



MASTERARBEIT / MASTER'S THESIS

Titel der Masterarbeit / Title of the Master's Thesis

„Biophysikalische und Raman-spektroskopische
Charakterisierung von Hautproben und Effekt von UVA-
Strahlung“

verfasst von / submitted by

Eva-Maria Schweiger BSc

angestrebter akademischer Grad / in partial fulfilment of the requirements for the degree of
Magistra pharmaciae (Mag.pharm.)

Wien, 2021 / Vienna 2021

Studienkennzahl lt. Studienblatt /
degree programme code as it appears on
the student record sheet:

UA 066 605

Studienrichtung lt. Studienblatt /
degree programme as it appears on
the student record sheet:

Masterstudium Pharmazie

Betreut von / Supervisor:

Ao. Univ.-Prof. Mag. Dr. Michael Wirth

Mitbetreut von / Co-Supervisor:

Mag. Dr. Victoria Klang

Danksagung

Ich bedanke mich sehr herzlich bei ao. Univ.-Prof. Mag. Dr. Michael Wirth für die Bereitschaft, die Betreuung meiner Masterarbeit zu übernehmen.

Ein besonderer Dank gilt Mag. Dr. Victoria Klang, die mir stets hilfsbereit zur Seite gestanden ist und mich bei der Durchführung der Versuche und dem Lösen von Problemen rat- und tatkräftig unterstützt hat.

Weiters möchte ich mich herzlich bei Dr. Franciska Erdo von der Pázmány Péter Catholic Universität (Budapest, Ungarn) für die zur Verfügung gestellten Hautproben bedanken.

Ein großer Dank gebührt auch meiner Familie. Allen voran meinen Eltern, die mir mein Studium erst ermöglicht und mich währenddessen moralisch und seelisch unterstützt haben. Ebenfalls bedanken möchte ich mich bei meinem Bruder, der mich stets motiviert und bei jeglichen Herausforderungen mit großer Geduld unterstützt hat.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	6
2. Allgemeines	8
2.1. <i>Die Haut</i>	8
2.1.1. Funktion und Aufbau der Haut	8
2.1.1.1. Epidermis	9
2.1.1.2. Dermis	12
2.1.1.3. Hypodermis	13
2.1.2. Die porzine Haut	13
2.1.3. Die Permeation von Arzneistoffen durch die Haut	14
2.2. <i>Licht und seine Effekte auf die Haut</i>	16
2.2.1. Akute UV-Schäden	18
2.2.2. Chronische UV-Schäden	19
2.2.2.1. Hautalterung	20
2.2.2.2. Immunsuppression	20
2.2.2.3. Karzinogenese	21
2.3. <i>Raman-Spektroskopie</i>	22
2.3.1. Der Raman-Effekt	22
2.3.2. Aufbau eines Raman-Spektrometers.....	24
2.3.3. Raman-Spektroskopie in der Hautforschung.....	25
2.4. <i>Biophysikalische Hautparameter</i>	31
2.4.1. Der transepidermale Wasserverlust (TEWL)	31
2.4.2. Die Hautfeuchtigkeit.....	33
2.4.2.1. Biox Epsilon™ E100.....	34
2.4.2.2. Das Corneometer®	36
2.4.3. Der pH-Wert	37
2.4.4. Der Melanin- und Erythemindex	39
2.5. <i>Der Sonnenlichtsimulator SOL 500</i>	42
2.6. <i>Modellsubstanz Coffein</i>	45
3. Material und Methoden	47
3.1. <i>Vorversuche</i>	47
3.2. <i>Gesunde Humanhaut</i>	48
3.2.1. Allgemeines	48
3.2.2. Messung der Raman-spektroskopischen Parameter.....	48
3.2.2.1. Fingerprint-Spektren.....	51
3.2.2.2. High-Wave-Number-Spektren	55
3.2.3. Messung der biophysikalischen Parameter.....	59
3.2.3.1. Der Melanin- und Erythemindex.....	59
3.2.3.2. Die Permittivität.....	60
3.2.3.3. Die Hautfeuchtigkeit	62
3.2.3.4. Der TEWL.....	62
3.2.3.5. Der pH-Wert.....	64
3.3. <i>Untersuchung porziner Haut</i>	64
3.3.1. Frische Ohren.....	64
3.3.1.1. Allgemeines.....	64
3.3.1.2. Probenvorbereitung.....	65

3.3.1.3.	Behandelte Ohren	66
3.3.1.4.	Unbehandelte Ohren	67
3.3.2.	Einfluss von Sonnenlicht auf porcine Haut	69
3.3.3.	Penetrationsstudie mit Coffein anhydricum	70
3.3.3.1.	Aufnahme eines Rein- und Differenzspektrums	70
3.3.3.2.	Durchführung der Penetrationsstudien	73
3.3.4.	Raman-spektroskopischer Vergleich von diversen Hautproben	74
4.	Ergebnisse.....	76
4.1.	<i>Gesunde Humanhaut</i>	<i>76</i>
4.1.1.	Erhebung von Basisdaten	76
4.1.1.1.	Fingerprint-Spektren	76
4.1.1.2.	HWVN-Spektren	82
4.1.2.	Einfluss der Jahreszeit	86
4.1.2.1.	Der Melanin- und Erythemindex	86
4.1.2.2.	Die Permittivität	87
4.1.2.3.	Die Hautfeuchtigkeit	88
4.1.2.4.	Der TEWL	89
4.1.2.5.	Der pH-Wert	90
4.1.3.	Ausschlusskriterien und Zufallsbeobachtungen	91
4.2.	<i>Untersuchung porciner Haut</i>	<i>91</i>
4.2.1.	Behandelte Ohren	91
4.2.2.	Unbehandelte Ohren	92
4.2.2.1.	Fingerprint-Spektren	92
4.2.2.2.	HWVN-Spektren	98
4.2.2.3.	Biophysikalische Parameter	100
4.2.3.	Einfluss von Sonnenlicht auf porcine Haut	102
4.2.3.1.	Fingerprint-Spektren	103
4.2.3.2.	HWVN-Spektren	109
4.2.3.3.	Biophysikalische Parameter	110
4.2.4.	Penetrationsstudien mit Coffein anhydricum	114
4.2.4.1.	Fingerprint-Spektren	114
4.2.5.	Raman-spektroskopischer Vergleich von diversen Hautproben	116
4.2.5.1.	Frische Schweinehaut	116
4.2.5.2.	Frische Rattenhaut	119
4.2.5.3.	Frische Mäusehaut	122
5.	Diskussion	127
6.	Zusammenfassung	134
7.	Abstract	137
8.	Literaturverzeichnis	139

1. Einleitung

Die Haut ist das größte und schwerste Organ des menschlichen Körpers. Als Schnittstelle zur Außenwelt bietet sie chemischen, immunologischen und mechanischen Schutz vor externen Einflüssen. Gleichzeitig schützt sie den Organismus durch Minimierung des transepidermalen Wasserverlustes (TEWL) davor auszutrocknen und gewährleistet den Ablauf lebenswichtiger Körperfunktionen innerhalb einer kontrollierten Umgebung. Basierend auf dieser tragenden Rolle, die sie in unserem alltäglichen Leben einnimmt, stellt die Haut seit Jahrzehnten auch in der Forschung einen wichtigen Kernbereich dar [1-3].

Während für die Untersuchung des allgemeinen Hautzustandes sowie für die physiologische Charakterisierung nicht-invasive biophysikalische Messmethoden zur Verfügung stehen, ist eine detaillierte Hautanalyse, die auch die tieferliegenden Schichten umfasst, etwas komplexer. Als State-of-the-Art galten im Bereich der Permeationsstudien bisher Verfahren wie Franz-Diffusions-Zellen, Tape-Stripping oder die Anwendung des Kryotoms in Kombination mit verschiedenen analytischen Techniken. Da es sich hierbei jedoch um sehr zeitaufwändige, destruktive und invasive Techniken handelt, die zudem keine akkurate räumliche Auflösung liefern, richtete sich der Fokus der Forschung in den letzten Jahren immer mehr auf nicht-invasive Methoden zur Charakterisierung der Haut wie die Raman-Spektroskopie [3].

Die Raman-Spektroskopie ermöglicht es die Haut zu charakterisieren, ohne sie dafür zerstören zu müssen. Sie gewährleistet die Untersuchung verschiedener Hautparameter, wie etwa die Ceramide, das Cholesterin, den Natural Moisturizing Factor (NMF), den Harnstoffgehalt oder den Wassergehalt anhand der Hautspektren. Neben der Erhebung dieser biologischen Hautparameter kann dank der Penetrationsfähigkeit des Lasers auch ein Tiefenprofil der Haut erstellt werden, wodurch sich auch die Penetration eines Wirkstoffes beobachten lässt. Zudem wird die Raman-Spektroskopie auch zur Diagnose pathologischer Zustände der Haut herangezogen [3-8].

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte unter anderem der Effekt von UV-Strahlung auf die Haut mittels Raman-Spektroskopie untersucht werden. Sonnenlicht kann eine Reihe von Effekten auf die Haut ausüben. Neben akuten und chronischen UV-Schäden gibt es noch weitere Wirkungen, die als Folge der Applikation von photoreaktiven Arzneistoffen in Kombination mit Sonnenlicht auftreten können [9].

Die Entstehung von Erythemen sowie eine gesteigerte Melanogenese zählen dabei zu den prominentesten akuten Folgen einer übermäßigen UV-Bestrahlung. Aufgrund der guten Reproduzierbarkeit dieser beiden Effekte hat sich die Quantifizierung experimentell induzierter Veränderungen der Hautfarbe zu einer wichtigen Informationsquelle in Bezug auf Haut-, Substanz- und Vehikeleigenschaften in der dermato-kosmetischen Forschung entwickelt [10-12].

Im ersten Teil dieser Arbeit wurde eine Charakterisierung von gesunder Humanhaut durchgeführt. Dabei sollte einerseits die Reproduzierbarkeit der Raman-Messergebnisse wöchentlich über einen Zeitraum von 12 Wochen untersucht werden. Andererseits sollte über mehrere Monate beobachtet werden, ob sich sowohl aus den spektroskopischen als auch den biophysikalischen Messungen jahreszeitenabhängige Veränderungen der relevanten Hautparameter ableiten ließen.

Der zweite Teil der Arbeit setzte sich aus verschiedenen Untersuchungen an porziner Haut zusammen. In der ersten Versuchsreihe sollte der Effekt verschiedener Lagerbedingungen (Kühlschrank, Tiefkühlschrank) auf relevante Hautparameter unbehandelter Schweineohren nach verschiedenen Zeiträumen mittels spektroskopischen und biophysikalischen Messungen untersucht werden. In der zweiten Versuchsreihe wurde der Einfluss von Sonnenlicht auf die physiologischen Parameter der Haut analysiert. Dazu wurden porzine Hautproben mit dem Sonnenlichtsimulator bestrahlt, vermessen und mit einer Kontrolle (unbestrahlte Proben) verglichen. In der dritten Versuchsreihe sollte der Effekt von UV-Strahlung auf die Hautpenetration von Coffein anhydricum beobachtet werden. Dazu wurde eine Lösung von Coffein auf zuvor bestrahlte Ohren aufgetragen. Nach einer kurzen Einwirkzeit wurden die Proben vermessen und wiederum mit einer Kontrolle (unbestrahlte Ohren) verglichen.

Abschließend wurden noch Proben frischer Mäuse-, Ratten- und Schweinehaut sowie eine Hautprobe, die von einer an Psoriasis leidenden Maus stammte, spektroskopisch vermessen und die daraus resultierenden Haut-Spektren einander gegenübergestellt.

2. Allgemeines

2.1. Die Haut

2.1.1. Funktion und Aufbau der Haut

Die Haut ist mit einer Größe von 1,5 – 2 m², einem Gewicht von 3,5 kg und einem Anteil von 10 % an der Körpermasse das größte und schwerste Organ des Menschen [1-2]. Sie fungiert als Barriere zwischen den physiologischen Prozessen im menschlichen Körper und der Außenwelt und ermöglicht so den Ablauf lebenswichtiger Körperfunktionen innerhalb einer kontrollierten Umgebung [2]. In ihrer Funktion bietet sie demnach chemischen, immunologischen und auch mechanischen Schutz vor diversen Umwelteinflüssen [1, 3].

Die Hautoberfläche ist mit einem pH-Wert von 4 – 6 von Natur aus „sauer“. Diese Eigenschaft bildet die Grundlage für die chemische Schutzfunktion der Haut und wird als „Säureschutzmantel“ oder „Hydrolipidfilm“ bezeichnet. Durch ihn wird der Körper auf zwei Wegen geschützt: Einerseits sorgt er dafür, dass die natürliche Mikroflora der Haut bestehen bleibt und das Wachstum pathogener Mikroorganismen, die eine alkalische Umgebung bevorzugen, verhindert wird. Andererseits wird das Stratum corneum als Einheit aufrechterhalten, da das pH-Optimum vieler Enzyme, die für die Lipid-Homöostase von großer Bedeutung sind, in diesem Bereich liegt.

Der von Talgdrüsen segregierte Talg ist ein weiterer Teil der chemischen Barriere. Er enthält nicht nur antimikrobielle Bestandteile, sondern bildet an der Hautoberfläche auch einen fettigen Film, wodurch die Hydratation sowie die Geschmeidigkeit der Haut beibehalten wird [2].

Immunzellen wie dermale dendritische Zellen, Langerhans-Zellen und Makrophagen bilden den immunologischen Schutz der Haut. Eindringene Mikroorganismen können von diesen Zellen, die antigen-präsentierende Eigenschaften besitzen, abgewehrt werden, indem sie naive T-Zellen aktivieren und so eine primäre Immunantwort hervorrufen [2].

Das Stratum corneum bildet primär die mechanische Barriere der Haut. Ihre Aufgabe ist es, übermäßigen Wasserverlust zu verhindern und das Eintreten von exogenem Material zu regulieren [2].

Neben der Barriere- und Schutzfunktion übernimmt die Haut noch weitere Aufgaben, wie etwa die Thermoregulation. Über Thermorezeptoren in der Haut wird zwischen warm und kalt differenziert. Ihre Signale erreichen den Hypothalamus, wodurch es zur Thermohomöostase kommt. Als Sinnesorgan reagiert die Haut über sensorische Nervenendigungen außerdem auf Reize wie Berührung, Vibration und Schmerz. Metabolische Prozesse, wie die Vitamin D-Synthese, finden ebenso in der Haut statt [2].

Das Organ Haut wird von außen nach innen grundsätzlich in drei Schichten gegliedert: in die Epidermis (Oberhaut), die Dermis (Lederhaut) und die Subcutis (Unterhautfettgewebe) [1]. Der Aufbau ist in Abbildung 1 nochmals grafisch dargestellt [13].

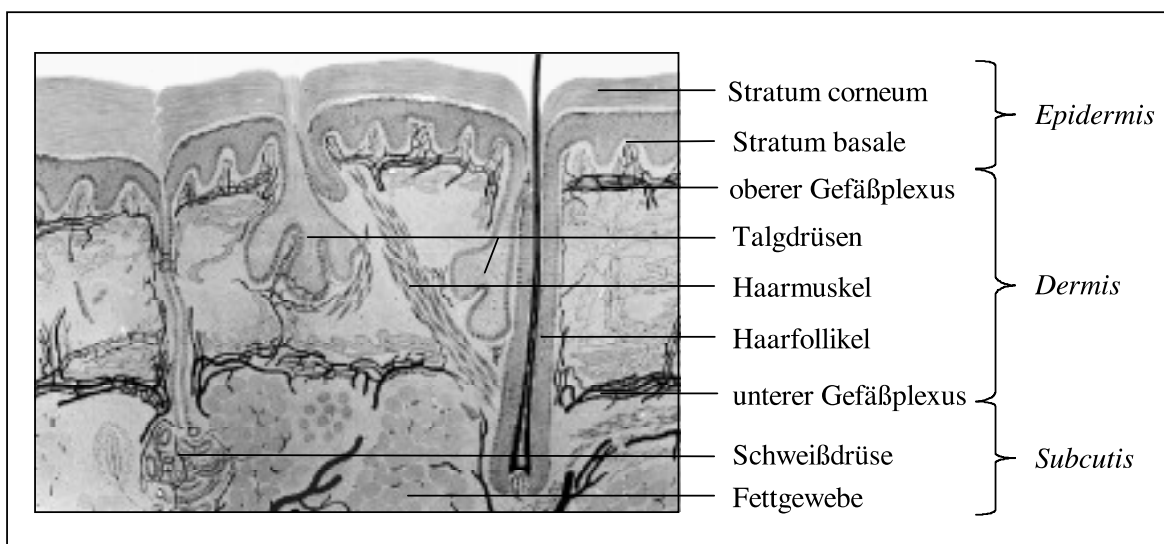


Abbildung 1: Aufbau der Haut [13]

2.1.1.1. Epidermis

Die Epidermis stellt die äußerste Schicht der Haut dar und kann je nach Körperstelle eine Dicke von 0,05 – 1,5 mm (50 – 1500 µm) umfassen [3]. Sie setzt sich zum Großteil aus Keratinozyten zusammen. Neben diesen enthält sie auch Langerhans-Zellen, Melanozyten, Merkel-Zellen und T-Zellen. Die Langerhans-Zellen können als immunologisch aktive Zellen eindringende Feststoffe erkennen und mit ihren verzweigten Dendriten abfangen. Zusammen mit den T-Zellen sind sie für die zelluläre Immunantwort der Haut von großer Bedeutung. Vergleichbar mit den Langerhans-Zellen besitzen auch die Melanozyten lange verzweigte Dendriten, über die sie mit basalen Keratinozyten in Kontakt stehen. Die Hauptaufgabe der

Melanozyten besteht darin, den Körper durch die Synthese von Melanin vor UV-Strahlung zu schützen, während die etwas tieferliegenden Merkel-Zellen als Nervenzellen für die Sinneswahrnehmung eine bedeutende Rolle spielen [1, 14].

Von außen nach innen betrachtet kann die Epidermis in vier Schichten unterteilt werden: das Stratum corneum (Hornschicht), das Stratum granulosum (Körnerzellschicht), das Stratum spinosum (Stachelzellschicht) und das Stratum basale (Basalzellschicht) [2]. Die drei letztgenannten Schichten bilden dabei die lebende Epidermis [3]. Das Stratum spinosum und das Stratum basale können zusammen auch als *Rete Malphigi* bezeichnet werden. An Stellen, für die eine etwas dickere Haut charakteristisch ist (z.B. Handflächen oder Fußsohlen), lässt sich zwischen dem Stratum corneum und dem Stratum granulosum eine weitere Schicht beobachten: das Stratum lucidum (Glanzschicht). Dieses wird dabei nicht als eigenständige epidermale Schicht gesehen, sondern zum Stratum corneum gezählt [2, 15].

Charakteristisch für die Epidermis ist auch ihre kontinuierliche Regeneration (*Desquamatio insensibilis*). Dieser Prozess der Abschuppung, der im Schnitt 28 Tage dauert und bei dem Keratinozyten zu kernlosen Korneozyten proliferieren, findet an der Oberfläche der Epidermis statt [1].

Als äußerste Schicht bildet die Epidermis außerdem die Schnittstelle zwischen Körper und Umwelt und fungiert daher hauptsächlich als Schutzschild für den menschlichen Organismus. Auf der einen Seite schützt sie uns durch Minimierung des transepidermalen Wasserverlustes (TEWL) vor Austrocknung. Andererseits hindert sie Fremdstoffe daran, uneingeschränkt durch die Haut zu penetrieren. Da für diese Barriere- und Schutzfunktion vor allem die Hornschicht der Epidermis, das Stratum corneum, verantwortlich ist, wird auf diese Schicht nachfolgend näher eingegangen [1].

Das Stratum Corneum

Das Stratum corneum ist 10 – 20 µm dick und aus 10 – 15 Schichten von Korneozyten aufgebaut. Diese kernlosen, verhornten Zellen entwickeln sich aus Keratinozyten, die eine terminale Differenzierung vom Stratum basale zum Stratum corneum durchlaufen haben. Anstelle der Plasmamembran besitzen Korneozyten einen „cornified envelope“, der von einem Lipidmantel umhüllt ist. Ein weiteres

Charakteristikum dieser Hornzellen ist das Fehlen eines Kernes sowie zytoplasmatischer Organellen. Sie enthalten in ihrem Inneren stattdessen Keratin-Filamente, die im Zuge ihrer Differenzierung aus Keratinozyten eingelagert werden [2, 16].

Der strukturelle Aufbau des Stratum corneum wird häufig mit dem einer Ziegelmauer verglichen („*brick and mortar*“-Modell nach Peter Elias) (Abb. 2) [17]. Die Korneozyten entsprechen dabei den Ziegelsteinen („*bricks*“), die in einer lipophilen extrazellulären Matrix mit Protein-/Peptid-haltigen Komponenten, dem Mörtel („*mortar*“), eingebettet sind. Diese Struktur wird durch Korneodesmosomen stabilisiert, indem sie die Korneozyten zusammenhalten [2]. Es wird angenommen, dass genau diese strukturelle Anordnung aus Lipiden und Korneozyten entscheidend zur Ausbildung der epidermalen Barriere beiträgt [1].

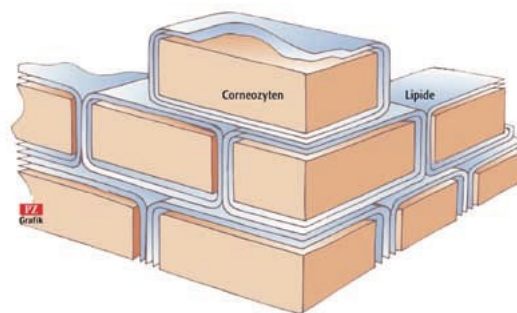


Abbildung 2: Ziegelstein-Mörtel-Modell nach ELIAS [17]

Da die Hautpermeation im Wesentlichen durch den Diffusionsprozess quer durch das Stratum corneum bestimmt wird, sind die strukturellen Eigenschaften dieser Schicht ein exzessiv erforschtes Thema. Ein besonderes Augenmerk wurde dabei auch auf die Lipide des Stratum corneum gelegt, die – wie oben erläutert – für die Barrierefunktion von großer Bedeutung sind. Zudem stellt die extrazelluläre Matrix, in der sich diese Lipide befinden, die einzige kontinuierliche Domäne des Stratum corneum dar [2].

Es konnte in vielfachen Studien gezeigt werden, dass der Penetrationsprozess durch die Haut hauptsächlich in der extrazellulären Matrix erfolgt und dass durch Extraktion von Lipiden die Barrierefunktion der Haut reduziert wird. Ebenso konnte gezeigt werden, dass die Hautpermeation durch Chemikalien, die zu einer veränderten Organisation der Lipide im Stratum corneum führen, erhöht wird [2].

Die Lipide des Stratum corneum sind in Lamellen angeordnet, die parallel zu den Korneozyten ausgerichtet sind [2]. Pro Tag werden ca. 40 – 80 mg Gesamtlipide in den Keratinozyten synthetisiert und in Lamellenkörperchen gespeichert. Zu einem etwas späteren Zeitpunkt, konkret beim Übergang der Keratinozyten vom Stratum granulosum zum Stratum corneum, erfolgt die Ausschleusung der Lipide in die extrazelluläre Matrix inklusive ihrer lamellaren Anordnung. Das Ausmaß der De-novo-Lipidsynthese ist in den verschiedenen Schichten der Epidermis unterschiedlich stark ausgeprägt. Eine besonders starke Lipidexpression wurde beispielsweise im Stratum granulosum nachgewiesen [1].

In der extrazellulären Matrix des Stratum corneum bilden drei apolare Lipide die lipophilen Hauptbestandteile: Ceramide, Cholesterin und freie Fettsäuren. Die geringe Konzentration an Phospholipiden in dieser Schicht lässt sich durch die enzymatische Hydrolyse polarer Lipide an der Schnittstelle zwischen Körnerzellschicht und Hornzellschicht erklären. Freie Fettsäuren, Cholesterin und Ceramide liegen equimolar verteilt vor, wobei Letztere mit einem Anteil von ca. 40 % an der Gesamtlipidmenge überwiegen [1].

2.1.1.2. Dermis

Die Dermis ist ≥ 1 mm dick und stellt damit die umfangreichste Schicht der menschlichen Haut dar. Sie ist im Wesentlichen aus Fibroblasten aufgebaut, die sich in der extrazellulären Matrix der strukturbildenden Proteine Elastin und Kollagen befinden. Diese Hautschicht bildet die Grundlage für die Elastizität und Reißfähigkeit der Haut. Immunzellen wie Makrophagen und dermale dendritische Zellen sind ebenso ein Teil der Dermis [1-2].

Die Dermis kann in zwei Schichten unterteilt werden: bei der oberen Dermis handelt es sich um das subepidermal gelegene Stratum papillare, das durch das Vorhandensein zahlreicher Zellen und Gefäße charakterisiert ist. Darunter findet man das faserhaltige Stratum reticulare. Diese beiden Schichten können mikroskopisch voneinander unterschieden werden. Während das Stratum reticulare durch Kollagenfasern, die scherengitterförmig in dicken Bündeln angeordnet sind, gekennzeichnet ist, liegen die kollagenen Fasern im Stratum papillare wesentlich dünner und loser gepackt vor. Das Stratum reticulare weist aufgrund seines Aufbaus eine gewisse Festigkeit auf; gleichzeitig gewährleistet es aber auch eine gewisse

Dehnbarkeit der Haut. Neben Mastzellen und Lymphozyten finden sich im Stratum papillare auch Papillaren oder Papillen, die bis in das Stratum basale ragen und folglich die dermo-epidermale Junktionszone bilden [1-2].

Die Dermis ist außerdem der Aufenthaltsort für Haarfollikel, Talg- und Schweißdrüsen, Lymphgefäße, Blutkapillaren sowie sensorische Nervenendigungen. Da sich die Blutkapillaren bis in die dermo-epidermale Junktionszone erstrecken, wird ein dualer Stoffaustausch mit der avasculären Epidermis ermöglicht. Basierend auf diesem Diffusionsprozess durch die Junktionszone finden beispielsweise Sauerstoff und Nährstoffe ihren Weg in die Epidermis; gleichzeitig können Abfallstoffe von ihr wegtransportiert werden [1-2]. Die Epidermis ist für ihren Stoffwechsel somit auf die vaskularisierte Dermis angewiesen.

2.1.1.3. Hypodermis

Die letzte und damit innerste Schicht der Haut stellt die Hypodermis, auch Unterhautfettgewebe oder Subcutis genannt, dar. Sie ist hauptsächlich aus subkutanem Fett aufgebaut, dass in Form von Fettgewebsläppchen vorliegt. Ein strukturelles Charakteristikum dieser Schicht ist die Trennung dieses läppchenförmigen Gewebes durch bindegewebige Septen. Sie stellt außerdem den Träger größerer Lymph- und Blutgefäße dar. Der fettreiche Charakter der Subcutis bildet zudem die Basis für ihre Funktionen. Zum einen ist sie für die Energiespeicherung verantwortlich, zum anderen spielt sie auch bei der Wärmeisolation eine große Rolle [1-2].

Je nachdem, welche Körperstelle betrachtet wird, kann die Subcutis vorhanden sein oder nicht. Während sie an gewissen Stellen (z.B. den Fersen) auch der mechanischen Polsterung dient, kann sie an anderen Körperstellen, wie etwa an den Augenlidern, nicht nachgewiesen werden [1-2].

2.1.2. Die porzine Haut

Die porzine Haut hat sich im Laufe der Zeit zu einem geeigneten in vitro-Modell für die humane Haut entwickelt. Insbesondere die dorsale (äußere) Seite des porzinen Ohres wird gerne als Alternative für die Durchführung von diversen Hautstudien

herangezogen; nicht zuletzt weil sie im Vergleich zu anderen Tierarten der menschlichen Haut am Ähnlichsten ist [18-20].

Zum einen besitzen beide eine vergleichbare Lipidzusammensetzung, zum anderen ist die Membranpermeabilität von porziner und humaner Haut für diverse Komponenten sehr vergleichbar. Um dies zu validieren, wurde die Permeabilität beider Hauttypen in Bezug auf ein einfaches Markermolekül wie Wasser untersucht. Dabei zeigte sich, dass sowohl die passive als auch die aktive Permeation durch beide Hautbarrieren hindurch vergleichbar ist [19]. Zudem konnte nach topischer Applikation, insbesondere für hydrophile Substanzen, eine ähnliche Penetrationsrate für porcine und menschliche Haut festgestellt werden [21].

Signifikante Gemeinsamkeiten konnten auch bei der genaueren Untersuchung der strukturellen Eigenschaften erhoben werden. Der Aufbau des Stratum corneum und der lebenden Epidermis ist bei Humanhaut und porciner Haut sehr ähnlich; auch die Struktur der Haarfollikel scheint übereinzustimmen. Außerdem ist die Subcutis bei beiden durch das Vorhandensein von Fettzellen gekennzeichnet. Während das Stratum corneum der Schweinehaut eine Dicke von durchschnittlich 21 μm aufweist, umfasst es beim Menschen je nach Körperstelle 6 – 19 μm . Auch in der Dicke der lebenden Epidermis zeigen sich mit 72 μm beim Schwein und 70 μm beim Menschen weitere Übereinstimmungen [21].

2.1.3. Die Permeation von Arzneistoffen durch die Haut

Die Haut ist eine selektiv permeable Barriere. Verschiedene Arzneistoffe können die Haut unterschiedlich schnell durchdringen. Die Permeation eines Wirkstoffes durch die Haut ist ein passiver Vorgang und kann durch den Massefluss oder Flux (J) beschrieben werden. Er definiert die Wirkstoffmenge, die pro Fläche und Zeiteinheit durch die Haut permeiert und wird durch zwei Faktoren bestimmt: zum einen durch die Permeabilität der Haut gegenüber dem zu untersuchenden Wirkstoff, zum anderen durch den Konzentrationsgradienten des eindringenden Stoffes, der quer durch die Haut aufgebaut wird. Auch die Dicke der Haut spielt eine Rolle [2].

Zusätzlich beeinflussen aber auch physikochemische Eigenschaften wie die Hydrophilie oder die molekulare Masse der Substanz die Rate der Permeation. Allgemein gelten Eigenschaften wie eine molekulare Masse von weniger als 500 Dalton sowie ein moderat hydrophiler Charakter bzw. ein Oktanol-Wasser

Verteilungskoeffizient von 1 – 3 als vorteilhaft. Folglich sind Moleküle mit diesen Charakterzügen durch eine schnelle Hautpermeation gekennzeichnet. Neben den oben genannten Faktoren gibt es noch weitere Parameter, die einen Einfluss auf die Permeation von Arzneistoffen haben. Dazu zählen beispielsweise das molekulare Volumen, die Wasserstoffbrückenbindungsaktivität sowie die Löslichkeit und der Schmelzpunkt einer Substanz [2].

Moleküle können auf zwei verschiedenen Wegen durch die Haut permeieren: einerseits über den transepidermalen Weg und andererseits über die transglanduläre oder transfollikuläre Route [2]. Dies ist in Abbildung 3 dargestellt [13]. Moleküle, die dem transepidermalen Pfad folgen, queren die Epidermis, die Dermis und die Hypodermis über den intrazellulären und/oder extrazellulären Raum. Diese Passage der Hautschichten kann entweder transzellulär oder interzellulär erfolgen. Transzellulär bedeutet, dass der Wirkstoff alternierend Schichten von Zellen und extrazellulärer Matrix durchquert. Dieser Vorgang umfasst folglich eine Abfolge von Verteilungs- und Diffusionsprozessen in wechselweise hydrophile und lipophile Domänen. Im Vergleich dazu durchwandert der eindringende Stoff im Zuge des interzellulären Pfades die Hautschichten, ohne die Zellen zu durchqueren. Diese Route führt den Wirkstoff in gewundener Form entlang der Lipidmatrix durch die Haut. Während kleine Moleküle mit hydrophilem Charakter den transzellulären Weg bevorzugen, favorisieren lipophile Moleküle den interzellulären Pfad [2]. Es dürfte jedoch generell der interzelluläre Pfad insgesamt eine deutlich größere Rolle in Bezug auf Hautpermeation verschiedener Stoffe spielen.

Die Permeation über die transfollikuläre und transglanduläre Route resultiert aus dem Eindringen der Moleküle in die Haut über Haarfollikel bzw. Schweißdrüsen. Da diese Hautanhangsgebilde aber nur etwa 0,1 % der Hautoberfläche ausmachen, dürfte dieser Weg in Bezug auf den perkutanen Transport generell eine eher untergeordnete Rolle einnehmen [2].

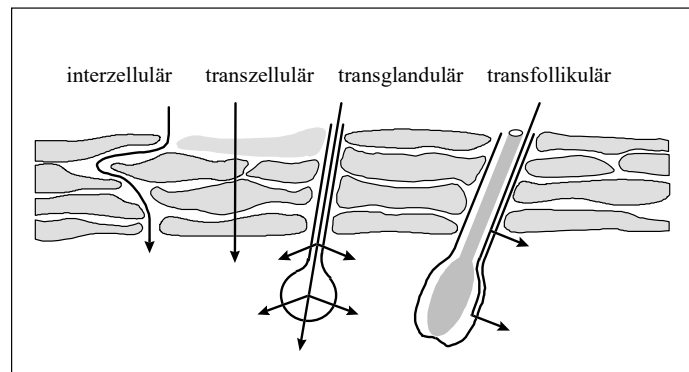


Abbildung 3: Permeationswege durch die Haut [13]

2.2. Licht und seine Effekte auf die Haut

Das Sonnenlicht, welches die Erdoberfläche erreicht, kann in drei Komponenten mit unterschiedlichen Wellenlängen eingeteilt werden. Die ultraviolette Strahlung (UV), der Bereich des sichtbaren Lichtes (Vis) und die Infrarot-Strahlung (IR) bilden das elektromagnetische Spektrum des Lichtes. Die UV-Strahlung umfasst den Wellenlängenbereich von 200 – 400 nm und nimmt etwa 6 % der solaren Bandbreite ein. Das sichtbare Licht (400 – 760 nm) macht 52 % des Spektrums aus und der Infrarotbereich (760 – 10^6 nm) bildet die restlichen 42 % [22].

Vom gesundheitlichen Aspekt aus betrachtet nimmt der ultraviolette Bereich die bedeutendste Rolle ein. Er kann in drei weitere Untereinheiten differenziert werden: UVC, UVB und UVA. Die UVC-Strahlung umfasst den kurzwelligen Bereich von 100 – 290 nm und bildet die energiereichste Form der UV-Strahlung. Da sie jedoch von der Ozonschicht der Stratosphäre effektiv absorbiert wird, erreicht sie die Erdoberfläche nicht und hat somit auch keinen Einfluss auf die Haut. Auch die mittelwellige UVB-Strahlung, die den Wellenlängenbereich von 290 – 320 nm abdeckt, trifft nur in abgeschwächter Form auf die Erdoberfläche auf. Folglich besteht jener Bereich der UV-Strahlung, dem eine Wirkung auf die Haut zugesprochen wird, nur zu ungefähr 5 % aus UVB-Strahlung. Die restlichen 95 % und damit den Großteil nimmt das langwellige UVA ein, dessen Spektrum die Wellenlängen von 320 – 400 nm umfasst [22-23].

Eine Interaktion zwischen Sonnenlicht und Haut wird durch Prozesse wie Absorption, Reflexion und Streuung gewährleistet. Das Ausmaß dieser Wechselwirkung wird

insbesondere durch die charakteristische mehrschichtige Struktur der Haut und die physikalischen Eigenschaften der Strahlung bestimmt. Strahlung ist durch das Vorhandensein von energiereichen Photonen gekennzeichnet. Allgemein gilt, dass mit steigender Wellenlänge die von den Photonen transportierte Energie abnimmt. Von UVB über UVA und dem sichtbaren Licht bis hin zum Infrarotbereich werden die Photonen energieärmer; gleichzeitig wird aber die Fähigkeit der Strahlung, biologisches Gewebe zu penetrieren, verstärkt. Während also die längerwellige und energieärmere UVA-Strahlung bis in die tiefergelegenen Schichten der Dermis eindringen kann, ist die Penetrationstiefe von UVB auf ca. 20 μm und damit die lebende Epidermis beschränkt. In Abbildung 4 wird dieser Sachverhalt nochmals grafisch dargestellt. Die Grafik zeigt zusätzlich die Penetrationseigenschaften des nahen Infrarotbereiches (760 – 1440 nm). Diese Strahlungsart kann die noch tiefer gelegene Subcutis erreichen und besitzt damit eine potentere Hautpenetration als UVA [22].

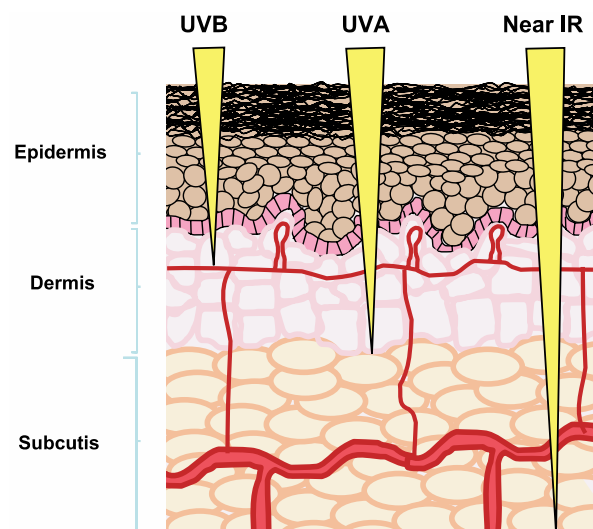


Abbildung 4: Penetration von Strahlung in die Haut in Abhängigkeit von der Wellenlänge [22]

Demnach bestimmen Eigenschaften wie die Penetrationstiefe in die Haut, der energetische Charakter der Photonen und das Maß an Sonnenlicht den biologischen Effekt der UV-Strahlung. Zusätzlich wird ihre Wirkung auch von der Menge an Quanten, die absorbiert wird, beeinflusst. Die Interaktion von optischer Strahlung mit absorbierenden Verbindungen (auch Chromophore genannt) bildet die Grundlage für diesen Vorgang. Die Zahl der absorbierten Quanten kann in Abhängigkeit von der Wellenlänge ermittelt und dargestellt werden. Daraus ergibt sich ein für jeden

Chromophor charakteristisches Aktionsspektrum bzw. Wirkspektrum, das eine wichtige Bezugsgröße bildet, um den Effekt von UV-Strahlung abschätzen zu können [22-24].

Die biologische Wirkung von Licht auf den menschlichen Körper ist also sehr komplex. Zum einen beeinflusst es unsere Stimmung, reguliert den zirkadianen Rhythmus und wird auch als Therapieform eingesetzt. Zum anderen wird durch UV-Strahlung die Bildung einiger Hormone sowie die Synthese von Vitamin D stimuliert. Neben diesen positiven Effekten kann Sonnenlicht jedoch auch schädigende Wirkungen auf die Haut ausüben. Ein Schaden durch Sonneneinstrahlung entsteht auf Basis einer Interaktion von UV-Strahlung mit Biomolekülen. Infolge der Absorption von Strahlung durch Moleküle kommt es häufig zu einer chemischen Modifikation ihrer Struktur. Tritt dieser Prozess auf, spricht man von einer direkten Interaktion zwischen UV-Strahlung und diesen Molekülen. Ein klassisches Resultat einer direkten Interaktion zwischen DNA und UV-Strahlung stellen etwa Pyrimidin-Dimere und/oder Photoprodukte dar. Die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) hingegen ist beispielhaft für einen indirekten Effekt. Interagieren Moleküle in der Haut (wie z.B. Melanin, NADH und Urocaninsäure) mit UV-Licht, kann die absorbierte Energie auf verschiedenen Wegen für die Produktion reaktiver Sauerstoffspezies genutzt werden, die schließlich zur Schädigung der Zellen führen können. Aus diesen direkten und indirekten Interaktionen können verschiedene akute und chronische Hautschäden resultieren [22].

2.2.1. Akute UV-Schäden

Sowohl UVA- als auch UVB-Strahlung kann zu chemischen Veränderungen und in weiterer Folge zu lichtbedingten Läsionen in der DNA führen. Wie bereits erwähnt zählen Pyrimidin-Dimere und Photoprodukte sowie die Bildung von Cyclobutan-Dimeren zwischen angrenzenden Thymin- oder Cytosin-Resten zu den gängigsten Photoläsionen. Die Zelle reagiert auf diese Prozesse mit einem umfangreichen Reparatursystem. Durch die Inhibierung des Zellzyklus beispielsweise wird der Zelle die Reparatur der aufgetretenen DNA-Läsionen ermöglicht und folglich eine Mutation der Schäden verhindert. Ist der Schaden jedoch irreparabel kommt es zur Einleitung der Apoptose und damit zum Untergang der schadhaften Zelle [22-23].

Eine häufige Folge exzessiver Sonnenlichtexposition ist der akut auftretende Sonnenbrand mit dem damit verbundenen Erythem. Hervorgerufen wird der akute Sonnenbrand vor allem durch UVB- und kurzwellige UVA-Strahlung, deren Interaktion mit zellulärer DNA zur Aktivierung inflammatorischer Gene und diversen Signalkaskaden führt. In weiterer Folge wird die Produktion zahlreicher Entzündungsmediatoren wie Prostaglandine, Cytokine, Chemokine und Histamine stimuliert [22, 24].

Neben dem Erythem können noch weitere akute Effekte auftreten. Darunter versteht man etwa eine verstärkte Vaskularisation oder eine gesteigerte Melaninsynthese (Melanogenese). Durch übermäßige Proliferation von Keratinozyten kann es außerdem zu einer Verdickung der Haut kommen. In Bezug auf die gesteigerte Melanogenese lassen sich zwei Arten von Pigmentierung unterscheiden: in Abhängigkeit vom Hauttyp kann es nach UV-Bestrahlung einerseits zu einer kurzandauernden Steigerung der Pigmentierung kommen, die sich innerhalb von wenigen Minuten zeigt. Andererseits kann eine für mehrere Stunden anhaltende Pigmentierung auftreten, bevor es schließlich zu der verzögerten Bräunung der Haut kommt, die über mehrere Tage hinweg bestehen bleibt. In Abhängigkeit von der Turnover-Rate der Haut, also den Auf- beziehungsweise Abbauprozessen, denen sie unterliegt, kann die Bräunung bis zu einem Monat bestehen bleiben [22, 24].

2.2.2. Chronische UV-Schäden

Obwohl es sich bei UVA im Vergleich zu UVB um Strahlung eines höheren Wellenlängenbereichs handelt und folglich weniger Photonenenergie transportiert wird, kann auch Strahlung aus diesem Bereich Hautschäden verursachen. Während UVA-Strahlung bei der Entstehung des akuten Sonnenbrandes nur eine sekundäre Rolle spielt gewinnt ihr Einfluss in Bezug auf längerfristige Hautschäden immer mehr an Bedeutung [13, 16].

Im Gegensatz zu UVB übt UVA auf Moleküle keine direkte Wirkung aus. Ihr Effekt basiert auf der Interaktion mit endogenen Chromophoren, sogenannten photosensitivierenden Komponenten wie Flavine oder Porphyrine. In Anwesenheit von Sauerstoff absorbiert der Chromophor Photonen aus der Strahlung und steigt dadurch in ein höheres Energie-Niveau auf. Diese gewonnene Energie wird jedoch nicht in Form von Licht oder Wärme freigesetzt. Der angeregte Chromophor tritt mit

umliegenden Molekülen in Wechselwirkung und transferiert dabei Elektronen bzw. Energie. Aus diesem energetischen Transfer gehen reaktive Moleküle hervor, die den Oxidationsvorgang begünstigen und so die Bildung von freien Radikalen sowie reaktiven Sauerstoffspezies ermöglichen. Diese photodynamischen Reaktionen bilden die Grundlage für die Entstehung chronischer UV-Schäden nach anhaltender UV-Belastung. Wenn man von chronischen UV-Schäden spricht sind damit insbesondere Prozesse wie Hautalterung, Immunsuppression und Karzinogenese gemeint [22].

2.2.2.1. Hautalterung

Hautalterung durch Sonnenstrahlung wird als eine der häufigsten Folgen von chronischer UV-Belastung beschrieben. Im Unterschied zur physiologisch auftretenden chronologischen Alterung der Haut (intrinsische Hautalterung), die durch feine Fältchen und moderat nachlassende Elastizität gekennzeichnet ist, weist die lichtbedingte Hautalterung (extrinsische Hautalterung) ein differenziertes klinisches Erscheinungsbild auf. Eine veränderte Pigmentierung, wie etwa „Altersflecken“ oder Sommersprossen (Epheliden), Trockenheit, Blässe sowie tiefe Falten und eine zunehmende Schlaffheit der Haut kennzeichnen den Prozess der Hautalterung durch UV-Strahlung. Häufig gehen auch erweiterte Gefäße (Teleangiectasien), prä-kanzerogene Läsionen und ein lederartiger Charakter der Haut mit diesem Krankheitsbild einher. Der molekulare Mechanismus hinter diesem Vorgang wird im Wesentlichen durch die bereits erwähnte Entstehung reaktiver Sauerstoffspezies unter dem Einfluss von UVA-Strahlung bestimmt. Die Interaktion der ROS mit Transkriptionsfaktoren wie AP-1 und TGF- β steigert bzw. vermindert deren Expressionsrate und führt in weiterer Folge zu einem verstärkten Untergang von Kollagen. Zusätzlich wird auch die Synthese des Kollagens downreguliert und damit der Hautalterungsprozess begünstigt [22, 26].

2.2.2.2. Immunsuppression

Die Haut bietet in ihrer Funktion als Schnittstelle zur Außenwelt auch eine immunologische Abwehr gegen eindringende Pathogene und kanzerogene Zellen. Verantwortlich dafür ist das Immunsystem der Haut, das sich aus der zellulären und humoralen Immunantwort zusammensetzt. Während die zelluläre Immunantwort auf

T-Lymphozyten basiert versteht man unter dem humoralen Abwehrsystem Antikörper-produzierende B-Zellen. T-Lymphozyten tragen auf ihrer Oberfläche einen T-Zell-Rezeptor, der eine gewisse Ähnlichkeit zu Antikörpern aufweist und mit dessen Hilfe sie Pathogene, Antigene und kanzerogene Zellen erkennen können. Je nach T-Zell-Typ besteht ihre Aufgabe darin, sich an das eindringende Pathogen zu heften, den angreifenden Organismus zu degradieren oder die Wundheilung einzuleiten. Chronische UV-Bestrahlung hat nicht nur einen negativen Einfluss auf die Alterung der Haut, sie kann auch wichtige Elemente der menschlichen Immunantwort supprimieren. Wird der Ablauf der Immunantwort gestört, werden Pathogene und kanzerogene Zellen nicht mehr degradiert und können sich dementsprechend negativ auf den Organismus auswirken. Die lichtbedingte Immunsuppression wird damit zu einem Risikofaktor für Hautkrebs und anderen negativen Effekten, die mit einem abgeschwächten Immunsystem in Verbindung gebracht werden [22].

2.2.2.3. Karzinogenese

Die Karzinogenese stellt einen weiteren chronischen UV-Schaden dar und gewinnt aufgrund der steigenden Inzidenzrate immer mehr an Bedeutung. Es wird angenommen, dass neben genetischen und umweltbedingten Faktoren eine chronische UV-Bestrahlung den signifikantesten Einfluss auf die Entstehung von Hautkrebs besitzt. Die Karzinogenese umfasst einen dreistufigen Prozess aus Initiation, Promotion und Progression. Während ein Großteil der Karzinogene meist nur einen dieser drei Prozesse vorantreibt, verkörpert die UV-Strahlung ein komplettes Karzinogen. Sie initiiert nicht nur die Mutation der Zellen, sondern stimuliert diese auch und verstärkt zusätzlich die Progression der kanzerogenen Zellen [22].

Wie bereits erwähnt kann es durch UV-Licht auf direktem oder indirektem Weg zu DNA-Läsionen kommen. Unter normalen Umständen werden diese Schäden von einem umfangreichen Kontrollsystem repariert oder durch Einleitung der Apoptose von einer Weitermutation abgehalten. Durch ultraviolette Strahlung wird die Effektivität dieses Reparatursystems jedoch vermindert, wodurch die kanzerogenen Zellen ungehindert proliferieren und metastasieren können und so das Risiko an Hautkrebs zu erkranken erhöht wird [22].

2.3. Raman-Spektroskopie

Trifft Licht auf eine Materie, kommt es zu dessen Streuung. Dabei kann zwischen elastischer und inelastischer Streuung differenziert werden. Während bei der elastischen Streuung die kinetische Energie des gestreuten Teilchens unverändert bleibt und sich nur der Impuls ändert, erleben die gestreuten Teilchen und Wellen bei der inelastischen Streuung nicht nur eine Impulsveränderung, sondern auch einen Energieverlust. Folglich geht mit der inelastischen Streuung von Licht an Molekülen eine Veränderung der Wellenlängen einher [27].

Zu Beginn des 20. Jahrhunderts verfügte man bereits über das Wissen, dass im Rahmen des Streuungsprozesses unter Millionen Photonen nur ein einziges einer inelastischen Streuung unterliegt. Die Analyse dieser inelastisch gestreuten Photonen stellte ohne Hilfsmittel, wie sie uns in der heutigen Zeit zur Verfügung stehen (Laser, Software-Programme), eine Herausforderung dar. In den 1920er Jahren machte es sich schließlich der indische Physiker Sir Chandrasekhara Venkara Raman zur Aufgabe, diesen Effekt - der später auch nach ihm benannt wurde - zu untersuchen und mit Hilfe eines optischen Versuchsaufbaus aufzuzeichnen. Dabei zeigte sich, dass durch inelastisch gestreutes Licht Informationen über die Struktur der für die Streuung verantwortlichen Moleküle gewonnen werden können. Obwohl der österreichische Physiker Adolf Smekal Jahre zuvor das Vorhandensein des Raman-Effekts in der Theorie vermutete, war es Sir Chandrasekhara Venkara Raman, dem der Nachweis dieses Effektes gelang und der auch weitere Untersuchungen in diesem Bereich durchführte [28].

Dank technologischer Fortschritte ist diese Technik heutzutage nicht mehr wegzudenken - gibt es doch kaum ein Forschungsgebiet, in dem sie nicht zum Einsatz kommt [28].

2.3.1. Der Raman-Effekt

Bei der Streuung von Licht handelt es sich um einen Vorgang, der auf der Interaktion zwischen einem elektromagnetischen Feld und einem molekularen System basiert. Aus dieser Wechselwirkung resultiert eine Störung der elektronischen Ladungsverteilung des Moleküls, wodurch in weiterer Folge ein Dipolmoment induziert wird. Diese induzierten Dipolmomente bilden dabei selbst ein sekundäres elektrisches Feld, das von der molekularen Materie ausgeht und das gestreute Licht

repräsentiert. Das induzierte Dipolmoment wird zusätzlich von der Polarisierbarkeit der molekularen Materie beeinflusst und ist durch das Vorhandensein verschiedener Schwingungsfrequenzen gekennzeichnet [29].

Der Raman-Effekt beschreibt im Allgemeinen das grundlegende Funktionsprinzip der Raman-Spektroskopie. Photonen aus dem einfallenden Licht können von einem Molekül absorbiert werden und dieses in einen Schwingungszustand versetzen. Das dabei entstehende Streulicht kann – wie nachstehend beschrieben – charakterisiert werden [30].

Moleküle, die sich in einem Schwingungsgrundzustand befinden, können aus dem einfallenden Licht Photonen absorbieren. Findet dabei keine Energieübertragung statt und wird das Photon also mit der gleichen Energie emittiert, mit der es absorbiert wurde, spricht man vom Prozess der Rayleigh-Streuung bzw. der elastischen Streuung. Resultiert aus der Absorption eines Photons hingegen ein angeregter Schwingungszustand des Moleküls, gefolgt von einer Relaxation in den Grundzustand, die auf der Emission eines energieärmeren Photons basiert, handelt es sich um die sogenannte inelastische Streuung oder Stokes-Streuung. Als letztes unterscheidet man noch die Anti-Stokes-Streuung. Dabei wird ein Photon von einem Molekül absorbiert, dass sich bereits in einem angeregten Schwingungszustand befindet. Durch die darauffolgende Emission eines energiereicheren Photons geht das Molekül in den Schwingungsgrundzustand zurück (Abb. 5). Die beiden zuletzt genannten Streuungen bilden zusammen den Raman-Effekt und liefern folglich strukturelle Information und Information über die Eigenschaften der untersuchten Materie [31-32].

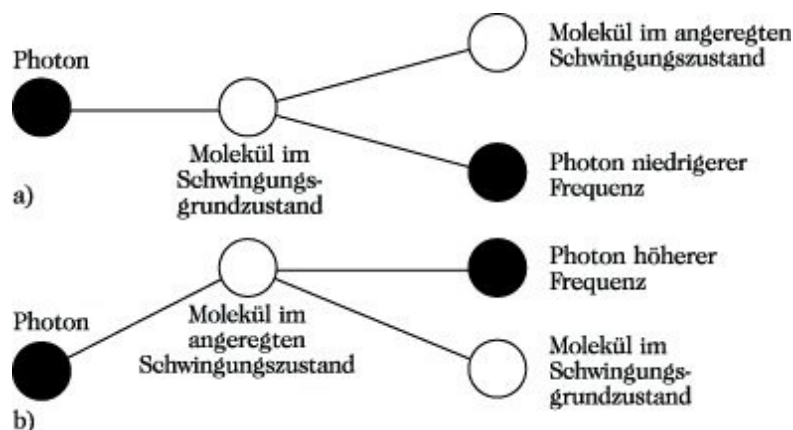


Abbildung 5: Entstehung von Stokes- und Anti-Stokes-Streuung [32]

Im Vergleich zur Stokes-Streuung ist die Intensität der Anti-Stokes-Streuung wesentlich geringer. Das inelastische Streulicht weist allgemein eine schwächere Intensität auf. Während das Rayleigh-Streulicht eine 10^{-3} -fache Intensität der Erregungsstrahlung besitzt, kann bei der Raman-Streuung nur mit einer $10^{-6} - 10^{-8}$ -fachen Ausbeute gerechnet werden. Folglich sollte der Empfänger des Raman-Spektrometers möglichst empfindlich und die Strahlung der Lichtquelle möglichst intensiv sein [30, 32].

2.3.2. Aufbau eines Raman-Spektrometers

Das Raman-Spektrometer setzt sich grundsätzlich aus einem Laser, einer Probenhalterung, einem Spektralphotometer und einem Detektor zusammen. Dank dieses Versuchsaufbaus wird die Untersuchung von Molekülen in allen Aggregatzuständen (fest, flüssig, gasförmig) ermöglicht [33].

Die zu untersuchende Probe wird mit einem Laser bestrahlt. Beim Durchtritt durch die Probe wird das Laserlicht von einem dahinterliegenden Spiegel (S_1) reflektiert, wodurch die Intensität der Strahlung erhöht wird. Im rechten Winkel zur Probe befindet sich ein zweiter Spiegel (S_2), der zur Intensitätsverstärkung des Streulichtes dient. Die entstandene Raman-Streuung wird mit Hilfe einer Linse in den Eintrittsspalt (1) fokussiert und trifft anschließend auf ein optisches Gitter. Dieses Gitter führt zu einer spektralen Zerlegung der Streustrahlung, sodass die Raman-Strahlung von der restlichen Strahlung getrennt werden kann, und leitet diese anschließend durch einen Austrittsspalt (2). Beim Austritt aus dem Spalt wird die Streustrahlung schließlich durch eine zweite Linse auf einen Detektor (CCD-Detektor) fokussiert (Abb. 6) [30].

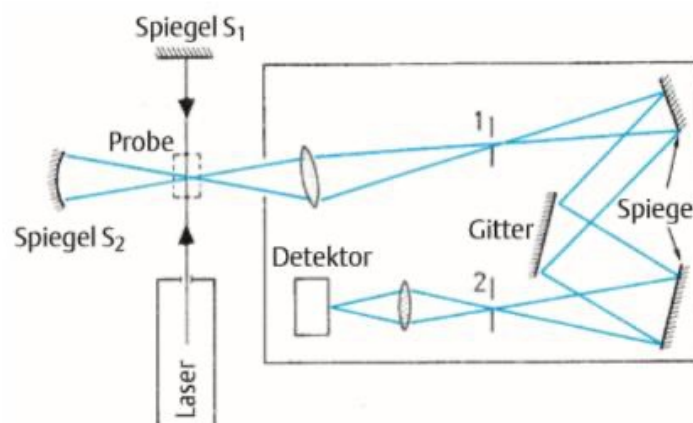


Abbildung 6: Aufbau eines Raman-Spektrometers [30]

Als Lichtquellen kommen meist rote oder grüne Gaslaser (Helium-Neon-Laser, Argon-Ionen-Laser), durchstimmbare Farbstofflaser (Rhodamin 6G) oder YAG-Feststofflaser (Yttrium-Aluminium-Granat-Laser) zum Einsatz [30].

In Abbildung 7 sind die einzelnen Bestandteile des im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Raman-Spektrometers (RiverD International B.V., Rotterdam, Niederlande) dargestellt.

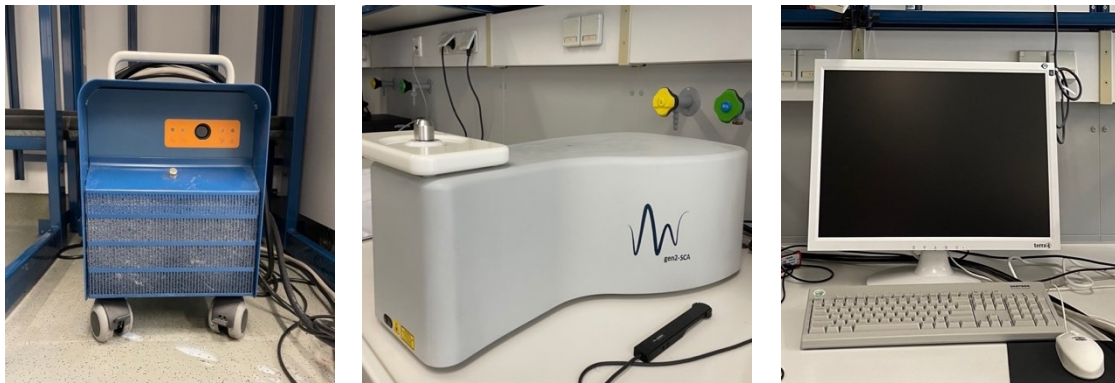


Abbildung 7: Bestandteile des Raman-Spektrometers (v.l.n.r): Power Supply Unit, Analyzer und Computer

Die Power Supply Unit ist für die Stromversorgung verantwortlich und der Analyzer bildet die Messeinheit des Raman-Spektrometers. Seine Steuerung erfolgt über den Computer und die darauf installierte RiverICon instrument control Software. Er setzt sich aus einem High Performance Raman Module (HPRM) mit einem CCD-Detektor, zwei Laserquellen ($\lambda = 671 \text{ nm}$ und 785 nm) und einem Messfenster zusammen. Die Auswertung erfolgt schließlich auf dem Computer [34].

2.3.3. Raman-Spektroskopie in der Hautforschung

Die Raman-Spektroskopie hat sich in den letzten Jahren (insbesondere aufgrund des enormen Fortschrittes in Bezug auf die optischen und technischen Ressourcen sowie im Bereich der Mikroskop- und Software-Entwicklung) zu einem der wichtigsten Analyse-Verfahren in der Hautforschung entwickelt. Das Anwendungsgebiet dieser spektroskopischen Methode ist nicht nur auf die analytische Untersuchung physiologischer und pathophysiologischer Hautcharakteristika beschränkt, sondern erstreckt sich mittlerweile auch zunehmend in die Bereiche der Arzneistoffentwicklung und der Kosmetik [3-7].

Das Forschungsgebiet rund um die Haut ist sehr breit gefächert. Neben der Analyse physiologischer Funktionen und biochemischer Charakteristika - inklusive deren strategischer Manipulation und Beeinflussung - sind auch die Diagnose pathologischer Zustände sowie Aufnahme- und Verteilungsvorgänge von aktiven Komponenten und Hilfsstoffen wichtige Kernbereiche. Die Untersuchung der Absorptionsprozesse, die in der Haut stattfinden, nimmt dabei eine ganz spezifische Rolle ein. Einerseits ist das Wissen über die Absorptionsfähigkeit der Haut gegenüber einer vermeintlich schadhaften Substanz ein wichtiger Aspekt, der im Rahmen von Sicherheitsstudien zur Risikoabschätzung erhoben wird. Andererseits bildet dieses Wissen die Basis für die rationale Entwicklung von Kosmetika, Schutz- und Pflegeprodukten sowie Arzneistoff-haltigen Dermatika [3].

Für einen kontrollierten oder sogar zielgerichteten Arzneistofftransport in die Haut ist auch die Analyse der Absorptions- und Transportmechanismen in den tiefergelegenen Hautschichten eine Notwendigkeit. Während der allgemeine Hautzustand und die physiologischen Charakteristika (wie etwa der pH-Wert oder die Hautfeuchtigkeit) an der Hautoberfläche relativ einfach mit nicht-invasiven Methoden erhoben werden können ist eine detaillierte Hautanalyse bis in tieferliegende Schichten etwas komplexer. Als State-of-the-Art-Methoden zur Untersuchung der Hautpermeation galten bisher Verfahren wie Franz-Diffusions-Zellen, Tape-Stripping oder die Anwendung des Kryotoms. Als Hautmodelle für die Durchführung von Versuchen kamen dabei häufig Labortiere, exzidierte Tierhaut oder Humanhaut zum Einsatz, wobei letztere entweder von Verstorbenen stammte oder im Rahmen einer Bauchdeckenstraffung extrahiert wurde. Die Versorgung mit extrahierter Humanhaut stellt jedoch einen limitierenden Faktor dar. Zusätzlich handelt es sich bei den erwähnten Verfahren um sehr zeitaufwändige, destruktive und invasive Techniken, die zudem keine akkurate räumliche Auflösung von Penetrationsprozessen auf molekularer Ebene liefern. Aufgrund dieser Problemstellungen, die teilweise große Hürden darstellen, stieg die Nachfrage nach präzisen und unkomplizierten Analyseverfahren enorm an [3].

Die Raman-Spektroskopie ermöglicht es die Haut zu charakterisieren, ohne sie dafür zerstören zu müssen. Da der Versuchsaufbau der Raman-Spektroskopie in Bezug auf die verwendete Laserquelle oder durch Kombinationen mit einem konfokalen Mikroskop sehr anpassungsfähig ist, sind die Messungen nicht nur auf in vitro- bzw.

ex vivo-Systeme beschränkt, sondern sind auch für den Einsatz im Zug von in vivo-Studien geeignet [3].

Wie bereits erwähnt wird dieses Verfahren gerne für die Charakterisierung des physiologischen bzw. pathologischen Hautzustandes verwendet. Neben der Erhebung von biologischen Hautfaktoren oder der Differenzierung zwischen den verschiedenen Schichten anhand ihrer molekularen Struktur kann mit dieser Technik dank der Penetrationsfähigkeit des Lasers auch ein Tiefenprofil der Haut erstellt werden. Dadurch kann sowohl der Effekt einer neuen Formulierung auf die Struktur der Haut untersucht als auch deren Penetrationsfähigkeit in die Haut beobachtet werden [3-8].

Durch die Erstellung eines Tiefenprofils der Haut kann im Rahmen der Raman-Messung der physiologische Hautzustand unter Betrachtung verschiedener Parameter untersucht werden. Dazu ist die Software, die zur Auswertung der Messungen verwendet wird, mit einem Fitting-Algorithmus ausgestattet. Dieser liefert für jeden Parameter die pro Hauttiefe gemessene relative Konzentration in Geräteeinheiten (*arbitrary units*, a.u.), in der dieser vorliegt. In Abhängigkeit von der Hauttiefe kann demnach auch der Gehalt dieser Parameter kontrolliert und unter verschiedenen Bedingungen verglichen werden.

Die Messeinheit des Spektrometers ist mit zwei Laserlichtquellen ausgestattet. Der eine Laser misst mit der Wellenlänge $\lambda = 671 \text{ nm}$ und deckt damit den High-Wave-Number-Bereich (HWN), der die Wellenzahlen $2800 - 3800 \text{ cm}^{-1}$ umfasst ab. Die Messung des zweiten Lasers erfolgt mit einer Wellenlänge von $\lambda = 785 \text{ nm}$ im Fingerprint-Bereich (FP), der durch Wellenzahlen von $800 - 1800 \text{ cm}^{-1}$ gekennzeichnet ist [34-35].

High-Wave-Number-Spektren

Aus dem High-Wave-Number-Bereich lassen sich wichtige Informationen über die biochemische Zusammensetzung der untersuchten Probe gewinnen. Basierend auf molekularen Vibrationen von Lipiden, Proteinen und Wasser ergibt sich ein Spektrum, dessen charakteristische Peaks vor allem für die Bestimmung des Wassergehaltes der Haut von großer Bedeutung sind [35].

Wassermoleküle liefern sowohl im Fingerprint- als auch im High-Wave-Number-Bereich ein Raman-Signal. Während dieses Signal im Fingerprint-Bereich eine relative schwache Bande im Spektrum produziert, die das O-H-Signal bei 1645 cm^{-1} widerspiegelt, zeigt sich im High-Wave-Number-Bereich ein starker, breiter Peak. Dieser entspricht dem O-H-Signal bei ca. 3350 cm^{-1} . Die Wasser-Bande im HWVN-Spektrum überlappt außerdem mit den N-H Protein-Signal bei 3329 cm^{-1} . Folglich ist das Raman-Signal im High-Wave-Number-Bereich viel einfacher von anderen Signalen zu unterscheiden als im Fingerprint-Bereich, da sich dort der O-H Peak und der etwas stärkere Amid I Peak annähernd an der gleichen Stelle befinden. Aus diesem Grund wird für die Quantifizierung des Wassergehaltes der Haut bzw. für Untersuchungen des Hydrationsstatus von Geweben insbesondere auf Raman-spektroskopische Messungen im HWVN-Bereich zurückgegriffen [35].

Das Stratum corneum ist mit 15 – 30 % durch eine eher geringe Wasserkonzentration gekennzeichnet. An der Grenze zur lebenden Epidermis, also etwa 10 – 15 μm unter der Hautoberfläche, kommt es zu einem abrupten Anstieg der Konzentration. In dieser tieferliegenden Schicht erreicht der Wassergehalt eine Plateauphase und bleibt danach mit einer Konzentration von etwa 70 % konstant [6, 36].

Für die Berechnung des Wassergehaltes der Haut mit Hilfe der High-Wave-Number-Spektren setzt man die Raman-Intensitäten zweier Vibrations-Signale zueinander in Relation. Man vergleicht hierbei die Intensität des O-H-Signals von Wasser bei 3390 cm^{-1} mit der Intensität des C-H-Signals bei 2935 cm^{-1} [36].

Fingerprint-Spektren

Wird der Fingerprint-Bereich eines Raman-Spektrums betrachtet, kann man auch daraus wertvolle biochemische Informationen gewinnen, die für die Charakterisierung der Probe von Bedeutung sind [35]. Einerseits lassen sich anhand der Fingerprint-Spektren aufgetragene Substanzen hinsichtlich ihres Gehaltes sowie ihrer Penetrationsfähigkeit in die Haut untersuchen. Andererseits werden diese Spektren auch genutzt, um die physiologischen Hautkomponenten nachzuweisen und in relativen Geräteeinheiten zu Vergleichszwecken zu quantifizieren. Dazu zählen unter anderem Ceramide, Cholesterin, Keratin, Harnstoff und der Natural Moisturizing

Factor (NMF). Auf diese wichtigen Hautparameter wird im Folgenden kurz näher eingegangen.

Wie bereits erwähnt, bilden Ceramide, Cholesterin und freie Fettsäuren die lipophilen Hauptbestandteile der extrazellulären Matrix im Stratum corneum. Die Ceramide nehmen dabei den größten Anteil an der Gesamtlipidmenge ein und sind für die Barrierefunktion ein wichtiger Faktor. Dabei kann zwischen Glukosylceramiden und Ceramiden unterschieden werden. Die Veresterung von Ceramiden mit langkettigen, gesättigten Fettsäuren ($> C_{20}$) führt dazu, dass diese resistenter auf Sauerstoff, Temperaturschwankungen und UV-Strahlung reagieren als mehrfach ungesättigte Fettsäuren. Auch die Bildung von freien Radikalen inklusive deren Metaboliten kann durch diese Veresterung um ein Vielfaches reduziert werden. Zudem beeinflussen die Ceramide (insbesondere das Ceramid I) aufgrund ihrer strukturellen Eigenschaften die Stabilität und Organisation der interzellulären Lipidlamellen und folglich die Integrität der Hautbarriere [1, 37].

Cholesterin ist unter anderem für die Stabilität und die Membran-Fluidität des Stratum corneum von großer Bedeutung. Seine Synthese findet in der Epidermis mit besonders starker Ausprägung im Stratum granulosum statt. Das Cholesterinsulfat lässt sich in jeder Schicht der Epidermis nachweisen. An der Grenze zwischen Stratum granulosum und Stratum corneum kommt es zur Desulfatierung des Cholesterinsulfats zu Cholesterin. Es wird angenommen, dass dieser Desulfatierungsschritt maßgeblich für die hohe Cholesterinkonzentration (20 – 25 %) im Stratum corneum verantwortlich ist [1, 37]. Höltje et al. untersuchten in einer Studie den Einfluss von Cholesterin auf die Struktur und die Dynamik der Haut [38]. Diese Simulationen der molekularen Dynamik von Hautlipiden zeigte, dass Fettsäuren bei Hauttemperatur eine sehr geordnete Konformation einnehmen. Durch Zugabe von Cholesterin kam es zu einer Abnahme der Rigidität dieser Anordnung. Folglich konnte also ein fluidierender Effekt des Cholesterins auf die Struktur beobachtet werden, wodurch seine Funktion im Stratum corneum nochmals bestätigt wurde [38].

Keratin ist eines der mengenmäßig dominierenden Proteine im Stratum corneum und liegt dort - sofern die Haut gesund ist - homogen verteilt vor. Wie bereits erwähnt durchlaufen die Korneozyten einen Differenzierungsprozess vom Stratum granulosum zum Stratum corneum. Dabei lagert sich faseriges Keratin in ihre

Wasser-Lipid-Matrix ein. Die Funktionen dieses Proteins sind sehr vielseitig. Das Keratin gewährleistet nicht nur die mechanische und elastische Belastbarkeit der Korneozyten und damit der Haut, sondern stellt zusammen mit den Korneodesmosomen auch einen wichtigen Faktor für die Barrierefunktion des Stratum corneum dar. Zudem hat es aufgrund seiner Wasserspeicherkapazität auch einen Einfluss auf den Diffusionsprozess von Wasser und ist mitverantwortlich dafür, dass es bei Okklusion zu einem Schwellungseffekt kommt [10, 37, 39].

Harnstoff zählt zu den natürlichen Feuchtigkeitsfaktoren der Epidermis, deren Funktion darin besteht, den Wassergehalt im Stratum corneum zu steigern. Er ist das Endprodukt des Aminosäurestoffwechsels und resultiert aus dem Abbau von Eiweiß. Es wird angenommen, dass Harnstoff als Teil des NMF die Wasserbindungsfähigkeit des Stratum corneum erhöht und somit die Verdunstung von Wasser an der Hautoberfläche reduzieren kann. Darüber hinaus stärkt er die epidermale Barriere und begünstigt die Lipidzusammensetzung in der Epidermis [1, 6].

Der NMF stellt eine Mischung aus verschiedenen hygroskopischen Molekülen dar. Er setzt sich primär aus freien Aminosäuren (wie etwa Histidin und Glutamin) und deren Derivaten zusammen. Zu diesen zählen die Pyrrolidoncarbonsäure (PCA) und die trans-Urocaninsäure (tUCA). Sie sind Abbauprodukte des Filaggrins, eines Struktur-Proteins, das für die epidermale Barrierefunktion und somit für die mechanische Festigkeit und Integrität des Stratum corneum von Bedeutung ist. Im Rahmen des Differenzierungsprozesses der Korneozyten, der ihre Migration an die Oberfläche des Stratum corneum umfasst, kommt es zur Hydrolyse des Filaggrins und damit zur Bildung freier Aminosäuren. Zusammen mit ihren Derivaten machen sie ca. 50 % des NMF aus, den restlichen Teil bilden freie Ionen, Zucker, Laktat und der bereits erwähnte Harnstoff. Der NMF wird in den Korneozyten gespeichert und nimmt dabei etwa 10 % ihrer Masse ein. Folglich repräsentieren diese hygroskopischen Moleküle ca. 20 – 30 % des Trockengewichtes des Stratum corneum [37, 40-41].

In seiner biologischen Funktion gewährleistet der NMF nicht nur die optimale Hydratation der Haut sowie den physiologischen Prozess der Desquamation, sondern beeinflusst auch die Barriere-Homöostase und die Hautplastizität [42]. Er besitzt ein starkes osmotisches Potential, das zur Anziehung und Bindung von Wassermolekülen führt, wodurch sich in weiterer Folge die hohe Wasserbindungskapazität erklären lässt [43]. Diese Eigenschaften machen ihn zu einem Schlüsselfaktor, um die Hautfeuchtigkeit aufrechtzuhalten und Hauttrockenheit

entgegenzuwirken. Boireau-Adamezyk et al. konnten im Rahmen einer Studie feststellen, dass der Gehalt der verschiedenen Komponenten des NMF je nach Körperstelle variiert [41].

2.4. Biophysikalische Hautparameter

2.4.1. Der transepidermale Wasserverlust (TEWL)

Als äußerste Schicht des menschlichen Organismus stellt die Epidermis das Schutzschild unseres Körpers dar. Durch die Minimierung des TEWL schützt sie die Haut vor Austrocknung. Diese Funktion wird beim Menschen von der Hornschicht der Epidermis, dem Stratum corneum, übernommen. Es wird vermutet, dass sowohl der ziegelmauerähnliche Aufbau, aber besonders auch die Lipidzusammensetzung dieser Hautschicht dabei eine Schlüsselrolle einnehmen [1].

Die Lipide des Stratum corneum sind zum einen für die Durchlässigkeit der Haut für Wasser im Zuge der Verdunstung verantwortlich. Zum anderen spielen sie aufgrund ihres ausgeprägten hydrophoben Charakters, ihrer interzellulären Lage und ihrer Anordnung in breite, lipidreiche Doppelschichten eine wesentliche Rolle bei der Regulation der Barrierefunktion nach Außen [44]. Eine Verminderung der epidermalen Lipidmenge oder eine Veränderung der Lipidzusammensetzung können den Aufbau der Barriere stören und in weiterer Folge zu trockener bzw. entzündeter Haut führen. Diese veränderten Hautzustände sind häufig durch einen erhöhten TEWL gekennzeichnet [1]. Bei intakter Haut werden grundsätzlich niedrige TEWL-Werte erwartet. Erfahrungsgemäß gilt ein Wert zwischen 8 – 12 g/m²/h als normal. Basierend darauf wird die Messung des TEWL gerne als Methode herangezogen, um die Barrierefunktion der Haut zu beurteilen [45].

Zur Bestimmung des TEWL wurden in den letzten Jahren verschiedene Messsysteme entwickelt. Dabei kann zwischen einem offenen und geschlossenen Kammersystem sowie einer geschlossenen Kondensorkammer unterschieden werden [46]. Diese Instrumente machen sich dafür in der Regel den Gradienten des Wasserdampfdruckes, der an der Hautoberfläche entsteht, zunutze. Es wird angenommen, dass sich mit zunehmender Steilheit dieses Gradienten die Verdunstungsrate von Wasser durch die Haut erhöht [47].

Das offene Kammersystem besteht aus einer runden Kammer, die in ihrem Inneren zwei Feuchtigkeitssensoren enthält. Aufgrund ihres offenen Aufbaus können die Sensoren durch die Umgebungsluft beeinflusst werden. Klimaanlage, das Öffnen bzw. Schließen von Fenstern oder Türen sowie der Atmungsvorgang und andere bewegungsabhängige Luftströme können somit einen Einfluss auf die Messung haben [48]. Verglichen dazu haben geschlossene Kondensorkammersysteme den Vorteil, dass die Sensoren durch die geschlossene Kammer vor Einflüssen aus der Umgebung geschützt sind. Zudem wird der Wasserdampf in der Kammer durch Eisbildung am Kondensator entfernt. Folglich kann dadurch im Vergleich zur offenen Kammer eine höhere Messgenauigkeit erzielt werden [46-47].

Der im Rahmen dieser Arbeit verwendete Biox AquaFlux™ AF200 (Biox Systems Ltd, England) funktioniert nach dem Kondensorkammerprinzip. Er besteht aus einem Messstab, an dessen vorderem Ende sich die zylinderförmige Messkammer befindet, sowie aus einer Halterung, der sogenannten „base unit“, in die der Messstab während der Kalibrierung oder in Messpausen geparkt werden kann (Abb. 8 und 9). Das eine Ende der Messkammer wird von einem Kondensator verschlossen, der konstant auf einer Temperatur von einigen Grad Celsius unter dem Gefrierpunkt von Wasser gehalten wird ($-7\text{ }^{\circ}\text{C}$). Das andere Ende ist offen und wird bei der Messung möglichst senkrecht auf die Hautoberfläche platziert. Wie bereits erwähnt entfernt der Kondensator den von der Haut stammenden Wasserdampf, indem er ihn in Eis umwandelt und somit aus der geschlossenen Atmosphäre der Messkammer entfernt. Dadurch wird bei der Messung die Feuchtigkeit am Kondensatorende geringgehalten, während mit zunehmender Wasserdampfflussrate die Feuchtigkeit an der Hautoberfläche steigt. Der daraus resultierende Feuchtigkeitsgradient wird für die Berechnung der *flux density* (Wasserdampfflussrate), also die Anzahl der Wassermoleküle in Gramm, die pro m^2 Hautoberfläche pro Stunde evaporiert ($\text{g}/\text{m}^2/\text{h}$), herangezogen und ergibt in weiterer Folge den gesuchten TEWL-Wert [47].



Abbildung 8: Messstab des Biox AquaFlux™ AF200



Abbildung 9: Messstab inklusive „base unit“

Der Messvorgang sollte unter Beachtung einiger zusätzlicher Faktoren wie etwa der ausgewählten Körperstelle, der Körpertemperatur, der Aktivität der Schweißdrüsen sowie dem psychischen Befinden der Probanden erfolgen, da auch diese Faktoren das Messergebnis beeinflussen können [1].

Der Biox AquaFlux™ AF200 ist zusätzlich über ein Netzkabel mit dem Computer verbunden. So kann mit Hilfe einer integrierten Software (Version 9.3) die Kalibrierung durchgeführt, der Kurvenverlauf des TEWL während der Messung mitverfolgt und das Ergebnis nach Messende abgelesen bzw. gespeichert werden [49].

2.4.2. Die Hautfeuchtigkeit

Der Hydratationsstatus unseres Organismus spielt für die Thermoregulation, die zelluläre Homöostase sowie für die Aufrechterhaltung physikalischer und kognitiver Fähigkeiten eine tragende Rolle. Die Messung der Hautfeuchtigkeit ist eine Möglichkeit, um die Hydrierung des Körpers an seiner Oberfläche abschätzen zu können. Es gibt unterschiedliche Methoden, die dabei zum Einsatz kommen [50].

Techniken bzw. Geräte, die auf elektrischen Methoden basieren, zählen dabei zu den am häufigsten eingesetzten Anwendungen. Diese Geräte machen sich Veränderungen in der elektrischen Leit- und Speicherfähigkeit der Haut zunutze und beurteilen anhand dieser Änderungen die Hydratation der Haut. Die Messgenauigkeit wird dabei von drei Faktoren beeinflusst: die Trockenheit der Haut, die vorhandene

Ionenkonzentration sowie die Messfrequenz. Während bei trockener Haut die Leitfähigkeit durch Elektronen bestimmt wird, basiert die Leitfähigkeit der hydrierten Haut auf dem Austausch von Protonen zwischen Wassermolekülen, die an Wasserstoffbrücken gebunden sind. Je nach Hauttemperatur und den Charakteristika der Hautoberfläche (Öl, Vorhandensein von Haaren) kann die Messung der Leitfähigkeit einigen Schwankungen unterliegen. Auch die elektrische Speicherkapazität der Haut kann in Abhängigkeit von der Wasserverteilung sowie dem Vorhandensein von Ionen und Dipolen, die die Penetration des elektrischen Feldes beeinflussen, unterschiedlich stark ausgeprägt sein [50].

2.4.2.1. Biox Epsilon™ E100

Beim Biox Epsilon™ E100 (Biox Systems Ltd, England) handelt es sich um ein Gerät, das auf einer kapazitiven Messmethode basiert (Abb. 10). Es ermöglicht die gleichzeitige Erfassung von Bild- und Hydrationsdaten. Dabei entspricht jeder Pixel einer reproduzierbaren Messung, auf deren Basis die Hautfeuchtigkeit beurteilt werden kann [51].

Diese Methode beruht auf dem „*contact imaging*“-Prinzip. Darunter versteht man die Entstehung eines Bildes aus dem direkten Kontakt zwischen den Sensoren und dem zu untersuchenden Objekt. Dafür beinhaltet der Epsilon™ Fujitsu MFB200 fingerprint Sensoren (Fujitsu Ltd, Japan), die in Abhängigkeit von der Penetrationsfähigkeit des von ihnen generierten elektrischen Feldes eine Messtiefe von bis zu 5 µm erreichen. Auf einer Messoberfläche von 12,8 mm x 15 mm sind 76800 einzelne Sensoren in einem rechteckigen Feld angeordnet, die auf Veränderungen der elektrischen Speicherfähigkeit, also der dielektrischen Permittivität, reagieren und so Informationen in Bezug auf die Hydratation der Haut darlegen [51].

Die dielektrischen Permittivität (ϵ) beschreibt die Interaktion von isolierenden Materialien mit einem elektrischen Feld und hat einen Einfluss auf die elektrische Speicherfähigkeit. Beim Epsilon™ wird für die Messungen die dielektrische Permittivität herangezogen, da für sie im Vergleich zur Speicherfähigkeit Kalibrierungsstandards vorhanden sind. Zudem stellt die Tatsache, dass Wasser verglichen mit anderen Materialien mit 80,1 eine hohe dielektrische Permittivität besitzt, einen weiteren Grund dar, warum ϵ als Messgröße von Vorteil ist [51].



Abbildung 10: Biox Epsilon™ E100 Sensor

Für die Messung wird der Epsilon™ in Kombination mit der Epsilon™ Software angewendet. Mit Hilfe der Software können zusätzliche Informationen aus den Messungen gewonnen oder diverse Einstellungen, wie etwa die „*Region of Interest*“, welche die Analyse einer ausgewählten Fläche ermöglicht, modifiziert werden. Abbildung 11 zeigt zwei im Rahmen einer Messung aufgenommene Bilder. Der rote Kreis symbolisiert die „*Region of Interest*“. Die dunklen Bereiche lassen sich auf einen schlechten Hautkontakt am Rand der Messfläche bzw. auf eine niedrige Hautfeuchtigkeit zurückführen, während eine satt grüne Region einen guten Hautkontakt sowie eine gute Hautfeuchtigkeit kennzeichnet. Sind im Bild zusätzlich sehr helle und somit weiße Punkte zu sehen ist dies ein Zeichen für Oberflächenwasser von aktiven Schweißdrüsen [52-53].

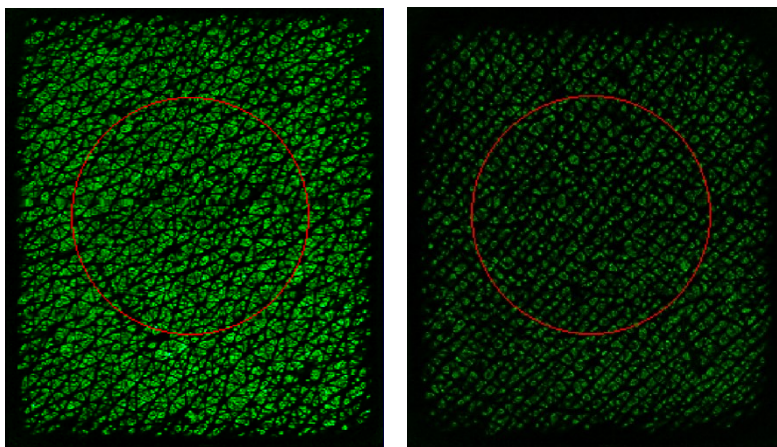


Abbildung 11: Permittivitätsmessung an feuchter (links) bzw. eher trockener (rechts) Haut

2.4.2.2. Das Corneometer®

Das Corneometer® (Courage & Khazaka, Köln, Deutschland) stellt eine weitere Möglichkeit dar, um die Hautfeuchtigkeit zu messen. Das Messprinzip basiert – ebenso wie beim Epsilon™-Sensor – auf der Veränderung der dielektrischen Eigenschaften. Es handelt sich also auch hier um eine kapazitive Messmethode. Das Corneometer® hat sich weltweit als ein sehr effizientes Gerät zur Messung der Hautfeuchtigkeit etabliert; nicht zuletzt aufgrund seiner einfachen Handhabung, der kurzen Messzeit und der hohen Reproduzierbarkeit der Ergebnisse. Die erhobenen Messwerte werden in „arbitrary units“ angegeben [54-55].

Das Corneometer® ist Teil eines Kombigerätes, der Derma Unit SSC 3, die sich aus dem Sebumeter®, dem Skin-pH-Meter® und dem Corneometer® zusammensetzt (Abb. 13). Der Messstab des Corneometer® besteht aus einem Sondenkopf, der senkrecht auf die zu untersuchende Stelle platziert wird (Abb. 13). Das Stratum corneum wird während der Messung von einem elektrischen Streufeld durchdrungen, wobei es in weiterer Folge zur Messung der Kapazität und damit des Wassergehaltes kommt. Die Sonde reagiert auf Hautkontakt. Etwa eine Sekunde nach dem Aufsetzen des Sondenkopfes signalisiert ein Piepston, dass die Messung erfolgreich war; gleichzeitig kann am Display der Messwert abgelesen werden.

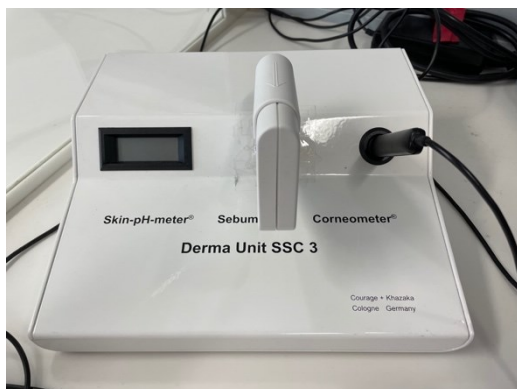


Abbildung 13: Kombigerät Derma Unit SSC3



Abbildung 13: Messstab des Corneometer®

Obwohl sich das Messprinzip des Epsilon™-Sensors und des Corneometers® sehr ähnlich sind, unterscheiden sich die beiden insbesondere in der Tatsache, dass der Epsilon™-Sensor mit deutlich mehr Sensoren ausgestattet ist als das Corneometer®. Vorteilhaft an der Messung mit dem Corneometer® ist jedoch, dass die Messzeit bei Einzelmessungen nur circa eine Sekunde beträgt, wodurch ein Okklusionseffekt verhindert und eine mögliche Verfälschung der Messergebnisse vermieden werden

kann. Zudem sorgt die geringe Eindringtiefe des elektrischen Streufeldes dafür, dass nur die Oberflächenfeuchtigkeit gemessen wird. In Tabelle 1 sind die vom Hersteller angegebenen Richtwerte für die Beurteilung der Ergebnisse grafisch dargestellt [56-58].

Hydratationsstatus	Unterarm (Innenseite)
sehr trocken	< 30
trocken	30 - 40
ausreichend feucht	> 40

Tabelle 1: Richtwerte für die Beurteilung der Ergebnisse [58]

2.4.3. Der pH-Wert

Wie bereits erwähnt bildet der pH-Wert aufgrund seines sauren Charakters den Säureschutzmantel bzw. Hydrolipidfilm der Haut und ist damit für ihre bakterizide und fungizide Abwehrwirkung verantwortlich. Er ist folglich für die Gesundheit und Integrität der Haut sowie für ihre Permeabilität von großer Bedeutung. Der pH-Wert wird von verschiedenen Faktoren bestimmt. Dazu zählen endogene Aspekte wie etwa die Hautfeuchtigkeit, die Schweiß- und Talgsekretion sowie die genetische Prädisposition und das Alter. Daneben können auch exogene Faktoren wie die Anwendung von Seife oder das Auftragen von kosmetischen Produkten und lokal applizierten Antibiotika den pH-Wert der Haut beeinflussen. Grundsätzlich liegt er in einem Bereich von 4 – 6. Je nach Geschlecht und der untersuchten Hautstelle kann er zusätzlich gewissen Schwankungen unterliegen [2, 57, 59-61].

Ein großer Entwicklungsschritt hinsichtlich Methodik und technischer Ausstattung für die pH-Messung der Haut erfolgte zu Beginn des 20. Jahrhunderts mit der Einführung kolorimetrischer Messmethoden. Dabei macht man sich die Farbveränderung eines chemischen Indikators zunutze, um Änderungen im pH-Wert detektieren zu können. Die Kolorimetrie wurde im Laboralltag schließlich von der potentiometrischen pH-Messung abgelöst. Darunter versteht man die Messung von elektrischen Impulsen mit Hilfe einer pH-Elektrode [59].

Auch die in der heutigen Zeit verwendeten Messgeräte basieren auf diesem Prinzip. Das Skin-pH-Meter® (Courage & Khazaka, Köln, Deutschland) erfasst den Haut-pH-Wert auf Basis ihrer Wasserstoffionenkonzentration. Dazu besteht es aus einer als Einstabmesskette bezeichneten Glaselektrode, in der die Mess- und Referenzelektrode kombiniert vorliegen (Abb. 14).

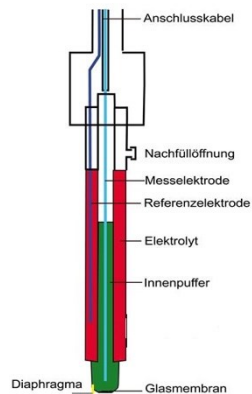


Abbildung 14: Kombi-Glaselektrode des Skin-pH-Meter® [62]

Die Messelektrode, die eine gepufferte Innenlösung enthält, wird durch eine Glasmembran von der zu untersuchenden Lösung, in diesem Fall also der Hautoberfläche, getrennt. Die Referenzelektrode, die mit einem Elektrolyt (KCl-Lösung) gefüllt ist, ummantelt die Messelektrode und ist für die Verbindung zur Hautoberfläche verantwortlich. Durch ein Diaphragma, das sich neben der Glasmembran befindet, wird der Ionentransport zwischen der Messlösung und dem Innenpuffer ermöglicht (Abb. 15).

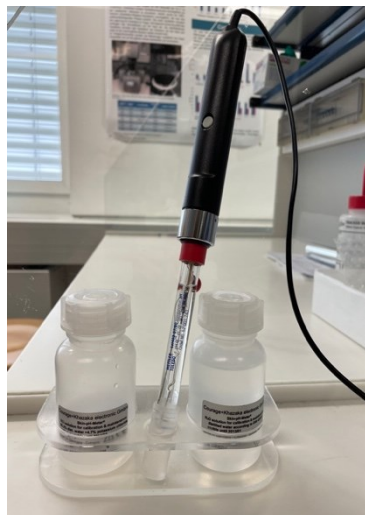


Abbildung 15: Skin-pH-Meter® mit Elektrolyt- und Waschlösung sowie Kombi-Glaselektrode des Skin-pH-Meter®

Während das Skin-pH-Meter® senkrecht auf der Hautoberfläche aufliegt, werden durch einen Knopfdruck die elektrischen Ableitungen der beiden Elektroden mit einem Voltmeter, welches die Potentialdifferenz prozessiert, verbunden. Nach circa einer Sekunde kann der pH-Wert vom Display der Derma Unit SSC 3 abgelesen werden. Wichtig ist es, die Messsonde vor und während den Messungen mit destilliertem Wasser feucht zu halten [57-58, 62].

In Tabelle 2 sind die Richtwerte des Herstellers bei Messungen von gesunder Haut unter normalen Raumbedingungen (20°C, 40 – 60 % Luftfeuchtigkeit) grafisch dargestellt [57-58].

pH-Wert	< 3,5 – 4,0	4,3	4,5 – 5,5	> 5,7
Frau	saurer Bereich		normal	hoher pH-Wert
Mann	saurer Bereich	normal		hoher pH-Wert

Tabelle 2: Richtwerte für die Beurteilung der Ergebnisse [57], [58]

2.4.4. Der Melanin- und Erythemindex

Die Hautfarbe wird zu einem großen Teil durch Pigmente des menschlichen Körpers (wie z.B. Hämoglobin, Melanin, Bilirubin oder Carotin) bestimmt. Neben ihrer dominierenden Rolle im Prozess der Hautfärbung unterliegen diese Komponenten in ihrer Funktion als Chromophore nicht selten auch dem Einfluss diverser exogener Faktoren. Hier können UV-Licht oder verschiedenen Arznei- bzw. Reizstoffe eine Rolle spielen. Eine Interaktion mit diesen Faktoren kann für die oben genannten Pigmente signifikante strukturelle sowie chemische Modifikationen zur Folge haben. Auf solche Veränderungen kann auch die Haut in unterschiedlicher Weise reagieren. Die beiden prominentesten Folgen von UV-Bestrahlung sind dabei die Entstehung von Erythemen sowie eine erhöhte Pigmentierung [11-12].

Diese beiden Effekte haben sich aufgrund ihrer guten Reproduzierbarkeit zu effizienten Modellzuständen in der dermato-kosmetischen Forschung etabliert. Sie werden beispielsweise angewendet, um die Hautpathophysiologie zu charakterisieren oder die Wirksamkeit von verschiedenen Stoffen zu beurteilen. Vorteilhaft ist auch, dass diese Farbveränderungen schnell (innerhalb von 2 – 7

Tagen) auftreten und ihre Bewertung theoretisch auch mit dem freien Auge durchgeführt werden kann. Die Quantifizierung experimentell induzierter Veränderungen der Hautfarbe hat sich folglich zu einer vielverwendeten Methode entwickelt. Als Indikator für diverse Haut-, Substanz- und Vehikeleigenschaften stellt sie eine wertvolle Informationsquelle dar; beispielsweise kann die Integrität der Barrierefunktion, die Bioverfügbarkeit von Stoffen oder die Substanzkonzentration in der Haut dadurch beurteilt werden [11-12].

Um die Farbreaktion der Haut objektiv und reproduzierbar quantifizieren zu können wurden verschiedene instrumentelle Methoden entwickelt. Für die Messung der Hautfarbe greifen diese Geräte auf unterschiedliche Techniken zurück. Am häufigsten basieren sie auf der Scanning-Reflexions-Spektrophotometrie, der Trimulus-Kolorimetrie oder der einfachen Schmalband-Reflexionskolorimetrie [11-12, 63].

Das im Rahmen dieser Arbeit verwendete Mexameter® MX 18 (Courage & Khazaka, Köln, Deutschland) basiert auf der Technik der Schmalband-Reflexionskolorimetrie und ermöglicht so die Messung der beiden Hauptfarbkomponenten Melanin und Hämoglobin (Erythem) durch Reflexion [64].

Das Messprinzip beruht dabei auf dem Prinzip der Absorption. Durch die spezielle Sonde des Mexameters® werden drei genau definierte Wellenlängen ausgesendet, wobei es folglich auf der Haut zur diffusen Reflexion kommt. Das von der Haut reflektierte Licht wird dann von einem Empfänger, der sich im Sondenkopf befindet, gemessen. Während die Quantität des ausgestrahlten Lichtes bekannt ist, kann das Ausmaß des von der Haut absorbierten Lichtes errechnet werden. Daraus kann in weiterer Folge auf die Menge an Melanin bzw. Hämoglobin (und damit auf den Rötungsgrad) geschlossen werden (vgl. Abb. 16 und 17) [64-66].

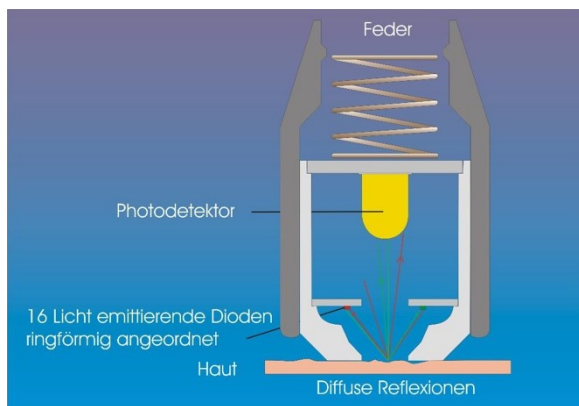


Abbildung 16: Messprinzip des Mexameter® [64]



Abbildung 17: Messsonde

Für die Messung des Melanins wird Licht in zwei bestimmten Wellenlängen ausgesendet (660 nm und 880 nm), da bei diesen Wellenlängen die Absorptionspeaks des Melanins liegen. Auch die Erythem-Messung erfolgt durch die Aussendung von Licht mit zwei verschiedenen Wellenlängen (568 nm und 660 nm), wobei eine die Hauptabsorptionsspitze des Hämoglobins kennzeichnet. Die andere soll helfen, den Einfluss anderer Komponenten (z.B. des Bilirubins) auszuschließen [64-66].

Sobald die Sonde auf der Haut aufliegt beginnt der Messvorgang. Etwa eine Sekunde nach dem Auflegen der Sonde ertönt ein akustisches Signal und es können sowohl der Melanin- als auch der Erythemindex mit Hilfe der MPA CTplus Software am Computerbildschirm abgelesen werden. Die aus den Messungen resultierenden Messwerte werden dabei als Verhältniszahlen (*Indices*) angezeigt und können Werte von 0 – 999 annehmen [64-66].

In den Tabellen 3 und 4 sind die Anhaltspunkte des Herstellers für die Beurteilung der Messergebnisse grafisch dargestellt [66].

Fototyp	Hauttyp	durchschn. Melaningehalt
I	Nordisch/Keltische Haut	< 100
II	Hellhäutiger Europäer	100 – 150
III	europ. Mischtyp/sehr helle Asiaten	150 – 250
IV	Mediterrane Haut/helle Asiaten	250 – 350
V	Dunkle Asiaten	350 – 450
VI	Schwarze Haut	450 – 999

Tabelle 3: Anhaltspunkte für die Beurteilung der Messergebnisse des Melaningehaltes [66]

durchschn. Erythemgehalt	Bewertung
0 – 170	kein Erythem
170 – 330	Minimalerythem
330 – 450	diffuse Rötung
450 – 570	hohes Erythem
> 570	extremes Erythem

Tabelle 4: Anhaltspunkte für die Beurteilung der Messergebnisse des Erythemgehaltes [66]

2.5. Der Sonnenlichtsimulator SOL 500

In Kapitel 2.2. wurde bereits auf den Effekt von Licht auf die Haut eingegangen. Neben den allgemeinen Folgen von UV-Strahlung wie die beschriebenen akuten und chronischen UV-Schäden können noch weitere Wirkungen beobachtet werden. Dabei wird zwischen der Photosensibilisierung, der Phototoxizität und der

Photoallergie unterschieden. Diese Phänomene beschreiben Hautreaktionen, die aus der Applikation eines photoreaktiven Arzneistoffes in Kombination mit übermäßiger Sonnenlichtexposition resultieren [9].

Doch nicht jede Exposition gegenüber Sonnenlicht geht mit schädlichen Hautreaktionen einher. Bis zu einer gewissen Dosis an Strahlung kann auch das UV-Licht als ungefährlich eingestuft werden. Die Photosensibilisierung beschreibt nun jenen Prozess, der dazu führt, dass durch Strahlungsdosen, die normalerweise als ungefährlich gelten, Reaktionen in der Haut ausgelöst werden. Verantwortlich dafür sind Substanzen mit strahlungsabsorbierenden Eigenschaften, sogenannte Photosensibilisatoren. Sie bewirken, dass umliegende Moleküle oder Substanzen durch die Interaktion mit UV-Strahlung modifiziert werden. Die daraus resultierten Hautreaktionen können dann in weiterer Folge zu phototoxischen und/oder photoallergischen Effekten führen [9].

Der Begriff Phototoxizität wird als eine akute Reaktion, die durch eine einmalige Behandlung mit einem photoreaktiven Stoff und der darauffolgenden Exposition gegenüber UV- oder sichtbarer Strahlung induziert wird, definiert. Diese Reaktion kann in vivo bei jedem Individuum auftreten, sofern sowohl das Arzneimittel als auch die Strahlung in einer geeigneten Konzentration bzw. Dosis vorliegen. Es handelt sich dabei also um eine nicht-immunologische Reaktion der Haut, die sich in Form von Erythemen, Ödemen, Blasenbildung und Pigmentation äußern kann. Als Photoirritation wird eine phototoxische Reaktion beschrieben, die auf der Interaktion einer topisch oder systemisch applizierten Substanz mit UV- bzw. sichtbarem Licht basiert [9, 67-68].

Von der Phototoxizität zu unterscheiden ist die Photoallergie. Dabei handelt es sich um eine erworbene immunologische Reaktion. Sie tritt auf, wenn UV-Strahlung mit einer photosensibilisierenden Substanz interagiert. Dabei kommt es zur Bildung von Haptenen oder Antigenen, die in weiterer Folge eine Typ IV-Hypersensitivitätsreaktion bewirken. Während die phototoxische Reaktion bereits nach einer einmaligen Behandlung auftritt reagiert die Haut bei der Photoallergie erst nach einer gewissen Induktionsperiode [9, 68].

Antihypertensiva, Diuretika, Antidepressiva, Antikonvulsiva sowie antimikrobielle und nicht-steroidale anti-inflammatorische Arzneistoffe (NSAID) zählen zu jener Gruppe von Arzneimitteln, die nachweislich die Fähigkeit besitzen, phototoxische Reaktion

beim Menschen zu induzieren. Da einige Vertreter dieser Gruppen sehr vielseitig und häufig als Dauermedikation in der Bevölkerung zum Einsatz kommen, hat sich die Phototoxizität in den letzten Jahren zu einem bedeutenden Forschungsgebiet entwickelt.

Die Evaluierung der Photosicherheit von Substanzen ist mittlerweile ein wichtiger Aspekt im Prozess der Arzneimittelentwicklung. Verschiedene in vitro-, ex vivo- und in vivo-Testsysteme bilden die Basis für die korrekte Bewertung des phototoxischen Potentials von Stoffen [67]. Ein wichtiger Aspekt ist dabei die Lichtquelle, die für die Messung des phototoxischen Potentials herangezogen wird. Bei der Prüfung von Substanzen auf Phototoxizität ist es von Vorteil, die experimentellen Rahmenbedingungen möglichst natürlich zu halten, um sowohl vergleichbare als auch reproduzierbare Ergebnisse gewährleisten zu können. Daher gelten Sonnenlichtsimulatoren, die die Simulation von natürlichem Sonnenlicht ermöglichen, als ideale künstliche Lichtquelle [25, 67, 69].

Der SOL 500 (Dr. Hönle AG, München, Deutschland) zählt zu jenen Sonnenlichtsimulatoren, die besonders gerne als Lichtquelle bei der Durchführung von Phototoxizitätsstudien eingesetzt werden [9, 25, 67-68]. Er ist mit einer hochmodernen Strahlungsquelle ausgestattet, die laut Hersteller reproduzierbare Prüfergebnisse liefert. Zudem ist die erzeugte Strahlung mit den in der Natur auftretenden Lichtverhältnissen vergleichbar. Als Quelle dieser Strahlung kommen Gasentladungslampen zum Einsatz, die Metallhalogenide enthalten. Im Rahmen des Strahlungsprozesses wird ein nahezu kontinuierliches Spektrum emittiert, welches gut mit der natürlichen Sonnenstrahlung korreliert, ohne dabei Ozon zu erzeugen. Versorgt wird der Strahler mit einem elektronischen Vorschaltgerät, das selbst bei Netzspannungsschwankungen für eine stabile Ausgangsleistung sorgt und die Lichtleistung um etwa 10 % steigert (Abb. 18). Mit dem SOL 500 kann ein hoher Strahlungswirkungsgrad von ca. 44 % im UV/VIS-Bereich erreicht werden. Damit wird der Spektralbereich zwischen 295 – 780 nm abgedeckt [70].

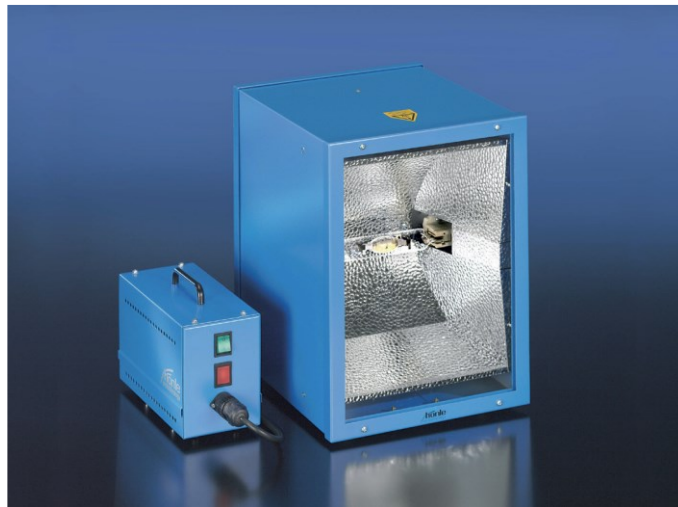


Abbildung 18: SOL 500 (Strahlungsquelle und Vorschaltgerät)
[70]

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der SOL 500 in Kombination mit dem H1 Filter (Dr. Hönle AG, München, Deutschland) eingesetzt. Der daraus resultierende Filtervorgang mit 50 % Transmission bei einer Wellenlänge von 335 nm lieferte ein fast völlig UVB-freies Spektrum. Zusätzlich sollte noch erwähnt werden, dass vor dem Strahlungsprozess die Messung der emittierten Energie mit einem kalibrierten UVA-Meter empfohlen wird [9, 68]. Dies ist für die weiterführenden Studien mit dem Gerät geplant.

2.6. Modellschubstanz Coffein

Coffein (1,3,7-Trimethylxanthin) ist ein bioaktiver Naturstoff und wurde 1920 erstmals aus der Kaffeebohne isoliert. Er gehört zur Gruppe der Xanthinalkaloide und kommt in Kaffee, Schwarztee, Guarana, Mate, Kakao und Kolasamen vor. Coffein kann in Form von diversen Getränken (Coca-Cola®, RedBull®) konsumiert, als Arzneimittel verschrieben oder für kosmetische Zwecke verwendet werden. Es ist in unseren Alltag folglich sowohl als Genuss- als auch Arzneimittel integriert und zählt daher zu den am häufigsten konsumierten pharmakologisch aktiven Substanzen weltweit [71-74].

Die breite Anwendungspalette des Coffeins brachte die Notwendigkeit mit sich, seine Charakteristika in vitro, ex vivo und in vivo zu untersuchen. Aufgrund dieser umfassenden Auseinandersetzung mit dieser Substanz und dem dadurch

erworbenen Wissen hat sich das Coffein im Laufe der Zeit zu einer beliebten Modellschubstanz in der Hautforschung entwickelt, obwohl sein hydrophiler Charakter nicht dem klassischen Bild einer Substanz mit idealen Penetrationseigenschaften entspricht [71, 75-76].

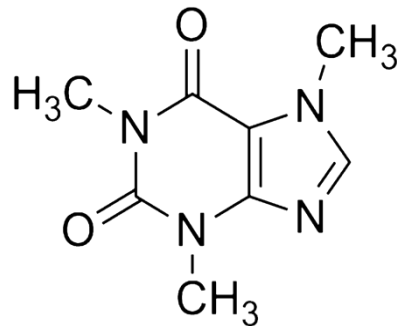


Abbildung 19: Chemische Struktur von Coffein [72]

Coffein liegt als geruchloses, weißes Kristallpulver oder in Form farbloser Kristalle vor und ist durch einen bitteren Geschmack gekennzeichnet. Es lässt sich in Chloroform gut und in Alkohol nur mäßig lösen; in Ether ist es praktisch unlöslich. Während es in Wasser bei Raumtemperatur nur wenig löslich ist weist es in siedendem Wasser eine ausgezeichnete Löslichkeit auf [72-73].

Das Wirkspektrum des Coffeins ist sehr breit gefächert. Neben der Inhibierung der Phosphodiesterase und dem antagonistischen Effekt auf zentrale Adenosin-Rezeptoren stimuliert es das zentrale Nervensystem, hält wach und fördert die Konzentrations- und Leistungsfähigkeit. Außerdem steigert es die Atmung und führt zur Stimulation des Herz-Kreislauf-Systems. Zudem wird angenommen, dass durch die topische Applikation von kosmetischen Produkten, die Coffein enthalten, eine übermäßige Ansammlung von Fett in der Haut verhindert werden kann. Zum anderen soll Coffein in Dermatika die Drainage von Lympheflüssigkeit fördern und die Haut vor Lichtschäden schützen [71-72, 74, 77].

3. Material und Methoden

3.1. Vorversuche

Die Vorversuche dienten in erster Linie dazu, die Geräte – also die Messsonden und das Raman-Spektroskop – kennenzulernen und ein Gefühl für die richtige Handhabung zu entwickeln.

Dazu wurde an sechs Probandinnen eine Vorversuchsreihe durchgeführt, in der mittels spektroskopischer und biophysikalischer Messungen die Eigenschaften der Haut ermittelt werden sollten. Die Erhebung des TEWL, der Permittivität, der Hautfeuchtigkeit, des pH-Wertes, des Melanin- und Erythemindexes sowie die Raman-spektroskopische Messung erfolgten dabei am nicht-dominanten Unterarm. In dieser Vorversuchsreihe wurde der Hautzustand unter normalen Bedingungen untersucht. Das bedeutet, dass die Haut unbehandelt blieb und keine Substanz aufgetragen wurde.

Ein weiteres Ziel dieser Probemessungen war es, eine geeignete Messreihenfolge der einzelnen Parameter für die nachfolgenden Hautstudien festzulegen. Dies erfolgte insbesondere unter Betrachtung verschiedenster Einflussfaktoren wie Akklimatisation oder Okklusionseffekten.

Da die Raman-Spektroskopie im Gegensatz zu den biophysikalischen Messmethoden kaum durch Faktoren wie die Aktivität der Schweißdrüsen oder den psychischen Zustand der Probanden (Nervosität, Agitiertheit) beeinflusst wird, kann die Messung auch mit relativ kurzer vorangegangener Akklimatisation der Probanden durchgeführt werden - zumal das Auffinden einer geeigneten Hautstelle mit der Kamera einige Zeit in Anspruch nehmen kann. Aus diesem Grund wurde der Messzyklus auch mit der Raman-Spektroskopie gestartet. Die nicht-invasive Messtechnik des Raman-Spektrometers gibt den Probanden zudem die Gelegenheit, sich während des 20-minütigen Messvorgangs zu akklimatisieren. Nach der spektroskopischen Messung wurden die biophysikalischen Parameter wie folgt erhoben: Begonnen wurde mit dem Mexameter®, gefolgt vom Biox Epsilon™ E100 und dem Corneometer®. Danach erhob man den TEWL mit dem Biox AquaFlux™ AF200 und beendete den Messzyklus schließlich mit dem Skin-pH-Meter®.

Um einen Okklusionseffekt zu verhindern, wurde bei den Sonden-Messungen die Stelle, an der die Raman-Messung durchgeführt wurde, ausgespart. Abschließend

sollte noch erwähnt werden, dass es sich bei den Geräteeinstellungen um Erfahrungswerte handelte, die in der Arbeitsgruppe bereits durch vorangegangene Arbeiten ausgearbeitet und im Rahmen dieser Masterarbeit übernommen wurden. Ein alternativer Ansatz für zukünftige Studien mit limitiertem Messareal besteht darin, 20 Minuten Akklimatisation auf jeden Fall einzurechnen, und danach erst die Messsonden gefolgt von der Raman-Analytik durchzuführen. Die Raman-Messung stellt mit Abstand das größte Risiko für Okklusionseffekte bei nachfolgenden Messungen auf der gleichen Hautstelle dar. Dies konnte aufgrund der großzügig gewählten Messfläche im Zuge dieser Studien umgangen werden, sollte aber immer bei der Versuchsplanung berücksichtigt werden.

3.2. Gesunde Humanhaut

3.2.1. Allgemeines

Um einerseits die Reproduzierbarkeit der Raman-Messergebnisse über einen längeren Zeitraum zu untersuchen und andererseits den Einfluss der Jahreszeit auf relevante Hautparameter (TEWL, Permittivität, Hautfeuchtigkeit, pH-Wert, Melanin-/Erythemindex) zu beobachten wurde an vier gesunden Probandinnen (weiblich, Alter 24 – 37 Jahre) über einen Zeitraum von 12 Wochen jeweils einmal wöchentlich eine Charakterisierung der Haut vorgenommen. Dafür führte man die oben beschriebenen biophysikalischen und spektroskopischen Messungen am nicht dominanten Unterarm durch. Zu beachten war dabei, dass die zu untersuchenden Hautstellen zum Zeitpunkt der Messungen frei von jeglichen dermal angewendeten Produkten sein mussten, um eine Verfälschung der Ergebnisse zu verhindern. Es sollte daher 24 Stunden vor der Messung auf dermale Produkte im Messareal verzichtet werden.

3.2.2. Messung der Raman-spektroskopischen Parameter

Die Messung der Raman-spektroskopischen Parameter wurde mit dem gen2-SCA Skin Composition Analyzer (RiverD International B.V., Rotterdam, Niederlande) durchgeführt. Das Gerät ist mit zwei Lasern (Wellenlänge $\lambda = 671$ nm bzw. $\lambda = 785$ nm) und einem CCD-Detektor ausgestattet. Bevor jedoch mit den Messungen

begonnen werden konnte, waren einige wichtige Schritte zu befolgen, um eine reibungslose und qualitativ hochwertige Datenerhebung zu gewährleisten.

Nach dem Einschalten des Computers und dem Starten des RiverIcon-Programms musste der CCD-Detektor auf -65 °C heruntergekühlt werden. Da die Sensitivität des Gerätes von der Wellenlänge abhängig ist, sind stets beide Laser vor der Messung auf ihre Funktionsfähigkeit zu überprüfen. Dazu wurde die Laserpower (in mW) der beiden Laser unter Verwendung der PM100/PM200 Software gemessen (Abb. 20). Anschließend wurde das Spektroskop mithilfe einer speziellen Kalibrierkappe kalibriert. Die daraus resultierende Signal-to-Noise-Ratio (S/N) gibt Auskunft über das Verhältnis vom gewünschten Signal, welches von den Photonen generiert wird, zum unerwünschten Hintergrundrauschen (Abb. 21). Die Messung der Laserpower und die anschließende Kalibrierung bilden die Voraussetzung dafür, aus den Messungen aussagekräftige Daten erheben zu können [34].

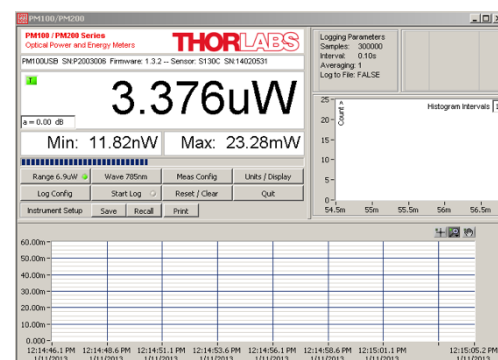
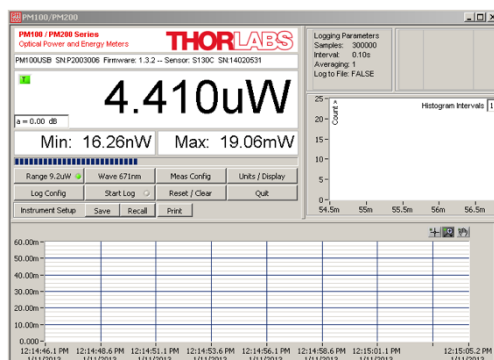


Abbildung 20: Messung der Laserpower bei $\lambda = 671 \text{ nm}$ bzw. $\lambda = 785 \text{ nm}$

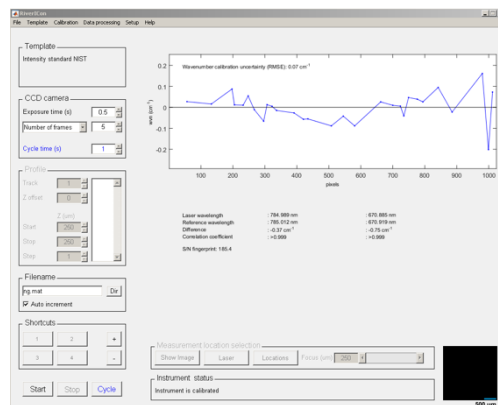
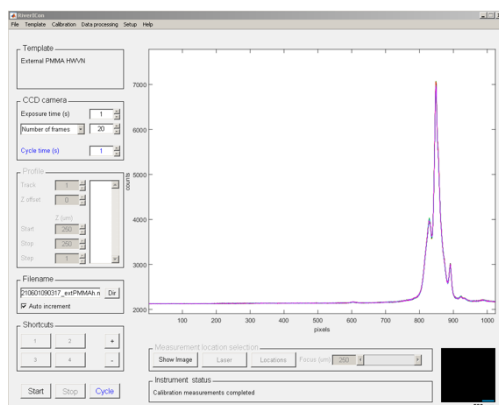


Abbildung 21: Kalibrierung des gen2-SCA

Nach der abgeschlossenen Kalibrierung wählte man die richtigen Geräteeinstellungen für die Vermessung der Haut aus. Wie bereits erwähnt handelte es sich dabei um Erfahrungswerte, die aus vorangegangenen Arbeiten übernommen wurden. Im RiverlCon-Fenster wurde dazu die Registerkarte *Data processing* geöffnet und im Dropdown-Menü die beiden Methoden *HWVN profile analysis* sowie *Fingerprint analysis -> NMF component fixed* aktiviert. Dieser Schritt ist von Bedeutung, da dadurch die automatische Messauswertung mithilfe des Fitting-Algorithmus ermöglicht wird.

Im Rahmen der Untersuchungen kamen vor allem Tiefenmessungen zur Erstellung eines Tiefenprofils der Hauteigenschaften zum Einsatz. Unter der Registerkarte *Template* wählt man dafür im Dropdown-Menü den Punkt *Raman profile* aus. *Raman experiment* wird hingegen für die Durchführung von Einzelmessungen verwendet.

Im Anschluss konnte schließlich mit den Messungen begonnen werden. Nachdem das Messfenster mit 70%igem Ethanol gereinigt wurde positionierte die Probandin den nicht dominanten Unterarm mittig auf das Messfenster (Abb. 22) [78].



Abbildung 22: Position des Unterarms auf dem Analyzer [78]

Parallel dazu wurde im RiverlCon-Fenster das mikroskopische Bild geöffnet, um den Kontakt zwischen der Haut und dem Messfenster zu kontrollieren. Hier ist anzumerken, dass es je nach Hautfeuchtigkeit ein bis zwei Minuten dauern kann, bis sich ein guter Kontakt einstellt. In Abbildung 23 ist exemplarisch ein mikroskopisches Bild dargestellt, das die Hautoberfläche einer Probandin zeigt. An den dunklen Stellen besteht bereits ein guter Hautkontakt. Mit dem roten Fadenkreuz, das die

Position des Lasers angibt, wurde nun eine passende Messstelle im dunklen Bereich des Bildes ausgewählt.



Abbildung 23: Mikroskopisches Bild der Hautoberfläche vor der Messung

Die Messungen erfolgten sowohl im HWVN- als auch im Fingerprint-Bereich, wobei fünf Spektren im Fingerprint- und drei Spektren im HWVN-Bereich aufgenommen wurden. Die gewählte Anzahl an Einzelmessungen stellt immer einen Kompromiss zwischen Genauigkeit (hohe Anzahl an Einzelmessungen für aussagekräftigen Mittelwert wünschenswert) und Zeitaufwand (lange Messdauer begünstigt Okklusionseffekte) dar. Erfahrungswerte hatten gezeigt, dass HWVN-Spektren im Allgemeinen eine höhere Reproduzierbarkeit aufweisen als Fingerprint-Spektren; daher wurde für letztere eine höhere Anzahl an Einzelmessungen gewählt.

3.2.2.1. Fingerprint-Spektren

Für die Aufnahme der Fingerprint-Spektren musste unter der Registerkarte *Template* neben dem Punkt *Raman profile* auch noch die Einstellung *fingerprint* aktiviert werden, wodurch sich die Vorlage für die Erhebung eines Fingerprint-Spektrums öffnete (Abb. 24).

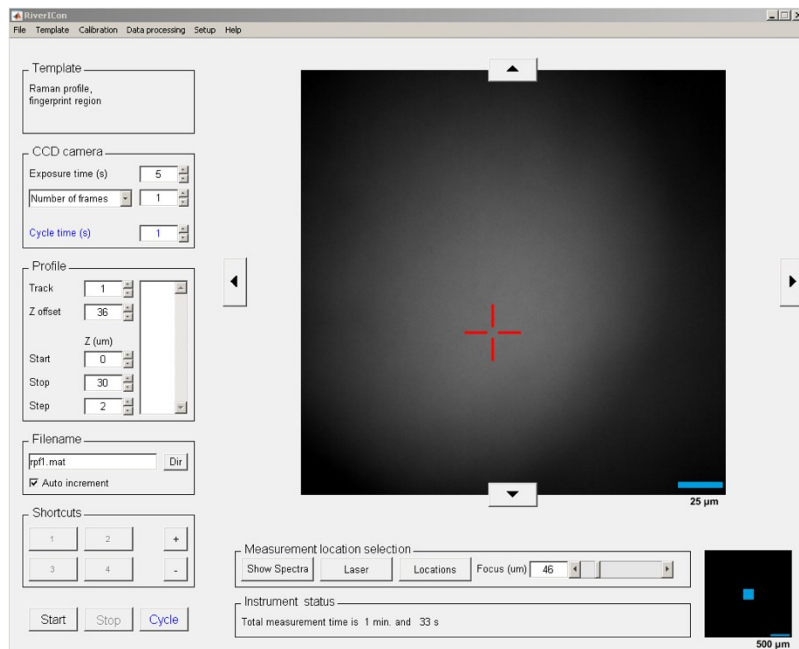


Abbildung 24: Einstellung der Parameter für die Erhebung eines Fingerprint-Spektrums

In dieser Schablone konnten messrelevante Parameter beliebig verändert werden. Dazu gehören etwa die *Exposure time* und die *Number of frames*. Die *Exposure time* gibt an, wie lange eine Stelle im Tiefenprofil mit dem Laser beleuchtet wird; bei einem *frame* handelt es sich um eine Einzelaufnahme an einer Stelle. Mit den Punkten *Start* und *Stop* kann der Messbereich, also der Startpunkt der Messung sowie die gewünschte maximale Eindringtiefe des Lasers in die Haut in μm , bestimmt werden. Durch den Parameter *Step* wird das Messintervall für jeden Schritt definiert, also wie viele μm zwischen zwei Messpunkten liegen sollen. Tabelle 5 zeigt die Parameterwerte, die im Rahmen dieser Arbeit für die Messungen gewählt wurden.

Fingerprint-Spektren	
Exposure time	5 sec.
Number of frames	1
Start	0 μm
Stop	30 μm
Step	2 μm

Tabelle 5: Messparameter für die Aufnahme eines Fingerprint-Spektrums

Ein weiterer wichtiger Parameter ist der *Z-Offset*. Er gibt Auskunft darüber, wo sich die Hautoberfläche befindet, indem er einen Startpunkt definiert, der einige μm über der Oberfläche liegt. Folglich kann er auch als „Nullpunkt des Lasers“ bezeichnet werden. Seine Bestimmung wurde wie folgt durchgeführt. Nachdem, wie oben beschrieben, eine passende Messstelle ausgewählt und der *Focus* (rechts unterhalb des mikroskopischen Bildes) auf 40 μm eingestellt wird aktiviert man über *Cycle* den Cyclevorgang und damit den Laser. Mit einem Mausklick auf *Show spectra* erhält man ein Spektrum, mit dessen Hilfe die Hautoberfläche ermittelt werden kann. Durch eine Erhöhung bzw. Erniedrigung des *Focus* (in μm) kann auch das Spektrum beliebig verändert werden. Je nach Intensität der Peaks kann abgeschätzt werden, ob sich der Laser bereits in der Haut oder noch außerhalb befindet.

In Abbildung 25 ist ein Spektrum abgebildet, dessen Peak-Intensitäten eine passende Laserposition vermuten lassen. Die höheren Peaks am linken Rand des Spektrums spiegeln den Anteil des Quarzglases wider, während die durch eine abnehmende Intensität gekennzeichneten Peaks im rechten Bereich den spektralen Anteil der Haut darstellen. Erfahrungsgemäß bedeutet eine steigende Peak-Intensität im rechten Teil des Spektrums, dass sich der Laser bereits in der Haut befindet. Für eine aussagekräftige Messung sollte die Startposition des Lasers und damit der *Z-Offset* einige μm über der Hautoberfläche gewählt werden.

Nachdem also durch Änderung des *Focus* ein Spektrum mit zufriedenstellendem Peakverlauf (Abb. 25) generiert worden ist kann der Cyclevorgang mit einem Klick auf *Stop* beendet werden. Der dabei als *Focus* verwendete Zahlenwert entspricht gleichzeitig dem *Z-Offset* für diese Messung.

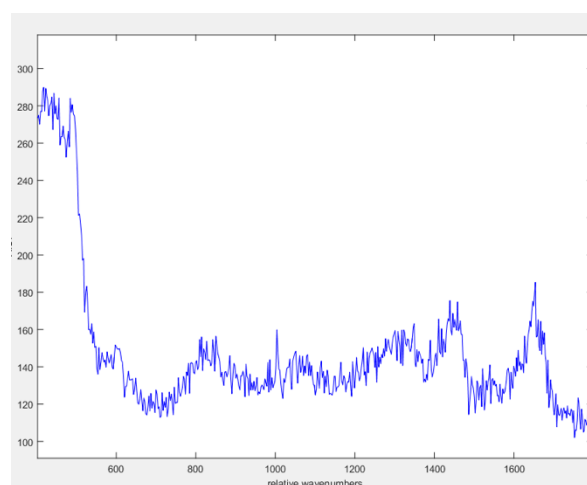


Abbildung 25: Spektrum zur Ermittlung des *Z-Offset*

Abschließend wird die Messung unter *Filename* noch mit dem Datum und einer Probandenkennzeichnung versehen und schließlich mit einem Mausklick auf *Start* gestartet.

Während des Messvorgangs wird auf der linken Seite des RiverIcon-Fensters das Raman-Spektrum dargestellt. Rechts davon können die Konzentrationsprofile des NMF sowie des Keratins mitverfolgt und die berechnete Position der Hautoberfläche in μm am linken unteren Rand der Profile abgelesen werden (Abb. 26).

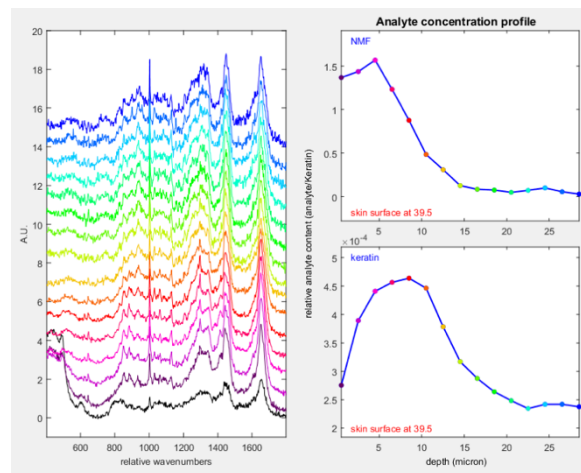


Abbildung 26: Raman-Spektrum (links) & NMF-/Keratin-Konzentrationsprofile (rechts)

Nach Abschluss der Messung wird diese vom Programm automatisch beendet und in einem Ordner, der mit dem Datum des jeweiligen Tages gekennzeichnet wird, gespeichert.

Für die Durchführung der nächsten Messung wird mithilfe des mikroskopischen Bildes erneut eine passende Stelle ausgewählt. Die Bestimmung des *Z-Offset* sowie der Messvorgang erfolgen dabei ident zur ersten Messung.

Nach insgesamt fünf solcher Messungen ist es empfehlenswert, das Programm SkinTools heranzuziehen, um die Vergleichbarkeit der Ergebnisse zu kontrollieren (Abb. 28). Dazu wird in der Registerkarte *File* (im SkinTools-Programm) über *Open* im *Data Rivericon* Ordner der Ordner mit dem richtigen Datum (Ordnername: Datum des jeweiligen Messtages) ausgewählt und die entsprechenden Messungen werden markiert und geöffnet. Anschließend wählt man über die Registerkarte *Methods* den Punkt *Default method NMF* aus. Dieser Schritt ist besonders wichtig, da dadurch eine sinnvolle Auswertung bzw. Darstellung der gewonnen Konzentrationskurven ermöglicht wird. Durch einen Klick auf *All* und anschließend *Start* erhält man die

Kurven der NMF-Konzentrationsprofile aller fünf Messungen (Abb. 27). In Abhängigkeit von der Vergleichbarkeit ihres Verlaufes beziehungsweise dem Vorhandensein von Ausreißern kann anschließend die Durchführung einer weiteren Messung notwendig sein, um auf die gewünschte Anzahl an Einzelmessungen zu kommen.

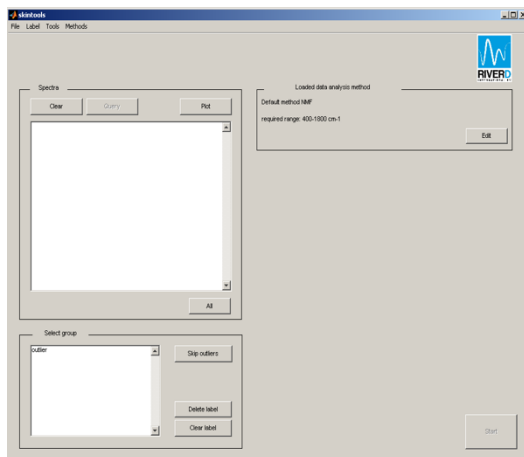


Abbildung 28: SkinTools-Fenster zur Auswertung der Messungen

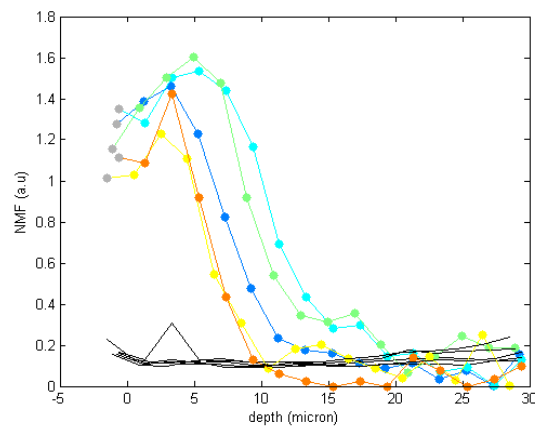


Abbildung 27: Vergleich der gewonnenen Konzentrationskurven

Im Zuge der vorliegenden Arbeit wurde so vorgegangen. Waren die Konzentrationskurven der einzelnen Messungen zufriedenstellend, wurden die daraus gewonnen Daten exportiert (*Export -> ASCII multi ->* in einem Ordner am Desktop gespeichert). Vor dem Export mussten die negativen Werte über die Registerkarte *Tools* und dem Punkt *set negative values to zero* noch auf Null gesetzt werden. Für die nachfolgende Auswertung übertrug man die Werte noch in eine Excel-Datei. Bei den exportierten Daten handelte es sich um Ergebnisse, die aus der Auswertung der Rohspektren mittels integriertem Fitting-Algorithmus resultierten.

3.2.2.2. High-Wave-Number-Spektren

Nach der Messung von fünf vergleichbaren Rohspektren im Fingerprint-Bereich wurde über *Template* und dem Menüpunkt *Raman profile* die Einstellung *HWVN* aktiviert und so in den High-Wave-Number-Bereich gewechselt. Dabei öffnete sich wie zuvor im Fingerprint-Bereich die Vorlage für die Erhebung eines HWVN-Spektrums (Abb. 29).

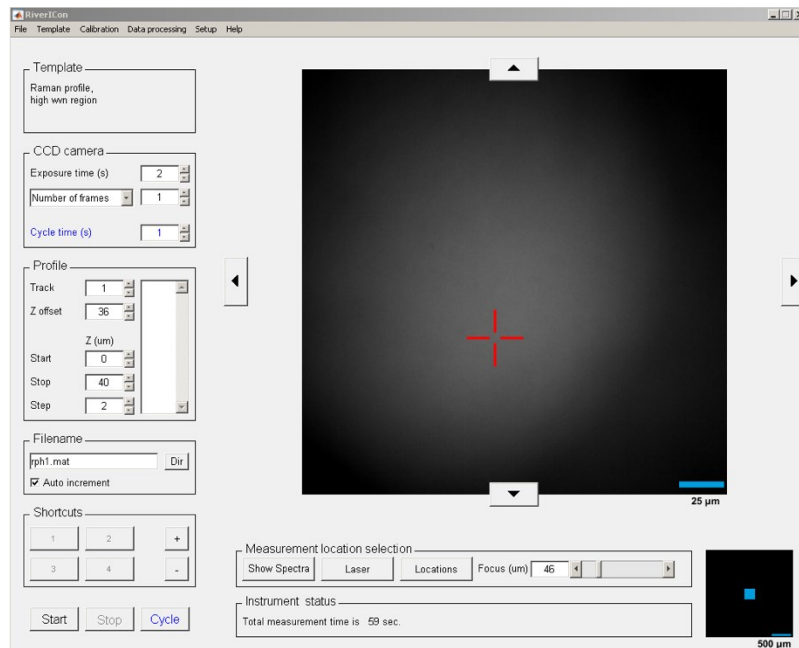


Abbildung 29: Einstellung der Parameter für die Erhebung eines HWVN-Spektrums

Auch hier wurden die Parameter *Exposure time*, *Number of frames*, *Start*, *Stop* und *Step* entsprechend definiert, um auswertbare Rohspektren zu erhalten. Bei den Zahlenwerten in Tabelle 6 handelt es sich erneut um Erfahrungswerte, die aus vorangegangenen Arbeiten übernommen wurden.

HWVN-Spektren	
Exposure time	2 sec.
Number of frames	1
Start	0 µm
Stop	40 µm
Step	2 µm

Tabelle 6: Messparameter für die Aufnahme eines HWVN-Spektrums

Im Unterschied zur Fingerprint-Region kann die Hautoberfläche im HWVN-Bereich nicht direkt ermittelt werden. Zur Bestimmung des *Z-Offset* muss folglich unter *Template* nochmals in den Fingerprint-Bereich gewechselt werden. Die Definition des *Z-Offset* erfolgt dort nach demselben Prinzip wie oben erläutert. Der *Filename* setzt sich auch hier wieder aus dem Datum und einer Probandenkennzeichnung

zusammen. Nachdem man alle Parameter richtig eingestellt hat wird der Messvorgang gestartet.

Im RiverIcon-Fenster kann auch hier während der Messung auf der linken Seite das Raman-Spektrum beobachtet werden. Rechts davon wird zudem das Konzentrationsprofil des Wassers (in Massenprozent) sowie die berechnete Position der Hautoberfläche in μm (am linken unteren Rand des Profils) dargestellt (Abb. 30).

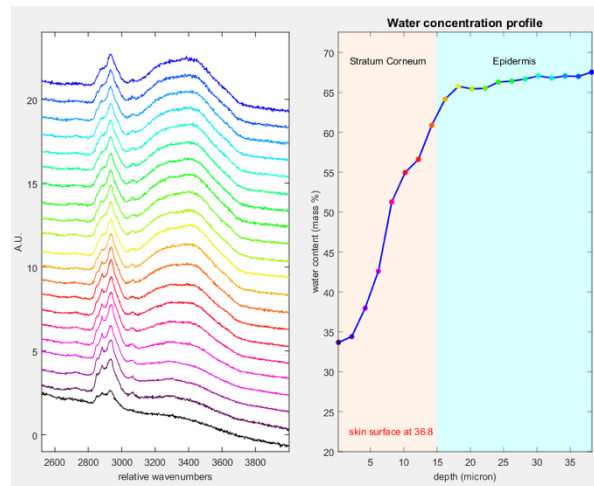


Abbildung 30: Raman-Spektrum (links) + Wasser-Konzentrationsprofil (rechts)

Die Messung wird erneut automatisch vom Programm beendet und im selben Ordner wie die davor aufgenommenen Fingerprint-Spektren gespeichert.

Nachdem man eine neue Messstelle ausgewählt hat wird der Vorgang noch zwei weitere Male wiederholt. Auch hier wird für die Vergleichbarkeit der erhobenen Konzentrationskurven das SkinTools-Programm herangezogen. Die Vorgangsweise entspricht dabei jener, die bei der Erhebung der Fingerprint-Spektren bereits beschrieben wurde - mit dem Unterschied, dass man als Methode nicht *Default method NMF*, sondern *Default method water* auswählt. Wie bei den NMF-Konzentrationskurven muss auch hier im Falle eines Ausreißers eine weitere Messung durchgeführt werden. Erfahrungsgemäß ergeben sich jedoch aus den HWVN-Spektren einheitlichere Kurven (Abb. 31) als im Fingerprint-Bereich, wodurch sich auch die im Protokoll festgelegten fünf Fingerprint- und drei HWVN-Messungen wie bereits erwähnt erklären lassen.

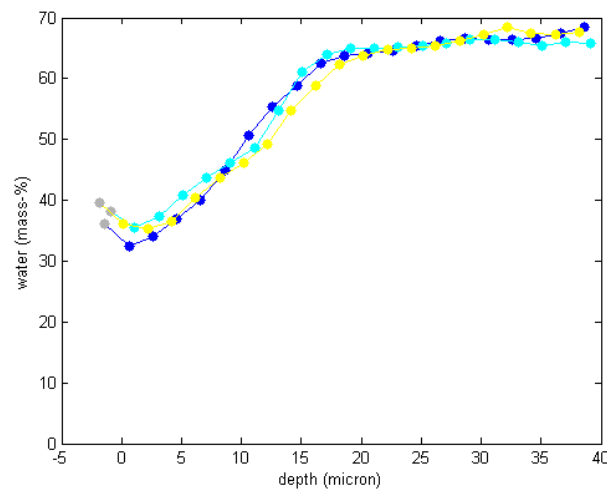


Abbildung 31: Vergleich der gewonnenen Wasserkonzentrationskurven

Für die weitere Auswertung werden auch hier die mit Hilfe des integrierten Fitting-Algorithmus gewonnenen Daten exportiert und in eine Excel-Datei übertragen.

Bestimmung der Stratum Corneum-Dicke

Aus den Wasserkonzentrationsprofilen der HWVN-Spektren kann mittels integriertem Fitting-Algorithmus der SkinTools Software der Wassergehalt bestimmt werden. Die daraus resultierenden Werte erlauben dabei nicht nur die Kontrolle der Hautfeuchtigkeit, sondern können auch zu Bestimmung der Stratum corneum-Dicke herangezogen werden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde aus dem gemessenen Wassergehalt eigenständig die entsprechende Stratum corneum-Dicke der Probandinnen mathematisch abgeleitet.

Das Stratum corneum ist mit 15 – 30 % durch eine eher geringe Wasserkonzentration gekennzeichnet. Etwa 10 – 15 µm unter der Hautoberfläche steigt die Konzentration steil an, bis schließlich die tieferliegende lebende Epidermis erreicht wird und die Wasserkonzentrationskurve in eine Plateauphase übergeht [6, 36].

Für die Bestimmung der Stratum corneum-Dicke aus dem gemessenen Wassergehalt ging man wie folgt vor: Zunächst wurden die ermittelten Werte in eine Excel-Datei übertragen und grafisch dargestellt. Die daraus resultierende

Wasserkonzentrationskurve spiegelte dabei exakt den davor erwähnten Konzentrationsverlauf des Wassers (steiler Anstieg, gefolgt von einer Plateauphase) wieder. Dieser charakteristische Kurvenverlauf ermöglichte eine Teilung der Wasserkonzentrationskurve in zwei Sektionen, an die in weiterer Folge jeweils eine Gerade angelegt wurde. Durch die Ermittlung des Schnittpunktes dieser beiden Geraden konnte die Stratum corneum-Dicke berechnet werden, indem man die Formel $y = kx + d$, die für jede Gerade aufgestellt wurde, gleichsetzte (Abb. 32) [79-80].

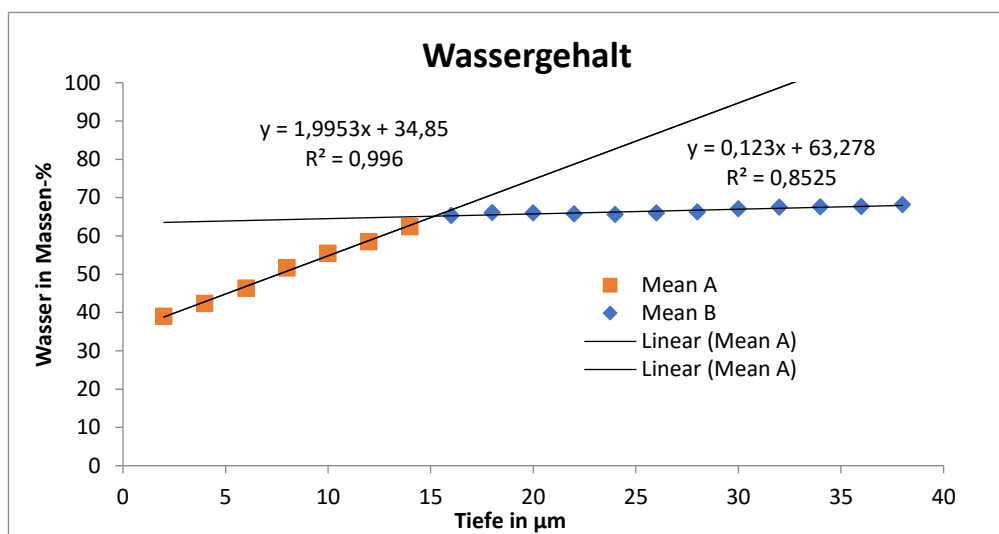


Abbildung 32: Wasserkonzentrationskurve einer Probandin mit angelegten Geraden zur Bestimmung der SC-Dicke

3.2.3. Messung der biophysikalischen Parameter

Neben der Raman-spektroskopischen Charakterisierung wurden auch die biophysikalischen Parameter wie der TEWL, die Permittivität, die Hautfeuchtigkeit, der pH-Wert sowie der Melanin- und Erythemindex untersucht.

3.2.3.1. Der Melanin- und Erythemindex

Nach Abschluss der Raman-Messungen startete man mit dem Messzyklus zur Erhebung der biophysikalischen Parameter. Begonnen wurde dabei mit der Ermittlung des Melanin- und Erythemindexes der Haut. Die Durchführung dieser Messungen erfolgte mit dem Mexameter® MX 18 (Courage & Khazaka, Köln, Deutschland).

Im Rahmen dieser Arbeit wurden jeweils fünf Messungen an fünf verschiedenen Stellen des Unterarms vorgenommen. Wie oben bereits erwähnt sparte man dabei die Messstelle der Raman-Messung aus, um einen möglichen Okklusionseffekt zu verhindern.

Nachdem am Computer das Programm MPA_CTPlus hochgefahren und unter dem Menüpunkt *Messung* die Probandenkennzeichnung festgelegt wurde konnte der Messvorgang gestartet werden. Dazu setzte man die Messsonde senkrecht auf das ausgewählte Hautareal auf. Die sich im Messkopf befindende Feder sorgte dafür, dass die Sonde mit konstantem Druck auf der Haut auflag. Während der Messung musste das Einfallen von natürlichem und künstlichem Licht möglichst vermieden werden, um Schwankungen der Ergebnisse zu verhindern. Innerhalb kürzester Zeit (nach etwa einer Sekunde) wurde durch ein akustisches Signal das Ende der Messung angezeigt. Gleichzeitig konnte der eben erhobene Melanin- und Erythemmesswert am Computerbildschirm kontrolliert und abgelesen werden (Abb. 33).

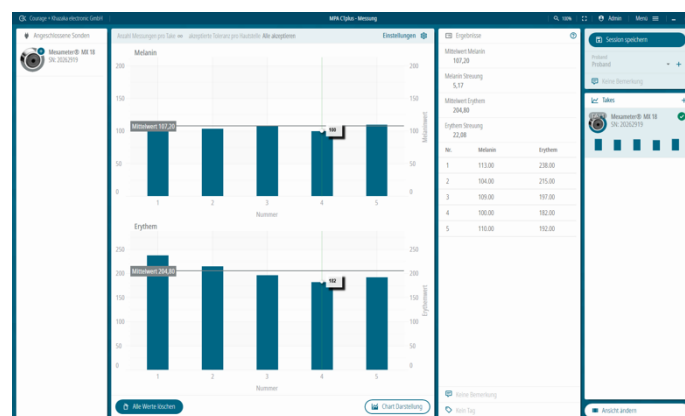


Abbildung 33: Ergebnisse der Melanin- und Erythemmessungen

Die Speicherung der Messwerte erfolgte auch hier automatisch. So konnten die Werte nach insgesamt fünf Messungen über den Menüpunkt *Ergebnisse* exportiert und zur weiteren Auswertung wochenweise in einer Excel-Datei gespeichert werden.

3.2.3.2. Die Permittivität

Für die Messung der Permittivität wurde der Biox Epsilon™ E100 Sensor (Biox Systems Ltd, England) herangezogen. Bevor mit den Messungen gestartet werden

konnte mussten in der Epsilon™ Software die Grundeinstellungen noch entsprechend angepasst sowie die *Region of Interest* definiert werden (Abb. 34).

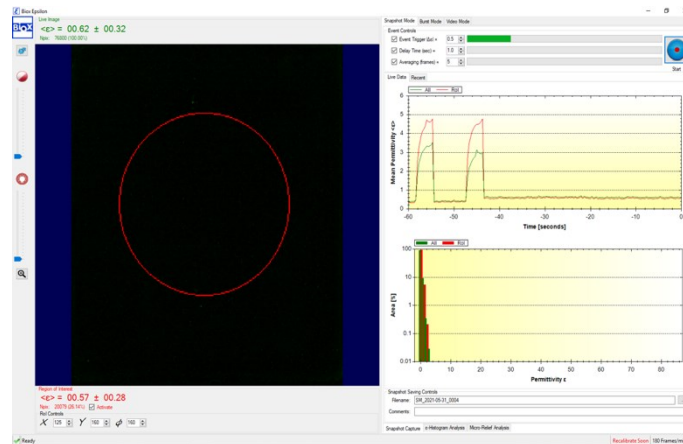


Abbildung 34: Messfenster der Epsilon Software

Die Einstellungen, die zur Bestimmung der Permittivität gewählt wurden sind in Tabelle 7 nochmal zusammengefasst dargestellt.

Permittivität	
Snapshot mode	
Event Trigger	0,5 $\Delta \varepsilon$
Delay Time	1,0 sec.
Averaging	5 frames
Region of Interest	
X	125
Y	160
Φ	160

Tabelle 7: Parameter zur Messung der Permittivität

Nachdem insgesamt drei Messungen an verschiedenen Stellen des Unterarms mit einem Klick auf das Start-Symbol rechts oben durchgeführt worden waren notierte man sich den jeweils mittleren ε -Wert ($\langle \varepsilon \rangle$ unter der Region of Interest). Die erhobenen Werte wurden ebenfalls wochenweise in einer Excel-Datei gesammelt.

3.2.3.3. Die Hautfeuchtigkeit

Die Bestimmung der Hautfeuchtigkeit wurde im Rahmen dieser Arbeit mit dem Corneometer® (Courage & Khazaka, Köln, Deutschland) durchgeführt. Dieses durch seine einfache Handhabung gekennzeichnete Gerät ermöglicht innerhalb weniger Sekunden eine Abschätzung des Hydratationszustandes der Haut.

Um die Messung zu starten wurde der Messstab aus der Halterung genommen und der Sondenkopf senkrecht auf die zu untersuchende Hautstelle gedrückt. Auch hier wurde das Ende des Messvorganges mit einem akustischen Signalton angezeigt. Dieser ertönte etwa eine Sekunde nach Aufsetzen der Sonde. Der Messwert konnte dann direkt vom Display der Derma Unit SSC 3 abgelesen und notiert werden. Insgesamt wurde dieser Vorgang dreimal an unterschiedlichen Hautstellen durchgeführt.

3.2.3.4. Der TEWL

Die Messung des TEWL hat sich im Laufe der Zeit zu einem Standardverfahren im Bereich der Hautforschung etabliert. Der TEWL wird insbesondere bei der Beurteilung der Barrierefunktion der Haut als Schlüsselfaktor herangezogen.

Der Messvorgang wurde wiederum an drei verschiedenen Stellen des nicht dominanten Unterarmes mittels Biox AquaFlux™ AF200 (Biox Systems Ltd, England) durchgeführt.

Zur Vorbereitung auf die Messungen wurde das Computerprogramm Biox AquaFlux™ geöffnet. Nachdem der AF (Zahlencode auf der Unterseite des Messstabes) eingegeben und der Cap-Faktor (muss = 1 sein) kontrolliert worden war konnte der *Mode* Schalter auf der Vorderseite der „base unit“ von Rot auf Blau umgelegt werden. Dadurch kommt es zu einer Temperaturabnahme am Kondensator, die am Computerbildschirm mitverfolgt werden kann. Für diesen Schritt musste aber davor noch die Kalibrierkappe gegen die Messkappe ausgetauscht werden. Um die Akkumulation von Wasser am Kondensator zu gewährleisten wurde der Messstab in offener Position in der „base unit“ geparkt. Unter *Ice* am rechten unteren Rand des Fensters konnte der Eisbildungsprozess kontrolliert werden. Bei einer Menge von circa 0,05 mg wurde mithilfe des Reinigungsstäbchenstiels versucht, die Eisbildung durch Kreis- bzw. Stoßbewegungen (etwa 10 – 15 Sekunden lang) noch weiter

anzuregen. Im Anschluss wechselte man von der Messkappe zur Kalibrierkappe und ließ den AquaFlux™ 30 Minuten lang kalibrieren (Abb. 35).

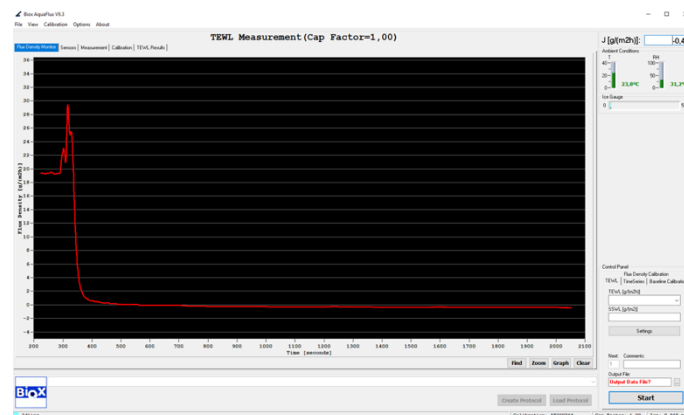


Abbildung 35: Kalibrierung des AquaFlux™

Nach 30 Minuten wurde rechts unten im Fenster *Control Panel* die Registerkarte *Baseline Calibration* ausgewählt und mit einem Klick auf *Calibrate* die Kalibrierung beendet und gespeichert.

Im Anschluss konnte mit der Durchführung der Messung begonnen werden. Dazu wurde der Messstab mit der Messkappe voran möglichst senkrecht auf das zu untersuchende Hautareal platziert. Durch Drücken des roten Knopfes auf der Vorderseite des Messstabes, wurde schließlich der Messvorgang gestartet.

Mit Hilfe der integrierten Biox AquaFlux™ Software konnte der Kurvenverlauf des TEWL in Abhängigkeit von der Zeit am Computerbildschirm mitverfolgt werden. Nachdem die Messung erfolgreich beendet worden war ertönte ein Signalton („Yay“). Im Gegensatz dazu signalisiert ein „Platsch“-Geräusch, dass die Messdauer überschritten wurde und das Ergebnis folglich keine Gültigkeit besaß – vermutlich aufgrund zu starker Schweißdrüsenaktivität, die das Auffinden des Basis-TEWL innerhalb der zweiminütigen Messdauer unmöglich machte. Nach einer erfolgreichen Messung konnte man den Messwert im Bereich *Control Panel* ablesen und notieren. Zusätzlich wurden auch die Messbedingungen rechts oben (Raumtemperatur und Luftfeuchtigkeit) aufgeschrieben. Abbildung 36 zeigt den Kurvenverlauf einer validen Messung.

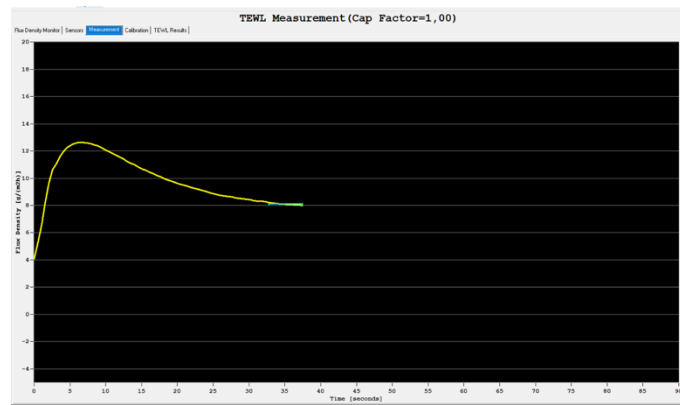


Abbildung 36: Kurvenverlauf einer validen TEWL-Messung

3.2.3.5. Der pH-Wert

Den Abschluss des Messzyklus bildete die pH-Wert-Messung. Dazu wurde das Skin-pH-Meter® (Courage & Khazaka, Köln, Deutschland) aus der KCl-Lösung, in der es gelagert wird, genommen und der vordere Teil der Glaselektrode wurde mit destilliertem Wasser gewaschen. Das überschüssige Wasser wurde durch eine kurze Schüttelbewegung entfernt.

Für die Messung platzierte man die Glaselektrode senkrecht auf die ausgewählte Hautstelle. Durch Drücken des weißen Knopfes auf der Seite des pH-Meters wurde die Messung gestartet. Nach etwa einer Sekunde konnte der Messwert vom Display der Derma Unit SSC 3 abgelesen und notiert werden. Auch hier wurden insgesamt drei Messungen an verschiedenen Hautstellen durchgeführt.

Die Werte, die im Rahmen der Messungen erhoben wurden, sammelte man wochenweise für jeden einzelnen Parameter. Aus den Einzelmessungen wurden anschließend für jede Woche der Mittelwert und die Standardabweichung ermittelt.

3.3. Untersuchung porziner Haut

3.3.1. Frische Ohren

3.3.1.1. Allgemeines

Ziel dieser Untersuchung war es, den Effekt der Lagerung im Kühlschrank (4 – 8 °C) bzw. im Tiefkühlschrank (-18°C) auf relevante Parameter der porzinen Haut zu

begutachten. Dazu führte man Vergleichsmessungen mit entsprechend gelagerten Ohren nach verschiedenen Zeiträumen durch. Alle Messungen wurden mit $n = 3 - 4$ Ohren durchgeführt. Gemessen wurde dabei jeweils auf der dorsalen Seite des Ohres an einem zentralen Hautstück.

3.3.1.2. Probenvorbereitung

Die Schweineohren wurden stets nach demselben Prinzip auf die Messungen vorbereitet. Die eingefrorenen Ohren wurden am Vortag (etwa 24 h vor der Messung) aus dem Tiefkühlschrank geholt und zum Antauen über Nacht im Kühlschrank gelagert. Im Falle der frischen Ohren, die nicht eingefroren wurden, sondern deren Lagerung sich auf zwei Tage im Kühlschrank beschränkte, war dieser erste Schritt nicht notwendig. Am Tag der Messung ließ man die Ohren dann etwa 30 Minuten bei Raumtemperatur akklimatisieren.

Im Anschluss wurden sie kurz mit Wasser gereinigt und mit einer Küchenrolle vorsichtig trocken getupft sowie auf diverse Beschädigungen, wie etwaige Verletzungen, Gefrierbrand oder Verfärbungen, untersucht. Für die Messung wurde auf der dorsalen Seite des Ohres ein geeignetes Hautstück von ca. $2 \times 5 \text{ cm}$ (10 cm^2) herausgeschnitten und mittels Skalpell vom Knorpel getrennt. Nachdem die Behaarung vorsichtig mithilfe einer Nagelschere entfernt worden war spannte man das Hautstück auf eine Styroporplatte, um eine Kontraktion des Gewebes und eine damit einhergehende Faltenbildung möglichst zu verhindern (Abb. 37).



Abbildung 37: Probenvorbereitung der Schweineohren (v. l. n. r.): akklimatisiertes Ohr; 2 x 5 cm großes Hautstück; lösen vom Knorpel; Enthaarung mittels Nagelschere; auf Styropor gespanntes Hautstück

3.3.1.3. Behandelte Ohren

Die Schweineohren wurden von einem lokalen Schlachthof (Gantner GmbH, Hollabrunn, Österreich) bezogen, der diese direkt nach der Schlachtung und der Abtrennung vom Tier zur Verfügung stellte.

Bei der ersten Lieferung frischer Ohren gestaltete sich die Durchführung der geplanten Messungen schwierig. Bereits zu Beginn der spektroskopischen Messung zeigten sich die ersten Probleme, da kein zufriedenstellender Kontakt zwischen der Schweinehaut und dem Messfenster hergestellt werden konnte. Zusätzlich erwies sich auch die Bestimmung des *Z-Offset* und damit die Suche nach der Hautoberfläche als problematisch. Zu diesem Zeitpunkt kam bereits die Vermutung auf, dass die Ohren möglicherweise vor der Lieferung einer Hygienebehandlung (Hitze, mechanische Abrasion) unterzogen worden waren. Diese Vermutung wurde schließlich im Rahmen der Messungen des TEWL bestätigt, die auf eine beschädigte Hautbarriere hinwiesen; es wurden stark erhöhte Werte um $80 \text{ g/m}^2/\text{h}$ aufgezeichnet. Die Messungen an dieser Charge wurden daraufhin abgebrochen.

3.3.1.4. Unbehandelte Ohren

In sämtlichen weiteren Versuchen wurden nur mehr unbehandelte Schweineohren vermessen. An den frischen, unbehandelten Ohren wurden zu verschiedenen Zeitpunkten Vergleichsmessungen durchgeführt, um den Effekt unterschiedlicher Lagerbedingungen (im Kühlschrank bzw. im Tiefkühlschrank) zu untersuchen.

Dazu wurde eine Charge frischer Proben wie folgt aufgeteilt: $n = 4$ Ohren wurden noch am selben Tag im frisch gelieferten Zustand vermessen (0 h). Jeweils vier weitere Ohren, also insgesamt acht Stück, wurden für Vergleichsmessungen am nächsten (24 h) und übernächsten Tag (48 h), ohne behandelt bzw. zerschnitten zu werden, gut verschlossen im Kühlschrank (4 – 8 °C) gelagert. Die übrigen Schweineohren wurden in Säcke zu je drei Stück ($n = 3$) eingepackt, beschriftet (Datum + Anzahl der Ohren) und anschließend in den Tiefkühlschrank (-18 °C) gegeben. Auf diese eingefrorenen Proben griff man für Folgemessungen nach einer Woche sowie nach vier und nach acht Wochen zurück. In Tabelle 8 wurden die Messbedingungen dieser Untersuchung nochmal grafisch dargestellt.

Anzahl (n)	Lagerung	Messzeitpunkt ¹
n = 4	Kühlschrank	0 h
n = 4	Kühlschrank	24 h
n = 4	Kühlschrank	48 h
n = 3	Tiefkühler	1 Woche
n = 3	Tiefkühler	4 Wochen
n = 3	Tiefkühler	8 Wochen

Tabelle 8: Messbedingungen der frischen und unbehandelten Ohren

Um mögliche Veränderungen in den relevanten Hautparametern aufgrund von unterschiedlichen Lagerbedingungen sowie Lagerzeiträumen feststellen zu können, wurden auch hier die biophysikalischen und spektroskopischen Messungen zur Hautcharakterisierung herangezogen.

¹ gibt die Zeitspanne wieder, die vom Zeitpunkt der Lieferung bis zur Messung vergangen ist

Begonnen wurde der Messzyklus wiederum mit der Raman-Spektroskopie. Dazu wurde das auf Styropor gespannte Hautstück mit dem Stratum corneum nach unten auf das Messfenster gelegt und mit einem konstanten Gewicht (ca. 293 g, Objektträgerschachtel) beschwert, um so einen guten Kontakt zur Messfläche herzustellen (Abb. 38). Für die Einstellungen zur Erhebung der Rohspektren wurden sowohl im Fingerprint- als auch im HWVN-Bereich die gleichen Zahlenwerte gewählt wie bei der parallel dazu ablaufenden Untersuchung der humanen Haut (siehe Kapitel 3.2.2.).



Abbildung 38: Beschwerung des Hautstückes mit einem konstanten Gewicht

Im Anschluss wurden die Messungen zur Ermittlung der biophysikalischen Parameter (TEWL, Hautfeuchtigkeit via Corneometer®, pH-Wert, Melanin-/Erythemindex) durchgeführt. Die Reihenfolge dieser Parametermessungen wurde direkt von der Humanhautstudie übernommen. Bei den Untersuchungen der porzinen Haut verzichtete man aufgrund der Größe des Hautstückes jedoch auf die Messung der Permittivität mit dem Biox Epsilon™ E100 Sensor. Zudem wurde auch die Anzahl der pro Parameter durchgeführten Messungen erhöht, da die erhobenen Messwerte der porzinen Hautproben im Vergleich zur Humanhaut deutlich größeren Schwankungen unterlagen. So wurden bei der Raman-Spektroskopie $n = 10 - 13$ Messungen im Fingerprint-Bereich und $n = 8 - 10$ Messungen im HWVN-Bereich durchgeführt. Mit dem Mexameter® erhob man $n = 20 - 21$ und mit dem Corneometer® $n = 8 - 10$ Messwerte. Für die Bestimmung des transepidermalen Wasserverlustes wurden jeweils $n = 6 - 8$ Messungen durchgeführt und der pH-Wert wurde aus $n = 4 - 5$ Einzelmessungen ermittelt.

Wie bei der Untersuchung der humanen Haut wurden auch im Rahmen dieser Studie die zu den verschiedenen Zeitpunkten erhobenen Messwerte für jeden einzelnen Parameter gesammelt. Aus den Einzelmessungen konnten anschließend für jeden Messzeitpunkt Mittelwert und Standardabweichung ermittelt werden.

3.3.2. Einfluss von Sonnenlicht auf porcine Haut

Um den Einfluss von Sonnenlicht auf relevante Hautparameter zu untersuchen, wurden $n = 3$ unbehandelte, eingefrorene Ohren (eingefroren am 25.07.2019) mit Hilfe des Sol 500 (Dr. Hönle AG, München, Deutschland) bestrahlt und anschließend vermessen.

Dazu wurden die Ohren wie oben beschrieben aufgetaut, präpariert und auf Styroporplatten gespannt (siehe Kapitel 3.3.1.2.). Die etwa 3 x 5 cm großen Proben steckte man anschließend mit Stecknadeln auf einer Korkplatte fest. Für die Bestrahlung wurde die Korkplatte etwa 50 cm vom Strahler entfernt möglichst senkrecht aufgestellt, um eine gleichmäßige Bestrahlung gewährleisten zu können. Diese senkrechte Position wurde durch hitzebeständige Fliesen, die der Platte als Stütze dienen sollten und sie auch gleichzeitig stabilisierten, ermöglicht (Abb. 39). Im Anschluss wurden die Ohren 30 Minuten lang bestrahlt.



Abbildung 39: Hautproben vor der Bestrahlung (links) + Versuchsaufbau mit SOL 500 (rechts)

Nachdem der Bestrahlungsvorgang abgeschlossen war wurden an den drei Ohren wie gewohnt die spektroskopischen und biophysikalischen Messungen durchgeführt

(0 h). Die Anzahl der erhobenen Einzelmessungen übernahm man dabei direkt von der vorangegangenen Untersuchung an porziner Haut. Anschließend wurden die Hautproben in Alufolie verpackt und über Nacht im Kühlschrank gelagert, bevor man am nächsten Tag (24 h) den Messzyklus nochmal wiederholte.

Als Kontrolle (unbestrahlte Ohren) wurden $n = 3$ unbehandelte, eingefrorene Schweineohren (ebenfalls eingefroren am 25.07.2019) aufgetaut, ident vorbereitet und vermessen. Im Gegensatz zu den bestrahlten Proben verzichtete man hier jedoch auf den zweiten Messzyklus nach 24 h.

Die Messergebnisse wurden wiederum in einer Excel-Datei gesammelt und der Mittelwert sowie die Standardabweichung aus den Einzelmessungen erhoben. Die daraus resultierenden Werte wurden anschließend mit den Ergebnissen aus den Kontrollmessungen grafisch in Relation gesetzt.

3.3.3. Penetrationsstudie mit Coffein anhydricum

Ziel dieser Penetrationsstudie mit Coffein anhydricum als Modellarzneistoff war es, den Effekt von UVA-Bestrahlung auf die Barrierefunktion der Haut und die Stoffpenetration zu ermitteln.

3.3.3.1. Aufnahme eines Rein- und Differenzspektrums

Vor Beginn der Penetrationsstudie wurde zuerst noch ein Reinspektrum von Coffein aufgenommen. Dazu wurden 10 mg/ml (= 0,01 g in 1 ml) Coffein anhydricum (Lot#1428211V Sigma-Aldrich, Missouri, USA) in Wasser gelöst. Mittels Pasteur-Pipette wurden vorsichtig 1 – 2 Tropfen der Lösung auf das Raman-Messfenster aufgetragen. Um den Verdunstungsverlust möglichst gering zu halten wurde das Messfenster nach dem Auftragen der Lösung wieder mit der Abdeckungskappe bedeckt. Dies ist auch aus Personenschutzgründen notwendig, da das austretende Laserlicht während der Messung das Auge schädigen kann.

Für die Aufnahme des Spektrums wurde über die Registerkarte *Template* und den Menüpunkt *Raman experiment* die Einstellung *fingerprint* ausgewählt. In der sich öffnenden Vorlage konnten nun wieder Werte für die Parameter *Exposure time*, *Number of frames* und *Cycle time* definiert werden. Die ausgewählten Einstellungen wurden – wie auch zuvor – aus vorangegangenen Arbeiten übernommen (Tab. 9).

Raman experiment	
Exposure time	5 sec.
Number of frames	240
Cycle time	1 sec.

Tabelle 9: Messparameter für die Aufnahme eines Reinspektrums

Abbildung 40 zeigt das aus der Aufnahme resultierende Coffein-Spektrum. Da dieses Spektrum jedoch eine Mischung aus Reinsubstanz und Lösungsmittel repräsentierte wurde mit Hilfe der SkinTools Software ein Differenzspektrum erstellt.

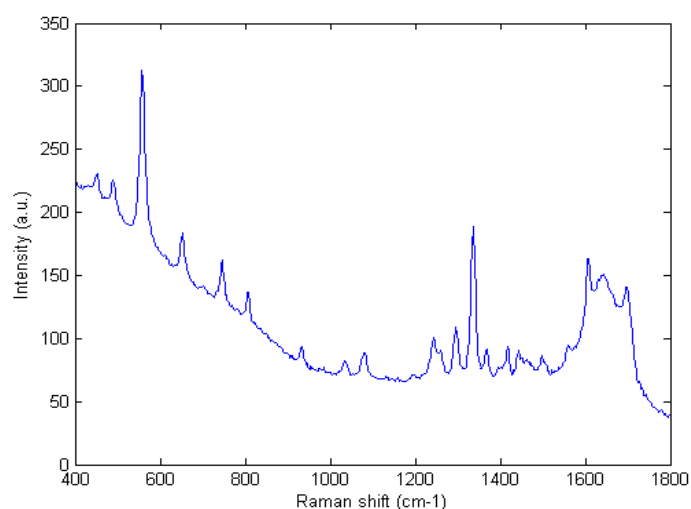


Abbildung 40: Coffein-Spektrum

Dazu wählt man im SkinTools-Fenster unter *Tools* den Punkt *Difference spectrum* aus. Im nächsten Schritt wird unter A das eben erstellte Coffein-Spektrum geöffnet und unter B ein Spektrum von reinem Wasser (Lösungsmittel). Mit einem Klick auf *Start* öffnet sich nun ein Fenster, in dem die Kurvenverläufe der drei Spektren zur Erstellung des Differenzspektrums mit Hilfe des *factor f* nochmals verändert werden können (Abb. 41).

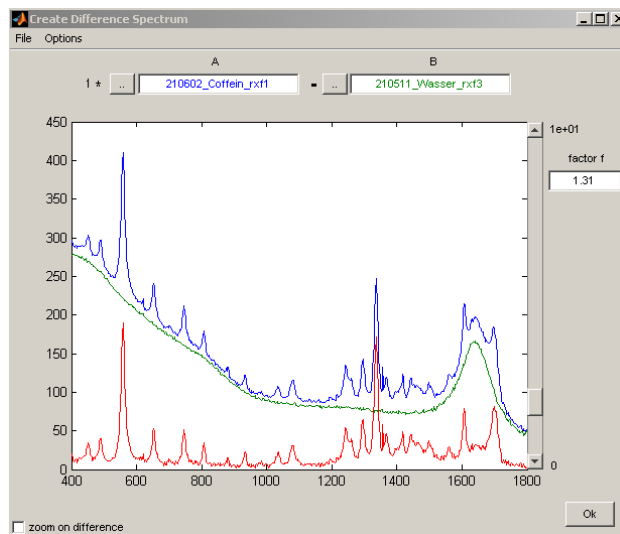


Abbildung 41: Erstellung des Differenzspektrums von Coffein

Das blaue Spektrum stellt hier das Spektrum des Coffein-Wasser-Gemisches dar, während das grüne Spektrum jenem von reinem Wasser entspricht. Aus der Differenz der beiden ergibt sich schließlich das Reinspektrum des Coffeins (rot).

Unter *File* und *Save as* wurde das Differenzspektrum in einen entsprechenden Ordner gespeichert. Mit Hilfe des SkinTools-Programms konnte im Anschluss das gewonnene Reinspektrum des Coffeins erstellt und exportiert werden. Dazu wurde über *File* und *Open* der Ordner, indem das Differenzspektrum abgespeichert wurde, geöffnet und das entsprechende Spektrum ausgewählt. Durch einen Klick auf *Plot* wurde schließlich das Reinspektrum des Coffeins generiert (Abb. 42).

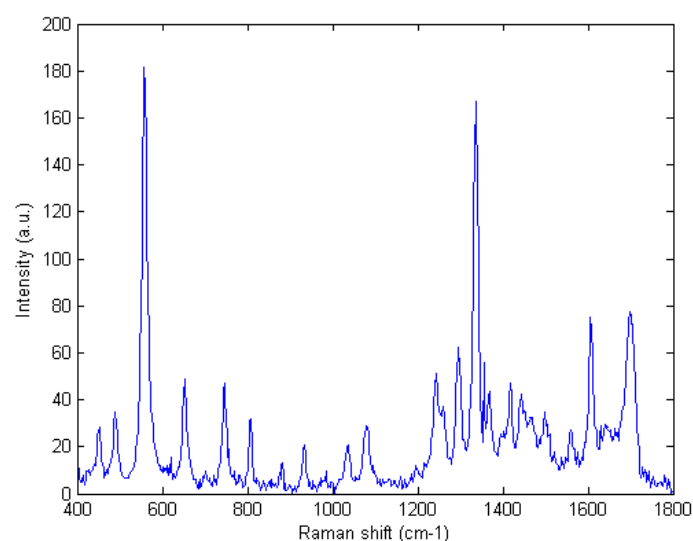


Abbildung 42: Reinspektrum des Coffeins

3.3.3.2. Durchführung der Penetrationsstudien

Um den Effekt von UVA-Bestrahlung auf die Penetrationseigenschaften von Coffein zu untersuchen wurden die Versuche wie folgt durchgeführt: Die Schweineohren wurden am Tag vor dem Versuch aus dem Tiefkühlschrank genommen und über Nacht (für ca. 24 h) zum Antauen in den Kühlschrank gelegt. Vor der weiteren Präparation ließ man die Ohren für 30 Minuten bei Raumtemperatur akklimatisieren. Anschließend wurden sie sanft mit Wasser gereinigt, trocken getupft und präpariert. Die Haut der dorsalen Seite des Ohres wurde mittels Skalpell vom Knorpel gelöst, zugeschnitten und mit Hilfe einer Nagelschere enthaart. Die 3 x 7 cm großen Hautproben (Fläche: 21 cm²) wurden schließlich mit Nadeln auf Styroporplatten gespannt.

Derweil erfolgte die Herstellung einer wässrigen Lösung von Coffein anhydricum im Messkolben. Als passende Konzentration für die Versuche wurde eine wässrige Lösung von 1 % (m/v) in gereinigtem Wasser verwendet (Einwaage: 0,01 g/ml). Basierend auf Erfahrungen aus anderen Arbeiten wurde eine Menge von 7 µl/cm² der Lösung (Gesamtmenge: 147 µl) mittels Eppendorfpipette auf die Hautprobe aufgetragen (Abb. 43). Diese wurde mit Hilfe eines gesättigten Fingerlings für zehn Sekunden verteilt und in die Haut einmassiert. Danach lagerte man das Ohr für 60 Minuten bei Raumtemperatur. Um ein Austrocknen zu vermeiden wurde die Probe dabei in eine Petrischale mit gesättigter Atmosphäre (3 ml Wasser) gelegt (Abb. 44).



Abbildung 44: Auftragemuster der wässrigen Lösung

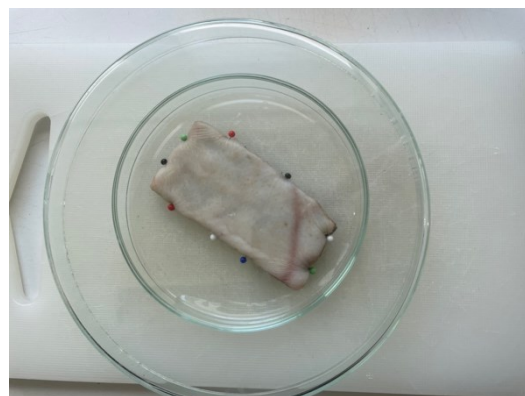


Abbildung 43: Lagerung des Ohres in gesättigter Atmosphäre

Im Anschluss wurden die Ohren vorsichtig trocken getupft und mit dem Raman-Spektroskop vermessen. Insgesamt wurden an $n = 3$ Ohren jeweils $n = 13 - 15$ Messungen im Fingerprint-Bereich durchgeführt.

Um den Effekt von UVA-Strahlung nachweisen zu können wurden nochmals $n = 3$ Schweineohren sowie eine wässrige Lösung von Coffein anhydricum wie oben beschrieben vorbereitet. Vor dem Auftragen der wässrigen Lösung erfolgte eine Bestrahlung dieser Hautproben mit Hilfe des Sol 500. Dafür wurden die Hautstücke wieder mit Stecknadeln auf der Korkplatte befestigt, etwa 50 cm vom Strahler entfernt möglichst senkrecht platziert und 30 Minuten lang bestrahlt. Nach einer 30-minütigen Akklimatisierung wurden mit Hilfe einer Eppendorfpipette 147 μl der wässrigen Lösung aufgetragen und mit einem gesättigten Fingerling für zehn Sekunden verteilt und einmassiert. Danach wurde das Ohr für 60 Minuten bei Raumtemperatur in gesättigter Atmosphäre gelagert und anschließend vorsichtig trocken getupft. Die nachfolgenden spektroskopischen Messungen wurden wiederum im Fingerprint-Bereich durchgeführt und umfassten $n = 13 - 15$ Einzelmessungen.

Für den Vergleich der erhobenen Messungen und den anschließenden Export der Ergebnisse nahm man sich die SkinTools Software zu Hilfe. Die Auswertung wurde nicht wie sonst mit *Default method NMF* durchgeführt, sondern mit einer eigens modifizierten Version davon (*Methode Coffein anhydr.*) Dazu wählte man unter *Methods* die Option *load user method* aus und holte sich die neu erstellte Methode aus dem entsprechenden Ordner. Durch die geänderte Methode umfasste die nachfolgende Auswertung der Rohspektren, die wie bereits erwähnt mit Hilfe eines integrierten Fitting-Algorithmus erfolgte, nicht nur die üblichen Hautparameter wie Ceramide, Keratin, NMF usw., sondern auch den Gehalt des aufgetragenen Coffeins. Die nachgewiesenen Coffein-Konzentrationen wurden anschließend in einer Excel-Datei gesammelt und mit den Konzentrationen der Kontrolle (unbestrahlte Ohren) verglichen.

3.3.4. Raman-spektroskopischer Vergleich von diversen Hautproben

Obwohl in der Arbeitsgruppe hauptsächlich die Haut porziner Ohren als alternatives Hautmodell herangezogen wird konnte durch Kontakt zur Pázmány Péter Catholic Universität (Budapest, Ungarn) Zugang zu frischen Hautproben von anderen Tierspezies erlangt werden. Zur Verfügung standen dabei Proben frischer Mäuse-,

Ratten- und Schweinehaut sowie eine Hautprobe, die von einer an Psoriasis leidenden Maus stammte. Dadurch bot sich die Möglichkeit diese Hautproben im Rahmen dieser Arbeit spektroskopisch zu vermessen und die daraus resultierenden Haut-Spektren miteinander zu vergleichen. Zu diesem Zweck wurden die Versuche wie folgt durchgeführt: Die Hautproben wurden in Alufolie verpackt und über Nacht im Kühlschrank gelagert. Am nächsten Tag wurden die Proben vor Versuchsbeginn auf Raumtemperatur gebracht und präpariert. Dazu wurden die bereits zugeschnittenen und mit Enthaarungscreme enthaarten Hautproben auf Styroporplatten gespannt. Abbildung 45 zeigt Beispiele der fertig vorbereiteten Proben.

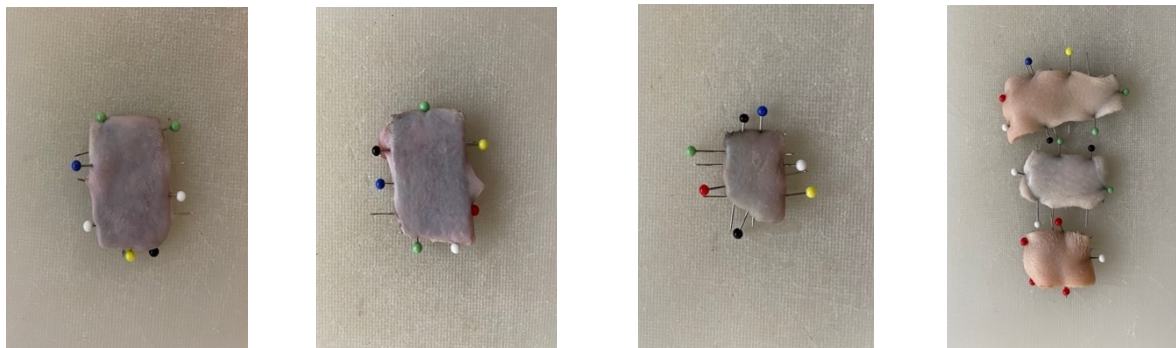


Abbildung 45: Hautproben v. l. n. r.: Ratte, Maus, psoriatische Maus und Schwein

Im Anschluss erfolgte die spektroskopische Vermessung der Proben mit dem Raman-Gerät. Es wurden pro Spezies jeweils $n = 3$ Proben vermessen. Je Probe wurden $n = 5 - 8$ Einzelmessungen im Fingerprint-Bereich und $n = 4 - 5$ Einzelmessungen im HWVN-Bereich durchgeführt. Nach dem Beenden der Messungen wurden diese vom System wieder automatisch in einem Ordner, der mit dem Datum des jeweiligen Tages gekennzeichnet war, gespeichert.

4. Ergebnisse

4.1. Gesunde Humanhaut

4.1.1. Erhebung von Basisdaten

Ziel dieser Erhebung war es, die Reproduzierbarkeit der Raman-Messergebnisse über einen längeren Zeitraum zu untersuchen. Dazu wurden an drei gesunden Probandinnen (weiblich, Alter 24 – 37 Jahre) in regelmäßigen Abständen über einen Zeitraum von 12 Wochen Basismessungen durchgeführt. Hierbei wurden sowohl im Fingerprint-Bereich als auch im HWVN-Bereich Rohspektren gemessen, die anschließend mittels integriertem Fitting-Algorithmus in Bezug auf wichtige Hautparameter ausgewertet wurden. Im Fingerprint-Bereich waren das Ceramide, Cholesterin, Keratin, NMF und Harnstoff und im HWVN-Bereich der Wassergehalt.

4.1.1.1. Fingerprint-Spektren

Mit Hilfe des integriertem Fitting-Algorithmus konnte für jede Einzelmessung einer jeden Probandin wochenweise der Gehalt der oben genannten Parameter erhoben werden. Aus den gemittelten Probandenwerten ($n = 3$) bildete man wiederum den Mittelwert und die Standardabweichung. Schließlich setzte man die Werte, die wöchentlich über drei Monate erhoben wurden, in Relation.

Ceramide

Im Laufe der 12 Wochen konnte durchwegs ein gleichbleibender Trend im Kurvenverlauf des Ceramidgehaltes beobachtet werden (Abb. 46). Charakteristisch dabei war, dass die Ceramidkonzentration in den ersten Messtiefen, also nahe der Hautoberfläche, am höchsten war. Mit zunehmender Hornhauttiefe nahm auch die Konzentration der Ceramide kontinuierlich ab. Abbildung 47 illustriert beispielhaft den Kurvenverlauf des Ceramidgehaltes einer Woche, der aus den Konzentrationen der drei Probandinnen gemittelt wurde.

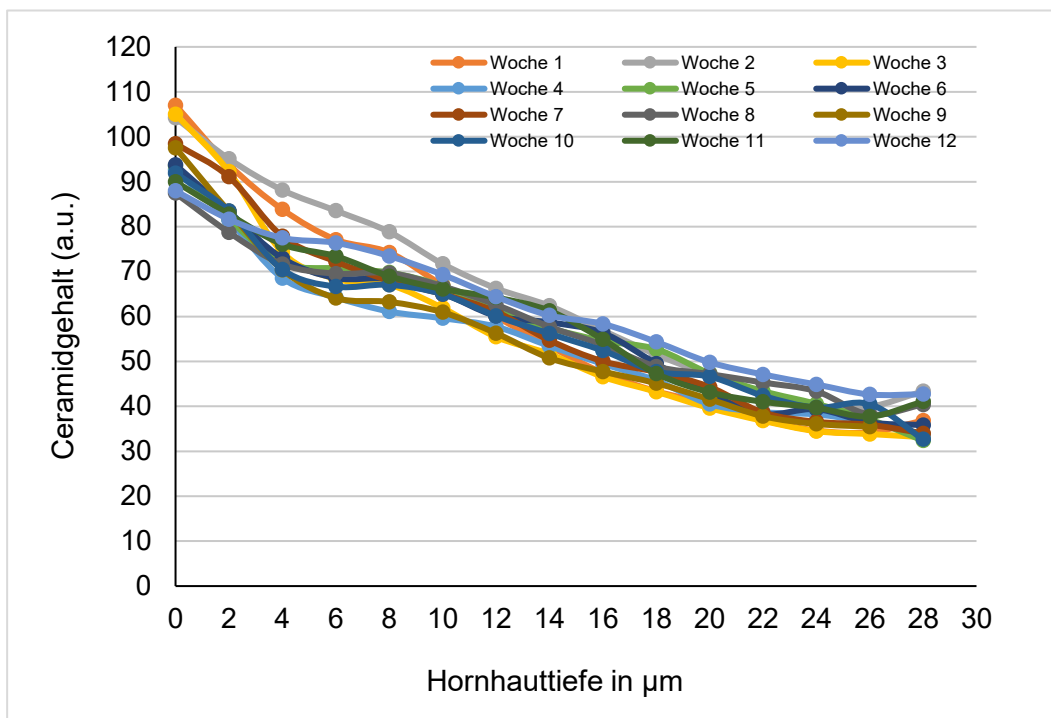


Abbildung 46: wochenweise Darstellung des Ceramidgehaltes in Abhängigkeit von der Hornhauttiefe

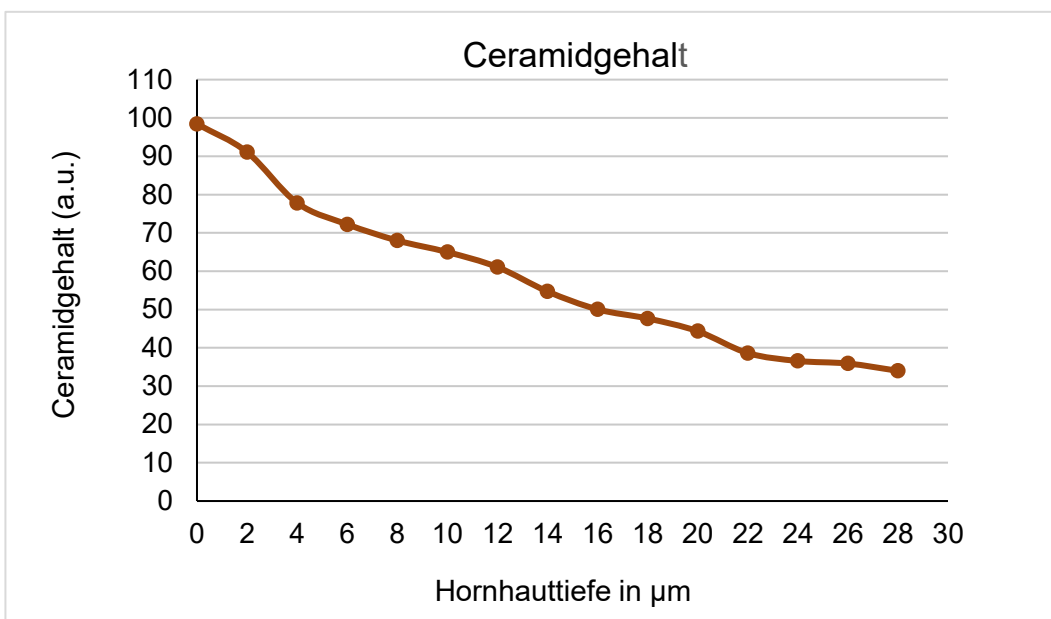


Abbildung 47: Ceramidgehalt gemittelt aus den Werten der drei Probandinnen (beispielhaft, Messergebnisse Woche 7)

Dieser Verlauf konnte durch die grafische Darstellung des gemittelten Ceramidgehaltes (gemittelt aus den mittleren Wochenwerten) bestätigt werden (Abb. 48).

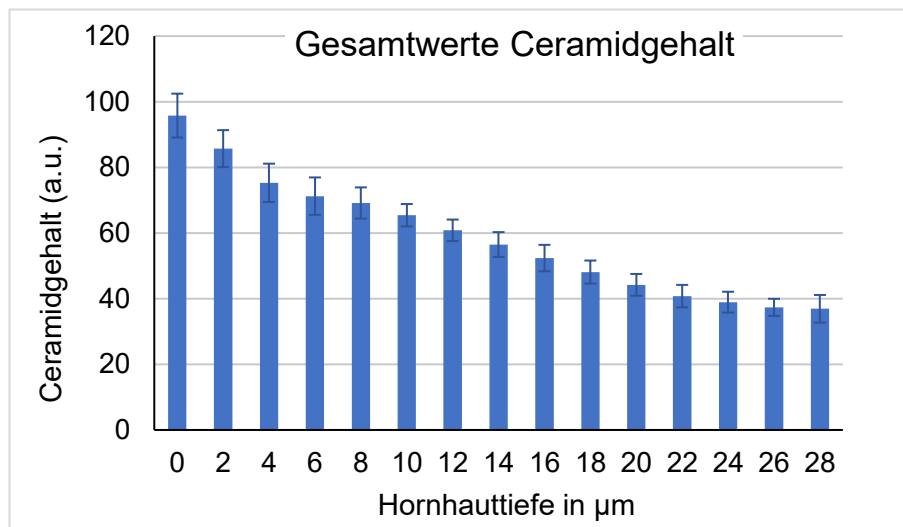


Abbildung 48: mittlerer Ceramidgehalt des gesamten Untersuchungszeitraumes aller Probandinnen mit Standardabweichung

Cholesterin

Ähnliches konnte auch bei der Auswertung der Cholesterinwerte festgestellt werden. Obwohl die Cholesterinkonzentrationen im Wochenvergleich hier etwas mehr schwankten, wie beispielsweise an dem neuerlichen Anstieg des Gehaltes bei einer Tiefe von 2 und 4 µm in Woche 10 und 12 oder dem höheren Anfangsgehalt in Woche 1 und 3 zu erkennen war, konnten im Verlauf des Messzeitraumes keine größeren Unterschiede beobachtet werden. Grundsätzlich nahm der Cholesteringehalt bis etwa 12 µm Tiefe ab und blieb dann mit Werten zwischen 0,02 und 0,03 u.a. relativ konstant (Abb. 49).

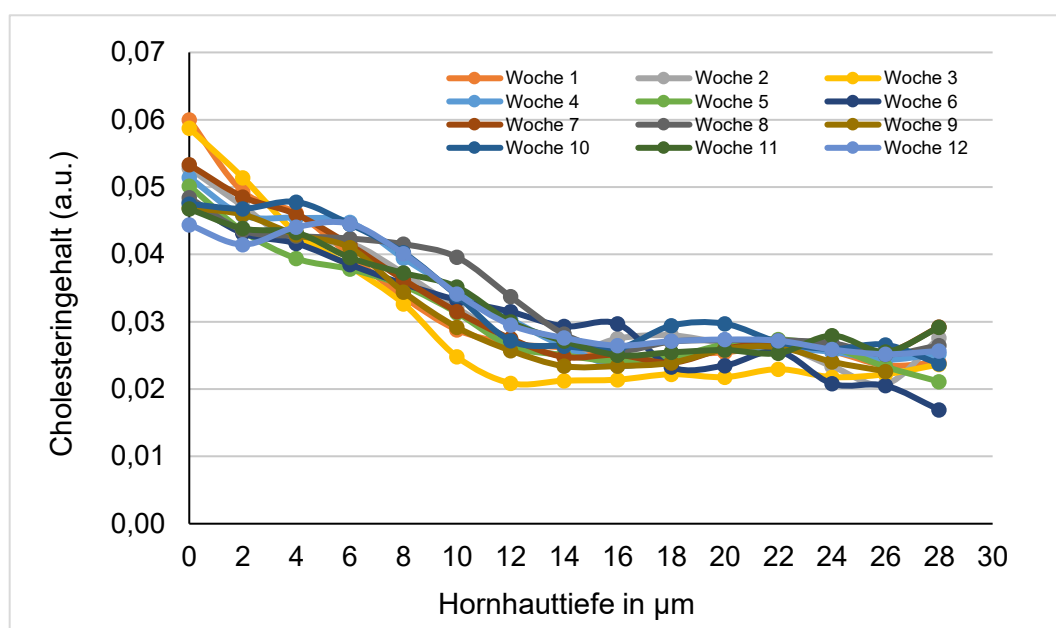


Abbildung 49: wochenweise Darstellung des Cholesteringehaltes in Abhängigkeit von der Hornhauttiefe

Die Darstellung des mittleren Cholesteringehaltes in den ersten 10 μm des Stratum corneum veranschaulichte nochmals, dass die Schwankungen im Gehalt durchaus im Rahmen des Vertretbaren lagen (Abb. 50).

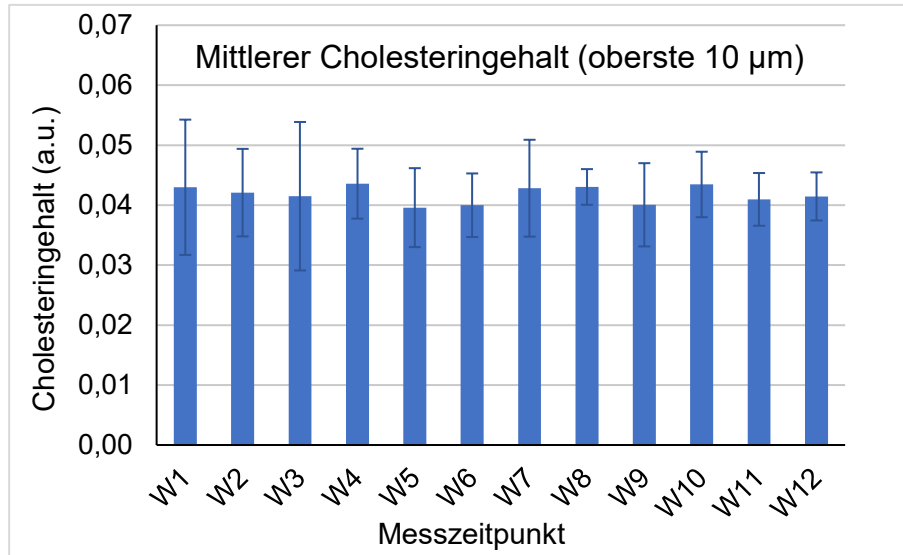


Abbildung 50: mittlerer Cholesteringehalt der obersten 10 μm

Keratin

Auch die Messungen des Keratingehaltes, der durch einen steilen Anstieg bis zu einer Tiefe von 4 μm , gefolgt von einem kontinuierlichen Abfall gekennzeichnet war, lieferten über den gesamten Untersuchungszeitraum hinweg vergleichbare Werte mit ähnlichen Standardabweichungen (Abb. 51 und 52).

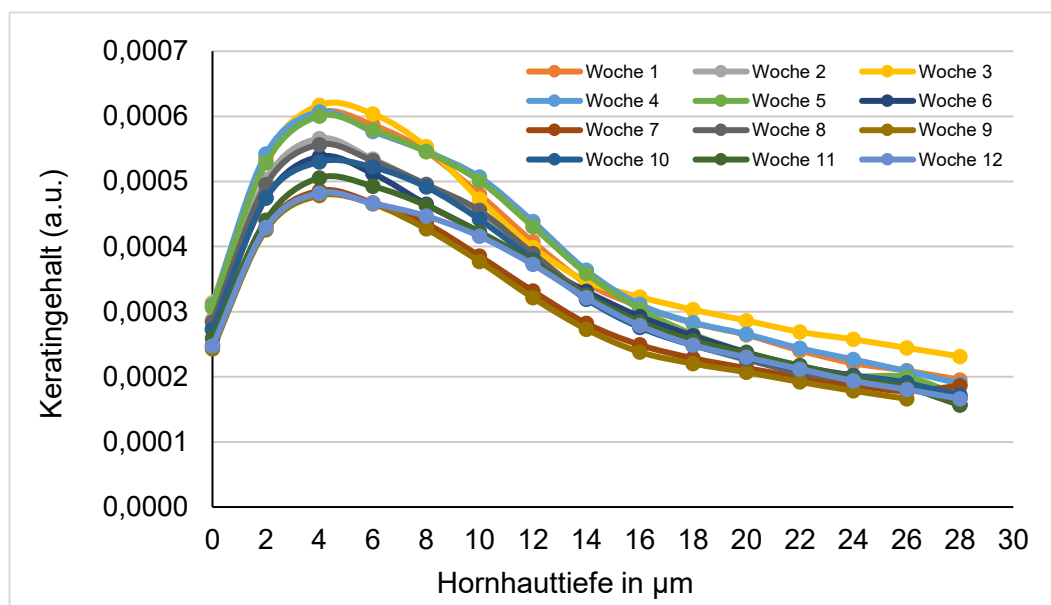


Abbildung 51: wochenweise Darstellung des Keratingehaltes in Abhängigkeit von der Hornhauttiefe

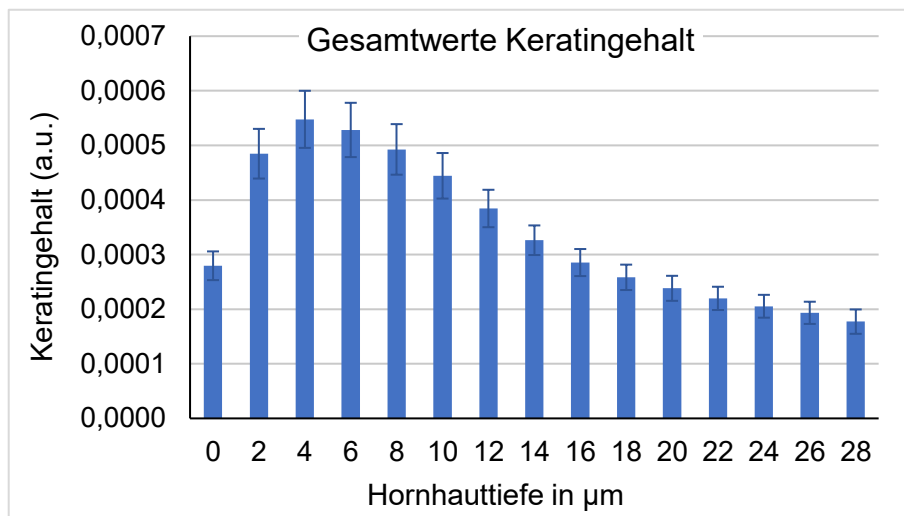


Abbildung 52: mittlerer Keratingehalt des gesamten Untersuchungszeitraumes aller Probandinnen mit Standardabweichung

NMF

Einen ähnlichen Kurvenverlauf wie das Keratin zeigte auch der NMF. Die NMF-Konzentration stieg ebenfalls bis zu einer Hornhauttiefe von 4 µm an, der Anstieg war jedoch durch einen geringeren Steigungsgrad gekennzeichnet. Verglichen mit der Keratinkonzentration fiel die NMF-Kurve hingegen steiler ab und ging bei 16 – 18 µm Tiefe in eine Plateauphase, die sich dem Nullpunkt näherte, über (Abb. 53).

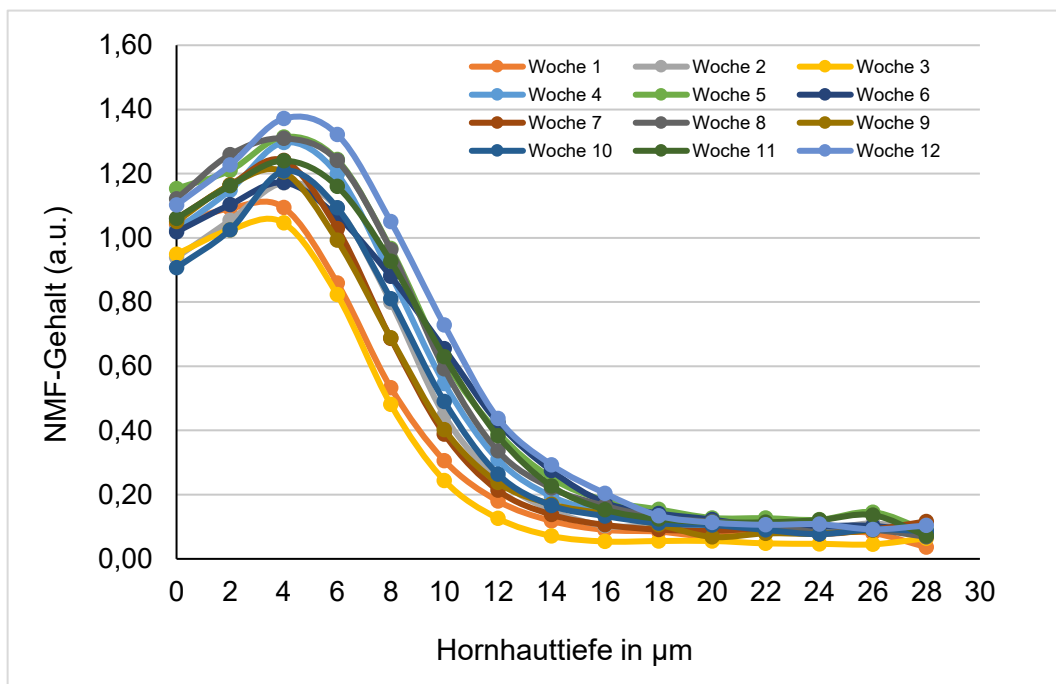


Abbildung 53: wochenweise Darstellung des NMF-Gehaltes in Abhängigkeit von der Hornhauttiefe

Wie aus der oben dargestellten Grafik hervorgeht konnten über den Zeitraum von 12 Wochen ähnliche Konzentrationen gemessen werden, die bei genauerer Betrachtung auch einigen Schwankungen ausgesetzt waren. Die Darstellung des mittleren NMF-Gehaltes in den ersten 10 μm des Stratum corneum zeigte, dass die Wochen 1 und 3 durch niedrigere Konzentrationen gekennzeichnet waren, während in den Wochen 5, 8 und 12 der Gehalt wieder anstieg. Die hohe Standardabweichung ließ zudem vermuten, dass die Werte auch probandenintern einigen Schwankungen unterlagen. Der Konzentrationsunterschied zwischen Woche 1 und Woche 12 könnte in diesem Fall eventuell auf die Veränderung der natürlichen Feuchthaltefaktoren in Abhängigkeit von den steigenden Temperatur zurückgeführt werden (Abb. 54).

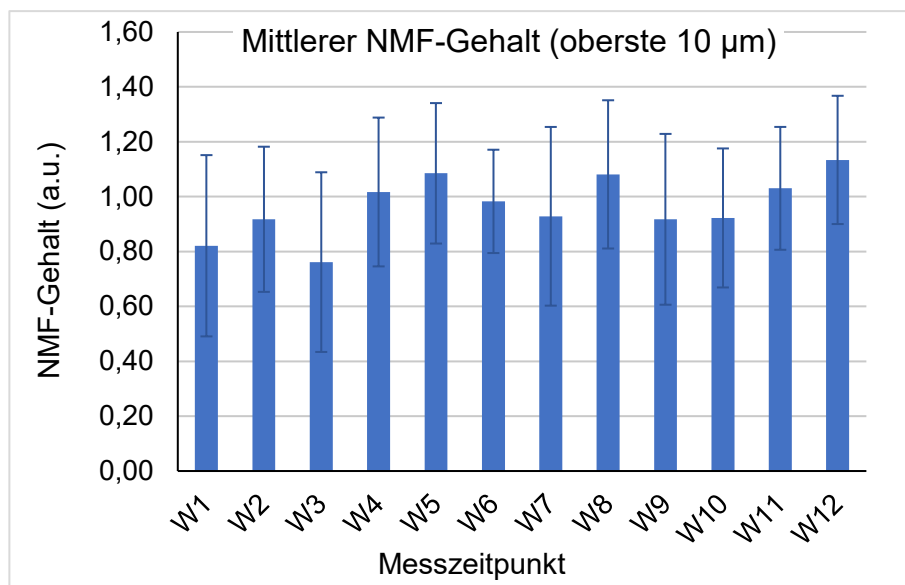


Abbildung 54: mittlerer NMF-Gehalt der obersten 10 μm

Harnstoff

Im Gegensatz zur NMF- und Keratin-Kurve blieb bei der Konzentrationskurve des Harnstoffes ein starker Anstieg zu Beginn aus. Der Verlauf war hingegen eher durch ein anfängliches Plateau mit nachfolgenden Abfall und anschließend einer neuerlichen Plateauphase ab einer Hornhauttiefe von 12 μm , bei der sich der Gehalt auf etwa 10 a.u. einpendelte, gekennzeichnet (Abb. 55). Die Wochen 1, 7 und 8 wiesen zwar etwas niedrigere (Woche 1) bzw. höhere (Woche 7 und 8) Werte auf, im Großen und Ganzen konnten jedoch über den gesamten Untersuchungszeitraum reproduzierbare Messergebnisse erhoben werden (Abb. 56).

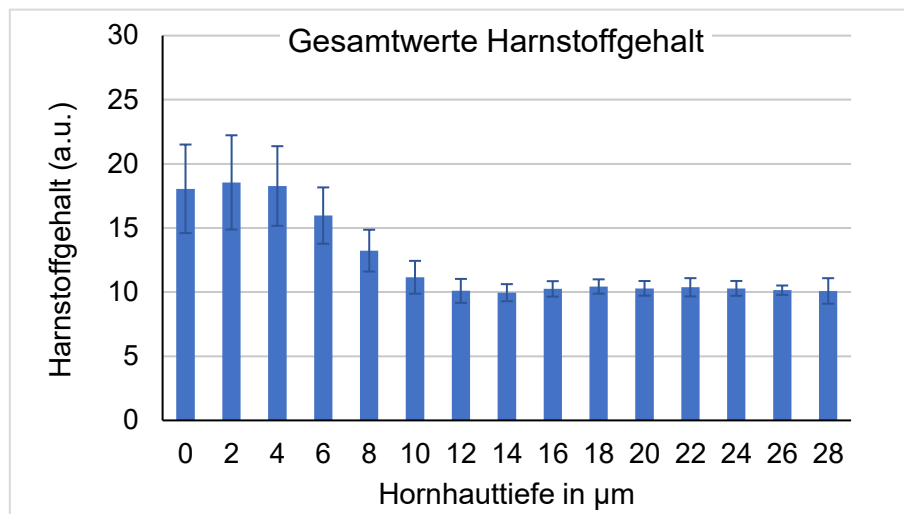


Abbildung 55: mittlerer Harnstoffgehalt des gesamten Untersuchungszeitraumes aller Probandinnen mit Standardabweichung

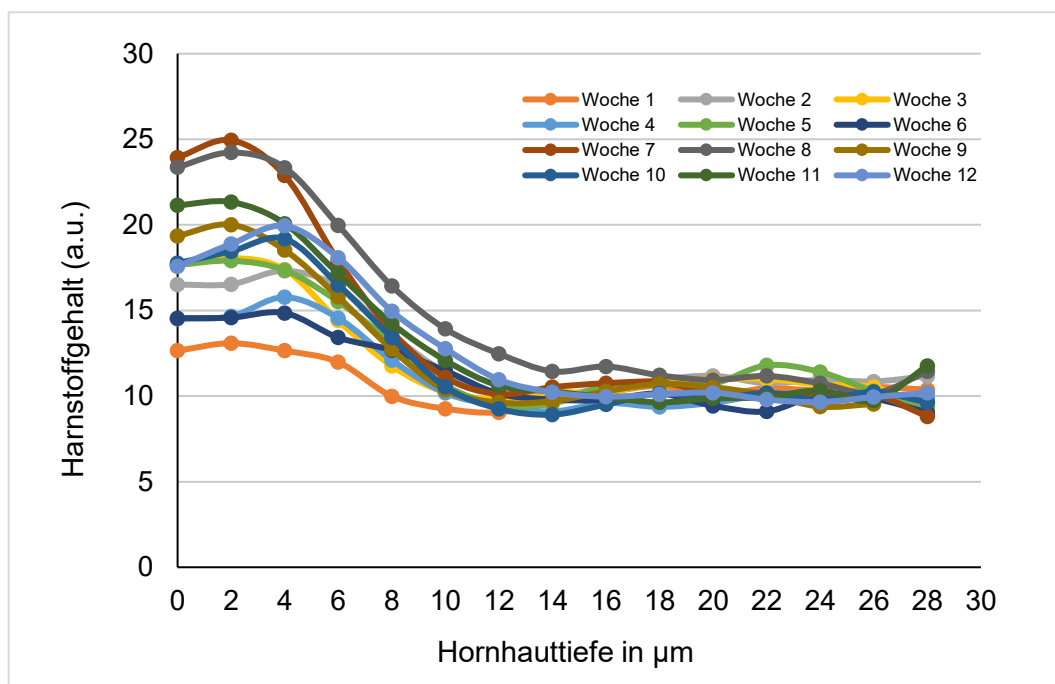


Abbildung 56: wochenweise Darstellung des Harnstoffgehaltes in Abhängigkeit von der Hornhauttiefe

4.1.1.2. HWVN-Spektren

Mit Hilfe des integrierten Fitting-Algorithmus konnte auch hier für jede Einzelmessung einer jeden Probandin wochenweise der Wassergehalt (in Massenprozent) erhoben werden. Aus den gemittelten Probandenwerten ($n = 3$)

bildete man wiederum den Mittelwert und die Standardabweichung für jede Woche. Anschließend wurden diese Werte wieder miteinander verglichen.

Wassergehalt

Die Auswertung der erhobenen Messwerte und der nachfolgende Vergleich der daraus resultierenden Mittelwerte lieferten 12 Wasserkonzentrationskurven, die exakt den in der Literatur beschriebenen Verlauf des Wassergehaltes in der Haut widerspiegeln [6, 36].

In einer Hornhauttiefe von 0 – 2 μm , also in Hautoberflächennähe, blieben die Werte zunächst konstant. Darauf folgte ein steiler Anstieg der Konzentrationen, bis sie bei etwa 20 μm Tiefe in eine Plateauphase übergingen und ein konstant bleibender Wassergehalt zwischen 65 – 70 % erreicht wurde (Abb. 57 und 58).

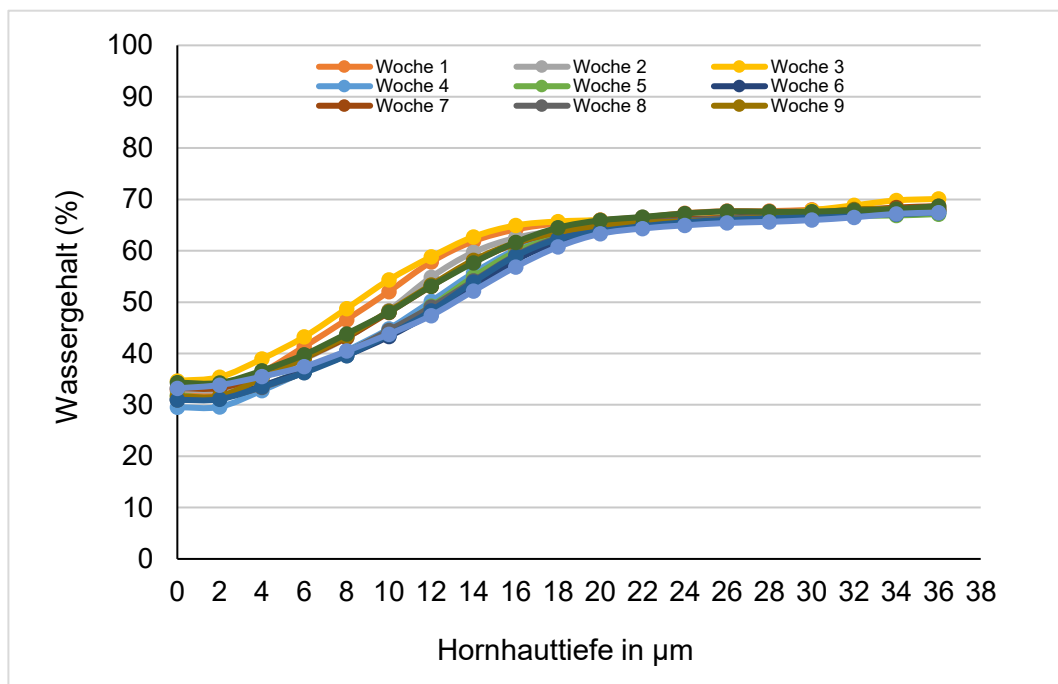


Abbildung 57: wochenweise Darstellung des Wassergehaltes in Abhängigkeit von der Hornhauttiefe

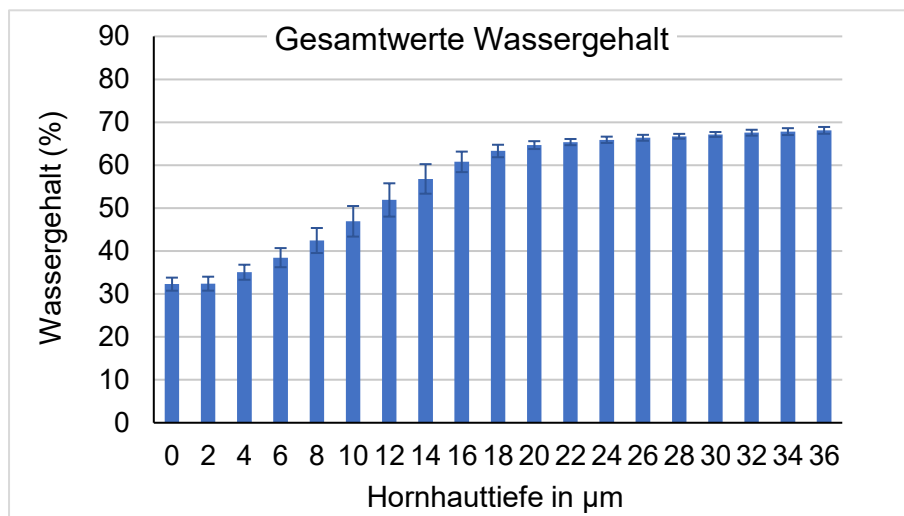


Abbildung 58: mittlerer Wassergehalt des gesamten Untersuchungszeitraumes aller Probandinnen mit Standardabweichung

Durch die Illustrierung des mittleren Wassergehaltes in den ersten 10 µm des Stratum corneum konnte nochmals bestätigt werden, dass über den gesamten Untersuchungszeitraum vergleichbare Wasserkonzentrationen ermittelt wurden. (Abb. 59).

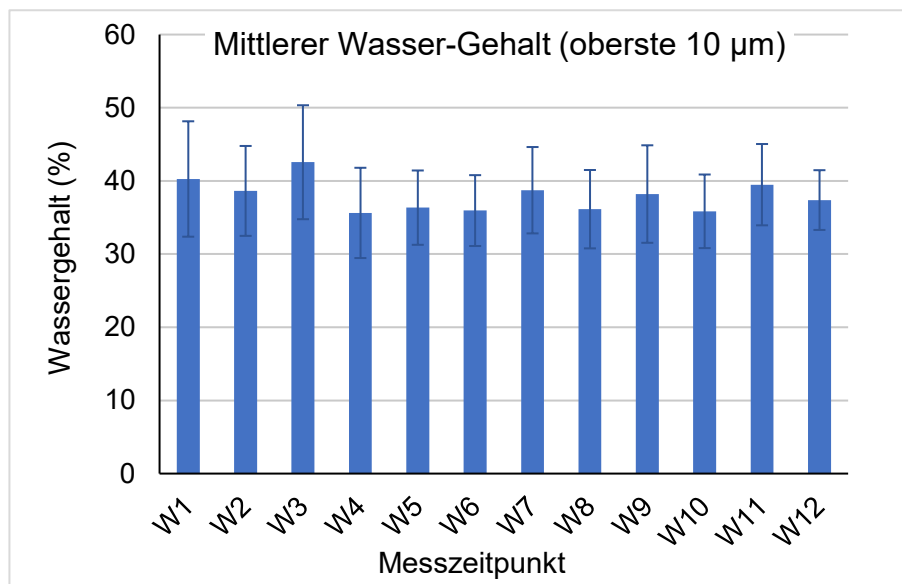


Abbildung 59: mittlerer Wassergehalt der obersten 10 µm

Bestimmung der Stratum corneum-Dicke

Wie bereits erwähnt können die erhobenen Wasserkonzentrationskurven auch zu Bestimmung der Stratum corneum-Dicke herangezogen werden. So wurde auch im

Rahmen dieser Arbeit aus dem wöchentlich gemessenen Wassergehalt eigenständig die entsprechende Stratum Corneum-Dicke mathematisch abgeleitet.

Über einen Untersuchungszeitraum von 12 Wochen konnte eine durchschnittliche Stratum corneum-Dicke von 18,07 μm berechnet werden. In Tabelle 10 und Abbildung 60 wurde die mathematisch abgeleitete SC-Dicke jeder Woche nochmals grafisch dargestellt und verglichen. Wie aus der Abbildung hervorgeht, konnten keine allzu großen Unterschiede zwischen den Werten verzeichnet werden.

	SC-Dicke (μm)		SC-Dicke (μm)
Woche 1	15,65 $\pm$ 2,95	Woche 7	17,50 $\pm$ 1,37
Woche 2	16,54 $\pm$ 1,96	Woche 8	19,20 $\pm$ 1,67
Woche 3	14,55 $\pm$ 0,56	Woche 9	17,12 $\pm$ 2,12
Woche 4	18,16 $\pm$ 1,03	Woche 10	19,43 $\pm$ 1,48
Woche 5	18,95 $\pm$ 2,09	Woche 11	18,59 $\pm$ 2,77
Woche 6	20,27 $\pm$ 1,51	Woche 12	20,83 $\pm$ 2,61

Tabelle 10: Ergebnisse der mathematischen Ableitung der SC-Dicke über den gesamten Untersuchungszeitraum gemittelt aus allen drei Probandinnen mit Standardabweichung

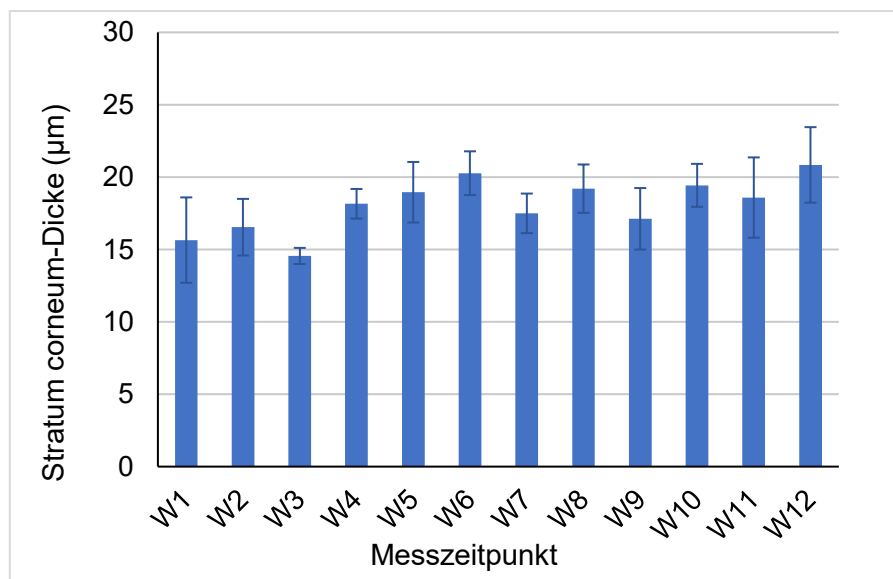


Abbildung 60: mathematisch abgeleitete SC-Dicke des gesamten Untersuchungszeitraumes gemittelt aus allen drei Probandinnen mit Standardabweichung

4.1.2. Einfluss der Jahreszeit

Mit Hilfe der biophysikalischen Messungen sollte über mehrere Monate beobachtet werden, ob sich jahreszeitenabhängig relevante Änderungen in den Hautparametern ergaben. Die Messbedingungen wurden hierbei möglichst konstant gehalten (Raumtemperatur: $25\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$, Luftfeuchtigkeit: $30\text{ \%} \pm 5\text{ \%}$).

4.1.2.1. Der Melanin- und Erythemindex

Für die Auswertung der mittels Mexameter® erhobenen Messwerte wurden zunächst der Mittelwert und die Standardabweichung aus den $n = 5$ Einzelmessungen jeder Probandin gebildet. Die resultierenden Werten ($n = 3$) wurden anschließend nochmals gemittelt, sodass man für jede Messwoche einen Mittelwert und eine Standardabweichung erhielt, die dann über den gesamten Untersuchungszeitraum hinweg verglichen wurden.

Dieser Art der Auswertung wurde auch für die Analyse der anderen Parameter (Permittivität, Haufeuchtigkeit, TEWL und pH) herangezogen.

Wie aus den Abbildungen 61 und 62 hervorgeht, zeigten sich im Wochenvergleich der Melanin- und Erythemindices größere Unterschiede.

Die Melaninwerte schwankten in den ersten sechs Wochen relativ stark, wobei in Woche 4 mit einem durchschnittlichen Gehalt von 127 das Maximum der gesamten 12 Wochen erreicht wurde. In Woche 7 – 10 hielt sich der Wert vorübergehend konstant auf 125, bis er in den letzten beiden Wochen nochmal unter 120 abfiel (Abb. 61).

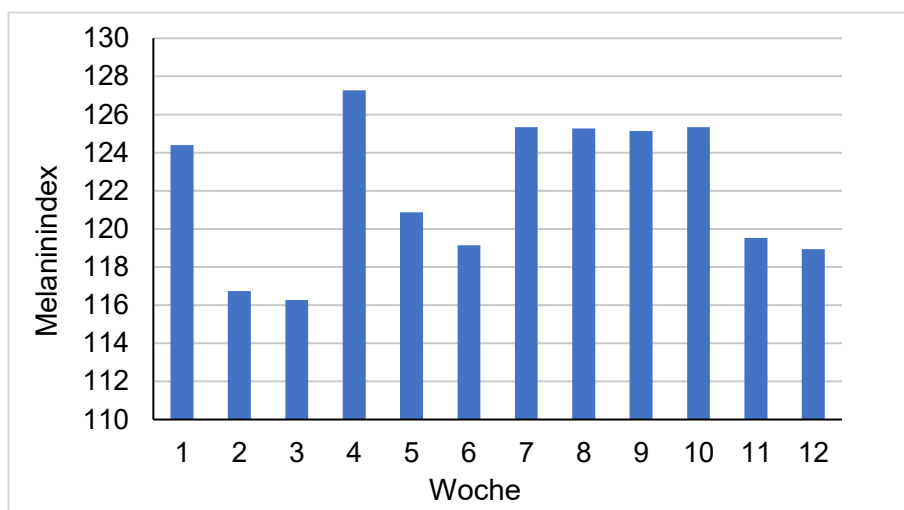


Abbildung 61: Wochenvergleich der durchschnittlichen Melaninindices der Probandinnen ($n=3$), aus optischen Gründen ohne Standardabweichung

Im Wochenvergleich der Erythemindices ließen sich noch größere Unterschiede beobachten. Über 12 Wochen hinweg zeigten sich Schwankungen zwischen einem durchschnittlichen Erythemgehalt von 165 (Woche 6) und 209 (Woche 4) (Abb. 62).

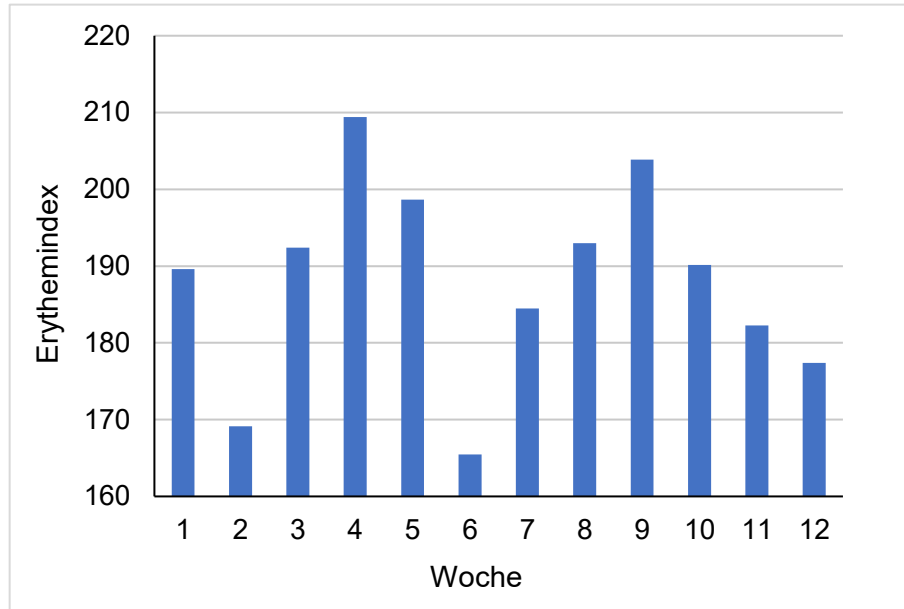


Abbildung 62: Wochenvergleich der durchschnittlichen Erythemindices der Probandinnen (n=3), aus optischen Gründen ohne Standardabweichung

Der durchschnittliche Melaniningehalt entspricht mit Werten zwischen 116 und 127 laut Hersteller dem Fototyp II und damit dem hellhäutigen Europäer (vgl. Tab. 3). Bei der Beurteilung des durchschnittlichen Erythemgehaltes (Werte zwischen 165 und 209) mit Hilfe der Richtwerte des Herstellers konnten im Rahmen dieser Untersuchungen keine bis minimale Erytheme beobachtet werden (vgl. Tab. 4).

Es wurde bei der Darstellung des Melanin- und Erythemindexes jeweils die Angabe der Standardabweichung vernachlässigt, da diese bei beiden Indices oft sehr hoch ausfiel und dadurch eine aussagekräftige Grafik nicht mehr möglich gewesen wäre. Aufgrund der beobachteten starken inter- und intraindividuellen Schwankungen kann daher zusammenfassend festgehalten werden, dass eine deutlich größere Anzahl and ProbandInnen notwendig ist, um aussagekräftige Daten in Studien zu erhalten.

4.1.2.2. Die Permittivität

Die Erhebung der Permittivität mit dem Biox Epsilon™ E100 Sensor lieferte im Vergleich zu den Melanin- und Erythemindices weniger schwankende Werte. Nichtsdestotrotz konnte auch hier eine Veränderung der Hauthydratation in

Abhängigkeit von dem Monat, in dem die Messung durchgeführt wurde, beobachtet werden.

Abbildung 63 spiegelt den Wochenvergleich der Permittivität wider. Wie zu erkennen ist, stieg der Wert im Laufe der 12 Wochen von 4,39 (Woche 1) auf 6,59 (Woche 12) an. Folglich schien die Haut Mitte März mehr unter Trockenheit zu leiden als Anfang Juni. Zu beachten war außerdem die Tatsache, dass Anfang Juni die Schweißproduktion aufgrund der steigenden Temperaturen deutlich aktiver war als im März (sichtbare weiße Punkte am Sensorimage signalisierten aktive Schweißdrüsen).

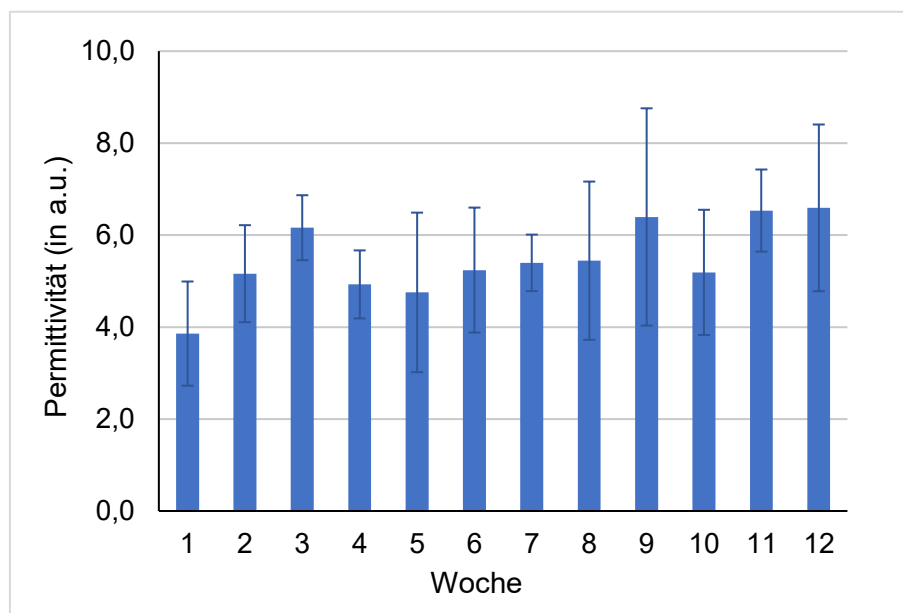


Abbildung 63: Wochenvergleich der durchschnittlichen Permittivität

Wie in der Abbildung anhand der Standardabweichung zu sehen ist, unterlagen die Werte der einzelnen Probandinnen in manchen Wochen einer etwas größeren Streuung. Auch hier kann man schlussfolgern, dass eine größere Anzahl an ProbandInnen empfehlenswert wäre.

4.1.2.3. Die Hautfeuchtigkeit

Die Beobachtungen der Permittivitäts-Messungen konnten durch die Messung der Hautfeuchtigkeit mit Hilfe des Corneometer® bestätigt werden. Auch hier zeichnete sich eine Zunahme der Hautfeuchtigkeit vom Messbeginn im März bis zum Messende im Juni ab (Abb. 64).

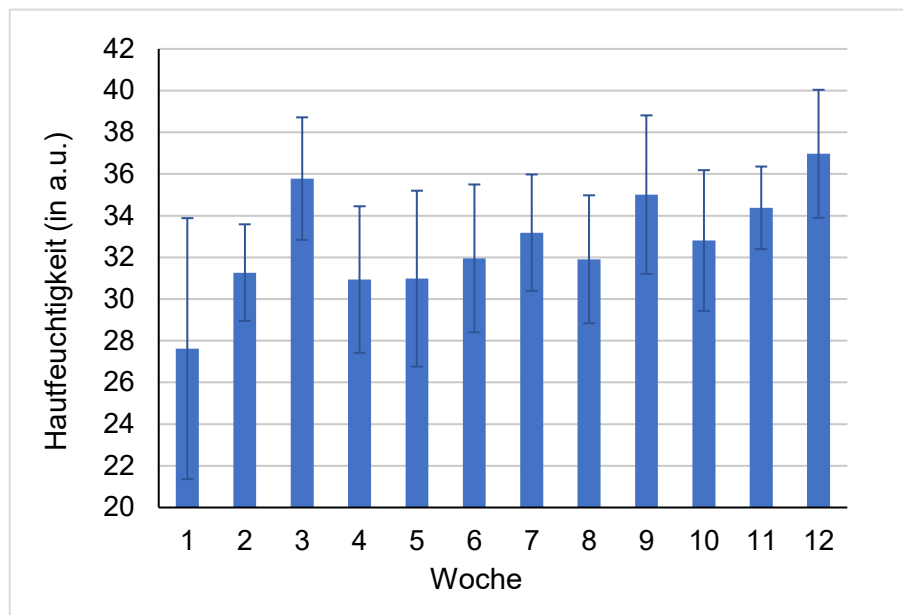


Abbildung 64: Wochenvergleich der durchschnittlichen Hautfeuchtigkeit

4.1.2.4. Der TEWL

Bei der Erhebung des transepidermalen Wasserverlustes konnten den gesamten Untersuchungszeitraum über grundsätzlich vergleichbare Werte festgestellt werden. Doch auch hier ließ sich ein leichter Trend in Bezug auf eine Steigerung des TEWL in Abhängigkeit vom Monat, in dem gemessen wurde, beobachten. Mit Ausnahme von Woche 3 und Woche 9 konnten durchwegs TEWL-Werte zwischen 6 und 8 g/m²/h gemessen werden. Basierend auf Erfahrungswerten handelte es sich bei diesen Ergebnissen um Werte, die im niedrigeren bis normalen Bereich einzuordnen waren und auf eine intakte Hautbarriere aller Probandinnen hinwiesen (Abb. 65).

Da die Ergebnisse keinen größeren Schwankungen unterlagen konnte zudem angenommen werden, dass die Messbedingungen über den gesamten Untersuchungszeitraum relativ konstant waren.

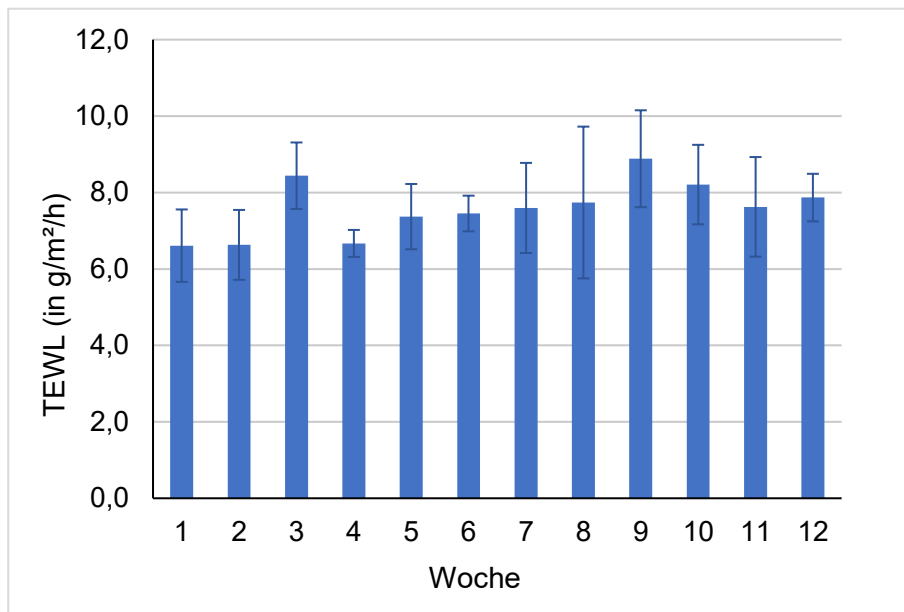


Abbildung 65: Wochenvergleich der durchschnittlichen TEWL-Werte

4.1.2.5. Der pH-Wert

Der Haut-pH, der mit Hilfe des Skin-pH-Meter® erhoben wurde, blieb über den gesamten Untersuchungszeitraum hinweg relativ konstant und war kaum Schwankungen ausgesetzt. Es konnten Werte zwischen 5,23 und 6,14 gemessen werden. Damit lag er laut Hersteller im normalen bis hohen Bereich (vgl. Tab. 2). Da sich aber die Mehrheit der Werte im Bereich unter 5,7 befanden, entsprachen die Ergebnisse den im User Manual angegebenen Wert (ca. 5,5 bei Frauen) [57] (Abb. 66).

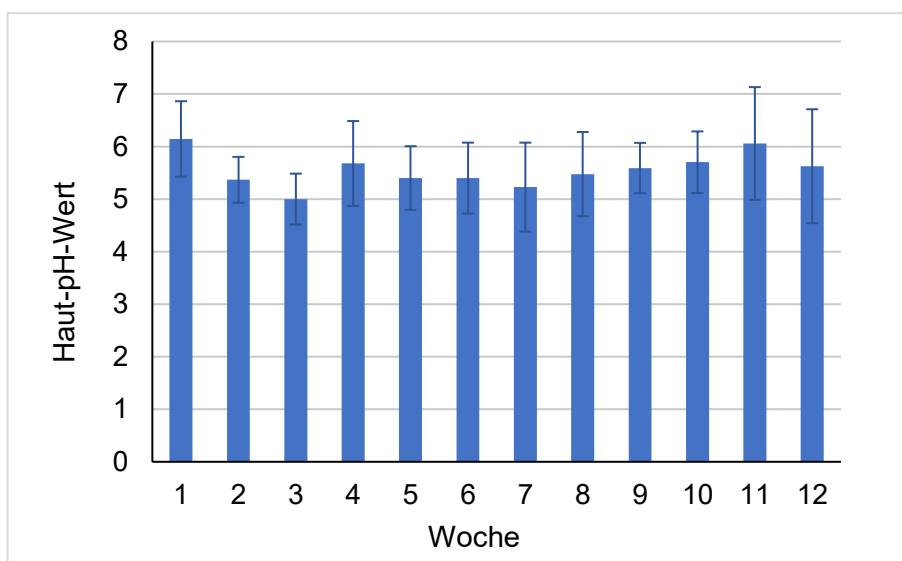


Abbildung 66: Wochenvergleich der durchschnittlichen Haut-pH-Werte

4.1.3. Ausschlusskriterien und Zufallsbeobachtungen

Eine Probandin unterzog sich vor bzw. während des Messzeitraumes einer kosmetischen Laserbehandlung zur Haarentfernung (genaue Parameter nicht näher bekannt). Die Probandin wurde daher von der allgemeinen Auswertung ausgeschlossen. Ihre Messergebnisse wurden jedoch trotzdem zu Vergleichszwecken mitverfolgt.

4.2. Untersuchung porziner Haut

4.2.1. Behandelte Ohren

Eine Charge Schweineohren wurde zwar im frischen Zustand geliefert, die Ohren wurden aber zuvor einer Hygienebehandlung unterzogen (mechanische Abrasion, Hitze). Die Durchführung der spektroskopischen Messungen gestalteten sich bereits zu Beginn schwierig, da kein zufriedenstellender Kontakt zum Messfenster hergestellt werden konnte. Die Ergebnisse waren in diesem Fall nicht aussagekräftig.

Um dies zu veranschaulichen wurden in einem Diagramm die Wasserkonzentrationskurven der behandelten ($n = 1$) und unbehandelten ($n = 3$) Ohren gegenübergestellt. Die Messungen wurden jeweils direkt am Tag der Lieferung durchgeführt (Abb. 67).

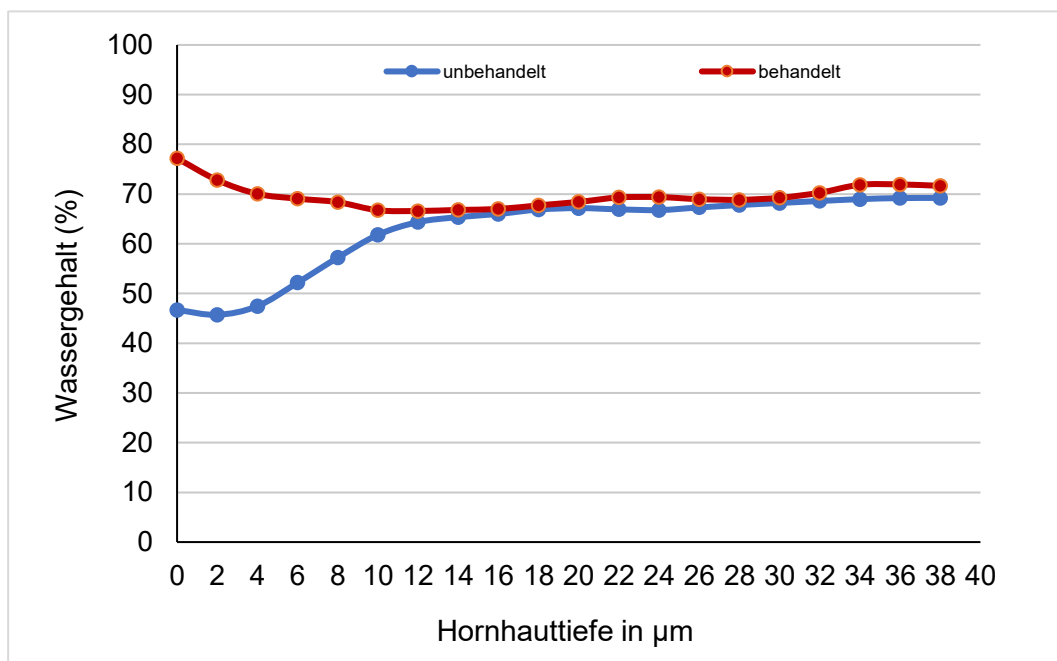


Abbildung 67: Vergleich der Wasserkonzentrationskurven behandelter und unbehandelter Ohren in Abhängigkeit von der Hornhauttiefe

Abbildung 67 zeigt, dass sich die Wasserkonzentrationskurve des behandelten Ohres (rot) deutlich von der der unbehandelten Ohren (blau) unterschied. Während die blaue Kurve dem typischen Verlauf (Plateauphase – Anstieg – Plateauphase) des Wassergehaltes im Stratum corneum entsprach, ging die rote Kurve zwar auch bei einer Hornhauttiefe von 12 μm in einer Plateauphase über, jedoch war der Wassergehalt davor auf höherem Niveau und es war eine leichte, uncharakteristische Abnahme des Wassergehaltes zu sehen. Folglich schien sich die Vermutung, dass diese Ohren einer Hygienebehandlung unterzogen worden waren, zu bestätigen – es liegt der Verdacht nahe, dass das Stratum corneum weitgehend entfernt wurde und die beobachtete Messkurve quasi im Bereich des höheren Wassergehalts der lebenden Epidermis startete.

In sämtlichen weiteren Versuchen wurden unbehandelte Schweineohren direkt nach der Schlachtung und der Abtrennung vom Tier vermessen; jegliche weitere Behandlung im Schlachthof wurde vermieden.

4.2.2. Unbehandelte Ohren

Um den Effekt der Lagerung im Kühlschrank (4 – 8 °C) und im Tiefkühlschrank (-18 °C) auf relevante Hautparameter zu untersuchen, wurden Vergleichsmessungen mit entsprechend gelagerten frischen Ohren nach verschiedenen Zeiträumen durchgeführt (vgl. Tab. 8). Nachfolgend werden die Ergebnisse dieser Messungen präsentiert.

4.2.2.1. Fingerprint-Spektren

Die Auswertung der erhobenen bzw. mit Hilfe des integrierten Fitting-Algorithmus generierten Messwerte erfolgte nach demselben Prinzip wie bei der Humanhautstudie. Anschließend wurden die für jeden Messzeitpunkt (0 h, 24 h, 48 h, 1, 4 und 8 Wochen) und jeden Parameter ermittelten Mittelwerte wieder zueinander in Relation gesetzt.

Ceramide

Bei der Betrachtung der Ceramidkonzentrationskurven der unter verschiedenen Bedingungen gelagerten und nach unterschiedlichen Zeiträumen vermessenen Ohren konnten keine allzu großen Unterschiede festgestellt werden. Außer einer

leichten vertikalen Verschiebung der Kurven entlang der y-Achse war ein gleichbleibender Trend im Kurvenverlauf sichtbar.

In den ersten Messtiefen nahe der Hautoberfläche (0 – 2 μm) konnten sehr ähnliche und gleichzeitig auch die höchsten Ceramidgehalte verzeichnet werden, die dann mit zunehmender Hornhauttiefe kontinuierlich abnahmen (Abb. 68).

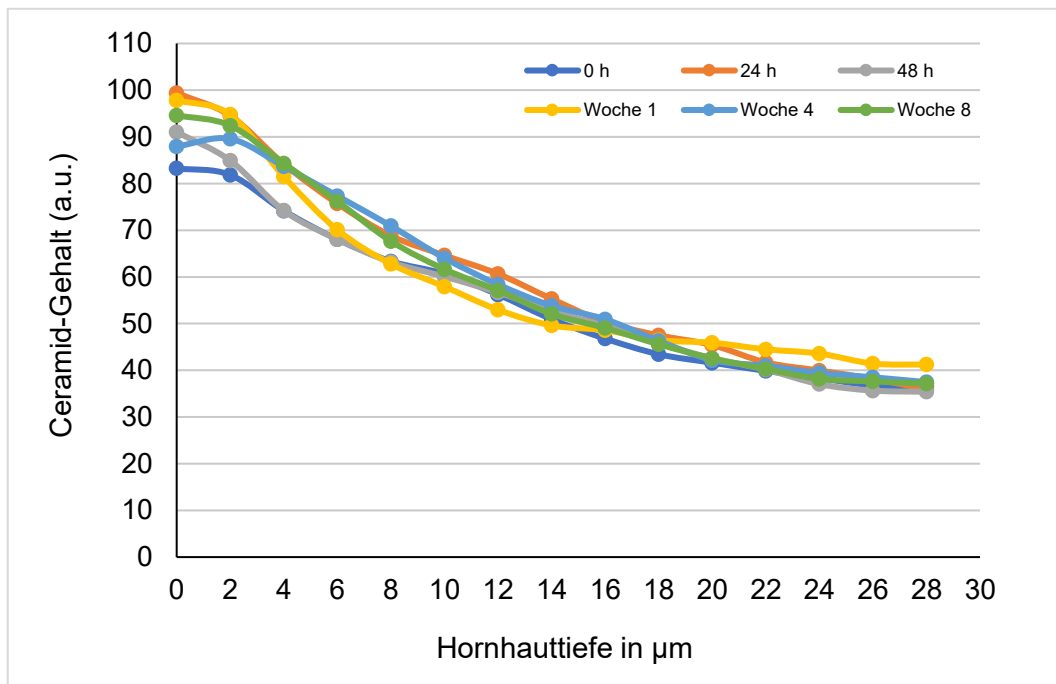


Abbildung 68: Vergleich der Ceramidkonzentrationen in Abhängigkeit von den Messzeitpunkten, der Lagerung und der Hornhauttiefe

Beim Vergleich des mittleren Ceramidgehaltes in den ersten 10 μm der Hornhaut, zeigte sich, dass am Tag der Lieferung (0 h) und nach 24 h die niedrigsten (0 h) und höchsten (24 h) Konzentrationen gemessen wurden. Insgesamt schienen die unterschiedlichen Lagerbedingungen und -zeiträume aber keinen großen Einfluss auf den Ceramidgehalt im Stratum corneum zu haben (Abb. 69).

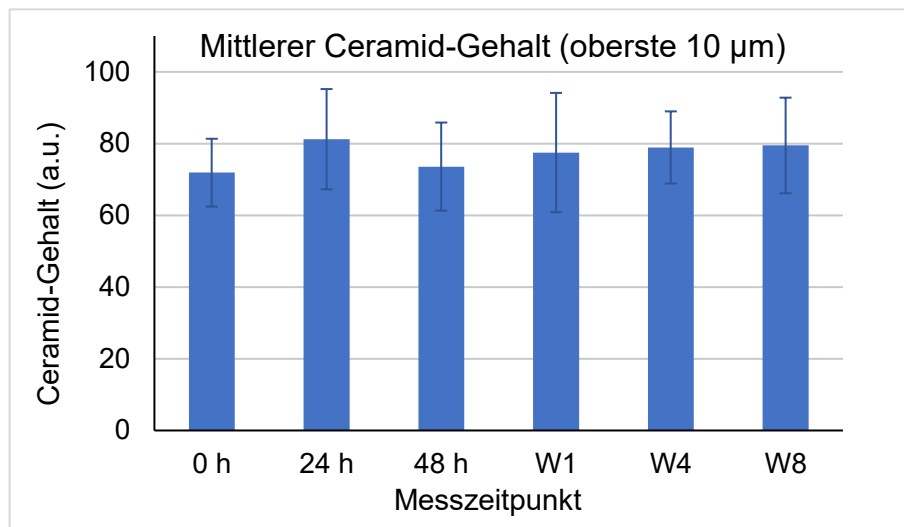


Abbildung 69: mittlerer Ceramid-Gehalt der obersten 10 µm

Cholesterin

Beim Vergleich der Cholesterinkonzentration wich eine Konzentrationskurve von den anderen ab. Während die Gehaltskurven zu den übrigen Messzeitpunkten vergleichbare Verläufe zeigten resultierten aus den Messungen, die nach 24 h und einer Lagerung im Kühlschrank erhoben wurden, etwas abweichende Werte. Die Schwankungen bezogen sich dabei insbesondere auf die ersten 0 – 6 µm des Tiefenprofils. In diesem Abschnitt lag der Gehalt etwa 0,02 a. u. über dem Rest. Danach überschnitten sich die Werte wieder mit den anderen Konzentrationen (Abb. 70).

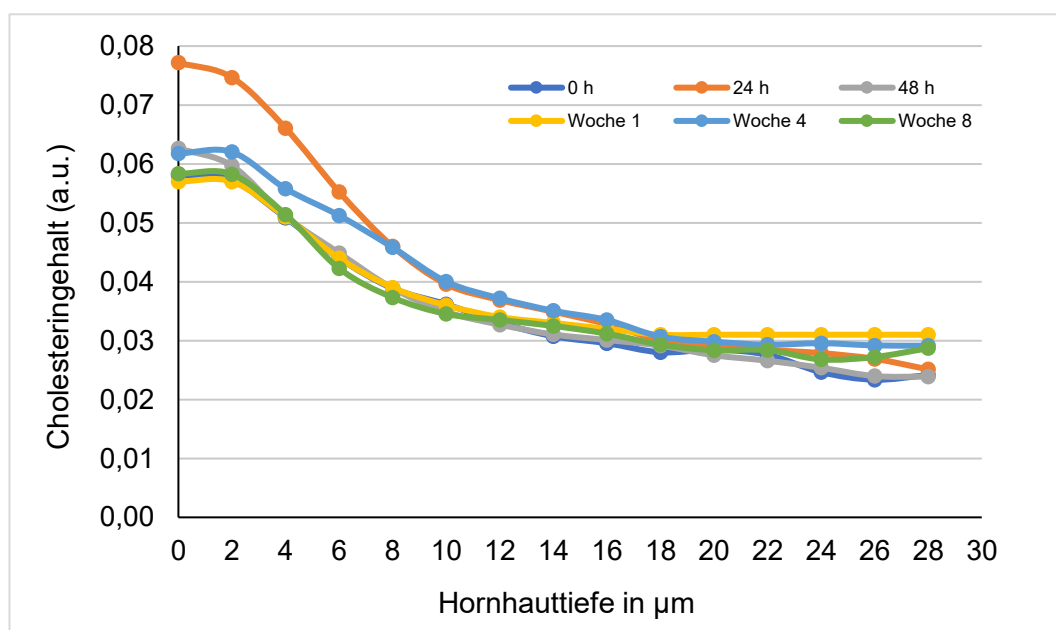


Abbildung 70: Vergleich der Cholesterinkonzentrationen in Abhängigkeit von den Messzeitpunkten, der Lagerung und der Hornhauttiefe

Prinzipiell konnte an der Hautoberfläche (0 – 2 μm Tiefe) der höchste Cholesteringehalt verzeichnet werden. In diesem Bereich blieb die Konzentration zudem annähernd konstant, fiel dann ab und pendelte sich schließlich bei einer Tiefe von 18 μm um Werte zwischen 0,02 und 0,03 u.a. ein.

Keratin

Die Messungen des Keratingehaltes lieferten Konzentrationskurven, die durch einen relativ vergleichbaren Verlauf gekennzeichnet waren. Zunächst stieg der Gehalt steil an, bis bei einer Tiefe von 4 μm der Konzentrationspeak erreicht wurde. Danach fiel der Gehalt ab und näherte sich mit zunehmender Hornhauttiefe einer Plateauphase an. Bei den Konzentrationskurven der Messungen nach 0 h und 24 h konnte im Vergleich zu den anderen Kurven ein deutlich höherer Konzentrationspeak sowie ein steilerer Abfall des Gehaltes beobachtet werden (Abb. 71)

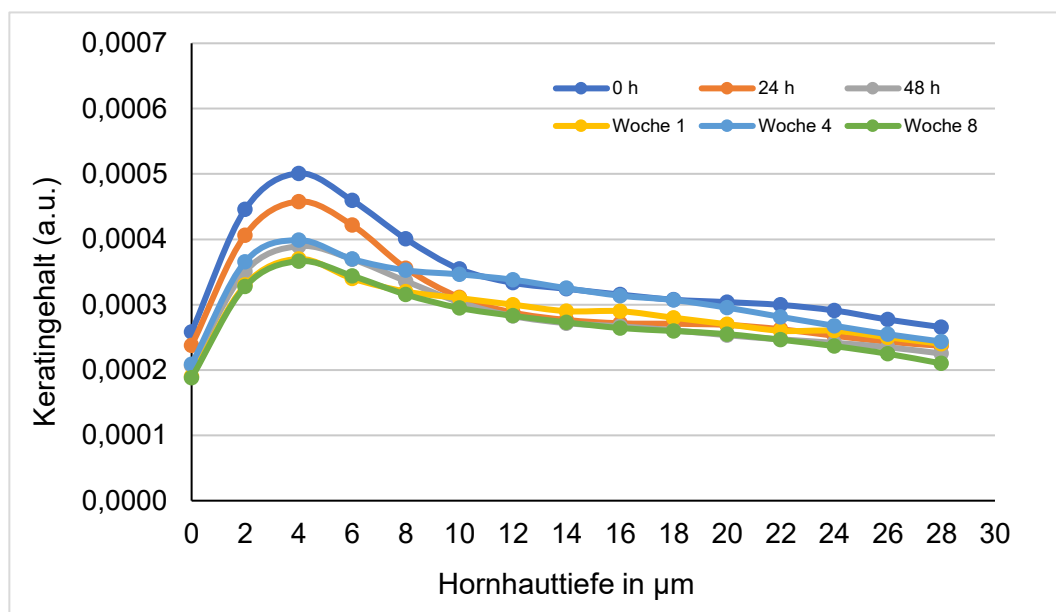


Abbildung 71: Vergleich der Keratinkonzentrationen in Abhängigkeit von den Messzeitpunkten, der Lagerung und der Hornhauttiefe

Bei der Betrachtung des mittleren Keratingehaltes in den ersten 10 μm der Haut zeichnete sich ein leichter Trend ab. Wie in Abbildung 72 dargestellt ist, nahm der Keratingehalt in Abhängigkeit vom Lagerungszeitraum kontinuierlich ab.

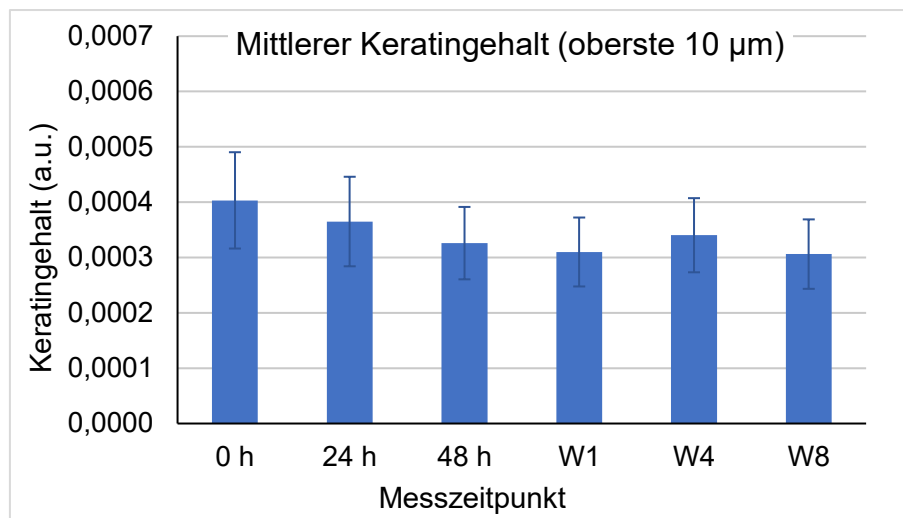


Abbildung 72: mittlerer Keratingehalt der obersten 10 µm

Nach vier Wochen stieg die mittlere Keratinkonzentration zwar nochmal etwas an; prinzipiell lässt sich aber die Vermutung aufstellen, dass der Keratingehalt in den obersten 10 µm leicht abnimmt, je länger die Ohren im Kühlschrank bzw Tiefkühlschrank gelagert werden.

NMF

Im Gegensatz zu den bereits diskutierten Parametern konnte beim Vergleich der erhobenen NMF-Konzentrationen erstmals ein deutlicher Unterschied zwischen den im Kühlschrank gelagerten Ohren und jenen, die tiefgekühlt wurden, festgestellt werden. Die gekühlten Ohren unterschieden sich von den eingefrorenen vor allem in den ersten 4 µm des Tiefenprofils. In diesem Bereich, in dem die Konzentrationen generell das Maximum erreichten, war der NMF-Gehalt der im Kühlschrank gelagerten Proben teilweise sogar doppelt so hoch wie jener der eingefrorenen. Anschließend gingen die Konzentrationen aller Proben in eine vergleichbare Plateauphase über und pendelten sich um einen Wert von 0,02 a.u. ein (Abb. 73).

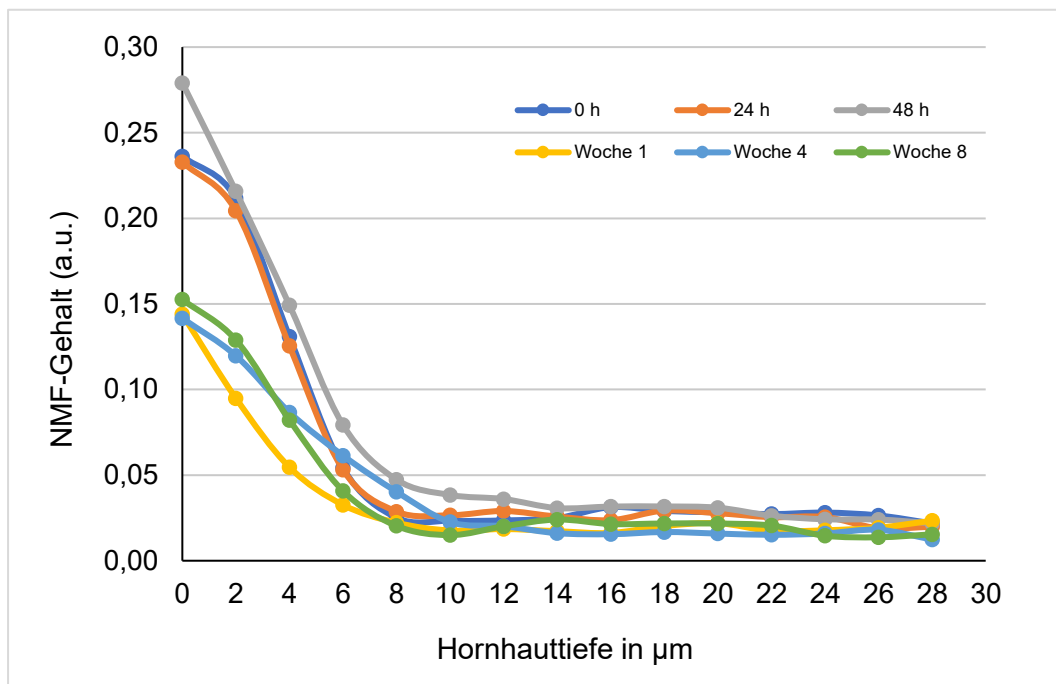


Abbildung 73: Vergleich der NMF-Konzentrationen in Abhängigkeit von den Messzeitpunkten, der Lagerung und der Hornhauttiefe

Diese Beobachtung konnte auch durch die grafische Darstellung der mittleren NMF-Konzentration in den ersten 10 μm des Tiefenprofils bestätigt werden (Abb. 74).

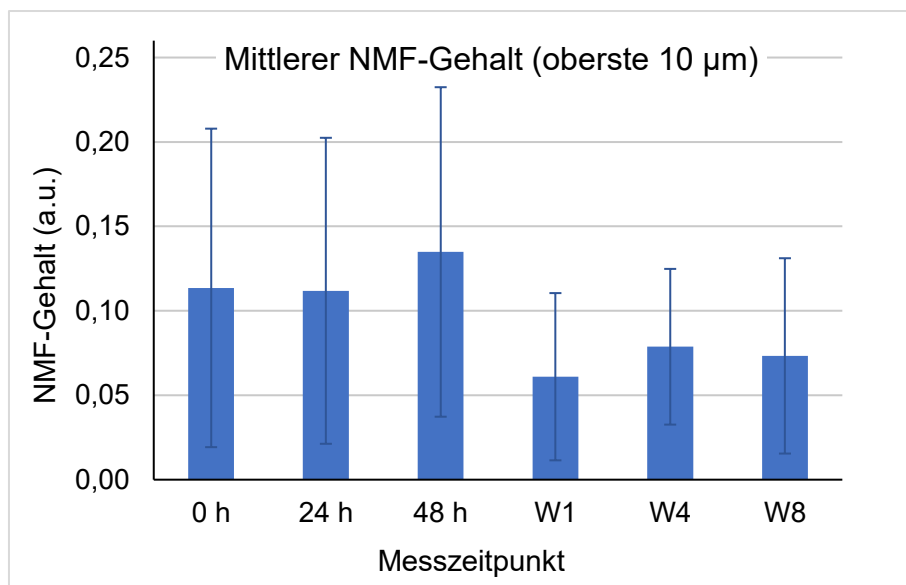


Abbildung 74: mittlerer NMF-Gehalt der obersten 10 μm

Harnstoff

Die Konzentrationskurven des Harnstoffs waren in den ersten Hauttiefen (0 – 2 μm) durch einen Abfall gekennzeichnet. Darauf folgte bis etwa 12 μm Tiefe ein Anstieg,

bis der Gehalt schließlich eine Plateauphase erreichte und sich um eine Konzentration von 10 a.u. einpendelte.

Obwohl aus den Messungen, die an eingefrorenen Ohren nach einer Woche durchgeführt wurden, etwas höher Werte resultierten, konnten insgesamt zu jedem Messzeitpunkt vergleichbare Harnstoffkonzentrationen erhoben werden (Abb. 75).

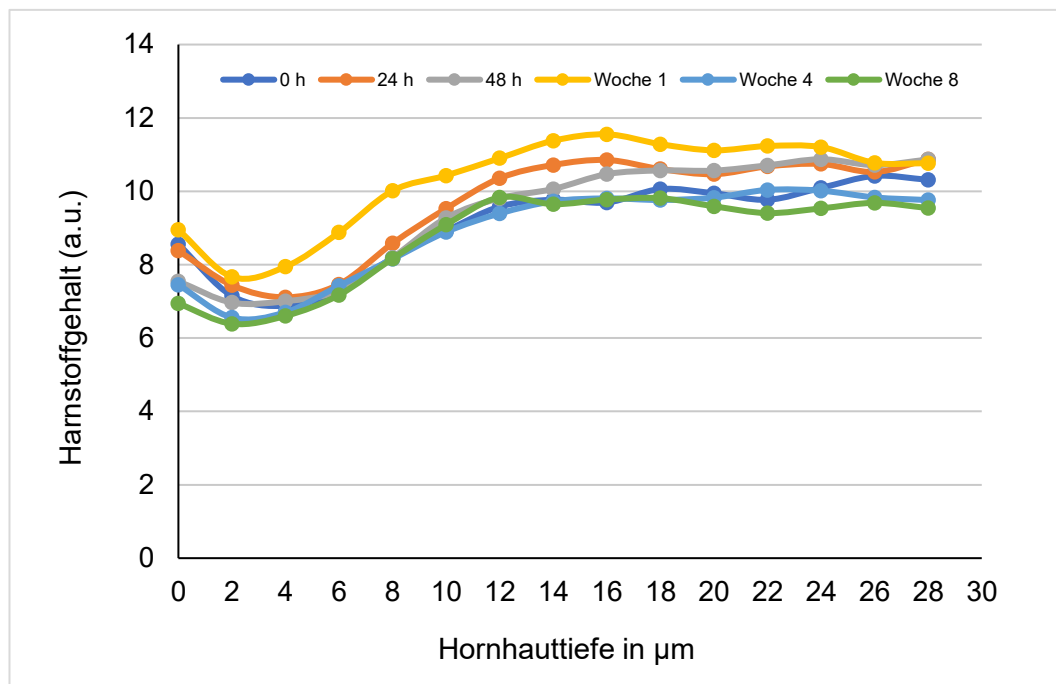


Abbildung 75: Vergleich der Harnstoffkonzentrationen in Abhängigkeit von den Messzeitpunkten, der Lagerung und der Hornhauttiefe

4.2.2.2. HWVN-Spektren

Für die Auswertung des Wassergehaltes der nach unterschiedlichen Lagerbedingungen und -zeiträumen gemessenen Ohren wurden mit Hilfe des Fitting-Algorithmus die Mittelwerte der Einzelmessungen eines jeden Ohres generiert. Diese Werte, die von $n = 3 - 4$ Ohren stammten, wurden erneut gemittelt und in Abhängigkeit vom Messzeitpunkt (0 h, 24 h, 48 h, 1, 4 und 8 Wochen) verglichen.

Wassergehalt

In Bezug auf den Wassergehalt konnten zu jedem Messzeitpunkt vergleichbare Konzentrationskurven erhoben werden. Der Kurvenverlauf war durch einen kaum erkennbaren Abfall in den ersten Messtiefen ($0 - 2 \mu\text{m}$), gefolgt von einem leichten Anstieg und einer abschließenden Plateauphase ab einer Tiefe von $14 - 16 \mu\text{m}$, gekennzeichnet (Abb. 76).

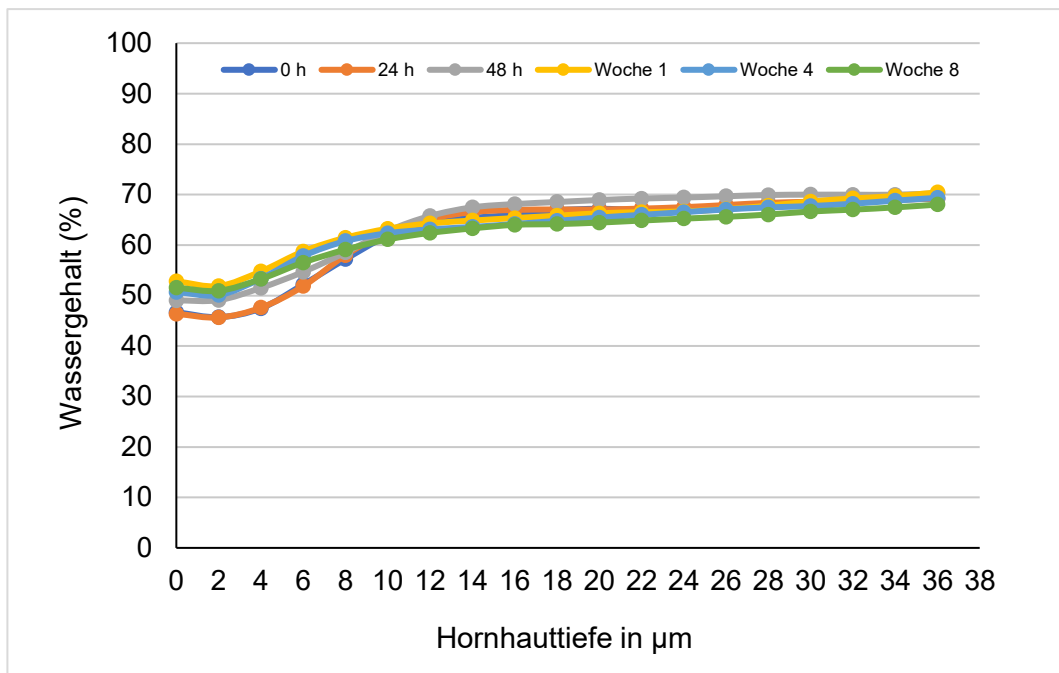


Abbildung 76: Vergleich des Wassergehaltes in Abhängigkeit von den Messzeitpunkten, der Lagerung und der Hornhauttiefe

Trotz der sehr ähnlichen Konzentrationskurven konnte bei näherer Betrachtung des mittleren Wassergehaltes in den ersten 10 μm ein leichter Unterschied beobachtet werden. So schien der Wassergehalt bei den Proben, die im Tiefkühlschrank gelagert wurden, etwas angestiegen zu sein (Abb. 77)

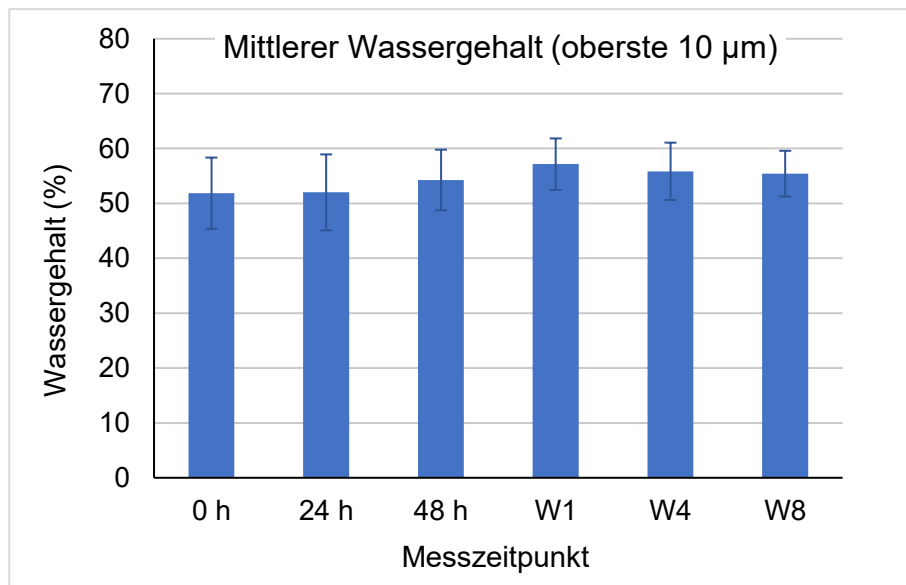


Abbildung 77: mittlerer Wassergehalt der obersten 10 μm

4.2.2.3. Biophysikalische Parameter

Um den Effekt der Lagerung im Kühlschrank bzw. im Tiefkühlschrank zu untersuchen wurden neben der Raman-Spektroskopie auch die biophysikalischen Sonden für die Messungen herangezogen. Nachfolgend werden die Ergebnisse dieser Messungen dargestellt.

Der Melanin- und Erythemindex

Die Einzelmessungen zur Erhebung des Melanin- bzw. Erythemindexes mit Hilfe des Mexameter® lieferten für beide Parameter durchwegs negative Werte. Die Ergebnisse der Messungen waren in diesem Fall nicht aussagekräftig.

Basierend auf der Tatsache, dass es sich bei den Proben um Haut von toten Tieren handelte, stellte man die Vermutung auf, dass sich der nicht messbare Erythemgehalt auf die damit verbundene fehlende Durchblutung zurückführen lässt.

Hinsichtlich des nicht messbaren Melaningehaltes versuchte man anhand einer Literaturrecherche herauszufinden, ob Melanin als Pigment in der Schweinehaut zu finden ist. Als Resultat dieser Recherche ergab sich die Annahme, dass es natürlich pigmentierte Rassen von Schweinen gibt. In diesem Fall dürfte es sich jedoch um eine Rasse gehandelt haben, die kaum eine natürliche Melaninpigmentation aufwies [81-82].

Die Hautfeuchtigkeit

Die Erhebung der Hautfeuchtigkeit mit Hilfe des Corneometer® lieferte stark schwankende Werte, die extremen Streuungen unterlagen, wie auch anhand der Standarabweichung zu sehen war. Wie aus der Abbildung 78 entnommen werden kann wiesen die frisch vermessenen (0 h) sowie die nach einer Woche im Tiefkühlschrank vermessenen Proben mit Werten um 45 a.u. die höchste Hautfeuchtigkeit auf. Im Gegensatz dazu wurden nach vier und acht Wochen im Tiefkühlschrank die niedrigsten Werte gemessen (33 a.u.). Laut Hersteller kann die Haut mit einem Wert von 33 als trocken und mit einem Wert von 45 als ausreichend feucht beurteilt werden (vgl. Tab. 1). Daraus lässt sich die Annahme ableiten, dass möglicherweise die längerfristige Lagerung im tiefgefrorenen Zustand eine Austrocknung der Haut bewirken kann. Zur Abklärung sind jedoch weitere Messungen notwendig.

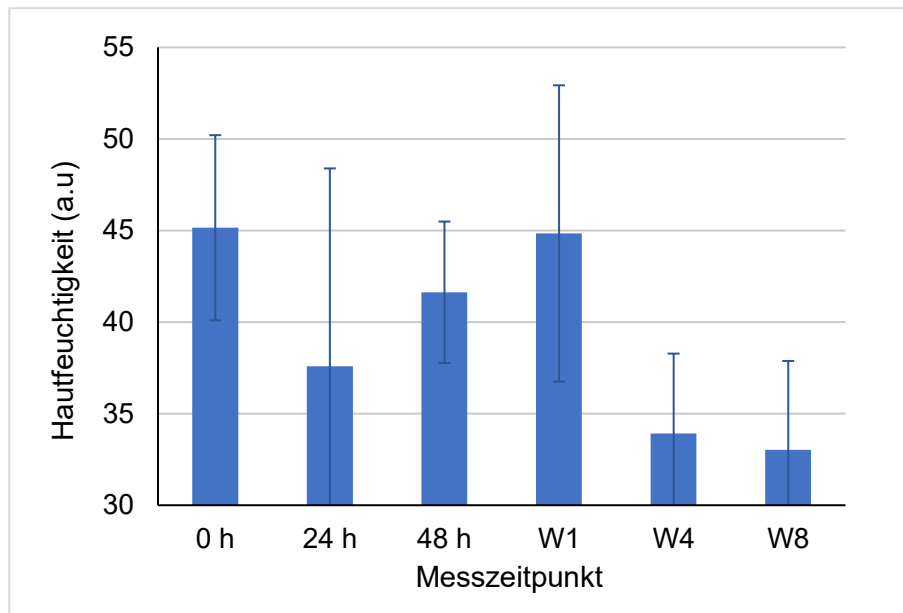


Abbildung 78: Vergleich der Hautfeuchtigkeit in Abhängigkeit von den Messzeitpunkten und der Lagerung

Der TEWL

Aus den Ergebnissen der TEWL-Messungen mit dem Biox AquaFlux™ konnten vergleichbare Werte erhoben werden, wobei der TEWL bei den eingefrorenen Ohren etwas höher ausfiel. Wie in der Abbildung 79 zu sehen ist, waren die Standardabweichungen nach 48 h sowie nach acht Wochen wieder erhöht, was bedeutete, dass es auch hier zu einer breiteren Streuung der Messwerten kam.

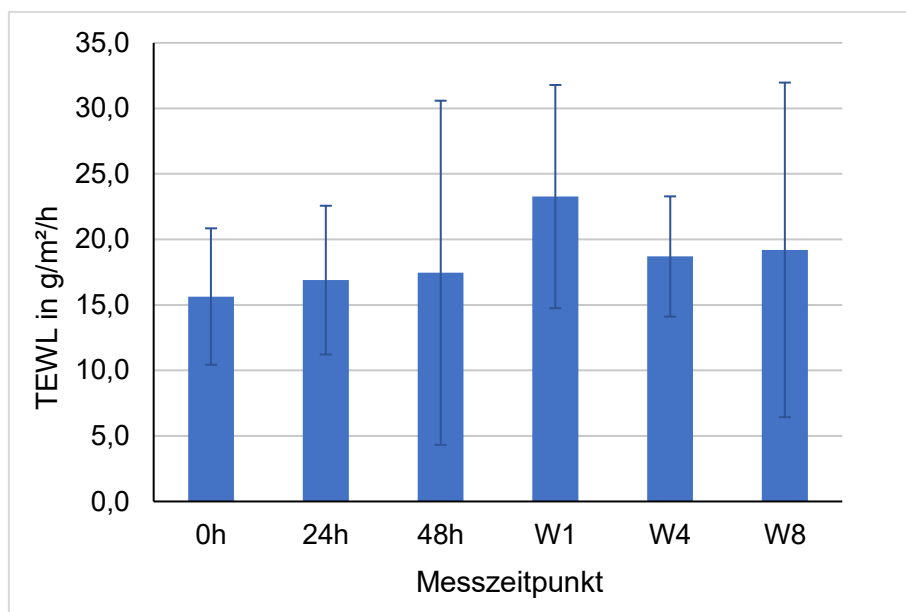


Abbildung 79: Vergleich der TEWL-Werte in Abhängigkeit von den Messzeitpunkten und der Lagerung

Insgesamt entsprachen die gewonnenen TEWL-Werte mit einem durchschnittlichen Wert von $18,43 \pm 2,65 \text{ g/m}^2/\text{h}$ jenen, die in der Literatur für intakte porcine Haut des dorsalen Ohres gefunden wurden [83]. Basierend darauf konnte auch davon ausgegangen werden, dass alle Proben eine intakte Hautbarriere besaßen.

Der pH-Wert

Mit Hilfe des Skin-pH-Meter® konnten zu jedem Messzeitpunkt kaum schwankende und gut vergleichbare Haut-pH-Werte ermittelt werden. Mit Werten zwischen 7,5 und 7,8 lag der pH-Wert der Ohren im schwach alkalischen Bereich (Abb. 80).

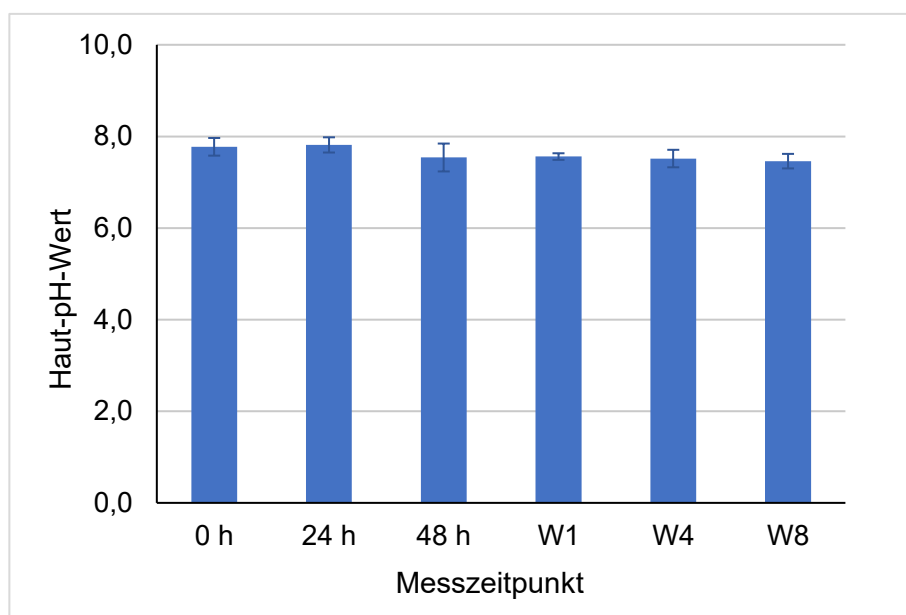


Abbildung 80: Vergleich der Haut-pH-Werte in Abhängigkeit von den Messzeitpunkten und der Lagerung

4.2.3. Einfluss von Sonnenlicht auf porcine Haut

Um den Einfluss von Sonnenlicht auf die relevanten Hautparameter zu untersuchen, wurden $n = 3$ unbehandelte, eingefrorene Ohren mit Hilfe des Sol 500 bestrahlt und anschließend vermessen. Als Kontrolle wurden wiederum $n = 3$ unbehandelte, eingefrorene Schweineohren aufgetaut und ident vorbereitet, aber vor dem Vermessen nicht bestrahlt.

4.2.3.1. Fingerprint-Spektren

Ceramide

Bei der Gegenüberstellung der Ceramidkonzentrationskurven von den unbestrahlten Ohren (Kontrolle) und den bestrahlten Ohren direkt nach der Bestrahlung (0 h) konnten kaum Unterschiede festgestellt werden. Beide Kurven zeigten einen ähnlichen Verlauf. Der Ceramidgehalt der bestrahlten Ohren direkt nach der Bestrahlung lag zu Beginn (0 μm) um etwa 15 a.u. und in den letzten Messtiefen (24 – 28 μm) um etwa 10 a.u. tiefer als jener der unbestrahlten Ohren.

Auffallend war, dass sich die Ceramidkonzentrationen der bestrahlten Ohren 24 h nach der Bestrahlung zu Beginn (0 μm) sowie in den letzten Messtiefen (24 – 28 μm) kaum von denen der unbestrahlten Ohren unterschieden. Im Vergleich dazu waren sie in den mittleren Messtiefen (2 – 22 μm) durch einen erhöhten Ceramidgehalt gekennzeichnet (Abb. 81).

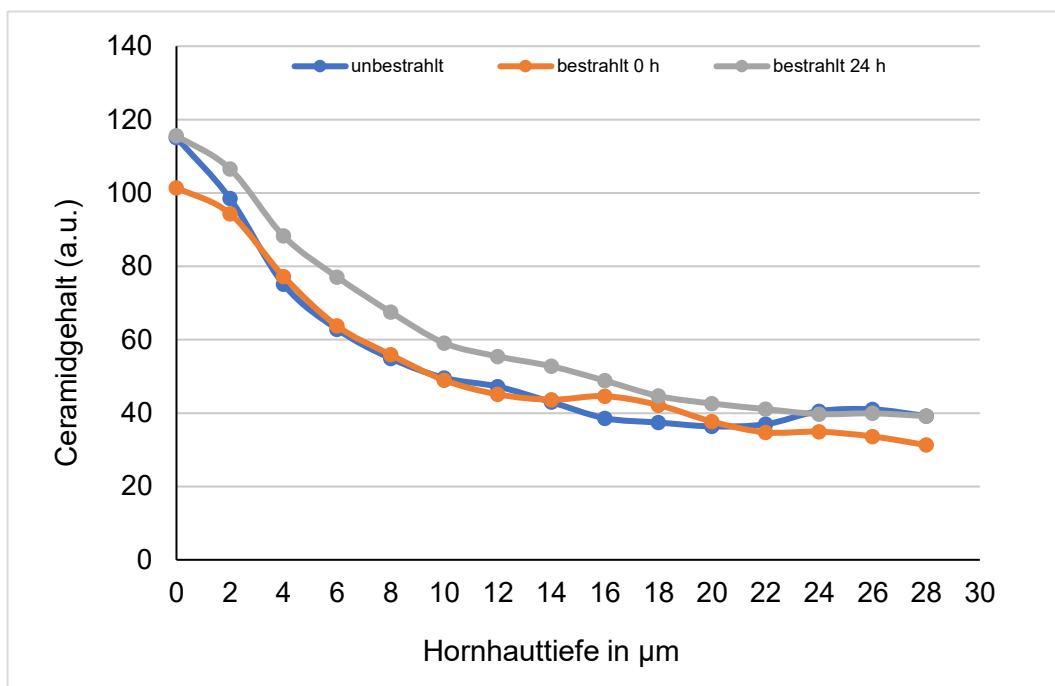


Abbildung 81: Vergleich der Ceramidkonzentrationen von unbestrahlten und bestrahlten (0 h, 24 h) Ohren in Abhängigkeit von der Hornhauttiefe

Der Anstieg der Ceramidkonzentration bei den bestrahlten Ohren nach einer 24-stündigen Lagerung im Kühlschrank konnte auch durch eine Gegenüberstellung der Konzentrationen in den ersten 10 μm des Stratum corneum gezeigt werden (Abb. 82).

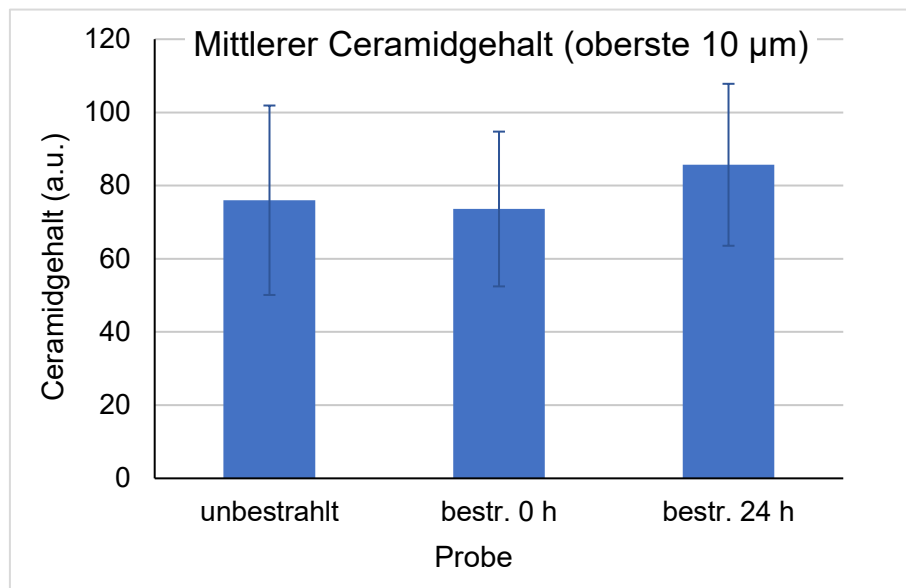


Abbildung 82: mittlerer Ceramidgehalt der obersten 10 µm im Vergleich

Cholesterin

Ähnliches konnte auch beim Vergleich der Cholesterinkonzentrationskurven beobachtet werden. Während sich der Cholesteringehalt der bestrahlten Ohren direkt nach der Bestrahlung (0 h) in Hautoberflächennähe (0 – 6 µm) kaum von den unbestrahlten differenzierte wick er in den darauffolgenden Tiefen (8 – 28 µm) etwas ab. Die Messungen dieser Ohren nach einer Lagerung von 24 h im Kühlschrank lieferten für die tieferliegenden Messpunkten (8 – 28 µm) vergleichbare Konzentrationen wie am Tag davor. In den ersten 0 – 6 µm konnte 24 h nach der Bestrahlung hingegen ein leichter Anstieg des Cholesteringehaltes beobachtet werden (Abb. 83).

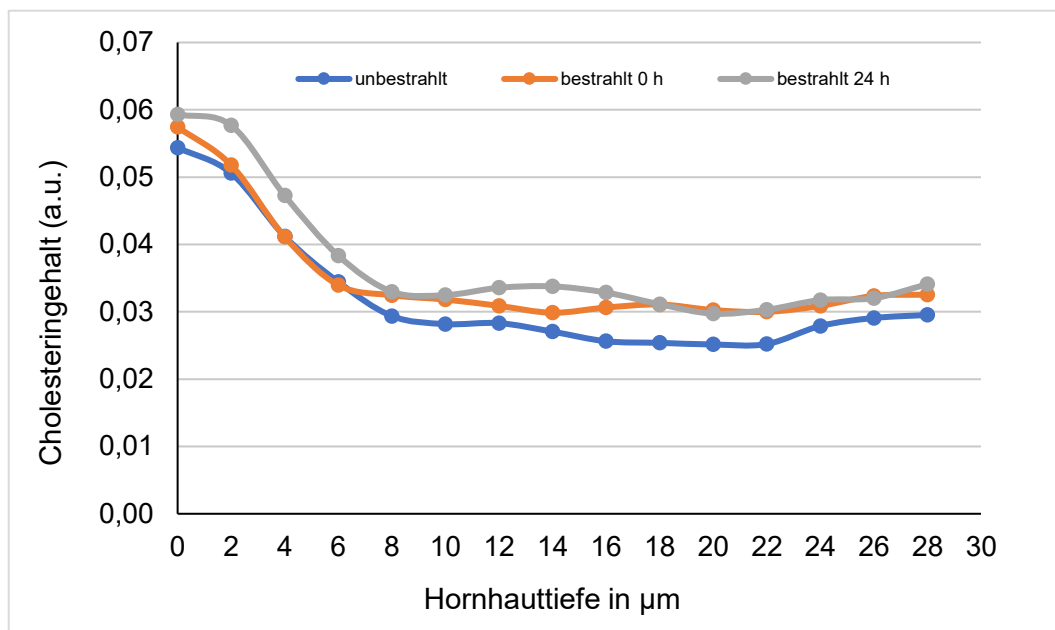


Abbildung 83: Vergleich der Cholesterinkonzentrationen von unbestrahlten und bestrahlten (0 h, 24 h) Ohren in Abhängigkeit von der Hornhauttiefe

Prinzipiell konnte also auch bei diesem Parameter ein leichter Konzentrationsanstieg nach der Bestrahlung und einer 24-stündigen Lagerung im Kühlschrank festgestellt werden.

Keratin

Anders als bei den bereits präsentierten Parametern kam es beim Keratin infolge der Bestrahlung sowie einer Lagerung über 24 h im Kühlschrank zu keinem Konzentrationsanstieg. Wie Abbildung 84 zeigt, konnte nach der Bestrahlung eine Abnahme des Keratingehaltes in der Haut beobachtet werden. Nach 24 h fiel die Konzentration der bestrahlten Ohren insbesondere in den ersten 0 – 10 μm des Tiefenprofils nochmal etwas ab, bis sie sich ab 14 μm wieder den Werten des Vortages näherte.

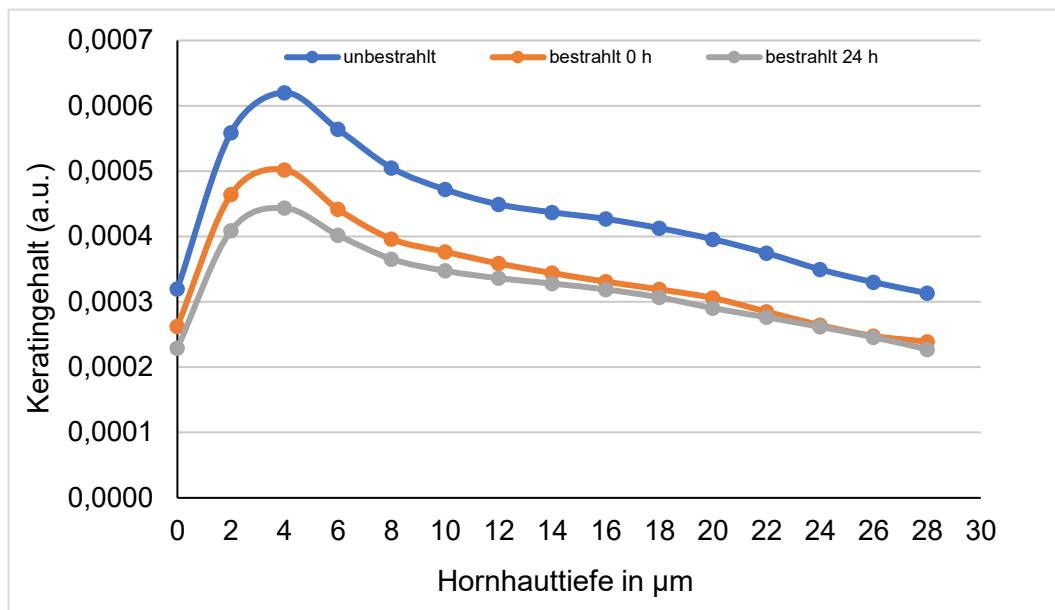


Abbildung 84: Vergleich der Keratinkonzentrationen von unbestrahlten und bestrahlten (0 h, 24 h) Ohren in Abhängigkeit von der Hornhauttiefe

Durch die Darstellung der Keratinkonzentrationen in den ersten 10 µm des Stratum corneum konnte ein Einfluss der Bestrahlung sowie der 24-stündigen Lagerung auf den Keratingehalt nochmal deutlich veranschaulicht werden (Abb. 85).

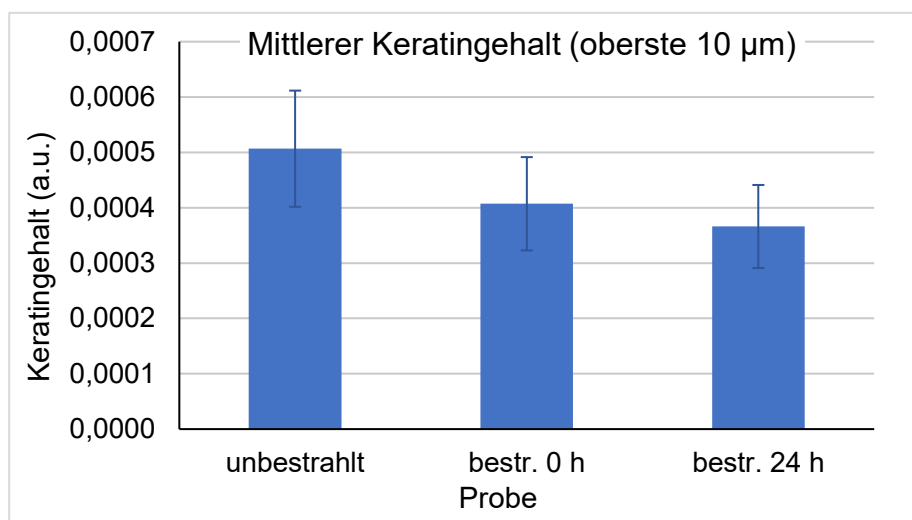


Abbildung 85: mittlerer Keratingehalt der obersten 10 µm im Vergleich

NMF

Im Vergleich zu den bereits besprochenen Parametern lieferten die erhobenen Messwerte stark schwankende NMF-Konzentrationskurven. Während sich direkt nach der Bestrahlung verglichen mit den unbestrahlten Ohren kaum ein Unterschied im NMF-Gehalt an der Hautoberfläche (0 – 4 µm) zeigte, war der Gehalt nach 24 h in

0 – 2 μm Tiefe um die Hälfte niedriger. Bei den unbehandelten Ohren fiel die Konzentration noch etwas weiter ab und pendelte sich nach einem neuerlichen Anstieg um Werte zwischen 0,02 – 0,04 a.u. ein. Mit zunehmender Messtiefe stieg auch der NMF-Gehalt der bestrahlten Ohren nochmal an. Direkt nach der Bestrahlung schwankten die NMF-Konzentrationen in den mittleren Messtiefen noch etwas, bis sie schließlich in 26 μm Tiefe einen Wert von 0,06 a.u. erreichten. 24 h nach der Bestrahlung war der NMF-Gehalt deutlich weniger Schwankungen ausgesetzt und pendelte sich gegen Messende um einen Wert von 0,09 a.u. ein (Abb. 86).

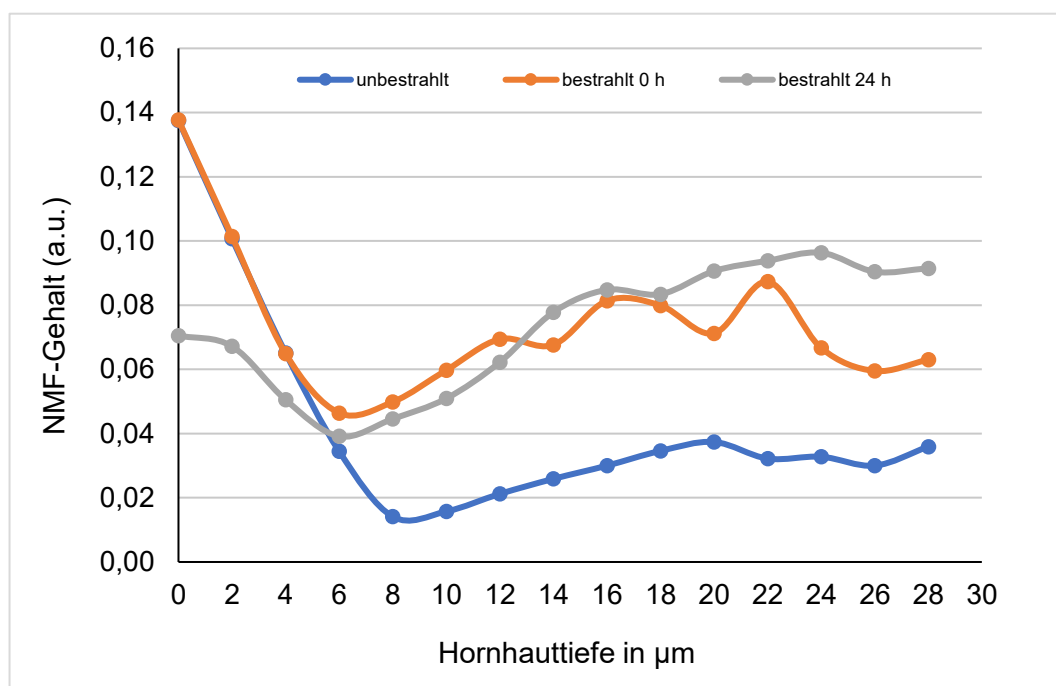


Abbildung 86: Vergleich der NMF-Konzentrationen von unbestrahlten und bestrahlten (0 h, 24 h) Ohren in Abhängigkeit von der Hornhauttiefe

Die Bestrahlung sowie eine Lagerung der bestrahlten Ohren über 24 h im Kühlschrank führte folglich zu einem Anstieg des NMF-Gehaltes in den tiefergelegenen Schichten des Stratum corneum und der nachfolgenden lebenden Epidermis. Weshalb der Kurvenverlauf die oben gezeigte ungewöhnliche Form annahm sollte in weiteren Studien geklärt werden.

Harnstoff

Bei der Erhebung des Harnstoffgehaltes konnten vergleichbare Konzentrationskurven gewonnen werden. Die vom Verlauf her recht ähnlichen Kurven unterschieden sich lediglich durch eine leichte vertikale Verschiebung entlang

der y-Achse, wodurch sich auf eine Abnahme der Harnstoffkonzentration schließen ließ (Abb. 87).

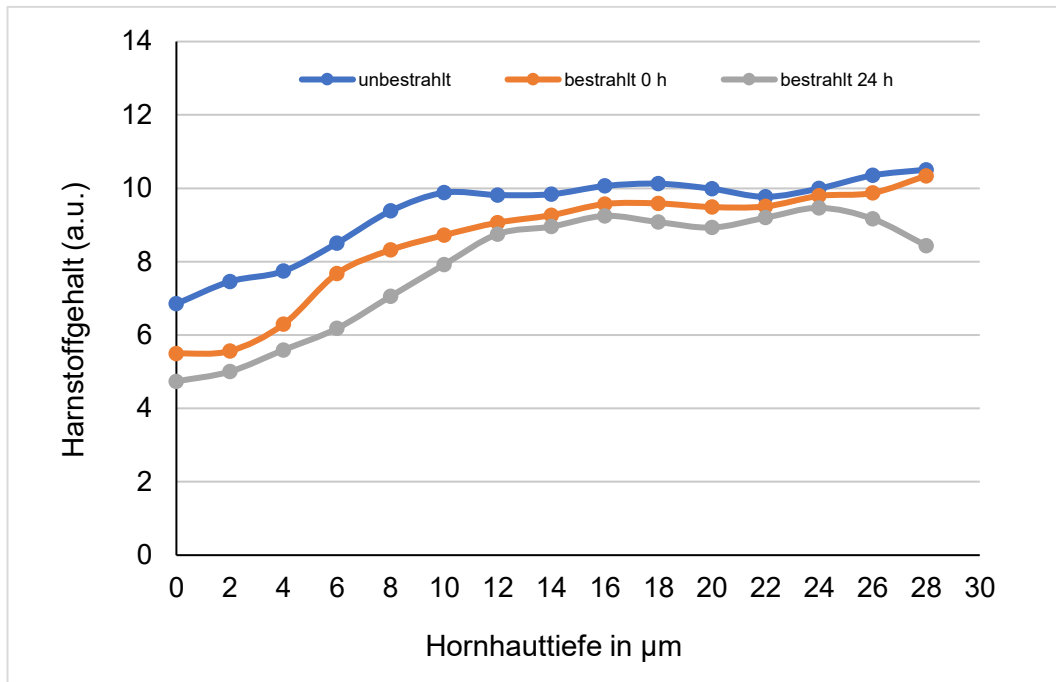


Abbildung 87: Vergleich der Harnstoffkonzentrationen von unbestrahlten und bestrahlten (0 h, 24 h) Ohren in Abhängigkeit von der Hornhauttiefe

Die Annahme, dass es in Folge der Bestrahlung sowie der 24-stündigen Lagerung dieser bestrahlten Ohren im Kühlschrank zu einer allgemeinen Abnahme des Harnstoffgehaltes in der Haut kommt, konnte durch die vergleichende Darstellung der Harnstoff-Konzentrationen in den ersten 10 µm des Stratum corneum bestätigt werden (Abb. 88).

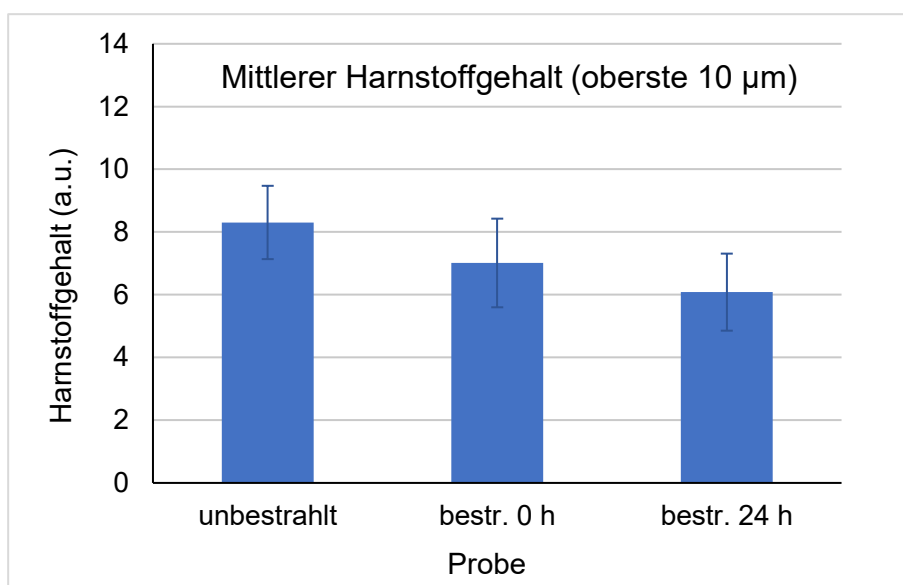


Abbildung 88: mittlerer Harnstoffgehalt der obersten 10 µm im Vergleich

4.2.3.2. HWVN-Spektren

Wassergehalt

Beim Vergleich der Wasserkonzentrationskurven konnte vor und nach der Bestrahlung sowie nach 24 h im Kühlschrank kein Unterschied zwischen dem erhobenen Wassergehalt festgestellt werden (Abb. 89 und 90).

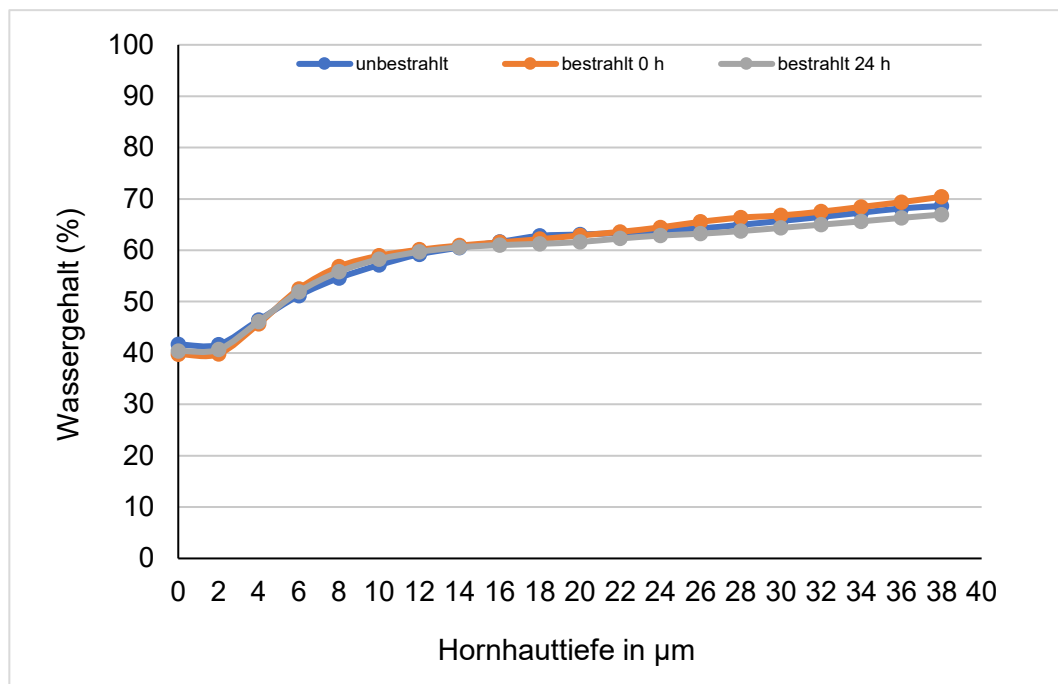


Abbildung 89: Vergleich des Wassergehaltes von unbestrahlten und bestrahlten (0 h, 24 h) Ohren in Abhängigkeit von der Hornhauttiefe

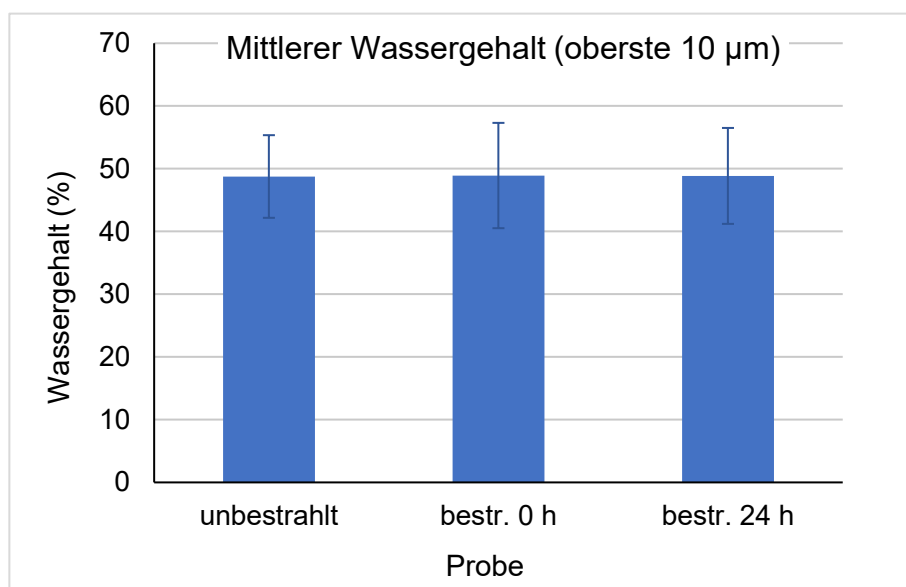


Abbildung 90: mittlerer Wassergehalt der obersten 10 µm im Vergleich

Auffallend ist jedoch, dass hier im Vergleich zu den frischen Ohren aus dem vorangegangenen Versuch der Wassergehalt an der Hautoberfläche (0 – 2 µm) um 10 % niedriger war.

Ähnliche Abweichungen konnten auch beim NMF- und Harnstoff-Gehalt beobachtet werden. Während bei diesem Versuch für die Ceramide in den ersten Tiefen (0 – 2 µm) verglichen mit der vorangegangenen Untersuchung ein Anstieg festgestellt werden konnte, war bei den Cholesterin- und Keratinkonzentrationen hingegen kaum ein Unterschied zu erkennen.

4.2.3.3. Biophysikalische Parameter

Der Melanin- und Erythemindex

Im Vergleich zu den unbehandelten Ohren davor konnten bei diesem Versuch darstellbare Werte für den Melanin- und Erythemindex erhoben werden.

Es schlichen sich auch hier immer wieder negative Messwerte ein. In Bezug auf den Melaningehalt konnte jedoch für die Kontrolle (unbestrahlte Ohren) aus allen Einzelmessungen ein positiver Mittelwert von 10 berechnet werden. Zudem war der Einfluss der Bestrahlung auch hier deutlich zu erkennen. Direkt nach der Bestrahlung wurde ein Gehalt von 63 beobachtet. In den darauffolgenden 24 h stieg der Melaninindex nochmals um fast 20 Indices an (80) (Abb. 91).

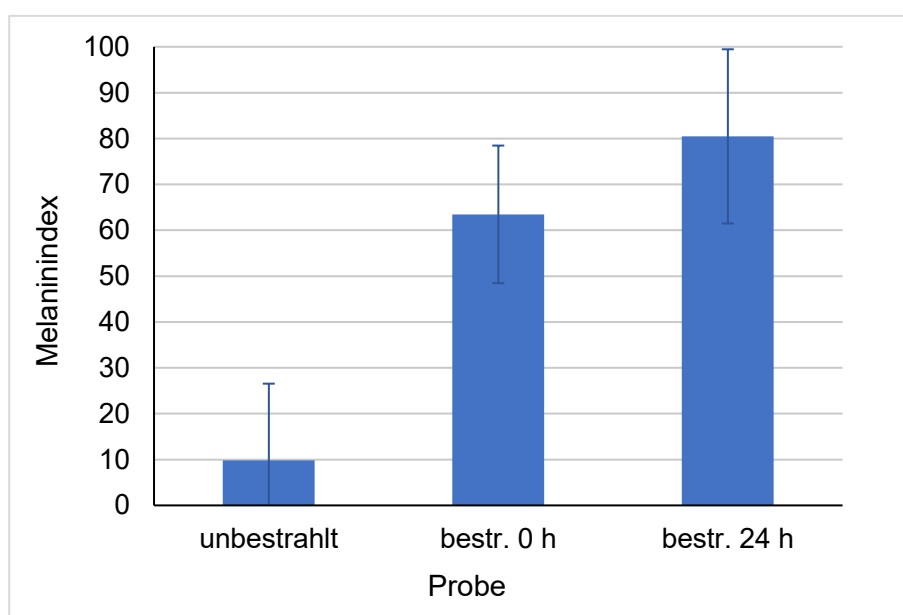


Abbildung 91: Vergleich der Melaninindices von unbestrahlten und bestrahlten (0 h, 24 h) Ohren

Ähnliches wurde auch beim Erythemindex festgestellt. Im Unterschied zum Melaninindex konnte für die Kontrolle (unbestrahlte Ohren) hier kein positiver Wert erhoben werden. Infolge der Bestrahlung kam es aber auch hier zu einem Anstieg des Erythemindex, der sich nach 24 h noch weiter steigerte (direkt nach der Bestrahlung: 14, nach 24 h: 37) (Abb. 92). Laut den Richtwerten des Herstellers konnte jedoch anhand dieser Werte kein Erythem festgestellt werden (vgl. Tab. 4).

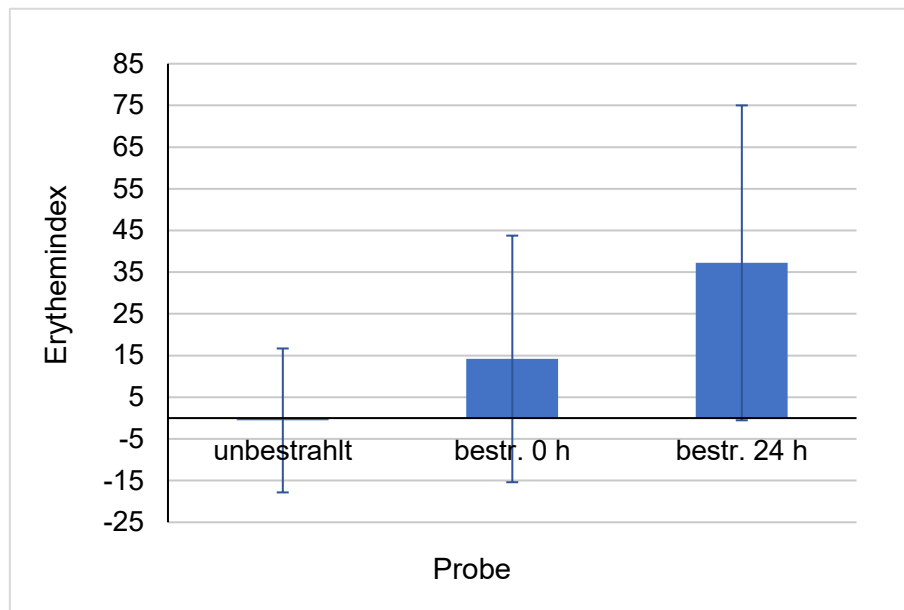


Abbildung 92: Vergleich der Erythemindices von unbestrahlten und bestrahlten (0 h, 24 h) Ohren

Die Hautfeuchtigkeit

In Bezug auf die Hautfeuchtigkeit konnten bei Betrachtung der unbestrahlten Ohren Parallelen zu den vorangegangenen Untersuchungen porziner Haut gezogen werden. Wie in Abbildung 93 zu sehen ist, spiegelte die hohe Standardabweichung der Kontrolle erneut eine starke Streuung der erhobenen Messwerte wider.

Wie erwartet konnte direkt nach der Bestrahlung eine Abnahme der Hautfeuchtigkeit beobachtet werden. Nach der 24-stündigen Lagerung im Kühlschrank kam es dann erneut zu einem leichten Anstieg des Feuchtigkeitsgehaltes. Im Gegensatz zur Kontrolle unterlagen die Messwerte der bestrahlten Ohren weniger starken Streuungen.

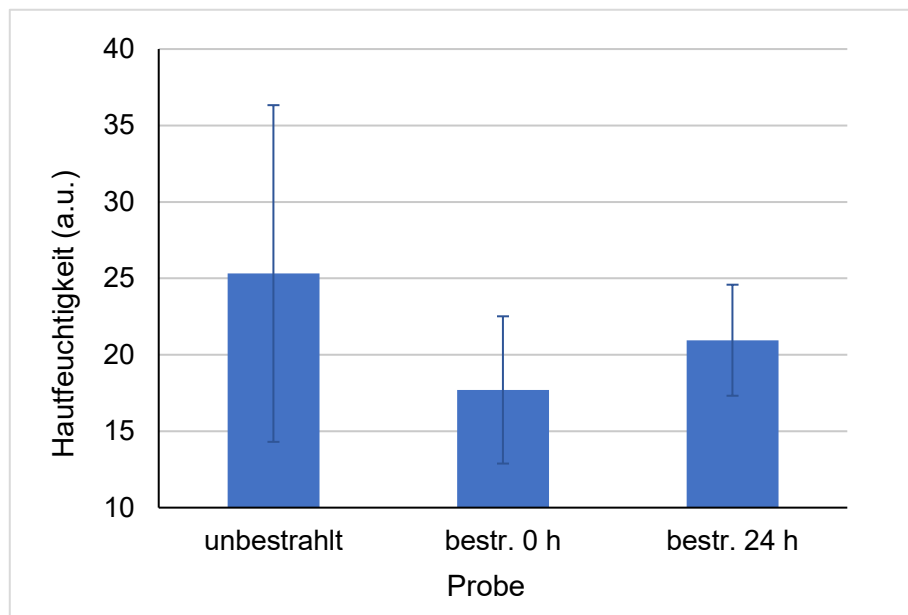


Abbildung 93: Vergleich der Hautfeuchtigkeit von unbestrahlten und bestrahlten (0 h, 24 h) Ohren

Der TEWL

Entgegen aller Erwartungen resultierte der höchste TEWL-Wert mit 12,29 g/m²/h aus den Messungen der unbestrahlten Ohren. Direkt nach der Bestrahlung konnte ein Wert erhoben werden, der fast um die Hälfte niedriger war (7,07 g/m²/h). Durch die Lagerung im Kühlschrank kam es nochmal zu einem leichten Anstieg des TEWLs (Abb. 94).

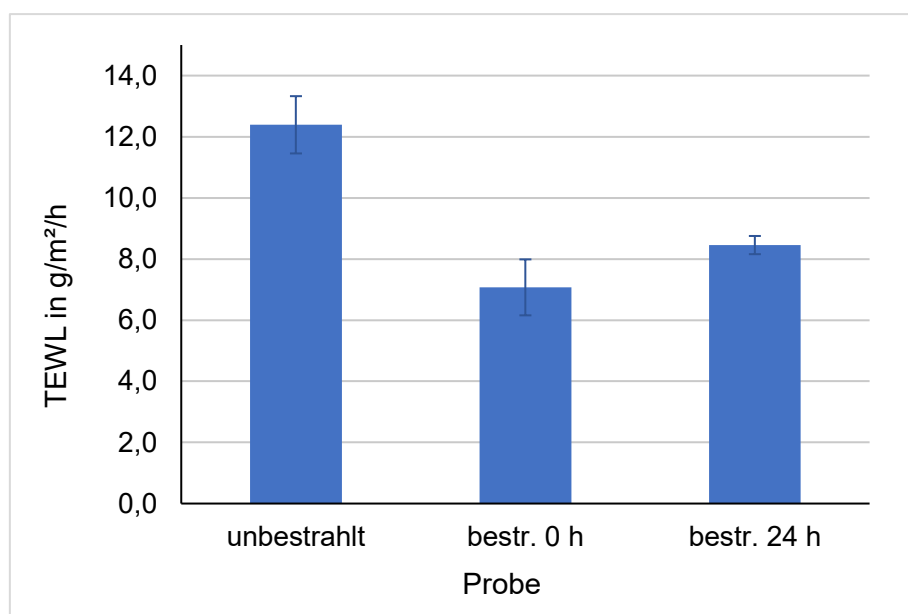


Abbildung 94: Vergleich der TEWL-Werte von unbestrahlten und bestrahlten (0 h, 24 h) Ohren

Allgemein konnte also festgestellt werden, dass es infolge der Bestrahlung zu keinen Einbußen in Bezug auf die Integrität der Hautbarriere kam. Weshalb beim TEWL nach Bestrahlung niedrigere Werte erhoben wurden, konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht geklärt werden und wird in weiteren Studien untersucht. Eine Art Austrocknung des tierischen Materials, welche die niedrigere Wasserabdunstung begünstigt haben könnte, erscheint möglich. Allerdings war der gemessene Wassergehalt innerhalb der Epidermis unverändert. Eine potenzielle Austrocknung durch die Bestrahlung und die zugehörige milde Wärmeentwicklung könnte demnach eher in tieferen Schichten wie der tieferen Dermis und Subcutis erfolgt sein.

Der pH-Wert

Aus der Gegenüberstellung der ermittelten Haut-pH-Werte der unbestrahlten Ohren sowie der bestrahlten Proben direkt nach der Bestrahlung bzw. nach 24 h resultierten gut vergleichbare und kaum schwankende Werte. Direkt nach der Bestrahlung konnte eine leichte Verschiebung des pH-Wertes in den schwach alkalischen Bereich beobachtet werden (7,51). Im Großen und Ganzen wurden jedoch keine signifikanten Unterschiede festgestellt. Die erhobenen Werte lagen mit 7,09 – 7,51 im neutralen bis schwach basischen Bereich (Abb. 95)

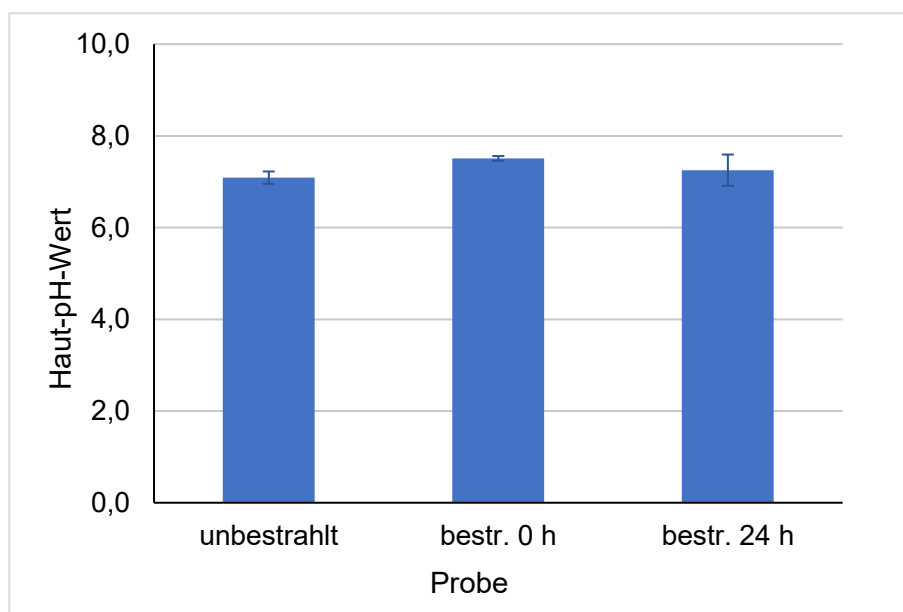


Abbildung 95: Vergleich der Haut-pH-Werte von unbestrahlten und bestrahlten (0 h, 24 h) Ohren

4.2.4. Penetrationsstudien mit Coffein anhydricum

Um den Effekt von UVA-Bestrahlung auf die Penetrationseigenschaften von Coffein zu untersuchen, wurden $n = 3$ Ohren vor dem Auftragen einer wässrigen Lösung von Coffein mit dem Sol 500 bestrahlt. Zur Kontrolle wurde die Lösung auf $n = 3$ weitere Ohren aufgetragen, die jedoch unbestrahlt blieben. Anschließend wurden Raman-spektroskopischen Messungen im Fingerprint-Bereich durchgeführt. Nachfolgend werden die daraus gewonnenen Ergebnisse präsentiert.

4.2.4.1. Fingerprint-Spektren

Die Auswertung der im Rahmen der Messungen erhobenen Rohspektren erfolgte in diesem Fall nicht mit der üblichen Methode (*Default method NMF*), sondern mit einer modifizierten Variante davon (*Methode Coffein anhydr.*). Diese wurde eigenständig erstellt, um den Fokus der Auswertung auf den gemessenen Coffeingehalt in der Haut zu richten.

Coffeingehalt

Die Auswertung lieferte folgende Ergebnisse: die Coffeinkonzentrationskurven der Kontrolle (unbestrahlte Ohren) und der bestrahlten Ohren zeigten kaum Unterschiede. Der Kurvenverlauf war bei beiden durch einen leichten Konzentrationsanstieg von 0 – 2 μm Tiefe und einem nachfolgenden Abfall des Gehaltes bis zu einer Messtiefe von 12 μm gekennzeichnet. Bei den übrigen Messpunkten des Tiefenprofils blieb die Coffeinkonzentration konstant bzw. stieg nochmal leicht an und pendelte sich um Werte von 250 – 380 a.u. ein.

Bei der Konzentrationskurve der bestrahlten Ohren konnte im Vergleich zur Kontrolle eine leichte Verschiebung entlang der y-Achse festgestellt werden. Folglich wurde bei den bestrahlten Ohren über das gesamte Tiefenprofil hinweg ein etwas niedriger Coffeingehalt beobachtet. Der Unterschied im Coffeingehalt zwischen der Kontrolle und den bestrahlten Ohren war jedoch nicht signifikant (Student's-t-test: $p = 0,7326$) (Abb. 96).

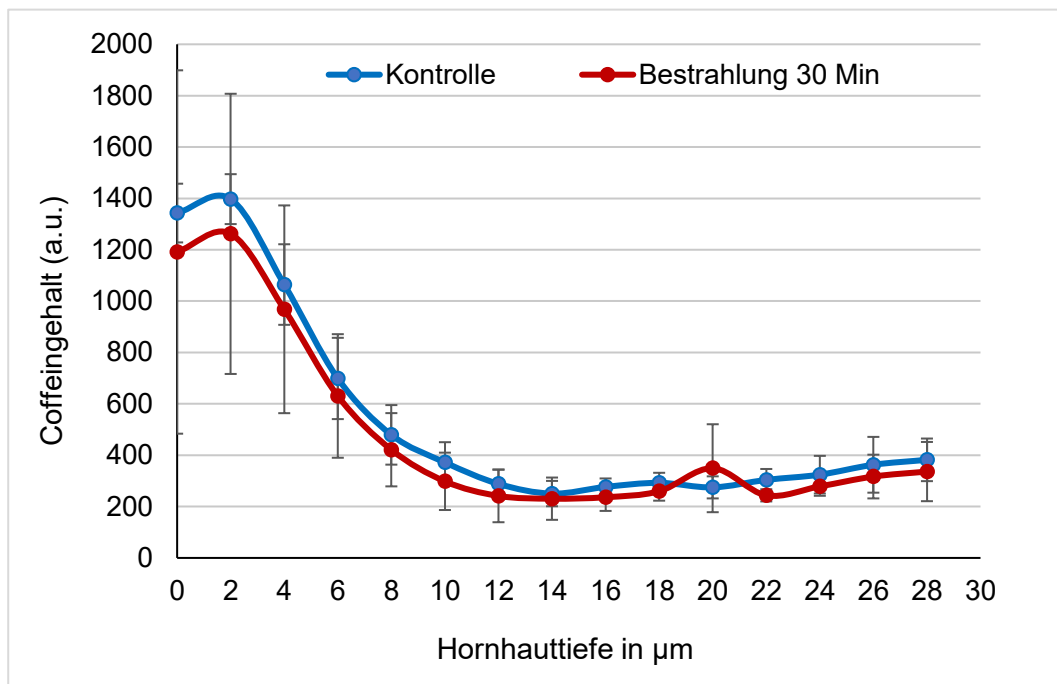


Abbildung 96: Vergleich des Coffeingehaltes von unbestrahlten und bestrahlten Ohren in Abhängigkeit von der Hornhauttiefe

Die oben genannten Beobachtungen konnten durch die Darstellung des summierten Coffeingehaltes in den ersten 10 µm des Stratum corneum bestätigt werden (Abb. 97).

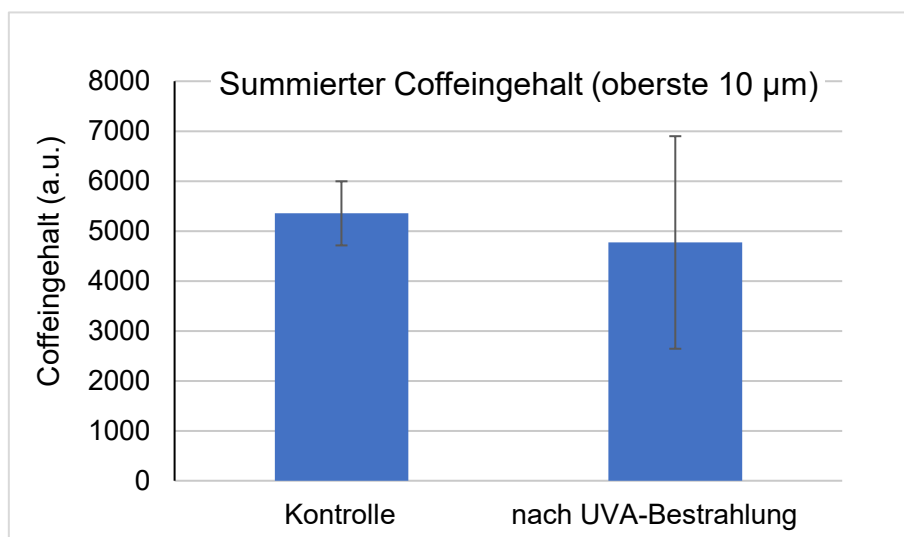


Abbildung 97: summierter Coffeingehalt der obersten 10 µm (Mittelwert der Einzelmessungen $\pm$ Standardabweichung)

Auch hier konnte zwischen der Kontrolle und den bestrahlten Ohren kein signifikanter Unterschied in Bezug auf die Gesamtmenge des Coffeins in den ersten 10 µm des

Stratum corneum festgestellt werden (Student's-t-test: $p = 0,6732$). Es konnte folglich kein Effekt von UVA-Bestrahlung auf die Penetrationseigenschaften von Coffein nachgewiesen werden.

4.2.5. Raman-spektroskopischer Vergleich von diversen Hautproben

Abschließend wurden im Rahmen dieser Arbeit noch Proben frischer Mäuse-, Ratten- und Schweinehaut sowie eine Hautprobe, die von einer an Psoriasis leidenden Maus stammte, spektroskopisch vermessen und die daraus resultierenden Haut-Spektren miteinander verglichen. Für die Auswertung wurden die Einzelmessungen jeder Probe mittels SkinTools geöffnet und via *Plot* ein Spektrum aus den gemittelten Einzelmessungen erstellt. In den Abbildungen 98 – 117 sind sowohl die Fingerprint-, als auch die HWVN-Spektren der verschiedenen Hautproben dargestellt.

4.2.5.1. Frische Schweinehaut

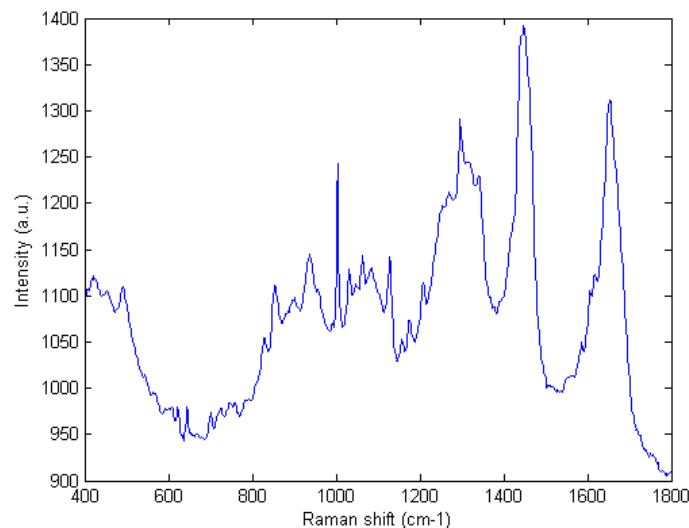


Abbildung 98: Fingerprint - Spektrum von Schweinehaut (Probe 1, vermutlich Rücken, gemittelt aus $n = 8$ Einzelmessungen)

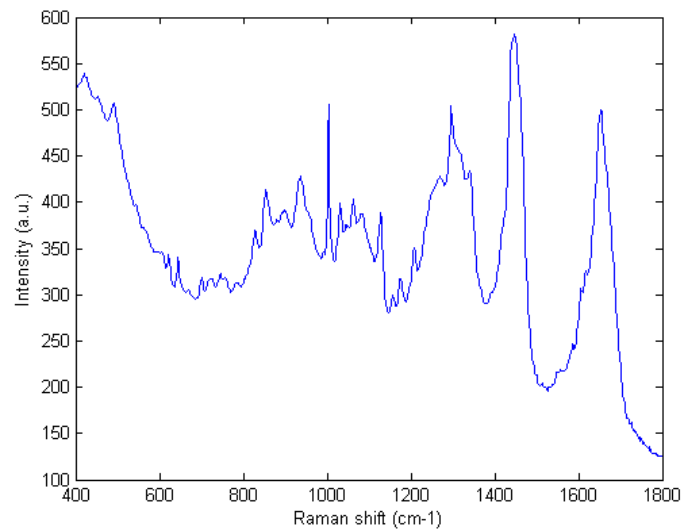


Abbildung 99: Fingerprint - Spektrum von Schweinehaut (Probe 2, vermutlich Bauchregion, gemittelt aus $n = 6$ Einzelmessungen)

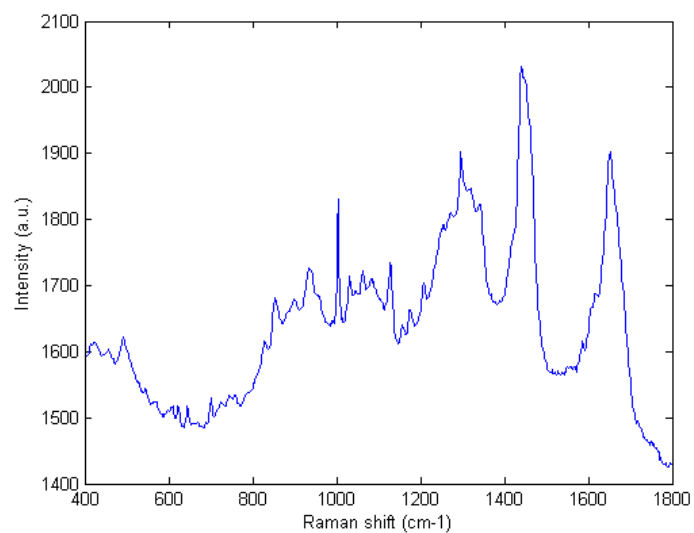


Abbildung 100: Fingerprint - Spektrum von Schweinehaut (Probe 3, vermutlich Hals/Flanke, gemittelt aus $n = 6$ Einzelmessungen)

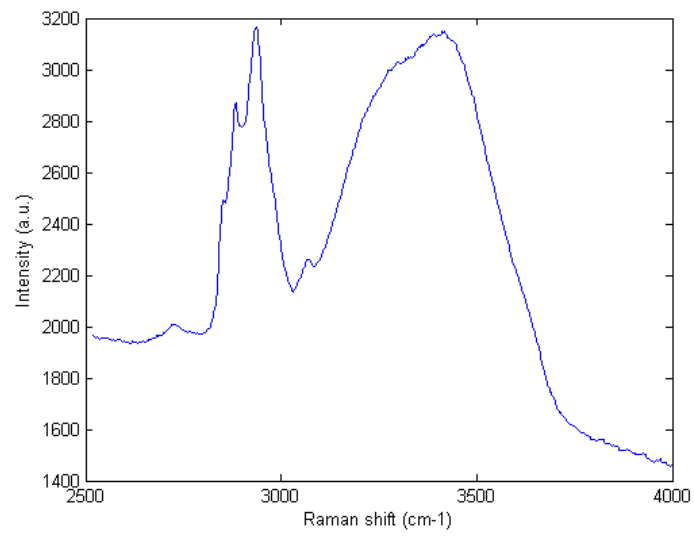


Abbildung 101: High wave number - Spektrum von Schweinehaut (Probe 1, vermutlich Rücken, gemittelt aus $n = 4$ Einzelmessungen)

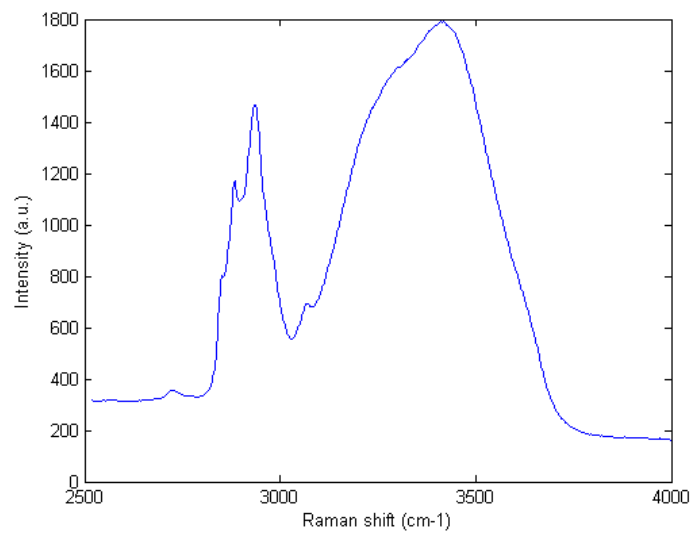


Abbildung 102: High wave number - Spektrum von Schweinehaut (Probe 2, vermutlich Bauchregion, gemittelt aus $n = 4$ Einzelmessungen)

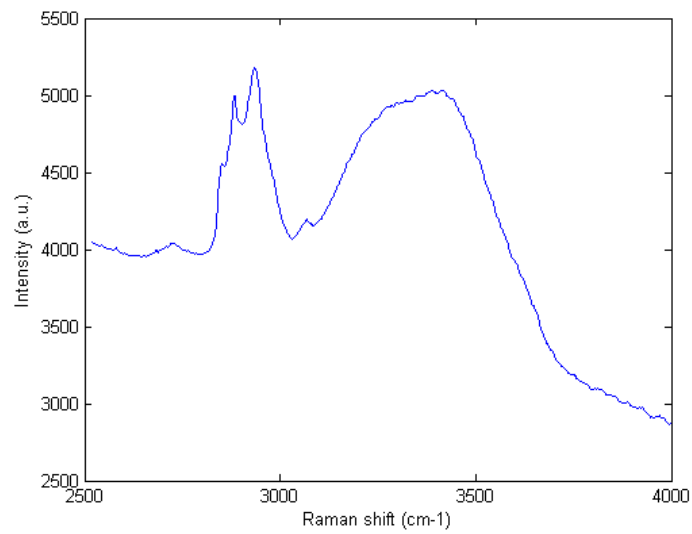


Abbildung 103: High wave number - Spektrum von Schweinehaut (Probe 3, vermutlich Hals/Flanke, gemittelt aus $n = 5$ Einzelmessungen)

4.2.5.2. Frische Rattenhaut

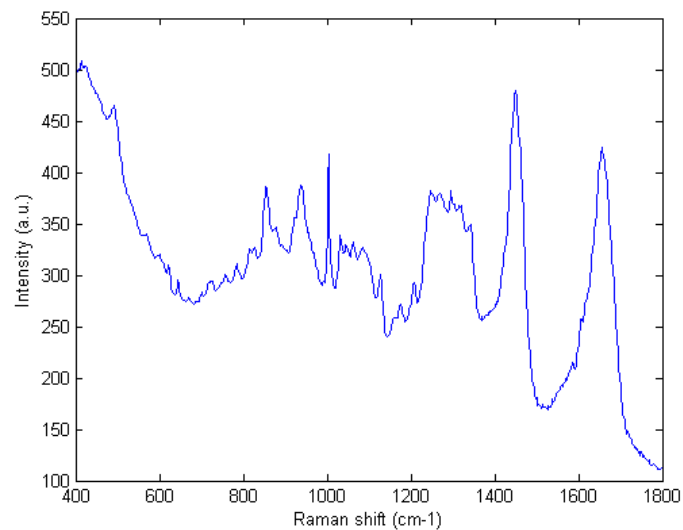


Abbildung 104: Fingerprint - Spektrum von Rattenhaut (Probe 1, Bauchregion, gemittelt aus $n = 5$ Einzelmessungen)

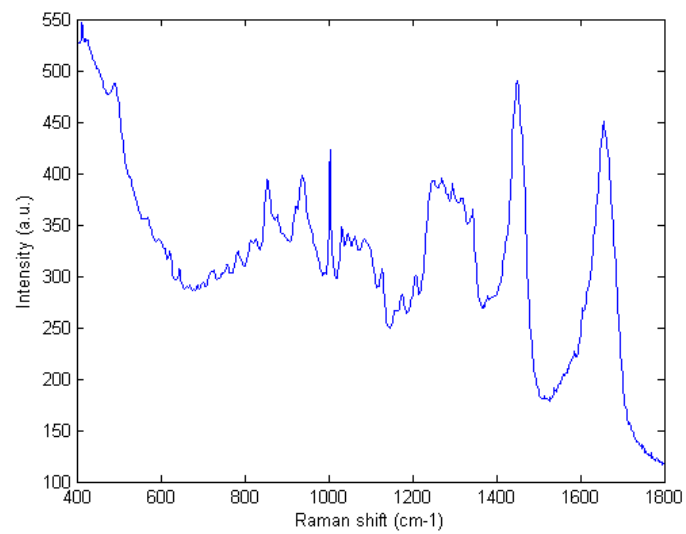


Abbildung 105: Fingerprint - Spektrum von Rattenhaut (Probe 2, Bauchregion, gemittelt aus $n = 5$ Einzelmessungen)

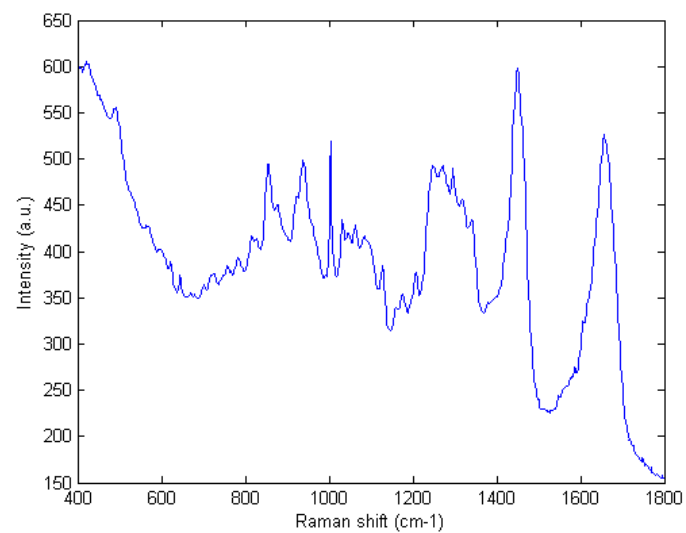


Abbildung 106: Fingerprint - Spektrum von Rattenhaut (Probe 3, Bauchregion, gemittelt aus $n = 6$ Einzelmessungen)

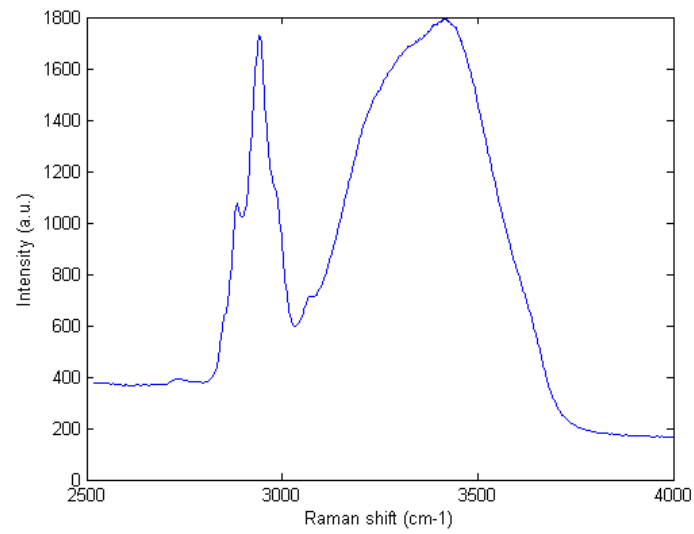


Abbildung 107: High wave number - Spektrum von Rattenhaut (Probe 1, Bauchregion, gemittelt aus $n = 4$ Einzelmessungen)

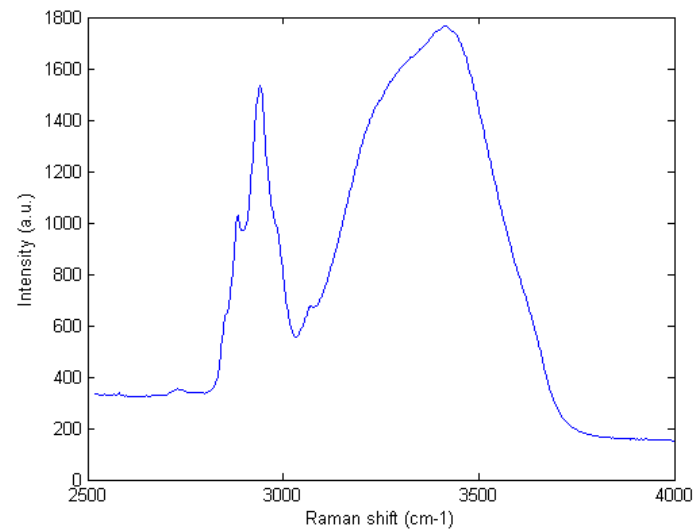


Abbildung 108: High wave number - Spektrum von Rattenhaut (Probe 2, Bauchregion, gemittelt aus $n = 5$ Einzelmessungen)

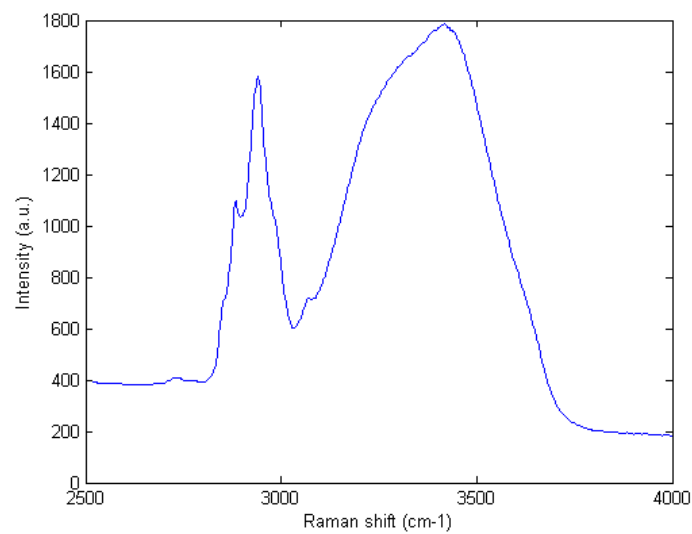


Abbildung 109: High wave number - Spektrum von Rattenhaut (Probe 3, Bauchregion, gemittelt aus $n = 5$ Einzelmessungen)

4.2.5.3. Frische Mäusehaut

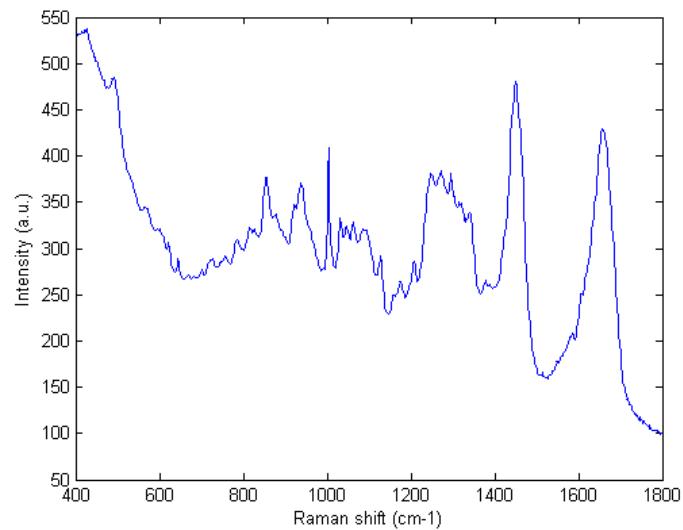


Abbildung 110: Fingerprint - Spektrum von Mäusehaut (Probe 1, Bauchregion, gemittelt aus $n = 5$ Einzelmessungen)

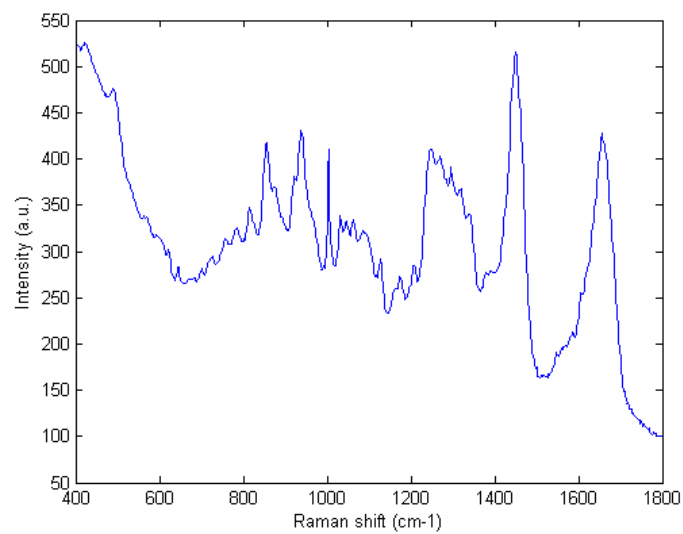


Abbildung 111: Fingerprint - Spektrum von Mäusehaut (Probe 2, Bauchregion, gemittelt aus $n = 5$ Einzelmessungen)

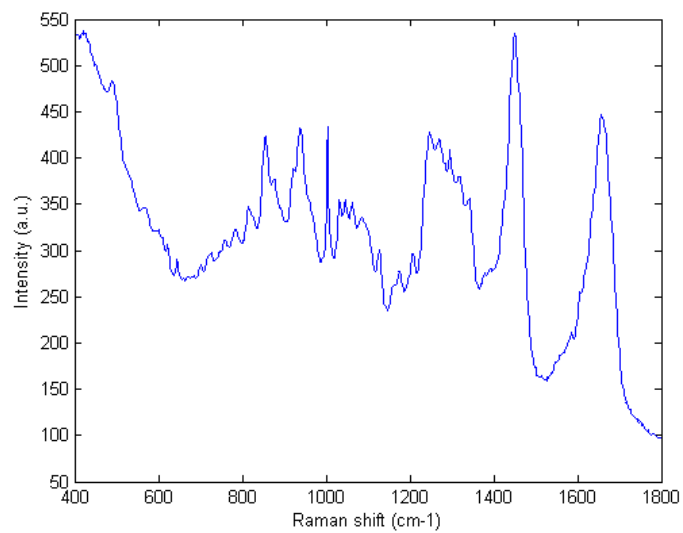


Abbildung 112: Fingerprint - Spektrum von Mäusehaut (Probe 3, Bauchregion, gemittelt aus $n = 6$ Einzelmessungen)

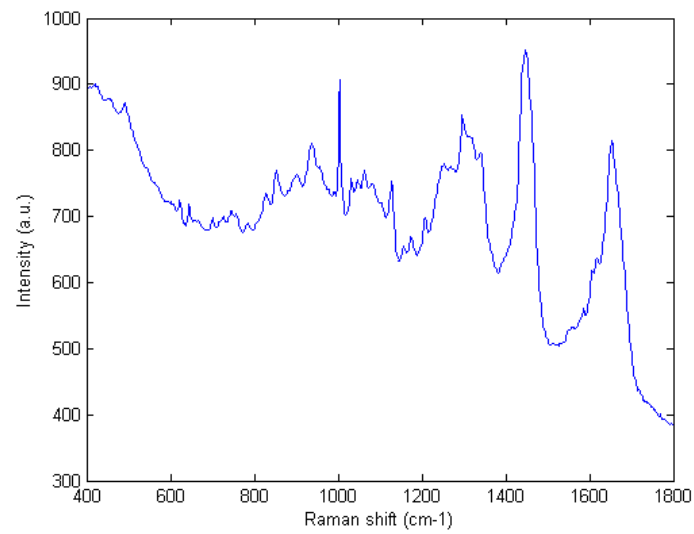


Abbildung 113: Fingerprint - Spektrum von Mäusehaut (Probe 1, psoriatisch, gemittelt aus $n = 7$ Einzelmessungen)

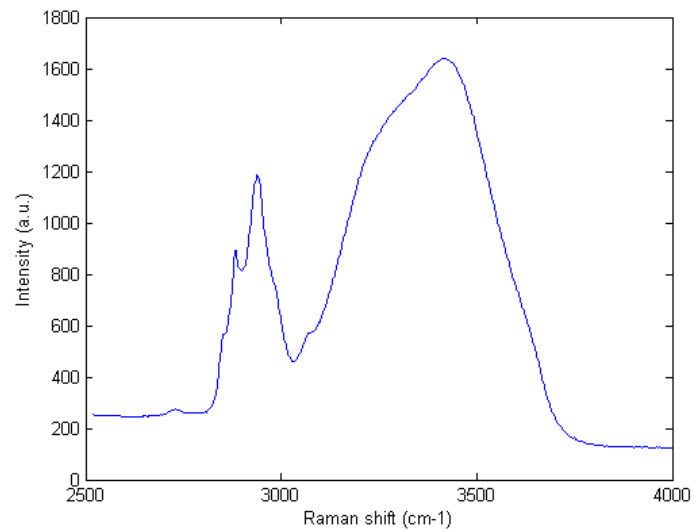


Abbildung 114: High wave number - Spektrum von Mäusehaut (Probe 1, Bauchregion, gemittelt aus $n = 4$ Einzelmessungen)

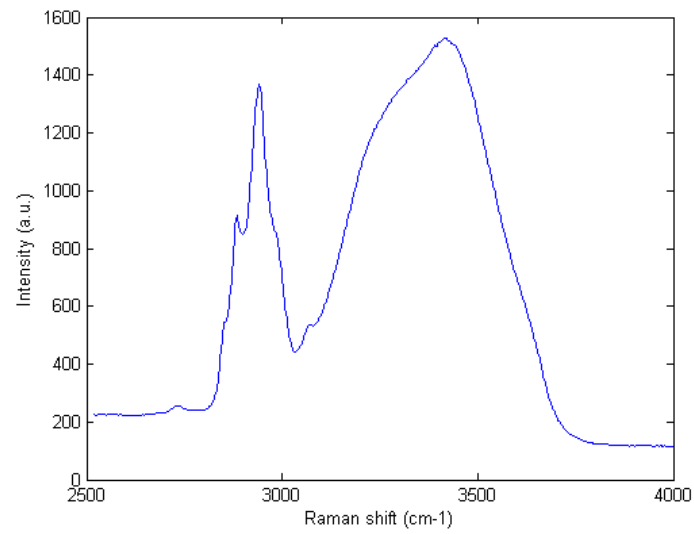


Abbildung 115: High wave number - Spektrum von Mäusehaut (Probe 2, Bauchregion, gemittelt aus $n = 4$ Einzelmessungen)

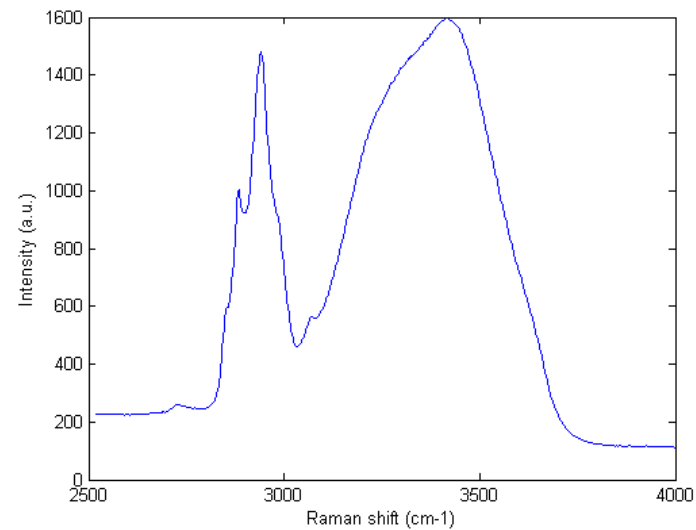


Abbildung 116: High wave number - Spektrum von Mäusehaut (Probe 3, Bauchregion, gemittelt aus $n = 5$ Einzelmessungen)

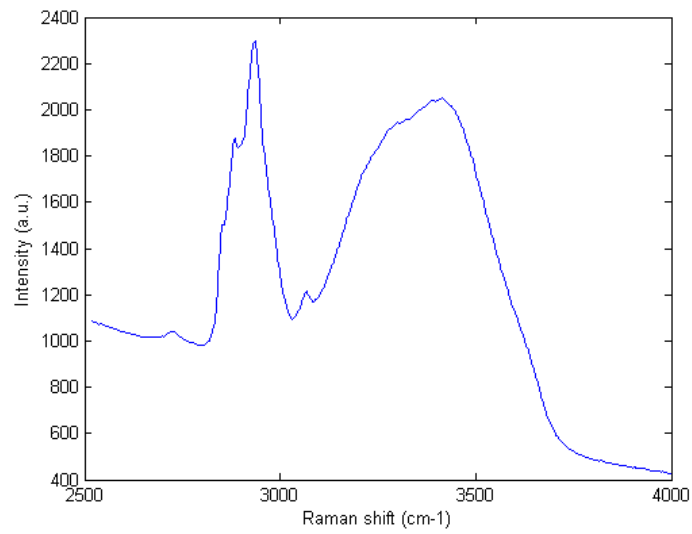


Abbildung 117: High wave number - Spektrum von Mäusehaut (Probe 1, psoriatisch, gemittelt aus $n = 5$ Einzelmessungen)

Wie anhand der erhobenen Spektren zu sehen ist, waren die Messungen der unterschiedlichen Proben sowohl im Fingerprint- als auch im HWVN-Bereich innerhalb einer Spezies sehr reproduzierbar.

5. Diskussion

Die Raman-Spektroskopie hat sich in den letzten Jahren zu einer vielversprechenden und gerne verwendeten Methode im Bereich der Hautforschung entwickelt. Im Zuge dieser Arbeit wurde die Reproduzierbarkeit von Raman-spektroskopischen in vivo Messungen an Humanhaut untersucht.

Die Messungen im Fingerprint-Bereich zeigten, dass für jeden der untersuchten Hautparameter den gesamten Messzeitraum über vergleichbare Konzentrationen erhoben werden konnten. Auffallend war jedoch, dass bei der Erhebung des Ceramid-, Cholesterin- und NMF-Gehaltes insbesondere in den Wochen 1, 3, 7 und 9 etwas größere probandeninterne Schwankungen anhand der Standardabweichung festgestellt wurden. Zudem konnte bei der Betrachtung der gewonnen NMF-Konzentration im Monatsvergleich zwischen März und Juni ein steigender Trend in Bezug auf den Gehalt beobachtet werden. Allerdings sind die erhobenen Unterschiede aufgrund der kleinen Probandinnenanzahl noch wenig aussagekräftig und sollten eher als Vorstudie betrachtet werden.

Bei den Messungen im HWVN-Bereich zur Ermittlung des Wassergehaltes konnte Ähnliches festgestellt werden. Obwohl während des gesamten Untersuchungszeitraumes reproduzierbare Wasserkonzentrationen zwischen 65 – 70 % gemessen wurden, stachen auch hier die Wochen 1, 3, 7, 9 und in diesem konkreten Fall auch 11 beim Vergleich des mittleren Wassergehaltes in den ersten 10 µm des Stratum corneum heraus.

Abgesehen davon, dass die Raman-spektroskopischen Messungen grundsätzlich kaum durch Einflüsse aus der Umgebung bzw. variierende Messbedingungen (Raumtemperatur, Luftfeuchtigkeit) beeinflusst werden, konnten mit Ausnahme von Woche 9 (durchschnittliches Temperaturmaximum von 26,43 °C) keine signifikanten Unterschiede im Vergleich zu den anderen Wochen beobachtet werden. Mögliche Gründe für diese ermittelten, aber nicht signifikanten Unterschiede könnten die geringe Probandenzahl sowie ein inhomogener Hautzustand (Auftragen von alltäglichen Hautpflegeprodukten, variierende Hautstelle) gewesen sein.

Im Gegensatz dazu lieferte die mathematische Ableitung der Stratum-corneum-Dicke aus dem erhobenen Wassergehalt reproduzierbare Werte ohne große Unterschiede. Zudem entsprach die aus den Berechnungen hervorgehende mittlere Stratum

corneum-Dicke mit einem Wert von 18,07 μm , den in der Literatur gefundenen Werten [21].

Bei der Untersuchung des jahreszeitlichen Einflusses auf die biophysikalischen Parameter konnten insbesondere bei dem wochenweisen Vergleich der Melanin- und Erythemindices deutliche Unterschiede festgestellt werden. Die Schwankungen des Melaningehaltes bezogen sich dabei vor allem auf die ersten sechs Messwochen. Als mögliche Gründe dafür könnten die wechselnden Wetterbedingungen in den Monaten März/April und die damit verbundenen Unterschiede in der Sonneneinstrahlung, die einen wesentlichen Einfluss auf die Melaninproduktion besitzt, sowie das untersuchte Hautareal (variierende Pigmentation, Muttermale), in Erwägung gezogen werden.

Im Vergleich dazu konnten bei der Betrachtung des Erythemindex über den gesamten Untersuchungszeitraum etwas stärker schwankende Werte beobachtet werden. Die Rötung der Haut ist die Folge einer Gefäßerweiterung und der damit verbundenen gesteigerten Durchblutung. Basierend darauf könnten neben den Wetterbedingungen (vermehrte Sonnenlichtexposition und steigende Temperaturen) auch die variierenden Messzeitpunkte (Vormittag/Nachmittag) ein Grund für diese durchwegs starken Unterschiede sein, da die Durchblutung der Haut tageszeitlichen Schwankungen (chronobiologischer/circadianer Rhythmus) unterliegt [66].

Für die Bestimmung der Hautfeuchtigkeit wurde zum einen der EpsilonTM-Sensor und zum anderen das Corneometer[®] herangezogen. Beide Methoden lieferten ähnliche Ergebnisse. Vom Messbeginn im März bis zum Untersuchungsende im Juni konnte eine Zunahme der Hautfeuchtigkeit, die möglicherweise auch auf eine stärkere Transpiration der Probandinnen zurückzuführen war, beobachtet werden.

Auch bei den gewonnenen TEWL-Werten wurde eine leichte Steigerung gegen Ende des Untersuchungszeitraumes festgestellt, wobei sich hier ebenso ein Einfluss der steigenden Temperaturen vermuten ließ. Da die Ergebnisse andererseits keinen größeren Schwankungen unterlagen konnte wiederum angenommen werden, dass die Messbedingungen über den gesamten Untersuchungszeitraum relativ konstant gehalten wurden.

Im Gegensatz zu den bereits diskutierten Parametern war der Haut-pH-Wert den gesamten Messzeitraum über durch konstante Ergebnisse gekennzeichnet. Es wurden hier kaum Schwankungen festgestellt. Zudem befand sich die Mehrheit der

Werte im Bereich unter 5,7. Somit entsprachen die Ergebnisse den vom Hersteller angegebenen Richtwerten (ca. 5,5 bei Frauen) [57].

Eine Probandin wurde von der allgemeinen Auswertung ausgeschlossen, da sie sich vor bzw. während des Untersuchungszeitraumes einer kosmetischen Laserbehandlung unterzog. Im Zuge der Messungen konnten bei dieser Probandin höhere TEWL-Werte sowie eine etwas trockenere Haut beobachtet werden. Folglich stellte man die Vermutung an, dass die besagte Laserbehandlung zu einer leichten Schädigung der Hautbarriere sowie einer Austrocknung der Haut führte.

Um die genannten Fehlerquellen zu minimieren wären für nachfolgende Studien die Auswahl eines größeren Probandenkollektives, festgelegte Messzeiten und eventuell eine strengere Per-Protokoll-Analyse empfehlenswert. Außerdem zeigten die Ergebnisse der Melanin- und Erythemindices, dass es in zukünftigen Studien auch wichtig sein wird, an exakt definierten kleineren Arealen zu messen.

Im zweiten Teil der Arbeit stand die Untersuchung der porcinen Haut im Vordergrund. Zur Erhebung der relevanten Hautparameter wurden auch hier die spektroskopischen und biophysikalischen Messungen nach demselben Prinzip wie oben durchgeführt. Bei der ersten Versuchsreihe sollte der Effekt unterschiedlicher Lagerbedingungen und -zeiträume auf die entsprechenden Hautparameter untersucht werden. Aus den spektroskopischen Messungen der ersten Lieferung frischer Ohren ließen sich keine aussagekräftigen Ergebnisse gewinnen. Bei der Betrachtung der erhobenen Wasserkonzentrationskurve konnten deutliche Abweichungen vom typischen Kurvenverlauf festgestellt werden. Die Kurve ging zwar auch bei einer Hornhauttiefe von 12 µm in eine Plateauphase über, jedoch war sie davor durch hohe Werte und eine uncharakteristische Abnahme des Wassergehaltes gekennzeichnet. Zu diesem Zeitpunkt stellte man bereits die Vermutung auf, dass diese Ohren vor der Lieferung einer Hygienebehandlung unterzogen worden waren. Durch die nachfolgende Messung des TEWL, wo stark erhöhte Ergebnisse auf eine geschädigte Hautbarriere hindeuteten, wurde diese Vermutung schließlich bestätigt. In sämtlichen weiteren Versuchen wurden nur mehr unbehandelte Ohren vermessen.

Aus den Rohspektren, die im Fingerprint-Bereich erhoben wurden, ergab sich Folgendes: sowohl bei der Erhebung der Ceramid- als auch der Harnstoffkonzentrationen konnten in Abhängigkeit von den Lagerzeiträumen bzw. -bedingungen keine Unterschiede festgestellt werden. Erste erkennbare Änderungen

zeigten sich im Cholesteringehalt nach einer 24-stündigen Lagerung im Kühlschrank. Im Vergleich zu den anderen Messzeitpunkten war die Konzentration zu diesem Zeitpunkt in den ersten 0 – 6 μm erhöht. Ob es sich dabei um natürliche (physiologische) Schwankungen handelte oder doch andere Umstände dafür verantwortlich waren, konnte im Zuge der Untersuchung nicht festgestellt werden. Neben dem Cholesteringehalt ließ sich auch bei Betrachtung der Keratinkonzentration ein Trend beobachten. In Abhängigkeit vom Lagerungszeitraum konnte hier eine fast kontinuierliche Abnahme des Gehaltes festgestellt werden.

Verglichen mit den anderen Parametern wurden in Bezug auf die NMF-Konzentrationen die größten Unterschiede ermittelt. Hier zeichnete sich ein deutlicher Effekt der Lagerbedingungen ab. Im Vergleich zu den im Kühlschrank gelagerten Ohren wiesen die tiefgekühlten deutlich niedrigere NMF-Konzentrationen auf. Dies könnte ein Zeichen dafür sein, dass die natürlichen Feuchthaltefaktoren durch den Einfrierprozess in den ersten 0 – 6 μm einem negativen Einfluss unterliegen.

Im HWVN-Bereich wurden bei der Erhebung des Wassergehaltes über den gesamten Messzeitraum reproduzierbare Wasserkonzentrationskurven ermittelt. Bei den eingefrorenen Ohren konnte im Vergleich zu den im Kühlschrank gelagerten Ohren ein leichter Anstieg der Wasserkonzentration in Hautoberflächennähe beobachtet werden; dieser war jedoch nicht signifikant.

Die Messungen der biophysikalischen Parameter lieferten vor allem in Bezug auf den Melanin- und Erythemindex äußerst auffällige Ergebnisse. Man erhielt für beide Parameter durchwegs negative Werte und folglich keine aussagekräftigen Ergebnisse. Als Grund für den nicht messbaren Erythemindex wurde die mangelnde Durchblutung vermutet, die aus der Tatsache resultierte, dass es sich hierbei um Proben von toten Tieren handelte.

Die mangelnde Aussagekraft des Melaniningehaltes dürfte man damit begründen können, dass die im Rahmen dieser Versuche untersuchte Rasse von Schweinen kaum eine natürliche Melaninpigmentation aufwies. Recherchen ergaben, dass dieses Pigment auch in anderen Studien äußerlich als Paste aufgetragen werden musste, um aussagekräftige Ergebnisse zu erhalten [81-82].

In Bezug auf die Hautfeuchtigkeit wurden in dieser Versuchsreihe stark schwankende Werte mit großen Standardabweichungen beobachtet. Auffallend war, dass für die

Hautfeuchtigkeit nach acht Wochen im Tiefkühlschrank im Vergleich zu einer Woche um etwa 10 a.u. niedrigere Werte verzeichnet wurden. Als Ursache für diese starken Unterschiede könnte auch ein Okklusionseffekt angenommen werden, der aus den vorhergegangenen spektroskopischen Messungen resultierte.

Im Vergleich dazu lieferten die Messungen des TEWL konstantere Ergebnisse. Auch hier konnte bei den Proben, die eine Woche im Tiefkühlschrank gelagert wurden, der höchste TEWL-Wert beobachtet werden. Insgesamt entsprachen die gewonnenen Ergebnisse mit einem durchschnittlichen Wert von $18,43 \pm 2,65 \text{ g/m}^2/\text{h}$ den in der Literatur für intakte porcine Haut des dorsalen Ohres gefundenen Werten. Daraus lässt sich schließen, dass alle Proben eine intakte Hautbarriere besaßen.

Der Haut-pH-Wert lag mit Werten zwischen 7,5 – 7,8 im schwach alkalischen Bereich und blieb den gesamten Untersuchungszeitraum über konstant.

Um einen eventuellen Einfluss durch Okklusion während der Raman-Messung (Messdauer ca. 45 Minuten) auszuschließen, wird für zukünftige Untersuchungen mit einem ähnlichen Versuchsaufbau eine Durchführung mit umgekehrter Abfolge (erst Untersuchung mittels Messsonden, danach Raman-Messung) empfohlen.

In einer weiteren Versuchreihe wurde der Einfluss von Sonnenlicht auf die porcine Haut untersucht. Bei der Betrachtung der Parameter des Fingerprint-Bereiches zeigte sich Folgendes: sowohl bei den Ceramiden als beim Cholesterin kam es infolge der Bestrahlung zu einem Anstieg der Konzentration. Insbesondere 24 h nach der Bestrahlung stieg der Gehalt dieser Parameter im Vergleich zu den anderen Messzeitpunkten nochmal etwas an.

Im Gegensatz dazu konnte beim Keratin- und Harnstoffgehalt genau das Gegenteil beobachtet werden. Die Bestrahlung der Proben führte in diesen Fällen zu einer Abnahme der Konzentration, die sich nach 24 h im Kühlschrank noch weiter steigerte. Der größte Unterschied ließ sich im NMF-Gehalt feststellen. Während sich direkt nach der Bestrahlung – verglichen mit der Kontrolle – kaum ein Unterschied in der NMF-Konzentration an der Hautoberfläche (0 – 4 μm) zeigte, war der Gehalt nach 24 h in 0 – 2 μm Tiefe um die Hälfte niedriger. Zudem konnte beobachtet werden, dass die Bestrahlung sowie eine Lagerung der bestrahlten Ohren über 24 h im Kühlschrank zu einem Anstieg des NMF-Gehaltes in den tiefergelegenen Schichten des Stratum corneum und der nachfolgenden lebenden Epidermis führte. Ob es sich dabei um mess- bzw. auswertungsbedingte Schwankungen handelte oder

diese Unterschiede tatsächlich auf den Bestrahlungsvorgang zurückzuführen waren, konnte im Rahmen dieser Untersuchung nicht festgestellt werden.

Aus den Rohspektren des HWVN-Bereiches konnten zu jedem Messzeitpunkt Wasserkonzentrationskurven erhoben werden, die sich kaum voneinander unterschieden. Folglich wurde hier kein Effekt durch Bestrahlung sowie einer 24-stündigen Lagerung im Kühlschrank festgestellt. Im Gegensatz zu den vorangegangenen Untersuchungen der unbehandelten Ohren konnten bei diesem Versuch darstellbare Werte für den Melanin- und Erythemindex aus den biophysikalischen Sonden-Messungen erhoben werden. Die Bestrahlung führte im Vergleich zur Kontrolle bei beiden Parametern zu einem deutlichen Anstieg des Gehaltes, der sich 24 h nach der Bestrahlung nochmal steigerte. Folglich konnte in dieser Versuchsreihe zwar eine Veränderung festgestellt werden, die Unterschiede waren aber nicht signifikant.

In Bezug auf die Hautfeuchtigkeit resultierte aus der Bestrahlung wie erwartet eine Abnahme des Gehaltes, der nach einem Tag im Kühlschrank wiederum leicht anstieg. Auffallend war zudem, dass bei den bestrahlten Ohren anhand der Standardabweichung eine geringere Streuung der Werte beobachtet werden konnte. Daraus lässt sich vermuten, dass möglicherweise aufgrund der geringeren Hautfeuchtigkeit der Okklusionseffekt durch die Raman-Messung bei den bestrahlten Ohren weniger stark ausgeprägt war.

Ähnliches konnte bei der Gegenüberstellung des TEWL festgestellt werden. Die Bestrahlung führte auch hier zu einer Abnahme der Werte. Entgegen aller Erwartungen wurde die Hautbarriere der Proben durch die Strahlung nicht negativ beeinflusst. Weshalb beim TEWL nach Bestrahlung niedrigere Werte erhoben wurden, konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht geklärt werden. Eine Austrocknung des tierischen Materials, welche die niedrigere Wasserabdunstung begünstigt haben könnte, erscheint möglich. Allerdings war der gemessene Wassergehalt innerhalb der Epidermis unverändert. Eine potenzielle Austrocknung durch die Bestrahlung könnte demnach eher in tieferen Schichten wie der tieferen Dermis und Subcutis erfolgt sein. Aus dieser Beobachtung ergibt sich eine potenzielle Untersuchungsbasis für nachfolgende Studien.

Wie auch in der vorangegangenen Versuchsreihe konnte bei Betrachtung des Haut-pH-Wertes kein signifikanter Unterschied vor bzw. nach der Bestrahlung festgestellt werden. Der pH-Wert erwies sich erneut als sehr stabiler Parameter.

Die Bestrahlung mit dem SOL 500 erfolgte hier zum ersten Mal. Dieser Pilotversuch wurde ohne Erfahrungswerte und aus zeittechnischen Gründen auch ohne Vorversuche durchgeführt. Für zukünftige Untersuchungen ist eine intensivere Auseinandersetzung sowie die Durchführung von Vorversuchen zu empfehlen, um die Einstellungen bzw. den Versuchsaufbau zu optimieren und mögliche Fehlerquellen zu minimieren.

Um den Effekt von UVA-Strahlung auf die Penetrationseigenschaften von Coffein zu untersuchen, führte man eine weitere Versuchsreihe durch. Die Auswertung der Fingerprint-Rohspektren ergab Folgendes: im Vergleich zur Kontrolle konnte bei den bestrahlten Ohren im gesamten Tiefenprofil ein etwas niedriger Coffeingehalt festgestellt werden. Der Unterschied war jedoch nicht statistisch signifikant (Student's-t-test: $p = 0,7326$). Dies konnte auch durch die Gegenüberstellung des summierten Coffeingehaltes in den ersten 10 μm der Hornhaut bestätigt werden. Es ließ sich folglich kein Effekt durch UV-Bestrahlung auf die Penetrationseigenschaften von Coffein beobachten.

Für zukünftige Arbeiten wäre es interessant, den Effekt von UV-Strahlung auf die Penetrationseigenschaften von Coffein anhand unterschiedlicher Konzentrationen zu untersuchen, um möglicherweise etwas genauere Aussagen treffen zu können.

Abschließend erfolgte noch die spektroskopische Vermessung von diversen Hautproben. Anhand der gewonnenen Spektren ließ sich feststellen, dass für die Schweine-, Ratten- und Mäusehautproben sowohl im Fingerprint- als auch im HWVN-Bereich speziensspezifisch reproduzierbare Spektren erhoben werden konnten.

6. Zusammenfassung

Die Raman-Spektroskopie ist in den letzten Jahren als nicht invasive Analysemethode immer mehr in den Fokus der Hautforschung gerückt. Sie ermöglicht einerseits eine schonende Analyse der Haut in Bezug auf physiologische bzw. pathologische Zustände. Andererseits repräsentiert sie im Prozess der Arzneistoffentwicklung sowie in der Kosmetikindustrie eine der wichtigsten analytischen Methoden der Grundlagenforschung.

Im ersten Teil dieser Arbeit wurden über einen Zeitraum von 12 Wochen Basismessungen an gesunden Probandinnen mit dem Ziel durchgeführt, die Reproduzierbarkeit der Raman-Messergebnisse zu untersuchen sowie mögliche jahreszeitenabhängige Veränderungen der relevanten Hautparameter anhand der spektroskopischen und biophysikalischen Messungen zu beobachten. Die spektroskopischen Messungen lieferten den gesamten Untersuchungszeitraum über für jeden der untersuchten Parameter vergleichbare Messergebnisse. Die erhobenen Werte unterlagen zwar hin und wieder leichten Schwankungen; insgesamt konnten jedoch keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden.

Aus den biophysikalischen Messungen konnten insbesondere bei der Erhebung des Melanin- und Erythemindex sowie der Hautfeuchtigkeit (mittels EpsilonTM-Sensor und Corneometer®) und zum Teil auch beim Vergleich der TEWL-Werte Unterschiede beobachtet werden. Auch hier waren diese Unterschiede nicht signifikant; dennoch konnte ein leichter jahreszeitenbedingter Einfluss vermutet werden.

Im Rahmen dieser Untersuchungen wurde aus den gewonnenen Wasserkonzentrationskurven wöchentlich die Stratum corneum-Dicke mathematisch abgeleitet. Auch hier konnten reproduzierbare Werte erhoben werden, die mit den in der Literatur gefundenen übereinstimmten. In diesem Bereich lässt sich ein großes Potential für weitere Untersuchungen an einem größeren Probandenkollektiv erkennen.

Im zweiten Teil der Arbeit wurden verschiedene Untersuchungen an porciner Haut durchgeführt. Das Ziel der ersten Versuchsreihe war es, den Effekt unterschiedlicher Lagerbedingungen (Kühlschrank, Tiefkühlschrank) auf die entsprechenden Hautparameter nach verschiedenen Zeiträumen zu untersuchen. Bei der ersten

Lieferung frischer Ohren handelte es sich um hygienisch behandelte Ohren, die keine aussagekräftigen Ergebnisse lieferten. In sämtlichen weiteren Versuchen wurden nur mehr unbehandelte Ohren vermessen. Die spektroskopischen Untersuchungen der unbehandelten Ohren zeigten vor allem in Bezug auf den NMF-Gehalt lagerbedingte Unterschiede. Im Vergleich zu den im Kühlschrank gelagerten Proben waren die eingefrorenen Ohren durch eine deutlich niedrigere NMF-Konzentration gekennzeichnet.

Im Rahmen der biophysikalischen Messungen konnten aufgrund der mangelnden Durchblutung (Hautproben von toten Tieren) und dem Fehlen einer natürlichen Melaninpigmentation keine relevanten Erythem- bzw. Melaninindices erhoben werden. Als Folge eines vermuteten Okklusionseffektes, der aus der vorangegangenen spektroskopischen Messung resultierte, ergaben sich hinsichtlich der Hautfeuchtigkeit stark schwankende Werte mit großen Standardabweichungen. Die Werte des TEWL wiesen hingegen auf eine intakte Hautbarriere der Proben hin und entsprachen den in der Literatur gefundenen Werte.

Mit dem Ziel, den Einfluss von Sonnenlicht auf die physiologischen Parameter der Haut zu untersuchen, wurden porzine Hautproben mit dem Sonnenlichtsimulator bestrahlt, vermessen und mit einer Kontrolle (unbestrahlte Proben) verglichen. Dabei konnten in Folge der Bestrahlung und einer 24-stündigen Lagerung im Kühlschrank in Hautoberflächennähe vor allem Veränderungen im NMF-Gehalt festgestellt werden. Im Gegensatz zu den davor untersuchten unbehandelten Ohren konnten durch die Bestrahlung zwar Erythem- und Melaninwerte erhoben werden; die Ergebnisse befanden sich dennoch in einem nicht relevanten Bereich. Zudem wurde anhand der biophysikalischen Messungen festgestellt, dass der Okklusionseffekt in Folge der Bestrahlung weniger stark ausgeprägt war als in den Untersuchungen davor. Des Weiteren wurde in Folge der Sonnenlichtexposition anhand der erhobenen TEWL-Werte keine Schädigung der Hautbarriere beobachtet.

In einer dritten Versuchsreihe wurde der Effekt von UV-Strahlung auf die Penetrationseigenschaften von Coffein anhydricum untersucht. Hierbei wurde eine Lösung von Coffein auf zuvor bestrahlte Ohren aufgetragen. Nach einer kurzen Einwirkzeit wurden die Proben vermessen und wiederum mit einer Kontrolle (unbestrahlte Ohren) verglichen. Anhand der spektroskopischen Messungen konnte in diesem Fall kein Effekt durch UV-Bestrahlung auf die Penetrationseigenschaften

von Coffein festgestellt werden; es drang bei beiden Probenarten die gleiche Menge an Coffein in die Haut ein.

Diese Pilotversuche zeigten, dass in der Arbeit mit dem SOL 500 großes Potential liegt. Um genauere Aussagen treffen zu können ist jedoch eine intensivere Auseinandersetzung mit dem Gerät sowie eine Variation der Einstellungen (Belichtungszeit usw.) notwendig.

Abschließend wurden noch Proben frischer Mäuse-, Ratten- und Schweinehaut sowie eine Hautprobe, die von einer an Psoriasis leidenden Maus stammte, spektroskopisch vermessen. Aus diesen Messungen konnten speziesspezifisch reproduzierbare Spektren erhoben werden.

7. Abstract

Die Haut ist als Schnittstelle zur Außenwelt täglich diversen Umwelteinflüssen ausgesetzt. Dabei stellt das Sonnenlicht wahrscheinlich den bedeutendsten und einflussreichsten Faktor dar. Basierend darauf rückte die Charakterisierung der Haut in den letzten Jahrzehnten immer mehr in den Fokus der Forschung. Folglich steigerte sich auch das Angebot an verschiedenen Methoden, mit deren Hilfe die Haut charakterisiert werden kann. Insbesondere die Raman-Spektroskopie hat sich als nicht invasive Technik in den letzten Jahren zu einer der wichtigsten Analysemethoden in diesem Bereich entwickelt.

Im Zuge dieser Arbeit wurde in einer 12-wöchigen Studie die Reproduzierbarkeit der Raman-Messungen sowie der jahreszeitliche Einfluss auf relevante Hautparameter mittels biophysikalischer Methoden an gesunder Humanhaut untersucht. Trotz einiger Schwankungen konnten über den gesamten Untersuchungszeitraum vergleichbare spektroskopische Ergebnisse erhoben werden. Zudem ließ sich anhand des Melanin- und Erythemindex sowie der Hautfeuchtigkeit ein Einfluss der Jahreszeiten erkennen.

Im zweiten Teil dieser Arbeit beschäftigte man sich mit porziner Haut. Zum einen untersuchte man dabei, wie relevante Hautparameter durch unterschiedliche Lagerbedingungen (Kühlschrank, Tiefkühlschrank) bzw. durch Sonnenlichtexposition beeinflusst werden. Zum anderen wurde der Effekt von UV-Strahlung auf die Penetrationseigenschaften von Coffein untersucht. Während in Abhängigkeit von der Lagerung und der Exposition gegenüber UV-Strahlung vor allem Veränderungen im NMF-Gehalt sowie der Hautfeuchtigkeit beobachtet werden konnten, wurde in Bezug auf die Penetrationsfähigkeit von Coffein kein Effekt durch Sonnenlichtexposition festgestellt.

Abschließend wurden noch Proben frischer Mäuse-, Ratten- und Schweinehaut sowie eine Hautprobe, die von einer an Psoriasis leidenden Maus stammte, spektroskopisch vermessen. Die gewonnenen Spektren zeigten speziesspezifisch keine Unterschiede.

Our skin is exposed to various environmental factors, of which UV-irradiation is probably the most influential one. Thus, the topic of skin research in context with UV exposure has become increasingly important over the last decades. Besides a variety of other methods, confocal Raman spectroscopy has become one of the most important analytical methods in the field of skin research due to its non-invasive nature.

The first aim was to investigate the reproducibility of measurements conducted with a Raman spectroscope over a 12-week duration as well as the influence of seasonal change on relevant skin parameters via biophysical methods. Apart from a few fluctuations the spectroscopic results were overall comparable. A slight influence of seasonal change could be detected while investigating the concentrations of melanin and erythema in the skin and its surface humidity.

The second part of this work included the examination of porcine skin under different aspects. Firstly, the change in relevant skin parameters was investigated under different storage conditions (refrigerator, freezer) and after exposure to UV-irradiation. Secondly, the influence of UV-irradiation on the ability of caffeine to penetrate into the skin was examined. Whereas there was no visible change in the penetration properties of caffeine after exposure to UV-irradiation, a difference in the concentrations of NMF and surface humidity could be detected depending on different storage conditions and due to UV-irradiation.

Finally, porcine and rodent skin (rat, mouse and psoriatic mouse skin) were spectroscopically analysed. It was possible to obtain reproducible skin spectra for all species.

8. Literaturverzeichnis

Hier finden sich alle bei der Erstellung dieser Arbeit verwendeten Literaturangaben. Ich habe mich bemüht, sämtliche Inhaber*innen der Bildrechte ausfindig zu machen und ihre Zustimmung zur Verwendung der Bilder in dieser Arbeit eingeholt. Sollte dennoch eine Urheberrechtsverletzung bekannt werden, ersuche ich um Meldung bei mir.

- [1] N. Schürer und J. Kresken, *Die trockene Haut: Pathogenese, klinische Manifestationsformen, Probleme der Differentialdiagnose, Galenik, medikamentöse Möglichkeiten, Kosmetika*, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft Stuttgart GmbH, 2000.
- [2] K. W. Ng und W. M. Lau, „Skin Deep: The Basics of Human Skin Structure and Drug Penetration“, in: *Percutaneous Penetration Enhancers - Chemical Methods in Penetration Enhancement*, Hrsg. N. Dragicevic, H. Maibach, Springer Verlag Berlin Heidelberg, 2015, S. 3-11, doi: 10.1007/978-3-662-45013-0_1.
- [3] N. Jung, B. Vukosavljevic, und M. Windbergs, „Raman Spectroscopy in Skin Research and Dermal Drug Delivery“, in: *Confocal Raman Microscopy*, Hrsg. J. Toporski, T. Dieing, und O. Holtricher, Springer International Publishing, 2018, S. 421–448, doi: 10.1007/978-3-319-75380-5_17.
- [4] M. Gniadecka, O. F. Nielsen, D. H. Christensen, und H. C. Wulf, „Structure of Water, Proteins, and Lipids in Intact Human Skin, Hair, and Nail“, *J. Invest. Dermatol.*, Bd. 110, Nr. 4, S. 393–398, 1998, doi: 10.1046/j.1523-1747.1998.00146.x.
- [5] M. Ashtikar, C. Matthäus, M. Schmitt, C. Krafft, A. Fahr, und J. Popp, „Non-invasive depth profile imaging of the stratum corneum using confocal Raman microscopy: First insights into the method“, *Eur. J. Pharm. Sci.*, Bd. 50, Nr. 5, S. 601–608, 2013, doi: 10.1016/j.ejps.2013.05.030.
- [6] M. Egawa, „In vivo simultaneous measurement of Harnstoff and water in the human stratum corneum by diffuse-reflectance near-infrared spectroscopy“, *Skin Res. Technol.*, Bd. 15, Nr. 2, S. 195–199, 2009, doi: 10.1111/j.1600-0846.2009.00353.x.

- [7] M. Gniadecka, P. A. Philipsen, S. Sigurdsson, S. Wessel, O. F. Nielsen, D. H. Christensen, J. Hercogova, K. Rossen, H. K. Thomsen, R. Gniadecki, L. K. Hansen, und H. C. Wulf, „Melanoma Diagnosis by Raman Spectroscopy and Neural Networks: Structure Alterations in Proteins and Lipids in Intact Cancer Tissue“, *J. Invest. Dermatol.*, Bd. 122, Nr. 2, S. 443–449, 2004, doi: 10.1046/j.0022-202X.2004.22208.x.
- [8] L. Binder, E. M. Kulovits, R. Petz, J. Ruthofer, D. Baurecht, V. Klang, und C. Valenta, „Penetration monitoring of drugs and additives by ATR-FTIR spectroscopy/tape stripping and confocal Raman spectroscopy – A comparative study“, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, Bd. 130, S. 214–223, 2018, doi: 10.1016/j.ejpb.2018.07.007.
- [9] H. Spielmann, M. Balls, J. Dupuis, W. J. Pape, G. Pechovitch, O. de Silva, H.-G. Holzhütter, R. Clothier, P. Desolle, F. Gerberick, M. Liebsch, W. W. Lovell, T. Maurer, U. Pfannenbecker, J. M. Potthast, M. Csato, D. Sladowski, W. Steiling, und P. Brantom, „The International EU/COLIPA In Vitro Phototoxicity Validation Study: Results of Phase II (Blind Trial). Part 1: The 3T3 NRU Phototoxicity Test“, *Toxicol. In Vitro*, Bd. 12, Nr. 3, S. 305–327, 1998, doi: 10.1016/S0887-2333(98)00006-X.
- [10] L. Norlén und A. Al-Amoudi, „Stratum Corneum Keratin Structure, Function, and Formation: The Cubic Rod-Packing and Membrane Templating Model“, *J. Invest. Dermatol.*, Bd. 123, Nr. 4, S. 715–732, 2004, doi: 10.1111/j.0022-202X.2004.23213.x.
- [11] P. Clarys, K. Alewaeters, R. Lambrecht, und A. O. Barel, „Skin color measurements: comparison between three instruments: the Chromameter®, the DermaSpectrometer® and the Mexameter®“, *Skin Res. Technol.*, Bd. 6, Nr. 4, S. 230–238, 2000, doi: 10.1034/j.1600-0846.2000.006004230.x.
- [12] A. R. Matias, M. Ferreira, P. Costa, und P. Neto, „Skin colour, skin redness and melanin biometric measurements: comparison study between Antera(®) 3D, Mexameter(®) and Colorimeter(®)“, *Skin Res. Technol. Off. J. Int. Soc. Bioeng. Skin ISBS Int. Soc. Digit. Imaging Skin ISDIS Int. Soc. Skin Imaging ISSI*, Bd. 21, Nr. 3, S. 346–362, 2015, doi: 10.1111/srt.12199.
- [13] C. Huschka, „Untersuchungen zur Wirkung von Biotin auf humane Keratinozyten und zur Modulation der Biotinpenetration in humane Haut“, PhD

- Thesis, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Halle (Saale), Deutschland, 1998. [Online]. Verfügbar unter: <http://dx.doi.org/10.25673/2893>
- [14] S. Heuschkel, „Untersuchungen zum Mechanismus der Penetrationserhöhung durch Mikroemulsionen und neue Enhancer bei der dermalen Applikation von Wirkstoffen“, PhD Thesis, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Halle (Saale), Deutschland, 2009.
- [15] H. Hamperl, „Haut und Hautdrüsen“, in: *Lehrbuch der Allgemeinen Pathologie und der Pathologischen Anatomie*, Hrsg. H. Hamperl, Springer Berlin Heidelberg, 1950, S. 737–767, doi: 10.1007/978-3-662-28502-2_23.
- [16] A. Schäffer, „Aufbau und Funktion der Haut“. <https://www.apotheken.de/krankheiten/hintergrundwissen/4586-aufbau-und-funktion-der-haut> (zugegriffen Juni 01, 2021).
- [17] R. Neubert und R. Wepf, „Stratum corneum: Struktur und Morphologie einer Barriere“, *Pharm Ztg*, Bd. 152, S. 14–21, 2007.
- [18] W. Meyer, J. Kacza, N.-H. Zschemisch, S. Godynicki, und J. Seeger, „Observations on the actual structural conditions in the stratum superficiale dermidis of porcine ear skin, with special reference to its use as model for human skin“, *Ann. Anat. - Anat. Anz.*, Bd. 189, Nr. 2, S. 143–156, 2007, doi: 10.1016/j.aanat.2006.09.004.
- [19] N. Sekkat, Y. N. Kalia, und R. H. Guy, „Biophysical study of porcine ear skin in vitro and its comparison to human skin in vivo“, *J. Pharm. Sci.*, Bd. 91, Nr. 11, S. 2376–2381, 2002, doi: 10.1002/jps.10220.
- [20] V. Klang, J. C. Schwarz, B. Lenobel, M. Nadj, J. Auböck, M. Wolzt, und C. Valenta, „In vitro vs. in vivo tape stripping: Validation of the porcine ear model and penetration assessment of novel sucrose stearate emulsions“, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, Bd. 80, Nr. 3, S. 604–614, 2012, doi: 10.1016/j.ejpb.2011.11.009.
- [21] U. Jacobi, M. Kaiser, R. Toll, S. Mangelsdorf, H. Audring, N. Otberg, W. Sterry, und J. Lademann, „Porcine ear skin: an in vitro model for human skin“, *Skin Res. Technol.*, Bd. 13, Nr. 1, S. 19–24, 2007, doi: 10.1111/j.1600-0846.2006.00179.x.
- [22] T. G. Polefka, T. A. Meyer, P. P. Agin, und R. J. Bianchini, „Effects of Solar

- Radiation on the Skin“, *J. Cosmet. Dermatol.*, Bd. 11, Nr. 2, S. 134–143, 2012, doi: 10.1111/j.1473-2165.2012.00614.x.
- [23] M. S. Roberts, „Common skin conditions and disorders“, *Drug Discov. Today Dis. Mech.*, Bd. 5, Nr. 2, S. 125–126, 2008, doi: 10.1016/j.ddmec.2008.09.008.
- [24] B. Meffert und H. Meffert, „Optische Strahlung und ihre Wirkungen auf die Haut - Optical Radiation and its Effects on the Skin“, *Biomed. Tech. Eng.*, Bd. 45, Nr. 4, S. 98–104, 2000, doi: 10.1515/bmte.2000.45.4.98.
- [25] A. R. Svobodová, A. Galandáková, J. Šianská, D. Doležal, R. Lichnovská, J. Ulrichová, und J. Vostálová, „DNA damage after acute exposure of mice skin to physiological doses of UVB and UVA light“, *Arch. Dermatol. Res.*, Bd. 304, Nr. 5, S. 407–412, 2012, doi: 10.1007/s00403-012-1212-x.
- [26] L. Rittié und G. J. Fisher, „Natural and Sun-Induced Aging of Human Skin“, *Cold Spring Harb. Perspect. Med.*, Bd. 5, Nr. 1, S. a015370, 2015, doi: 10.1101/cshperspect.a015370.
- [27] Online-Lexikon, Artikel „Streuung“, <https://www.spektrum.de/lexikon/physik/streuung/14050> (zugegriffen Juni 26, 2021).
- [28] S. C. Pînzaru und W. Kiefer, „Raman’s Discovery in Historical Context“, in: *Confocal Raman Microscopy*, Hrsg. J. Toporski, T. Dieing, und O. Hollricher, Springer International Publishing, 2018, S. 3–21, doi: 10.1007/978-3-319-75380-5_1.
- [29] B. Dietzek, D. Cialla, M. Schmitt, und J. Popp, „Introduction to the Fundamentals of Raman Spectroscopy“, in: *Confocal Raman Microscopy*, Hrsg. J. Toporski, T. Dieing, und O. Hollricher, Springer International Publishing, 2018, S. 47–68, doi: 10.1007/978-3-319-75380-5_3.
- [30] S. Bienz, L. Bigler, T. Fox, und H. Meier, *Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie*, 9. Auflage, Georg Thieme Verlag Stuttgart, 2016.
- [31] H. Vortisch, „Beobachtung von Phasenübergängen in einzeln levitierten Schwefelsäuretröpfchen mittels Raman-Spektroskopie und elastischer Lichtstreuung“, PhD Thesis, Freie Universität Berlin, 2002. [Online]. Verfügbar unter: <http://dx.doi.org/10.17169/refubium-8424>
- [32] Online-Lexikon, Artikel „Raman-Spektroskopie“, <https://www.spektrum.de>

- /lexikon/chemie/raman-spektroskopie/7804 (zugegriffen Juni 27, 2021).
- [33] Online-Lexikon, Artikel „Raman-Spektroskopie“. <https://www.spektrum.de/lexikon/optik/raman-spektroskopie/2746> (zugegriffen Aug. 06, 2021).
- [34] RiverD International B.V., „gen2-SCA Skin Composition Analyzer with RiverIcon 3.2 control software, Operator Manual“, 2014.
- [35] L. E. Masson, C. M. O'Brien, I. J. Pence, J. L. Herington, J. Reese, T. G. van Leeuwen, und A. Mahadevan-Jansen, „Dual excitation wavelength system for combined fingerprint and high wavenumber Raman spectroscopy“, *Analyst*, Bd. 143, Nr. 24, S. 6049–6060, 2018, doi: 10.1039/C8AN01989D.
- [36] P. J. Caspers, G. W. Lucassen, H. A. Bruining, und G. J. Puppels, „Automated depth-scanning confocal Raman microspectrometer for rapid in vivo determination of water concentration profiles in human skin“, *J. Raman Spectrosc.*, Bd. 31, Nr. 8–9, S. 813–818, 2000, doi: 10.1002/1097-4555(200008/09)31:8/9<813::AID-JRS573>3.0.CO;2-7.
- [37] L. dos Santos, V. K. Tippavajhala, T. O. Mendes, M. G. Pereira da Silva, P. P. Fávero, C. A. Téllez Soto, und A. A. Martin, „Evaluation of penetration process into young and elderly skin using confocal Raman spectroscopy“, *Vib. Spectrosc.*, Bd. 100, S. 123–130, 2019, doi: 10.1016/j.vibspec.2018.11.010.
- [38] M. Höltje, T. Förster, B. Brandt, T. Engels, W. von Rybinski, und H.-D. Höltje, „Molecular dynamics simulations of stratum corneum lipid models: fatty acids and cholesterol“, *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.*, Bd. 1511, Nr. 1, S. 156–167, 2001, doi: 10.1016/S0005-2736(01)00270-X.
- [39] C. Choe, J. Schleusener, J. Lademann, und M. E. Darvin, „Keratin-water-NMF interaction as a three layer model in the human stratum corneum using in vivo confocal Raman microscopy“, *Sci. Rep.*, Bd. 7, Nr. 1, S. 15900, 2017, doi: 10.1038/s41598-017-16202-x.
- [40] S. Kezic, A. Kammeyer, F. Calkoen, J. W. Fluhr, und J. D. Bos, „Natural moisturizing factor components in the stratum corneum as biomarkers of filaggrin genotype: evaluation of minimally invasive methods“, *Br. J. Dermatol.*, Bd. 161, Nr. 5, S. 1098–1104, 2009, doi: 10.1111/j.1365-2133.2009.09342.x.
- [41] E. Boireau-Adamezyk, A. Baillet-Guffroy, und G. N. Stamatas, „The stratum corneum water content and natural moisturization factor composition evolve

- with age and depend on body site“, *Int. J. Dermatol.*, Bd. 60, Nr. 7, S. 834–839, 2021, doi: 10.1111/ijd.15417.
- [42] M. Robinson, M. Visscher, A. Laruffa, und R. Wickett, „Natural moisturizing factors (NMF) in the stratum corneum (SC). I. Effects of lipid extraction and soaking“, *J. Cosmet. Sci.*, Bd. 61, Nr. 1, S. 13–22, 2010.
- [43] J. P. Marty, „[NMF and cosmetology of cutaneous hydration“, *Ann. Dermatol. Venereol.*, Bd. 129, Nr. 1 Pt 2, S. 131–136, 2002.
- [44] G. Grubauer, P. M. Elias, und K. R. Feingold, „Transepidermal water loss: the signal for recovery of barrier structure and function.“, *J. Lipid Res.*, Bd. 30, Nr. 3, S. 323–333, 1989, doi: 10.1016/S0022-2275(20)38361-9.
- [45] Q. Zhang, M. Murawsky, T. LaCount, G. B. Kasting, und S. K. Li, „Transepidermal water loss and skin conductance as barrier integrity tests“, *Toxicol. In Vitro*, Bd. 51, S. 129–135, 2018, doi: 10.1016/j.tiv.2018.04.009.
- [46] V. Klang, „Der Weg über die Hautbarriere: Dermale Systeme in der pharmazeutischen Technologie“, Vorlesung Universität Wien, 2019.
- [47] „AquaFlux™ Model AF200 - TEWL measurement“, *Biox Systems Ltd.* <https://www.bioxsystems.com/products/aquaflux/> (zugegriffen Juli 12, 2021).
- [48] J. Nuutinen, E. Alanen, P. Autio, M.-R. Lahtinen, I. Harvima, und T. Lahtinen, „A closed unventilated chamber for the measurement of transepidermal water loss“, *Skin Res. Technol.*, Bd. 9, Nr. 2, S. 85–89, 2003, doi: 10.1034/j.1600-0846.2003.00025.x.
- [49] „Product Description“, *Biox Systems Ltd.* <https://www.bioxsystems.com/products/aquaflux/product-description/> (zugegriffen Juli 12, 2021).
- [50] M. A. Yokus und M. A. Daniele, „Skin Hydration Sensor for Customizable Electronic Textiles“, *MRS Adv.*, Bd. 1, Nr. 38, S. 2671–2676, 2016, doi: 10.1557/adv.2016.540.
- [51] „Epsilon™ Model E100“, *Biox Systems Ltd.* <https://www.bioxsystems.com/products/epsilon-model-e100/> (zugegriffen Juli 14, 2021).
- [52] W. Pan, X. Zhang, E. Chirikhina, C. Bontozoglou, und P. Xiao, „Measurement of

- Skin Hydration with a Permittivity Contact Imaging System“, S. 5 [Online] verfügbar unter http://tst.pg2.at/abstracts/data/full_papers/full_paper_339.pdf (zugegriffen August 24, 2021)
- [53] Biox Systems Ltd., „Biox Epsilon Instructor Manual“, 2018.
- [54] K. O’goshi und J. Serup, „Inter-instrumental variation of skin capacitance measured with the Corneometer®“, *Skin Res. Technol.*, Bd. 11, Nr. 2, S. 107–109, 2005, doi: 10.1111/j.1600-0846.2005.00086.x.
- [55] P. Clarys, R. Clijsen, J. Taeymans, und A. Barel, „Hydration measurements of the stratum corneum: comparison between the capacitance method (digital version of the Corneometer CM 825 (R)) and the impedance method (Skicon-200EX (R))“, *Skin Res. Technol. Off. J. Int. Soc. Bioeng. Skin ISBS Int. Soc. Digit. Imaging Skin ISDIS Int. Soc. Skin Imaging ISSI*, Bd. 18, S. 316–23, 2011, doi: 10.1111/j.1600-0846.2011.00573.x.
- [56] „Courage + Khazaka Electronic, Köln - Alle Wissenschaftliche Produkte“. <https://www.courage-khazaka.de/de/wissenschaftliche-produkte/alle> (zugegriffen Juli 14, 2021).
- [57] Courage + Khazaka electronic GmbH, „Information und Gebrauchsanweisung zum Kombigerät Derma Unit SSC 3 und der Software für Windows“, 2008.
- [58] Courage + Khazaka electronic GmbH, „Information and Instruction Manual Derma Unit SSC 3 and the Windows Software“, 2020.
- [59] C. Ehlers, U. I. Ivens, M. L. Møller, T. Senderovitz, und J. Serup, „Comparison of two pH meters used for skin surface pH measurement: the pH meter ‘pH900’ from Courage & Khazaka versus the pH meter ‘1140’ from Mettler Toledo“, *Skin Res. Technol.*, Bd. 7, Nr. 2, S. 84–89, 2001, doi: 10.1034/j.1600-0846.2001.70205.x.
- [60] C. Ehlers, U. I. Ivens, M. L. Møller, T. Senderovitz, und J. Serup, „Females have lower skin surface pH than men“, *Skin Res. Technol.*, Bd. 7, Nr. 2, S. 90–94, 2001, doi: 10.1034/j.1600-0846.2001.70206.x.
- [61] M.-H. Schmid-Wendtner und H. C. Korting, „The pH of the Skin Surface and Its Impact on the Barrier Function“, *Skin Pharmacol. Physiol.*, Bd. 19, Nr. 6, S. 296–302, 2006, doi: 10.1159/000094670.

- [62] „Courage + Khazaka Electronic, Köln - Skin-pH-Meter PH 905“. <https://www.courage-khazaka.de/de/wissenschaftliche-produkte/alle/16-wissenschaftliche-produkte/alle-produkte/96-ph-meter-d> (zugegriffen Juli 15, 2021).
- [63] M. Baquié und B. Kasraee, „Discrimination between cutaneous pigmentation and erythema: Comparison of the skin colorimeters Dermacatch and Mexameter“, *Skin Res. Technol.*, Bd. 20, Nr. 2, S. 218–227, 2014, doi: 10.1111/srt.12109.
- [64] „Courage + Khazaka Electronic, Köln - Mexameter® MX 18“. <https://www.courage-khazaka.de/de/wissenschaftliche-produkte/alle/16-wissenschaftliche-produkte/alle-produkte/92-mexameter-d> (zugegriffen Juli 31, 2021).
- [65] J. Stump, „Antiinflammatorische Wirkung von Aloe vera Gel (97,5%) im UV-Erythemtest, eine monozentrische, randomisierte, placebokontrollierte Doppelblindstudie“, PhD Thesis, Albert-Ludwigs-Universität Freiburg i. Br., Deutschland, 2006. [Online]. Verfügbar unter: urn:nbn:de:bsz:25-opus-28428
- [66] Courage + Khazaka electronic GmbH, „Information und Bedienungsanleitung für die Mexameter MX 18 Sonde“, 2020.
- [67] N. Matsumoto, A. Akimoto, H. Kawashima, und S. Kim, „Comparative study of skin phototoxicity with three drugs by an *in vivo* mouse model“, *J. Toxicol. Sci.*, Bd. 35, Nr. 1, S. 97–100, 2010, doi: 10.2131/jts.35.97.
- [68] L. R. Gaspar, J. Tharmann, P. M. B. G. Maia Campos, und M. Liebsch, „Skin phototoxicity of cosmetic formulations containing photounstable and photostable UV-filters and vitamin A palmitate“, *Toxicol. In Vitro*, Bd. 27, Nr. 1, S. 418–425, 2013, doi: 10.1016/j.tiv.2012.08.006.
- [69] K. Kim, H. Park, und K.-M. Lim, „Phototoxicity: Its Mechanism and Animal Alternative Test Methods“, *Toxicol. Res.*, Bd. 31, Nr. 2, S. 97–104, 2015, doi: 10.5487/TR.2015.31.2.097.
- [70] „UV-LED und UV-Produktinformationen zum Download“. <https://www.hoenle.de/produkte/download-produktinformation> (zugegriffen Juli 18, 2021).
- [71] L. Luo und M. E. Lane, „Topical and transdermal delivery of caffeine“, *Int. J.*

- Pharm.*, Bd. 490, Nr. 1, S. 155–164, 2015, doi: 10.1016/j.ijpharm.2015.05.050.
- [72] „PharmaWiki - Coffein“. <https://www.pharmawiki.ch/wiki/index.php?wiki=coffein> (zugegriffen Juli 21, 2021).
- [73] K. Nieber, S. Felke, A. Schmalz, „Coffein: Genussmittel und Arzneistoff“, *Pharmazeutische Zeitung online*, 2007, <https://www.pharmazeutische-zeitung.de/ausgabe-042007/coffein-genussmittel-und-arzneistoff/> (zugegriffen Juli 21, 2021).
- [74] Y.-F. Li, S.-H. Ouyang, L.-F. Tu, X. Wang, W.-L. Yuan, G.-E. Wang, Y.-P. Wu, W.-J. Duan, H.-M. Yu, Z.-Z. Fang, H. Kurihara, Y. Zhang, und R.-R. He, „Caffeine Protects Skin from Oxidative Stress-Induced Senescence through the Activation of Autophagy“, *Theranostics*, Bd. 8, Nr. 20, S. 5713–5730, 2018, doi: 10.7150/thno.28778.
- [75] C. Kim, J. Shim, und S. Han, „The skin-permeation-enhancing effect of phosphatidylcholine: Caffeine as a model active ingredient“, *J. Cosm. Sci.*, Bd. 53, Nr. 6, S. 363-74, 2002,
- [76] M. Dias, A. Farinha, E. Faustino, J. Hadgraft, J. Pais, und C. Toscano, „Topical delivery of caffeine from some commercial formulations“, *Int. J. Pharm.*, Bd. 182, Nr. 1, S. 41–47, 1999, doi: 10.1016/S0378-5173(99)00067-8.
- [77] N. H. C. S. Silva, I. Drumond, I. F. Almeida, P. Costa, C. F. Rosado, C. P. Neto, C. S. R. Freire, und A. J. D. Silvestre, „Topical caffeine delivery using biocellulose membranes: a potential innovative system for cellulite treatment“, *Cellulose*, Bd. 21, Nr. 1, S. 665–674, 2014, doi: 10.1007/s10570-013-0114-1.
- [78] „RiverD International B.V. - Raman spectroscopy, Skin Analysis, Bacterial typing“, <https://www.riverd.com/> (zugegriffen Juli 24, 2021).
- [79] J. M. Crowther, A. Sieg, P. Blenkiron, C. Marcott, P. J. Matts, J. R. Kaczvinsky, und A. V. Rawlings, „Measuring the effects of topical moisturizers on changes in stratum corneum thickness, water gradients and hydration in vivo“, *Br. J. Dermatol.*, Bd. 159, Nr. 3, S. 567–577, 2008, doi: 10.1111/j.1365-2133.2008.08703.x.
- [80] G. N. Stamatias, J. de Sterke, M. Hauser, O. von Stetten, und A. van der Pol, „Lipid uptake and skin occlusion following topical application of oils on adult and infant skin“, *J. Dermatol. Sci.*, Bd. 50, Nr. 2, S. 135–142, 2008, doi:

10.1016/j.jdermsci.2007.11.006.

- [81] C. J. Sully, K. L. Olds, und N. E. I. Langlois, „Evaluation of a model of bruising in pigmented skin for investigating the potential for alternate light source illumination to enhance the appearance of bruises by photography of visible and infrared light“, *Forensic Sci. Med. Pathol.*, Bd. 15, Nr. 4, S. 555–563, 2019, doi: 10.1007/s12024-019-00135-0.
- [82] K. Song, S. M. An, M. Kim, J.-S. Koh, und Y. C. Boo, „Comparison of the antimelanogenic effects of p-coumaric acid and its methyl ester and their skin permeabilities“, *J. Dermatol. Sci.*, Bd. 63, Nr. 1, S. 17–22, 2011, doi: 10.1016/j.jdermsci.2011.03.012.
- [83] V. Klang, J. C. Schwarz, S. Haberfeld, P. Xiao, M. Wirth, und C. Valenta, „Skin integrity testing and monitoring of in vitro tape stripping by capacitance-based sensor imaging“, *Skin Res. Technol.*, Bd. 19, Nr. 1, S. e259–e272, 2013, doi: 10.1111/j.1600-0846.2012.00637.x.