

Ortsaufgelöste Bestimmung von endogenen und topisch applizierten Substanzen auf und in Haut

Perspektiven und Grenzen der Lasermikrodissektion (LMD)
in Verbindung mit der Kopplung
Flüssigchromatographie-Massenspektrometrie (LC/MS)



Dissertation

Zur Erlangung des Doktorgrades
des Fachbereiches Chemie der
Universität Hamburg

vorgelegt von

Hamed Tayyeb
aus Tehran

Hamburg 2005

Gutachter der Dissertation:
Herr Prof. Dr. Hans-Jürgen Duchstein
Frau Prof. Dr. Martina Kerscher

Tag der mündlichen Prüfung: 07.07.2005

*Meiner Frau Rabia, meiner kleinen
Tochter Lenna und meinen Eltern
gewidmet*

صبر تلخ است
اما میوه اش شیرین

Bitter ist die Geduld, doch ihre Frucht ist süß.

Saadi (um 1215-1292), berühmter persischer Dichter, Erzähler,
Anekdotenschreiber und Mystiker

Danksagung

Ich danke Herrn Dr. U. Hintze und Herrn Dr. C. Rapp für die Schaffung der Möglichkeit, dass die vorliegende Arbeit in der Produktanalytik der Beiersdorf AG unter exzellenten fachlichen und technischen Bedingungen durchgeführt werden konnte.

Herrn Dr. Wepf und Herrn Dr. Fischer aus der Abteilung Mikroskopie danke ich für ihre hervorragende fachliche und technische Unterstützung, ihr stetiges Interesse an dieser Arbeit sowie eine reibungslose Kooperation mit dem Labor LC-MS/HPLC in der Produktanalytik.

Herrn Professor Duchstein möchte ich für die hervorragende universitäre Betreuung sowie Frau Professor Kerscher für die freundliche Übernahme des Koreferates der Arbeit danken.

Insbesondere danke ich meinem direkten Betreuer Herrn Dr. Vietzke für sein stetiges Interesse an dieser Arbeit, seine hervorragende wissenschaftliche Betreuung und seine fortwährende Diskussionsbereitschaft.

Herrn Düsing und Herrn Akhiani danke ich für die Möglichkeit, die für die Arbeit notwendigen Penetrationsversuche in der Abteilung Bioverträglichkeit 2 durchführen zu können.

Weiterhin danke ich Frau Dunckelmann und Herrn Puschmann aus der Abteilung Mikroskopie für ihre fachliche Unterstützung bei der Einweisung in die Arbeit mit dem Kryostaten bzw. in die Arbeiten mit dem Lasermikrodissektor.

Mein spezieller Dank gilt jedoch meiner Frau Rabia, die mir ihre seelische Unterstützung nie verwehrte, wenn ich sie brauchte und mir stets zur Seite stand. Und ich danke meinen Eltern, die mir eine exzellente Ausbildung

ermöglichten und mich immer wieder ermutigten, mich akademisch weiterzubilden.

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	1
2	ZIELSETZUNG	3
3	THEORETISCHE GRUNDLAGEN	4
3.1	HAUT	4
3.1.1	<i>Aufbau und Funktion der Haut</i>	4
3.1.2	<i>Hautanhangsgebilde</i>	7
3.1.3	<i>Lipide der Haut</i>	7
3.2	DAS STRATUM CORNEUM ALS HAUPTPENETRATIONSBARRIERE DER HAUT	9
3.3	WEGE ZUR PENETRATION VON SUBSTANZEN IN DIE HAUT	10
3.4	MÖGLICHKEITEN ZUR DARSTELLUNG DER PENETRATION VON SUBSTANZEN IN DIE HAUT	11
3.5	LASERMIKRODISSEKTION	14
3.5.1	<i>Aufbau des Leica AS Lasermikrodissektors</i>	14
3.5.2	<i>Anwendungsfelder der Lasermikrodissektion</i>	16
3.6	CHROMATOGRAPHIE	18
3.6.1	<i>Theoretische Grundlagen</i>	18
3.6.2	<i>Chromatographische Trennverfahren</i>	18
3.6.3	<i>Hochdruckflüssigchromatographie/HPLC</i>	19
3.7	KOPPLUNG FLÜSSIGCHROMATOGRAPHIE/ API-ES MASSENSPEKTROMETRIE	20
3.8	MASSENANALYSATOREN	22
3.8.1	<i>Quadrupol</i>	22
3.8.2	<i>Triple Quadrupol</i>	23
3.8.3	<i>Elektrische Ionenfalle (Ion Trap)</i>	24
4	MATERIAL & METHODEN	26
4.1	PROBENGEWINNUNG/EXTRAKTION	26
4.2	HOCHDRUCK-FLÜSSIGCHROMATOGRAPHIE	27
4.2.1	<i>Trennung Ceramide</i>	27
4.2.2	<i>Trennung freier Fettsäuren</i>	29
4.2.3	<i>Trennung Mono-, Di-, und Triglyceride</i>	30
4.2.4	<i>Trennung Phospholipide</i>	32
4.2.5	<i>Trennung Cholesterin und Squalen</i>	34
4.2.6	<i>Quantifizierung Nilrot</i>	35
4.2.7	<i>Quantifizierung Salicylsäure</i>	39
4.3	PENETRATIONSVERSUCHE MIT DER FRANZ`SCHEN DIFFUSIONSZELLE	43
4.4	LEICA AS LASERMIKRODISSEKTOR	45
5	ERGEBNISSE	47
5.1	PROBENVORBEREITUNG	47
5.1.1	<i>Arbeiten mit dem Kryostaten</i>	47

5.1.2	<i>Evaluierung der Probenahme am Kryostaten</i>	49
5.2	UNTERSUCHUNG VON TALGDRÜSENLIPIDEN	52
5.2.1	<i>Vergleich Hautoberflächenlipide-Talgdrüsenlipide</i>	54
5.2.2	<i>Weitere Bestandteile der Talgdrüsenlipide</i>	59
5.3	HAUTPENETRATION VON NILROT	65
5.3.1	<i>Darstellung der Penetration von Nilrot aus dem Vehikel Dimethylsulfoxid im Schweinehautmodell</i>	65
5.3.2	<i>Penetration von Nilrot in Paraffinum liquidum im Schweinehautmodell</i>	71
5.3.3	<i>Darstellung der Penetration von Nilrot aus verschiedenen Vehikeln in die Hautanhangsgebilde humaner Haut</i>	72
5.4	HAUTPENETRATION VON SALICYLSÄURE	79
5.4.1	<i>Untersuchung der Penetration von Salicylsäure aus verschiedenen pharmazeutischen Präparaten mit der Franz'schen Diffusionszelle</i>	79
5.4.2	<i>Darstellung der Penetration der Salicylsäure aus verschiedenen pharmazeutischen Präparaten mittels Lasermikrodissektion</i>	83
6	DISKUSSION	86
6.1	UNTERSUCHUNG TALGDRÜSENLIPIDE	86
6.2	FRANZ'SCHE DIFFUSIONSZELLE	87
6.3	PENETRATION VON NILROT	88
6.4	PENETRATION VON SALICYLSÄURE	91
7	ZUSAMMENFASSUNG	98
8	SUMMARY	99
9	ANHANG	100
9.1	PENETRATIONSPROFIL VON NILROT AUS PARAFFINUM LIQUIDUM IN SCHWEINEHAUT, VERGLEICH ERGEBNISSE FDZ VS. LMD	100
9.2	VOLUMENNORMIERTES PENETRATIONSPROFIL VON NILROT AUS DEN VEHIKELN PL UND DMSO IN HUMANHAUT/GESICHT, ERGEBNISSE LMD	101
9.3	PENETRATIONSPROFIL VON SALICYLSÄURE AUS VERSCHIEDENEN PHARMAZEUTISCHEN PRÄPARATEN, VERGLEICH ERGEBNISSE FRANZ'SCHE DIFFUSIONSZELLE VS. LMD	103
9.4	VERWENDETE CHEMIKALIEN UND GERÄTE	109
9.4.1	<i>Chemikalien</i>	109
9.4.2	<i>Geräte</i>	110
10	LITERATURVERZEICHNIS	111

Abkürzungen

API	Atmospheric pressure ionisation
amu	atomic mass unit
BSA	Bovine Serum Albumin
CID	Collision induced decay
CLSM	Confocal laser scanning microscopy
DMSO	Dimethylsulfoxid
DC	Dünnschichtchromatographie
ESI	Electrospray ionisation
FDZ	Franz'sche Diffusionszelle
GLC	Gas-flüssig-Chromatographie
GSC	Gas-fest-Chromatographie
HPLC	High pressure liquid chromatography
INCI	International nomenclature of cosmetic ingredients
LC	Liquid chromatography
LES	Laurylethersulfat
LMD	Lasermikrodissektion
MS	Massenspektrometrie
m/z	Masse zu Ladungsverhältnis
MRM	Multi reaction monitoring
NSAR	Nicht steroidale Antirheumatika
PL	Paraffinum liquidum
PC	Phosphatidylcholin
PET	Polyethylenterephthalat
PCR	Polymerase chain reaction
RP	reversed Phase
SM	Sphingomyelin
SB	Stratum basale
SC	Stratum corneum

SS

Stratum spinosum

t-BME

tert-Butylmethylether

1 Einleitung

Die Haut stellt die äußere Begrenzung des Menschen zu seiner Umwelt dar. Mit einer Gesamtfläche von 1,5-2 m², die von Größe und Gewicht des Individuums abhängig ist, überzieht sie den Körper. Sie wiegt zwischen 3,5 und 10 kg und ist damit eines der größten Organe. Das äußere Erscheinungsbild der Haut ist gekennzeichnet durch Furchen und Falten [1].

Die Humanhaut besteht histologisch betrachtet aus der Epidermis (Oberhaut), der Dermis (Lederhaut) und der Subcutis (Unterhaut). Die bedeutende Aufgabe der Epidermis ist der Schutz vor großem Wasserverlust und damit vor Austrocknung des Individuums.

Als Applikationsort für dermale und transdermale Zubereitungen steht die Haut im Interesse dermatokosmetischer und dermatopharmazeutischer Forschung. Für kosmetische Anwendungen ist eine Akkumulation des Wirkstoffes in den oberen Hautschichten mit minimaler Penetration gewünscht, während für systemische Applikationen eine tiefe Penetration in die Haut favorisiert wird [2].

Die Untersuchung von hauteigenen Substanzen ist für die Hautforschung von Interesse, um Funktion und Aufbau der Haut besser verstehen zu können sowie krankhafte Zustände der Haut gegen den Normalzustand der Haut abgrenzen zu können. Da der kutane Metabolismus der Haut als lebendes Organ die Resorption von topisch applizierten Substanzen beeinflussen kann [3, 4], ist die Kenntnis über Menge, Verteilung und Wirkort von Substanzen in der Haut von großer Bedeutung.

Die Relevanz der vorliegenden Arbeit ergibt sich aus dem Umstand, dass es in den letzten Jahren zu einer großen Zahl von Neuentwicklungen im Bereich dermatokosmetischer Formulierungen gekommen ist. Neben Untersuchungen zur Sicherheit wird in jüngerer Zeit mehr und mehr auch eine differenziertere Zusammensetzung und wissenschaftlich evaluierte Wirksamkeit von Dermatokosmetika erwartet [5]. Zudem ist in der Literatur bislang keine adäquate Methode beschrieben, mit der orts aufgelöst der

Nachweis von Analyten, insbesondere in Hautanhangsgebilden wie Haarschäften, Talgdrüsen oder Schweißdrüsen durchgeführt werden kann.

Die Lasermikrodissektion (LMD) bietet als relativ neue Methode die Möglichkeit, aus Hautschnitten orts aufgelöst und kontaminationsfrei Proben zu gewinnen.

Die Flüssigchromatographie (LC) als Separationsmethode, gekoppelt mit der Massenspektrometrie (MS) als empfindliches Detektionsverfahren, ermöglicht einen empfindlichen und selektiven Nachweis der zu untersuchenden Analyten.

Um dieses Vorhaben näher zu untersuchen, sind Machbarkeitsuntersuchungen notwendig, um Potential und Grenzen des chemisch-analytischen Nachweises von endogenen und topisch applizierten Analyten mittels LMD, zusammen mit der Kopplung LC/MS, aufzeigen zu können sowie gegen andere Verfahren abzugleichen.

2 Zielsetzung

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, orts aufgelöst auf/in Haut endogene und topisch applizierte Analyten mittels Kopplung LMD-LC-MS zu bestimmen und Potential und Grenzen der verwendeten Methodik aufzuzeigen.

Daraus ergaben sich im Einzelnen folgende Ziele :

- Entwicklung sensibler und selektiver Analysemethoden zum Nachweis geringster Analytmengen in kleinsten Probenmengen
- Evaluierung der Probenahme am Kryostaten
- Nachweis der selektiven und kontaminationsfreien Probenahmemöglichkeit mittels LMD am Beispiel der Analytik von Talgdrüsenlipiden
- Darstellung der Penetration des Fluoreszenzfarbstoffes Nilrot als Modellsubstanz im Schweinehaut-/Humanhautmodell mittels Probenahme am LMD
- Übertragung und Verifizierung der Erkenntnisse bezüglich des Fluoreszenzfarbstoffes Nilrot auf andere Modellanalyten wie Salicylsäure

3 Theoretische Grundlagen

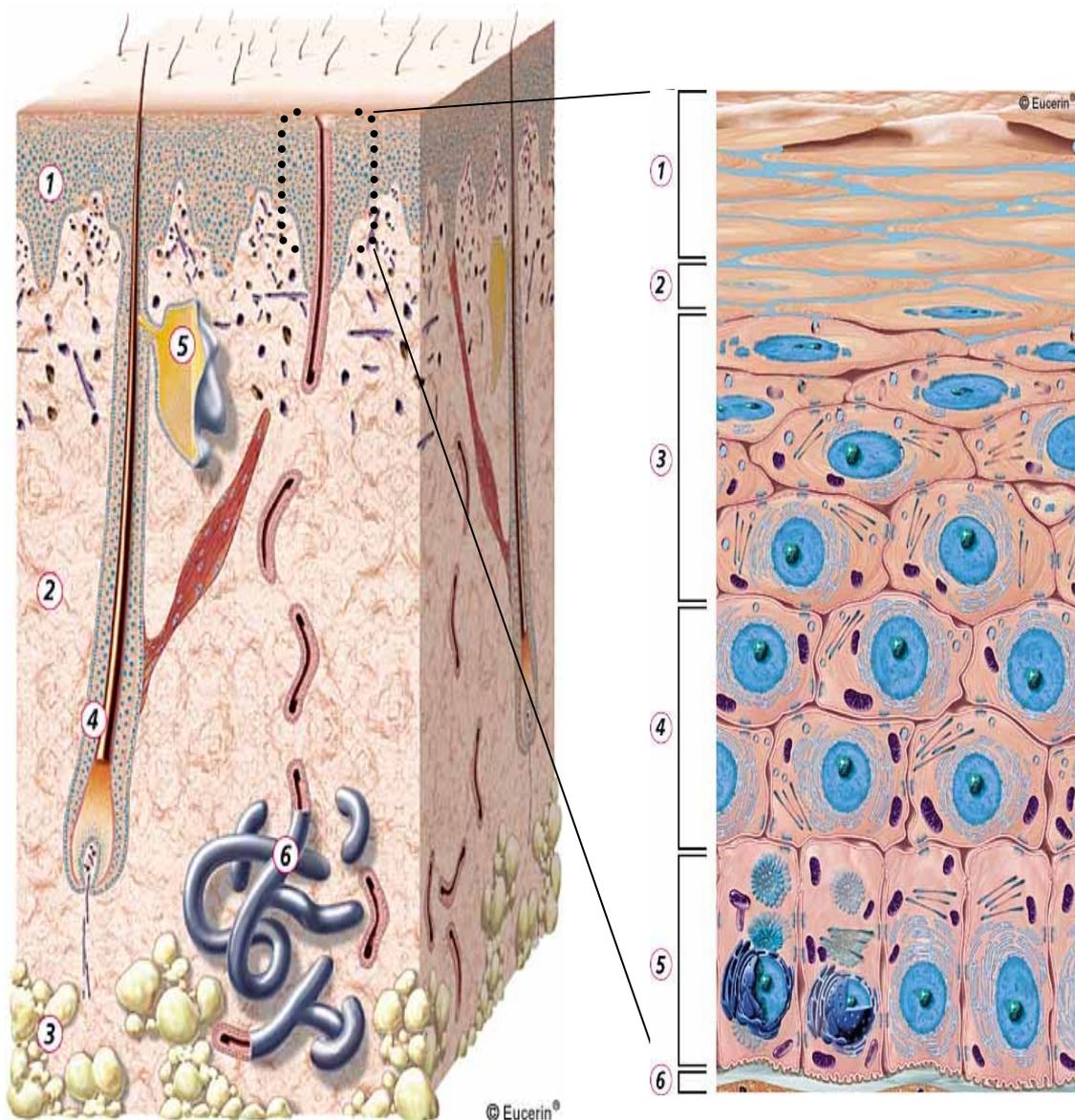
3.1 Haut

3.1.1 Aufbau und Funktion der Haut

Die Haut bietet sowohl eine mechanische als auch eine chemische Schutzfunktion. Sie schützt den Körper vor äußeren Schädigungen wie z.B. vor Mikroorganismen, Chemikalien, UV-Strahlung und vor großem Wasserverlust. Die Haut dient durch Reizaufnahme als Organ der Kommunikation mit unserer Umwelt. Sie ist in der Lage, verschiedene Sinnesempfindungen zu vermitteln, als da wären der Tastsinn, Temperatursinn und der Schmerzsin. Durch äußerlich sichtbare Veränderungen wie Erröten oder Erblassen vermittelt sie unsere Gefühlslage an die Umwelt. Durch Berührung, Temperatur- oder Schmerzwahrnehmung etwa, die durch die freien Nervenenden in der Haut direkt an das Gehirn weitervermittelt werden, erleben wir unsere Umwelt.

In Verbindung mit dem Blutzirkulationssystem sorgt die Haut durch eine Wärmeabgabe an die Umwelt für eine gleich bleibende Körpertemperatur von 37 °C. Dabei ist der Wärmeabstrom durch Verdunstung von Schweiß (glanduläre, sensible Wasserabgabe) und von Wasser, das durch die Hautoberfläche diffundiert (insensible Wasserabgabe), bei weitem am wichtigsten.

Im Wesentlichen kann man die Haut nach ihrem mehrschichtigen Aufbau in Epidermis, Dermis und Subcutis unterteilen, wobei die Epidermis als äußerste Hautschicht die eigentliche Schutzhülle gegenüber der Umwelt bildet. Der schematische Aufbau der Haut mit einer vergrößerten Darstellung der Hautstrata der Epidermis, denen für die Applikation von kosmetischen Produkten die größte Bedeutung zukommt, ist in Abbildung 1 dargestellt.



1-Epidermis

2-Dermis

3-Subcutis

4-Haarfollikel

5-Talgdrüse

6-Schweißdrüse

1)Hornschicht (Stratum corneum)

2)Glanzschicht (Stratum lucidum)

3)Körnerschicht (Stratum granulosum)

4)Stachelzellschicht (Stratum spinosum)

5)Basalschicht (Stratum basale)

6)Basalmembran

Abbildung 1: Schematischer Aufbau der Haut (links) und eine vergrößerte Darstellung der für die Applikation von Kosmetika relevanten Hautschichten (rechts) (<http://www.eucerin.de/advice/skincells/overview.html>)

Die Epidermis gliedert sich histologisch insgesamt in 5 Schichten:

Das **Stratum corneum**¹⁾ (Stratum = Decke, Schicht, cornea = lat. Hornhaut) ist die oberste Schicht der Epidermis, bestehend aus flachen, fest gepackten, kernlosen verhornten Zellen (Keratinozyten). Die Hornschicht, insbesondere deren mittleres Drittel, bildet die eigentliche Barrierschicht der Haut gegen exogene Faktoren. Die Dicke der Hornschicht beträgt etwa 10-15 µm auf der Felderhaut und 100-150 µm an den Hand- und Fußinnenseiten.

Das **Stratum lucidum**²⁾ ist die so genannte Glanzschicht, die in histologischen Präparaten stark lichtbrechend ist. Die Keratinozyten sind stark abgeplattet und liegen dicht beieinander.

Das **Stratum granulosum**³⁾, die Körnerschicht mit seinen Körnerzellen bildet 1-2 Schichten aus. Den Namen Körnerschicht erhält sie durch ihr Aussehen, welches durch die Anwesenheit der basophilen Keratohyalin granula, und vielen Vesikeln bedingt ist, die ihr unter dem Lichtmikroskop ein körniges Aussehen verleihen.

Darunter befindet sich das **Stratum spinosum**⁴⁾ (spino = lat. Dorn, Stachel), die Stachelzellschicht, in dem die Keratinozyten größer und polygonal sind und sich in höheren Schichten zunehmend abflachen. Untereinander sind diese Zellen durch multiple „stachelartige“ Interzellularbrücken, den Desmosomen verbunden.

Das **Stratum basale**⁵⁾ (basalis = lat. Basis, Grund) ist eine Schicht kubischer Zellen mit großen Kernen, welche die unterste Schicht der Epidermis bilden. Die Basalzellen sitzen direkt auf der Basalmembran, die die Epidermis von der Dermis scharf abgrenzt. Durch Zellteilungen (Proliferation) sorgen ein Teil der Basalzellen (Stammzellen) als Mutterzellen für kontinuierliche Erneuerung der Haut, wobei die Tochterzellen durch die rege Zellteilung in die weiter außen gelegenen Schichten geschoben werden, wo sie verschiedene Differenzierungsstadien durchlaufen [1].

3.1.2 Hautanhangsgebilde

Zur Haut rechnet man auch die Hautanhangsgebilde wie Hautdrüsen, Schweißdrüsen, Brustdrüsen, Talgdrüsen, Duftdrüsen, Haare und Nägel, von denen Talgdrüsen in Haartrichter einmünden. Talgdrüsen kommen etwa in 60-400 µm Tiefe in der Haut vor [6], werden durch Androgene stimuliert und sezernieren bei beiden Geschlechtern vermehrt erst nach der Pubertät [7].

3.1.3 Lipide der Haut

Die auf der Haut vorkommenden Lipide stammen überwiegend aus der Talgdrüsensekretion, zum geringeren Teil stammen sie aus der Kittsubstanz zwischen den verhornten Keratinozyten, den Barrierelipiden [7, 8, 9].

Die Talgdrüsensekretion, auch Sebum genannt, besteht nach Stewart [9] aus Squalen, Cholesterin, Cholesterinestern, Wachsestern und Triglyceriden. Erst nachdem das Sebum die Haarfollikel passiert und die Hautoberfläche erreicht hat, enthält es zusätzlich freie Fettsäuren und geringe Mengen an Mono- und Diglyceriden, welche aus Triglyceriden durch bakterielle Hydrolyse entstehen. Zu ähnlichen Ergebnissen führte auch die Untersuchung von Kellum [10], der Sebumlipide per Dünnschichtchromatographie (DC) untersucht hat. Cassidy et al. [11] untersuchten Talgdrüsenlipide ebenfalls per DC und fanden zusätzlich Phospholipide als Bestandteil der Talgdrüsenlipide.

Die Lipide der Hornschicht werden überwiegend in den Keratinozyten synthetisiert und bestehen aus Ceramiden, Cholesterin und freien Fettsäuren, die eine Kettenlänge zwischen 20 und 28 C-Atomen haben [7, 8].

Diese Angaben werden von Downing et al. bestätigt, extrazelluläre Stratum corneum-Lipide bestünden hauptsächlich aus Ceramiden, freien Fettsäuren, Cholesterin, und zu wenigen Anteilen aus Triglyceriden, Cholesterylsulfat und Stearylestern. Phospholipide sowie Glykolipide würden als Bestandteil der Barrierelipide fehlen [12].

In der Tabelle 1 sind die wichtigsten Bestandteile der Barrierelipide des Stratum corneums und der Talgdrüsenlipide (Sebum) einander gegenübergestellt.

Tabelle 1: Gegenüberstellung der Markersubstanzen für Barrierelipide und Sebumlipide

Hautoberflächenlipide		
	Barrierelipide	Sebumlipide
Ceramide	√	-
Squalen	-	√
Cholesterin	√	-
Fettsäuren	langkettig	kurzkettig

Der auf der Hautoberfläche vorkommende Lipidfilm ist also immer eine Mischung aus Barrierelipiden und den Sebumlipiden. Die ausschließliche Untersuchung humaner Talgdrüsen kann aber für das Verständnis des physiologischen Zustandes sowohl normaler als auch krankhafter Zustände der Haut, z.B. Akne, von Bedeutung sein. Es fehlt jedoch an praktikablen Methoden, Talgdrüsenlipide frei von Barrierelipid-Verunreinigungen zu isolieren [11]. Kealey et al. beschreiben, wie in einer mühsamen Prozedur, mittels Präparation von Hand, unter Zuhilfenahme von Pinzette und Skalpell unter dem Mikroskop Talg- sowie Schweißdrüsen vom umliegenden Gewebe getrennt werden [13].

3.2 Das Stratum corneum als Hauptpenetrationsbarriere der Haut

Die äußerste Epidermisschicht, das Stratum corneum, stellt die Hauptpermeationsbarriere für dermal applizierte Wirkstoffe dar. Wie Untersuchungen zeigen, kontrolliert das Stratum corneum Diffusion und Penetration von chemischen Substanzen und Arzneistoffen in und durch die Haut. Primär verhindert Sie den transepidermalen Wasserverlust durch die Haut hindurch [14].

Die Struktur des Stratum corneum lässt sich unter Zuhilfenahme des „Brick-and-mortar (Ziegelstein und Mörtel)-Modells“ nach Elias [15] vereinfacht erklären. Verhornte Keratinozyten bilden die Ziegelsteine, die durch interzelluläre Lipide und wasserbindende moisturizing factors (Feuchthaltesubstanzen) wie z.B. Harnstoff, Aminosäuren etc., als Mörtel verbunden werden, wie in Abbildung 2 dargestellt ist.

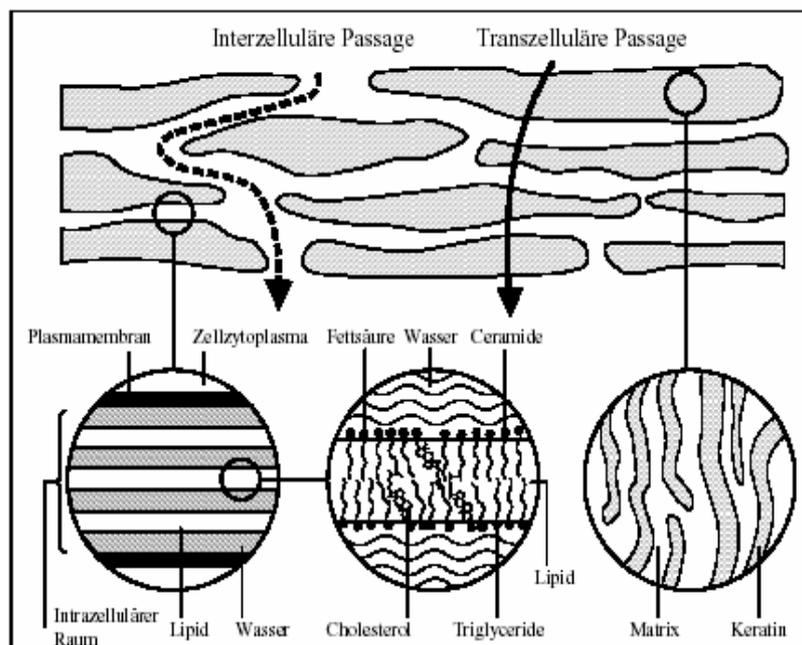


Abbildung 2: Aufbau des Stratum corneum und Transportwege durch das Stratum corneum, [16]

3.3 Wege zur Penetration von Substanzen in die Haut

Prinzipiell stehen Substanzen mehrere Möglichkeiten offen, in die Haut zu penetrieren. Man unterscheidet die transfollikuläre, transglanduläre, inter- und transzelluläre Penetration, wie in Abbildung 3 schematisch dargestellt wird.

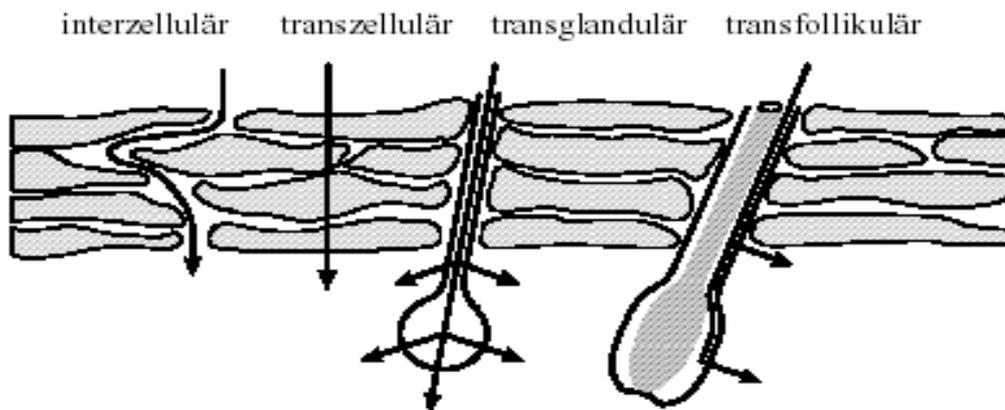


Abbildung 3: Darstellung der Penetrationswege von Substanzen durch die Haut [17]

Da Haare und Schweißporen jedoch nur 0,1-0,5 % der Gesamtoberfläche der Haut ausmachen [18, 19], wird Ihnen gemeinhin kein nennenswerter Beitrag zur Gesamtpenetration von Substanzen in die Haut beigemessen. Neueste Studien zeigen jedoch, dass der Annahme widersprochen werden muss, die Menge der Hautanhangsgebilde würde nicht mehr als 0,1% der Gesamthautoberfläche betragen. Otberg et al. fanden heraus, dass der durchschnittliche prozentuale Anteil an Haarfollikeln am Unterarm 0,09 %, am Stirnansatz jedoch 1,28 % beträgt [20].

Lediglich die perkutane Resorption großflächig topisch aufgetragener Substanzen hat eine Bedeutung, insbesondere wenn diese gut fettlöslich sind. Polare Substanzen wie z.B. Zucker oder Elektrolyte dagegen werden kaum resorbiert. Denn das Stratum corneum stellt für die Resorption vieler Stoffe ein starkes Hindernis dar.

3.4 Möglichkeiten zur Darstellung der Penetration von Substanzen in die Haut

Der Erfolg topischer Dermatika ist zuletzt vom Ausmaß der Wirkstoffkonzentration an seinem Wirkort abhängig. Wie tief und wohin ein topisch applizierter Wirkstoff in die Haut vordringen soll, ist durch seine Funktion vorgegeben, wie in Tabelle 2 dargestellt ist.

Tabelle 2: Auflistung von Wirkstoffen und deren favorisierte Zielorte in der Haut [21]

Haut-Zielort	Klasse	Beispiel
Oberfläche	Hautreinigungsmittel	Ethanolhaltige Zubereitungen
	Hautschutzmittel	Polymethylphenylsiloxangele
Stratum corneum	Moisturizer	Harnstoff
	Keratolytika	Salicylsäure
Lebende Epidermis/Dermis	Antiphlogistika	Glucocorticoide
	Antibiotika	Tetracyclin
	Diagnostika	
Systemische Zirkulation	Vasotonika	Heparin
	Transdermale Therapeutika	Estradiol, Glyceroltrinitrat
Schweißdrüsen	Antitranspirantien	Al^{3+} -Salze
Talgdrüsen	Antiaknemittel	Erythromycin
	Hormone	Antiandrogene
	(Haarausfall, Haarwachstum)	

In der Literatur wird eine große Anzahl an Techniken und Verfahren beschrieben, wie die dermatologische Wissenschaft die Fragen zu klären versucht, auf welchem Wege und in welchem Ausmaß Substanzen die Haut zu penetrieren vermögen.

Touitou et al. [2] beschreiben die verschiedenen Bestimmungsmöglichkeiten von Analyten in Haut sowie die Stärken und Schwächen der beschriebenen Verfahren. Unter anderem werden die Erstellung von Tiefenprofilen mittels horizontaler Schnittstapel mit anschließender Quantifizierung der Analytmenge in den Schnitten oder die quantitative Autoradiographie benannt.

Einige Arbeitsgruppen versuchen anhand der Kenntnis von chemischen und physikalischen Eigenschaften der zu untersuchenden Analyten wie der Molekülgröße/Molekülstruktur, die Penetrationseigenschaften von Verbindungen vorherzusagen [22, 23].

Spektroskopische Methoden werden zur Quantifizierung von fluoreszierenden Analyten [24] in oberen Hautschichten sowie zur Bestimmung von Analyten mit einer Absorption von Energie im infraroten Bereich [25] beschrieben. Beiden Methoden gemeinsam ist jedoch deren Beschränkung auf eine spezifische Gruppe von Verbindungen mit speziellen chemischen Eigenschaften. Deshalb können diese Verfahren nur als zusätzliche Methoden zur Aufklärung der Penetration von Substanzen in die Haut dienen, da deren Reichweite in die Haut nur bis in die obersten Hautschichten genügt. Eine spektroskopische Methode, die zwar ebenfalls auf die Detektion von fluoreszierenden Analyten beschränkt ist, jedoch Analyten bis in die Dermis hin detektieren kann, ist die Konfokale Laserrastermikroskopie, im englischen CLSM (confocal laser scanning microscopy) abgekürzt. Diese Methode wurde unter anderem dazu eingesetzt, um qualitative Unterschiede zwischen nativer und rekonstruierter Haut und deren Penetrationseigenschaften zu untersuchen [26] oder die Penetrationstiefe von fluoreszenzmarkierten Liposomen bzw. von hydrophilen und lipophilen Fluoreszenzfarbstoffen in Liposomen zu visualisieren [27, 28, 29].

Um der Frage der Penetration eines kosmetischen oder pharmazeutischen Wirkstoffes durch oder in das Hautgewebe nachzugehen, ist die Untersuchung mit der Franz'schen Diffusionszelle (FDZ) weit verbreitet [30].

Mit der FDZ kann *in vitro* eine Abschätzung der dermalen Resorption von Analyten aus Formulierungen in die Haut erfolgen [31]. Dabei kann mit hohem Probendurchsatz schnell und präzise abgeschätzt werden, ob ein Wirkstoff aus einer bestimmten Grundlage heraus in die Haut zu penetrieren vermag oder nicht. In Abbildung 4 ist die FDZ schematisch dargestellt.

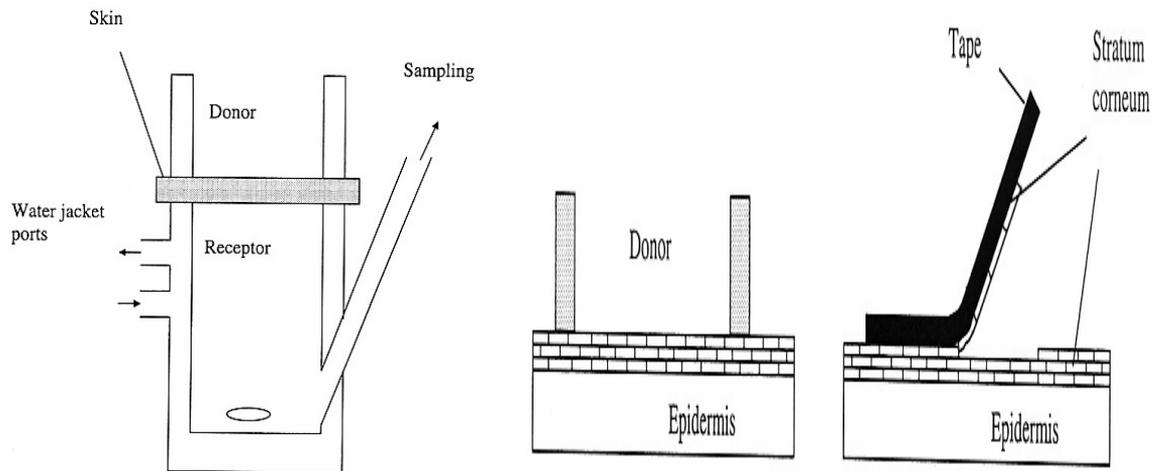


Abbildung 4: Schematische Darstellung der Franz'schen Diffusionszelle und dem sich anschließenden Tape-Stripping [32]

Jedoch ist die Methode der FDZ, bedingt durch die Probenahme-prozedur nicht in der Lage, Aussagen über Menge sowie Ausmaß der Wirkstoffpenetration über die Hautanhangsgebilde bzw. über die genaue örtliche Verteilung von Substanzen zu treffen (Material & Methoden, Kap. 4.3).

Die einzige beschriebene Methode, die quantitative Aussagen über das Ausmaß der Penetration in Hautanhangsgebilden treffen lässt, ist die quantitative Autoradiographie [33, 34, 35, 36]. Bei dieser Methode wird quantitativ die Strahlung gemessen, die ein Stoff selbst abgibt (griech. auto = selbst, Graphie = Aufzeichnung). Wesentliche Nachteile dieser Methode sind zum einen deren Beschränkung auf radioaktive bzw. radioaktiv markierte Verbindungen, die zudem noch sicherheitsrelevanter Vorkehrungen

bedürfen. Zum anderen müssen von der behandelten Haut angefertigte Dünnschnitte für eine Dauer von 4-7 Wochen entwickelt werden, um anschließend quantitative Aussagen über die Verteilung von Substanzen in der Haut treffen zu können.

Außer der quantitativen Autoradiographie bietet kein anderes Verfahren zur Darstellung der Penetration die Möglichkeit, den Anteil und somit das Ausmaß der transfollikulären und damit transglandulären Penetration zu bestimmen, bzw. orts aufgelöst eine Quantifizierung von Analyten in Haarkanälen und Talgdrüsen durchzuführen.

Die Lasermikrodissektion als relativ neue mikroskopische Methode kann als „Quasi Erntetechnik“, gemeinsam mit empfindlichen Nachweisverfahren dazu verwendet werden, topisch applizierte Substanzen orts aufgelöst und kontaminationsfrei an ihrem Wirkort nachzuweisen und auch quantitativ zu bestimmen.

3.5 Lasermikrodissektion

3.5.1 Aufbau des Leica AS Lasermikrodissektors

Das Leica AS Lasermikrodissektions-System (Leica AS LMD) ist ein Mikroskop, das mit Hilfe eines gepulsten UV-Lasers der Wellenlänge 337 nm präzises und kontaminationsfreies Schneiden von Gewebekompartimenten aus histologischen Gewebeschnitten ermöglicht. Das Schneiden (dissektieren) der interessierenden Gewebekompartimente erfolgt durch Fokussierung des Laserstrahls auf den Gewebeschnitt. Die gewünschte Schnittlinie des Lasers im Gewebeschnitt wird mit Hilfe einer geeigneten Software in dem vom Mikroskop erzeugten Bild eingezeichnet. Der Probentisch des Mikroskops bleibt dabei statisch, nur der Laser wird durch eine entsprechende Optik im Mikroskop bewegt. Die dissektierten Gewebeteile fallen anschließend der Gravitationskraft folgend in einen geeigneten Aufnahmebehälter (Deckel eines Polymerase Kettenreaktion-Tubes, engl. PCR-Tube), welcher sich unmittelbar unter dem Objektträger

befindet. Dieser Sachverhalt wird schematisch in Abbildung 5 dargestellt. Eine makroskopische Aufnahme von Dermisdissektaten ist in Abbildung 6 zu sehen.

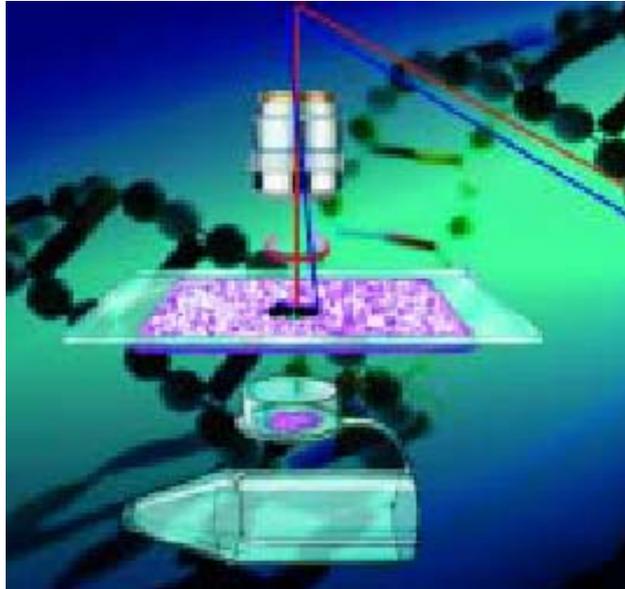


Abbildung 5: Schematische Darstellung der Lasermikrodissektion von Gewebeschnitten mit dem Leica AS LMD (Leica, *Application Letter-Laser Microdissection*, 2002)



Abbildung 6: Dissezierte Dermisstreifen im Cap eines PCR-Tubes, makroskopische Aufnahme

Die dissektierten Gewebeteile stehen anschließend diversen Untersuchungsmethoden zur Verfügung. Die Applikationen des LMD erstrecken sich von der Untersuchung von RNA und DNA, über Proteinanalytik und Chromosomenuntersuchungen, bis hin zur Untersuchung von lebenden Zellen.

Im Falle von RNA- oder DNA-Analysen müssen in der Regel die Proteine mittels Proteasen verdaut werden, um danach DNA oder RNA extrahieren zu können. Eine anschließende Amplifikation mittels Polymerase Kettenreaktion (PCR) und Auftrennung der DNA/RNA-Moleküle mittels Gelelektrophorese nach Molekulargewicht und Ladung gibt Aufschluss über den RNA/DNA-Gehalt interessierender Zellen. Wenn Proteine oder andere Biomoleküle wie Fettsäuren, Glyceride etc. untersucht werden sollen, können durch geeignete Wahl des Lösungsmittels, in dem die Dissektate aufgenommen werden, ohne weitere Probenaufarbeitung qualitative oder quantitative Analysen angeschlossen werden.

3.5.2 Anwendungsfelder der Lasermikrodissektion

Die Lasermikrodissektion (LMD) kann ein wertvolles Tool für folgende Anwendungsgebiete sein: Molekulare Medizin, Pathologie, Krebsforschung, Zellbiologie, Neurobiologie, Forensische Medizin, Präparation von Einzelzellen sowie die eingangs erwähnte Untersuchung von RNA/DNA und Proteinen.

In der Literatur werden fast ausschließlich Ergebnisse über molekularbiologische Untersuchungen publiziert. So wird die LMD dazu verwendet, um aus spezifischen Zellpopulationen mittels RNA/DNA-Gewinnung und anschließender Amplifikation mittels PCR Änderungen hinsichtlich der Genexpression von Zellen [37, 38, 39, 40], bzw. ein

verändertes Proteinexpressionsmuster [41] zu untersuchen. Verschiedene Autoren arbeiten in Ihren Reviews die Vorzüge des LMD in der Krebsforschung heraus. Insbesondere die präzise Separation von Tumorzellen und umgebendem, normalem Gewebe und anschließende Untersuchung von DNA/RNA und Proteinen zum besseren Verständnis der Entstehung sowie der Progression von Krebserkrankungen wird verdeutlicht [42, 43, 44, 45]. Burnet et al. geben einen neurowissenschaftlichen Ausblick der Verwendbarkeit des LMD. Insbesondere heben sie hervor, dass das LMD sich zur Untersuchung von psychiatrischen Funktionsstörungen als nützlich erweisen kann. Bei Verdacht der Beteiligung von bestimmten Zellpopulationen, können diese selektiv mit dem LMD ausgewählt, und weiteren Untersuchungen unterzogen werden [46]. Auch in der Parasitologie wird das LMD bereits mit Erfolg eingesetzt, um in vivo verschiedene Stadien der Wirts-Parasit Interaktionen untersuchen zu können bzw. um eine selektive Genexpressionsanalyse von Parasiten aufgrund ihrer Morphologie während verschiedener Entwicklungsstadien durchzuführen [47, 48]. In der Gastroenterologie wird das LMD dazu benutzt, um in vivo Interaktionen der Magenmucosazellen mit pathogenen Keimen, unter Ihnen *Helicobacter Pylori* als der prominenteste Keim im menschlichen Magentrakt, zu untersuchen [48, 49].

Die publizierten Ergebnisse beschränken sich weitestgehend auf die Untersuchung von Genen und deren Expression während unterschiedlichster physiologischer und oder zellulärer Vorgänge im menschlichen Körper. Eine qualitativ analytische Herangehensweise an spezifisch gewonnene Dissektate beschreibt dagegen Baogang J. Xu et al. Es werden per MALDI-TOF Massenspektren von humanen Brustepithelzellen erstellt, die sowohl invasive Mammacarcinomzellen als auch gesunde Brustepithelzellen enthielten. Dabei wurde festgestellt, dass es signifikante Unterschiede bei den Peakintensitäten der Proteine in den jeweils untereinander verglichenen Zelltypen gab [50].

3.6 Chromatographie

3.6.1 Theoretische Grundlagen

Als Chromatographie bezeichnet man Verfahren, welche die Trennung von Stoffgemischen und den Nachweis bzw. die quantitative Bestimmung der Einzelkomponenten zum Ziel haben. Bei allen chromatographischen Verfahren sind zwei miteinander nicht mischbare Stoffe notwendig, die man als Phasen bezeichnet. Eine der Phasen befindet sich häufig stationär im Trennsystem (stationäre Phase). Mit Hilfe der zweiten Phase (mobile Phase) wird das zu trennende Substanzgemisch über die stationäre Phase transportiert. Die stationäre Phase kann ein Festkörper oder eine Flüssigkeit sein, die mobile Phase ist entweder flüssig oder gasförmig.

Die Anfänge der chromatographischen Methoden gehen auf die Arbeiten des russischen Botanikers Michail Semjonowitsch Tswett (1872-1919) zurück, der 1903 seine erste Arbeit über Chromatographie veröffentlichte. Dabei trennte er Pflanzenfarbstoffe an festen Adsorbentien unter Verwendung von Calciumcarbonat als Adsorbens und Petrolether mit wenig Alkohol als mobile Phase [51].

3.6.2 Chromatographische Trennverfahren

Für chromatographische Trennungen sind Verteilungsvorgänge und Adsorptionsvorgänge als Trennmechanismen von Bedeutung. Bei der Verteilungschromatographie wird die zu untersuchende Substanz oder das Substanzgemisch zwischen zwei miteinander nicht mischbaren Phasen verteilt. Eine der beteiligten Phasen ist natürlich die mobile Phase, die andere befindet sich als dünner Film auf der Oberfläche und in den Poren des Trägermaterials. Die Trennung erfolgt durch Aufeinanderfolge vieler einzelner Verteilungsvorgänge zwischen beiden Phasen. Beispiele für chromatographische Verfahren, die hauptsächlich auf Verteilungsvorgänge

beruhen, sind die Papierchromatographie und die Gas-Flüssig-Chromatographie (GLC).

Als Adsorption bezeichnet man die Bindung bzw. die Anreicherung eines Stoffes an der Oberfläche eines zweiten Stoffes. Sie beruht meistens auf spezifischen Wechselwirkungen zwischen der Oberfläche des adsorbierenden Stoffes (Sorbens) und den funktionellen Gruppen des adsorbierten Stoffes. Bei der Adsorptionschromatographie wird die zu untersuchende Substanz an einer festen Oberfläche (stationäre Phase) adsorbiert. Mit Hilfe eines Lösungsmittelgemisches (mobile Phase, Elutionsmittel) kann die adsorbierte Substanz von der Oberfläche der stationären Phase abgelöst bzw. desorbiert werden. Da unterschiedliche Stoffe je nach Polarität und Löslichkeit unterschiedlich stark adsorbiert und desorbiert werden, kann ein Stoffgemisch durch aufeinander folgende Adsorption und Desorption getrennt werden. Meistens sind bei chromatographischen Trennungen den reinen Adsorptionseffekten auch Verteilungsvorgänge, Ionenaustauscheffekte und Siebeffekte überlagert.

Chromatographische Trennverfahren, bei denen Adsorptionserscheinungen eine Rolle spielen, sind die Gas-Fest-Chromatographie (GSC), die Säulenchromatographie (SC) und die Dünnschichtchromatographie (DC).

3.6.3 Hochdruckflüssigchromatographie/HPLC

Ein weiterentwickeltes Verfahren der Säulenchromatographie ist die Hochdruckflüssigchromatographie (HPLC). Bei der Säulenchromatographie wird das Sorptionsmittel in eine senkrecht stehende Säule (z.B. ein Glasrohr) eingefüllt. Die zu untersuchenden Substanzen werden als Lösung auf das Sorptionsmittel aufgegeben und mit einem Elutionsmittel durch die Säule gespült. Die Substanzen werden nach unterschiedlichen Zeiten (Volumina) aus der Säule eluiert und können so von einander getrennt und isoliert

werden. Voraussetzung ist eine ausreichende Fließgeschwindigkeit der mobilen Phase, die durch die Schwerkraft zustande kommt. Die Trennleistung der Säule hängt stark von der Partikelgröße und der Partikelgrößenverteilung der stationären Phase ab. Je kleiner und gleichmäßiger die Teilchen geformt sind, desto größer ist die Trennleistung. Aus kleineren Partikeln resultiert jedoch eine wesentlich größere Packungsdichte in der Trennsäule. Um trotz der hohen Packungsdichte noch eine ausreichende Strömungsgeschwindigkeit des Elutionsmittel zu gewährleisten, wird bei der HPLC das Elutionsmittel unter hohem Druck mit Hilfe von Pumpen durch die Säule gedrückt.

3.7 Kopplung Flüssigchromatographie/ API-ES Massenspektrometrie

Die Verbindung der Hochdruckflüssigchromatographie (HPLC) mit der Electrospray Ionisation Massenspektrometrie (ESI/MS) als Detektionsmöglichkeit bietet ein Verfahren zur Untersuchung nichtflüchtiger, polarer sowie thermolabiler Verbindungen, die der Gaschromatographie nicht zugänglich sind.

Beim Electrospray-Verfahren wird die in Lösung vorhandene Probe unter Atmosphärendruck in einem starken elektrostatischen Feld versprüht, das zwischen der Kapillarspitze, aus der die Lösung austritt, und einer wenige Millimeter davon entfernt lokalisierten Gegenelektrode angelegt wird. Durch eine Öffnung im Zentrum dieser Gegenelektrode gelangen die gebildeten Ionen in den Analysatorteil eines Massenspektrometers.

Durch das Anlegen eines hohen positiven oder negativen Potentials an der LC-Kapillare wird gleichzeitig eine rasche und feine Zerstäubung der aus der Kapillare austretenden Flüssigkeit und eine effektive Ionisierung der in der Flüssigkeit gelösten Analyt-Moleküle erzielt. Je nach Polarität der an das Ende der LC-Kapillare angelegten Hochspannung bilden sich Flüssigkeitströpfchen mit positiver oder negativer Überschussladung. Der

ESI-Prozess lässt sich formal in vier aufeinander folgende Teilprozesse unterteilen [52, 53]:

- 1) Bildung kleiner geladener Tröpfchen (mit üblicherweise 1-3 μm Durchmesser)
- 2) Lösungsmittelverlust dieser Tröpfchen verbunden mit einer Zunahme der Oberflächenladung
- 3) Abspaltung kleiner Mikrotröpfchen (Coulomb-Explosionen)
- 4) Desolvatisierung dieser abgespaltenen Mikrotröpfchen beim Transfer in den Massenspektrometer durch das Trockengas

Prinzipiell sind mit ESI Flussraten im Bereich von 1-20 μL möglich. Übliche Flussraten der normalen HPLC hingegen liegen zwischen 0,5-2,0 mL/min. Um ESI mit diesen Flussraten kompatibel zu machen, wurde eine pneumatisch unterstützte Version der ESI entwickelt, wie in Abbildung 7 schematisch dargestellt ist.

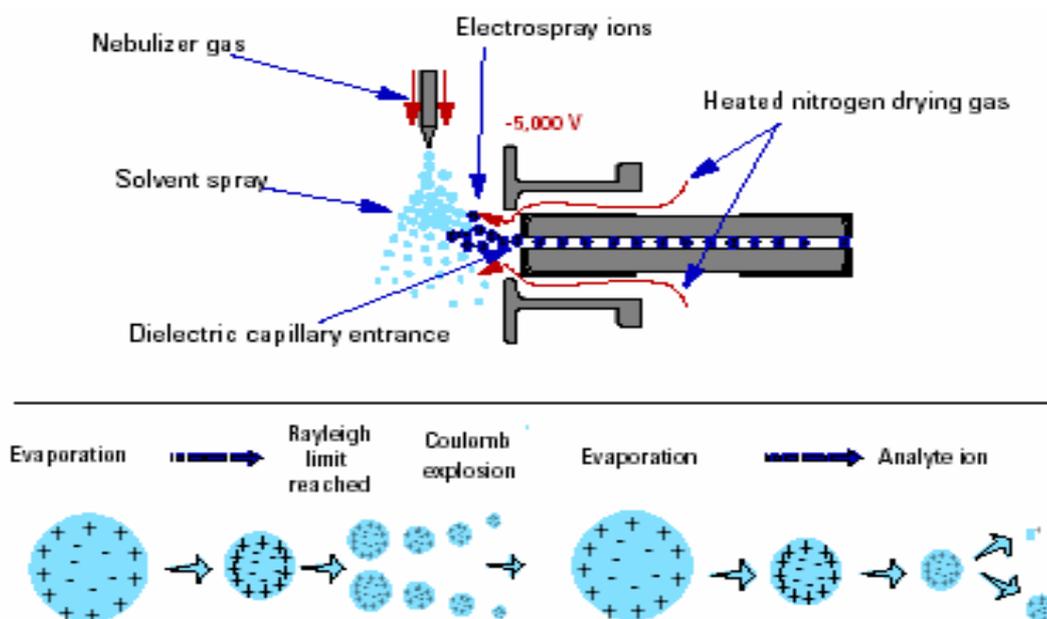


Abbildung 7: API-Electrospray-Ionisation (*Esquire-LC, Operations Manual Version 1.4. 1994, Firma Bruker Daltonic*)

Diese Technik wird bei den heutigen ESI-Quellen weitgehend eingesetzt. Durch einen konzentrisch-gleichgerichteten Gasfluss um den Ausgang der LC-Kapillare herum wird die austretende Lösung effektiver vernebelt. Wenn der Ionisierungsraum durch eine einfache Mikroöffnung mit dem Analysatorraum des Massenspektrometers in Verbindung steht, wird die Desolvatisierung durch einen dem Spray entgegengerichteten Fluss von trockenem, warmem Stickstoff unterstützt.

3.8 Massenanalysatoren

3.8.1 Quadrupol

Ein Quadrupol besteht aus vier kreiszylindrischen Stäben, an denen eine Gleichspannung U und eine Wechselspannung mit der Frequenz f anliegt, wobei gegenüber liegende Stäbe die gleiche Polarität der Gleichspannung und die gleiche Phase der Wechselspannung besitzen. Im Prinzip stellen Quadrupole Massenfilter dar, die unter bestimmten gegebenen physikalischen Bedingungen nur Ionen einer bestimmten Masse zu Ladungsverhältnis (m/z) durchlassen. Durch die Anordnung der vier parallelen stabförmigen Metallelektroden können Ionen eines definierten m/z -Verhältnisses unter dem Einfluss des kombinierenden Wechsel- und Gleichspannungsfeldes stabile oszillierende Bahnen durchlaufen. Alle anderen Ionen mit unterschiedlichem m/z -Verhältnis fliegen auf instabilen Bahnen und werden durch Kollision mit den Metallstäben entladen. Dieser Sachverhalt ist in Abbildung 8 dargestellt.

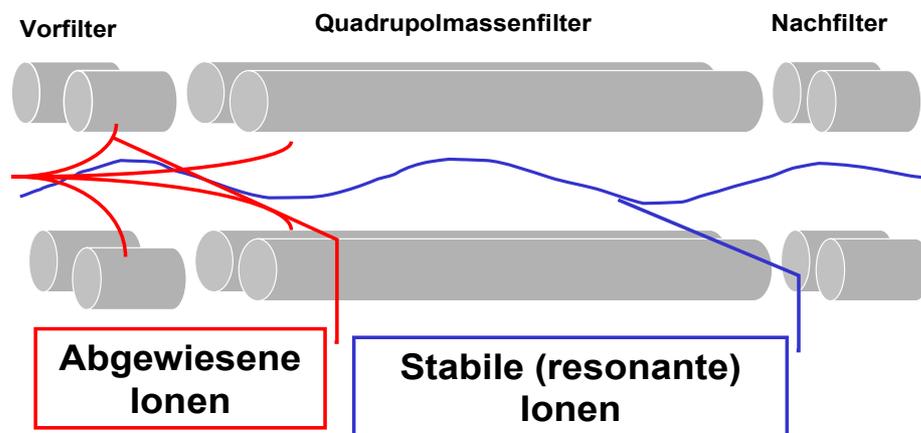


Abbildung 8: Arbeitsweise eines Quadrupoles (*Allgemeine Theorie Micromass*. 2003, Micromass GmbH)

3.8.2 Triple Quadrupol

Eine Möglichkeit, Strukturinformationen über die einzelnen Ionen zu erhalten, sind die so genannten Triple-Quadrupol-Analysatoren: Der erste als Q_0 bezeichnete Quadrupol, der nur mit Wechselstrom betrieben wird, dient als Hilfs-Quadrupol zum erleichterten Eintreten der Ionen in die eigentliche Analysatoreinheit. Der erste Mess-Quadrupol Q_1 scannt die Ionen und überführt sie in den Q_2 -Quadrupol. In der Q_2 -Einheit befindet sich eine Kollisionskammer mit inertem Gas (z.B. Stickstoff, Helium oder Argon). Die durch das Gas induzierte Fragmentierung der Moleküle wird allgemein auch als CID (collision induced decay) bezeichnet. Die durch das Kollisionsgas entstandenen Fragmente werden im zweiten Mess-Quadrupol Q_3 nach ihrem Masse zu Ladungsverhältnis (m/z) analysiert und treffen schließlich auf den Detektor. Ein schematischer Aufbau eines Tandem-Massenspektrometers ist in Abbildung 9 dargestellt.

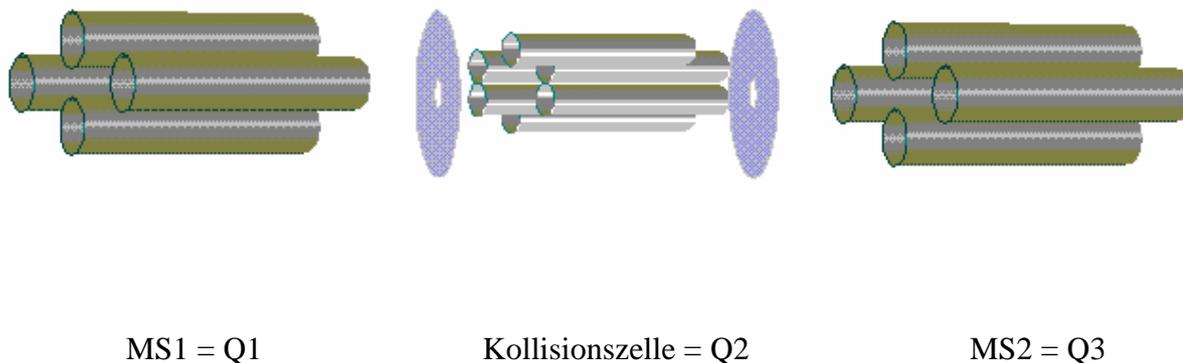


Abbildung 9: Schematischer Aufbau eines Tandem-Massenspektrometers
(Allgemeine Theorie Micromass. 2003, Micromass GmbH)

Diese Messanordnung dient zur Durchführung von MS/MS-Analysen (Vorläuferionen-, Produktionen-, Neutralverlust-Analysen).

3.8.3 Elektrische Ionenfalle (Ion Trap)

Eine andere, häufig verwendete Analysatoreinheit in der Massenspektrometrie ist die Ionenfalle (ion trap). Sie besteht aus einer Ringelektrode und zwei Endkappenelektroden, an die Wechselspannungen angelegt werden. Die Endkappenelektroden besitzen kleine, zentrische Öffnungen zum Ein- bzw. Auslass der Ionen.

Im Wesentlichen basiert die Funktionsweise der Ionenfalle auf demselben Prinzip wie der Quadrupol. Denn bildlich betrachtet, kann die Ringelektrode der Ionenfalle mit einem in sich gebogenen Quadrupolstab gleichgesetzt werden, dessen Enden miteinander verbunden sind. Die Endkappenelektroden begrenzen dabei das System von beiden Seiten ähnlich wie zwei sich gegenüber liegende Stäbe im Quadrupol. Dadurch werden die Ionen nicht mehr wie im Quadrupol über eine bestimmte Strecke transportiert, sondern beschreiben vielmehr Bahnen in dem in sich geschlossenen System, in dem sie quasi „gefangen“ sind. Der schematische Aufbau einer Ionenfalle ist in Abbildung 10 wiedergegeben.

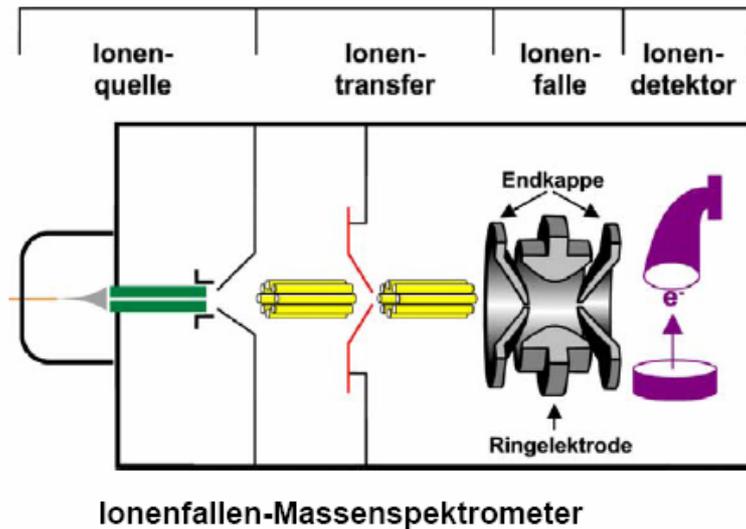


Abbildung 10: Schematische Darstellung eines Ionenfallenmassenspektrometers (http://www.unisaarland.de/fak8/heinzle/de/teaching/Aufbaupraktikum2004/AK_Huber.pdf)

Durch diese Anordnung wird ein dreidimensionales Quadrupolfeld aufgebaut, das zur Speicherung bzw. Einfangen von Ionen in einem elektrischen Feld dient. Zuerst werden Ionen eines möglichst großen Massenbereiches in der Ionenfalle akkumuliert, wobei sie innerhalb der Ionenfalle stabile Bahnen durchlaufen. Zur Analyse bestimmter Ionen kann die Wechselspannungsamplitude erhöht werden, wodurch Ionen aus dem Stabilitätsbereich der Ionenfalle gedrängt werden.

Die Ionen können dadurch für variable Zeiten (Mikrosekunden bis Sekunden) auf stabilen Bahnen gehalten und nach ihrer Masse zu Ladungsverhältnis analysiert werden.

4 Material & Methoden

4.1 Probengewinnung/Extraktion

- Die Gewinnung von Stratum corneum-Lipiden wurde mit Hilfe eines in Isopropanol getränkten Wattestückchens von der Hautoberfläche freiwilliger Probanden und anschließender Extraktion im Ultraschallbad (15 Minuten) vorgenommen.
- Die Gewinnung von Talgdrüsenlipiden erfolgte bei quantitativen Auswertungen durch Aufnahme der gesammelten Talgdrüsendissektate in 100 µL Isopropanol und anschließender Extraktion im Ultraschallbad (30 Minuten).
- Die gewonnenen Proben aus Versuchen der FDZ (vgl. Kap 4.3) wurden in Isopropanol aufgenommen [Hautüberstand: 4 mL, Stratum corneum-Tapes: 5 mL, Epidermis : 5 mL, Dermis: 10 mL, Rezeptorphase: Entnahme von mindestens 2 Aliquots] und über Nacht stehen gelassen. Danach werden die gewonnenen Hautproben einer Extraktion im Ultraschallbad (ca. 10 Minuten) unterworfen
- Die Gewinnung von Nilrot aus Haut-, Talgdrüsen- und Haardissektaten erfolgte durch Aufnahme der Dissektate in 50 µL Aceton und anschließender Extraktion im Ultraschallbad (30 Minuten).
- Die Gewinnung von Salicylsäure aus Hautdissektaten erfolgte durch Aufnahme der Dissektate in 50 µL Isopropanol und anschließender Extraktion im Ultraschallbad (30 Minuten).

4.2 Hochdruck-Flüssigchromatographie

4.2.1 Trennung Ceramide

Pumpe:	quarternäre Pumpe, Serie 1100, Agilent
Entgaser:	Serie 1100, Agilent
Injektor:	automatischer Probengeber, Serie 1100, Agilent
Injektionsvolumen:	5 µL
Trennsäule:	Grom-Sil Octyl 3 CP, 3 µm, 60 x 2 mm, Grom Analytik und HPLC GmbH
Auswertung:	Data analysis Version 3.0 (Build 49), Bruker Daltonics
Gerät:	API-ES Ionenfallenmassenspektrometer-ESQUIRE~LC, Bruker Daltonics
Geräteparameter:	siehe Tabelle 5
Gradient:	

Time (min)	MetOH+2 mM NH_4Ac %	t-BME %	Flow (mL/min)
00.00	95.00	05.00	00.20
00.50	95.00	05.00	00.20
06.00	70.00	30.00	00.20
11.00	70.00	30.00	00.20
13.00	60.00	40.00	00.20
20.00	60.00	40.00	00.20
20.50	95.00	05.00	00.20
30.00	95.00	05.00	00.20

Trennprinzip:	hydrophobe Wechselwirkungen zwischen dem alkylierten Trennmaterial in der Trennsäule und den unpolaren Alkylketten der Ceramide, wodurch eine Auftrennung der Ceramide nach Kettenlänge ermöglicht wird
---------------	---

Detektion: Ceramide werden massenspektrometrisch im negativen Ionenmodus als $[M-H]^-$ Quasimolekülonen ionisiert.

Tabelle 3: Massensignale m/z von Ceramiden als $[M-H]^-$ Quasimolekülonen

Amidgebundene Fettsäure	Cer1 Cer(EOS)	Cer 2 Cer(NS)	Cer 3 Cer(NP)	Cer 4 Cer (EOH)	Cer 5 Cer(AS)	Cer 6 Cer(AP)	Cer 7 Cer(AH)	Cer 8 Cer(NH)	N-acyl- Sphinganin
14		508.5	526.5		524.5	542.5	540.5	524.5	510.5
15		522.5	540.5		538.5	556.5	554.5	538.5	524.5
16		536.5	554.5		552.5	570.5	568.5	552.5	538.5
17		550.5	568.5		566.5	584.5	582.5	566.5	552.5
18		564.5	582.5		580.5	598.5	596.5	580.5	566.5
18:1		562.5	580.5		578.5	596.5	594.5	578.5	564.5
19		578.5	596.5		594.5	612.5	610.5	594.5	580.5
20	870.5	592.5	610.5	886.5	608.5	626.5	624.5	608.5	594.5
21	884.5	606.5	624.5	900.5	622.5	640.5	638.5	622.5	608.5
22	898.5	620.5	638.5	914.5	636.5	654.5	652.5	636.5	622.5
23	912.5	634.5	652.5	928.5	650.5	668.5	666.5	650.5	636.5
24	926.5	648.5	666.5	942.5	664.5	682.5	680.5	664.5	650.5
25	940.5	662.5	680.5	956.5	678.5	696.5	694.5	678.5	664.5
26	954.5	676.5	694.5	970.5	692.5	710.5	708.5	692.5	678.5
27	968.5	690.5	708.5	984.5	706.5	724.5	722.5	706.5	692.5
28	982.5	704.5	722.5	998.5	720.5	738.5	736.5	720.5	706.5
29	996.5	718.5	736.5	1012.5	734.5	752.5	750.5	734.5	720.5
30	1010.5	732.5	750.5	1026.5	748.5	766.5	764.5	748.5	734.5
31	1024.5	746.5	764.5	1040.5	762.5	780.5	778.5	762.5	748.5
32	1038.5	760.5	778.5	1054.5	776.5	794.5	792.5	776.5	762.5
33	1052.5	774.5	792.5	1068.5	790.5	808.5	806.5	790.5	776.5
34	1066.5	788.5	806.5	1082.5	804.5	822.5	820.5	804.5	790.5
35	1080.5	802.5	820.5	1096.5	818.5	836.5	834.5	818.5	804.5
36	1094.5	816.5	834.5	1110.5	832.5	850.5	848.5	832.5	818.5

Fett: Ceramid species mit größter Signalintensität. Diese Species werden zur Bestimmung der Ceramidverteilung vereinfachend herangezogen.

4.2.2 Trennung freier Fettsäuren

Pumpe:	quarternäre Pumpe, Serie 1100, Agilent
Entgaser:	Serie 1100, Agilent
Injektor:	automatischer Probengeber, Serie 1100, Agilent
Injektionsvolumen:	5 µL
Trennsäule:	Grom-Sil ODS 5-ST, 5 µm, 60 x 2 mm, Grom Analytik und HPLC GmbH
Auswertung:	Data analysis Version 3.0 (Build 49), Bruker Daltonics
Gerät:	API-ES Ionenfallenmassenspektrometer-ESQUIRE~LC, Bruker Daltonics
Geräteparameter:	siehe Tabelle 5
Gradient:	

Time (min)	$H_2O + 0.5\% HCOOH$	MetOH %	t-BME %	Flow (mL/min)
00.00	20.00	80.00	00.00	00.20
01.00	00.00	100.0	00.00	00.20
10.00	00.00	60.00	40.00	00.20
15.00	00.00	60.00	40.00	00.20
15.50	00.00	100.0	00.00	00.20
16.00	20.00	80.00	00.00	00.20
30.00	20.00	80.00	00.00	00.20

Trennprinzip:	hydrophobe Wechselwirkungen zwischen dem alkylierten Trennmaterial in der Trennsäule und den unpolaren Alkylketten der Fettsäuren, wodurch eine Auftrennung der Fettsäuren nach Kettenlänge ermöglicht wird
Detektion:	Fettsäuren werden massenspektrometrisch im negativen Ionenmodus als $[M-H]^-$ Quasimolekülonen ionisiert.

4.2.3 Trennung Mono-, Di-, und Triglyceride

Pumpe:	quaternäre Pumpe, Serie 1100, Agilent
Entgaser:	Serie 1100, Agilent
Injektor:	automatischer Probengeber, Serie 1100, Agilent
Injektionsvolumen:	5 µL
Trennsäule:	Grom-Sil Octyl 3-CP, 5 µm, 60 x 2 mm, Grom Analytik und HPLC GmbH
Auswertung:	Data analysis Version 3.0 (Build 49), Bruker Daltonics
Gerät:	API-ES Ionenfallenmassenspektrometer-ESQUIRE~LC, Bruker Daltonics
Geräteparameter:	siehe Tabelle 5
Gradient:	

Time (min)	H_2O %	MetOH+2mM NH_4Ac %	t-BME %	Flow (mL/min)
00.00	10.00	90.00	00.00	00.20
01.00	00.00	100.0	00.00	00.20
06.00	00.00	65.00	35.00	00.20
16.00	00.00	65.00	35.00	00.20
16.50	00.00	100.0	00.00	00.20
17.00	10.00	90.00	00.00	00.20
30.00	10.00	90.00	00.00	00.20

Trennprinzip: hydrophobe Wechselwirkungen zwischen dem alkylierten Trennmaterial in der Trennsäule und den unpolaren Alkylketten der Glyceride, wodurch eine Auftrennung der Glyceride nach Kettenlänge ermöglicht wird

Detektion: Glyceride werden massenspektrometrisch bevorzugt als Quasimolekülonen $[M+NH_4]^+$ im positiven Ionenmodus ionisiert.

Tabelle 4: Berechnete molekulare Massen für Triglyceride [FS = Fettsäuren, TG = Triglyceride. Die Kombination einer FS aus der ersten Zeile (Umrandung fett) der Tabelle sowie zwei weiteren FS aus den Tabellenspalten (die Masse Glycerins hinzuaddiert, abzüglich der Masse von 3 Molekülen Wasser) ergeben jeweils die Masse eines TG, die in der Mitte von 2 FS steht].

FS	C14		C15		C16		C16:1		C18		C18:1		C18:2		C18:3	
FS	TG	FS	TG	FS	TG	FS	TG	FS	TG	FS	TG	FS	TG	FS	TG	FS
C14	722	C14	736	C14	750	C14	748	C14	778	C14	776	C14	774	C14	772	C14
C15	750	C15	764	C15	778	C15	776	C15	806	C15	804	C15	802	C15	800	C15
C16	778	C16	792	C16	806	C16	804	C16	834	C16	832	C16	830	C16	828	C16
C16:1	774	C16:1	788	C16:1	802	C16:1	800	C16:1	830	C16:1	828	C16:1	826	C16:1	824	C16:1
C18	834	C18	848	C18	862	C18	860	C18	890	C18	888	C18	886	C18	884	C18
C18:1	830	C18:1	844	C18:1	858	C18:1	856	C18:1	886	C18:1	884	C18:1	882	C18:1	880	C18:1
C18:2	826	C18:2	840	C18:2	854	C18:2	852	C18:2	882	C18:2	880	C18:2	878	C18:2	876	C18:2
C18:3	822	C18:3	836	C18:3	850	C18:3	848	C18:3	878	C18:3	876	C18:3	874	C18:3	872	C18:3

Tabelle 5: Geräteparameter zur Bestimmung der Talgdrüsenlipide am Bruker Daltonics Esquire-LC

Geräteparameter	Freie Fettsäuren	Triglyceride			Ceramide
		0-5 Minuten	5-10 Minuten	10-30 Minuten	
Polarity	negative	positive	positive	positive	negative
Capillary{ #115}	+ 4000	- 4000	- 4000	- 4000	+ 4000
End Plate{ #115}	- 500	+ 500	+ 500	+ 500	- 500
Nebulizer[psi]	20.00	20.00	18.00	18.00	18.00
Dry Gas[°C]	7.00	8.00	7.00	7.00	7.00
Dry Temp[°C]	300.00	300.00	300.00	300.00	300.00
Scan Range	standard	standard	standard	standard	standard
Scan Resolution	normal	normal	normal	normal	normal
Target mass	300.00	381.00	619.00	881.00	800.00
Compound Stability %	120.00	50.00	100.00	110.00	120.00
Trap Drive Level %	40.00	100.00	100.00	100.00	100.00
Scan[m/z]	180-600	250-1300	250-1300	250-1300	200-1200
Averages	6.00	6.00	6.00	6.00	5.00
Max. Acc. Time[ms]	200.00	200.00	200.00	200.00	300.00
ICC Target[Skt.]	5000	10000	10000	10000	3000

4.2.4 Trennung Phospholipide

Pumpe: quarternäre Pumpe, Serie 1100, Agilent

Entgaser: Serie 1100, Agilent

Injektor: automatischer Probengeber, Serie 1100, Agilent

Injektionsvolumen: 5 µL

Trennsäule: Grom-Sil Octyl 5-CP, 5 µm, 60 x 2 mm, Grom Analytik und HPLC GmbH

Auswertung: Data analysis Version 3.0 (Build 49), Bruker Daltonics

Gerät: API-ES Ionenfallenmassenspektrometer-ESQUIRE~LC, Bruker Daltonics

Geräteparameter: siehe Tabelle 6

Gradient:

Time (min)	$H_2O + 0.5\% HCOOH$	MetOH %	t-BME %	Flow (mL/min)
00.00	30.00	70.00	00.00	00.20
04.00	00.00	100.00	00.00	00.20
07.00	00.00	100.00	00.00	00.20
09.00	00.00	70.00	30.00	00.30
14.00	00.00	70.00	30.00	00.30
16.00	00.00	100.00	00.00	00.30
18.00	00.00	100.00	00.00	00.30
20.00	30.00	70.00	00.00	00.20
30.00	30.00	70.00	00.00	00.20

Trennprinzip: hydrophobe Wechselwirkungen zwischen dem alkylierten Trennmaterial in der Trennsäule und den unpolaren Alkylketten der Phospholipide, wodurch eine Auftrennung der Phospholipide nach Kettenlänge ermöglicht wird

Detektion: Phospholipide werden massenspektrometrisch bevorzugt als Quasimolekülionen $[M+H]^+$ / $[M+Na]^+$ im positiven Ionenmodus ionisiert.

Tabelle 6: Geräteparameter zur Bestimmung von Phospholipiden am Bruker Daltonics Esquire-LC

Geräteparameter	Sphingomyeline	Phosphatidylcholine
Polarity	positive	positive
Capillary[V]	- 4000	- 4000
End Plate[V]	+ 500	+ 500
Nebulizer[psi]	15.00	15.00
Dry Gas[°C]	9.00	9.00
Dry Temp[°C]	300.00	300.00
Scan Range	standard	standard
Scan Resolution	normal	normal
Target mass	700.00	800.00
Compound Stability %	100.00	100.00
Trap Drive Level %	100.00	100.00
Scan[m/z]	400-1000	400-1000
Averages	3.00	3.00
Max. Acc. Time[ms]	200.00	200.00
ICC Target[Skt.]	25000	25000

4.2.5 Trennung Cholesterin und Squalen

Pumpe: quarternäre Pumpe, Serie 1100, Agilent

Entgaser: Serie 1100, Agilent

Injektor: automatischer Probengeber, Serie 1100, Agilent

Injektionsvolumen: 5 µL

Trennsäule: Grom-Sil Octyl 4-FE, 5 µm, 60 x 2 mm, Grom Analytik und HPLC GmbH

Auswertung: LC/MSD Chemstation Rev.A.08.04[1008]

Gerät: API-ES Quadrupol Massenspektrometer, Serie 1100, Agilent

Geräteparameter: siehe Tabelle 7

Gradient:

Time (min)	H_2O %	MetOH+2mM NH_4Ac %	t-BME %	Flow (mL/min)
00.00	07.50	92.50	00.00	00.20
05.00	00.00	100.0	00.00	00.20
14.00	00.00	90.00	10.00	00.20
15.00	00.00	50.00	50.00	00.20
16.00	00.00	50.00	50.00	00.20
17.00	00.00	100.00	00.00	00.20
18.00	07.50	92.50	00.00	00.20
25.00	07.50	92.50	00.00	02.00

Trennprinzip: hydrophobe Wechselwirkungen zwischen dem alkylierten Trennmaterial in der Trennsäule und den unpolaren Alkylketten von Cholesterin und Squalen, wodurch eine Trennung nach Affinitätsunterschieden zum Trennmaterial ermöglicht wird

Detektion: Beide Verbindungen werden im positiven Ionenmodus als $[M+H]^+$ gemessen, wobei das Cholesterin unter Verlust eines Moleküls Wasser als $[M-H_2O+H]^+$ detektiert wird

Tabelle 7: Geräteparameter zur Bestimmung von Cholesterin und Squalen am Agilent MSD 1100

Polarity	positive
Fragmentor [V]	30
Capillary [V]	4000
Nebulizer [psi]	20
Drying Gas [C°]	300
Drying Gas [L/min]	8
Gain	1.0
Peakwith [min]	0.25

4.2.6 Quantifizierung Nilrot

Pumpe: quarternäre Pumpe, Serie 1100, Agilent

Entgaser: Serie 1100, Agilent

Injektor: automatischer Probengeber, Serie 1100, Agilent

Injektionsvolumen: 5 μ L

Trennsäule: Grom-Sil Octyl 5-CP, 5 μ m, 60x2 mm, Grom Analytik und HPLC GmbH

Auswertung: Mass Lynx GLOBAL MASS INFORMATICS V4.00.00

Gerät: API-ES triple Quadrupol Massenspektrometer, Quattro micro, Waters

Geräteparameter: siehe Tabelle 8

Gradient:

Time (min)	H ₂ O +HCOOH %	MetOH %	t-BME %	Flow (mL/min)
00.00	40.00	60.00	00.00	0.2
04.00	00.00	100.00	00.00	0.2
06.00	00.00	100.00	00.00	0.2
07.00	00.00	70.00	30.00	0.2
09.00	00.00	70.00	30.00	0.2
11.00	00.00	100.00	00.00	0.3
13.00	40.00	60.00	00.00	0.3
15.00	40.00	60.00	00.00	0.3
16.00	40.00	60.00	00.00	0.2
22.00	40.00	60.00	00.00	0.2

Tabelle 8: Geräteparameter am Quattro micro für die Bestimmung von Nilrot

Geräteparameter	Nilrot
Polarity	ES (+)
Capillary (kv)	2.80
Cone (V)	27.0
Extractor (V)	2.0
RF-Lens (V)	0.5
Source Temp. (°C)	120
DesolvationTemperature (°C)	450
Cone Gas Flow (L/Hr)	OFF
Desolvation Gas Flow (L/Hr)	OFF
Analyser	15.0
LM 1 Resolution	15.0
HM 1 Resolution	0.5
Ion Energy 1	-1
Entrance	34
Collision	+1
Exit	15.0
LM 2 Resolution	15.0
HM 2 Resolution	3.0
Ion Energy 2	650
Multiplier (V)	
Pressure Gauges	
Gas Cell Pirani Pressure (mbar)	<1e-4 mBars

4.2.6.1 Deutung der Fragmentspektren des Nilrots

Die Quantifizierung des Nilrotes erfolgte im Multi reaction monitoring (MRM)-modus des Triple Quadrupol Massenspektrometers „Quattro micro“ der Firma Waters (Eschborn). Auch wenn diese Verbindung endogen in der Haut nicht vorkommt, bietet eine MRM-Bestimmung von Fragmenten der zu bestimmenden Analyten zusätzliche Selektivität bei der Quantifizierung.

Für die MRM-Methode ist der Massenübergang des protonierten Nilrot, also $319,3 \text{ m/z} \longrightarrow 275,3 \text{ m/z}$, dem signalintensivsten, ebenfalls protonierten Hauptfragment ausgewählt worden.

Das Fragment kann dabei rein rechnerisch eine Summenformel von $C_{18}H_{15}N_2O$, also der Massenübergang $319 \text{ m/z} \longrightarrow 275 \text{ m/z}$ formal der Abspaltung eines Moleküls, Acetaldehyd, C_2H_4O entsprechen. Eine andere Möglichkeit des Verlustes der Massendifferenz von 44 amu wäre die Eliminierung eines Moleküls CO_2 und die Bildung der Verbindung mit der Summenformel $C_{19}H_{19}N_2$. Diese Möglichkeit kommt aber so gut wie gar nicht in Frage, da das Nilrot keine abspaltbare Carboxylgruppe als Seitenkette besitzt. Bei einer Kollisionsenergie von 34 Elektronenvolt ist die Fragmentausbeute am größten gewesen. In Abbildung 11 ist der Massenübergang Nilrot zum Fragment 275 m/z dargestellt. Wenn auch die postulierte Struktur nur ein Vorschlag ist, wie das Molekül mit der Masse 275 m/z aussehen könnte, erscheint es sehr wahrscheinlich, dass dem quartären Stickstoffatom je eine Methyl- und Ethylgruppe abgetrennt werden. Zudem scheint der Verlust an 8 Wasserstoffatomen zugleich an keiner anderen Stelle im Molekül sinnvoll. Somit wäre die Summenformel für die postulierte Verbindung $C_{17}H_{11}N_2O_2$.

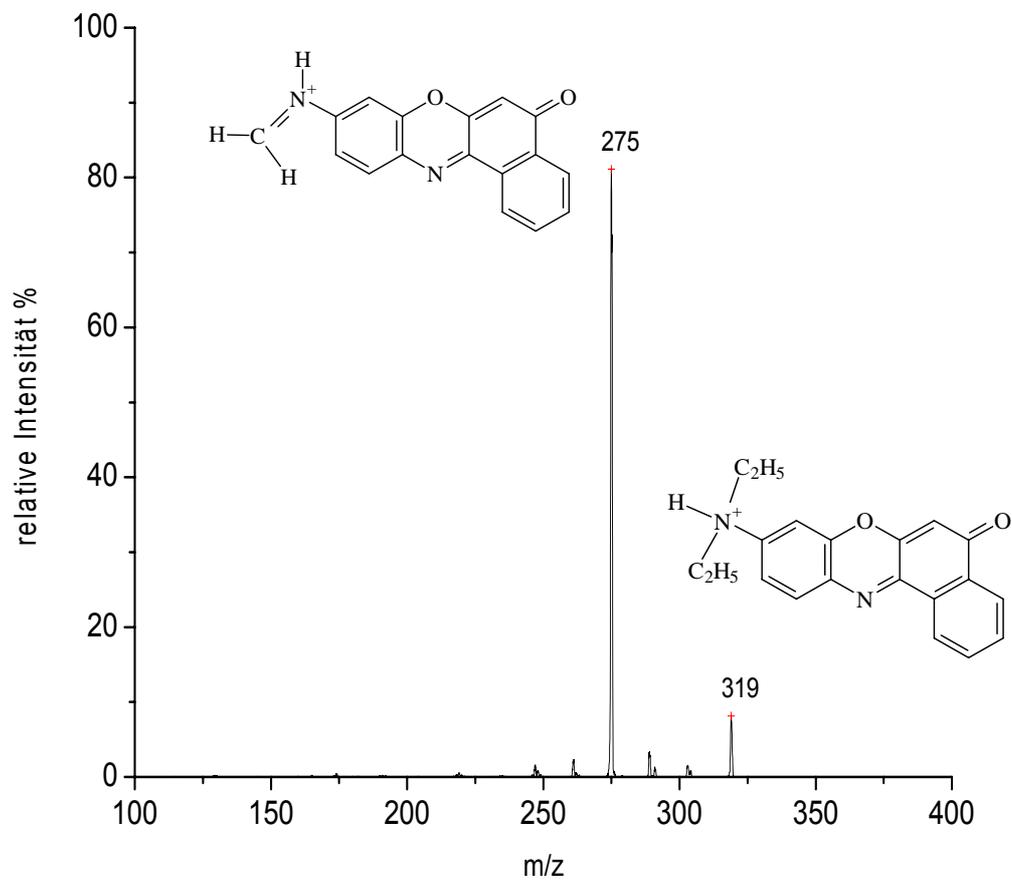


Abbildung 11: Massenübergang Nilrot zum Fragment der Masse 275 m/z, Kollisionsenergie 34 eV

4.2.7 Quantifizierung Salicylsäure

Pumpe:	quarternäre Pumpe, Serie 1100, Agilent
Entgaser:	Serie 1100, Agilent
Injektor:	automatischer Probengeber, Serie 1100, Agilent
Injektionsvolumen:	5 µL
Trennsäule:	Grom-Sil Octyl 5-CP, 5 µm, 60 x 2 mm, Grom Analytik und HPLC GmbH
Auswertung:	Mass Lynx GLOBAL MASS INFORMATICS V4.00.00
Gerät:	API-ES triple Quadrupol Massenspektrometer, Quattro micro, Waters
Geräteparameter:	siehe Tabelle 9
Gradient:	

Time (min)	H_2O +0,5 %HCOOH %	MetOH+0,5% HCOOH	t-BME %	Flow (mL/min)
00.00	70.00	30.00	00.00	0.25
03.00	00.00	100.00	00.00	0.25
05.00	00.00	70.00	30.00	0.25
06.50	00.00	70.00	30.00	0.25
08.00	00.00	100.00	00.00	0.25
10.00	00.00	100.00	00.00	0.30
12.00	70.00	30.00	00.00	0.30
13.50	70.00	30.00	00.00	0.30
15.00	70.00	30.00	00.00	0.25
19.00	70.00	30.00	00.00	0.25

Tabelle 9: Geräteparameter am Quattro micro für die Bestimmung von Salicylsäure

Geräteparameter	Salicylsäure
Polarity	ES (-)
Capillary (kv)	3.02
Cone (V)	25.0
Extractor (V)	1.0
RF-Lens (V)	0.3
Source Temp. (°C)	120
DesolvationTemperature (°C)	450
Cone Gas Flow (L/Hr)	OFF
Desolvation Gas Flow (L/Hr)	OFF
Analyser	
LM 1 Resolution	15.0
HM 1 Resolution	15.0
Ion Energy 1	0.5
Entrance	-1
Collision	15
Exit	+1
LM 2 Resolution	15.0
HM 2 Resolution	15.0
Ion Energy 2	3.0
Multiplier (V)	650
Pressure Gauges	
Gas Cell Pirani Pressure (mbar)	<1e-4 mBars

4.2.7.1 Deutung der Fragmentspektren Salicylsäure

Die Quantifizierung der Salicylsäurekonzentration ist ebenfalls mit dem Triple Quadrupol Massenspektrometer von Micromass durchgeführt worden. Es wurde eine selektive MRM-Methode entwickelt, da im MRM-Modus eine empfindlichere Quantifizierung der Salicylsäure möglich ist, aufgrund des deutlich erhöhten Signal zu Rauschverhältnisses. Die Salicylsäure ist im Massenübergang 137 m/z \longrightarrow 93 m/z, also der Übergang von Salicylsäure zum Phenol, gemessen worden, da dieses Fragment die höchste Signalausbeute ergab. In Abbildung 12 ist der beschriebene Massenübergang dargestellt.

Dieser Massenübergang entspricht dem Verlust von 44 amu, also der Abspaltung der Carboxylgruppe des Salicylatanions. Bandu et al. bestätigen das bereits beschriebene Fragmentierungsverhalten der Salicylsäure bei ihren Untersuchungen [54].

Die entwickelte Methode hatte eine Nachweisgrenze von ca. 5 ng/mL und eine Bestimmungsgrenze von 15 ng/mL für den Massenübergang des Salicylats anions zum Phenolat anion.

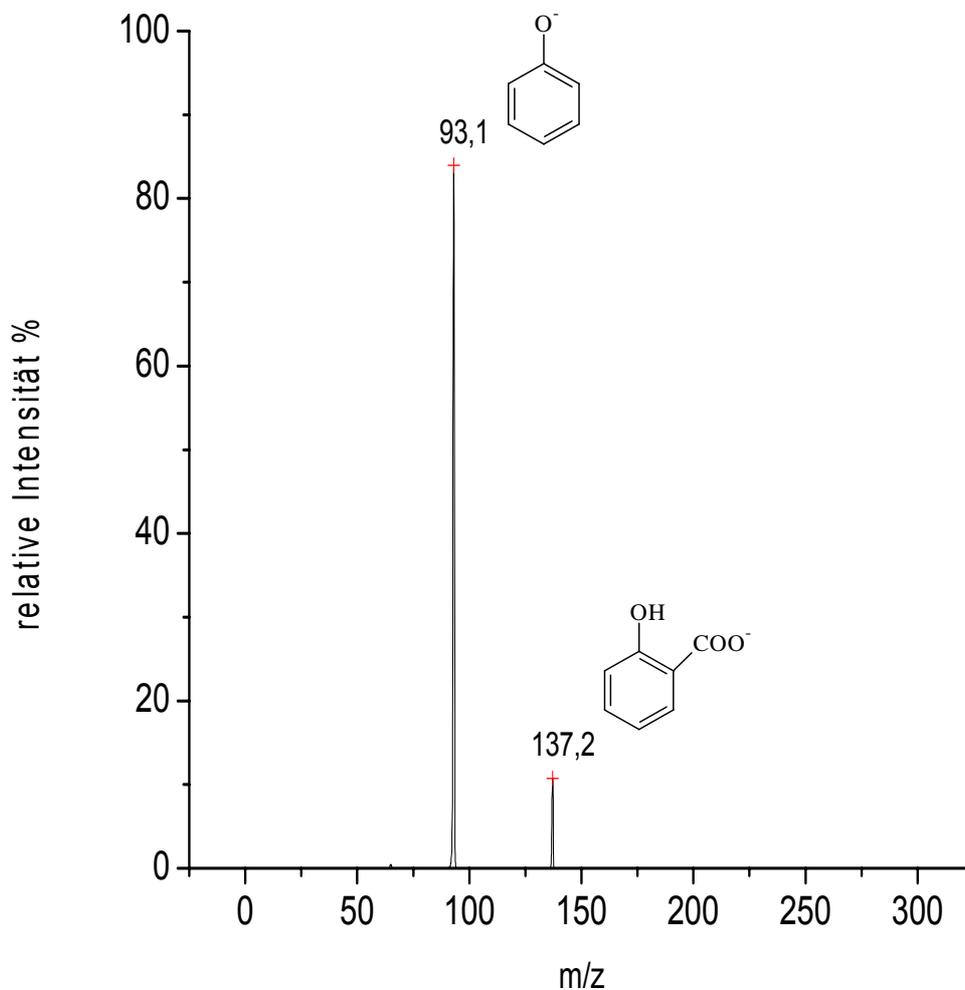


Abbildung 12: Massenübergang Salicylats anion zu Phenolat anion im negativen Ionenmodus bei der Kollisionsenergie 15 eV

Wenn die Salicylsäure einer höheren Kollisionsenergie unterworfen wird, kommt es zu weiteren Fragmentierungen (Abbildung 13). Es wird vermutet, dass es sich zum einen um das Cyclohexa 1,3-dien-5-in-Anion (m/z 75) und zum anderen um das Cyclopentadien-Anion (m/z 65) handelt.

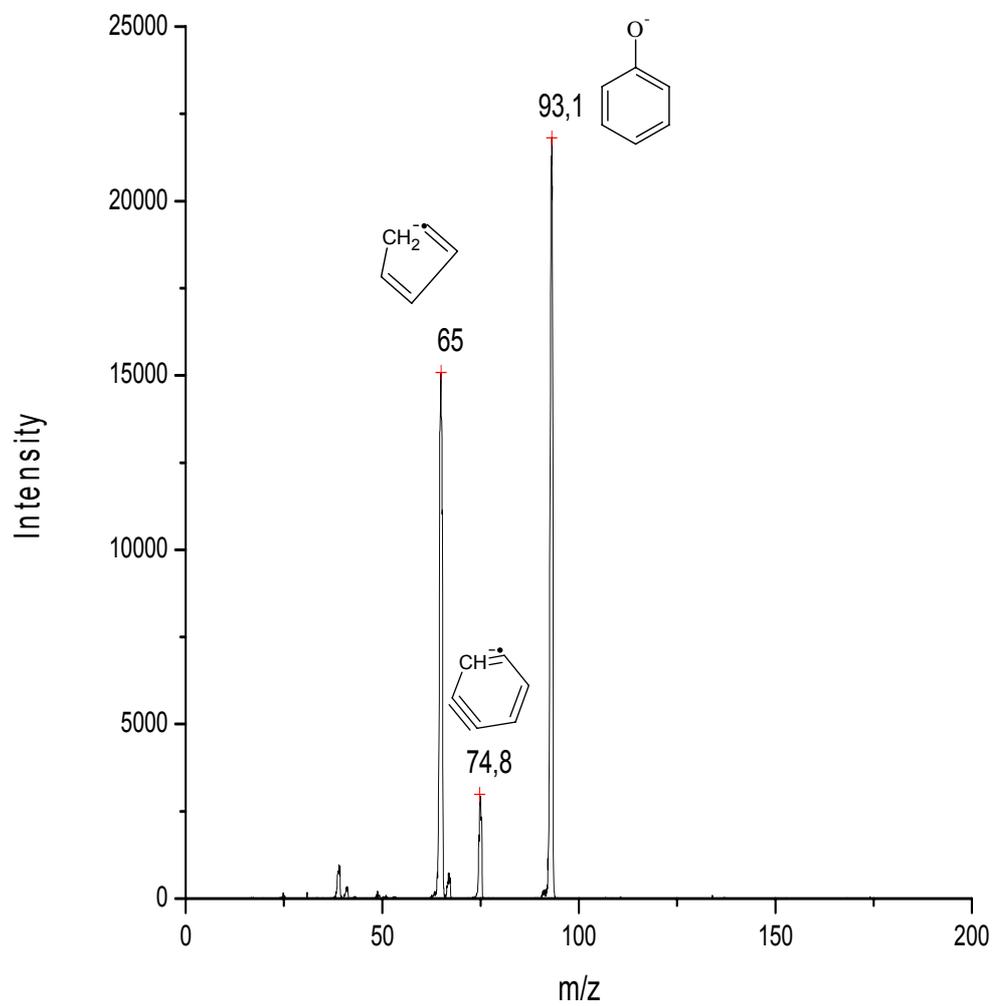


Abbildung 13: Fragmentspektren der Salicylsäure bei einer Kollisionsenergie von 35 eV

4.3 Penetrationsversuche mit der Franz'schen Diffusionszelle

Zur Untersuchung des Penetrationsverhaltens von Substanzen aus verschiedenen Grundlagen sind in dieser Arbeit Penetrationsversuche mit präparierter Schweinehaut in modifizierten Diffusionszellen nach Franz durchgeführt worden (Abbildung 14).

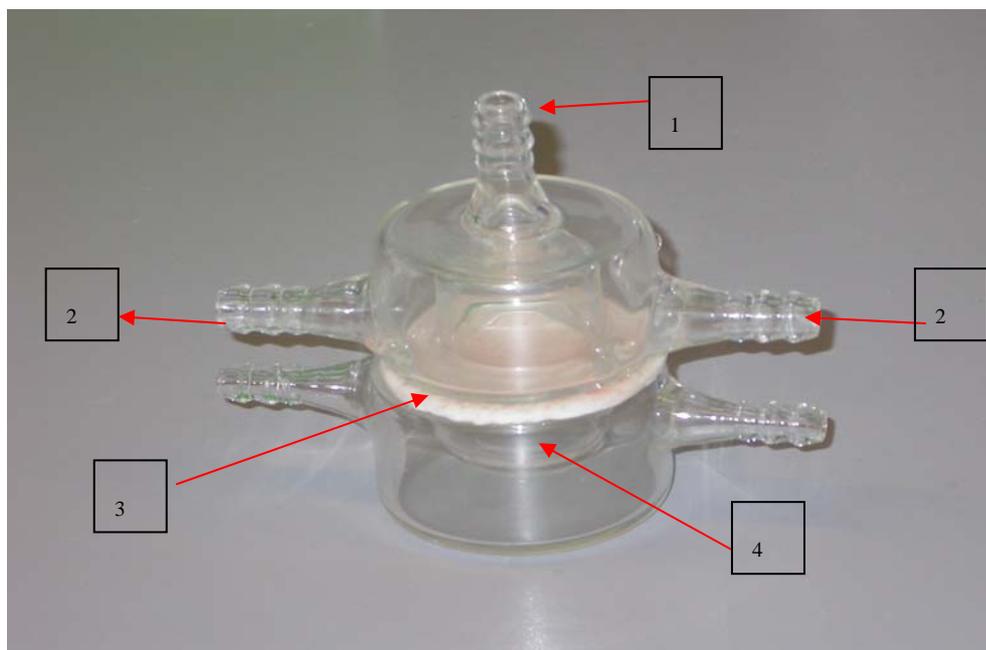


Abbildung 14: Makroskopische Abbildung einer Franz'schen Diffusionszelle [1= topisch applizierte Formulierung, 2= temperiertes Wasser (34 °C), 3= präparierte Schweinehaut (ca. 5 cm²), 4= Rezeptorphase]

Die Diffusionszelle besteht aus zwei einzelnen, doppelwandigen und temperierbaren Glaskammern. Die untere Zelle dient der Aufnahme der Rezeptorphase. Die Rezeptorphase ist mit dem Blutkompartiment der Haut gleichzusetzen und besteht zu 0,9 % aus NaCl (Natriumchlorid), 1 % BSA (Bovine Serum Albumin) und 0,02 % Gentamycinsulfat, alle in Wasser gelöst. Die präparierte Schweinehaut wird im Falle von nicht flüssigen dermalen Applikationsformen (Cremes, Salben etc.) zunächst mit der zu untersuchenden Grundlage behandelt. Dabei wird die Grundlage leicht mit dem Zeigefinger unter Zuhilfenahme eines Fingerlings für etwa 20 Sekunden in die Haut einmassiert. Anschließend wird die Haut mit der dermalen Seite auf der unteren Glaskammer derart fixiert, dass sie mit der Rezeptorphase in Kontakt

kommt. Die obere Glaskammer dient zur Vermeidung von starkem Wasserverlust durch Verdunstung und sorgt dadurch für gleich bleibende Versuchsbedingungen (konstante Hydratationsbedingungen der Hautprobe) bei den durchgeführten Penetrationsversuchen. Nach einer Penetrationsdauer von ca. 24 Stunden werden die Hautproben von ihren Hautüberständen befreit und der Probenahmeprozedur der FDZ-Methode unterworfen.

Die Hautschichten werden aus einem Hautstück folgendermaßen gewonnen:

- 1) Oberfläche: leichtes Abschaben mit einem Spatel und/oder mehrmaliges Abwischen mit Baumwollwatte. Diese Menge ist das nicht absorbierte bzw. nicht eingezogene Prüfmuster
- 2) Hornschicht : ca. 16-20 Strips mit Tesafilm. Durch mehrmaliges Aufdrücken eines Tesafilmstreifens sowie anschließendem Abziehen der Klebestreifen werden die obersten Zellschichten der Epidermis gewonnen.
- 3) Epidermis: Erhitzen der Hautscheibe (Epidermisseite für ca. 30-45 Sekunden auf einer 80 °C heißen Ceranplatte), wodurch eine Brandblase induziert wird und die Epidermis sich unter Zuhilfenahme von Spatel und Pinzette ablösen lässt.
- 4) Dermis: Gesamtdermis bzw. ausgeschnittene Applikationsfläche
- 5) Rezeptorphase: Entnahme von mindestens 2 Aliquots

4.4 Leica AS Lasermikrodissektor

Die Bearbeitbarkeit biologischer Proben am LMD ist zum einen stark abhängig von der Beschaffenheit der bearbeiteten histologischen Proben (biologische Beschaffenheit der Probe, bearbeitete Hautschicht, Schnittdicke etc.). Zum anderen spielen die Lasereinstellungen des Lasermikrodissektors (Laserenergie, Strahlquerschnitt, Schnittgeschwindigkeit) eine wichtige Rolle beim Schneiden der Proben (Abbildung 15)

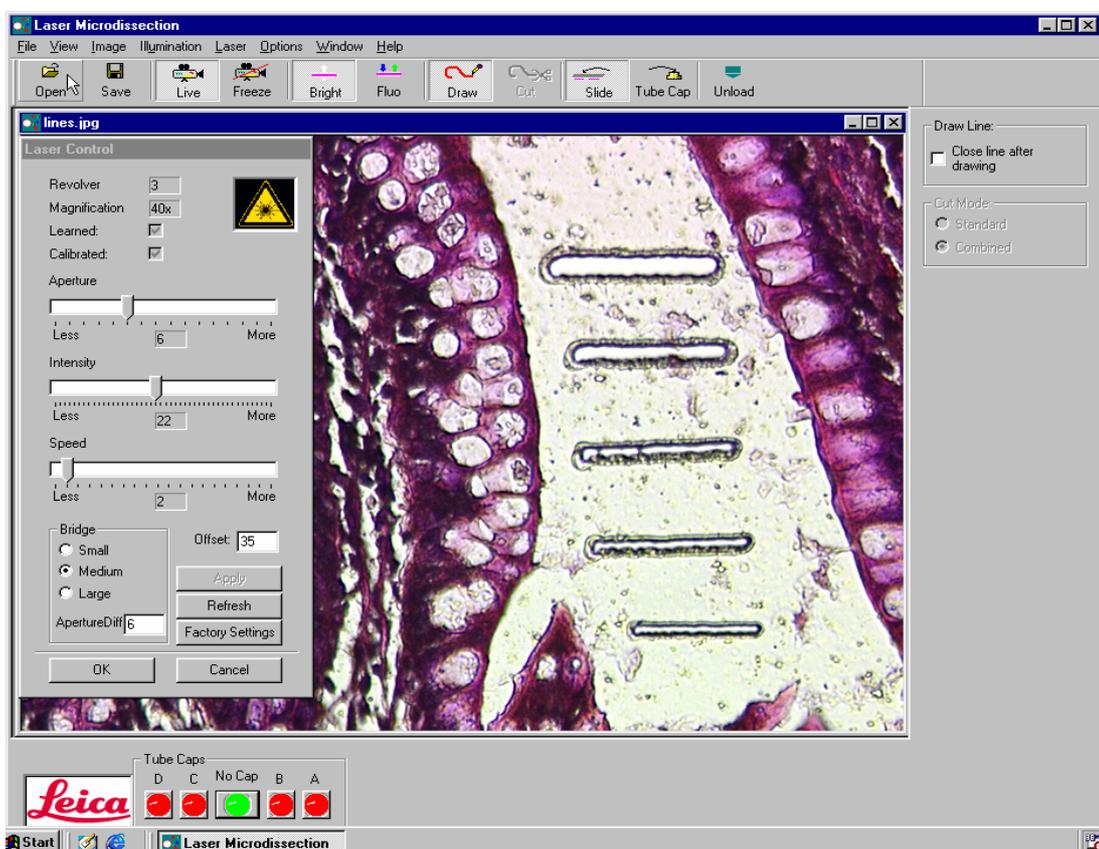


Abbildung 15: Darstellung verschiedener Schnittbreiten, die mit unterschiedlichen Lasereinstellungen am LMD erzeugt werden. Links im Screenshot der Bedieneroberfläche sieht man das Feld „Laser Control“ mit den Parametern Aperture, Intensity und Speed, die jeweils abhängig vom verwendeten Objektiv die Schnittqualität erheblich beeinflussen können.

Eine Angabe der maximal möglichen Schnitttiefen in Abhängigkeit vom verwendeten Objektiv ist in Tabelle 10 gegeben. Die maximal bearbeitbare Probendicke ist abhängig vom verwendeten Objektiv und vom Probenmaterial.

Tabelle 10: Schnittbreiten und maximale Schnitttiefe (Probendicke der Kryostatschnitte) für verschiedene Objektive

Vergrößerung	Bezeichnung	Max. Schnitttiefe [μm]	Min. Schnittbreite [μm]
4x	C Plan	-	-
10x	HCX APO W U-V-I	<50	10-35
20x	HCX APO W U-V-I	<40	6-20
40x	HCX PL Fluotar	<50	3-10
63x	PL Fluotar Corr PH2	<30	2-10
150x	HCX PL Fluotar	<10	2-5

Die angegebenen Werte für die Schnittbreite und Schnitttiefe sind als Richtwerte zu sehen, die bei der Verwendung unterschiedlicher Proben stark variieren können. Zudem sollten die optimalen Lasereinstellungen vom Anwender den jeweiligen Anforderungen der zu bearbeitenden Hautschnitte angepasst werden.

Im Allgemeinen kann man jedoch sagen, dass je größer die Werte für die Lasereinstellung wie Aperture, Intensity und Speed sind, desto breiter sind die mit der Lasermikrodissektion erzielten Schnitte.

5 Ergebnisse

5.1 Probenvorbereitung

5.1.1 Arbeiten mit dem Kryostat

Um mit Hilfe der Lasermikrodissektion aus Haut bzw. Haarstrukturen selektiv und kontaminationsfrei Proben gewinnen zu können, muss die Haut zunächst in definiert dicke Schnitte überführt werden. Vor Beginn der Dissektatnahme mit dem LMD musste geprüft werden, ob es bei der Erstellung von Dünnschnitten mit dem Kryostat (Abbildung 16) zu Querkontaminationen bzw. Verschleppungen interessierender Analyten über die gesamte Hautprobe kommen kann. Eine derartige Verschmierung der Analyten würde die Ergebnisse unbrauchbar machen.



Abbildung 16: Leica CM-3050 Kryostat

Dazu wird die Hautprobe zunächst mit Hilfe eines Einbettmediums (z.B. Tissue tec, Jung/Leica Instruments GmbH, Nussloch), auf einem Probenteller fixiert (Abbildung 17).

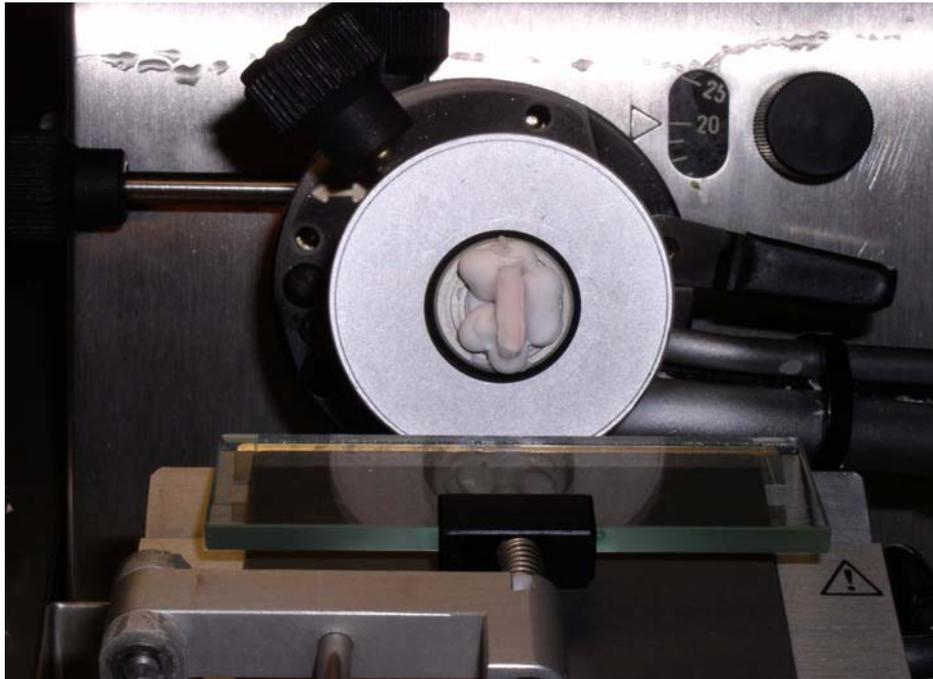


Abbildung 17: Probenteller mit fixierter Hautprobe

Bei Temperaturen um $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ gefriert das Einbettmedium ein und erstarrt zu einer weißlichen Masse und ermöglicht zum einen ein besseres Schneiden des Präparates, weil das gefrorene Gewebe beim Schneiden besser zusammengehalten wird und nicht auseinander bricht. Zum anderen ermöglicht es ein leichteres Anhaften sowohl der Probe auf dem Probenteller als auch der Kryostatschnitte auf den verwendeten Objektträgern.

Es werden Hautschnitte der Dicke zwischen $5\text{-}20\text{ }\mu\text{m}$ angefertigt, um sie anschließend auf speziell für das LMD vorhergesehene, mit Polyethylenterephthalat-Folie (PET-Folie) beschichtete Objektträger (Micro Dissect GmbH, Mittenaar) aufzubringen (Abbildung 18).



Abbildung 18: Schweinehautdünnschnitte, 20 µm dick, auf Leica-Objektträger mit PET-Folie aufgebracht

5.1.2 Evaluierung der Probenahme am Kryostaten

Zur Evaluierung des Kontaminationsrisikos wurde der lipophile Fluoreszenzfarbstoff Nilrot als Modellanalyt verwendet, da er eine visuelle Penetrationskontrolle erlaubt. Schweinehaut bzw. Humanhaut wurde mit 0,2 %igem Nilrot in Dimethylsulfoxid (DMSO) behandelt und anschließend im Kryostaten geschnitten. Mit Hilfe der im Leica AS LMD integrierten fluoreszenzmikroskopischen Einheit war festzustellen, dass es während des Schneideprozesses zu keinerlei Verschmierungen des Farbstoffes kommt, etwa von Orten hoher Farbstoffkonzentration in Richtung Orte niedriger Farbstoffkonzentration (Abbildung 19).

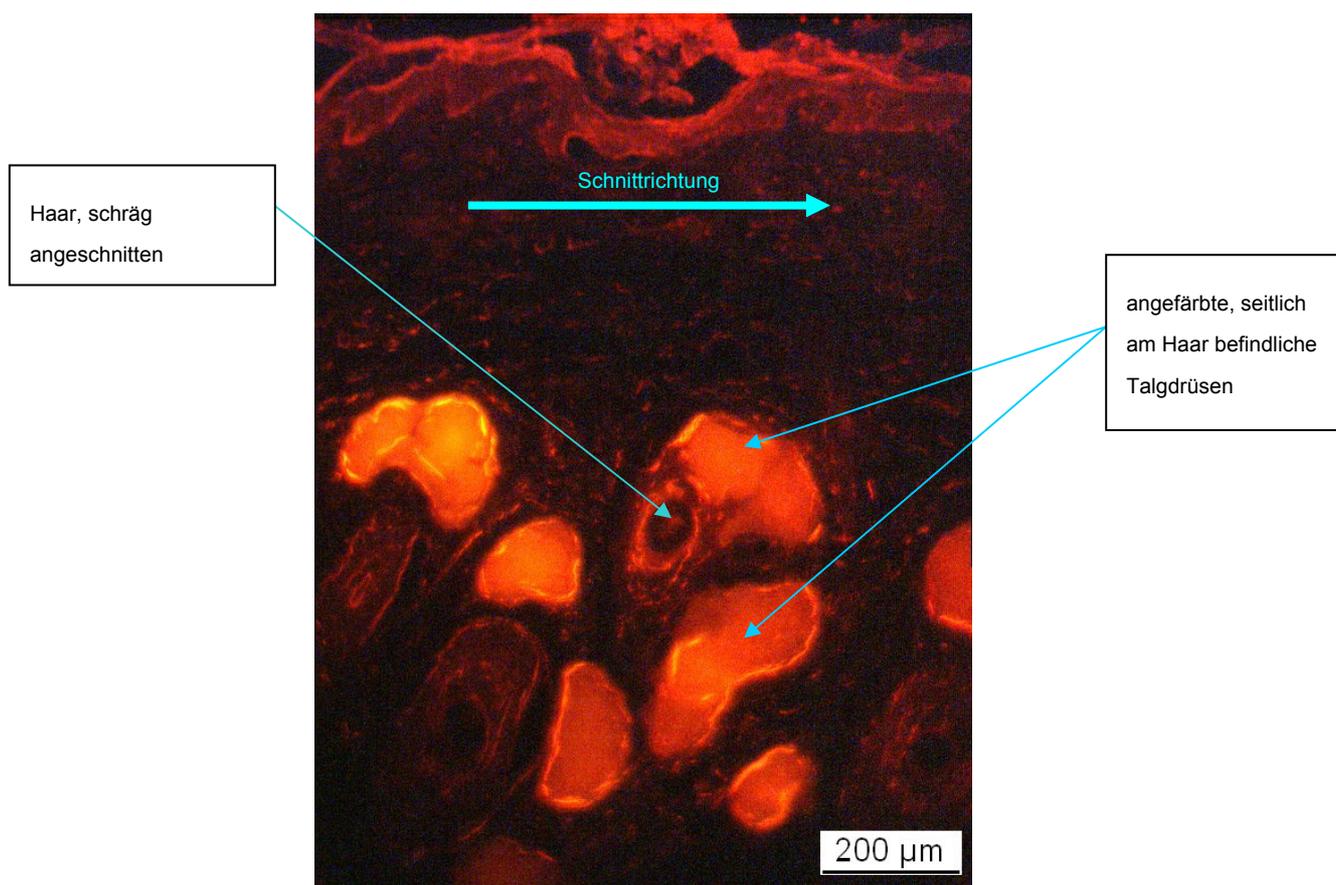


Abbildung 19: Vertikaler Schnitt aus einer Humanhautprobe/Face, behandelt mit 0,2 % Nilrot in DMSO, LMD-Fluoreszenzmopdus Preview, Filter 3 (565/BP 610/75) 100-fache Vergrößerung, Exposure Time 1/30 seconds

Eine tatsächliche, für die Quantifizierung nachteilige Verschmierung der bereits penetrierten Farbstoffmoleküle wäre aber vermutlich auch erst dann zu befürchten, wenn die behandelte Hautprobe von der Hornschichtseite in Richtung Dermis geschnitten werden würde, also wenn die einzelnen Hautstrata parallel zur Klinge verlaufen würden. In diesem Falle bestünde die Gefahr der Umverteilung von bereits penetrierten Wirkstoffmolekülen aus einer Hautschicht in die angrenzenden Hautschichten. Es wurden aber alle Hautschnitte so angefertigt, dass die Klinge bei jedem Schneidevorgang alle Hautschichten zeitgleich erfasst und nicht eine Hautschicht nach der anderen. Dieser Sachverhalt wird in Abbildung 20 schematisch dargestellt.



Abbildung 20: Schema Haut-Schnitttrichtung

Somit wären, wenn überhaupt, Verschmierungen immer entlang einer in sich histologisch homogenen Hautschicht zu befürchten, also etwa innerhalb des Stratum corneums, entlang der Dermis etc..

5.2 Untersuchung von Talgdrüsenlipiden

Als Nachweis der selektiven und kontaminationsfreien Probenahme mittels LMD ist die Talgdrüse (Abbildung 21) mit den Talgdrüsenlipiden ausgewählt und eingehend untersucht worden.

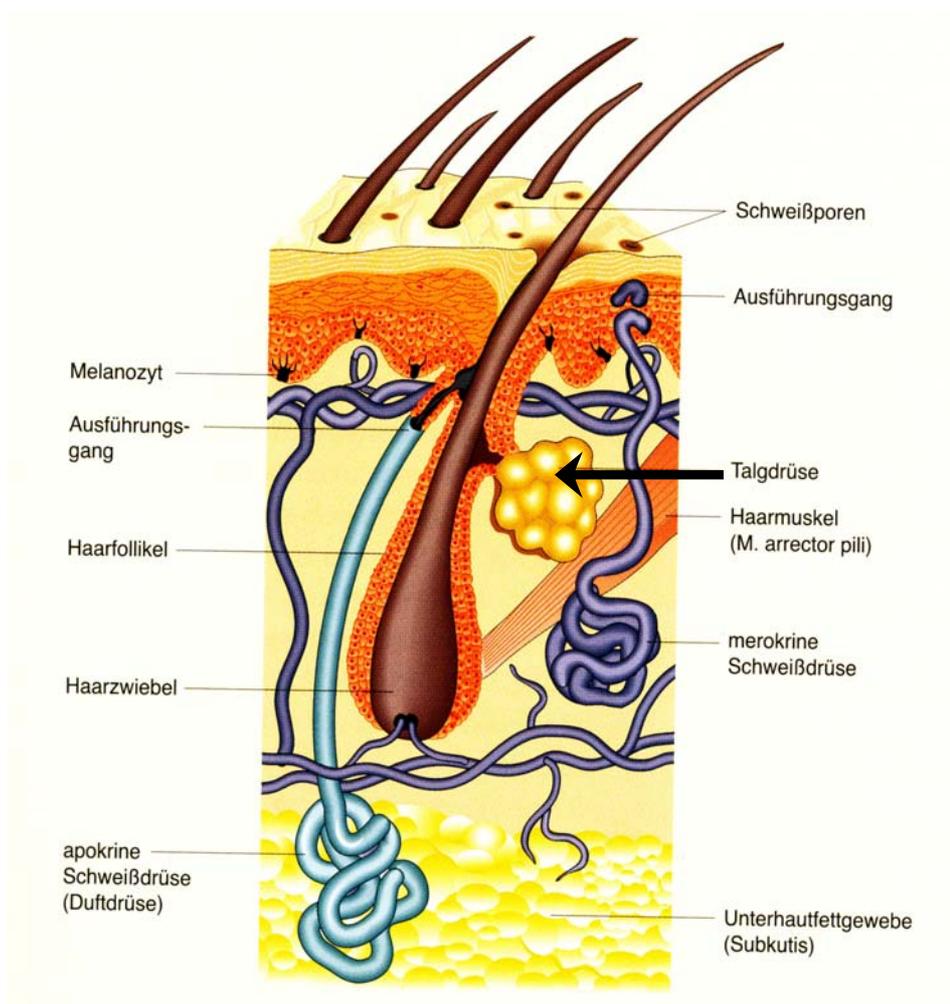


Abbildung 21: Schematischer Aufbau der Haut mit Hautanhangsgebilden [55]

Das LMD ist eine interessante Art der Probengewinnung aus biologischem Material, weil es eine praktisch kontaminationsfreie Präparation einzelner Zellen oder Zellpopulationen aus ihrem Umfeld erlaubt, ohne dabei mit den angrenzenden Zellen in Berührung zu kommen, wie Abbildung 22 anhand der Dissektion von Talgdrüsenmaterial veranschaulicht.

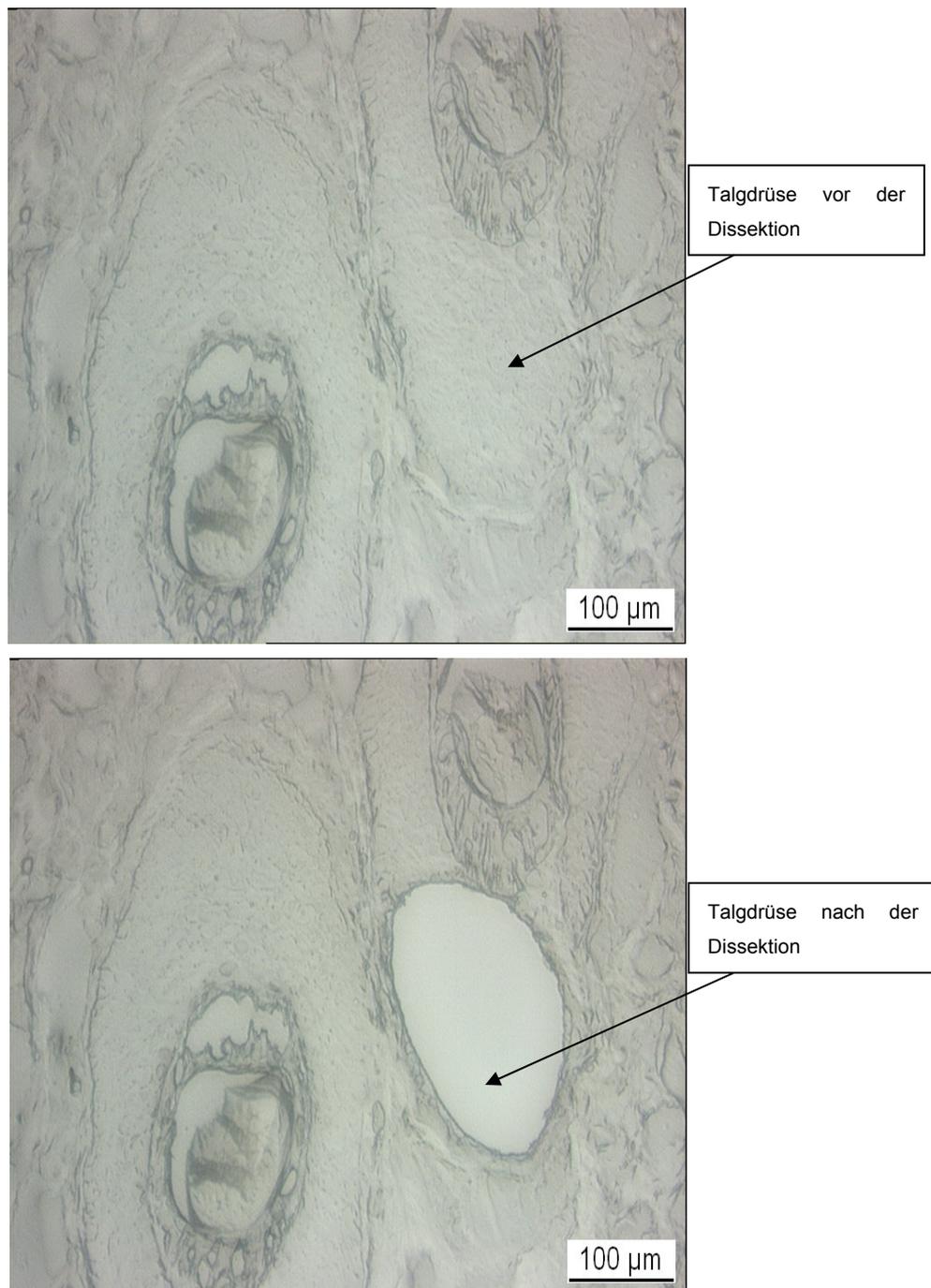


Abbildung 22: Talgdrüse vor (oben) und nach (unten) der Dissektion, jeweils seitlich an einem schräg angeschnittenen Haar, 200-fach vergrößert

5.2.1 Vergleich Hautoberflächenlipide-Talgdrüsenlipide

Der gewählte Versuchsangang dient zum Beweis der selektiven und kontaminationsfreien Probenahme mittels LMD. Das dissektierte Lipidmaterial (Abbildung 23) wurde auf seine Fettsäurezusammensetzung, auf das Vorkommen von Mono-, Di- und Triglyceriden, auf Ceramide sowie auf Cholesterin und Squalen hin untersucht. Zusätzlich wurde das Talgdrüsenmaterial auf das Vorkommen von Phospholipiden untersucht. Die untersuchte Menge des Probenmaterials betrug etwa $2 \cdot 10^7 \mu\text{m}^3$ ($10^6 \mu\text{m}^2$ Dissektatfläche x $20 \mu\text{m}$ Schnittdicke), der Menge von ca. 9-10 Dissektaten entsprechend. Unter der Annahme, dass die Dichte des gesammelten Probenmaterials 1 g/cm^3 betragen hat, entspricht das gesammelte Material einer Menge von etwa $20 \mu\text{g}$ Lipidmaterial. Bei einer realen Dichte von $0,8-0,9 \text{ g/cm}^3$ [Stearinsäure, Dichte = $0,845 \text{ g/cm}^3$, Tristearin, Dichte = $0,8621 \text{ g/cm}^3$] entspricht das gesammelte Lipidmaterial jedoch einer Menge von etwa $16-18 \mu\text{g}$.



Abbildung 23: Talgdrüsendissektate im Deckel eines PCR-Tubes, 200-fach vergrößert

Zum Vergleich wurden Lipide von der Hautoberfläche freiwilliger Probanden gewonnen. Sowohl die gewonnenen Hautextrakte als auch die Talgdrüsendissektate wurden auf das Vorkommen von Ceramiden hin untersucht. Die Extraktion der Massenspuren von den am häufigsten vorkommenden Ceramide (Material & Methoden, Kap 4.2.1 Tabelle 3) ergab, dass auf der Hautoberfläche Ceramide als Barrierelipide zu finden sind, wie Abbildung 24 veranschaulicht.

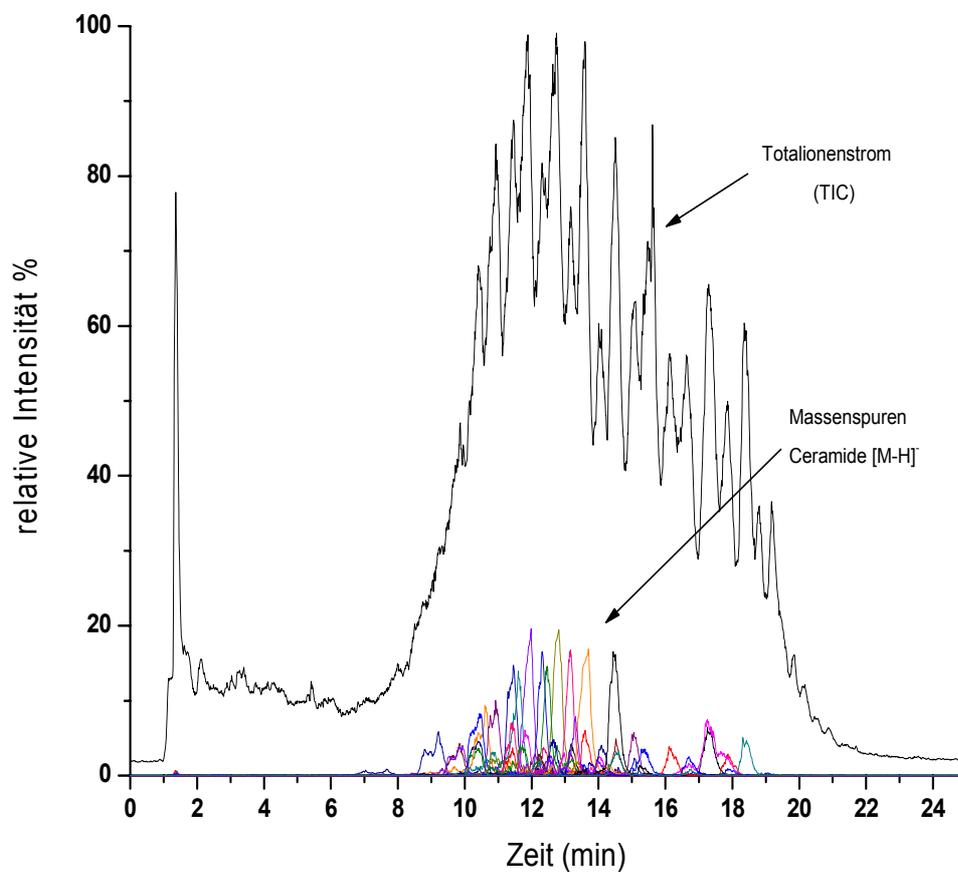


Abbildung 24: Hautoberflächenlipide auf Ceramide hin untersucht

Jedoch konnten keine Ceramide im gesammelten Talgdrüsenmaterial nachgewiesen werden, wie man in Abbildung 25 sehen kann:

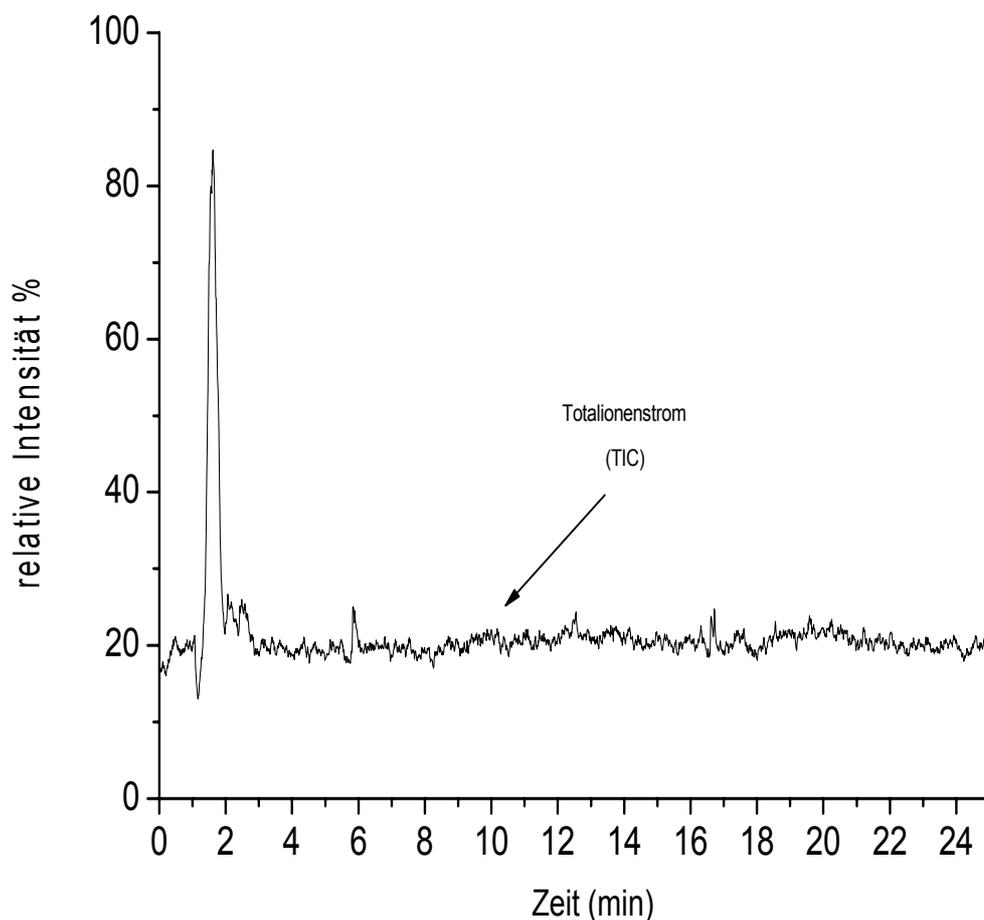


Abbildung 25: Talgdrüsenlipide, auf Ceramide hin untersucht

Zusätzlich wurden die Talgdrüsenlipide auf deren Fettsäureverteilung hin untersucht. Die entwickelte Trennmethode wurde zunächst mit einem Mischstandard auf dessen Trennleistung untersucht. Ein Testchromatogramm der verwendeten Fettsäuren ist in Abbildung 26 zu sehen.

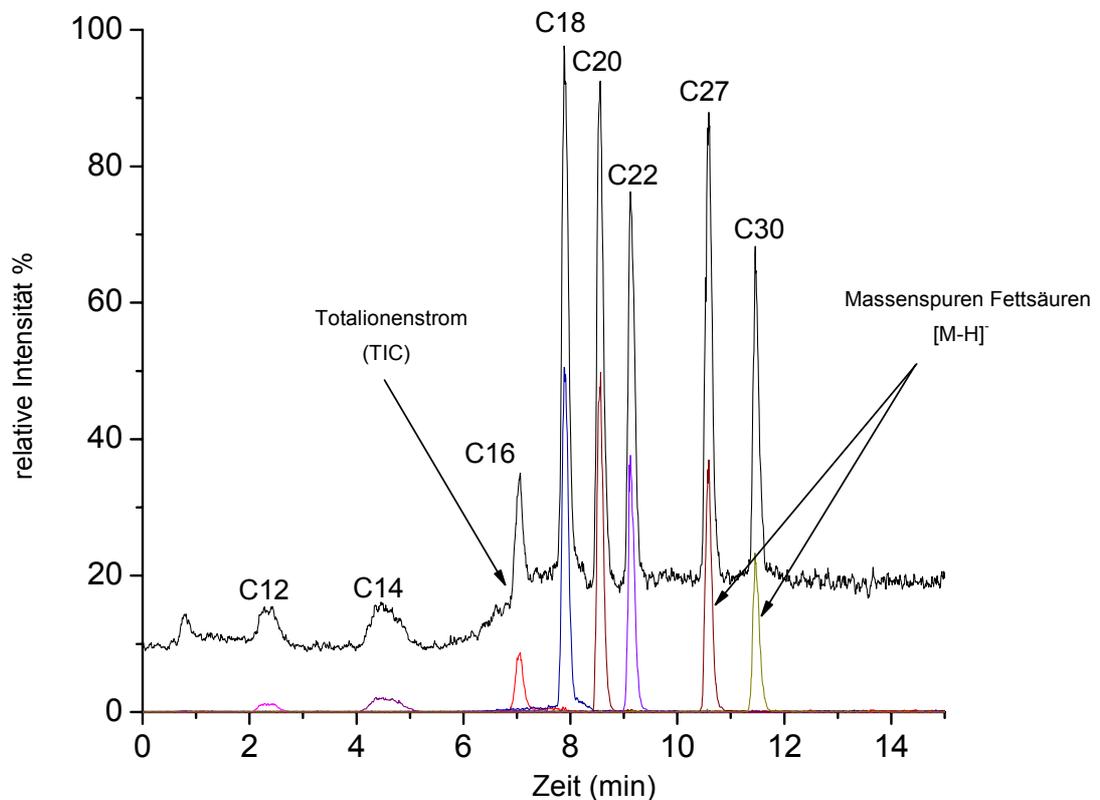


Abbildung 26: Fettsäuren-Mischstandard getrennt auf einer RP8-Trennphase. Einsatzkonzentration der Fettsäuren jeweils zwischen 5-10 µg/mL

Sowohl bei den Talgdrüsenlipiden als auch bei den Barrierelipiden sind sämtliche Massenspuren der Fettsäuren mit der Kettenlänge C14-C30 extrahiert worden.

Wie Abbildung 27 darstellt, sind in den Talgdrüsenlipiden überwiegend kurzkettige Fettsäuren mit einer Kohlenstoffkettenlänge < C24 enthalten.

Es konnten die kurzkettigen Fettsäuren Laurinsäure (C12), Myristinsäure (C14), Palmitinsäure (C16) und Stearinsäure (C18) sowie die längerkettigen Fettsäuren Arachinsäure (C20) und Lignocerinsäure (C24) in den Talgdrüsenlipiden dargestellt werden. Die Palmitin- und Stearinsäure sind jedoch die dominierenden Fettsäuren in den Talgdrüsenlipiden.

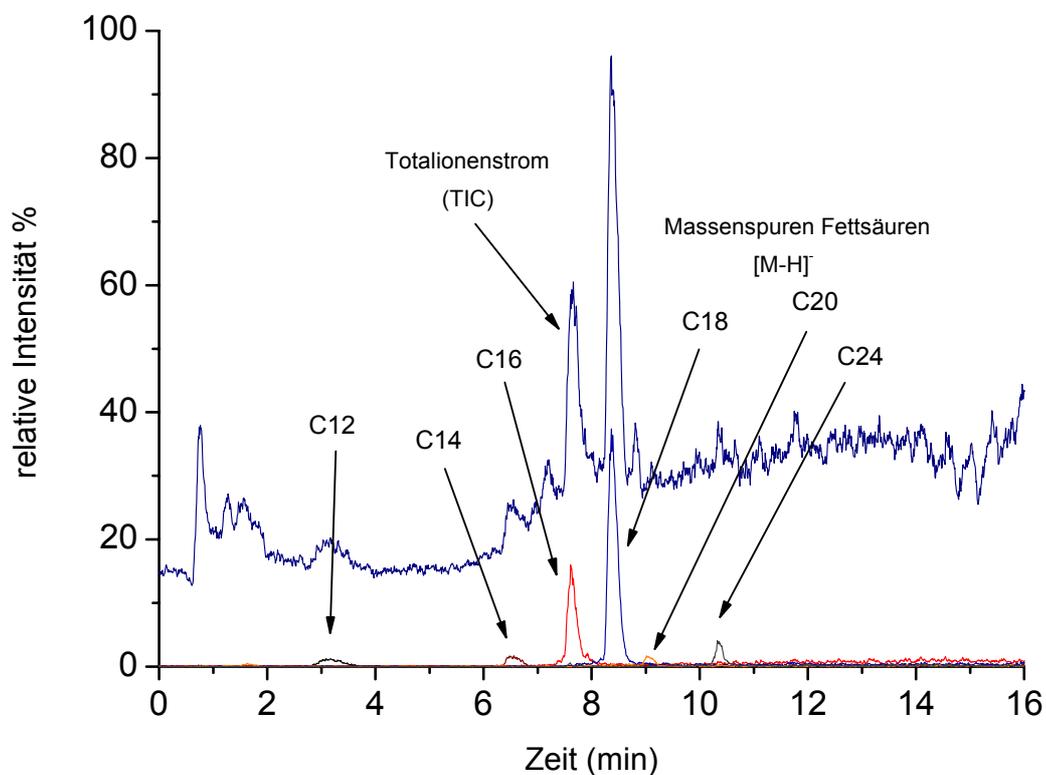


Abbildung 27: Talgdrüsenlipide auf freie Fettsäuren untersucht

Auf der Hautoberfläche kommen neben der Palmitin- und Stearinsäure auch andere kurzkettige Fettsäuren wie die Myristinsäure, die Palmitoleinsäure (C16:1) sowie die Linolsäure (C18:1) vor, wie Abbildung 28 darstellt.

Jedoch überwiegen auf der Hautoberfläche die langkettigen Fettsäuren mit Kohlenstoffkettenlängen zwischen C20 und C30.

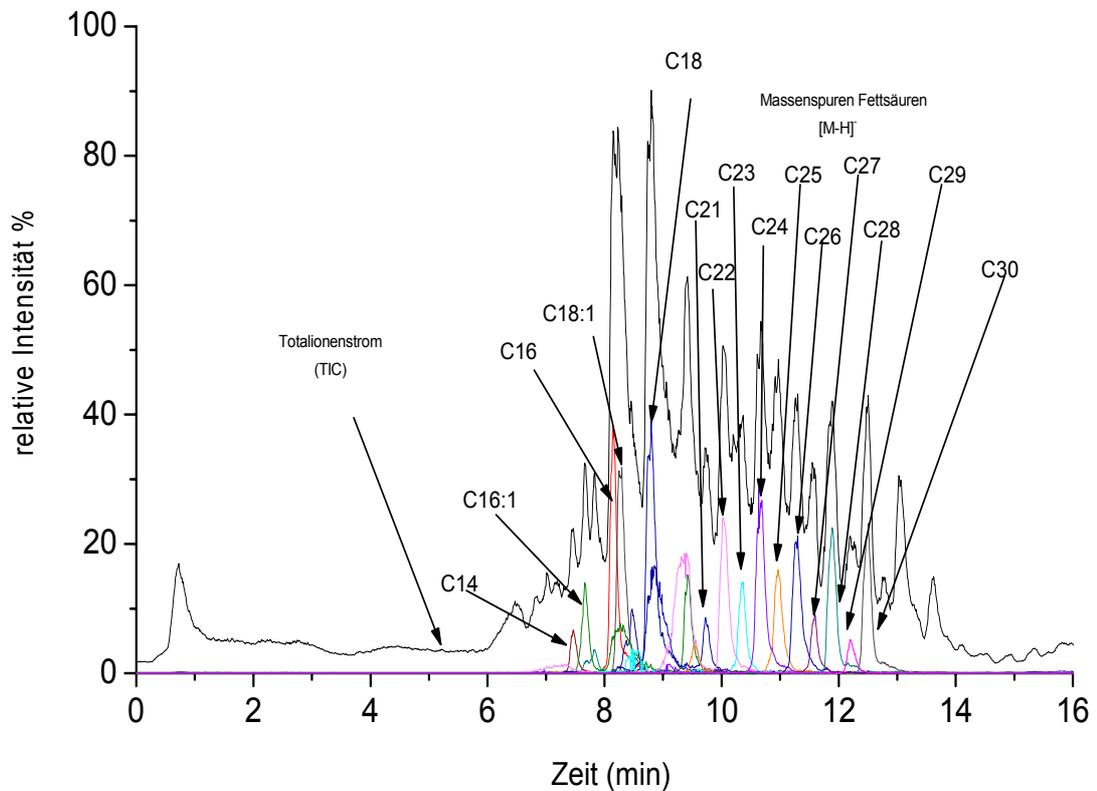


Abbildung 28: Proband weiblich, Hautoberflächenfilm auf freie Fettsäuren hin untersucht

Die beiden dominierenden Fettsäuren, sowohl in Talgdrüsen als auch auf der Hautoberfläche, sind den Untersuchungen zufolge die Palmitinsäure und die Stearinsäure.

5.2.2 Weitere Bestandteile der Talgdrüsenlipide

Die Talgdrüsendissectate wurden zusätzlich auf Triglyceride hin untersucht. Mit einem Mischstandard, bestehend aus Monooleoylglycerin, Dipalmitin sowie Triheptadecanoin (jeweils 5-10 µg/mL) wurde die Trennleistung der entwickelten chromatographischen Methode zur Trennung von Mono-, Di- und Triglyceriden überprüft. Triglyceride brauchen zwischen 7 und 8 Minuten,

um von der verwendeten chromatographischen Trennsäule zu eluieren. In Abbildung 29 ist ein Chromatogramm der untersuchten Talgdrüsenlipide mit extrahierten Massenspuren von Triglyceriden zu sehen.

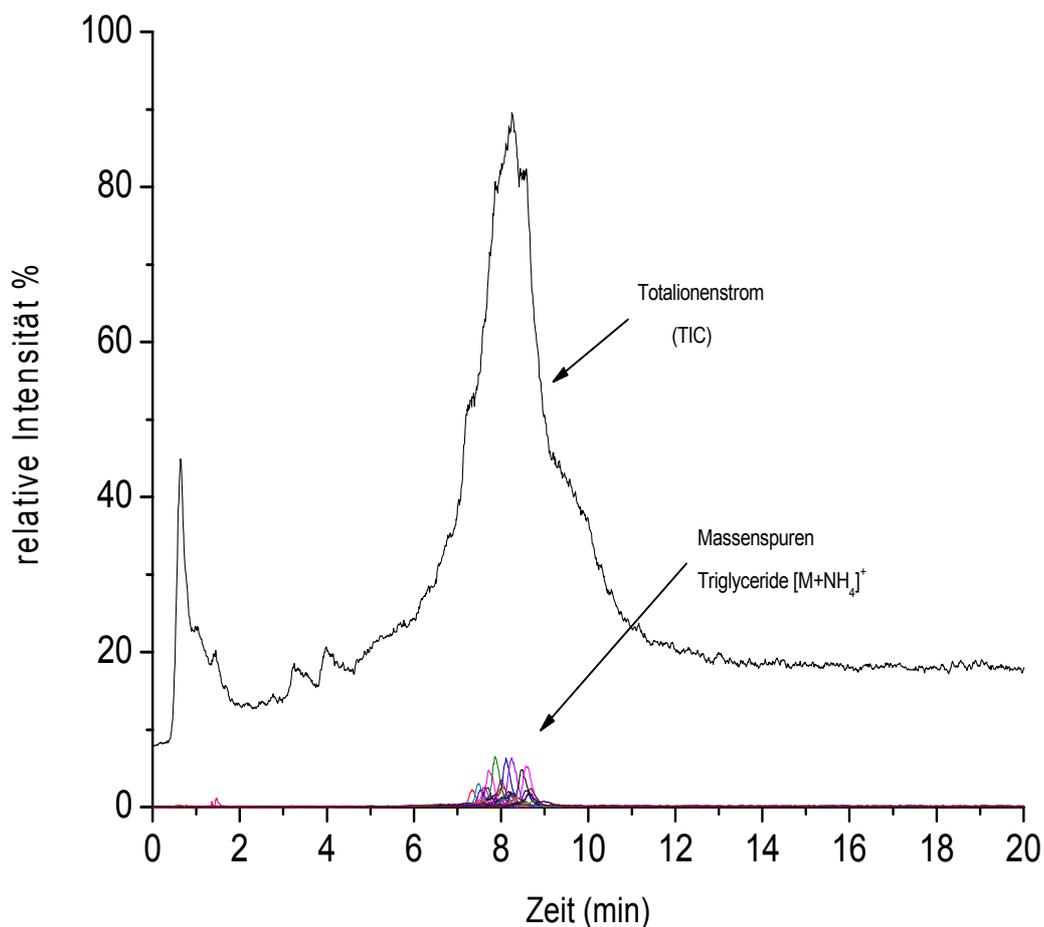


Abbildung 29: Talgdrüsenlipide, auf Triglyceride hin untersucht

Zur Darstellung der Triglyceride in den Talgdrüsenlipiden wurden mit den kurzkettigen Fettsäuren, nämlich Myristin (C14)-, Pentadecan (C15)-, Palmitin (C16)-, Palmitolein (C16:1)-, Stearin (C18)-, Linol (C18:1)-, Linolen (C18:2)- und Ölsäure (C18:3), Massen für mögliche Triglyceride berechnet (siehe Material & Methoden Kap.4.2.3, Tabelle 4). Es wurden die berechneten Massenspuren, die nur einen Bruchteil der möglichen Fettsäurezusammensetzung von Triglyceriden als Talgdrüsenlipide

widerspiegeln, als Ammoniumaddukte extrahiert. Ein Summenspektrum über den Retentionszeitbereich von 7-9 Minuten ist in Abbildung 30 dargestellt.

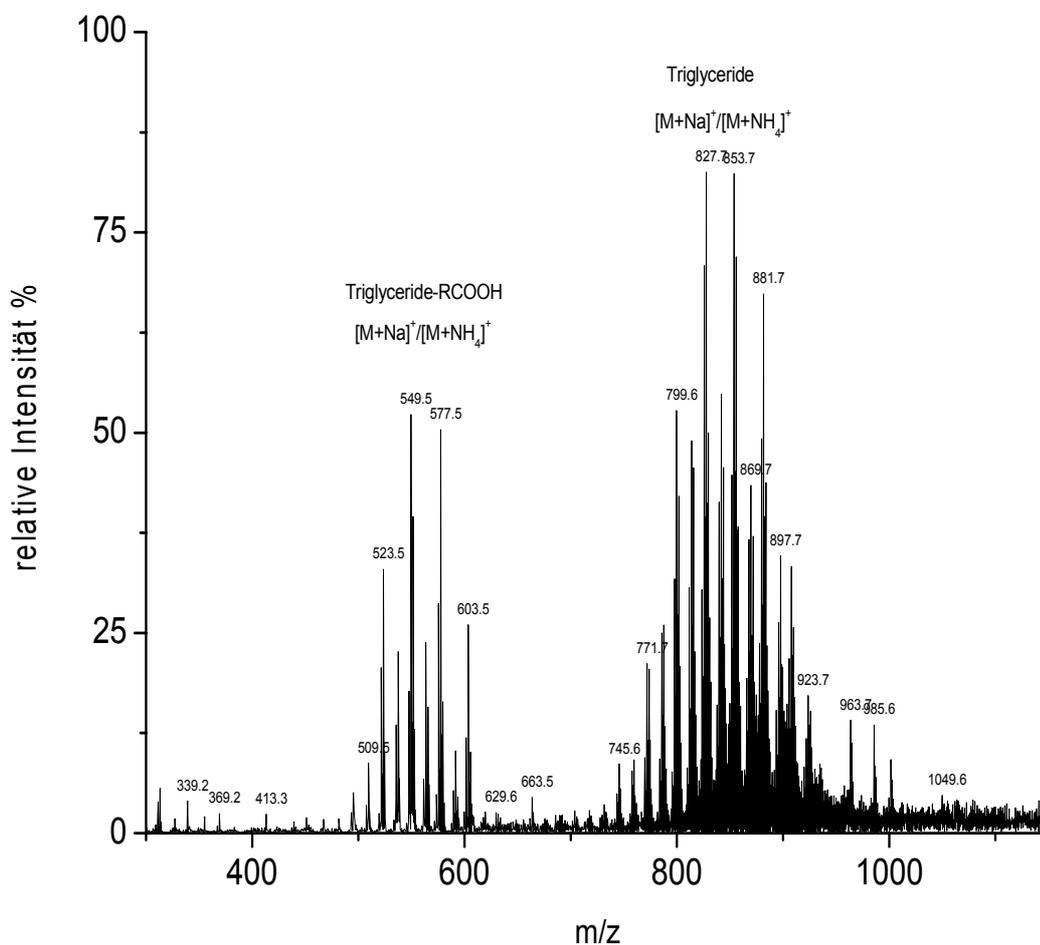


Abbildung 30: API-ES Massenspektrum (positiver Ionenmodus) des gewonnenen Talgdrüsenmaterials

Es kommen überwiegend Signale im Massenbereich zwischen 800-1000 amu vor und können Triglyceriden zugeordnet werden. So entspricht zum Beispiel die Masse 853,7 rein rechnerisch dem Ammoniumaddukt des Triglycerides mit einer Pentadecansäure und zwei Linolensäuren als gebundene Fettsäuren. Diglyceride eluieren bei ca. 5 Minuten, wie mit der Substanz Dipalmitin im Referenzmischstandard festgestellt wurde. Für die Beobachtung, dass im Elutionszeitfenster der Triglyceride Massen

erscheinen, die eher Diglyceriden zuzuordnen sind, gibt es eine plausible Erklärung. Die Signale im Massenbereich 450-600 amu entsprechen Triglyceriden, die auf Ihrer Flugbahn zu der Ionenquelle eine Fettsäure abspalten und somit zusätzlich als Diglyceride vom Massenanalysator detektiert werden.

Zusätzlich konnte eindeutig Squalen als Bestandteil der Talgdrüsenlipide nachgewiesen werden, wie Abbildung 31 veranschaulicht.

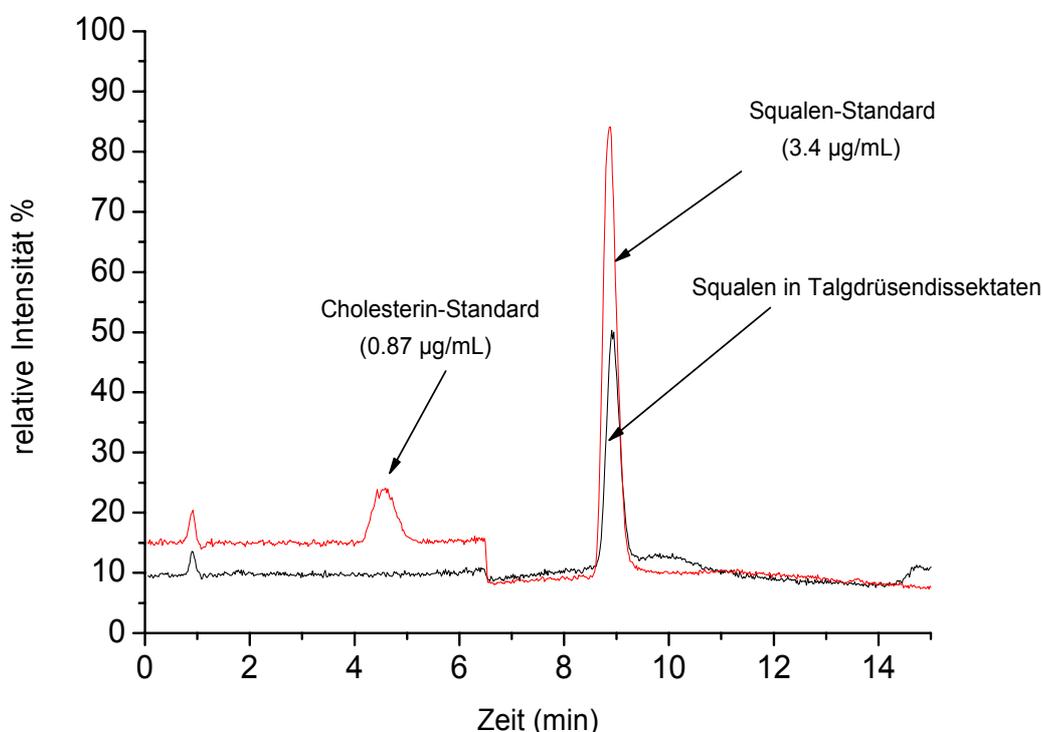


Abbildung 31: Mischstandard aus Cholesterin und Squalen (rot) und in Talgdrüsendissektaten detektiertes Squalen (schwarz)

Bei der durchgeführten Messung lag die Nachweisgrenze für das Cholesterin bei ca. 100 ng/mL und die Bestimmungsgrenze lag bei ca. 300 ng/mL. Das bedeutet, dass Cholesterin bei der durchgeführten Messung nicht nachweisbar war bzw. die Konzentration des Cholesterins in den gesammelten Talgdrüsenlipiden < 100 ng/Ansatz gewesen ist. Eine Aussage über die exakte Menge des detektierten Squalens kann nicht gemacht werden, da die genaue Dichte des gewonnenen Probenmaterials nicht

bekannt ist. Die quantifizierte Menge des Squalens betrug jedoch 2 µg/mL, gleichzusetzen mit 200 ng Absolutmenge in 100 µL Lösungsmittelvolumen. Bezieht man die quantifizierte Menge des Squalens auf die abgeschätzte Menge der dissektierten Talgdrüsenlipide von etwa 16 µg, ergibt das einen Anteil von 1,25 %.

Es war zudem möglich, Sphingomyeline (SM) in Spuren (Abbildung 32) und Phosphatidylcholine (PC) in kleinen Mengen (Abbildung 33) im Talgdrüsenmaterial nachzuweisen.

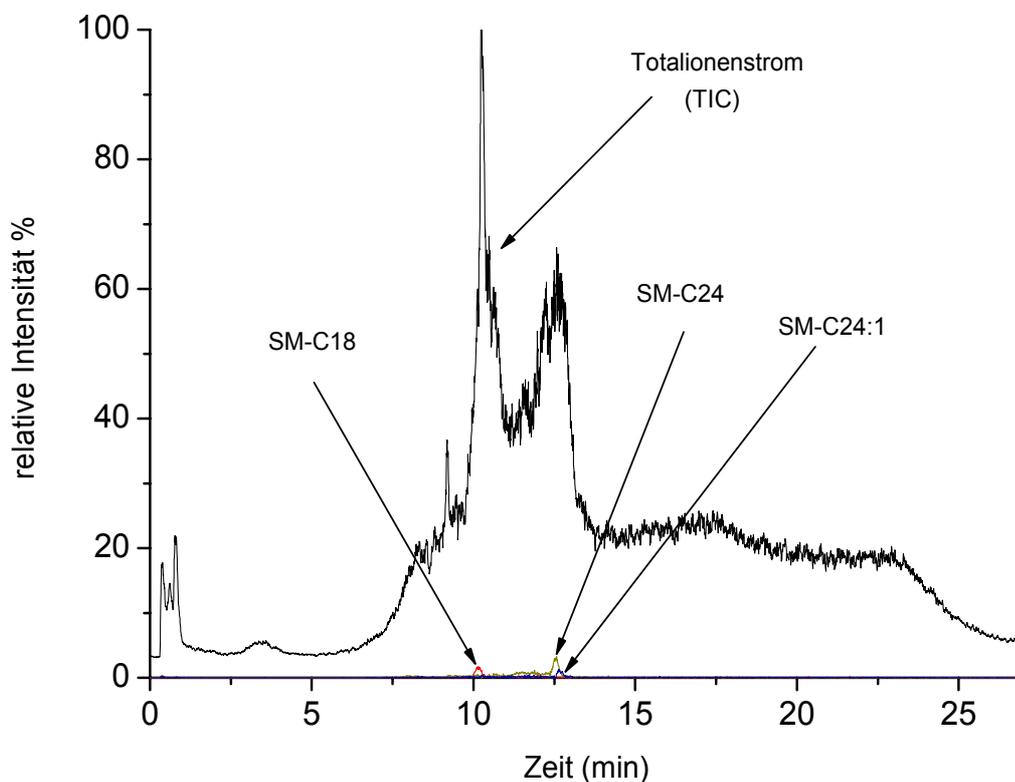


Abbildung 32 : Talgdrüsenlipide auf Sphingomyeline (Phospholipide) hin untersucht

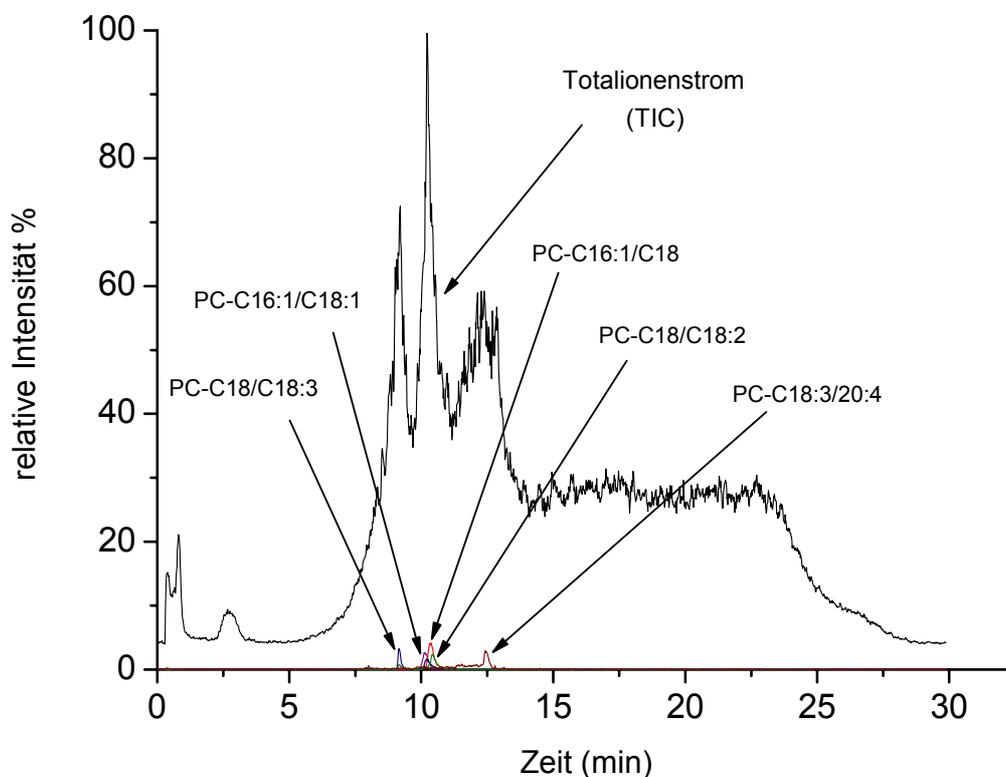


Abbildung 33 : Talgdrüsenlipide auf Phosphatidylcholine (Phospholipide) hin untersucht

Es konnten eindeutig Sphingomyeline mit den amidgebundenen Fettsäuren Stearinsäure (SM-C18), Tetracosansäure (SM-C24) und die Delta-15-cis-Tetracosansäure (SM-C24:1) detektiert werden.

Ebenfalls konnten Phosphatidylcholine mit den Fettsäurekombinationen Stearinsäure/Linolensäure (PC-C18/C18:3), Palmitinsäure/Ölsäure (PC-C16/C18:1), Palmitoleinsäure/Stearinsäure (PC-C16:1/C18), Stearinsäure/Linolsäure (PC-C18/C18:2) sowie das Phosphatidylcholin mit der Fettsäurekombination Linolensäure/Arachidon-säure (PC-C18:3/C20:4) eindeutig in den Talgdrüsenlipiden nachgewiesen werden.

5.3 Hautpenetration von Nilrot

5.3.1 Darstellung der Penetration von Nilrot aus dem Vehikel Dimethylsulfoxid im Schweinehautmodell

Die Vergleichbarkeit von Penetrationsprofilen, die mit Hilfe der beiden Probenahmetechniken LMD und FDZ zu ermitteln sind, sollte mit Hilfe des Fluoreszenzfarbstoffes Nilrot vergleichend untersucht werden. Dazu wurden 3 Hautareale mit jeweils 20 μL einer 0,2 %-igen Nilrotlösung in DMSO behandelt, wobei zwei gestrippt (vgl. Kap. 4.3) und nach dem Probenahmeverfahren der FDZ weiter bearbeitet wurden, und die dritte Probe dünn geschnitten und am LMD dissektiert worden ist. Bereits fluoreszenzmikroskopisch war festzustellen, dass das Nilrot sich überwiegend im Stratum corneum anreichert und in tiefere Hautschichten nicht in nennenswertem Umfang zu penetrieren vermag. In den Abbildungen 34 und 35 sieht man jeweils Dünnschnitte einer unbehandelten Probe und einer mit Nilrot behandelten Hautprobe.

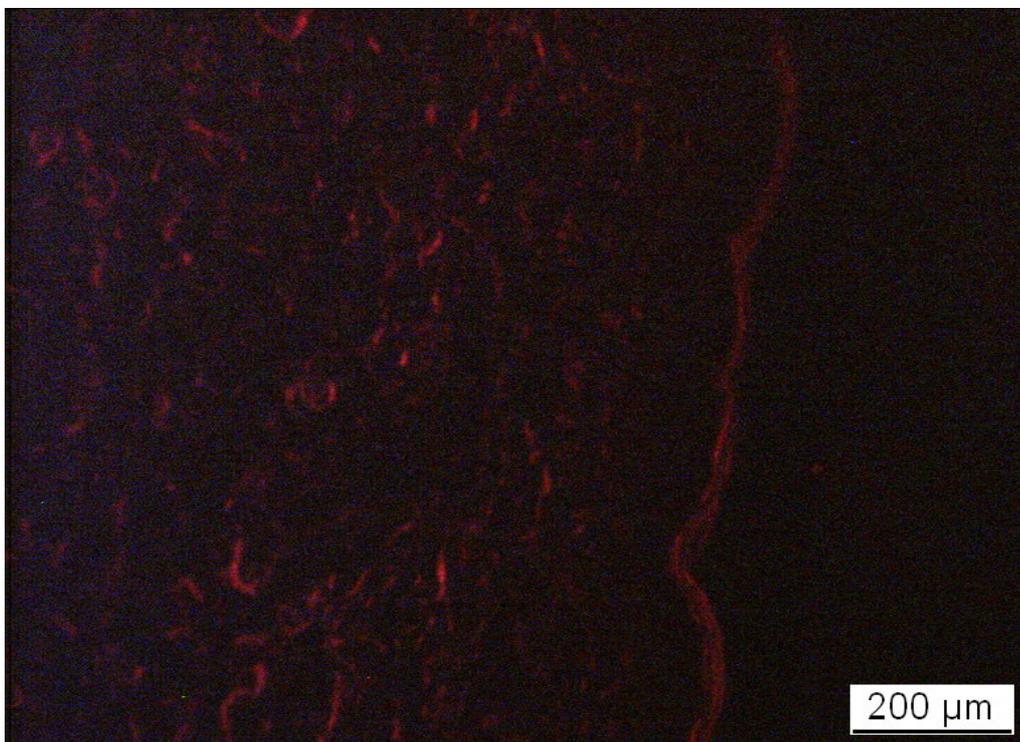


Abbildung 34: Unbehandelte Hautprobe, LMD-Fluoreszenzmodus Preview, Filter 3 (565/BP 610/75), Exposure Time $\frac{1}{4}$ seconds, 100-fache Vergrößerung

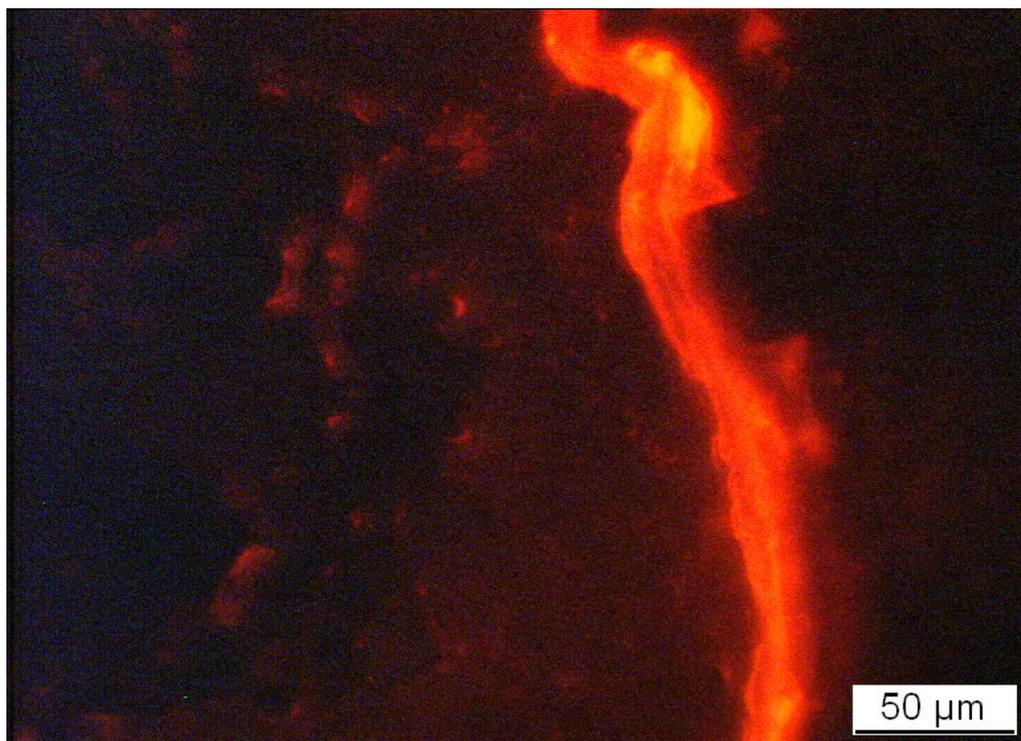


Abbildung 35: Mit 0,2% Nilrot in DMSO behandelte Hautprobe, LMD-Fluoreszenzmodus Preview, Filter 3 (565/BP 610/75), Exposure Time $\frac{1}{4}$ seconds, 400-fache Vergrößerung. Zu sehen ist eine bevorzugte Anreicherung des Nilrots im Stratum corneum.

Es hatte sich in durchgeführten Vorversuchen bereits abgezeichnet, dass keine vollständige Extraktion des Nilrots aus den Dissektaten möglich ist. Deshalb wurde in einer Versuchsreihe experimentell ermittelt, mit welchem organischen Lösungsmittel eine quantitative Extraktion am sinnvollsten ist. Isopropanol war als Lösungsmittel zunächst ausgewählt worden, weil sich Nilrot gut darin löst und die Proben der FDZ ebenfalls in Isopropanol extrahiert wurden.

Für die Extraktion des Nilrotes aus Dissektaten hat sich jedoch eine fünfzehnminütige Extraktion mit Aceton als am wirkungsvollsten erwiesen, wie Tabelle Nr. 11 veranschaulicht. Dazu sind jeweils 500 mg Epidermismaterial mit 2 μ g Nilrot in 2 mL Isopropanol über Nacht bei Raumtemperatur für 24 Stunden inkubiert worden. Am nächsten Tag wurde das Lösungsmittel behutsam unter Stickstoffstrom abgedampft und das

adsorbierte Nilrot der Extraktion mit unterschiedlichen Lösungsmitteln unterworfen.

Tabelle 11: Gegenüberstellung der Extraktionsbedingung und der prozentualen Ausbeute zur Extraktion von Nilrot

Extraktionsbedingung	Ausbeute in %
Isopropanol 15 min	42,9
Acetonitril 15 min	50,1
Ethylacetat 15 min	55,1
Methanol 15 min	78,2
Aceton 15 min	84,7
Isopropanol 30 min	38,7
Acetonitril 30 min	79,3
Ethylacetat 30 min	77,5
Methanol 30 min	84,7
Aceton 30 min	81,8

Zur Veranschaulichung der untersuchten Dissektate sind in Abbildung 36 die dissektierten Hautareale in der Epidermis dargestellt.

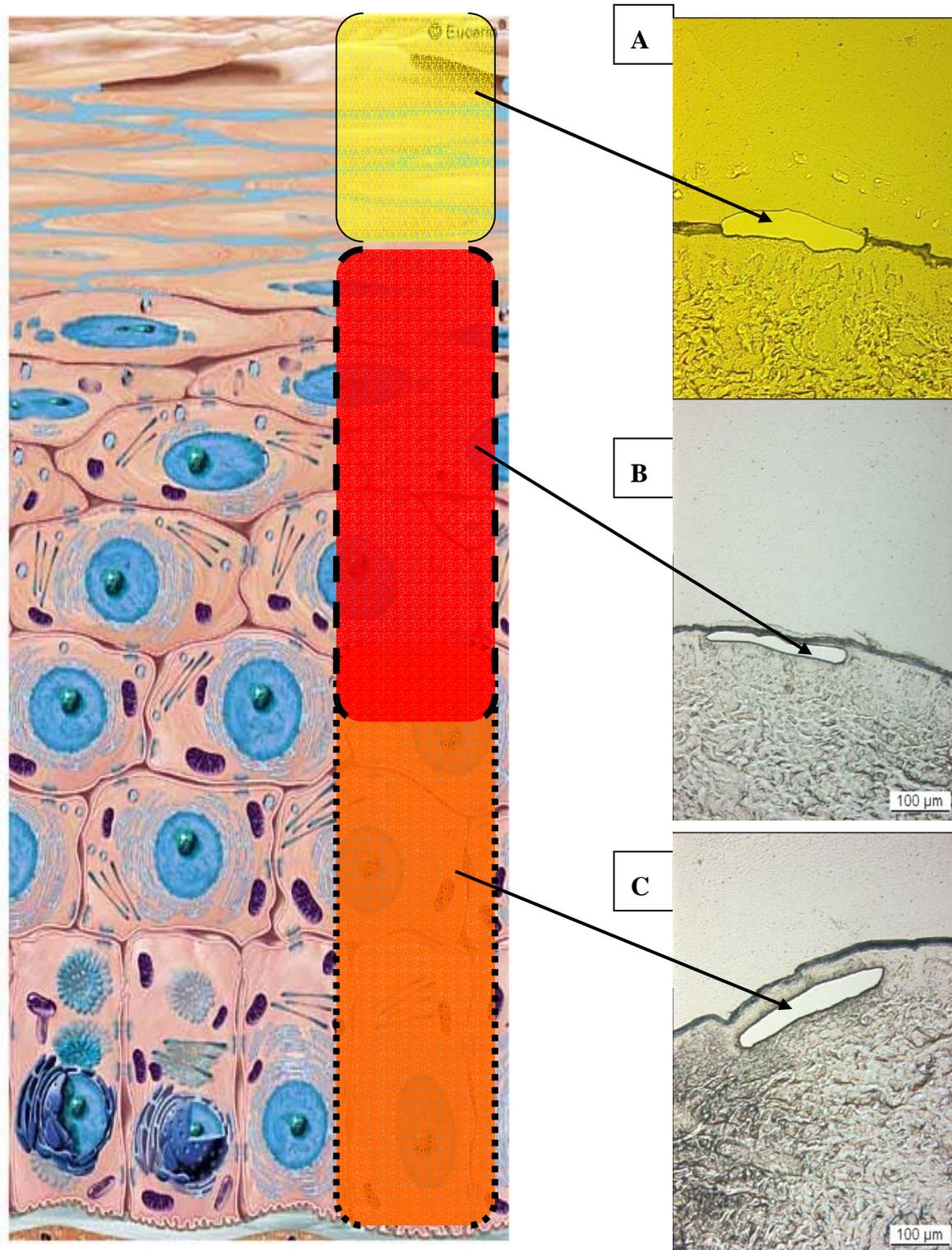


Abbildung 36 : Dissektiertes Stratum corneum [(A), 200-fach vergrößert], Stratum granulosum/Stratum spinosum [(B), 200-fach vergrößert], sowie Stratum spinosum/Stratum basale [(C), 200-fach vergrößert]

Die Penetrationsergebnisse sowie die graphische Darstellung der Ergebnisse sind in den Tabellen 12 und 13 sowie in Abbildung 37 zu sehen.

Tabelle 12: Konzentrationsprofil von Nilrot in verschiedenen Hautschichten, Vergleich FDZ und LMD

Proben	Konzentration total in ng [FDZ] (bezogen auf Gesamtapplikationsfläche)		Hautschichten LMD	Konzentration total In ng [LMD] (bezogen auf 1 cm ²)
	Versuch1	Versuch2		
Hautüberstand	12540	13823		
SC Tapes 1+2	10800	18434	} Stratum corneum	151
SC Tapes 3+4	2160	2842		
SC Tapes 5+6	400	678		
SC Tapes 7+8	290	376		
SC Tapes 9+10	200	190		
SC Tapes 11+12	66	155		
SC Tapes 13+14	105	93		
SC Tapes 15+16	27	111		
Epidermis	447	612		
Dermis	34,5	34	Dermis	2

Tabelle 13: Penetrationsprofil von Nilrot in DMSO Total in %, Vergleich FDZ und LMD

	Franz'sche Diffusionszelle		Franz'sche Diffusionszelle		LMD Penetration total in %
	Penetration absolut in % (bezogen auf applizierte Menge)		Penetration total in %		
	Versuch1	Versuch2	Versuch1	Versuch2	
Stratum corneum	51	61	96,6	97	96
Epidermis-Sc	1,6	1,6	3	2,6	3
Dermis	0,1	0,09	0,2	0,15	1

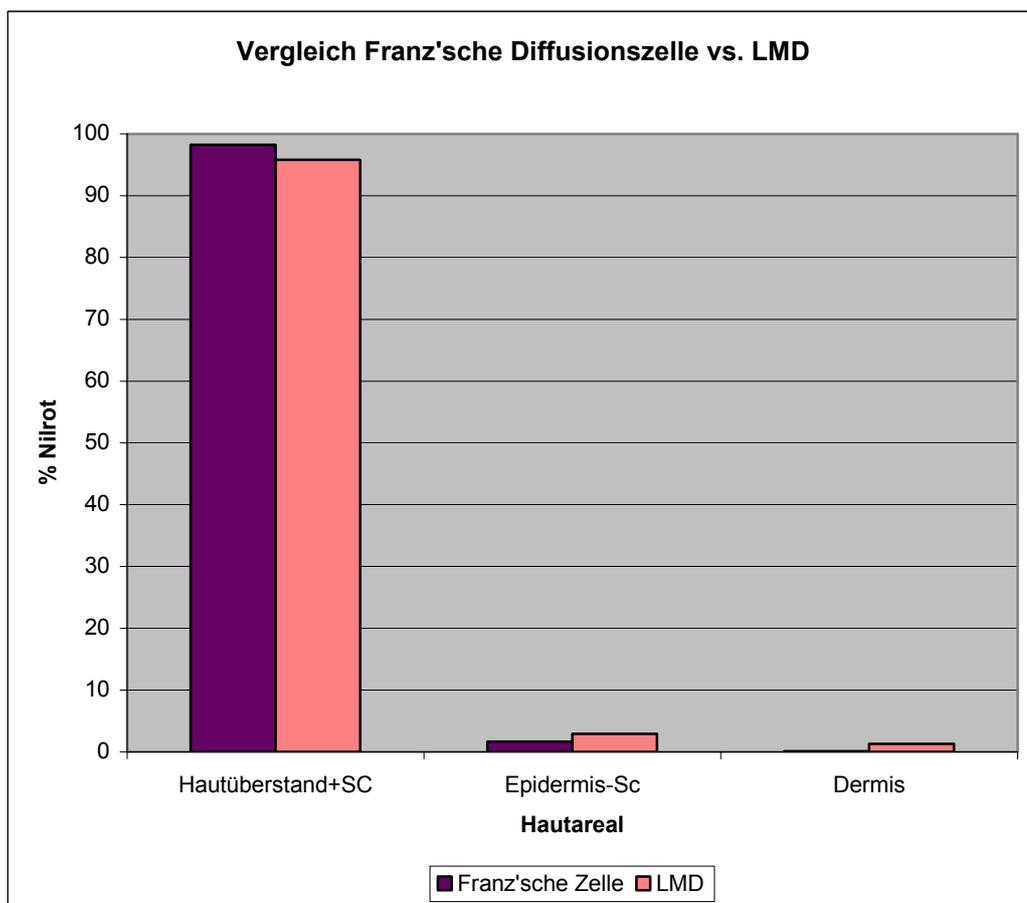


Abbildung 37: Graphische Darstellung der Penetrationsergebnisse FDZ im Vergleich zum LMD, Penetration von Nilrot 0,2 % in DMSO.

5.3.2 Penetration von Nilrot in Paraffinum liquidum im Schweinehautmodell

Neben DMSO als bekanntem Penetrationsvehikel wurde Paraffinum liquidum (PL) als lipophile, neutrale Grundlage gewählt, um das Penetrationsverhalten des Nilrots mit den Methoden der FDZ sowie dem LMD vergleichend zu untersuchen. Dazu sind 2 Hautproben vom Schweinehauatrücken mit Nilrot, 0,2 % in Paraffinum liquidum gelöst, behandelt worden und nach 24 Stunden jeweils der Probenahme-prozedur der FDZ sowie der Probengewinnung mittels LMD unterworfen worden. Die Ergebnisse (Abbildung 38), lassen die Schlussfolgerung zu, dass Nilrot in Paraffinum liquidum gelöst, besser die Haut zu penetrieren vermag als Nilrot aus DMSO (vgl. Abbildung 37).

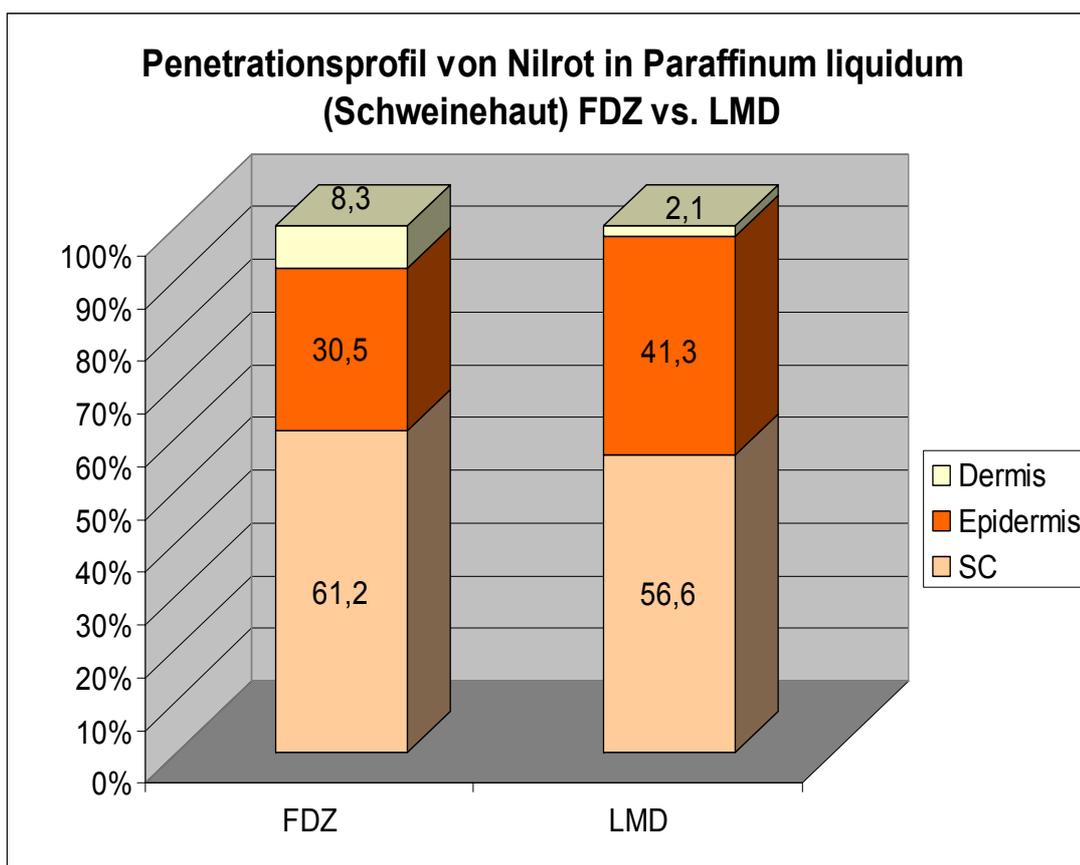


Abbildung 38: Darstellung der Penetration von Nilrot 0,2 % aus Paraffinum liquidum, Vergleich FDZ vs. LMD, Schweinehaut

5.3.3 Darstellung der Penetration von Nilrot aus verschiedenen Vehikeln in die Hautanhangsgebilde humaner Haut

Obwohl Schweinehaut im Allgemeinen als das beste Tiermodell für die Abschätzung der dermalen Resorption/Penetration von Substanzen in Humanhaut gilt [56, 57], bestehen doch erhebliche Unterschiede zwischen menschlicher Haut und Schweinehaut. Als Hauptunterschied ist die Dicke des Stratum corneums zu nennen, welche beim Hausschwein, als geringste absolute Dicke zwischen 25-40 μm beträgt [58], im Vergleich zum Stratum corneum der Humanhaut mit nur 15-20 μm Dicke [59]. Außerdem besitzen Schweine im Vergleich zu anderen Spezies keine Schweißdrüsen.

Aus den oben genannten Gründen sind zusätzlich zur Darstellung der Penetration von Nilrot in Schweinehaut Untersuchungen an Humanhautproben durchgeführt worden. Es wurde Humanhaut aus dem Stirnansatz bzw. Gesichtshaut verwendet, weil diese Hautlokalisation reich an Haaren (Stirnansatz), aber insbesondere reich an Talgdrüsen ist. Die Haut von 3 verschiedenen Hautspendern ist zum Einsatz gekommen, wobei die Haut des ersten Spenders direkt vom Stirnansatz gewesen ist, also reich sowohl an Haaren als auch an Talgdrüsen. Die Haut der beiden anderen Spender stammt aus der Gesichtsregion. Abbildung 39 stellt den Dünnschnitt einer humanen Hautprobe aus dem Stirnansatz dar, behandelt mit 0,2 % Nilrot in PL. Die unter Normallicht erstellte Aufnahme zeigt Talgdrüsen, die in einen Haartrichter einmünden (vgl. Abbildung 21, Kap. 5.2). Abbildung 40 ist der gleiche Hautdünnschnitt wie unter Abbildung 39 dargestellt, lediglich im Fluoreszenzmodus abgebildet. Man sieht deutlich, dass es zu einer bevorzugten Anreicherung des Fluoreszenzfarbstoffes in den Haarkanälen und in den Talgdrüsen gekommen ist. Ein Teil der verwendeten humanen Gesichtshaut wurde mit 0,2 % Nilrot in DMSO behandelt. Abbildung 41 ist die Darstellung eines Dünnschnittes von dieser humanen Hautprobe. Vergleicht man Abbildung 40 und Abbildung 41, die unter gleichen Bedingungen aufgenommen worden sind, so sieht man bereits visuell, dass Nilrot aus DMSO heraus sich scheinbar viel besser in Talgdrüsen, und ebenso in Haarkanälen anreichert, als aus PL.



Abbildung 39: Schräg angeschnittenes Haar (Humanhaut Face/Stirnansatz) mit seitlich am Haarkanal befindlichen Talgdrüsen, Humanhaut behandelt mit 0,2 % Nilrot in Paraffinum liquidum, Normallicht, 100-fache Vergrößerung

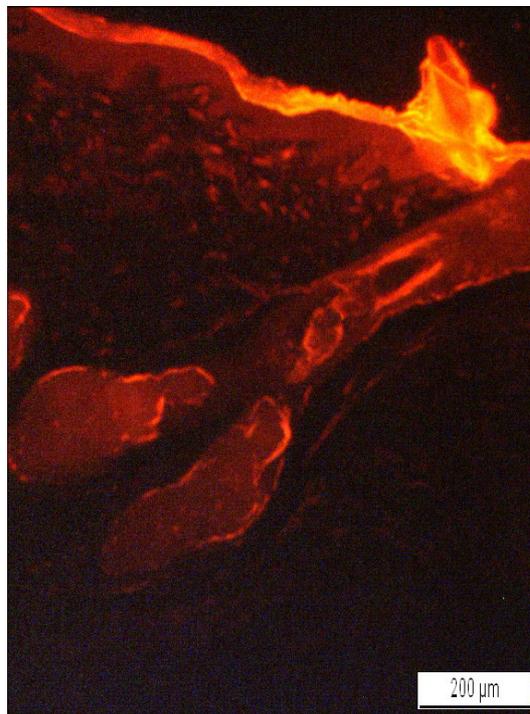


Abbildung 40: Schräg angeschnittenes Haar (Humanhaut Face/Stirnansatz) mit seitlich am Haarkanal befindlichen Talgdrüsen, Humanhaut behandelt mit 0,2 % Nilrot in Paraffinum liquidum, LMD-Fluoreszenzmodus Preview, Filter 3 (565/BP 610/75), 100-fache Vergrößerung, Exposure Time 1/30 seconds. Man sieht eine bevorzugte Anreicherung des Nilrots im Stratum corneum, aber ebenso im Haarkanal und in den Talgdrüsen.

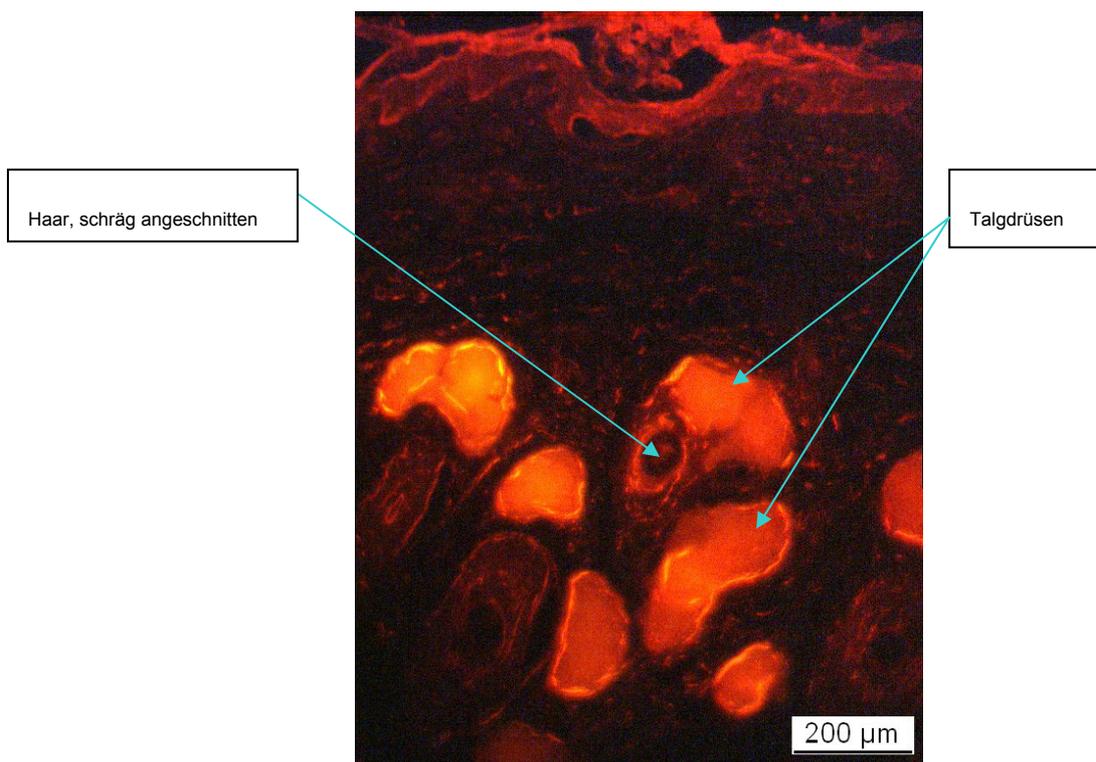


Abbildung 41: Vertikaler Schnitt aus einer Humanhautprobe/Face, behandelt mit 0,2 % Nilrot in DMSO, LMD-Fluoreszenzmodus Preview, Filter 3(565/BP 610/75), 100-fache Vergrößerung, Exposure Time 1/30 seconds. Zu sehen ist eine bevorzugte Anreicherung des Nilrots in Talgdrüsen.

Anschließend wurde die Farbstoffmenge in den Hautanhangsgebilden bestimmt. Wenn man die Werte in Tabelle 14 betrachtet, ist gut zu erkennen, dass Nilrot aus dem Vehikel Paraffinum liquidum scheinbar besser in die Dermis penetriert als Nilrot aus DMSO. Da aber offenbar (vgl. Abbildungen 40 und 41) eine Anreicherung des Farbstoffes in den Haarkanälen sowie in den Talgdrüsen stattgefunden hat, sind aus beiden Hautproben sowohl Haarkanäle als auch Talgdrüsen dissektiert worden, die auf Ihren Gehalt an Nilrot untersucht wurden.

Betrachtet man die Werte in Ihrer Gesamtheit, so ergibt sich folgende Wertetabelle (Tabelle 14), in der alle quantifizierten Mengen relativ mit einander verglichen werden. Die Werte für die Versuche 2 und 3 für beide Vehikel sind im Tabellenanhang (Kap. 9.2 Tabellen 16 und 17) zu finden.

Tabelle 14: Volumennormiertes Penetrationsprofil von Nilrot aus den Vehikeln PL und DMSO in Gesichtshaut (jeweils Versuchsansatz 1)

Hautareale	Konz. ng total in 50 μ L (C)	Dissektiertes Volumen in μm^3 (V_{Diss})	Faktor gleiche Volumina (F_v)	Signal gleiche Volumina (S_v)	Volumennormierte Penetration in % (P_{vn})
Nilrot-DMSO Dermis	0,13	22878600	4,37	0,57	0,31
Nilrot-DMSO Epidermis- Str. corneum	0,65	20313000	4,92	3,2	1,78
Nilrot-DMSO Stratum coreum	6,75	4611900	21,7	146,5	81,24
Nilrot-DMSO Talgdrüsen	1,33	62038000	1,61	2,14	1,19
Nilrot-DMSO Haarkanäle	9,94	35595920	2,81	27,92	15,49
Nilrot-PL Dermis	0,052	21318000	4,7	0,24	0,29
Nilrot-PL Epidermis- Str. corneum	1,68	16997400	5,9	9,87	11,91
Nilrot-PL Stratum coreum	3,1	4335600	23,1	71,42	86,22
Nilrot-PL Talgdrüsen	0,35	68997480	1,57	0,55	0,66
Nilrot-PL Haarkanäle	0,52	63846020	1,45	0,75	0,91

Zur Bestimmung der Menge an Nilrot in den gesammelten Dissektaten wurde eine Doppelbestimmung durchgeführt. Die Quantifizierung des Analyten erfolgte aus einem Lösungsmittelgesamtvolumen von 50 μL , so dass bei der experimentell ermittelten Nachweisgrenze von 0,8 ng/mL noch ein qualitativer Nachweis von 40 Pikogramm in den 50 μL Extraktionsvolumen möglich gewesen wäre. Die Nachweisgrenze eines zu quantifizierenden Analyten wird im Allgemeinen als das 3-fache des minimalen Signal zu Rausch-Verhältnisses definiert und ist mit einer Verdünnungsreihe experimentell zu ermitteln.

Die Bestimmungsgrenze, das 9-fache des minimalen Signal zu Rausch-Verhältnisses, für quantitative Bestimmungen ebenso experimentell zu ermitteln, lag bei Nilrot bei etwa 1,5 ng/mL. Dadurch wäre eine exakte Quantifizierung von 75 Pikogramm in 50 μL Extraktionsvolumen noch realisierbar gewesen. Um alle Werte unter einander relativ vergleichen zu können, wird die quantifizierte Menge C auf das Volumen der Dissektate V_{Diss} bezogen. Es wird ein Faktor F_v für gleiche Volumina berechnet, um die ermittelte Konzentration in den Dissektaten auf das Probenvolumen zu relativieren. Dabei wird eine Zahl X , in dieser Berechnung 10^8 , durch das Dissektatvolumen der jeweils untersuchten Hautstrata dividiert, um den Zahlenwert F_v nach folgender Formel zu erhalten: $F_v = \frac{10^8}{V_{Diss}}$.

Der Zahlenwert „Signal für gleiche Volumina“ S_v ergibt sich, wenn man die ermittelte Konzentration an Nilrot mit dem Faktor für gleiche Volumina multipliziert: $S_v = C \cdot F_v$. Diese Art der Rechnung ist insofern sinnvoll, als dass man die absoluten Dichten für die dissektierten Hautareale nicht kennt. Somit vergleicht man lediglich die tatsächlich quantifizierten Mengen mit den dissektierten Volumina an den untersuchten Hautarealen. Die volumennormierte prozentuale Penetration P_{vn} der jeweils untersuchten Hautstrata für das betrachtete Vehikel ergibt sich nach folgender Formel:

$P_{vn} = \frac{S_v}{\text{Gesamtmenge}_{Sv}} \cdot 100$. Dabei wird der prozentuale Anteil eines

beobachteten Hautareals errechnet, indem man den Zahlenwert S_v für das betrachtete Hautareal durch den gleichen Zahlenwert für die Gesamtheit aller Hautareale eines betrachteten Vehikels dividiert und mit hundert multipliziert.

Die graphische Darstellung der erzielten Ergebnisse ist in den Abbildungen 42 und 43 zu betrachten.

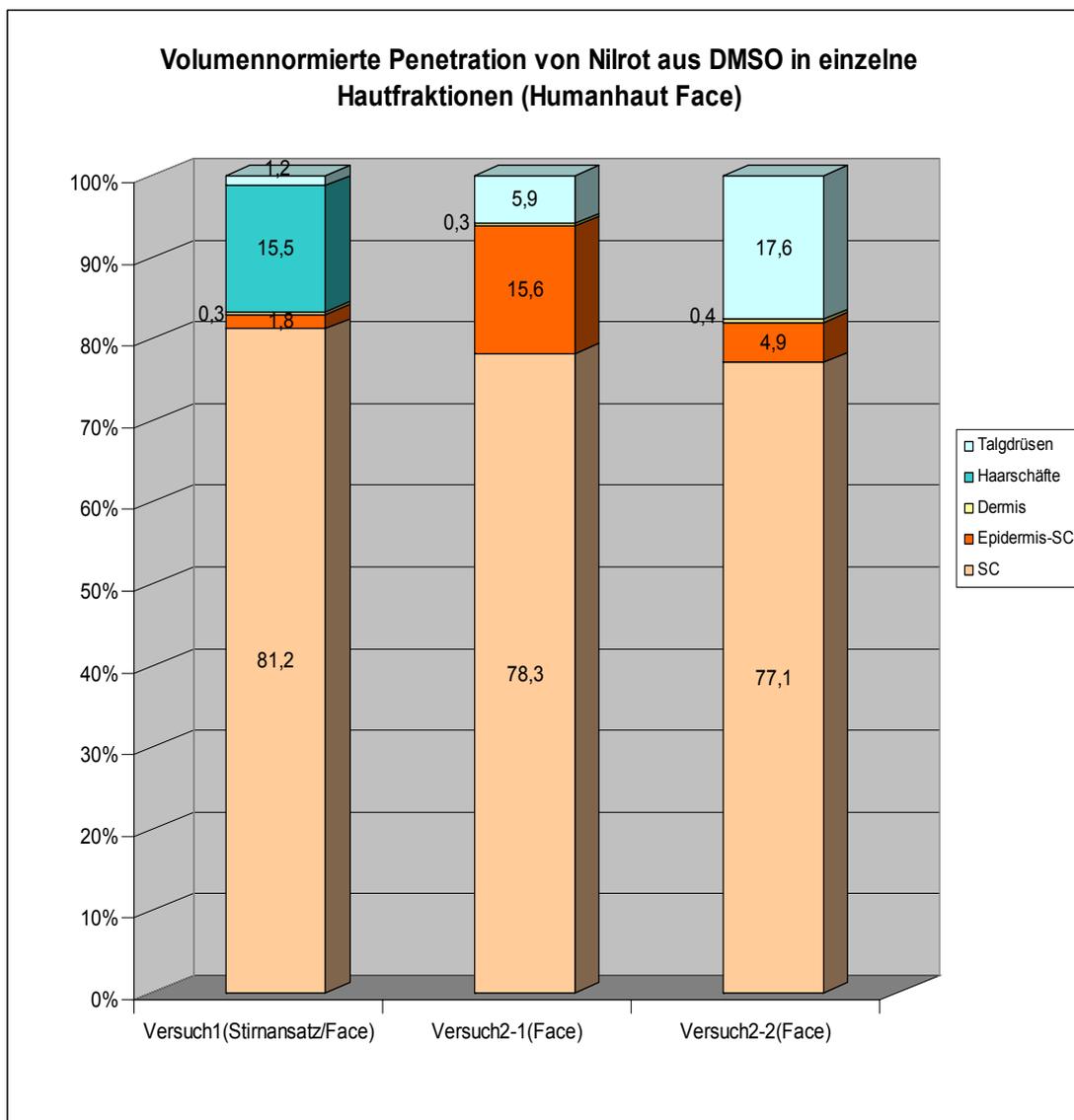


Abbildung 42: Vergleich der prozentualen Penetration von Nilrot aus DMSO in einzelne Hautfraktionen

Die erzielten Resultate (vgl. Tabelle 12 und Abbildungen 42 u. 43) legen die Schlussfolgerung nahe, dass das Nilrot aus verschiedenen Grundlagen unterschiedliche Penetrationsrouten zur Penetration durch die Haut favorisiert.

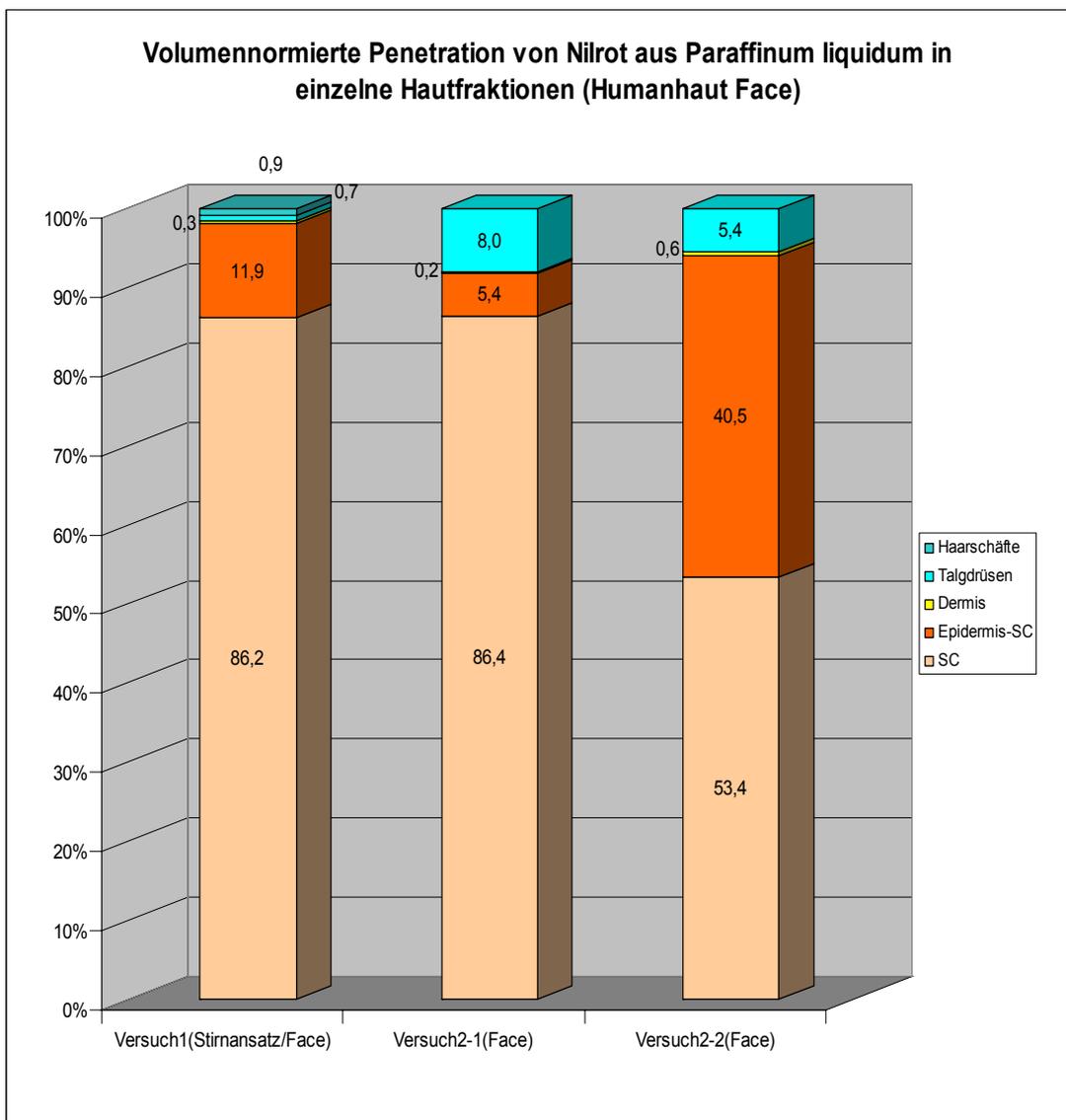


Abbildung 43: Vergleich der prozentualen Penetration von Nilrot aus dem Vehikel Paraffinum liquidum in verschiedene Hautfraktionen

5.4 Hautpenetration von Salicylsäure

5.4.1 Untersuchung der Penetration von Salicylsäure aus verschiedenen pharmazeutischen Präparaten mit der Franz'schen Diffusionszelle

Als pharmazeutisch relevante Modellsubstanz zur Darstellung der Penetration im Vergleich FDZ/ LMD ist die Salicylsäure als Modellsubstanz ausgewählt worden. Zum einen deshalb, weil Salicylsäure aufgrund seiner keratolytischen Eigenschaften sehr gut die Haut „anlöst“ und somit eine Penetration in allen Hautstrata nachweisbar sein sollte. Zum anderen ist die Salicylsäure als Modellsubstanz in vielen Penetrationsstudien aufgrund seiner Penetrationseigenschaften ausgiebig in der Literatur beschrieben worden und ermöglicht so einen guten Vergleich mit den in dieser Arbeit entwickelten Methoden.

Um eine Auswahl verschiedener Grundlagen zu haben, in denen Salicylsäure verarbeitet ist, sind folgende Präparate verwendet worden: Aknefug®-Liquidum 1 %, eine isopropanolische Lösung (Dr. August Wolff GmbH & Co. Arzneimittel, Bielefeld), Mobilat®-aktiv Salbe, eine 2 %-ige Salbengrundlage (Sankyo Pharma GmbH, München), und Salicylvaseline 2 % (Bombastus-Werke AG, Freital) .

Für jeden Penetrationsversuch wurden jeweils 6 Hautstücke mit äquivalenten Mengen an den genannten Produkten behandelt und in Franz'schen Diffusionszellen für jeweils 24 Stunden der Penetration unterzogen. Anschließend wurden alle Hautproben von ihren Überständen befreit. Nur bei den Hautproben, die mit dem Präparat Aknefug®-Liquidum 1 % behandelt worden waren, gab es keine Überstände.

Drei der Proben wurden der Probenahmeprozedur der FDZ, wie anfangs (Kap. 4.3) beschrieben, unterworfen. Weitere 3 Proben wurden am Kryostaten geschnitten und für LMD-Untersuchungen verwendet.

Dabei wurde beim Schneiden der Hautproben im Kryostaten darauf geachtet, dass die angefertigten Schnitte eine repräsentative Menge des gesamten Querschnittes darstellen. Konkret heißt das, dass nach 5-6 Schnitten, die auf

einem Objektträger aufgebracht wurden, etwa 20-30 Schnitte verworfen wurden, um anschließend wieder 5-6 Schnitte anzufertigen. Die erzielten Resultate sind in den Abbildungen 44-46 dargestellt.

Aus der isopropanolischen Lösung penetriert die Salicylsäure sehr gut durch alle Hautkompartimente hindurch und ist in relativ großen Mengen in der Rezeptorphase, dem „künstlichen“ Blutkompartiment, nachzuweisen (Abbildung 44).

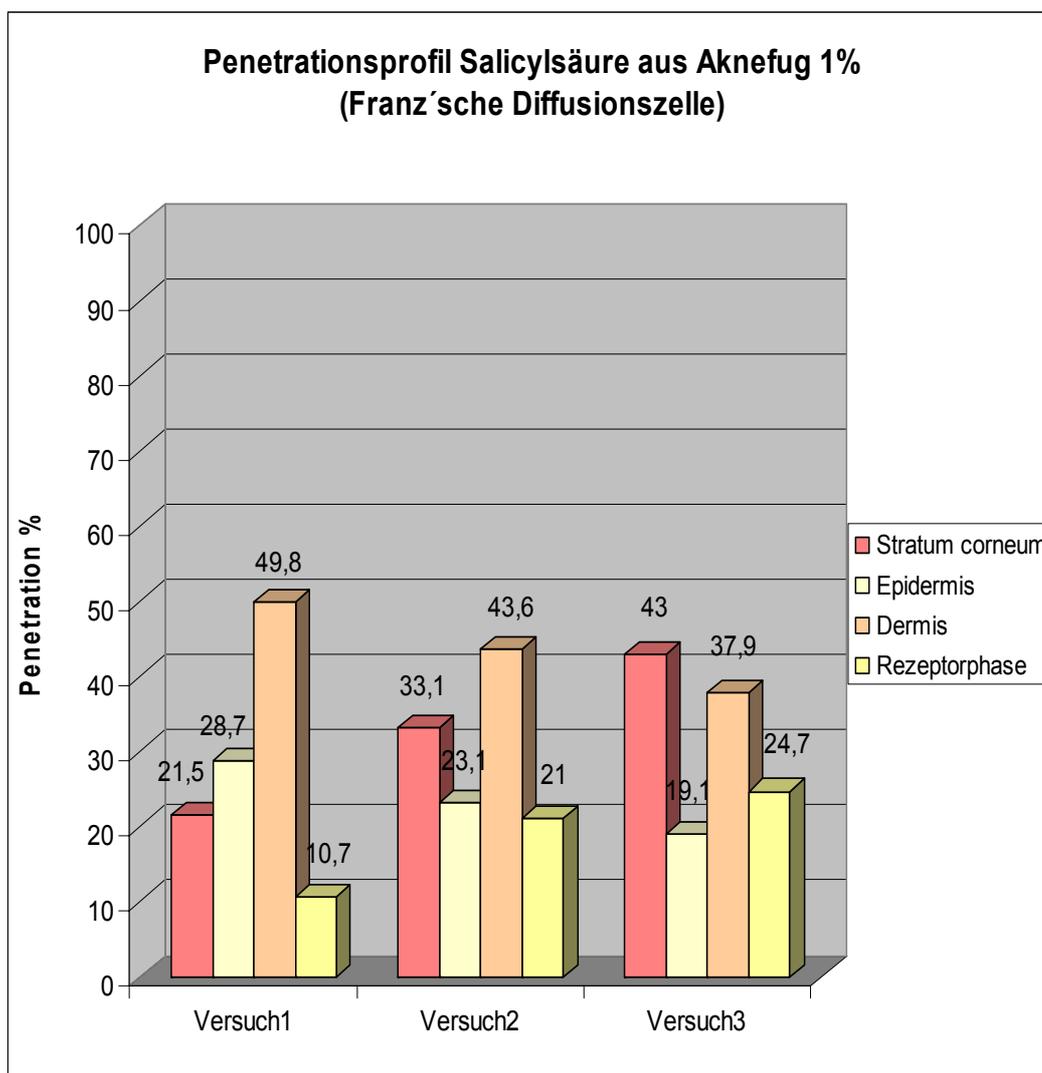


Abbildung 44: Darstellung des Penetrationsprofils von Salicylsäure aus Aknefug®-liquidum 1%

Aus der Mobilat®-Salbe penetriert die Salicylsäure ebenfalls durch die Haut hindurch, allerdings zu einem sehr viel geringeren Prozentsatz im Vergleich zum Aknefug®-Liquidum 1 %. Die größte Wirkstoffmenge akkumuliert in der Hornschicht, wahrscheinlich durch Eigenschaften der Salbengrundlage, die die Penetrationseigenschaften der Salicylsäure modifizieren (Abbildung 45).

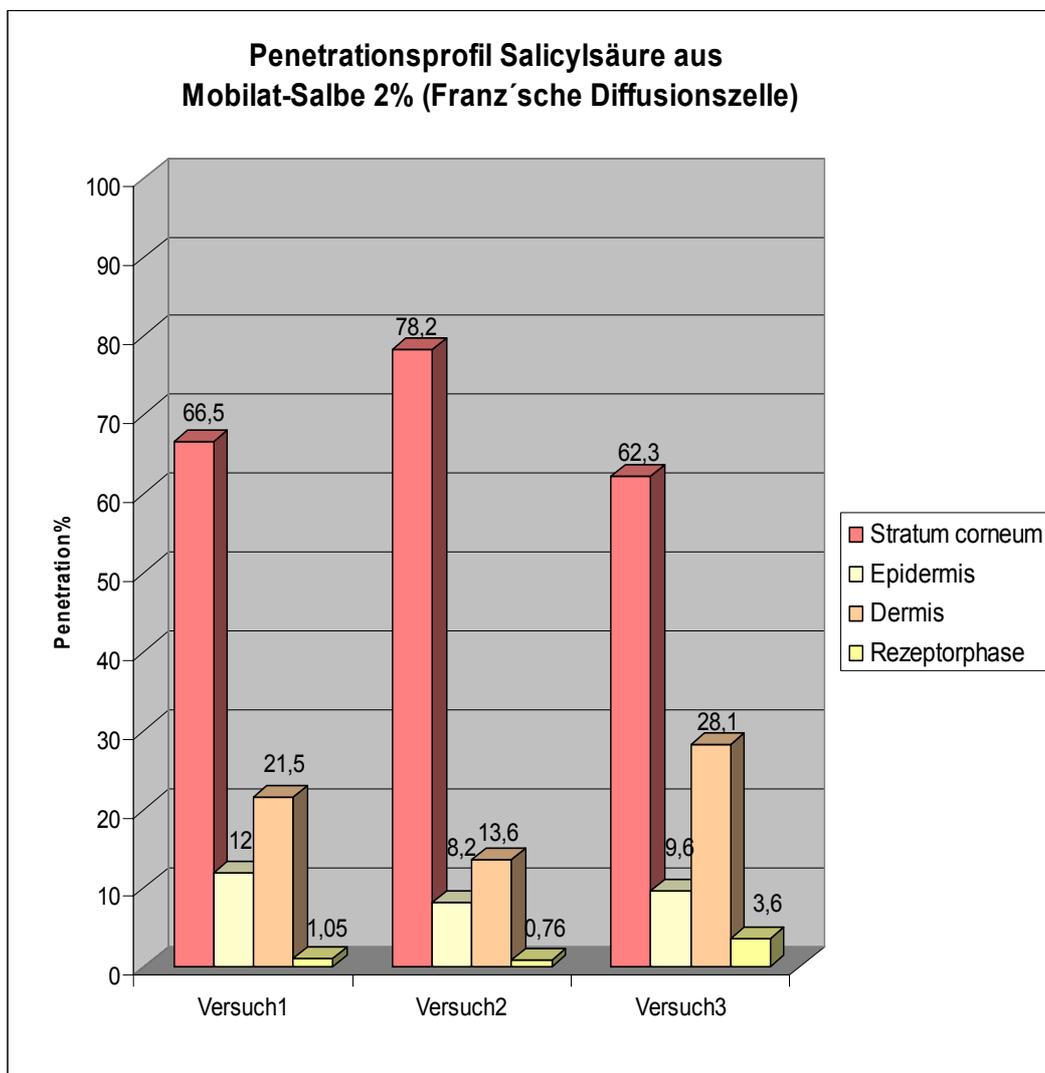


Abbildung 45: Darstellung des Penetrationsprofils von Salicylsäure aus Mobilat®-salbe

Aus der Grundlage Vaseline penetriert die Salicylsäure ebenfalls gut durch die Haut hindurch und ist in großen Mengen in der Dermis sowie in der Rezeptorphase nachzuweisen (Abbildung 46).

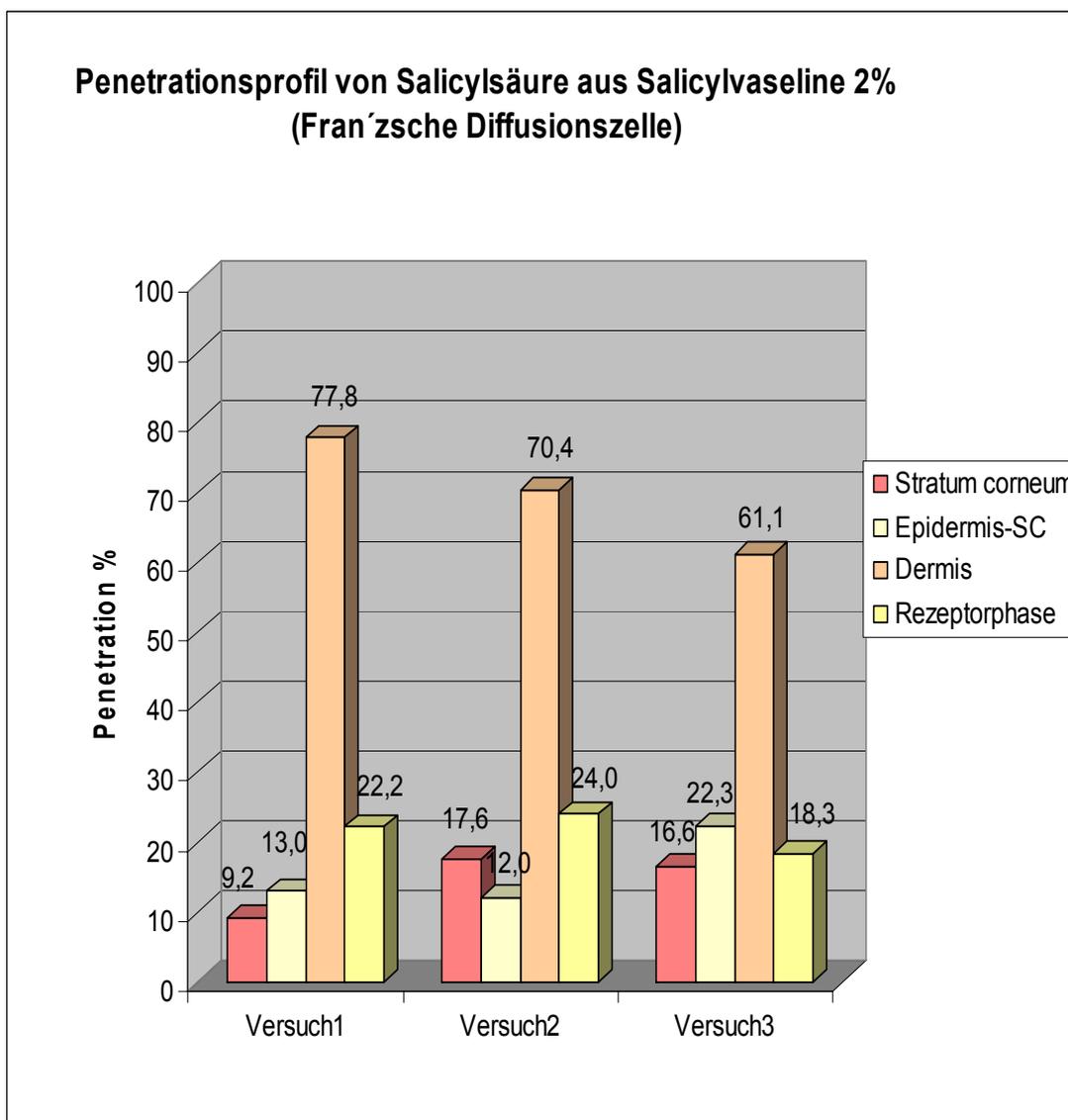


Abbildung 46: Darstellung des Penetrationsprofils von Salicylsäure aus Salicylvaseline 2%

5.4.2 Darstellung der Penetration der Salicylsäure aus verschiedenen pharmazeutischen Präparaten mittels Lasermikrodissektion

Die Graphiken zu den LMD-basierten Werten sind in den Abbildungen 47-49 dargestellt.

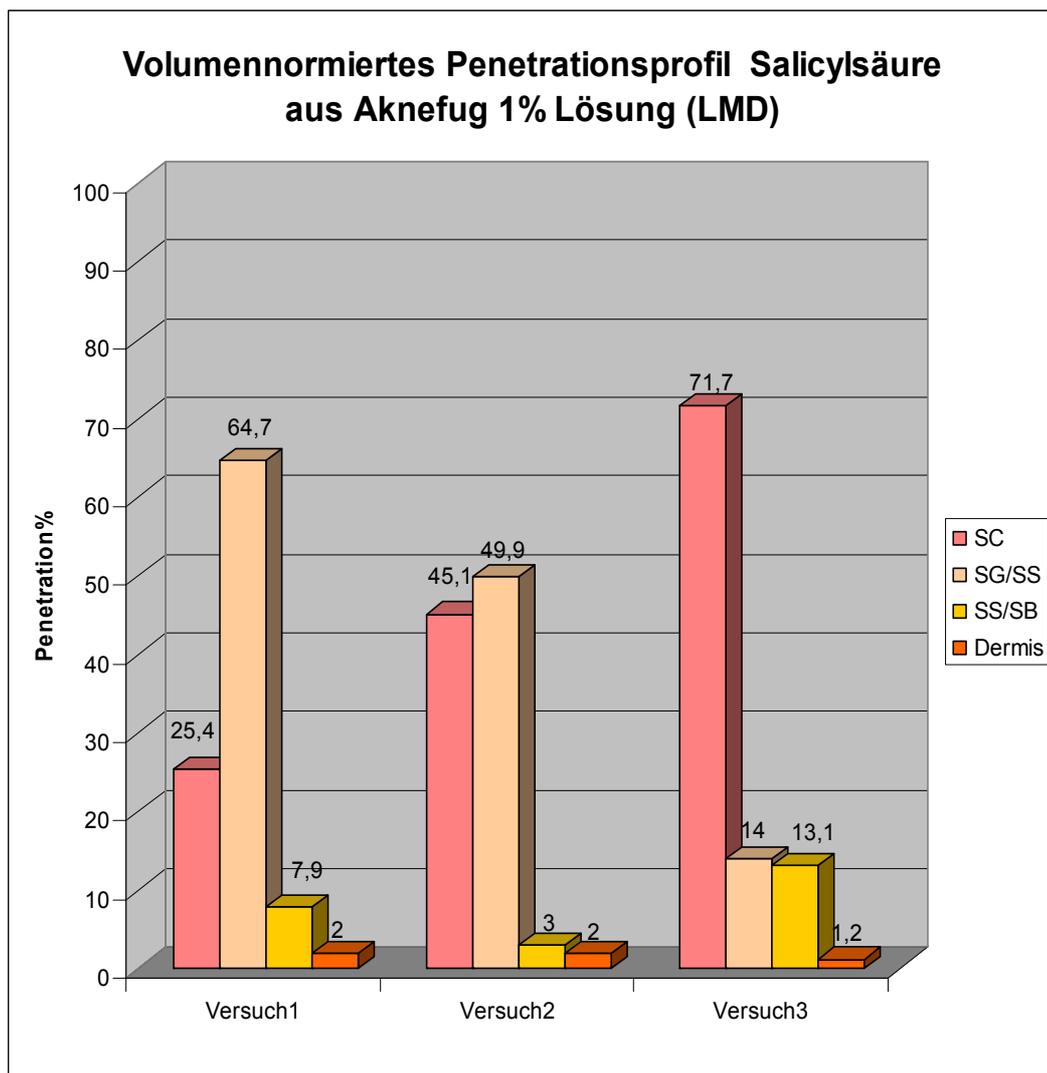


Abbildung 47: Darstellung des volumennormierten Penetrationsprofils von Salicylsäure aus Aknefug®-Liquidum 1 %

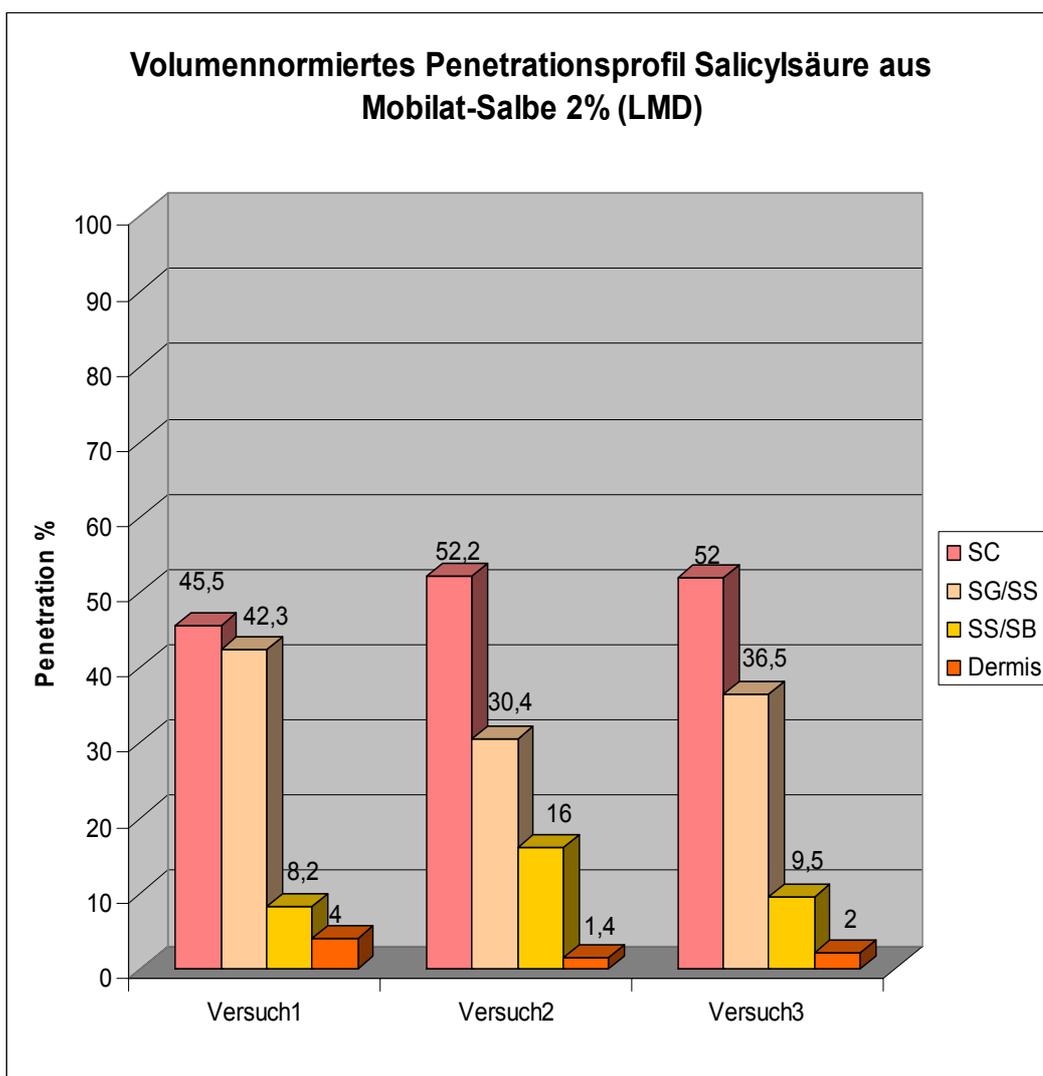


Abbildung 48: Darstellung des volumennormierten Penetrationsprofils von Salicylsäure aus Mobilat®-Salbe 2%

Zur Bestimmung der Salicylsäure in den Dissektaten ist aus jeweils zwei Bestimmungen der Mittelwert berechnet worden, der wie bei Nilrot (vgl. Kap.4.3.4) in die Berechnung des volumennormierten Penetrationsprofils eingegangen ist. Die Penetrationsdaten zur Salicylsäure, sowohl von den Versuchen mit der FDZ als auch mit dem LMD sind im Anhang zu finden (vgl. Kap. 9.2).

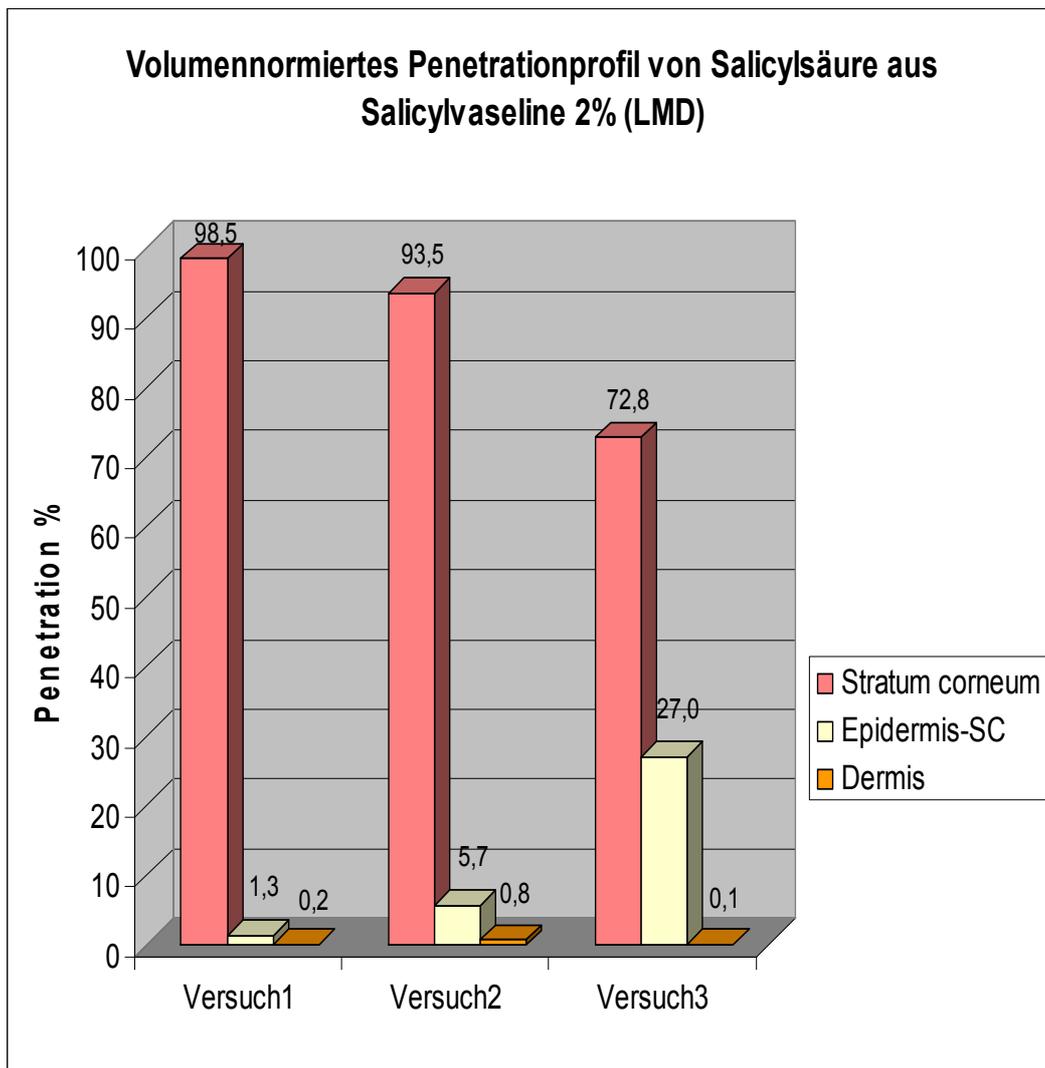


Abbildung 49: Darstellung des Volumennormierten Penetrationsprofils von Salicylsäure aus Salicylvaseline 2%

Bei den ersten Versuchen ist die Epidermis mittels LMD genauer unterteilt worden, in der Annahme man könnte das Penetrationsverhalten der Salicylsäure exakter zum Ausdruck bringen. Nachdem die ersten Ergebnisse der LMD-basierten Penetrationsergebnisse vorlagen und die erwarteten Resultate nicht im Einklang waren mit den Ergebnissen der FDZ-Versuche, ist beim Einsatz der Salicylvaseline nur noch eine grobe Unterteilung der verwendeten Haut in die drei Hauptkompartimente Stratum corneum, Epidermis-Stratum corneum und Dermis erfolgt.

6 Diskussion

6.1 Untersuchung Talgdrüsenlipide

Zum Nachweis der kontaminationsfreien Probenahme mittels LMD sind Talgdrüsenlipide mit Hautoberflächenlipiden vergleichend untersucht worden. Markersubstanzen der Stratum corneum-Lipide wie z.B. Ceramide oder Cholesterin sollten in den Talgdrüsenlipiden nicht vorkommen

Im gesammelten Talgdrüsenmaterial konnten keine Ceramide nachgewiesen werden, was als Beweis der kontaminationsfreien Probenahme mittels LMD zu deuten ist. Die Tatsache, dass in dissektierten Talgdrüsen keine langkettigen Fettsäuren nachgewiesen werden konnten, zeigt ebenfalls eine kontaminationsfreie Probenahme mittels Lasermikrodissektion.

Cholesterin bzw. Cholesterinester konnten in dem untersuchten Talgdrüsenmaterial ebenfalls nicht detektiert werden. Dieser Umstand kann erneut als Indiz der kontaminationslosen Probenahme des LMD angesehen werden, da Cholesterin und Cholesterinester als Barrierelipide aus der Kittsubstanz zwischen den verhornten Keratinozyten stammen und nicht wie Squalen überwiegend aus den Talgdrüsen an die Hautoberfläche gelangen [7].

Des Weiteren wird aus den Ergebnissen deutlich, dass eine verschleppungsfreie Präparation beim Schneiden der Hautproben am Kryostaten möglich ist. Es treten zudem offensichtlich keine Umverteilungen der Substanzen beim Lagern und Auftauen der Dünnschnitte auf.

Mit der Probenahmetechnik der Lasermikrodissektion wird eine hohe Ortsauflösung erreicht, die neue Möglichkeiten und Perspektiven in der Lipidforschung der Haut erahnen lässt. Durch empfindliche Detektionsverfahren wie der Massenspektrometrie ist es zudem möglich, Biomoleküle in kleinsten Mengen zu identifizieren sowie quantitativ zu bestimmen.

6.2 Franz'sche Diffusionszelle

Die Franz'sche Diffusionszelle gilt als etablierte und anerkannte Methode welche mit hohem Probendurchsatz die Untersuchung der Penetration von Substanzen durch die Haut ermöglicht. Jedoch weist die FDZ Schwächen auf, was die Probenahmeprozedur anbelangt

Einer der Schwachpunkte der Probenahme der FDZ liegt eindeutig darin, dass das Ausmaß der Penetration in Hautanhangsgebilde nicht erfasst werden kann, weil Anhangsgebilde (Haarkanäle, Schweiß- und Talgdrüsen) bei der Trennung der Hautstrata formal entweder der Epidermis oder der Dermis zugesprochen werden. Die mechanische Trennung der Epidermis von der Dermis kann z.T. dazu führen, dass Anhangsgebilde, die in der Dermis hängen, aus der Epidermis herausgezogen werden und dort entsprechend große Löcher hinterlassen. Je nach Individuum und Körperregion gibt es außerdem Unterschiede in der Anzahl der Anhangsgebilde, was zu einer zusätzlichen Unsicherheit bei der Interpretation der Messergebnisse führen kann.

Ein weiterer Schwachpunkt der FDZ ist die Gewinnung der Hautproben, insbesondere die thermische Trennung der Epidermis von der Dermis. Nicht nur, dass dieser Schritt die Untersuchung der Penetration thermolabiler Verbindungen unmöglich macht, sie kann auch dafür sorgen, dass durch die Wärmeeinwirkung eine Umverteilung penetrierter Substanzen stattfinden kann.

Zudem läuft das Abstreifen des Stratum Corneums aufgrund der topographischen Beschaffenheit der Haut nicht quantitativ ab, sondern ist interindividuellen Schwankungen durch Hautfalten und Hautfurchen unterworfen und weist je nach angewandter Kraft der durchführenden Person erhebliche Unterschiede im Ergebnis auf [25]. Die Tatsache, dass die Haut nicht planar ist, wird anhand der Abbildung 50 deutlich.



Abbildung 50: Schweinehautschnitt 5 µm, 200-fach vergrößert, mit Hämatoxyllin angefärbt. Erkennbar sind Furchen auf der Hautoberfläche.

6.3 Penetration von Nilrot

Aus den Penetrationsergebnissen, die mittels FDZ und LMD generiert wurden, ist ersichtlich, dass eine gute Vergleichbarkeit zwischen den Ergebnissen der FDZ und dem LMD für die Penetration von Nilrot gegeben ist.

Die mit dem LMD erzielten Ergebnisse werden auf 1 Quadratzentimeter extrapoliert, da die tatsächliche Applikationsfläche bei allen durchgeführten Penetrationsversuchen etwa 1 cm² groß gewesen ist. Da bei der FDZ hingegen immer das gesamte Hautareal und die darin wieder gefundene Menge des gesuchten Analyten in die Berechnung eingeht, unabhängig von der tatsächlichen Größe der Applikationsfläche, ist eine solche Auswertung, wie beim LMD vorgenommen, nicht notwendig.

Den Penetrationsergebnissen zufolge penetriert Nilrot in verschiedenen Grundlagen eingearbeitet unterschiedlich durch die Haut. Während Nilrot in Paraffinum liquidum gelöst, scheinbar eher breitflächig, also eher auf interzellulärem oder transzellulärem Wege in die Haut penetriert, scheint die gleiche Verbindung aus Dimethylsulfoxid heraus eher die „Shunt- Penetrationsroute“ [19] durch die Haarfollikel hindurch in die Dermis zu bevorzugen.

Die Tatsache, dass Haarfollikel und mit Ihnen assoziierte Talgdrüsen wichtige Penetrationsrouten für Substanzen in die Haut darstellen, findet jedoch mehr Anerkennung in der Hautforschung [18]. Lademann et al. fanden in ihren Untersuchungen heraus, dass Mikropartikel mit einem Durchmesser von 1,5 µm besonders effektiv in die Haarfollikel penetrieren, wobei eine Penetrationstiefe von > 2300 µm im Haarfollikel erreicht wird. Demnach stellen Mikropartikel ein effektives Transportsystem für Wirkstoffe durch die Barriere der menschlichen Haut dar [60].

Durch die richtige Auswahl des Vehikels, kann scheinbar die Penetration von Fluoreszenzfarbstoffen bevorzugt in die Haarfollikel induziert werden [61]. Die Eindringtiefe von Fluoreszenzfarbstoffen wie z.B. Indigocarmin in Humanhaut ist ungefähr 1,2 mm, von der Hautoberfläche her betrachtet, fanden Genina et al. heraus [62].

Die mit den Haarfollikeln assoziierten Talgdrüsen fungieren dabei als Reservoir für Substanzen, die durch die leichter permeierbaren Zellwände der Talgdrüsenzellen die Epidermis und Dermis besser erreichen können, als durch die verhornten Keratinozyten des Stratum corneums [18, 62].

Ramachandran und Fleischer [63] arbeiteten in Ihrer Publikation die Relevanz der transfollikulären Penetrationsroute und dessen Bedeutung zur Entwicklung transdermaler therapeutischer Systeme heraus. Andere Wissenschaftler haben durch unterschiedliche technische Verfahren den Beweis erbracht, dass die follikuläre Penetration einen hohen Anteil an der Gesamtpenetration ausmacht [19, 64, 65], bzw. das Ausmaß der Penetration von der Gesamthaardichte der behandelten Region abhängig ist [20, 66].

Mehrere Arbeitsgruppen konnten zudem in Penetrationsstudien, sowohl mit Humanhaut [67, 68], als auch im Tiermodell [6, 69, 70] nachweisen, dass die Penetration von Substanzen in follikelfreier Haut zum Teil um ein vielfaches geringer ist im Vergleich zu normaler Haut mit Haarfollikeln und Talgdrüsen als Hautanhangsgebilde.

Somit kann man als Ergebnis dieser Untersuchungen festhalten, dass man mit dem LMD orts aufgelöst und spezifisch einen gesuchten Analyten an seinem bevorzugten Wirkort erfassen und quantifizieren kann.

Die Tatsache, dass zum Teil große Unterschiede in den quantifizierten Mengen im gleichen Hautareal von unterschiedlichen Hautproben festgestellt werden, kann mehrere Ursachen haben. Zum einen kann, wie bei allen biologischen Proben, die interindividuelle Varianz der untersuchten Hautproben eine nicht zu vernachlässigende Rolle spielen.

Zum anderen kann die große Anzahl von Einzelschritten bei den durchgeführten Untersuchungen, angefangen bei der Probenvorbereitung bis hin zur Extraktion von Kleinstmengen an Probe/Analyt, für eine gewisse Anfälligkeit der erzielten Ergebnisse sorgen.

Dennoch, auch wenn Schwankungen bei den quantifizierten Mengen in den einzelnen Hautfraktionen zu verzeichnen sind, können Tendenzen zum bevorzugten Penetrationsverhalten von Nilrot aus verschiedenen Grundlagen in die Haut sehr gut erkannt werden, die mit den durchgeführten Versuchen nachgewiesen werden.

6.4 Penetration von Salicylsäure

Die mittels FDZ generierten Ergebnisse zur Penetration von Salicylsäure spiegeln weitestgehend das in der Literatur beschriebene Penetrationsverhalten der Salicylsäure wieder.

Versuche zur Modifikation der Penetrationseigenschaften der Salicylsäure aus verschiedenen Akneprodukten konnten zeigen, dass die Penetration der Salicylsäure aus einer anionischen LES-Grundlage (Laurylethersulfat) am größten ist und durch Zugabe des Copolymers Polyolprepolymer-15 in verschiedenen Konzentrationsstufen, stetig verringert werden konnte [71].

Untersuchungen von Tadanori et al. [72], bezüglich der Hautpermeabilität von verschiedenen nicht steroidalen Antirheumatika (NSAR), darunter auch Salicylsäure und dessen Abkömmlinge deuten an, dass ein Zusammenhang besteht zwischen der Lipophilie der untersuchten Verbindungen und deren Tendenz, sich in lipophilen Kompartimenten der Haut, wie dem Stratum corneum zu akkumulieren. Die Ergebnisse dieser Untersuchung zeigen, dass die Salicylsäure, in acetonischer Lösung appliziert, in den ersten 4 Stunden nach der Applikation zu 70% absorbiert wird.

Dadgar et al. [73] haben nach Applikation von zwei analgetischen Substanzen, nämlich 3-Phenylpropylsalicylat und Ethyl-5-Methoxysalicylat in Form eines Liniments, im Blutplasma von Probanden die Metabolitenausscheidung, unter anderem die Salicylsäurekonzentration untersucht. Andere Arbeitsgruppen [74, 75] untersuchten sowohl die renale Ausscheidung als auch den Plasmaspiegel der Salicylsäure und dessen Metaboliten nach epidermaler Applikation von salicylsäurehaltigen Antiphlogistika auf die Haut und konnten nachweisen, dass bereits nach wenigen Tagen ein konstanter Wirkstoffspiegel im Plasma bzw. im Harn nachzuweisen ist. Interessant ist in diesem Zusammenhang die Beobachtung von Wester et al. [76], dass Salicylsäure aufgrund seiner keratolytischen Wirkung und der daraus möglicherweise abgeleiteten penetrationsfördernden Eigenschaften keinen positiven Effekt auf die Absorption von Hydrocortison ausübt im Vergleich zu einer Grundlage ohne Salicylsäure.

Die Grundlage einer Darreichungsform kann nämlich die Freisetzung und die Wirkung eines Wirkstoffes beeinflussen. Der erste Schritt bei einer topischen Applikation besteht in der Diffusion des gelösten Wirkstoffs zur Grenzfläche Grundlage/Haut und der anschließenden Penetration des gelösten Wirkstoffs in die Epidermis[77].

Die Grundlage Isopropanol bei dem Präparat Aknefug®-Liquidum 1% agiert wahrscheinlich ähnlich wie Ethanol als Penetrationsmodifier [78], und ermöglicht eine rasche Penetration der Salicylsäure durch alle Hautschichten hindurch.

Bei der Mobilat®-Salbe handelt es sich um eine Lösungssalbe, d.h. die Salicylsäure liegt in der Salbengrundlage gelöst vor. Und je besser löslich ein Wirkstoff in der Grundlage ist, desto stärker wird er von der Grundlage festgehalten. Diese Tatsache bedingt eine Anreicherung der Salicylsäure aus der Mobilat®-Salbe hauptsächlich im Stratum corneum.

Die Ergebnisse der Penetration der Salicylsäure aus der Grundlage Vaseline kommen dadurch zustande, dass die Salicylvaseline eine Suspensionssalbe ist, d.h. der hydrophile Wirkstoff Salicylsäure, der sich nicht gut in der lipophilen Grundlage Vaseline löst, liegt suspendiert darin vor. Die Beobachtung, dass die Salicylsäure aus der Suspensionssalbe von der Haut besser aufgenommen wird als aus der Lösungssalbe (Mobilat®), ist auf das Vorliegen günstigerer Werte des Verteilungskoeffizienten zurückzuführen. Mit größerem Verteilungskoeffizienten (Verteilungsverhalten von Wirkstoffen zwischen einer organischen lipophilen und einer mit dieser nicht mischbaren wässrigen hydrophilen Phase) nimmt die Diffusionsgeschwindigkeit zu. Außerdem ist aus Suspensionssalben eine konstantere Penetrationsgeschwindigkeit erreichbar, da sich ungelöster Wirkstoff in dem Maße in der Grundlage nachlöst wie gelöster Wirkstoff in die Haut penetriert. Deshalb ist bei Suspensionssalben mit einem geringeren Einfluss der Grundlage auf die Penetration des Wirkstoffes in die Haut zu rechnen als bei Lösungssalben[77].

Wenn man sich die Ergebnisse, die mittels Dissektion von Hautstrata am LMD gewonnen wurden anschaut, fällt folgendes auf: In der Epidermis sind unabhängig von der Applikationsform fast durchweg über 95-98% der Salicylsäure detektiert worden. In der Dermis, in der nach den Versuchen mit der FDZ ebenfalls viel zu erwarten wäre, sind im Schnitt nur etwa 1-2% quantifiziert werden.

Deshalb wird vermutet, dass das Einbettmedium Tissue-tec, das ja die Gesamtprobe umgibt (Abbildung 51), einen gewissen osmotischen Effekt auf die Hautprobe ausübt.

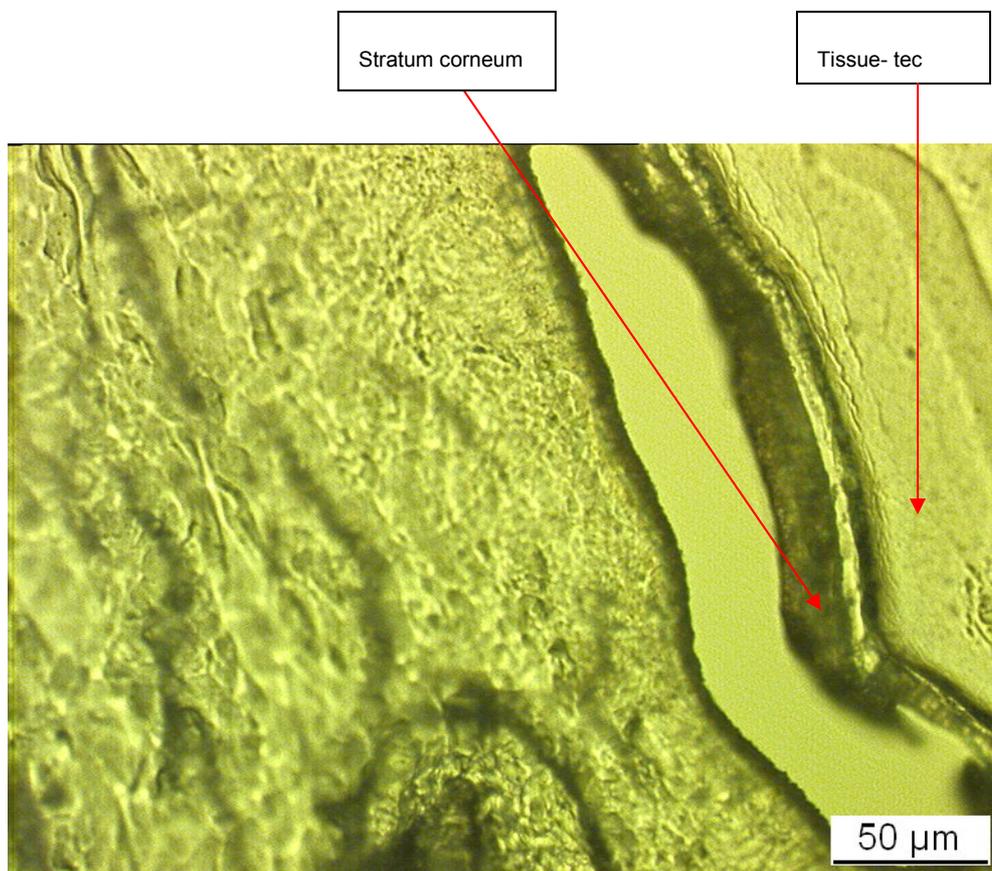


Abbildung 51: Vertikaler Hautschnitt auf dem Objektträger aufgebracht, mit angrenzendem Einbettmedium Tissue-Tec, Normallicht, 400-fache Vergrößerung

Das Prinzip der Osmose beruht auf der Diffusion von Lösungsmittelmolekülen durch eine semipermeable Trennwand [79]. Befinden sich beiderseits der Membran verschieden konzentrierte Lösungen,

so wird beim Vorliegen einer permeablen Trennwand, die allen Komponenten des Lösungssystems den Durchtritt gestattet, ein Konzentrationsausgleich nach Art der freien Diffusion erfolgen.

Im Falle der Dünnschnitte, die von der Stratum corneum Seite mit dem Einbettmedium in Kontakt stehen (Abbildung 51), existiert quasi ein System mit zwei Kompartimenten, in denen verschiedene Konzentrationen des betrachteten Moleküls, in diesem Falle die Salicylsäure, existieren.

Das Stratum corneum könnte als eine Art semipermeable Membran fungieren, die für die Salicylsäure als Verbindung mit nicht allzu großer Molekularmasse jedoch durchlässig ist. So könnte die bereits penetrierte Salicylsäure, von der Dermisseite Richtung Stratum corneum diffundieren, also von Orten höherer Konzentration in Richtung Orte niedrigerer Konzentration, um sich im Einbettmedium Tissue-tec zu akkumulieren. Da der Stoffaustausch maßgeblich von der Diffusionsgeschwindigkeit der Moleküle im gelösten System abhängig ist, verläuft sie aber durch das Hautgewebe nur bis zum Grad der Akkumulation im Stratum corneum ab.

In diesem Zusammenhang wäre eine Bestimmung der Salicylsäurekonzentration im Einbettmedium hilfreich zur Aufklärung des beobachteten Sachverhaltes. Die Durchführung ist jedoch schwierig, da sich der Laser des LMD nur schwerlich durch das Tissue-tec hindurcharbeiten kann, selbst bei drastischen Lasereinstellungen. Als Alternative könnte man jedoch versuchen, mittels Zuhilfenahme von Mikrokapillaren das auf den Objektträgern befindliche Einbettmedium aufzusaugen und auf Salicylsäure hin zu untersuchen. Eine andere Möglichkeit bestünde darin, behandelte Hautproben ohne Einbettung in Tissue tec zu schneiden.

Obwohl die mit Nilrot behandelten Proben ebenfalls in Tissue-tec eingebettet worden sind, hat es eine gute Korrelation zu den Werten der FDZ gegeben. Deshalb wird angenommen, dass sich das Nilrot als lipophile Substanz nicht besonders gut im hydrophilen Tissue tec löst.

Aber auch andere Arbeitsgruppen, die das Penetrationsprofil der Salicylsäure im Vergleich Franz'sche Diffusionszelle und Mikrodialyse untersucht haben,

haben Diskrepanzen zwischen den erzielten Resultaten verzeichnet. Leveque et al., die die Penetration der Salicylsäure mit den Techniken der Mikrodialyse und der FDZ untersuchten, kamen zwar zu ähnlichen Ergebnissen in ihren Untersuchungen, weisen jedoch in ihrer Publikation darauf hin, dass die mit der Mikrodialyse wieder gefundene Menge nur eine kleine Fraktion der in der Gesamtprobe vorhandenen Analytmenge darstellt [80]. Außerdem ist es denkbar, dass die Salicylsäure während des Vorganges der Probengewinnung weiter penetriert ist, und daraus resultierend bei der teilweise mehrere Stunden andauernden Probenahmen keine repräsentativen Mengen in den dissektierten Hautstrata vorhanden gewesen ist.

Zudem ergibt sich bei einem Kreisdurchmesser der Gesamtapplikationsfläche von 2,5 cm eine Fläche von 4,9 cm² bzw. 490 mm². Wiederum ist das Gesamtvolumen des Dermisanteils der Applikationsfläche bei 5000 µm (5 mm angenommener Schichtdicke) etwa 2,45 · 10¹² µm³. Somit beträgt ein dissektierte Dermisvolumen von 5 · 10⁷ µm³ (z.B. Versuch1-Mobilat-LMD, Anhang, Kap. 10.2, Tabelle 23) einen Anteil von nur 0,002 % des Gesamtdermisvolumens der Applikationsfläche. Da dieser Anteil nur einen winzigen Anteil der Gesamtapplikationsfläche ausmacht, können schon bereits geringe Schwankungen in der Wirkstoffverteilung große Auswirkungen auf das Gesamtpenetrationsergebnis haben. Das könnte der Grund für die Unterschiede zwischen den beiden Methoden FDZ/LMD sein, wie bei der Salicylsäure beobachtet.

Aber auch im Falle der Salicylsäure ist eine orts aufgelöste Quantifizierung in verschiedenen Hautschichten möglich. Bei Verbindungen, die nicht fluoreszieren und somit der Detektion per CLSM nicht zugänglich sind, ist eine orts aufgelöste Bestimmung nur mit der Lasermikrodissektion zu erreichen. Denn ein orts aufgelöster Nachweis von Substanzen aus verschiedenen Darreichungsformen ist unabdingbar für die Untersuchung der biologischen Wirkung von Substanzen aus verschiedenen Applikationsgrundlagen.

Die Lasermikrodissektion wird nicht bereits etablierte und mit hohem Probendurchsatz schnell und präzise Ergebnisse liefernde Methoden wie die Franz'sche Diffusionszelle zur Darstellung der Penetration von Substanzen in die Haut ersetzen oder verdrängen können. Allein der Umstand, dass die Probenvorbereitung sowie die Probengewinnung einer einzigen Hautprobe mehrere Stunden in Anspruch nehmen kann, lässt die Schlussfolgerung zu, dass die Lasermikrodissektion weniger für routinemäßige Untersuchungen mit einem hohen Probendurchsatz geeignet ist. Im Vergleich zum LMD können bei der FDZ innerhalb einer Stunde zwischen 2-4 Hautproben bearbeitet werden.

Weiterer Klärungsbedarf besteht bei der Probenvorbereitung. Speziell sollten andere Verfahren zum Einbetten der behandelten Hautprobe am Kryostaten erprobt werden, um einen möglichen Einfluss von Einbettmedien zu minimieren bzw. zu eliminieren.

Die angefertigten Hautschnitte ihrerseits stellen lediglich einen kleinen Ausschnitt der Gesamtprobe dar, so dass Diskrepanzen zwischen Ergebnissen bereits etablierter Methoden wie der FDZ und dem LMD vorkommen können. Auf der anderen Seite zeigen Wiederholungen bei LMD-Messungen reproduzierbare Messergebnisse. Gründe für die beobachteten Diskrepanzen können sein:

- Bei der Berechnung der Analytmengen gehen bei beiden Verfahren andere Gewichtungen in die Auswertung ein. Denn man bezieht beim LMD die Analytmenge auf das Dissektatvolumen und geht damit das Risiko ein, zu wenig Analyt auf ein zu großes Volumen zu beziehen, weil per Zufall ein Hautareal bearbeitet worden ist, in welches nicht so viel der applizierten Menge an Substanz vorgedrungen ist. Genau so gut ist aber auch denkbar, zu viel Analyt auf ein zu kleines Dissektatvolumen zu beziehen.
- Bei der Franz'schen Diffusionszelle gibt es nur 3 zu untersuchende Hauptkompartimente und das gesamte Hautkompartiment geht immer als Ganzes in die Berechnung mit ein, unabhängig davon, ob die

Penetration an gewissen Arealen der Hautprobe ganz oder nur teilweise stattgefunden hat und unabhängig vom Volumenanteil der untersuchten Hautstrata. Würde bei der Erstellung von Penetrationsprofilen mittels FDZ ebenfalls eine volumennormierte Berechnung der prozentualen Verteilung von Wirkstoffen in der Haut erfolgen, würden vermutlich ähnliche Verteilungsprofile beim LMD zu beobachten sein.

- Die FDZ kann aufgrund der Probenahme den Anteil der Hautanhangsgebilde an der Gesamtpenetration nicht berücksichtigen.

Die Lasermikrodissektion entfaltet seine Stärke jedoch genau an dieser Stelle, wo bis heute keine Nachweismethode adäquate Lösungen zu liefern vermag. Denn bei Sichtung der existierenden Literatur ist keine Methodik beschrieben worden, die es erlaubt, auf relativ einfachem Wege das Ausmaß der Penetration bzw. Akkumulation von Wirk- und Hilfsstoffen in Hautanhangsgebilden wie Haaren, Talg- und Schweißdrüsen quantitativ zu erfassen.

Zudem kann mit Hilfe der Lasermikrodissektion eine exaktere Untersuchung der Hautkompartimente durchgeführt werden. So ist es möglich, das mittels FDZ grob abgeschätzte Penetrationsprofil von Substanzen innerhalb einer histologisch homogenen Hautschicht (z.B. Epidermis) mit Hilfe der Lasermikrodissektion genauer zu unterteilen und auch den Anteil der Hautanhangsgebilde an der Gesamtpenetration quantitativ zu erfassen.

Denkbar ist für die Zukunft die Erstellung vertikaler Penetrationsprofile entlang von Haaren, um den Erfolg der Wirkstoffakkumulation am gewünschten Hauptwirkort, z.B. der Haarwurzel, qualitativ oder quantitativ ausdrücken zu können. In diesem Zusammenhang wäre der Nachweis der Penetration von Wirkstoffen aus den Haarfollikeln in das die Haarfollikel umschließende Dermisgewebe ebenfalls interessant.

7 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden Potential und Grenzen des chemisch/analytischen Nachweises von endogenen und topisch applizierten Analyten auf/in Haut, mittels einer Methodenkopplung von Lasermikrodissektion- und Flüssigchromatographie/Massenspektrometrie untersucht.

Es konnte anhand ausgewählter Beispiele gezeigt werden, dass eine ortsaufgelöste und kontaminationsfreie Probenahme mittels Lasermikrodissektion und ein anschließender Nachweis der Zielanalyten im Pikogrammbereich möglich ist. Durch die Kopplung der LMD-Technik mit der Flüssigchromatographie-Massenspektrometrie, insbesondere der multi reaction monitoring-Detektion (MRM), kann zusätzlich hohe Selektivität bei der Quantifizierung der zu bestimmenden Analyten erreicht werden.

Als Fazit der vorliegenden Arbeit kann festgehalten werden, dass sich die LMD als zusätzliche Methode und als Ergänzung bereits etablierter Methoden wie der Franz'schen Diffusionszelle oder der konfokalen Laserrastermikroskopie hervorragend dazu eignet, ortsaufgelöst und kontaminationsfrei, den gesuchten Wirkstoff an seinem Wirkort sowohl qualitativ als auch quantitativ zu bestimmen.

8 Summary

In the present study both potential and limits of direct coupling of Laser Microdissection with Liquid Chromatography-Mass Spectrometry (LMD-LC-MS) in spatially resolved chemical detection of endogenous skin compounds (e.g. lipids) and topically applied compounds were investigated.

In different feasibility studies it was shown, that a spatially resolved and non-contaminant acquisition of specimen by means of LMD and subsequent analysis of target molecules is possible in the range of few picogrammes. By direct coupling to Liquid chromatography-Mass spectrometry, especially using multi reaction monitoring-modus (MRM), further selectivity in the quantification of substances can be achieved.

As a conclusion of the presented work, it can be summarised that the LMD is suitable to serve as additional method to other mainstream-methods such as the FDC and the confocal laser scanning microscopy (CLSM). It is excellently qualified for the spatially resolved and non-contaminant determination of an agent at its desired location, either qualitatively or quantitatively.

9 Anhang

9.1 Penetrationsprofil von Nilrot aus Paraffinum liquidum in Schweinehaut, Vergleich Ergebnisse FDZ vs. LMD

Tabelle 15: Konzentrationsprofil von Nilrot in Paraffinum liquidum in verschiedenen Hautschichten, Vergleich FDZ und LMD, Schweinehaut

Proben	Konzentration total in ng [FDZ]	Hautschichten LMD	Volumennormiertes Penetrationsprofil In ng [LMD]
Hautüberstand	21735	Stratum corneum	56,6
SC Tapes 1+2	3213,8		
SC Tapes 3+4	1247,7		
SC Tapes 5+6	420,8		
SC Tapes 7+8	203,5		
SC Tapes 9+10	154,5		
SC Tapes 11+12	156,6		
SC Tapes 13+14	77,8		
SC Tapes 15+16	105		
Epidermis	2781,7		
Dermis	753,3	Dermis	2

9.2 Volumennormiertes Penetrationsprofil von Nilrot aus den Vehikeln PL und DMSO in Humanhaut/Gesicht, Ergebnisse LMD

Tabelle 16: Volumennormiertes Konzentrationsprofil von Nilrot in Paraffinum liquidum in verschiedenen Hautschichten, Humanhaut Gesicht (Versuche 2+3)

Hautareale Versuch2+3	Konz. ng total in 50 μ L (C)	Dissektiertes Volumen in μm^3 (V_{Diss})	Faktor gleiche Volumina (F_v)	Signal gleiche Volumina (S_v)	Volumennormierte Penetration in % (P_{vn})
Nilrot-PL Dermis	0,075	121438180	0,82	0,06	0,29
Nilrot-PL Epidermis- Str. corneum	0,39	26432800	3,8	1,46	5,4
Nilrot-PL Stratum coreum	1,68	7197460	13,9	23,4	86,4
Nilrot-PL Talgdrüsen	1,83	85077100	1,18	2,15	7,96
Nilrot-PL Dermis	0,067	108543060	0,92	0,06	0,6
Nilrot-PL Epidermis- Str. corneum	1,24	28557340	3,5	4,3	40,55
Nilrot-PL Stratum coreum	0,36	7105080	14,07	5,65	53,4
Nilrot-PL Talgdrüsen	0,45	78789820	1,27	0,58	5,4

Tabelle 17: Volumennormiertes Konzentrationsprofil von Nilrot in DMSO in verschiedenen Hautschichten, Humanhaut Gesicht (Versuche 2+3)

Hautareale Versuch2+3	Konz. ng total in 50 μ L (C)	Dissektiertes Volumen in μm^3 (V_{Diss})	Faktor gleiche Volumina (F_v)	Signal gleiche Volumina (S_v)	Volumennormierte Penetration in % (P_{vn})
Nilrot-DMSO Dermis	0,12	108725560	0,92	0,11	0,3
Nilrot-DMSO Epidermis- Str. Corneum	1,16	21108080	4,74	5,52	15,5
Nilrot-DMSO Stratum coreum	2,06	7412800	13,5	27,75	78,3
Nilrot-DMSO Talgdrüsen	1,15	55160420	1,8	2,1	5,9
Nilrot-DMSO Dermis	0,13	103357360	0,97	0,12	0,4
Nilrot-DMSO Epidermis- Str. Corneum	0,4	26097180	3,8	1,54	4,9
Nilrot-DMSO Stratum coreum	1,88	7730440	12,94	24,4	77,1
Nilrot-DMSO Talgdrüsen	3,4	61234440	1,6	5,56	17,6

9.3 Penetrationsprofil von Salicylsäure aus verschiedenen pharmazeutischen Präparaten, Vergleich Ergebnisse Franz'sche Diffusionszelle vs. LMD

Tabelle 18: Konzentrationsprofil Salicylsäure, Präparat Aknefug 1%, FDZ

Probe FDZ	Aknefug-Probe1 Konzentration ng/mL	Aknefug-Probe2 Konzentration ng/mL	Aknefug-Probe3 Konzentration ng/mL
Hautüberstand			
Deckel	2830,3	860,7	1139,3
SC 1-2	2758,3	3555,2	6771,7
SC 3-4	2555,7	3540,7	4933,6
SC 5-6	2732,6	3949,3	6696,2
SC 7-8	2532,6	2517,9	5777,9
SC 9-10	2306,5	2977	3348,9
SC 11-12	2044,1	2523,8	2450,5
SC 13-14	1791,9	2091,2	4124,2
SC 15-16	1324	1565,3	1986,9
Epidermis	24056,9	15763,1	16047,5
Dermis	41804,6	29744	31836,3
Rezeptorphase	21492,6	42032,6	49423,1
Applikation Salicylsäure	200 µg	200 µg	200 µg

Tabelle 19: Volumennormiertes Penetrationsprofil Salicylsäure, Präparat Aknefug 1%, LMD-Probe 1

Aknefug 1% LMD-Probe 1	Konzentration ng total in 50 μL Lösung	Dissektiertes Volumen in μm^3	Faktor für gleiche Volumina	Signal für gleiche Volumina
SC	4,6	9072480	11	57,2
SG-SS	11,4	8870520	11,3	214
SS-SB	2,22	14148520	7,1	21,1
Dermis	1,7	42737360	2,4	4,6

Tabelle 20: Volumennormiertes Penetrationsprofil Salicylsäure, Präparat Aknefug 1%, LMD-Probe 2

Aknefug 1% LMD-Probe 2	Konzentration total in 50 μL Lösung	Dissektiertes Volumen in μm^3	Faktor für gleiche Volumina	Signal für gleiche Volumina
SC	26	8328720	12	129,2
SG-SS	12,4	8682320	11,5	138,3
SS-SB	1,6	18678600	5,4	9,8
Dermis	2,5	44862360	2,2	6,4

Tabelle 21: Volumennormiertes Penetrationsprofil Salicylsäure, Präparat Aknefug 1%, LMD-Probe 3

Aknefug 1% LMD-Probe 3	Konzentration total in 50 μL Lösung	Dissektiertes Volumen in μm^3	Faktor für gleiche Volumina	Signal für gleiche Volumina
SC	13,8	6392980	15,6	215,3
SG-SS	3,4	7977720	12,5	42,1
SS-SB	6,1	15478360	6,5	39,5
Dermis	1,7	48974520	2	3,5

Tabelle 22: Konzentrationsprofil Salicylsäure, Präparat Mobilat 2%, FDZ

Probe FDZ	Mobilat-Probe1 Konzentration ng/mL	Mobilat-Probe2 Konzentration ng/mL	Mobilat-Probe3 Konzentration ng/mL
Hautüberstand	133093,8	186708,6	46520,5
Deckel	500,3	12311,3	3483,7
SC 1-2	36271	46517,5	38207,2
SC 3-4	35,3	21376,3	28046,4
SC 5-6	42887	16871,4	25338
SC 7-8	28759,7	28970,7	21172,4
SC 9-10	23555,9	19111,5	19957,6
SC 11-12	20841,3	22905,7	13890,4
SC 13-14	22892,5	12645,3	6205,7
SC 15-16	14089	15812,3	10203,5
Epidermis	29028,9	33249,6	16942,4
Dermis	85614,6	59277,1	28484,1
Rezeptorphase	21581,5	6607,3	3782,4
Applikation Salicylsäure	594 µg	621,4 µg	499,4 µg

Tabelle 23: Volumennormiertes Penetrationsprofil Salicylsäure, Präparat Mobilat 2%, LMD-Probe 1

Mobilat LMD-Probe1	Konzentration total in 50 µL Lösung	Dissektiertes Volumen in µm ³	Faktor für gleiche Volumina	Signal für gleiche Volumina
SC	11	8566300	11,7	127,8
SG-SS	14,7	12373460	8,1	118,8
SS-SB	5,5	24085320	4,15	23
Dermis	5,8	50712100	1,97	11,4

Tabelle 24: Volumennormiertes Penetrationsprofil Salicylsäure, Präparat Mobilat 2%, LMD-Probe 2

Mobilat LMD-Probe2	Konzentration total in 50 µL Lösung	Dissektiertes Volumen in µm ³	Faktor für gleiche Volumina	Signal für gleiche Volumina
SC	15,6	7039220	14,2	221,4
SG-SS	11,7	9080740	11	128,9
SS-SB	11,5	16987440	5,9	67,6
Dermis	3,2	53492180	1,9	5,9

Tabelle 25: Volumennormiertes Penetrationsprofil Salicylsäure, Präparat Mobilat 2%, LMD-Probe 3

Mobilat LMD-Probe3	Konzentration total in 50 µL Lösung	Dissektiertes Volumen in µm ³	Faktor für gleiche Volumina	Signal für gleiche Volumina
SC	8,4	7293400	13,7	115,3
SG-SS	9,4	11600240	8,6	80,8
SS-SB	3,9	18596340	5,4	20,9
Dermis	2,2	51709540	1,9	4,3

Tabelle 26: Konzentrationsprofil Salicylsäure, Präparat Salicylvaseline 2%, FDZ

Probe FDZ	Salicylvaseline Probe1 Konzentration ng/mL	Salicylvaseline Probe2 Konzentration ng/mL	Salicylvaseline Probe3 Konzentration ng/mL
Hautüberstand	23248	14218,2	38663,2
Deckel	615,8	1002	907,5
SC 1-2	2846,2	5124,8	6471,1
SC 3-4	1831,7	3588,5	3164,3
SC 5-6	1799,8	2582,6	4564,4
SC 7-8	2067,6	2501,1	3287,9
SC 9-10	1653,4	2233	1983,2
SC 11-12	2175,6	1527,1	1392
SC 13-14	1256	1016,5	1505,7
SC 15-16	1582,9	1157,4	1219,4
Epidermis	21498,6	13423,3	31776
Dermis	128902,3	78921	86886,7
Rezeptorphase	122032,4	129914,4	110486,9
Applikation Salicylsäure	550,4 µg	540,4 µg	603,4 µg

Tabelle 27: Volumennormiertes Penetrationsprofil Salicylsäure, Präparat Salicylvaseline 2%, LMD-Probe 1

Salicylvaseline LMD-Probe1	Konzentration total in 50 μ L Lösung	Dissektiertes Volumen in μm^3	Faktor für gleiche Volumina	Signal für gleiche Volumina
SC	9,8	6902580	14,5	141,7
Epidermis-Sc	8,6	31244740	0,2	1,9
Dermis	1,15	448630900	0,2	0,3

Tabelle 28: Volumennormiertes Penetrationsprofil Salicylsäure, Präparat Salicylvaseline 2%, LMD-Probe 2

Salicylvaseline LMD-Probe2	Konzentration total in 50 μ L Lösung	Dissektiertes Volumen in μm^3	Faktor für gleiche Volumina	Signal für gleiche Volumina
SC	8,6	9152920	10,9	93,9
Epidermis-Sc	20,2	57774680	1,7	34,9
Dermis	0,7	454769940	0,2	0,1

Tabelle 29: Volumennormiertes Penetrationsprofil Salicylsäure, Präparat Salicylvaseline 2%, LMD-Probe 3

Salicylvaseline LMD-Probe3	Konzentration total in 50 μ L Lösung	Dissektiertes Volumen in μm^3	Faktor für gleiche Volumina	Signal für gleiche Volumina
SC	13,7	293049540	15,4	210,5
Epidermis-Sc	6,1	47398040	2,1	12,8
Dermis	5,2	6488440	0,3	1,8

9.4 Verwendete Chemikalien und Geräte

9.4.1 Chemikalien

Substanz	Hersteller	R-und S-Sätze	Gefahrensymbol
Aceton	Merck	R 11-36-66-67 S 9-16-26	F,Xi
Ameisensäure	Merck	R 35 S 23.2-26-36/37/39-45	C
Ammoniumacetat	Merck		
Tertiär-Butylmethylether	Merck	R 11-66 S 16-23.2-29-33	F
Isopropanol	Merck	R 11-36-67 S 7-16-24/25-26	F,Xi
Lipidstandards:			
Monooleylglycerin	Sigma		
Dipalmitin	Sigma		
Triheptadecanoin	Sigma		
Methanol	Merck	R 11-23/24/25-39/23/24/25 S 7-16-36/37-45	F,T
Nilrot	Molecular Probes		
Salicylsäure	Merck	R 22-41 S 22-24-26-39	Xn

9.4.2 Geräte

Material	Bezeichnung	Hersteller
HPLC-Anlage	Entgaser 1100	Hewlett Packard/Agilent
	Quarternäre Pumpe 1100	
	Probengeber 1100	
	Säulenthermostat 1100	
HPLC-Säulen	Grom-Sil Octyl 3-CP, 3 µm, 60x2 mm	Grom Analytik+HPLC GmbH
	Grom-Sil Octyl 5-CP, 5 µm, 60x2 mm	
	Grom-Sil ODS 5-ST, 5 µm, 60x2 mm	
Kryotom	Leicy Kryostat CM 3050	Leica
LMD	Leica AS Laser microdissection	Leica Microsystems
Massenspektrometer	Esquire-LC	Bruker Daltonics
	MSD 1100	Agilent
	Quattro micro	Micromass/Waters
Objektträger	Leica Frame Slides, PET Membrane 1.4 µm, 50 pcs.	Leica Microdissect GmbH
Ultraschallbad	Sonorex Super 10 P Digital	Bandelin

10 Literaturverzeichnis

1. Jung, E. G., Moll, I., *Dermatologie*, ed. A. Bob and Bob, K. Vol. 5. 2003, Stuttgart: Thieme Verlag. 505.
2. Touitou, E., Meidan, V. M., Horwitz, E., *Methods for quantitative determination of drug localized in the skin*. J Controlled Release, 1998. **56**: p. 7-21.
3. Martin, R. J., Denyer, S. P., Handgraft, J., *Skin metabolism of topically applied compounds*. Int J Pharm, 1987. **39**(1-2): p. 23-32.
4. Steinträsser, I., Merkle, H. P., *Dermal metabolism of topically applied drugs: Pathways and models reconsidered*. PHARM ACTA HELV, 1995. **70**(1): p. 3-24.
5. Kerscher, M., Reuther, T., *Kosmetik und Hautpflege aus dermatologischer Sicht-neue Trends*. Aktuel Dermatol, 2003. **29**(1/2): p. 27-32.
6. Hueber, F., Wepierre, J., Schaefer, H., *Role of Transepidermal and Transfollicular Routes in Percutaneous Absorption of Hydrocortisone and Testosterone: In vivo Study in the Hairless Rat*. Skin Pharmacol, 1992. **5**: p. 99-107.
7. Heymann, E., *Haut, Haar und Kosmetik: Eine chemische Wechselwirkung-Handbuch für Körperpflegeberufe, Apotheker und Dermatologen*. Vol. 2. 2003, Bern: Verlag Hans Huber. 224.
8. Downing, D. T., Stewart, M. E., Wertz, P. W., VI, S. W. C., Strauss, J. S., *Skin Lipids*. Comp.Biochem.Physiol., Part B, 1983. **76**(4): p. 673-678.
9. Stewart, M. E., *Sebaceous Gland Lipids*. Sem Dermatol, 1992. **11**(2): p. 100-105.
10. Kellum, R. E., *Human Sebaceous Gland Lipids. Analysis by thin-layer chromatography*. Arch Dermatol, 1967. **95**(2): p. 218-220.
11. Cassidy, D. M., Lee, C. M., Laker, M. F., Kaeley, T., *Lipogenesis in isolated human sebaceous glands*. FEBS Lett, 1986. **200**(1).
12. Downing, D. T., Stewart, M. E., Wertz, P. W., IV, S. W. C., Abraham, W., Strauss, J. S., *Skin Lipids: An Update*. J Invest Dermatol, 1987. **88**(3): p. 2s-6s.
13. KEALEY, T., LEE, C., M., THODY, A. J., COAKER, T., *The isolation of human sebaceous glands and apocrine sweat glands by shearing*. Brit J Dermatol, 1986. **114**: p. 181-188.
14. Fartasch, M., *The nature of the epidermal barrier : structural aspects*. Adv Drug Delivery Rev, 1996. **18**(3): p. 273-282.
15. Elias, P., *Epidermal Lipids, barrier function, and desquamation*. J Invest Dermatol, 1983. **80**: p. 44-49.
16. Wiechers, J. W., *The barrier function of the skin in relation to percutaneous absorption of drugs*. PHARM WEEKBLAD, 1989. **11**(6): p. 185-198.

17. Lippold, B. C., *Kutane Resorption- Möglichkeiten, Modelle, Beeinflussung*. ACTA PHARM TECHNOL, 1981. **27**(1): p. 1-9.
18. Agarwal, R., Katare, O. P., Vyas, S. P., *The Pilosebaceous Unit: A Pivotal Route for Topical Drug Delivery*. Methods Find Exp Clin Pharmacol, 2000. **22**(2): p. 129-133.
19. Lademann, J., Otberg, N., Richter, H., Lindemann, U., Schäfer, H., Sterry, W., *Wie gelangen Substanzen in und durch unsere Haut? Die follikuläre Penetration als entscheidender Penetrationsweg*. Humboldt-Spektrum, 2001. **3-4**: p. 32-35.
20. Otberg, N., Richter, H., Schaefer, H., Peytavi-Blume, U., Sterry, W., Lademann, J., *Variation of Hair Follicle Size and Distribution in Different Body Sites*. J Invest Dermatol, 2004. **122**: p. 14-19.
21. Neubert, R. H. H., Schmalfuß, U., Huschka, C., Wohlrab, W. A., *Neuere Entwicklungen auf dem Gebiet der dermalen Wirkstoffapplikation*. Pharm Ind, 1988. **80**(2): p. 149-156.
22. Moss, G. P., Dearden, J. C., Patel, H., Cronin, M. T. D., *Quantitative structure-permeability relationships (QSPRs) for percutaneous absorption*. Toxicol in Vitro, 2002. **16**: p. 299-317.
23. Yamashita, F., Hashida, M., *Mechanistic and empirical modeling of skin permeation of drugs*. Adv Drug Delivery Rev, 2003. **55**(9): p. 1185-1199.
24. Pirot, F., Kalia, Y. N., Stinchcomb, A. L., Keating, G., Bunge, A., Guy, R. H., *Characterization of the permeability barrier of human skin in vivo*. Proc Natl Acad Sci USA, 1997. **94**: p. 1562-1567.
25. Stamatas, G. N., Wu, J., Kollias, N., *Non-invasive Method for Quantitative Evaluation of Exogenous Compound Deposition on Skin*. J Invest Dermatol, 2002. **118**(2): p. 295-302.
26. Simonetti, O., Hoogstraate, A., Bialik, W., Kempenaar, A., Schrijvers, A. H. G. J., Bodde, H. E., *Visualization of diffusion pathways across the stratum corneum of native and in-vitro-reconstructed epidermis by confocal laser scanning microscopy*. ARCH DERMATOL RES, 1995. **5**(287): p. 465-473.
27. van Kujik-Meuwissen, M. E. M. J., Mougín, L., Junginger, H. E., Bouwstra, J. A., *Application of vesicles to rat skin in vivo: a confocal laser scanning microscopy study*. J Controlled Release, 1998(56): p. 189-196.
28. Verma, D. D., Verma, S., Blume, G., Fahr, A., *Liposomes increase skin penetration of entrapped and non entrapped hydrophilic substances into human skin: a skin penetration and confocal laser scanning microscopy study*. Eur J Pharm Biopharm, 2003. **55**: p. 271-277.
29. Tóitou, E., Godin, B., Dayan, N., Weiss, C., Piliponsky, A., Levi-Schaffer, F., *Intracellular delivery mediated by an ethosomal carrier*. Biomaterials, 2001. **22**(22): p. 3053-3059.
30. Franz, T. J., *Percutaneous absorption on the relevance of in vitro data*. J Invest Dermatol, 1975. **64**(3): p. 190-5.

31. Wissing, S. A., R.H.Müller, *Solid lipid nanoparticles as carrier for sunscreens: in vitro release and in vivo skin penetration*. J Controlled Release, 2002(81): p. 225-233.
32. Moser, K., Kriwet, K., Naik, A., Kalia, Y. N., Guy, R. H., *Passive Skin penetration enhancement and its quantification in vitro*. Eur J Pharm Biopharm, 2001. **52**(2): p. 103-112.
33. B., F., Touitou, E., *Localization of lipophilic molecules penetrating rat skin in vivo by quantitative autoradiography*. Int J Pharm, 1990. **74**(1): p. 59-65.
34. Touitou, E., M., A., B., F., D., K., Horwitz, E., Touitou, D., *Quantitative skin autoradiography: An efficient tool in measuring drug localized in skin layers, hair follicles and glands*. Proc Int Symp Controlled Release Bioact Mater, 1994. **21**: p. 431-432.
35. Bidmon, H., Pitts, J., Solomon, H., JV, B., Stumpf, W. E., *Estradiol distribution and penetration in rat skin after topical application, studied by high resolution autoradiography*. HISTOCHEMISTRY, 1990. **95**(1): p. 43-54.
36. Hayakawa, N., Kubota, N., Imai, N., Stumpf, W. E., *Receptor microscopic autoradiography for the study of percutaneous absorption, in vivo skin penetration, and cellular-intercellular deposition*. J Pharmacol Toxicol, 2004. **50**(2): p. 131-137.
37. Burbach, G. J., Dehn, D., Turco, D. D., Deller, T., *Quantification of layer-specific gene expression in the hippocampus: effective use of laser microdissection in combination with quantitative-PCR*. J Neurosci Methods, 2003. **131**(1-2): p. 83-91.
38. Cantz, T., Jochheim, A., Cieslak, A., Hilleman, T., Scharf, J., Manns, M. P., Ott, M., *PCR-based quantification of amplified RNA from laser microdissected mouse liver samples*. Exp Mol Pathol, 2003. **75**: p. 53-57.
39. Shah, G., M.D., Middleton, F., Ph.D., Bruch, D., M.S., Kittur, D., M.D., *Gene expression profile in laser dissected endothelial cells from vascularised heart transplant subjected to ischemia/reperfusion injury*. J Surg Res, 2003. **114**(2): p. 278.
40. Nabeshima, H., Murakami, T., Yoshinaga, K., Sato, K., Terada, Y., Okamura, K., *Analysis of the clonality of ectopic glands in peritoneal endometriosis using laser microdissection*. Fertil Steril, 2003. **80**(5): p. 1144-1150.
41. De Souza, A. I., Mc Gregor, E., Dunn, M. J., Rose, M. L., *Preparation of human heart for laser microdissection and proteomics*. Proteomics, 2004. **4**(3): p. 578-586.
42. Simone, N. L., Paweletz MS, C. P., Charboneau, L., Petricoin, E. F., Liotta, L. A., *Laser capture microdissection: Beyond functional genomics to proteomics*. Mol Diagn, 2000. **5**(4): p. 301-307.
43. Michener, C. M., Ardekani, A. M., Petricoin, E. F., Liotta, L. A., Kohn, E. C., *Genomics and proteomics: application of novel technology to early detection and prevention of cancer*. Cancer Detect Prev, 2002. **26**(4): p. 249-255.

44. De Preter, K., Vandesompele, J., Heimann, P., Kockx, M. M., van Gele, M., Hoebeek, J., Smet, E. D., *Application of laser capture microdissection in genetic analysis of neuroblastoma and neuroblastoma precursor cells*. Cancer Lett, 2003. **197**(1-2): p. 53-61.
45. Becette, V., Vignaud, S., Regnier, C., Labroquere, M., Fourme, E., Menet, E., Bieche, I., Spyrtatos, F., *Gene transcript assay by real-time RT-PCR in epithelial breast cancer cells selected by laser microdissection*. Int J Biol Markers, 2004. **19**(2): p. 100-108.
46. Burnet, P. W. J., Eastwood, S. L., Harrison, P. J., *Laser-Assisted Microdissection: Methods for the Molecular Analysis of Psychiatric Disorders at a Cellular Resolution*. Biol Psychiatry, 2004. **55**(2): p. 107-111.
47. Semblet, J. P., Silvie, O., Franetich, J.-F., Hannoun, L., Eling, W., Mazier, D., *Laser capture microdissection of Plasmodium falciparum liver stages for mRNA analysis*. Mol Biochem Parasitol, 2002. **121**(2): p. 179-183.
48. Jones, M. K., Randall, L. M., McManus, D. P., Engwerda, C. R., *Laser microdissection microscopy in parasitology: microscopes meet thermocyclers*. Trends Parasitol, 2004. **20**(11): p. 502-506.
49. Hooper, L. V., *Laser microdissection: exploring host-bacterial encounters at the front lines*. Curr Opin Microbiol, 2004. **7**(3): p. 290-295.
50. Xu, B. J., Caprioli, R. M., Sanders, M. E., Jensen, R. A., *Direct analysis of laser capture microdissected cells by MALDI mass spectrometry*. J Am Soc Mass Spectrom, 2002. **13**(11): p. 1292-1297.
51. Rücker, P. D. G., Neugebauer, D. M., Willems, D. G. G., *Instrumentelle pharmazeutische Analytik*. Vol. 2., überarbeitete Auflage. 1992, Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH. 447.
52. Lehmann, W. D., *Massenspektrometrie in der Biochemie*. 1996, Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag.
53. Lottspeich, F., Zorbas, H., *Bioanalytik*. 1998, Heidelberg: Spektrum akademischer Verlag GmbH.
54. Bandu, M. L., Watkins, K. R., Bretthauer, M. L., Moore, C. A., Desaire, H., *Prediction of MS/MS Data. A Focus on Pharmaceuticals containing Carboxylic Acids*. ANAL CHEM, 2004. **76**(6): p. 1746-1753.
55. Spornitz, U. M., *Anatomie und Physiologie-Lehrbuch und Atlas für Pflege und Gesundheitsberufe*. Vol. 4. 2004: Springer Medizin Verlag Heidelberg. 498.
56. Schmook, F. P., Meingassner, J. G., Billich, A., *Comparison of human skin or epidermis models with human and animal skin in in-vitro percutaneous absorption*. Int J Pharm, 2001. **215**(1-2): p. 51-56.
57. Lin, S.-Y., Hou, S.-J., Hsu, T. H.-S., Yeh, F.-L., *Comparisons of Different Animal Skins with Human Skin in Drug Percutaneous Penetration Studies*. Methods Find Exp Clin Pharmacol, 1992. **14**(8): p. 645-654.

58. Meyer, W., *die Haut des Schweines, Vergleichende histologische und histochemische Untersuchungen an der Haut von Wildschweinen, Hausschweinen und Kleinschweinen*. 1986, Hannover: Schlütersche Verlagsanstalt und Druckerei GmbH & Co.
59. Handgraft, J., *Skin, the final frontier*. Int J Pharm, 2001. **224**(1-2): p. 1-18.
60. Lademann, J., Schaefer, H., Otberg, N., Teichmann, A., Blume-Peytavi, U., Sterry, W., *Penetration von Mikropartikeln in die menschliche Haut*. Hautarzt, 2004. **55**: p. 1117-1119.
61. Grams, Y. Y., Bouwstra, J. A., *Penetration and distribution of three lipophilic probes in vitro in human skin focusing on the hair follicle*. J Controlled Release, 2002(83): p. 253-262.
62. Genina, E. A., Bashkatov, A. N., Sinichkin, Y. P., Kochubey, V. I., Lakodina, N. A., Altshuler, G. B., Tuchin, V. V., *In vitro and in vivo study of dye diffusion into the human skin and hair follicles*. J Biomed Opt, 2002. **7**(3): p. 471-477.
63. Ramachandran, C., Fleischer, D., *Transdermal delivery of drugs for the treatment of bone diseases*. Adv Drug Delivery Rev, 2000. **42**(3): p. 197-223.
64. Barry, B. W., *Drug delivery routes in skin: a novel approach*. Adv Drug Delivery Rev, 2002. **54**(1): p. 31-40.
65. Schaefer, H., Lademann, J., *The Role of Follicular Penetration*. Skin Pharmacol Appl Skin Physiol, 2001. **14**(1): p. 23-27.
66. Tur, E., Maibach, H. I., Guy, R. H., *Percutaneous Penetration of Methyl Nicotinate at Three Anatomic Sites: Evidence for an Appendageal Contribution to Transport?* Skin Pharmacol, 1991. **4**: p. 230-234.
67. Hueber, F., Schaefer, H., Wepierre, J., *Role of Transepidermal and Transfollicular Routes in Percutaneous Absorption of Steroids: In vitro Studies on Human Skin*. Skin Pharmacol, 1994(7): p. 237-244.
68. Ogiso, T., Shiraki, T., OKAJIMA, K., TANINO, T., IWAKI, M., WADA, T., *Transfollicular Drug Delivery: Penetration of Drugs Through Human Scalp Skin and Comparison of Penetration between Scalp and Abdominal Skin In Vitro*. J Drug Targeting, 2002. **10**(5): p. 369-378.
69. Illel, B., Schaefer, H., Wepierre, J., Doucet, O., *Follicles Play an Important Role in Percutaneous Absorption*. J Pharm Sci, 1990. **80**(5): p. 424-427.
70. Bamba, F. L., Wepierre, J., *Role of the appendageal pathway in the percutaneous absorption of pyridostigmine bromide in various vehicles*. Eur J Drug Metab Pharmacokinet, 1993. **18**(4): p. 339-348.
71. Rhein, L., Chaudhuri, B., Jivani, N., Fares, H., Davis, A., *Targeted delivery of salicylic acid from acne treatment products into and through skin: Role of solution and ingredient properties and relationships to irritation*. J Cosmet Sci, 2004. **55**(1): p. 65-80.

72. Yano, T., Nakagawa, A., Tsuji, M., Noda, K., *Skin permeability of various non-steroidal anti-inflammatory drugs in man*. Life Sci, 1986. **39**(12): p. 1043-1050.
73. Dadgard, D., Climax, J., Lambe, R., Darragh, A., *High-Performance Liquid chromatographic determination Of certain salicylates and their major metabolites in plasma following topical administration of a liniment to healthy subjects*. J CHROMATOGR B, 1985(342): p. 315-321.
74. Hüther, K. J., Hiereth, H., Messer, W., *Transdermale Salicylat-Resorption nach epidermaler Applikation einer anlagetischen/antiphlogistischen Salben- und Gel-Zubereitung*. Arzneimittel Forsch, 1982. **32**(1): p. 69-72.
75. Dasch, W., Braun, E., Nowack, H., *transdermale Salicylat-Resorption und Verhalten des Corticosteroid-Plasmaspiegels nach epidermaler Applikation einer antiphlogistisch wirksamen Salbe*. Arzneimittel Forsch, 1983. **33**(8).
76. Wester, R. C., Noonan, P. K., Maibach, H. I., *Effect of salicylic acid on the percutaneous absorption of hydrocortisone. In vivo studies in the rhesus monkey*. Arch Dermatol, 1978. **114**(8): p. 1162-1164.
77. Bauer, K. H., Frömming, K.-H., Führer, C., *Pharmazeutische Technologie*. Vol. 5. 1997, Stuttgart ; Jena ; Lübeck ; Ulm ; Frankfurt: Gustav Fischer, Govi-Verlag.
78. Suhonen, T. M., Bouwstra, J. A., Urtti, A., *Chemical enhancement of percutaneous absorption in relation to stratum corneum structural alterations*. J Controlled Release, 1999. **59**: p. 149-161.
79. Mortimer, C. E., *Chemie, Das Basiswissen der Chemie*. Vol. 6. 1996, stuttgart: Georg Thieme Verlag. 744.
80. Leveque, N., Makki, S., Hadgraft, J., Humbert, P., *Comparison of Franz cells and microdialysis for assesing salicylic acid penetration through human skin*. Int J Pharm, 2004. **269**(2): p. 323-328.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Tayyeb, Hamed
Geburtsdatum	26.05.1976
Geburtsort	Tehran/Iran
Familienstand	verheiratet, 1 Kind
Staatsangehörigkeit	Deutsch

Schulbildung

1986	Besuch der 4. Klasse der Grundschule in Tehran/Iran
1987	Besuch der 4. Klasse der Grundschule Bindfeldweg in Hamburg
1988-1996	Besuch des Gymnasiums Bondenwald in Hamburg
Juni 1996	Allgemeine Hochschulreife

Studium

1996-2000	Studium der Pharmazie an der Universität Hamburg
März 1999	Erstes Staatsexamen
Oktober 2000	Zweites Staatsexamen
November 2000-April 2001	Erste Hälfte des praktischen Jahres nach § 4 AAppO, Friedrichsberg Apotheke, Hamburg
Mai 2001-Oktober 2001	Zweite Hälfte des praktischen Jahres nach § 4 AAppO, Abteilung für Analytische Entwicklung der Lilly Forschung GmbH in Hamburg
Januar 2002	Drittes Staatsexamen
Januar 2002	Approbation zum Apotheker

Promotion

Juli 2002-Mai 2005	Universität Hamburg, Fachbereich Chemie, Institut für Pharmazie, Arbeitskreis Prof. H.-J. Duchstein, in Kooperation mit der Beiersdorf AG in Hamburg
--------------------	---
