

2. Grundlagen

In Anbetracht der Zielstellungen und der Aufgaben dieser Arbeit sollen im Folgenden die wesentlich eingesetzten Materialien und Methoden erläutert und deren Relevanz für die durchgeführten Untersuchungen aufgezeigt werden.

2.1 Die humane Haut

Die Haut grenzt als lebenswichtiges Organ den Organismus schützend von seiner Umwelt ab. Mit einer Fläche von 1,5 – 2,0 m² beim Erwachsenen und einer Masse von etwa 7 bis 10 % des Körpergewichtes ist die Haut das größte Organ des Menschen (Franz und Lehman 2000, Odland 1991, Wohlrab 2001). Sie besitzt eine hochspezialisierte Schutzfunktion gegenüber der Außenwelt und prägt das individuelle Erscheinungsbild des Menschen wesentlich mit. Als Barriere steuert sie die Wasserabgabe, verhindert die Austrocknung und das Eindringen von Substanzen. Die Haut schützt den Menschen sowohl vor mechanischen und chemischen Einflüssen als auch vor schädigender UV-Strahlung. Des Weiteren reguliert sie die Wasserabgabe und den Wärmehaushalt. Sie besitzt Absonderungs- und Stoffwechselfunktionen. Die Haut weist eine Vielzahl von Temperatur- und Schmerzrezeptoren auf, über die sie thermische Reize, Berührungen und Schmerzen wahrnimmt. Sie besitzt einen sauren pH-Wert, der im Allgemeinen zwischen pH 5,0 und 6,0 liegt. Durch diesen Säureschutzmantel wirkt sie aktiv gegen das Eindringen fremder Keime (Marchioni und Hausknecht 1938). Diese vielfältigen Funktionen kennzeichnen die große Bedeutung der Haut für den Gesamtorganismus.

2.1.1 Allgemeiner anatomischer Aufbau

Durch einen komplexen, hoch organisierten und stark strukturierten Aufbau kann die Haut ihren vielfältigen Aufgaben Rechnung tragen.

Sie lässt sich histologisch in drei, jeweils weiter differenzierbare, Schichten gliedern (Abb. 1). Den äußeren Teil bildet die mehrschichtige, nicht durchblutete Epidermis (Oberhaut). Ihre Dicke kann zwischen 30 µm an den Augenlidern und 1,6 mm an den Hand- und Fußsohlen variieren. Sie besteht neben der bedeutendsten Zellart der Oberhaut, den Keratinozyten, weiterhin aus den für die Pigmentierung verantwortlichen Melanozyten, den zum Immunsystem gehörenden Langerhans-Zellen und den Merkel Zellen, bei denen eine Funktion als Mechanorezeptoren diskutiert wird (Franz und Lehman 2000, Wohlrab 2001).

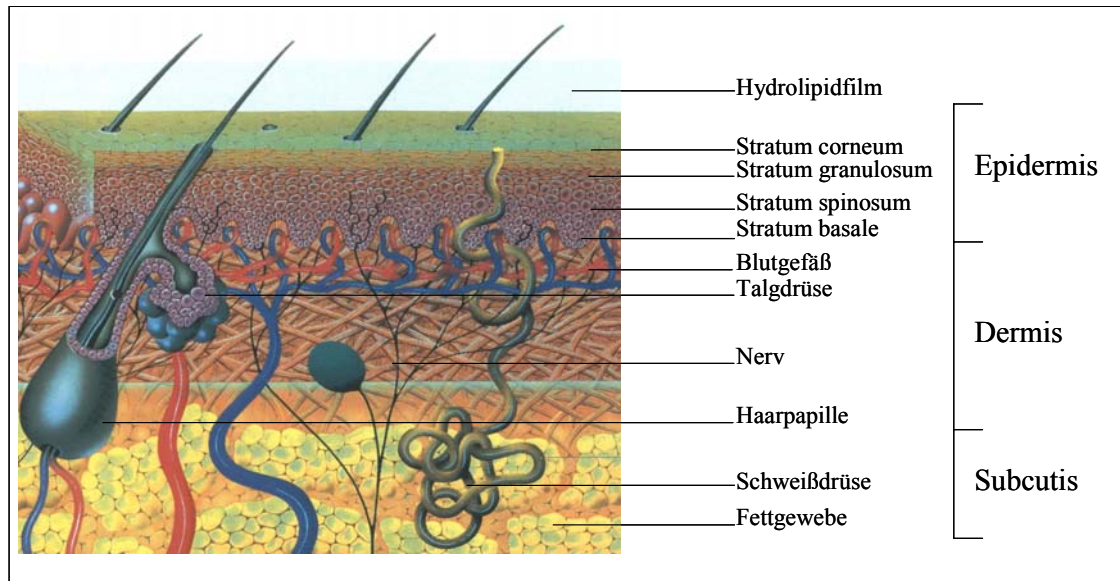


Abb. 1: Die menschliche Haut schematisch (modifiziert nach Hermal 1999)

Die Epidermis wird durch die Basalmembranzzone von der darunter befindlichen Dermis (Lederhaut, Corium) abgetrennt. Die Dermis ist eine bindegewebsreiche Schicht, welche hauptsächlich aus den Fibrinproteinen Kollagen und Elastin aufgebaut ist, die gemeinsam mit zellulären Bestandteilen in eine amorphe Grundsubstanz aus Mucopolysacchariden eingebettet sind. Die Dermis lässt sich in zwei Schichten unterteilen. Während die obere, dünnere Schicht, der Papillarebereich, aus zahlreichen Kapillargefäßen, Lymphräumen und Nervenfasern besteht, enthält die darunterliegende Schicht, das Stratum reticulare, das eigentliche Stütz- und Bindegewebe. Die perkutane Absorptionsrate von Stoffen kann ebenfalls durch die Blutzirkulation in der Haut beeinflusst werden, einerseits wenn die Substanzen gut durch das Stratum corneum permeieren oder andererseits, wenn die Haut verletzt und somit die Barriereeigenschaften vermindert sind (Riviere und Williams 1992). Zu den in der Dermis vorkommenden Zelltypen zählen Fibroblasten, Mastzellen, Histiozyten, Leukozyten und Lymphozyten. Die Subcutis (Unterhaut), welche ein lockeres Bindegewebe darstellt, in das Fettgewebe läppchenförmig eingelagert ist, schließt sich unter der Dermis an. Sie dient sowohl der Nährstoff- und Wasserspeicherung, als auch dem mechanischen- und Wärmeschutz.

2.1.2 Das Stratum corneum

Die größte Barrierefunktion besitzt das äußere Abschlussgewebe der Epidermis, das nichtlebende Stratum corneum (Franz und Lehman 2000). Es ist das Endprodukt des epidermalen Differenzierungsprozesses. Das so genannte „brick and mortar“-Modell dient vielfach der Veranschaulichung der Funktionsstruktur des Stratum corneum. Es

beschreibt die Anordnung der ziegelsteinartig in eine besonders zusammengesetzte Lipidmatrix eingebetteten Keratinozyten (Michaels et al. 1975).

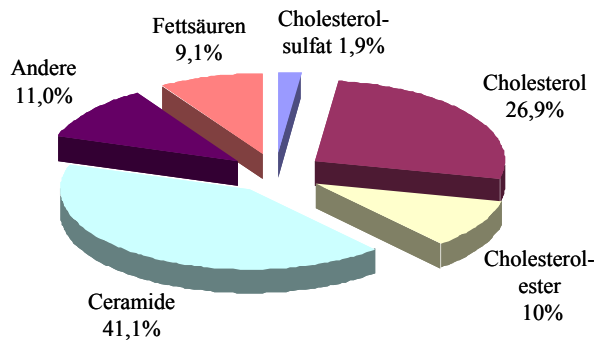


Abb. 2: Zusammensetzung der Lipide des humanen Stratum corneum (Wertz und Downing 1991)

Diese Lipidmatrix (Abb. 2) setzt sich aus Ceramiden, Cholesterol, Cholesterolestern und freien Fettsäuren zusammen (Downing et al. 1983). Besonders auffällig ist, im Unterschied zu anderen Biomembranen, die fast völlige Abwesenheit von Phospholipiden. Eine differenzierte Version des „Ziegelstein-Mörtel-Modells“ wurde 1994 von Forslind unter der

Bezeichnung „domain mosaic model“ vorgestellt, welches davon ausgeht, dass kristalline Domänen über Lipide flüssigkristalliner Phasen verbunden sind (Forslind 1994). Diesem Modell entsprechend erfolgen Diffusionsprozesse entlang fluider Domänen. Zwei weitere Modellvarianten wurden von Norlen bezüglich der Ausformung „membrane folding model“ und der Struktur und Funktion der Hautbarriere „single gel phase model“ vorgeschlagen (Norlen 2001 a,b).

Das Stratum corneum unterliegt einem ständig ablaufenden Erneuerungsprozess. Die Keratinozyten der Epidermis werden im Stratum basale gebildet und durchlaufen einen Differenzierungsprozess, bis sie als Hornzellen an der Hautoberfläche abgestriffen werden. Lateral und apikal sind die basalen Keratinozyten durch zahlreiche Desmosomen mit den Nachbarzellen verknüpft (Chambers und Renyi 1925). Des Weiteren wird der Zusammenhalt der Keratinozyten durch eine gegenseitige hakenartige Verzahnung der Zellen, die als so genannte „hook like structure“ bezeichnet wird, gefestigt (Wepf 2003). Die Zahl der Desmosomen nimmt zu den oberen Zellschichten des Stratum corneum hin ab. Dadurch wird die Festigkeit der Zellverbände geringer und die äußeren Zellen können leicht abgelöst werden. Der Zeitraum, bis eine Zelle vom Stratum granulosum bis an die Oberseite der Hornschicht wandert und abgestriffen wird, beträgt durchschnittlich 14 Tage (Franz und Lehman 2000, Rothberg et al. 1961). Die epidermale Lipidsynthese erfolgt im Stratum spinosum in so genannten „Odland-Körpern“. Diese befinden sich innerhalb der Zellen. Beim Übergang von der lebenden Epidermis zum Stratum corneum erfolgt die exozytotische Ausschleusung der Lipide der Odland-Körper in den Interzellularraum.

Die zwischen den in 15 bis 25 Zellschichten dicht angeordneten, kernlosen Hornzellen (Korneozyten) befindlichen Lipide nehmen nur etwa 15% der Gesamtmasse des Stratum corneum ein (Flynn 1985).

Die Lipidmatrix ist jedoch hauptsächlich für die Barrierefunktion des Stratum corneum, welches eine effektive Begrenzung sowohl für den Wasserverlust als auch für die

Penetration exogener Substanzen darstellt, verantwortlich (Blank 1952, Elias et al. 1982, Forslind et al. 1997, Golden 1987, Grubauer et al. 1992, Potts und Francoeur 1990, Williams und Elias 1987). Für die Barriereigenschaften der Hornschicht ist nicht ein einzelnes Hautlipid verantwortlich, sondern das noch nicht vollständig geklärte Zusammenspiel des vielgestaltigen Lipidsystems (Norlen et al. 1999). Die Lipide des Stratum corneum weisen eine inhomogene, tiefenabhängige Verteilung auf (Bommannan et al. 1990, Lampe et al. 1983).

Auf die Barrierehomöostase des Stratum corneum können zudem sowohl physiologischer als auch psychologischer Stress einen beeinträchtigenden Einfluss ausüben (Denda et al. 1989, 2000).

Die Hornschicht besitzt einen geringen Wassergehalt, welches eine Ursache für die besondere Barrierefunktion gegenüber hydrophilen Substanzen darstellt. Sie ist jedoch imstande, in wässriger Umgebung über 50% an Wasser aufzunehmen (Franz und Lehman 2000, Lippold 1984, Scheuplein und Morgan 1969).

Für die dermale Aufnahme von Arzneistoffen werden der interzelluläre, der transzelluläre und als Route über Hautanhangsgebilde, der transglanduläre und transfollikuläre Transportweg unterschieden. Die beiden letztgenannten Routen spielen aufgrund des geringen betragenden Oberflächenanteils von maximal 1% eine eher untergeordnete Rolle (Franz und Lehman 2000). Wiechers beschrieb den Anteil der Haarfollikel und Drüsen an der Gesamthautoberfläche sogar mit unter 0,1% (Wiechers 1989). Die An- oder Abwesenheit von Haarfollikeln und Drüsen beeinflusst den Angaben dieser Arbeit zufolge den Betrag der perkutanen Absorption nicht signifikant (Wiechers 1989). Seit längerem wurde angenommen, dass die Penetration von Substanzen durch das Stratum corneum hauptsächlich über eine inter- oder transzelluläre Route erfolgt (Michaels et al. 1975). Hydrophile, polare Moleküle diffundieren dieser Theorie zufolge über die transzelluläre Route alternierend durch Korneozyten und extrazelluläre Lipiddoppelschichten. Für Arzneistoffe mit lipophileren Eigenschaften wurde die Diffusion über die lipidreiche interzelluläre Route angenommen. Permeanten wurden in den interzellulären Domänen des Stratum corneum von Nemanic und Elias und Bodde et al. nachgewiesen (Nemanic und Elias 1980, Bodde et al. 1991). Der Diffusionsweg von Wasser durch das Stratum corneum ist um ein Vielfaches größer als die eigentliche Stratum corneum Dicke. Diese Feststellung unterstützt das Vorliegen einer interzellulären Route (Potts und Francoeur 1990, 1991). Demgegenüber stehen Untersuchungen, in denen der Diffusionsweg von 4-Cyanophenol durch das Stratum corneum bestimmt wurde. Die hierbei ermittelten Werte lagen viel näher an der Dicke der Hornschicht und warfen somit erneut die Frage nach der Relevanz einer transzellulären Penetration auf (Pellett et al. 1997). Diese Ergebnisse wurden jedoch später angezweifelt und hingegen dargestellt, dass Pellett et al. anhand ihrer Ergebnisse nicht eindeutig auf den Diffusionsweg im Stratum corneum schließen können (Bunge et al. 1999). Untersuchungen auf die Permeabilität von

Salicylsäure und Wasser durch das Stratum corneum zeigten, dass die Anzahl der Zellschichten nicht allein die Diffusionsgeschwindigkeit beeinflusst, sondern die Lipidzusammensetzung der Hornschicht einen entscheidenden Einfluss auf die Permeabilität besitzt (Elias et al. 1981).

Menon, Elias und Ghadially wiesen darauf hin, dass extrazelluläre dynamische Reservoirs, die als „lacunar domains“ bezeichnet werden, eine wichtige Penetrationsroute für exogene Substanzen darstellen und dass sowohl polare als auch unpolare Substanzen interzellulär durch das Stratum corneum diffundieren (Menon et al. 1994, Menon und Ghadially 1997). Auch weitere Untersuchungen gehen von einem interzellulär lokalisierten polaren Transportweg aus, wonach die polare Route wässrige Regionen enthält, welche von polaren Lipiden umgeben sind, die die Wände so genannter Mikrokanäle bilden (Sznitowska et al. 1998). Die Penetrationsrate polarer Moleküle ist sehr klein. Es wird angenommen, dass die Lipidbarriere des Stratum corneum zwei parallele Penetrationswege enthält, die lipoidale Route und den hydrophilen polaren Weg, welcher über einen noch nicht exakt bekannten Porenmechanismus verläuft (Hatanaka et al. 1994, Manabe et al. 2000, Peck et al. 1995, Sznitowska und Berner 1995, Tezel et al. 2003). Kürzlich postulierte Mitragotri ein Modell, in welchem er vier mögliche Routen des Arzneistofftransportes durch das Stratum corneum vorschlägt, um das Permeationsverhalten sowohl von lipophilen als auch von hydrophilen Stoffen zu beschreiben (Mitragotri 2003). Dabei wird zwischen einer freien Volumendiffusion durch Lipidbilayer, der lateralen Diffusion entlang der Lipidbilayer, einer Diffusion durch wässrige Poren und der Diffusion durch so genannte Shunt's unterschieden. Diese Theorie beinhaltet, dass hydrophile Substanzen durch vereinfacht als Poren beschriebene Fehlstellen in den Lipidbilayern diffundieren. Dies zeigt, dass über den genauen Mechanismus, wie Xenobiotika das Stratum corneum permeieren, vielfältig diskutiert wird. Vorherrschend wird jedoch die Auffassung einer dominierenden interzellulären Route vertreten. Für die topische Anwendung ist vielfach neben dem Ausmaß, die Geschwindigkeit des Arzneistoffes von Interesse, mit der dieser die äußere Hautschicht passiert. Aufgrund der komplexen Hautstruktur und der vielfältigen Diskussion über Diffusionswege für Arzneistoffe durch das Stratum corneum wird selbiges vereinfacht als eine Membran mit dazugehöriger Schichtdicke angesehen. Diese Annahme wurde bereits von Kalia et al. für Diffusionsuntersuchungen getätigt (Kalia et al. 2001). Von Interesse ist hierbei, wie schnell ein dermal applizierter Arzneistoff effektiv von der Oberseite des Stratum corneum zur Unterseite diffundiert. Die Diffusion durch diese Barriere soll mit einer hierfür entsprechend entwickelten spektroskopischen Methode nichtinvasiv in Realzeit charakterisiert werden.

2.2 Harnstoff

Harnstoff (Carbamid, Urea) zählt unter den Naturstoffen, die seit langem sowohl in der externen Therapie von Hauterkrankungen als auch zu kosmetischen Zwecken eingesetzt werden, zu den bekanntesten. Als Bestandteil des Urins ist die Anwendung zur Wundbehandlung seit vorchristlicher Zeit bekannt. Die zahlreichen auf dem Markt befindlichen harnstoffhaltigen Präparate sind ein Indiz für die Zunahme der vielfältigen Anwendung von Harnstoff in den letzten beiden Jahrzehnten. Die Substanz wurde durch die Beschreibung ihrer bakteriziden Wirkung und die Anwendung bei Wunden durch Symers und Kirk 1915 (Symers und Kirk 1915) sowie durch die von Robinson 1936 geschilderten wundreinigenden Effekte populär (Robinson 1936). Die lindernden und heilenden Eigenschaften von harnstoffhaltigen Cremes wurden 1943 von Rattner zur Behandlung des Handekzemes beschrieben (Rattner 1943). Durch die Einführung der Behandlung von Ichthyosis, atopischen Ekzem und Psoriasis mit 10%-igen harnstoffhaltigen Cremes regte 1968 Swanbeck eine breitere Anwendung der Substanz an (Swanbeck 1968). Die siebziger Jahre waren der Beginn einer intensiven Erforschung der Wirkung dermal applizierter harnstoffhaltiger Formulierungen von Wohlrab (Wohlrab und Schiepmann 1976). Für die Etablierung der Harnstoffanwendung in der modernen Dermatologie sind einige Aspekte von besonderer Bedeutung.

Harnstoff ist eine physiologische Substanz, die mit etwa einem Prozent in der menschlichen Haut enthalten ist. Die Herkunft in der Epidermis ist nur zum Teil bekannt. Von dieser Harnstoffgesamtmenge ist mit zwei Fünftel ein erheblicher Anteil im Schweiß enthalten (Fiedler 1977). Für den größten Teil des in der Epidermis enthaltenen Harnstoffes wird der Ursprung aus dem von Verhornungsprozessen begleiteten Eiweißabbau vermutet (Müller und Pflugshaupt 1989). Als Endprodukt des physiologischen Eiweißstoffwechsels unterliegt Harnstoff keiner weiteren Metabolisierung. Toxische Effekte und systemische Nebenwirkungen sind bei der topischen Anwendung von Harnstoff ebenso wie Photosensibilisierungs- bzw. Sensibilisierungsercheinungen nicht bekannt (Wohlrab 1992). In Einzelfällen wurde von einem kurzandauernden Brennen im Falle einer lokalen Applikation bei akutem und subakutem Ekzem, insbesondere bei der Kombination von Harnstoff mit Natriumchlorid, berichtet (Loden et al. 1999, Proksch 2000). Somit erweist sich Harnstoff als dermatologisch bewährtes, häufig angewandtes, atoxisches Pharmakon.

Insgesamt sind bei externer Applikation der Substanz mehrere Effekte bekannt, die die funktionelle und strukturelle Organisation der Haut beeinflussen können. Ein Befeuchtungseffekt der Hornschicht wird den so genannten „natural moisturizing factors“ zugeschrieben, zu denen neben weiteren Grundbestandteilen, wie Aminosäuren, Lactaten, 2-Pyrrolidon-5-carbonsäure und anorganischen Ionen, auch Harnstoff mit ca. 7% (m/m) zählt (Ziegenmeyer 1992). Sein hydrationssteigernder

Einfluss auf die Hornschicht prädestiniert Harnstoff dazu, in zahlreichen kosmetischen Formulierungen und in der Dermatologie therapeutisch zur Behandlung trockener Hautzustände eingesetzt zu werden (Bohnsack et al. 1997, Puschmann und Gogoll 1989, Wohlrab 1988, 1991a, 1992).

Diese Eigenschaft ist maßgeblich dafür verantwortlich, dass Harnstoff als Basistherapeutikum bei Ichthyosen eingesetzt wird (Schnyder 1989). Harnstoff führt in hohen Konzentrationen (20-40 % (m/m)) zur Proteinauflösung und Separierung der Zellen in der Hornschicht (Vanscheidt 1992, Proksch 2000). Aus diesem Grund kann die für solch hohe Konzentrationen nach Wohlrab (Wohlrab 2001) beschriebene keratoplastische Eigenschaft der Substanz beispielsweise zur Auflösung von Nagelplatten angewandt werden. Als Folge seiner keratoplastischen Wirkung wird Harnstoff auch als Arzneistoff bei Psoriasis zur Beeinflussung der Schuppenbildung an der Oberhaut, zur Quellung und Hornauflösung eingesetzt (Rohde 1989).

Eine Dezimierung der DNA-synthetisierenden Epidermiszellen unter Harnstoffeinfluss konnte sowohl im Tiermodell als auch an humaner Haut nachgewiesen werden (Wohlrab und Schiepmann 1976, Wohlrab 1992). Untersuchungen zur Ursache dieser proliferationshemmenden Wirkung ergaben nach lokaler Applikation am Meerschweinchenohr eine Epidermisverdünnung und eine Verminderung des ³H-Thymidinabbaus in die epidermale DNA. In späteren Studien wurde die Reduktion der epidermalen Hyperproliferation bereits bei einer 10%-igen harnstoffhaltigen Salbe bei Psoriasis belegt (Hagemann und Proksch 1996). Nach Zugabe zu Zellkulturen verursachte die antiproliferative Wirkung der Substanz einen verminderten Mitoseindex und infolge dessen ein vermindertes Wachstum der gesamten Zellpopulation (Glinos et al. 1983). Den Einfluss auf die epidermale Proliferation beschreibt Wohlrab zusammenfassend mit einer Epidermisverdünnung um circa 20%, einer Reduktion der DNA-synthetisierenden Zellen im Stratum basale um circa 45%, einer Verlängerung der Generationszeit der postmitotischen Epidermiszellen und einer Änderung im Regulationsmechanismus beim Eintritt in die DNA-Synthese oder deren Ablauf (Wohlrab 1992).

Für die Optimierung der therapeutischen Effektivität verschiedener Arzneistoffe gewinnt die penetrationsfördernde Eigenschaft von Harnstoff in Kombinationspräparaten zunehmend an Bedeutung. Diese Eigenschaft kann zum einem genutzt werden, um bei gleich bleibender Konzentration einer aktiven Substanz deren therapeutische Aktivität zu verbessern oder zum anderen, um eine gleiche therapeutische Effektivität bei deutlich geringerer Konzentration zu erreichen (Wohlrab 1984, Wohlrab 1991b). Als Ursachen für die penetrationssteigernde Wirkung von Harnstoff werden die durch Harnstoff verursachte Hydratationssteigerung der Hornschicht und seine keratoplastischen Eigenschaften diskutiert (Müller und Pflugshaupt 1989, Proksch 2000, Vanscheidt 1992, Wohlrab 1992). Folge dieser Eigenschaften sind Änderungen im strukturfunktionellen Zustand der Haut,

insbesondere der Hornschicht, die zu einer Verbesserung der Penetrationsbedingungen für viele Arzneistoffe führen. Für glucocorticoid- oder dithranolhaltige Dermatika konnte weiterhin auch eine Liberationssteigerung der Wirkstoffe aus der Grundlage durch Harnstoffzusatz nachgewiesen werden (Horsch et al. 1984, Wohlrab 1986, Wohlrab 1992).

Auf die antimikrobielle, vor allem antimykotische Aktivität von Harnstoff, die gegenüber anderen Antibiotika allerdings gering ausgeprägt ist, wurde ebenfalls wiederholt verwiesen (Necas und Svoboda 1973, Müller und Pflugshaupt 1989). Nolting empfahl Harnstoff als vielfach vernachlässigten Wirkstoff auf dem Gebiet der Mykologie für eine bessere und aussichtsreiche Therapie von Mykosen (Nolting 1989). Harnstoff besitzt juckreizlindernde Eigenschaften (Puschmann 1992, Swanbeck und Rajka 1970). Diese Wirkung ist ursächlich für den Erfolg der Neurodermitisbehandlung mit dieser Substanz (Swanbeck 1989).

Das unterschiedliche Verhalten der Substanz hinsichtlich der Anreicherung und des hydrationsfördernden Effektes im Stratum corneum wurde von Wohlrab bei der Applikation einer harnstoffhaltigen O/W- und einer W/O-Emulsion festgestellt (Wohlrab 1991). In einer früheren Studie wurde gezeigt, dass diese Differenzen auch zwischen der Verabreichung einer wässrigen Lösung und einer O/W-Emulsion auftreten (Wohlrab und Hassler 1981). Die bisher durchgeführten Studien, bei denen zu wenigen Zeiten nach Applikation der Harnstoffgehalt in verschiedenen Hauttiefen bestimmt wurde, dienen dem vergleichenden Zweck verschiedener Formulierungen (Knorst 1997, Wohlrab 1984b, 1991b, 1992, Wohlrab und Hassler 1981).

Trotz der reichlichen Untersuchungen weist die Kenntnis über Harnstoff dennoch Lücken auf. Die Diffusion dieses relevanten, topischen Arzneistoffs durch humanes Stratum corneum ist bisher unbekannt.

In diesem Zusammenhang soll geklärt werden:

- wie schnell Harnstoff durch das Stratum corneum diffundiert,
- ob es demnach realisierbar ist, die pharmakokinetischen Kenntnisse der Substanz durch die Bestimmung des Diffusionskoeffizienten zu verbessern, denn dieser Parameter kann als Anhaltspunkt für die Optimierung von topischen Formulierungen Anwendung finden,
- ist die Kinetik, im Gegensatz zu Experimenten mit der destruktiven tape-stripping Technik, durch Realzeitmessung detektierbar,
- und des Weiteren ob Harnstoff schnell oder langsam die Hornschicht permeiert.

Über Untersuchungen mit einer Permeationszelle über das Permeationsverhalten von Harnstoff an isolierter Maushaut unter Angabe eines Permeationskoeffizienten wird in der Literatur nur an einer Stelle berichtet (Ackermann et al. 1985). In diesem Zusammenhang wurde festgestellt, dass im Falle der Maushaut nach Applikation einer wässrigen Harnstofflösung ca. 100 Stunden bis zum Erreichen eines Gleichgewichtes zwischen wässrigem Akzeptor und der Haut vergehen. Die Diffusion von Harnstoff am

humanen Stratum corneum wurde nach bisheriger Kenntnis nicht charakterisiert. Neben weiteren Untersuchungen, wie beispielsweise zum Wirkmechanismus der Substanz, kann somit ein Weg für weitere und verbesserte Einsatzmöglichkeiten des Harnstoffs eröffnet werden.

2.3 Künstliche Membranen auf Silikonbasis

Experimente mit Modellmembranen können keine vollkommene Imitation natürlicher, am Stratum corneum ablaufender Diffusionsvorgänge sein, sondern sollen dazu dienen, entsprechende Teilvorgänge in überschaubarer und reproduzierbarer Form darzustellen (Richter 1985).

Silikonmembranen werden bevorzugt in Modellen für die Arzneistoffpermeation eingesetzt, da sie sich gleichmäßig, reproduzierbar und kostengünstig herstellen lassen und ausreichend verfügbar sind. Sie sind chemisch und physikalisch definiert aufgebaut. Modellmembranen besitzen einen begrenzten Einsatzbereich, welcher hauptsächlich von der Lipophilie und der Molekülgröße der Diffusanten abhängt. Diese jeweils limitierten Anwendungsgebiete bedingen die Vielzahl von Membranmodellen für unterschiedliche Fragestellungen. Es sind mehrere einfach zusammengesetzte Modellmembranen für die Simulation von Diffusionsprozessen lipophiler Arzneistoffe beschrieben. Weitaus weniger Membranmodelle existieren dagegen für die Anwendung hydrophiler Arzneistoffe.

Der Einsatz von Silikonmembranen ist für Arzneistoffpermeationsstudien weit verbreitet (Buraphacheep et al. 1994, Chow et al. 1984, Cross et al. 2001, Dias et al. 2001, Dias et al. 2004, Farinas et al. 1994, Gelotte et al. 1990, Hagen und Flynn 1987, Hatanaka et al. 1990, Horsch et al. 1981, Hou und Flynn 1997, Iervolino et al. 2000, Jetzer et al. 1986, Liang et al. 1985, Lippold et al. 1984, Maitani et al. 1996, McCarley und Bunge 2003, Moser et al. 2001, Patel et al. 1984, Pellett et al. 1997a, Raghavan et al. 2000, Reppel et al. 1978, Richter 1992, Richter und Nuhn 1989, Schwarb et al. 1999, Touitou und Lisette 1985, Walkow et al. 1987a und 1987b, Watkinson et al. 1995). Neben der häufigen Anwendung von Silikonmembranen wird in der Literatur der Einsatz weiterer Membranmodelle für Permeationsstudien beschrieben. Polydimethylsiloxan-Polycarbonat-Block-Copolymermembranen wurden für Permeationsuntersuchungen von verschiedenen lipophilen Arzneistoffen von Feldstein et al. eingesetzt (Feldstein et al. 1998). Hierbei konnten, im Gegensatz zu vielen anderen Studien, Ähnlichkeiten im Permeationsverhalten verschiedener Arzneistoffe zwischen der Membran und der humanen Haut festgestellt werden. Mit einem lipophilen Füllstoff beladene Collodiummatrixmembranen wurden ebenfalls für Arzneistoffpermeations- und -penetrationsuntersuchungen eingesetzt (Bendas 1993, Bendas et al. 1995, Fürst et al. 1980, Neubert und Wohlrab 1990, Neubert et al. 1991,

Neubert et al. 1995, Ritter et al. 1990). Für biopharmazeutische in vitro Untersuchungen kamen weiterhin Membranen aus Polyamid (Agren et al. 1974, Chattaraj et al. 1995, Phares et al. 1995, Walkow et al. 1987a), Polyhydroxyethylmethacrylat (p-HEMA) (Liang et al. 1985) sowie Methacrylatcopolymeren (Zentner et al. 1978), Polyethylen (Cross et al. 2001, Jiang et al. 1998, Lippold et al. 1984, Walkow et al. 1987) und Polyvinylpyrrolidon-Polyethylenglykol (Iordanski et al. 2000) zur Anwendung.

Cellulosen dienten ebenfalls bei Permeationsstudien als Matrices für Membranen (Fang et al. 1999, Fang et al. 2002, Liaw und Lin 2000, Julian und Zentner 1986, Shaker et al. 2000, Touitou und Lisette 1985, Walkow et al. 1987a, 1987b). Celluloseacetat wurde vielfach als hydrophile Membran (Barry und El Eini 1976, Barry und Brace 1977, Chattaraj et al. 1995, Chowdary et al. 1993, Dias et al. 1999, Farinha et al 2003, Müller und Kreuter 1999, Wang et al. 2002) verwendet. Diese hydrophilen Folien sind in der Regel porös und müssen vielfach mit Wasser vorbehandelt werden. Bei der Verwendung solcher Folien wurde von Horsch et al. geschildert, dass neben dem diffusiven Stoffübergang auch ein konvektiver Transport möglich ist (Horsch et al. 1981). Polymermembranen aus Polydimethylsiloxan-Hydroxyethylmethacrylat, die sowohl hydrophile als auch lipophile Domänen in ihrem Netzwerk enthielten, kamen ebenfalls für Arzneistoffpermeationsstudien zum Einsatz (Yamaguchi et al. 1997). Die mit den verschiedenen Membranmodellen durchgeführten Permeationsstudien erfolgten meist mit Hilfe von Diffusionszellen. Hierbei wird die Membranoberfläche vollständig durch die Flüssigkeit der Donatorkammer bedeckt. Im Falle der Durchführung von Diffusionsuntersuchungen mit der herkömmlichen ATR-Spektroskopie liegt dagegen die Membran auf einem plan polierten ATR-Kristall auf. Für die Auswahl einer Membran für Permeationsstudien mit der Standard ATR-Spektroskopie muss demzufolge auch berücksichtigt werden, dass diese Membranen eine glatte Oberfläche aufweisen und sich in guten Kontakt zum ATR-Kristall bringen lassen. Silikonmembranen haben sich hierfür bereits als geeignet erwiesen und wurden für Penetrationsuntersuchungen mithilfe der ATR-Technik eingesetzt (Dias et al. 2001, 2004, McCarley und Bunge 2003, Moser et al. 2001, Pellet et al. 1997a).

Der Stoffdurchgang durch Silikonpolymere wurde von Horsch et al. als ausschließlicher Diffusionsprozess beschrieben (Horsch et al. 1981). Für die Verwendung von Silikonem als Membranmaterial sprechen auch deren hervorragende physikalische und chemische Eigenschaften, wie ihre chemische Resistenz und ihre gute Temperaturbeständigkeit (Bien 1975, Noll 1968, Richter 1985). Die nachgewiesene physiologische Unbedenklichkeit führte bereits zu einem breiten Einsatz dieser Substanzen auf pharmazeutischem und medizinischem Gebiet.

Die Anwendung von Silikonmembranen zur Verfolgung der Arzneistoffpermeation geht auf Garret und Chemburkar zurück (Garret und Chemburkar 1968, 1968a, 1968b). Diese bis zu 250 μm dicken Membranen wurden durch Heißvulkanisation gefertigt. Sie enthielten bis zu 30% Siliziumdioxid zur Erhöhung der mechanischen Stabilität. Neben

der hohen Dicke wirkte sich jedoch auch der Füllstoffanteil aufgrund seiner adsorptiven Eigenschaften nachteilig auf die Permeationsmessungen aus (Flynn und Rosemann 1971, Nakano et al. 1979). Die in dieser Arbeit verwendeten Silikon-Membranen wurden nach dem Prinzip der Kaltvulkanisation hergestellt, welches eine unkomplizierte Anfertigung der Membranen ermöglicht. Dieses Verfahren wurde von Richter und Reppel zur Herstellung stabiler Silikon-Membranen für Permeationsstudien beschrieben (Reppel et al. 1978, Richter 1985, Richter et al. 1978). Die Membranen enthalten als Matrix einen Polydimethylsiloxankautschuk, der bereits bei Raumtemperatur durch einen geeigneten Vernetzer in Elastomere überführt wird. Da sich das System während der Vernetzung im gelösten Zustand befindet, sind eine einfache, gleichmäßige Verteilung der Komponenten und eine genaue Dosierung erreichbar. Auf dieser Grundlage erfolgte bereits in das sich ausbildende Netzwerk die Einarbeitung von Füllstoffen, wie Phospholipiden, Laurylalkohol, Linolsäure und Arachidonsäure (Richter 1985).

2.4 Rinderhufmembranen

Neben der Haut stellen ebenfalls Nägel, wenn auch mit deutlich geringerer Oberfläche, einen topischen Anwendungsort für Arzneistoffe dar. Vielfach werden Arzneistoffe zur lokalen Therapie von Mykosen auf diesem Weg appliziert (Franz 1992, Haria und Bryson 1995, Nolting und Seebacher 1993, Polak und Zaug 1990, Quadripur et al. 1981). Die Durchführung von Diffusionsstudien an Rinderhufmembranen wurde durch mehrere Gesichtspunkte angeregt. Zum einen sind humane Nägel meist nicht ausreichend erhältlich. Gesunde menschliche Nägel stehen nicht auf die gleiche Art und Weise zur Verfügung, wie die verwendeten Hautproben, die aus ohnehin durchgeführten Reduktionsplastiken stammten (siehe 3.1). Rinderhufe lassen sich indessen in größerer Anzahl erwerben. Es handelt sich dabei um Material, welches nach Schlachtungen überdies meist verworfen wird. Zum anderen stehen bei Rinderhufen im Vergleich zu humanen Nägeln größere Mengen Hornmaterial zur Verfügung. Die Nagelplatte besitzt hinsichtlich ihrer Diffusibilität einen vielmehr hydrophilen und weniger lipophilen Membrancharakter (Mertin und Lippold 1997a, 1997b, Walters et al 1983, 1985). Rinderhufmembranen sowie humane Nagelplatten verhalten sich wie hydrophile Gelmembranen (Walters et al. 1985). Während im Falle einer lipophilen Verteilungsmembran der maximale Flux von der Wirkstofflöslichkeit im Vehikel und dem Verteilungskoeffizienten abhängig ist, nimmt er im Falle einer hydrophilen Gelmembran mit steigender Wasserlöslichkeit zu (Mertin und Lippold 1997a). Somit stellte sich die Frage, ob die Rinderhufmembranen als natürliche, hydrophile Membranen für Diffusionsstudien mit der ATR-Zelle verwendbar sind. Die Versuchsanordnung der Diffusionsexperimente an den Rinderhufmembranen erfolgte in

Analogie zu den Stratum corneum Experimenten (siehe auch Kapitel 7.3). Als Membran fungierte hier lediglich eine voll hydratisierte Rinderhufmembran.

2.5 FTIR-ATR-Spektroskopie für Penetrationsexperimente

Bei diesem speziellen Messverfahren der Infrarotspektroskopie wird das Phänomen der Totalreflexion genutzt, um IR-Spektren aus dem Oberflächenbereich einer Probe aufzunehmen. Totalreflexion tritt auf, wenn der IR-Strahl in einem Medium mit hohem Brechungsindex n_1 schräg auf die Grenzfläche zu einem optisch dünneren Medium n_2 trifft und dabei der Einfallswinkel α_{ATR} den Grenzwinkel der Totalreflexion θ_G , definiert durch $\sin \theta_G = n_2/n_1$, übersteigt (Mirabella et al. 1985). Jedoch dringt ein Teil der Strahlung in das optisch dünnere Medium ein und wird geringfügig versetzt. Es ergeben sich ähnliche spektrale Abhängigkeiten wie bei Transmissionsspektren, wenn die ins optisch dünnere Medium eingedrungene Strahlung absorbiert wird. Diese Spektren werden als ATR-Spektren bezeichnet. Das optisch dichtere Medium ist ein entsprechend geschliffener ATR-Kristall, während es sich bei dem optisch dünneren Medium um die zu untersuchende Probe handelt (Abb. 3).

Die Eindringtiefe in die Probe variiert im Bereich von 1,4 bis 2,8 μm in Abhängigkeit von der Wellenlänge, dem Einfallswinkel des total reflektierten Strahles und von dem Brechungsindex sowohl des Kristalls als auch der Probe (Günzler und Heise 1996, Lu et al. 1998).

Die Abhängigkeit der Eindringtiefe d_p lässt sich durch folgende Gleichung darstellen:

$$d_p = \frac{\lambda_{IR}}{2\pi n_1 \sqrt{\sin^2 \alpha_{ATR} - (n_2/n_1)^2}} \quad 2.4.1$$

Dabei ist λ_{IR} die Wellenlänge des IR-Strahles, α_{ATR} der Einfallswinkel, n_1 , n_2 sind die Brechungsindices der beiden Medien und d_p ist die Eindringtiefe (Abb. 3).

In vielen ATR-Messeinheiten wird ein Kristall aus Zinkselenid (ZnSe) mit einem Einfallswinkel von 45° oder 60° verwendet. ZnSe ist relativ kostengünstig, hat einen hohen Brechungsindex ($n=2,4$) und besitzt im Spektralbereich zwischen 650 cm^{-1} und 4000 cm^{-1} keine Eigenabsorption. Dieser Spektralbereich ist für die meisten Stoffe und für biologische Systeme besonders relevant. Aufgrund dieser Eigenschaften besitzt ZnSe ein breites Anwendungsspektrum und ist besonders gut für Untersuchungen an biologischen Systemen geeignet. Neben ZnSe werden als gebräuchliche Materialien für ATR-Kristalle Germanium, Diamant, Silikon und Thallium Bromid-Jodid (KRS-5) verwendet (Wilks 1993).

Für die meisten biologischen Systeme ist die Eindringtiefe des IR-Strahls im mittleren Infrarotbereich kleiner als 1,5 μm (van Lucassen et al. 1998).

Die ATR-Technik wurde mit der „tape stripping“ Methode kombiniert, um Konzentrationsprofile im SC zu analysieren (Bodde et al. 1996, Higo et al. 1993, Stinchcomb et al. 1999). Mit dieser Methodik wurden Hautveränderungen nach Chemikalienkontakt analysiert (Mak et al. 1990).

In mehreren Untersuchungen diente die ATR-Technik zur Untersuchung der Hydratation von Hautoberflächen (Branagan et al. 2000, Brancaleon et al. 2000, Brancaleon et al. 2001, van Lucassen et al. 1998, Potts et al. 1985).

Da aufgrund der geringen Eindringtiefe des Infrarotstrahles in die Probe Spektren aus dem Oberflächenbereich einer Probe detektiert werden, ist ein enger optischer Kontakt zwischen Kristall und Probe erforderlich. Vielfach ist der Kontakt zwischen ATR-Kristall und Probe schwierig zu kontrollieren. Dies ist der Fall, wenn es sich bei der Probe nicht um flüssige oder halb feste Medien, sondern um Membranen oder andere feste Proben handelt. Geringe Änderungen während des Experimentes im Probe/Kristall-Kontakt können durch Normierung auf eine unbeeinflusste Membranbande korrigiert werden. Diese Membranbande dient somit als interner Standard (Mirabella et al. 1985, Farinas et al. 1994).

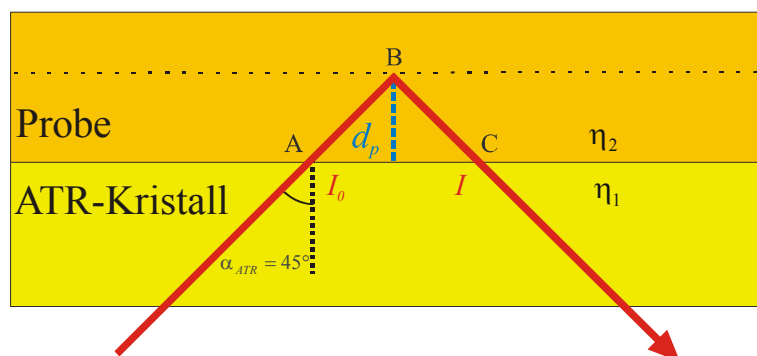


Abb. 3: Prinzip der ATR-Messtechnik

Der Weg d_{ATR} , den die Strahlung in der Probe bei einem Einfallswinkel von 45° zurücklegt, wird aus der Eindringtiefe d_p berechnet:

$$d_{ATR} = AB + BC = 2\sqrt{2d_p} \quad 2.4.2$$

Für eine quantitative Auswertung der Spektraldaten wird das Lambert-Beersche Gesetz angewandt (Schmidt 1994).

Für einen wirkstoffhaltigen Akzeptor gilt:

$$I = I_0 \quad \text{für } x = 0,$$

$$\frac{\partial I}{\partial x} = -\beta_A I \quad \text{für } 0 < x < d_{ATR}.$$

Dabei ist I die Intensität des IR-Strahles im Akzeptor und I_0 die Intensität des Einfallstrahls. Der optische Absorptionskoeffizient des wirkstoffhaltigen Akzeptors wird durch β_A beschrieben. Dieser ist wiederum von der Wirkstoffkonzentration c_W abhängig.

$$\beta_A = \beta_M + \varepsilon_W c_W,$$

hierin ist β_M der Absorptionskoeffizient des wirkstofffreien Akzeptors und ε_W der Extinktionskoeffizient des Diffusanten im Akzeptor. Wenn in einem Bereich das Akzeptormedium keine IR-Absorption besitzt, d.h. $\beta_M = 0$ ist, ist der Absorptionskoeffizient des Akzeptors β_A direkt proportional zur Wirkstoffkonzentration c_W .

Bei der Entwicklung topischer Arzneiformen ist ein wesentlicher Schritt, das Penetrations- bzw. Permeationsverhalten der wirksamen Bestandteile zu charakterisieren. Viele angewandte Methoden besitzen den Nachteil, die Wirkstoffkonzentration in einem Akzeptor nicht in Realzeit, sondern erst nach Beendigung des Experimentes zu bestimmen. Die Donatorformulierung wird vom Akzeptor entfernt und der Wirkstoff aus dem Akzeptor extrahiert. Des Weiteren erfolgt die Bestimmung der Akzeptorkonzentration nicht direkt, sondern mit Alternativmethoden, wie HPLC, GC oder HPLC-MS (Chattaraj et al 1995, Fürst et al. 1987, Reifenrath et al. 1994). Infolge einer verbleibenden Restmenge Donator und dem zusätzlichen Extraktionsschritt ist ein systematischer Messfehler kaum vermeidbar. Vielfach ist die Menge des Diffusanten im Donator und Akzeptor gering. Dies erschwert zusätzlich die Bestimmung des Gehaltes mit den genannten Methoden. In einigen Fällen kamen radioaktiv markierte Substanzen zum Einsatz (Cornwell und Barry 1994, Schaefer et al. 1978). Die Anwendung dieser Methode wird jedoch durch die Anzahl verfügbarer radioaktiv markierter Arzneistoffe auf wenige Substanzen begrenzt.

Mit den meisten Methoden ist keine durchgängige Realzeitmessung möglich. Die Erstellung eines Konzentrations-Zeit-Profiles ist aufwendig, da für jeden Messzeitpunkt ein Experiment notwendig ist. Im Gegensatz dazu können mit den nichtinvasiven Messmethoden, wie der ATR-Technologie, die zeitabhängigen Wirkstoffkonzentrationszunahmen während eines Penetrations- oder Diffusionsexperimentes relativ einfach in Realzeit detektiert werden.

Die Extinktion einer Diffusantenbande kann als normierte Konzentration aufgetragen werden, unter der Voraussetzung, dass die Fremdmolekülenkonzentration während des

gesamten Messzeitraumes im Detektionsbereich der Grenzflächenwelle viel kleiner ist, als die Konzentration der Gastmoleküle (Akzeptormoleküle). Unter dieser Bedingung müssen die Konzentrationen nicht mit Alternativmethoden bestimmt werden (Brandt 1985, Brandt und Hemmelmann 1986).

Aus diesem Grunde kamen spektroskopische Methoden, wie die ATR-Spektroskopie, immer häufiger bei Penetrationsuntersuchungen an künstlichen Membranen zum Einsatz (Cantor 1999, Dias et al. 2001, 2004, Farinas et al. 1994, Harrison et al. 1996, Nardviriyakul et al. 1996, Pellett et al. 1997a, Sammon et al. 2000, Wurster et al. 1993). Die ATR-Spektroskopie wurde auch genutzt, um Wechselwirkungen zwischen Wasser und Polymer während der Wasserdiffusion in Polypropylenfilme zu charakterisieren (Shen und Wu 2003). Des Weiteren wurden auch Penetrationsstudien am Stratum corneum mit Hilfe der ATR-Spektroskopie durchgeführt (Grewal et al. 1998, Harrison et al. 1996, Pellett et al. 1997b). Bei diesem Verfahren erübrigen sich Schritte zur Trennung des Donators und des Akzeptors sowie Maßnahmen zur Wirkstoffextraktion aus dem Akzeptor während des Experimentes. Dadurch wird der systematische Fehler verringert.

IR-Spektren sind substanzspezifisch. Sie weisen typische Absorptionsbanden auf und können somit als Fingerabdruck eines Stoffes angesehen werden. Aus diesem Grund ist es mit der FTIR-ATR-Spektroskopie möglich, neben der Detektion eines Diffusanten, zeitgleich weitere Veränderungen über einen breiten spektralen Bereich zu verfolgen (Günzler und Heise 2002).

Da zwischen Veränderungen in der Lage und der Intensität von Absorptionsbanden und strukturellen Modifikationen im Akzeptor ein enger Zusammenhang besteht, kann in einigen Fällen die Strukturänderung im Akzeptor während eines Diffusionsexperimentes verfolgt werden (Margarida et al. 1995). Die Änderung der SC-Struktur aufgrund eines Enhancereinflusses wurde in mehreren Untersuchungen mit Hilfe der FTIR-ATR-Spektroskopie charakterisiert (Clancy et al. 1994, Dias et al. 2001, Mak et al. 1990, Takeuchi et al. 1993, Yokomizo 1996, Yokomizo 1997).