



universität
wien

DIPLOMARBEIT

Titel der Diplomarbeit

Einfluss verschiedener Lysine auf die Hautpermeation von Natrium-
Fluorescein

angestrebter akademischer Grad

Magistra der Pharmazie (Mag.pharm.)

Verfasserin / Verfasser:	Birgit Herbsthofer
Matrikel-Nummer:	0204241
Studienrichtung (lt. Studienblatt):	A 449 Pharmazie
Betreuerin / Betreuer:	Ao. Univ.- Prof. Mag. pharm. Dr. Claudia Valenta
Wien, am 08. 08. 2008	

Danksagung

Ich möchte mich beim Department für Pharmazeutische Technologie und Biopharmazie für das Ermöglichen meiner Arbeit bedanken.

Mein besonderer Dank gilt Frau Ao. Univ.- Prof. Mag. pharm. Dr. Claudia Valenta für die hervorragende Betreuung, Hilfsbereitschaft und das angenehme Arbeitsklima während meiner Diplomarbeit.

Herrn Ao. Univ.- Prof. Mag. pharm. Dr. Martin Kratzel möchte ich für die Synthesen der Oligo-Lysine meinen Dank aussprechen.

Weiters möchte ich mich noch bei Mag. pharm. Sonja Höller und Mag. pharm. Amra Hasanovic für die nette Unterstützung und Hilfsbereitschaft während des praktischen Teils meiner Diplomarbeit bedanken.

Besonderer Dank gilt auch meinem Freund Clemens für seine kompetente Unterstützung bei EDV-Problemen, was viel zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat.

Ich danke meinen Eltern für die Ermöglichung meines Studiums.

Inhaltsverzeichnis

1	Abkürzungsverzeichnis	1
2	Einleitung	3
3	Die Haut	5
3.1	Aufbau der Haut.....	5
3.2	Permeation durch die Haut	7
3.3	Penetrationsenhancer	9
4	Additiva	15
4.1	Oligo-Lysine	15
4.2	Natriumlaurylsulfat (SDS)	18
4.3	Chitosan-glykolsäure	20
5	Diffusionsversuche	25
5.1	Präparation der Schweinehaut.....	25
5.2	Freisetzungsmodell.....	25
5.3	Versuchsanordnung.....	26
6	Analytik	31
6.1	Na-Fluorescein	31
6.2	Prinzip der Fluorimetrie und Aufbau eines Fluorimeters	32
6.3	Erstellung der Eichgerade.....	35
7	Differential Scanning Calorimetry (DSC).....	37
7.1	Prinzip der DSC	37
7.2	Probenvorbereitung	38
8	Ergebnisse	39
8.1	Species 1	39
8.2	Species 2	46
8.3	Species 3	49
8.4	Differential Scanning Calorimetry (DSC).....	51
9	Diskussion der Ergebnisse.....	55
10	Zusammenfassung	59
11	Literaturverzeichnis	61

12	Anhang	67
12.1	Tabellen der Diffusionsstudien	67
	Lebenslauf	93
	Posterpräsentation	95

1 Abkürzungsverzeichnis

Aqua dest.	Destilliertes Wasser
CPPs	Cell Penetrating Peptides
CTAB	Cetyltrimethylammoniumbromid
DCMS	Decylmethylsulfoxid
DDAA	Dodecyl N, N-dimethylaminoacetat
DDAIP	Dodecyl-2-methyl-2-(N, N-dimethylaminoacetat)
DMA	Dimethylacetamid
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DSC	Differential Scanning Calorimetry
EtOH	Ethanol
H ₃ PO ₄	Phosphorsäure
HIV	Humaner Immundefizienz Virus
HSV	Herpes Simplex Virus
Lys-3	Tripeptid von Lysin
Lys-5	Pentapeptid von Lysin
Lys-7	Heptapeptid von Lysin
n. d.	nicht detektierbar
Na-Fluorescein	Natrium-Fluorescein
NaOH	Natriumhydroxid
PG	Propylenglykol
SDS	Natriumlaurylsulfat
STABW	Standardabweichung
TAT	Trans-Activator of Transcription

2 Einleitung

Das Stratum corneum stellt die Hauptpermeabilitätsbarriere für Wirkstoffe durch die Haut dar. Deshalb wird der Entwicklung von Substanzen, die die Hautpermeation fördern, große Bedeutung zugeschrieben.

In letzter Zeit beschäftigt sich die Forschung zunehmend mit zellpenetrierenden Peptiden, sogenannten „Cell Penetrating Peptides“ (CPPs) [1, 2]. Es handelt sich um kationische oder amphiphile Peptide, die aus höchstens dreißig Aminosäuren bestehen. Sie haben die Fähigkeit, konjugierte Proteine oder Oligonukleotide beschleunigt durch zelluläre Membranen zu transportieren. Auffällig ist, dass alle bisher beschriebenen CPPs hohe Anteile der kationischen Aminosäuren Arginin oder Lysin aufweisen. Für die vorliegende Arbeit waren diese kationisch geladenen CPPs interessant, da die Haut durch ihre Proteinzusammensetzung schwach negativ geladen ist [3]. Da die Diffusion durch die Haut eine passive ist, ist auch die Molekülgröße wesentlich. Es gibt eine Untersuchung über CPPs und Hautpermeation [4]. In dieser Studie wurde versucht, verschiedene zellpenetrierende Peptide wie z.B. „HIV transcription factor TAT“, der aus ca. 86 bis 101 Aminosäuren besteht, in die präparierte Schweinehaut zu schleusen. Dabei sollte mittels Fluoreszenzmikroskopie die Konzentration der Peptide in den verschiedenen Hautschichten nachgewiesen werden. Es zeigte sich, dass nur eine geringe Menge in die Haut penetrierte, allerdings eine transdermale Penetration fast gar nicht stattfand. Daher stellte sich die Frage, ob Bruchstücke solcher Peptide wie z.B. Oligopeptide aus Lysin einen nennenswerteren Einfluß auf die Hautpermeation ausüben könnten.

Es sollte daher in der vorliegenden Arbeit untersucht werden, ob kleine definierte Peptide basierend auf Lysin einen positiven Einfluß auf die Hautpermeation des Modellstoffes Na-Fluorescein haben. Dazu wurden das Tripeptid Lys-3, das Pentapeptid Lys-5 und das Heptapeptid Lys-7 getestet.

Da in einer kürzlich veröffentlichten Arbeit darüber hinaus herausgefunden wurde, dass Natriumlaurylsulfat (SDS), ein anionogenes Tensid, in Kombination mit einem Polypeptid eine synergistische Wirkung ausübte, war eine weitere Fragestellung, ob eine etwaige penetrationsfördernde Wirkung auch in Kombination mit Oligo-Lysinen verstärkt werden würde [5].

Darüber hinaus sollte das am besten wirksame Oligo-Lysin noch in Chitosan-glykolsäure als Vehikel getestet werden und schließlich sollte eine mögliche Hautinteraktion der Oligo-Lysine mittels Haut-DSC-Studien noch zusätzlich bewiesen werden. Zunächst werden die allgemeinen Aspekte der Haut beleuchtet.

3 Die Haut

3.1 Aufbau der Haut

Die Haut ist die Außengrenze zwischen Umwelt und Organismus. Bei einem Erwachsenen beträgt ihre Ausdehnung etwa 1,5 bis 2 m² und besitzt mit einem Anteil von ca. 7 bis 10% seines Körpergewichtes eine entscheidende Abwehr- und Schutzfunktion [6].

Wie in Abb. 3.1 ersichtlich ist der Aufbau der Haut nach außen durch die Epidermis begrenzt mit der Hornschicht als oberster Schicht (Stratum corneum). Darunter befindet sich die Dermis (Lederhaut) gefolgt von der Subcutis (Unterhaut). Hautanhangsgebilde (Adnexen) wie Schweißdrüsen, Talgdrüsen, Haare und Nägel sind in die Haut eingelagert [6].

Die Hautoberfläche des Menschen ist mit einem Hydrolipidfilm bedeckt, der aus Fettsäuren, Triglyzeriden, Wachsen, Aminosäuren und anderen Komponenten besteht. Er hat antimikrobielle Wirkung [7].

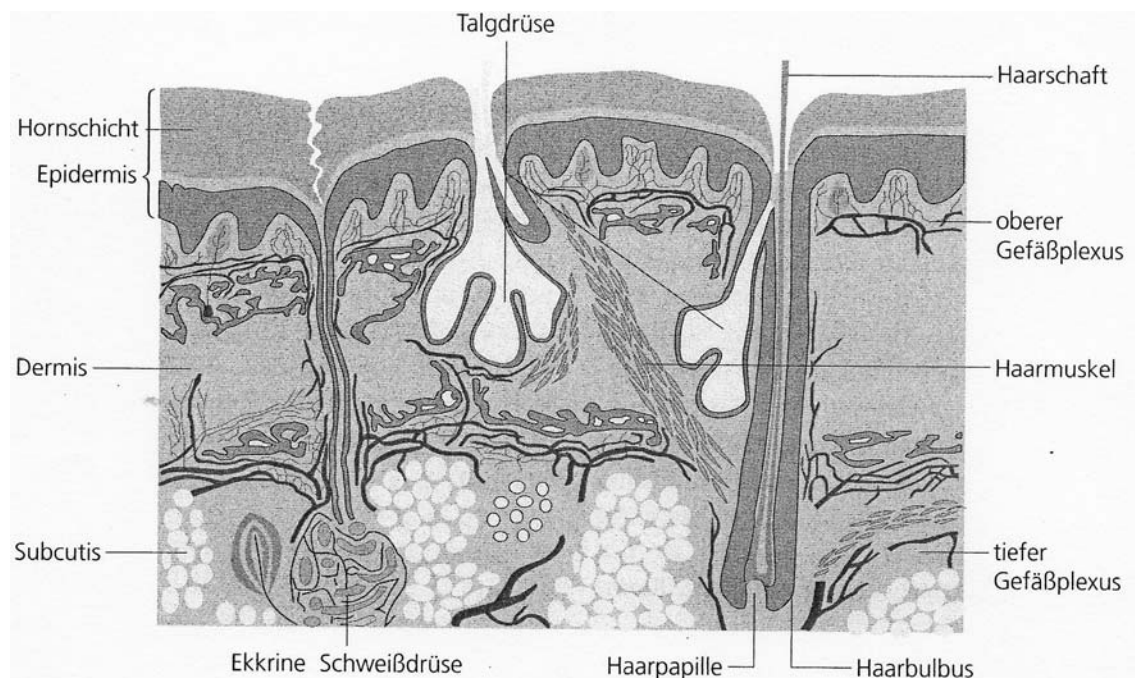


Abb. 3.1 Aufbau der humanen Haut [6]

Epidermis

Abb. 3.2 zeigt die Epidermis als mehrschichtiges, verhornendes Plattenepithel, das sich von außen nach innen in mehrere Schichten einteilen lässt:

- Stratum corneum (Hornschicht)
- Stratum granulosum (Körnerschicht)
- Stratum spinosum (Stachelzellschicht)
- Stratum basale (Basalzellschicht) [6]

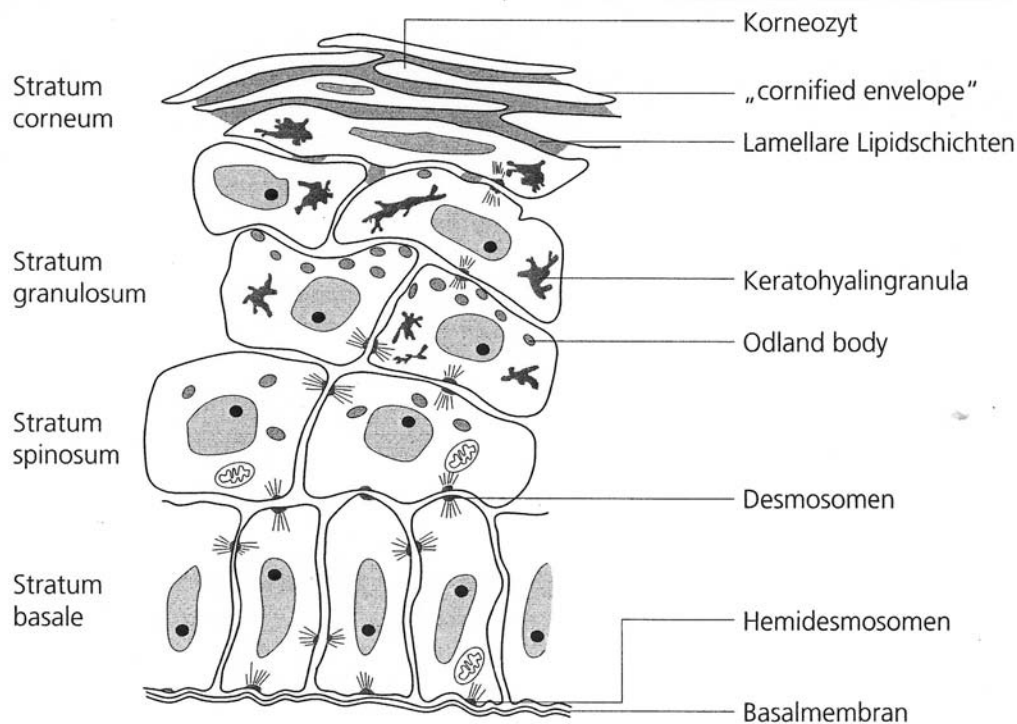


Abb. 3.2 Schematischer Aufbau der Epidermis [6]

Die tiefstgelegene Schicht, das Stratum basale, ist mit der Basalmembran durch Hemidesmosomen verbunden und besteht aus zylindrischen Zellen. Im Stratum basale finden Zellteilungen statt. Eine Tochterzelle wird als Stachelzelle an das Stratum spinosum abgegeben, die andere bleibt im Stratum basale zurück. Das Stratum spinosum besteht aus 2 bis 5 Zellschichten. Darin erfolgt eine Volumenvergrößerung der Keratinozyten sowie eine zunehmende Abflachung der Zellen. Das von Keratohyalin granula gekennzeichnete Stratum granulosum besteht aus 2 bis 3 Zellschichten. Die Keratohyalin granula sind Vorstufen des Keratins der Korneozyten der Hornschicht. Der Umbau von kernhaltigen zu kernlosen Keratinozyten findet beim Übergang vom Stratum granulosum zum Stratum corneum statt. Ein vollständiges Durchwandern aller

Zellschichten bis hin zur Abstoßung durch die Hornschicht dauert ca. 28 bis 30 Tage [6].

Die äußerste Schicht, das Stratum corneum, stellt das Barriere- und Speichersystem der Haut dar und ist im Wesentlichen aus zwei Kompartimenten aufgebaut:

- 10 bis 20 Zellschichten voll keratinisierter, abgeplatteter, kernloser Korneozyten, die an der Oberfläche ständig in Form kleiner Schuppen abschilfern
- lamellare Lipidschichten [6, 8]

Andere epidermale Zellsysteme sind Melanin-produzierende Melanozyten, Antigen-präsentierende Langerhans-Zellen und Merkel-Zellen [8].

Dermis (Lederhaut):

Die Dermis besteht hauptsächlich aus Kollagen und Elastin. Sie sorgt für die Elastizität und mechanische Stabilität der Haut.

Weiters befinden sich darin auch zahlreiche Gefäße und Nervenfasern, die für die Ernährung der Haut und deren Berührungsempfindlichkeit zuständig sind [7].

Subcutis (Unterhaut):

Die Subcutis besteht aus lockerem Bindegewebe und Fettzellen und dient vor allem als Nährstoff- und Wasserspeicher. Sie schützt auch vor Wärme und mechanischem Einfluss [6,7].

3.2 Permeation durch die Haut

Das Stratum corneum stellt die Barriere der Haut dar. Verantwortlich dafür sind die interzellulären Lipide. Das Zweikompartimentmodell besagt ja, dass die Korneozyten ziegelsteinähnlich geschichtet und in einen Lipidmörtel eingebettet sind. Dieser Lipidmörtel setzt sich aus Ceramiden (ca. 40 %), freien Fettsäuren (ca. 25 %), Cholesterol (ca. 25 %), Anteilen von Cholesteryl-sulfat (ca. 6 %) und Triglyzeriden zusammen. Phospholipide sind keine vorhanden, dadurch lässt

sich eine Unterscheidung von anderen Biomembranen, die ja vor allem aus Phospholipiden aufgebaut sind, vornehmen [6].

Schließlich erschwert aber auch der geringe Wassergehalt im Stratum corneum die Hautpermeation [9]. Dem kann durch okklusive Bedingungen (z.B. Pflaster, Transdermale therapeutische Systeme, Vasline) entgegengewirkt werden. Der transepidermale Wasserverlust wird behindert und es kommt zu einem Wasserstau in der Hornschicht. Die nun aufgequollenen Strukturen in der Hornschicht erleichtern das Eindringen von Substanzen [6].

Penetrationswege

- transepidermal (intrazellulär oder transzellulär)
- durch Poren (transglandulär oder transfollikulär)

Der Porentransport ist allerdings zu vernachlässigen, da der Anteil der Porenfläche an der Gesamtfläche der Haut nur etwa 0,1 bis 1% beträgt.

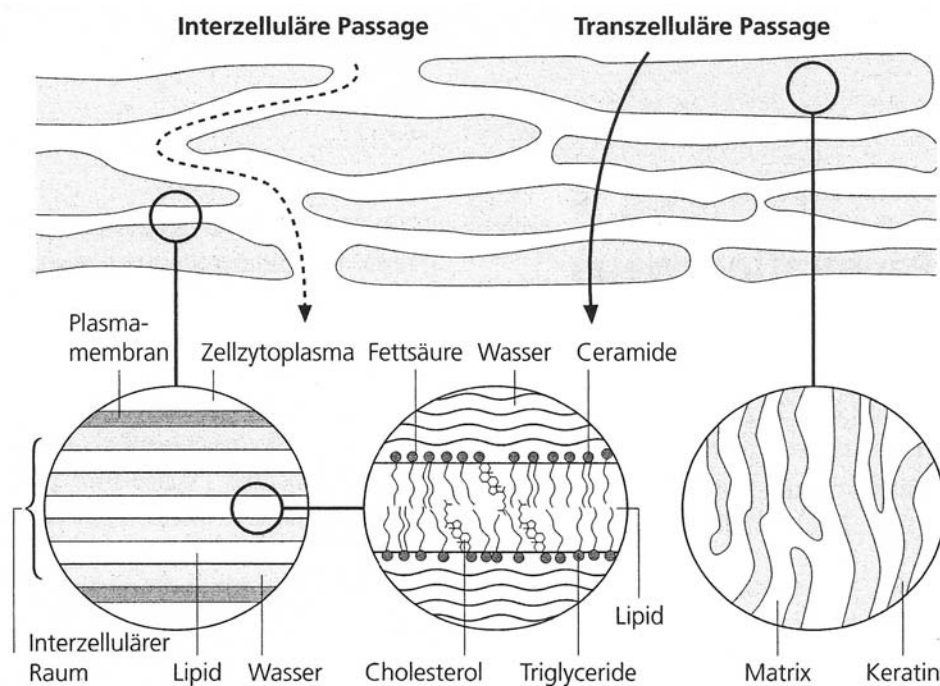


Abb. 3.3 Transportwege durch das Stratum corneum [6]

Abb. 3.3 zeigt die beiden bevorzugten Penetrationswege, nämlich die interzelluläre und die transzelluläre Route. Der interzelluläre Weg ist eher für lipophile Stoffe bestimmt, wobei mit steigender Polarität der transzelluläre Weg

überwiegt [9]. Sehr gute Voraussetzungen für die Penetration in das Stratum corneum sind gegeben, wenn der Wirkstoff lipophil ist und eine gewisse Wasserlöslichkeit besitzt [7].

Fick'sches Diffusionsgesetz

Der Wirkstofftransport durch die Haut wird durch das Fick'sche Diffusionsgesetz beschrieben. Die Diffusionsgeschwindigkeit steht in Abhängigkeit von der Kontaktfläche und dem Konzentrationsgradienten.

$$\frac{dm}{dt} = -D \cdot F \cdot \frac{dC}{dx}$$

$\frac{dm}{dt}$ Massestrom pro Zeiteinheit

D Diffusionskoeffizient

F Querschnittsfläche (Kontaktfläche)

$\frac{dC}{dx}$ Konzentrationsdifferenz pro Wegstrecke (Konzentrationsgradient) [9]

3.3 Penetrationsenhancer

Stoffe, die in der Lage sind, den Widerstand der Hornschicht gegenüber der Passage von Arzneistoffen herabzusetzen und deren Hautpermeation zu erleichtern werden als Penetrationsenhancer oder Penetrationsbeschleuniger bezeichnet [7].

Penetrationsfördernde Substanzen müssen pharmakologisch inert sein und dürfen kein irritatives oder allergenes Potential besitzen. Eine vollständige Regenerierung der Barrierefunktion der Haut nach Absetzen der Substanz sollte gewährleistet sein [9].

Die Lipide der Haut liegen in einem starren, gelartigen Zustand vor, der durch Penetrationsenhancer verändert werden kann. Es kommt zu Wechselwirkungen der Enhancer mit den Lipidstrukturen der Haut. Dies führt dann zu einer Störung der molekularen Organisation der Lipide und schließlich zu einer Packungsumordnung der Lipidkörper. Anstelle der echtkristallinen bilden sich

flüssigkristalline oder sogar amorphe Zustände aus. Eine Abnahme der Rigidität ist die Folge. Zusätzlich spielen auch Hydratation und die Änderung des Verteilungsverhaltens des Wirkstoffes zwischen lipophiler und wässriger Phase eine große Rolle [6,9].

Nun wird ein Überblick über die verschiedenen chemischen Penetrationenhancer gegeben.

Sulfoxide

Dimethylsulfoxid (DMSO) ist ein dipolar aprotisches Lösungsmittel, stark hygroskopisch und mit Wasser in jedem Verhältnis mischbar. Es fungiert ausschließlich als Protonenakzeptor. Mit Wasser kann DMSO um Wasserdonatoren konkurrieren. DMSO fördert die Penetration von ionischen und nichtionischen Molekülen mit einer Molmasse <3000. Es wird in Konzentrationen bis 60% eingesetzt.

DMSO wirkt als Penetrationenhancer dadurch, dass es seine Fähigkeit als Protonenakzeptor nutzt. Es verdrängt Wasser von den polaren Kopfgruppen der interzellulären Lipide und es entstehen solvatisierte Kanäle zwischen den Bilayerschichten. Eine Verringerung der Packungsdichte der Lipidmoleküle und somit eine erhöhte Fluidität sind die Folge. Als Nebeneffekt treten anfängliche Hautirritationen sowie der durch den Metaboliten Dimethylsulfid verursachte knoblauchähnliche Mundgeruch und Geschmack auf.

Ein weiteres penetrationsförderndes Sulfoxid ist Decylmethylsulfoxid (DCMS). Die optimale Kettenlänge beträgt C₁₀. DCMS wirkt bereits ab Konzentrationen von 0,1%. Die Penetration polarer Wirkstoffe wird durch DCMS mehr gefördert als die von unpolaren Wirkstoffen. DCMS ändert die Konformation und öffnet auf diese Weise Kanäle [6, 11, 12].

Alkohole

Alkohole extrahieren Lipide und Proteine, dies führt zu einer erhöhten Porosität des Stratum corneum und die Passage hydrophiler Substanzen wird erleichtert, wobei die Löslichkeit des Arzneistoffes aber mit steigendem Alkoholgehalt abnimmt. Die Penetrationssteigerung hängt auch von der Kettenlänge des Alkohols ab. In Studien mit Indomethacin wurde eine Verbesserung der

Penetration bis zu einer Kettenlänge des Alkohols von C₆ beobachtet, längerkettige Alkohole mindern die Penetrationsgeschwindigkeit wieder [6, 12].

Polyole

Zum einen hat Propylenglykol (PG) Lösungsmittelfunktion für den Wirkstoff, zum anderen geht aus thermodynamischen Untersuchungen hervor, dass PG Solvationseffekte auf die Keratine ausübt, indem es dort vorhandene Wasserstoffbindungsstellen besetzt. Die Lipidstrukturen der Hornschicht werden jedoch nicht angegriffen. Deswegen wird PG auch oft mit einem Penetrationsvermittler wie Azone[®] oder Ölsäure kombiniert, der diese Lipidstrukturen angreift [12].

Alkane

In Studien wurden C₇ bis C₁₆ Alkane verwendet und die Penetration untersucht. Ergebnisse besagen, dass sie die Barriereigenschaften der Haut verändern, ohne sie zu zerstören [11].

Langkettige Fettsäuren

Die optimale Wirkung im gesättigten Zustand liegt bei einer Kettenlänge zwischen C₉ und C₁₂. Die penetrationssteigernde Wirkung der Fettsäuren hängt auch von der Lage, Anzahl und vom Typ (cis/trans-Isomerie) der Doppelbindungen ab. Ungesättigte Fettsäuren besitzen eine bessere Wirkung als gesättigte Fettsäuren und cis-Isomere sind wirksamer als trans-Isomere. Die Wirkung der Fettsäuren beruht auf einer Zerstörung der interzellulären Lipidbilayer. In unzähligen Studien wurde Ölsäure [13] als penetrationsfördernd identifiziert [11, 12].

Ester

Beispiel für einen penetrationsfördernden Ester ist Ethylacetat, das polare, wasserstoffbindende und wasserlösliche Eigenschaften besitzt. Der Wirkungsmechanismus ist dem des DMSO ähnlich. Es wird eine Solvationshülle um die polaren Kopfgruppen des Lipids gebildet. Dies hat eine Störung der Packungsordnung der Lipide zufolge, die Fluidität und somit die

Penetration werden gesteigert. Es wurde Methylpropionat und Butylacetat als Penetrationsförderer eingesetzt [11].

Amine und Amide

- Harnstoff

Harnstoff findet in der Dermatologie schon lange Anwendung als hydratisierendes Mittel bei Neurodermitis, Psoriasis und Hyperkeratosen. Aufgrund keratolytischer Eigenschaften wird Harnstoff auch als Penetrationsenhancer eingesetzt. Die Wirkung erfolgt durch eine Wechselwirkung mit den Keratinozyten. Wasserstoffbrücken werden gespalten und somit der Wasserhaushalt geändert. Dies führt zu einer erhöhten Durchlässigkeit der Hornschicht. Es wurden auch zyklische Harnstoffderivate eingesetzt, die durch die Enzyme der Haut metabolisiert werden und somit eine verminderte Toxizität besitzen [6].

- Dimethylacetamid (DMA) und Dimethylformamid (DMF)

In geringen Konzentrationen greifen DMA und DMF die Keratinregionen an, in hohen Konzentrationen jedoch werden die Lipiddomänen zum Ziel, wobei sie eine Solvatationshülle um die polaren Kopfgruppen der Lipide bilden und somit den Lipidordnungszustand ändern und die Fluidität erhöhen [11].

- Pyrrolidone

Pyrrolidone sind apolare, diprotische Verbindungen, z.B. 2-Pyrrolidon und N-Methylpyrrolidon. In niedrigen Konzentrationen werden zunächst die Keratinstrukturen angegriffen, in höheren Konzentrationen wird der Lipidaufbau verändert. N-(2-Hydroxyethyl)-2-pyrrolidon und dessen Fettsäureester zeigen eine sehr variable Lipophilie durch Einfügen von unterschiedlichen funktionellen Gruppen. Die Lipophilie kann durch Verlängerung der Alkylseitenkette erhöht werden, durch Einführung von Carboxylgruppen kommt es zu einer Verringerung der unpolaren Natur der Substanz. Die Penetrationseigenschaften sind stark vehikelabhängig [6, 12].

- Azone[®]

1-Dodecylazacycloheptan-2-on (Laurocapram, Azone[®]) ist eine Verbindung, die sowohl aus Elementen von Pyrrolidon als auch aus DCMS besteht. Ein großer Vorteil besteht in der möglichen Anwendung sehr niedriger Konzentrationen (1 bis 5%). Azone[®] ist ein guter Penetrationsenhancer für lipophile und auch für hydrophile Substanzen. Der Effekt lässt sich durch Zugabe eines Kosolvens wie z.B. Propylenglykol steigern. Der Wirkmechanismus dieser Kombination lässt sich so erklären, dass Azone[®] durch Wirkung auf die Lipiddoppelschichten den interzellulären Penetrationsweg beeinflusst und das polare PG die transzelluläre Route verbessert, indem es mit den intrazellulären Proteinen interagiert. DSC Untersuchungen zeigen eine Minderung der charakteristischen Phasenübergangstemperatur in den Modelllipiden. Den besten Effekt zeigen Aza-Cycloalkanone mit einer Kettenlänge von C₁₂, die Ringgröße hingegen ist weniger ausschlaggebend. Studien ergaben, dass trans-Doppelbindungen weniger Hautirritationen verursachen [6, 11, 12].

Terpene

Mono- und Sesquiterpene besitzen eine erhöhte Penetration von verschiedenen Arzneistoffen. DSC Studien weisen auf eine Zerstörung der interzellulären Lipidbarriere hin [11].

Oberflächenaktive Substanzen

Im Allgemeinen wirken kationische Tenside stärker als anionische. Diese wiederum wirken destruktiver auf die Haut als nichtionische. Als Beispiele für oberflächenaktive Substanzen sind Cetyltrimethylammoniumbromid (CTAB, kationisch) und Natriumlaurylsulfat (SDS, anionisch) anzuführen. Sie entfernen den Schutzfilm der Hautoberfläche und ändern somit die Barriereigenschaften der Haut [11].

Biologisch abbaubare Penetrationsenhancer

Ziel der Entwicklung biologisch abbaubarer Penetrationsenhancer ist die reduzierte lokale und systemische Toxizität. Ein Vertreter ist Dodecyl N, N-dimethylaminoacetat (DDAA). Mit wachsender Kettenlänge des

N, N Dialkylrestes nimmt die Aktivität dieser Substanzklasse ab.

Dodecyl-2-methyl-2-(N, N-dimethylaminoacetat) (DDAIP) entsteht durch Substitution eines Wasserstoffatoms der Acetateinheit des DDAA durch eine Methylgruppe. Studien ergaben, dass DDAIP eine bessere Wirkung aufweist als DDAA [6, 11].

Cyclodextrine

Cyclodextrine sind biologisch gut verträgliche Substanzen. Je nach Anzahl der Glucoseeinheiten unterscheidet man α , β , γ Cyclodextrine. Es wird diskutiert, ob lipophile Stoffe in den durch den Ring gebildeten Hohlraum eingebaut werden können und die Löslichkeit dieser Stoffe erhöhen können [11].

Physikalische Methoden

Neben den chemischen Penetrationsförderern sind auch noch die physikalischen Methoden zu erwähnen. Mittels Iontophorese werden ionogene Arzneimittel mithilfe elektrischen Stromes in die Haut eingebracht. Diese Methode ist vor allem für Lokalanästhetika wie Lidocain oder für Proteine und Peptide geeignet. Die Wirkstofffreisetzung erfolgt aus einem kathodischen bzw. anodischen Reservoirsystem. Dadurch wird eine kontinuierliche Freigabe erzielt.

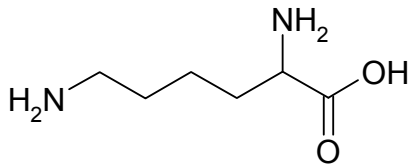
Ein weiteres Verfahren ist die Phonophorese. Dabei werden mittels Ultraschall Wirkstoffe in die Haut eingebracht. Als Überträger der Ultraschallwellen werden Gelformulierungen und Propylenglycol/Wasser- Mischungen verwendet. Der genaue Wirkmechanismus ist noch unklar. Es wird aber angenommen, dass die Energie der Ultraschallwellen in der Haut zu einer thermischen und mechanischen Beanspruchung führt, die zu Veränderungen in der Hornschicht beiträgt und so die Aufnahme des Wirkstoffes fördert [6, 11].

Im folgenden Kapitel werden die Stoffe, die in der vorliegenden Arbeit Verwendung fanden, beschrieben.

4 Additiva

4.1 Oligo-Lysine

L-Lysin



Summenformel

C₆H₁₄N₂O₂

Relative Molekülmasse

146,2 g/mol

Synonyme

L-Lys, (S)-α, ε-Diaminocapronsäure, (S)-2, 6-Diaminohexansäure

Schmelzpunkt

224 C°

Säure/Basen Eigenschaften

pK₁ (α -COOH) = 2,16

pK₂ (α -NH₃⁺) = 9,18

pK₃ (Seitenkette) = 10,79

Löslichkeit

wasser- und alkohollöslich

Kontraindikation

Acidose, Leberinsuffizienz

Definition und Eigenschaften

Lysin ist eine essentielle basische Aminosäure und muss daher mit der Nahrung aufgenommen werden. Sie ist bei neutralem pH Wert ionisiert und somit positiv geladen. Sie kommt in Form von farblosen Nadeln (in Wasser) oder in Form von hexagonalen Plättchen (in EtOH verdünnt) vor. Lysin ist in Getreideproteinen und in anderen pflanzlichen Nahrungsmitteln nur in begrenzter Menge vorhanden. Tierische Proteine hingegen enthalten viel Lysin

(Milch, Eier, Fisch und Fleisch). Hitzebehandelte Lebensmittel enthalten fast kein Lysin, da es Maillard-Reaktionen mit Zuckern oder Isopeptid-Bindungen eingeht [10, 14, 15, 16, 17, 18, 19].

Anwendung findet Lysin vor allem als Nahrungsmittelzusatz bei proteinarmer Ernährung und in medizinischen Infusionslösungen. Es wird auch gegen Herpes Simplex Infektionen benutzt. Herpes Viren benötigen zum Wachstum oder für die Replikation Arginin. Lysin konkurriert mit Arginin um eine bessere Absorption und den Eintritt in die Gewebezellen. Lysin schaltet somit Arginin aus und hemmt das Wachstum der Herpes Viren [20].

Da Lysin die Resorption von Calcium erhöht und die renale Ausscheidung vermindert, fördert es das Knochenwachstum und kann zur Prophylaxe oder möglichen Therapie der Osteoporose eingesetzt werden [16].

Eine weitere Anwendung findet Lysin bei der metabolischen Alkalose und als Antifibrinolytikum. Antifibrinolytika verhindern die Spaltung von Peptidbindungen, an denen Lysin beteiligt ist. Dadurch wird die Proteolyse von Plasminogen zu Plasmin gehemmt [21].

Als Baustein von Kollagen ist Lysin ein wichtiger Bestandteil der Gefäßwände und könnte möglicherweise auch bei Herzgefäßerkrankungen eingesetzt werden.

Lysin ist auch oft im aktiven Zentrum von Enzymen anzutreffen, wo es Co-Faktoren und Substrate kovalent bindet [18].

Abgebaut wird Lysin in der Leber über Pipecolinsäure zu Acetoacetyl-CoA und dann zu Acetyl-CoA. Bei Fäulnis geht es in Cadaverin über [10, 14].

Lysinintoleranz

Mangel an L-Lysin-Dehydrogenase

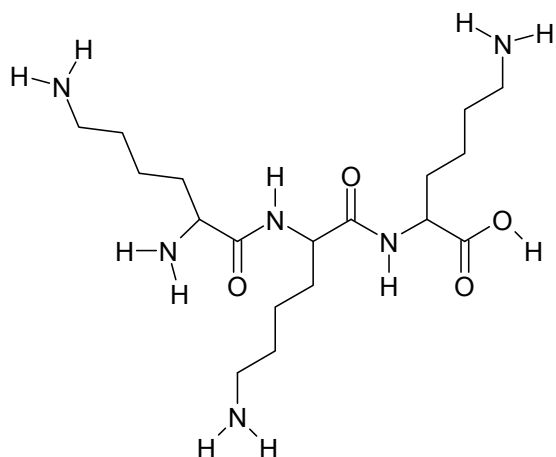
Hyperlysinämie

Mangel an Lysin-Oxoglutarat-Reduktase [16]

Bei der vorliegenden Arbeit wurden die durch Festphasensynthese hergestellten Oligo-Lysine Lys-3, Lys-5 und Lys-7 verwendet.

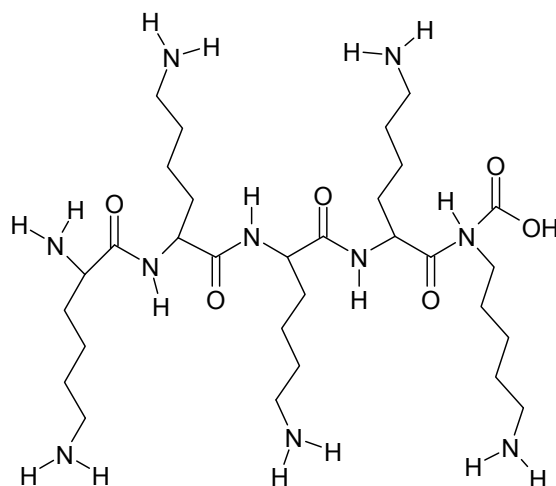
Lys-3

relative Molekülmasse: 402 g/mol



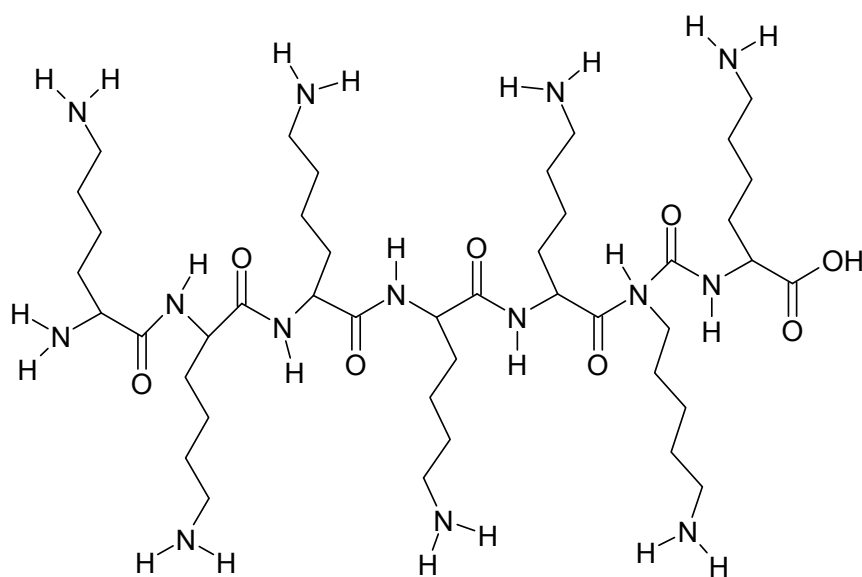
Lys-5

relative Molekülmasse: 658 g/mol



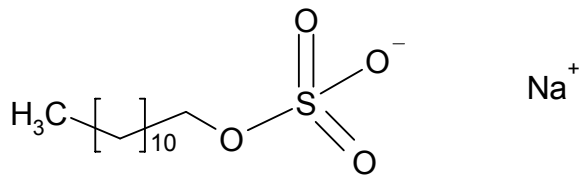
Lys-7

relative Molekülmasse: 914 g/mol

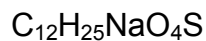


4.2 Natriumlaurylsulfat (SDS)

Struktur



Summenformel



Relative Molekülmasse

288,4 g/mol

Synonyme

Natrii laurilsulfas Ph.Eur., Natriumdodecylsulfat, Natrium laurylsulfuricum

Schmelzpunkt

204 – 207 C°

Löslichkeit

leicht löslich in Wasser unter Bildung einer opaleszierenden Lösung, teilweise löslich in Ethanol

Inkompatibilitäten

mit einigen Alkaloidsalzen, mit quaternären Ammoniumsalzen, mit Blei- und Kaliumsalzen kommt es zur Fällung

Definition und Eigenschaften

Natriumlaurylsulfat ist ein Gemisch von Natriumalkylsulfaten, das hauptsächlich aus Natriumdodecylsulfat besteht. Es enthält mindestens 85% Natriumalkylsulfate und kommt in Form von weißen bis gelblichen Kristallen oder Pulvern vor [10, 22, 23].

Natriumlaurylsulfat gehört zur Gruppe der anionischen Tenside. Es ist ein Schwefelsäureester, der durch Umsetzung von höheren Fettalkoholen mit Schwefelsäure entsteht.

Die Länge der hydrophoben Alkylkette beeinflusst die Permeationsraten durch die Haut. Tenside mit 10 oder 12 unverzweigt angeordneten C-Atomen zeigen den höchsten Einfluß auf die Hautpermeation.

Die Wirkung dieser Tenside auf die Hautoberfläche hat eine Entfernung des Schutzfilmes der Haut zur Folge. Weiters werden Lipide aus der Hornhaut gelöst. Dies führt zu einer erhöhten Durchlässigkeit der Hornhaut für andere Stoffe. Da die anionischen Tenside ein Anschwellen der Hornschicht induzieren, werden Hydratationseffekte vermutet, die auch an der penetrationssteigernden Wirkung beteiligt sind [7, 12, 24].

Anwendung

Natriumlaurylsulfat wird als Emulgator in Salben und Cremes und als Netzmittel in festen Arzneiformen verwendet [10, 9].

In Zahnpasten wird es zur Schaumentwicklung eingesetzt, wobei nur Konzentrationen bis 1% erlaubt sind, da höhere Tensidkonzentrationen die Rückbildung des Zahnfleisches (Parodontose) fördern [24].

In Studien wird auch auf einen Zusammenhang mit der Entstehung von Aphten im Mund und der Verwendung von SDS-haltigen Zahnpasten hingewiesen [25].

Natriumlaurylsulfat findet auch Anwendung in der SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese. Diese wird zur Molekulargewichtsbestimmung von Proteinen verwendet. Als Träger dient ein hochvernetztes Polyacrylamidgel. Die Proteine werden in einer wässrigen Lösung aufgenommen, die negativ geladenes SDS enthält. SDS bindet mit seinem Fettsäureanteil an die hydrophoben Bezirke des Proteins. Das Molekül geht Wechselwirkungen mit anderen Proteinen ein. Zusätzlich werden Disulfidbrücken durch Zugabe einer reduzierenden Thiolverbindung wie β -Mercaptoethanol oder Dithiothreitol aufgespalten. Die durch das SDS negativ geladenen Proteine wandern bei der Elektrophorese durch das Polyacrylamidplattengel in Richtung positiver Elektrode. Die Proteine werden nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt, da kleine Proteine schneller durch die Poren des Polyacrylamidgels wandern. Durch Färbung mit einem speziellen Farbstoff werden die Proteine dann sichtbar gemacht und man erhält eine lineare Beziehung zwischen dem Logarithmus der Molmasse und den Wanderungstrecken der Proteine. Die Molmassen der Proteine lassen sich

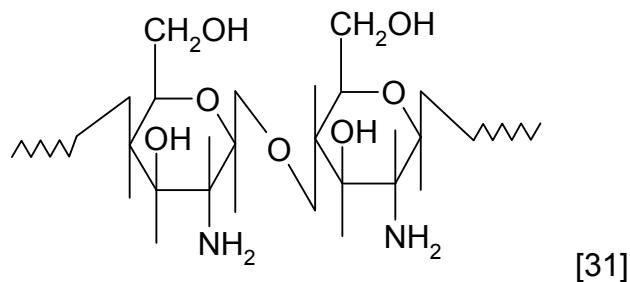
durch Standards, die in einer Parallelspur mitgelaufen sind, ermitteln [26, 27, 28].

In einigen Studien mit Zellkulturen wird auch die mögliche Anwendung von SDS in topisch vaginalen Formulierungen beschrieben. Es kann in Gelformulierungen eingearbeitet werden, die antimikrobiell wirken und die Infektiosität von Herpes Simplex Viren (HSV) der Stämme 1 und 2 und dem Humanen Immundefizienz Virus (HIV) Typ 1 reduzieren [29].

4.3 Chitosan-glykolsäure

Chitosan

Struktur



Gewinnung

Chitosan wird durch Deacetylierung von Chitin gewonnen.

Chitin ist ein natürlich vorkommendes N-haltiges Polysaccharid. Es ist ein Homopolymer aus β 1 $\rightarrow$ 4 verknüpftem N-Acetylglucosamin und bildet die wichtigste Gerüstsubstanz der Insekten und Mollusken. Es kommt auch in Würmern, Bakterien, Pilzen und Flechten vor. Chitin ist farb-, geschmack- und geruchlos und besitzt sehr schlechte Lösungseigenschaften [10, 15, 22].

Eigenschaften und Anwendung

Das durchschnittliche Molekulargewicht des kationischen Polymers Chitosan beträgt 3800- 20000 g/mol und ist zu 65% bis 95% deacetyliert.

Unter neutralen oder basischen Bedingungen besitzt Chitosan freie Aminogruppen und ist in Wasser unlöslich. Im Säuren hingegen erfolgt eine Protonierung der Aminogruppen und es wird somit wasserlöslich. Weiters ist

Chitosan in verdünnten Säuren (außer Schwefelsäure), wässrigem Methanol und in Glycerin löslich.

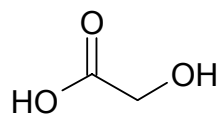
Chitosan verursacht keine allergischen Reaktionen, ist nicht toxisch und wird leicht vom Organismus abgebaut. Weiters besitzt es mukoadhesive und wundheilende Eigenschaften, wirkt antimikrobiell und zeichnet sich durch seine gute Bioverträglichkeit aus.

Chitosan wird in der Entwicklung von Nano- und Mikropartikeln genutzt, sowie in der Herstellung von Hydrogelen. Eine weitere Anwendung findet Chitosan in der Augenheilkunde, in der Haarkosmetik und als Hilfsstoff bei der Tablettenherstellung. Es kann auch zu Fäden verarbeitet werden, die für chirurgische Zwecke geeignet sind [18, 30, 31].

Man nimmt an, dass chitosanhältige Hydrogele mit dem Stratum corneum interagieren und somit die Löslichkeit des Arzneistoffes in der Haut erhöhen [31]. Möglicherweise wird eine Steigerung der Permeabilität des Stratum corneum auch durch Okklusion erreicht [33].

Chitosanhältige Hydrogele können in chemische und physikalische Hydrogele unterteilt werden. Chemische Hydrogele werden durch irreversible kovalente Crosslinker gebildet, physikalische Hydrogele hingegen zeichnen sich durch reversible, ionische Crosslinker aus. Bei der vorliegenden Arbeit wurde als Crosslinker Glykolsäure verwendet [34].

Glykolsäure



Summenformel

$C_2H_4O_3$

Relative Molekülmasse

76, 05 g/mol

Löslichkeit

wasserlöslich

pK_a Wert

3,83

Schmelzpunkt

77-78 C°

Siedepunkt

100 C°

Eigenschaften und Anwendung

Glykolsäure kommt als Kristall vor, sie ist farblos und geruchlos [10, 35].

Chemisch wird Glykolsäure zu den α -Hydroxysäuren gezählt. Das sind organische Carbonsäuren mit einer Hydroxylgruppe in α -Stellung, also an dem der Carboxylgruppe benachbarten C-Atom. Glykolsäure oder Hydroxyessigsäure (HO-CH₂-COOH) ist die einfachste α -Hydroxycarbonsäure und wird aus Weintrauben und Zuckerrohr gewonnen.

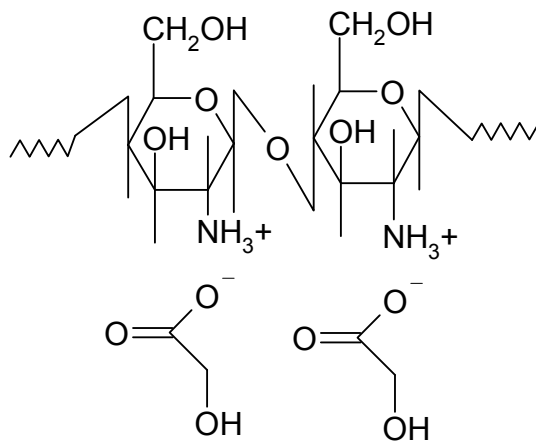
Glykolsäure wirkt auf die Haut sowohl epidermal als auch dermal. Geringe Konzentrationen von Glykolsäure führen im Stratum corneum zu einer Verringerung der Kohäsion zwischen den Korneozyten und zu einer Ablösung eines großen Teils des Stratum corneums. Gleichzeitig stimulieren α -Hydroxysäuren die Zellteilungsaktivität der Keratinozyten und führen zu einer Zunahme der Epidermisdicke. α -Hydroxysäuren besitzen auch feuchtigkeitsspendende Wirkung und belegen eine erhöhte Produktion von Kollagen durch die Fibroblasten der Dermis. Das hat eine Verdickung der Dermis zur Folge und damit eine Milderung von Falten.

Anwendung finden α -Hydroxysäuren vor allem in der Kosmetik als Anti- Age und Peeling Produkte und in der Dermatologie bei Erkrankungen, die mit einer übermäßigen Verhornung einhergehen, wie z.B. bei Akne, Psoriasis, Ichthyosen, zur Beseitigung von Warzen und bei verschiedenen Ekzemen.

Je höher die Konzentration und je niedriger der pH-Wert, desto besser sind die Wirkungen der α -Hydroxysäuren, aber auch die Hautirritationen nehmen zu [36, 37].

Für das Hydrogel wurde das Salz Chitosan-glykolsäure verwendet. Dieses Salz wurde hergestellt, indem zur sauren Lösung von Chitosan eine bestimmte Menge an Glykolsäure gegeben wurde. Nach einigen Reinigungsschritten mittels Dialyse und anschließender Lyophilisation wurde das Chitosan-glykolsäure Salz erhalten.

Chitosan-glykolsäure



5 Diffusionsversuche

5.1 *Präparation der Schweinehaut*

Für die Diffusionsversuche wurde porcine Haut verwendet, da die Zusammensetzung porciner Haut der humanen Haut ähnlich ist. Die Haut wurde mittels Dermatom auf 1,2 mm bzw. 1 mm geschnitten und zur Aufbewahrung eingefroren. Bei allen vorliegenden Untersuchungen wurden Hautstücke von drei verschiedenen Individuen verwendet. Diese wurden als Species 1, Species 2 und Species 3 bezeichnet. Da sich die Dicke (Species 1: 1,2 mm, Species 2 und 3: 1 mm) auf die Höhe der Permeabilität auswirkte, ist für alle weiteren Untersuchungen jeweils angegeben, von welcher Species die Hautstücke stammten.

5.2 *Freisetzungsmodell*

Abb. 5.1 zeigt den schematischen Aufbau einer Franz-Diffusionszelle. Sie besteht aus zwei Glasteilen, dazwischen wird das Hautstück (mit der epidermalen Seite nach oben) durch eine Metallklammer fixiert. Im unteren Teil der Franz-Zelle wird ein Magnetrührer eingebracht, damit das Akzeptormedium mit dem diffundierten Arzneistoff homogen verteilt wird und sich das Diffusionsgleichgewicht schneller einstellt. Dann wird ca. 2 ml Akzeptormedium (Phosphatpuffer pH 7,4) luftblasenfrei eingebracht.

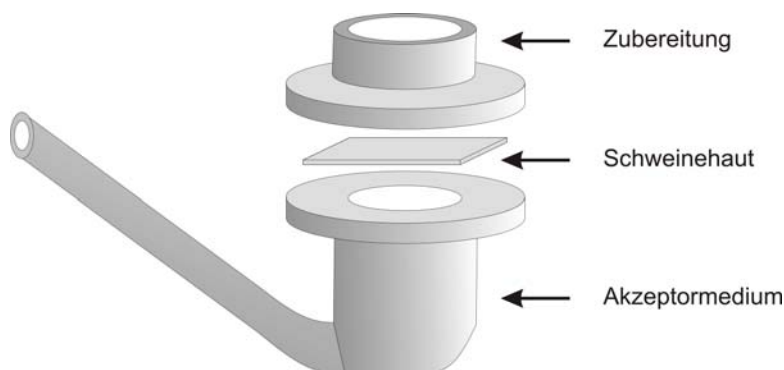


Abb. 5.1 Schematischer Aufbau der Franz-Diffusionszelle

5.3 Versuchsanordnung

Die Hautstücke wurden in die Franz-Zellen, die bereits mit Akzeptormedium befüllt sind, eingespannt und mit jeweils 100 µl einer Lösung bzw. 0,1 g oder 0,2 g eines Gels 14 h lang imprägniert.

Es wurden mindestens drei Parallelversuche durchgeführt. Da jedoch bei den vorliegenden Untersuchungen sehr große interindividuelle Permeationsunterschiede festgestellt wurden, sind Kontrollimprägnierungen pro Species durchgeführt worden.

Folgende Imprägnierungen wurden durchgeführt:

Species 1	▪ 50%iger EtOH ▪ Aqua dest. ▪ SDS ▪ 1, 2 und 3 mM Lys-3 in 50%igem EtOH ▪ 1, 2 und 3 mM Lys-5 in 50%igem EtOH ▪ 1%iges Lys-5 ($\cong 0,015$ M) in Aqua dest. ▪ 1, 2 und 3 mM Lys-7 in 50%igem EtOH ▪ Kombinationen
Species 2	▪ 50%iger EtOH ▪ Aqua dest. ▪ Chitosan-glykolsäure Gel ▪ 2 mM Lys-7 in 50%igem EtOH ▪ Chitosan-glykolsäure Gel mit 2 mM Lys-7 bzw. 10 mM Lys-7
Species 3	▪ 50%iger EtOH ▪ 2 mM Lys-7 in 50%igem EtOH ▪ Chitosan-glykolsäure Gel mit 2 mM Lys-7



Abb. 5.2 Franz-Diffusionzellen im Wasserbad

Die Imprägnierungen wurden von der Haut vollständig aufgenommen, Reste des Gels jedoch mussten vor dem Diffusionsversuch vorsichtig mit einer Küchenrolle entfernt werden. Nach der Einwirkzeit von 14 h wurden die Franz-Zellen in einem Wasserbad von 32°C temperiert. Nach ca. einer Stunde Equilibrierung wurden 600 µl einer 0,1%igen Na-Fluorescein Lösung (Phosphatpuffer pH 7,4) aufgetragen und mit einem Deckglas vor Verdunstung geschützt. Danach wurde stündlich das gesamte Akzeptormedium für die Analytik entnommen und durch frischen Phosphatpuffer pH 7,4 ersetzt. Der Versuch wurde neun Stunden lang durchgeführt, wobei eine stündliche Probenziehung erfolgte. Danach wurden die gesammelten Lösungen in den Eppendorfgefäßen 6 Minuten lang bei 11000 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert, damit sich möglicherweise darin befindliche Hautpartikeln absetzten. Vom Überstand wurden jeweils 300 µl auf einer Mikrotiterplatte aufgetragen und der Na-Fluoresceingehalt spektrophotometrisch bestimmt. Im Folgenden wird die Herstellung der verwendeten Materialien und der verschiedenen Lösungen bzw. der Gele, die zur Imprägnierung benötigt wurden, beschrieben.

Phosphatpuffer pH 7,4

Als Akzeptormedium dient ein Phosphatpuffer pH 7,4. Zur Herstellung dieses Puffers werden in einem 1000 ml Messkolben 1,7 g Kaliumdihydrogenphosphat (wasserfrei) und 1,78 g Dinatriumhydrogenphosphat (wasserfrei) eingewogen und mit Aqua dest. aufgefüllt. Nach vollständiger Lösung beider Komponenten wird der pH Wert mittels einer pH Elektrode überprüft und gegebenenfalls auf pH 7,4 justiert.

0,1%ige Na-Fluorescein Lösung

Na-Fluorescein dient als Modellarzneistoff. Zur Herstellung einer 0,1%igen Na-Fluorescein Lösung werden 10 mg Na-Fluorescein in 10 ml Phosphatpuffers pH 7,4 gelöst.

50%iger Ethanol (V/V)

Dafür werden 5,15 ml Aqua dest. mit 4,25 ml 96%igem Ethanol gemischt.

0,1%ige SDS Lösung

Eine 0,1%ige SDS Lösung wird durch Lösen von 10 mg SDS in 10 ml Aqua dest. bzw. für einen weiteren Versuch in 10 ml 50%igem EtOH hergestellt.

Ethanolische Lys-3, Lys-5 und Lys-7 Lösung

Von jedem Polypeptid werden jeweils 1 mM, 2 mM und 3 mM Lösungen in 50%igem Ethanol hergestellt.

1%ige wässrige Lys-5 Lösung ($\cong 0,015$ M)

Für die Herstellung einer 1%igen Lys-5 Lösung werden 10 mg des Lys-5 in 1 ml Aqua dest. gelöst.

Kombinationen

Folgende Kombinationen wurden hergestellt:

1 mM Lys-5 in 0,1%igem SDS

1 mM, 2 mM und 3 mM Lys-7 in 0,1%igem SDS

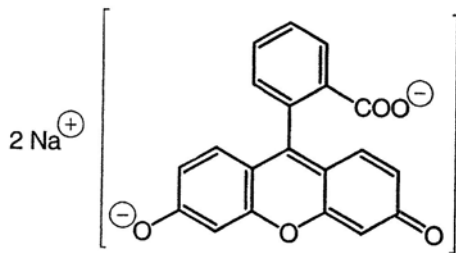
Chitosan-glykolsäure Gel

Chitosan-glykolsäure liegt als Lyophilisat vor. Etwa 0,1 g der Chitosan-glykolsäure werden mit Aqua dest. auf 5 g ergänzt und über Nacht quellen gelassen. Das entstandene lysinfreie Gel dient als Kontrolle. Lys-7 wird in dieses Gel eingearbeitet, sodass eine Endkonzentration von 2 mM bzw. 10 mM erreicht wird.

6 Analytik

6.1 Na-Fluorescein

Struktur



Summenformel

$C_{20}H_{10}Na_2O_5$

Relative Molekülmasse

376,3 g/mol

Synonyme

Fluoresceinum natricum, 2-(6-Hydroxy-3-oxo-3H-xanthen-9-yl)-benzoesäure

Löslichkeit

leicht löslich in Wasser, löslich in Ethanol 96%, unlöslich in Dichlormethan und Hexan

Eigenschaften

- orangerotes, feines, hygroskopisches, geruchloses Pulver
- die wässrige Lösung ist von starker gelbgrüner Fluoreszenz, auch in stärkster Verdünnung
- Fluoreszenz verschwindet beim Ansäuern und tritt beim Zusatz von Alkali wieder auf

Anwendung

Na-Fluorescein wird als diagnostisches Hilfsmittel bei Gallenblasen- und Darmoperationen verwendet sowie zur Untersuchung unterirdischer Wasserläufe und zur Beobachtung von Verunreinigungen durch Abwässer.

Die wichtigste Verwendung jedoch findet Na-Fluorescein in der Fluoreszenzangiographie. Die Fluoreszenzangiographie ermöglicht eine

Darstellung des retinalen und uveal Gefäßsystems bzw. Blutflusses am Augenhintergrund. Es wird eine 2%ige Lösung von Na-Fluorescein in eine Armvene injiziert. Der Farbstoff gelangt über den Blutkreislauf in die Blutgefäße der Augen und verteilt sich dort. Na-Fluorescein wird mit blauem Licht angeregt und strahlt hellgrünes Licht ab. Mit einer speziellen Kamera werden Photographien gemacht und somit die Hämodynamik der Netzhautzirkulation erfasst. Die Na-Fluoresceinlösung wird über die Niere ausgeschieden, wodurch der Urin orange gefärbt ist. Die Na-Fluoreszenzangiographie wird zur Diagnose von Netzhaut- und Aderhauterkrankungen verwendet. Beispiele dafür sind Retinopathia diabetica, Makuladegeneration und degenerative Erkrankungen des Pigmentepithels [10, 14, 38, 39].

Eine weitere Anwendung findet Na-Fluorescein im sogenannten Fluoresceinversuch. Es erfolgt eine Untersuchung des Tränenabflusses, indem eine Fluoresceinlösung in den Bindehautsack eingeträufelt wird, die beim Gesunden in der Nase erscheint und das Taschentuch gelb-grün färbt [14].

6.2 Prinzip der Fluorimetrie und Aufbau eines Fluorimeters

Fluorimetrie

Bei der Fluorimetrie handelt es sich um eine Methode, bei der Moleküle durch Licht zur Fluoreszenz angeregt werden. Die Intensität des Fluoreszenzlichtes ist direkt proportional zur Konzentration der Substanz [40, 41].

Elektronenanregung und Fluoreszenz

Elektronen können sich nur auf ganz bestimmten Bahnen bewegen, sogenannten Orbitalen. Diese Orbitale sind paarweise mit Elektronen entgegengesetzten Spins besetzt, sie befinden sich im Singulettgrundzustand (S_0). Unter Beibehaltung der Spinrichtung kann ein Elektron durch Aufnahme elektromagnetischer Strahlung in ein energiereicheres, nicht besetztes Orbital wechseln. Es befindet sich dann in angeregten Singulettzuständen (S_1 , S_2), die jedoch instabil sind und das Molekül deshalb wieder in den Grundzustand zurückkehrt. Dabei wird die zuvor aufgenommene Anregungsenergie durch Aussendung von Licht wieder abgegeben [41, 42].

Das Anregungslicht ist energiereicher als die Emissionsstrahlung. Das kann mit einem von Jablonski entwickelten Termschema verdeutlicht werden [41]. Abb. 6.1 zeigt Absorptionsübergänge vom untersten Schwingungszustand des Grundzustandes (S_0), die auf verschiedenen Schwingungsniveaus des Anregungszustandes (S_1 , S_2) führen. Die Emissionsvorgänge, die entgegengesetzt verlaufen, beginnen nicht aus dem jeweiligen erreichten Schwingungsniveau des Anregungszustandes, sondern sie erfolgen vom niedrigsten, energieärmsten Schwingungsniveau des Anregungszustandes. Die überschüssige Energie wird in Form von Wärme an die Umgebung abgegeben [41].

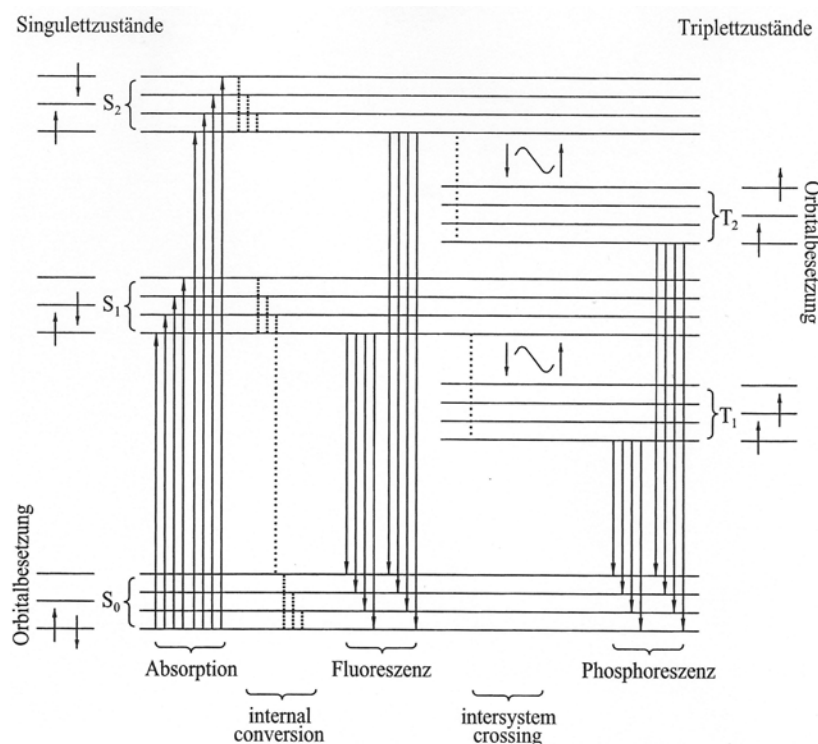


Abb. 6.1 Termschema nach Jablonski [41]

Fluorimeter

Zur Messung der Fluoreszenz wird ein Fluorimeter verwendet.

Abb. 6.2 zeigt den Aufbau eines Fluorimeters. Es besteht aus einer Lichtquelle, einem Anregungs-Monochromator, einer Küvette mit der zu messenden Substanz, einem Absorptions-Monochromator, einem Empfänger zur Messung der Absorption, einem Emissions-Monochromator und einem Empfänger zur Messung der Emission (Fluoreszenz) [40].

Durch den Anregungs-Monochromator erfolgt die Anregung der Probe mit monochromatischem Licht. Die Wellenlänge sollte sich im Bereich des Absorptionsmaximums der zu bestimmenden Substanz befinden. Die Messung der Fluoreszenz erfolgt senkrecht zur Messung der Absorption, so werden die beiden Strahlengänge im Gerät gut getrennt [40, 42]. Der Emissions-Monochromator dient der Analyse des Fluoreszenzlichtes und ermöglicht die Entfernung von Resten des Anregungslichtes. Dabei werden meist Spektralfilter eingesetzt. Als Empfänger werden Photomultiplier verwendet [40].

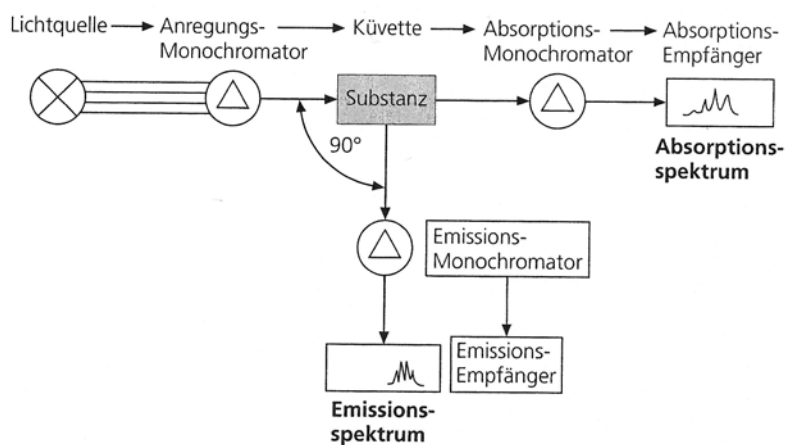


Abb. 6.2 Aufbau eines Fluorimeters [40]

Fluoreszenz zeigen vor allem aromatische Systeme, Verbindungen mit konjugierten Doppelbindungen, Carbonylverbindungen und kondensierte Heterocyclen [40].

Die Fluorimetrie ist eine hochempfindliche Methode mit einer Nachweisgrenze bis in den ppb-Bereich (parts per billion) [42].

An die Lösungsmittel sind deswegen sehr hohe Reinheitsanforderungen gestellt. Sie dürfen auch keine Eigenabsorption und keine Eigenfluoreszenz aufweisen und müssen photostabil sein [40].

Die Wellenlänge des Anregungslichtes und die des Fluoreszenzlichtes müssen weit genug auseinanderliegen, da sonst kein linearer Zusammenhang zwischen der gemessenen Fluoreszenzintensität und der Konzentration der Probe gegeben ist [41].

In der pharmazeutischen Analytik wird die Fluorimetrie vor allem zur Gehaltsbestimmung sowie zur Identitäts- und Reinheitsprüfung eingesetzt [40].

Bei der vorliegenden Arbeit wurden die freigesetzten Na-Fluoresceinmengen mittels Fluoreszenzdetektion analysiert. Es wurde ein Fluorimeter der Type Tecan M 200 verwendet.

6.3 Erstellung der Eichgerade

Zur Erstellung der Eichgerade von Na-Fluorescein wurden 10,58 mg Na-Fluorescein in 10 ml Phosphatpuffer pH 7,4 gelöst. Danach wurden verschiedene Verdünnungen angefertigt und jeweils 300 µl davon auf einer Mikrotiterplatte aufgetragen, die dann unter gleichen Bedingungen wie die Proben bei einer Wellenlänge von 485/535 nm (Excitation/Emission) mit dem Mikrotiterplattenreader vermessen wurden.

Tab. 6.1 Eichung Na-Fluorescein

	µg/ml	Emission
Verdünnung 1:5000	0,2116	27785
Verdünnung 1:10000	0,1058	14196
Verdünnung 1:20000	0,0529	7206
Verdünnung 1:30000	0,0353	4916
Blindwert (Puffer)	0	48

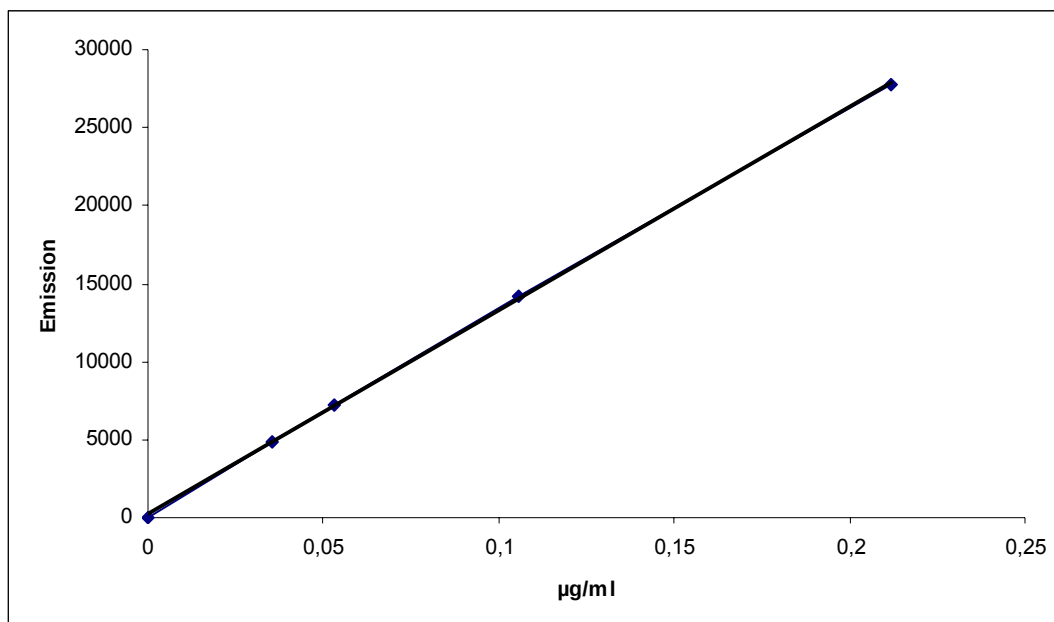


Abb. 6.3 Eichgerade für Na-Fluorescein

Geradengleichung: $y = 130697x + 228,08$, Bestimmtheitsmaß: $R^2 = 0,9998$

7 Differential Scanning Calorimetry (DSC)

7.1 Prinzip der DSC

Die DSC ist eine thermoanalytische Methode, bei der die Energiedifferenz zwischen Probe und Referenz bei linear steigender Temperatur gemessen wird. Durch Integration über die Zeit erhält man die Enthalpieänderung der Probe. Bei dieser Methode können somit alle Vorgänge erfasst werden, bei denen Energie verbraucht oder abgegeben wird (endotherme und exotherme Phasentransformationen) [9, 10].

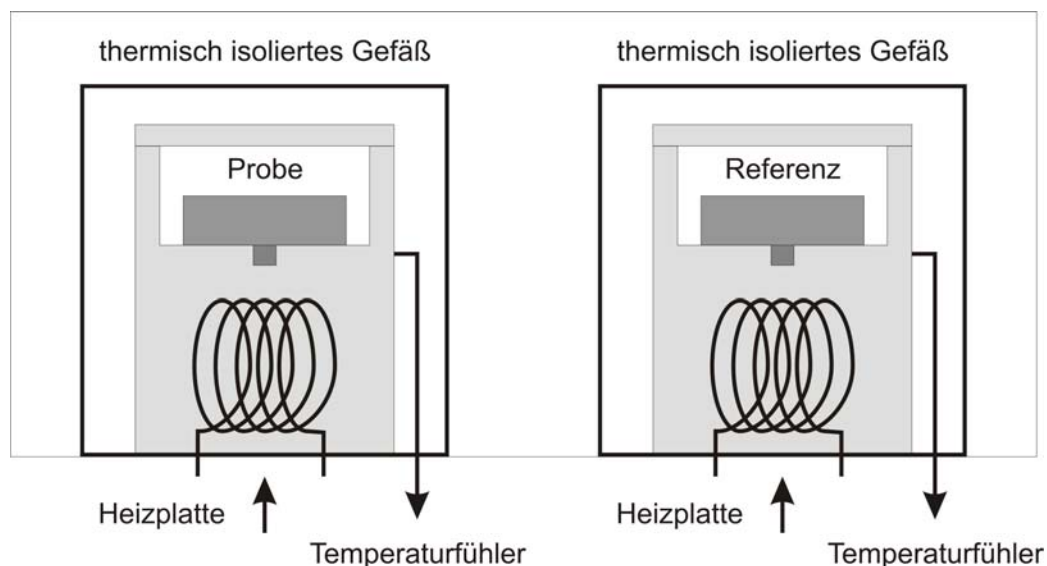


Abb. 7.1 Aufbau einer Leistungskompensations-DSC

Abb. 7.1 zeigt den Aufbau einer Leistungskompensations-DSC. Die Probe wird in ein Aluminiumgefäß eingeschweißt, das Referenzgefäß besteht nur aus einem zugeschweißten, leeren Aluminiumgefäß. Probe und Referenz werden jeweils in eine thermisch isolierte Vorrichtung eingebracht, damit keine Wärme das System nach außen verlassen oder von außen aufgenommen werden kann. Beide besitzen je einen Temperaturfühler und eine Heizvorrichtung und werden einem bestimmten Temperaturprogramm unterzogen. Die Temperaturen von Probe und Referenz steigen gleichmäßig an, ihre Temperaturdifferenz beträgt Null. Im Augenblick eines Phasenüberganges in der Probe wird die daraus resultierende Temperaturdifferenz durch Vergrößern

oder Vermindern der Heizleistung kompensiert, damit die Temperaturen gleich gehalten werden. Man kann nun die Temperatur, bei der der Phasenübergang stattfindet, und die verbrauchte Wärmemenge, die für diese Umwandlung nötig ist, in Form der verbrauchten zusätzlichen elektrischen Energie bestimmen [9, 43].

Man erhält unterschiedliche Peaks, die je nach Richtung des Wärmeflusses endotherm oder exotherm verlaufen. Beispiele für endotherme Vorgänge sind Schmelzen, Verdampfen und Sublimieren, Beispiele für exotherme Reaktionen sind Erstarren, Kondensieren, Oxidieren, Kristallisieren und Sintern [44].

Die Differential Scanning Calorimetry wird zur Messung von thermischen Umwandlungen verwendet, zur Bestimmung von Identität und Reinheit von Stoffen, zur Bestimmung der Wärmekapazität und der Schmelzwärme [45].

Bei der vorliegenden Arbeit wurden charakteristische Temperaturübergänge der porcinen Hautstücke gemessen. Die Haut als natürliche Membran zeigt bestimmte Temperaturübergänge, die charakteristisch für Lipide oder auch Proteine sind [46]. Diese Temperaturübergänge sind je nach Species z.B. Schwein, Nagetier oder Mensch unterschiedlich. Eine mögliche Interaktion mit bestimmten Strukturen der Haut kann in Änderungen dieser Übergangstemperaturen angegeben werden.

7.2 Probenvorbereitung

Für die Versuche mittels DSC wurden Hautstücke der Species 3 verwendet, die in gefrorenem Zustand im Tiefkühlschrank bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert wurden. Die Hautstücke wurden aufgetaut und jeweils ein Hautstück vier Stunden lang in eine 1,5 ml Lösung gelegt, die entweder aus Aqua dest. oder aus 0,01 M Lysin-3, 5, oder 7 (in Aqua dest.) bestand. Zur Durchführung der Versuche wurden jeweils ca. 25 mg Haut in einen speziellen Aluminiumbehälter eingewogen und mit einem passenden Deckel mithilfe einer Presse verschlossen. Als Referenz diente ein leerer, verschlossener Aluminiumbehälter. Die Temperatureinstellung wurde so gewählt, dass 1 Minute auf 30°C equilibriert wurde und danach eine Temperatursteigerung von 5 Kelvin pro Minute erfolgte (von 30°C bis 120°C). Es wurden mindestens 3 Parallelversuche durchgeführt.

8 Ergebnisse

Im Folgenden werden die Ergebnisse der Diffusionsuntersuchungen nach den verschiedenen Imprägnierungen sowie die Ergebnisse der DSC Studien mit Haut angegeben. Die Diffusionskurven zeigen die freigesetzten Na-Fluoresceinmengen in Abhängigkeit der Zeit. Die Unterkapitel sind in der gleichen Reihenfolge wie in Kapitel 5.3 unterteilt.

8.1 *Species 1*

8.1.1 Imprägnierung mit 50%igem Ethanol und Aqua dest.

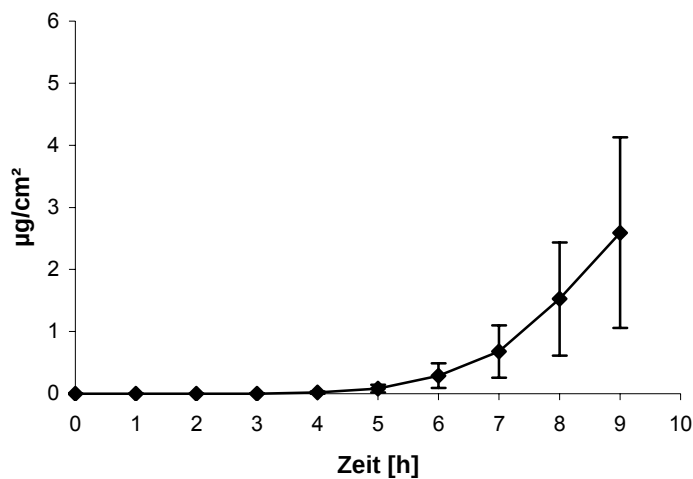


Abb. 8.1 Einfluß von 50%igem Ethanol auf die Na-Fluorescein Permeation in $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ in Abhängigkeit der Zeit, $n=3$ (siehe Tab. Seite 67)

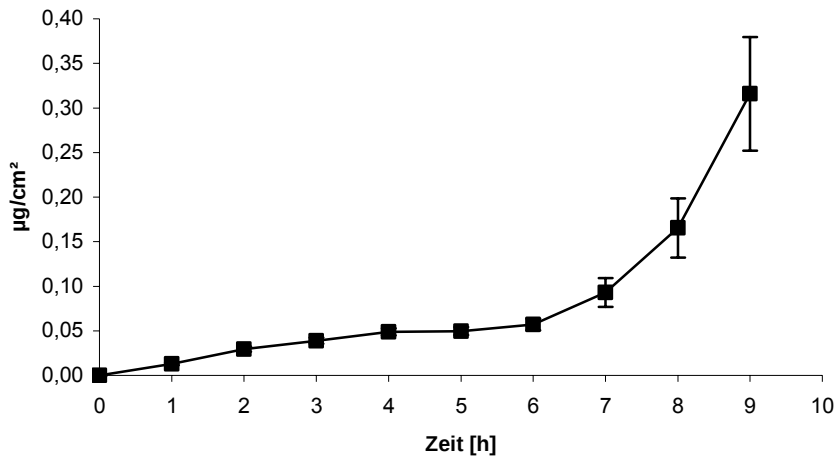


Abb. 8.2 Einfluß von Aqua dest. auf die Na-Fluorescein Permeation in $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ in Abhängigkeit der Zeit, $n=3$ (siehe Tab. Seite 68)

Wie erwartet war die kumulative Na-Fluoresceinpenetration nach Imprägnierung mit 50%igem EtOH um das ca. achtfache höher als nach Imprägnierung mit Aqua dest. Nach beiden Typen der Imprägnierung konnte eine Lagtime von ca. 6 Stunden beobachtet werden. Dieses Ergebnis stimmt mit Angaben aus der Literatur überein, die eine Permeationssteigerung durch Einwirken von Ethanol beschrieben haben. Dabei wird davon ausgegangen, dass Ethanol in die Lipidbereiche des Stratum corneum eindringt, Lipide und Proteine extrahiert und somit die Porosität des Stratum corneum erhöht [6].

Diese beiden Imprägnierungen wurden als Kontrollen im Bezug auf ethanolische oder wässrige Oligo-Lysinlösungen herangezogen. Allerdings muss darauf hingewiesen werden, dass bei Species 2 niedrigere Ergebnisse durch Imprägnierung mit EtOH als mit Aqua dest. erzielt wurden, jedoch konnte dafür keine Erklärung gefunden werden.

8.1.2 Imprägnierung mit SDS

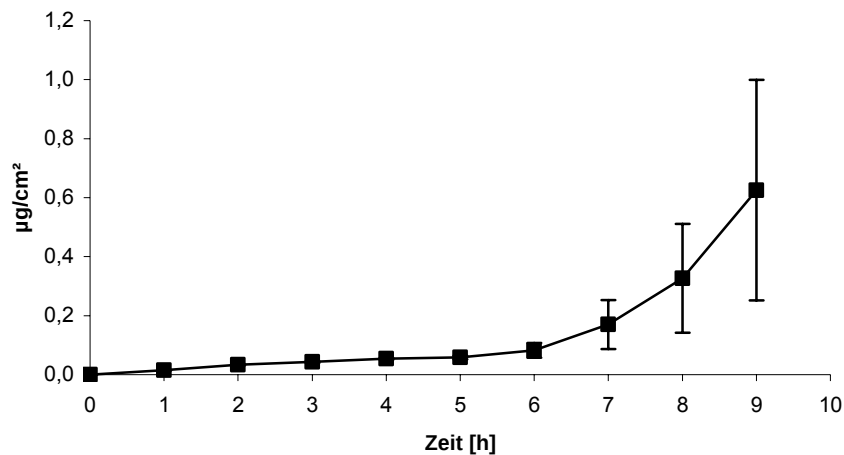


Abb. 8.3 Einfluß von 0,1%igem SDS in Aqua dest. auf die Na-Fluorescein Permeation in $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ in Abhängigkeit der Zeit, $n=3$ (siehe Tab. Seite 69)

Nach 9 Stunden Diffusion wurde $0,63 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ bzw. 0,10% aus der aufgetragenen Na-Fluoresceinmenge freigesetzt. Eine 0,1%ige SDS in Aqua dest. Imprägnierung ergab eine ca. doppelt so hohe Na-Fluoresceinpermeation wie nach Imprägnierung mit Aqua dest.

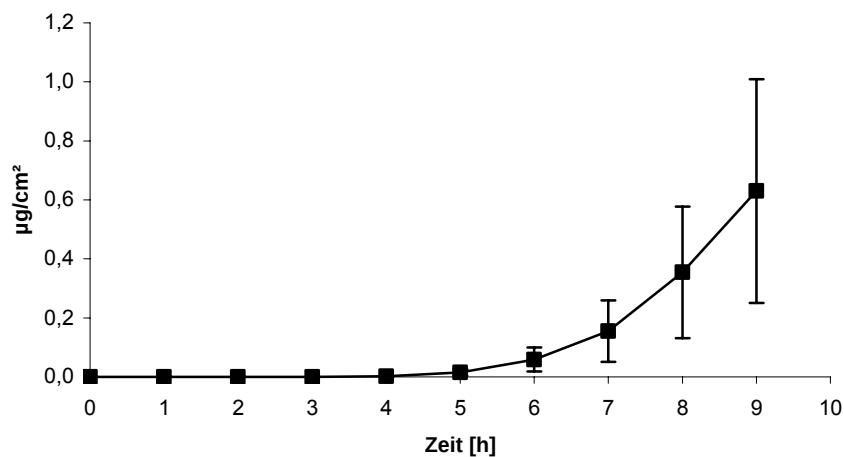


Abb. 8.4 Einfluß von 0,1%igem SDS in 50%igem Ethanol auf die Na-Fluorescein Permeation in $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ in Abhängigkeit der Zeit, $n=3$ (siehe Tab. Seite 70)

Die kumulative Freisetzungsmenge von Na-Fluorescein betrug nach 9 Stunden $0,63 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ bzw. 0,10%. Wie schon nach Imprägnierung mit 50%igem Ethanol

konnte eine Lagtime von ca. 6 Stunden gemessen werden. Damit waren die Freisetzungsraten nach Imprägnierung mit 0,1%igem SDS in 50%igem Ethanol und nach Imprägnierung mit 0,1%igem SDS in Aqua dest. im gleichen Größenordnungsbereich.

8.1.3 Imprägnierung mit 1, 2 und 3 mM Lysin-3 in 50%igem EtOH

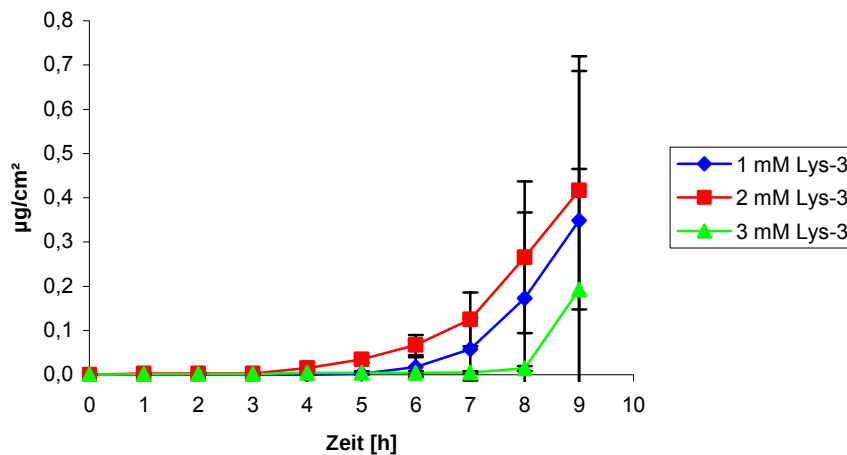


Abb. 8.5 Einfluß von unterschiedlichen Konzentrationen von Lys-3 auf die Na-Fluorescein Permeation in $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ in Abhängigkeit der Zeit, $n=3-4$ (siehe Tab. Seite 71-73)

Wie aus der Abb. 8.5 ersichtlich konnte durch Imprägnierung mit Lys-3 eine Steigerung der Na-Fluoresceinhautpermeation erzielt werden. Eine unterschiedliche Konzentration von 1 bis 3 mM Lys-3 zeigte keine signifikanten Unterschiede, allerdings ergab sich ein positiver Trend für eine Imprägnierung mit 2 mM Lys-3.

8.1.4 Imprägnierung mit 1, 2 und 3 mM Lysin-5 in 50%igem EtOH und 1%iges Lys-5 ($\cong 0,015$ M) in Aqua dest

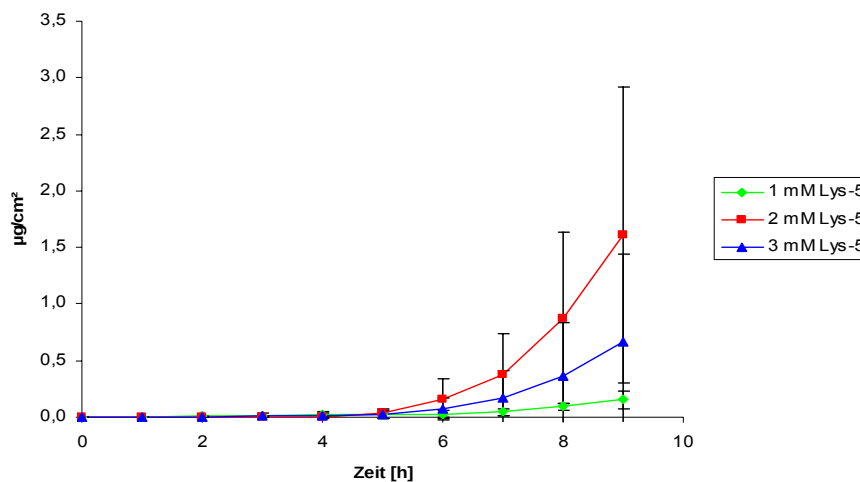


Abb. 8.6 Einfluß von unterschiedlichen Konzentrationen von Lys-5 auf die Na-Fluorescein Permeation in $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ in Abhängigkeit der Zeit, $n=3-4$ (siehe Tab. Seite 74-76)

Wie aus der Abb. 8.6 ersichtlich zeigte eine Imprägnierung mit 1 bis 3 mM Lys-5 eine deutlich höhere Na-Fluoresceinpermeation als nach Imprägnierung mit Lys-3. Auch in diesem Fall zeigte sich, dass 2 mM Lys-5 den größten Effekt auf die Na-Fluoresceinpermeation ausübte.

Da erwartet werden konnte, dass Ethanol auch einen positiven Einfluß auf die Hautpermeation ausübte, wollten wir auch die Wirkung von Lys-5 in einer wässrigen Lösung als Imprägnierung testen. Dazu stellten wir eine 1%ige wässrige Lösung von Lys-5 ($\cong 0,015$ M) her. Die Imprägnierung erfolgte wie auch bei den anderen Versuchen 14 Stunden lang.

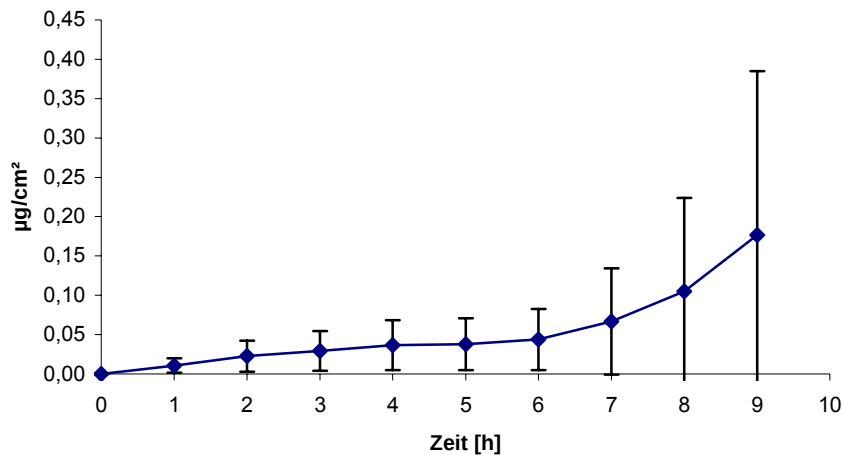


Abb. 8.7 Einfluß von 1%igem Lys-5 ($\cong 0,015$ M) in Aqua dest. auf die Na-Fluorescein Permeation in $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ in Abhängigkeit der Zeit, $n=3$ (siehe Tab. Seite 77)

Wie sich zeigte, war die Na-Fluoresceinpermeation nach 9 Stunden um das ca. neunfache geringer als nach Imprägnierung mit einer alkoholischen Lösung.

8.1.5 Imprägnierung mit 1, 2 und 3 mM Lysin-7 in 50%igem EtOH

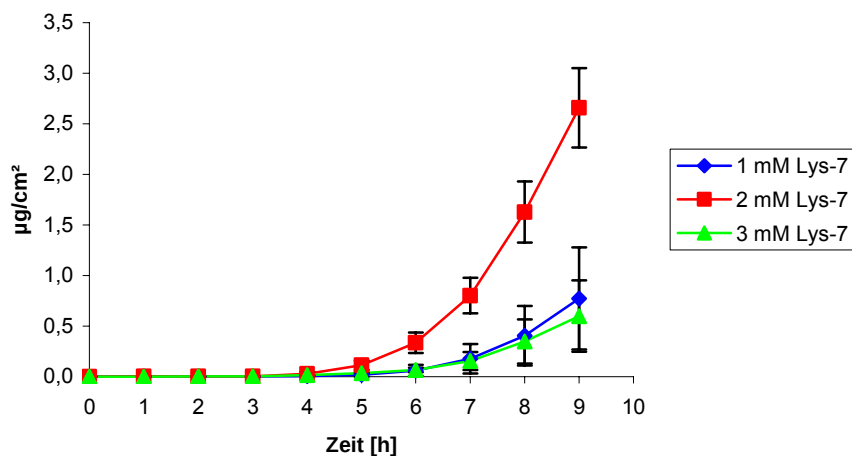


Abb. 8.8 Einfluß von unterschiedlichen Konzentrationen von Lys-7 auf die Na-Fluorescein Permeation in $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ in Abhängigkeit der Zeit, $n=3$ (siehe Tab. Seite 78-80)

Aus der Abb.8.8 geht hervor, dass nach Imprägnierung mit Lys-7 die Na-Fluoresceinpermeation signifikant gegenüber einer Permeation von Lys-5 gesteigert werden konnte. Dabei zeigte sich, dass eine Imprägnierung mit 2 mM Lys-7 zu einer signifikanten Steigerung der kumulativen Freigabe von Na-Fluorescein um das ca. vierfache führte.

8.1.6 Kombinationen

Als weiterer Punkt sollte getestet werden, ob eine Imprägnierung mit einer Kombination des oberflächenaktiven SDS mit verschiedenen Oligo-Lysinen eine noch weitergehende Steigerung der Na-Fluoresceinpermeation bewirken könnte.

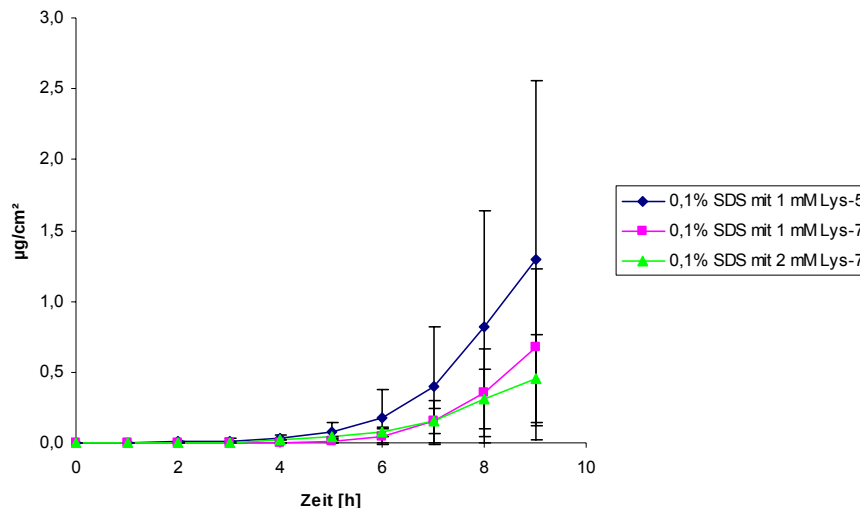


Abb. 8.9 Einfluß von 0,1%igem SDS mit 1 mM Lys-5, 1 und 2mM Lys-7 auf die Na-Fluorescein Permeation in $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ in Abhängigkeit der Zeit, $n=7$ (siehe Tab. Seite 81-83)

Wie die Abb. 8.9 zeigt, blieben die gemessenen Permeationsquoten in der gleichen Größenordnung wie nach Imprägnierung mit ethanolischem Lys-5 mit der Ausnahme von der Kombination des 0,1%igem SDS mit 2 mM Lys-7 , die sogar zu niedrigeren Diffusionsquoten von Na-Fluorescein führte.

8.2 Species 2

8.2.1 Imprägnierung mit 50%igem Ethanol, Aqua dest. und Chitosan-glykolsäure Gel

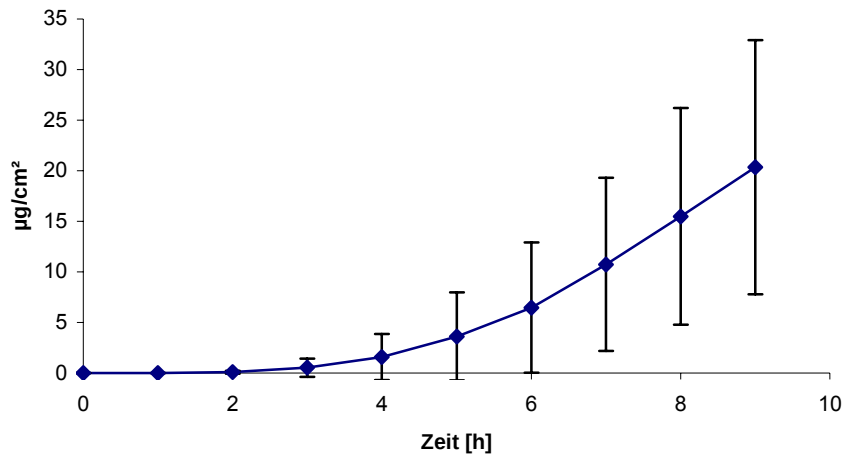


Abb. 8.10 Einfluß von 50%igem Ethanol auf die Na-Fluorescein Permeation in $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ in Abhängigkeit der Zeit, $n=7$ (siehe Tab. Seite 84)

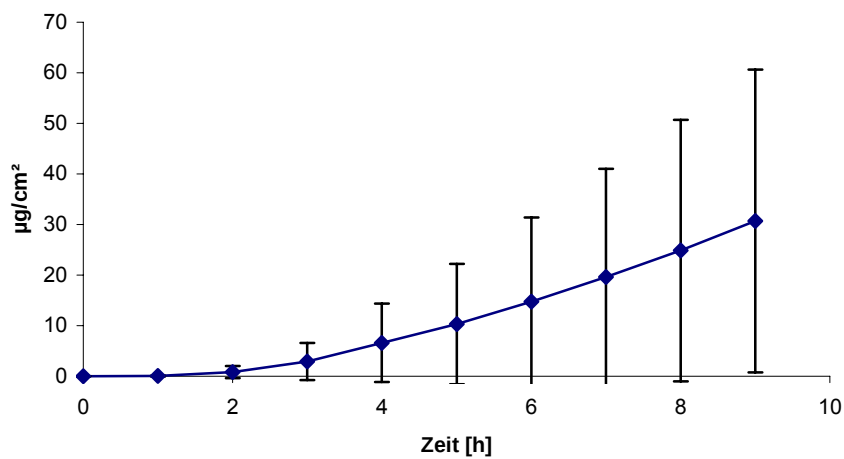


Abb. 8.11 Einfluß von Aqua dest. auf die Na-Fluorescein Permeation in $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ in Abhängigkeit der Zeit, $n=4$ (siehe Tab. Seite 85)

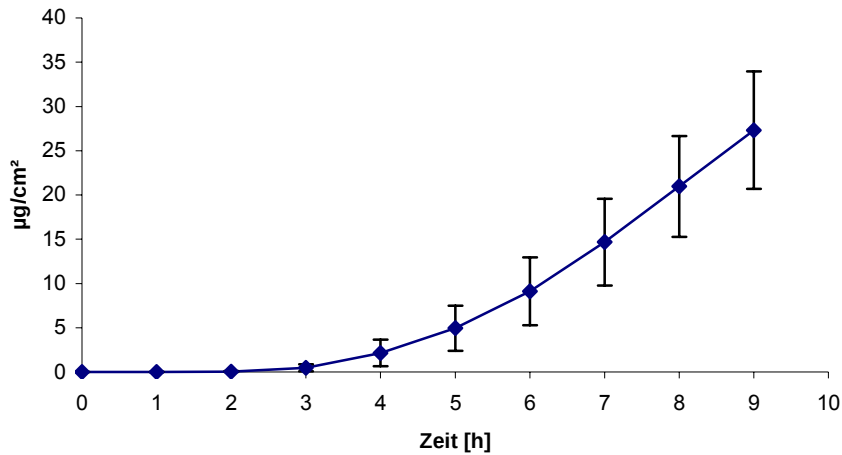


Abb. 8.12 Einfluß von Chitosan-glykolsäure Gel auf die Na-Fluorescein Permeation in $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ in Abhängigkeit der Zeit, $n=6$ (siehe Tab. Seite 86)

Da es interindividuelle Unterschiede in den Permeationsraten gab, musste von jeder Species auch die Kontrolle wiederholt werden. Daher war es neben Aqua destillata und 50%igem Ethanol auch notwendig, einen neuen Kontrollwert, nämlich Chitosan-glykolsäure Gel, zu vermessen. Wie aus den Abb. 8.10 bis 8.11 ersichtlich waren die Permeationen in einem Bereich zwischen 20 und 30 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$.

8.2.2 Imprägnierung mit 2 mM Lysin-7 in 50%igem EtOH und Chitosan-glykolsäure Gel mit 2 mM Lys-7 bzw. 10 mM Lys-7

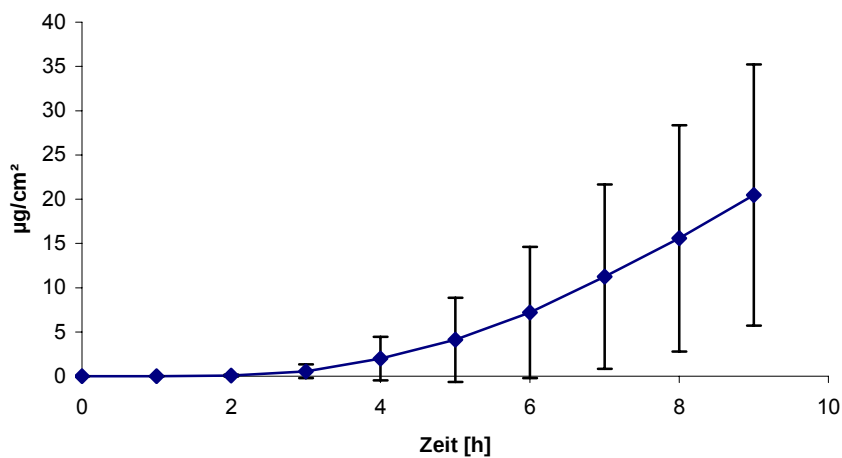


Abb. 8.13 Einfluß von 2 mM Lys-7 auf die Na-Fluorescein Permeation in $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ in Abhängigkeit der Zeit, $n=6$ (siehe Tab. Seite 87)

Nach Imprägnierung mit einer ethanolischen Lys-7 Lösung ergaben sich Permeationsraten von 20,47 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ bzw. 3,26%. Dies entsprach ca. der kumulativen Menge Na-Fluoresceins nach 14 stündiger Imprägnierung der Haut mit 50%igem Ethanol. Die Lagtime betrug ca. 4 Stunden.

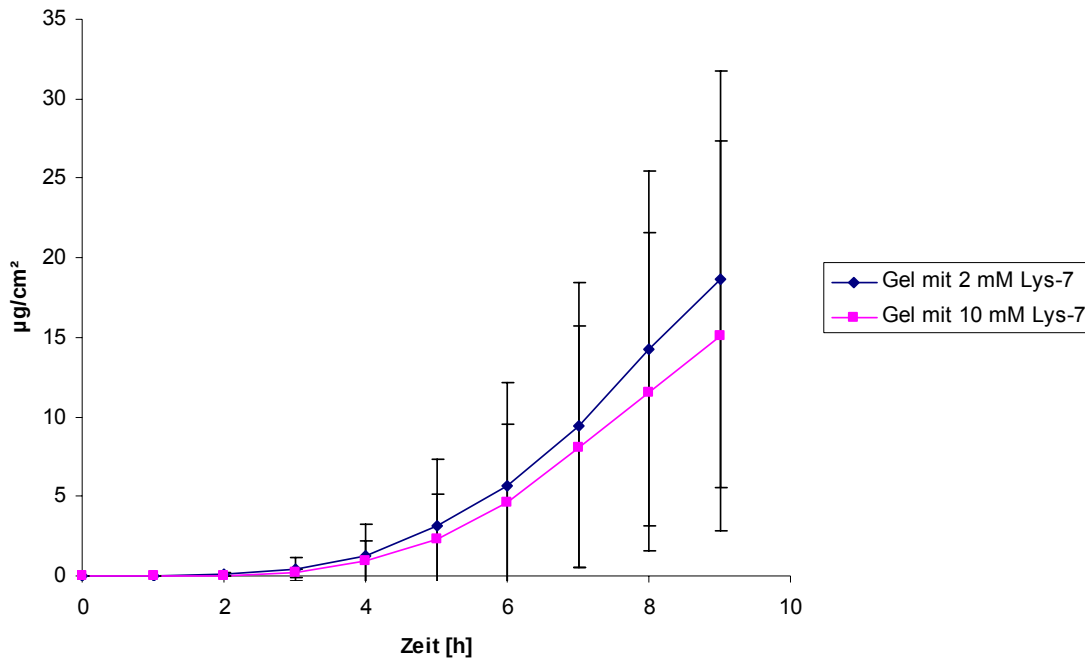


Abb. 8.14 Einfluß von Chitosan-glykolsäure Gel mit 2 mM Lys-7 bzw. 10 mM Lys-7 auf die Na-Fluorescein Permeation in $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ in Abhängigkeit der Zeit, $n=3$ (siehe Tab. Seite 88-89)

Wie schon Abb. 8.12 zeigte, hatten Imprägnierungen mit Chitosan-glykolsäure Gel einen positiven Effekt auf die Na-Fluoresceinpermeation. Durch Einarbeitung von Lys-7 in das Gel und nachfolgender 14 stündiger Imprägnierung der Haut wurde diese hohe Na-Fluoresceinpermeation jedoch reduziert.

8.3 Species 3

8.3.1 Imprägnierung mit 50%igem Ethanol

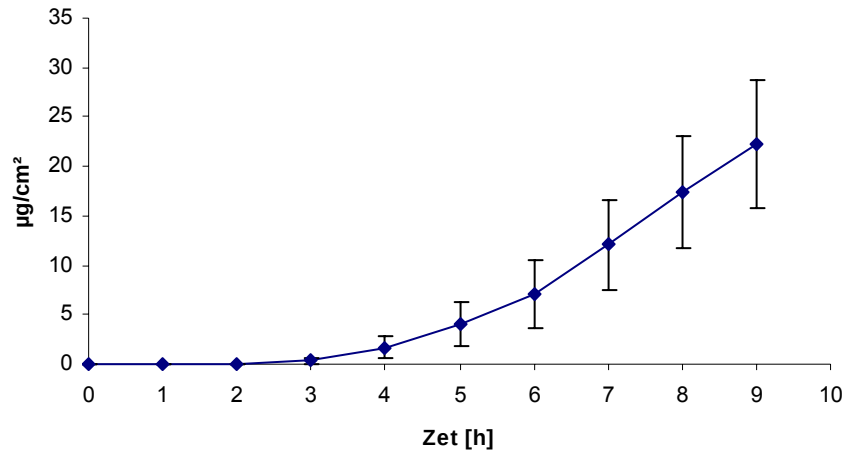


Abb. 8.15 Einfluß von 50%igem Ethanol auf die Na-Fluorescein Permeation in $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ in Abhängigkeit der Zeit, $n=4$ (siehe Tab. Seite 90)

Wie aus der Abb. 8.15 ersichtlich hatte eine Imprägnierung mit 50%igem Ethanol den gleichen Effekt auf die Na-Fluoresceinpermeation in Species 3 wie in Species 2.

8.3.2 Imprägnierung mit 2 mM Lysin-7 in 50%igem EtOH und Chitosan-glykolsäure Gel mit 2 mM Lys-7

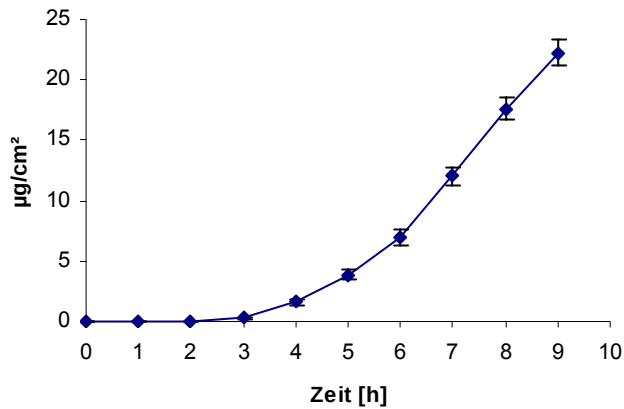


Abb. 8.16 Einfluß von 2 mM Lys-7 auf die Na-Fluorescein Permeation in $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ in Abhängigkeit der Zeit, $n=4$ (siehe Tab. Seite 91)

In Species 3 bewirkte eine Imprägnierung mit 2 mM Lys-7 eine ähnlich hohe Na-Fluoresceinpermeationssteigerung nach 9 Stunden Diffusion wie die Kontrolle.

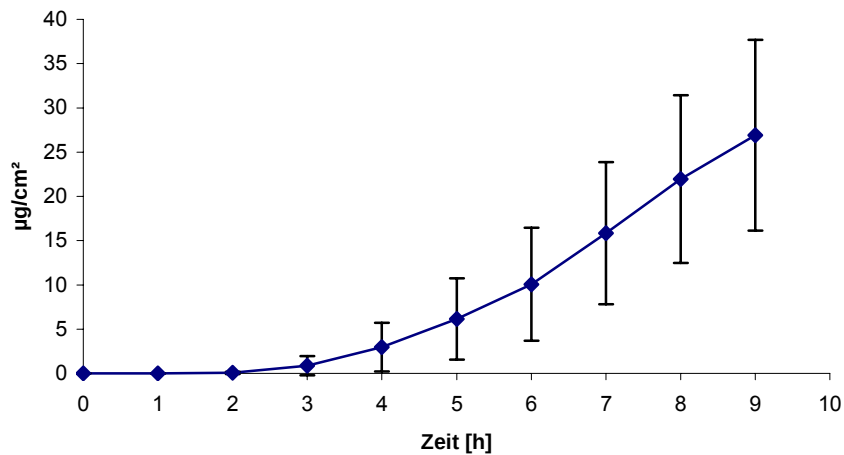


Abb. 8.17 Einfluß von Chitosan-glykolsäure Gel mit 2 mM Lys-7 auf die Na-Fluorescein Permeation in $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ in Abhängigkeit der Zeit, $n=4$ (siehe Tab. Seite 92)

Nach Imprägnierung mit einem lysinhaltigen Chitosan-glykolsäure Gel bewirkte das Oligo-Lysin eine deutliche Permeationssteigerung.

8.4 Differential Scanning Calorimetry (DSC)

Der Wassergehalt der porcinen Hautstücke wurde gravimetrisch bestimmt und mit 70% gemessen.

8.4.1 Porcine Haut imprägniert mit destilliertem Wasser

Für unsere Untersuchungen wurden die Hautstücke entweder mit Aqua dest. oder mit Oligo-Lysinlösungen jeweils 4 Stunden lang imprägniert, wobei das Thermogramm der mit Aqua dest. imprägnierten Hautstücke als Vergleichsthermogramm herangezogen wurde.

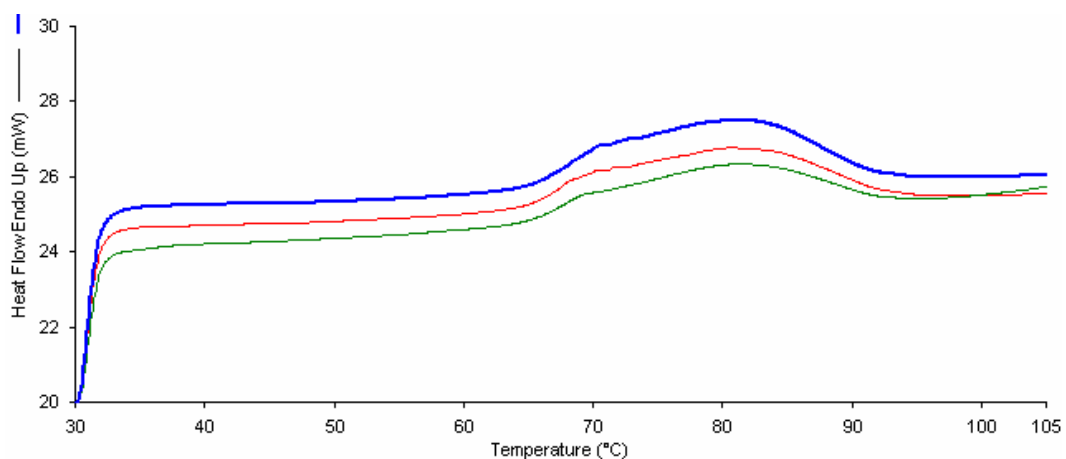


Abb. 8.18 Thermogramm von porciner Haut nach 4 Stunden Imprägnierung mit Aqua dest.

Wie aus der Abb. 8.18 ersichtlich zeigten sich nur breite Peaks, wobei ein charakteristischer Übergang bei ca. 80°C lag.

8.4.2 Porcine Haut imprägniert mit wässrigen Lösungen von Lysin-3, Lysin-5 und Lysin-7

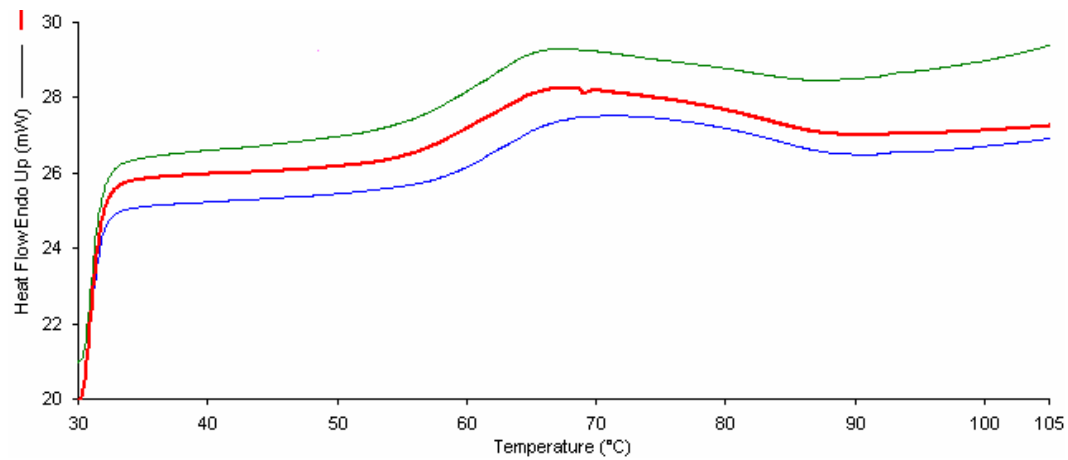


Abb. 8.19 Thermogramm von porciner Haut nach 4 Stunden Imprägnierung mit Lys-3

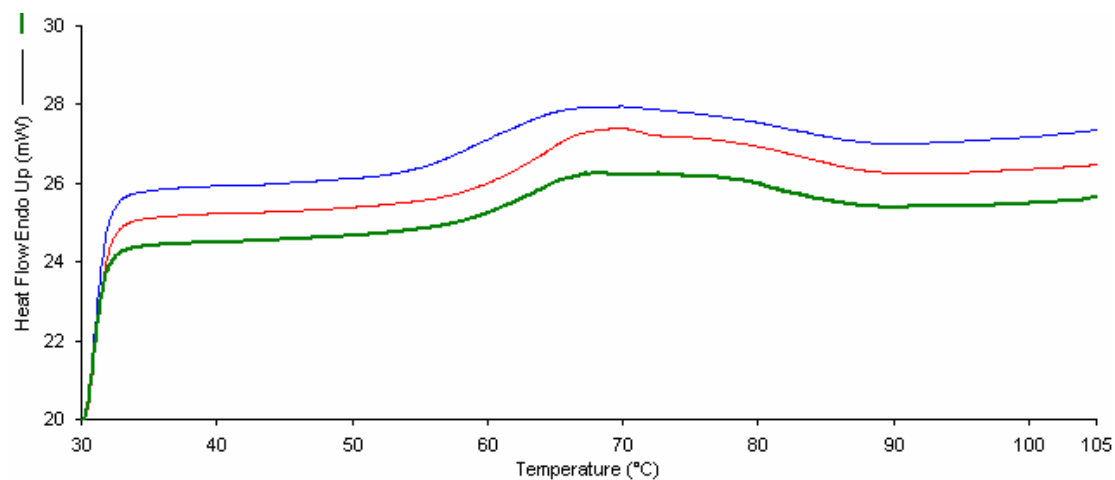


Abb. 8.20 Thermogramm von porciner Haut nach 4 Stunden Imprägnierung mit Lys-5

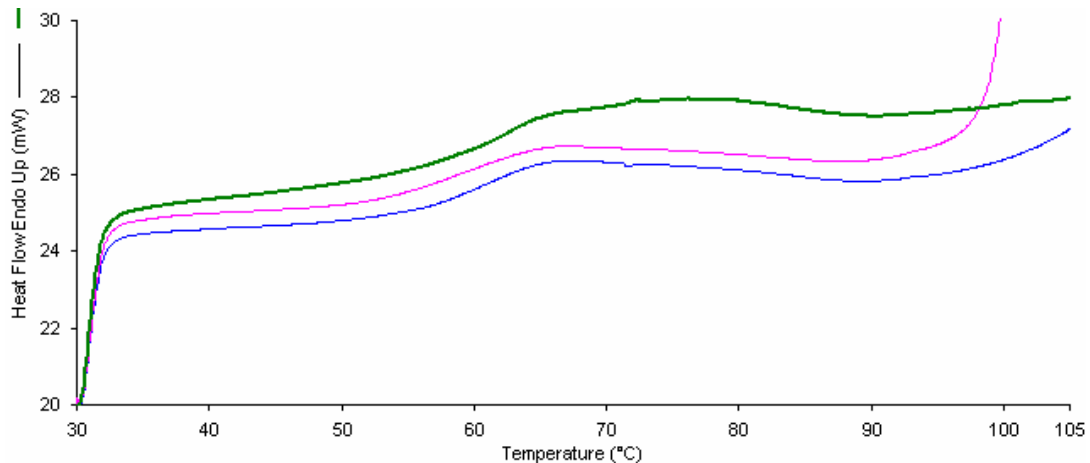


Abb. 8.21 Thermogramm von porciner Haut nach 4 Stunden Imprägnierung mit Lys-7

Wie aus allen drei vorangegangenen Abbildungen ersichtlich bewirkte eine Imprägnierung mit einer Oligo-Lysinlösung eine Verschiebung der Phasenübergangstemperatur nach ca. 68°C im Vergleich zum Kontrollwert von ca. 80°C. Wie in Tab. 8.1 dargestellt ist der Unterschied unter den einzelnen Oligo-Lysinen vernachlässigbar.

Peakparameter der DSC Kurven

Tab. 8.1 Peakparameter der DSC Kurven mit Standardabweichungen (n=3)

	Linearer onset (C°)	Tmax (C°)	Enthalpie (J/g)
4h imprägniert mit Aqua dest.	65,59 ± 0,54	80,60 ± 0,26	17,99 ± 0,96
4h imprägniert mit Lys-3	58,19 ± 1,96	67,51 ± 1,02	16,94 ± 1,11
4h imprägniert mit Lys-5	58,04 ± 1,46	68,02 ± 1,02	16,43 ± 0,81
4h imprägniert mit Lys-7	56,03 ± 2,25	68,27 ± 3,40	13,86 ± 2,47

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass eine Interaktion von Hautbestandteilen nach Imprägnierung mit verschiedenen Oligo-Lysinen gemessen werden konnte.

Um diese Unterschiede untereinander zu vergleichen sind in Abb. 8.22 die Mittelwerte der Thermogramme gegenübergestellt.

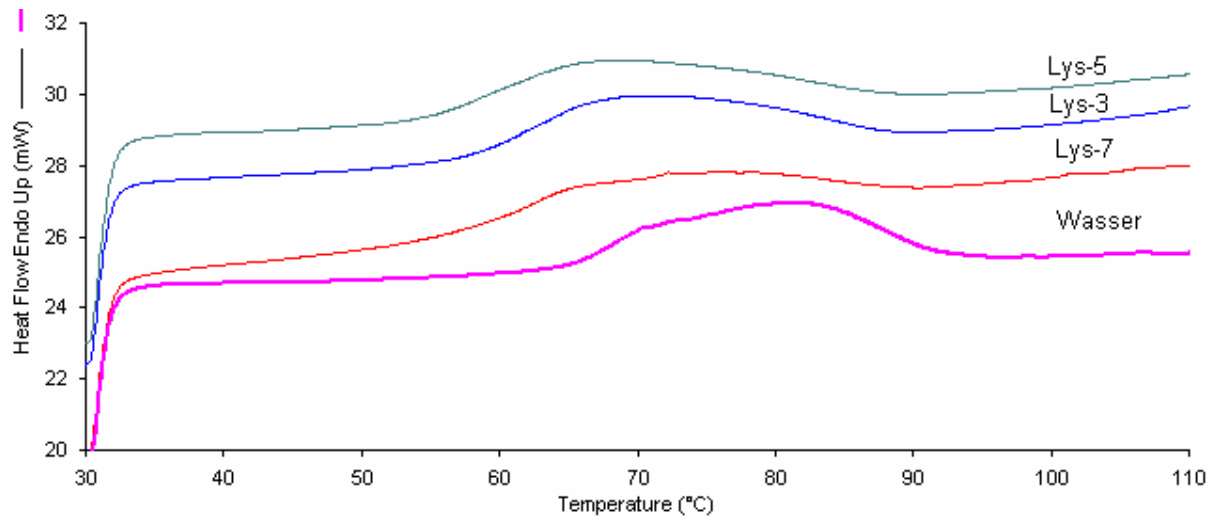


Abb. 8.22 Thermogramm von porciner Haut nach 4 Stunden Imprägnierung mit Wasser, Lys-3, 5 und 7 im Vergleich zueinander

9 Diskussion der Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit konnte bewiesen werden, dass definierte Oligo-Lysine die Hautpermeation des Modellarzneistoffes Na-Fluorescein positiv beeinflussen können. Eine Schwierigkeit bei den Untersuchungen waren die verschiedenen Permeationseigenschaften der unterschiedlichen Species, die hauptsächlich aufgrund der unterschiedlichen Schichtdicke zustande kamen.

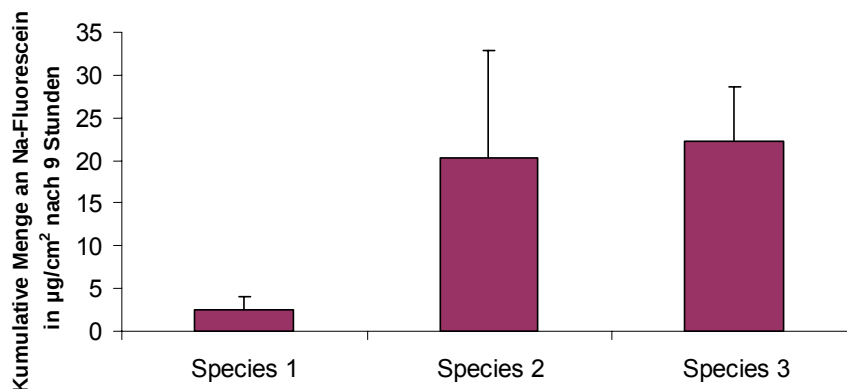


Abb. 9.1 Vergleich der kumulativen Mengen am permeierten Na-Fluorescein nach 9 Stunden für Ethanol Species 1-3

Da es in der vorliegenden Arbeit darauf ankam, den Effekt unterschiedlicher Imprägnierungen auf die Hautpermeation zu untersuchen, wurden alle Werte immer auf die entsprechenden Kontrollen bezogen. Zum Beispiel konnte eine gute Korrelation zwischen Species 1, 2 und 3 nach Imprägnierung von 2 mM Lys-7 gefunden werden.

Darüber hinaus ergab sich, dass eine Kombination mit dem oberflächenaktiven SDS und Oligo-Lysinen keine synergistische Wirkung auf die Hautpermeation brachte.

Eine Imprägnierung mit einer alkoholischen Lys-7 Lösung zeigte den größten Effekt auf die Na-Fluoresceinpermeation im Vergleich zu den anderen Oligo-Lysinen Lys-3 und Lys-5. Aus der Abb. 9.2 geht deutlich hervor, dass eine 14 stündige Imprägnierung mit 2 mM Lys-7 die höchste kumulative Permeation von der aufgetragenen Na-Fluoresceinmenge ergab.

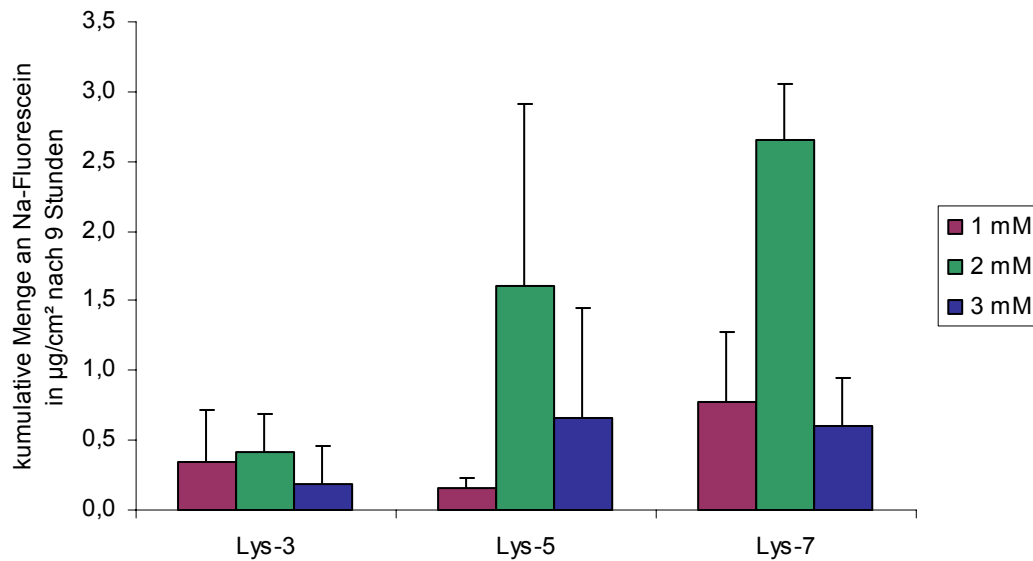


Abb. 9.2 Vergleich der kumulativen Mengen am permeierten Na-Fluorescein nach 9 Stunden für Lys-3, Lys-5 und Lys-7

Weiters ist ersichtlich, dass Lys-3 und Lys-5 geringere Einflüsse ausübten. Die relativ großen Standardabweichungen kommen dadurch zustande, dass es sich um biologisches Material handelte, das sehr unterschiedliche Eigenschaften aufweisen kann.

Interessanterweise zeigten Species 2 und 3 unterschiedliche Permeationsraten nach Imprägnierung mit einem lysinhaltigen Gel (siehe Abb. 8.14 und 8.17). Während bei Species 2 das Oligo-Lysin in diesem Fall sogar zu einer Erniedrigung der Permeation führte, kam es bei Species 3 zu einer Erhöhung der Permeation. Eine mögliche Erklärung könnte in der geringen Auftragemenge des Gels bei Species 2 liegen. Um Klarheit zu gewinnen, müsste die Versuchsanordnung mit neuer porciner Haut wiederholt werden.

Die genauen Veränderungen in den Hautstrukturen, die die eingesetzten Oligo-Lysine bewirkten, sind bisher nicht bekannt. Allerdings zeigte sich in DSC Untersuchungen, dass die Oligo-Lysine mit Hautbestandteilen Wechselwirkungen eingehen können, da die typischen Übergangstemperaturen zu geringeren Werten verschoben wurden. Möglicherweise wird dadurch die Fluidität erhöht. In der Literatur sind Übergangstemperaturen bei 60°C, 70°C und 100°C beschrieben, die interzellulärem Lipid, Protein-interzellulärem Lipid

und Keratin zugeordnet werden. Möglicherweise korreliert der Peak bei 80°C mit dem des in der Literatur angeführten Protein-interzellulären Lipids [46].

10 Zusammenfassung

Es ist bekannt, dass zellpenetrierende Peptide (CPPs) die Fähigkeit haben, konjugierte Proteine oder Oligonukleotide durch zelluläre Membranen zu transportieren. Für uns waren die kationischen CPPs von Bedeutung, da die Haut durch die Proteine negativ geladen ist. Die positive Ladung der CPPs kommt durch die Aminosäuren Lysin und Arginin zustande. Es ist auch bekannt, dass das anionische Tensid SDS in Kombination mit einem Polypeptid eine synergistisch penetrationsfördernde Wirkung ausübte.

Daher sollte in der vorliegenden Arbeit der Einfluß von Lys-3, Lys-5 und Lys-7 sowie diverser Kombinationen von 0,1%igem SDS mit den verschiedenen Oligo-Lysinen auf die Permeation von Na-Fluorescein durch Schweinehaut untersucht werden.

Dazu wurden Diffusionsversuche mittels Franz-Zellen und porciner Haut durchgeführt. Die Hautstücke wurden jeweils 14 Stunden lang mit der jeweiligen zu testenden Lösung bzw. dem Gel imprägniert. Danach wurde die Na-Fluoresceinlösung aufgetragen. Die gesamten Diffusionsversuche wurden 48 Stunden lang durchgeführt, wobei ein genauer Probenziehplan eingehalten wurde. Die Analytik wurde fluorimetrisch auf Mikrotiterplatten durchgeführt.

Da die verschiedenen Individuen aufgrund der unterschiedlichen Schichtdicke differierende Permeationsraten zeigten, war es wichtig, sich immer auf die entsprechenden Kontrollen zu beziehen.

Es konnte bewiesen werden, dass definierte Oligo-Lysine die Hautpermeation des Modellarzneistoffes Na-Fluorescein positiv beeinflussen können. Von allen getesteten Oligo-Lysinen zeigte 2 mM Lys-7 den größten Effekt auf die Hautpermeation von Na-Fluorescein. Die Ergebnisse nach Imprägnierung mit 2 mM Lys-7 korrelierten bei Species 1, 2 und 3.

Weiters ergab eine Kombination mit dem oberflächenaktiven SDS und Oligo-Lysinen keine weitere Erhöhung der Permeation von Na-Fluorescein durch die Haut.

Das am besten wirksame Lys-7 wurde zusätzlich noch in Chitosan-glykolsäure Gel eingearbeitet und dadurch nach Imprägnierung bei Species 2 eine Erniedrigung, bei Species 3 jedoch eine Erhöhung der Permeation der Na-Fluoresceinmenge durch die Haut erzielt. Möglicherweise lag der Grund dafür in der unterschiedlich großen Auftragemenge.

Um Wechselwirkungen zwischen den Oligo-lysinen mit Teilen der Haut zu visualisieren wurden Versuche mittels Differential Scanning Calorimetry (DSC) durchgeführt. Dafür wurden die Hautstücke vier Stunden lang mit einer wässrigen Lösung von Lys-3, Lys-5 und Lys-7 imprägniert. Als Vergleichswert dienten Hautstücke, die vier Stunden lang in Aqua dest. eingelegt waren. Die daraus resultierenden Thermogramme zeigten eine mögliche Interaktion von Oligo-Lysinen mit Haut, da die typischen Übergangstemperaturen zu geringeren Werten verschoben wurden. Möglicherweise könnte dadurch die Fluidität der Hautmembran erhöht werden.

Abschließend kann festgestellt werden, dass die untersuchten Oligo-Lysine signifikante Effekte auf die Hautpermeation des Modellstoffes Na-Fluorescein in Abhängigkeit ihrer Molekülgröße ausübten.

Ob und wie weit die hier untersuchten Oligo-Lysine in neue Formulierungen wie z.B. Nanoemulsionen oder Liposomen und in Kombination mit pharmazeutischen Wirkstoffen eingesetzt und Effekte zeigen können, soll Gegenstand weiterer Untersuchungen sein.

11 Literaturverzeichnis

- [1] L. N. Patel, J. L. Zaro, W. C. Shen. Cell Penetrating Peptides: Intracellular Pathways and Pharmaceutical Perspectives. *Pharm. Res.* 24 (2007) 1977-1992.
- [2] E. L. Synder, S. F. Dowdy. Cell Penetrating Peptides in Drug Delivery. *Pharm. Res.* 21 (2004) 389-393.
- [3] M. P. Y. Piemi, D. Korner, S. Benita, J.-P. Marty. Positively and negatively charged submicron emulsions for enhanced topical delivery of antifungal drugs. *J. Control. Release* 58 (1999) 177-187.
- [4] L. B. Lopes, C. M. Brophy, E. Furnish, C. R. Flynn, O. Sparks, P. Komalavilas, L. Joshi, A. Panitch, M. V. L. B. Bentley. Comparative Study of the Skin Protein Transduction Domains and a Conjugated Peptide. *Pharm. Res.* 22 (2005) 750-757.
- [5] Y. C. Kim, P. J. Ludovice, M. R. Prausitz. Transdermal delivery enhanced by magainin pore-forming peptide. *J. Control. Release* 122 (2007) 375-383.
- [6] R. Neubert, W. Wohlrab, W. Marsch. Dermatopharmazie, Vehikel-Wirkstoffe-Pharmakologie. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart 2001.
- [7] R. Voigt. Pharmazeutische Technologie. 10. Auflage. Deutscher Apotheker Verlag Stuttgart 2006.
- [8] G. Thews, E. Mutschler, P. Vaupel. Anatomie Physiologie Pathophysiologie des Menschen. 5. Auflage. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart 1999.

- [9] K. H. Bauer, K- H. Frömming, C. Führer. Lehrbuch der pharmazeutischen Technologie. 8. Auflage. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart 2006.
- [10] Hunnius, Pharmazeutisches Wörterbuch. 9. Auflage. Walter de Gruyter Berlin- New York 2004.
- [11] E. W. Smith, H. I. Maibach. Percutaneous Penetration Enhancers. CRC Press, Inc. 1995.
- [12] R. Niedner, J. Ziegenmeyer. Dermatika, Therapeutischer Einsatz, Pharmakologie und Pharmazie. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart 1992.
- [13] S. Höller, V. Klang, C. Valenta. Skin-compatible lecithine drug delivery systems for fluconazole: effect of phosphatidylethanolamine and oleic acid on skin permeation. J. Pharm. Pharmacol. 60 (2008) 587-591.
- [14] Psychrembel, Klinisches Wörterbuch. 260. Auflage. Walter de Gruyter Berlin- New York 2004.
- [15] J. Koolman, K-H. Röhm. Taschenatlas der Biochemie. 3. Auflage. Georg Thieme Verlag Stuttgart New York 2003.
- [16] W. Blaschek, S. Ebel, E. Hackenthal, U. Holzgrabe, K. Keller, J. Reichling, V. Schulz. Hagers Enzyklopädie der Arzneistoffe und Drogen. 6. Auflage. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart 2007.
- [17] Hoffmann – La Roche AG, Urban und Fischer. Roche Lexikon. 5. Auflage. Urban und Fischer München – Jena 2003.
- [18] J. Falbe, M. Regitz. Rompp Lexikon Chemie. 10. Auflage. Georg Thieme Verlag Stuttgart, New York 1997.

- [19] G. L. Zubay. Biochemie. Übersetzung der 4. Auflage. McGraw Hill 2000.
- [20] <http://www.nutrivea-de.com/Lysin.htm> 02.06.08.
- [21] D. Steinhilber, M. Schubert-Zsilavecz, H. J. Roth. Medizinische Chemie, Targets und Arzneistoffe. Deutscher Apotheker Verlag Stuttgart 2005.
- [22] Europäisches Arzneibuch Grundwerk, Band 2. 5. Ausgabe. Verlag Österreich GmbH 2005.
- [23] Merck Chemikalien und Reagenzien 2008-2010.
- [24] E. Heymann. Haut, Haar und Kosmetik. 2. Auflage. Verlag Hans Huber 2003.
- [25] B. B. Herlofson, P. Barkvoll. Sodium lauryl sulfate and recurrent aphthous ulcers. A preliminary study. Acta Odontol. Scand. 52 (1994) 257-259.
- [26] G. Löffler, P. E. Petrides, P. C. Heinrich. Biochemie und Pathobiochemie. 8. Auflage. Springer Medizin Verlag Heidelberg 2007.
- [27] F. Lottspeich, J. W. Engels. Bioanalytik. 2. Auflage. Spektrum Akademischer Verlag 2006.
- [28] Laborunterlagen zum Praktikum Arzneimittelanalytik und Wirkstoffentwicklung (einschl. biochemischer Methoden) WS 2007.
- [29] J. Piret, S. Roy, M. Gagnon, S. Landry, A. Desormeaux, R. F. Omar, M. G. Bergeron. Comparative Study of Mechanisms of Herpes Simplex Virus Inactivation by Sodium Lauryl Sulfate and n-Lauroylsarcosine. Antimicrob. Agents and Chemother. 46 (2002) 2933-2942.
- [30] H. P. Fiedler. Lexikon der Hilfsstoffe für Pharmazeutische Kosmetik und angrenzende Gebiete. 5. Auflage. Editio Cantor Verlag 2002.

- [31] S. A. Agnihotri, N. N. Mallikarjuna, T. M. Aminabhavi. Recent advances on chitosan-based micro- and nanoparticles in drug delivery. *J. Control. Release* 100 (2004) 5-28.
- [32] T. Cerchiara, B. Luppi, F. Bigucci, I. Orienti, V. Zecchi. Physically cross-linked chitosan hydrogels as topical vehicles for hydrophilic drugs. *J. Pharm. Pharmacol.* 54 (2002) 1453-1459.
- [33] J. M. Smith. Chitosan and Transdermal Drug Delivery. *Retinoids* 19 (2003) 72-75.
- [34] J. Berger, M. Reist, J. M. Mayer, O. Felt, N. A. Peppas, R. Gurny. Structure and interactions in covalently and ionically crosslinked chitosan hydrogels for biomedical applications. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 57 (2004) 19-34.
- [35] <http://www.enius.de/schadstoffe/glykolsaeure.html> 15.04.08.
- [36] W. Raab, U. Kindl. *Pflegekosmetik*. 4. Auflage. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart 2004.
- [37] P. Perugini, I. Genta, F. Pavanetto, B. Conti, S. Scalia, A. Baruffini. Study on glycolic acid delivery by liposomes and microspheres. *Int. J. Pharm.* 196 (2000) 51-61.
- [38] H. Freyler. *Augenheilkunde*. 2. Auflage. Springer Verlag Wien- New York 1985.
- [39] www.mrcophth.com/ffainterpretation//ffaprinciples.html 22.04.08.
- [40] G. Rücker, M. Neugebauer, G. G. Willems. *Instrumentelle pharmazeutische Analytik*. 3. Auflage. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart 2001.

[41] E. Ehlers. Analytik II, Kurzlehrbuch quantitative und instrumentelle pharmazeutische Analytik. 10. Auflage. Deutscher Apotheker Verlag Stuttgart 2002.

[42] A. Dominik, D. Steinhilber. Instrumentelle Analytik. 2. Auflage. Deutscher Apotheker Verlag Stuttgart 2002.

[43] http://www.univie.ac.at/chemwiki/pcprakt:bspa3:start#a.1.3_literatur
08.05.08.

[44] http://www.uni-weimar.de/Bauing/bauchemie/Downloads/Struktur/MethStrAufkl_09.pdf 08.05.08.

[45] H. Leuenberger. Martin, Physikalische Pharmazie. 4. Auflage. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart 2002.

[46] J. Hadgraft, R. H. Guy. Transdermal Drug Delivery, Developmental Issues and Research Initiatives. Marcel Dekker 1989.

12 Anhang

12.1 Tabellen der Diffusionsstudien

Folgende Ergebnisse wurden unter Einsatz von Species 1 erzielt

Tab. 12.1 Einfluss von 50%igem Ethanol auf die Hautpermeation von Na-Fluorescein in $\mu\text{g}/\text{cm}^2$

Zeit [h]	Zelle 1	Zelle 2	Zelle 3	Mittelwert	STABW
0	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
2	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
3	n.d.	n.d.	0,0040	0,0013	0,0023
4	n.d.	0,0211	0,0344	0,0185	0,0174
5	0,0112	0,1224	0,1165	0,0834	0,0626
6	0,0901	0,4838	0,2987	0,2909	0,1969
7	0,2763	1,1127	0,6470	0,6786	0,4191
8	0,7174	2,5111	1,3480	1,5255	0,9100
9	1,3838	4,3203	2,0716	2,5919	1,5358

Tab. 12.2 Einfluss von 50%igem Ethanol auf die Hautpermeation von Na-Fluorescein in % (m/m)

Zeit [h]	Zelle 1	Zelle 2	Zelle 3	Mittelwert	STABW
0	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
2	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
3	n.d.	n.d.	0,0006	0,0002	0,0004
4	n.d.	0,0033	0,0054	0,0029	0,0027
5	0,0018	0,0193	0,0183	0,0131	0,0099
6	0,0142	0,0762	0,0470	0,0458	0,0310
7	0,0435	0,1753	0,1019	0,1069	0,0660
8	0,1130	0,3956	0,2124	0,2403	0,1433
9	0,2180	0,6806	0,3263	0,4083	0,2419

Tab. 12.3 Einfluss von Aqua dest. auf die Hautpermeation von Na-Fluorescein
in $\mu\text{g}/\text{cm}^2$

Zeit [h]	Zelle 1	Zelle 2	Zelle 3	Mittelwert	STABW
0	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
1	0,0115	0,0141	0,0133	0,0130	0,0013
2	0,0261	0,0318	0,0305	0,0294	0,0030
3	0,0350	0,0414	0,0401	0,0388	0,0034
4	0,0443	0,0518	0,0502	0,0488	0,0039
5	0,0448	0,0532	0,0511	0,0497	0,0044
6	0,0508	0,0639	0,0566	0,0571	0,0066
7	0,0816	0,1115	0,0860	0,0931	0,0161
8	0,1488	0,2038	0,1439	0,1655	0,0332
9	0,2975	0,3867	0,2634	0,3159	0,0637

Tab. 12.4 Einfluss von Aqua dest. auf die Hautpermeation von Na-Fluorescein
in % (m/m)

Zeit [h]	Zelle 1	Zelle 2	Zelle 3	Mittelwert	STABW
0	n. d.	n. d.	n. d.	n.d.	n.d.
1	0,0018	0,0022	0,0021	0,0020	0,0002
2	0,0041	0,0050	0,0048	0,0046	0,0005
3	0,0055	0,0065	0,0063	0,0061	0,0005
4	0,0070	0,0082	0,0079	0,0077	0,0006
5	0,0070	0,0084	0,0080	0,0078	0,0007
6	0,0080	0,0101	0,0089	0,0090	0,0010
7	0,0129	0,0176	0,0136	0,0147	0,0025
8	0,0234	0,0321	0,0227	0,0261	0,0052
9	0,0469	0,0609	0,0415	0,0498	0,0100

Tab. 12.5 Einfluss von 0,1%igem SDS in Aqua dest. auf die Hautpermeation von Na-Fluorescein in $\mu\text{g}/\text{cm}^2$

Zeit [h]	Zelle 1	Zelle 2	Zelle 3	Mittelwert	STABW
0	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
1	0,0146	0,0143	0,0169	0,0153	0,0014
2	0,0333	0,0311	0,0359	0,0334	0,0024
3	0,0430	0,0408	0,0459	0,0432	0,0026
4	0,0539	0,0508	0,0565	0,0537	0,0029
5	0,0628	0,0516	0,0603	0,0582	0,0059
6	0,1064	0,0569	0,0836	0,0823	0,0248
7	0,2501	0,0842	0,1764	0,1702	0,0831
8	0,5010	0,1336	0,3449	0,3265	0,1844
9	0,9747	0,2316	0,6701	0,6255	0,3736

Tab. 12.6 Einfluss von 0,1%igem SDS in Aqua dest. auf die Hautpermeation von Na-Fluorescein in % (m/m)

Zeit [h]	Zelle 1	Zelle 2	Zelle 3	Mittelwert	STABW
0	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
1	0,0023	0,0023	0,0027	0,0024	0,0002
2	0,0052	0,0049	0,0057	0,0053	0,0004
3	0,0068	0,0064	0,0072	0,0068	0,0004
4	0,0085	0,0080	0,0089	0,0085	0,0005
5	0,0099	0,0081	0,0095	0,0092	0,0009
6	0,0168	0,0090	0,0132	0,0130	0,0039
7	0,0394	0,0133	0,0278	0,0268	0,0131
8	0,0789	0,0211	0,0543	0,0514	0,0290
9	0,1535	0,0365	0,1056	0,0985	0,0588

Tab. 12.7 Einfluss von 0,1%igem SDS in 50%igem Ethanol auf die Hautpermeation von Na-Fluorescein in $\mu\text{g}/\text{cm}^2$

Zeit [h]	Zelle 1	Zelle 2	Zelle 3	Mittelwert	STABW
0	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
1	0,0002	n.d.	n.d.	0,0001	0,0001
2	0,0003	n.d.	n.d.	0,0001	0,0002
3	0,0003	n.d.	n.d.	0,0001	0,0002
4	0,0038	n.d.	0,0019	0,0019	0,0019
5	0,0220	0,0021	0,0213	0,0151	0,0113
6	0,0782	0,0121	0,0862	0,0588	0,0407
7	0,1977	0,0369	0,2316	0,1554	0,1040
8	0,4422	0,1007	0,5202	0,3544	0,2231
9	0,7628	0,2025	0,9247	0,6300	0,3789

Tab. 12.8 Einfluss von 0,1%igem SDS in 50%igem Ethanol auf die Hautpermeation von Na-Fluorescein in % (m/m)

Zeit [h]	Zelle 1	Zelle 2	Zelle 3	Mittelwert	STABW
0	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
2	0,0001	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
3	0,0001	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
4	0,0006	n.d.	0,0003	0,0003	0,0003
5	0,0035	0,0003	0,0034	0,0024	0,0018
6	0,0123	0,0019	0,0136	0,0093	0,0064
7	0,0311	0,0058	0,0365	0,0245	0,0164
8	0,0697	0,0159	0,0820	0,0558	0,0351
9	0,1202	0,0319	0,1457	0,0992	0,0597

Tab. 12.9 Einfluss von 1 mM Lys-3 auf die Hautpermeation von Na-Fluorescein in $\mu\text{g}/\text{cm}^2$

Zeit [h]	Zelle 1	Zelle 2	Zelle 3	Zelle 4	Mittelwert	STABW
0	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
1	0,0003	n.d.	n.d.	n.d.	0,0001	0,0002
2	0,0003	n.d.	n.d.	n.d.	0,0001	0,0002
3	0,0003	n.d.	n.d.	n.d.	0,0001	0,0002
4	0,0003	n.d.	n.d.	n.d.	0,0001	0,0002
5	0,0003	0,0039	n.d.	0,0037	0,0020	0,0021
6	0,0006	0,0222	n.d.	0,0476	0,0176	0,0225
7	0,0037	0,0779	0,0008	0,1498	0,0580	0,0708
8	0,0188	0,2384	0,0146	0,4185	0,1725	0,1944
9	0,0533	0,4882	0,0442	0,8098	0,3489	0,3706

Tab. 12.10 Einfluss von 1 mM Lys-3 auf die Hautpermeation von Na-Fluorescein in % (m/m)

Zeit [h]	Zelle 1	Zelle 2	Zelle 3	Zelle 4	Mittelwert	STABW
0	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
2	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
3	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
4	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
5	n.d.	0,0006	n.d.	0,0006	0,0003	0,0003
6	0,0001	0,0035	n.d.	0,0075	0,0028	0,0035
7	0,0006	0,0123	0,0001	0,0236	0,0091	0,0112
8	0,0030	0,0376	0,0023	0,0659	0,0272	0,0306
9	0,0084	0,0769	0,0070	0,1276	0,0550	0,0584

Tab. 12.11 Einfluss von 2 mM Lys-3 auf die Hautpermeation von Na-Fluorescein in $\mu\text{g}/\text{cm}^2$

Zeit [h]	Zelle 1	Zelle 2	Zelle 3	Mittelwert	STABW
0	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
1	0,0013	0,0054	0,0011	0,0026	0,0024
2	0,0013	0,0054	0,0011	0,0026	0,0024
3	0,0013	0,0054	0,0011	0,0026	0,0024
4	0,0133	0,0186	0,0142	0,0154	0,0028
5	0,0295	0,0423	0,0317	0,0345	0,0069
6	0,0544	0,0933	0,0536	0,0671	0,0227
7	0,1063	0,1929	0,0759	0,1250	0,0607
8	0,2223	0,4546	0,1195	0,2655	0,1717
9	0,3795	0,7028	0,1679	0,4168	0,2694

Tab. 12.12 Einfluss von 2 mM Lys-3 auf die Hautpermeation von Na-Fluorescein in % (m/m)

Zeit [h]	Zelle 1	Zelle 2	Zelle 3	Mittelwert	STABW
0	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
1	0,0002	0,0009	0,0002	0,0004	0,0004
2	0,0002	0,0009	0,0002	0,0004	0,0004
3	0,0002	0,0009	0,0002	0,0004	0,0004
4	0,0021	0,0029	0,0022	0,0024	0,0004
5	0,0046	0,0067	0,0050	0,0054	0,0011
6	0,0086	0,0147	0,0084	0,0106	0,0036
7	0,0167	0,0304	0,0120	0,0197	0,0096
8	0,0350	0,0716	0,0188	0,0418	0,0270
9	0,0598	0,1107	0,0265	0,0657	0,0424

Tab. 12.13 Einfluss von 3 mM Lys-3 auf die Hautpermeation von Na-Fluorescein in $\mu\text{g}/\text{cm}^2$

Zeit [h]	Zelle 1	Zelle 2	Zelle 3	Mittelwert	STABW
0	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
1	0,0018	n.d.	0,0026	0,0015	0,0013
2	0,0018	n.d.	0,0026	0,0015	0,0013
3	0,0018	n.d.	0,0026	0,0015	0,0013
4	0,0018	0,0082	0,0026	0,0042	0,0035
5	0,0018	0,0082	0,0026	0,0042	0,0035
6	0,0018	0,0082	0,0026	0,0042	0,0035
7	0,0030	0,0082	0,0048	0,0053	0,0026
8	0,0179	0,0082	0,0165	0,0142	0,0052
9	0,0636	0,0082	0,5059	0,1925	0,2727

Tab. 12.14 Einfluss von 3 mM Lys-3 auf die Hautpermeation von Na-Fluorescein in % (m/m)

Zeit [h]	Zelle 1	Zelle 2	Zelle 3	Mittelwert	STABW
0	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
1	0,0003	n.d.	0,0004	0,0002	0,0002
2	0,0003	n.d.	0,0004	0,0002	0,0002
3	0,0003	n.d.	0,0004	0,0002	0,0002
4	0,0003	0,0013	0,0004	0,0007	0,0005
5	0,0003	0,0013	0,0004	0,0007	0,0005
6	0,0003	0,0013	0,0004	0,0007	0,0005
7	0,0005	0,0013	0,0008	0,0008	0,0004
8	0,0028	0,0013	0,0026	0,0022	0,0008
9	0,0100	0,0013	0,0797	0,0303	0,0430

Tab. 12.15 Einfluss von 1 mM Lys-5 auf die Hautpermeation von Na-Fluorescein in $\mu\text{g}/\text{cm}^2$

Zeit [h]	Zelle 1	Zelle 2	Zelle 3	Zelle 4	Mittelwert	STABW
0	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
1	0,0008	0,0014	0,0011	0,0007	0,0010	0,0003
2	0,0103	0,0131	0,0011	0,0007	0,0063	0,0063
3	0,0210	0,0432	0,0011	0,0007	0,0165	0,0201
4	0,0243	0,0604	0,0011	0,0007	0,0216	0,0281
5	0,0287	0,0640	0,0011	0,0007	0,0236	0,0299
6	0,0317	0,0786	0,0079	0,0016	0,0300	0,0349
7	0,0372	0,0843	0,0366	0,0116	0,0424	0,0304
8	0,0721	0,1065	0,1324	0,0540	0,0913	0,0350
9	0,0820	0,1536	0,2582	0,1161	0,1525	0,0763

Tab. 12.16 Einfluss von 1 mM Lys-5 auf die Hautpermeation von Na-Fluorescein in % (m/m)

Zeit [h]	Zelle 1	Zelle 2	Zelle 3	Zelle 4	Mittelwert	STABW
0	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
1	0,0001	0,0002	0,0002	0,0001	0,0002	n.d.
2	0,0016	0,0021	0,0002	0,0001	0,0010	0,0010
3	0,0033	0,0068	0,0002	0,0001	0,0026	0,0032
4	0,0038	0,0095	0,0002	0,0001	0,0034	0,0044
5	0,0045	0,0101	0,0002	0,0001	0,0037	0,0047
6	0,0050	0,0124	0,0012	0,0003	0,0047	0,0055
7	0,0059	0,0133	0,0058	0,0018	0,0067	0,0048
8	0,0114	0,0168	0,0209	0,0085	0,0144	0,0055
9	0,0129	0,0242	0,0407	0,0183	0,0240	0,0120

Tab. 12.17 Einfluss von 2 mM Lys-5 auf die Hautpermeation von Na-Fluorescein in $\mu\text{g}/\text{cm}^2$

Zeit [h]	Zelle 1	Zelle 2	Zelle 3	Mittelwert	STABW
0	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
2	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
3	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
4	0,0004	0,0128	n.d.	0,0044	0,0073
5	0,0195	0,0777	n.d.	0,0324	0,0404
6	0,1477	0,3419	0,0002	0,1633	0,1714
7	0,3903	0,7312	0,0109	0,3775	0,3603
8	0,9942	1,5623	0,0661	0,8742	0,7553
9	1,8662	2,7621	0,1857	1,6047	1,3080

Tab. 12.18 Einfluss von 2 mM Lys-5 auf die Hautpermeation von Na-Fluorescein in % (m/m)

Zeit [h]	Zelle 1	Zelle 2	Zelle 3	Mittelwert	STABW
0	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
2	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
3	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
4	0,0001	0,0020	n.d.	0,0007	0,0011
5	0,0031	0,0122	n.d.	0,0051	0,0064
6	0,0233	0,0539	n.d.	0,0257	0,0270
7	0,0615	0,1152	0,0017	0,0595	0,0568
8	0,1566	0,2461	0,0104	0,1377	0,1190
9	0,2940	0,4351	0,0293	0,2528	0,2060

Tab. 12.19 Einfluss von 3 mM Lys-5 auf die Hautpermeation von Na-Fluorescein in $\mu\text{g}/\text{cm}^2$

Zeit [h]	Zelle 1	Zelle 2	Zelle 3	Mittelwert	STABW
0	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
1	0,0001	0,0014	0,0016	0,0010	0,0008
2	0,0001	0,0014	0,0016	0,0010	0,0008
3	0,0001	0,0171	0,0016	0,0063	0,0094
4	0,0001	0,0171	0,0337	0,0169	0,0168
5	0,0001	0,0171	0,0712	0,0294	0,0371
6	0,0050	0,0202	0,1851	0,0701	0,0999
7	0,0325	0,0359	0,4487	0,1724	0,2393
8	0,1096	0,0867	0,9116	0,3693	0,4698
9	0,2580	0,1686	1,5643	0,6636	0,7813

Tab. 12.20 Einfluss von 3 mM Lys-5 auf die Hautpermeation von Na-Fluorescein in % (m/m)

Zeit [h]	Zelle 1	Zelle 2	Zelle 3	Mittelwert	STABW
0	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
1	n.d.	0,0002	0,0003	0,0002	0,0001
2	n.d.	0,0002	0,0003	0,0002	0,0001
3	n.d.	0,0027	0,0003	0,0010	0,0015
4	n.d.	0,0027	0,0053	0,0027	0,0026
5	n.d.	0,0027	0,0112	0,0046	0,0058
6	0,0008	0,0032	0,0292	0,0110	0,0157
7	0,0051	0,0057	0,0707	0,0272	0,0377
8	0,0173	0,0137	0,1436	0,0582	0,0740
9	0,0406	0,0266	0,2464	0,1045	0,1231

Tab. 12.21 Einfluss von 1%igem Lys-5 ($\cong 0,015$ M) in Aqua dest. auf die Hautpermeation von Na-Fluorescein in $\mu\text{g}/\text{cm}^2$

Zeit [h]	Zelle 1	Zelle 2	Zelle 3	Mittelwert	STABW
0	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
1	n.d.	0,0157	0,0165	0,0107	0,0093
2	n.d.	0,0348	0,0331	0,0226	0,0196
3	n.d.	0,0447	0,0432	0,0293	0,0254
4	n.d.	0,0559	0,0540	0,0367	0,0318
5	n.d.	0,0562	0,0574	0,0379	0,0328
6	n.d.	0,0569	0,0746	0,0438	0,0390
7	n.d.	0,0648	0,1352	0,0667	0,0676
8	0,0029	0,0759	0,2357	0,1048	0,1191
9	0,0163	0,1010	0,4120	0,1764	0,2084

Tab. 12.22 Einfluss von 1%igem Lys-5 ($\cong 0,015$ M) in Aqua dest. auf die Hautpermeation von Na-Fluorescein in % (m/m)

Zeit [h]	Zelle 1	Zelle 2	Zelle 3	Mittelwert	STABW
0	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
1	n.d.	0,0025	0,0026	0,0017	0,0015
2	n.d.	0,0055	0,0052	0,0036	0,0031
3	n.d.	0,0070	0,0068	0,0046	0,0040
4	n.d.	0,0088	0,0085	0,0058	0,0050
5	n.d.	0,0088	0,0090	0,0060	0,0052
6	n.d.	0,0090	0,0117	0,0069	0,0061
7	n.d.	0,0102	0,0213	0,0105	0,0106
8	0,0005	0,0120	0,0371	0,0165	0,0188
9	0,0026	0,0159	0,0649	0,0278	0,0328

Tab. 12.23 Einfluss von 1 mM Lys-7 auf die Hautpermeation von Na-Fluorescein in $\mu\text{g}/\text{cm}^2$

Zeit [h]	Zelle 1	Zelle 2	Zelle 3	Mittelwert	STABW
0	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
1	0,0027	0,0044	0,0015	0,0029	0,0015
2	0,0027	0,0044	0,0015	0,0029	0,0015
3	0,0027	0,0044	0,0015	0,0029	0,0015
4	0,0027	0,0046	0,0075	0,0049	0,0024
5	0,0076	0,0086	0,0419	0,0194	0,0195
6	0,0306	0,0272	0,1242	0,0606	0,0550
7	0,1057	0,0821	0,3449	0,1776	0,1454
8	0,2686	0,2021	0,7424	0,4043	0,2946
9	0,5627	0,4077	1,3493	0,7732	0,5049

Tab. 12.24 Einfluss von 1 mM Lys-7 auf die Hautpermeation von Na-Fluorescein in % (m/m)

Zeit [h]	Zelle 1	Zelle 2	Zelle 3	Mittelwert	STABW
0	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
1	0,0004	0,0007	0,0002	0,0005	0,0002
2	0,0004	0,0007	0,0002	0,0005	0,0002
3	0,0004	0,0007	0,0002	0,0005	0,0002
4	0,0004	0,0007	0,0012	0,0008	0,0004
5	0,0012	0,0014	0,0066	0,0031	0,0031
6	0,0048	0,0043	0,0196	0,0096	0,0087
7	0,0167	0,0129	0,0543	0,0280	0,0229
8	0,0423	0,0318	0,1169	0,0637	0,0464
9	0,0886	0,0642	0,2126	0,1218	0,0795

Tab. 12.25 Einfluss von 2 mM Lys-7 auf die Hautpermeation von Na-Fluorescein in $\mu\text{g}/\text{cm}^2$

Zeit [h]	Zelle 1	Zelle 2	Zelle 3	Mittelwert	STABW
0	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
1	0,0016	0,0027	0,0016	0,0020	0,0007
2	0,0016	0,0027	0,0016	0,0020	0,0007
3	0,0016	0,0029	0,0043	0,0029	0,0013
4	0,0124	0,0292	0,0468	0,0295	0,0172
5	0,0625	0,1215	0,1530	0,1124	0,0459
6	0,2180	0,4019	0,3858	0,3352	0,1019
7	0,6064	0,9511	0,8490	0,8022	0,1771
8	1,3067	1,9056	1,6709	1,6277	0,3018
9	2,2633	3,0476	2,6617	2,6575	0,3922

Tab. 12.26 Einfluss von 2 mM Lys-7 auf die Hautpermeation von Na-Fluorescein in % (m/m)

Zeit [h]	Zelle 1	Zelle 2	Zelle 3	Mittelwert	STABW
0	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
1	0,0002	0,0004	0,0003	0,0003	0,0001
2	0,0002	0,0004	0,0003	0,0003	0,0001
3	0,0002	0,0004	0,0007	0,0005	0,0002
4	0,0020	0,0046	0,0074	0,0046	0,0027
5	0,0099	0,0191	0,0241	0,0177	0,0072
6	0,0343	0,0633	0,0608	0,0528	0,0160
7	0,0955	0,1498	0,1337	0,1264	0,0279
8	0,2058	0,3002	0,2632	0,2564	0,0475
9	0,3565	0,4801	0,4193	0,4186	0,0618

Tab. 12.27 Einfluss von 3 mM Lys-7 auf die Hautpermeation von Na-Fluorescein in $\mu\text{g}/\text{cm}^2$

Zeit [h]	Zelle 1	Zelle 2	Zelle 3	Mittelwert	STABW
0	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
1	0,0034	0,0002	0,0006	0,0014	0,0017
2	0,0034	0,0021	0,0006	0,0021	0,0014
3	0,0034	0,0030	0,0006	0,0023	0,0015
4	0,0167	0,0160	0,0128	0,0152	0,0021
5	0,0402	0,0340	0,0291	0,0345	0,0056
6	0,0905	0,0642	0,0463	0,0670	0,0223
7	0,2519	0,1299	0,0809	0,1542	0,0881
8	0,5932	0,2770	0,1741	0,3481	0,2184
9	0,9864	0,5143	0,2951	0,5986	0,3533

Tab. 12.28 Einfluss von 3 mM Lys-7 auf die Hautpermeation von Na-Fluorescein in % (m/m)

Zeit [h]	Zelle 1	Zelle 2	Zelle 3	Mittelwert	STABW
0	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
1	0,0005	n.d.	0,0001	0,0002	0,0003
2	0,0005	0,0003	0,0001	0,0003	0,0002
3	0,0005	0,0005	0,0001	0,0004	0,0002
4	0,0026	0,0025	0,0020	0,0024	0,0003
5	0,0063	0,0054	0,0046	0,0054	0,0009
6	0,0143	0,0101	0,0073	0,0106	0,0035
7	0,0397	0,0205	0,0127	0,0243	0,0139
8	0,0935	0,0436	0,0274	0,0548	0,0344
9	0,1554	0,0810	0,0465	0,0943	0,0557

Tab. 12.29 Einfluss von 0,1%igem SDS + 1 mM Lys-5 auf die Hautpermeation von Na-Fluorescein in $\mu\text{g}/\text{cm}^2$

Zeit [h]	Zelle 1	Zelle 2	Zelle 3	Zelle 4	Zelle 5	Zelle 6	Zelle 7	Mittelwert	STABW
0	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
1	0,002	0,002	0,001	0,003	0,003	0,005	n.d.	0,002	0,002
2	0,015	0,013	0,014	0,003	0,003	0,005	n.d.	0,008	0,006
3	0,027	0,034	0,034	0,003	0,004	0,005	n.d.	0,015	0,016
4	0,031	0,043	0,071	0,003	0,027	0,023	n.d.	0,028	0,024
5	0,035	0,076	0,201	0,003	0,112	0,082	n.d.	0,073	0,070
6	0,037	0,161	0,503	0,004	0,335	0,238	n.d.	0,183	0,190
7	0,040	0,347	1,040	0,010	0,789	0,569	0,005	0,400	0,415
8	0,046	0,693	1,903	0,043	1,720	1,280	0,026	0,816	0,821
9	0,054	1,227	3,014	0,092	2,619	1,977	0,074	1,294	1,269

Tab. 12.30 Einfluss von 0,1%igem SDS + 1 mM Lys-5 auf die Hautpermeation von Na-Fluorescein in % (m/m)

Zeit [h]	Zelle 1	Zelle 2	Zelle 3	Zelle 4	Zelle 5	Zelle 6	Zelle 7	Mittelwert	STABW
0	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
1	n.d.	n.d.	n.d.	0,001	0,001	0,001	n.d.	n.d.	n.d.
2	0,002	0,002	0,002	0,001	0,001	0,001	n.d.	0,001	0,001
3	0,004	0,005	0,005	0,001	0,001	0,001	n.d.	0,002	0,003
4	0,005	0,007	0,011	0,001	0,004	0,004	n.d.	0,004	0,004
5	0,006	0,012	0,032	0,001	0,018	0,013	n.d.	0,012	0,011
6	0,006	0,025	0,079	0,001	0,053	0,038	n.d.	0,029	0,030
7	0,006	0,055	0,164	0,002	0,124	0,090	0,002	0,063	0,065
8	0,007	0,109	0,230	0,007	0,271	0,202	0,004	0,129	0,129
9	0,008	0,193	0,475	0,015	0,413	0,311	0,012	0,204	0,200

Tab. 12.31 Einfluss von 0,1%igem SDS + 1 mM Lys-7 auf die Hautpermeation von Na-Fluorescein in $\mu\text{g}/\text{cm}^2$

Zeit [h]	Zelle 1	Zelle 2	Zelle 3	Mittelwert	STABW
0	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
1	0,0029	0,0014	0,0020	0,0021	0,0008
2	0,0029	0,0014	0,0020	0,0021	0,0008
3	0,0029	0,0014	0,0020	0,0021	0,0008
4	0,0029	0,0014	0,0056	0,0033	0,0021
5	0,0065	0,0019	0,0283	0,0122	0,0141
6	0,0287	0,0064	0,1040	0,0464	0,0511
7	0,1150	0,0254	0,3109	0,1504	0,1460
8	0,3060	0,0755	0,6907	0,3574	0,3108
9	0,6078	0,1596	1,2576	0,6750	0,5521

Tab. 12.32 Einfluss von 0,1%igem SDS + 1 mM Lys-7 auf die Hautpermeation von Na-Fluorescein in % (m/m)

Zeit [h]	Zelle 1	Zelle 2	Zelle 3	Mittelwert	STABW
0	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
1	0,0005	0,0002	0,0003	0,0003	0,0001
2	0,0005	0,0002	0,0003	0,0003	0,0001
3	0,0005	0,0002	0,0003	0,0003	0,0001
4	0,0005	0,0002	0,0009	0,0005	0,0003
5	0,0010	0,0003	0,0045	0,0019	0,0022
6	0,0045	0,0010	0,0164	0,0073	0,0081
7	0,0181	0,0040	0,0490	0,0237	0,0230
8	0,0482	0,0119	0,1088	0,0563	0,0490
9	0,0957	0,0251	0,1981	0,1063	0,0870

Tab. 12.33 Einfluss von 0,1%igem SDS + 2 mM Lys-7 auf die Hautpermeation von Na-Fluorescein in $\mu\text{g}/\text{cm}^2$

Zeit [h]	Zelle 1	Zelle 2	Zelle 3	Mittelwert	STABW
0	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
1	0,0003	0,0024	0,0020	0,0016	0,0011
2	0,0003	0,0024	0,0020	0,0016	0,0011
3	0,0003	0,0055	0,0042	0,0033	0,0027
4	0,0162	0,0217	0,0206	0,0195	0,0029
5	0,0466	0,0374	0,0394	0,0411	0,0048
6	0,1179	0,0518	0,0784	0,0827	0,0333
7	0,2406	0,0653	0,1519	0,1526	0,0876
8	0,5196	0,0978	0,3091	0,3088	0,2109
9	0,7610	0,1336	0,4646	0,4531	0,3138

Tab. 12.34 Einfluss von 0,1%igem SDS + 2 mM Lys-7 auf die Hautpermeation von Na-Fluorescein in % (m/m)

Zeit [h]	Zelle 1	Zelle 2	Zelle 3	Mittelwert	STABW
0	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
1	n.d.	0,0004	0,0003	0,0002	0,0002
2	n.d.	0,0004	0,0003	0,0002	0,0002
3	n.d.	0,0009	0,0007	0,0005	0,0004
4	0,0026	0,0034	0,0033	0,0031	0,0005
5	0,0073	0,0059	0,0062	0,0065	0,0008
6	0,0186	0,0082	0,0124	0,0130	0,0052
7	0,0379	0,0103	0,0239	0,0240	0,0138
8	0,0819	0,0154	0,0487	0,0487	0,0332
9	0,1199	0,0210	0,0732	0,0714	0,0494

Folgende Ergebnisse wurden unter Einsatz von Species 2 erzielt

Tab. 12.35 Einfluss von 50%igem Ethanol auf die Hautpermeation von Na-Fluorescein in $\mu\text{g}/\text{cm}^2$

Zeit [h]	Zelle 1	Zelle 2	Zelle 3	Zelle 4	Zelle 5	Zelle 6	Zelle 7	Mittel- wert	STABW
0	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
2	n.d.	0,222	0,340	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,080	0,141
3	0,063	1,439	2,155	n.d.	n.d.	0,030	0,000	0,527	0,892
4	0,578	4,053	5,638	n.d.	0,111	0,686	0,051	1,588	2,287
5	2,251	8,544	10,991	0,296	0,565	2,374	0,304	3,618	4,347
6	4,961	13,848	17,013	1,174	1,728	5,567	0,993	6,469	6,445
7	9,298	20,589	24,182	3,308	4,388	10,759	2,672	10,742	8,568
8	14,723	27,897	31,837	6,739	7,119	15,616	4,477	15,487	10,721
9	20,008	34,846	39,093	10,486	10,448	20,931	6,594	20,344	12,560

Tab. 12.36 Einfluss von 50%igem Ethanol auf die Hautpermeation von Na-Fluorescein in % (m/m)

Zeit [h]	Zelle 1	Zelle 2	Zelle 3	Zelle 4	Zelle 5	Zelle 6	Zelle 7	Mittel- wert	STABW
0	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
2	n.d.	0,035	0,053	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,013	0,022
3	0,010	0,224	0,336	n.d.	n.d.	0,005	n.d.	0,082	0,139
4	0,090	0,632	0,879	n.d.	0,017	0,107	0,008	0,248	0,357
5	0,351	1,332	1,714	0,046	0,088	0,370	0,047	0,564	0,678
6	0,774	2,159	2,653	0,183	0,269	0,868	0,155	1,009	1,005
7	1,450	3,210	3,770	0,516	0,684	1,677	0,417	1,675	1,336
8	2,295	4,349	4,964	1,051	1,110	2,435	0,698	2,414	1,672
9	3,119	5,433	6,095	1,635	1,629	3,263	1,028	3,172	1,958

Tab. 12.37 Einfluss von Aqua dest. auf die Hautpermeation von Na-Fluorescein in $\mu\text{g}/\text{cm}^2$

Zeit [h]	Zelle 1	Zelle 2	Zelle 3	Zelle 4	Mittelwert	STABW
0	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
1	n.d.	0,1889	n.d.	n.d.	0,0472	0,0945
2	n.d.	2,5233	n.d.	0,7268	0,8125	1,1909
3	0,0178	7,5764	0,0130	4,0566	2,9160	3,6445
4	0,0469	15,3045	0,0515	10,9829	6,5965	7,7633
5	0,0936	22,8141	0,1391	18,1223	10,2923	11,9053
6	0,3324	31,4515	0,5163	26,6976	14,7494	16,6548
7	0,9516	40,5365	1,4204	35,6303	19,6347	21,3975
8	2,1115	49,6900	2,9857	44,6474	24,8586	25,8460
9	4,1323	59,1740	5,5005	53,9139	30,6802	29,9472

Tab. 12.38 Einfluss von Aqua dest. auf die Hautpermeation von Na-Fluorescein in % (m/m)

Zeit [h]	Zelle 1	Zelle 2	Zelle 3	Zelle 4	Mittelwert	STABW
0	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
1	n.d.	0,0302	n.d.	n.d.	0,0075	0,0151
2	n.d.	0,4028	n.d.	0,1160	0,1297	0,1901
3	0,0028	1,2095	0,0021	0,6476	0,4655	0,5818
4	0,0075	2,4433	0,0082	1,7533	1,0531	1,2393
5	0,0149	3,6421	0,0222	2,8931	1,6431	1,9006
6	0,0531	5,0210	0,0824	4,2621	2,3546	2,6588
7	0,1519	6,4713	0,2268	5,6881	3,1345	3,4160
8	0,3371	7,9326	0,4766	7,1276	3,9685	4,1261
9	0,6597	9,4467	0,8781	8,6069	4,8979	4,7808

Tab. 12.39 Einfluss von Chitosan-glykolsäure Gel auf die Hautpermeation von Na-Fluorescein in $\mu\text{g}/\text{cm}^2$

Zeit [h]	Zelle 1	Zelle 2	Zelle 3	Zelle 4	Zelle 5	Zelle 6	Mittelwert	STABW
0	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
2	0,067	n.d.	n.d.	0,143	0,017	0,094	0,054	0,058
3	0,763	0,037	0,170	0,989	0,152	0,699	0,468	0,397
4	2,756	0,468	0,833	4,235	1,282	3,251	2,137	1,50
5	6,807	2,197	2,627	8,276	3,285	6,479	4,945	2,553
6	11,862	5,070	5,164	14,156	7,152	11,332	9,123	3,839
7	18,343	9,739	9,250	21,032	12,385	17,309	14,676	4,896
8	25,546	15,532	14,339	28,282	18,400	23,730	20,971	5,695
9	32,275	21,138	19,119	36,017	25,001	30,379	27,322	6,639

Tab. 12.40 Einfluss von Chitosan-glykolsäure Gel auf die Hautpermeation von Na-Fluorescein in % (m/m)

Zeit [h]	Zelle 1	Zelle 2	Zelle 3	Zelle 4	Zelle 5	Zelle 6	Mittelwert	STABW
0	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
2	0,011	n.d.	n.d.	0,022	0,003	0,015	0,008	0,009
3	0,119	0,006	0,027	0,155	0,024	0,109	0,073	0,062
4	0,431	0,073	0,130	0,662	0,200	0,508	0,334	0,234
5	1,064	0,343	0,411	1,293	0,513	1,013	0,773	0,399
6	1,854	0,792	0,807	2,212	1,118	1,771	1,426	0,600
7	2,867	1,522	1,446	3,287	1,936	2,705	2,294	0,765
8	3,992	2,427	2,241	4,420	2,876	3,708	3,277	0,890
9	5,044	3,303	2,988	5,629	3,907	4,748	4,270	1,038

Tab. 12.41 Einfluss von 2 mM Lys-7 auf die Hautpermeation von Na-Fluorescein in $\mu\text{g}/\text{cm}^2$

Zeit [h]	Zelle 1	Zelle 2	Zelle 3	Zelle 4	Zelle 5	Zelle 6	Mittelwert	STABW
0	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
2	0,187	0,243	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,072	0,112
3	1,465	1,644	0,107	0,065	0,018	0,018	0,553	0,779
4	4,821	5,371	1,128	0,439	0,064	0,065	1,981	2,450
5	10,185	10,006	3,049	1,107	0,163	0,168	4,113	4,752
6	16,774	15,849	6,852	2,593	0,565	0,593	7,205	7,423
7	24,515	22,970	12,002	4,948	1,515	1,590	11,257	10,409
8	31,673	29,366	17,938	8,034	3,135	3,329	15,579	12,779
9	38,782	35,688	24,779	12,065	5,591	5,930	20,473	14,758

Tab. 12.42 Einfluss von 2 mM Lys-7 auf die Hautpermeation von Na-Fluorescein in % (m/m)

Zeit [h]	Zelle 1	Zelle 2	Zelle 3	Zelle 4	Zelle 5	Zelle 6	Mittelwert	STABW
0	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
2	0,030	0,039	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,011	0,018
3	0,233	0,262	0,017	0,010	0,003	0,003	0,088	0,124
4	0,768	0,855	0,180	0,070	0,010	0,010	0,316	0,390
5	1,622	1,594	0,486	0,176	0,026	0,027	0,655	0,757
6	2,672	2,524	1,091	0,413	0,090	0,094	1,147	1,182
7	3,904	3,658	1,911	0,788	0,241	0,253	1,793	1,658
8	5,044	4,677	2,857	1,280	0,499	0,530	2,481	2,035
9	6,177	5,684	3,946	1,922	0,890	0,944	3,261	2,350

Tab. 12.43 Einfluss von Chitosan-glykolsäure Gel mit 2 mM Lys-7 auf die Hautpermeation von Na-Fluorescein in $\mu\text{g}/\text{cm}^2$

Zeit [h]	Zelle 1	Zelle 2	Zelle 3	Mittelwert	STABW
0	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
2	n.d.	0,1866	n.d.	0,0622	0,1077
3	n.d.	1,2811	n.d.	0,4270	0,7396
4	0,1071	3,6088	0,0782	1,2647	2,0301
5	0,7830	7,9490	0,5625	3,0982	4,2024
6	2,1576	13,1565	1,5897	5,6346	6,5203
7	4,8467	19,7699	3,7116	9,4428	8,9616
8	8,7596	27,1280	6,9165	14,2681	11,1751
9	12,3498	33,6543	9,8552	18,6197	13,0799

Tab. 12.44 Einfluss von Chitosan-glykolsäure Gel mit 2 mM Lys-7 auf die Hautpermeation von Na-Fluorescein in % (m/m)

Zeit [h]	Zelle 1	Zelle 2	Zelle 3	Mittelwert	STABW
0	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
2	n.d.	0,0286	n.d.	0,0095	0,0165
3	n.d.	0,1961	n.d.	0,0654	0,1132
4	0,0164	0,5523	0,0120	0,1936	0,3107
5	0,1198	1,2166	0,0861	0,4742	0,6432
6	0,3302	2,0135	0,2433	0,8624	0,9979
7	0,7418	3,0257	0,5680	1,4452	1,3715
8	1,3406	4,1518	1,0585	2,1837	1,7103
9	1,8901	5,1506	1,5083	2,8497	2,0018

Tab. 12.45 Einfluss von Chitosan-glykolsäure Gel mit 10 mM Lys-7 auf die Hautpermeation von Na-Fluorescein in $\mu\text{g}/\text{cm}^2$

Zeit [h]	Zelle 1	Zelle 2	Zelle 3	Mittelwert	STABW
0	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
2	n.d.	0,0447	n.d.	0,0149	0,0258
3	n.d.	0,5035	0,0231	0,1755	0,2843
4	n.d.	2,4398	0,3825	0,9408	1,3122
5	0,0541	5,5021	1,3497	2,3020	2,8461
6	0,2746	10,0332	3,4122	4,5734	4,9819
7	0,9766	16,1352	7,1912	8,1010	7,6201
8	1,8366	21,8349	10,9307	11,5341	10,0128
9	2,9308	27,4307	14,7854	15,0490	12,2521

Tab. 12.46 Einfluss von Chitosan-glykolsäure Gel mit 10 mM Lys-7 auf die Hautpermeation von Na-Fluorescein in % (m/m)

Zeit [h]	Zelle 1	Zelle 2	Zelle 3	Mittelwert	STABW
0	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
2	n.d.	0,0071	n.d.	0,0024	0,0041
3	n.d.	0,0800	0,0037	0,0279	0,0452
4	n.d.	0,3876	0,0608	0,1495	0,2085
5	0,0086	0,8742	0,2144	0,3657	0,4522
6	0,0436	1,5941	0,5421	0,7266	0,7915
7	0,1552	2,5636	1,1426	1,2871	1,2107
8	0,2918	3,4692	1,7367	1,8326	1,5908
9	0,4656	4,3582	2,3491	2,3910	1,9466

Folgende Ergebnisse wurden unter Einsatz von Species 3 erzielt

Tab. 12.47 Einfluss von 50%igem Ethanol auf die Hautpermeation von Na-Fluorescein in $\mu\text{g}/\text{cm}^2$

Zeit [h]	Zelle 1	Zelle 2	Zelle 3	Zelle 4	Mittelwert	STABW
0	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
2	n.d.	0,0418	0,0030	n.d.	0,0112	0,0204
3	0,1713	0,7182	0,3380	0,0582	0,3214	0,2884
4	1,1861	3,1764	1,7425	0,5151	1,6550	1,1316
5	3,0821	6,8904	4,2571	1,6170	3,9616	2,2313
6	5,7397	11,4265	7,6067	3,3938	7,0417	3,3935
7	10,4158	17,8583	12,9869	6,9914	12,0631	4,5780
8	15,4499	24,4143	18,5289	11,1358	17,3822	5,5832
9	20,1223	30,3139	23,5350	14,7831	22,1886	6,5050

Tab. 12.48 Einfluss von 50%igem Ethanol auf die Hautpermeation von Na-Fluorescein in % (m/m)

Zeit [h]	Zelle 1	Zelle 2	Zelle 3	Zelle 4	Mittelwert	STABW
0	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
2	n.d.	0,0067	0,0005	n.d.	0,0018	0,0033
3	0,0275	0,1153	0,0543	0,0093	0,0516	0,0463
4	0,1904	0,5100	0,2798	0,0827	0,2657	0,1817
5	0,4949	1,1064	0,6835	0,2596	0,6361	0,3583
6	0,9216	1,8347	1,2214	0,5449	1,1306	0,5449
7	1,6724	2,8674	2,0852	1,1226	1,9369	0,7351
8	2,4807	3,9201	2,9751	1,7880	2,7910	0,8965
9	3,2309	4,8674	3,7789	2,3737	3,5627	1,0445

Tab. 12.49 Einfluss von 2 mM Lys-7 auf die Hautpermeation von Na-Fluorescein in $\mu\text{g}/\text{cm}^2$

Zeit [h]	Zelle 1	Zelle 2	Zelle 3	Zelle 4	Mittelwert	STABW
0	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
2	0,0111	0,0075	0,0061	n.d.	0,0062	0,0046
3	0,3887	0,3411	0,3187	0,2174	0,3165	0,0722
4	1,8013	1,7008	1,5599	1,2422	1,5761	0,2436
5	4,2428	4,1183	3,7953	3,2808	3,8593	0,4293
6	7,4277	7,3875	6,7798	6,1620	6,9392	0,5970
7	12,5999	12,7498	11,7358	11,1442	12,0574	0,7552
8	18,1395	18,4918	17,1010	16,6227	17,5888	0,8737
9	22,8599	23,4062	21,5770	21,1521	22,2488	1,0594

Tab. 12.50 Einfluss von 2 mM Lys-7 auf die Hautpermeation von Na-Fluorescein in % (m/m)

Zeit [h]	Zelle 1	Zelle 2	Zelle 3	Zelle 4	Mittelwert	STABW
0	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
2	0,0018	0,0012	0,0010	n.d.	0,0010	0,0007
3	0,0624	0,0548	0,0512	0,0349	0,0508	0,0116
4	0,2892	0,2731	0,2505	0,1995	0,2531	0,0391
5	0,6813	0,6613	0,6094	0,5268	0,6197	0,0689
6	1,1926	1,1862	1,0886	0,9894	1,1142	0,0959
7	2,0231	2,0472	1,8844	1,7894	1,9360	0,1213
8	2,9126	2,9691	2,7458	2,6690	2,8241	0,1403
9	3,6705	3,7582	3,4645	3,3963	3,5724	0,1701

Tab. 12.51 Einfluss von Chitosan-glykolsäure Gel mit 2 mM Lys-7 auf die Hautpermeation von Na-Fluorescein in $\mu\text{g}/\text{cm}^2$

Zeit [h]	Zelle 1	Zelle 2	Zelle 3	Zelle 4	Mittelwert	STABW
0	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
2	0,0151	0,2562	n.d.	0,0073	0,0697	0,1245
3	0,4965	2,4516	0,1103	0,4109	0,8673	1,0691
4	2,2021	6,9892	0,7288	1,9553	2,9688	2,7566
5	5,0904	12,7343	2,0709	4,6651	6,1402	4,5942
6	8,7366	19,1139	4,1204	8,2544	10,0563	6,3839
7	14,4112	27,0836	7,9846	13,9024	15,8454	8,0399
8	20,4162	35,0818	12,4137	19,8819	21,9484	9,4871
9	25,2625	41,7499	15,9356	24,6953	26,9108	10,7747

Tab. 12.52 Einfluss von Chitosan-glykolsäure Gel mit 2 mM Lys-7 auf die Hautpermeation von Na-Fluorescein in % (m/m)

Zeit [h]	Zelle 1	Zelle 2	Zelle 3	Zelle 4	Mittelwert	STABW
0	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
2	0,0024	0,0411	0,0000	0,0012	0,0112	0,0200
3	0,0797	0,3936	0,0177	0,0660	0,1393	0,1717
4	0,3536	1,1222	0,1170	0,3140	0,4767	0,4426
5	0,8173	2,0447	0,3325	0,7491	0,9859	0,7377
6	1,4028	3,0690	0,6616	1,3254	1,6147	1,0250
7	2,3139	4,3487	1,2821	2,2322	2,5442	1,2909
8	3,2781	5,6329	1,9932	3,1923	3,5241	1,5233
9	4,0563	6,7036	2,5587	3,9652	4,3209	1,7300

Lebenslauf

Name: Birgit Herbsthofer
Geburtsdatum: 09.08.1983
Geburtsort: Linz
Eltern: Mag. pharm. Egbert Herbsthofer
Hildegund Herbsthofer
Geschwister: Werner Herbsthofer

Ausbildung

1990-1994 Volksschule Pöstlingberg, Linz
1994-2002 Georg von Peuerbach Gymnasium, Linz
Juni 2002 Matura mit gutem Erfolg
Seit Oktober 2002 Studium der Pharmazie an der Universität Wien

Studienbegleitende Tätigkeiten

Februar 2005 Feriertätigkeit in der Apotheke „Zum Goldenen Adler“, Linz
Juli 2005 Feriertätigkeit in der Apotheke „Zum Goldenen Adler“, Linz
Februar 2006 Feriertätigkeit in der Apotheke „Zum Goldenen Adler“, Linz
Februar 2007 Feriertätigkeit in der Apotheke „Zum Goldenen Adler“, Linz
August 2007 Feriertätigkeit in der Apotheke „Zum Goldenen Adler“, Linz

WS 2007/08 Tutorium für die Übungen zur Magistralen
SS 2008 Arzneimittelherstellung (Department für Pharmazeutische
Technologie und Biopharmazie)

Sonstige Kenntnisse:

Fremdsprachen: Englisch (fließend), Französisch

Posterpräsentation

Posterpräsentation am 35th Annual Meeting of the
Controlled Release Society in New York, USA, 12. Juli 2008

Titel:

Influence of oligo-lysines on skin permeation of sodium
fluorescein

Influence of oligo-lysines on skin permeation of sodium fluorescein

M. Kratzel¹, B. Herbsthofer², C. Valenta²

¹Department of Medicinal Chemistry, University of Vienna, Austria, A-1090
martin.kratzel@univie.ac.at

²Department of Pharmaceutical Technology and Biopharmaceutics, University of
Vienna,
Austria, A-1090

ABSTRACT SUMMARY

Different oligo-lysines were tested for their positive influence on skin permeation of the model drug sodium fluorescein. A 14 h pre-impregnation with Lys-7 in a concentration of 2 mM showed the highest influence on the permeation of this model drug.

INTRODUCTION

Transdermal delivery is an attractive method to administer drugs and to avoid pain of injection. Drug delivery into and through the skin is limited by the barrier properties of the stratum corneum, a complex structure of compact keratinized cell layers. Therefore, it is of interest to investigate substances which could have a positive impact on skin permeation. One class of such representatives could be cell penetrating peptides (1).

These peptides also known as protein transduction domains or membrane transduction peptides are of interest due to their ability to translocate across cellular membranes. Because it is known that cationic cell penetrating peptides contain clusters of lysine residues the question was whether different oligo-lysines could also have an effect on the skin permeation of the model drug sodium fluorescein. Moreover, it should be investigated whether there is a difference between Lys-3, Lys-5 and Lys-7 and to find the optimal concentration of the permeation enhancers.

EXPERIMENTAL METHODS

Synthesis of oligo-lysines

Lys-3, Lys-5 and Lys-7 (oligomers of lysine with 3, 5 or 7 amino acid residues) were prepared using conventional techniques of solid phase peptide synthesis. Fmoc-Lys(Boc)-OH was used as amino acid derivative. The synthesis was carried out on Wang resin applying the batchwise process. The final hydrolysis with trifluoroacetic acid (99%), which included the cleavage of peptide from the resin as well as the deprotection of the side chains, provided the unprotected oligo-lysines. The structure of the peptides was confirmed by ESI-MS.

Skin permeability measurement

Before measuring the skin permeability the skin was pretreated with solutions of oligo-lysines. The skin was placed in a glass FRANZ diffusion cell. The receptor was phosphate buffer (pH 7.4). The donor chamber was filled with an oligo-lysine solution in ethanol 50%. Three oligo-lysines were used for the pretreatment: Lys-3; Lys-5 and Lys-7. Of each oligo-lysine 100 µl were applied in following concentrations: 1 mM; 2 mM; 3 mM. After a 14 h exposure to one of these formulations at room temperature, the glass cells were thermostated at 32 °C, the stirring was performed for 1 hour. After this pretreatment the donor chamber was emptied and filled with 0.6 ml of 0,1% sodium fluorescein in phosphate buffer (pH 7.4). Samples were taken hourly for 9 h from the receiver chamber and analyzed for the sodium fluorescein content spectrofluorimetrically (Tecan, M 200, fluorimeter).

Skin preparation

Porcine abdominal skin was obtained by removing the dermis by the supply of a dermatome set at 1 mm.

RESULTS AND DISCUSSION

The impregnation with different oligo-lysines showed an influence of the type and concentration on the skin permeation. The highest permeation of sodium fluorescein was seen with 2 mM impregnation of Lys-7 (see Fig. 1).

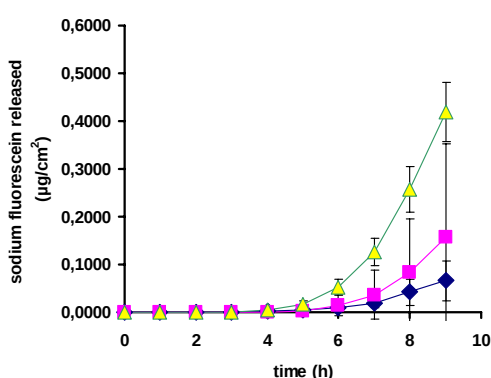


Fig. 1. Skin permeation of sodium fluorescein after different impregnation with oligo-lysines;

◆: Lys-3; ■: Lys-5; △: Lys-7
the concentration was 2 mM.

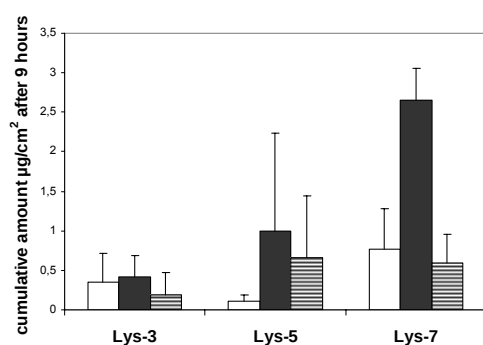


Fig. 2. Comparison of the cumulative permeated amount of sodium fluorescein after 9 hours. White bars: 1 mM; black bars: 2 mM; grey bars: 3 mM concentration of the different oligo-lysines.

A comparison of the cumulative amounts of permeated sodium fluorescein after impregnation with 1 mM, 2 mM or 3 mM showed the highest amount with 2 mM for each oligo-lysine. An impregnation with 3 mM showed even a sodium fluorescein decrease compared to 2 mM (see Fig. 2).

CONCLUSION

Lys-7 has a penetration enhancing effect on the model drug sodium fluorescein. Further studies with novel skin preparations like nano-emulsions containing Lys-7 will be performed.

REFERENCES

- [1] Leena N. Patel, Jennica L. Zaro, Wei-Chiang Shen, Cell penetrating peptides: Intracellular pathways and pharmaceutical perspectives. Pharm. Res. 24, 1977-1992 (2007)