzweigten Kohlenwasserstoffkette mit zehn und zwölf Kohlenstoffatomen (z. B. Natriumdodecylsulfat) als optimale Enhancer ermittelt werden. Die Folge der Anwendung dieser Moleküle können jedoch erhebliche irreversible Schäden der Lipidbarriere sein, die sich einerseits im Elektronenmikroskop beobachten und daneben durch eine Erhöhung des TEWL nachweisen lassen (Fartasch, 1997). Als weitere Ursache für die Resorptionserhöhung kommt einer Verbesserung der Hydratation des Stratum corneum nach Bindung des Tensides an epidermale Proteine in Frage. Durch die Kopplung des Tensides an den Wirkstoff durch Ausbildung von Ionenpaaren (Lipophilisierung) konnten NEUBERT et al. einen gesteigerten Arzneistofftransport aufzeigen (1984).

Die Verwendung kationischer Tenside (Alkylammoniumhalogenide) führt zu einer noch stärkeren Schädigung der Haut, weshalb ihr Einsatz als Penetrationspromotor sehr kritisch zu bewerten ist. Hingegen erscheint die Anwendung von nichtionogenen Tensiden durch das geringere irritative Potential sinnvoll. Zu den wichtigsten verträglichen Vertretern dieser Modulatoren zählen die Fettsäureester des Sorbitans (Span[®]-Reihe), des Polyoxyethylensorbitans (Tween[®]-Reihe) und die Poloxamere (Blockpolymere aus Polyoxyethylen und Polyoxypropylen). Ihr Wirkungsmechanismus steht im Zusammenhang mit der Interkalation der Tenside zwischen die interzellulären Lipide der Hornschicht. Gleichfalls werden Wechselwirkungen mit den intrazellulären Proteinen (Keratinfilamenten) für einen erleichterten Transport des Wirkstoffs beschrieben (Ziegenmeyer, 1992).

2.5 Biotin

2.5.1 Physikochemische Eigenschaften

Bereits 1942 konnte durch die Untersuchungen von DU VIGNEAUD die Klärung des chemischen Aufbaus des Vitamins erbracht werden (Abb. 2-9). Von seiner Grundstruktur her ordnet man es den B-Vitaminen zu. Seiner chemischen Zusammensetzung nach besteht Biotin aus einem bicyclischen Derivat des Harnstoffs mit einem Imidazolidon- und einem Thiophanring (Roth, 1987).

Zur Klasse der wasserlöslichen Vitamine gehörend, sind dem Biotin hydrophile Eigenschaften zuteil. Dieser Aspekt konnte durch die Bestimmung des sehr niedrigen Octanol/Wasser-Verteilungskoeffizienten ($PC = 0,7$) bestärkt werden (Dollery, 1991). Wäßrige Lösungen von Biotin besitzen schwach saure Eigenschaften ($pH=3,5$). Das Molekül selbst verhält sich gegenüber den meisten schwachen Säuren und Alkali sowie Hitze stabil. Sensibel reagiert das Vitamin hingegen auf die Einwirkung von UV-Licht und Oxidationsmitteln (Bässler et al., 1992).

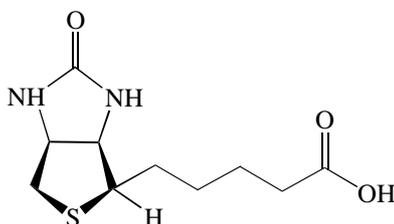


Abb. 2-9 Struktur von Biotin - $C_{10}H_{16}O_3N_2S$ [244,31]

2.5.2 Pharmakologie des Vitamins

Biotin spielt eine bedeutende metabolische Rolle in den Stoffwechselprozessen der B-Vitamine. In seiner Funktion als CO_2 -Überträger befindet sich das Biotin als prosthetische Gruppierung eng in den Ablauf enzymkatalysierter Reaktionen eingebunden (Bitsch und Bartel, 1994). Im menschlichen Organismus unterstützt das Vitamin drei mitochondriale Carboxylasen, die Pyruvat-Carboxylase, die Propionyl-CoA-Carboxylase und die β -Methylcrotonyl-CoA-Carboxylase sowie die zytosolische Acetyl-CoA-Carboxylase (Bonjour, 1984). Hierbei bedarf es der Ausbildung eines CO_2 -Biotin-Enzym-Komplexes (= aktives Carbonyl), um die Umwandlung des Substrates in das carboxylierte Produkt zu vollenden (Lynen, 1959). Durch die Cofunktion dieses biochemischen Carboxylgruppenüberträgers kann beim Biotin von einem indirekten Einflußfaktor auf den Ablauf grundlegender Stoffwechselvorgänge wie der Gluconeogenese, der Fettsäuresynthese, des Propionatmetabolismus und auch den Abbau von Aminosäuren ausgegangen werden. Besondere Aufmerksamkeit gilt der Beteiligung an der Umsetzung von Acetyl-CoA zu Malonyl-CoA, dem ersten Schritt der Biosynthese von Fettsäuren.

Neben seiner Funktion als Coenzym besitzt Biotin eigenständige pharmakologische Wirkungen. An diese ist in besonderem Umfang die Therapie von Erkrankungen der Hautanhangsgebilde geknüpft (Floersheim, 1992; Schmidt, 1993). Die Begründung des Mechanismus betreffs der Regulation des

Wachstums- und Differenzierungsverhaltens des Keratinozyten wird jedoch kontrovers diskutiert (Fritsche, 1990; Fritsche et al., 1991; Limat et al., 1996).

Für den menschlichen Organismus konnten bisher keinerlei toxische Auswirkungen von Biotin gefunden werden. Auch nach der Applikation hoher Dosen scheint es sich um einen unbedenklichen Stoff zu handeln (Miller und Hayes, 1982).

2.5.3 Dermatologische Relevanz von Biotin

Die Effektivität der Biotintherapie in Form von parenteraler oder oraler Applikation hoher Dosen konnte bei Biotin-Mangelerscheinungen und dem multiplen Carboxylasemangel deutlich gemacht werden (Dakshinamurti und Chauhan, 1989; Roth, 1989). Erkrankungen diesen Typs stehen im direkten Zusammenhang mit dem Biotin-Stoffwechsel. Daneben sind zur Behandlung von Haut-, Haar- und Nagelerkrankungen hauptsächlich die eigenständigen pharmakologischen Wirkungen des Vitamins von Interesse. Bereits 1969 berichteten BONNET und FLORENS über die positiven Einflüsse von Biotin als Adjuvans bei der Behandlung von Haarausfall, seborrhoischer Dermatitis und polymorpher Akne. Umfangreiche Studien untermauern seitdem diesen therapeutischen Ansatz. Nachweislich konnte die Bedeutsamkeit von Biotin bei der Therapie unterschiedlicher Formen der Alopezie, atopischer und seborrhoischer Dermatitis sowie bei weichen, brüchigen und splitternden Nägeln belegt werden (Bitsch und Bartel, 1994; Colombo et al., 1990). Ferner ließ sich eine Verbesserung der Haarqualität, belegt anhand elektronenmikroskopischer Untersuchungen, nachweisen (Floersheim, 1992).

Grundlegend bleibt der Therapieerfolg jedoch an die systemische Applikation von Biotin gebunden. In einer vergleichenden Studie konnte mit einer Applikation von 2,5 mg/d die wirksame Dosis zur Behandlung von Haar- und Nagelwachstumsstörungen ermittelt werden (Siebert und Schneeweiß, 1996). Eine Erhöhung der applizierten Dosis führte nicht zur Verbesserung der Symptomatik, wohl aber zu einem beschleunigten Wirkungseintritt und einem stärkeren Rückgang der Wachstumsstörung.

Allgemein erscheint die Tatsache, daß sich sichtbare Erfolge zumeist erst nach einem ausgedehnten Behandlungszeitraum (mehrere Monate) einstellen, ungünstig für die Auswahl des Vitamins als Therapeutikum bei den bereits erwähnten Symptomen. In allen durchgeführten Studien führte die systemische Therapie mit Biotin nur zu minimalen unerwünschten Nebenwirkungen, die vielmals nicht im direkten Zusammenhang mit der Applikation des Vitamins standen.

Der Einfluß topisch applizierter biotinhaltiger Formulierungen mit einem Biotingehalt von 0,25% und 0,50% wurde 1995 erstmals von GILLI und FLOERSHEIM an der Altershaut ermittelt. Resultierend war eine Veränderung des klinischen Erscheinungsbildes in Form einer deutlichen Verminderung der Fältchenausprägung. Nach der dermalen Applikation von Biotin waren bisher keinerlei epitheliale und histopathologische Veränderungen der Haut nachweisbar.

3 IN VITRO-UNTERSUCHUNGEN ZUM EINFLUß VON BIOTIN AUF HUMANE KERATINOZYTEN

3.1 Einfluß auf die Proliferation von Keratinozyten

Zur Beurteilung der Zytotoxizität topisch applizierter Arznei- und Hilfsstoffe werden in der Dermatologie üblicherweise Methoden herangezogen, die zur Erfassung des Einflusses dieser Substanzen auf das Proliferationsverhalten dienen. Eine standardisierte Methode zur Charakterisierung des Zellwachstums stellt hierbei die Bestimmung der DNA-Syntheseleistung anhand des ³[H]-Thymidin-Einbaus in die DNA dar. Bei einer konstanten Anzahl von Zellen pro Ansatz erhält man ein Maß für die Zellen, die sich in der S-Phase des Zellzyklus befinden, da an dieser Stelle der Einbau des markierten Basenanalogs in die DNA erfolgt.

Weiterhin lassen sich mittels DNA-Zytometrie durch spezifische Färbemethoden die Anteile proliferierender Zellen im Zellzyklus bestimmen (Kap. 2.1.3.1). Zur detaillierten Untersuchung des Wachstums der Zellen können daneben Markerproteine (Ki-67, PCNA, p21...), welche als typische Moleküle in den einzelnen Phasen des Zellzyklus exprimiert vorkommen, determiniert werden (Galand und Degraef, 1989; Schwarting et al., 1986). Ausgewählte Parameter dieser Methodik wurden im speziellen Fall für das zu untersuchende Vitamin im folgenden ermittelt.

Als Inkubationszeiten für die Einwirkung von Biotin auf den Keratinozyten wurden *24 h, 48 h, 72 h und 96 h* gewählt. Diese Auswahl erfolgte orientierend an früheren Studien zur Verträglichkeit topisch zu applizierender Wirk- und Hilfsstoffe (Brosin et al., 1997; Hofland et al., 1991; Limat et al., 1996; Ponec et al., 1990). Als Konzentrationsbereich wurde für die Inkubation mit Biotin ein breites Spektrum um den physiologischen Level von 10^{-5} mol/l gewählt (Limat et al., 1996).

3.1.1 Untersuchungen zum ³[H]-Thymidin-Einbau in die DNA

Ergebnisse

Nach dem bereits erwähnten Zeitschema (Kap. 3.1) wurden die Untersuchungen zum Proliferationsverhalten von humanen Keratinozyten unter Einfluß verschiedener Biotinkonzentrationen durchgeführt. Am 3. Tag nach Einsaat der Zellsuspensionen (HaCaT als auch native Vorhautkeratinozyten) in 24-er Well Gewebe-Kulturplatten (Kap. 8.1.3.1) begann sich ein konfluierend wachsender Zellrasen im Kulturgefaß auszubilden. Nach Zusatz der definierten Mengen (Abb. 3-1 und Abb. 3-2) an Biotin konnte nach *24 h, 48 h, 72 h und 96 h* die Quantifizierung der DNA-Syntheseleistung erfolgen. Die Ergebnisse der Untersuchungen finden sich in den folgenden Abbildungen im Vergleich zur Kontrolle (Puffer nach Mc Iloaine ohne Biotinzusatz) dargestellt.

Im Kurvenverlauf der einzelnen Untersuchungszeiträume betrachtet, waren die Meßergebnisse beider Kulturen bei keiner der applizierten Konzentrationen an Biotin von den Kontrollwerten zu unterscheiden (Abb. 3-1 und Abb. 3-2).

Innerhalb der einzelnen Konzentrationen gesondert betrachtet (Abb. 3-1), vollzogen sich in der HaCaT-Kultur Änderungen der Syntheseleistungen bei variablen Inkubationszeiten. So war nach der Applikation von 10^{-4} mol/l Biotin eine *geringfügige Proliferationssteigerung* im Meßzeitraum von *48 h bis 72 h* sichtbar. Diese blieb jedoch auf die Dauer von 24 h beschränkt, da sich nach 96 h die DNA-Syntheseleistung wieder auf dem Niveau der Kontrolle befand. Die Inkubation von 10^{-5} mol/l,

dem physiologischen Biotinlevel, ergab ebenso wie alle anderen Konzentrationen keinerlei meßbare Verschiebungen der Proliferation über den vollständigen Untersuchungszeitraum.

Bei den verwendeten nativen humanen Keratinozyten war die Streubreite der Meßwerte geringer als in der zuvor untersuchten HaCaT-Kultur. Die Daten der DNA-Syntheseleistung wiesen über den gesamten Kurvenverlauf bei allen Mediumkonzentrationen keine signifikanten Unterschiede im Vergleich zur Kontrolle aus. Im Gegensatz zu den HaCaT-Keratinozyten konnte bei diesen Messungen kein zeitlicher Einfluß auf die Proliferation festgestellt werden.

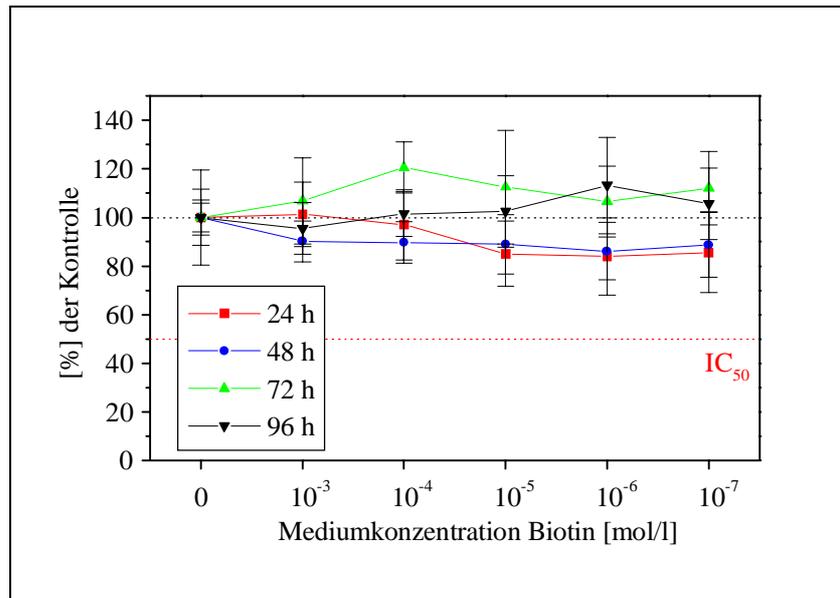


Abb. 3-1 Einfluß von Biotin auf die Syntheseleistung von HaCaT-Keratinozyten, erfaßt anhand des ³[H]-Thymidin-Einbaus in die DNA ($\bar{x} \pm \text{SEM}$; n = 8)

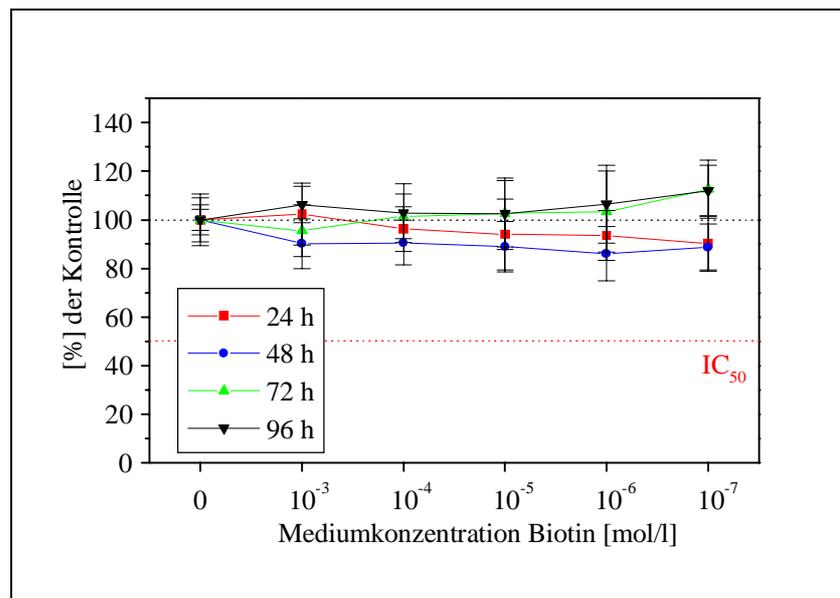


Abb. 3-2 Einfluß von Biotin auf die Syntheseleistung von nativen humanen Keratinozyten, erfaßt anhand des ³[H]-Thymidin-Einbaus in die DNA ($\bar{x} \pm \text{SEM}$; n = 8)

Diskussion

Die erhaltenen Aussagen zum Proliferationsverhalten beider epidermaler Zelltypen unter dem Einfluß von Biotin sprechen durchweg für die positive Akzeptanz des Vitamins. Auf keine der applizierten Mengen an Biotin antworteten die in vitro-Systeme mit einer toxischen Reaktion (IC_{50} nicht bestimmbar). Analog zu den Untersuchungen von LIMAT et al. waren über das gesamte Spektrum an Konzentrationsbreite keine Proliferationsveränderungen nachzuweisen (Limat et al., 1996).

Die Differenzen, die im zeitlichen Verlauf bei der Inkubation der HaCaT-Kultur mit 10^{-4} molarer Lösung auftraten, wurden zunächst als eine Art der Adaptation der Zelle gegenüber dem Wirkstoff diskutiert. Veränderungen dieser Art könnten sich in einer möglichen Arretierung in einer Zellzyklusphase äußern. Zur Klärung des Sachverhaltes folgten flowzytometrische Untersuchungen verschiedener Zellzyklus-assoziiierter Parameter (Kap. 3.1.2).

3.1.2 Durchflußzytometrische Untersuchungen zum Proliferationsverhalten

Mit der Durchflußzytometrie wurde ein potentes Verfahren zur Vervollständigung der Charakterisierung des Wachstumsverhaltens von Keratinozyten unter der Einwirkung der zu untersuchenden Substanz herangezogen (Clausen, 1983; van Erp et al., 1994). Bei dieser Art der Messung von suspendierten Zellen läßt sich neben strukturellen Parametern auch die Zellanzahl erfassen. Durch die Färbung mit fluoreszierenden Stoffen (z.B. mit Propidiumiodid, welches zwischen benachbarte Basenpaare der DNA interkaliert) wird die Bestimmung der DNA-Ploidie und der Verteilung der Zellen im Zellzyklus möglich. Somit sollten durch die Flowzytometrie umfassende Aussagen zum Proliferationsverhalten von Keratinozyten unter Einfluß von Biotin gewonnen werden. Die Variabilität des Meßverfahrens macht die Spezifikation von Proliferations-assoziierten Proteinen mittels fluoreszenzmarkierten Antikörpern durchführbar. Unter Nutzung dieses analytischen Verfahrens erschien die Erfassung des Kernantigens Ki-67, welches nur von proliferierenden Zellen exprimiert wird (Rijzewijk et al., 1989), sinnvoll. Der FITC-markierte monoklonale Antikörper Ki-67 markiert dieses Antigen, welches in der späten G_1 -, S- und G_2/M -Phase der Zellteilung exprimiert wird (Gerdes et al., 1984). Zusammengefaßt läßt sich durch die Bestimmung des Kernantigens Ki-67 die Wachstumsfraktion umfassend charakterisieren.

Ergebnisse

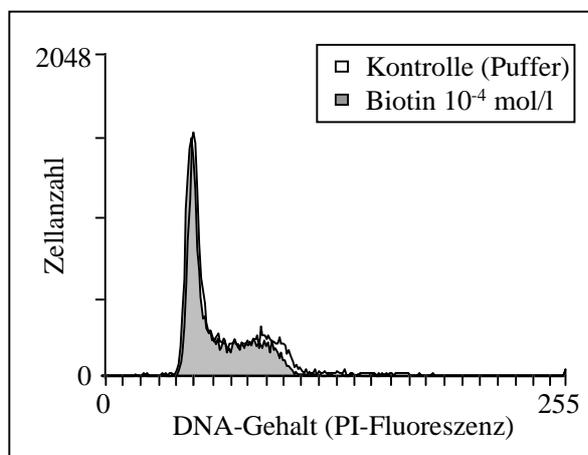


Abb. 3-3 DNA-Histogramm von HaCaT-Zellen nach Biotininkubation (24 h)

HaCaT-Keratinozyten, die mit einer Konzentration von 10^{-4} mol/l Biotin inkubiert wurden, zeigten im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen (Medium-SFM und Puffer-Mc Iloaine) *keine Abweichungen in den einzelnen Zyklusphasen* (Tab. 3-1, Abb. 3-3). Daneben konnte ebenfalls eine Unabhängigkeit vom Inkubationszeitraum ermittelt werden.

Des weiteren erfolgte die Charakterisierung der Wachstumsfraktion nach flowzytometrischer Erfassung des Ki-67 Kernantigens. Anhand der Fluoreszenzintensität eines FITC-markierten Antikörpers gegen das Ki-67 Protein wurden kultivierte Keratinozyten untersucht, denen während des Wachstums Biotin über unterschiedliche Zeitdauer (24 - 72 h) zugegeben wurde.

Im Ergebnis dieser Versuche ließen sich keine Unterschiede in den Fluoreszenzintensitäten der Proben nachweisen. Die Dotplots zeigten keine Ab- bzw. Zunahme der Ki-67 positiven Zellen, so daß auch die Expression des Antigens *Ki-67* im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle *bei* einer Kultivierung mit 10^{-4} mol/l Biotin Mediumkonzentration im Untersuchungszeitraum von 48 h und 72 h als *unbeeinflusst* einzustufen ist (Abb. 3-4).

Tab. 3-1 Anteile der HaCaT-Zellen an den Zellzyklusphasen nach Inkubation mit Biotin (10^{-4} mol/l, DNA-Färbung mit PI) ($\bar{x} \pm SD$, n = 5)

Zyklusphase	G ₀ /G ₁ -Phase	S-Phase	G ₂ /M-Phase
Kontrolle - Puffer (Mc Iloaine)	50,8 ± 1,6%	40,5 ± 0,8%	8,8 ± 1,4%
Kontrolle - Medium (SFM)	50,1 ± 1,5%	40,0 ± 0,8%	10,0 ± 1,6%
24 h nach Biotin Inkubation	51,4 ± 1,5%	39,9 ± 1,7%	8,7 ± 1,0%
48 h nach Biotin Inkubation	51,7 ± 2,4%	38,7 ± 1,9%	9,6 ± 2,0%
72 h nach Biotin Inkubation	49,3 ± 0,8%	41,8 ± 1,7%	8,9 ± 2,2%

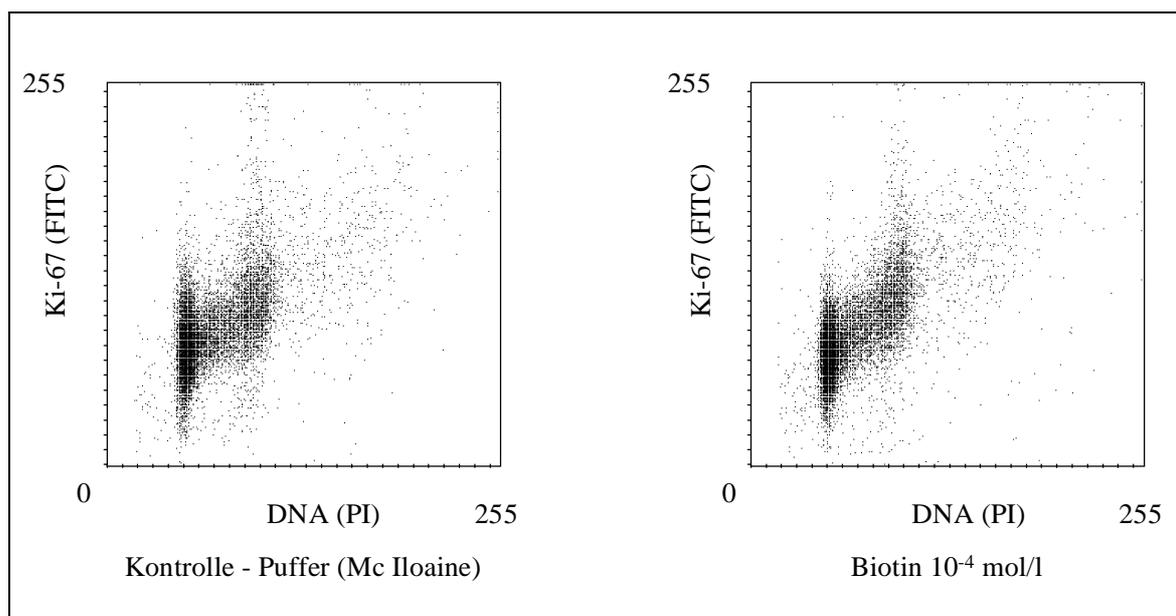


Abb. 3-4 Flowzytometrische Bestimmung von Ki-67 nach Markierung mit FITC-Ki-67 AK 48h nach Biotinzugabe

Diskussion

Zur vollständigen Charakterisierung des Proliferationsvorganges der Keratinozyten eignet sich neben der Erfassung der DNA-Syntheseleistung noch die Betrachtung der einzelnen Phasen des Zellzyklus (Kap. 2.1.3, Abb. 2-4). Im gleichen Maße interessant ist die Determinierung von spezifischen, von der Zelle exprimierten Proteinen, die eng mit der Regulation der Proliferation verknüpft sind (Bruno et al., 1992; van Erp et al. 1994). Beide Strategien wurden bei den vorgestellten Untersuchungen beachtet und für die Klärung der Wirkungsweise von Biotin herangezogen.

Die erhaltenen Resultate zu den DNA-Gehalten in den einzelnen Zyklusphasen (Tab. 3-1) ergaben ein für die HaCaT-Kultur typisches Verteilungsmuster. Unter Addition von Biotin reagierten die konfluenten Zellkulturen weder mit einer Erhöhung noch mit einer Reduktion der Syntheseleistung der DNA. Der ausbleibende Effekt geht konform mit den Ergebnissen, die unter Anwendung vorausgegangener Methoden ($^3\text{[H]}$ -Thymidin-Einbau, Abb. 3-1 und Abb. 3-2) an HaCaT-Zellen als auch an nativen humanen Keratinozyten ermittelt werden konnten (Kap. 3.1.1). Bestätigung dafür sind ebenfalls parallele Resultate von LIMAT et al. an der HaCaT-Kultur und an ORS-Zellen (1996).

VAN RUISSEN et al. fanden bei ihren Untersuchungen eine Abhängigkeit der Proliferation von spezifischen Wachstumsfaktoren in der Zellkultur (1994). Unter der Annahme, daß Biotin analoge Effekte entfalten könnte, wäre eine mögliche Arretierung der Zelle nach Erhalt der ersten Ergebnisse des $^3\text{[H]}$ -Thymidin-Einbaus denkbar. Die Durchflußzytometrie erbrachte das Resultat, daß die Zellkinetik ohne Zweifel frei von dem Einfluß des Biotins blieb. Es ließ sich keine Arretierung in der G_1 -Phase (G_1 -Block) oder eine etwaige Beschleunigung der G_2/M -Phase (Mitose) nachweisen.

Um die Proliferation von humanen Keratinozyten umfassender zu beurteilen, wurde der Proliferationsmarker Ki-67, welcher in der Wachstumsfraktion (späte G_1 -, S-, G_2 - und M-Phase) exprimiert wird (Gerdes et al., 1984), erfaßt. Diese Wachstumsfraktion spiegelt dabei das Verhältnis proliferierender Zellen zu ruhenden Zellen wider. Somit erschien die Bestimmung von Ki-67 als eine günstige Methode zur Bewertung offener Fragestellungen, wie sie nach Erfassung der S-Phase mittels Einbau von $^3\text{[H]}$ -Thymidin in die DNA auftraten.

Die Resultate der Untersuchungen zur Wachstumsfraktion (Abb. 3-4) veranschaulichen die positive Akzeptanz von Biotin. Wie schon im DNA-Status sichtbar (Tab. 3-1) und mittels $^3\text{[H]}$ -Thymidin-Einbau zuvor nachgewiesen (Kap. 3.1.1), zeigten sich auch hier im Untersuchungszeitraum bei variabler Mediumkonzentration an Biotin keine Veränderungen der Proliferation des Zellsystems. Diese positive Bilanz hinsichtlich der Verträglichkeit von Biotin dürfte weitere Untersuchungen spezifischer Proliferationsmarker (z. B. PCNA) ausschließen.

3.2 Einfluß von Biotin auf die Differenzierung von Keratinozyten

Die terminale Differenzierung des Keratinozyten stellt neben der Apoptose eine besondere Form des programmierten Zelltodes dar. In ihrer Entwicklung von der proliferativ aktiven Basalzelle zum kernlosen Corneozyten durchläuft die Zelle verschiedene Stadien mit unterschiedlicher biochemischer Aktivität. Dabei werden vom Keratinozyten spezifische Moleküle exprimiert (Kap. 2.1.3). Moderne analytische Verfahren sind heute in der Lage, komplexe Veränderungen in diesen Stadien der Differenzierung zu erfassen. So bietet die Flowzytometrie die Möglichkeit, neben der Bestimmung von Differenzierungsproteinen (Involucrin, Loricrin, Filaggrin, Elafin) durch Bindung an fluoreszenzmarkierte AK ebenfalls schnelle intrazelluläre Prozesse wie die Veränderungen des Calciumgehaltes, des Membranpotentials oder des pH-Wertes zu bewerten.

3.2.1 Durchflußzytometrische Untersuchungen zur Involucrin-Expression

Das Protein Involucrin ist als wesentlicher Marker der terminalen Differenzierung des Keratinozyten etabliert. Es ist eng an der Ausprägung der cornified envelope beteiligt (Hohl, 1990). In der Proteinhülle des Corneozyten sorgt es als eine Art Matrix, im Verband mit weiteren Proteinen, für die Verankerung der Keratinfilamente. Die Expression von Involucrin findet bereits sehr zeitig im Stratum spinosum statt, weshalb man dieses Protein als frühen Marker der Differenzierung bezeichnet (Ishida-Yamamoto et al., 1997).

Ergebnisse

Die Wirkung von Biotin auf die Expression von Involucrin wurde mittels Flowzytometrie untersucht. Dazu erfolgte die Inkubation konfluenter HaCaT-Keratinozyten über einen Zeitraum von 48 h. Nach Ablauf der Inkubationszeit fand die Erfassung des exprimierten Involucrins mit dem fluoreszenzmarkierten AK (FITC-anti-Involucrin) (Kap. 8.1.4.1) statt.

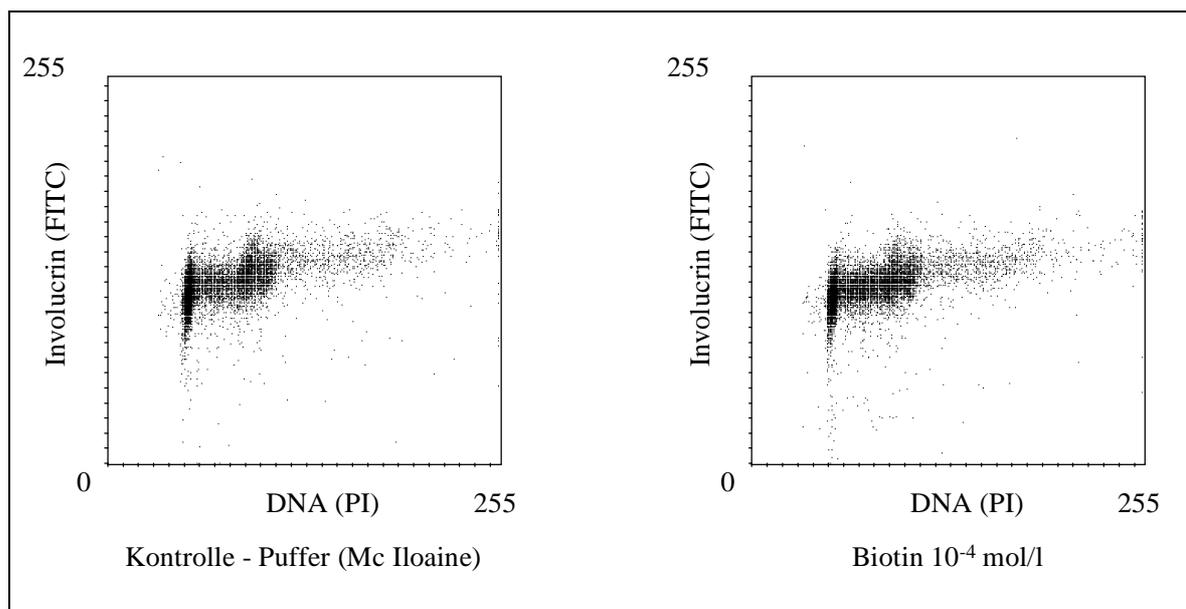


Abb. 3-5 Flowzytometrische Bestimmung von Involucrin nach Markierung mit FITC-anti-Involucrin AK

Im Vergleich zu unbehandelten Keratinozyten (Kontrolle mit Puffer Mc Illoaine) konnten unter Biotineinwirkung keine Veränderungen im Involucrinstatus nachgewiesen werden. Dieses Resultat wurde bei Proben mit einer Mediumkonzentration von 10^{-6} bis 10^{-4} mol/l gleichermaßen beobachtet (n = 5). In Abb. 3-5 findet sich das ausgewählte Beispiel der höchsten Biotinkonzentration dargestellt. Das Verteilungsmuster der markierten Zellen nach Biotinapplikation war im Vergleich zur Kontrolle gleichbleibend.

Diskussion

Den Nachweis der Hochregulation der Involucrinexpression erbrachten RATNAM et al. bereits eindrucksvoll durch die Variation der extrazellulären Ca^{2+} -Konzentration und den Zusatz von Vitamin D-Analogen (1996). Versuche von PARAMIO und JORCANO, bei denen eine Inhibierung der Tyrosinkinase induziert wurde, zeigten dagegen eine verzögerte Expression von Involucrin (1997).

Untersuchungen zum Einfluß von Biotin auf das Zellsystem HaCaT hatten zu Modifikationen im Keratinmuster geführt (Fritsche et al., 1991). Hingegen fanden LIMAT et al. an HaCaT- und ORS-Zellen keinerlei Änderungen im Proliferations- und Differenzierungsverhalten (1996). Somit bestand die Notwendigkeit, zur Klärung dieser konträren Aussagen eigene Analysen anzustreben.

Die Expression des Differenzierungsmarkers Involucrin kann somit nach den vorliegenden Ergebnissen als frei vom Einfluß des Vitamins H gewertet werden. Obwohl dieses Resultat unter Nutzung einer anderen Analytik und in einem abweichenden Untersuchungszeitraum zustande kam, weist es eine Analogie zu den Ergebnissen von LIMAT et al. auf (1996). Somit läßt sich der Befund als gesichert beurteilen.

3.2.2 Durchflußzytometrische Untersuchungen zum intrazellulären Calciumgehalt

Der Ablauf zellregulatorischer Vorgänge im menschlichen Organ Haut als auch in spezifischen Zellkulturen ist eng an die Konzentration von verschiedenen Metallionen geknüpft (Boyce und Ham, 1983; Lee et al., 1994). Das Calcium nimmt insgesamt von seiner Funktion her eine bedeutende regulatorische Stellung ein (Whitfield et al., 1995). In vielfältigen Untersuchungen wurde bisher intensiv auf den intra- und extrazellulären Calciumgehalt eingegangen und dabei die Funktion als „*second messenger*“ und *regulierender Faktor im Differenzierungsprozeß* der Zelle erläutert (Fairley, 1988; Menon et al., 1994).

Bei der Kultivierung epidermaler Zellkulturen nimmt die *Calciummediumkonzentration* Einfluß auf den *intrazellulären Calciumgehalt* (Hennings et al., 1980). Konzentrationen unterhalb von 0,1 mM haben eine Ausprägung von proliferierenden Monoschichten zur Folge, wie sie besonders zu toxikologischen Untersuchung herangezogen werden (Maier et al., 1991; Ponc et al., 1989). Zur Förderung der Differenzierung und Ausprägung mehrschichtiger Epithelien dienen physiologische als auch Calciumkonzentrationen oberhalb von 1,0 mM (Watt und Green, 1982).

Im Zusammenhang mit dem Wechselspiel zwischen dem extrazellulären und dem intrazellulären Calciumlevel und dessen Beeinflussung durch Wirkstoffe stehen Untersuchungen, die sich mit der Differenzierung im Endstadium, mit der Integrität der Barrierefunktion des Stratum corneum beschäftigen (Jones und Shraper, 1994; Lee et al., 1992; Lee et al., 1994). Unter dem Aspekt der Veränderung bestimmter enddifferenzierter Merkmale der Haut und deren Anhangsgebilde erschien

ein möglicher Wirkungsmechanismus des Biotins über die Regulation des Calciumstatus sinnvoll (Floersheim, 1989; Fritsche, 1990).

Ergebnisse

Bei variablen Mediumkonzentrationen an Biotin in der Kultur von HaCaT-Keratinozyten zeigten sich keine Abweichungen in der Intensität der gemessenen intrazellulären Calciumsignale (Abb. 3-6). Der intrazelluläre Calciumhaushalt der Zellen blieb unter den entsprechenden Bedingungen (Kap. 8.1.4.2.1) über den gesamten Untersuchungszeitraum unverändert.

Anschließend kinetische Untersuchungen im Kurzzeitbereich (bis zu acht min nach Applikation) ergaben ebenfalls keinen Zusammenhang zwischen applizierter Biotinmenge und dem erhaltenen intrazellulären Calciumsignal. Selbst nach Zugabe hoher Wirkstoffmengen (0,5 mmol) blieb der intrazelluläre Calciumlevel auf dem Niveau der unbehandelten Kontrolle (Abb. 3-7).

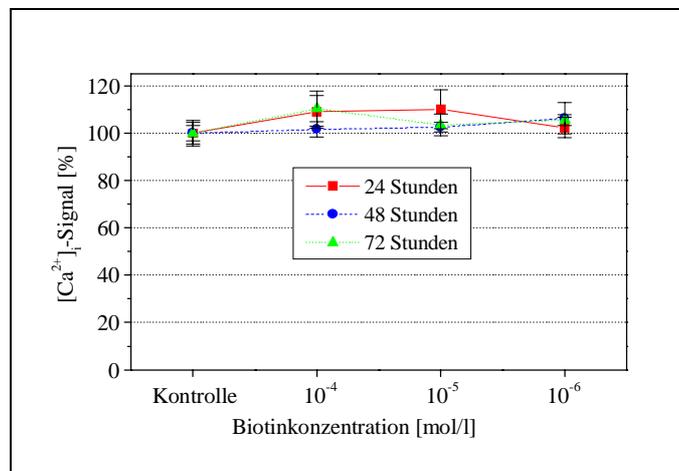


Abb. 3-6 Flowzytometrische $[Ca^{2+}]_i$ -Siganle von HaCaT-Zellen nach Einwirkung von Biotin ($\bar{x} \pm SEM$; n = 5)

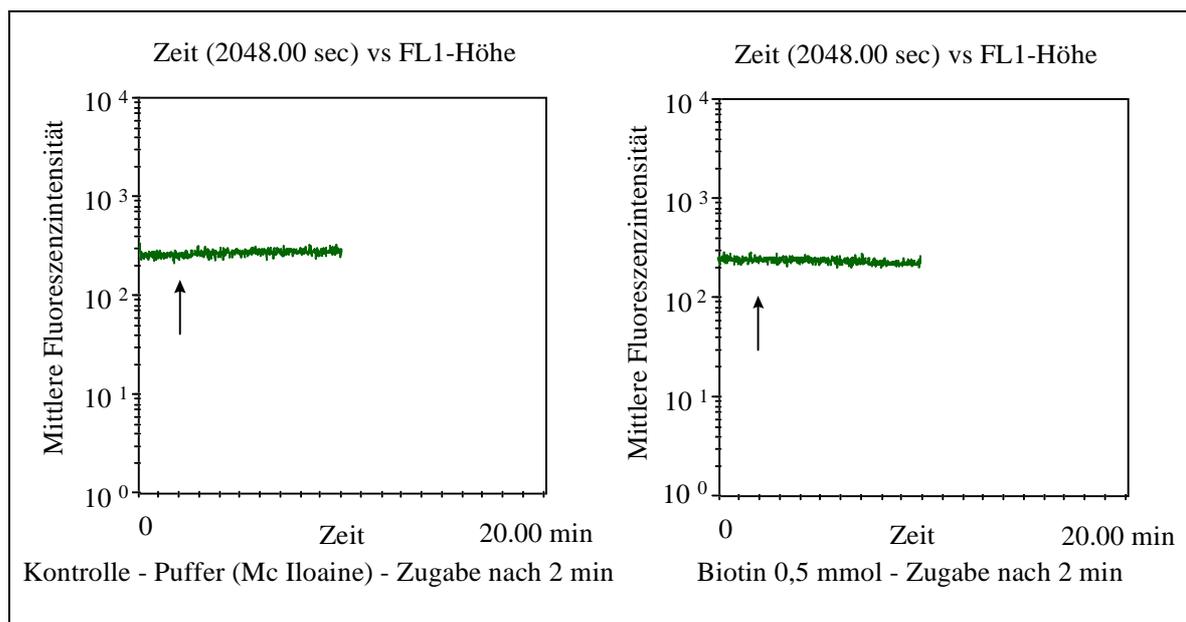


Abb. 3-7 Flowzytometrische Bestimmung des intrazellulären Calciumgehaltes

Diskussion

Die Calciumhomöostase in biologischen Systemen kann als Wechselspiel zwischen extra- und intrazellulärer Konzentration beschrieben werden. Gleichmaßen liegen Ca^{2+} -Gleichgewichte extra- als auch intrazellulär nebeneinander vor. Das sensiblere intrazelluläre Ca^{2+} -Gleichgewicht, welches Gegenstand der Untersuchungen zur Wirkungsweise von extrazellulärem Biotin war, ist ständig äußeren Reizen ausgesetzt und spiegelt somit geringste Veränderungen wider. HENNINGS et al. fanden reflektorische Reaktionen des intrazellulären Ca^{2+} -Gehalts auf eine Erhöhung der Ca^{2+} -Konzentration im Medium (1989).

Das verwendete Schema (Kap. 8.1.4.2.1) zur Prüfung der Biotinwirkung auf den freien intrazellulären Ca^{2+} -Gehalt sollte sich wegen der Vergleichbarkeit möglichst nahe an den zuvor gelaufenen Untersuchungen orientieren. So stand die Verwendung von 10^{-6} - 10^{-4} molarer Mediumkonzentration im Vordergrund der Analyse. Daß auch hier keine Veränderungen nach Zusatz des Vitamins nach erfolgter Kultivierungsdauer von 48 h auftraten, spricht für die Stabilität der bestimmten Differenzierungsmarker gegenüber variabler Konzentration an Vitamin H.

Nachdem über lange Inkubationszeiträume eine Modifikation der intrazellulären Calciumspiegel ausblieb, sollten noch schneller ablaufende Prozesse erfaßt werden. Hierzu diente die Kurzzeitkinetik, bei der dem zu analysierenden System unter der Messung Biotin zugegeben wurde. Während jedoch vergleichsweise freie Fettsäuren nach kurzer Zeit eine Veränderung der freien intrazellulären Calciumkonzentration auslösen konnten, blieben ähnliche Effekte nach der Biotinapplikation aus (Glanz et al. 1996; Fröde, 1998).

3.3 Untersuchungen zur Beeinflussung der Apoptose von HaCaT-Keratinozyten

Im biologischen System sind Zellteilung und Wachstum unmittelbar mit dem *programmierten Zelltod* verknüpft. Bei der regulativen Entwicklung des Keratinozyten von der Basalzelle zur Hornzelle laufen unterschiedliche Formen des Zelltodes ab. Einen Teil davon stellt die bisher besprochene *terminale Differenzierung* dar; der andere wird durch die *Apoptose* beschrieben. Während nekrotische Erscheinungen im Organismus nur durch das Komplementsystem oder eine Virusinfektion ausgelöst werden können (bzw. durch extreme Abweichungen vom physiologischen Zustand), unterliegt die Induktion der Apoptose dem Einfluß extrazellulärer Reize. Das Einleiten apoptotischer Vorgänge kann durch DNA-Schädigungen, durch physiologische Signalstoffe wie den Tumornekrosefaktor, unter Einwirkung von Gamma- oder UV-Strahlen, Chemotherapeutika und unter Einfluß freier Radikale erfolgen (Noll und Eschborn, 1997; Paus et al., 1995; Rudin et al., 1997).

Morphologisch läßt sich im Anfangsstadium der Apoptose eine Abnahme des Zellvolumens beobachten. Dabei bleiben die Zellorganellen im Gegensatz zur Nekrose intakt. Nach Schrumpfung des Zellkerns und einer Verdichtung des Chromatins setzt der Abbau chromosomaler DNA ein. Während in der Cytoplasmamembran von *nekrotischen Zellen* die Bildung von Ausstülpungen und Bläschen - *membrane blebbing* - beobachtet wird, beginnen sich in apoptotischen Zellen *membrane coated vesicle*, sogenannte apoptotische Körperchen oder *apoptotic bodies* von der Zelle abzuschnüren. Diese wiederum fallen der Phagozytose benachbarter Zellen zum Opfer (Paus et al., 1995). Im Einhergang mit Veränderungen an der Cytoplasmamembran vollzieht sich die Verlagerung, physiologisch auf der cytoplasmatischen Membranseite lokalisierten Phosphatidylserins, auf die extrazelluläre Seite (Beverly et al., 1996; Darzynkiewicz et al., 1997). Dieser Prozeß kann als ein typischer Marker apoptotischer Zellen aufgefaßt wer. Für die nachfolgenden Untersuchungen wurde das Bindungsassay von Phosphatidylserin-Annexin-V-FLUOS genutzt und durch Ausschlußfärbung mit PI die Klassifizierung der Zellen mittels Durchflußzytometrie durchgeführt (Kap. 8.1.5, Tab. 3-2).

Tab. 3-2 Möglichkeiten der Klassifizierung der einzelnen Zelltypen und Fragmente

	Annexin-V-FLUOS	PI
vitale Zellen	negativ	negativ
apoptotische Zellen	<i>positiv</i>	negativ
spätapoptotische und nekrotische Zellen	<i>positiv</i>	<i>positiv</i>
Zellkerne	negativ	<i>positiv</i>

Ergebnisse

Ausgehend von den zu erwartenden Signalen am Durchflußzytometer erfolgte die Auswertung (Tab. 3-2) anhand der Trennung von vitalen, apoptotischen, spätapoptotisch/nekrotischen Zellen sowie durch PI markierte Zellkerne. Den zu untersuchenden Zellsystemen wurde 24 h vor der Messung das Lipid γ -Linolensäure zugesetzt. Damit konnte nachweislich an unbehandelten Keratinozyten (Medium ohne zusätzliche Biotinzugabe) eine Induktion der Apoptose aufgezeigt werden (Fröde, 1998). Eine Bestätigung dieser Resultate wird in Abb. 3-8 deutlich. Im Grundzustand des Zellsystems (ohne Fettsäurezusatz) lag eine Proportion von ca. 75% vitaler, ca. 10% apoptotischer

und ca. 10% spätapoptotische/nekrotischer Zellen vor. Schon die Zugabe von 20 μM γ -LA führte zu einer merklichen Veränderung des Verhältnisses zwischen vitalen und apoptotischen Keratinozyten. Messungen unter Einwirkung von 25 als auch 30 μM γ -LA zeigten eine Verstärkung des Befundes. Keratinozyten, die vor Zugabe der Fettsäure bereits über 48 h mit 10^{-4} molarer Biotinkonzentration im Wachstumsmedium vorinkubiert wurden, wiesen ein analoges Verhalten wie unbehandelte Keratinozyten auf (Abb. 3-8). Dies geht aus den simultanen Kurvenverläufen (statistisch nicht signifikant unterschiedlich) vitaler, apoptotischer und nekrotischer (sowie spätapoptotischer) Zellen hervor. Eine Verhinderung der Apoptose durch erhöhte Biotinzufuhr während des Wachstums der Keratinozyten unter in vitro-Bedingungen konnte im Untersuchungszeitraum nicht gefunden werden.

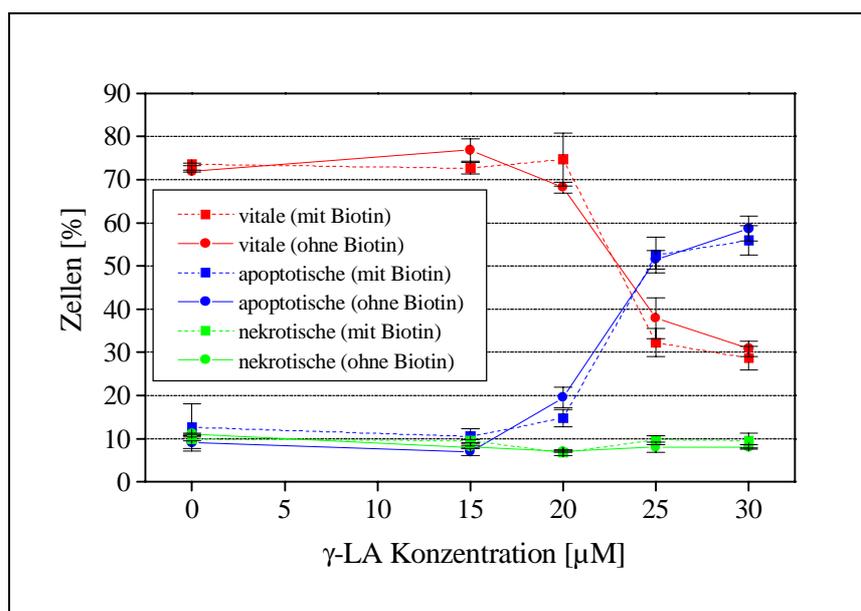


Abb. 3-8 Einfluß von Biotin (10^{-4} mol/l) auf HaCaT-Keratinozyten nach Induktion der Apoptose durch γ -Linolensäure (24 h Inkubation) ($\bar{x} \pm \text{SEM}$; n = 5)

Diskussion

Als Hintergrund der Untersuchungen zum Einfluß von Biotin stand zunächst die Frage nach einer möglichen Verhinderung apoptotischer Vorgänge nach prophylaktischer Behandlung. Des weiteren sollten parallel eventuelle regulative Eingriffe in den Ablauf des Zelltodes erfaßt werden.

Eine Induktion der Apoptose an der HaCaT-Kultur konnte durch UVB-Bestrahlung erzielt werden (Schwarz et al., 1995). Analoge Effekte traten nach Einwirkung von verschiedenen Fettsäuren auf die Zellen ein (Fröde, 1998). Zur Prüfung des Einflusses von Biotin auf apoptotische Zellen stand somit ein aussagekräftiges Modell zur Verfügung.

Die deutliche Abnahme in der Vitalität der behandelten Zellen und die Zunahme der Apoptose bei Konzentrationserhöhung der γ -Linolensäure sprechen für eine regulatorische Wirkung der Fettsäure. Eine angestrebte präventive Wirkung von Biotin durch Vorinkubation der Keratinozyten ließ sich dabei nicht nachweisen. Gleichzeitig trat auch kein Gegenteiliges Resultat auf, was im Einklang mit den erhaltenen Ergebnissen zum Wachstumsverhalten unter Biotinzusatz steht (Kap. 3.1). So läßt sich insgesamt schlußfolgern, daß Biotin die Apoptose unter den untersuchten Bedingungen weder verhindern, noch fördern kann.

3.4 Fettsäuresynthese von Keratinozyten

Fettsäuren sind als strukturgebende Komponenten der interzellulären Stratum corneum Lipide bekannt. In deren Komplexität beteiligen sie sich wesentlich an der Ausprägung der Barrierefunktion der Haut.

Daneben erfüllen sie als biologisch aktive Moleküle unentbehrliche Aufgaben bei der Umsetzung struktureller und metabolischer Funktionen in der lebenden Epidermis. In dieser Eigenschaft leisten sie als freie Moleküle oder gebunden in Form von komplexeren Lipiden (Phospholipide, Sphingolipide, Acylglyceride) ihren Beitrag zum Aufbau und zur Dynamik von zellulären Membranen.

Der Keratinozyt ist als metabolisch aktive Zelle in der Lage, freie Fettsäuren zu synthetisieren (Mogner et al., 1988), nicht aber essentielle Fettsäuren (Chapkin und Ziboh, 1984). Die Grenzen der Syntheseaktivität im endoplasmatischen Retikulum sind mit der Einführung (9,10-Dehydrogenase) einer Doppelbindung (Synthese von Ölsäure) erschöpft. Eine Erweiterung dieses Vorgangs ist nicht möglich, so daß zweifach ungesättigte Fettsäuren (Linolsäure) als essentiell gelten. Essentielle Fettsäuren müssen somit unter in vivo-Bedingungen dem Blutkreislauf entnommen werden. Mechanistische in vitro-Studien zu dieser Problematik berichten über unterschiedliche Auffassungen zu den Transportvarianten. Während FITSCHER und Mitarbeiter von einem durch Proteine vermittelten Transport der Fettsäuren ausgehen (1996), hält ZAKIM die einfache Diffusion für wahrscheinlicher (1996).

In der Literatur sind die Effekte von hoch dosiertem Biotin, welches allerdings über einen langen Zeitraum oral appliziert werden muß, gut dokumentiert (Colombo et al., 1990; Floersheim, 1992). So waren eindeutige Verbesserungen der Qualität von Hautanhangsgebilden und eine verminderte Fältchenausprägung der Altershaut am Probanden zu finden (Kap. 2.5) (Gilli und Floersheim, 1995). Der klärende Mechanismus dieser Wirkungen konnte bis heute nicht aufgezeigt werden.

Ein Zusammenhang zwischen der Funktion des Vitamins als einem Cofaktor des Enzyms Acetyl-CoA Carboxylase und der Regulation der Fettsäuresynthese im Keratinozyten sollte untersucht werden. Aus diesem Grund wurden dem Medium kultivierter HaCaT-Keratinozyten und dem humaner Vorhautkeratinozyten erhöhte Dosen an Biotin zugesetzt und der Einfluß auf die Lipidsynthese anhand ausgewählter Fettsäuren beurteilt.

3.4.1 Untersuchungen zum Fettsäuregehalt von Keratinozyten unter Einwirkung von Biotin

Ergebnisse

In der Abb. 3-9 und Abb. 3-10 befinden sich die aus Keratinozyten eluierten Mengen an Myristinsäure (MA), Palmitinsäure (PA), Stearinsäure (SA), Ölsäure (OA) und Linolsäure (LA) dargestellt. Eine Quantifizierung erfolgte von paarweisen Kulturen, die im Wachstumsprozeß unterschiedlichen Biotinzusätzen ausgesetzt waren. Zur Standardisierung wurden die mittels GC-MS bestimmten Fettsäuren dabei auf den Proteingehalt der erfaßten Keratinozytenanzahl bezogen (Kap. 8.1.6.2).

Der Abb. 3-9 sind die Resultate der Untersuchungen an der HaCaT-Kultur zu entnehmen. Die Zusammensetzung der Fettsäureanteile bei unbehandelten Zellen ergab eine Gleichförmigkeit der Niveaus von Palmitin-, Stearin- und Ölsäure (um 15 µg Lipid / mg Protein). Nur die Werte der kürzerkettigen Myristinsäure und der essentiellen Linolsäure bewegten sich unterhalb dieses Levels.

Die geringen Mengen an Linolsäure (unter 2,5 µg Lipid / mg Protein) blieben vom Biotinzusatz des Mediums unbeeinflusst. Für alle anderen Fettsäuren galt eine deutliche Abhängigkeit der ermittelten Konzentrationen vom verwendeten Biotingehalt. Die Kultivierung der Zellen im Medium mit einem Gehalt von 10⁻⁶ mol/l Biotin erbrachte keine Änderung der Lipidzusammensetzung. Erst nach Erreichen der Mediumkonzentration von 10⁻⁵ mol/l waren Steigerungen meßbar, wobei unterschiedlich starke Erhöhungen vorlagen. Das Konzentrationsniveau der Myristinsäure erhob sich geringer (ca. 2,5 µg Lipid / mg Protein mehr) als das der Palmitin-, Stearin- oder auch der Ölsäure. Letztere zwei konnten bis zum doppelten Wert gesteigert (Abb. 3-9, 10⁻⁴ und 10⁻³ mol/l Biotin im Medium) nachgewiesen werden. Während für Myristin-, Palmitin und Stearinsäure bereits die maximale Erhöhung der Fettsäuresynthese unter Einwirkung von 10⁻⁵ mol/l Biotin zu verzeichnen war, setzte die Steigerung der Ölsäurewerte verzögert ein. Erst bei 10⁻⁴ mol/l Biotin im Medium kam es zur Entfaltung des Maximalwertes (um 35 µg Lipid / mg Protein). Mit der Mediumkonzentration von 10⁻³ mol/l Biotin war die Zugabemöglichkeit an Vitamin H erschöpft, da die dafür benötigte Konzentration das Maximum der Löslichkeit von Biotin im verwendeten Puffer wiedergibt (Tab. 8-1).

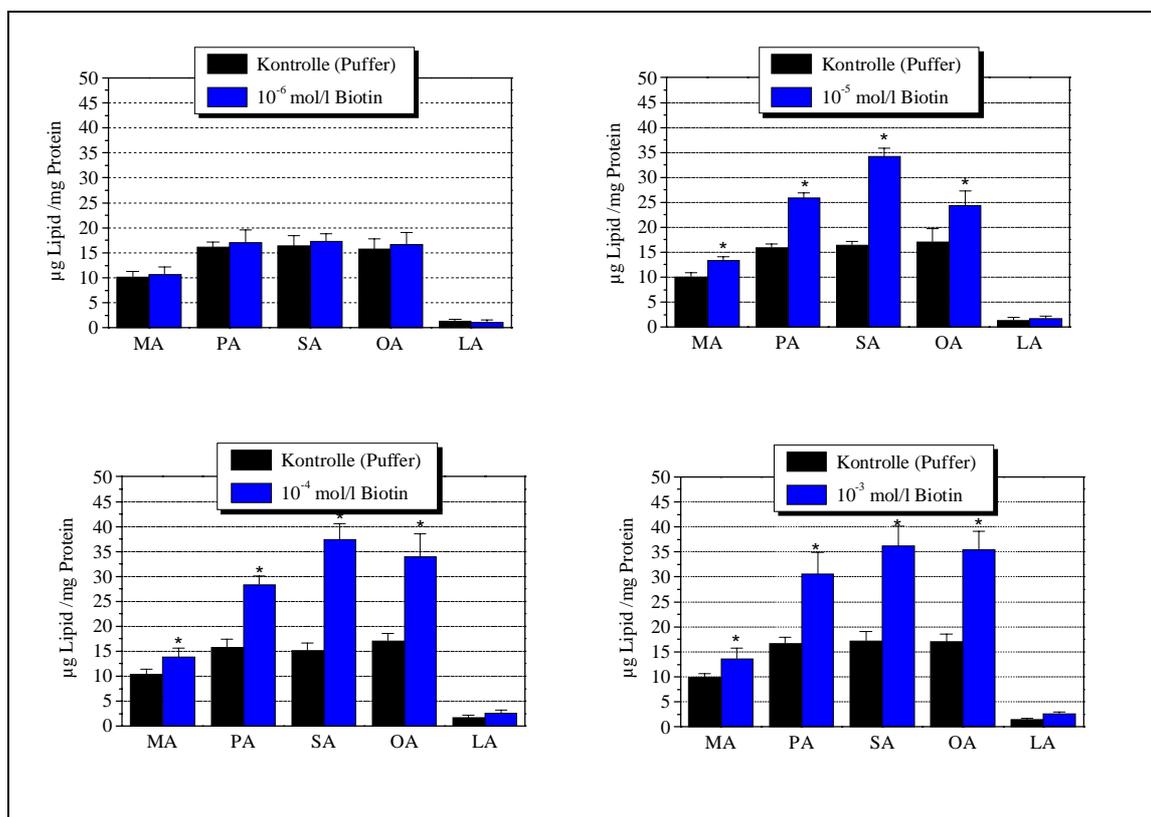


Abb. 3-9 Einfluß von Biotin auf den Fettsäuregehalt von HaCaT-Keratinozyten ($\bar{x} \pm SD$; * signifikante Differenz zur Kontrolle $p \leq 0,05$; $n = 6$)

Die Ergebnisse der Untersuchungen zu den Anteilen bereits erwähnter Fettsäuren in nativen humanen Keratinozyten sind in Abb. 3-10 dargestellt. Diese erfolgten bei ausgewählten Mediumkonzentrationen an Biotin (10⁻⁶ und 10⁻⁴ mol/l). Das Wachstum der Zellen im Medium geringeren Biotingehaltes hatte keinen Einfluß auf die Zusammensetzung der analysierten Fettsäuren. Die Grundniveaus aller

bestimmten Lipide glichen denen, die zuvor schon in der HaCaT-Kultur auftraten. Der Einfluß des erhöhten Biotinspiegels im Kulturmedium äußerte sich ebenfalls in einer Anhebung der Mengen an Myristin-, Palmitin-, Stearin- und Ölsäure, wogegen die Linolsäure unverändert determiniert werden konnte.

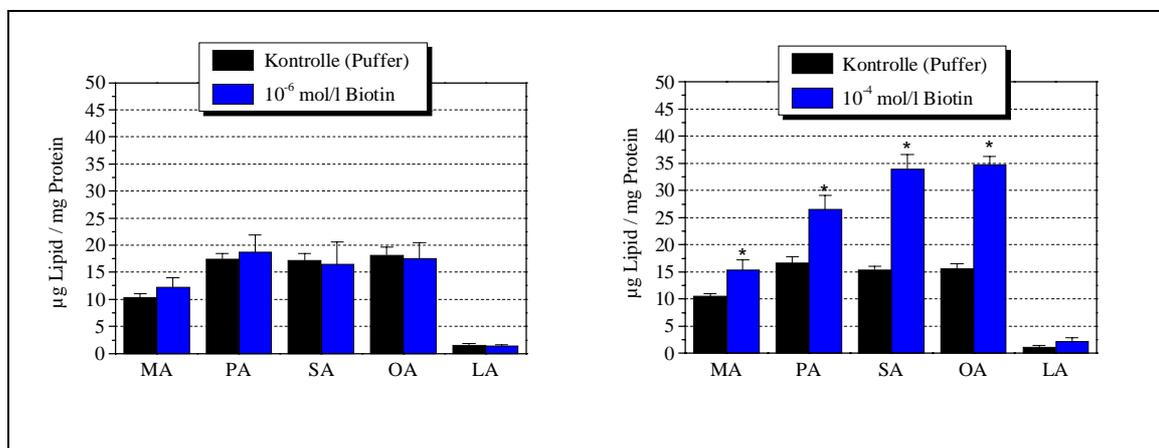


Abb. 3-10 Einfluß von Biotin auf den Fettsäuregehalt nativer humaner Keratinozyten ($\bar{x} \pm SD$; * signifikante Differenz zur Kontrolle $p \leq 0,05$; $n = 6$)

Diskussion

Bei den vorgestellten Ergebnissen zum Einfluß von Biotin auf die Fettsäuresynthese zeigten sich eindeutige Veränderungen. Diese Effekte waren dabei konzentrationsabhängig. Während niedrige Biotinlevel im Medium (10^{-6} mol/l) als unwirksam eingestuft werden können, ließ sich durch den Zusatz hoher Biotinmengen (10^{-5} bis 10^{-3} mol/l im Medium) die Lipidsyntheseleistung von in vitro-Keratinozyten steigern. Schon in den Untersuchungen von PROUD et. al konnte die Notwendigkeit von Biotin für eine intakte Fettsäuresynthese in der Haut von Ratten demonstriert werden (1990). Dazu erzeugten die Autoren durch bewußte Ernährung der Tiere mit Avidin (bindet vier Moleküle Biotin) einen künstlichen Mangelzustand, der in der Rattenhaut neben einem verminderten Carboxylasen-spiegel auch zu einer Reduktion der Fettsäuren (auf 30% im Vergleich zu gesunden Tieren) führte. Die Reversibilität des Zustandes und eine Wirkung von Biotin auf gesunde Probanden wurden nicht untersucht.

Die Tatsache, daß die erhaltenen Lipidkonzentrationen höher als jene in grundlegenden Untersuchungen zur Lipidkomposition in humanen Keratinozyten (Schürer et al., 1993) lagen, sind auf das verwendete analytische Verfahren zurückzuführen. Der Gebrauch von Trimethylsulfoniumhydroxid (TMSH) zur Probenderivatisierung für die GC-MS führte neben der Methylierung der freien Fettsäuren auch zur Erfassung der in komplexen Lipiden (Phospholipiden) gebundenen Vertreter (Schulte und Weber, 1989). Somit ließen sich nur Aussagen zum Verhältnis zwischen Kontroll- und Meßwert (Biotin-behandelt) treffen.

Steigerungen der Niveaus der Fettsäuren unter Biotineinwirkung konnten sowohl in der Kultur von HaCaT (Abb. 3-9), als auch bei nativen humanen Keratinozyten (Abb. 3-10) nachgewiesen werden. Damit scheint rein mechanistisch betrachtet, die Beeinflussung der Fettsäuresynthese nicht in einer Abhängigkeit vom verwendeten Keratinozytentyp zu stehen. Das Grundprinzip des Wirkungsmecha-

nismus dürfte sich über die Funktion von Biotin als Coenzym der Acetyl-CoA carboxylase erklären lassen (Kap. 2.5). Das Ausbleiben einer Steigerung der Mengen an Linolsäure ist in Verbindung mit der Unfähigkeit des Keratinozyten, mehrfach ungesättigte Fettsäuren eigenständig zu synthetisieren, zu betrachten (Chapkin und Ziboh, 1984).

Analoge Untersuchungen zum Einfluß ausgewählter B-Vitamine auf die Lipidsynthese des Keratinozyten führten zu vergleichbaren Resultaten (Tanno et al., 1998) So konnte nach Mediumzusatz von wasserlöslichem Nicotinsäureamid (Niacinamid) neben der Biosynthese von Ceramiden auch die von Fettsäuren und Cholesterol beeinflusst werden. Bereits eine Mediumkonzentration von 0,3 μM steigerte die Ceramidproduktion. Im Sinne einer sekundären Reaktion wurde über die erhöhte Aktivität an Serin-Palmitoyl-Transferase, dem Schlüsselenzym der Ceramidsynthese, die Steigerung der Fettsäuresynthese durch Palmitoyl CoA nachgewiesen.

Im Zusammenhang mit der fördernden Wirkung auf die Lipidsynthese lassen sich die untersuchten B-Vitamine als effektive Promotoren der epidermalen Permeationsbarriere der Haut diskutieren.

4 CHARAKTERISIERUNG DER BIOTINHALTIGEN FORMULIERUNGEN

4.1 Biotinhaltige kolloidale Trägersysteme

4.1.1 Nanopartikel

4.1.1.1 Komponenten der Partikelsysteme

Benzalkoniumchlorid

Benzalkoniumchlorid ist ein Vertreter der quaternären Ammoniumverbindungen. Der O/W-Emulgator ist gut wasserlöslich und zählt zu den kationisch aktiven Substanzen. Im alkalischen Bereich besitzt er stark desinfizierende Eigenschaften. In Abhängigkeit vom pH-Wert ($\text{pH} > 5$) eignet sich Benzalkoniumchlorid als Konservierungsmittel für empfindliche galenische Formulierungen (Fiedler, 1996).

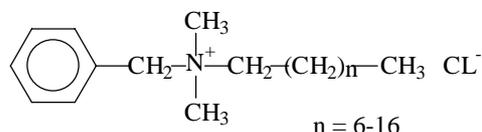


Abb. 4-1 Struktur von Benzalkoniumchlorid (BA)

Natriumdodecylsulfat (Natriumlaurylsulfat)

Der anionische Emulgator Natriumdodecylsulfat gehört der Klasse der sauren Fettalkoholschwefelsäureester an. Hierbei handelt es sich um ein weißes Pulver, welches gut in Wasser löslich ist. Mit einem Wert von 40 für die Hydrophilic Lipophilic Balance wird der O/W-Emulgator in der Galenik hauptsächlich für die Herstellung von Cremes, Salben und Linimenten genutzt (Fiedler, 1996). Durch seine starke Tensidwirkung kann Natriumdodecylsulfat die Aufnahme verschiedener Wirkstoffe in die Haut fördern. Als Nachteil stehen jedoch irreversible Schäden der Hornschicht nach Applikation hoher Dosen (Ziegenmeyer, 1992).

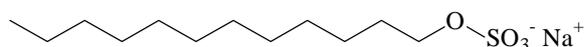


Abb. 4-2 Struktur von Natriumdodecylsulfat $\text{C}_{12}\text{H}_{25}\text{NaO}_4\text{S}$ (SDS) [288,38]

Stärkeacetat (Sconacell® A)

Bei dem verwendeten modifizierten Stärkeprodukt Sconacell® A handelt es sich um ein experimentell hergestelltes Polysaccharid (BSL Olefinverbund GmbH, Schkopau). Die acetylierte Stärke, deren Ausgangsprodukt speziell gezüchtete Maisstärke mit einem hohen Amylosegehalt ($\geq 70\%$) war, wurde mit einem Substitutionsgrad der α -glykosidisch gebundenen Grundsegmente von 2,45 verwendet. Die lipophilen Eigenschaften von Sconacell® A sind durch ein positives Löslichkeitsverhalten gegenüber den meisten organischen Lösungsmitteln gekennzeichnet (mehr als 1% löslich in Chloroform, Methylenchlorid, Essigsäure und DMSO). In Wasser, Ether und Methanol gilt Stärkeacetat als nicht löslich.

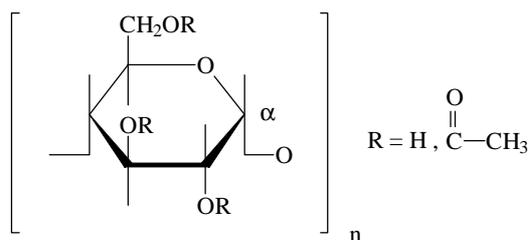


Abb. 4-3 Grundstruktur des Stärkeacetates (STA) [> 100.000]

Die verwendeten Partikelsysteme wurden unter Nutzung des *solvent evaporation process* aus modifizierter Stärke hergestellt (Huschka, 1994) (Kap. 8.2.1). Dabei diente das Polysaccharid als Trägermaterial für den Arzneistoff. Im Ergebnis des modifizierten Herstellungsverfahrens konnten zwei biotinhaltige Partikelsysteme mit unterschiedlichen physikochemischen Eigenschaften entwickelt werden. Diese standen den Untersuchungen zur topischen Anwendung in Form von wäßrigen Nanopartikel-Suspensionen zur Verfügung.

Tab. 4-1 Zusammensetzung der wäßrigen Nanopartikelsuspensionen

Vehikel	Biotin	STA	BA	SDS	Auqa bidest.
<i>BA-Partikel</i>	0,1%	1%	0,2%	-	ad 100%
<i>SDS-Partikel</i>	0,1%	1%	-	0,2%	ad 100%

4.1.1.2 Charakterisierung der Partikelsysteme

Die verwendeten Nanopartikel wurden zunächst mittels Photonenkorrelationsspektroskopie (PCS) charakterisiert. Nach den erhaltenen Verteilungsprofilen konnten die Partikel einer Größenklasse von 50-300 nm zugeordnet werden. Für die *BA-Partikel* lag der mittlere Teilchengrößendurchmesser bei $145,4 \pm 12,3$ nm ($n = 5$), für die *SDS-Partikel* bei $155,2 \pm 11,8$ nm ($n = 5$) (Kap.8.2.1).

Die Prüfung nach der Ladung der Oberfläche erfolgte anhand der Messung des Zetapotentials. In Analogie zu den aktiven Anteilen der Emulgatoren befanden sich die detektierten Zetapotentiale für BA im positiven ($35,4 \pm 0,9$ mV; $n = 5$) und bei SDS ($-38,5 \pm 1,4$ mV; $n = 5$) im negativen Bereich. Anhand elektronenmikroskopischer Aufnahmen konnten die Nanopartikel als kugelförmige, solide Teilchen mit porenartiger Struktur identifiziert werden (Kap. 8.2.1).

4.1.2 Liposomen

4.1.2.1 Komponenten der liposomalen Systeme

Phosphatidylcholin (PC)

Das Glycerophospholipid Phosphatidylcholin (Lecithin) ist das am häufigsten vorkommende Phospholipid in biologischen Membranen, welches sich besonders angereichert im Gehirn, dem Herzmuskel und im Eidotter befindet. Der Fettsäurerest im Molekül ist variabel, wobei Palmitin-, Öl-, Linol- und Stearinsäure überwiegen (Nuhn, 1997). Ethanol, Methanol und Chloroform haben gute Lösungseigenschaften für Phosphatidylcholin inne. Das oberflächenaktive Molekül besitzt eine amphiphile Zwitterionenstruktur, bestehend aus einer hoch polaren Kopfgruppe und einem

hydrophoben Anteil aus Acylketten. Bedingt durch diesen molekularen Aufbau ist Phosphatidylcholin in der Lage, in wäßrigen Puffermedien lamellare Vesikel auszubilden.

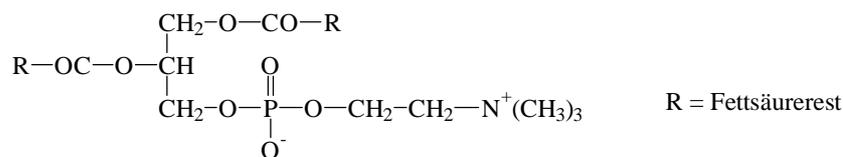


Abb. 4-4 Struktur von Phosphatidylcholin

Cholesterol

Als Bestandteil von Zellmembranen und als Komponente der interzellulären Lipide der Hornschicht nimmt Cholesterol wesentlichen Anteil auf deren Strukturgebung. In chemisch reiner Form nimmt Cholesterol die Gestalt hydrophober weißer Nadeln oder Blättchen an. Das Molekül ist wasserunlöslich, dagegen löst es sich heißem Ethanol, Ether, Aceton und Chloroform (Fiedler, 1996). Unter pharmazeutisch technologischer Sicht spielt Cholesterol eine Rolle als W/O-Emulgator (Voigt, 1997).

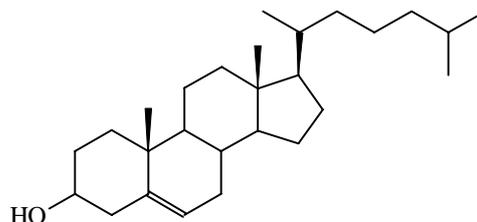


Abb. 4-5 Struktur von Cholesterol $\text{C}_{27}\text{H}_{45}\text{OH}$ [386,64]

Die Herstellung der liposomalen Systeme erfolgte unter Nutzung der Dünnschicht-Hydrations-Methode mit nachgeschalteter Extrusion durch definierte Membranen (Kap. 8.2.1).

Tab. 4-2 Zusammensetzung der biotinhaltigen Liposomen

Vehikel	Biotin	PC	Cholesterol	Puffer (Mc Illoaine)
<i>Liposom</i>	0,1%	5%	-	ad 100%
<i>Liposom + Chol.</i>	0,1%	5%	1%	ad 100%

4.1.2.2 Charakterisierung der liposomalen Systeme

Mittels Photonenkorrelationsspektroskopie wurde zunächst die Größe der verwendeten Liposomen bestimmt. Die entsprechenden Verteilungsprofile der Vesikel lagen dabei in Größenbereichen von 25-250 nm. Der mittlere Teilchengrößendurchmesser für die einfachen *Liposomen* konnte bei $165,2 \pm 8,4$ nm ($n = 5$) und der von cholesterolmodifizierten Liposomen (*Liposom + Chol.*) bei $171,1 \pm 12,5$ nm ($n = 5$) ermittelt werden. Die Betrachtung der Vesikel im Elektronenmikroskop führte zur Identifizierung von parallel vorliegenden uni- als auch multilamellaren Strukturen (Kap. 8.2.1).

4.1.3 Mikroemulsionen

4.1.3.1 Komponenten der Mikroemulsionen

Cholesterol (siehe Kap. 4.1.2.1)

Isopropylpalmitat (IPP)

Der Fettsäureester Isopropylpalmitat liegt in Form einer hellen, dünnen, öligen und geruchlosen Flüssigkeit vor. Der Stoff ist unlöslich in Wasser und Glycerin. In Ethanol lassen sich 3%-ige Lösungen herstellen. Mit Ölen und Fetten kann Isopropylpalmitat gut gemischt bzw. darin klar darin gelöst werden (Fiedler, 1996). Der Ester der Palmitinsäure besitzt eine ausgeprägte Wirkung als Lösungsvermittler und Penetrationsbeschleuniger (Reynolds et al., 1996).

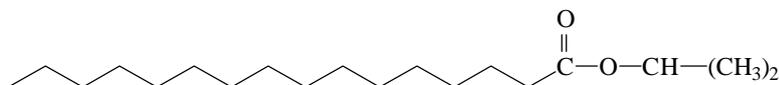


Abb. 4-6 Struktur von Isopropylpalmitat, $C_{19}H_{38}O_2$ [298,5]

Span[®] 20 (Sorbitan monolaurat)

Der nichtionogene lipophile W/O-Emulgator (HLB $8,6 \pm 1$) ist ein Laurinsäureester des Sorbitans. Die gelbe bis bernsteinfarbene Flüssigkeit kann durch seine chemischen Eigenschaften (wasserunlöslich, löslich in Ethylalkohol und Paraffin) als hydrophobes Molekül charakterisiert werden (Fiedler, 1996).

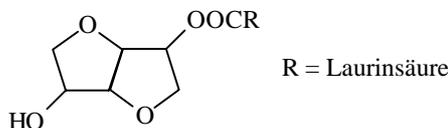


Abb. 4-7 Struktur von Span[®] 20, $\sim C_{18}H_{34}O_6$ [~346]

Tagat[®] O2 (Polyoxyethylenglycerolmonooleat)

Der nichtionogene Emulgator Tagat[®] O2 ist ein Vertreter der Polyoxyethylenglycerolfettsäureester. Die gelbe Flüssigkeit hat einen HLB-Wert von 15,0. Tagat[®] O2 löst sich in Wasser und Ethylalkohol, in Fetten und Paraffinöl ist der Emulgator unlöslich. Die Gruppe der Polyoxyethylenglycerolfettsäure-ester zählt zu den gut haut- und schleimhautverträglichen Produkten. Tagat[®] O2 wurde in 100%-iger von der Haut reaktionslos vertragen (Fiedler, 1996).

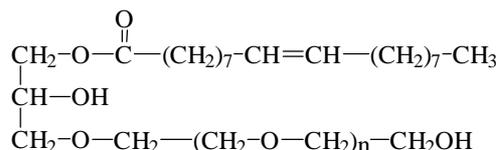


Abb. 4-8 Struktur von Tagat[®] O2

Das Zusammenfügen der Einzelkomponenten der Mikroemulsionen erfolgt unter Sichtkontrolle bei Identifizierung eindeutig klarer Systeme (Kap. 8.2.3). Diese wurden im Phasendiagramm als

einphasig isotrope Gebiete gekennzeichnet, wobei sich die Addition des Cholesterols (2 und 5% in IPP gelöst und substituiert) nur unwesentlich auf die Lage des Phasengebietes auswirkte (Abb. 4-9). Die für die Untersuchung der in vitro-Liberation und der Penetration in humane Haut ex vivo erstellten Mikroemulsionssysteme sind in Tab. 4-3 dargestellt. Der Wirkstoff lag dabei innerhalb der wäßrigen Phase in gelöster Form vor.

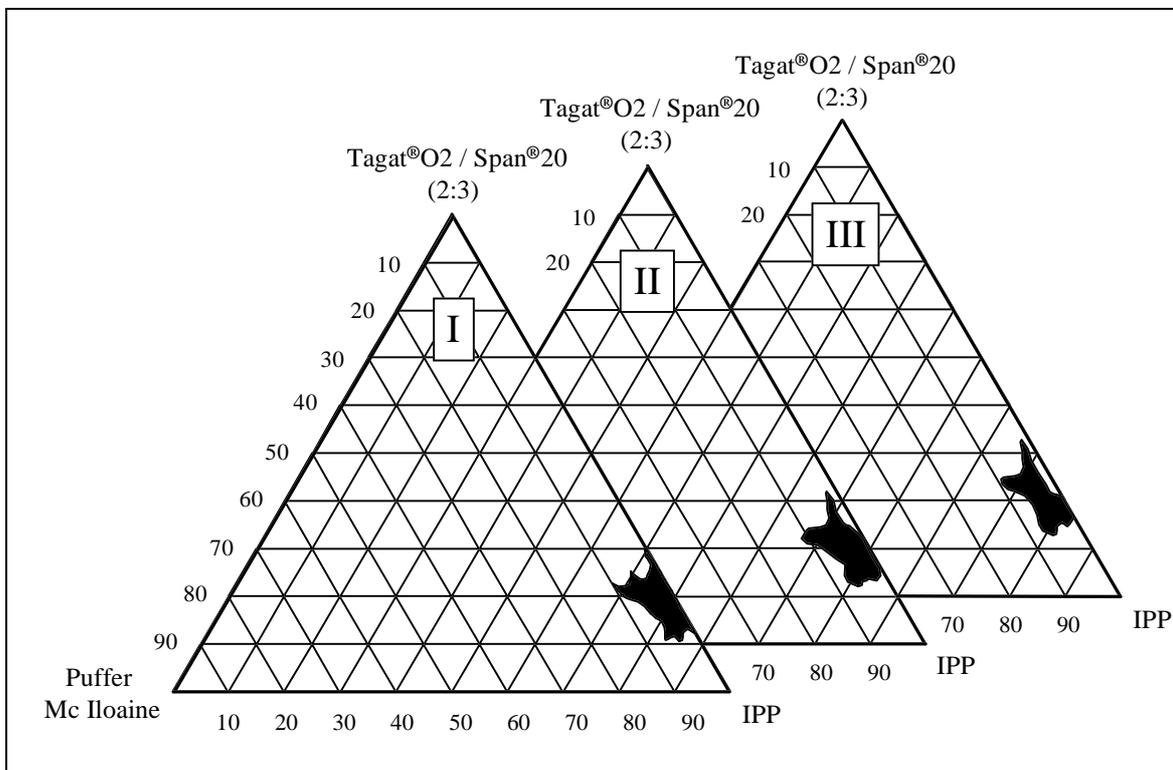


Abb. 4-9 Phasendiagramme für die biotinhaltigen Mikroemulsionen (0,1%)
(I = ME; II = ME + 2% Chol.; III = ME + 5% Chol.)

Tab. 4-3 Zusammensetzung der Mikroemulsionen

Vehikel	Biotin	Puffer (Mc Iloaine)	Tagat® O2 / Span® 20 (2 : 3)	Cholesterol	IPP
<i>ME</i>	0,1%	5,9%	18,8%	-	ad 100%
<i>ME + 2% Chol.</i>	0,1%	5,9%	18,8%	2%	ad 100%
<i>ME + 5% Chol.</i>	0,1%	5,9%	18,8%	5%	ad 100%

4.1.3.2 Charakterisierung der Mikroemulsionen

Die in Tab. 4-3 aufgeführten Mikroemulsionen wurden unter Nutzung der Polarisationsmikroskopie, der Photonenkorrelationspektroskopie und der Gefrierbruchelektronenmikroskopie hinreichend charakterisiert (Kap. 8.2.3).

Die Betrachtung der Formulierungen bei gekreuzten Polarisatoren im Polarisationsmikroskop zeigte keine Lichtdoppelbrechung, was den Ausschluß anisotroper Phasen in der Mikroemulsion zuließ.

Auf Grund des schwarzen Sichtfeldes konnten alle Systeme als isotrop einphasig gekennzeichnet werden. Die Ergebnisse der PCS charakterisierten die Größenverhältnisse innerhalb der Mikroemulsionen. Das Standardsystem (*ME*) besaß einen mittleren Tröpfchengrößendurchmesser von $30,2 \pm 2,3$ nm ($n = 5$). Die Einarbeitung von Cholesterol führte zu einer Reduktion der Tröpfchengröße, wobei sich keine Dimensionsunterschiede bei Variation der Cholesterolkonzentration zeigten [*ME* + 2% *Chol.* - $20,1 \pm 2,8$ nm, ($n = 5$); *ME* + 5% *Chol.* - $18,5 \pm 3,4$ nm, ($n = 5$)]. Aus den elektronenmikroskopischen Aufnahmen konnten bestätigende Aussagen über die Teilchendurchmesser gewonnen werden. Die innerhalb der Wasserschichten eingelagerten globulären Strukturen folgten den bereits in der PCS ermittelten Größenverhältnissen.

4.2 Biotinhaltige Emulsionen

4.2.1 Standardemulsionen

Als Standardvehikel für die Untersuchungen zur topischen Applikation von Biotin wurden zwei Vertreter des Deutschen Arzneibuches ausgesucht. Die Auswahl der Vehikel läßt sich mit der umfassenden Kenntnis über die Mechanismen der Wechselwirkungen zwischen Haut, Vehikel und Pharmakon begründen. Zudem besitzen beide Typen eine große Relevanz in der dermatologischen Therapie.

Durch die Einarbeitung von Wasser in die hydrophilen Absorptionsgrundlagen (Hydrophile Salbe, Wollwachsalkoholsalbe) erfolgte eine Auftrennung in die beschriebenen Emulsionstypen mit hydrophil-lem als auch lipophilem Grundcharakter. Für die folgenden Untersuchungen zur dermalen Anwendung von Biotin (Stoffbeschreibung siehe Kap. 2.5) wurde in beide Emulsionen eine Wirkstoffmenge von 0,1% eingearbeitet.

O/W-Emulsion - (Zusammensetzung der Wasserhaltigen hydrophilen Salbe nach DAB 10)

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

W/O-Emulsion - (Zusammensetzung der Wasserhaltigen Wollwachsalkoholsalbe nach DAB 9)

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

Komponenten der Standardemulsionen

Alcoholes Lanae

Wollwachsalkohole umfassen die unverseifbare Alkoholfraktion, die nach Verseifung des Wollwachses (1-2% freie Fettsäuren und Kohlenwasserstoffe, 3% freie Alkohole und 95% veresterte Verbindungen) erhalten wird (Fiedler, 1996). Ihrer Aktivität nach zählen Wollwachsalkohole zu den

W/O-Emulgatoren. Als negativer Aspekt bei der Anwendung von wollwachsalkohlhaltigen Grundlagen ist das erhöhte Allergisierungspotential der Emulgatoren einzuschätzen.

Cetylstearylalkohol (Lanette® O)

Der nichtionogene Emulgator stellt ein Gemisch aus den höheren Fettalkoholen Cetylalkohol und Stearylalkohol dar. Cetylstearylalkohol zählt zu der Klasse der W/O-Emulgatoren von geringer Tensidwirkung. Ihr Einsatz in gelstrukturierten Grundlagen erfolgt unter dem Aspekt der Stabilisierung durch Kristallisation.

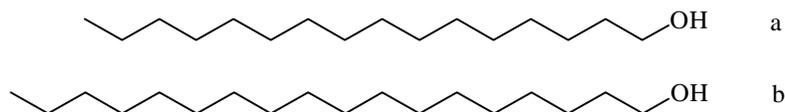


Abb. 4-10 Strukturen von Cetylalkohol (a), $C_{16}H_{34}O$ [242,45] und Stearylalkohol (b), $C_{18}H_{38}O$ [270,50]

Lanette® N (Emulgierender Cetylstearylalkohol DAB 10)

Der emulgierende Cetylstearylalkohol (Lanette® N) ist ein Komplexemulgator, dessen kolloid-disperses Gemisch sich aus 90% Lanette® O (Cetylstearylalkohol) und 10% Lanette® E (Natrium-Cetylstearylsulfat) zusammensetzt. Die selbstemulgierende Mischung der Fettalkohole wird hauptsächlich zur Herstellung von Creme- und Salbengrundlagen verwendet (Fiedler, 1996). Lanette® N zählt zu den anionenaktiven Stoffen, was zu Wechselwirkungen im Sinne eines Ionenaustausches mit kationischen Wirkstoffen führen kann.

Paraffinum subliquidum

Die gereinigte, dickflüssige Mischung von gesättigten aliphatischen Kohlenwasserstoffen ist geruch- und geschmacklos, klar und farblos. Der lipophile Charakter der Flüssigkeit wird durch die leichte Löslichkeit in Chloroform und Ether sowie die Unlöslichkeit in Wasser und Ethylalkohol verdeutlicht (Fiedler, 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, 1992).

Vaselineum album

Weißes Vaseline ist ein Gemisch aus gereinigten, gebleichten, hauptsächlich gesättigten Kohlenwasserstoffen, welches aus Erdölestillaten gewonnen wird. Die Grundstruktur der Vaseline kann als plastisches Gel mit netzartigem Gerüst beschrieben werden, wobei sich die immobile Gerüstphase aus langkettigen und die mobile Phase aus kurzkettigen Kohlenwasserstoffanteilen zusammensetzt (Junginger, 1992). Der Vaseline sind hautschützende Wirkungen, die im Zusammenhang mit begünstigenden wundheilenden und regenerativen Effekten bei geschädigtem Hautzustand stehen, zu eigen. Gleichfalls führt das Eindringen von Vaseline in die intercorneozytären Hornschichtbereiche zu einer Regulierung des TEWL (Ghadially et al., 1992).

4.2.2 Modifizierte Emulsionen

Die topische Verfügbarkeit des hydrophilen Wirkstoffes Biotin sollte durch Modifikation der Standardemulsionen erhöht werden. Mögliche Ansätze dafür wurden durch die Anwendung der Modulatoren Hyaluronidase und Harnstoff gesehen. Innerhalb einer Konzentrationsreihe (Enzymaktivität pro Fläche) erfolgte die Charakterisierung der Modulatorwirkung des Enzyms. Die Addition von Harnstoff wurde orientierend an bereits erfolgreichen Studien durchgeführt (Knorst, 1997). Im Folgenden soll näher auf die Spezifität der Modulatoren eingegangen werden.

Harnstoff (Urea)

Harnstoff kann in Form farbloser Kristalle oder als weißes, kristallines Pulver vorliegen. Die Substanz ist geruchlos und besitzt einen salzartigen Geschmack. Wasser stellt für den Harnstoff ein sehr gutes Lösungsmittel dar. Weiterhin löst er sich in Ethanol, Methanol und Glycerol, wobei Ether, Chloroform und Dichlormethan Harnstoff nicht lösen (Fiedler, 1996). In Anteilen von bis zu 10% in verschiedenen Emulsionstypen konnte eine penetrationsfördernde Wirkung von Harnstoff nachgewiesen werden (Wohlrab, 1989) (Kap. 2.4.2).

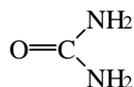


Abb. 4-11 Struktur von Harnstoff, CH₄N₂O [60,06]

Hyaluronidase

Hyaluronidase wird im englischen Sprachgebrauch auch als spreading factor bezeichnet. Dies charakterisiert die Aktivität des Enzyms als Diffusionsfaktor, da es durch den Abbau von Proteoglykanen die Durchlässigkeit von Geweben erhöht.

Bei dem verwendeten Ferment handelte es sich um ein experimentelles Produkt der Abteilung für Experimentelle Mikrobiologie der Friedrich-Schiller-Universität Jena. Bei der Fermentierung wurde auf eine bakterielle Synthesemethode von Hyaluronidase zurückgegriffen, bei der das Enzym von Streptokokken der Gruppe B produziert wird. Eine Klassifizierung der Bakterienstämme wird nach der Art des Zellwandantigens vorgenommen, wobei die bedeutendsten Vertreter den Gruppen A-C zugeordnet sind. Streptokokken der Gruppe B zählen zu den humanpathogenen Keimen, die beispielsweise zur Auslösung neonataler Hirnhautentzündung führen können (Kayser et al., 1993). Zur Vermeidung dieser oder ähnlicher pathophysiologischer Reaktionen des Organismus wurde nach Isolation der Hyaluronidase eine umfassende Aufarbeitung und Reinigung des Produktes durchgeführt. Somit läßt sich eine Infektion durch zurückbleibende mikrobielle Begleitstoffe ausschließen. Das gereinigte Protein kann wie folgt charakterisiert werden:

Molekulargewicht	116.000 D
Stabilitätsoptimum	pH-Wert = 7,0-7,5
Aufarbeitung	entpyrogenisiert, gebunden an Ovalbumin, lyophilisiert
Aussehen	weißer, flockiger Feststoff
Löslichkeitsverhalten	gut wasserlöslich (Ozegowski, 1997).

Die Aktivitäten der bereitgestellten Fermente lagen bei 50.000 IE/mg. Im Vergleich zu kommerziell erhältlicher Hyaluronidase aus Rindertestes stellt diese Konzentration eine Erhöhung um mehr als das Fünzigfache dar. Für die Untersuchungen zur modulierenden Wirkung der Hyaluronidase auf die Penetration von Biotin wurde das Enzym in einer Aktivität von 1.250 - 10.000 IE pro cm² Applikationsfläche in die Vehikel eingearbeitet.

Vehikelkomposition

Die Zusammensetzungen der biotinhaltigen Standardemulsionen und deren Modifikationen, die für die in vitro-Untersuchungen am MSMM und an humaner Haut verwendet wurden, sind in Tab. 4-4 und Tab. 4-5 beschrieben.

Tab. 4-4 Zusammensetzung der untersuchten W/O-Emulsionen

Vehikel	Biotin	Urea	Hyaluronidase	Wasserhaltige Wollwachsalkoholsalbe
<i>ST O/W</i>	0,1%	-	-	99,9%
<i>H 1 O/W</i>	0,1%	-	0,6% (1.250 IE/cm ²)	99,3%
<i>H 2 O/W</i>	0,1%	-	1,3% (2.500 IE/cm ²)	98,6%
<i>H 3 O/W</i>	0,1%	-	2,6% (5.000 IE/cm ²)	97,3%
<i>H 4 O/W</i>	0,1%	-	6,3% (10.000 IE/cm ²)	93,6%
<i>U O/W</i>	0,1%	10,0%	-	89,9%
<i>U O/W H 2</i>	0,1%	10,0%	2,6% (2.500 IE/cm ²)	87,3%

Tab. 4-5 Zusammensetzung der untersuchten O/W-Emulsionen

Vehikel	Biotin	Urea	Hyaluronidase	Wasserhaltige Hydrophile Salbe
<i>ST W/O</i>	0,1%	-	-	99,9%
<i>H 1 W/O</i>	0,1%	-	0,6% (1.250 IE/cm ²)	99,3%
<i>H 2 W/O</i>	0,1%	-	1,3% (2.500 IE/cm ²)	98,6%
<i>H 3 W/O</i>	0,1%	-	2,6% (5.000 IE/cm ²)	97,3%
<i>H 4 W/O</i>	0,1%	-	6,3% (10.000 IE/cm ²)	93,6%
<i>U W/O</i>	0,1%	10,0%	-	89,9%
<i>U W/O H 2</i>	0,1%	10,0%	2,6% (2.500 IE/cm ²)	87,3%

5 UNTERSUCHUNGEN ZUR LIBERATION VON BIOTIN AUS VERSCHIEDENEN VEHIKELSYSTEMEN IN KÜNSTLICHE MEMBRANEN

5.1 Modellbeschreibung

Für die folgenden Untersuchungen zum Liberationsverhalten von Biotin aus kolloidalen Trägersystemen und modifizierten Emulsionen wurde das in vitro-Mehrschichtmembranmodell (MSMM) nach FÜRST-NEUBERT verwendet. Der prinzipielle Aufbau des Modells findet sich in Abb. 5-1 dargestellt. In einer Art Grundgerüst können bis zu neun Zellen, die jeweils aus drei Polyacrylat-scheiben (Grundscheibe, Schablone, Deckscheibe) zusammengesetzt sind, untergebracht werden. In der Mitte der Zelle ist eine durchbrochene Scheibe lokalisiert, die durch eine quadratische Öffnung von 4 cm^2 gekennzeichnet ist. An dieser Stelle kann die zu untersuchende topische Formulierung auf den freiliegenden Akzeptor, bestehend aus einer definierten Anzahl an Membranen, aufgetragen werden. Die Akzeptormembranen sind von der Grundscheibe zusätzlich durch eine Nephrophanfolie abgegrenzt.

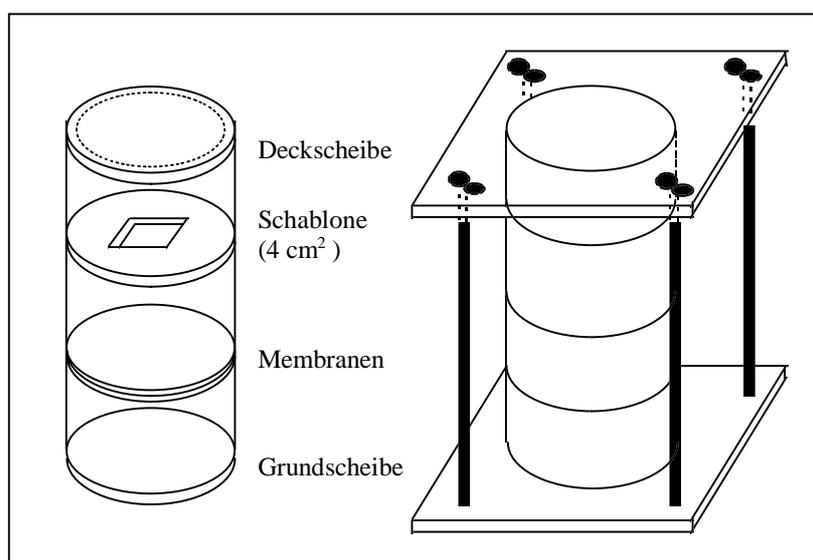


Abb. 5-1 Aufbau des Mehrschichtmembranmodells nach FÜRST-NEUBERT (Fürst et al., 1987; Neubert et al., 1991)

Das MSMM kommt durch seine Spezifikation (variabler nichtwässriger Akzeptor) den physiologischen Bedingungen der Haut nahe. Eine Erfassung des zeitlichen Transportvorganges (Diffusion) im Akzeptor wird durch die Vielschichtigkeit des Akzeptors realisierbar (Neubert et al., 1992). Die Vergleichbarkeit zu in vivo-Bedingungen bleibt durch den direkten Kontakt zwischen Vehikel und Akzeptor bei Analogie der applizierten Dosis (ca. $2,5 \text{ mg/cm}^2$) erhalten. Die Versuchstemperatur ist während des Liberationsvorganges der mittleren Hautoberflächentemperatur nachempfunden (32°C). Insgesamt bietet das MSMM durch seine Variabilität gegenüber anderen Modellen entscheidende Vorteile für die Charakterisierung des Freisetzungsverhaltens aus topischen Formulierungen (Tiemessen et al., 1988). Zur Untersuchung der Liberation von Biotin aus Standardformulierungen und kolloidalen Trägersystemen wurde das Modell den Wirkstoffeigenschaften und der Beschaffenheit des Vehikelsystems angepaßt (Kap. 8.3).

5.2 Liberation von Biotin aus kolloidalen Trägersystemen

5.2.1 Nanopartikel

Ergebnisse

Die Untersuchungen der Biotinfreisetzung aus *STA-Partikeln* mit unterschiedlicher Oberflächenladung sind im Vergleich zur Emulsion *ST O/W* in Abb. 5-1 dargestellt. Der Auftrag der Wirkstoffkonzentrationen erfolgte in Prozent der freigesetzten Mengen an Wirkstoff.

Die Liberation von Biotin aus dem Standard *ST O/W* erwies sich bereits nach 30 min als abgeschlossen (ca. 65%). Eine Veränderung der freigesetzten Menge nach verlängerter Liberationsdauer war nicht meßbar.

Beide partikulären Systeme erbrachten eine Steigerung der Freigabe von Biotin, wobei aus *SDS-Partikeln* vermehrt Wirkstoff freigesetzt wurde als aus *BA-Partikeln*. Im zeitlichen Verlauf konnte bei beiden wäßrigen Partikelsuspensionen eine kontinuierliche Zunahme der liberierten Mengen nachgewiesen werden.

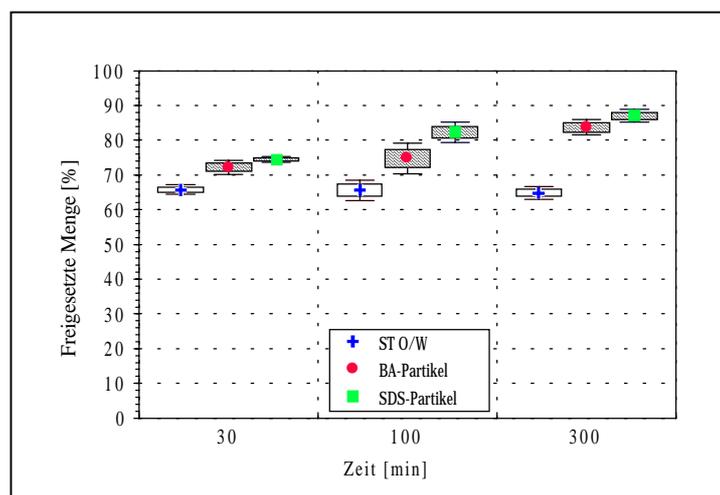


Abb. 5-2 In vitro-Liberation von Biotin aus Nanopartikeln im Vergleich zur O/W-Emulsion in das MSMM ($p \leq 0,05$; $n = 5$)

Diskussion

Für die Bewertung der in vitro-Liberationen von Biotin aus den vorgestellten Partikelsystemen wurde zum Vergleich die Referenzformulierung *ST O/W* herangezogen. Dieses Vehikel stellte mit seinem hohen Wasseranteil ein annähernd dimensioniertes hydrophiles Donatorkompartiment für Biotin wie die Partikelsuspensionen dar. Die Liberation von Biotin aus der O/W-Emulsion war im Untersuchungszeitraum von der Zeit unabhängig und auf einen Maximalwert von ca. 65% beschränkt. Sowohl im zeitlichen Verlauf als auch im Vergleich der freigesetzten Mengen konnten deutliche Vehikeleffekte bei den untersuchten Partikelsystemen nachgewiesen werden. Insgesamt erfolgte eine hohe Freigabe des Wirkstoffs nach kurzer Zeit (30 min). Die Menge an freigesetztem Biotin nahm weiterhin zu, wobei eine Erschöpfung des Donators innerhalb des Untersuchungszeitraum nicht erfaßt werden konnte.

Unterschiede des Liberationsverhaltens bei den Partikelsystemen (*SDS-Partikel* mit höherem Niveau der Freigabe) können in Zusammenhang mit der aus der Herstellung der Partikelsysteme resultierenden Oberflächenladung (Kap. 4.1.1.2) gebracht werden. Die gegensätzlich geladenen Partikel bieten für den Wirkstoff unterschiedlich starke Bindungskräfte, woraus sich eine erleichterte Liberation bei den *SDS-Partikeln* ableiten lassen könnte.

5.2.2 Liposomen

Ergebnisse

Der Abb. 5-3 sind die Ergebnisse der Liberation von Biotin aus liposomalen Systemen im Vergleich zur Emulsion *ST O/W* zu entnehmen. Die *in vitro*-Liberation von Biotin aus beiden liposomalen Formulierungen war durch eine schnellere und erhöhte Freigabe des Wirkstoffs gekennzeichnet. Nach 30-minütiger Liberationsdauer konnten aus dem Vehikel *Liposom* ca. 80% der freigesetzten Biotinmenge bestimmt werden. Die Liberation aus dem modifizierten System (*Liposom + Chol.*) fiel zu diesem Zeitpunkt geringer aus. Nach 100 min glichen sich die Freigaben beider Formulierungen an und blieben bis zum Ende des Untersuchungszeitraumes auf dem gleichen Niveau.

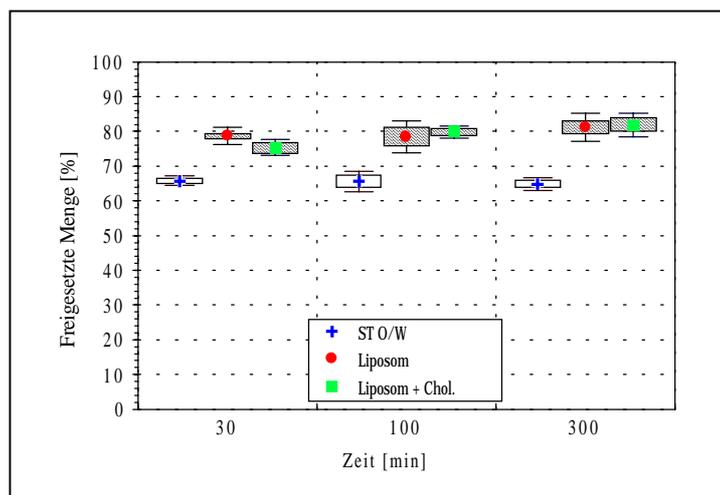


Abb. 5-3 **In vitro-Liberation von Biotin aus Liposomen im Vergleich zur O/W-Emulsion in das MSMM ($p \leq 0,05$; $n = 5$)**

Diskussion

Wie bei den Untersuchungen der *in vitro*-Liberation von Biotin aus Nanopartikeln (Kap. 5.2.1), konnten auch bei diesen wäßrigen vesikulären Systemen Veränderungen im Sinne einer Liberationssteigerung nachgewiesen werden. Bedingt durch die hydrophilen Anteile der liposomalen Suspensionen, die für Biotin ein optimales Lösungsvermögen bewirken, stand der Wirkstoff ständig für den Diffusionsprozeß zur Verfügung. Somit erklärt sich ein frühzeitiges Vorhandensein hoher liberierter Mengen an Biotin. Die Verteilung des Arzneistoffs innerhalb der einzelnen Akzeptormembranen konnte beim Vehikel *Liposom* zu jeder Zeit als gleichförmig ermittelt werden. Daraus läßt sich ableiten, daß es sich bereits nach kurzer Einwirkzeit um einen abgeschlossenen Prozeß der Freigabe handelt.

Die Modifizierung der liposomalen Formulierung durch Cholesterol (*Liposom + Chol.*) erbrachte eine kurzzeitige Verzögerung der Liberation von Biotin. Dieses Resultat steht in Analogie zu den Ergebnissen der Freigabeuntersuchungen aus Mikroemulsionen mit niedrigem Cholesterolgehalt (*ME + 2% Chol.*) (Kap. 5.2.2). Eine Erklärung für diesen Effekt läßt sich in der Stabilisierung der Liposomenmembran durch den Einbau von Cholesterol sehen (Grit und Crommelin, 1992; Ruiz et al., 1988).

5.2.3 Mikroemulsionen

Ergebnisse

In Abb. 5-4 sind die Ergebnisse der *in vitro*-Liberation von Biotin aus Mikroemulsionen im Vergleich zum Standard O/W-Emulsion dargestellt. Die freigesetzten Mengen an Wirkstoff aus den Mikroemulsionen lagen deutlich unterhalb des Niveaus der O/W-Emulsion (*ST O/W*).

Innerhalb der Mikroemulsionen konnten Unterschiede des Liberationsausmaßes bei variablem Cholesterolgehalt gefunden werden. Die Inkorporation von 2% Cholesterol (*ME + 2% Chol.*) führte, verglichen mit der *ME*, nach 30 min zu einer verminderten, nach 100 min zu einer identischen und nach 300 min zu einer erhöhten Freigabe. Eine Konzentrationserhöhung des Cholesterolanteils auf 5% (*ME + 5% Chol.*) äußerte sich in einem weiteren Absinken der Liberation nach 30 min. Über den gesamten Untersuchungszeitraum wurden unter Verwendung der Formulierung *ME + 5% Chol.* die geringsten Mengen an Biotin ermittelt.

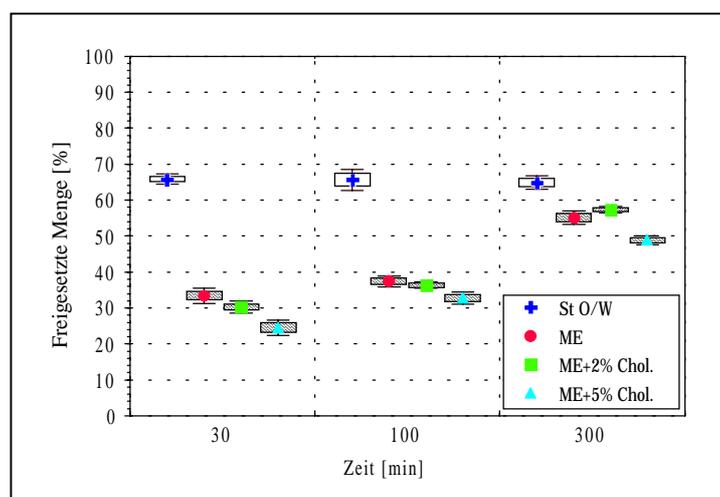


Abb. 5-4 **In vitro-Liberation von Biotin aus Mikroemulsionen im Vergleich zur O/W-Emulsion in das MSMM ($p \leq 0,05$; $n = 5$)**

Diskussion

Das Liberationsverhalten des Wirkstoffs aus den Mikroemulsionssystemen war durch ein verringertes Ausmaß gegenüber der Referenzformulierung (*ST O/W*) gekennzeichnet.

Die mizellare Struktur der Mikroemulsionen wirkte sich auf die Liberation von Biotin als hemmender Faktor aus. Eine mögliche konzentrationsabhängige Stabilisierung der Inversmizellen durch die Inkorporation des Cholesterols könnte als Ursache für die verringerte Freigabe aus den modifizierten angesehen werden.

5.3 Liberation von Biotin aus modifizierten Emulsionen

Neben der Bestimmung der in vitro-Liberation von Biotin aus kolloidalen Trägersystemen war das Freigabeverhalten von modifizierten Emulsionen von Interesse. Dazu erfolgte einerseits die Datenaufnahme der Liberation von Biotin aus standardisierten O/W- und W/O-Vehikeln sowie nach deren Modulation mit Harnstoff und ausgewählten Konzentrationen an Hyaluronidase (Wagner et al., 1997).

5.3.1 O/W-Vehikel

Ergebnisse

Die in Abb. 5-5 dargestellten Ergebnisse zeigen die liberierten Mengen an Biotin aus den modifizierten O/W-Emulsionen. Als Vergleichsvehikel kam der Standard *ST O/W* zum Einsatz, welcher eine Freigabe von Biotin um 65% bei allen Zeitpunkten der Untersuchung zuließ.

Der Zusatz von Hyaluronidase in einer Konzentration von 10.000 IE pro cm² Applikationsfläche (*H 4 O/W*) führte nach 30 min zu einer erheblichen Verringerung der Liberation (35%). Dagegen lag die Freigabe der modifizierten Emulsion mit 2.500 IE/cm² Hyaluronidase (*H 2 O/W*) nur geringfügig unter und die der harnstoffhaltigen Emulsion (*U O/W*) auf dem Niveau der modulatorfreien Formulierung.

Nach einer Inkubationszeit von 100 min konnten für die Vehikel *H 2 O/W* und *U O/W* Biotinmengen von ca. 70% in den Membranen analysiert werden. Für das Vehikel *H 4 O/W* wurde eine Steigerung der Freigabe auf etwa 55% ermittelt.

Mit prolongierter Liberationsdauer (300 min) vollzog sich eine Annäherung der freigesetzten Mengen aus allen Formulierungen. Der Zusatz von Hyaluronidase (*H 4 O/W*) erbrachte ein analoges Liberationsverhalten zur O/W-Emulsion (*ST O/W*), während das Vehikel mit geringerem Hyaluronidasegehalt (*H 2 O/W*) und die Formulierung mit Harnstoff (*U O/W*) zu reduzierten Freigaben führten.

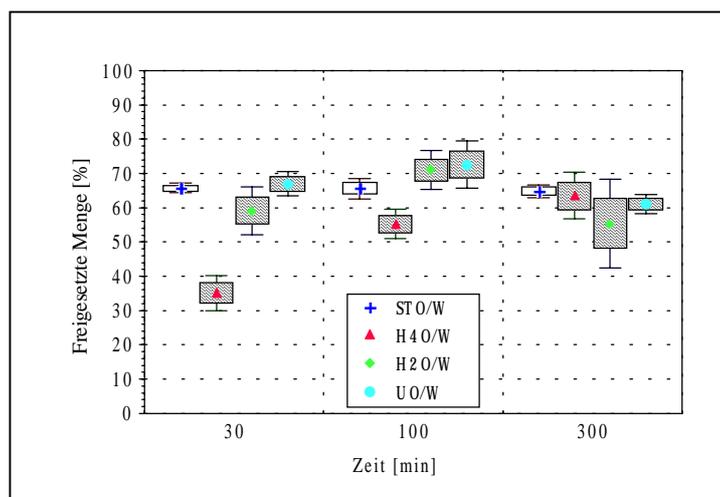


Abb. 5-5 In vitro-Liberation von Biotin aus hyaluronidase- bzw. harnstoffmodifizierten O/W-Vehikeln in das MSMM ($p \leq 0,05$; $n = 3$)

Diskussion

Das Ausmaß der Liberation von Biotin aus O/W-Vehikeln (Abb. 5-5) lag im Vergleich zu den Vehikeln vom W/O-Typ (Abb. 5-6) auf einem höheren Niveau.

Innerhalb der O/W-Systeme zeigten sich Unterschiede im Liberationsverhalten nach der Inkorporation verschiedener Modulatoren.

Die Beeinflussung der Liberation des untersuchten Wirkstoffs äußerte sich bei der Hyaluronidase in Form eines konzentrationsabhängigen Vorgangs. Hohe Hyaluronidaseanteile (*H 4 O/W*) in der Formulierung führten zu einer zeitweisen Herabsetzung der Freigabe. Diese Tatsache könnte die Folge einer simultanen Liberation von Biotin und dem hydrophilen Enzym sein, die kurzzeitig zugunsten des Enzyms erfolgte. Nach Reduktion des Enzymanteils im Vehikel (*H 2 O/W*) war das Liberationsverhalten dem des Standards angepaßt.

Die Modifikation mit 10% Harnstoff (*U O/W*) erbrachte eine zwischenzeitliche Steigerung der Liberation (100 min Wert höher als Standard), die im Zusammenhang mit der wasserbrechenden Wirkung des Harnstoffs stehen könnte. Das Absinken der liberierten Mengen nach 300 min spricht für eine schnellere Erschöpfung des Liberationsvorgangs.

5.3.2 W/O-Vehikel

Ergebnisse

Die liberierten Mengen an Biotin aus den modifizierten Vehikeln sind in Abb. 5-6 im Vergleich zur W/O-Emulsion (*ST W/O*) dargestellt. Insgesamt wurde der Wirkstoff nur zu einem geringen Anteil aus den Formulierungen liberiert. Das Liberationsausmaß des Standards *ST W/O* lag zu allen Versuchszeiten bei etwa 15%.

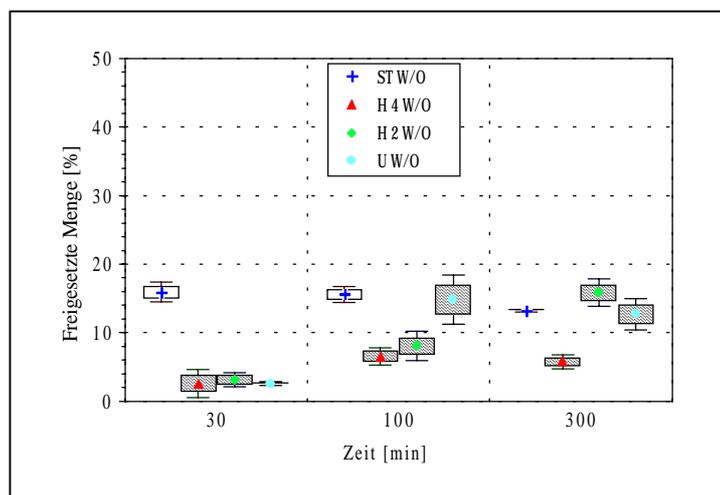


Abb. 5-6 **In vitro-Liberation von Biotin aus hyaluronidase- bzw. harnstoffmodifizierten W/O-Vehikeln in das MSMM ($p \leq 0,05$; $n = 3$)**

Durch den Zusatz der Modulatoren Hyaluronidase (*H 2 W/O* und *H 4 W/O*) und Harnstoff (*U W/O*) wurde nach 30 min eine signifikante Verringerung der Biotinliberation verursacht. Mit fortschreitender Liberationsdauer erhoben sich die liberierten Mengen der hyaluronidasehaltigen Emulsionen (*H 2 W/O* und *H 4 W/O*) auf etwa die Hälfte, die der harnstoffhaltigen Emulsion

(*U W/O*) auf das gleiche Niveau des Standards *ST W/O*. Nach 300 min Inkubationszeit war die Freigabe von Biotin aus der Formulierung mit hohem Hyaluronidasegehalt (*H 4 W/O*) nicht weiter angestiegen. Das harnstoffmodifizierte Vehikel (*U W/O*) erreichte zu dieser Zeit das Ausmaß des Standards, das Vehikel mit der geringen Hyaluronidasekonzentration (*H 2 W/O*) konnte es übertreffen.

Diskussion

Die Liberationsuntersuchungen aus den W/O-Vehikeln erbrachten im Vergleich zu den O/W-Vehikeln nur sehr geringe Freigaben an Biotin.

Die Modifikation mit Hyaluronidase (*H 2 W/O* und *H 4 W/O*) oder Harnstoff (*U W/O*) konnte sich im Kurzzeitbereich (30 min) nicht förderlich auf die Freisetzung auswirken. Hierbei dürfte eine Ursache in der Konkurrenzsituation von hochkonzentrierten hydrophilen Modulator- und niedrigkonzentrierten hydrophilen Wirkstoffanteilen im Vehikel gesehen werden, die eine primäre Bevorzugung der Eigenliberation der Modulatoren zur Folge hätte.

Mit zunehmender Zeit konnte die Addition von Harnstoff (*U W/O*) jedoch positiven Einfluß auf das Liberationsprofil von Biotin nehmen und zumindest das Niveau des Standards erreichen. Eine Überschreitung der liberierten Mengen aus dem Vehikel *ST W/O* konnte bei keiner Modifikation nachgewiesen werden. Insgesamt verblieben weit über 80% der eingesetzten Wirkstoffkonzentration im Vehikel, was für die Applikation biotinhaltiger W/O-Vehikel hinsichtlich der topischen Verfügbarkeit eine ungünstige Voraussetzung darstellt.

6 UNTERSUCHUNGEN ZUR PENETRATION VON BIOTIN IN HUMANE HAUT EX VIVO

6.1 Modellbeschreibung und Versuchsbedingungen

Zur Charakterisierung des Penetrationsverhaltens von Biotin aus kolloidalen Trägersystemen sowie der modifizierten Emulsionstypen in humane exzidierte Haut, wurde als *in vitro*-Modell die FRANZ'sche Diffusionszelle gewählt. Die Auswahl des Modells stützte sich auf die Erfahrungen der Autoren, die korrelierende Ergebnisse zwischen den *in vitro*-Daten des Modells und den *in vivo*-Resultaten feststellen konnten (Feldmann und Maibach, 1970; Franz, 1975).

Der Aufbau des Modells ist schematisch in Abb. 6-1 dargestellt. Der Grundkörper der FRANZ'schen Diffusionszelle besteht aus einem doppelwandigen, temperierbaren Glasteil. Darin befindet sich die durch Rühren ständig im homogenen Zustand gehaltene Akzeptorflüssigkeit. Im direkten Kontakt zum Akzeptor liegt das Probenmaterial auf einer Gaze, die durch einen Glasring und eine Metallklammer stabilisiert wird. Eine Glasbedeckung fungiert als Verdunstungsschutz zur Einhaltung weitgehend konstanter Hydratationsbedingungen während des Untersuchungszeitraumes.

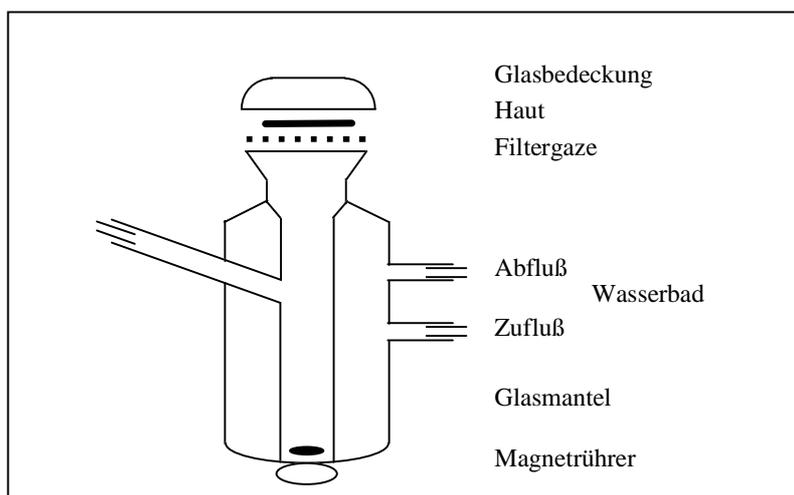


Abb. 6-1 Aufbau der FRANZ'schen Diffusionszelle (Franz, 1975)

Das Einkammersystem, wie es die FRANZ'sche-Diffusionszelle darstellt, bietet für Penetrationsuntersuchungen von Wirkstoffen in humane exzidierte Haut den Vorteil, daß es nicht an die Verwendung von „unendlich“ großen Wirkstoffmengen in überdimensionierten Donatoren (*infinite dose*-Technik) gebunden ist (Franz, 1978). So konnte bei den Untersuchungen zur Penetration von Biotin in humane Haut *ex vivo* eine pharmakologisch relevante Konzentration von 0,1% Arzneistoff aufgetragen werden (*finite dose*-Technik). Durch den Einsatz von Wasser als Akzeptormedium wurden bei der einmaligen Applikation der zu untersuchenden Vehikel *sink*-Bedingungen für den hydrophilen Arzneistoff realisiert.

Der Nachteil der Anwendung dieser Applikationstechnik liegt in einer zeitabhängigen Donatorentleerung begründet, die zum Ausbleiben eines *steady state* der Wirkstoffdiffusion führt und somit beschreibende Parameter der Kinetik unzugänglich macht.

Zur Standardisierung der Versuchsbedingungen konnte auf Probandenmaterial mit geringer Schwankung des Alters zurückgegriffen werden (Kap. 8.4.1.1). Gesunde Mammahaut, die maximal drei Monate tiefgefroren gelagert wurde, stand den Untersuchungen zur Verfügung.

In der Dermatopharmazie haben sich zur Testung klinisch relevante Dosierungen von 2-5 mg/cm² für halbfeste bzw. 5-7 µl/cm² für flüssige Formulierungen als günstig erwiesen. (Walker et al., 1991). Dieser Empfehlung wurde durch die Applikation von 20 mg / 3,14 cm² für die *Emulsionssysteme* bzw. 20 µl / 3,14 cm² für die *wäßrigen kolloidalen Trägersysteme* entsprochen.

Um Informationen über das Penetrationsausmaß des Wirkstoffes im Kurzzeit- als auch im Langzeitbereich zu erhalten, erfolgte die Datenaufnahme nach Einwirkzeiten von 30 und 300 min. Dazu soll im folgenden eine Unterscheidung der Vehikeleffekte anhand der ermittelten Konzentrationen [nmol/mm³] in den einzelnen Hautschichten *Stratum corneum*, *Epidermis* und *Dermis* getroffen werden. Eine exakte Wiedergabe der Akzeptorwerte gestaltete sich durch Schwankungen in der Schichtdicke der verwendeten Materialien als schwierig. Deshalb konnten Akzeptorangaben nur unter Einbeziehung nicht penetrierter Anteile als tendenzielle Angaben gewertet werden.

6.2 Modulation der Penetration durch kolloidale Arzneistoffträger

Die Penetration von Biotin stand zunächst unter dem Einfluß verschiedener kolloidaler Trägersysteme (Aufbau und Struktur siehe Kap. 2.4.1). Dazu erfolgte die Auswahl und Entwicklung dieser Vehikel speziell abgestimmt auf die stofflichen Eigenschaften des Wirkstoffs.

Nach der hinreichenden physikochemischen Charakterisierung (Kap. 4.1) und der Erfassung der Liberation des Wirkstoffs in das in vitro-MSMM (Kap. 5.2) konnte unter Nutzung der FRANZ'schen Diffusionszelle die Penetration von Biotin aus den Vehikeln in humane Haut ex vivo bestimmt werden.

6.2.1 Nanopartikel

Die Verwendung des Trägermaterials Stärkeacetat Sconacell[®] A ermöglichte die Herstellung matrixartiger biotinhaltiger Partikel. Deren Applikation erfolgte in Form von wäßrigen Nanopartikel-suspensionen, welche bei der Beurteilung der Penetrationsbeeinflussung von Biotin mit der Standard-emulsion *ST O/W* verglichen wurden.

Ergebnisse

Stratum corneum

Im Vergleich zum Vehikel *ST O/W* führte die Applikation der partikulären Suspensionen zu einer signifikanten Depoterhöhung an penetriertem Biotin im Stratum corneum (Abb. 6-2). Dabei zeigten die verwendeten Partikelsysteme unterschiedlich starke Potenz der Penetrationsbeeinflussung. Nach kurzer Einwirkzeit konnten die *BA-Partikel* (ca. 25 nmol/mm³) etwa fünffach und die *SDS-Partikel* etwa dreifach erhöhte Wirkstoffmengen ins Stratum corneum transportieren. Mit prolongierter Applikationsdauer näherten sich die erzielten Niveaus beider Systeme einander an und befanden sich bei ca. vierfach höherer Biotinkonzentration als der Standard (um 22 nmol/mm³).

Im Verteilungsprofil der penetrierten Biotinanteile zeichnete sich nach der Anwendung der *BA-Partikel* sowohl nach 30 als auch nach 300 min eine Anreicherung in den tieferen kompakteren Hornlagen des Stratum corneum ab (Abb. A. 1 und Abb. A. 2).

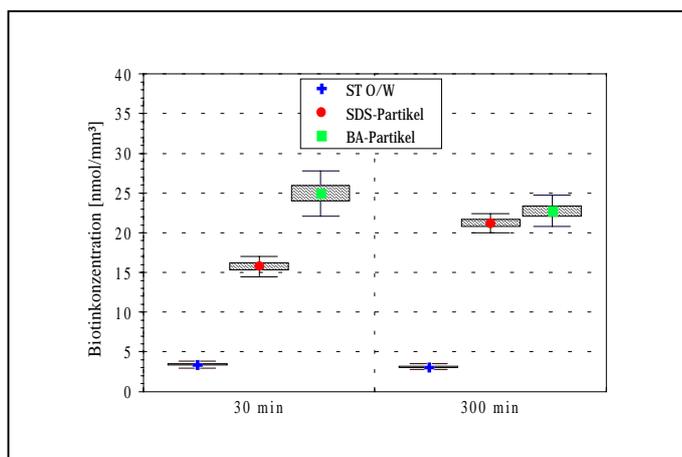


Abb. 6-2 Penetration von Biotin aus Partikeln in humane Haut ex vivo im Vergleich zum O/W-Standard (Stratum corneum) ($p \leq 0,05$; $n = 3$)

Epidermis

Wie in Abb. 6-3 ersichtlich, wurden in den epidermalen Schichten der Haut nur sehr niedrige Wirkstoffmengen quantifiziert. Dabei befanden sich die ermittelten Biotinkonzentrationen nach Applikation der *BA-Partikel* sowie der *SDS-Partikel* unterhalb von denen des Standards *ST O/W*. Nach 30 und ebenfalls nach 300 min fiel der epidermale Transport nach Einsatz der *SDS-Partikel* am geringsten aus. Betrachtet man die Lokalisation des Wirkstoffs in den epidermalen Schichten der Haut, so lassen sich im Kurzzeitbereich durch die Anwendung der *BA-Partikel* die epidermalen Konzentrationen beeinflussen (Abb. A. 1).

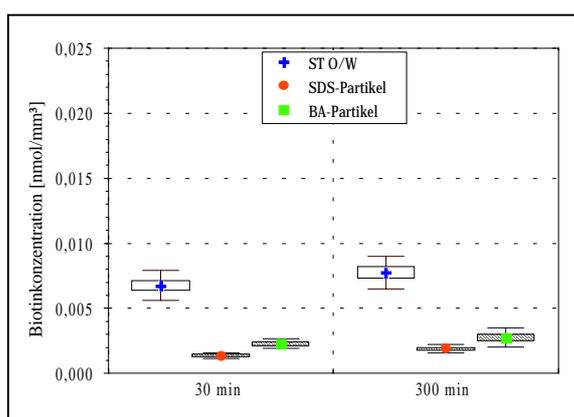


Abb. 6-3 Penetration von Biotin aus Partikeln in humane Haut ex vivo im Vergleich zum O/W-Standard (Epidermis) ($p \leq 0,05$; $n = 3$)

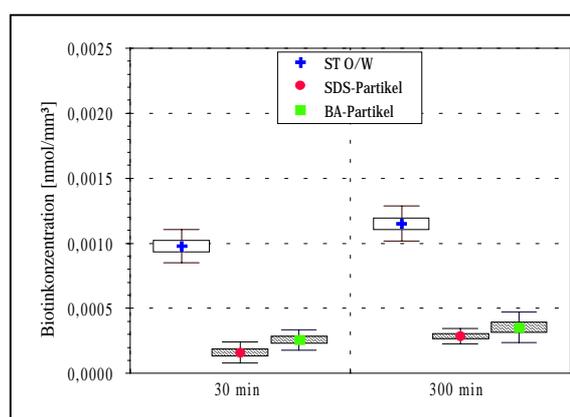


Abb. 6-4 Penetration von Biotin aus Partikeln in humane Haut ex vivo im Vergleich zum O/W-Standard (Dermis) ($p \leq 0,05$; $n = 3$)

Dermis

Ein analoges Transportverhalten für Biotin, wie es bereits in der Epidermis gezeigt werden konnte (Abb. 6-3), ließ sich auch in der Dermis nachweisen (Abb. 6-4). Beide Partikelsuspensionen konnten nicht die Biotinkonzentrationen des Standards erreichen (unterhalb von $0,005 \text{ nmol/mm}^3$). Die Anreicherung von Biotin innerhalb der dermalen Schichten war zu beiden Zeiten sehr gering und mit abnehmender Tendenz im Tiefenprofil (Abb. A. 1 und Abb. A. 2).

Diskussion

Die Variation in der Oberflächenladung der Vesikel erbrachte ein spezifisches Penetrationsverhalten für den hydrophilen Wirkstoff innerhalb der Hornschicht. Der zugrundeliegende Mechanismus für die frühzeitige Depotausprägung nach Applikation der *BA-Partikel* könnte im Zusammenhang mit einer erhöhten Affinität des positiv geladenen Teilchens (Kap. 4.1.1.2) zur negativ geladenen Oberfläche der Haut stehen. Diese Hypothese stützt sich weniger auf das Interaktionspotential zwischen den geladenen Partikeln und den corneozytären Proteinen (Mack et al., 1993), welche z. B. durch Ionenbeziehungen ihre Bindung stabilisieren (Filaggrin und Keratinfilament im Verband), sondern bezieht sich auf die Wechselwirkungen mit den Lipiden des Stratum corneum. Ferner könnte die alleinige kolloidale Struktur der Partikel Ursache der Erhöhung der Wirkstoffmenge in der Hornschicht sein. Untersuchungen von CALVO und Mitarbeitern berichten in diesem Zusammenhang von einer verbesserten in vitro-cornealen Penetration von Indometacin nach Applikation verschiedener kolloidaler Trägersysteme (1996). In Analogie zu dieser Studie sind die in vitro-Ergebnisse an humaner Haut auch von der schnellen Freigabe des Wirkstoffs aus dem Partikelsystem beeinflusst (Kap. 5.2.1).

Mit der Wirkung auf die Hornschicht erscheint das Wirkungsspektrum der Partikelsuspensionen erschöpft zu sein. Das Ausbleiben wirksamer Mengen in den epidermalen Schichten läßt die Anwendung der Partikelsysteme für die topische Applikation von Biotin jedoch in Frage stellen.

6.2.2 Liposomen

Die liposomalen biotinhaltigen Vehikelsysteme wurden ebenfalls als wäßrige Suspensionen appliziert und das Ausmaß der Penetration von Biotin mit dem des hydrophilen Standardvehikels *ST O/W* verglichen.

Ergebnisse

Stratum corneum

Aus der Abb. 6-5 gehen die Biotinkonzentrationen im Stratum corneum nach Applikation der liposomalen Suspensionen und dem *ST O/W* hervor. Bereits in der Initialphase der Wirkstoffpenetration führte die Anwendung der Formulierung *Liposom* zu einer signifikanten Erhöhung der Biotinkonzentration im Vergleich zum Standard. Mit prolongierter Penetrationsdauer konnte dieses eingebrachte Wirkstoffdepot noch angehoben werden. Die Verwendung der cholesterolhaltigen Formulierung *Liposom + Chol.* zeigte eine verzögerte Penetration von Biotin (30 min), die bei verlängerter Einwirkzeit gleiche Mengen wie das cholesterolfreie Vehikel erlangte. Insgesamt wiesen beide liposomalen Formulierungen analoge Verteilungsmuster in der Hornschicht auf, wobei nach

300 min in den lockeren Hornlagen des Stratum corneum disjunctum prozentual mehr Biotin ermittelt werden konnte (Abb. A. 1 und Abb. A. 2).

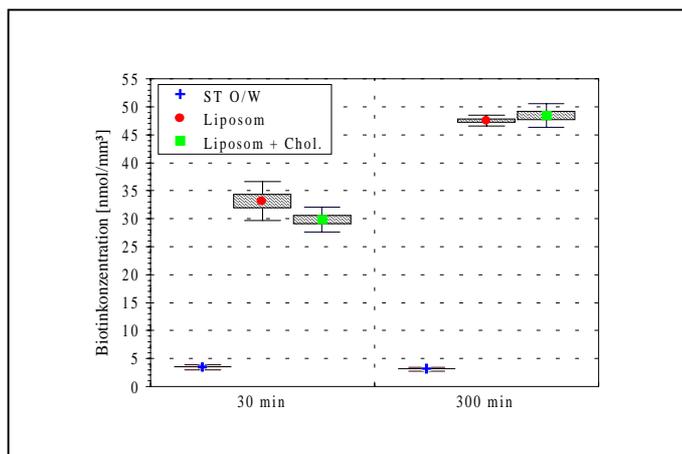


Abb. 6-5 Penetration von Biotin aus Liposomen in humane Haut ex vivo im Vergleich zum O/W-Standard (Stratum corneum) ($p \leq 0,05$; $n = 3$)

Epidermis

Betrachtet man die Wirkstoffkonzentrationen in den epidermalen Hautschichten (Abb. 6-6), so lassen sich nur geringfügige Schwankungen unter den applizierten Vehikeln beobachten. Während es unter Einfluß des Vehikels *Liposom* schon nach kurzer Zeit zu einer Erhöhung der Epidermiskonzentration kam, war der Zusatz von Cholesterol (*Liposom + Chol.*) hier ohne Steigerungseffekt. Mit zunehmender Applikationsdauer verbesserten beide liposomalen Vehikel den epidermalen Transport für Biotin und ließen die Wirkstoffkonzentration auf über 0,01 nmol/mm³ anwachsen.

In den Verteilungsprofilen in den Abb. A. 1 und Abb. A. 2 werden die Vehikelunterschiede sichtbar, die nach kurzer Applikationsdauer in der oberen Epidermis eine Überlegenheit der einfachen Liposomen und nach 300 min die Gleichheit der liposomalen Systeme zum Ausdruck bringen.

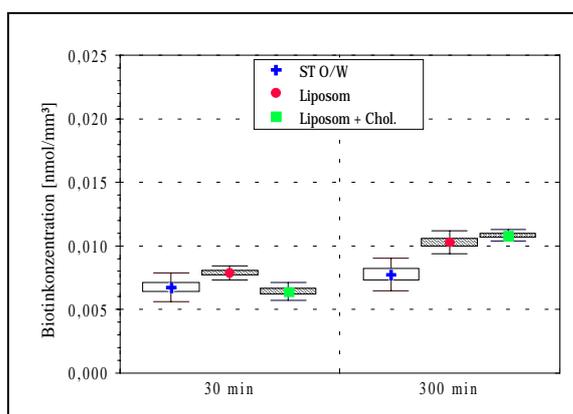


Abb. 6-6 Penetration von Biotin aus Liposomen in humane Haut ex vivo im Vergleich zum O/W-Standard (Epidermis) ($p \leq 0,05$; $n = 3$)

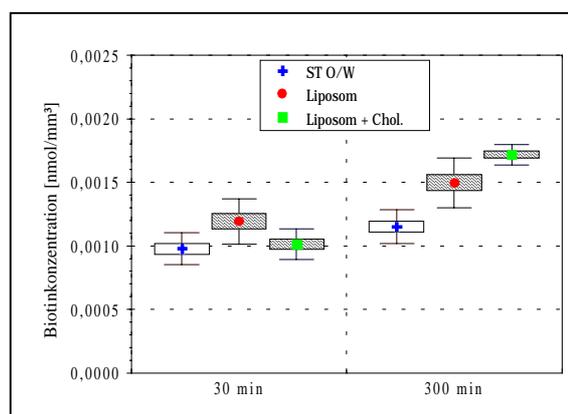


Abb. 6-7 Penetration von Biotin aus Liposomen in humane Haut ex vivo im Vergleich zum O/W-Standard (Dermis) ($p \leq 0,05$; $n = 3$)

Dermis

Eine Fortsetzung der epidermalen Vehikeleinflüsse (Abb. 6-6) konnte in den tieferen Schichten der Haut registriert werden (Abb. 6-7). Auch hier zeigten sich initial Unterschiede im Ausmaß der Penetration von Biotin aus den Liposomen mit und ohne Cholesterol. Die zunächst verlangsamte Penetration durch die Vehikelmodulation (*Liposom + Chol.*) bewirkte nach zunehmender Einwirkdauer eine Förderung des Arzneistofftransportes (Abb. A. 1 und Abb. A. 2).

Diskussion

Die Anwendung der liposomalen Vehikel führte insgesamt betrachtet zu den höchsten Biotindepots im Stratum corneum. Dieser Effekt läßt sich einerseits auf intensive Wechselwirkungen zwischen den vesikulären Hauptbestandteilen und den interzellulären Lipiden des Stratum corneum, andererseits auf die frühzeitige Freigabe (Abb. 5-3) des inkorporierten Wirkstoffs und hydratisierende Effekte des hohen Wasseranteils der liposomalen Formulierung zurückführen. Im Gegensatz zu den partikulären Trägersystemen konnten durch die Anwendung der Liposomen nach prolongierter Einwirkzeit epidermal effektive Biotinkonzentrationen erzielt werden.

Die Modifikation der Phosphatidylcholinliposomen mit Cholesterol diente der Vesikelstabilisierung, die auf einer Erniedrigung der Membranpermeabilität beruht. Inwieweit diese Veränderung der Liposomenmembran Auswirkungen auf die Penetration von Biotin nehmen kann, sollte anhand der in vitro-Untersuchungen an humaner Haut ex vivo geklärt werden. Resultierend aus der Modifikation trat initial eine Penetrationsverzögerung ein, die im Zusammenhang mit der retardierten Freigabe von Biotin aus dem Vehikel *Liposom + Chol.* gesehen werden kann (Abb. 5-3). KIRJAVAINEN und Mitarbeiter stufen neben der Ladung der Vesikel auch den Cholesterolgehalt und die Kettenlänge der Acylreste innerhalb der Phospholipide als regulierende Faktoren der Wirkstoffpenetration ein (1996). Hinsichtlich ihrer epidermalen Wirksamkeit und der hohen Reservoirbildung im Stratum corneum erscheint die topische Applikation dieser einfachen biotinhaltigen Liposomensuspensionen sinnvoll.

6.2.3 Mikroemulsionen

Mikroemulsionen sind für ihre transdermale Wirksamkeit geschätzte Vehikel. Durch die gezielte Modifikation der Systeme mit Cholesterol sollte, in Analogie zu den Untersuchungen von SCHMALFUß, eine epidermale Nutzbarkeit für die topische Applikation von Biotin angestrebt werden (1997). Als Bezugsgröße der dermalen Aktivität der Mikroemulsionen wird im folgenden der O/W-Standard *ST O/W* herangezogen, der den effektiveren Vertreter der untersuchten Makroemulsionssysteme repräsentiert.

Ergebnisse

Stratum corneum

Aus der Abb. 6-8 lassen sich die Penetrationsdaten für das Stratum corneum nach Applikation der Mikroemulsionssysteme entnehmen. Obwohl sich die erhaltenen Resultate der Hornschichtmengen nach Verwendung des Standards (*ST O/W*) und der nichtmodifizierten Mikroemulsion (*ME*) nach 30 und 300 min statistisch unterscheiden, war der entsprechende Differenzbetrag nur sehr gering. Eine Einarbeitung von 2 bzw. 5% Cholesterol (*ME + 2% Chol.*, *ME + 5% Chol.*) in die Mikroemul-

sion führte im Stratum corneum zu signifikant gesteigerten Konzentrationen an Wirkstoff. Der nach 30 min ermittelte Depotunterschied zwischen *ME + 2% Chol.* und *ME + 5% Chol.* mündete in einer Erhöhung des Niveaus beider Vehikel nach prolongierter Einwirkzeit.

Aus den Verteilungsprofilen in Abb. A. 3 und Abb. A. 4 gehen die unterschiedlichen Penetrationskräfte der Mikroemulsionssysteme für Biotin hervor. Nach 30 min befanden sich im disjunctionalen Teil der Hornschicht (Abrisse 1-4) die höchsten Anteile an eingedrunenem Wirkstoff. Während hier eine Vehikeldominanz von *ME + 2% Chol.* und *ME + 5% Chol.* zu beobachten war, verschwimmt diese mit zunehmender Abrißtiefe im Stratum corneum conjunctum. Obwohl mit verlängerter Einwirkzeit die Profile einen analogen Verlauf einnahmen, ergaben sich in der Addition der einzelnen Meßwerte signifikante Vehikelunterschiede (Abb. 6-8).

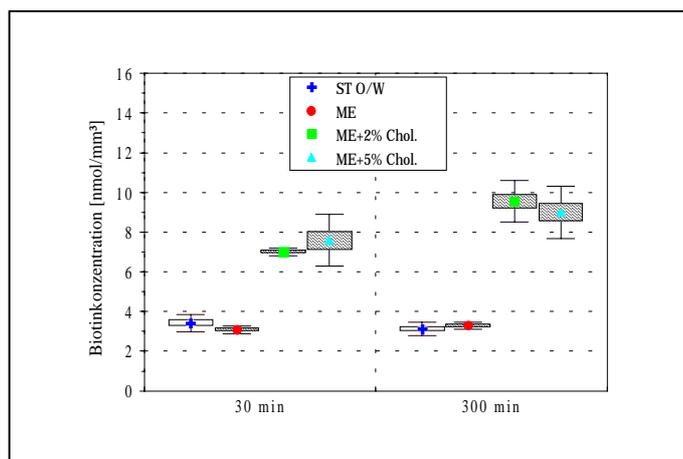


Abb. 6-8 Penetration von Biotin aus Mikroemulsionen in humane Haut ex vivo im Vergleich zum O/W-Standard (Stratum corneum) ($p \leq 0,05$; $n = 3$)

Epidermis

Die Konzentrationen des Vitamins in den Schichten der Epidermis sind in der Abb. 6-9 dargestellt. Der Einfluß der einfachen Mikroemulsion *ME* kam über den gesamten Untersuchungszeitraum durch eine Reduktion der penetrierten Mengen im Vergleich zum Standard *ST O/W* zum Ausdruck. Signifikante Unterschiede zum Standard *ST O/W* und zur *ME* im Sinne einer Penetrationssteigerung wiesen die mit Cholesterol ergänzten Vehikel *ME + 2% Chol.* und *ME + 5% Chol.* auf. Diese fiel nach kurzzeitiger Anwendung besonders stark bei Inkorporation von 5% Cholesterol aus (sechsfach höher als *ME + 2% Chol.*) und geht ebenfalls aus der Biotinverteilung in den epidermalen Schichten aus Abb. A. 3 hervor. Nach verlängerter Applikationsdauer befanden sich die gemessenen Biotinkonzentrationen unter Einwirkung beider cholesterolhaltigen Mikroemulsionen auf dem gleichen Niveau (Abb. A. 4).

Dermis

Wie in Abb. 6-10 ersichtlich, zeichnete sich in der Dermis die besondere Tiefenwirkung der Mikroemulsionen ab. Diese Aussage wird bei Betrachtung der Verteilung des Wirkstoffs in den einzelnen Schichten der Dermis in den Abb. A. 3 und Abb. A. 4 verdeutlicht, da der Kurvenverlauf ein steiles Profil mit nahezu gleichbleibender Wirkstoffmenge bis in die tiefen Schichten repräsentiert.

Alle drei applizierten Vehikel führten bei Addition der gesamten dermalen Mengen zu einem gesteigerten Transport von Biotin in die dermalen Schichten der Haut, wobei mit zunehmendem Cholesterolgehalt eine Effektverstärkung nachweisbar war.

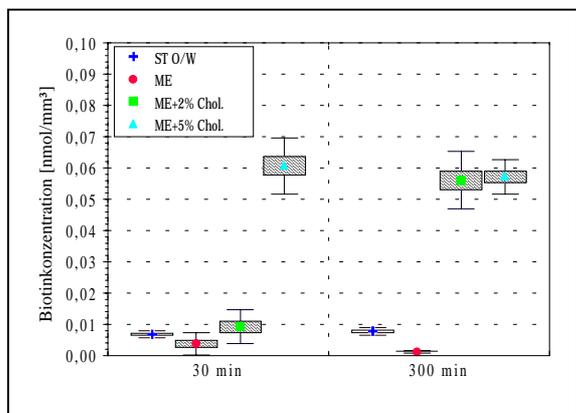


Abb. 6-9 Penetration von Biotin aus ME in humane Haut ex vivo im Vergleich zum O/W-Standard (Epidermis) ($p \leq 0,05$; $n = 9$)

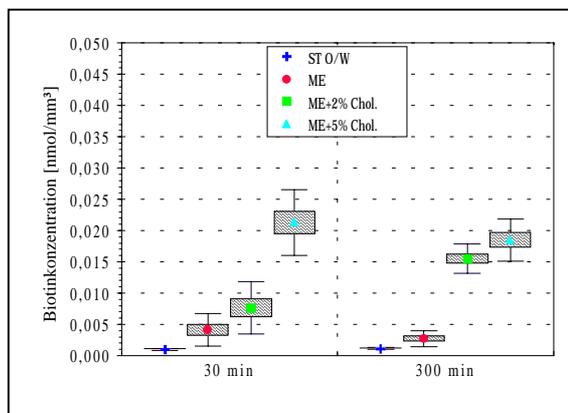


Abb. 6-10 Penetration von Biotin aus ME in humane Haut ex vivo im Vergleich zum O/W-Standard (Dermis) ($p \leq 0,05$; $n = 9$)

Diskussion

Während das einfache Mikroemulsionssystem (*ME*) im Vergleich zur Standardemulsion vom O/W-Typ (*ST O/W*) noch ohne den angestrebten Einfluß auf den epidermalen Transport von Biotin blieb, konnten unter Inkorporation von Cholesterol Erfolge erzielt werden.

Mit der Einarbeitung von 2% Cholesterol (*ME + 2% Chol.*) befand sich initial die epidermale Biotinkonzentration erstmals im wirksamen Bereich ($0,01 \text{ nmol/mm}^3 - 10^{-5} \text{ mol/l}$). Durch Erhöhung der Modulatorkonzentration auf 5% (*ME + 5% Chol.*) stieg die Wirkstoffkonzentration in der Epidermis sogar auf ein Vielfaches an.

Obwohl die in vitro-Liberation beider cholesterolmodifizierter Systeme für Biotin hinter der des einfachen Vehikels zurückblieb (Kap. 5.2.3), resultierte aus der Anwendung beider Vehikel ein verändertes Konzentrations-Zeit-Profil. Somit erscheinen die erhaltenen Resultate an humaner Haut ex vivo unter dem Einfluß von spezifischen Wechselwirkungen zwischen Vehikelbestandteilen und dem Applikationsorgan zu stehen. Eine Veränderung der Barriereintegrität durch die Zerstörung der geordneten Strukturen der Lipidbilayer als Folge der Einlagerung der penetrierten Cholesterolmoleküle wurde bereits von SCHMALFUß als möglicher Weg der Penetrationsmodulation diskutiert (1997). Eine Verallgemeinerung der Aussagen über die Penetrationsbeeinflussung mit steigender Konzentration an Cholesterol in ähnlich strukturierten Mikroemulsionen kann nicht getroffen werden, da die Resultate für biotinhaltige Formulierungen im Gegensatz zu denen mit Diphenhydramin für einen verbesserten Wirkstofftransport sorgten.

6.3 Penetration von Biotin aus modifizierten Emulsionen

Anhand der Untersuchungen zum Einfluß von Biotin auf die Lipidsynthese des Keratinozyten konnten epidermal wirksame Konzentrationen ermittelt werden (Kap. 3.4.1). Deshalb diente die Modulation der Penetration des hydrophilen Vitamins in erster Linie der Optimierung des Konzentrations-Zeit-Profiles in den lebenden Schichten der Epidermis. Somit wurden Emulsionen mit unterschiedlichem Hyaluronidasegehalt, Vehikel mit Zusatz von 10% Harnstoff und kombinierte Vehikel mit beiden Modulatoren untersucht.

6.3.1 Hyaluronidasehaltige O/W-Emulsionen

Ergebnisse

Stratum corneum

Die in Abb. 6-11 dargestellten Ergebnisse der Penetration von Biotin aus hyaluronidasehaltigen O/W-Vehikeln in die Hornschicht humaner Haut ex vivo spiegeln den Einfluß der Enzymmodulation wider. Während nach Einarbeitung hoher Enzymmengen (10.000 IE/cm², *H 4 O/W*) keine Veränderungen im Ausmaß der Wirkstoffpenetration auftraten, führte die Reduktion der Enzymkonzentration zu einer Steigerung der ermittelten Wirkstoffkonzentrationen im Stratum corneum (*H 3 O/W*, *H 2 O/W*, *H 1 O/W*). Bekräftigt wird diese Tatsache bei Betrachtung der schichtweisen Arzneistoffverteilung, die anhand der registrierten Radioaktivität (dpm) pro Fläche in den Abb. A. 5 und Abb. A. 6 präsentiert wird. Bei Verwendung der Vehikel mit reduziertem Enzymgehalt konnten deutliche Verschiebungen der Verteilungsprofile gefunden werden, währenddessen *H 4 O/W* und *ST O/W* eine übereinstimmende Verteilungscharakteristik hatten.

Unter Verwendung der Formulierung *H 3 O/W* bildete sich bereits nach 30 min ein Wirkstoffdepot von ca. 7 nmol/mm³. Mit zunehmender Einwirkzeit erhöhte sich dieses Reservoir auf etwa 15 nmol/mm³. Die Konzentrationen der Vehikel mit geringerem Gehalt an Hyaluronidase (*H 2 O/W* und *H 1 O/W*) lagen im Vergleich dazu auf niedrigerem Niveau, jedoch oberhalb der Konzentration des Standards *ST O/W*.

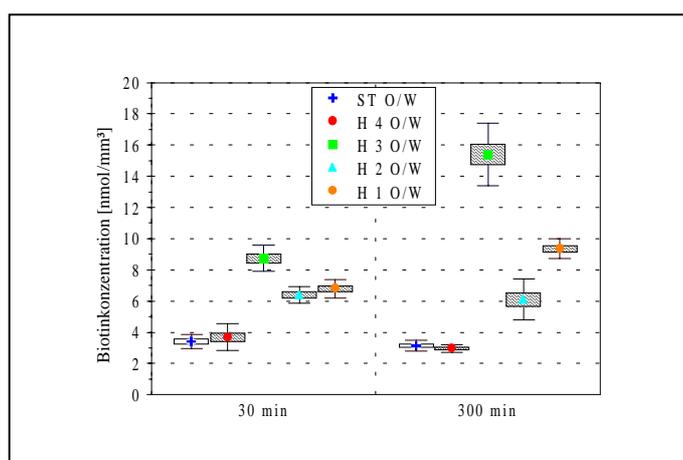


Abb. 6-11 Penetration von Biotin aus O/W-Vehikeln mit Hyaluronidase in humane Haut ex vivo im Vergleich zum O/W-Standard (Stratum corneum) ($p \leq 0,05$; $n = 3$)

Epidermis

In der Epidermis der humanen Haut lagen nach 30 und 300 min Einwirkzeit die in Abb. 6-12 aufgeführten Konzentrationen an Biotin vor. Mit dem Standard *ST O/W* ließen sich nur geringe Mengen an Biotin in die epidermalen Schichten einbringen (unter 0,01 nmol/mm³). Nach Modifikation von *ST O/W* durch Einarbeitung eines hohen Enzymanteils (6,3%, *H 4 O/W*) konnte die Epidermiskonzentration nur bei prolongierter Applikationsdauer gesteigert werden. Dagegen bewirkten alle hyaluronidasehaltigen Emulsionen mit geringerer Enzymmenge (*H 3 O/W*, *H 2 O/W*, *H 1 O/W*) eine signifikante Erhöhung der epidermalen Konzentrationen. Dabei beeinflussten diese Vehikel den epidermalen Wirkstofftransport unterschiedlich stark. Während aus *H 3 O/W* und *H 1 O/W* nach kurzer Einwirkzeit (30 min) höhere Wirkstoffmengen als nach verlängerter Einwirkdauer (300 min) determiniert wurden, blieb bei der Formulierung *H 2 O/W* das Niveau erhalten. Aus den Verteilungsprofilen in Abb. A. 5 und Abb. A. 6 konnten lediglich die Kurvenverläufe bei Applikation von *H 3 O/W* nach 30 min sowie *H 2 O/W* und *H 3 O/W* nach 300 min als unterschiedlich zum Standard interpretiert werden.

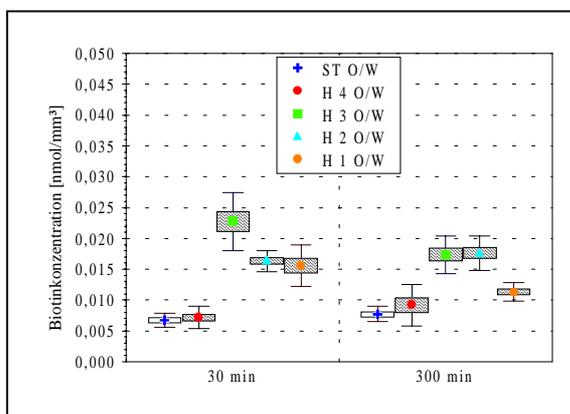


Abb. 6-12 Penetration von Biotin aus O/W-Vehikeln mit Hyaluronidase in humane Haut ex vivo im Vergleich zum O/W-Standard (Epidermis) ($p \leq 0,05$; $n = 9$)

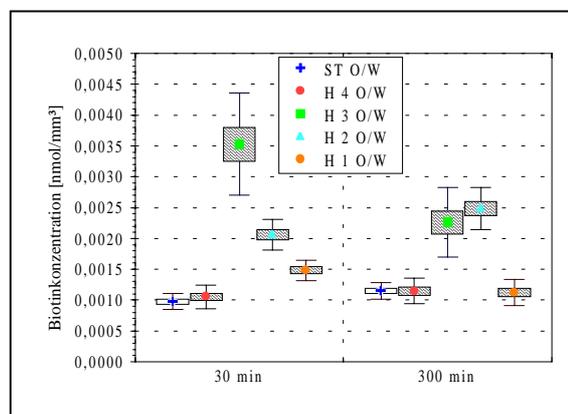


Abb. 6-13 Penetration von Biotin aus O/W-Vehikeln mit Hyaluronidase in humane Haut ex vivo im Vergleich zum O/W-Standard (Dermis) ($p \leq 0,05$; $n = 9$)

Dermis

Aus der Abb. 6-13 lassen sich die Ergebnisse des Wirkstofftransportes von Biotin aus den O/W-Vehikeln in die dermalen Schichten der Haut entnehmen. Für den Standard *ST O/W* gilt, wie bereits in der Epidermis festgestellt (Abb. 6-12), daß er die Penetration von Biotin nur in einem geringem Ausmaß zuläßt.

Verglichen mit *ST O/W* blieb die Addition von 6,3% Hyaluronidase (*H 4 O/W*) ohne Auswirkung auf die dermale Verteilung (Abb. A. 5 und Abb. A. 6) und die Gesamtkonzentration (Abb. 6-12) des Vitamins. Indes verursachte die Modifizierung des Vehikels mit steigender Enzymkonzentration von 0,6% (*H 1 O/W*), 1,3% (*H 2 O/W*) bis 2,6% (*H 3 O/W*) eine signifikante Zunahme der Biotinkonzentration nach 30 min Einwirkzeit. Bei deren Verlängerung auf 300 min waren nur die Vehikel *H 2 O/W* und *H 3 O/W* in der Lage, den Wirkstofftransport zu steigern. *H 1 O/W* und *H 4 O/W* erzielten die gleiche Wirkung wie der Standard *ST O/W*.

Diskussion

Das Penetrationsverhalten von Biotin aus der in Kap. 4.2.1 beschriebenen Wasserhaltigen Hydrophilen Salbe nach DAB 10 stellte hinsichtlich der erforderlichen Wirkkonzentration in der Epidermis einen unbefriedigenden Zustand dar. Obwohl die Resultate der in vitro-Liberation des Standards (Abb. 5-5) eine gute Prognose für die Penetration erwarten ließen, waren der hohe Wasseranteil in der Emulsion und die verwendeten Vehikelbestandteile allein nicht genug treibende Kraft für den angestrebten Biotintransport.

Durch die Modulation der O/W-Emulsion mit Hyaluronidase ergaben sich zunächst veränderte Bedingungen für die Liberation des Wirkstoffs. Die retardierte Liberation durch den hohen Enzymgehalt (6,3%) bei Anwendung des Vehikels *H 4 O/W* steht im Zusammenhang mit dem Ausbleiben einer Penetrationsverbesserung gegenüber dem Standard. Emulsionen mit reduzierter Enzymmenge zeigten ein gleichwertiges Liberationsverhalten, führten jedoch zu signifikanten Steigerungen der penetrierten Biotinmengen in den einzeln betrachteten Hautkompartimenten Stratum corneum, Epidermis und Dermis. Somit könnten die erhaltenen in vitro-Resultate an humaner Haut ursächlich auf eine Wechselwirkung zwischen dem Vehikel und dem Akzeptor zurückgeführt werden.

Über den möglichen Mechanismus dieser Wechselwirkungen lassen sich teils fundierte, teils spekulative Aussagen treffen. Fest steht, daß die Hyaluronsäure als spezifisches Substrat der Hyaluronidase nur in den lebenden Schichten der Epidermis und Dermis lokalisiert ist und nicht im Stratum corneum nachweisbar war (Tammi et al., 1988). Der Abbau der Hyaluronsäure und anderen sauren Mucopolysacchariden (Dermantansulfat, Keratansulfat, Chondroitin) vollzieht sich über die Spaltung der Glykankomponenten, die im Falle der Einwirkung bakterieller Hyaluronidase durch die Lösung glykosidischer Bindungen unter β -Eliminierung in der Bildung von Disacchariden mit Doppelbindung endet (Abb. 6-14).

Eine Verbesserung der Penetration für Biotin in die lebenden Schichten der Haut macht eine Beeinflussung der Barriereintegrität des Stratum corneum erforderlich. Ansatzpunkte für die Umsetzung dieser Anforderung sind in der Fluidisierung der Lipidbilayer und einer nachfolgenden Permeabilitätserhöhung zu sehen, die jedoch nicht unter Hyaluronidaseeinfluß nachweisbar war (Squier, 1984).

Über mögliche Wechselwirkungen des Enzyms mit der Proteinstruktur des Corneozyten bzw. eine daraus resultierende Zerstörung der cornified envelope existieren keinerlei Hinweise in der Literatur.

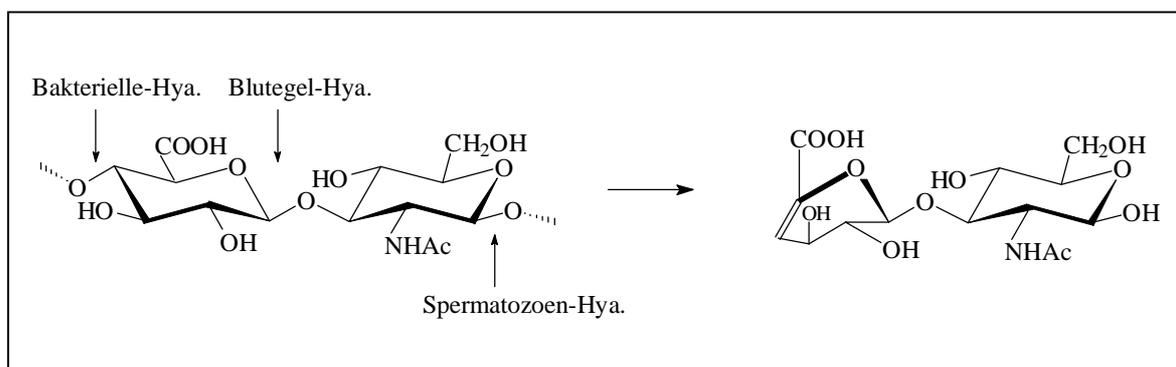


Abb. 6-14 Mechanismus der enzymatischen Spaltung von Hyaluronsäure (nach Nuhn, 1997)

6.3.2 Hyaluronidasehaltige W/O-Emulsionen

Neben den Untersuchungen der Penetration von Biotin aus O/W-Vehiklen sollte ebenfalls dessen Transportverhalten unter Einfluß von lipophileren W/O-Emulsionen charakterisiert werden.

Ergebnisse

Stratum corneum

Wie in Abb. 6-15 dargestellt, fiel der Wirkstofftransport in die Hornschicht humaner Haut ex vivo nur sehr gering aus (unter 8 nmol/mm³). Mit dem Standard *ST W/O* wurden die niedrigsten Biotinkonzentrationen erzielt. Der Zusatz von Hyaluronidase bewirkte konzentrations- sowie zeitabhängige Veränderungen der Penetration von Biotin. Während die Modifikation des W/O-Vehikels unter Verwendung von hohen Enzymmengen (*H 4 W/O* mit 10.000 IE/cm²) im Kurzzeitbereich ohne Steigerungseffekt blieb, äußerte sich die Erhöhung der Modulatorkonzentrationen von 0,6% (*H 1 W/O*) über 1,3% (*H 2 W/O*) auf 2,6% (*H 3 W/O*) in einer Zunahme der Wirkstoffpenetration. Indes erbrachte die Bestimmung der penetrierten Raten nach einer Einwirkzeit von 300 min eine negative Korrelation von inkorporierter Enzym- und eingedrungener Biotinmenge (Abb. 6-15). Bei Betrachtung der wirkstoffhaltigen Abrisse des Stratum corneum werden innerhalb der Verteilungsprofile die Einflüsse der hyaluronidasehaltigen Vehikel transparent (Abb. A. 8).

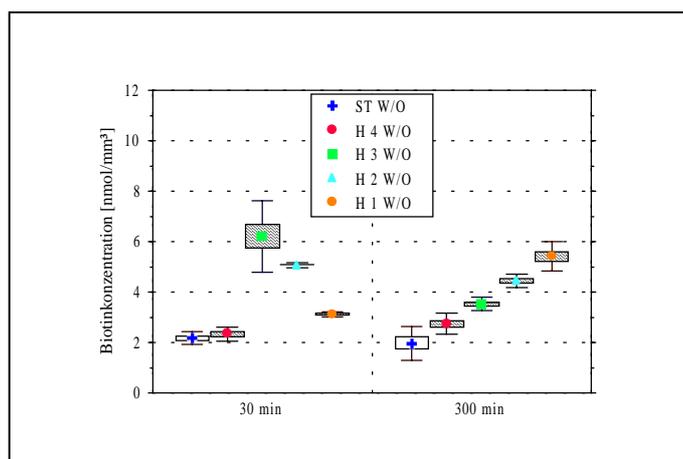


Abb. 6-15 Penetration von Biotin aus W/O-Vehikeln mit Hyaluronidase in humane Haut ex vivo im Vergleich zum W/O-Standard (Stratum corneum) ($p \leq 0,05$; $n = 3$)

Epidermis

In der Abb. 6-16 sind die epidermalen Konzentrationen von Biotin nach einer Einwirkdauer von 30 und 300 min dargestellt. Die Ergebnisse repräsentieren ein vehikeldominiertes Wirkstoffprofil in Anlehnung an die beschriebene Verteilung innerhalb der Hornschicht (Abb. 6-15).

Eine signifikante Erhöhung der epidermalen Biotinkonzentration gegenüber dem Standardvehikel *ST W/O* war bei kurzer Applikationsdauer durch die Einarbeitung der Enzymmengen unterhalb von 10.000 IE/cm² (*H 3 W/O*; *H 2 W/O*; *H 1 W/O*) erreichbar (Abb. A. 7).

Obwohl der Zusatz einer Enzymmenge von 10.000 IE/cm² (*H 4 W/O*) mit prolongierter Einwirkzeit ein Übertreffen des Vergleichswertes der Standardkonzentration (*ST W/O*) ermöglichte, wurde die minimale pharmakologische Wirkkonzentration des Vitamins von 10⁻⁵ mol/l (0,01 nmol/mm³) nicht

erreicht. Alle Vehikel mit niedrigerer Hyaluronidasekonzentration bewirkten nach 300 min eine Penetrationsförderung des Vitamins in den Bereich epidermal effizienter Konzentrationen, die ebenfalls als deutliche Verschiebung der Wirkstoffprofile in Abb. A. 8 sichtbar wird.

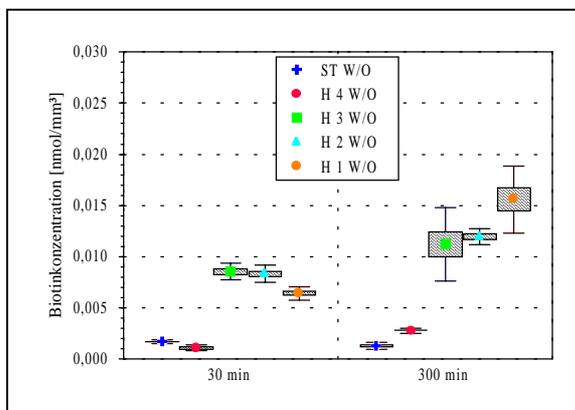


Abb. 6-16 Penetration von Biotin W/O-Vehikeln mit Hyaluronidase in humane Haut ex vivo im Vergleich zum W/O-Standard (Epidermis) ($p \leq 0,05$; $n = 9$)

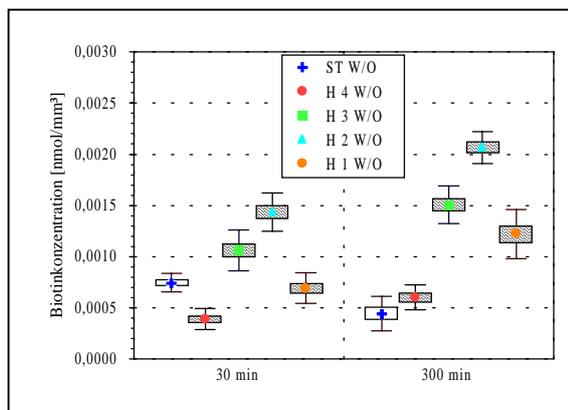


Abb. 6-17 Penetration von Biotin aus W/O-Vehikeln mit Hyaluronidase in humane Haut ex vivo im Vergleich zum W/O-Standard (Dermis) ($p \leq 0,05$; $n = 9$)

Dermis

Aus der Abb. 6-17 gehen die dermalen Konzentrationen an Biotin nach Applikation der W/O-Vehikel hervor. Die höchste erreichte Biotinkonzentration betrug in der Dermis etwa 0,0021 nmol/mm³, womit das Ausmaß der Penetration insgesamt als sehr gering einzustufen wäre. Die Variation der W/O-Emulsion *ST W/O* durch Versetzen mit differierenden Enzymmengen erbrachte unterschiedlich starke Wirkungen auf den dermalen Transport von Biotin (Abb. A. 7 und Abb. A. 8). Sowohl im Kurz- als auch im Langzeitbereich erwiesen sich die Vehikel *H 3 W/O* und *H 2 W/O* als beste Transporter für Biotin in die dermalen Schichten der Haut.

Diskussion

Im Gegensatz zu den epidermal erzielten Biotinkonzentrationen nach Applikation der modifizierten O/W-Vehikel (Abb. 6-12) erforderte die Überschreitung der minimalen Wirkkonzentration bei Anwendung der hyaluronidasehaltigen W/O-Vehikel eine längere Einwirkdauer (Abb. 6-16). Bedingt durch die Verschlechterung der Liberation aus den lipophileren Vehikeln (unter 20% Gesamtliberation auch nach 300 min) läßt sich der Rückgang der Depotausprägung im Stratum corneum (Abb. 6-15) als auch der verminderte epidermale Transport erklären. Der vehikeldominierte Effekt resultiert dabei aus der Struktur der Wasserhaltigen Wollwachsalkoholsalbe nach DAB 9, die Biotin, gelöst in durch Mischemulgatoren stabilisierten Wassertröpfchen, in der Emulsion einschließt. Als außerordentlich interessant stellte sich die Gegenläufigkeit von Hyaluronidasegehalt im Vehikel und erzielter Biotinkonzentration im lebenden Gewebe nach kurzer und erweiterter Applikationsdauer heraus. Ein Anhaltspunkt für die Effektivität der niedrigen Modulatorkonzentration könnte im Zusammenhang mit Untersuchungen von Sheinaus et al. gesehen werden. Durch Inkorporation von 750 TRU Hyaluronidase pro Gramm lipophiler Salbengrundlage (Plastibase®

wasserfrei) konnte die Penetration von Natriumjodid im Vergleich zum modulatorfreien Vehikel signifikant gesteigert werden, während der Transport von Natriumchlorid, Sulfanilamid und dessen Natriumsalz nicht beeinflusst wurde. Nach Austausch des Vehikels gegen hydrophilere Grundlagen (Hydrophile Salbe U. S. P. XIV, Plastibase wasserhaltig) war ebenfalls keine penetrationsfördernde Wirkung des Enzyms auf die untersuchten Modellsubstanzen nachweisbar (Sheinaus et al., 1955). Bis heute gilt der Mechanismus der Penetrationsbeeinflussung durch Hyaluronidase als nicht geklärt. Eine Eigenpenetration des Enzyms durch die Hornschicht kann, bedingt durch die Molekülgröße (116.000 D) des Modulators, als unwahrscheinlich angesehen werden. Denkbar erscheint jedoch das Vordringen des Enzyms in die dermalen Schichten der Haut über die folliculäre Route, wobei dann eine Wirkungsentfaltung des Enzyms erfolgen könnte (Abb. 6-14). Zur vollständigen Klärung dieser Hypothese sind jedoch Untersuchungen zur Eigenpenetration des Enzyms notwendig, die bis zum heutigen Zeitpunkt aus analytischen Gründen noch nicht durchführbar waren.

6.3.3 Harnstoffhaltige O/W-Emulsionen

Ergebnisse

Stratum corneum

Durch die Modifizierung der O/W-Emulsion mit 10% Harnstoff einerseits und der zusätzlichen Addition von Hyaluronidase andererseits, konnten im Stratum corneum veränderte Wirkstoffmengen gemessen werden. So bildeten sich in der Initialphase der Wirkstoffpenetration in der Hornschicht signifikant erhöhte Wirkstoffdepots aus (Abb. 6-18 und Abb. A. 9), wobei die reine Harnstoffformulierung *U O/W* mit über 8 nmol/mm³ mehr Biotin einbringen konnte als das kombinierte Vehikel *U O/W H 2* (~ 5 nmol/mm³). Nach 300 min Einwirkzeit sank die Transportleistung von *U O/W* geringfügig unter die von *U O/W H 2* ab, wobei sich die Verteilung von Biotin im Stratum corneum nur in den oberen Abrissen unterschied (Abb. A. 10).

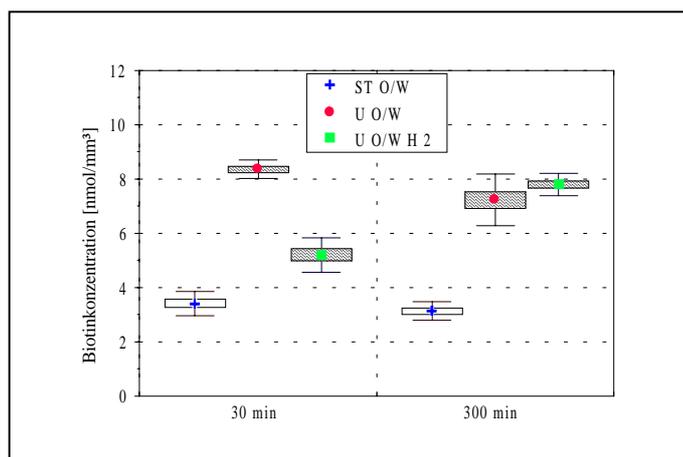


Abb. 6-18 Penetration von Biotin aus modifizierten O/W-Vehikeln in humane Haut ex vivo im Vergleich zum O/W-Standard (Stratum corneum) ($p \leq 0,05$; $n = 9$)

Epidermis

Die in den epidermalen Hautschichten ermittelten Biotinkonzentrationen waren vom Einfluß der modulierten Vehikel dominiert (Abb. 6-19).

Wie schon in der Hornschicht konnten auch hier durch den Einsatz des harnstoffhaltigen Vehikels *U O/W* zu beiden Versuchszeiten signifikant erhöhte Wirkstoffkonzentration nachgewiesen werden. Diese lagen nach 30 min bei ca. 0,018 nmol/mm³ ($1,8 \cdot 10^{-5}$ mol/l) und nach 300 min bei 0,012 nmol/mm³ ($1,2 \cdot 10^{-5}$ mol/l) über dem W/O-Standard mit ca. 0,007 nmol/mm³ ($0,7 \cdot 10^{-5}$ mol/l). Die Kombination beider Modulatoren erbrachte erst nach 300 min (Abb. 6-19) den erwünschten Steigerungseffekt auf ca. 0,015 nmol/mm³ ($1,5 \cdot 10^{-5}$ mol/l), während initial (Abb. A. 9) ein Rückgang des Penetrationsausmaßes meßbar war.

Dermis

In Analogie zur Epidermis (Abb. 6-19) ließen sich auch in der Dermis nach 30 min mit dem harnstoffhaltigen Vehikel *U O/W* die höchsten Biotinmengen bestimmen (Abb. 6-20 und Abb. A. 9). Dieser Wirkstoffspiegel (um 0,002 nmol/mm³) blieb auch nach verlängerter Applikationsdauer erhalten.

Die Kombination von Harnstoff und Hyaluronidase im Vehikel *U O/W H 2* führte zum verzögerten Anstieg der Biotinkonzentrationen nach prolongierter Applikationsdauer. Das Penetrationsausmaß von *U O/W* wurde dabei nicht erreicht.

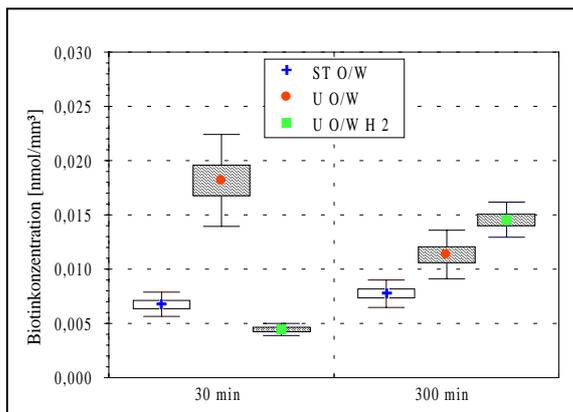


Abb. 6-19 Penetration von Biotin aus modifizierten O/W-Vehikeln in humane Haut ex vivo im Vergleich zum O/W-Standard (Epidermis) ($p \leq 0,05$; $n = 9$)

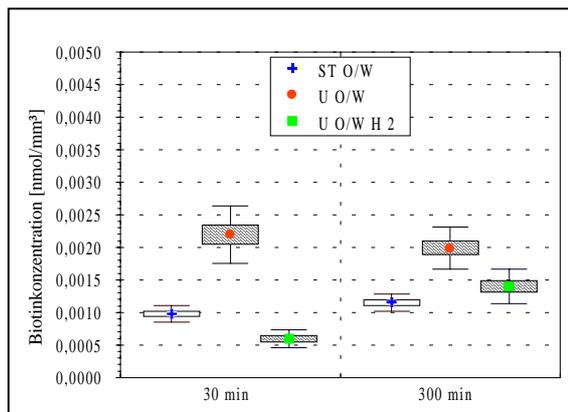


Abb. 6-20 Penetration von Biotin aus modifizierten O/W-Vehikeln in humane Haut ex vivo im Vergleich zum O/W-Standard (Dermis) ($p \leq 0,05$; $n = 9$)

Diskussion

Die Modifikation der O/W-Emulsion mit 10% Harnstoff wirkte sich besonders *initial* begünstigend auf das Penetrationsverhalten von Biotin aus. Dieses Resultat steht im engen Zusammenhang mit der Eigenpenetration des Modulators (Abb. 6-24). Für die Begründung des Mechanismus lassen sich mehrere Einflüsse des Moleküls diskutieren. Wie von WOHLRAB ermittelt, konnten harnstoffhaltige

hydrophile Vehikel die Wasserbindungskapazität der Hornschicht kurzzeitig erhöhen und demzufolge für erleichterte Penetrationsbedingungen sorgen (1988). Weiterhin ist Harnstoff für seine brechende Wirkung auf hydrophobe Bindungen und Mizellstrukturen bekannt (Davis, 1971), die in Verbindung mit der Degradierung der interzellulären Bilayerstruktur gebracht werden kann.

Insgesamt eignet sich die Anwendung von O/W-Vehikeln mit 10% Harnstoff für den Bedarf initial hoher epidermaler Biotinkonzentrationen (Abb. 6-19).

Bei der Untersuchung der Kombinationsvehikel mit Harnstoff und Hyaluronidase blieb nach kurzer Einwirkzeit der erwartete synergistische Effekt beider Modulatoren aus. Im Gegensatz zum Penetrationsschub der reinen hyaluronidasehaltigen Formulierung *H 2 O/W* trat epidermal ein Rückgang des Biotintransportes auf. Eine Ursache dafür könnte in der Coapplikation von hydrophilem Wirkstoff und hydrophilem Modulator liegen, wobei in Anwesenheit des Enzyms die Penetration von Harnstoff bevorzugt beschleunigt wurde (Vergleich Abb. 6-19 und Abb. 6-25). Aus der fortschreitenden Harnstoffpenetration unter Einwirkung der Hyaluronidase resultierend, läßt sich die Zunahme der epidermalen Biotinmengen nach verlängerter Applikationsdauer erklären.

6.3.4 Harnstoffhaltige W/O-Emulsionen

Wie schon bei den Untersuchungen zum Einfluß von Hyaluronidase auf den Biotintransport wurden ebenfalls für die harnstoffhaltigen Formulierungen Abhängigkeiten von der verwendeten Grundlage überprüft. Dabei sollten aus der Literatur bekannte spezifische Effekte der Harnstoffwirkung auf die Penetration von Biotin ausgenutzt werden (Wohlrab, 1990a).

Ergebnisse

Stratum corneum

Wie in Abb. 6-21 ersichtlich, traten trotz Modifikation des W/O-Vehikels ST W/O mit Harnstoff und dem Enzym nur geringfügige, jedoch signifikante Veränderungen der Wirkstoffpenetration auf. Insgesamt war nur eine schwache Ausprägung der Wirkstoffdepots in der Hornschicht zu bestimmen (unter 4 nmol/mm³).

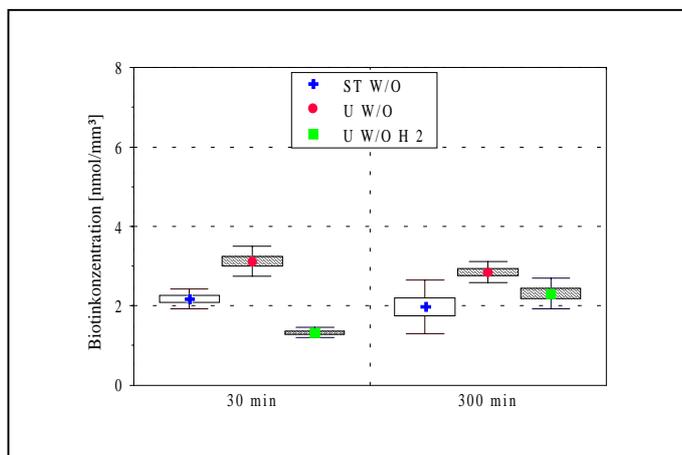


Abb. 6-21 Penetration von Biotin aus modifizierten W/O-Vehikeln in humane Haut ex vivo im Vergleich zum W/O-Standard (Stratum corneum) ($p \leq 0,05$; $n = 3$)

Die Formulierung *U W/O* mit 10% Harnstoff bewirkte sowohl nach 30 als auch nach 300 min eine signifikante Steigerung der Biotinpenetration (Abb. 6-21), wie sie ebenfalls sichtbar aus den Verteilungsprofilen in den Abb. A. 11 und Abb. A. 12 hervorgeht. Erst mit fortgeschrittener Applikationsdauer trat die penetrationsfördernde Wirkung des mit Hyaluronidase versetzten Vehikels *U W/O H 2* ein.

Epidermis

Die in Abb. 6-22 dargestellten epidermal determinierten Konzentrationen an Biotin lassen eine Verbindung zu den bereits beschriebenen Verhältnissen im Stratum corneum (Abb. 6-21) erkennen. Aus dem Zusatz von 10% Harnstoff zum W/O-Standard resultierte eine Erhöhung der eingebrachten Biotinmengen, die vermehrt in den oberen Schichten der lebenden Epidermis lokalisiert werden konnte (Abb. A. 11 und Abb. A. 12). Das kombinierte Vehikel *U W/O H 2* zeigte im Vergleich zu *U W/O* eine verzögerte Penetrationscharakteristik.

Dermis

Der dermale Transport des Vitamins konnte nicht durch die Modulatoren gesteigert werden (Abb. 6-23). Das Penetrationsausmaß von *U W/O* bewegt sich auf dem Niveau des Vergleichsvehikels *ST W/O*, während die Addition von Hyaluronidase in *U W/O H 2* eine verschlechterte Penetration in die Tiefe verursachte.

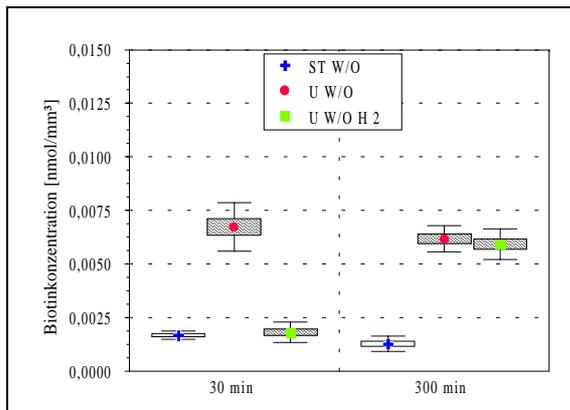


Abb. 6-22 Penetration von Biotin aus modifizierten W/O-Vehikeln in humane Haut ex vivo im Vergleich zum W/O-Standard (Epidermis) ($p \leq 0,05$; $n = 9$)

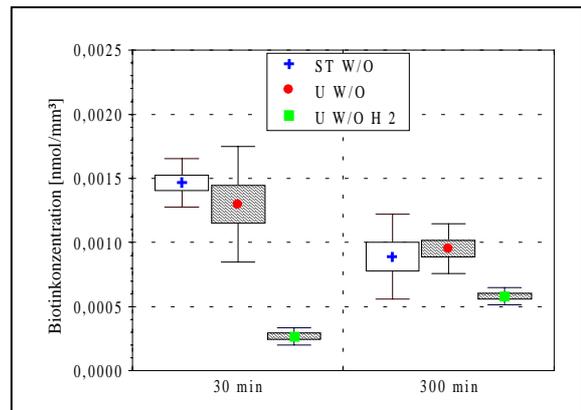


Abb. 6-23 Penetration von Biotin aus modifizierten W/O-Vehikeln in humane Haut ex vivo im Vergleich zum W/O-Standard (Dermis) ($p \leq 0,05$; $n = 9$)

Diskussion

Nach Beurteilung der Liberationsergebnisse (Abb. 5-6), die bei Zusatz von Harnstoff und Hyaluronidase vor allem im Kurzzeitbereich in gleichem Maße eine Verringerung der Biotinfreisetzung erkennen ließen, wurde zunächst eine Verschlechterung der Penetration vermutet. Diese Annahme traf allein im Falle des kombinierten Vehikels *U W/O H 2* zu.

In Analogie zur Biotinpenetration aus der harnstoffhaltigen O/W-Emulsion (*U O/W*) erbrachte der Harnstoffzusatz zu beiden Untersuchungszeiten einen penetrationsfördernden Effekt. Vergleicht man jedoch die Absolutwerte in den einzelnen Hautschichten, so fällt klar die Überlegenheit der hydrophileren O/W-Vehikel auf.

Entgegen früheren Untersuchungen von WOHLRAB, der nach 300 min für Hydrokortison eine höhere epidermale Penetration aus einer W/O-Emulsion (Unguentum Alcoholum Lanae aquosum AB-DDR, ähnliche Zusammensetzung ST W/O) beobachtete, konnte für Biotin keine verzögerte und intensivere Einwirkung nach Applikation des lipophileren Vehikels (*U W/O*) gefunden werden (Wohlrab, 1990b). Hinzu kommt, daß alle mit Harnstoff versetzten W/O-Vehikel zu keinem Zeitpunkt der Gehaltsbestimmung die entscheidende epidermale Wirkkonzentration (10^{-5} mol/l) für die Biotinwirkung realisieren konnten.

Zieht man die Eigenpenetration des Modulators Harnstoff aus W/O-Emulsionen hinzu (Abb. 6-24), so fällt diese initial im Stratum corneum nur ca. halb so stark aus wie die aus den O/W-Systemen. Demzufolge konnte auch der Wirkstofftransport nur bedingt durch die Einflüsse von Harnstoff gefördert werden. Ebenso bewirkte die Coapplikation von Hyaluronidase einen bevorzugten Harnstofftransport in die lebenden Hautschichten, der zum Nachteil der Biotinpenetration ausfiel.

6.3.4.1 Eigenpenetration des Modulators Harnstoff in humane Haut ex vivo

Neben der Erfassung der penetrierten Mengen an Biotin diente die Charakterisierung der Eigenpenetration des verwendeten Modulators Harnstoff zur Vervollständigung der Analyse von Wechselwirkungen zwischen Modulator, Arzneistoff und dem Erfolgsorgan Haut. Dazu galt es, die penetrierten Harnstoffmengen aus den biotinhaltigen Emulsionen einmal unter Zusatz von 10% Harnstoff (*U O/W* und *U W/O*) und weiterhin nach ergänzender Einarbeitung von niedrigen Mengen an Hyaluronidase (2.500 IE/cm²) zu ermitteln.

Ergebnisse

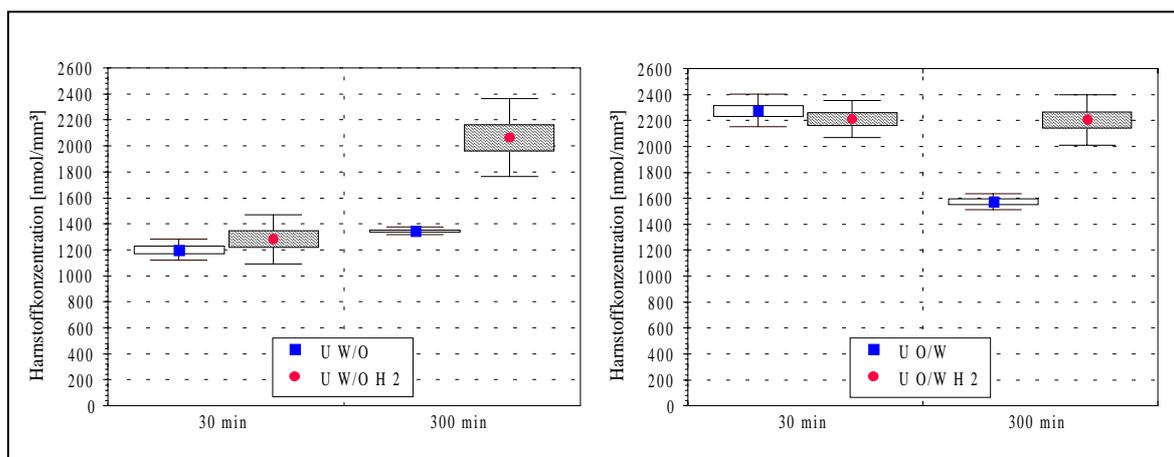


Abb. 6-24 Penetration von Harnstoff aus biotinhaltigen Vehikeln in humane Haut ex vivo (Stratum corneum) ($p \leq 0,05$, $n = 3$)

Stratum corneum

Nach einer Applikationsdauer von 30 min zeigten sich, je nach verwendeter Vehikelgrundlage, Unterschiede im Ausmaß der Modulatorpenetration (Abb. A. 13). So lagen die Harnstoffkonzentrationen im Stratum corneum bei der Verwendung der hydrophileren O/W-Vehikel auf einem ca. doppelt so hohen Niveau wie die aus den W/O-Systemen (Abb. 6-24).

Der zeitliche Verlauf der Penetration von Harnstoff aus den reinen Harnstoffemulsionen wies ein gegenläufiges Profil auf. Während die Harnstoffpenetration aus dem Vehikel *U W/O* von 30 min nach 300 min als gesteigert erfaßt wurde, sank sie bei Applikation von *U O/W*. Die Absolutwerte der Harnstoffpenetration aus *U W/O* lagen jedoch unterhalb von denen aus dem hydrophileren Vehikel *U O/W*. Außergewöhnlich und nicht den Gesetzmäßigkeiten der Diffusion folgend, erschien die Verteilung von Harnstoff nach verlängerter Penetrationszeit. Hier konnten nach Applikation beider Emulsionen Anreicherungen in den mittleren Hornlagen (Abrisse 8-14) determiniert werden (Abb. A. 14).

Die Einarbeitung von Hyaluronidase in die Emulsionen führte erst nach prolongierter Einwirkdauer (300 min) zu Veränderungen der Harnstoffpenetration. Innerhalb der W/O-Vehikel erbrachte die hyaluronidasehaltige Formulierung (*U W/O H 2*) nach 300 min eine Erhöhung des Penetrationsausmaßes. Bei Applikation des Vehikels *U O/W H 2* waren die Konzentrationen nach 30 und 300 min ohne Unterschied und auf gleichem Niveau wie nach Verwendung der W/O-Emulsion *U W/O H 2*.

Epidermis

Die in Abb. 6-25 dargestellten Resultate beschreiben die Vehikel- und Zeitabhängigkeit der Harnstoffpenetration in humane Haut ex vivo aus unterschiedlichen Emulsionstypen.

Während die Penetration des Modulators in die epidermalen Schichten der Haut aus der reinen Harnstoffformulierung *U O/W* im zeitlichen Verlauf der Penetration nur einen sehr geringen Unterschied aufwies, erhöhte sich bei Anwendung des Vehikels *U W/O* nach 300 min die Konzentration um das Doppelte auf ca. 4,5 nmol/mm³.

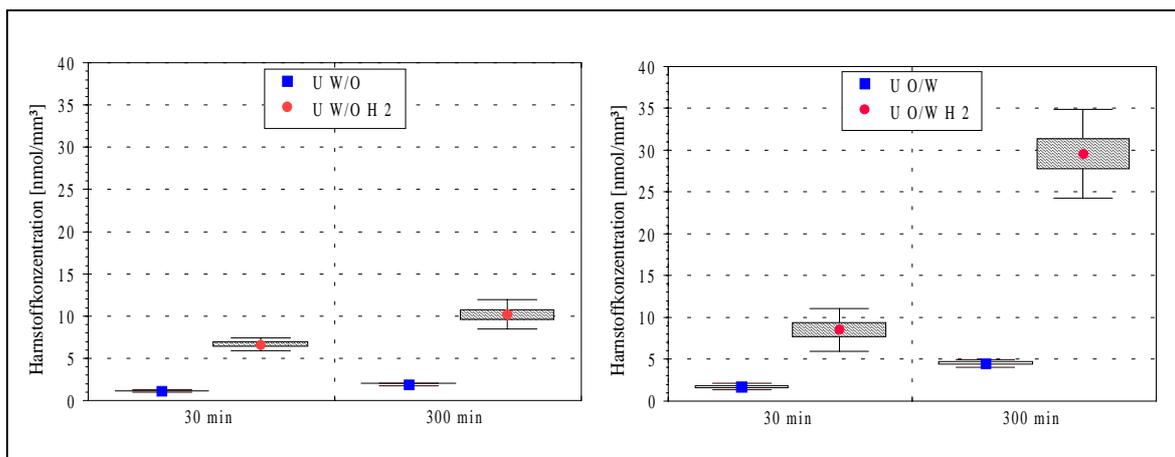


Abb. 6-25 Penetration von Harnstoff aus biotinhaltenen Vehikeln in humane Haut ex vivo (Epidermis) ($p \leq 0,05$, $n = 9$)

Für beide untersuchten Emulsionstypen konnte nach Einarbeitung von Hyaluronidase (2.500 IE/cm²) ein Einfluß auf die Modulatorpenetration nachgewiesen werden (Abb. A. 13, Abb. A. 14). Bereits nach einer Applikationsdauer von 30 min waren Steigerungen der Harnstoffkonzentration sichtbar, wobei mit dem O/W-Vehikel *U O/W H 2* erhöhte Absolutwerte erzielt wurden (ca. 8 nmol/mm³). Der Prozeß der Konzentrationssteigerung unter Einfluß des Enzyms setzte sich mit zunehmender Applikationsdauer fort. Dabei lag eine Erhöhung der ermittelten Konzentration nach 300 min für die Vehikel *U W/O H 2* (ca. 10 nmol/mm³) und *U O/W H 2* (ca. 30 nmol/mm³) um den Faktor 3 vor.

Dermis

In den tieferen Schichten der Haut konnten, wie in Abb. 6-26 dargestellt, Unterschiede im Ausmaß der Penetration des Modulators ermittelt werden, die in Analogie zu den epidermal bestimmten Konzentrationen vom eingesetzten Vehikel dominiert wurden. Betrachtet man jedoch die quantifizierten Substanzmengen an Harnstoff, so wird das Gefälle von epidermaler Konzentration zu dermalen Konzentration deutlich (Abb. 6-25, bis zu zehnfach höhere Mengen).

Absolut gesehen fiel die Penetration von Harnstoff aus den Vehikeln *U W/O* und *U O/W* nach 30 min nur gering aus (unter 0,5 nmol/mm³). Beim lipophileren Vehikel *U W/O* setzte sich dieses Verhalten auch nach verlängerter Applikationsdauer fort, während durch *U O/W* eine dreifach höhere Menge an Harnstoff in die dermalen Hautschichten eingebracht werden konnte.

Über den gesamten Untersuchungszeitraum ließen sich signifikante Anstiege nach Applikation der hyaluronidasehaltigen Emulsionen (*U W/O H 2* und *U O/W H 2*) erkennen, die ebenso innerhalb der unterschiedlichen Verteilungsprofile in den Abb. A. 13 und Abb. A. 14 zum Ausdruck kommen.

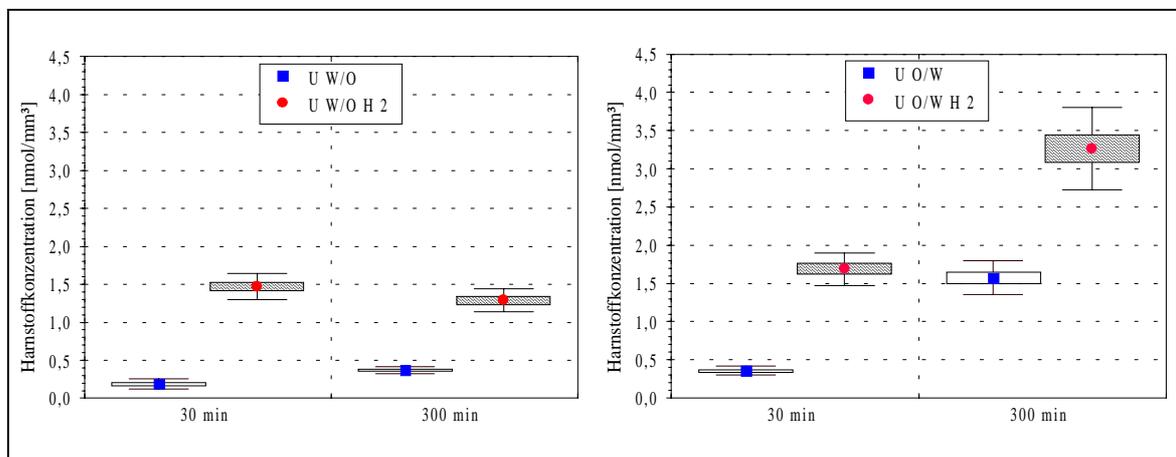


Abb. 6-26 Penetration von Harnstoff aus biotinhaltigen Vehikeln in humane Haut ex vivo (Dermis) ($p \leq 0,05$, $n = 9$)

Diskussion

Die Harnstoffpenetration aus den untersuchten Biotinvehikeln wurde bereits im Zusammenhang mit der Wirkstoffpenetration in den Kap. 6.3.3 und 6.3.4 diskutiert. Daneben lassen sich jedoch die vorliegenden Resultate unter dem Aspekt der möglichen physiologischen Eigenwirkung von Harnstoff (Kap. 2.4.2) betrachten, wobei innerhalb der lebenden Epidermis antiproliferative Effekte

auf den Keratinozyten erst bei lokalen Konzentrationen im mmol-Bereich zu erwarten sind (Wohlrab, 1998).

Wie schon für den hydrophilen Wirkstoff Biotin nachgewiesen (Kap. 6.3.1 und 6.3.2), führte auch im Falle der Harnstoffpenetration die Addition von Hyaluronidase (2.500 IE/cm²) zu veränderten Penetrationsprofilen. So erscheint eine Modifikation der Standardemulsionen ST O/W und ST W/O angebracht, um einerseits die Depotwirkung in der Hornschicht nach prolongierter Applikationsdauer zu erhöhen (Abb. 6-24) und andererseits den epidermalen Transport von Harnstoff (Abb. 6-25) zu beschleunigen.

7 ZUSAMMENFASSUNG

7.1 In vitro-Untersuchungen zum Einfluß von Biotin auf humane Keratinozyten

Die unvollständige Kenntnislage über das Verhalten des lebenden Keratinozyten unter Einfluß von Biotin führte trotz sichtbarer Erfolge nach langzeitiger oraler Anwendung (Kap. 2.5) zu einer kritischen, teils reservierten Haltung der Dermatologen gegenüber dem therapeutischen Einsatz des Vitamins.

Ziel der vorliegenden in vitro-Untersuchungen war es, mögliche Wirkungen des Biotins auf den humanen Keratinozyten zu prüfen. Dabei konnte ein umfassendes Methodenspektrum ausgeschöpft werden, um spezifischen, teils widersprüchlichen Aussagen der Fachliteratur über das Wachstumsverhalten von Keratinozyten unter Biotineinfluß nachzugehen. Nach den vorliegenden Befunden lassen sich folgende Aussagen zur Wirkung von Biotin auf den humanen Keratinozyten treffen:

1. Die Charakterisierung des *Proliferationsverhaltens* der Zellen unter Biotineinfluß ergab *keinerlei Anhaltspunkte für einen Eingriff des Vitamins* in regulierende Prozesse des Wachstums bzw. Anhaltspunkte für eine toxische Wirkung. Im Bereich von 10^{-7} - 10^{-3} mol/l Biotin kann bis zu 96 h Einwirkdauer von einer *positiven Toleranz* des Keratinozyten ausgegangen werden.
2. Weiterführend läßt sich nach den erhaltenen Resultaten aus den Untersuchungen zum intrazellulären Calciumgehalt und der Involucrinexpression die *Differenzierung bzw. Keratinisierung des Keratinozyten* von der Basalzelle hin zum Corneozyten als *frei vom Einfluß des Biotins* bewerten.
3. In Analogie zur Unabhängigkeit der Differenzierungsvorgänge vom Biotinstatus stehen die Ergebnisse der Untersuchungen zur Apoptose nach Biotinapplikation. So ließen sich die durch Fettsäuren induzierten, *apoptotischen Vorgänge* im Keratinozyten *nicht durch eine prophylaktische Vorinkubation verhindern*. Ebenso war *kein* denkbarer *regulativer Eingriff* in den Ablauf des Zelltodes *nachweisbar*.
4. Als ein wesentlicher Befund der in vitro-Untersuchungen kann das *veränderte Fettsäuremuster der Keratinozyten* nach Wachstum in *mit Biotin* angereichertem Medium (10^{-5} bis 10^{-3} mol/l, eingeordnet werden. Eine Ursache dafür dürfte im Zusammenhang mit der bekannten Wirkung des Vitamins als Coenzym der Acetyl-CoA-Carboxylase stehen, wobei die Prüfung der direkten Wirkung von gesteigerten Biotindosen auf die Induktion der zytosolischen Carboxylase noch aussteht. Gesichert gilt die *Steigerung* des gesamten Fettsäuregehaltes der humanen Keratinozyten (HaCaT und native) an *Myristin-, Palmitin-, Stearin- und Ölsäure*, wogegen die *Linol-säure unverändert synthetisiert* wird. Ebenso wirkte sich die Mediumkonzentration an Biotin unterschiedlich stark fördernd auf die Syntheseleistung aus (Abb. 3-9 und Abb. 3-10). Insgesamt lassen sich durch die ermittelten Veränderungen im Lipidhaushalt der Zellen mögliche Auswirkungen auf die Struktur und Funktion der gesamten Epidermis vermuten.

7.2 Untersuchungen zur Liberation von Biotin in artifizielle Lipidmembranen

Die in vitro-Liberationsuntersuchungen von Biotin wurden am Mehrschichtmembranmodell (MSMM) nach FÜRST UND NEUBERT unter Auswahl eines geeigneten hydrophilen Akzeptormediums in Form von künstlichen Membranen vorgenommen. Unter Zuhilfenahme dieser Versuchsanordnung konnte die Liberation des Wirkstoffs aus flüssigen kolloidalen Trägersystemen und den halbfesten Formulierungen der verschiedenen Emulsionstypen charakterisiert werden. Für die untersuchten kolloidalen Trägersystem lassen sich folgende Ergebnisse resümieren:

1. Das *Liberationsverhalten* von Biotin aus den STA-Partikeln war von der *Oberflächenladung* der Partikel *dominiert*, wobei die *Freisetzung aus SDS-Partikeln gegenüber den BA-Partikeln erleichtert* vollzogen wurde.
2. Während die *liposomalen Suspensionen* zu einer *Steigerung der Wirkstoffliberation* im Vergleich zur *O/W-Emulsion* in der Lage waren, führte die Verwendung der *Mikroemulsionen* zum *Rückgang*. Einerseits erzielte die *Modifikation mit Cholesterol im liposomalen Vehikel keine Veränderung* der Liberation, andererseits innerhalb der *Mikroemulsion* mit steigendem Cholesterolgehalt eine weitere *Retardierung*.

Die Charakterisierung des *Liberationsverhaltens* des hydrophilen Wirkstoffs aus den unterschiedlichen Emulsionstypen sowie deren Modifikationen mit Harnstoff und Hyaluronidase erbrachte eine *deutliche Abhängigkeit von der verwendeten Grundlage* des Vehikels. So können die Resultate wie folgt zusammengefaßt werden:

1. Die Applikation einer *O/W-Emulsion* ließ eine *ca. vierfach erhöhte Liberation* von Biotin im Vergleich zur *W/O-Emulsion* zu.
2. Innerhalb der *O/W-Emulsion* ist eine Modifikation mit *geringer Hyaluronidasemenge* (2.500 IE/cm²) *empfehlenswert*, da sie im Gegensatz zum hohen Modulatoranteil (10.000 IE/cm²) die *Liberation* bis 300 min nach Auftrag *nicht* in Form einer Retardierung *verändert*. Analog dazu kann die Freigabe nach Einarbeitung von *10% Harnstoff* als *gleichwertig zum Standard* gewertet werden.
3. Das ungünstige *Liberationsverhalten* für Biotin aus der *W/O-Emulsion* konnte auch *nach Vehikelmodulation nicht im positiven Sinne beeinflusst* werden. Zur initialen Untersuchungszeit (30 min) befanden sich bei allen modifizierten Vehikeln noch über 95% an Wirkstoff in der Grundlage. Nur mit Verzögerung erreichten das harnstoffmodifizierte und das Vehikel mit geringerer Hyaluronidasemenge (2.500 IE/cm²) das Ausmaß des W/O-Standards. Aus der Emulsion mit hohem Enzymanteil (10.000 IE/cm²) wurden, absolut betrachtet, die geringsten Wirkstoffanteile liberiert.

7.3 Untersuchungen zur Penetration von Biotin in humane Haut ex vivo

Das Interesse an der topischen Applikation von Biotin gründete sich vorwiegend auf die Möglichkeit der regenerativen Beeinflussung von altersbedingten Hautveränderungen. Dabei wurde dem Biotin eine Auswirkung auf die Fältchenausprägung der Haut zugesprochen, ohne die mechanistische Grundlage dieser Wirkung zu kennen.

Nach dem Vorliegen der Ergebnisse zum Einfluß von Biotin auf die Fettsäuresynthese stand die Aufgabe, geeignete Vehikel für diesen hydrophilen Problemarzneistoff zu entwickeln und eine Anreicherung von effektiven Konzentrationen ($\geq 10^{-5}$ mol/l) im epidermalen Gewebe anzureichern. Zunächst erfolgte dazu die Charakterisierung der Transportfähigkeit von Biotin in die Epidermis humaner Haut ex vivo unter Verwendung unterschiedlicher kolloidaler Trägersysteme im Vergleich zur hydrophilen O/W-Emulsion.

1. Obwohl die *partikulären Systeme* in Abhängigkeit ihrer Oberflächenladung zur Ausprägung erhöhter Biotindepots in der Hornschicht führten, erwies sich ihre *epidermale Penetrationskraft* als *unzureichend*.
2. Die Applikation der *Liposomen* erbrachte im Absolutmaßstab die *höchsten Depots* im *Stratum corneum*, wobei die Cholesterolmodifikation in einer verzögerten Anflutung resultierte. Die *epidermale Wirksamkeit* kann jedoch erst *nach prolongierter Einwirkdauer* gewährleistet werden.
3. Der Einsatz der modifizierten *Mikroemulsionen* erscheint *besonders effektiv* bei einem *Cholesterolgehalt von 5%* für den Biotintransport geeignet. Schon nach kurzer Applikationsdauer (30 min) war die epidermal erforderliche Wirkkonzentration erreicht. Dieser Zustand wurde ebenfalls nach verlängerter Penetrationszeit aufrechterhalten.

Neben den kolloidalen Trägersystemen wurde das Penetrationsverhalten von Biotin aus gebräuchlichen Emulsionen (Wasserhaltige Wollwachsalkoholsalbe nach DAB 9 und Wasserhaltige Hydrophile Salbe nach DAB 10) und deren Modifikationen mit Hyaluronidase und/oder Harnstoff untersucht.

1. Die *Penetration* von Biotin aus beiden *Standardvehikeln* ist hinsichtlich ihrer epidermal erzielten Konzentration als *unzureichend* einzustufen.
2. Beide eingesetzten *Modulatoren* erwiesen sich als *geeignet*, die *Wirkstoffaufnahme in die Epidermis positiv zu beeinflussen*, wobei das *Ausmaß* des Arzneistofftransportes durch das Stratum corneum in die Epidermis *vom verwendeten Vehikel abhängig* ist.
3. Obwohl sich unter Einsatz einer *modifizierten W/O-Emulsion* ein *penetrationsfördernder Effekt* einstellte, lag die epidermale Konzentration allerdings *erst nach prolongierter Applikationsdauer* oberhalb der erforderlichen minimalen Wirkkonzentration.

4. *Beide Enhancer* erbrachten in der *O/W-Emulsion* im *Kurzzeitbereich* wirksame epidermale Konzentrationsprofile, während sich im *Langzeitversuch* mit einem *hyaluronidasehaltigen Vehikel* deutlich *bessere Effekte* erzielen ließen. Dieser *Sachverhalt* war auch *auf* das entsprechend *modifizierte W/O-Vehikel* übertragbar.
5. Die Frage nach einer *empfehlenswerten Hyaluronidasemenge* läßt sich nach den erhaltenen Resultaten wie folgt beantworten. Unter *Einhaltung gleicher Ausgangsaktivitäten* des Enzyms von 50000 IE/mg gelten Hyaluronidasekonzentrationen von 1,3 - 2,6% (entsprechend einer Aktivität von 2500 - 5000 IE/cm² Applikationsfläche) im Vehikel als ausreichend, um einen penetrationsfördernden Effekt auf das Biotin auszuüben.
6. Die *Kombination beider Modulatoren* in effektiven Konzentrationen führte *initial* zu einer *Verminderung der Wirkstoffpenetration*, die durch den Hyaluronidaseanteil *zugunsten* der *Eigenpenetration des Harnstoff* ausfiel.

8 EXPERIMENTELLER TEIL

8.1 Zellkultur

8.1.1 Herstellung der Biotin-Lösungen

Eine Voraussetzung für die Zugabe von Biotin zum zellulären System war die Ermittlung eines verträglichen Lösungsmittels. Deshalb erfolgte zunächst die Bestimmung der Löslichkeit des Stoffes in verschiedenen Medien (Göbel, 1995). Obwohl die Grundeigenschaften der Substanz eher einen hydrophilen Charakter ausweisen, reichte das Lösungsvermögen von Wasser nicht aus, um ausreichend hohe Mediumkonzentrationen zu erzielen. Durch eine gezielte Variation des pH-Wertes und den Einsatz von Puffersubstanzen konnte jedoch die Löslichkeit erhöht (Tab. 8-1) werden. So wurde durch die Verwendung des *Puffers nach Mc Iloaine* (Mischung aus 14 ml einer 0,1 M Zitronensäuremonohydratlösung und 86 ml einer 0,2 M Dinatriumhydrogenphosphatmonohydratlösung; pH 7,2 überprüft mit pH-Meter) eine ausreichende Löslichkeit von Biotin erzielt und der pH-Wert an den, des verwendeten Kulturmediums angepaßt.

Tab. 8-1 Löslichkeit von Biotin in verschiedenen Lösungsmitteln (ergänzt nach Göbel, 1995)

Lösungsmittel	pH-Wert	c_s [mg/ml]
Sörensen-Phosphat-Puffer	4,8	$0,35 \pm 0,02$
	5,9	$1,54 \pm 0,03$
	7,2	$6,96 \pm 0,06$
Tris-Puffer nach Gomori	7,2	$1,72 \pm 0,06$
<i>Puffer nach Mc Iloaine</i>	7,2	$17,27 \pm 0,54$
Wasser	7,0	$0,220 \pm 0,01$
Ethanol		$0,817 \pm 0,02$

8.1.2 Kulturbedingungen humaner Keratinozyten (HaCaT, native Keratinozyten)

Die Gewinnung und die anschließende Kultivierung der nativen humanen Keratinozyten aus neonatalem Vorhautgewebe erfolgte nach der Vorschrift von GIBCO BRL Life Technologies (Eggenstein, BRD).

Die Kultivierung der HaCaT-Keratinozyten wurde in Gibco's Keratinocyte Serum Free Medium (SFM) unter Zusatz von BPE (25 µg/ml, Rinderhypophysenextrakt) und rEGF (0,1-0,2 ng/ml, Rekombinanter Epidermaler Wachstumsfaktor) in 5%iger CO₂-Atmosphäre (pH 7,2 - 7,4) bei 36,6°C im low calcium-Status (0,09 mM) durchgeführt. Nach einer Kulturdauer von 7 Tagen wurde das Medium aus den Kulturflaschen abgegossen und die Zellen mit PBS-Puffer gewaschen. Die Zugabe von Trypsin (0,05%) mit einer unterstützenden Inkubation über 10 min im Brutschrank diente der Ablösung der adhärennten Zellen vom Boden der Kulturgefäße. Bevor mittels vorsichtigen Turbulierens mit einer Pipette die Herstellung der Zellsuspension begünstigt wurde, konnte durch Zusatz von 1-2 ml Medium die Proteinase inaktiviert werden.

Die Bestimmung der Zellanzahl erfolgte nach Zugabe von 400 µl Thyrode-Eosin-Lösung zu 100 µl Zellsuspension, von der 1-2 Tropfen in eine Fuchs-Rosenthal-Kammer überführt wurden. Es schloß

sich die Zählung der Keratinozyten in fünf von 20 Gruppenquadraten unter einem Lichtmikroskop an. Daraus wurde unter Berücksichtigung des Kammerinhaltes ($\times 1.000$), der Verdünnung (1:5) und des Suspensionsvolumens die Gesamtzahl an Zellen berechnet.

Nach Zentrifugation der verbliebenen Zellsuspension (1.500 rpm - 5 min) wurde der Überstand vorsichtig verworfen. Dem zurückbleibenden Zellpellet wurde nach Aufklopfen soviel Kulturmedium zugesetzt, daß eine definierte Suspension von einer Million Zellen/ml Medium resultierte. Diese Zellsuspension war sowohl Ausgangsmedium für die Stammhaltung bzw. Untersuchungsansätze in Gewebe-Kulturflaschen (1 Million Zellen/20 ml SFM) als auch für die Einsaat in Greiner-Plastekulturplatten mit 24 wells (25.000 Zellen/ml). Für die Durchführung der beschriebenen Experimente kamen HaCaT-Zellen der 24. - 50. Passage bzw. native humane Keratinozyten der 2. - 3. Passage zur Anwendung.

8.1.3 Proliferationsverhalten von Keratinozyten

8.1.3.1 Bestimmung des $^3\text{[H]}$ -Thymidin-Einbaus in die DNA

Am 3. Tag nach Zelleinsaat (HaCaT oder native Keratinozyten in 24 well Greiner-Plastekulturplatten - 25.000 Zellen/ml) erfolgte die Zugabe der Biotinlösungen (20 μl je 1 ml Zellsuspension) Daneben wurden Zellen mit einer medium- und einer lösungsmittelbehandelten Kontrolle kultiviert. Der Untersuchungszeitraum belief sich auf 24 h, 48 h, 72 h und 96 h. Eine Stunde vor Ablauf der Versuchszeit wurde den Zellen 20 μl $^3\text{[H]}$ -Thymidin (0,5 μCi Mediumaktivität) zugesetzt, um anhand des $^3\text{[H]}$ -Thymidin-Einbaus die DNA-Syntheseleistung zu bestimmen. Zum Ablösen der Zellen vom Kulturgefäß wurde der anschließende Erntevorgang am Cell-Harvester durch eine weitere kurzzeitige Inkubation (15 - 20 min) mit 0,05%igem Trypsin unterbrochen. Nach dem vollständigen Ernten unter begleitender durchlichtmikroskopischer Kontrolle befanden sich die losen Zellen in den Filterblättchen des Harvesters. Diese wurden in Szintillationsmeßgefäße überführt, bis zur Trockne aufbewahrt und nach Zugabe des Flüssigkeitsszintillationscocktails im Flüssigkeitsszintillationsmeßgerät vermessen.

8.1.3.2 Durchflußzytometrische Bestimmung der Wachstumsfraktion

Am 3. Tag nach Zelleinsaat der HaCaT-Keratinozyten in Gewebe-Kulturflaschen erfolgte die Zugabe der Biotinlösungen (10^{-4} mol/l Mediumkonzentration). Parallel wurden Zellen mit einer medium- und einer lösungsmittelbehandelten Kontrolle kultiviert. Der Untersuchungszeitraum belief sich auf 24 h, 48 h, und 72 h. Nach Ende der Kulturdauer wurden die Zellen für die Messungen am Durchflußzytometer [5-Parameter-Zellanalyse-Gerät mit simultaner Messung von Vorwärts-Lichtstreuung und 3 Fluoreszenzen; mit luftgekühltem Argonlaser (488 nm); Meßsignalverstärkung linear bzw. logarithmisch; Signalauflösung 1024 Kanäle; Software: Systemsoftware PASCAL 3.22, CellFit-Software Version 2.01.2, Lysys II Vers. 1.1, ChronysTM] mit 1%igem Trypsin von der Gewebe-Kulturflasche (37°C, 20 min) abgelöst und in PBS-Lösung (Phosphat-gepufferte Salzlösung 0,137 M; 8,00 g NaCl, 0,20 g KCl, 1,44 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,20 g KH_2PO_4 ad 1000 ml Aqua dest., pH 7.4 mit NaHCO_3 eingestellt) überführt. Das weitere Vorgehen der Probenvorbereitung verlief nach dem Schema in (Abb. 8-1).

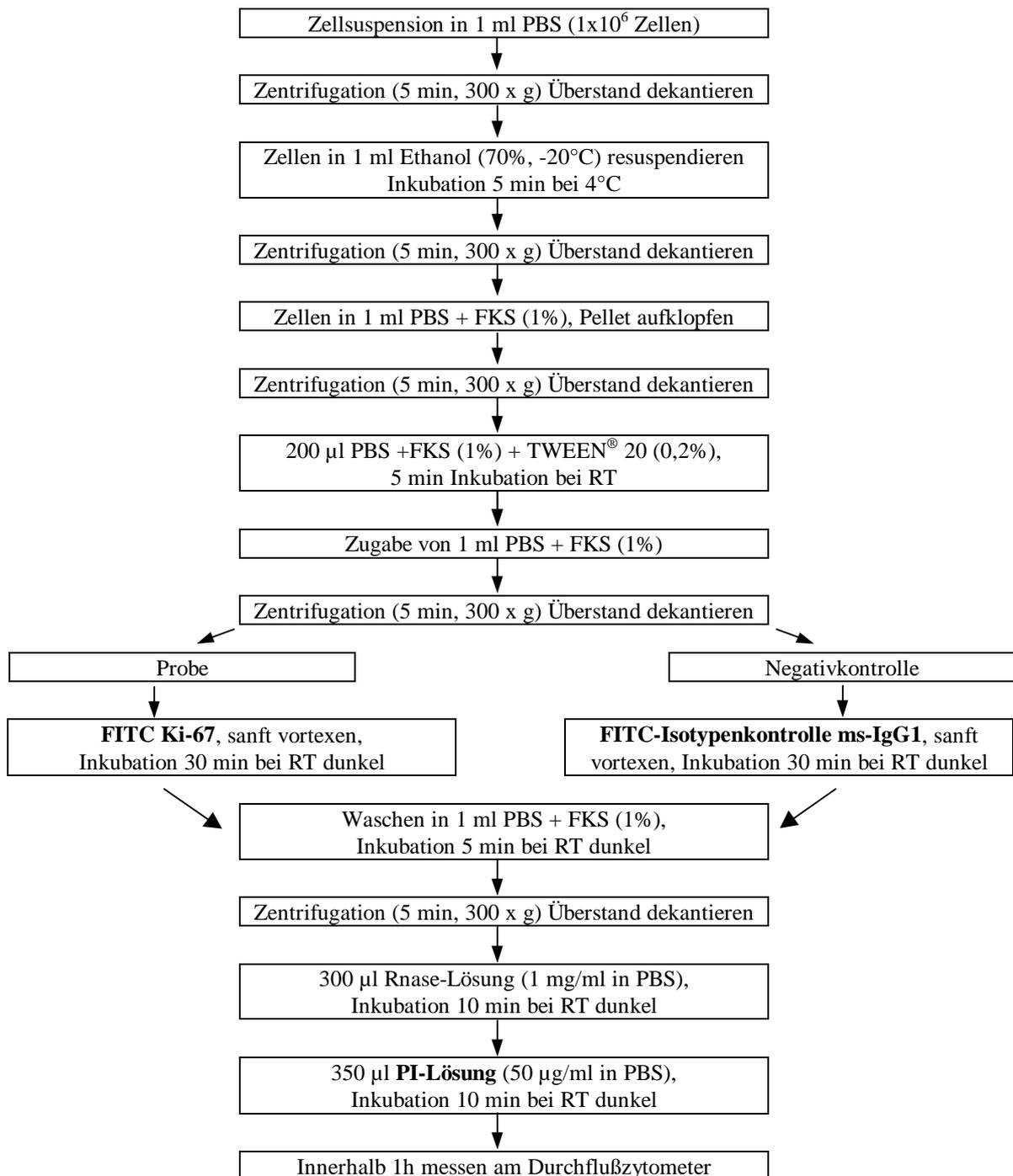


Abb. 8-1 Präparation zum Nachweis von Ki-67 und PI am Durchflußzytometer

8.1.4 Differenzierungsverhalten von Keratinozyten

8.1.4.1 Durchflußzytometrische Bestimmung von Involucrin

Am 6. Tag nach Zelleinsaat der HaCaT-Keratinozyten in Gewebe-Kulturflaschen erfolgte die Zugabe der Biotinlösungen (10^{-6} - 10^{-4} mol/l Mediumkonzentration). Neben einer medium- und einer lösungsmittelbehandelten Kontrolle wurden die Zellen über 48 h mit Biotin inkubiert. Nach Ablauf der Kulturdauer wurden die Zellen für die Messungen am Durchflußzytometer nach folgendem Schema präpariert (Abb. 8-2):

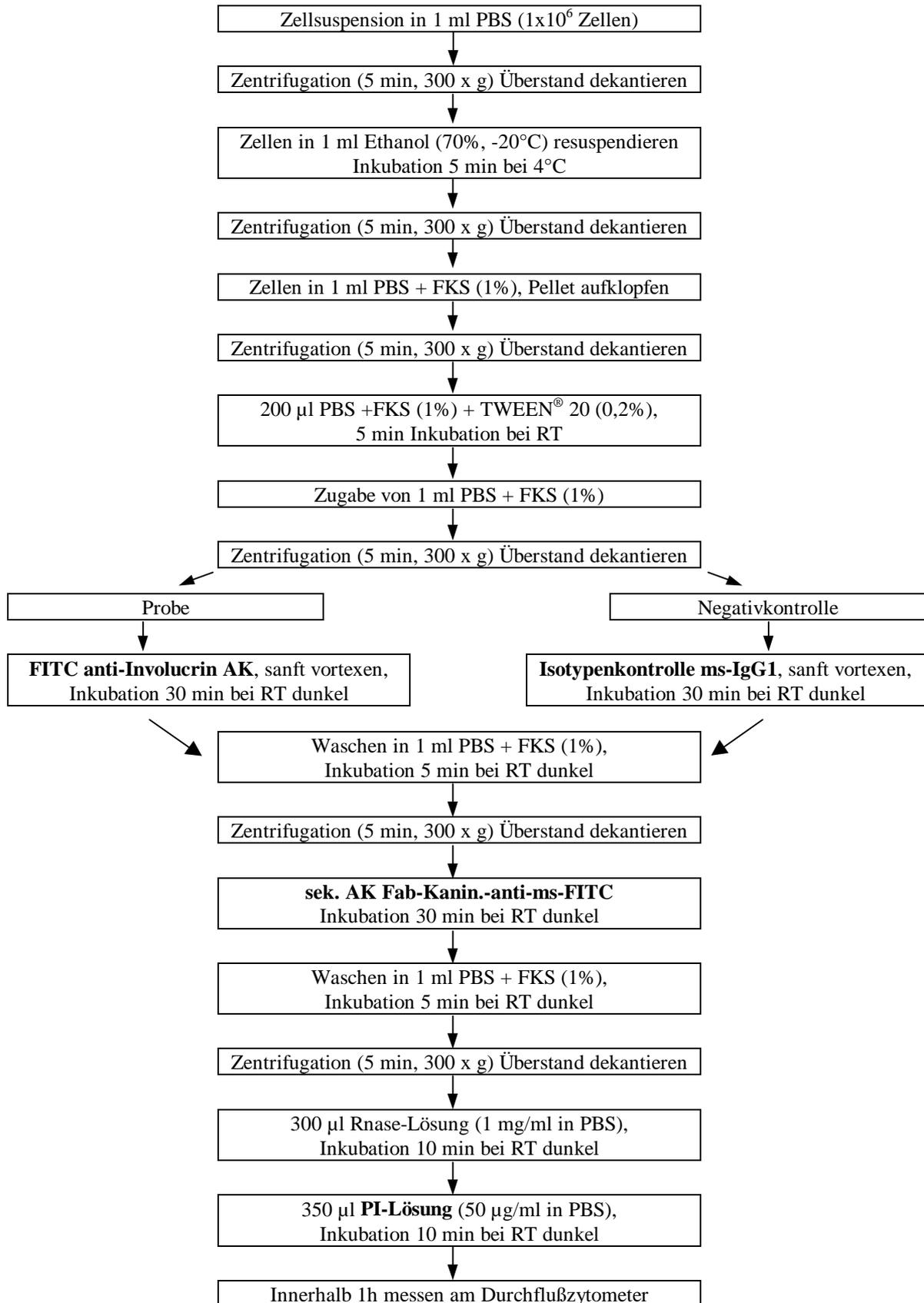


Abb. 8-2 Präparation zum Nachweis von Invulcrin am Durchflußzytometer

8.1.4.2 Durchflußzytometrische Bestimmung der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration

8.1.4.2.1 Ermittlung der Langzeitwirkung

Für die Versuche zur Bestimmung der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration wurde den HaCaT-Zellen am 3. Tag der Kulturdauer Biotin zugegeben (Mediumkonzentration 10⁻⁶ - 10⁻⁴ mol/l, mit Lösungsmittelkontrolle). Die Inkubationszeit der Keratinozyten war auf 24 h, 48 h bzw. 72 h nach Zugabe von Biotin beschränkt. Nach Ende der Kulturdauer wurden die Zellen für die Messungen am Durchflußzytometer mit 1%igem Trypsin von der Gewebe-Kulturflasche (37°C, 20 min) abgelöst und in HBSS-Lösung (145 mM NaCl; 4 mM KCl; 10 mM Glucose; 2 mM MgCl₂; 10 mM HEPES; pH 7,4) überführt.

Die Kalibrierung und Realisierung der Calciummessung am Durchflußzytometer erfolgte nach Vorschrift von FRÖDE (Fröde, 1998). Die Bestimmung des intrazellulären Calciums wurde dabei mit dem calciumempfindlichen Fluorochrom Fluo-3/AM durchgeführt. Entsprechende Stammlösungen von 1 mM Fluo-3/AM in wasserfreiem DMSO und Pluronic F-127 (25 % w/w in wasserfreiem DMSO) wurden hergestellt und bei -20°C aufbewahrt. Die Arbeitslösung (HBSS-Lösung, 39 µM Fluo-3/AM und 5 µl/ml Pluronic F-127) wurde kurz vor Versuchsbeginn hergestellt. Diese wurde als Endkonzentration von 3,5 µM Fluo-3/AM zu den Zellsuspensionen gegeben und bei einer Temperatur von 37°C im Dunkeln für 30 min inkubiert. Nach Zusatz von 12 µg/ml Propidiumiodid (in HBSS-Lösung) wurden die Proben am Durchflußzytometer vermessen.

8.1.4.2.2 Ermittlung der Kurzzeitwirkung

Die unbehandelten HaCaT-Zellen wurden wie in Kap. 8.1.2 kultiviert, am 6. Kulturtag geerntet, danach in HBSS-Lösung überführt und mit Farbstoff Fluo-3/AM beladen (analog zu der Inkubation in Kap. 8.1.4.2.1). Im Anschluß an die Farbstoffbeladung erfolgte die Messung der Kontrolle (Puffer nach Mc Iloaine) und die Zugabe von Biotin (0,5 mmol Endkonzentration), wobei die Lösungen 2 min nach Versuchsbeginn eingespritzt wurden. Die Fluoreszenzintensitäten des Calciumsignals wurden über einen Zeitraum von ca. 10 min als Funktion zur Zeit aufgenommen.

8.1.5 Durchflußzytometrische Bestimmung der Apoptose

Unter Verwendung des Annexin-V-FLUOS Kit wurde die Translokation von Phosphatidylserin als Marker apoptotischer Zellen nachgewiesen. Dazu wurden HaCaT-Zellen gemäß Kapitel 8.1.2 kultiviert. Ab dem 3. Kulturtag erfolgte neben der Kultivierung unbehandelter Zellen die unter Inkubation von 10⁻⁴ mol/l Biotin im Medium. Am 5. Tag der Kulturdauer wurde den Zellen γ -Linolensäure in unterschiedlichen Konzentrationen (0 - 30 µmol im Medium) zugesetzt. Nach weiteren 24 h schloß sich die Ernte der Zellen an (1x10⁶ Zellen, 1 x in PBS gewaschen und für 5 min bei 200 x g zentrifugiert). Das erhaltene Zellpellet wurde mit 100 µl einer Markierungslösung [20 µl Annexin-V-FLUOS ad 1000 µl Inkubationspuffer (10 mM HEPES pH 7,4; 140 mM NaCl; 5 mM CaCl₂) und 20 µl PI (50 µg/ml PI in Inkubationspuffer)] resuspendiert und für 10 - 15 min im Dunkeln inkubiert, mit 400 µl Inkubationspuffer ergänzt und mittels Durchflußzytometrie analysiert.

8.1.6 Durchführung der Untersuchungen zum Lipidstoffwechsel

Sowohl HaCaT-Zellen als auch native humane Keratinozyten wurden, wie in Kap. 8.1.2 beschrieben, in Kulturflaschen (1 Mill. Zellen / 20 ml SFM) kultiviert und am 3.Tag nach Einsaat mit der Biotinlösung (Mediumkonzentration 10^{-7} - 10^{-3} mol/l und Lösungsmittelkontrolle) versetzt. Am 6.Tag erfolgte das Ernten der konfluenten Monolayer und die Probenvorbereitung, wobei einzelne Pellets zu je 3 Mill. Zellen für die Lipidextraktion sowie für die Proteinbestimmung verwendet wurden.

8.1.6.1 Durchführung der Lipid-Extraktion

Die Extraktion der Zellen erfolgte in Anlehnung an die Methode der Lipidextraktion von Bligh und Dyer (1959). Dazu wurde das Zellpellet mit 20 ml eines Lösungsmittelgemisches versetzt (Chloroform und Methanol; 2:1), unter Rühren homogenisiert und 30 min im Dunkeln unter Schütteln extrahiert. Es schloß sich die Filtration (Sterilfilter) und die Einengung des Extraktes (Vakuumsrotationsverdampfer) an. Der Lipidfilm wurde in 4 ml Methanol aufgenommen und der Analytik via GC-MS zugeführt.

8.1.6.2 Bestimmung des Proteingehaltes

Der Proteingehalt der Zellen wurde mit dem Protein Assay Kit nach der Lowry-Methode bestimmt. Nach der Präparation laut Vorschrift zum Kit (P 5656) erfolgte die Messung am Absorptionsreader bei 690 nm.

8.1.6.3 Analytik der Fettsäuren mittels GC-MS

Die extrahierten Lipide der Keratinozyten wurden als methanolische Lösungen der GC-MS-Analytik zugeführt, um die darin enthaltenen Fettsäuren zu quantifizieren. 100 μ l der Lösung wurden mit je 1 μ l 0,2 M Trimethylsulfoniumhydroxid zu Methylestern umgesetzt, um die Verdampfbarkeit zu verbessern.

Gerät	Finnigan MAT Magnum, GC-Varian 3400
Autosampler	Finnigan MAT A 200 S
Detektor (MS)	Iontrap
Ionisierung	Elektronenstoß 70 eV
Kapillarsäule	FFAP, 25 m x 0,25 mm x 0,25 μ m, mit 10 m unbelegter Vorsäule
Injektionsvolumen	1 μ l
Injektionsart	splitless, Splitventilöffnung nach 1 min
Injektionstemperatur	250°C
Temperaturprogramm	60-160°C : 15°C/min 160-240°C : 25°C/min
Quellentemperatur	220°C
Trägergas	Helium, Vordruck 13 psi
Flußrate	40 cm/min
Kalibrierung	Externer Standard (Konzentrationen: 0,02-10 μ g/ml)

8.2 Herstellung und Charakterisierung der Vehikelsysteme

8.2.1 Nanopartikel

Herstellung

In Anlehnung an das von HUSCHKA beschriebene Verfahren zur Herstellung von Nanopartikeln aus Stärkeestern erfolgte die Anfertigung der untersuchten biotinhaltigen Partikelsysteme (Huschka, 1994). Als Trägermaterial kam dabei das halbsynthetische Polymer Stärkeacetat (Sconacell®A) mit einem Substitutionsgrad von 2,45 zum Einsatz. 10 ml einer 1%igen STA-Lösung in Dichlormethan wurden mittels eines Ultra-Turrax Homogenisators T 25 (Dispergierwerkzeug S25N25F) 1 min bei 24.000 U/min mit 20 ml der entsprechenden 0,2%igen wässrigen Emulgatorlösung (BA oder SDS) und 20,1 mg Biotin homogenisiert und anschließend für fünf Minuten im Ultraschall-Bad aufbewahrt. Der entstandenen dünnflüssigen Emulsion konnte danach durch Lösungsmittelextraktion unter Verwendung eines Vakuumrotationsverdampfers im Wasserbad die lipophile Phase (Dichlormethan) entzogen werden. Als Endprodukte lagen nach einem weiteren gelchromatographischen Reinigungsschritt mit PD 10-Columns somit unterschiedlich geladene biotinhaltige Partikelsysteme vor. Diese Partikelsuspensionen wurden physikochemisch charakterisiert und den Untersuchungen zur in vitro-Liberation und anschließenden Penetration in humane Haut ex vivo zugeführt.

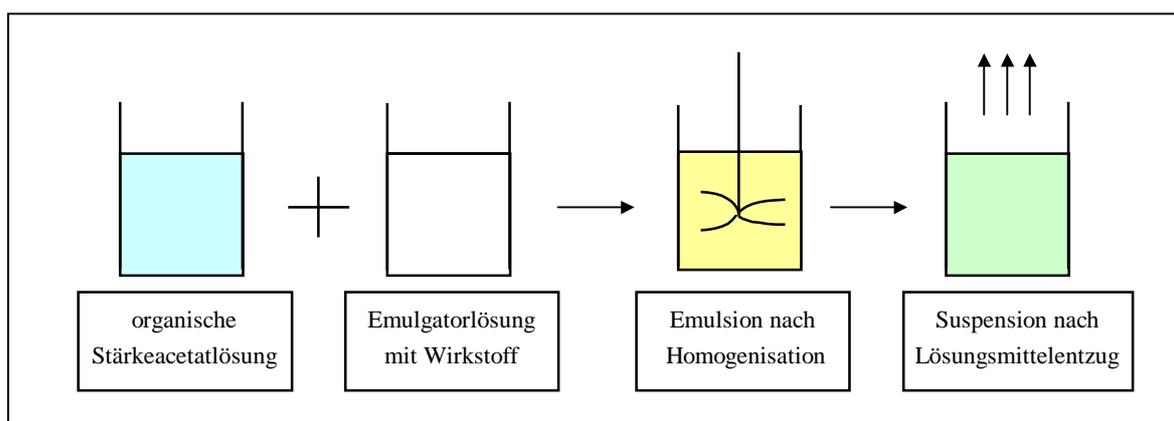


Abb. 8-3 Ablaufschema der Partikelherstellung (solvent evaporation process)

Charakterisierung

Photonenkorrelationspektroskopie

Die Bestimmung der Größenverteilung der Vesikel konnte mittels PCS am Photonenkorrelationspektrometer realisiert werden. Das Meßmedium für die Bestimmung der Teilchengröße war Aqua bidest., welches zusätzlich mit einem Membranfilter 200 nm gereinigt wurde. Dem Wasser wurde solange Partikelsuspension zugetropft, bis die Zählrate (Geräteparameter) im idealen Bereich lag. Die Meßtemperatur lag bei 20°C, wobei die Viskosität von Wasser zugrundegelegt wurde. Die Meßdauer war auf 120 Sekunden eingestellt, was einer Anzahl von zehn Messungen entspricht. Aus drei Durchläufen dieser Meßvorgänge ermittelte der Rechner den Mittelwert der Probe. Dieser wiederum war die Grundlage für die Auswertung und den Vergleich mit weiteren Proben.

Zetapotentialmessung

Meßmedium für die Bestimmung des Zetapotentials war eine 10^{-3} molare wäßrige Kaliumchloridlösung, so daß die Mindestleitfähigkeit für die Messung erreicht war. Dazu wurden die Partikel (10 ml wäßrige Suspension) in einem Maßkolben mit Kaliumchlorid auf die entsprechende Molarität eingestellt. 3-5 ml dieses Probenmaterials dienten als ausreichende Menge, um die Meßzelle des Zetamasters vollständig zu füllen. Dabei sollte das Probenmaterial möglichst langsam eingespritzt werden, um störende Luftblasen in der Meßzelle zu vermeiden.

Die Temperatur bei den durchgeführten Messungen lag bei 25°C. Sie wurde durch ein Thermostat konstant gehalten und vom Zetamaster während der Datenaufnahmen dokumentiert. Die Messung pro Probe war in drei Durchläufe mit je zehn Potentialbestimmungen gegliedert. Der daraus berechnete Mittelwert diente als Grundlage für die Probenauswertung.

Elektronenmikroskopie

Die Untersuchungen zur Strukturaufklärung wurden am Institut für Ultrastrukturforschung der Friedrich-Schiller-Universität Jena von Herrn Prof. Meyer durchgeführt.

Die Präparation der Nanopartsuspensionen erfolgte mit der Gefrierbruchanlage. Dazu wurde die Suspension unter Nutzung der sogenannten Sandwich-Technik mit verflüssigtem Propan eingefroren und bei -130°C gebrochen. Im Anschluß daran erfolgte nach 30 s Ätzdauer die Bedampfung mit Platin (35° Winkel) und Kohle (90° Winkel). Die Betrachtung der mit Ethanol/Chloroform (1:1) abgelösten Präparationen wurde am Elektronenmikroskop durchgeführt.

Für die Erkennung der Oberflächeneigenschaften und der Teilchengröße kam noch eine weitere Präparationstechnik zum Einsatz. Hierbei wurde die Nanopartikelsuspension auf frisch gespaltenen Glimmer aufgebracht, etwas mit Filterpapier abgesaugt und dann luftgetrocknet. Im Vakuum erfolgte dann unter einem Winkel von 30° die Aufdampfung von Platinkohle. Dieser Platinkohle-Abdruck wurde mit Wasser vom Glimmer getrennt, mit Chloroform gewaschen und unter dem Elektronenmikroskop untersucht.

8.2.2 Liposomen

Herstellung

Die Herstellung der liposomalen Vehikel erfolgte unter Nutzung der Dünnfilm-Hydrations-Methode. 20 ml einer 5%igen Phosphatidylcholinlösung (bei Modifikation 1% Cholesterolzusatz) wurde aus einem Rundkolben im Vakuumrotationsverdampfer im Wasserbad vollständig das Lösungsmittel Chloroform entzogen, so daß sich an der Kolbeninnenseite ein blasenfreier Lipidfilm ausbildete. An den Lösungsmittelentzug schloß sich die Extraktion des Lipids mit der biotinhaltigen Pufferlösung nach Mc Iloaine an (20 ml mit 21 mg Biotin). Durch vorsichtiges mechanisches Schütteln im Laborschüttler wurde der Film vollständig vom Kolben abgelöst und danach für 5 min im temperierten (45°C) Ultraschall-Bad belassen. Anschließend wurde durch Zuhilfenahme eines Extruders die Lipiddispersion unter Einwirkung von Stickstoffdruck (30 bar) durch Polycarbonatfilter (Nucleopore®) definierter Porengröße (je zweimal mit 400 nm, 200 nm und 100 nm) extrudiert. In einem abschließenden Reinigungsschritt konnten die Liposomen von nicht eingeschlossenem freien Biotin gelchromatographisch (PD 10-Columns) gereinigt und auf einen Biotingehalt von 0,1% in der

Suspension eingestellt werden. Die Vesikel wurden physikochemisch charakterisiert und den in vitro-Untersuchungen zugeführt.

Charakterisierung

Photonenkorrelationsspektroskopie (PCS)

Die Durchführung der Bestimmung der Größenverteilung der Liposomen innerhalb der wäßrigen Suspensionen erfolgte in Analogie zur Bestimmung der Teilchengröße der Partikel, wie sie in Kap. 8.2.1. beschrieben wurde.

Elektronenmikroskopie

Die elektronenmikroskopische Strukturaufklärung der liposomalen Systeme wurde ebenfalls von Prof. Meyer in Jena durchgeführt. Dabei erfolgte die Präparation der Liposomensuspensionen in Anlehnung an die beschriebene Gefrierbruchmethode in Kap. 8.2.1..

8.2.3 Mikroemulsionen

Herstellung

Das Zusammenfügen der Komponenten der Mikroemulsion (Kap.4.1.3.1) erfolgte unter Kennzeichnung der isotropen Gebiete im nach folgendem Vorgehen erstellten Dreiphasengebiet. Zunächst wurde ein feststehendes Gemisch aus Tensid/Cotensid (2 : 3) und der lipophilen Ölkomponente im Verhältnis (z. B. 20% : 80%) vorgelegt (Abb. 8-4). Daran schloß sich das Zumischen der wäßrigen Pufferphase in 5% Schritten bzw. 2,5% Schritten an. War das entstandene Endprodukt optisch klar, so konnte es vorübergehend als Mikroemulsion interpretiert werden. Zur Prüfung dieser Annahme fügte sich die physikochemische Charakterisierung der Vehikel an.

Bei Einarbeitung des Arzneistoffes wurde dieser in der hydrophilen Phase der Mikroemulsion gelöst. Die Modifikationen mit Cholesterol erfolgten unter Substitution von Isopropylpalmitat.

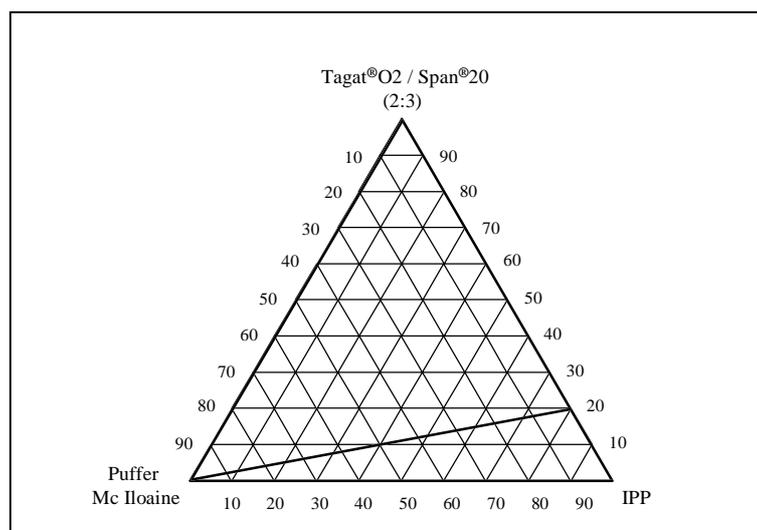


Abb. 8-4 Erstellen des Phasendiagramms nach der Verdünnungsmethode (ausgehend von einem Tensid/Öl-Gemisch - 20% : 80% entstehen entlang der Geraden wasserhaltige Systeme) (Köln, 1986)

Charakterisierung

Polarisationsmikroskop

Die Untersuchungen der Mikroemulsionen auf Isotropie wurden am Polarisationsmikroskop bei 100facher Vergrößerung durchgeführt.

Elektronenmikroskopie

Im Falle der Strukturuntersuchungen der Mikroemulsionen wurde ebenfalls auf die Technik der Gefrierbruch-Elektronenmikroskopie zurückgegriffen, die bereits in Kap. 8.2.1 beschrieben wurde.

Photonenkorrelationsspektroskopie (PCS)

Die Bestimmung der Tröpfchengröße der Mikroemulsionen wurde nach Filtration der Proben durch einen Membranfilter (200 nm) durchgeführt. Nach dem Überführen in die Streulichtküvetten erfolgte die Temperierung auf 25°C und die Vermessung bei einem Winkel von 60°.

Kompakt-Goniometer (ALV)	Winkelbereich 20° bis 150°
Diodengepumpter Nd-YAG Laser (ADLAS)	$\lambda = 532 \text{ nm}$, Leistung 150 mW
Faseroptik (ALV), Detektor:	Photomultiplier (EMI)
Datenerfassung:	ALV-5.000/E Multiple Tau Correlator
Software:	ALV-5.000/E Version 5.3.1, SLS
Thermostat:	LAUDA RC 6

8.2.4 Emulsionen

8.2.4.1 Standardemulsionen

Zunächst wurde eine Stammlösung von 0,1 g Biotin in 10,0 Puffer nach Mc Iloaine pH 7,2 hergestellt, diese anteilig mit der Wasserphase gemischt, danach der erwärmten Salbengrundlage in kleinen Teilen beigefügt und bis zum Erkalten gerührt. Die Vehikelkonzentration lag bei 0,1% Biotin.

Rezeptur der O/W-Emulsion (ST O/W)		Rezeptur der W/O-Emulsion (ST W/O)	
biotinhaltige Pufferlösung	1,0 g	biotinhaltige Pufferlösung	1,0 g
Aqua bidest.	6,0 g	Aqua bidest.	4,0 g
Hydrophile Salbe DAB 10	10,0 g	Wollwachsalkoholsalbe DAB 9	10,0 g

8.2.4.2 Modifizierte Emulsionen

Die Modulatoren Hyaluronidase und Harnstoff wurden in der entsprechenden Menge in Aqua bidest. gelöst und in die Grundvehikel eingearbeitet (Kap. 4.2.2)

8.3 Liberationsuntersuchungen am Mehrschichtmembranmodellsystem

Die in vitro-Liberation von Biotin aus den untersuchten Formulierungen konnte unter Nutzung des Mehrschichtmembranmodellsystems nach FÜRST-NEUBERT bestimmt werden (Kap. 5.1). Zur Optimierung der Versuchsbedingungen für den hydrophilen Arzneistoff mußte die Zusammensetzung des Akzeptors verändert werden. Anstelle des lipophilen Akzeptorlipides Dodecanol trat Glycerol, welches durch seine höhere Hydrophilie bessere Lösungseigenschaften für Biotin besitzt (Göbel, 1995).

8.3.1 Glycerol-Collodium-Membranen

Aufgrund der besseren Löslichkeit für Biotin bestanden die verwendeten Membranen aus einer Collodiummatrix mit Glycerol als hydrophiler Akzeptorkomponente. Um eine ausreichend hohe Akzeptorkapazität für den Wirkstoff anbieten zu können, mußte der Glycerol mit 8% in die Matrix eingearbeitet werden.

Membranrezeptur:

Glycerol	8,0 g
Diethylether-Ethanol-Gemisch (8,5 : 1,5 Vol%)	ad 100,0 g
Collodiumlösung 4%ig	ad 200,0 g

Die Rezepturlösung wurde auf der fettfreien Glasplatte eines Filmziehgerätes unter dem Abzug ausgegossen. Nach Verdunsten des Lösungsmittelgemisches konnte die Folie abgelöst werden. Mit Hilfe einer kreisrunden Schablone erfolgte die Anfertigung der einzelnen Membran ($d = 4$ cm). Um Schwankungen beim Gehalt des Akzeptorlipides durch Verdunstung zu vermeiden, wurden nur frisch hergestellte Membranen verwendet.

8.3.2 Versuchsdurchführung

Die benötigte Anzahl der Glycerolmembranen (6-8) wurde zwischen Grund- und Deckplatte einer Zelle luftblasenfrei eingebracht. Zur Abgrenzung gegenüber der Grundscheibe sowie zur Erhöhung der sink-Kapazität des Akzeptors diente die Verwendung der Nephrophanfolie.

Radioaktiv markierte Vehikel (alle verwendeten Emulsionen und Mikroemulsionssysteme)

Der Auftrag der Vehikel erfolgte mit Hilfe eines Füllspatels bei homogener Verteilung direkt auf die Membranoberfläche (4 cm^2). Die durch Differenzwägung ermittelte Auftragsmenge (ca. 10 mg) wurde zuvor auf einer Folie gut mit der Tracerlösung vermischt ($0,2 \mu\text{Ci}/\mu\text{l}$ ^{14}C -Biotin gelöst in Puffer nach Mc Illoaine).

Die Versuchsanordnung bestand grundsätzlich aus drei Zellen, die im Modell fixiert und lichtgeschützt verpackt in einem Thermostaten bei $32^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ belassen wurden. Nach einer Inkubationszeit von 30, 100 und 300 min erfolgte die Entnahme der Zellen mit anschließender Auftrennung der Membranen und Extraktion des liberierten Biotins. Mit dem Extraktionsmedium (2 ml Puffer nach Mc Illoaine) wurde das Biotin 30 min lang unter Schütteln (Schüttelgerät) aus den Membranen

eluiert. 100 µl aus diesem Eluat wurden in Szintillationsgefäße überführt, diese mit 3 ml Szintillator Aqua Safe 300 Plus aufgefüllt und im Flüssigkeitsszintillationszähler vermessen.

Nichtradioaktive Vehikel (Nanopartikel und Liposomen)

Der Auftrag der biotinhaltigen wäßrigen Systeme auf die Membranoberfläche erfolgte mit einer Mikroliterspritze (10 µl pro Zelle). Die erweiterte Versuchsanordnung bestand bei diesen Versuchen aus drei Wiederfindungs- und fünf Meßzellen. Nach Ablauf des Untersuchungszeitraums von ebenfalls 30, 100 und 300 min konnten die voneinander getrennten Membranen mit 6 ml Aqua bidest. ausgeschüttelt (Schüttelgerät) werden. Die biotinhaltigen Lösungen wurden im Anschluß der Analytik via HPLC-MS (Kap. 8.4.3) zugeführt.

8.4 Penetrationsuntersuchungen an humaner Haut ex vivo

8.4.1 Versuchsvorbereitung und -durchführung

8.4.1.1 Präparation des biologischen Materials

Die für die Penetrationsstudien verwendeten Hautpräparate stammten von Mammareduktionsplastiken. Das Untersuchungsmaterial wurde innerhalb von 2 h - 4 h nach der Operation aufgearbeitet. Dazu erfolgte zunächst die Säuberung mit isotonischer NaCl-Lösung. Es schloß sich das mechanische Entfernen des subkutanen Fettgewebes und die Herstellung runder Stücke mit Hilfe eines Locheisens (d = 2 cm) an, so daß danach einzeln in Aluminiumfolie verpackte Präparate bei -20 °C im Tiefkühlschrank für maximal drei Monate gelagert werden konnten.

Das Alter der Probandinnen lag zwischen 17 und 53 Jahren, wobei bei der Versuchsplanung aus Standardisierungsgründen versucht wurde, weitgehend auf altersgleiche Haut zurückzugreifen.

8.4.1.2 Versuche mit radioaktiv markierten Substanzen

Zirka 30 min vor Versuchsbeginn wurden die FRANZ'schen Diffusionszellen mit dem Akzeptormedium Wasser gefüllt und auf 32 °C temperiert. Unmittelbar vor der Vehikelapplikation wurde diese mit dem in Ethanol gelösten Tracer ¹⁴C-Biotin (5 µCi) bzw. ¹⁴C-Harnstoff (5 µCi) versetzt. Dabei wurde Wert auf homogene Vermischung mit der unmarkierten Zubereitung sowie auf die vollständige Verdunstung des Lösungsmittels gelegt. Anschließend erfolgte der homogene Auftrag von ca. 20 mg Emulsion bzw. 20 µl der Mikroemulsion (Tracer in hydrophile Phase eingearbeitet) auf der gesamten Epidermisfläche eines aufgetauten und mit einem Watteträger vom Gefrierwasser getrockneten Hautstückes. Unmittelbar nach der Vehikelapplikation wurde dieses auf eine Gaze gelegt und in der Diffusionszelle fixiert (Kap. 6.1).

Nach Ablauf der Versuchszeiten von 30 min und 300 min wurde die Haut dem Modell entnommen und der Formulierungsrückstand vorsichtig mit Watteträgern entfernt. Die weitere Aufarbeitung erforderte die Fixierung des Untersuchungsmaterials mit Stecknadeln an der Peripherie auf einer mit Aluminiumfolie bespannten Polystyrenunterlage. Unter Zuhilfenahme einer Schablone konnte das Stratum corneum reproduzierbar auf einer Kreisfläche (d = 1,6 cm) durch 20 Tesafilmabrisse vollständig eliminiert werden. Dessen quantitative Bestimmung erfolgte in paarweiser Fraktionierung der Abrisse (10 x 2). Aus der lebenden Haut wurden je drei Stanzbiopsien (d = 0,6 cm) entnommen,

die zur Anfertigung von Horizontalschnitten (8 x 20 µm - Epidermis, 30 x 40 µm - Dermis) an einem Gefriermikrotom dienten. Für die Quantifizierung der Proben wurden diese mit Methanol und Szintillator [4,0 g PPO (2,5-Diphenyloxazol) und 0,1 g POPOP 1,4-Di-2-(5-phenyloxazolyl)-benzen in 1,0 l Toluol]) versetzt, wobei zuvor die Epidermis- und Dermischnitte sowie die Stanzenreste zur vollständigen Zersetzung des Gewebes über Nacht in 100 µl bzw. 1 ml Soluene belassen wurden. Im Anschluß daran wurden die Proben unter Mitführung zweier Leerwerte im Flüssigkeitsszintillationszähler vermessen.

8.4.1.3 Chromatographieversuche

Für die Durchführung der Chromatographieversuche wurden analoge Vorbereitungen zu den Versuchen mit radioaktiven Substanzen getroffen. Je 20 µl der Suspensionen der Nanopartikel und der Liposomen wurden mit der Mikroliterspritze homogen auf der Haut verteilt und das Hautpräparat in der Diffusionszelle fixiert. Nach Ende der Versuchszeiten von 30 min und 300 min wurde die Haut, wie in Kap. 8.4.1.2 beschrieben, aufgearbeitet. Von den Stratum corneum Proben wurden, den analytischen Bedingungen zufolge, die Abrisse 1-2 und im folgenden jeweils drei Abrisse gepoolt und mit Methanol (4 bzw. 2 ml) für 30 min extrahiert. Die aus der lebenden Epidermis und Dermis entnommenen drei Stanzbiopsien (d = 0,6 cm) wurden ebenfalls an einem Gefriermikrotom oberflächenparallel abgetragen und die Schnitte der Epidermis in zwei Proben je 4 x 20 µm und die, der Dermis in drei Proben je 10 x 40 µm zusammengefaßt. Einer Probe wurden die Schnitte aller drei Stanzen einer Haut zugeordnet. An die Extraktion mit 1 ml Methanol schloß sich eine Zentrifugation bei 12.000 U/min für 5 min an, bevor die Proben der Analytik via HPLC-MS zugeführt wurden.

8.4.2 Histologische Untersuchungen zur Bestimmung der mittleren Epidermisbreite

Von jedem Operationspräparat wurden zur Bestimmung der mittleren Epidermisbreite histologische Schnitte angefertigt. Dazu wurde ein kleines Stück der Haut mit 4%igem Formaldehyd fixiert, in der aufsteigenden Alkoholreihe entwässert und anschließend in Paraffin eingebettet. Nach Anfertigung von 5 µm dicken Gewebeschnitten mit einem Mikrotom wurden diese sofort in heißem Wasser auf einen Objektträger aufgezogen und zum Glätten im Brutschrank bei 60 °C für 30 min aufbewahrt. Die nach Entfernen des Paraffins und erfolgter Hämalaun-Eosin-Färbung (HE) [Hämalaun-Färbung nach MAYER; (Romeis, 1989)] anfallenden Präparate wurden wiederum entwässert und anschließend eingedeckt.

Zur Ermittlung der mittleren Epidermisbreite wurden die HE-gefärbten histologischen Hautschnitte am Morphometrie-Unterprogramm des Bildanalyzesystems CYDOK untersucht. Dabei erfolgte die automatische Berechnung des Mittelwertes mit Standardabweichung aus zehn Werten von verschiedenen interaktiv markierten Epidermisabschnitten. (Tab. 8-2).

8.4.3 Biotin-Analytik mittels HPLC-MS

Die Bestimmung der liberierten und penetrierten Mengen an Biotin wurde wie folgt durchgeführt:

Gerät	Waters 600 E
Autosampler	Waters Wisp 712
Detektor (MS)	Finnigan-MAT SSQ 710C, Quadrupol

Kapillarsäule	Nucleosil 120 3C18, 125 x 2 mm, 3 µm Korngröße
Kapillartemperatur	250 °C
Injektionsvolumen	5 µl
Elutionsmittel	90 ml Methanol-9 ml Aqua bidest.-1 ml Acetonitril
Flußrate	15 µl/min
Elektronenspray-Ionisierung	4,5 kV
Scan-Mode	SIM (Selected Ion Monitoring)
Collision induced dissociation	20 V
Kalibrierung	Externer Standard Biotin (Konzentrationen: 0,01-5 µg/ml)

Tab. 8-2. Mittlere Epidermisbreiten der verwendeten Mammahautpräparate

Versuch	mittlere Epidermisbreite ± SD [µm]		
	Haut A	Haut B	Haut C
<i>BA-Partikel</i>	68,16 ± 7,58	51,94 ± 15,12	76,63 ± 14,49
<i>SDS-Partikel</i>	68,16 ± 7,58	51,94 ± 15,12	76,63 ± 14,49
<i>Liposom</i>	68,16 ± 7,58	51,94 ± 15,12	76,63 ± 14,49
<i>Liposom + Chol.</i>	68,16 ± 7,58	51,94 ± 15,12	76,63 ± 14,49
<i>ME</i>	64,91 ± 6,42	79,86 ± 12,08	78,38 ± 26,67
<i>ME + 2% Chol.</i>	64,91 ± 6,42	79,86 ± 12,08	78,38 ± 26,67
<i>ME + 5% Chol.</i>	64,91 ± 6,42	79,86 ± 12,08	78,38 ± 26,67
<i>ST O/W</i>	64,91 ± 6,42	79,86 ± 12,08	78,38 ± 26,67
<i>H 1 O/W</i>	70,00 ± 20,00	68,22 ± 20,04	82,82 ± 18,41
<i>H 2 O/W</i>	70,00 ± 20,00	68,22 ± 20,04	82,82 ± 18,41
<i>H 3 O/W</i>	64,91 ± 6,42	79,86 ± 12,08	78,38 ± 26,67
<i>H 4 O/W</i>	64,91 ± 6,42	79,86 ± 12,08	78,38 ± 26,67
<i>U O/W</i>	98,60 ± 27,36	101,95 ± 34,63	83,26 ± 23,39
<i>U O/W H 2</i>	98,60 ± 27,36	101,95 ± 34,63	83,26 ± 23,39
<i>ST W/O</i>	64,91 ± 6,42	79,86 ± 12,08	78,38 ± 26,67
<i>H 1 W/O</i>	70,00 ± 20,00	68,22 ± 20,04	82,82 ± 18,41
<i>H 2 W/O</i>	70,00 ± 20,00	68,22 ± 20,04	82,82 ± 18,41
<i>H 3 W/O</i>	70,00 ± 20,00	68,22 ± 20,04	82,82 ± 18,41
<i>H 4 W/O</i>	64,91 ± 6,42	79,86 ± 12,08	78,38 ± 26,67
<i>U W/O</i>	98,60 ± 27,36	101,95 ± 34,63	83,26 ± 23,39
<i>U W/O H 2</i>	98,60 ± 27,36	101,95 ± 34,63	83,26 ± 23,39

8.5 Statistische Auswertung der Versuchsergebnisse

Die statistische Prüfung wurde mit der Software STATISTICA für Windows [StatSoft, Inc., 1997, Tulsa, USA] durchgeführt. Unterschiede wurden als statistisch signifikant bewertet, wenn die Irrtumswahrscheinlichkeit $p \leq 0,05$ betrug (Weber, 1980).

Untersuchungen an humanen Keratinozyten in vitro

Die Ergebnisse der in-vitro Untersuchungen an humanen Keratinozyten resultieren aus Acht- bzw. Sechs- oder Fünffachbestimmungen und sind als Mittelwerte mit dem Standardfehler des Mittelwertes bzw. der Standardabweichung angegeben. Zur Prüfung auf signifikante Differenzen kam bei Stichproben aus normalverteilten Grundgesamtheiten mit gleicher Varianz die Varianzanalyse (One Way Analysis of Variance) zur Anwendung. Im Falle von nicht normalverteilten Grundgesamtheiten kam der parameterfreie Test (Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance on Ranks), der die analogen Hypothesen der Varianzanalyse verteilungsunabhängig prüft, zum Einsatz. Unterschiede zwischen den einzelnen Mittelwerten wurden durch paarweise Vergleiche nach dem Student-Newman-Keuls-Verfahren bestimmt.

Charakterisierung der Vehikelsysteme

Die Daten der Größenverteilungen der kolloidalen Trägersysteme wurden als Mittelwerte von Fünffachbestimmungen mit Standardabweichung ermittelt. Der Mittelwertvergleich erfolgte paarweise nach dem Student-Newman-Keuls-Verfahren.

Liberation in artifizielle Lipidmembranen

Die Ergebnisse der in vitro-Liberation resultieren aus Mittelwerten von Fünf- bzw. Dreifachbestimmungen, die in Form von Box (SEM) und Whisker (SD) Plots dargestellt wurden. Die Prüfung auf signifikante Unterschiede wurde mit dem Kruskal-Wallis-Test durchgeführt. Der parameterfreie Test (Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance on Ranks), der die analogen Hypothesen der Varianzanalyse verteilungsunabhängig prüft, wurde ausgewählt, weil die Mehrzahl der Daten die Anforderungen parametrischer Tests nach normalverteilten Variablen und gleichen Varianzen nicht erfüllte.

Penetration in humane Haut ex vivo

Die Ergebnisse der Penetrationsstudien sind in Kap. 6 in Analogie zu den Liberationsdaten als statistische Graphiken (Box und Whisker Plots) dargestellt. Die entsprechenden statistischen Kenngrößen entstammen den Rohdaten von Dreifachbestimmungen an Häuten, denen zur Ermittlung der Konzentrationen an Biotin bzw. Harnstoff in der lebenden Epidermis und Dermis je drei Stanzbiopsien entnommen wurden.

Die im Anhang dargestellten Verlaufsprofile der Wirkstoff- bzw. Modulatorpenetration enthalten im Stratum corneum die Mittelwerte der Dreifachbestimmungen mit Standardabweichung. In der Epidermis und Dermis wurde aufgrund der Datendichte nur auf die Darstellung der Mittelwerte aus den neun Stanzbiopsien zurückgegriffen.

Die Untersuchung auf signifikante Differenzen erfolgte mit dem Kruskal-Wallis- und dem Student-Newman-Keuls-Test.

8.6 Verwendete Substanzen

Annexin-V-FLUOS	Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim, BRD
Acetonitril gradient grade für die HPLC	Merck KGaA, Darmstadt, BRD
Aqua Safe 300 Plus	Zinsser Analytik, Frankfurt, BRD
Benzalkoniumchlorid	Serva Feinbiochemie, Heidelberg, BRD
Biotin	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, BRD
¹⁴ C-Biotin (spez Akt. 55 mCi/mmol)	Amersham-Buchler GmbH, Braunschweig, BRD
Calciumchlorid (CaCl ₂)	Merck KGaA, Darmstadt, BRD
Cholesterol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen, BRD
Chloroform reinst p.a.	Merck KGaA, Darmstadt, BRD
Collodiumlösung 4% DAC 1986	Caesar & Loretz GmbH, Hilden, BRD
Dichlormethan	Merck KGaA, Darmstadt, BRD
Diethylether	Merck KGaA, Darmstadt, BRD
Dimethylsulfoxid (DMSO) zur Synthese	Merck KGaA, Darmstadt, BRD
Dinatriumhydrogenphosphatmonohydrat	VEB Laborchemie Apolda, DDR
Eosin gelblich	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen, BRD
Ethanol 96% reinst	Merck KGaA, Darmstadt, BRD
Ethanol reinst p.a.	Laborchemie Apolda GmbH, BRD
FKS (Fetales Kälberserum)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen, BRD
FLUO 3/AM	Mo Bi Tec (Molecular Biologische Technologie), Göttingen, BRD
FITC anti-Involucrin AK	Novocostra NCL-INV, Newcastle, Great Britain
FITC Isotypenkontrolle ms-IgG1	Dianova dia-606NEG, Hamburg, BRD
FITC Ki-67 AK	Dianova dia-606S, Hamburg, BRD
Flüssigkeitsszintillationscocktail	Ultima Gold Canberra Packard GmbH, Dreieich, BRD
Formaldehyd	VEB Laborchemie Apolda, DDR
Glucose wasserfrei	Merck KGaA, Darmstadt, BRD
Glycerol	Merck KGaA Darmstadt, BRD
Harnstoff	Merck KGaA, Darmstadt, BRD
¹⁴ C-Harnstoff (spez Akt. 55 mCi/mmol)	BIOTREND Chemikalien GmbH, Köln, BRD
HEPES-Puffer	Serva Feinbiochemie, Heidelberg, BRD
Hyaluronidase	Abteilung Experimentelle Mikrobiologie der Friedrich-Schiller-Universität Jena, BRD
Hämalaun nach MAYER für die Mikroskopie	Merck, Darmstadt, BRD
Isopropylpalmitat	Fluka-Chemie AG, Buchs, Schweiz
Isotypenkontrolle ms-IgG1	DAKO X931, Diagnostika GmbH, Hamburg, BRD
Kaliumchlorid(KCl)	Serva Feinbiochemie, Heidelberg, BRD
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	VEB Laborchemie Apolda, DDR
γ-Linolensäure	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen, BRD

Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	VEB Laborchemie Apolda, DDR
Methanol reinst p.a.	Laborchemie Apolda GmbH, BRD
Methanol gradient grade für die HPLC	Merck KGaA, Darmstadt, BRD
Natriumchlorid (NaCl) reinst p.a.	Merck KGaA, Darmstadt, BRD
Natriumdodecylsulfat	Serva Feinbiochemie, Heidelberg, BRD
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO ₃)	VEB Laborchemie Apolda, DDR
Nephrophanfolie	VEB Filmfabrik Wolfen, DDR
Phosphatidylcholin (99%, vom frischen Ei)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen, BRD
Pluronic F-127	Calbiochem-Novabiochem GmbH, Bad Soden, BRD
POPOP	Canberra Packard GmbH, Dreieich, BRD
PPO	Canberra Packard GmbH, Dreieich, BRD
Propidiumiodid	Calbiochem-Novabiochem GmbH, Bad Soden, BRD
Protein Assay Kit P5656	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen, BRD
R-nase (Ribonuclease, 60 Kunitz U/mg)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen, BRD
Sconacell [®] A	BSL Olefinverbund GmbH, Schkopau, BRD
Span [®] 20	Pharma-Zentrale GmbH, Herdecke, BRD
sekundärer AK: Fab-Kaninchen-anti-ms-FITC	DAKO F313, Diagnostika GmbH, Hamburg, BRD
Serum free keratinocyte medium (inklusive rEGF + BPE)	Gibco BRL Life Technologies GmbH, Eggenstein, BRD
Soluene 350	Canberra Packard GmbH, Dreieich, BRD
Stickstoffgas	Messer Griesheim, Leipzig, BRD
Tagat [®] 02	Franken-Chemie, Wendelstein, BRD
Tesafilm	Beiersdorf AG, Hamburg, BRD
[6- ³ H]-Thymidin 60,3 Ci/mmol	American Radiolabeled Chemicals Inc, St. Louis, USA
Toluol	Merck-Schuchardt, Hohenbrunn, BRD
Trimethylsulfoniumhydroxid	Macherey Nagel GmbH, Düren, BRD
Trypsin	Gibco Life Technologies GmbH, Eggenstein, BRD
TWEEN [®] 20	Serva Feinbiochemie, Heidelberg, BRD
Zitronensäuremonohydrat	VEB Laborchemie Apolda, DDR
Wollwachsalkoholsalbe nach DAB 9	Apotheke der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
Hydrophile Salbe nach DAB 10	Apotheke der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

8.7 Verwendete Geräte und Hilfsmittel

Absorptionsreader	Labsystems, iEMS, Merlin, Bornheim-Hersel, BRD
Bildanalysestystem mit	Cydok, Carl H. Hilgers, Königswinter, BRD
Durchlichtmikroskop	Zetopan, Reichert AG Wien, Österreich
Biopsiestanzen	Stiefel Laboratorium GmbH, Offenbach, BRD
Brutschrank	Vitromat Typ sbs-11, Mytron Heiligenstadt, BRD
Cell-Harvester und Vakuum-Controller	INOTECH, IH-110, Wohlen, Schweiz
Elektronenmikroskop	JEM 100 B, Jena, BRD
Eppendorf-ReaktionsgefäÙe	Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg, BRD
Eppendorf-Zentrifuge	EC 5402, Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg, BRD
Extruder	Lipex Biomembranes Inc., Vancouver, Canada
DurchfluÙzytometer	Becton Dickinson, Heidelberg, BRD
Filmziehgerät	Eigenbau, Feinmechanikerwerkstatt der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, DDR
Flüssigkeitsszintillationszähler	Wallac 1410, Berthold, Berlin, BRD
Franz-Diffusionszelle mit	Crown Glass Company, Somerville, New Jersey, USA
Wasserbad	Thermostat B3-DC1, Haake, Karlsruhe, BRD
Fuchs-Rosenthal-Zählkammer	Faust GmbH, Halle, BRD
Füllspatel	VEB Dentalfabrik Treffurt, DDR
GC-Anlage	Finnigan MAT Magnum, GC-Varian 3400, Finnigan-MAT, Bremen, BRD
GC-Kapillarsäule	FFAP, Macherey-Nagel, Düren oder Fisher Scientific, Nidderau, BRD
Gefrierbruchanlage	BAF 400D, Balzers, Lichtenstein
Gefriermikrotom	Mikrotom-Modell 1206, Frigomobil Reichert-Jung, Heidelberg-Nußloch, BRD
Gewebe-Kulturflaschen und -Kulturplatten	Greiner GmbH, Frickenhausen, BRD
HaCaT-Keratinocyten	Deutsches Krebsforschungsinstitut Heidelberg, BRD
HPLC-MS-Anlage	Waters 600 E, Waters GmbH, Eschborn, BRD
HPLC-MS-Säule	Nucleosil 120, Macherey-Nagel, Düren, BRD
Laminarbox	VEB Elektromat Dresden, DDR
Lichtmikroskop	Olympus CK2-TR, Olympus Optical Co., Ltd., Japan
Mehrschichtmembranmodell	Eigenbau, Feinmechanikerwerkstatt der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, DDR
Membranfilter 200 nm, Chromafil, Typ 20/25	Macherey-Nagel, Düren, BRD
Mikroliterspritze	VEB Werk für Technisches Glas, Ilmenau, DDR

PD 10-Columns	Sephadex® G-25 M, Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Schweden
Polycarbonatfilter (Nucleopore®)	Costar Corporation, Cambridge, USA
pH-Meter	pH 525, Wissenschaftlich-Technische Werkstätten GmbH, Weilheim, BRD
Photonenkorrelationsspektrometer	Autosizer 2c, Malvern Instruments GmbH, Herrsching, Deutschland
Pipetten	Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg, BRD
Präzisionswaagen	Typ 870-13, Gottl. Kern & Sohn, Albstadt 1, BRD UMC 5, Sartorius AG Göttingen, BRD
Schüttelgeräte	Thys 2, MLW Labortechnik Ilmenau, DDR Heidolph unimax 2010, BRD
Sterilfilter Nalgene 0,2 µm	Nalge-Company, Worcester, USA
Streulichtküvetten	Hellma, Mühlheim ,BRD
Szintillationsmeßgefäße	Pony Vial, Pico Glass Vial, Econo Glass Vial, Canberra Packard GmbH, Dreieich, BRD
Ultraschall-Bad	Bandelin, Sonorex Super RK 102 H, Deutschland
Ultra-Turrax Homogenisator T 25	IKA Labortechnik, Staufen, BRD
mit dem Dispergierwerkzeug S25N-25F	IKA Labortechnik, Staufen, BRD
Vakuumrotationsverdampfer	Rotivapor RE 111, Laboratoriumstechnik Büchli, Flawil, Schweiz
mit	
Wasserbad	Büchli 461, Laboratoriumstechnik Büchli, Flawil, Schweiz
Wasserbad	Thermostat TB 120, MLW Prüfgerätewerk Medingen, Sitz Freital, DDR
Zentrifuge 1.500 rpm/min; 300 x g; 200 x g	Biofuge Primo, Heraeus Instruments, Gera, BRD
Zentrifuge 12.000 rpm/min	Hettich Mikroliter, Tuttlingen, BRD

LITERATURVERZEICHNIS

Aungst, B. J., Rogers, N. J., Shefter, E. (1986) Enhancement of naloxon penetration through human skin in vitro using fatty acids, fatty alcohols, surfactants, sulfoxides and amines. *Int. J. Pharm.* 33: 225-234

Baden, H. P., Lee, L. D., Kubilus, J. (1976) Intra and extracellular cementing substances. *J. Soc. Cosmet. Chem.* 27: 433-441

Barenholz, Y., Crommelin, D. J. A. (1994) Liposomes as pharmaceutical dosage formes. *Encyclopedia of Pharmaceutical Technology* (J. Swarbrick, ed.) Marcel Dekker, New York, Basel, Hongkong

Barry, B. W. (1987) Mode of action of penetration enhancers in human skin. *J. Contr. Rel.* 6: 85-97

Barry, B. W., Bennett, S. L. (1987) Effect of penetration enhancers on the permeation of mannitol, hydrocortisone and progesterone through human skin. *J. Pharm. Pharmacol.* 39 (7): 535-46

Bässler, K. H., Grünh, E., Loew, D., Pietrzik, K. (1992) *Vitaminlexikon für Ärzte, Apotheker und Ernährungswissenschaftler.* Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, Jena, New York

Bauer, K. H., Frömring, K.-H., Führer, C. (1991) *Pharmazeutische Technologie.* Georg Thieme Verlag, Stuttgart

Bendas, B. (1993) *Untersuchungen zum Mechanismus der in vitro-Penetration lipophiler Arzneistoffe aus binären und ternären Vehikelsystemen in künstliche und natürliche Akzeptoren.* Dissertation, Math.-Nat.-Tech. Fak., Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

Bendas, B., Schmalfuß, U., Neubert, R., Wohlrab, W. (1995) Influence of propylene glycol as cosolvent on mechanism of drug transport from hydrogels. *Int. J. Pharm.* 116: 19-30

Bevers, E. M., Comfurius, P., Zwaal, R. F. A. (1996) Regulatory mechanisms in maintenance and modulation of transmembrane lipid asymmetry: pathophysiological implications. *Lupus* 5: 480-487

Birrenbach, G., Speiser, P. (1976) Polymerized micelles and their use as adjuvants in immunology. *J. Pharm. Sci.* 65: 1763-1766

Bitsch, R., Bartel, K. (1994) *Biotin.* Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart

Bligh, B. E., Dyer, W. J. (1959) A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* 37: 911-917

Boltri, L., Morel, S., Trotta, M., Gasco, M. R. (1994) In vitro transdermal permeation of nifedipine from thickened microemulsions. *J. Pharm. Belg.* 49 (4): 315-320

Bonjour, J. P. (1984) *Handbook of vitamins,* Machlin, L. J. ed., Basel

Bonnet, J., Florens, A. (1969) Le bépanthène et la biotine dans quelques indications de la pratique dermatologique courante. *Gaz. Méd. de France* 76 (6): 1201-1203

Boddé, H. E., van den Brink, I., Koerten, H. K., de Haan, F. H. N. (1991) Visualization of in vitro percutaneous penetration of mercuric chloride transport through intercellular space versus cellular uptake through desmosomes. *J. Contr. Rel.* 15: 227-236

- Boukamp, P., Petrussevska, R. T., Breitkreutz, D., Hornung, J., Markham, A., Fusenig, N. E. (1988) Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line. *J. Cell Biol.* 106: 761-771
- Bowser, P. A., White, R. J. (1985) Isolation, barrier properties and lipid analysis of stratum compactum, a discrete region of the stratum corneum. *Br. J. Dermatol.* 112: 1-14
- Boyce, S. T., Ham, R. G. (1983) Calcium-regulated differentiation of normal human epidermal keratinocytes in chemically defined clonal culture and serum-free serial culture. *J. Invest. Dermatol.* 81 (1): 335-405
- Brosin, A., Wolf, V., Mattheus, A., Heise, H. (1997) Use of XTT-assay to assess the cytotoxicity of different surfactants and metal salts in human keratinocytes. *Acta Derm. Venereol.* 77: 26-28
- Bruno, S., Gorczyca, W., Darzynkiewicz, Z. (1992) Effect of ionic strength in immunocytochemical detection of the proliferation associated nuclear antigens p120, PCNA and the protein reacting with Ki-67 antibody. *Cytometry* 13: 496-501
- Bullough, W. S. (1973) The epidermal chalone mechanism. *Nat. Cancer Inst. Monogr.* 38: 98-107
- Calvo, P., Vila-Jato, J. L., Alonso, M. J. (1996) Comparative in vitro evaluation of several colloidal systems, nanoparticles, nanocapsules, and nanoemulsions, as ocular drug carriers. *J. Pharm. Sci.* 85 (5): 530-536
- Cappel, M., Kreuter, J. (1991) Effect of nanoparticles on transdermal drug delivery. *J. Microencapsulation* 8: 369-374
- Carlfors, J., Blute, I., Schmidt, V. (1991) Lidocaine in microemulsions-a dermal delivery system. *J. Dispersion science and technology* 12 (5-6): 467-482
- Cevc, G., Schätzlein, A., Blume, G. (1995) Transdermal drug carriers - basic properties, optimization and transfer efficiency in the case of epicutaneously. *J. Control. Rel.* 36 (1-2): 3-16
- Chapkin, R. S., Ziboh, V. A. (1984) Inability of skin enzyme preparation to biosynthesize arachidonic acid from linoleic acid. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 124: 784-792
- Christophers, E. (1980) Anatomie der Haut Epidermopoese und Keratinisation. In: Korting, G. W. *Dermatologie in Praxis und Klinik für die fachärztliche Weiterbildung in vier Bänden. Bd. 1* Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York
- Clausen, O. P. (1983) Flow cytometry of keratinocytes. *J. Cutan. Pathol.* 10 (1): 33-51
- Colombo, V. E., Gerber, F., Bronhofer, M., Floersheim, G. L. (1990) Treatment of brittle fingernails and onychoschizia with biotin: scanning electron microscopy. *J. Am. Acad. Dermatol.* 23: 1127-1132
- Constantinides, P. P., Seang, H. Y., (1995) Particles size determination of phase-inverted water in oil microemulsions under different dilution and storage condition. *Int. J. Pharm.* 115: 225-234
- Cooper, E. R. (1984) Increased skin permeability for lipophilic molecules. *J. Pharm. Sci.* 73: 1153-1156

- Couvreur, P., Kante, B., Roland, M., Guiot, P., Baudhuin, P., Speiser, P. (1979) Polycyanoacrylate nanocapsules as potential lysosomotropic carriers: Preparation, morphological and sorptive properties. *J. Pharm. Pharmacol.* 31: 331-332
- Crommelin, D. J. A., Schreier, H. (1994) Liposomes. In: Kreuter, J. *Colloidal drug delivery systems*. Marcel Dekker, New York, Basel, Hongkong
- Curatolo, W. (1987) The lipoidal permeability barriers of the skin alimentary tract. *Pharm. Res.* 4 (4): 271-277
- Dakshinamurti, K., Chauhan, J. (1989) Biotin. In: Aurach, G. D. (ed.): *Vitamins and hormones*. Acad. Press. Inc., San Diego
- Darzynkiewicz, Z., Juan, G., Li, X., Gorczyca, W., Murakami, T., Traganos, F. (1997) Cytometry in cell necrobiology: analysis of apoptosis and accidental cell death (necrosis). *Cytometry* 27: 1-20
- Davis, S. S. (1971) Hydrophobic bonding in soap-stabilized emulsions. *J. Pharm. Pharmacol.* 23: 161s-169s, Suppl.
- Derer, W., Schulz, J., Fusenig, N. E., Stark, H.-J., Geiges, D., Gschwendt, M. (1996) Spontaneous malignant transformation in vitro of the human epidermal keratinocyte line HaCaT. *Proceedings zur XXIII. Jahrestagung der Arbeitsgemeinschaft Dermatologische Forschung*. P 51: 115
- Dollery, C. (1991) Biotin. In: *Therapeutic drugs*. Ed. Boobis, A. R., Burley, D., Davies, D. M., Davies, D. S., Harrison, P. I., Orme, M. L'E., Park, B. K., Goldberg, L. I., Churchill Livingston
- Dreher, F.; Walde, P.; Luisi, P. L.; Elsner, (1995) P. Human skin irritation of a soybean lecithin microemulsion gel and of liposomes. *Proc. Int. Symp. Controlled Release Bioact. Mater.* 22nd, 640-641
- Eckert, R. L. (1989) Structure, function and differentiation of the keratinocyte. *Physiological Reviews* 69 (4): 1316-1346
- Eckert, R. L. (1993) The structure an function of skin. In: Mukhtar, H. *Pharmacology of the skin*. CRC Press, Boca, Raton, Ann Arbor, London
- Elias, P. M. (1981) Epidermal lipids, membranes and keratinization. *Int. J. Dermatol.* 20: 1-19
- Elias, P. M. (1983) Epidermal lipids, barrier function and desquamation. *J. Invest. Dermatol.* 80: 44s-49s
- Elias, P. M. (1992) Lipids and the epidermal water barrier: Metabolism, regulation and pathophysiology. *Semin. Dermatol.* 11: 176-182
- Elias, P. M., Friend, D. S. (1975) The permeability barrier in mammalian epidermis. *J. Cell. Biol.* 65: 180-191
- van Erp, P. E., de Jongh, G. J., Boezeman, J. B., Schalkwijk, J. (1994) The growth and differentiation of human keratinocytes in vitro: a combined immunohistochemical and flow cytometric study. *Arch. Dermatol. Res.* 286 (2): 115-22
- Feldmann, R. J., Maibach, H. J. (1974) Percutaneous penetration of hydrocortisone with urea. *Arch. Dermatol.* 109: 58-59

- Fairley, J. A. (1988) Calcium and the skin. *Arch. Dermatol.* 124 (3): 443-444
- Fartasch, M. (1997) Ultrastructure of the epidermal barrier after irritation. *Microsc. Res. Tech.* 1997 37 (3): 193-199
- Feldmann, R. J., Maibach, H. I. (1970) Absorption of some organic compounds through the skin in man. *J. Invest. Dermatol.* 54: 399-404
- Fiedler, H. P. (1996) *Lexikon der Hilfsstoffe für Pharmazie, Kosmetik und angrenzende Gebiete.* Editio Cantor Verlag, Aulendorf
- Fitscher, B. A., Elsing, C., Riedel, H.-D., Gorski, J., Stremmel, W. (1996) Protein-mediated facilitated uptake for fatty acids, bilirubin and other amphiphatic compounds. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 212: 15-23
- Fleisher, D., Niemiec, S. M., Oh, C. K., Hu, Z., Ramachandran, C., Wiener, N. (1995) Topical delivery of growth hormone releasing peptide using liposomal systems: an in vitro study using hairless mouse skin. *Life. Sci.* 57 (3): 1293-1297
- Floersheim, G. L. (1989) Behandlung brüchiger Fingernägel mit Biotin. *Z. Hautkr.* 64: 41-48
- Floersheim, G. L. (1992) Prüfung der Wirkung von Biotin auf Haarausfall und Haarqualität. *Z. Hautkr.* 67: 246-255
- Foldvari, M. (1994) In vitro cutaneous and percutaneous delivery and in vivo efficacy of tetracaine from liposomal and conventional vehicles. *Pharm. Res.* 11: 1593-1598
- Franz, T. J. (1975) Percutaneous absorption. On the relevance of in vitro data. *J. Invest. Dermatol.* 64: 190-195
- Franz, T. J. (1978) The finite dose technique as a valid in vitro model for the study of percutaneous absorption in man. *Curr. Probl. Dermatol.* 7: 58-68
- Friberg, E. (1990) Micelles, microemulsions, liquid crystals and the structure of stratum corneum lipids. *J. Soc. Cosmet. Chem.* 41: 155-171
- Friberg, E., Podzimek, P. (1984) A nonaqueous microemulsion. *Coll. Polym. Sci.* 262: 252-253
- Fröde, D. (1998) Untersuchungen zum Einfluß freier Fettsäuren auf in vitro kultivierte humane Keratinozyten. Dissertation, Math.-Nat.-Tech. Fak., Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
- Fritsch, P. (1990) *Dermatologie.* Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York,
- Fritsche, A. (1990) Biotin verändert das Zytokeratinmuster von kultivierten Keratinozyten. Inauguraldissertation, Universität Zürich
- Fritsche, A., Mathis, G. A., Althaus, F. R. (1991) Pharmakologische Wirkungen von Biotin auf Epidermiszellen. *Schweiz. Arch. Tierheilk.* 133: 277-283
- Funk, J. O., Kind, P. (1997) Cell cycle control, genetic instability and cancer. *Hautarzt* 48: 157-165
- Ghadially, R., Halkier-Sorensen, L., Elias, P. M. (1992) Effects of petrolatum on stratum corneum structure and function. *J. Am. Acad. Dermatol.* 26 (3): 387-396

- Galand, P., Degraef, C. (1989) Cyclin/PCNA immunostaining as an alternative to tritiated thymidine pulse labelling for marking S phase cells in paraffin sections from animal and human tissues. *Cell. Tissue Kinet.* 22 (5): 383-392
- Gallarate, M.; Gasco, M. R.; Trotta, M.; Chetoni, P.; Saettone, M. F. (1993) Preparation and evaluation in vitro of solutions and o/w microemulsions containing levobunolol as ion-pair. *Int. J. Pharm.* 100 (1-3): 219-225
- Geilen, C. C., Bektas, M., Wieder, T., Orfanos, C. E. (1996) The vitamin D-3 analogue, calcipotriol, induced sphingomyelin hydrolysis in human keratinocytes. *FEBS-Letters* 378: 88-92
- Gehring, W. (1996) Der Einfluß von Biotin bei reduzierter Nagelqualität. Eine plazebo-kontrollierte doppelblinde klinische Studie. *Akt. Dermatol.* 22: 20-25
- Gehring, W., Ghyczy, M., Gareiss, J., Gloor, M. (1995) The influence on skin penetration by dithranol formulated in phospholipid solution and phospholipid liposomes. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 41 (2): 140-142
- Gehring, W., Klein, M., Gloor, M. (1994) Liposomen als Träger von Dithranol bei der Behandlung der Psoriasis vulgaris. *Z. Hautkr.* 69 (7): 451-453
- Gerdes, J., Lemke, H., Baisch, H., Wacker, H.-H., Schwab, U., Stein, H. (1984) Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated antigen defined by the monoclonal antibody Ki 67. *J. Immunol.* 133 (4): 1710-1715
- Gibbs, S., Backendorf, C., Ponc, M. (1996) Regulation of keratinocyte proliferation and differentiation by all-trans-retinoic acid, 9-cis-retinoic acid and 1,25-dihydroxy vitamin D₃. *Arch. Dermatol. Res.* 288: 729-738
- Gilli, L., Floersheim, G. L. (1995) Beeinflussung der Fältchenausprägung bei Altershaut durch topisch appliziertes Biotin. *Z. Hautkr.* 70 (6): 419-425
- Glanz, D., Fröde, D., Kuhnt, B., Wohlrab, W., Gläßer, D. (1996) Measurement of fatty acid induced changes of intracellular free calcium-concentration in cultured keratinocytes - a comparison of methods. *Biol. Chem.* 377, Suppl.
- Göbel, S. (1995) Entwicklung und Untersuchung einer biotinhaltigen topischen W/O Mikroemulsion. Diplomarbeit, Math.-Nat.-Tech. Fak., Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
- Golden, G. M., McKie, J. E., Potts, R. O. (1987) Role of stratum corneum lipid fluidity in transdermal drug flux. *J. Pharm. Sci.* 76: 25-28
- Goodman, M., Barry, B. W. (1985). Action of skin permeation enhancers Azone, oleic acid and decylmethylsulfoxide: Permeation and DSC studies. *J. Pharm. Pharmacol.* 37: 80
- Grabbe, J., Welker, P., Rosenbach, T., Nürnberg, W., Krüger-Krasagakes, S., Artuc, M., Fiebiger, E., Henz, B. M. (1996) Release of stem cell factor from a human keratinocyte line, HaCaT, is increased in differentiating versus proliferating cells. *J. Invest. Dermatol.* 107: 219-224
- Grayson, S., Elias, P. M. (1982) Isolation and lipid biochemical characterization of stratum corneum cell membrane complexes: Implications for the cutaneous permeability barrier. *J. Invest. Dermatol.* 78: 128-135

- Grit, M., Crommelin, D. J. (1992) The effect of aging on the physical stability of liposome dispersions. *Chem. Phys. Lipids.* 62 (2): 113-122
- Grubauer, G., Feingold, K. R., Harris, R. M., Elias, P. M. (1989) Lipid content and lipid type as determinants of the epidermal permeability barrier. *J. Lipid Res.* 30: 89-96
- Gurny, R., Peppas, N., Harrington, D. D., Baker, G. S. (1981) Development of biodegradable and injectable latices for controlled release of potent drugs. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 7: 1-25
- Hadgraft, J. (1984) Penetration enhancers in percutaneous adsorption. *Pharm. Int.* 5: 252-254
- Hadgraft, J., Peck, J., Williams, D. G., Pugh, W. J., Allan, G. (1996) Mechanisms of action of skin penetration enhancers/retarders: Azone and analogues. *Int. J. Pharm.* 141: 17-25
- Hanley, K., Jiang, Y., Holleran, W. M., Elias, P. M., Williams, M. L., Feingold, K. R. (1997) Glycosylceramide metabolism is regulated during normal and hormonally stimulated epidermal barrier development in the rat. *J. Lipid Res.* 38 (3): 576-584
- Handjani, R. M., Ribier, A. (1991) Topical pharmaceuticals and cosmetics containing biodegradable nanoparticles for skin treatment. *Eur. Pat. Appl.*, 20 pp., EP 91-400684
- Hennings, H., Michael, D., Cheng, Ch., Steinert, P., Holbrook, K., Yuspa, St. H., (1980) Calcium regulation of growth and differentiation of mouse epidermal cells in culture. *Cell* 19: 245-254
- Hennings, H., Kruszewski, F. H., Yuspa, St. H., Tucker, R. W. (1989) Intracellular calcium alterations in response to increased external calcium in normal and neoplastic keratinocytes. *Carcinogenesis* 10 (4): 777-780
- Hofland, H. E. J., Bouwstra, J. A., Ponec, M., Boddé, H. E., Spies, F., Coos Verhoef, J., Junginger, H. E. (1991) Interactions of non-ionic surfactant vesicles with cultured keratinocytes and human skin in vitro: A survey of toxicological aspects and ultrastructural changes in stratum corneum. *J. Contr. Rel.* 6: 155-168
- Hofland, H. E. J., Bouwstra, J. A., Boddé, H. E., Spies, F., Junginger, H. E. (1995) Interactions between liposomes and human stratum corneum in vitro: Freeze fracture electron microscopical visualization and small angle X-ray scattering studies. *Br. J. Dermatol.* 132 (6): 853-866
- Hohl, D. (1990) Cornified cell envelope. *Dermatologica* 180: 201-211
- Hori, M., Maibach, H. I., Guy, R. H. (1992) Enhancement of propranolol hydrochloride and diazepam skin absorption in vitro. II: Drug, vehicle, and enhancer penetration kinetics. *J. Pharm. Sci.* 81 (4): 330-333
- Hsu, L.-R., Huang, Y.-B., Wu, P.-C., Tsai, Y.-H. (1994) Percutaneous absorption of piroxicam from FAPG base through rat skin: Effects of fatty acid added to FAPG base. *Int. J. Pharm.* 106: 1-6
- Huc, A., Buffevant, C., Anselme, K., Levy, M. C., Andry, M. C (1991) A new encapsulation system: collagen-glycosaminoglycans-based capsules. *Seifen-Öle-Fette-Wachse* 117 (5): 180-6
- Huschka, C. (1994) Herstellung kolloidaler Arzneistoffträger unter Verwendung von Stärkeestern. Diplomarbeit, Math.-Nat.-Tech. Fak., Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

Huschka, C., Schmalfuß, U., Wohlrab, W., Neubert, R. (1996) Kolloidale Trägersysteme für die topische Applikation. *Kosmet. Med.* 1: 34-41

Inohara, S., Kitano, Y., Kitagawa, K. (1995) Cell cycle regulators in the keratinocyte (cyclin-cdk). *Exp. Dermatol.* 4: 1-8

Ishida-Yamamoto, A., Kartasova, T., Matsuo, Sh., Kuroki, T., Iizuka, H. (1997) Invulocrin and SPRR are synthesized sequentially in differentiating cultured epidermal cells. *J. Invest. Dermatol.* 108: 12-16

Jones, K. T., Sharpe, G. R. (1994) Intracellular free calcium and growth changes in single human keratinocytes in response to vitamin D and five 20-epi-analogues. *Arch. Dermatol. Res.* 286: 123-129

Junginger, H. E. (1992) Systematik der Dermatika - Kolloidchemischer Aufbau. In: Niedner, R., Ziegenmeyer, J. (Hrsg.) *Dermatika*. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH

Kayser, F. H., Bienz, K. A., Eckert, J., Lindenmann, J. (1993) *Medizinische Mikrobiologie*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York

Kamb, A. (1995) Cell-cycle regulators and cancer. *Trends Genet.* 11: 136-140

Kemken, J., Ziegler, A., Müller, B. W. (1991) Investigations into the pharmacodynamic effects of dermally administered microemulsions containing beta-blockers. *J. Pharm. Pharmacol.* 43 (10): 679-684

Kemken, J., Ziegler, A., Müller, B. W. (1992) Influence of supersaturation on the pharmacodynamic effect of bupranolol after dermal administration using microemulsions as vehicle. *Pharm. Res.* 9 (4): 545-558

Kirjavainen, M., Urtti, A., Jaaskelainen, I., Suhonen, T. M., Paronen, P., Valjakka-Koskela, R., Kiesvaara, J., Monkkonen, J. (1996) Interaction of liposomes with human skin in vitro - the influence of lipid composition and structure. *Biochim. Biophys. Acta.* 1304 (3): 179-189

Knorst, M. (1997) Charakterisierung und Optimierung der Liberation und Penetration des Harnstoffs aus halbfesten Formulierungen. Dissertation, Math.-Nat.-Tech. Fak., Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

Kölln, C. J. (1986) Entwicklung, Charakterisierung und Prüfung hautverträglicher Mikroemulsions-systeme zur perkutanen Absorption. Dissertation, Universität Kiel

Koosha, F., Müller, R. H., Washington, C. (1987) Production of polyhydroxybutyrate (PHB) nanoparticles for drug targeting. *J. Pharm. Pharmacol.* 39: 136

Korting, H. Chr., (1995) *Dermatotherapie*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York

Kreuter, J., Speiser, P. (1976) In vitro studies of poly(methylmethacrylate) adjuvants. *J. Pharm. Sci.* 65: 1624-1627

Krill, S. L., Knutson, K., Higuchi, W. I. (1992) Ethanol effects on the stratum corneum lipid phase behavior. *Biochim. Biophys. Acta.* 1112 (2): 273-280

- Kriwet, K., Mueller-Goymann, Ch. (1995) Diclofenac release from phospholipid drug systems and permeation through excised human stratum corneum. *Int. J. Pharm.* 125 (2): 231-242
- Landmann, L. (1991) Die Permeabilitätsbarriere der Haut. *Pharm. unserer Zeit* 20 (4): 155-163
- Lampe, M. A., Burlingame, A. L., Whitney, J., Williams, M. L., Brown, B. E., Roitman, E., Elias, P. M. (1983) Human stratum corneum lipids: Characterization and regional variations. *J. Lipid Res.* 24: 120-130
- Lasch, J., Bouwstra, J. (1995) Interactions of external lipids (lipid vesicles) with the skin. *J. Liposome Res.* 5 (3): 543-569
- Lasch, J., Laub, R., Wohlrab, W. (1992) How deep do intact liposomes penetrate into human skin? *J. Control. Rel.* 18 (1): 55-58
- Lautenschläger, H., Röding, J., Ghyczy, M. (1988) Über die Verwendung von Liposomen aus Soja-Phospholipiden in der Kosmetik. *Seifen-Öle-Fette-Wachse* 114: 531-534
- Lautenschläger, H. (1989) Kosmetische Formulierungen mit Liposomen und Phospholipiden - Umfeld und Zusammenhänge. *Seifen-Öle-Fette-Wachse* 115 (18): 662-663
- Lautenschläger, H. (1990) Liposomes in dermatological preparations-Part.1 *Cosmetics Toiletries* 105: 89-96
- Lee, S. H., Elias, P. M., Proksch, E., Menon, G. K., Mao-Quiang, M., Feingold, K. R. (1992) Calcium and potassium are important regulators of barrier homeostasis in murine epidermis. *J. Clin. Invest.* 89 (2): 530-538
- Lee, S. H., Elias, P. M., Feingold, K. R., Mauro, Th. (1994) A role for ions in barrier recovery after acute perturbation. *J. Invest. Dermatol.* 102: 976-979
- Leung, R., Shah, D. O. (1989) Microemulsions: An evolving technology for pharmaceutical applications. In: Rosoff, M. (Hrsg.) *Controlled release of drugs: Polymers and aggregated systems.* VCH Publishers, Inc., New York
- Limat, A., Suormala, T., Hunziker, T., Waelti, E. R., Braathen, L. R., Baumgartner, R. (1996) Proliferation and differentiation of cultured human follicular keratinocytes are not influenced by biotin. *Arch. Dermatol. Res.* 288: 31-38
- Linn, E. E., Pohland, R. C., Byrd, T. K. (1990) Microemulsion for intradermal delivery of cetyl alcohol and octyl dimethyl PABA. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 16 (6): 899-920
- Linn, E. E., West, M. P., York, Th. O. (1986) Skin moisturizing microemulsions. *Eur. Pat. Appl.*, 51 pp. EP 86-308852
- Lippold, B. C. (1981) Kutane Resorption - Möglichkeiten, Modelle, Beeinflussung. *Acta Pharm. Technol.* 27: 1-9
- Lodén, M. (1996) Urea-containing moisturizers influence barrier properties of normal skin *Arch. Dermatol. Res.* 288 (2) : 103-107

- Loth, H. (1986) Grundlagen des intra- und transdermalen Transportes von Arzneistoffen, I. Acta Pharm. Technol. 32 (3): 109-114
- Loth, H. (1987) Grundlagen des intra- und transdermalen Transportes von Arzneistoffen, II. Acta Pharm. Technol. 33 (1): 3-14
- Lynen, F. (1979) New experiments of biotin enzymes. CRL Crit. Rev. Biochem. 7: 103
- Mack, J. W., Steven, A. C., Steinert, P. M. (1993) The mechanism of interaction of filaggrin with intermediate filaments. The ionic zipper hypothesis. J-Mol-Biol. 232 (1): 50-66
- Mahrle, G., Bonnekoh, B., Ghyczy, M., Wiegreb, W. (1991) Stability of anthralin in liposomal phospholipids. Arch. Dermatol. Res. 283: 483-484
- Maier, K., Schmitt-Landgraf, R., Siegmund, B. (1991) Development of an in vitro system with human skin cells for evaluation of phototoxicity. Toxicol. in Vitro 5: 457-461
- Mak, V. H. W., Cumpstone, M. B., Kennedy, A. H., Harmon, C. S., Guy, R. H., Potts, R. O. (1991) Barrier function of human keratinocyte cultures grown at the air-liquid interface. J. Invest. Dermatol. 96: 323-327
- Malcomson, C., Lawrence, M. J. (1993) A comparison of the incorporation of model steroids into non-ionic micellar and microemulsion systems. J. Pharm. Pharmacol. 45: 141-143
- Martin, G. P. (1992) Phospholipids as skin penetration enhancers. In: Walters, K., Hadgraft, J., (eds) Skin penetration enhancement (Drugs and the pharmaceutical sciences, Swarbrick, 7, Series ed.) Marcel Dekker, New York
- Menczel, E., Touitou, E. (1989) Cutaneous permeation of lipophilic molecules: effects of enhancers. In: Bronaugh, R.L., Maibach, H. I. (Hrsg.), Percutaneous absorption, Marcel Dekker, Inc., New York, Basel
- Menon, G. K., Elias, P. M. (1997) Morphologic basis for a pore-pathway in mammalian stratum corneum. Skin Pharmacol. 10: 235-246
- Menon, G. K., Elias, P. M., Feingold, K. R. (1994) Integrity of the permeability barrier is crucial for maintenance of the epidermal calcium gradient. Br. J. Dermatol. 130: 139-147
- Mezei, M., Gulaschkaram, V. (1980) Liposomes - a selective drug delivery system for the topical route of administration. Life sciences 26: 1473-1477
- Michel, C.; Purmann, T.; Mentrup, E.; Michel, G. Kreuter (1991) 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, Ill.
- Miller, D. R., Hayes, K. C. (1982) Vitamin excess and toxicity. Nutritional toxicology 1: 81-113
- Mogner, D. J., Williams, M., Feingold, K. R., Brown, B. E., Elias, P. M. (1988) Localization of sites of lipid biosynthesis in mammalian epidermis. J. Lipid Res. 29: 603-612
- Møllgaard, B., Hoelgaard, A. (1983a) Vehicle effect on topical drug delivery. II. Concurrent skin transport of drugs and vehicle components. Acta Pharm. Suec. 20: 443-450

Møllgaard, B., Hoelgaard, A. (1983b) Permeation of estradiol through the skin - effect of vehicles. *Int. J. Pharm.* 15: 185-197

Müller, K. H., Pflugshaupt, Ch. (1989) Harnstoff in der Dermatologie I. *Hautarzt* 40: 1-12, Suppl. 9

Niedner, R., (1992) Grundlagen der dermatologischen Therapie. In: Niedner, R., Ziegenmeyer, J. (Hrsg.) *Dermatika*. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH

Neubert, R., Bendas, C., Gienau, B., Wohlrab, W., Fürst, W. (1991) A multilayer membrane system for modelling drug penetration into skin. *Int. J. Pharm.* 75: 89-94

Neubert, R., Bendas, B., Wohlrab, W. (1992) Use of a multilayer membrane system and excised human skin for studying the topical availability of glucocorticoids. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 38: 11-16

Neubert, R., Fürst, W., Bohm, W., Dabow, S. (1984) Drug permeation through artificial lipid membranes. The mechanism of ion pair transport. *Pharmazie* 39(6): 401-403

Neubert, R., Schmalfuß, U., Wohlrab, W., Huschka, C. (1996) Wirkstoffpenetration in die Haut und deren Modulation. *PZ* 141 (17): 11-23

Neuner, P., Pourmojib, M., Klosner, G., Trautinger, F., Knobler, R. (1996) Increased release of the tumour necrosis factor receptor p75 by immortalized human keratinocytes results from an activated shedding mechanism and is not related to augmented steady-state levels of p75 mRNA. *Arch. Dermatol. Res.* 288: 691-696

Noll, M.; Eschborn: (1997), Apoptose: Mord und Selbstmord im menschlichen Organismus. *PZ* 142 (23): 1885-1891

Nuhn, P. (1997) *Naturstoffchemie: Mikrobielle, pflanzliche und tierische Naturstoffe*. S. Hirzel Verlag Stuttgart, Leipzig

Ozegowski, J.-H. (1997), mündliche Mitteilung (Institut für experimentelle Mikrobiologie, Klinikum der Friedrich-Schiller-Universität Jena)

Paramio, J., M, Jorcano, J. L., (1997) Role of protein kinases in the in vitro differentiation of human epidermal HaCaT cells. *Br. J. Dermatol.* 137 (1): 44-50

Paus, R., Menrad, A., Czarnetzki, B. M. (1995) Nekrobiologie der Haut: Apoptose. *Hautarzt* 46: 285-303

Pfeifer, S., Pfliegel, P., Borchert, H.-H. (1995) *Biopharmazie: Pharmakokinetik-Bioverfügbarkeit-Biotransformation*. Ullstein Mosby GmbH & Co KG Berlin, Wiesbaden

Pfüller, U. (1986) *Mizellen, Vesikel, Mikroemulsionen. (Tensidassoziate und ihre Anwendung in Analytik und Biochemie)* Verlag Volk und Gesundheit, Berlin

Polakowska, R. R., Piacentini, M., Bartlett, R., Goldsmith, L. A., Haake, A. R. (1994) Apoptosis in human skin development: morphogenesis, periderm and stem cells. *Developmental Dynamics* 199: 176-188

Polano, M. K., Ponec, M. (1976) Dependence of corticosteroid penetration on the vehicle. *Arch. Dermatol.* 112: 675-680

Ponec, M., Haverkort, M., Soei, Y. L., Kempenaar, J., Boddé, H. E. (1990) Use of human keratinocyte and fibroblast cultures for toxicity studies of topically applied compounds. *J. Pharm. Sci.* 79: 312-316

Ponec, M., Haverkort, M., Soei, Y. L., Kempenaar, J., Brussee, J., Boddé, H. E. (1989) Toxicity screening of n-alkylazacycloheptan-2-one derivatives in cultured human skin cells: Structure-toxicity relationships. *J. Pharm. Sci.* 78: 738-741

Prince, L. M. (1977) *Microemulsions. Theory and practice.* Academic press Inc., New York, San Francisco, London

Proksch, E., Holleran, W. M., Menon, G. K., Elias, P. M., Feingold, K. R. (1993) Barrier function regulates epidermal lipid and DNA synthesis. *Br. J. Dermatol.* 128 (5): 473-482

Proud, V. K., Rizzo, W. B., Patterson, J. W., Heard, G. S., Wolf, B. (1990) Fatty acid alterations and carboxylase deficiencies in the skin of biotin-deficient rats. *Am. J. Clin. Nutr.* 51: 853-858

Raab, W. (1989) *Biochemie, Pharmakologie und Toxikologie von Harnstoff.* *Hautarzt* 40: 23-26, Suppl. 9

Ratnam, A. V., Bikle, D. D., Su, M. J., Pillai, S. (1996) Squamous carcinoma cell lines fail to respond to 1,25-Dihydroxyvitamin D despite normal levels of the vitamin D receptor. *J. Invest. Dermatol.* 106 (3): 522-525

Rawlings, A. V., Mayo, A. M., Rogers, J., Scott, I. R. (1993) Aging and the seasons influence stratum corneum lipid levels. *J. Invest. Dermatol.* 101: 483

Reynolds, J. E. F., Parfitt, K., Parsons, A. V., Sweltman, S. C. (1996) *Martindale. The Extra Pharmacopoeia., Thirty-first Edition.* The Royal Pharmaceutical Society, London

Rijzewijk, J. J., van Erp, P. E. J., Bauer, F. W. (1989) Two binding sites for Ki67 related quiescent and cycling cells in human epidermis. *Acta Derm. Venerol.* 69: 512-515

Romeis, B. (1989) In: Böck, P. (Hrsg.) *Mikroskopische Technik.* Urban & Schwarzenberg München, Wien, Baltimore

Rosano, H. L., Clause, M. (1987) *Microemulsion systems.* Surfactant Science Series 24, Marcel Dekker, Inc., New York

Rössler, B., Kreuter, J., Ross, G. (1994) Effect of collagen microparticles on the stability of retinol and its absorption into hairless mouse skin. *Pharmazie* 49 (2-3): 175-179

Rössler, B., Kreuter, J., Scherer, D. (1995) Collagen microparticles: preparation and properties. *J. Microencapsulation* 12 (1): 49-57

Roth, H. J. (1987) Vitamine. *Deutsche Apoth. Zeitung* 127 (42): 21, Suppl. 6

Roth, K. S. (1989) Biotin in clinical medicine -a review. *Am. J. Clin. Nutr.* 34: 1967-1974

Rudin, Ch. M., Thompson, C. B. (1997) Apoptosis and Disease: Regulation and clinical relevance of programmed cell death. *Annu. Rev. Med.* 48: 267-281

van Ruissen, F., van Erp, P. E., de Jongh, G. J., Boezeman, J. B., van de Kerkhof, P. C., Schalkwijk, J. (1994) Cell kinetic characterization of growth arrest in cultured human keratinocytes. *J. Cell. Sci.* 107 (8): 2219-2228

Ruiz, J., Goni, F. M., Alonso, A. (1988) Surfactant-induced release of liposomal contents. A survey of methods and results. *Biochim. Biophys. Acta.* 937 (1): 127-134

Saint Ruth, H., Attwood, D., Ktistis, G. Taylor, C. J. (1995) Phase studies and particle sizes analysis of oil-in-water phospholipid microemulsions. *Int. J. Pharm.* 116: 253-261

Schäfer-Korting, M., Korting, H. C., Ponce-Poschl, E. (1994) Liposomal tretinoin for uncomplicated acne vulgaris. *Clin. Investig.* 72 (12): 1086-1091

Schaller, M., Korting H. C., Schmid, M. H. (1996) Interaction of cultured human keratinocytes with liposomes encapsulating silver sulphadiazine: proof of the uptake of intact vesicles. *Br. J. Dermatol.* 134: 445-450

Scheuplein, R. J. (1972) Properties of the skin as a membrane. *Adv. Biol. Skin.* 12: 125-152

Schmalfuß, U. (1997) 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

Schmidt, K. H. (1993) Vergleich der Wirkungsmechanismen verschiedener Wirkstoffe gegen brüchige Nägel. *Z. Hautkr.* 68: 517-520

Schneider, I.-M. (1997) Untersuchungen zum Einfluß von Glycolipiden und Fettsäuren auf den Wirkstofftransport in humane Haut und auf das Proliferationsverhalten von humanen Keratinozyten. Dissertation, Math.-Nat.-Tech. Fak., Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

Schreier, H., Bouwstra, J. (1994) Lipsomes and niosomes as topical drug carriers: dermal and transdermal delivery. *J. Control. Rel.* 30 (1): 1-15

Schulte, E., Weber, K., (1989) Rapid preparation of fatty acid methyl esters from fats with trimethylsulfonium hydroxide or sodium methyolate. *Fat. Sci. Technol.* 91 (5) 181-183

Schürer, N. Y., Köhne, A., Schliep, V., Barlag, K., Goerz, G. (1993) Lipid composition and synthesis of HaCaT cells, an immortalized human keratinocyte line, in comparison with normal human adult keratinocytes. *Exp. Dermatol.* 2: 179-185

Schütze, W. (1997) mündliche Mitteilung, Doktoranden-Tagung der Deutschen Pharmazeutischen Gesellschaft, Würzburg

Schwarting, R., Gerdes, J., Niehus, J., Jaeschke, L., Stein, H (1986) Determination of the growth fraction in cell suspensions by flow cytometry using the monoclonal antibody Ki-67. *J. Immunol. Methods* 90: 65-70

Schwarz, A., Bhardwaj, R., Aragane, Y., Mahnke, K., Riemann, H., Metze, D., Luger, T. A., Schwarz, T. (1995) Ultraviolet-B-induced apoptosis of keratinocytes: evidence for partial

involvement of tumor necrosis factor-alpha in the formation of sunburn cells. *J. Invest. Dermatol.* 104 (6): 922-927

Sharma, B. B.; Jain, S. K.; Vyas, S. P. (1994) Topical liposome system bearing local anesthetic lignocaine: preparation and evaluation. *J. Microencapsulation* 11 (3): 279-286

Serup, J. (1992) A double-blind comparison of two creams containing urea as the active ingredient. *Acta Derm. Venerol.* 177: 34-38, Suppl.

Sheinaus, H., Christian, J. E., Sperandio, G. J. (1955) The effect of topically applied hyaluronidase on cutaneous permeability to certain substances. *J. Amer. Pharma. Assoc. (sci. Edit.)* 44: 483-486

Siebert, U.; Schneeweiß, S. (1996) Zur Dosierung und Wirkung von Biotin bei Nagel- und Haarwachstumsstörungen. *Zeitschrift Hautnah* 6: 438-443

Squier, C. A. (1984) Effect of enzyme digestion on the permeability barrier in keratinizing and non-keratinizing epithelia. *Br. J. Dermatol.* 111 (3): 253-264

Steinert, P. M., Marekow, L. N. (1996) The proteins elafin, filaggrin, keratin intermediate filaments, loricrin and small proline-rich proteins 1 and 2 are iospeptide cross-linked components of the human epidermal cornified cell envelope. *J. Biol. Chem.* 270 (30): 17702-17711

Stricker, H. (1987) *Physikalische Pharmazie*. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart

Stüttgen, G. (1990) Die biologische Funktion des Stratum corneum. Pharmakokinetische Bedingungen für die topische Applikation. In: Riebock, N. *Die Haut als Transportorgan für Arzneistoffe*. Steinkopf Verlag Darmstadt

Stüttgen, G. (1992) Ergebnisse und Konsequenzen einer langfristigen Harnstofftherapie für die medizinische Praxis. *Hautarzt* 43: 9-12, Suppl. 9

Tammi, R., Ripellino, J. A., Margolis, R. U., Tammi, M. (1988) Localization of epidermal hyaluronic acid using the hyaluronate binding region of cartilage proteoglycan as a specific probe. *J. Invest. Dermatol.* 90 (3): 412-414

Tanno, O., Ota, Y., Yasuda, R., Inoue, S. (1998) Niacinamide increases biosynthesis not only of ceramides but of fatty acids and cholesterol in cultured human keratinocytes. *J. Invest. Dermatol.* 110 (4): 672

Thacharodi, D., Panduranga Rao, K. (1994) Transdermal absorption of nifedipine from microemulsions of lipophilic skin penetration enhancers. *Int. J. Pharm.* 111, 235-240

Tiemessen, H. L. G. M., Boddé, H. E., van Koppen, M., Bauer, W. C., Junginger, H. E. (1988) A two chambered diffusion cell with improved flow through characteristics for studying the drug permeability of biological membranes. *Acta Pharm. Technol.* 34: 99-101

du Vigneaud, V., Melville, D. B., Folkers, K., Wolf, D. E., Mozingo, R., Keresztesy, J. C., Harris, S. A. (1942) The structure of biotin.: A study of desthiobiotin. *J. Biol. Chem.* 146: 475-485

Voigt, R. (1997) *Pharmazeutische Technologie für Studium und Beruf*. Ullstein Mosby GmbH & Co KG Berlin, Wiesbaden

- Wagner, C., Göbel, S., Wohlrab, W., Neubert, R. (1997) Vehicle-dependent biotin liberation and penetration into human skin. *Skin Pharmacol.* 10: 34-39
- Walker, M., Chambers, L. A., Hollingsbee, D. A., Hadgraft, J. (1991) Significance of vehicle thickness to skin penetration of halcinonide. *Int. J. Pharm.* 70: 167-172
- Watt, F. M., Green, H. (1982) Stratification and terminal differentiation of cultured epidermal cells. *Nature* 295: 434-436
- Watt, F. M., Phil, D. (1983) Involucrin and other markers of keratinocyte terminal differentiation. *J. Invest. Dermatol.* 81: 100-103, Suppl. 1
- Weber, E. (1980) *Grundriß der Biologischen Statistik. Anwendungen der mathematischen Statistik in Forschung, Lehre und Praxis.* Gustav Fischer Verlag Jena
- Wertz, P. W., Downing, D. T. (1982) Glycolipids in mammalian epidermis. Structure and function in the water barrier. *Science* 217: 1261-1262
- Whitfield, J. F., Bird, R. P., Chakravarthy, B. R., Isaacs, R. J., Morley, P. (1995) Calcium-cell cycle regulator, differentiator, killer, chemopreventor, and maybe, tumor promoter. *J. Cell. Biochem.* 22: 74-91 Suppl.
- Williams, M. L., Elias, P. M. (1987) The extracellular matrix of stratum corneum: Role of lipids in normal and pathological function. *CRC Crit. Rev. Therap. Drug Carrier Systems* 3: 95-122
- Wohlrab, J. (1995) *Der Einfluß liposomaler Lipide auf das Proliferationsverhalten humaner Keratinozyten.* Dissertation, Med. Fak., Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
- Wohlrab, W. (1984) The influence of urea on the penetration kinetics of topically applied corticosteroids. *Acta Derm. Venereol.* 64 (3): 233-238
- Wohlrab, W. (1988) Der Einfluß von Harnstoff auf die Wasserbindungskapazität der menschlichen Hornschicht. *Dermatol. Monatsschr.* 174: 622-627
- Wohlrab, W. (1989) Bedeutung von Harnstoff in der externen Therapie. *Hautarzt* 40: 35-41, Suppl. 9
- Wohlrab, W. (1990a) Simultane Bestimmung der Harnstoff- und Hydrokortisonpenetration in die menschliche Haut. *Dermatol. Monatsschr.* 176: 139-143
- Wohlrab, W. (1990b) Galenik und Pharmakologie von Harnstoffpräparaten. *Dt. Derm.* 38: 619-625
- Wohlrab, W. (1992) Einführung Neurodermitis und Harnstoff. *Hautarzt* 43: 1-4, Suppl. 9
- Wohlrab, W., Lasch, J. (1989) Penetration kinetics of liposomal hydrocortisone in human skin. *Dermatologica* 174: 18-22
- Wohlrab, W., Lasch, J., Laub, R., Taube, C. M., Wellner, K. (1992) Distribution of liposomal-encapsulated ingredients in human skin ex vivo In: Braun-Falco, O., Korting, H. C., Maibach, H. I. *Liposome Dermatics Griesbach Conference*, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg
- Wohlrab, W., Lasch, J., Taube, K. M., Wozniak, K. J. (1989) Hautpermeation von liposomal inkorporiertem Hydrocortison. *Pharmazie* 44: 333-335

Wokalek, H. (1992) Die Haut. In: Niedner, R., Ziegenmeyer, J. (Hrsg.) Dermatika. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart

Woodfort, R., Barry, B. W. (1986) Penetration enhancers and the percutaneous absorption of drugs: An update. *J. Toxicol. Cutaneous Ocul. Toxicol.* 5: 165-175

Wright, N., Alison, M. (1984) The biology of epithelial cell populations. Bd. 1. Clarendon Press, Oxford

Yamada, M., Uda, Y., Tanigawara, Y. (1987) Mechanism of enhancement of percutaneous absorption of molsidomine by oleic acid. *Chem. Pharm. Bull.* 35: 3399-3406

Zakim, D. (1996) Fatty acids enter cells by simple diffusion. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 212: 5-14

Ziegenmeyer, J. (1992) Biopharmazeutische Aspekte bei der Anwendung von Dermatika. In: Niedner, R., Ziegenmeyer, J. (Hrsg.) Dermatika. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart

ANHANG

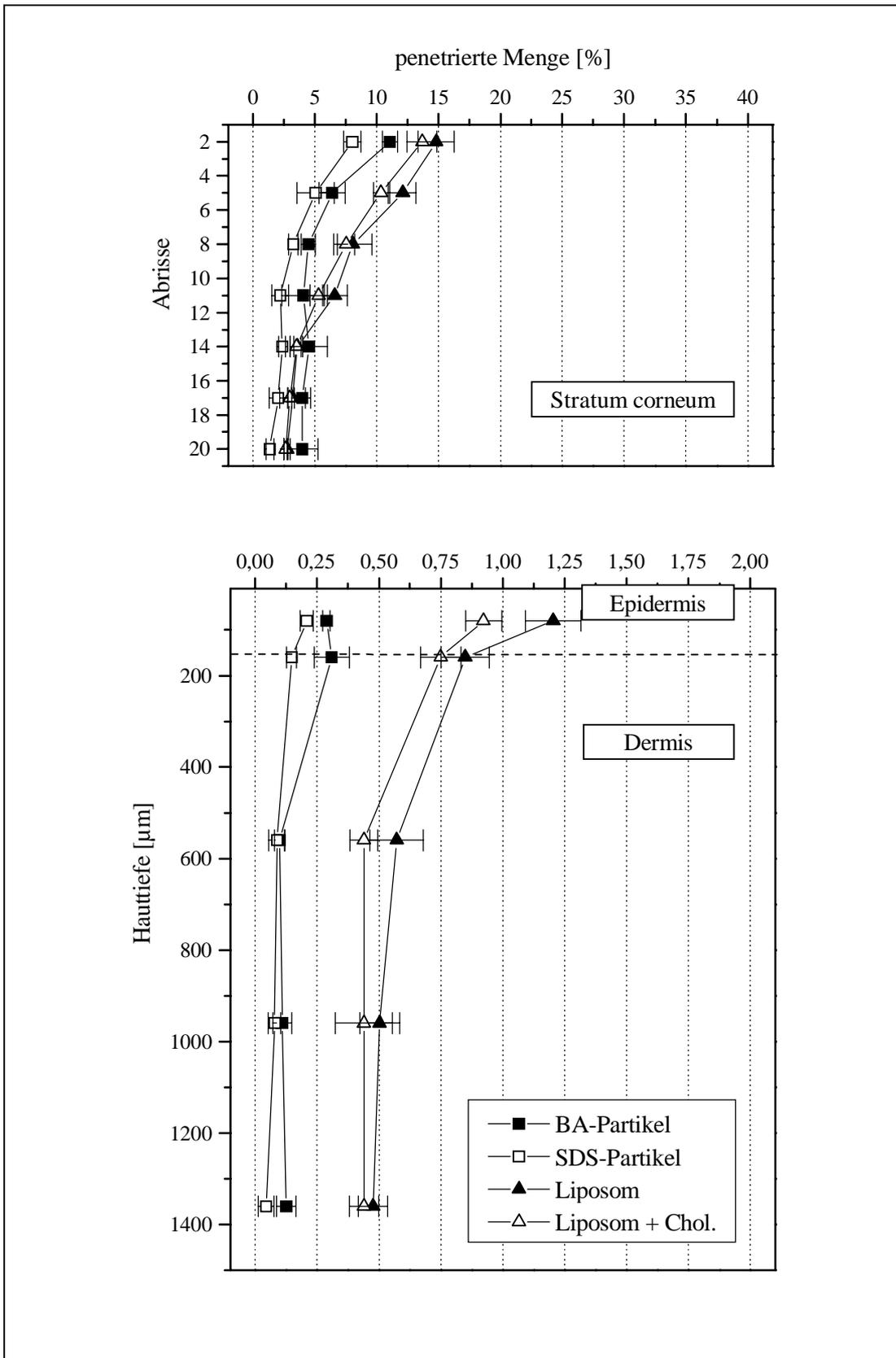


Abb. A.1 Verteilung von penetriertem Biotin aus Nanopartikeln und Liposomen in humaner Haut ex vivo 30 min nach Vehikelapplikation

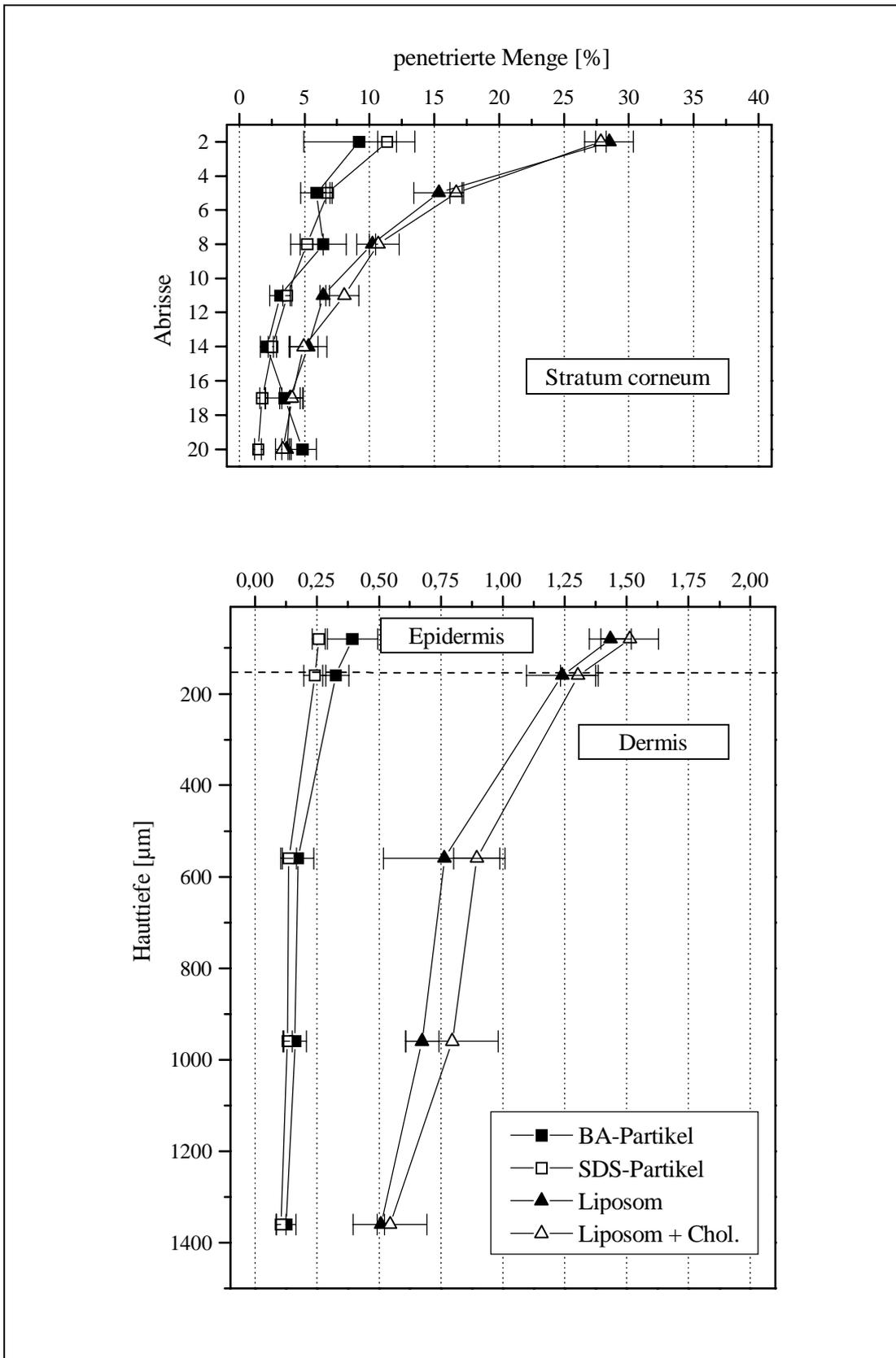


Abb. A. 2 Verteilung von penetriertem Biotin aus Nanopartikeln und Liposomen in humaner Haut ex vivo 300 min nach Vehikelapplikation

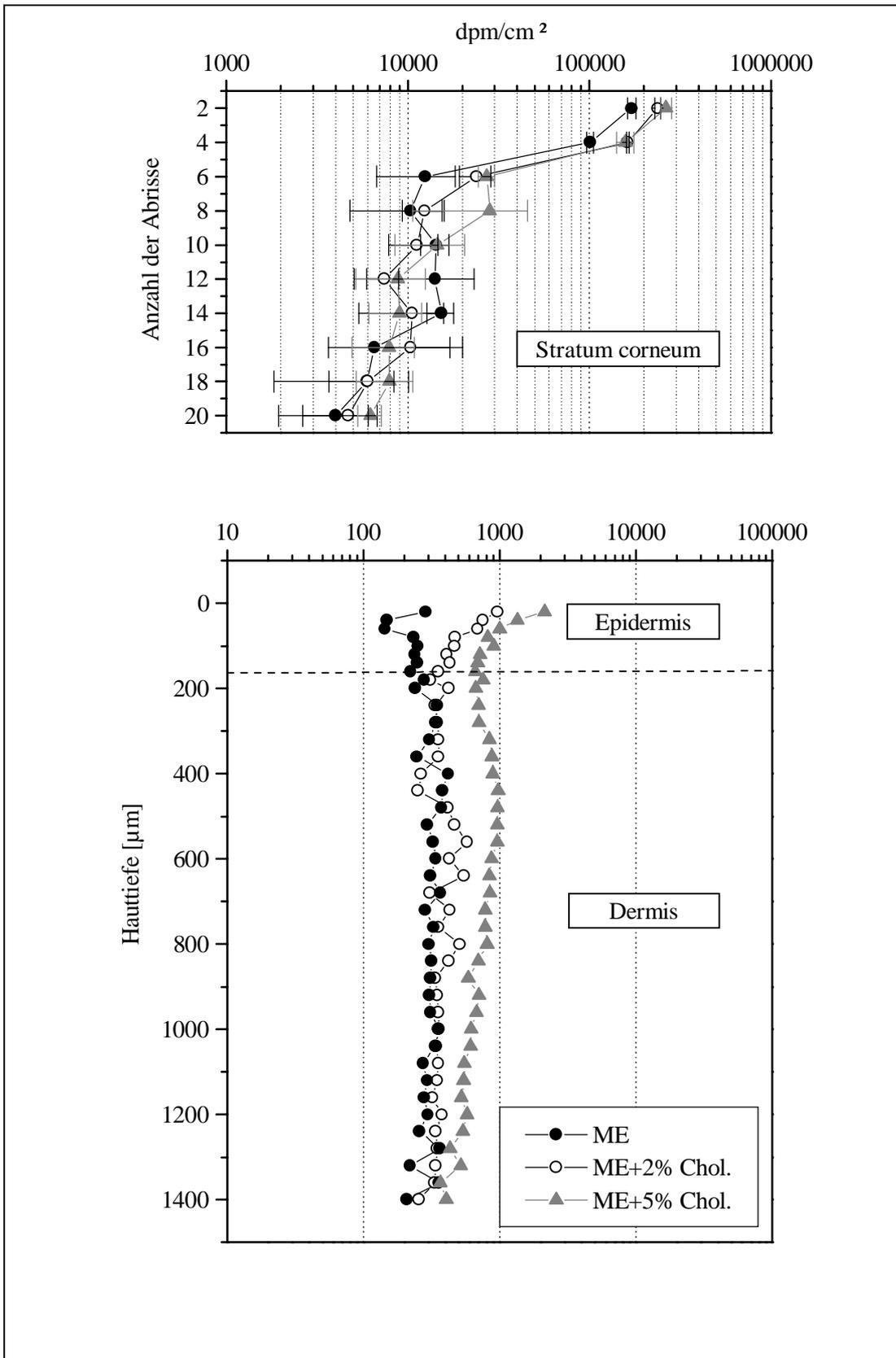


Abb. A. 3 Verteilung von penetriertem Biotin aus Mikroemulsionen in humaner Haut ex vivo 30 min nach Vehikelapplikation

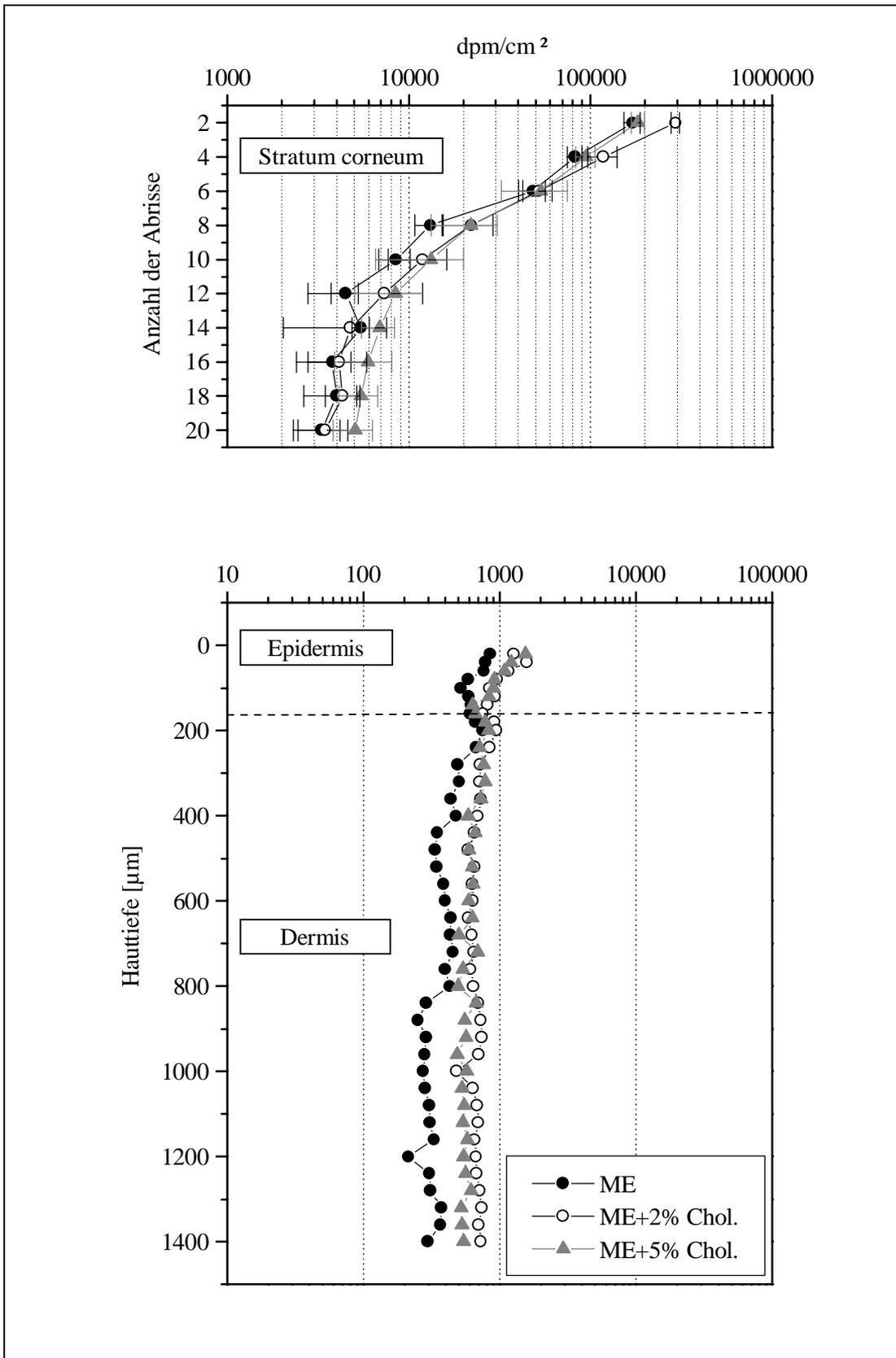


Abb. A. 4 Verteilung von penetriertem Biotin aus Mikroemulsionen in humaner Haut ex vivo 300 min nach Vehikelapplikation

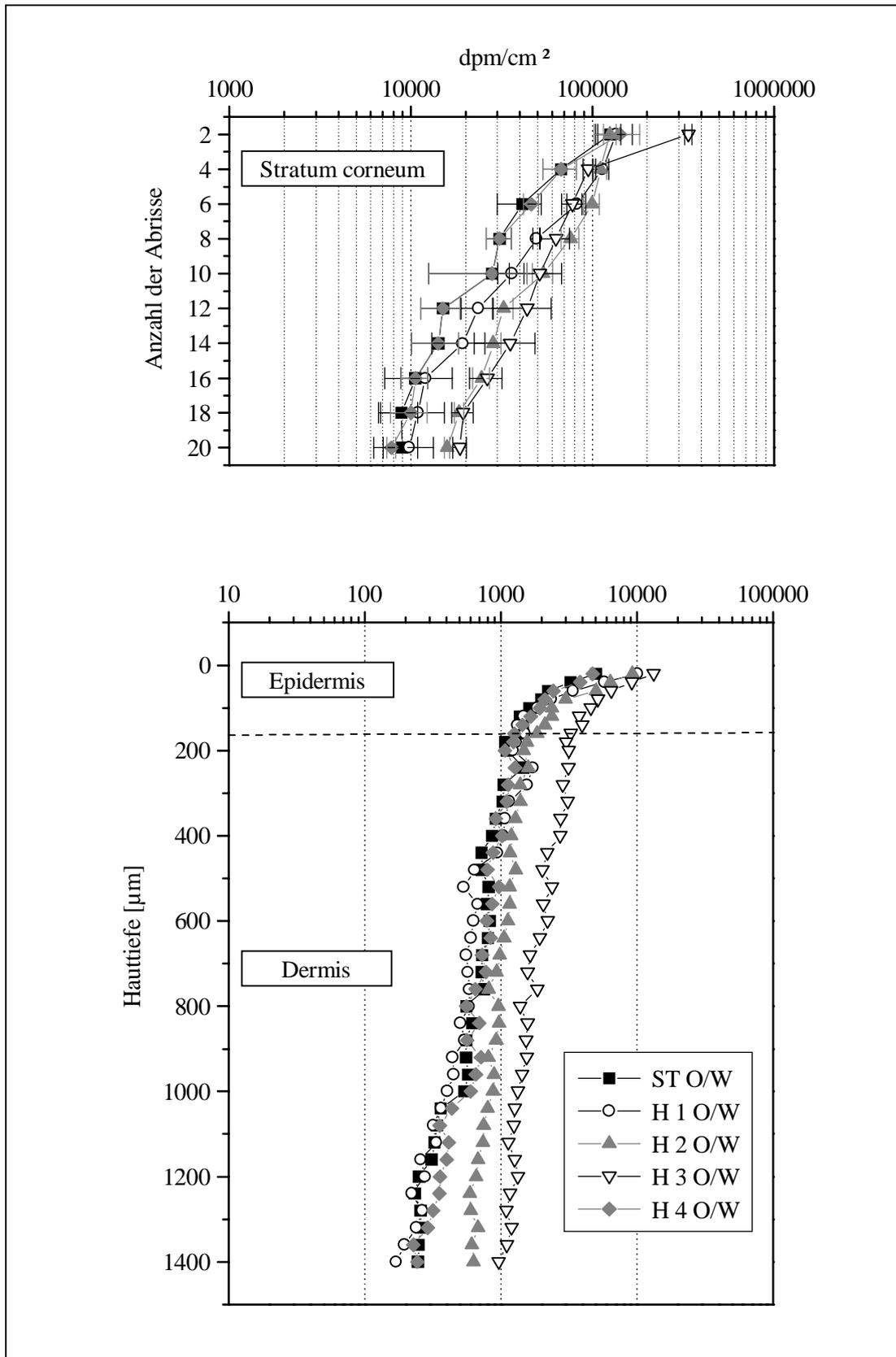


Abb. A. 5 Verteilung von penetriertem Biotin aus O/W-Emulsionen mit Hyaluronidase in humaner Haut ex vivo 30 min nach Vehikelapplikation

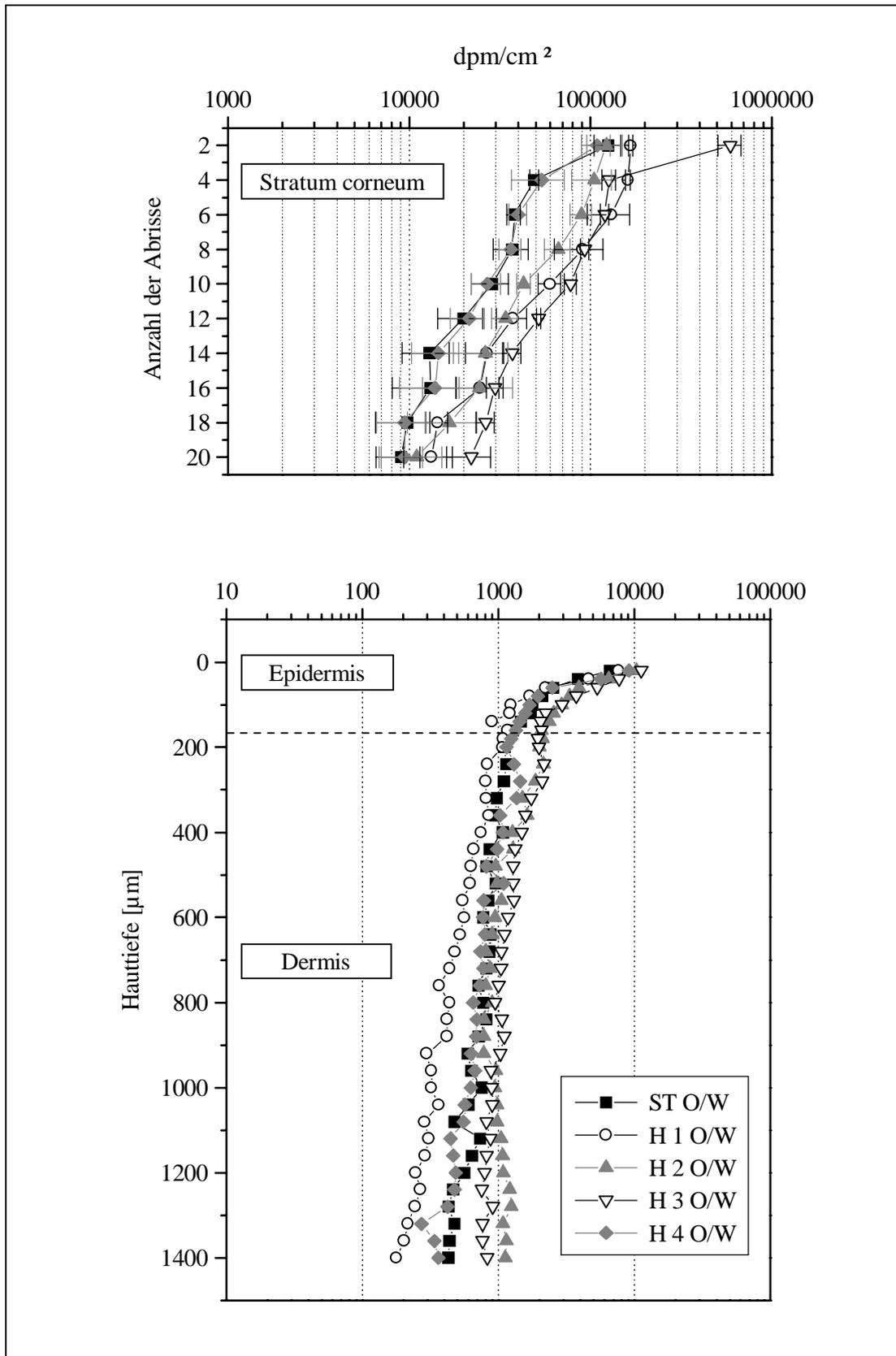


Abb. A. 6 Verteilung von penetriertem Biotin aus O/W-Emulsionen mit Hyaluronidase in humaner Haut ex vivo 300 min nach Vehikelapplikation

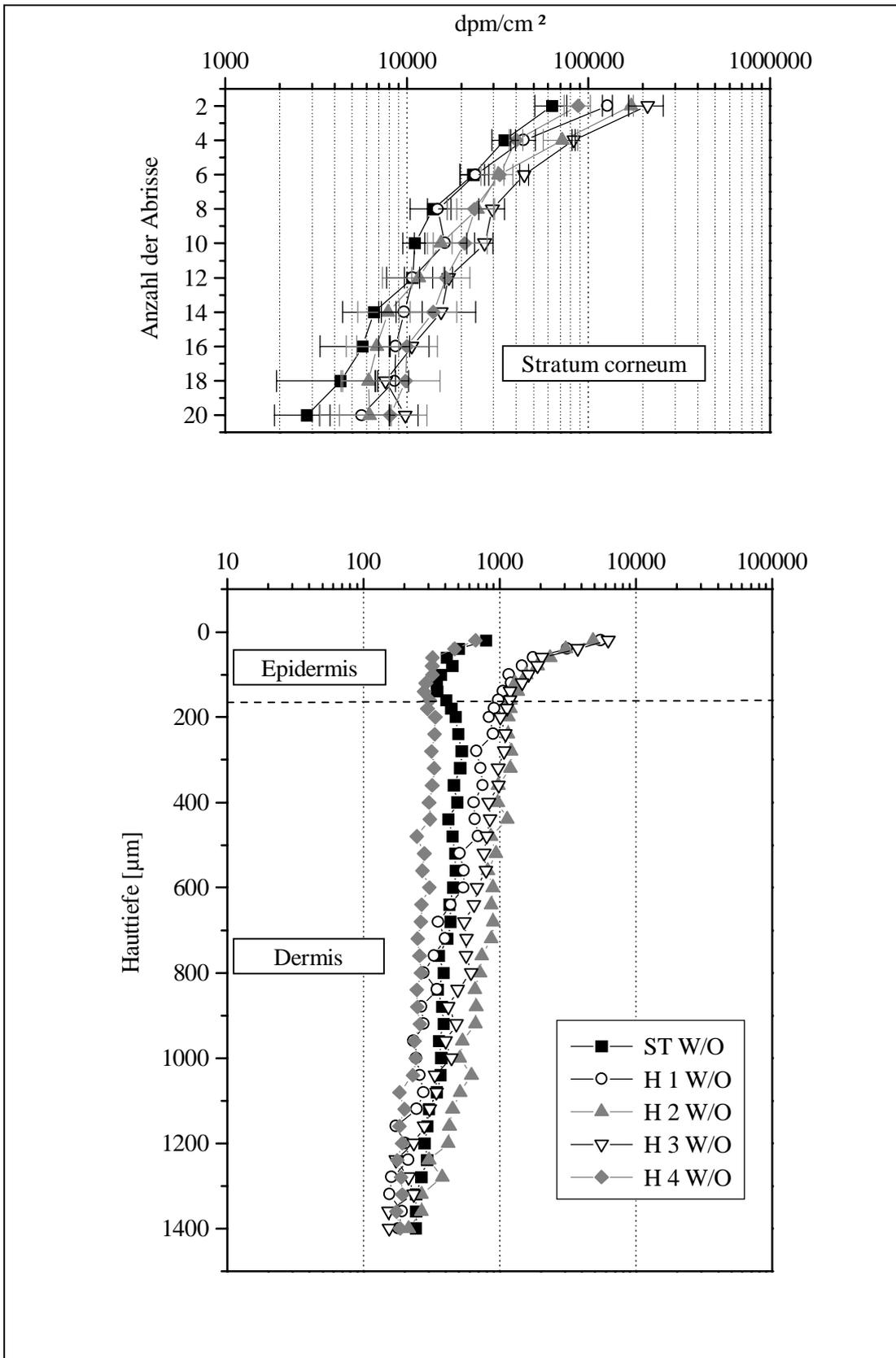


Abb. A. 7 Verteilung von penetriertem Biotin aus W/O-Emulsionen mit Hyaluronidase in humaner Haut ex vivo 30 min nach Vehikelapplikation

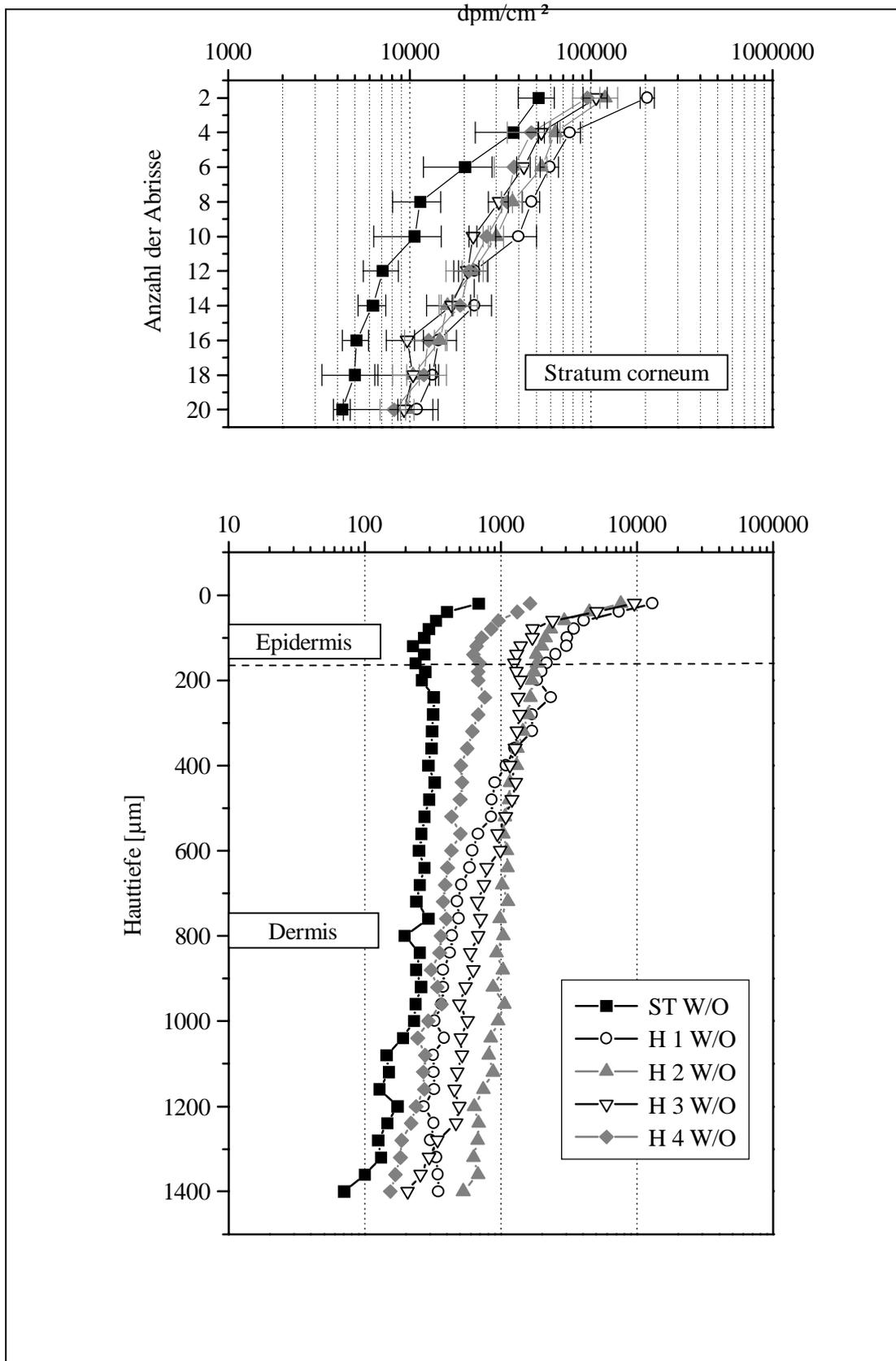


Abb. A. 8 Verteilung von penetriertem Biotin aus W/O-Emulsionen mit Hyaluronidase in humaner Haut ex vivo 300 min nach der Applikation

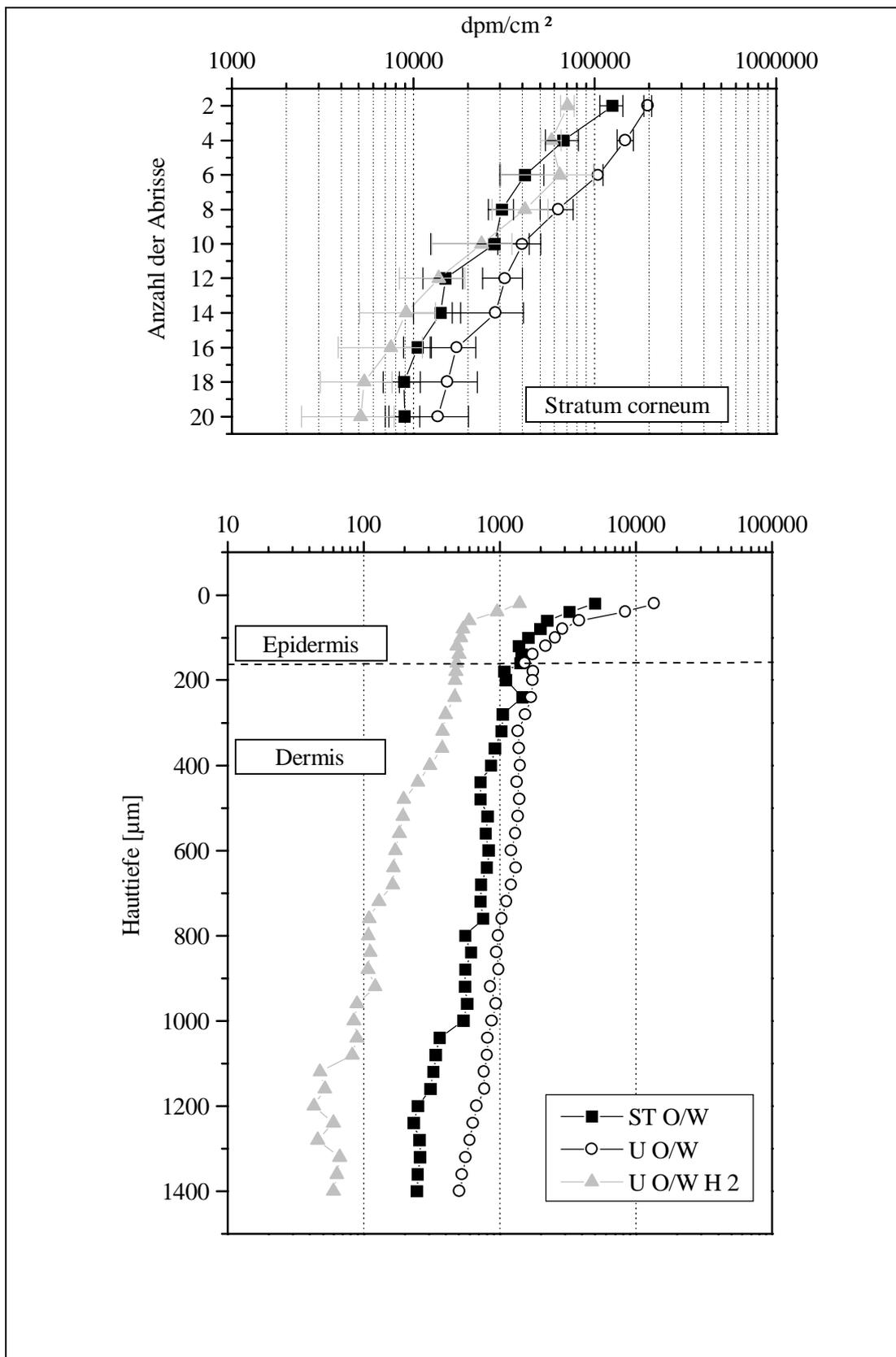


Abb. A. 9 Verteilung von penetriertem Biotin aus modifizierten O/W-Emulsionen in humaner Haut ex vivo 30 min nach der Applikation

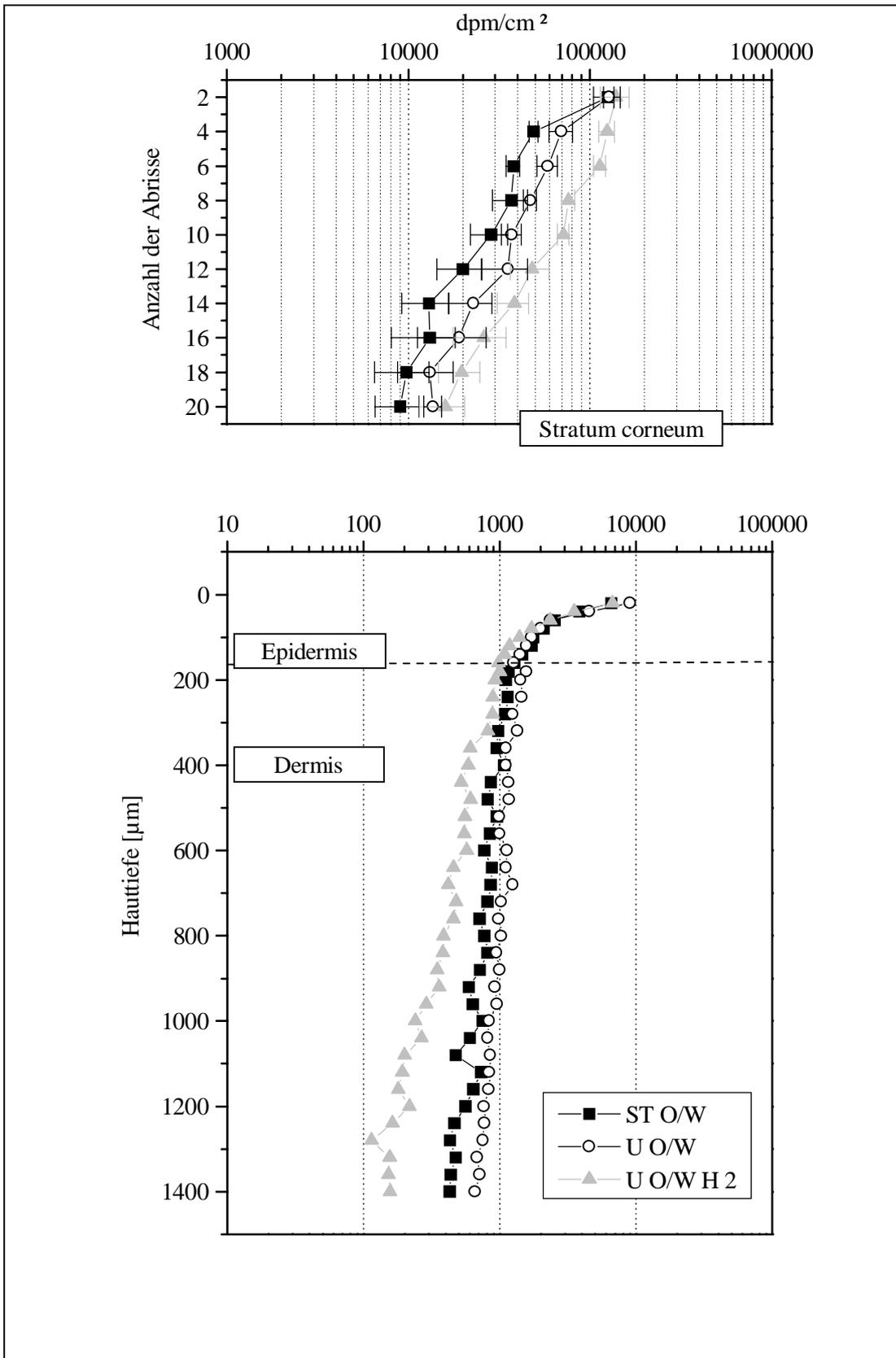


Abb. A. 10 Verteilung von penetriertem Biotin aus modifizierten O/W-Emulsionen in humaner Haut ex vivo 300 min nach der Applikation

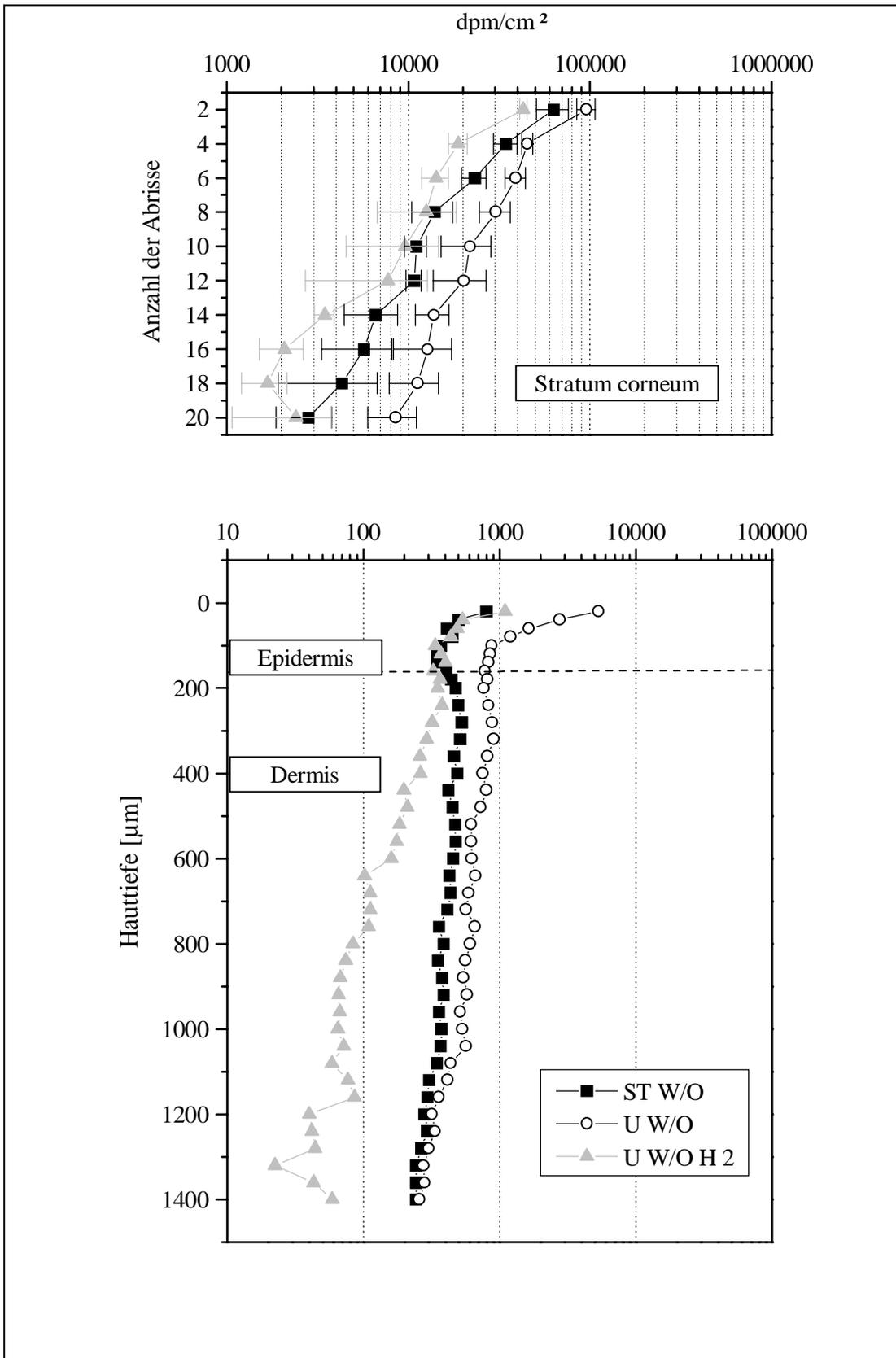


Abb. A. 11 Verteilung von penetriertem Biotin aus modifizierten W/O-Emulsionen in humaner Haut ex vivo 30 min nach der Applikation

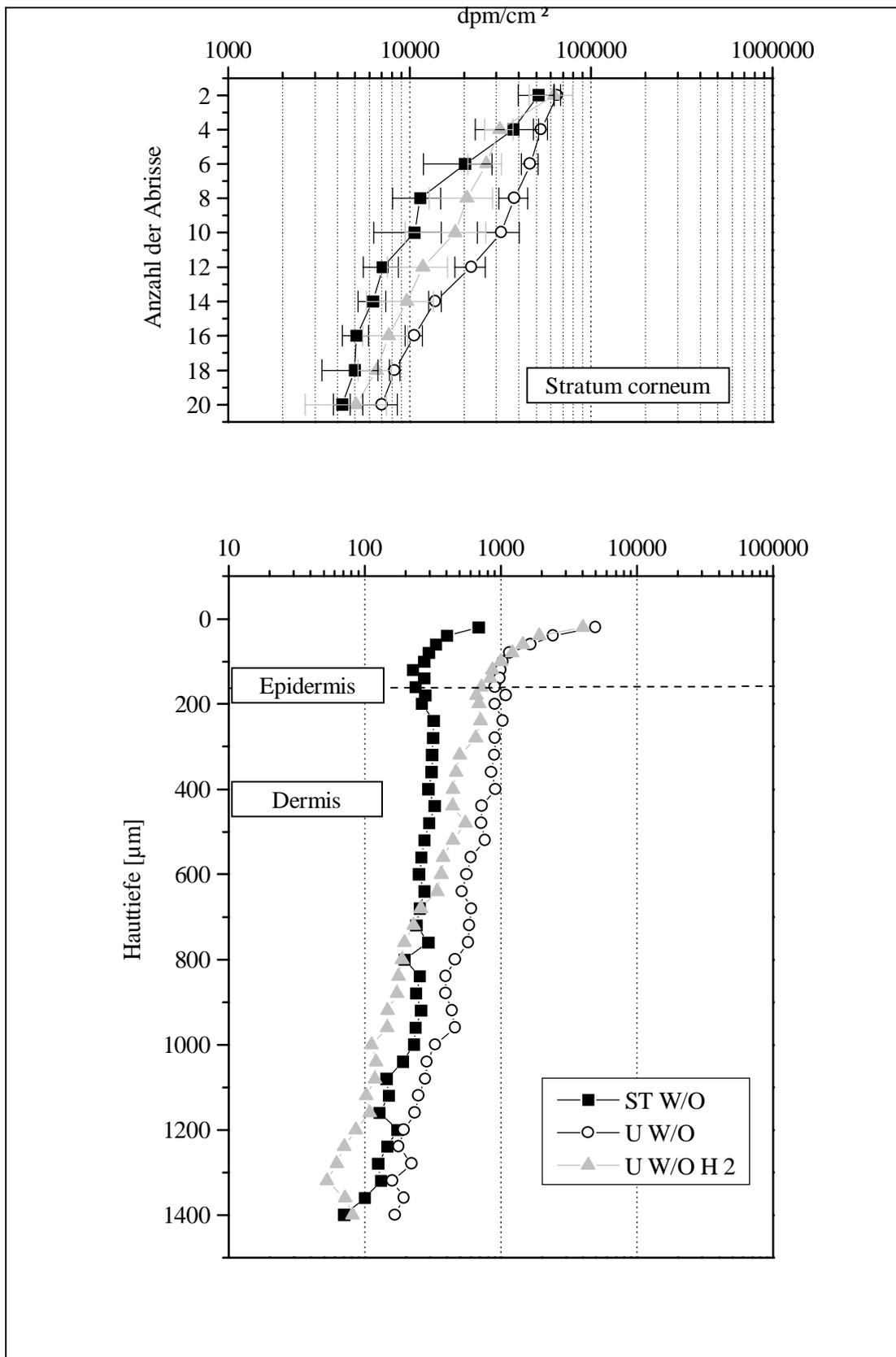


Abb. A. 12 Verteilung von penetriertem Biotin aus modifizierten W/O-Emulsionen in humaner Haut ex vivo 300 min nach der Applikation

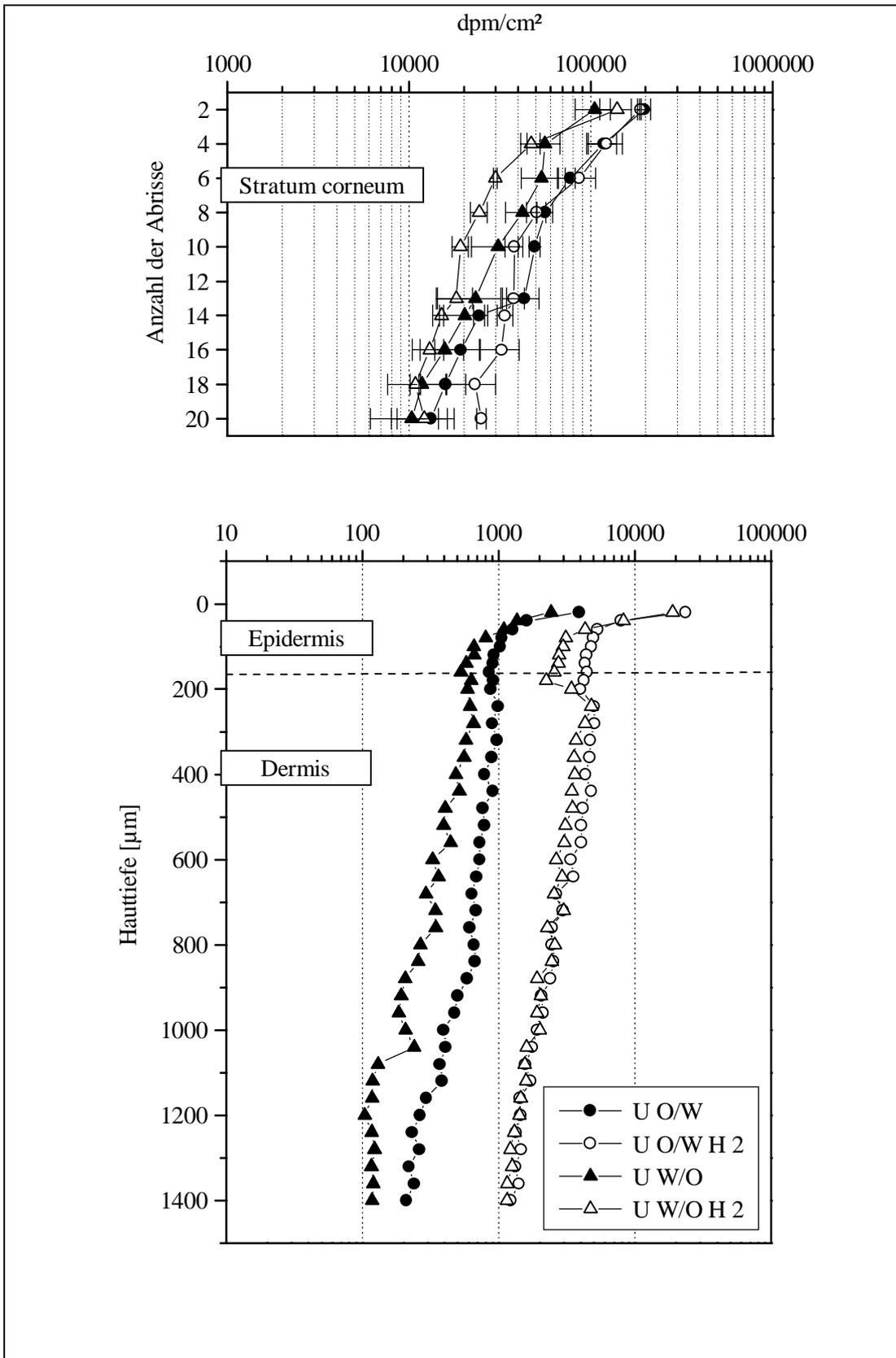


Abb. A. 13 Verteilung von penetriertem Harnstoff aus modifizierten W/O- und O/W-Vehikeln in humaner Haut ex vivo 30 min nach der Applikation

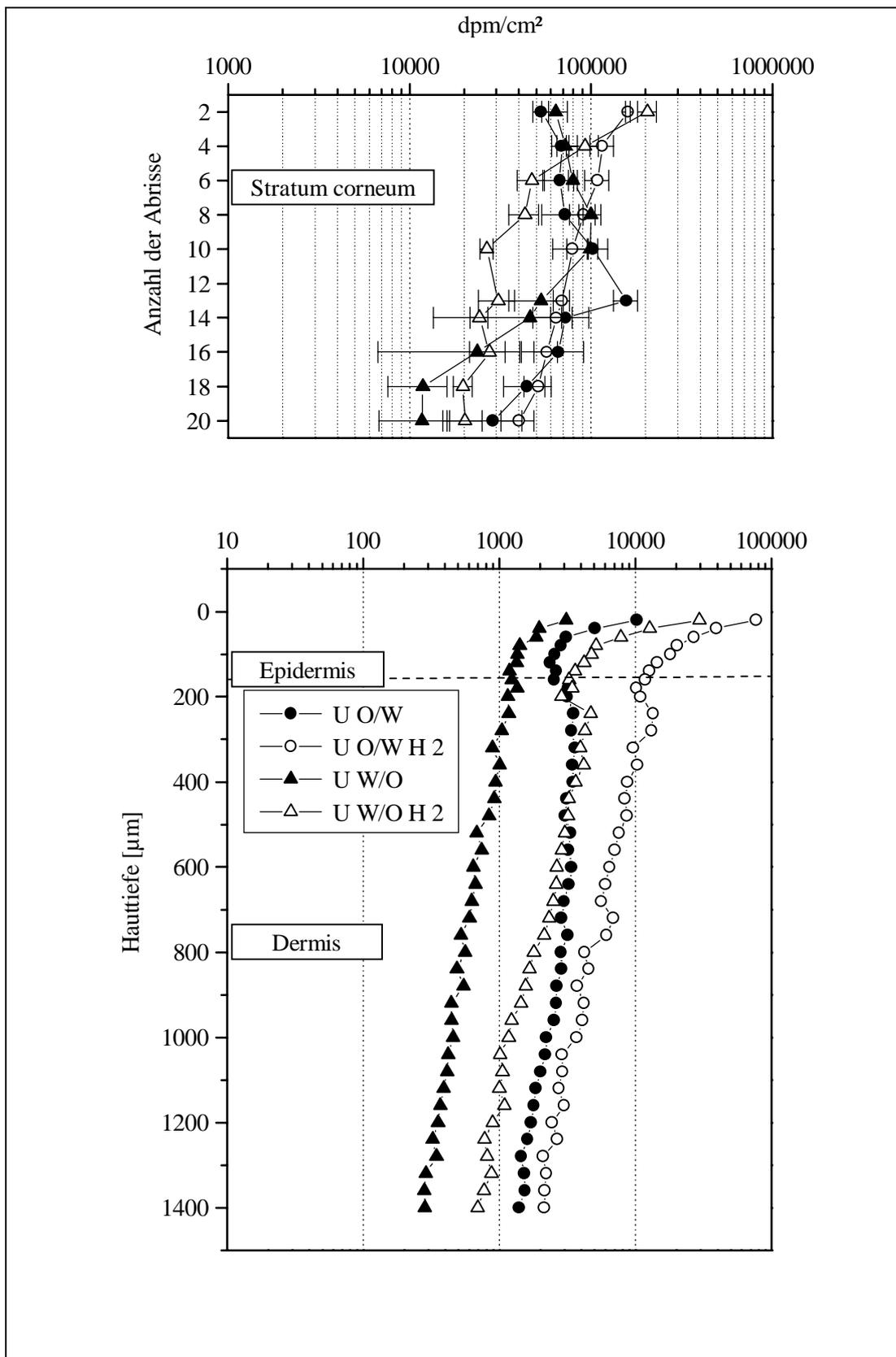


Abb. A. 14 Verteilung von penetriertem Harnstoff aus modifizierten W/O- und O/W-Vehikeln in humaner Haut ex vivo 300 min nach der Applikation

Lebenslauf

Lebenslauf

Name : Christoph Huschka

Geburtstag : 08.02.1969

Geburtsort : Naumburg / Saale

Familienstand : verheiratet mit Beate Huschka, geb. Rzehak

Nationalität : deutsch

Eltern : Adolf Huschka, geb. am 22.10.1936, gest. am 07.02.1994
Tischlermeister - Pianobauer
Helena Huschka, geb. Kicsiny, geb. am 06.10.1936
gelernte Finanzbuchhalterin, jetzt Rentnerin

Geschwister : Elisabeth Pflüger, geb. Huschka, geb. am 05.04.1964
Diplommusikpädagogin, Diplom im Fach Klavier

Schulbildung :

09/1975-08/1985 Polytechnische Oberschule „ Maxim Gorki “ Schkölen

09/1985-08/1987 Erweiterte Oberschule „ Lilo Herrmann “ Eisenberg

Wehrpflicht :

11/1987-04/1989 Grundwehrdienst in der NVA der DDR

Berufsausbildung :

09/1987-10/1987 sowie 05/1989-07/1989 Berufspraktikum in der Stadt-Apotheke Eisenberg

09/1989-08/1993 Studium der Pharmazie, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

08/1993 Zweiter Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung

09/1993-03/1994 Pharmaziepraktikum Steintor-Apotheke Halle

04/1994-09/1994 Diplom, Institut für Pharmazeutische Technologie und Biopharmazie

10/1994 Dritter Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung
Approbation als Apotheker

seit 02/1995 Doktorand in der Klinik und Poliklinik für Hautkrankheiten
Mitglied im Graduiertenkolleg “Transport von Wirkstoffen in biologischen Systemen “
assoziiertes Mitglied im Sonderforschungsbereich 197/A8 Bio- und Modellmembranen “Beeinflussung der Lipidorganisation des Stratum corneum zur Modulation der Barrierefunktion und der Wirkstoffpenetration in humane Haut“

Hiermit erkläre ich an Eides statt, daß ich andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommene Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Christoph Huschka

Halle (Saale), 14.08.98