AUS DEM LEHRSTUHL FÜR DERMATOLOGIE
PROF. DR. MED. DR. H.C. M. LANDTHALER
DER MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

FLUORESZENZINDUKTION UND RELATIVES PENETRATIONSVERHALTEN VERSCHIEDENER 5-AMINOLÄVULINSÄURE/-METHYLESTER FORMULIERUNGEN AM EX-VIVO SCHWEINEHAUTMODELL

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Medizinischen Fakultät
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Christine Worlicek

2008

AUS DEM LEHRSTUHL FÜR DERMATOLOGIE
PROF. DR. MED. DR. H.C. M. LANDTHALER
DER MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

FLUORESZENZINDUKTION UND RELATIVES PENETRATIONSVERHALTEN VERSCHIEDENER 5-AMINOLÄVULINSÄURE/-METHYLESTER FORMULIERUNGEN AM EX-VIVO SCHWEINEHAUTMODELL

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Medizinischen Fakultät
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Christine Worlicek

2008

Dekan:	Prof. Dr. Bernhard Weber
1. Berichterstatter:	Prof. Dr. Rolf-Markus Szeimies
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. Martin Fleck
Tag der mündlichen Prüfung:	27.04.2009

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

I. EINLEITUNG 1

1. Geschichte der photodynamischen Therapie 1
2.1. Mechanismus der photodynamischen Therapie 3
2.2. Photosensibilisatoren 5
2.3. Prodrugs 6
2.4. Anwendungsbereiche der PDT in der Dermatologie 7
2.5. Lichtquellen 7

3. Vorteile der PDT 8

4. Schweinehautmodell 8

II. MATERIAL UND METHODEN 10

1. Material 10
1.1. Präparation der Schweinehaut 10
1.2. Formulierungen 10
1.3. Reagenzien, Zusammensetzungen und Equipment 10

2. Methoden 11
2.1. Präparation der Schweinehaut 11
2.2. Präparation der Schweinehaut ohne Stratum corneum 13
2.2.1. Entfernen des Stratum corneum durch „Tape-Stripping“ 13
2.2.2. Entfernen des Stratum corneum durch Abbrühen 13
2.2.3. Entfernen des Stratum corneum mit einem Metall-Spatel 13
2.2.4. Auswertung unterschiedlicher „Tape-Stripping“ Methoden 14
2.3. Bestimmung der Fluoreszenzinduktion und der relativen Penetration 14
2.3.1. Auftragen der Formulierungen 14
2.3.1.1. *Metvix®* (16% 5-Aminolävulinsäure-Methylester als Hydrochlorid) 15
2.3.1.2. *Levulan® Kerastick®* (20% 5-Aminolävulinsäurehydrochlorid) 15
2.3.1.3. *5-ALA (20%) in hydrophilem Gel mit 40% DMSO und ohne DMSO* 15
2.3.1.4. *5-ALA (20%) in Psoralon-Fettcreme* 15
2.3.1.5. *5-ALA (20%) in Unguentum emulsificans aquosum* 15
2.3.2. Unterschiedliche Inkubationsbedingungen (Temperaturen) 16
2.3.3. Entnahme von Gewebe 16
2.3.4. Kryoschnitte 17
2.3.5. Paraffin 17

2.3.6. Vitalitätsnachweis 17
2.3.7. Aufnahmen 17
2.3.8. Bestimmung der mittleren Fluoreszenzinduktion 18
2.3.9. Bestimmung der relativen Eindringtiefe als Marker für die Verteilung von PPIX 19
2.4. Bestrahlung 20
2.4.1. Bestrahlung von Haut mit und ohne Stratum corneum 20
2.5. Histologische Färbungen 20
2.5.1. HE-Färbung an kryokonservierten Gewebeschnitten 20
2.5.2. NBTC 20
2.5.3. TUNEL- Assay 21

III. ERGEBNISSE 22

1. Vitalitätsnachweis der Schweinehaut nach 24h 23

2. Vergleich der Fluoreszenzinduktion und der Penetrationseigenschaften der einzelnen 5-Aminolävulinsäure/-methylester Formulierungen an intakter Schweinehaut 24
2.1. Inkubation der Schweinehaut mit den verschiedenen Formulierungen 24
2.2. Nachweis der Aufnahme und Umsetzung von 5-Aminolävulinsäure/-methylester (5-ALA/ -Methylester) zu Protoporphyrin IX (PPIX) 24
2.3. Vergleich der mittleren Fluoreszenzintensitäten 27
2.3.1. Vergleich der mittleren Fluoreszenzintensität bei 37°C 27
2.3.2. Vergleich der mittleren Fluoreszenzintensität bei 32°C 29
2.3.3. Vergleich der Fluoreszenzintensität bei 4°C 31
2.3.4. Vergleich der Fluoreszenzintensität bei 32°C und 37°C 32
2.4.1. Vergleich der relativen Eindringtiefen bei 37°C 33
2.4.2. Vergleich der relativen Eindringtiefen bei 32°C 35
2.4.3. Vergleich der relativen Eindringtiefen bei 4°C 37

3. Vergleich der Fluoreszenzinduktion und der Penetrationseigenschaften der einzelnen 5-Aminolävulinsäure/-methylester Formulierungen an gestrippter Schweinehaut 40
3.1. Entfernen des Stratum corneum 40
3.1.1. Entfernen des Stratum corneum durch Abbrühen 40
3.1.2. Entfernen des Stratum corneum mit einem Metallspatel 41
3.1.3. Entfernen des Stratum corneum durch „Tape-Stripping“ 42
3.2. Vergleich der mittleren Fluoreszenzintensitäten 43
3.2.1. Vergleich der mittleren Fluoreszenzintensität bei 37°C 43
3.2.2. Vergleich der Fluoreszenzintensität an intakter und gestrippter Schweinehaut 45
3.2.4. Vergleich der relativen Penetration an intakter und „gestrippter“ Schweinehaut 47

4. Bestrahlung der Schweinehaut 48
4.1. Bestrahlung der Schweinehaut bei erhaltenem Stratum corneum 48
4.2. Apoptosenachweis mit NBTC 48
4.3. Apoptosenachweis mit TUNEL 49

IV. DISKUSSION 51

1. Ex vivo Schweinehautmodell 51

2. Mittlere Fluoreszenzintensität und relative Penetration an intakter Haut in Abhängigkeit von der Temperatur 52

3. Fluoreszenzintensität und relative Penetration an intakter Haut in Abhängigkeit der Formulierung 55

4. Entfernen des Stratum corneum 62

5. Mittlere Fluoreszenz und relative Penetration an „gestrippter" Haut 63

6. Bestrahlung 64

V. ZUSAMMENFASSUNG 66

VI. LITERATURVERZEICHNIS 67

VII. ANHANG 73

1. Reagenzien, Zusammensetzungen und Equipment 73
1.1. Formulierungen 73
1.2. HEPES-Agar 73
1.3. HE-Färbung 74
1.4. NBTC-Färbung 74
1.5. TUNEL 74
1.6. Sonstiges 75

2. Abkürzungsverzeichnis 76

3. CURRICULUM VITAE 77

4. Danksagung 79

I. Einleitung

1. Geschichte der photodynamischen Therapie

Aus antiken ägyptischen Schriften von 1300 v. Chr. geht hervor, dass bereits zu dieser Zeit die ägyptischen Gelehrten um den Nutzen von Sonnenlicht wussten und dieses Wissen auch therapeutisch einsetzten. So wurde z. B. die Weißfleckenkrankheit (Vitiligo) mit Pflanzensäften und Sonnenlicht behandelt. Auch Abn Mohamed Abdullah Ben Ahmed („Ebn Baithar“) aus Malaga um 1200 v. Chr. und Hippokrates (460-375 v. Chr.) berichteten von ihren Erfahrungen mit der Kombination aus photosensibilisierenden Medikamenten und nachfolgender Bestrahlung mit Sonnenlicht [1].

Im 19. Jahrhundert wurden bereits zahlreiche Arbeiten über beobachtete Photoreaktionen verfasst. Man erkannte, dass gewisse Medikamente auch in höheren Konzentrationen harmlos waren, solange das Sonnenlicht nach der Verabreichung gemieden wurde. Oskar Raab nutzte 1897 erstmalig den wirkungsverstärkenden Effekt des Lichtes therapeutisch aus. Er untersuchte den Einfluss von Acridin und seinen Derivaten auf Infusorien und andere Protozoen *in vitro* mit unterschiedlichen Farbstoffkonzentrationen, um die Schwellenkonzentration ihrer Toxizität zu bestimmen. Da die Ergebnisse der über 800 Teilversuche inkonsistent und nicht reproduzierbar waren, überprüfte Raab zusammen mit seinem Doktorvater Professor Hermann von Trappeiner die einzelnen Versuchsparameter und bemerkte, dass der einzige Parameter, der sich stets veränderte, das Tageslicht war [2]. Von Trappeiner prägte 1904 den Begriff „photodynamische Reaktion“. Er vermutete damals einen fluoreszenzbasierten Effekt [3].

1902 fand Ledoux-Lebards heraus, dass die photodynamische Therapie (PDT) bei Paramezien unter Verwendung von Eosin effektiver in einer offenen Flasche war als in einer geschlossenen. Er folgerte, dass Sauerstoff eine Grundvoraussetzung für den Ablauf der PDT sei [4]. 1909 schrieb auch von Trappeiner, dass die Anwesenheit von Sauerstoff für die Wirkung der PDT verantwortlich sei [5].

Bereits 1903 führte von Trappeiner erste therapeutische Experimente mittels phototoxischer Reaktionen in der Behandlung von Pityriasis, Lupus vulgaris, Hautkrebs, Tuberkulose, Syphillis der Haut und Molluscum contagiosum durch Auftragung eines eosinhaltigen Farbstoffes auf die Haut und nachfolgender Bestrahlung mit Licht durch. Aufgrund unbefriedigender therapeutischer Ergebnisse wurden diese Behandlungen jedoch bald abgebrochen. Neben Farbstoffen wie Eosin, Acridin und Chinidin wurden nun auch andere fluoreszierende Farbstoffe untersucht [1].

Walter Hausmann untersuchte seit 1908 in Wien die photodynamischen Effekte von Chlorophyll an roten Blutzellen. Er verwendete auch das strukturell ähnliche

Hämatoporphyrin (Hp), ein eisenfreies Hämderivat [6]. Im Tierexperiment erlitten Mäuse, die 2 mg Hp erhielten und dem Sonnenlicht ausgesetzt wurden Erytheme, Ödeme und sogar Hautnekrosen. Im Gegensatz dazu zeigten Mäuse, die 10 mg Hp verabreicht bekamen und im Dunkeln gehalten wurden keine Reaktionen [7].

Am 12. Oktober 1912 führte Friedrich Meyer-Betz an der Klinik der Universität München einen heroischen Selbstversuch durch: Er injizierte sich selbst 200 mg Hp und bestrahlte darauf hin ein kleines Hautareal seines Unterarmes mit dem Licht einer Finsen-Lampe. Es entstanden Ulzerationen. Selbst Tage danach erlitt er während einer Bahnfahrt eine massive, systemische phototoxische Reaktion mit Hautschwellungen und brennenden Schmerzen [8].

Ein weiterer Fortschritt für die PDT war die Entdeckung der Akkumulation und Retention von Hp im Zentrum eines frisch exzidierten Rattensarkoms, dargestellt in Form einer rötlichen Fluoreszenz durch Albert Policard, einem französichen Arzt [9]. Auch Auler und Banzer detektierten 1942 eine rote Fluoreszenz in Tumorarealen, Metastasen und Lymphbahnen nach subkutaner oder intravenöser Applikation von Hp [10].

Im Jahr 1948 bestätigte Figge diese Ergebnisse und schlug Hp als geeigneten Photosensibilisator für die PDT vor. Aufgrund seiner Unreinheit und der Tatsache, dass es sich bei Hp um ein Gemisch aus verschiedenen Porphyrinen handelte, das zu schweren phototoxischen Reaktionen führte, wurde es jedoch schließlich als unpraktisch erachtet [11]. Samuel Schwarz entwickelte daraufhin 1955 ein Hämatoporphyrin-Derivat (HpD). Diese Mixtur war mit hydrophoben oligomeren Porphyrinen angereichert [12].

1973 berichtete Thomas Dougherty über eine reduzierte Wachstumsgeschwindigkeit von transplantierten Mammakarzinomen in Mäusen nach Sensibilisierung mit Fluoreszin und anschließender Bestrahlung [13]. Er postulierte daraufhin die Kriterien für einen erfolgreichen Photosensibilisator für die PDT:

(1) keine Toxizität für gesunde Zellen bei therapeutischen Dosen, (2) definierte Aufnahme und Anreicherung im erkrankten Gewebe, (3) Aktivierung durch Licht im Wellenlängenbereich über 600 nm und (4) photochemische Aktivität (ausreichende oxidative Schädigung des erkrankten Gewebes).

Der Sensibilisator Dihämatoporphyrinether (DHE) erfüllte diese Kriterien.

1978 veröffentlichte Dougherty eine Arbeit über 25 Patienten mit kutanen oder subkutanen Tumoren, die mit 2,5-5 mg/kg Körpergewicht HpD oder DHE intravenös behandelt wurden. Anschließend wurden sie mit gefiltertem roten Licht (600-700 nm) aus einer Xenon-Bogenlampe bestrahlt. Die Applikationsintervalle zwischen Sensibilisator und Licht mit dem höchsten Verhältnis zwischen Haut- und Tumorreaktion lagen im Bereich von 3-4 Tagen. Insgesamt zeigten 111 von 113 Tumoren eine komplette oder zumindest partielle Remission [14].

Heutzutage wird die PDT in verschiedenen medizinischen Fachbereichen erfolgreich eingesetzt. So z. B. in der Gastroenterologie, der Urologie, der Gynäkologie, in der Hals-, Nasen-, Ohrenheilkunde, der Neurochirurgie und vielen anderen Fächern. Eine besonders wichtige Rolle spielt die topische PDT zunehmend in der Dermatologie bei der Behandlung von epithelialen Tumoren, wie dem Basalzellkarzinom, und aktinischen Keratosen [15].

2. Photodynamische Therapie

2.1. Mechanismus der photodynamischen Therapie

Die photodynamische Therapie (PDT) ist eine Form der Photochemotherapie, die eingesetzt wird zur Behandlung von Tumoren, die weniger als 3 mm in die Haut reichen [15], prämalignen Veränderungen der Haut und verschiedener Hohlorgane, aber auch von nicht-onkologischen Erkrankungen, wie der altersbedingten Makuladegeneration. Grundlage der PDT ist die Interaktion zwischen Photosensibilisator und sichtbarem Licht in Anwesenheit von Sauerstoff (Abb. 1).

Diese drei Komponenten bilden die Grundlage der photooxidativen Reaktionen vom Typ-I- oder Typ-II-Mechanismus. Bei der photooxidativen Reaktion vom Typ-I reagieren die Photosensibilisatormoleküle als Elektronenakzeptoren unter Bildung von Radikalen oder Radikalanionen, die sich mit molekularem Sauerstoff zu Superoxidradikalen ($O_2^{\cdot-}$ oder $HO_2^{\cdot}$) umsetzen können. Desweiteren entstehen Peroxide, die Radikalkettenreaktionen initiieren, und Wasserstoffperoxid (H_2O_2), aus dem wiederum das äußerst reaktive Hydroxylradikal ($HO^{\cdot}$) entsteht. Beim Typ-II-Mechanismus wird durch direkte Energieübertragung von Photosensibilisatormolekülen auf molekularen Sauerstoff hochreaktiver Singulett-Sauerstoff ($^1O_2$) gebildet [16]. Dieser reagiert anschließend mit seiner direkten Umgebung, dem Gewebe. Singulett-Sauerstoff ist hoch reaktiv und äußerst zytotoxisch. Er oxidiert Aminosäuren mit elektronenreichen Seitenketten, Nukleinsäuren, Fettsäuren, Phospholipide und Cholesterin [13, 17, 18]. Abhängig von der Konzentration der reaktiven Sauerstoffspezies und ihrer subzellulären Lokalisation kommt es durch die oxidative Modifikation zu einer Aktivierung und/oder Inhibierung der zellulären Funktionen (Low-dose PDT) oder aber zum Zelltod durch Nekrose bzw. Apoptose (High-dose PDT) [19]. Dementsprechend wird die Low-dose Therapie zur Behandlung von entzündlichen Hauterkrankungen, die High-dose Therapie zur Behandlung von Tumorerkrankungen eingesetzt. Beim energetischen Rückfall des angeregten Photosensibilisators vom Singulett-Zustand in den Grundzustand kann Licht als Fluoreszenz emittiert werden, was in der Diagnostik von großem Nutzen ist. Die

charakteristische Fluoreszenz dient der Visualisierung (Erkennung und Abgrenzung) von Tumoren und prämalignen Veränderungen.
Der Vorteil von Licht des roten Spektralbereichs liegt in der geringen Absorption (Ursache ist der kleine Absorptionskoeffizient endogener Chromophore) sowie der geringen Streuung des Gewebes in diesem Bereich.
Der limitierende Faktor für die Entstehung der reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) ist die Eindringtiefe des Lichtes, das somit das Anwendungsspektrum der photodynamischen Therapie auf superfizielle Läsionen beschränkt [20].

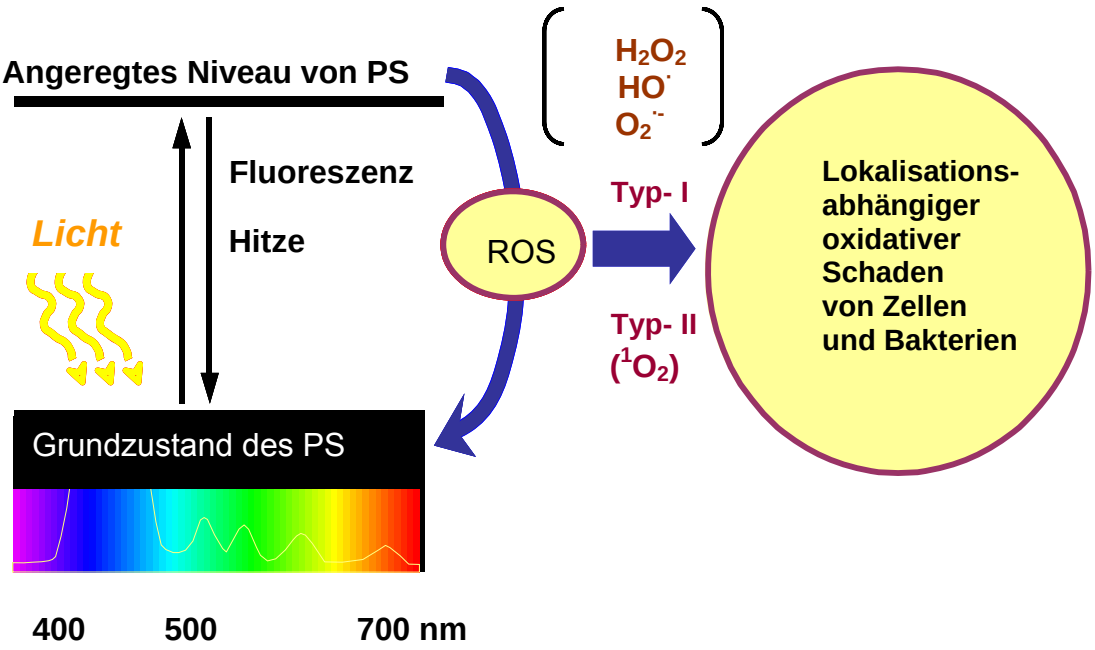


Abb. 1: Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS)
Nach Absorption von Licht kann die Energie des angeregten Photosensibilisators (PS) als Fluoreszenz abgegeben, in Wärme umgewandelt oder zur Erzeugung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) verwendet werden. Nach Erzeugung der ROS kommt es abhängig von der Lokalisation des PS in direkter Nähe zur oxidativen Schädigung des Gewebes. Entweder kann die Energie auf Substrat (Typ-I) direkt übertragen werden, wodurch sich im Verlauf Sauerstoffradikale ($HO^{\cdot}$ oder $O_2^{\cdot -}$) und Wasserstoffperoxid bilden. In der Typ-II-Reaktion wird die Energie direkt auf Sauerstoff übertragen, der in den hochreaktiven Singulett-Sauerstoff ($^1O_2$) übergeht.

2.2. Photosensibilisatoren

Grundlage für die Entwicklung von neuen Wirkstoffen für die photodynamische Therapie ist das Hämatoporphyrinderivat, ein Photosensibilisator der ersten Generation. Von ihm leiten sich die Kriterien für die Entwicklung eines Photosensibilisators der zweiten Generation ab:
(1) Chemisch stabile Reinsubstanz, (2) bessere Absorptionscharakteristika (längerwelliges Absorptionsmaximum und höherer Absorptionskoeffizient), (3) höhere Fluoreszenz-Quantenausbeute bei diagnostischer Anwendung bzw. höhere Singulett-Sauerstoff-Quantenausbeute bei therapeutischer Anwendung und (4) bessere pharmakokinetische Eigenschaften (höhere Tumorselektivität und schnelle Ausscheidung) [21].
Die strukturelle Gemeinsamkeit der meisten Photosensibilisatoren ist ein ausgedehntes konjugiertes π-Elektronensystem (meist 14π-System), das die Voraussetzung für die Absorption von Licht des roten Spektralbereichs ist.
Um eine Verschiebung des Absorptionsmaximums in den längerwelligen Spektralbereich zu erreichen kann entweder das konjugierte π-Elektronensystem erweitert werden (z. B. Phthalocyanine, Lutetium-Texaphyrin) oder es können ein bis zwei Pyrroluntereinheiten der Porphyringrundstruktur reduziert werden (Substanzklassen: Chlorine, Bakteriochlorine). Durch die chemische Instabilität (Absenkung des Redoxpotientials) und die Energie des T_1-Zustandes des Chromophors (>94 kJ/mol für die Bildung von Singulett-Sauerstoff) sind hier allerdings Grenzen gesetzt [22]. Die Steigerung der Singulett-Sauerstoff-Quantenausbeute wird durch den Einbau eines diamagnetischen Metallions, z. B. Zinn (Sn), erreicht. Die pharmakokinetischen Eigenschaften werden durch die Hydrophilie des Photosensibilisators bestimmt und können durch die Modifizierung von Substituenten beeinflusst werden [21]. Aufgrund ihrer Molekülgröße eignen sich die heute verwendeten Photosensibilisatore, wie die gereinigten Formen des Hämatoporphyrin-Derivats (Photofrin® und Photosan®), Verteporfin (Visodyne®), ein Chlorin und Temoporfin (Foscan®), nicht für die topische Applikation und werden daher nur systemisch verabreicht.

2.3. Prodrugs

Die 1990 von J. C. Kennedy entwickelte PDT mit endogenen Porphyrinen nach exogener Applikation von 5-Aminolävulinsäure (ALA) zählt als Meilenstein in der Entwicklung der PDT [20]. Die geringe Größe und das geringe Molekulargewicht von ALA (Levulan®, Molmasse: 167,6 g/mol) und später 5-Aminolävulinsäuremethylester (MAL, Metvix®, Molmasse: 181,6 g/mol) ermöglichen eine gute Penetration durch die pathologisch veränderte Epidermis der Hauttumoren [19]. ALA ist ein Vorläufer von Häm im körpereigenen Stoffwechsel und wird in den Mitochondrien durch die Aminolävulinsynthase in mehreren Reaktionsschritten aus Glyzin und Succinat synthetisiert. 5-Aminolävulinsäure selbst ist kein Photosensibilisator, wird jedoch im Gewebe zu Porphyrinen, v.a. dem fluoreszierenden und photodynamisch aktiven Protoporphyrin IX (PPIX), metabolisiert. Durch die exogene Gabe von ALA wird der, die Porphyrinsynthese regulierende, erste Reaktionsschritt im Hämstoffwechsel umgangen. Die Produktion endogener Porphyrine, die normalerweise durch einen negativen Rückkoppelungsmechanismus über die freie Hämkonzentration geregelt ist, kann folglich uneingeschränkt weiterlaufen. PPIX wird nur sehr langsam durch den Einbau von Eisen durch die Ferrochelatase in Häm umgebaut und reichert sich dadurch exzessiv in Tumoren und prämalignen Veränderungen an [23]. Der genaue Mechanismus der verstärkten Akkumulation in erkranktem Gewebe ist jedoch noch ungeklärt. Vermutet werden: (1) gesteigerte Penetration in die Läsion a. G. einer Beeinträchtigung der physiologischen Barriere, (2) gesteigerte Aufnahme in die Zelle a. G. veränderter Eigenschaften transmembranärer Transportproteine, (3) veränderter Aktivität einzelner Enzyme und (4) verminderter Eisenverfügbarkeit [21]. Nach topischer Applikation werden ALA und MAL hauptsächlich von Zellen epithelialen Ursprungs aufgenommen. Die gesunden Zellen des umliegenden Gewebes und mesenchymale Zellen, wie Fibroblasten, zeigen eine wesentlich geringere Protoporphyrinsynthese und ermöglichen eine Abgrenzung des Tumors [24].

2.4. Anwendungsbereiche der PDT in der Dermatologie

Der einzige momentan in Europa zugelassene Photosensibilisator für die topische PDT ist 5-Aminolävulinsäuremethylester (Metvix®, Photocure AS, Oslo, Norwegen, und Galderma SA, Paris, Frankreich). Metvix® ist zugelassen für die Behandlung von superfiziellen und nodulären Basalzellkarzinomen (BCC) sowie aktinischen Keratosen in Kombination mit rotem Licht. In den USA sind Metvix® in Kombination mit rotem Licht und Levulan® Kerastick® (DUSA, Wilmington, MA, USA), der 5-Aminolävulinsäurehydrochlorid enthält, in Kombination mit blauem Licht zur Behandlung der aktinischen Keratose zugelassen [25].
Weitere Indikationen, für die jedoch keine Zulassungen bestehen, sind für die Low-dose Therapie die Psoriasis vulgaris, diverse virusinduzierte Hauterkrankungen, Erkrankungen der Talgdrüsen und Haarfollikel, sklerosierende und granulomatöse Hauterkrankungen. Ziel der Low-dose Therapie ist nicht die Gewebezerstörung, sondern die Modulation zellulärer Funktionen. Die High-dose Therapie dagegen findet Anwendung auf dem Gebiet der onkologischen Indikationen mit dem Ziel der Zerstörung des entarteten Gewebes. Sie wird eingesetzt bei der Behandlung von Basalzellkarzinomen, Plattenepithelkarzinomen, dem Kaposi-Syndrom, kutanen Lymphomen, Melanomen, kutanen Metastasen und aktinischen Keratosen [26, 27].

2.5. Lichtquellen

Nach der vorangegangenen Porphyrinsynthese müssen die entstandenen Photosensibilisatoren mit Licht der entsprechenden Wellenlänge aktiviert werden. Die Porphyrine und die von ihnen abstammenden Photosensibilisatoren haben ein typisches Absorptionsspektrum mit einem Maximum bei einer Wellenlänge von 405 nm, die sog. Soret-Bande. Diese Bande entspricht sichtbarem blauem Licht, das in Kombination mit ALA für die Behandlung der aktinischen Keratose verwendet werden kann [28]. Daneben existieren noch die sogenannten Q-Banden, eine davon hat ihr Maximum bei 635 nm. Obwohl die Absorption wesentlich kleiner ist als bei 405 nm, wird in den meisten Fällen mit rotem Licht gearbeitet, da dieses am tiefsten ins Gewebe eindringt [29, 30]. Mit einer vergleichenden Studie konnte gezeigt werden, dass Licht kürzerer Wellenlänge bei der Behandlung des Morbus Bowen weniger effektiv ist als die gleiche Dosis roten Lichtes [15, 31]. Für die photodynamische Therapie mit ALA und MAL eignen sich sowohl Laser, als auch inkohärente Lichtquellen. Bei der Behandlung mit 5-ALA und Laserlicht einer Wellenlänge von 585 nm, das mit der Q-Bande von PPIX übereinstimmt, konnten ähnliche Ergebnisse erzielt werden wie mit inkohärentem Licht [32]. Besonders geeignet für die Behandlung aktinischer Keratosen und des Morbus Bowen ist die topische PDT mit

Lichtquellen, die über große Belichtungsfelder verfügen und somit eine gleichzeitige Belichtung größerer Körperregionen ermöglichen. Hierfür werden inkohärente Lichtquellen bevorzugt: zum einen Lampen (z. B. PDT 1200L, Waldmann Medizintechnik, Villingen-Schwenningen, Deutschland), zum anderen LED`s (light emitting diodes) (z. B. Aktilite™, Galderma oder Omnilux™, Waldmann) mit den passenden Filtern.
Für die High-dose Therapie mit dem Ziel der Gewebezerstörung werden Lichtdosen von 100-150 J/cm^2 (100-200 mW/cm^2) für Breitspektrum-Rotlicht (580-700 nm) verwendet. Für die engeren Emissionsspektren der LED-Systeme mit einer Bandbreite von ca. 30-40 nm werden dagegen nur Werte von 37-50 J/cm^2 benötigt [19]. Bei der Durchführung der Therapie sollte die Lichtintensität nicht 200 mW/cm^2 überschreiten, um hyperthermische Effekte zu vermeiden [30, 33]. Während der Bestrahlung sollten Patient und Klinikpersonal Schutzbrillen tragen, um eine Schädigung der Augen zu verhindern [34].

3. Vorteile der PDT

Nicht-melanozytäre Hauttumore, wie das Basalzellkarzinom und das Plattenepithelkarzinom, wurden bisher chirurgisch, kryochirurgisch, durch Elektrodissektion, durch Radiotherapie oder topisch mit 5-Fluorouracil oder Podophyllin behandelt. Zu den Nachteilen dieser Therapieformen zählen neben den hohen Kosten auch eine Hypo- oder Hyperpigmentierung der behandelten Hautareale, Narbenbildung, Schmerzen, Entzündungen, Hautirritationen und eine über Wochen andauernde Krustenbildung [35]. Bei der Behandlung großflächiger und multipler Läsionen, wie dem Basalzellkarzinom und der aktinischen Keratose, gilt daher die photodynamische Therapie mittlerweile als eine der besten Behandlungsoptionen. Sie ist nicht invasiv, hat eine kurze Sensibilisierungsphase, deckt große Hautareale ab, beeinträchtigt nicht das umgebende Gewebe und führt daher zu einwandfreien kosmetischen Ergebnissen.

4. Schweinehautmodell

Bereits im Jahr 2000 wurde durch das Anatomische Institut der Tierärztlichen Hochschule in Hannover und das Institut für Tieranatomie der Landwirtschaftlichen Akademie Poznan (Prag) die spezielle Histologie des Integuments von Hausschweinen, sowie dessen makroskopische Aspekte und das Haarkleid untersucht.
Die Untersuchungen zeigten, dass das Ohrintegument sowie das Integument der allgemeinen Körperdecke für die *ex-vivo*-Nutzung in der humandermatologischen Forschung als Modell für humane Haut geeignet ist [36, 37].

5. Fragestellung

Die topische photodynamische Therapie (PDT) mit 5-Aminolävulinsäure/-methylester ist eine zunehmend eingesetzte Therapieoption zur Behandlung Aktinischer Keratosen und des superfiziellen oder nodulären Basalzellkarzinoms. Da es bisher keine einheitlichen Richtlinien für die Applikation von 5-ALA/Methylester gibt, existieren sowohl in der Praxis als auch in den einzelnen Kliniken unterschiedliche Verabreichungsformen und Abläufe.
Diese Arbeit hat das Ziel sechs unterschiedliche Formulierungen von 5-ALA bzw. seinem Methylester, die sich durch ihre hydrophilen/lipophilen Eigenschaften unterscheiden, zu vergleichen. Desweiteren sollen unterschiedliche Parameter, wie die Umgebungstemperatur, die Inkubationszeiten und ein vorangehendes „Stripping“ der Haut untersucht werden, um ein optimales Procedere für die Durchführung der topischen PDT zu ermitteln. Hierfür soll ein Modell mit *ex vivo* Schweinehaut etabliert werden, das die Anreicherung des aus 5-ALA/-Methylester entstehenden Protoporphyrin IX (PPIX) im Gewebe objektiviert. Zunächst soll die Vitalität der Schweinehaut über einen Zeitraum von 24h nachgewiesen werden, da für die Umsetzung von 5-ALA in den eigentlichen, fluoreszierenden Photosensibilisator Protoporphyrin IX (PPIX) die Enzyme der Keratinozyten nötig sind. Mithilfe eines Auflichtmikroskops, gekoppelt mit einer CCD-Kamera, soll anschließend die Fluoreszenzintensität von PPIX, als Marker der umgesetzten Menge von 5-ALA/-Methylester gemessen werden. Als zweiter Marker für die Anreicherung von PPIX in der Epidermis wird die Breite seiner Fluoreszenzbande als Marker für die relative Penetration von 5-ALA/-Methylester in Abhängigkeit von der jeweiligen Formulierung gemessen. Um nach der Untersuchung der oben aufgeführten Parameter einen Bezug zur klinischen Anwendung der topischen PDT herzustellen, sollen die zuvor mit den verschiedenen Formulierungen inkubierten Schweinehäute mit Licht des roten Spektralbereichs bestrahlt werden. Die hieraus resultierenden Gewebeveränderungen werden im Anschluss mittels Vitalitätstest dargestellt.
Verglichen werden Metvix®, Levulan® Kerastick®, 5-ALA in hydrophilem Gel mit und ohne Penetrationsverstärker (DMSO), 5-ALA in Psoralon Fettcreme und 5-ALA in Unguentum emulsificans aquosum.
Das *ex vivo* Schweinehautmodell soll die Möglichkeit bieten in Zukunft auch andere Farbstoffe und Photosensibilisatoren bezüglich ihrer Penetrationseigenschaften und/oder ihrer Fluoreszenzinduktion zu untersuchen.

II. Material und Methoden

1. Material

1.1. Präparation der Schweinehaut

Schweinehaut mit vorhandener Subkutis aus der Rückenpartie von 4-6 Monate alten, weiblichen oder kastrierten männlichen Hausschweinen (Pietrain, Landrasse), bezogen von einem Metzger in Saal bei Kelheim. Die Haut wurde direkt nach der Schlachtung, in ein angefeuchtetes Tuch eingeschlagen, zur weiteren Verarbeitung ins Labor gebracht.

1.2. Formulierungen

Verglichen wurden Metvix®, Levulan® Kerastick®, 5-ALA in hydrophilem Gel mit und ohne Penetrationsverstärker (DMSO), 5-ALA in Psoralon Fettcreme und 5-ALA in Unguentum emulsificans aquosum. (Details siehe Anhang, Punkt VI)

1.3. Reagenzien, Zusammensetzungen und Equipment

(Siehe Anhang, Punkt VII.1)

2. Methoden

2.1. Präparation der Schweinehaut

Aufgrund der hohen Ähnlichkeit zu humaner Haut wurde für diese Arbeit mit der Haut aus der Rückenpartie von weiblichen bzw. kastrierten männlichen, 6 Monate alten Schweinen (Pietrain, Landrasse) gearbeitet [36].

Diese wurde direkt nach der Schlachtung, vor dem Abbrühen der Schweine, einschließlich Subkutis entnommen und in ein feuchtes Tuch eingeschlagen ins Labor gebracht. Die weitere Bearbeitung erfolgte innerhalb der nächsten vier Stunden. Zunächst wurde die Hautoberfläche vorsichtig mit Aqua dest. gereinigt, die Borsten mit einem Langhaarschneider entfernt (Abb. 2) und die Subcutis mit einem Skalpell bis zur Dermis entfernt (Abb. 3). Die verbliebene Kutis wurde in ca. 3x4 cm große Stücke geschnitten und für 10 Minuten in 70% Ethanol gelegt, um die natürliche Hautflora zu reduzieren. Anschließend wurden die Hautstücke drei Mal gründlich in PBS gewaschen. Während der Vorbereitung des für die Einbettung benötigten Agars lagen die Hautstücke weiterhin in PBS, um ein Austrocknen zu verhindern.

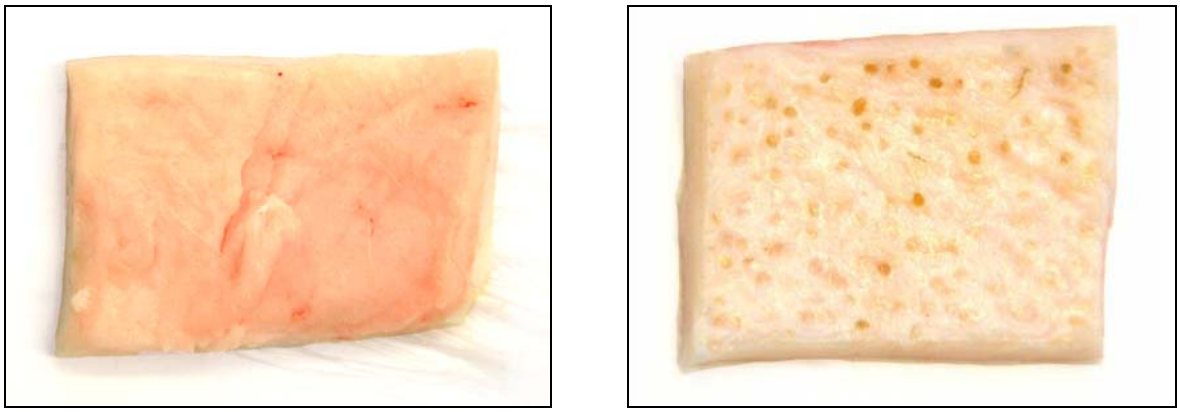
Nach Abkühlen des Agars wurden die Hautstücke aus dem PBS genommen, mit sterilen Kompressen getrocknet und in Petrischalen gelegt. Diese wurden mit dem HEPES-Agar aufgefüllt, bis die Haut dem Agar auflag und die Seitenränder von ihm bedeckt waren. Die Epidermis selbst lag frei (Abb. 4). Bis zum Auftragen der Formulierungen wurden die eingebetteten Hautstücke bei Raumtemperatur gelagert.

A B

Abb. 2: Vorbereitung der Schweinehaut, Entfernen der Borsten

(A) Direkt nach der Schlachtung entnommene Schweinehaut einschließlich Subkutis

(B) Schweinehaut nach der Entfernung der Borsten mit einem Langhaarschneider



A B

Abb. 3: Präparation der Schweinehaut, Entfernen der Subkutis

(A) Schweinehaut mit Subcutis

(B) Schweinehaut nach Entfernen der Subcutis mit einem Skalpell

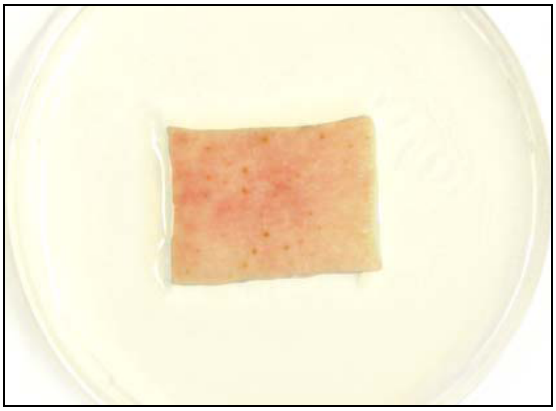


Abb. 4: In HEPES-Agar eingebettete Haut

Die von Borsten und Subkutis befreite Schweinehaut wurde nach der Reinigung in PBS und der Desinfektion in 70% Ethanol in HEPES-Agar eingebettet. Der Agar bedeckte die Unterseite und die Seitenränder des Hautstücks, die Oberfläche der Epidermis lag frei.

2.2. Präparation der Schweinehaut ohne Stratum corneum

2.2.1. Entfernen des Stratum corneum durch „Tape-Stripping“

Zusätzlich zu den Versuchen an intakter Schweinehaut wurden die Versuche auch an zuvor „gestrippter“ Haut durchgeführt. Die einzelnen Hautstücke wurden, wie unter Punkt II.2.1 beschrieben, vorbereitet. Vor dem Einbetten wurde jedoch zusätzlich die für die Auftragung der Formulierungen vorgesehene Hautoberfläche (ca. 2x3 cm) mit Tesafilm bedeckt. Durch leichten Druck mit dem Finger wurde die Adhäsion des Klebestreifens an der Hautoberfläche verstärkt. Durch schnelles Abziehen des Tesafilms in einem Zug wurde die oberste Schicht des Stratum corneum von der Haut entfernt. Dieser Vorgang wurde insgesamt 35 Mal mit jeweils frischem Klebeband wiederholt. Anschließend wurde das Hautstück in HEPES-Agar eingebettet.

2.2.2. Entfernen des Stratum corneum durch Abbrühen

Die, wie unter Punkt II.2.1 beschrieben, präparierte Schweinehaut wurde vor dem Einbetten für ca. 0,5 Sekunden mit kochendem Wasser übergossen. Es wurde darauf geachtet, dass nur die Oberfläche der Epidermis mit dem Wasser in Berührung kam. Anschließend wurde die sich lösende Hautschicht mit einer Pinzette abgezogen. Die Hautstücke wurden daraufhin in HEPES-Agar eingebettet.

2.2.3. Entfernen des Stratum corneum mit einem Metall-Spatel

Die, wie unter Punkt II.2.1 beschrieben, präparierte Schweinehaut wurde vor dem Einbetten auf einer Fläche von ca. 6 cm^2 mit einem Metall-Spatel aufgeraut, bis sich das Stratum corneum löste. Dieses konnte nach ca. vierminütigem Aufrauen zur Seite geschoben und mithilfe von Tesafilm („Tape-Stripping“), wie unter Punkt II.2.2.1 beschrieben, entfernt werden. Das „Tape-Stripping“ wurde wiederholt bis auf dem abgezogenen Klebestreifen mit bloßem Auge keine Hautschuppen mehr zu erkennen waren (ca. zwanzig Mal). Anschließend wurden diese Hautstücke in HEPES-Agar eingebettet.

2.2.4. Auswertung unterschiedlicher „Tape-Stripping“ Methoden

Nach Entfernen des Stratum corneum wurden mithilfe von Biopsiestanzen Gewebeproben entnommen, kryokonserviert, geschnitten und auf Objektträger aufgezogen. Anschließend wurden die zuvor HE gefärbten Schnitte mit dem Durchlichtmikroskop untersucht. Es wurde der Erhalt der unter dem Stratum corneum liegenden Zellschichten der Epidermis und die Dicke des z.T. noch erhaltenen Stratum corneum kontrolliert. Mit der Software „Image Pro PLUS“ (Media Cybernetic) wurde die Dicke des verbliebenen Stratum corneum ausgemessen und mit intakter Haut verglichen.

2.3. Bestimmung der Fluoreszenzinduktion und der relativen Penetration

2.3.1. Auftragen der Formulierungen

Auf den zuvor in HEPES-Agar eingebetteten Schweinehäuten wurde mit Hilfe einer Schablone eine 2x2,5 cm (5 cm^2) große Fläche mit einem wasserfesten Stift markiert. Es wurde darauf geachtet, dass innerhalb dieser Fläche keine Verletzungen, Hyperpigmentierungen oder verstärkten Gefäßzeichnungen vorhanden waren. Anschließend wurden die Formulierungen mithilfe eines Spatels gleichmäßig aufgetragen (Abb. 5). Mit der „gestrippten“ Haut wurde in allen folgenden Schritten ebenso verfahren wie mit intakter Haut (einschließlich Stratum corneum).

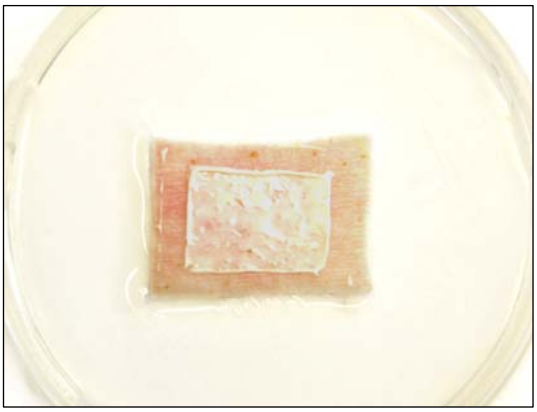


Abb. 5: Aufgetragene Formulierung (0,06g/cm^2 Psoralon Fettcreme)

Auf den in HEPES-Agar eingebetteten Häuten wurde mithilfe einer Schablone eine Fläche von 5 cm^2 markiert. Sie enthielt weder verletzte noch hyperpigmentierte Hautareale. Auf diese Fläche wurde mithilfe eines Spatels die jeweilige Formulierung in einer Menge aufgetragen, dass die Wirkstoffkonzentration 0,012 g/cm^2 betrug (Ausnahme Levulan® Kerastick® siehe II.2.3.1.2).

2.3.1.1. *Metvix®* (16% 5-Aminolävulinsäure-Methylester als Hydrochlorid)

Auf einer Hautfläche von 2x2,5 cm (5 cm^2) wurden 0,375 g Metvix (= 0,075 g/cm^2) mithilfe eines Metallspatels gleichmäßig verteilt. Diese Menge wurde entsprechend den Herstellerangaben von Metvix® (Galderma), die am Patienten eine Auftragungsdicke von 1 mm empfehlen, bestimmt. Die aus der verwendeten Menge Metvix® resultierende Wirkstoffmenge 0,012 g/cm^2 wurde auch für die anderen Formulierungen als Testmenge festgelegt. Dadurch konnten die voneinander abweichenden 5-ALA Konzentrationen der einzelnen Formulierungen einander angeglichen werden.

2.3.1.2. *Levulan® Kerastick®* (20% 5-Aminolävulinsäurehydrochlorid)

Den Herstellerangaben folgend wurde die Lösung mithilfe des „Sticks“ gleichmäßig auf einer Fläche von 5 cm^2 Haut verteilt. Die Menge entsprach ca. 0,0075 g. Aufgrund der dünnflüssigen Beschaffenheit der Formulierung war es nicht möglich, eine Menge von 0,3 g (Formulierung) aufzutragen, die allerdings nötig gewesen wäre, um die durch Metvix® festgelegte Wirkstoffmenge von 0,012 g/cm^2 zu erhalten.

2.3.1.3. *5-ALA (20%) in hydrophilem Gel mit 40% DMSO und ohne DMSO*

Aufgrund der schlechten Oberflächenhaftung dieser hydrophilen Gelformulierungen auf der lipophilen Haut musste die gleiche Wirkstoffmenge wie bei den übrigen Formulierungen (Metvix®, 5-ALA in Unguentum emulsificans aquos. und Psoralon Fettcreme) punktuell, also in Form von 12 Tropfen aufgetragen werden. Diese 12 Tropfen entsprachen ebenfalls einer Fläche von ca. 5 cm^2. Die aufgetragene Wirkstoffmenge betrug 0,012 g/cm^2 (= 0,06 g/cm^2 Formulierung).

2.3.1.4. *5-ALA (20%) in Psoralon-Fettcreme*

Entsprechend der bei Metvix® festgelegten Wirkstoffmenge 0,012 g/cm^2 wurden 0,3 g der Formulierung *5-ALA in Psoralon-Fettcreme* mit einem Metallspatel auf einer Fläche von 5 cm^2 (= 0,06 g/cm^2 Formulierung) gleichmäßig verteilt.

2.3.1.5. *5-ALA (20%) in Unguentum emulsificans aquosum*

Entsprechend der bei Metvix® festgelegten Wirkstoffmenge 0,012 g/cm^2 wurden 0,3 g der Formulierung *5-ALA in Unguentum emulsificans aquos.* mit einem Metallspatel auf einer Fläche von 5 cm^2 (= 0,06 g/cm^2 Formulierung) gleichmäßig verteilt.

2.3.2. Unterschiedliche Inkubationsbedingungen (Temperaturen)

Die mit den einzelnen Formulierungen bedeckten Schweinehäute (Wirkstoffmenge 0,012 g/cm^2) wurden während der einzelnen Versuchsdurchgänge bei 37°C (Körperkerntemperatur) und 32°C (Hauttemperatur) im Brutschrank sowie bei 4°C im Kühlschrank gelagert. Um eine Abschwächung der PPIX-Fluoreszenzintensität und damit eine Verfälschung späterer Messergebnisse zu vermeiden, wurden die Häute während der Inkubationszeit vor Licht geschützt. Die Petrischalen wurden hierfür mit Alufolie überzogen. Die Versuchsdurchgänge an „gestrippter" Schweinehaut erfolgten ausschließlich bei 37°C.

2.3.3. Entnahme von Gewebe

Zu den zuvor festgelegten Zeitpunkten - nach 0h, 1h, 4h, 8h, 18h und 24h („gestrippte" Haut: 0h, 4h und 8h) - wurden von den bei 37°C, 32°C und 4°C („gestrippte" Haut: 37°C) gelagerten Hautstücke mittels Biopsiestanzen (Durchmesser 4 mm) je zwei Gewebeproben entnommen (Abb. 6). Um die Fluoreszenzintensität nicht abzuschwächen, erfolgte die Entnahme in einem abgedunkelten Raum. Die Überstände der nicht eingedrungenen Formulierungen wurden mit sterilen Kompressen von der Oberfläche der Hautstanzen entfernt. Die erste Gewebeprobe wurde in Formalin konserviert, die zweite zur Kryokonservierung lichtgeschützt in Alufolie eingewickelt, zunächst in Stickstoff schockgefroren und anschließend bei -80°C gelagert.

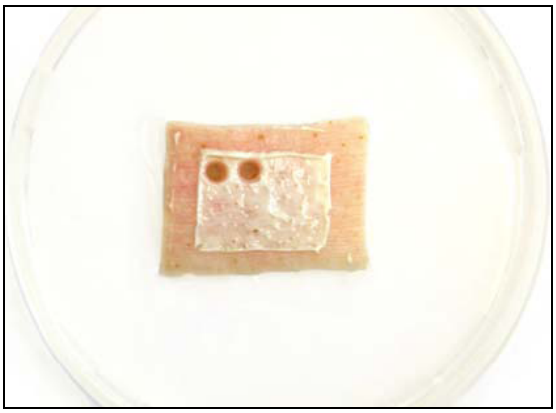


Abb. 6: Entnahme der Gewebeproben

Mithilfe von Biopsiestanzen (Ø 4 mm) wurden aus den mit den jeweiligen Formulierungen inkubierten Hautstücken nach 0h, 1h, 4h, 8h, 18h und 24h („gestrippte" Haut: 0h, 4h und 8h) je zwei Hautproben entnommen. Die erste wurde in Formalin fixiert, die zweite kryokonserviert. Dieser Schritt wurde in einem abgedunkelten Raum durchgeführt, um eine Abschwächung der Fluoreszenzintensität durch Licht zu verhindern.

2.3.4. Kryoschnitte

Die zuvor bei -80°C gelagerten Gewebestanzen wurden in einem abgedunkelten Raum am Kryostat mit Einmalklingen 8 µm dick geschnitten und auf beschichtete Objektträger (Superfrost Plus) aufgezogen.

2.3.5. Paraffin

Nach der Fixierung in Formalin für mindestes 24h wurden die Gewebeproben dehydriert und in Paraffin eingebettet. Die dabei entstandenen Paraffinblöcke wurden anschließend am Rotationsmikrotom mit Einmalklingen 2 µm dick geschnitten und auf beschichtete Objektträger (Superfrost Plus) aufgezogen.

2.3.6. Vitalitätsnachweis

Die in Paraffin konservierten und anschließend geschnittenen Gewebeproben wurden mithilfe des TUNEL-Assays (siehe II.2.5.3) gefärbt und fluoreszenzmikroskopisch ausgewertet.

2.3.7. Aufnahmen

Mithilfe eines Auflichtmikroskops und einer daran gekoppelten CCD-Kamera wurden von den Kryoschnitten bei 10-facher Vergrößerung mit der Software „Cam Care“ Durchlicht- und Fluoreszenzaufnahmen (Filter: *Photofrin,* siehe VII.1.6*)* im 16 bit Format getrennt voneinander aufgenommen. Die Belichtungszeit der Durchlichtaufnahmen betrug 0,016 Sekunden, die der Fluoreszenzaufnahmen 2,5 Sekunden. Um die Fluoreszenzintensität nicht abzuschwächen, erfolgte dieser Schritt in einem abgedunkelten Raum. Im Anschluss wurden die Fluoreszenzaufnahmen und die entsprechenden Durchlichtaufnahmen mithilfe der Software „Image Pro PLUS“ (Media Cybernetic) übereinander gelagert. Die fertigen Bilder wurden für die Auswertung der Fluoreszenzintensität und der relativen Penetration verwendet.

2.3.8. Bestimmung der mittleren Fluoreszenzinduktion

Die Fluoreszenzintensität wurde mithilfe der Software „Image Pro PLUS“ (Media Cybernetic) bestimmt. Hierfür wurde von jeder Aufnahme die Intensität an drei unterschiedlichen Stellen der Epidermis gemessen. Bei jeder der drei Messungen wurde der Leerwert (a: Hintergrund oberhalb der zu messenden Region) von dem Wert der tatsächlich fluoreszierenden Region (b) abgezogen (Abb. 7). Auf diese Weise konnte der Messfehler, der durch die Eigenfluoreszenz der Aufnahme entstanden wäre, vermieden werden. Durch die Durchführung der Messung an drei Stellen der Epidermis, anstatt die gesamte Aufnahme in einem zu vermessen, konnten Schwankungen der Messwerte, die sich in Vorversuchen zeigten, vermieden werden. Die Schwankungen resultierten aus den unterschiedlichen Fluoreszenzintensitäten der Epidermis, der Subkutis und des Hintergrundes, sowie aus ihren unterschiedlichen flächenmäßigen Anteilen. Die Fluoreszenz konnte für alle Werte größer Null bestimmt werden.
Insgesamt wurde dieser Versuch drei Mal durchgeführt und aus neun Einzelwerten wurde ein Mittelwert gebildet.

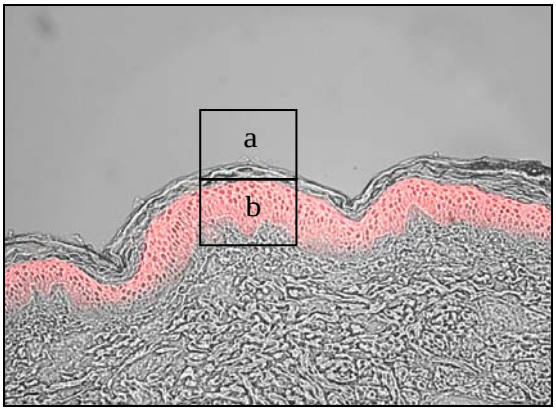


Abb. 7: Fluoreszenzaufnahme, x10
(Levulan® Kerastick®, 18h nach Auftragen, intakte Haut)
Die zuvor mithilfe des Fluoreszenzmikroskops gemachten Aufnahmen der Epidermis wurden mithilfe von „Image Pro PLUS“ ausgewertet. Die Fluoreszenzintensität der einzelnen Kryoschnitte wurde an jeweils drei unterschiedlichen Stellen gemessen. Für jeden Messpunkt wurde a von b abgezogen.

2.3.9. Bestimmung der relativen Eindringtiefe als Marker für die Verteilung von PPIX

Aus den Fluoreszenzaufnahmen wurden für alle sechs Formulierungen die Inkubationszeiten 0h, 4h und 24h („gestrippte“ Haut: 0h, 4h und 8h) ausgewählt und mit „Image Pro PLUS“ (Media Cybernetic) bezüglich ihrer relativen Eindringtiefe ausgewertet. Hierfür wurde die PPIX-Fluoreszenzbande in ihrer Breite vermessen. Ausgangspunkt der Messung war der oberflächlichste Punkt der Epidermis, wobei das Stratum corneum nicht mit gemessen wurde (Abb. 8). Endpunkt war die Stelle an der keine Fluoreszenz mehr nachweisbar war. Wie unter Punkt II.2.3.5 beschrieben, wurde pro Aufnahme an drei verschieden Stellen der Epidermis die Breite der Fluoreszenzbande ausgemessen. Aus diesen drei Werten sowie den sechs entsprechenden Werten der zwei weiteren Parallelversuche (n=3) wurden anschließend die entsprechenden Mittelwerte gebildet.
(1 Pixel ≈ 1,33 µm)

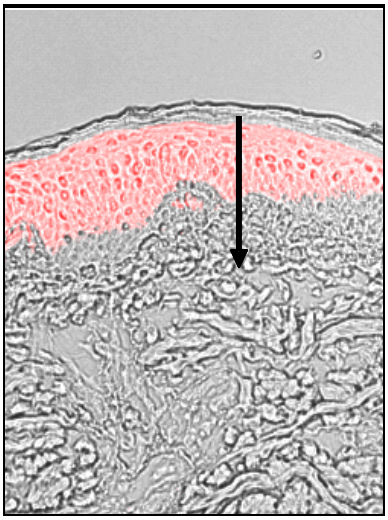


Abb. 8: Fluoreszenzaufnahme, (x40)
(Levulan® Kerastick®, 24h nach Auftragen)
Aus den Fluoreszenzaufnahmen wurden für alle sechs Formulierungen die Inkubationszeiten 0h, 4h und 24h („gestrippte“ Haut: 0h, 4h und 8h) ausgewählt und mit „Image Pro PLUS“ (Media Cybernetic) bezüglich ihrer relativen Eindringtiefe, die als Marker für die Verteilung von 5-ALA bzw. dem daraus gebildeten PPIX diente, ausgewertet. Die relative Eindringtiefe wurde an drei verschiedenen Stellen der Epidermis gemessen. Aus diesen drei Werten sowie den sechs entsprechenden Werten der zwei weiteren Parallelversuche (n=3) wurden anschließend die entsprechenden Mittelwerte gebildet.

2.4. Bestrahlung

2.4.1. Bestrahlung von Haut mit und ohne Stratum corneum

Die in HEPES-Agar eingebetteten und mit den einzelnen Formulierungen (Wirkstoff 0,012 g/cm^2, Ausnahme *Levulan*® *Kerastick*® 0,004 g/cm^2) bedeckten Häute wurden bei 37°C für 8h inkubiert. Anschließend wurden die Überstände der einzelnen Formulierungen entfernt und die Häute für 20 Minuten mit einer Lampe (PDT 1200L, Waldmann Medizintechnik) im roten Spektralbereich, bei 150 mW/cm^2 (~ 180 J/cm^2) bestrahlt.
12h nach der Bestrahlung wurden, wie unter Punkt II.2.3.3. beschrieben, je zwei Gewebestanzen entnommen, in Paraffin und Stickstoff konserviert und geschnitten.

2.5. Histologische Färbungen

2.5.1. HE-Färbung an kryokonservierten Gewebeschnitten

Die bei -80°C gelagerten Gewebebiopsien wurden am Kryostat mit Einmalklingen 8 µm dick geschnitten und auf beschichtete Objektträger (Superfrost Plus) aufgezogen. Anschließend wurden sie für 5 Minuten bei 68°C im Brutschrank getrocknet. Nach der Fixierung auf dem Objektträger mit Formalin und dem Spülen in aqua bidest wurden die Gewebeschnitte mit Mayers Hämalaun (Chromatin Blau) gefärbt und im lauwarmen Wasser gebläut. Die Gegenfärbung wurde mit Eosin durchgeführt. Nach der Spülung mit aqua bidest. und aufsteigender Alkoholreihe wurden die Schnitte mit Enthylan eingedeckelt.

2.5.2. NBTC

Die bei einer Temperatur von ca. -20°C gelagerten Kryoschnitte wurden 5 Minuten vor Durchführung der Färbung bei Raumtemperatur aufgetaut. Währenddessen wurden NADH (20%), NBTC (50%), PBS (20%) und die Ringerlösung (10%) gemischt und die Kryoschnitte bei Raumtemperatur für 10 Minuten darin inkubiert. Die gefärbten Schnitte wurden mit Aquatex eingedeckelt.
Die NBTC (Nitro-Blau Terazolinum-Chlorid)-gefärbten Gewebeschnitte wurden mit dem Durchlichtmikroskop bei 40-facher Vergrößerung qualitativ ausgewertet. Vitale Zellen wurden proportional zu ihrem NADH-Gehalt (Nikotinamid-adenin-dinukleotid) dunkelblau angefärbt, während die toten Zellen ungefärbt blieben.

2.5.3. TUNEL- Assay

Der TUNEL-Assay diente dem Nachweis fragmentierter DNA toter Zellen, wobei nicht zwischen Apoptose und Nekrose unterschieden werden konnte. Die Positivkontrolle wurde durch 30-minütige Inkubation eines Gewebeschnittes mit DNase in PBS bei 37°C angefertigt.

Die für diese Färbung verwendeten Paraffinschnitte wurden zunächst in einer absteigenden Alkoholreihe rehydriert. Anschließend wurden die bereits in Aqua dest. gewaschenen Schnitte in TBS gespült. Nach dem Verdau mit Proteinase K 1:1000 in 10 mM Tris-Puffer (pH 8) und folgendem Spülen in TBS wurden sie für 20 Minuten in TdT-Equilibrierungspuffer vorinkubiert. Im nächsten Schritt wurden die Schnitte mit TdT-Markierungs-Reaktions-Mixtur bedeckt und für 1,5 Stunden bei 37°C in einer lichtgeschützten Feuchtekammer inkubiert. Nach dem Waschen in TBS wurden die Schnitte mit Mounting Media eingedeckelt und mit klarem Nagellack versiegelt.

Die tunelgefärbten Kryoschnitte wurden mit dem Fluoreszenzmikroskop ausgewertet. Hierfür wurden die Filter *FITC* (fragmentierte DNA toter Zellen, grün) und *Höchst (*DNA vitaler und toter Zellen, blau) verwendet. Die zwei Fluoreszenzaufnahmen und die Durchlichtaufnahme wurden unabhängig voneinander mithilfe eines Auflichtmikroskops gekoppelt mit einer CCD-Kamera bei 40-facher Vergrößerung im 16 bit Format aufgenommen. Anschließend wurden diese drei Aufnahmen mit der Software “Image Pro PLUS“ (Media Cybernetic) übereinander gelagert. Die dadurch entstandenen Bilder zeigten Zellen mit blauen Zellkernen (vitale Zellen) und Zellen mit türkisen Zellkernen (tote Zellen), die durch das Übereinanderlagern der Zellen mit blauem und grünem Zellkern entstanden. Im nächsten Schritt wurden drei Gesichtsfelder ausgezählt und die vitalen und toten Zellen in Verhältnis zueinander gesetzt. Anhand dieses Verhältnisses wurden die sechs getesteten 5-ALA/-Methylester Formulierungen den unterschiedlichen Stufen eines Schemas zugeteilt, das in Anlehnung an Saikia et al. [38] festgelegt wurde (siehe Tab. 1).

Stufe	Apoptose/Nekrose
0	= 0%
1	= 1-5%
2	= 6-15%
3	= 16-25%
4	= 26-50%
5	= 51-75%
6	= 76-100%

Tab. 1: Stufenschema (Verhältnis tote/vitale Zellen)

Die Einteilung der relativen Apoptose/Nekrose erfolgte anhand von sieben Stufen.

III. Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit wurde ein vitales Schweinehautmodell etabliert, mithilfe dessen verschiedene 5-Aminolävulinsäure/-methylester Formulierungen bezüglich ihrer Fluoreszenzinduktion verglichen wurden. Die Fluoreszenzintensität diente hierbei der Darstellung der umgesetzten Menge von 5-Aminolävulinsäure/-methylester (5-ALA/-Methylester) in fluoreszierendes Protoporphyrin IX und damit als Maß für die Verteilung von 5-ALA/-Methylester im Gewebe. Durch die Messung der Breite des innerhalb der Epidermis entstandenen „Fluoreszenzbandes“ konnten Rückschlüsse auf die Penetrationseigenschaften der einzelnen Formulierungen gezogen werden. Da ausschließlich die PPIX-Fluoreszenz und nicht 5-ALA selbst bestimmt wurde, wird in dieser Arbeit nur von der „relativen“ Penetration bzw. Eindringtiefe gesprochen. Die 5-ALA/-Methylester Formulierungen wurden zum einen an intakter zum anderen an „gestippter“ Schweinehaut verglichen, nachdem zuvor die Vitalität der Haut über einen Zeitraum von 24h nachgewiesen werden konnte.
Verglichen wurden sechs verschiedene Formulierungen von 5-ALA/-Methylester.

Formulierung	**Wirkstoff (aufgetragene Menge 0,012 g/cm^2)**
Metvix® 160mg/g Creme [MAL]*	Methyl(5-amino-4-oxopentanoat) (als Hydrochlorid) (16%) (ö/w)
Levulan® Kerastick® [LKS]*	5-amino-4-oxopentanoat-hydrochlorid (20%) (in Ethanol)
5-ALA in hydrophilem Gel (mit 40 % DMSO) [mit DMSO]*	5-Aminolävulinsäure (20%) mit 40% DMSO
5-ALA in hydrophilem Gel (ohne DMSO) [ohne DMSO]*	5-Aminolävulinsäure (20%) ohne DMSO
5-ALA in Psoralon Fettcreme [Psoralon]*	5-Aminolävulinsäure (20%)(w/ö)
5-ALA in Unguentum emulsificans aquosum [Ungt. emuls. aquos.]*	5-Aminolävulinsäure (20%)

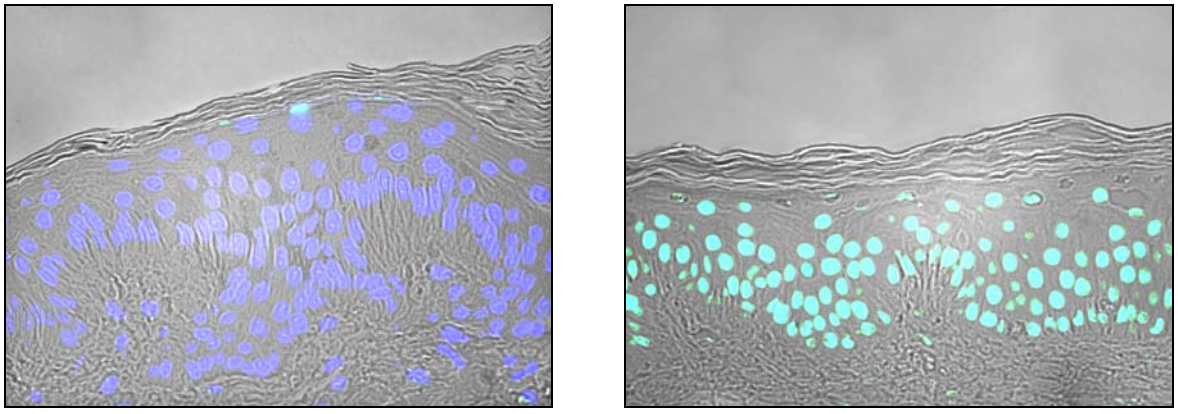
Tabelle 2: Formulierungen von 5-Aminolävulinsäure/-methylester (5-ALA/-Methylester)

* Im weiteren Verlauf der Arbeit wird z.T. auf diese Abkürzungen zurückgegriffen

Ein weiterer Versuchsparameter war die Umgebungstemperatur. Die Versuche wurden bei 37°C (Körperkerntemperatur), 32°C (Hauttemperatur) und 4°C durchgeführt. Um das Modell auch im Hinblick auf die klinische Verwendung von 5-ALA/-Methylester zu testen, wurden die mit den sechs verschiedenen 5-ALA Formulierungen für 8h inkubierten, Hautstücke mit und ohne Stratum corneum mit einer Lampe im roten Spektralbereich bestrahlt. Die daraus resultierenden Gewebeveränderungen (Apoptose/Nekrose) wurden mithilfe der beiden bereits erwähnten Färbungen dargestellt.

1. Vitalitätsnachweis der Schweinehaut nach 24h

Die sechs zu vergleichenden 5-ALA/-Methylester Formulierungen sollten anhand ihrer Fluoreszenzinduktion, als Maß für ihre Anreicherung innerhalb der Epidermis sowie ihre relative Penetration, miteinander verglichen werden. Basis der Umwandlung von 5-ALA/-Methylester in Protoporphyrin IX bilden die Enzyme der Schweinehaut. Voraussetzung für dieses Modell war daher die Vitalität der Schweinehaut, die über einen Zeitraum von 24h mittels TUNEL- (Abb. 9) und NBTC-Färbung (Abb. 10) nachgewiesen werden konnte. Beide Färbungen bestätigten nach 24-stündiger Inkubationszeit mit allen sechs Formulierungen bei 37°C, 32°C und 4°C eine 98±2%ige Vitalität der Schweinehaut mit und ohne Stratum corneum.



A B

Abb. 9: Vitalitätsnachweis mittels TUNEL-Färbung nach 24-stündiger Inkubation (40x)

A) Tunel-gefärbte, 24h eingebettete Epidermis mit 98±2%iger Vitalität

B) mit DNase vorbehandelte Positivkontrolle;

(blaue Zellkerne= vitale Zellen, türkise Zellkerne = apoptotische/nekrotische Zellen);

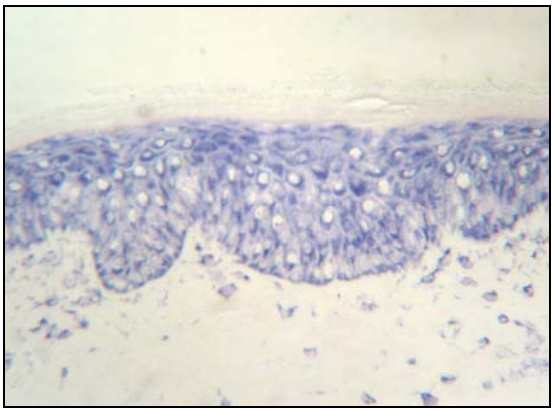


Abb. 10: Vitalitätsnachweis mittels NBTC-Färbung (40x)

Die Abbildung zeigt einen NBTC gefärbten Kryoschnitt 24h nach der Einbettung in HEPES-Agar mit 98±2%iger Vitalität.

2. Vergleich der Fluoreszenzinduktion und der Penetrationseigenschaften der einzelnen 5-Aminolävulinsäure/-methylester Formulierungen an intakter Schweinehaut

2.1. Inkubation der Schweinehaut mit den verschiedenen Formulierungen

Die photodynamische Therapie basiert auf den drei Komponenten Photosensibilisator (PS), hier 5-ALA/-Methylester, Licht und Sauerstoff. Das *ex vivo* Schweinehautmodell ermöglichte eine quantitative und qualitative Unterscheidung der verschiedenen 5-ALA/-Methylester Formulierungen hinsichtlich ihres Penetrationsverhaltens und ihrer Fluoreszenzinduktion. Die Fluoreszenzintensität diente der Darstellung des aus 5-ALA/-Methylester gebildeten fluoreszierenden Protoporphyrin IX (PPIX), wobei mit zunehmender PPIX-Konzentration im Gewebe auch die Fluoreszenzintensität zunahm. Die Fluoreszenzintensität wurde mithilfe des Fluoreszenzmikroskops bestimmt.

2.2. Nachweis der Aufnahme und Umsetzung von 5-Aminolävulinsäure/-methylester (5-ALA/-Methylester) zu Protoporphyrin IX (PPIX)

Die eingebetteten Schweinehäute wurden bei 37°C, 32°C und 4°C mit den sechs verschiedenen 5-ALA Formulierungen Metvix® (MET), Levulan® Kerastick® (LKS), 5-ALA in hydrophilem Gel mit 40% DMSO, 5-ALA in hydrophilem Gel ohne DMSO, 5-ALA in Psoralon Fettcreme und 5-ALA in Unguentum emulsificans aquos. 24h inkubiert. Zu den zuvor festgelegten Zeitpunkten - 0h, 1h, 4h, 8h, 18h und 24h - wurden Gewebeproben entnommen. Diese wurden kryokonserviert, geschnitten und unter dem Fluoreszenzmikroskop ausgewertet. Hierzu wurden die Kryoschnitte mit einer CCD-Kamera (PCO; Kelheim), gekoppelt mit einem Auflichtmikroskop (Axiotech; Zeiss, Göttingen) aufgenommen, bearbeitet und mit der Software „Image Pro PLUS“ (Media Cybernetic) bezüglich ihrer Fluoreszenzintensität und der Breite ihrer Fluoreszenzbanden vermessen.

Abb. 11 und 12 zeigen den zeitlichen Verlauf der Fluoreszenz bei 37°C am Beispiel von LKS und MET. Bei der mit LKS inkubierten Schweinehaut konnte bereits 4h nach Inkubationsbeginn eine deutliche PPIX-Fluoreszenz nachgewiesen werden, während bei MAL erst nach 8-stündiger Inkubationszeit eine Fluoreszenz zu erkennen war.

Es zeigte sich insgesamt eine von der Inkubationszeit und der verwendeten 5-ALA/-Methylester Formulierung abhängige Zunahme der Fluoreszenz.

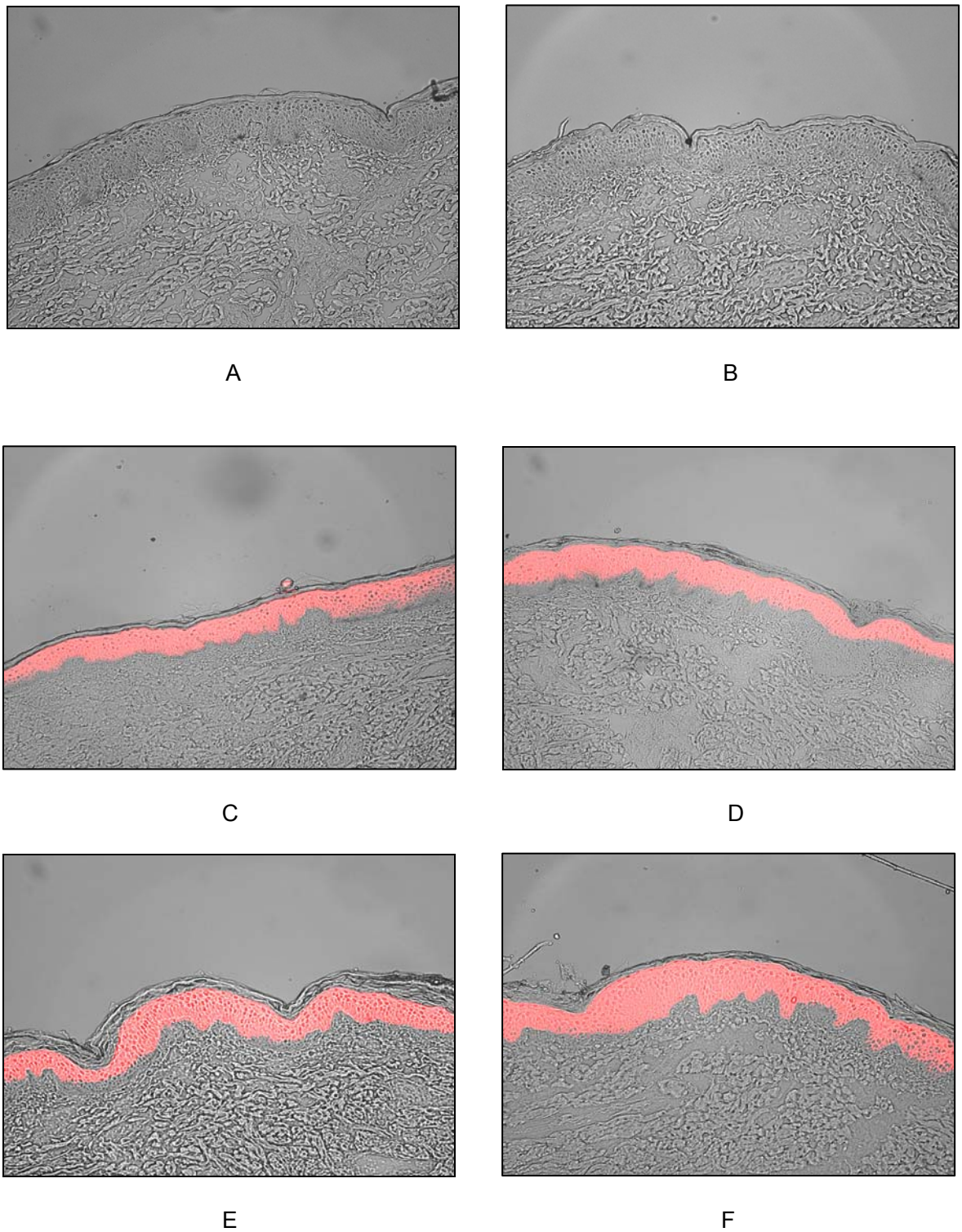


Abb. 11: Zeitlicher Verlauf der Fluoreszenzentwicklung während der Inkubation der Schweinehäute mit Levulan® Kerastick® bei 37°C (x10)

Von einem mit LKS bei 37°C inkubierten Hautstück wurden nach 0h (A), 1h (B), 4h (C), 8h (D), 18h (E) und 24h (F) Proben entnommen und als Kryoschnitte unter dem Fluoreszenzmikroskop betrachtet. Die Fluoreszenz von PPIX ist rot dargestellt.

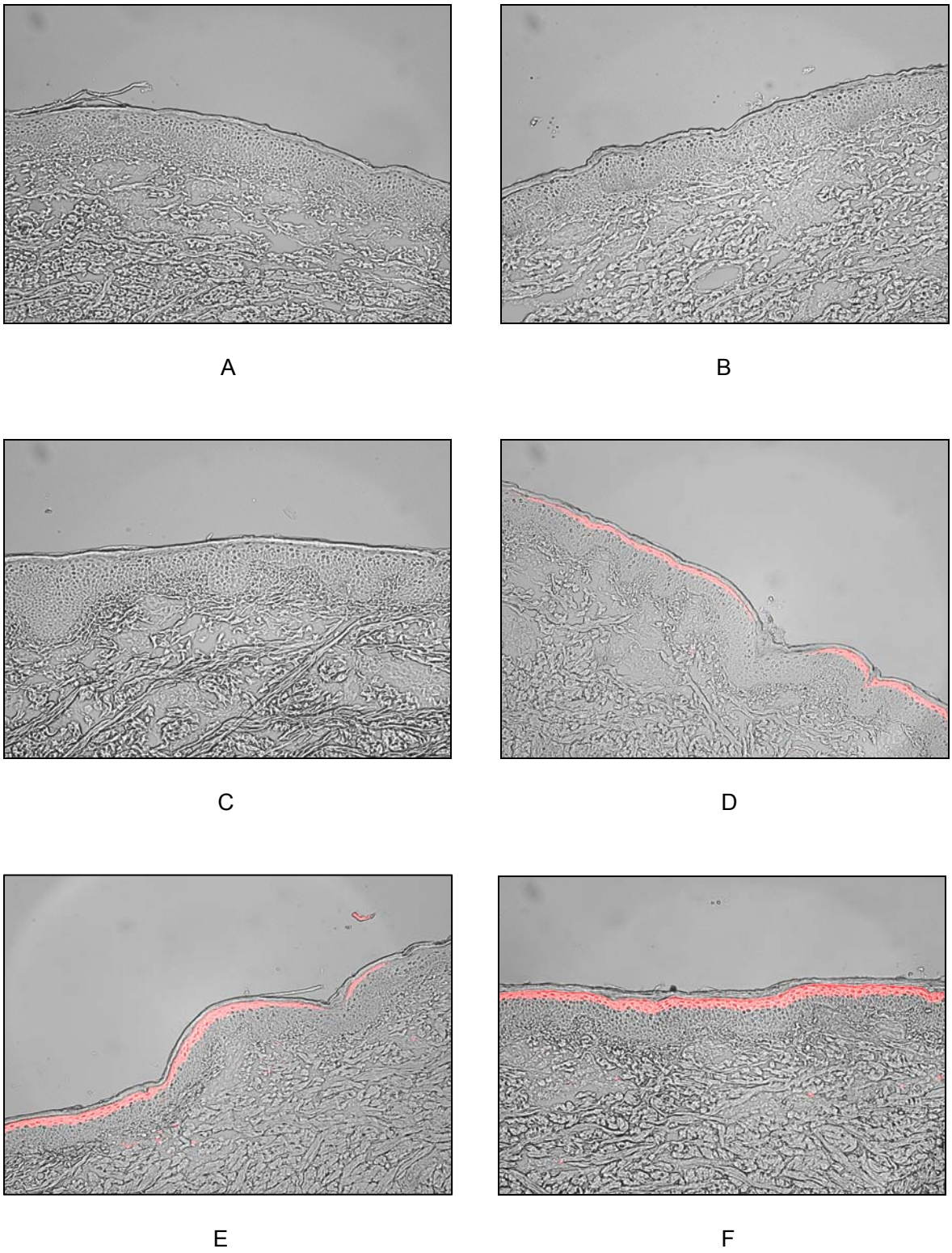


Abb. 12: Zeitlicher Verlauf der Fluoreszenzentwicklung während der Inkubation der Schweinehäute mit Metvix® bei 37°C (x10)

Von einem mit MAL bei 37°C inkubierten Hautstück wurden nach 0h (A), 1h (B), 4h (C), 8h (D), 18h (E) und 24h (F) Proben entnommen und als Kryoschnitte unter dem Fluoreszenzmikroskop betrachtet. Die Fluoreszenz von PPIX ist rot dargestellt.

2.3. Vergleich der mittleren Fluoreszenzintensitäten

2.3.1. Vergleich der mittleren Fluoreszenzintensität bei 37°C

Die, wie unter Punkt III.2.2 beschrieben, angefertigten und bearbeiteten Aufnahmen wurden jeweils an drei unterschiedlichen Stellen der Epidermis bezüglich ihrer Fluoreszenzintensität vermessen. Aus den in drei Parallelversuchen gewonnenen neun Einzelwerten wurde für jede Formulierung ein Mittelwert gebildet. Die jeweiligen mittleren Fluoreszenzintensitäten sind in Abb. 13 dargestellt.
Bereits nach 4-stündiger Inkubationszeit zeigte LKS eine signifikant stärkere Fluoreszenzintensität als die übrigen Formulierungen. Dieser Vorsprung blieb auch im weiteren Verlauf erhalten. Die Gelformulierungen mit und ohne DMSO unterschieden sich weder nach 8h noch nach 24h signifikant. 5-ALA in hydrophilem Gel mit DMSO zeigte sowohl nach 8h als auch nach 24h eine signifikant stärkere Fluoreszenzintensität als MAL, 5-ALA in Psoralon Fettcreme und 5-ALA in Ungt. emuls. aquos. Während die drei letztgenannten Formulierungen nach 8h noch keinen signifikanten Unterschied zeigten, fluoreszierte 5-ALA in Psoralon Fettcreme nach 24h signifikant stärker als MAL und 5-ALA in Ungt. emuls. aquos., die sich noch immer nicht signifikant unterschieden.
Aufgrund der unterschiedlichen Signalintensitäten konnte folgende Reihenfolge beobachtet werden:

Nach 8h:
LKS > 5-ALA in hydrophilem Gel mit DMSO ≈ 5-ALA in hydrophilem Gel ohne DMSO > 5-ALA in Psoralon Fettcreme ≈ MAL ≈ 5-ALA in Ungt. emuls. aquos.

Nach 24h:
LKS > 5-ALA in hydrophilem Gel mit DMSO ≈ 5-ALA in hydrophilem Gel ohne DMSO > 5-ALA in Psoralon Fettcreme > MAL ≈ 5-ALA in Ungt. emuls. aquos.

Die zugehörigen Signifikanzen sind in Tabelle 3 aufgeführt.

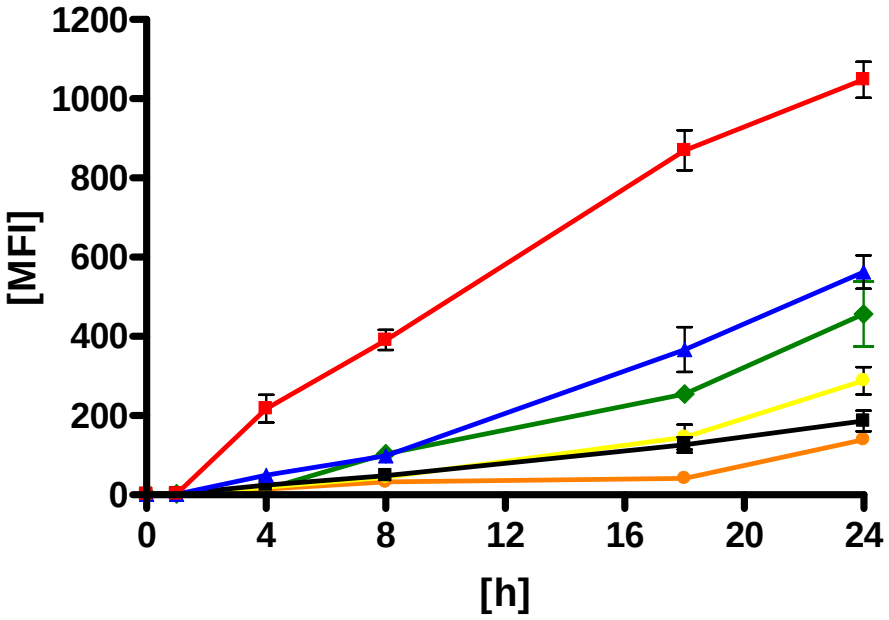


Abb. 13: Fluoreszenzintensitäten der verschiedenen 5-ALA-Formulierungen im Zeitverlauf bei 37°C

Die vorbereiteten Hautstücke wurden mit sechs verschiedenen 5-ALA-Formuierungen, ■ MAL, ■ LKS, ◆ 5-ALA in hydrophilem Gel mit DMSO, ▲ 5-ALA in hydrophilem Gel ohne DMSO, ● 5-ALA in Psoralon Fettcreme und ▲ 5-ALA in Ungt. emuls. aquos. bei 37°C inkubiert. Nach 0h, 1h, 4h, 8h, 18h und 24h wurde eine Probe der Haut entnommen, kryokonserviert und die mittlere Fluoreszenzintensität von PPIX bestimmt. (n=3± Standardabweichung), (h= Inkubationszeit in Stunden; MFI= mittlere Fluoreszenzintensität)

Vergleich	8h	24h
LKS vs. MAL	< 0,0001	< 0,0001
LKS vs. mit DMSO	< 0,0001	< 0,0001
LKS vs. ohne DMSO	< 0,0001	< 0,0001
LKS vs. Psoralon	< 0,0001	< 0,0001
LKS vs. Ungt. emuls. aquos.	< 0,0001	< 0,0001
mit DMSO vs. ohne DMSO	0,5965	0,261
mit DMSO vs. Psoralon	< 0,0001	<0,0001
mit DMSO vs. Ungt. emuls. aquos.	< 0,0001	<0,0001
mit DMSO vs. MAL	0,0003	< 0,0001
Psoralon vs. MAL	0,743	0,0271
Ungt. emuls aquos. vs. MAL	0,1276	0,1133
Psoralon vs. Ungt. emuls. aquos.	0,08895	0,0005

Tab. 3: Signifikanzbestimmung für den Vergleich der einzelnen 5-ALA/-Methylester Formulierungen bei 37°C (ungepaarter T- Test)

(Abkürzungen siehe Tabelle 1), (p<0,05 = signifikanter Unterschied)

2.3.2. Vergleich der mittleren Fluoreszenzintensität bei 32°C

Die, wie unter Punkt III.2.2 beschrieben, angefertigten und bearbeiteten Aufnahmen wurden jeweils an drei unterschiedlichen Stellen der Epidermis bezüglich ihrer Fluoreszenzintensität vermessen. Aus den in drei Parallelversuchen gewonnenen neun Einzelwerten wurde für jede Formulierung ein Mittelwert gebildet. Die jeweiligen mittleren Fluoreszenzintensitäten sind in Abb. 14 dargestellt.
Bereits nach 4-stündiger Inkubationszeit zeigte LKS eine signifikant stärkere Fluoreszenzintensität als die übrigen Formulierungen. Dieser Vorsprung blieb auch im weiteren Verlauf erhalten. Die Gelformulierungen mit und ohne DMSO zeigten im Gegensatz zu den Ergebnissen bei 37°C (Abb. 13) ab 24-stündiger Inkubation einen signifikanten Unterschied. 5-ALA in hydrophilem Gel mit DMSO wies bereits nach 8h eine signifikant höhere Fluoreszenzintensität auf als MAL, 5-ALA in Psoralon Fettcreme und 5-ALA in Ungt. emuls. aquos. 5-ALA in Psoralon Fettcreme zeigte nach 8h und 24h keinen signifikanten Unterschied zu MAL, zu 5-ALA in Ungt. emuls. aquos. jedoch schon. Ab 24h zeigte auch MAL, im Gegensatz zu den Ergebnissen bei 37°C (Abb. 13), eine signifikant höhere Fluoreszenzintensität als 5-ALA in Ungt. emuls. aquos.
Aufgrund der unterschiedlichen Signalintensität konnte folgende Reihenfolge beobachtet werden:

Nach 8h:
LKS > 5-ALA in hydrophilem Gel mit 40% DMSO ≈ 5-ALA in hydrophilem Gel ohne DMSO > 5-ALA in Psoralon Fettcreme (≈ MAL ≈) > 5ALA in Ungt. emuls. aquos.

Nach 24h:
LKS > 5-ALA in hydrophilem Gel mit DMSO > 5-ALA in hydrophilem Gel ohne DMSO > 5-ALA in Psoralon Fettcreme ≈ MAL > 5-ALA in Ungt. emuls. aquos.

Die zugehörigen Signifikanzen sind in Tabelle 4 aufgeführt.

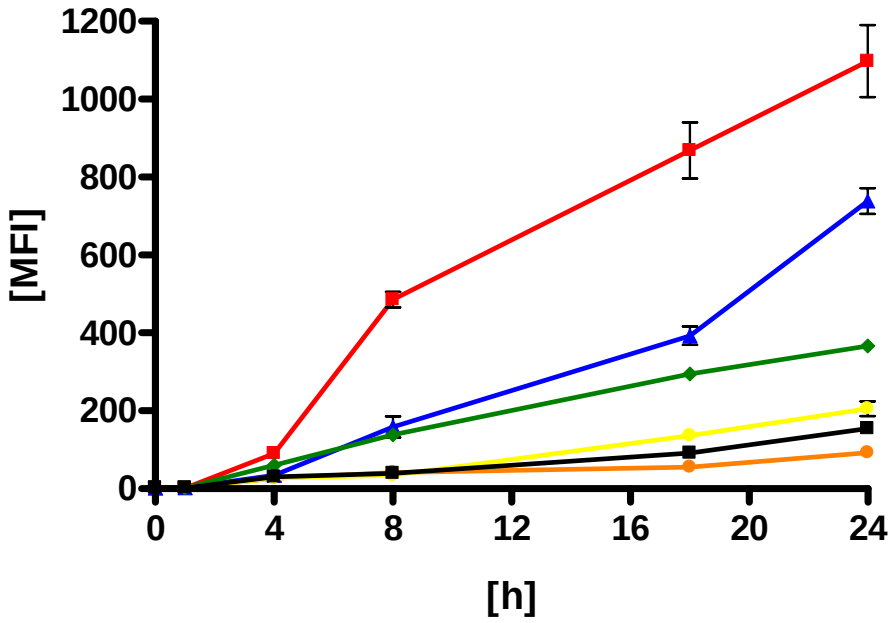


Abb. 14: Fluoreszenzintensitäten der verschiedenen 5-ALA- Formulierungen im Zeitverlauf bei 32°C

Die vorbereiteten Hautstücke wurden mit sechs verschiedenen 5-ALA-Formuierungen, ■ MAL, ■ LKS, ◆ 5-ALA in hydrophilem Gel mit DMSO, ▲ 5-ALA in hydrophilem Gel ohne DMSO, ● 5-ALA in Psoralon Fettcreme und ▲ 5-ALA in Ungt. emuls. aquos. bei 32°C inkubiert. Nach 0h, 1h, 4h, 8h, 18h und 24h wurde eine Probe der Haut entnommen, kryokonserviert und die mittlere Fluoreszenzintensität von PPIX bestimmt. (n=3± Standardabweichung), (h= Inkubationszeit in Stunden; MFI= mittlere Fluoreszenzintensität)

Vergleich	8h	24h
LKS vs. MAL	< 0,0001	< 0,0001
LKS vs. mit DMSO	< 0,0001	0,0023
LKS vs. ohne DMSO	< 0,0001	< 0,0001
LKS vs. Psoralon	< 0,0001	< 0,0001
LKS vs. Ungt. emuls. aquos.	< 0,0001	< 0,0001
mit DMSO vs. ohne DMSO	0,5379	< 0,0001
mit DMSO vs. Psoralon	0,0003	< 0,0001
mit DMSO vs. Ungt. emuls. aquos.	0,0006	< 0,0001
mit DMSO vs. MAL	0,0005	< 0,0001
Psoralon vs. MAL	0,2425	0,058
Ungt. emuls. aquos. vs. MAL	0,5534	0,0042
Psoralon vs. Ungt. emuls. aquos.	0,038	< 0,0001

Tab. 4: Signifikanzbestimmung für den Vergleich der einzelnen 5-ALA/-Methylester Formulierungen bei 32°C (ungepaarter T- Test)

(Abkürzungen siehe Tabelle 1), (p<0,05 = signifikanter Unterschied)

2.3.3. Vergleich der Fluoreszenzintensität bei 4°C

Die, wie unter Punkt III.2.2 beschrieben, angefertigten und bearbeiteten Aufnahmen wurden jeweils an drei unterschiedlichen Stellen der Epidermis bezüglich ihrer Fluoreszenzintensität vermessen. Aus den in drei Parallelversuchen gewonnenen neun Einzelwerten wurde für jede Formulierung ein Mittelwert gebildet. Die jeweiligen mittleren Fluoreszenzintensitäten sind in Abb. 15 dargestellt.

Im Vergleich zu den Ergebnissen unter Punkt III.2.3.1 und III.2.3.2 (37°C bzw. 32°C) zeigte sich bei 4°C für alle sechs Formulierungen nur eine minimale Fluoreszenzintensität. Nach 24h erreichte diese je nach Formulierung 3-12% der Fluoreszenzintensität bei 32°C bzw. 37°C. Das entsprach in etwa den 4h-Werten bei diesen Temperaturen. LKS erreichte nach 24h weniger als ein Viertel seiner Fluoreszenzintensität nach 4h bei 37°C.

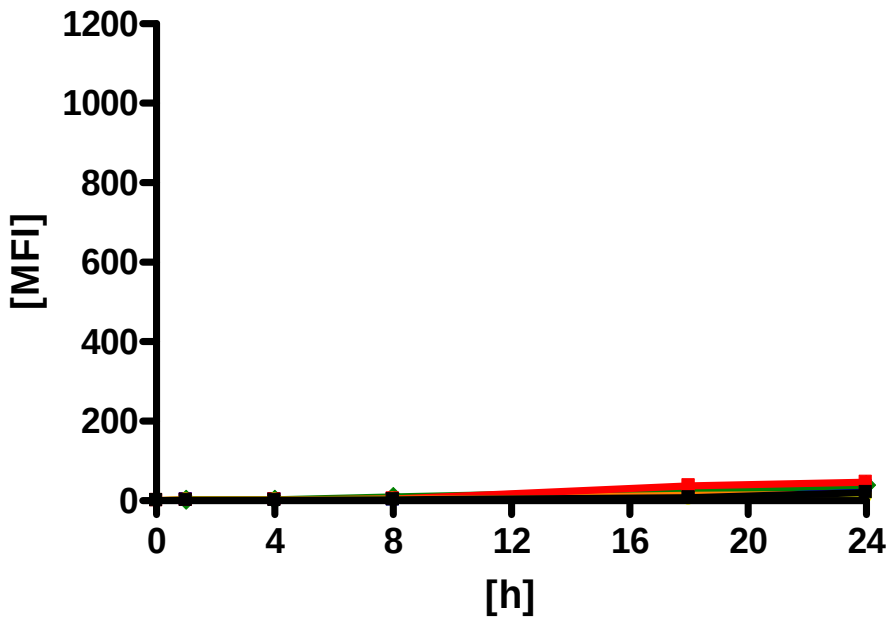


Abb. 15: Fluoreszenzintensitäten der verschiedenen 5-ALA- Formulierungen im Zeitverlauf bei 4°C

Die vorbereiteten Hautstücke wurden mit sechs verschiedenen 5-ALA-Formuierungen, ■ MAL, ■ LKS, ◆ 5-ALA in hydrophilem Gel mit DMSO, ▲ 5-ALA in hydrophilem Gel ohne DMSO, ● 5-ALA in Psoralon Fettcreme und ▲ 5-ALA in Ungt. emuls. aquos. bei 4°C inkubiert. Nach 0h, 1h, 4h, 8h, 18h und 24h wurde eine Probe der Haut entnommen, kryokonserviert und die mittlere Fluoreszenzintensität von PPIX bestimmt. (n=3± Standardabweichung), (h= Inkubationszeit in Stunden; MFI= mittlere Fluoreszenzintensität)

2.3.4. Vergleich der Fluoreszenzintensität bei 32°C und 37°C

Durch die Erhöhung der Umgebungstemperatur um 5°C, von 32°C auf 37°C (Abb. 16), verbesserte sich die Fluoreszenzintensität von Metvix® nach 8-stündiger Inkubationszeit signifikant um 22,8%, während 5-ALA in hydrophilem Gel mit 40% DMSO eine 33,0%ige, 5-ALA in hydrophilem Gel ohne DMSO eine 25,0%ige, 5-ALA in Ungt. emuls. aquos. eine 22,3%ige und LKS eine 19,5%ige Verminderung der Fluoreszenzintensität zeigten. 5-ALA in Psoralon Fettcreme zeigte keinen Unterschied.

Nach 24-stündiger Inkubationszeit konnte, außer bei 5-ALA in Ungt. emuls. aquos., kein signifikanter Unterschied der Fluoreszenzintensität der einzelnen Formulierungen festgestellt werden. Die Fluoreszenzintensität von 5-ALA in Ungt. emuls. aquos. verbesserte sich um 33,9 %.

Die zugehörigen Signifikanzen sind in Tabelle 5 aufgeführt.

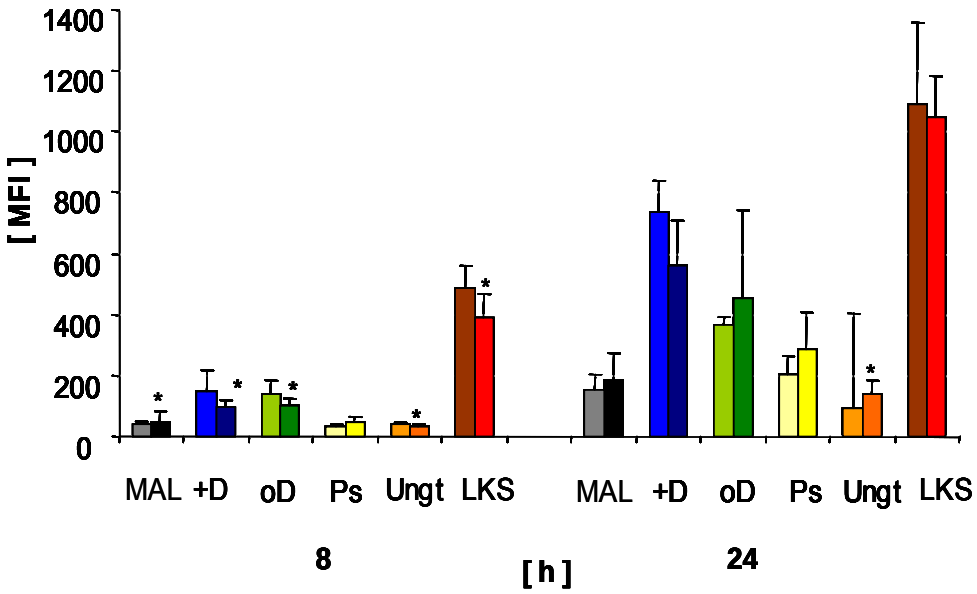


Abb. 16: Vergleich der Fluoreszenzintensität bei 32°C und 37°C

Metvix® [MAL] (■ 32°C, ■ 37°C), Levulan® Kerastick® [LKS] (■ 32°, ■ 37°C), 5-ALA in hydrophilem Gel mit DMSO [+D] (■ 32°C, ■ 37°C), 5-ALA in hydrophilem Gel ohne DMSO [oD] (■ 32°C, ■ 37°C), 5-ALA in Psoralon Fettcreme [Ps] (■ 32°C, ■ 37°C) und 5-ALA in Ungt. emuls. aquos. [Ungt] (■ 32°C, ■ 37°C); (* signifikant)

	8h	24h
Metvix®	0,005	0,3458
mit DMSO	0,0238	0,068
ohne DMSO	<0,0001	0,3566
Psoralon	0,1993	0,0711
Ungt. emuls. aquos.	0,0124	0,0122
LKS	0,0105	0,6822

Tab. 5: Signifikanzbestimmung für den Vergleich der einzelnen 5-ALA/-Methylester Formulierungen bei 32°C und 37°C (ungepaarter T- Test)
(Abkürzungen siehe Tabelle 1),
(p<0,05 = signifikanter Unterschied)

2.4. Vergleich der relativen Eindringtiefe

2.4.1. Vergleich der relativen Eindringtiefen bei 37°C

Aus den bereits für die Auswertung der Fluoreszenzintensität verwendeten Fluoreszenzaufnahmen wurden für alle sechs Formulierungen die Inkubationszeiten 0h, 4h und 24h ausgewählt und die dazugehörige Breite der jeweiligen Fluoreszenzbanden als Maß für die Eindringtiefe der einzelnen Formulierungen bestimmt. Aus den in drei Parallelversuchen gewonnenen neun Einzelwerten wurde für jede Formulierung ein Mittelwert gebildet. Die jeweiligen relativen Eindringtiefen sind in Abb. 17 dargestellt.
Nach 4- und 24-stündiger Inkubationszeit zeigte LKS eine signifikant tiefere Penetration als die übrigen Formulierungen. Die Gelformulierungen mit und ohne DMSO zeigten wie schon bei der Fluoreszenzintensität, unter Punkt III.2.3.1, keinen signifikanten Unterschied. 5-ALA in hydrophilem Gel mit DMSO penetrierte nach 4h und 24h signifikant tiefer als MAL, 5-ALA in Psoralon Fettcreme und 5-ALA in Ungt. emuls. aquos. Während sich zwischen 5-ALA in Psoralon Fettcreme und MAL weder nach 4h noch nach 24h ein signifikanter Unterschied zeigte, penetrierte 5-ALA in Ungt. emuls. aquos. zu beiden Zeitpunkten signifikant schlechter als 5-ALA in Psoralon Fettcreme und Metvix®.
Aufgrund der unterschiedlichen Signalintensität konnte folgende Reihenfolge beobachtet werden:

Nach 8h:
LKS > 5-ALA in hydrophilem Gel mit DMSO ≈ 5-ALA in hydrophilem Gel ohne DMSO > 5-ALA in Psoralon Fettcreme ≈ MAL > 5-ALA in Ungt. emuls. aquos.

Nach 24h:
LKS > 5-ALA in hydrophilem Gel mit DMSO ≈ 5-ALA in hydrophilem Gel ohne DMSO > 5-ALA in Psoralon Fettcreme ≈ MAL > 5-ALA in Ungt. emuls. aquos.

Die zugehörigen Signifikanzen sind in Tabelle 6 aufgeführt.

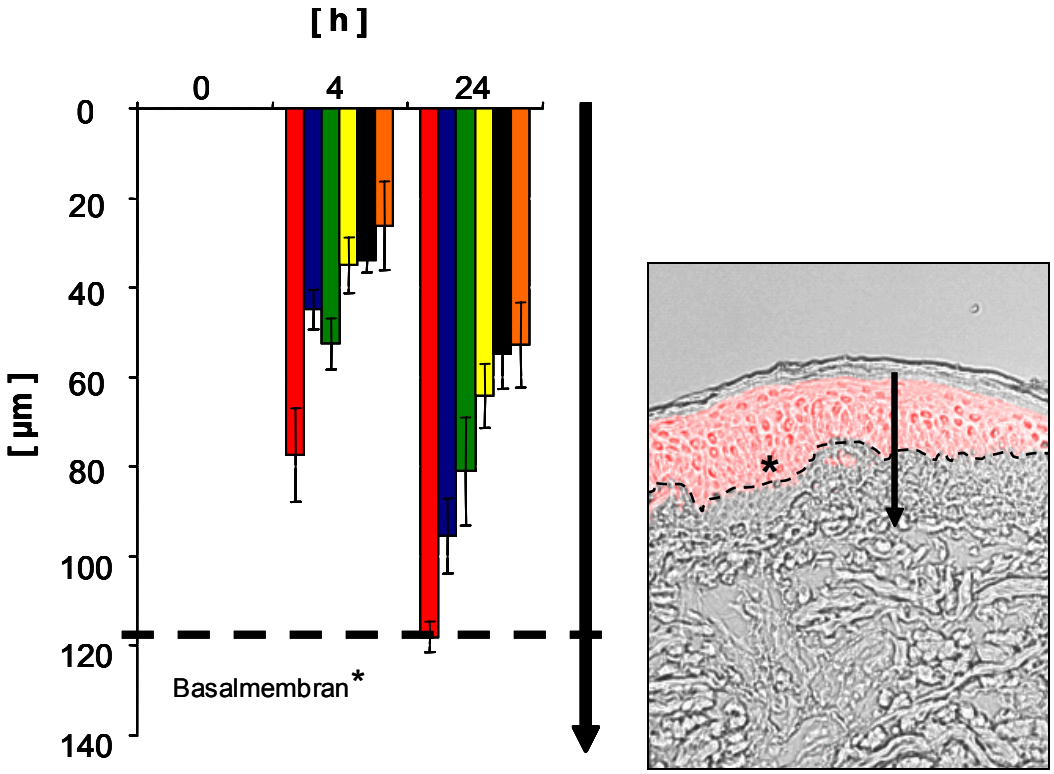


Abb. 17: Eindringtiefen der verschiedenen 5-ALA- Formulierungen im Zeitverlauf bei 37°C

Aus den bereits für die Auswertung der Fluoreszenzintensität verwendeten Fluoreszenzaufnahmen wurden für alle sechs Formulierungen, ■ MAL, ■ LKS, ■ 5-ALA in hydrophilem Gel mit DMSO, ■ 5-ALA in hydrophilem Gel ohne DMSO, ■ 5-ALA in Psoralon Fettcreme und ■ 5-ALA in Ungt. emuls. aquos., die Inkubationszeiten 0h, 4h und 24h ausgewählt und mit der Software „Image Pro PLUS (Media Cybernetic) bezüglich ihrer relativen Eindringtiefe ausgewertet. (n=3± Standardabweichung), (h= Stunden; * = Basalmembran, Ø in 90-115 µm Tiefe; → die Eindringtiefe wurde entlang dem Pfeil gemessen)

Vergleich	4h	24h
LKS vs. MAL	<0,0001	< 0,0001
LKS vs. mit DMSO	<0.0001	< 0,0001
LKS vs. ohne DMSO	<0.0001	< 0,0001
LKS vs. Psoralon	<0.0001	< 0,0001
LKS vs. Ungt. emuls. aquos.	<0.0001	< 0.0001
mit DMSO vs. ohne DMSO	0,2333	0,3687
mit DMSO vs. Psoralon	0,0042	<0,0001
mit DMSO vs. Ungt. emuls. aquos.	< 0,0001	<0.0001
mit DMSO vs. MAL	< 0,0001	< 0,0001
Psoralon vs. MAL	0,4415	0,3598
Ungt. emuls. aquos. vs. MAL	0,0125	0,0041
Psoralon vs. Ungt. emuls. aquos.	0,0077	0,0001

Tab. 6: Signifikanzbestimmung für den Vergleich der einzelnen 5-ALA /-Methylester Formulierungen bei 37°C (ungepaarter T- Test)
(Abkürzungen siehe Tabelle 1), (p<0,05 = signifikanter Unterschied)

2.4.2. Vergleich der relativen Eindringtiefen bei 32°C

Aus den bereits für die Messung der Fluoreszenzintensität gewonnenen Fluoreszenzaufnahmen wurden für jede der sechs verschiedenen Formulierungen die Inkubationszeiten 0h, 4h und 24h ausgewählt und die dazugehörige Breite der jeweiligen Fluoreszenzbande als Maß für die Eindringtiefe der einzelnen Formulierungen bestimmt. Aus den in drei Parallelversuchen gewonnenen neun Einzelwerten wurde für jede Formulierung ein Mittelwert gebildet. Die jeweiligen relativen Eindringtiefen sind in Abb. 18 dargestellt.
Nach 4- und 24-stündiger Inkubationszeit zeigte LKS eine signifikant tiefere Penetration als die übrigen Formulierungen. Die beiden Gelformulierungen mit und ohne DMSO zeigten wie schon bei der Fluoreszenzintensität, unter Punkt III.2.3.2, erst nach 24h einen signifikanten Unterschied. 5-ALA in hydrophilem Gel mit DMSO penetrierte nach 4h und 24h signifikant tiefer als MAL, 5-ALA in Psoralon Fettcreme und 5-ALA in Ungt. emuls. aquos. Während 5-ALA in Psoralon Fettcreme nach 4h und 24h signifikant tiefer penetrierte als 5-ALA in Ungt. emuls. aquos. zeigte sich zwischen 5-ALA in Psoralon Fettcreme und MAL erst nach 24h ein signifikanter Unterschied. 5-ALA in Ungt. emuls. aquos. penetrierte nach 4h signifikant weniger tief als MAL, zeigte nach 24h allerdings eine ähnliche Penetrationstiefe.
Aufgrund der unterschiedlichen Signalintensität konnte folgende Reihenfolge beobachtet werden:

Nach 8h:
LKS > 5-ALA in hydrophilem Gel mit DMSO ≈ 5-ALA in hydrophilem Gel ohne DMSO > 5-ALA in Psoralon Fettcreme ≈ MAL > 5-ALA in Ungt. emuls. aquos.

Nach 24h:
LKS > 5-ALA in hydrophilem Gel mit DMSO > 5-ALA in hydrophilem Gel ohne DMSO > 5-ALA in Psoralon Fettcreme > MAL ≈ 5-ALA in Ungt. emuls. aquos.

Die zugehörigen Signifikanzen sind in Tabelle 7 aufgeführt.

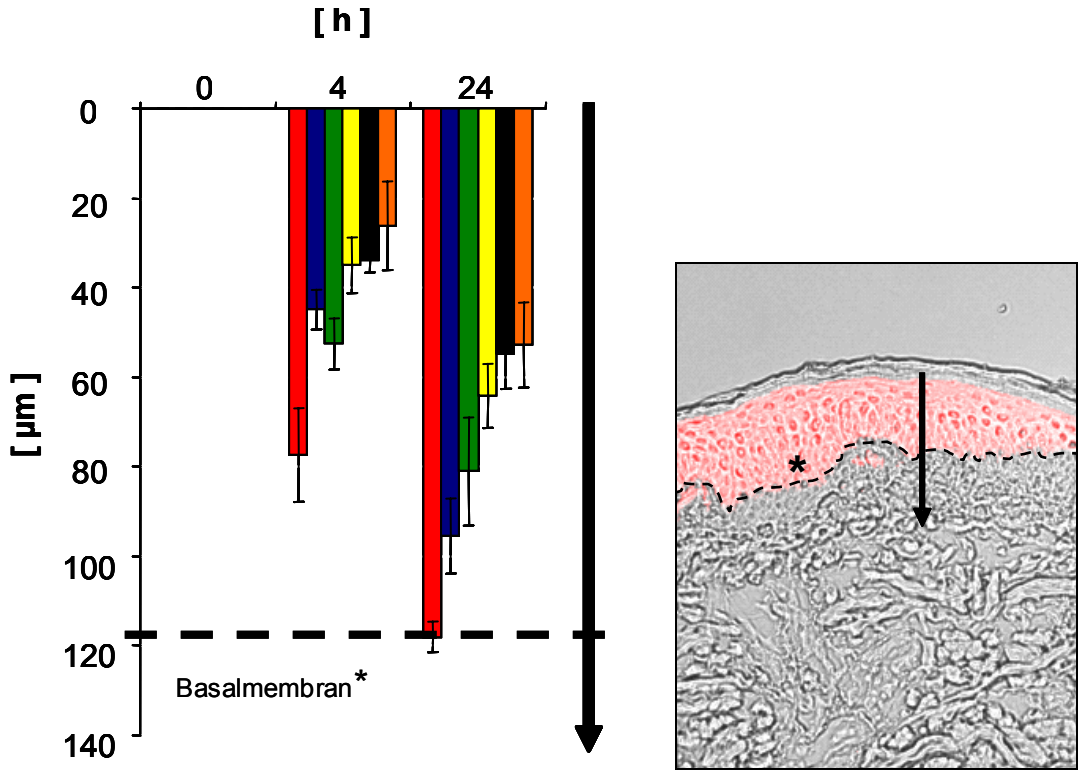


Abb. 18: Eindringtiefen der verschiedenen 5-ALA- Formulierungen im Zeitverlauf bei 32°C,

Aus den bereits für die Auswertung der Fluoreszenzintensität verwendeten Fluoreszenzaufnahmen wurden für alle sechs Formulierungen, ■ MAL, ■ LKS, ■ 5-ALA in hydrophilem Gel mit DMSO, ■ 5-ALA in hydrophilem Gel ohne DMSO, ■ 5-ALA in Psoralon Fettcreme und ■ 5-ALA in Ungt. emuls. aquos., die Inkubationszeiten 0h, 4h und 24h ausgewählt und mit der Software „Image Pro PLUS“ (Media Cybernetic) bezüglich ihrer relativen Eindringtiefe ausgewertet. (n=3± Standardabweichung), (h= Stunden; * = Basalmembran, Ø in 90-115 µm Tiefe; → die Eindringtiefe wurde entlang dem Pfeil gemessen)

Vergleich	4h	24h
LKS vs. MAL	<0,0001	<0,0001
LKS vs. mit DMSO	<0.0001	<0.0001
LKS vs. ohne DMSO	<0.0001	<0.0001
LKS vs. Psoralon	<0.0001	<0.0001
LKS vs. Ungt. emuls. aquos.	<0.0001	<0.0001
mit DMSO vs. ohne DMSO	0,062	0,0093
mit DMSO vs. Psoralon	0,0012	< 0,0001
mit DMSO vs. Ungt. emuls. aquos.	< 0,0001	< 0,0001
mit DMSO vs. MAL	< 0,0001	< 0,0001
Psoralon vs. MAL	0,6204	0,0177
Ungt. emuls. aquos. vs. MAL	0,0452	0,6446
Psoralon vs. Ungt. emuls. aquos.	0,0418	0,012

Tab. 7: Signifikanzbestimmung für den Vergleich der einzelnen 5-ALA/-Methylester Formulierungen bei 32°C (ungepaarter T- Test)
(Abkürzungen siehe Tabelle 1),
(p<0,05 = signifikanter Unterschied)

2.4.3. Vergleich der relativen Eindringtiefen bei 4°C

Aus den bereits für die Messung der Fluoreszenzintensität gewonnenen Fluoreszenzaufnahmen wurden für jede der sechs verschiedenen Formulierungen die Inkubationszeiten 0h, 4h und 24h ausgewählt und die dazugehörige Breite der jeweiligen Fluoreszenzbande als Maß für die Eindringtiefe der einzelnen Formulierungen bestimmt. Aus den in drei Parallelversuchen gewonnenen neun Einzelwerten wurde für jede Formulierung ein Mittelwert gebildet. Die jeweiligen relativen Eindringtiefen sind in Abb. 19 dargestellt.

Da nach 4-stündiger Inkubationszeit noch keine Fluoreszenz messbar war (siehe III.2.3.3.), konnte zu diesem Zeitpunkt keine Eindringtiefe bestimmt werden.

Nach 24-stündiger Inkubationszeit zeigte LKS eine signifikant tiefere Penetration als MAL, 5-ALA in Psoralon Fettcreme und 5-ALA in Ungt. emuls. aquos. Die beiden Gelformulierungen unterschieden sich nicht signifikant. 5-ALA in hydrophilem Gel mit DMSO penetrierte signifikant tiefer als MAL, 5-ALA in Psoralon Fettcreme und 5-ALA in Ungt. emuls. aquos. Ebenso unterschieden sich die drei letztgenannten Formulierungen signifikant, wobei 5-ALA in Psoralon Fettcreme tiefer in die Epidermis eindrang als MAL und dieses wiederum tiefer als 5-ALA in Ungt. emuls. aquos.

Aufgrund der unterschiedlichen Signalintensität konnte folgende Reihenfolge beobachtet werden:

Nach 24h:

LKS ≈ 5-ALA in hydrophilem Gel mit DMSO ≈ 5-ALA in hydrophilem Gel ohne DMSO > 5-ALA in Psoralon Fettcreme > MAL > 5-ALA in Ungt. emuls. aquos.

Die zugehörigen Signifikanzen sind in Tabelle 8 aufgeführt.

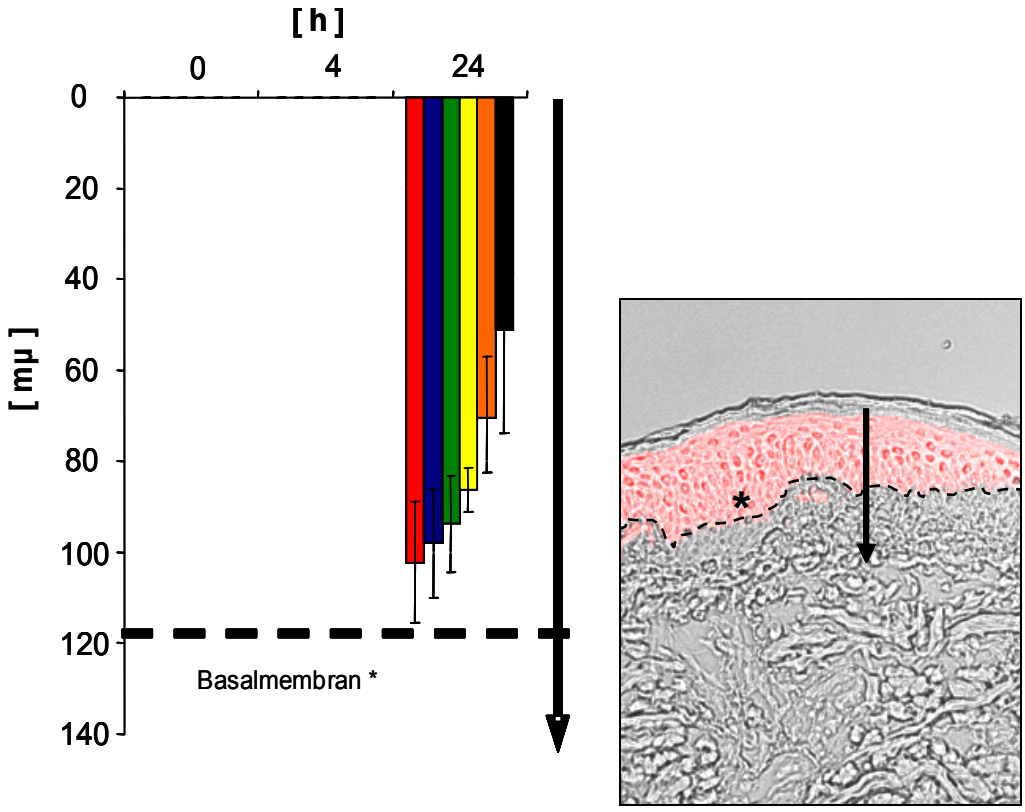


Abb. 19: Eindringtiefen der verschiedenen 5-ALA- Formulierungen im Zeitverlauf bei 4°C,

Aus den bereits für die Auswertung der Fluoreszenzintensität verwendeten Fluoreszenzaufnahmen wurden für alle sechs Formulierungen, ■ MAL, ■ LKS, ■ 5-ALA in hydrophilem Gel mit DMSO, ■ 5-ALA in hydrophilem Gel ohne DMSO, ■ 5-ALA in Psoralon Fettcreme und ■ 5-ALA in Ungt. emuls. aquos., die Inkubationszeiten 0h, 4h und 24h ausgewählt und mit der Software „Image Pro PLUS“ (Media Cybernetic) bezüglich ihrer relativen Eindringtiefe ausgewertet. (n=3± Standardabweichung), (h= Stunden; * = Basalmembran, Ø in 90-115 µm Tiefe; → die Eindringtiefe wurde entlang dem Pfeil gemessen)

Vergleich	24h
LKS vs. MAL	<0,0001
LKS vs. mit DMSO	0,5007
LKS vs. ohne DMSO	0,1955
LKS vs. Psoralon	0,0227
LKS vs. Ungt. emuls. aquos.	<0,0001
mit DMSO vs. ohne DMSO	0,5207
mit DMSO vs. Psoralon	0,07
mit DMSO vs. Ungt. emuls. aquos.	<0,0001
mit DMSO vs. MAL	<0,0001
Psoralon vs. MAL	<0,0001
Ungt. emuls. aquos. vs. MAL	0,0034
Psoralon vs. Ungt. emuls. aquos.	0,0008

Tab. 8:
Signifikanzbestimmung für den Vergleich der einzelnen 5-ALA/-Methylester Formulierungen bei 4°C (ungepaarter T- Test)
(Abkürzungen siehe Tabelle 1),
(p<0,05 = signifikanter Unterschied)

2.4.4. Vergleich der relativen Eindringtiefe bei 32°C und 37°C

Durch die Erhöhung der Umgebungstemperatur um 5°C, von 32°C auf 37°C (Abb. 20), zeigte sich für MAL nach 8-stündiger Inkubationszeit eine signifikante Verminderung der relativen Eindringtiefe um 29,3%, für 5-ALA in hydrophilem Gel ohne DMSO um 18,3% und für 5-ALA in Unguentum emulsificans aquos. um 33%. 5-ALA in hydrophilem Gel mit 40% DMSO, LKS und 5-ALA in Psoralon Fettcreme zeigten keine signifikanten Veränderungen.

Nach 24-stündiger Inkubationszeit zeigte nur 5-ALA in Psoralon Fettcreme eine signifikante Verschlechterung der Eindringtiefe um 3,6%, während die übrigen Formulierungen sich nicht signifikant unterschieden.

Die zugehörigen Signifikanzen sind in Tabelle 9 aufgeführt.

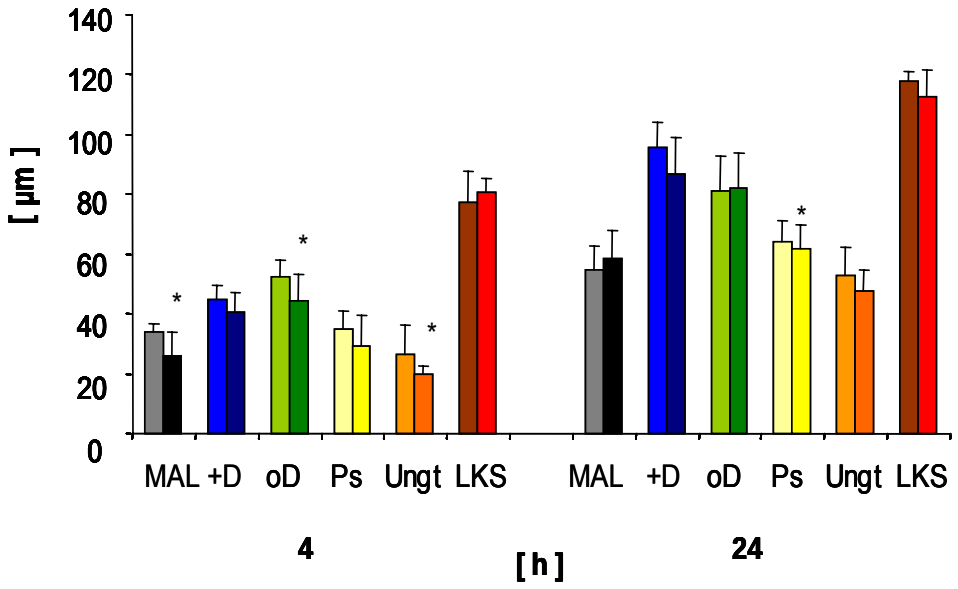


Abb. 20: Vergleich der Eindringtiefe bei 32°C und 37°C

Metvix® [MAL] (■ 32°C, ■ 37°C), Levulan® Kerastick® [LKS], (■ 32°, ■ 37°C), 5-ALA in hydrophilem Gel mit DMSO [+D] (■ 32°C, ■ 37°C), 5-ALA in hydrophilem Gel ohne DMSO [oD] (■ 32°C, ■ 37°C), 5-ALA in Psoralon Fettcreme [Ps] (■ 32°C, ■ 37°C) und 5-ALA in Ungt. emuls. aquos. [Ungt] (■ 32°C, ■ 37°C); (* signifikant)

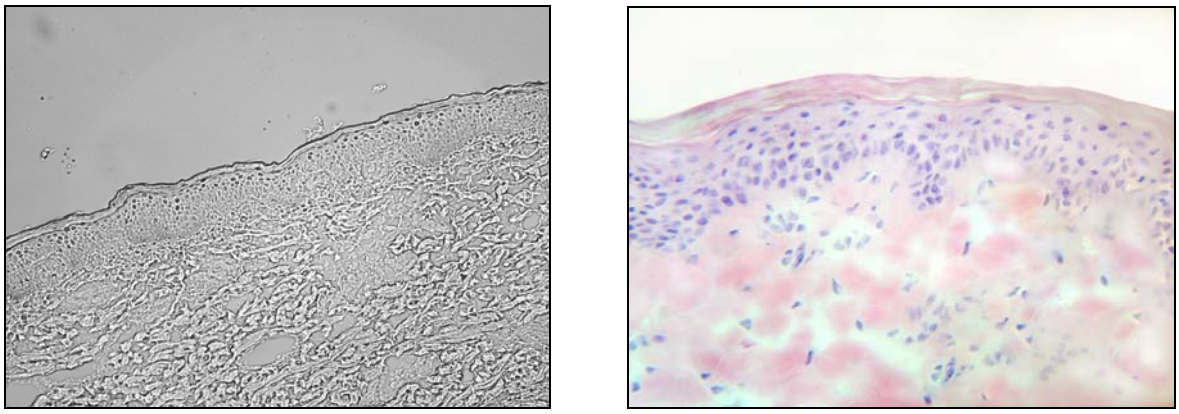
	4h	24h
MAL	0,01	0,1996
mit DMSO	0,0981	0,0752
ohne DMSO	0,0255	0,9976
Psoralon	0,1593	0,0446
Ungt. emuls. aquos.	0,0438	0,3875
LKS	0,4699	0,1412

Tab. 9:
Signifikanzbestimmung für den Vergleich der einzelnen 5-ALA/-Methylester Formulierungen bei 32°C und 37°C (ungepaarter T- Test)
(Abkürzungen siehe Tabelle 1),
($p<0,05$ = signifikanter Unterschied

3. Vergleich der Fluoreszenzinduktion und der Penetrationseigenschaften der einzelnen 5-Aminolävulinsäure/-methylester Formulierungen an gestrippter Schweinehaut

3.1. Entfernen des Stratum corneum

Messungen des Stratum corneum an unbehandelter Haut ergaben eine Dicke von durchschnittlich 30± 4 µm (n=10).



A B

Abb. 21: Schweinehaut mit erhaltenem Stratum corneum

A) Durchlichtaufnahme (x10)

B) HE-Färbung (40x)

3.1.1. Entfernen des Stratum corneum durch Abbrühen

Die HE Präparate der Häute, die für ca. 0,5 Sekunden mit kochendem Wasser abgebrüht wurden, zeigten eine Destruktion der kompletten Epidermis (Abb. 22).

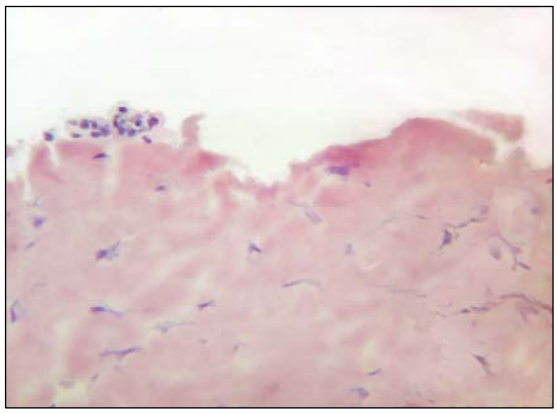


Abb. 22: Abgebrühte Schweinehaut (HE, 40x)

Die Schweinehaut wurde vor dem Einbetten für ca. 0,5 Sekunde mit kochendem Wasser übergossen, anschließend wurde die sich lösende oberste Hautschicht mit einer Pinzette abgezogen.

3.1.2. Entfernen des Stratum corneum mit einem Metallspatel

Die HE Präparate der mit einem Spatel bearbeiteten Häute zeigten eine komplette Entfernung des Stratum corneum sowie eine Destruktion der obersten Epithelzellschichten. Die Zellkerne waren deformiert und die einzelnen Zellen nicht deutlich voneinander abzugrenzen (Abb. 23).

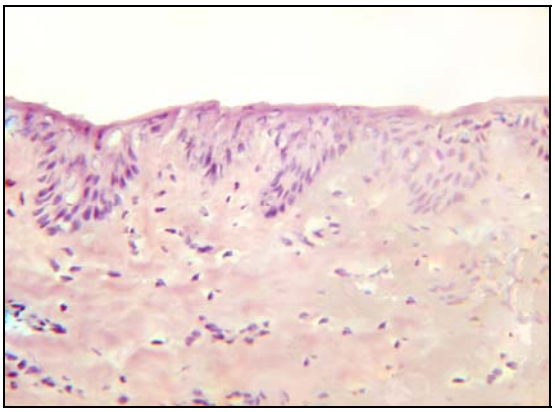
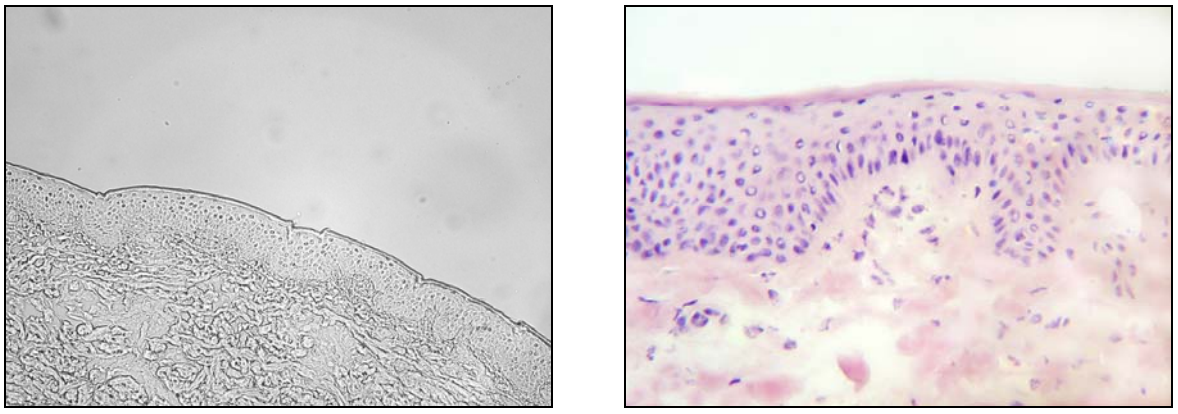


Abb. 23: Schweinehaut nach Entfernen des Stratum corneum mit einem Metallspatel (HE, 40x)
Die Schweinehaut wurde auf einer Fläche von ca. 6 cm^2 mit einem Spatel aufgeraut bis sich das Stratum corneum löste. Nach ca. vierminütigem Aufrauen konnte dieses zur Seite geschoben und mithilfe von Tesafilm („Tape-Stripping“) entfernt werden. Das „Tape-Stripping“ wurde wiederholt bis auf dem abgezogenen Klebestreifen keine Hautpartikel mehr zu sehen waren (~ 20 x).

3.1.3. Entfernen des Stratum corneum durch „Tape-Stripping“

Die HE Präparate der 35x mit Tesafilm gestrippten Häute zeigten im Durchlichtmikroskop eine unbeschädigte, komplett erhaltene Epidermis mit einem deutlich reduzierten Stratum corneum (Abb. 24).
Mithilfe der Software „Image Pro Plus“ wurde eine Reduktion des Stratum corneum von 67,5± 2% festgestellt (n=10). Für die Versuchsdurchgänge an „gestrippter“ Haut wurde diese „Tape-Stripping“-Methode verwendet, da sie im Gegensatz zu den beiden anderen Methoden (siehe III.3.1.1 und III.3.1.2) eine reproduzierbare Entfernung des Stratum corneum bei Erhalt des Gewebes gewährleistete.



A B

Abb. 22: Schweinehaut nach „Tape-Stripping“
A) Durchlichtaufnahme (10x)
B) HE-Färbung (40x),

3.2. Vergleich der mittleren Fluoreszenzintensitäten

3.2.1. Vergleich der mittleren Fluoreszenzintensität bei 37°C

Die zuvor mit Tesafilm 35x „gestrippten“ Häute (aufgetragene Wirkstoffmenge 0,012 g/cm^2) wurden bei 37°C für je 0h, 4h und 8h mit den verschiedenen Formulierungen lichtgeschützt inkubiert. Nach der jeweiligen Inkubationszeit wurde eine Hautprobe mithilfe einer Biopsiestanze entnommen. Diese wurde, wie unter Punkt II.2.2 beschrieben, mithilfe des Fluoreszenzmikroskops beurteilt. Aus den in drei Parallelversuchen gewonnenen neun Einzelwerten wurde für jede Formulierung ein Mittelwert gebildet. Die jeweiligen mittleren Fluoreszenzintensitäten sind in Abb. 25 dargestellt.
Wie bereits bei intakter Haut, unter Punkt III.2.3.1, zeigte LKS nach 4-stündiger Inkubationszeit eine signifikant stärkere Fluoreszenzintensität als die übrigen Formulierungen. Dieser Vorsprung blieb auch nach 8h erhalten. Die beiden Gelformulierungen mit und ohne DMSO zeigten nach 8h keinen signifikanten Unterschied. 5-ALA in hydrophilem Gel mit DMSO zeigte nach 8-stündiger Inkubationszeit eine signifikant stärkere Fluoreszenzintensität als MAL, 5-ALA in Psoralon Fettcreme und Ungt. emuls. aquos. Während 5-ALA in Psoralon Fettcreme signifikant stärker fluoreszierte als MAL und 5-ALA in Ungt. emuls. aquos., unterschieden sich diese beiden Formulierungen nicht voneinander.
Aufgrund der Signalintensität konnte folgende Reihenfolge beobachtet werden:

Nach 8h:
LKS > 5-ALA in hydrophilem Gel mit 40% DMSO ≈ 5-ALA in hydrophilem Gel ohne DMSO > 5-ALA in Psoralon Fettcreme > MAL ≈ Ungt. emuls. aquos.

Die zugehörigen Signifikanzen sind in Tabelle 10 aufgeführt.

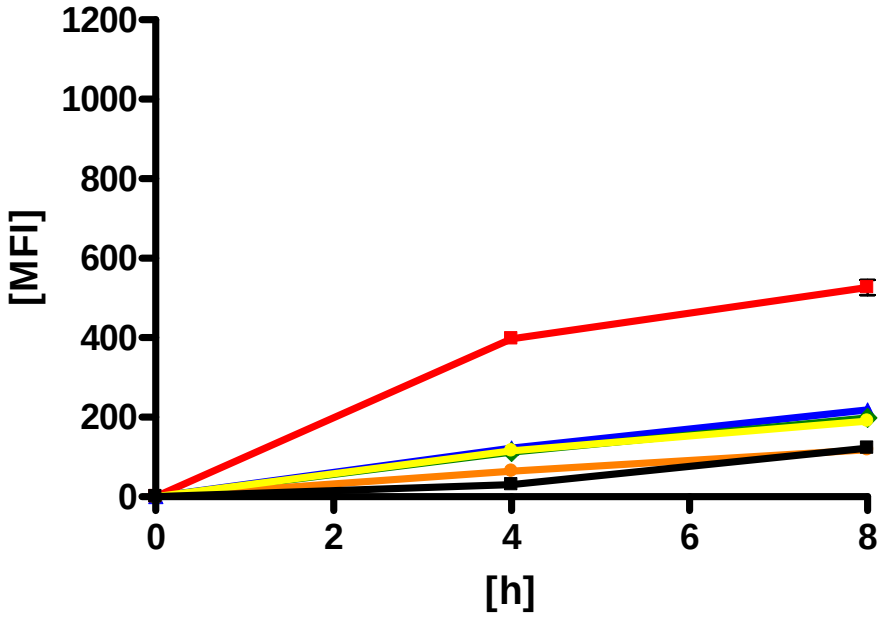


Abb. 25: Fluoreszenzintensitäten der verschiedenen 5-ALA- Formulierungen im Zeitverlauf bei 37°C an „gestrippter“ Haut

Die vorbereiteten Hautstücke wurden mit fünf verschiedenen 5-ALA Formulierungen ■ MAL, ■ LKS, ◆ 5-ALA in hydrophilem Gel mit DMSO, ▲ 5-ALA in hydrophilem Gel ohne DMSO, ● 5-ALA in Psoralon Fettcreme und ▲ 5-ALA in Ungt. emuls. aquos., bei 37°C inkubiert. Nach 0h, 4h und 8h wurde eine Probe der Haut entnommen und als Kryoschnitt unter dem Fluoreszenzmikroskop beurteilt.
(n=3± Standardabweichung), (h= Stunden; MFI= mittlere Fluoreszenzintensität)

Vergleich	8h
LKS vs. MAL	<0,0001
LKS vs. mit DMSO	<0,0001
LKS vs. ohne DMSO	<0,0001
LKS vs. Psoralon	<0,0001
LKS vs. Ungt. emuls. aquos.	<0,0001
mit DMSO vs. ohne DMSO	0,0849
mit DMSO vs. Psoralon	0,023
mit DMSO vs. Ungt. emuls. aquos.	<0,0001
mit DMSO vs. MAL	<0,0001
Psoralon vs. MAL	<0,0001
Ungt. emuls. aquos. vs. MAL	0,6092
Psoralon vs. Ungt. emuls. aquos.	<0,0001

Tab. 10: Signifikanzbestimmung für den Vergleich der einzelnen 5-ALA/-Methylester Formulierungen bei 37°C an „gestrippter Haut“ (ungepaarter T- Test)
(Abkürzungen siehe Tabelle 1), (p<0,05 = signifikanter Unterschied)

3.2.2. Vergleich der Fluoreszenzintensität an intakter und gestrippter Schweinehaut

Tab. 11 zeigt die Zunahme der PPIX-Fluoreszenzintensität an „gestrippter“ im Vergleich zu intakter Haut. Hierzu wurden die, wie unter Punkt III.2.3.1 und III.3.2.1 beschrieben, erarbeiteten Mittelwerte in Verhältnis zueinander gesetzt.
Es lässt sich eine deutliche Verbesserung der Fluoreszenzintensität durch das „Tape-Stripping“ der Schweinehaut für alle 5-ALA Formulierungen beobachten.

Formulierung	**0h**	**4h**	**8h**
LKS	0%	45%	20%
MAL	0%	20%	60%
5-ALA in hydrophilem Gel mit DMSO	0%	76%	54%
5-ALA in hydrophilem Gel ohne DMSO	0%	56%	48%
5-ALA in Psoralon Fettcreme	0%	83%	76%
5-ALA in Unguentum emulsificans aquos.	0%	77%	73%

Tab. 11 : Erhöhung der Fluoreszenzintensität durch vorangehendes „Strippen“ der Schweinehaut
Die Tabelle zeigt die Verstärkung der Fluoreszenzintensität an „gestrippter“ Schweinehaut im Vergleich zu intakter Haut in Prozent. Hierzu wurden die unter Punkt III.2.3.1 und III.3.2.1 erarbeiteten Mittelwerte in Verhältnis zueinander gesetzt. Durch das „Tape-Stripping“ konnte eine deutliche Verstärkung der Fluoreszenzintensität von PPIX erreicht werden.

3.2.3. Vergleich der relativen Eindringtiefe bei 37°C

Von den bereits für die Messung der mittleren Fluoreszenzintensität angefertigten Aufnahmen der Inkubationszeiten 0h, 4h und 8h wurde die Breite der jeweiligen Fluoreszenzbande mit Hilfe des Fluoreszenzmikroskops als Maß für die Eindringtiefe der einzelnen Formulierungen bestimmt. Aus den in drei Parallelversuchen gewonnenen neun Einzelwerten wurde für jede Formulierung ein Mittelwert gebildet. Die jeweiligen relativen Eindringtiefen sind in Abb. 26 dargestellt.
Nach 8-stündiger Inkubationszeit zeigte LKS eine signifikant höhere Eindringtiefe als 5-ALA in hydrophilem Gel ohne DMSO, 5-ALA in Psoralon Fettcreme, MAL und 5-ALA in Ungt. emuls. aquos. LKS und 5-ALA in hydrophilem Gel mit DMSO unterschieden sich jedoch nicht. Auch 5-ALA in hydrophilem Gel mit DMSO und 5-ALA in hydrophilem Gel ohne DMSO zeigten keinen signifikanten Unterschied. 5-ALA in Psoralon Fettcreme zeigte eine signifikant höhere Eindringtiefe als MAL, jedoch keinen Unterschied zu 5-ALA in Ungt. emuls. aquos. MAL und 5-ALA in Ungt. emuls. aquos. unterscheiden sich nicht signifikant voneinander.
Die zugehörigen Signifikanzen sind in Tabelle 12 aufgeführt.

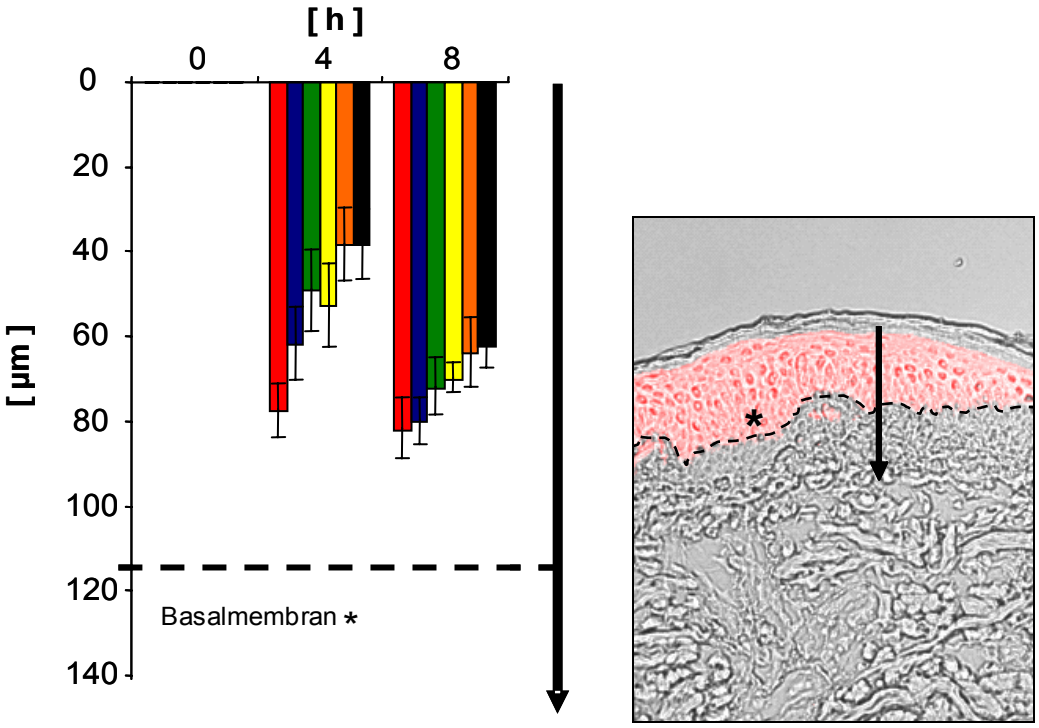


Abb. 26: Eindringtiefen der verschiedenen 5-ALA- Formulierungen im Zeitverlauf bei 37°C an „gestrippter“ Haut

Aus den bereits für die Auswertung der Fluoreszenzintensität verwendeten Fluoreszenzaufnahmen wurden für alle sechs Formulierungen, ■ MAL, ■ LKS, ■ 5-ALA in hydrophilem Gel mit DMSO, ■ 5-ALA in hydrophilem Gel ohne DMSO, ■ 5-ALA in Psoralon Fettcreme und ■ 5-ALA in Ungt. emuls. aquos., die Inkubationszeiten 0h, 4h und 8h ausgewählt und mit der Software „Image Pro PLUS“ (Media Cybernetic) bezüglich ihrer relativen Eindringtiefe ausgewertet. (n=3 ± Standardabweichung), (h= Stunden; * = Basalmembran, Ø in 90-115 µm Tiefe; → die Eindringtiefe wurde entlang dem Pfeil gemessen)

Vergleich	8h
LKS vs. MAL	<0,0001
LKS vs. mit DMSO	0,7399
LKS vs. ohne DMSO	0,0183
LKS vs. Psoralon	0,0008
LKS vs. Ungt. emuls. aquos.	0,0007
mit DMSO vs. ohne DMSO	0,0898
mit DMSO vs. Psoralon	0,0235
mit DMSO vs. Ungt. emuls. aquos.	0,0033
mit DMSO vs. MAL	0,0007
Psoralon vs. MAL	0,0021
Ungt. emuls. aquos vs. MAL	0,5917
Psoralon vs. Ungt. emuls. aquos.	0,0531

Tab. 12:
Signifikanzbestimmung für den Vergleich der einzelnen 5-ALA/-Methylester Formulierungen (ungepaarter T- Test) bei 37°C, an „gestrippter Haut“
(Abkürzungen siehe Tab. 1)
(p<0,05 = signifikanter Unterschied)

3.2.4. Vergleich der relativen Penetration an intakter und „gestrippter“ Schweinehaut

Der Vergleich von intakter und „gestrippter“ Schweinehaut zeigte bereits nach 4h deutlich breitere Fluoreszenzbanden innerhalb der „gestrippten“ Epidermis und damit eine deutlich stärkere relative Penetration der einzelnen 5-ALA Formulierungen (Tab. 13a). Die einzige Ausnahme bildete LKS, der keine Veränderung seines Penetrationsverhaltens zeigte.
Im Vergleich zur relativen Penetration der Formulierungen an intakter Schweinehaut ließ sich an „gestrippter“ Haut bereits nach 8h die annähernd gleiche Eindringtiefe ermitteln wie nach 24h an intakter Haut (Tab. 13b).

	intakte Haut nach 4h (µm)	**"gestrippte" Haut nach 4h (µm)**
MAL	26,1	38,1
+DMSO	40,5	56,7
oDMSO	44,4	57,9
Psoralon	29,1	52,6
Ungt. emuls. aquos.	19,7	38,2
LKS	80,7	78,7

Tab. 13a: Vergleich der relativen Penetration der einzelnen 5-ALA/-Methylester Formulierungen an intakter und „gestrippter“ Haut nach 4-stündiger Inkubation
Bereits nach 4-stündiger Inkubation konnte an „gestrippter“ Haut eine deutlich stärkere Penetration nachgewiesen werden als an intakter Haut. Die einzige Ausnahme bildete LKS.

	intakte Haut nach 24h (µm)	**"gestrippte" Haut nach 8h (µm)**
MAL	58,5	61,8
+DMSO	86,6	79,8
oDMSO	82,0	71,7
Psoralon	61,9	69,7
Ungt. emuls. aquos.	47,5	63,6
LKS	112,9	81,6

Tab. 13b: Vergleich der relativen Penetration der einzelnen 5-ALA/-Methylester Formulierungen an intakter Haut nach 24-stündiger Inkubation und an „gestrippter“ Haut nach 8-stündiger Inkubation
Bereits nach 8-stündiger Inkubation konnte an „gestrippter“ Haut eine ähnliche Penetration nachgewiesen werden wie an intakter Haut nach 24-stündiger Inkubation.

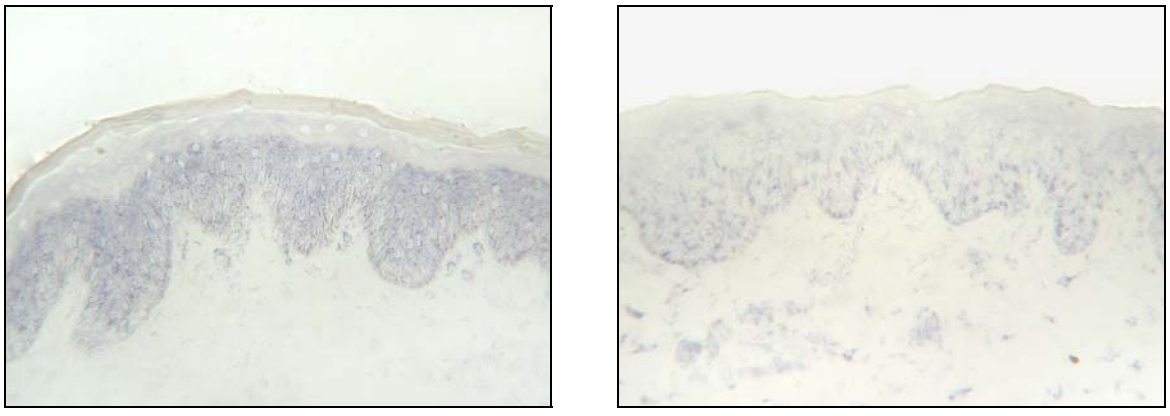
4. Bestrahlung der Schweinehaut

4.1. Bestrahlung der Schweinehaut bei erhaltenem Stratum corneum

Nach 8-stündiger Inkubation der eingebetteten Schweinehäute mit den sechs 5-ALA Formulierungen bei 37°C wurden die Hautstücke für 20 Minuten mit einer Lampe (PDT 1200L, Waldmann Medizintechnik) im roten Spektralbereich, bei 150 mW/cm^2 (~180 J/cm^2) bestrahlt. 12h nach der Bestrahlung wurden je zwei Gewebeproben entnommen, in Paraffin und Stickstoff konserviert und geschnitten.

4.2. Apoptosenachweis mit NBTC

Die mittels NBTC gefärbten Schnitte mit und ohne Stratum corneum wurden qualitativ mit dem Durchlichtmikroskop bei 40-facher Vergrößerung ausgewertet. Abb. 27 zeigt intakte (A) und „gestrippte“ Schweinehaut (B) nach 8-stündiger Inkubation mit LKS und anschließender Bestrahlung mit einer Lampe im roten Spektralbereich für 20 Minuten, bei 150 mW/cm^2 (~180 J/cm^2). Die vitalen Zellen wurden proportional zu ihrem NADH-Gehalt (Nikotinamid-adenin-dinukleotid) dunkelblau gefärbt, während die toten Zellen ungefärbt blieben. Der Anteil der ungefärbten, toten Zellen nahm durch die Reduktion des Stratum corneum mithilfe des „Tape Strippings“ deutlich zu. Das gleiche Ergebnis konnte für die übrigen Formulierungen gezeigt werden, allerdings durch die schwächere Penetration und PPIX Synthese bedingt, in einem insgesamt geringeren Ausmaß.



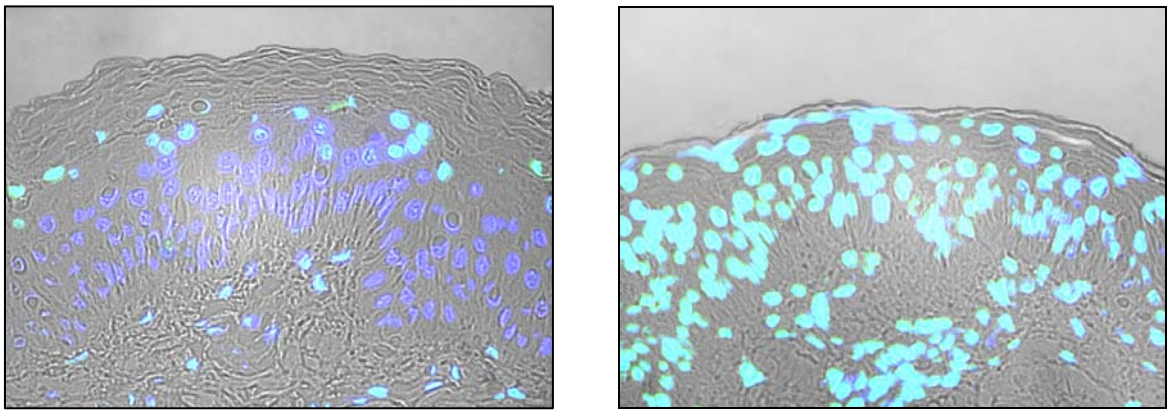
A B

Abb. 27: Vitalitätsnachweis mittels NBTC-Färbung

Schweinehaut nach 8-stündiger Inkubation mit LKS und anschließender Bestrahlung für 20 Minuten im roten Spektralbereich, bei 150 mW/cm^2 (~ 180 J/cm^2). A: intakte Schweinehaut, B: „gestrippte“ Schweinehaut; (Durchlichtaufnahme; x40)

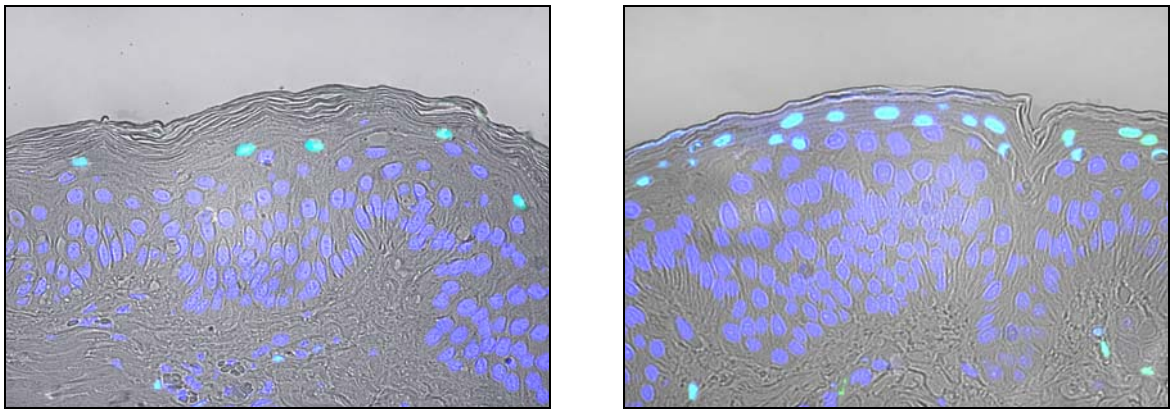
4.3. Apoptosenachweis mit TUNEL

Die mithilfe des TUNEL-Assays gefärbten Schnitte mit und ohne Stratum corneum wurden unter dem Fluoreszenzmikroskop quantitativ ausgewertet (Abb. 28 und 29). Bei 40-facher Vergrößerung wurden in je drei Gesichtsfeldern die vitalen Zellen mit blauem Zellkern und die toten Zellen mit türkisem Zellkern ausgezählt und in Verhältnis zueinander gesetzt.
Anschließend wurden die sechs getesteten 5-ALA/-Methylester Formulierungen anhand der durch sie induzierten Apoptose/Nekrose den sieben Stufen (0-6) eines zuvor festgelegten Schemas (Abb. 30) zugeteilt und verglichen. Auch hier zeigte die Reduktion des Stratum corneum eine deutliche Verbesserung der Bestrahlungsergebnisse. Im Durchschnitt konnte eine 8-12%ige Zunahme der Apoptose/Nekrose festgestellt werden. Eine Ausnahme bildete LKS, der durch das „Tape Stripping“ eine ~69%ige Erhöhung der apoptotischen/nekrotischen Zellen von 25% auf 97% erzielte.
(Positivkontrolle: siehe IV.1, Abb.9a)



A B

Abb. 28: Vitalitätsnachweis mittels TUNEL-Färbung (40x)
Schweinehaut nach 8-stündiger Inkubation mit LKS und anschließender Bestrahlung für 20 Minuten im roten Spektralbereich, bei 150 mW/cm^2 (~ 180 J/cm^2). A: intakte Schweinehaut, B: „gestrippte“ Schweinehaut; (blaue Zellkerne= vitale Zellen, türkise Zellkerne = apoptotische/nekrotische Zellen)



A B

Abb. 29: Vitalitätsnachweis mittels TUNEL-Färbung (MAL)

Schweinehaut nach 8-stündiger Inkubation mit MAL und anschließender Bestrahlung für 20 Minuten im roten Spektralbereich, bei 150 mW/cm^2 (~ 180 J/cm^2). A: intakte Schweinehaut, B: „gestrippte“ Schweinehaut; (blaue Zellkerne= vitale Zellen, türkise Zellkerne = apoptotische/nekrotische Zellen)

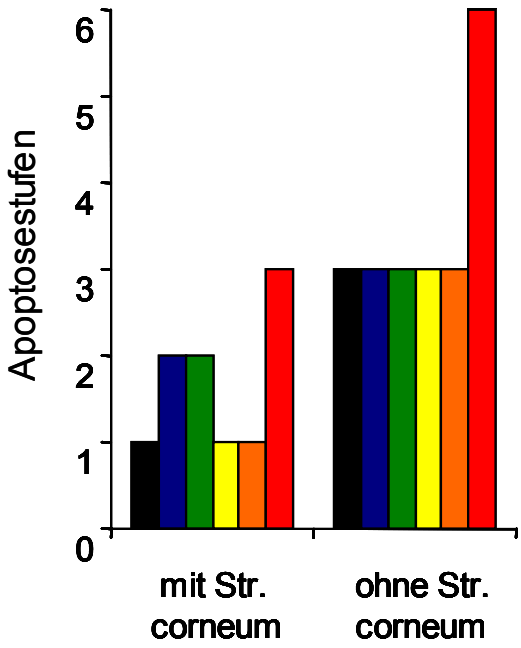


Abb. 30: Stufeneinteilung anhand dem relativen Verhältnis tote/vitale Zellen

Schema zur Einteilung der durch die Bestrahlung der 8h inkubierten Hautstücke ausgelösten Apoptose/Nekrose (Stufe 0 =0%, Stufe 1=1-5%, Stufe 2=6-15%, Stufe 3=16-25%, Stufe 4=26-50%, Stufe 5=51-75%, Stufe 6=76-100%). ■ MAL, ■ LKS, ■ 5-ALA in hydrophilem Gel mit DMSO, ■ 5-ALA in hydrophilem Gel ohne DMSO, ■ 5-ALA in Psoralon Fettcreme und ■ 5-ALA in Unguentum emulsificans aquos.

IV. Diskussion

Die photodynamische Therapie mit 5-ALA ist eine effiziente Therapieoption für die Behandlung der aktinischen Keratose (AK), des Morbus Bowen und des superfiziellen oder nodulären Basalzellkarzinoms (BCC). 5-ALA ist ein sehr kleines Molekül (167,6 g/mol). Seine hydrophilen Eigenschaften beeinträchtigen seine Penetration durch die hydrophobe Haut jedoch deutlich [39]. Das lipophile Stratum corneum bildet die Hauptbarriere. Um dennoch eine hohe Penetrationsrate und damit hohe PPIX-Produktion zu erreichen, werden in der PDT verschiedene chemische und physikalische Strategien angewendet. Zum einen kommen verschiedene Vehikel und Penetrationsverstärker zum Einsatz, zum anderen wird zum Beispiel über eine Temperaturerhöhung der Haut oder das „Tape-Stripping“ versucht die Penetration und die PPIX-Synthese zu verbessern.
In dieser Arbeit wurden die sechs verschiedenen 5-ALA/-Methylester Formulierungen Metvix® (MET), Levulan® Kerastick® (LKS), 5-ALA in hydrophilem Gel (mit 40% und ohne DMSO), 5-ALA in Psoralon Fettcreme und 5-ALA in Unguentum emulsificans aquos. bei 37°C, 32°C und 4°C an *ex vivo* Schweinehaut mit und ohne Stratum corneum verglichen.

1. Ex vivo Schweinehautmodell

Das Integument des Hausschweines wird heute vielfach als dermatologisches Modell für die Haut des Menschen genutzt [36, 37]. In histologischen Untersuchungen zeigte die Epidermis des Hausschweines grundsätzlich die gleichen Strukturanteile - Stratum basale, Stratum spinosum, Stratum granulosum und Stratum corneum (conjunctum/disjunctum) - wie menschliche Haut. Lichtmikroskopisch unterschied sich hierbei das Integument des Schweineohres nicht von dem der allgemeinen Körperdecke [36, 37]. Schmook et al. verglichen menschliche Haut mit Schweinehaut (Landrasse x Edelschwein), Rattenhaut, Graftskin™ LSE™ (lebende Haut-Äquivalente) und Skinethic™ HRE (human reconstructed epidermis) mithilfe von vier topisch applizierten Substanzen - Salicylsäure, Hydrocortison, Clotrimazol und Terbinafin - die unterschiedliche Polaritäten aufwiesen [40]. Wie bereits in anderen Publikationen beschrieben, zeigte sich die größte Übereinstimmung des Penetrationsverhaltens und der Konzentration der verwendeten Substanzen innerhalb der Keratinozyten zwischen humaner Haut und der Haut von Hausschweinen. Dieser Vergleich wurde bei einer Temperatur von 32°C über einen Zeitraum von 48h durchgeführt [40].
In dieser Arbeit wurde Haut aus der Rückenpartie von sechs Monate alten weiblichen oder kastrierten männlichen Hausschweinen der Rassen Pietrain und Landrasse verwendet, die, wie oben erwähnt, u. a. von Schmook et al. (2001) als geeignetes Modell

für humane Haut empfohlen wurden. Die Verwendung des Integuments der Rückenpartie setzte eine vorsichtige Reinigung der Haut von oberflächlichen Verschmutzungen voraus. Hierfür wurde die Haut zunächst für ca. 5 Minuten angefeuchtet und anschließend sehr vorsichtig mit Aqua dest. gereinigt [36, 37]. Da dieses Modell u. a. für Penetrationsstudien eingesetzt wurde, musste ein Abrieb der Hornschicht und damit eine Verfälschung der Ergebnisse verhindert werden. Im Gegensatz zu den meisten bisher veröffentlichten Studien an Schweinehaut, die vom Zellmetabolismus und damit von der Vitalität der Haut unabhängiges Penetrations- und Anreicherungsverhalten untersuchten, wurde in dieser Arbeit die vorbereitete Schweinehaut in HEPES-Agar eingebettet. Dies geschah in Anlehnung an einen bereits 1997 durchgeführten Versuch mit humaner Haut. Damals wurde die Eignung von 9-Acetoxy-2,7,12,17-tetrakis-(beta-methoxyethyl)-porphycen (ATMPn) als Photosensibilisator für die photodynamische Therapie (PDT) untersucht [41]. Die Petrischalen mit dem Agar übernahmen die Funktion von Feuchtekammern, die ein Austrocknen der Haut verhinderten. Auf diese Weise konnte die Vitalität der Haut und damit die für die Umsetzung von 5-ALA/-Methylester in rot fluoreszierendes Protoporphyrin IX (PPIX) nötigen Enzyme, bei 37°C, 32°C und 4°C über einen Zeitraum von mehr als 24h erhalten werden.

2. Mittlere Fluoreszenzintensität und relative Penetration an intakter Haut in Abhängigkeit von der Temperatur

Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurde gezeigt, dass das *ex vivo* Schweinehautmodell den Vergleich unterschiedlicher 5-ALA/-Methylester Formulierungen über einen Zeitraum von 24h ermöglicht.

2003 berichteten van den Akker et al. von einer temperaturabhängigen Erhöhung der Fluoreszenz. Sie führten dies auf drei Hauptursachen zurück: (1) auf die Erhöhung der Penetration in die Haut, (2) auf die erhöhte Aufnahme von 5-ALA/-Methylester in die Keratinozyten und (3) auf die erhöhte Enzymaktivität sowie die daraus resultierende verstärkte PPIX-Produktion [42]. In dieser Arbeit konnte am *ex vivo* Schweinehautmodell die Abhängigkeit der PPIX-Synthese und der Penetration der einzelnen Formulierungen von der Temperatur nur zum Teil festgestellt werden. Entsprechend den Ergebnissen von van den Akker et al., die eine starke Verminderung der PPIX-Produktion in vitaler, humaner Haut durch eine Temperaturerniedrigung auf 15°C feststellten, zeigte sich auch in dieser Arbeit bei einer Umgebungstemperatur von 4°C selbst nach 24-stündiger Inkubationszeit nur eine minimale PPIX-Produktion. Sie entsprach je nach Formulierung 3-12% der gleichen Formulierung bei 32°C bzw. 37°C. Der Vergleich der mittleren Fluoreszenzintensität [MFI] der einzelnen Formulierungen bei 32°C und 37°C zeigte keine

einheitliche Verstärkung der Fluoreszenzintensität und damit der PPIX-Synthese durch die Erhöhung der Temperatur um 5°C. Zwar zeigte der Vergleich der Fluoreszenzintensitäten z.T. signifikante Unterschiede zwischen 37°C und 32°C, allerdings ohne Tendenz. Betrachtet man die Standardabweichungen der mittleren Fluoreszenzintensitäten so ist davon auszugehen, dass bei einer höheren Anzahl von Parallelversuchen keine Unterschiede mehr feststellbar wären. Es ist anzunehmen, dass durch die Temperaturerhöhung nicht nur die Aktivität der Enzyme der PPIX-Synthese, sondern auch des Enzyms Ferrochelatase, das für den Umbau von PPIX zu Hämoglobin verantwortlich ist, gesteigert wird [43]. Die Konsequenz wäre damit eine Erhöhung der Clearance von PPIX, was die fehlende Erhöhung des PPIX-Levels und damit der Fluoreszenz erklären würde. Aus diesem Grund führten van den Akker et al. die temperaturabhängige Steigerung der Fluoreszenzintensität in ihrer Arbeit auf die gesteigerte Penetration und nicht auf eine gesteigerte PPIX-Synthese zurück und argumentierten damit gegen die Ergebnisse von Juzenas et al. und Moan et al., die in ihren Veröffentlichungen von einer temperaturabhängigen Steigerung der PPIX-Synthese berichteten [44, 45]. Da im Gegensatz zu gesunder Haut, wie sie für diesen Versuch verwendet wurde, in Tumoren jedoch ein relativer Eisenmangel herrscht, muss davon ausgegangen werden, dass im klinischen Alltag eine Temperaturerhöhung der Haut doch auch für die PPIX-Synthese von Bedeutung sein könnte. Da ohne Eisen keine Hämbiosynthese möglich ist, kann auch eine gesteigerte Aktivität der Ferrochelatase zu keiner gesteigerten Clearance von PPIX führen. Außerdem ist zu beachten, dass van den Akker et al. die temperaturabhängige Steigerung der Fluoreszenz zum einen an humaner Haut *in vivo* und zu anderen bei 26°C, 28,6°C, 35,3°c und 40,8°C, also von dieser Arbeit abweichenden Temperaturen, über einen Zeitraum von 8h untersuchten. Die 8-stündige Versuchszeit ist ein wesentlicher Unterschied zu dieser Arbeit, in der eine Detektion der Fluoreszenz erst ab 4-stündiger Inkubationszeit möglich war. Van den Akker et al. verwendeten in ihrem Versuchsaufbau Licht von 405 nm (blaues Licht), das ein wesentlich höheres Absorptionsmaximum hat als rotes Licht bei 635 nm. Dies könnte die höhere Sensibilität ihres Modells erklären. Es stellt sich an dieser Stelle die Frage, ob die Temperaturerhöhung von 5°C im *ex vivo* Schweinehautmodell eventuell innerhalb der ersten 4 h zu einer gesteigerten Fluoreszenzintensität geführt hat und aufgrund der zu geringen Sensibilität der Messungen nicht festgestellt werden konnte.

Van den Akker et al. stellten an *in vivo* Nacktmäusehaut fest, dass der erste Teil der Penetration aus einer passiven Diffusion durch das Stratum corneum besteht und somit die erste Stunde der PPIX-Synthese temperaturunabhängig ist. Für den zweiten Teil der Penetration durch die Epidermis zeigten sie jedoch eine Temperaturabhängigkeit. Die

unterschiedliche Dicke der Haut von Nacktmäusen und Schweinen jedoch macht diese Zeitangabe für das *ex vivo* Schweinehautmodell unwahrscheinlich. Es muss hier mit einer deutlich höheren Dauer für die passive Diffusion durch das Stratum corneum (Schweinehaut ≈ 30 µm) gerechnet werden. In dieser Arbeit zeigte sich nach 24-stündiger Inkubationszeit, bezogen auf die Gesamttiefe der Epidermis von 110-120 µm, kein wesentlicher Unterschied im Penetrationsverhalten der einzelnen Formulierungen bei 4°C, 32°C und 37°C. Das bedeutet, dass in diesem Versuchsmodell die passive Diffusion den aktiven Transport von 5-ALA/-Methylester stark überwiegt. Ähnlich wie bei der Bestimmung der MFI ist bei einer höheren Versuchsanzahl eine Annäherung der Penetrationswerte bei 32°C und 37°C zu erwarten. Nach 4-stündiger Inkubation konnte bei 4°C keine Fluoreszenz gemessen werden, was auch eine Bestimmung der Eindringtiefe verhinderte. Die Übereinstimmung der Penetration nach 24h lässt jedoch auch nach 4h eine große Ähnlichkeit zur Penetration bei 32°C bzw. 37°C vermuten. Ursache der geringen MFI der Formulierungen bei 4°C wäre damit im Gegensatz zu den Ergebnissen von van den Akker et al. nicht in der unterschiedlichen Penetration, sondern in einer langsameren Aufnahme von 5-ALA/-Methylester in die Zelle und dessen verminderte Umsetzung zu PPIX zu suchen. Van den Akker et al. zeigten zwar im *in vitro* Modell an Nacktmäusehaut einen positiven Trend der Penetrationseigenschaften durch die Erhöhung der Temperatur, allerdings waren auch ihre Ergebnisse nicht signifikant. Die Ursache für den fehlenden positiven Trend der Penetrationseigenschaften bei 37°C ist in dieser Arbeit in dem unterschiedlichen Versuchsaufbau zu suchen. Während hier mit *ex vivo* Schweinehaut gearbeitet wurde, verwendeten van den Akker et al. *in vitro* Haut von Nacktmäusen für ihre Penetrationsstudien und *in vivo* humane Haut für die Fluoreszenzmessung. Aufgrund der mangelnden Angaben über den Aufbau und die Beschaffenheit der Haut von Nacktmäusen in der Literatur, lässt sich nur vermuten, dass ein Unterschied der Schweine- und Mäuseepidermis, sowohl in der Dicke (Schweinehaut 110-120 µm) wie auch dem Lipidanteil besteht. Ein weiterer wesentlicher Unterschied bestand in der Versuchsdurchführung. Van den Akker et al. untersuchten das Penetrationsverhalten von 5-ALA indem sie in vitro Mäusehaut zwischen 2 Kammern lagerten. Die Donor-Kammer enthielt 20%ige 5-ALA Lösung (w/w) bei einem pH von 3, während die Akzeptor-Kammer 10 mM Kalium-Puffer mit einem pH von 6,8 enthielt. Es wurde die Penetration durch Epidermis und Dermis gemessen indem der Rezeptorpuffer mit einem Spektrophotometer untersucht wurde. Im Unterschied dazu wurde in dieser Arbeit die Schweinehaut für 24h in Hepes-Agar gelagert und keinem osmotischen Gradienten ausgesetzt. Eine deutliche Fluoreszenz war höchstens bis zur Basallamina feststellbar. Kennedy et al. zeigten bereits in den Fibroblasten der Dermis eine wesentlich geringere Fähigkeit zur PPIX-Produktion als in Keratinozyten der Epidermis [46].

Außerdem wurde in der vorliegenden Arbeit nur die relative Penetration mithilfe der PPIX-Fluoreszenz, die als Maß für die Verteilung von 5-ALA/-Methylester diente, gemessen und nicht 5-ALA selbst. Diese Methode erlaubt daher zwar den Vergleich der unterschiedlichen Formulierungen bezüglich ihrer Penetrationseigenschaften, allerdings ermöglicht sie keine verbindlichen Aussagen bezüglich der genauen Penetrationstiefe und -dauer der Formulierungen. Um exakte Aussagen bezüglich dieser Parameter machen zu können, müsste zusätzlich die Dauer der PPIX-Synthese aus 5-ALA miteinberechnet werden. Van den Akker et al. jedoch bestimmten ausschließlich die durch die komplette Kutis diffundierte 5-ALA-Menge bzw. seine Ester unabhängig von der Umwandlung in PPIX. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Erhöhung der Temperatur von 32°C auf 37°C in dieser Arbeit zu keiner Zunahme der PPIX-Synthese führte. Eine Umgebungstemperatur von 4°C jedoch beeinträchtigte diese deutlich.

3. Fluoreszenzintensität und relative Penetration an intakter Haut in Abhängigkeit der Formulierung

Der wichtigste Schritt der Penetration in die Epidermis ist die Diffusion von 5-ALA/-Methylester im lipophilen Stratum corneum, der Hauptbarriere der Epidermis. Sein Aufbau kann nach Elias als Zweikompartimentenmodell beschrieben werden. Dabei befinden sich ca. 5-20 Lagen ausdifferenzierter, lipidarmer Epithelzellen ziegelsteinartig eingebettet in eine Matrix aus Hautlipiden, wie Cholesterol, Ceramiden und freien Fettsäuren [47, 48]. Die Penetration durch das Stratum corneum ist von unterschiedlichen Faktoren abhängig. Zum einen von der Beschaffenheit der Formulierung auf der Hautoberfläche, zum anderen von der Löslichkeit von 5-ALA bzw. seinem Ester in den Lipiden des Stratum corneum und der Bindung an seine Proteine [43]. Diese Faktoren können durch die physikochemischen Eigenschaften des verabreichten Wirkstoffes und seiner Verabreichungsform beeinflusst werden [49]. Im Stratum corneum existieren prinzipiell drei Möglichkeiten der Aufnahme von Stoffen: I) der interzelluläre Transport, II) der intrazelluläre Transport und III) der Transport entlang der Hautanhangsgebilde [49]. Innerhalb der Epidermis kommt es dagegen zunächst zu einer Verteilung im interstitiellen Raum mit anschließender Aufnahme in die Keratinozyten [50].

In dieser Arbeit wurden die sechs unterschiedlichen 5-ALA Formulierungen bezüglich zweier Parameter untersucht. Zum einen wurde die mittlere Fluoreszenzintensität bestimmt, zum anderen wurde ihre relative Penetration in die Epidermis gemessen. Hierbei sollte beachtet werden, dass die MFI von der Penetration abhängig ist. Sie wurde über die gesamte Tiefe der Epidermis (110-120 µm) gemessen. Das bedeutet, dass nicht die Fluoreszenz der einzelnen Zellen, sondern ausschließlich ein Gesamtwert ermittelt

werden konnte. Abhängig von der Anzahl der fluoreszierenden Zellen und damit von der Verteilung innerhalb der Epidermis stieg die MFI an. Wie bereits die Bezeichnung der „relativen“ Penetration andeutet, handelt es sich hierbei nicht um die direkt gemessene Penetration von 5-ALA selbst, sondern um die mit dem Fluoreszenzmikroskop gemessene Breite der PPIX-Fluoreszenzbande innerhalb der Epidermis, die als Maß für die Verteilung von 5-ALA innerhalb des Gewebes diente.

LKS zeigte unabhängig von der Temperatur eine signifikant stärkere Fluoreszenzintensität und relative Penetration als die übrigen Formulierungen. Bereits nach 4-stündiger Inkubationszeit erreichte er die doppelte Penetrationstiefe und ein Mehrfaches der Fluoreszenzintensität als die übrigen Formulierungen. Nach 18h fluoreszierte die komplette Epidermis bis zur Basalmembran, die eine Ausbreitung im angrenzenden Bindegewebe verhinderte bzw. behinderte [50]. Kennedy et al. stellten außerdem in den Fibroblasten der Dermis eine wesentlich geringere Fähigkeit zur PPIX-Produktion fest als in den Keratinozyten der Epidermis [46]. Dies erklärt die fehlende Fluoreszenz der Dermis bei intensiv fluoreszierender Epidermis. Im Unterschied zu den übrigen Formulierungen setzt sich die Lösung von LKS aus zwei Kompartimenten zusammen, die direkt vor dem Gebrauch miteinander vermischt werden. Das eine Kompartiment enthält den Wirkstoff Magnesium 354 von ALA-HCl als Trockenkörper, das andere 1,5 ml des Trägers Spiritus USP (Äthanolinhalt = 48% v/v), Wasser, laureth-4, Isopropylalkohol und Polyäthylenglykol. Eine Erklärung für die guten Penetrationseigenschaften und damit hohe PPIX-Produktion von LKS liegt in dem hohen Ethanolanteil der Lösung. Ethanol wirkt bis zu einem Ethanol:Wasser Gehalt von 0,63 [51] als Penetrationsverstärker, indem es die Struktur der Haut modifiziert und somit die Penetration erleichtert [52]. Kurzkettige Alkohole, besonders Ethanol, zeigten für eine Vielzahl von Substanzen, unter anderem Östrogen und Mannitol, eine Verstärkung der Penetration [51, 53]. Ethanol verändert die Löslichkeitseigenschaften des Gewebes und verbessert die Verteilung von 5-ALA im Stratum corneum [54], indem es interzelluläre Lipide durch Extraktion aus der Epidermis herauslöst [55] und somit den polaren Penetrationsweg verbessert. Ähnlich wie Elias et al., die von einer stressinduzierten Porenbildung innerhalb der Epidermis berichteten [56] vermuten auch Goates et al. eine Bildung von „offenen“ Regionen innerhalb der Alkyl Kette der Lipide, die durch den Einfluss von Ethanol entstehen und somit die Verteilung von 5-ALA/Methylester im Gewebe erleichtern [53]. Desweiteren führt Ethanol in Abhängigkeit der Inkubationszeit zu einer Veränderung der Konformation der Proteine des Stratum corneum. Goates et al. vermuten, dass ein von der Inkubationsdauer abhängiger Wechsel der Proteinstruktur von α-Helices in ß-Faltblattstrukturen einen wesentlichen Teil zur verbesserten Verteilung von 5-ALA/-Methylester beiträgt [53]. Es ist allerdings fraglich, ob die in dieser Arbeit untersuchten Inkubationszeiten für die Konformationsänderung der

Proteine ausreichen. Neben den morphologischen Veränderungen des Stratum corneum tragen auch die physikalischen Eigenschaften von Ethanol zu seiner penetrationsverstärkende Wirkung bei. Durch die Verdunstung des Ethanolanteils an Luft kommt es rasch zu einer Konzentrationserhöhung von 5-ALA an der Grenzschicht zur Epidermis. In diesem Fall, bei LKS ist davon auszugehen, dass die ursprüngliche Wirkstoffkonzentration von 20% durch das Verdunsten von Ethanol stark zunimmt und allein dadurch bessere Absorptionsbedingungen gegenüber den übrigen Formulierungen vorliegen. Eine weitere Erklärung für die gute Penetration ist die Hydrophilie der LKS-Lösung. Donnelly et al. beschrieben eine verzögerte Freisetzung von 5-ALA aus lipophilen Vehikeln im Vergleich zu den Hydrophilen [57]. Auch Casas et al. berichteten von einer verbesserten Penetration durch die Verabreichung von 5-ALA in hydrophilen Vehikeln [58].

Als Alternative zu Ethanol als Penetrationsverstärker werden u. a. die Ester von 5-ALA, wie z. B. ALA-Methylester in Form von MAL, einer ö/w Creme, eingesetzt. Diese sind lipophiler als 5-ALA selbst und zeigten bereits *in vitro* trotz einer geringeren Konzentration eine deutlich höhere PPIX-Produktion [59-63]. Dieses Ergebnis konnte allerdings durch *in vivo* Studien nicht reproduziert werden. Sórensen et al. zeigten an Nacktmäusen, dass eine 24-stündige Inkubation mit ALA-Methylester zu einer langsameren PPIX-Produktion mit einem geringeren Maximum nach einer längeren Zeitspanne führte [64]. Übereinstimmend mit der Literatur [43, 45, 59, 61, 62, 65, 66] zeigten auch Kloek et al., dass kurzkettige ALA-Ester (C1-C3) zu einer geringeren PPIX-Fluoreszenz führten als 5-ALA selbst oder seine lipophileren Derivate [60]. Auch in dieser Arbeit erzielte MAL (Methyl-ALA-HCl) eine deutlich geringere Fluoreszenzintensität und Penetration als LKS (ALA–HCl) und 5-ALA in hydrophilem Gel mit und ohne DMSO. Die Ursachen für das unterschiedliche Penetrationsverhalten von 5-ALA und seinen Estern *in vitro* und *in vivo* konnten bisher noch nicht geklärt werden. Als Ursache für die geringere Penetration des Methylesters (Metvix®) *in vivo* kommen mehrere Möglichkeiten in Frage. Eine davon sind seine lipophileren Eigenschaften, die zu einer erhöhten Aufnahme in die Keratinozyten führen, was einen konkurrierenden Prozess zur Penetration darstellt [43]. Der Versuchsaufbau dieser Arbeit erlaubt ausschließlich die Beurteilung der Gesamt-PPIX-Produktion über die komplette Epidermistiefe und nicht auf Einzelzellebene. Daher lässt sich auch keine Aussage darüber treffen, ob MAL durch eine stärkere zelluläre Aufnahme zu einer erhöhten PPIX-Produktion in den einzelnen Zellen geführt hat, die dann durch die insgesamt geringere Penetration innerhalb des Messbereiches (Abb. 7 (b)) und damit geringere mittlere Fluoreszenzintensität maskiert wurde. Es synthetisierten insgesamt weniger Zellen PPIX. Außerdem muss davon ausgegangen werden, dass ein erhöhtes 5-ALA Angebot in den Zellen nicht zwangsläufig zu einer Erhöhung der PPXI-Produktion

führt, da ab einer gewissen intrazellulären 5-ALA Konzentration die für die PPIX-Produktion verantwortlichen Enzyme gesättigt sind und die PPIX-Synthese ein Plateau erreicht. Desweiteren zeigten van den Akker et al. in einer Pilotstudie, dass ein Teil der ALA-Ester während ihrer Passage durch die Haut durch das Enzym Carboxylesterase zu ALA hydrolysiert wird [43]. Vermutlich trägt auch dieser Prozess zu einer verzögerten Penetration bei. Ein weiterer Aspekt ist die Instabilität von 5-ALA in wässrigen Lösungen mit einem pH über 5,2. Mit zunehmendem pH (Hautoberfläche: pH 5-6 [67, 68]) kommt es zu einer Gelbfärbung und Bildung von Pyrazin Derivaten [69-71]. Dieses Phänomen konnte auch in dieser Arbeit beobachtet werden. Ab etwa 4-stündiger Inkubationszeit trat eine zunehmende Gelbfärbung von MAL auf.

De Rosa et al. erklärten die besseren Penetrationseigenschaften von ALA in einer ö/w Emulsion gegenüber seinen Estern damit, dass 5-ALA in der wässrigen externen Phase gelöst ist und dadurch sofort freigesetzt werden kann, während die lipophileren Ester in der dispersen Phase gelöst sind und vor einer Freisetzung erst die externe Phase überwinden müssen [72].

5-ALA in Unguentum emulsificans aquosum, einer hydrophilen Salbe (ö/w), erzielte zusammen mit MAL und 5-ALA in Psoralon Fettcreme die geringste relative Penetration und mittlere Fluoreszenzintensität. Entgegen den Aussagen von de Rosa et al. [72] penetrierte 5-ALA in Unguentum emulsificans aquos. tendenziell weniger gut als der ALA-Methylester in Metvix®, beides ö/w Emulsionen. Es ist jedoch zu vermuten, dass dieses Ergebnis nicht, entgegen den bisher aufgeführten Studien, durch eine bessere Penetration der ALA-Ester, sondern durch die für diese Anwendung weniger geeignete Grundlage Unguentum emulsificans aquos. hervorgerufen wurde. Während der Durchführung der einzelnen Versuche konnte eine Phasentrennung der hydrophilen Salbengrundlage sowohl nach einer mehrtägigen Aufbewahrung der Formulierung im Kühlschrank bei 4°C als auch nach mehrstündiger Inkubationszeit auf der Schweinehaut bei 32°C bzw. 37°C beobachtet werden. Ursache hierfür ist die Instabilität der ö/w Emulsionen in Abhängigkeit von pH und Temperatur [49]. Auch ein gleichmäßiges Verteilen der hydrophilen Salbe auf der sehr lipidreichen Schweinehaut wurde durch die vergleichsweise schlechte Oberflächenhaftung erschwert. Obwohl es sich bei MAL ebenfalls um eine Creme (ö/w) handelt zeigte diese Formulierung keine Phasentrennung und konnte auch leichter aufgetragen werden. Die Instabilität von MAL führte, wie bereits erwähnt, erst nach ca. 4h zu einer Gelbfärbung. Ebenso widersprechen die in dieser Arbeit gezeigten schlechteren Penetrationseigenschaften von 5-ALA in Unguentum emulsificans aquos. (ö/w) verglichen mit 5-ALA in Psoralon Fettcreme (w/ö) den bisher veröffentlichten Studien und bekräftigen somit die Annahme, dass die Rezeptur von 5-ALA in Unguentum emulsificans aquos., wie sie die Apotheke der Universitätsklinik

Regensburg nach GMP Richtlinien herstellt wird, nicht für die PDT geeignet ist. Wie bereits erwähnt beschrieben Donnelly et al. eine verbesserte Freisetzung von 5-ALA aus hydrophilen Vehikeln, wie Unguentum emulsificans aquos., verglichen mit den Lipophilen, wie Psoralon Fettcreme [57]. Eine ähnliche Studie, wie sie in dieser Arbeit durchgeführt wurde, veröffentlichten Winkler et al. [73]. Sie zeigten eine höhere Permeabilität für 5-ALA in Excipial® Creme (ö/w) verglichen mit Excipial® Fettcreme (w/ö). Auch Casas et al. beobachteten eine bessere Penetration der hydrophilen Vehikel [58]. Dies ist auch der Grund für die mittelmäßige Penetranz und Fluoreszenz von 5-ALA in Psoralon Fettcreme verglichen mit dem hydrophilen LKS und 5-ALA in hydrophilem Gel mit und ohne DMSO. Lieb et al. beobachteten ebenfalls eine geringe Freisetzung von 5-ALA aus Psoralon Fettcreme [74]. Eine Ursache für die dennoch tendenziell bessere Penetration und stärkere Fluoreszenz von Psoralon Fettcreme gegenüber den hydrophileren Formulierungen MAL und 5-ALA in Unguentum emulsificans aquos., könnte der Zusatz des Penetrationsverstärkers Propylenglycol sein. Dieser kann durch seine Eigenpenetration in die Haut sowohl den Wirkstoff als auch andere Enhancer im Sinne eines „Solvent-drag-Effektes“ [75] mittransportieren. Außerdem zeigte die lipophile Psoralon Fettcreme im Gegensatz zu 5-ALA in Unguentum emulsificans aquos. eine sehr gute Oberflächenhaftung. Auf der weniger lipidreichen humanen Haut könnte dieses Detail eventuell vernachlässigt werden.

Als letzte der sechs Formulierungen wurde 5-ALA in hydrophilem Gel mit und ohne DMSO untersucht. Hierbei wurde auf zwei Aspekte geachtet. Zum einen wurde zunächst die Gelformulierung selbst mit den übrigen Formulierungen verglichen, zum anderen wurde der Einfluss von DMSO auf die Penetrationseigenschaften beurteilt. Insgesamt zeigte die 5-ALA Gelformulierung nach LKS und vor 5-ALA in Psoralon Fettcreme, Unguentum emulsificans aquos. und MAL die zweit stärkste relative Penetration und PPIX-Synthese. Dies ist unter anderem auf die Hydrophilie des Gels zurückzuführen. Die hydrophilen Eigenschaften dieser Gelformulierung und die daraus resultierende schlechte Oberflächenhaftung erforderten eine punktuelle Auftragung des Gels anstatt der flächenhaften Auftragung, wie sie bei den anderen Formulierungen durchgeführt wurde. Trotz extensiver Forschung konnte bisher kein Mechanismus für die penetrationsverstärkenden Eigenschaften von Wasser gefunden werden [54]. Es zeigte sich jedoch, dass der normale Wassergehalt des Stratum corneum von 15-20% durch Okklusion auf 400% gesteigert werden kann [54]. Ein ähnlicher Effekt ist auch für die Gelformulierung von 5-ALA zu erwarten. Das tropfenförmige Auftragen des Gels führte vermutlich neben der Hydrierung der Epidermis zu einer Art Okklusion der Grenzschicht zwischen Gel und Epidermis und damit zu einem „Aufquellen“ des Stratum corneum. 25-35% des Wassers innerhalb der Epidermis sind gebunden, während der Rest frei im

Gewebe vorliegt und somit als Lösungsmittel für hydrophile Substanzen wirken kann [76]. Je mehr Wasser frei im Stratum corneum vorliegt, umso leichter kann der Austausch des hydrophilen Wirkstoffes zwischen Vehikel und Stratum corneum stattfinden [54]. Elias et al. berichteten außerdem von der Entstehung kontinuierlicher Transportwege über Poren, die durch hohen Stress, wie extensive Hydrierung, Ultraschall und Iontophorese, erzeugt werden können [56]. Die Bildung solcher Poren durch den Zusammenfluss einzelner Lakunen, die physiologischer Weise unverbunden zwischen den Korneozyten vorliegen, führen zu einer bemerkenswerten Penetrationsverstärkung [56].

Jacobi et al. untersuchten an Schweinehaut das Penetrationsverhalten des hydrophilen Patents „blue V“ zum einen in einer ö/w Emulsion zum anderen in Wasser [49]. Während das Patent „blue V“ in der ö/w Emulsion im Stratum corneum sowohl inter- als auch intrazellulär penetrierte wurde die gleiche Substanz in Wasser gelöst ausschließlich intrazellulär gefunden. Die zusätzliche interzelluläre Lokalisation des Patents „blue V“ deutet darauf hin, dass zumindest ein Teil der applizierten ö/w Emulsion in der Lipidmatrix des Stratum corneum zwischen den ziegelsteinartig angeordneten Korneozyten zurückbleibt [49]. Das würde bedeuten, dass vor der Penetration in die Epidermis zunächst das komplette Stratum corneum einschließlich der Lipidmatrix gesättigt werden muss. Rein hydrophile Vehikel verteilen sich dagegen ausschließlich intrazellulär und erreichen auf diese Weise schneller und in höheren Konzentrationen die Epidermis.

Ein dieser Arbeit entsprechendes Ergebnis veröffentlichten auch Winkler et al., die ebenfalls unterschiedliche Vehikel für 5-ALA an humaner Haut und modifizierten Franz-Zellen testeten. Sie zeigten eine deutlich stärkere Penetration für 5-ALA in Dolgit® Microgel im Vergleich zu 5-ALA in Excipial® Creme (ö/w) und Excipial® Fettcreme [73].

Der Zusatz von Dimethylsulfoxid in der Gelformulierung zeigte in dieser Arbeit nicht die erwarteten Ergebnisse. Zwar führte DMSO zu einer tendenziell gesteigerten relativen Penetration und PPIX-Produktion gegenüber der reinen Gelformulierung, allerdings nicht signifikant. Als einzige Ausnahme führte DMSO bei 32°C nach 24h zu einer signifikanten Verbesserung der Ergebnisse. Es ist jedoch anzunehmen, dass eine höhere Anzahl an Parallelversuchen zu einer Aufhebung der Signifikanz führen würde. DMSO ist ein dipolares „Aprotic“ Lösungsmittel [77], dessen penetrationsverstärkende Eigenschaften auf verschiedene Mechanismen zurückzuführen sind. Zum einen führt es zu einer Extraktion der Hautlipide und Denaturierung der Proteine des Stratum corneum, zum anderen verursacht es durch den Transport von Wasser hohen osmotischen Stress im Stratum corneum, der zu einer veränderten Struktur der Bilayer führt [78]. Diese Effekte sind jedoch konzentrationsabhängig. Um ein optimales Ergebnis zu erhalten, sind Konzentrationen von über 60% DMSO nötig [51, 65]. In dieser Arbeit wurde jedoch ausschließlich mit 40%igem DMSO gearbeitet. De Rosa et al. zeigten allerdings auch

durch den Zusatz von 20% DMSO in eine ö/w Emulsion mit 10% 5-ALA eine 2,5 fache Erhöhung der PPIX-Produktion. Diese Versuche wurden jedoch an *in vivo* Mäusehaut durchgeführt. Eine Erklärung für die unterschiedlichen Ergebnisse zwischen der Arbeit von de Rosa et al. und dieser Arbeit könnten zum einen die Mäusehaut, zum anderen die Verwendung der ö/w Emulsion anstatt des Gels und letztendlich auch die unterschiedlichen 5-ALA-Konzentrationen sein. Wenn man die Penetration und PPIX-Produktion der Gelformulierung mit der 5-ALA Formulierung in Unguentum emulsificans aquos. vergleicht, so erzielt die Gelformulierung ohne DMSO bereits mehr als die dreifache PPIX-Produktion und etwa die doppelte Penetrationstiefe. Besonders im Hinblick darauf, dass DMSO durch die Erzeugung von osmotischem Stress wirkt, ein Mechanismus der auch die penetrationsverstärkenden Eigenschaften von Wasser auszeichnet, ist zu vermuten, dass der Effekt von DMSO in der hydrophilen Gelformulierung durch seine ähnlichen Penetrationseigenschaften nicht zur Geltung kommt. Die bisherigen Veröffentlichungen von de Rosa et al. [77], Casas et al. [58] und anderen Forschungsgruppen beschreiben ausschließlich die Verwendung von DMSO in Kombination mit ö/w Emulsionen, deren Penetrationsmechanismen durchaus von DMSO profitieren. Williams et al. beschrieben einen deutlich stärkeren Einfluss von DMSO auf die fragile Haut von Nagetieren als auf humane Haut [54]. Im Umkehrschluss kann also davon ausgegangen werden, dass die noch deutlich „gröbere“ Haut von Schweinen erst recht nicht so stark von DMSO profitiert wie die Mäusehaut.

Insgesamt lässt sich zusammenfassen, dass LKS die stärkste relative Penetration und PPIX-Produktion erzielte. 5-ALA in hydrophilem Gel erreichte die zweitbesten Ergebnisse und konnte seine Penetration und PPIX-Produktion durch den Zusatz von DMSO nur tendenziell verbessern. Die schlechte Oberflächenhaftung jedoch erschwert seine praktische Anwendung in der Klinik. Entgegen den Erwartungen zeigte 5-ALA in Psoralon Fettcreme die drittstärkste Penetration, vor MAL und 5-ALA in Unguentum emulsificans aquos. Die schlechtesten Ergebnisse erzielte 5-ALA in Unguentum emulsificans aquos. Dieses Ergebnis ist jedoch auf die Instabilität der Grundlage zurückzuführen. Es kann davon ausgegangen werden, dass eine Modifizierung der ö/w Emulsion zu einer Verbesserung der Ergebnisse führen würde.

4. Entfernen des Stratum corneum

Dem Stratum corneum, der äußeren Grenzschicht des Integuments wird in modernen Permeabilitätsstudien die Funktion der eigentlichen Barriere zugeschrieben [79, 80]. Dabei befinden sich ca. 5-20 Lagen ausdifferenzierter, lipidarmer Epithelzellen ziegelsteinartig eingebettet in eine Matrix aus Hautlipiden, wie Cholesterol, Ceramiden und freien Fettsäuren [48]. Sein hoher Lipidanteil ist verantwortlich für die geringe Penetration des hydrophilen 5-ALA Moleküls durch das Stratum corneum. Sekkat et al. verglichen 2002 den transepidermalen Wasserverlust (TEWL) von humaner Haut und Schweinehaut bei komplett erhaltenem Stratum corneum und nach der Entfernung der einzelnen Schichten des Stratum corneum. Es zeigte sich hierbei eine bemerkenswerte Übereinstimmung der Daten von menschlicher Haut und Schweinehaut [81]. Um die Penetration der sechs getesteten 5-ALA Formulierungen zu erhöhen, wurden in dieser Arbeit drei unterschiedliche Methoden zur Entfernung des Stratum corneum verglichen. Das „Strippen“ mithilfe von Tesafilm („Tape Stripping“, 35x) zeigte als einzige der drei Methoden eine Reduktion des Stratum corneum bei intaktem Stratum granulosum, spinosum und basale. Das Stratum corneum konnte um 67,5±2% reduziert werden. Die Menge des entfernten Stratum corneum hängt hierbei von unterschiedlichen Faktoren ab. Ausschlaggebend sind der Wassergehalt der Haut, die Kohäsion der einzelnen Korneozyten, die mit der Gewebetiefe zunimmt und schließlich die interindividuellen Unterschiede [82, 83]. Trotz dieser Faktoren konnte in der vorliegenden Arbeit durch das „Tape-Stripping“ eine reproduzierbare Reduktion des Stratum corneum um 67,5±2% erzielt werden. Das „Tape Stripping“ ist daher eine häufig eingesetzte Methode bei Penetrationsstudien [84] und wurde auch im Zuge dieser Arbeit eingesetzt. Das Abbrühen der Hautoberfläche mit kochendem Wasser für ca. 0,5 Sekunden führte dagegen zu einer Ablösung der kompletten Epidermis bis auf die Basalmembran. Eine erhebliche und unkontrollierbare Gewebezerstörung beschrieben auch Dick et al. bereits 1991 bei dem Versuch der Herstellung von “epidermal membranes“. Damals sollte die Dermis durch das Einwirken von 60°C heißem Wasser von der Epidermis gelöst werden [85]. Der Versuch die Kornea mechanisch durch vorangehendes Aufrauen der Hautoberfläche mit einem Metallspatel und anschließendem „Tape-Stripping“ zu entfernen führte zu einer Beschädigung der Keratinozyten. Diese zeigten eine Deformierung der kompletten Zelle und des Zellkerns, die zum einen auf den Druck des Spatels und zum anderen auf die dadurch entstanden Scherkräfte, zurückzuführen sind.

5. Mittlere Fluoreszenz und relative Penetration an „gestrippter“ Haut

In dieser Arbeit konnte, wie erwartet, eine deutliche Zunahme der Penetration und der Fluoreszenzintensität durch das „Tape-Stripping“ beobachtet werden.
Die Formulierungen zeigten nach 4-stündiger Inkubationszeit eine durchschnittliche Steigerung der Fluoreszenzintensität von 70%, nach 8-stündiger Inkubationszeit von 60%. Zwei Ausnahmen müssen jedoch diskutiert werden. LKS zeigte nach vier Stunden eine 45%ige Steigerung der MFI, nach 8 Stunden jedoch nur noch eine 20%ige. Als Erklärung findet sich hier nur die bereits bei erhaltenem Stratum corneum überdurchschnittlich intensive Fluoreszenzintensität. Die anfangs noch bei 45% liegende Steigerung, die dann jedoch um mehr als die Hälfte abnimmt, lässt vermuten, dass zwar zunächst das Stratum corneum als Barriere für LKS fungiert, die Kapazitäten des transepidermalen Transportes jedoch bereits bei intakter Haut nahezu ausgereizt sind und die für die Umsetzung von 5-ALA/-Methylester in PPIX verantwortlichen Enzyme ihre Sättigungsschwelle bereits fast erreicht haben.
Die zweite Ausnahme bildet Metvix®. Diese Formulierung verhält sich genau entgegengesetzt. Nach 4-stündiger Inkubationszeit zeigt sie eine Fluoreszenzsteigerung von nur 20%, nach 8 Stunden dagegen von 60%. Dieses Verhalten bestätigt die unter Punkt IV.3 erwähnte Feststellung von de Rosa et al., dass die lipophileren ALA-Ester in der dispersen Phase einer ö/w Emulsion gelöst sind und vor ihrer Freisetzung zunächst die hydrophile externe Phase überwinden müssen [72]. Während die übrigen Formulierungen allein durch Reduktion des Stratum corneum eine deutliche Steigerung der MFI erzielten, blieb für MAL noch die zusätzliche Barriere der hydrophilen externen Phase der ö/w Emulsion erhalten. Diese Formulierung konnte also nur verzögert von dem „Tape Stripping“ profitieren.
Nach 8-stündiger Inkubationszeit erreichten alle Formulierungen außer 5-ALA in Unguentum emulsificans aquos. und LKS ähnliche Eindringtiefen wie nach 24h an intakter Haut. 5-ALA in Unguentum emulsificans aquos. erreichte sogar eine deutlich tiefere Penetration. Hierzu ist zu sagen, dass die Packungsdichte der beiden Kompartimente des Stratum corneum, der lipidarmen Korneozyten zum einen und der interzellulären Lipidmatrix zum anderen einem Gradienten unterliegen. Der an der Grenze zur vitalen Epidermis sehr kompakte Zellverband wird nach außen hin immer lockerer [47]. Das bedeutet, dass die Reduktion der obersten 67,5% des Stratum corneum durch das „Tape Stripping“ zu einer Reduktion nicht nur der Breite dieser Barriere, sondern auch der Lipophilie auf seiner Oberfläche geführt haben muss. Somit konnte die unter Punkt IV.3 aufgeführte schlechte Oberflächenhaftung der hydrophilen Formulierung verbessert werden. Dies konnte auch während der Versuchsdurchführung durch ein erleichtertes

Auftragen mit verbesserter Anhaftung beobachtet werden. Das gleiche gilt auch für die beiden Gelformulierungen mit und ohne DMSO. Damit wäre neben der Reduktion des Stratum corneum eine zweite Grundlage für die verbesserten Penetrationsbedingungen, nämlich die Beschaffenheit der Formulierung auf der Hautoberfläche [43], erfüllt. LKS zeigte keine Steigerung der Eindringtiefe durch die Reduktion des Stratum corneum. Dass jedoch die MFI gesteigert werden konnte, deutet darauf hin, dass zwar die Penetration bereits an intakter Haut ein Maximum erreicht hatte, allerdings durch die Reduktion des Stratum corneum gleich zu Beginn eine insgesamt größere Menge der Formulierung in die Epidermis gelangen konnte.
Die hier aufgeführten Ergebnisse zeigen, dass gerade das Fehlen des Stratum corneum auf der Oberfläche von Basalzellkarzinomen die vermehrte Ansammlung von PPIX in den entarteten Zellen gegenüber dem benachbarten Gewebe begünstigt und somit eine gezielte Behandlung des erkrankten Gewebes unterstützt. Auf der anderen Seite ist dies auch eine Erklärung für die besseren Erfolge der PDT der mittelstark ausgeprägten Aktinischen Keratose (AK) im Nacken- und Kopfbereich im Vergleich zur PDT der stark hyperkeratotischen AK im Bereich der Extremitäten [86, 87].

6. Bestrahlung

Nach 8-stündiger Inkubation der eingebetteten Schweinehäute mit den sechs 5-ALA Formulierungen bei 37°C wurden die Hautstücke mit und ohne Stratum corneum für 20 Minuten mit Licht des roten Spektralbereichs, bei 150 mW/cm^2 (~ 180 J/cm^2) bestrahlt. Die anschließende TUNEL-Färbung ermöglichte eine quantitative Auswertung der resultierenden Gewebeschädigung. Eine Unterscheidung zwischen Apoptose und Nekrose wurde durch diese Färbung jedoch nicht ermöglicht.
12h nach der Bestrahlung konnte eine Gewebezerstörung in der obersten Schicht der Epidermis festgestellt werden. Es zeigte sich, wie zu erwarten, eine enge Korrelation zwischen der unter Punkt IV.3 besprochenen relativen Penetration und PPIX-Synthese der einzelnen Formulierungen und der durch sie ausgelösten Gewebezerstörung.
Während Metvix®, 5-ALA in Unguentum emulsificans aquos. und Psoralon Fettcreme nur zu einer 2-4%igen Apoptose/Nekrose führten, zeigten die beiden Gelformulierungen eine durchschnittliche Gewebezerstörung von 8-10%. LKS hob sich auch hier deutlich von den übrigen Formulierungen ab. Er erzielte eine ~22%ige Gewebezerstörung, die im Gegensatz zu den anderen Formulierungen auch in tieferen Schichten zu finden war.
Die Reduktion des Stratum corneum zeigte eine deutliche Verbesserung des Bestrahlungsergebnisses. Im Durchschnitt konnte eine 8-12%ige Zunahme der Apoptose/Nekrose festgestellt werden. Eine Ausnahme bildete LKS, der durch das „Tape

Stripping“ eine ~69%ige Zunahme der Apoptose/Nekrose erzielte. Die Gewebezerstörung betraf die komplette Epidermis.

Diese Ergebnisse verdeutlichen die Abhängigkeit der PDT zum einen von der Absorption des Lichtes, zum anderen von der PPIX-Synthese in den Keratinozyten. Durch die Reduktion des Stratum corneum konnte nicht nur die Penetration der Formulierungen erleichtert werden, sondern auch die Eindringtiefe des Lichtes erhöht und seine Streuung [88] vermindert werden.

V. Zusammenfassung

Die topische photodynamische Therapie mit 5-Aminolävulinsäure/-methylester spielt in der Dermatologie zunehmend eine wichtige Rolle, allerdings gib es keine einheitlichen Leitlinien für ihre Durchführung. Neben den bereits zugelassenen Formulierungen wie Metvix® und Levulan® Kerastick® werden in den Kliniken wie auch im niedergelassenen Bereich nach GMP Richtlinien hergestellte 5-ALA/-Methylester Formulierungen verwendet. Diese basieren auf unterschiedlichen Grundlagen und werden nach individuellen Vorgaben hergestellt. Als Grundlagen dienen Gele oder Emulsionen, die unterschiedliche Penetrationsverstärker enthalten. Um einen reproduzierbaren Vergleich der verschiedenen 5-ALA/-Methylester Formulierungen zu ermöglichen, wurde in dieser Arbeit ein *ex vivo* Schweinehautmodell etabliert. Verglichen wurden Metvix® (MAL, 5-ALA-Ester), Levulan® Kerastick® (LKS), 5-ALA in hydrophilem Gel (mit 40% und ohne DMSO), 5-ALA in Psoralon Fettcreme und 5-ALA in Unguentum emulsificans aquosum. Um optimale Inkubationszeiten und Inkubationsbedingungen zu ermitteln, wurden die Temperaturen 37°, 32°C und 4°C als Variablen verwendet. Außerdem wurden die verschiedenen Formulierungen sowohl an intakter wie auch an „gestrippter“ Schweinehaut verglichen. Anschließend wurden die Bestrahlungsergebnisse beurteilt.

Das LKS-Applikationssystem zeigte eindeutig die besten Ergebnisse. Es erzielte eine deutlich bessere relative Penetration und stärkere Fluoreszenzinduktion zu einem früheren Zeitpunkt als die übrigen Formulierungen. Die hydrophilen Gelformulierungen mit und ohne DMSO erzielten die zweitbesten Ergebnisse, wobei der Zusatz von DMSO zwar tendenziell, jedoch nicht signifikant zu einer Penetrationsverstärkung führte. Eine mittelmäßige Penetration und Fluoreszenzinduktion zeigte 5-ALA in Psoralon Fettcreme. Die schlechtesten Ergebnisse erzielten MAL und 5-ALA in Unguentum emulsificans aquosum. Die Erhöhung der Umgebungstemperatur von 32°C auf 37°C führte zu keiner Verbesserung der Ergebnisse, die Erniedrigung der Umgebungstemperatur auf 4°C reduzierte die Fluoreszenzinduktion jedoch auf 3-12%, wobei die relative Penetration kaum beeinträchtigt wurde. Durch das „Tape-Stripping“ konnte eine deutliche Verbesserung der Ergebnisse erzielt werden, was sich auch in den Bestrahlungsergebnissen wiederspiegelte.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass der bisher nur in den USA zugelassene LKS nicht nur eindeutig bessere Bestrahlungsergebnisse erzielte als die übrigen Formulierungen, sondern zusätzlich auch das Auftragen innerhalb vorgegebener Areale wesentlich erleichterte. Das ex vivo Schweinehautmodell bietet eine gute Möglichkeit diese Studien auch auf andere Photosensibilisatoren und physikochemische Strategien auszudehnen.

VI. Literaturverzeichnis

1. Szeimies, R.M., Geschichte der photodynamischen Therapie, in Klinische Fluoreszenzdiagnostik und photodynamische Therapie, R.M. Szeimies, M. Landthaler, and D. Jocham, Editors. 2003, Blackwall Verlag GmbH: Berlin, Wien. p. 1-11.

2. Raab, O., Über die Wirkung fluoreszierender Stoffe auf Infusoria, 1900, Z Biol p. 39: 524.

3. Trappeiner, H.v. and A. Jodlbauer, Über die Wirkung der photodynamischen (fluoreszierenden) Stoffe auf Infusorien, Dtsch Arch Klin Med 1904: p. 80: 427-87

4. Ledoux-Lebards, C., Annales de l`Institut Pasteur. 1902: p. 16: 593.

5. Trappeiner, H.v., Die photodynamische Erscheinung. Ergebn Physiol, 1909: p. 8: 698-741

6. Hausmann, W., Die sensibilisierende Wirkung tierischer Farbstoffe und ihrer physiologischen Bedeutung. Wien Klin Wochenschr 1908: p. 21: 1527-8.

7. Hausmann, W. and Die sensibilisierende Wirkung des Hämatoporphyrins. Biochem Z, 1911: p. 30: 276-316.

8. Meyer-Betz, F., Untersuchungen über die biologische (photodynamische) Wirkung des Hämatoporphyrins und anderen derivaten des Blut- und Gallenfarbstoffes. Dtsch Arch Klin Med, 1913: p. 112: 476-503.

9. Policard, A., Etude sur les aspects offerts par des tumeurs expérimentales examinées a la lumière de Wood. C R Soc Biol, 1924 p. 91 : 1423-4.

10. Auler, H. and G. Banzer, Untersuchungen über die Rolle von Porphyrinen bei geschwulstkranken Menschen und Tieren. Z Krebsvorsch, 1942: p. 53:65-8.

11. Rassmussen-Taxdal, S., G. Ward, and F. Figge, Fluorescence of human lymphatic and cancer tissus following high doses of intravenous hematoprphyrin. Cancer, 1955: p. 8:78-81.

12. Schwartz, S., K. Absolon, and H. Vermund, Some relationships of porphyrins x-rays and Tumors. Med Bull, 1955: p. 27: 7-13.

13. Dougherty, J., Photoradiation Therapy. in: Abstracts of the American Chmical Society Meeting 1973: p. Chicago, I1.

14. Dougherty, T.J., et al., Photoradiation therapy for the treatment of malignant tumors. Cancer Res, 1978. 38(8): p. 2628-35.

15. Babilas, P., et al., Photodynamic therapy in dermatology-an update. Photodermatol Photoimmunol Photomed, 2005. 21(3): p. 142-9.

16. Schneckenburger, H., Nicht-onkologische Indikationen in der Dermatologie in Klinische Fluoreszenzdiagnostik und photodynamische Therapie, R.M. Szeimies, M. Landthaler, and D. Jocham, Editors. 2003, Blackwall Verlag GmbH, Berlin, Wien. p. 15-28.

17. Pass, H.I., Photodynamic therapy in oncology: mechanisms and clinical use. J Natl Cancer Inst, 1993. 85(6): p. 443-56.

18. Landthaler, M., A. Ruck, and R.M. Szeimies, Photodynamic therapy of skin tumors. Hautarzt, 1993. 44(2): p. 69-74.

19. Szeimies, R.M., et al., Photodynamic therapy for non-melanoma skin cancer. Acta Derm Venereol, 2005. 85(6): p. 483-90.

20. Savary, J.F., et al., Photodynamic therapy of early squamous cell carcinomas of the esophagus: a review of 31 cases. Endoscopy, 1998. 30(3): p. 258-65.

21. Strauss, W., Photosensibilisatoren, in Klinische Fluoreszenzdiagnostik und photodynamische Therapie, R.M. Szeimies, M. Landthaler, and D. Jocham, Editors. 2003, Blackwall Verlag GmbH, Berlin, Wien. p. 29-38.

22. Bonnett, R., Photosensitizers of the Porphyrin and phthalocyanineseries for photodynamic therapie. Chem Soc Rev, 1995: p. 19-23.

23. Wolf, P., Photodynamische Therapie: Grundlage und klinische Anwendung in der Dermatologie. Deutsches Ärzteblatt 96, 1999. 22: p. A-1493/B-1273/C1195.

24. Ackermann, G., et al., Simulations on the selectivity of 5-aminolaevulinic acid-induced fluorescence in vivo. J Photochem Photobiol B, 1998. 47(2-3): p. 121-8.

25. Zeitouni, N.C., A.R. Oseroff, and S. Shieh, Photodynamic therapy for nonmelanoma skin cancers. Current review and update. Mol Immunol, 2003. 39(17-18): p. 1133-6.

26. Karrer, S. and L.R. Braathen, Nicht-onkologische Indikationen in der Dermatologie, in Klinische Fluoreszenzdiagnostik und photodynamische Therapie, R.M. Szeimies, M. Landthaler, and D. Jocham, Editors. 2003, Blackwall Verlag GmbH, Berlin, Wien. p. 221-235.

27. Sidoroff, A., Onkologische Indikationen in der Dermatologie: Tumoren (Basalzellkarzinome u.a.), in Klinische Fluoreszenzdiagnostik und photodynamische Therapie, R.M. Szeimies, M. Landthaler, and D. Jocham, Editors. 2003, Blackwall Verlag GmbH, Berlin, Wien. p. 206-220.

28. Piacquadio, D.J., et al., Photodynamic therapy with aminolevulinic acid topical solution and visible blue light in the treatment of multiple actinic keratoses of the face and scalp: investigator-blinded, phase 3, multicenter trials. Arch Dermatol, 2004. 140(1): p. 41-6.

29. Szeimies, R.M., et al., Wavelength dependency of photodynamic effects after sensitization with 5-aminolevulinic acid in vitro and in vivo. J Invest Dermatol, 1995. 105(5): p. 672-7.

30. Brown, S.B., The role of light in the treatment of non-melanoma skin cancer using methyl aminolevulinate. J Dermatolog Treat, 2003. 14 Suppl 3: p. 11-4.

31. Morton, C.A., et al., Comparison of red and green light in the treatment of Bowen's disease by photodynamic therapy. Br J Dermatol, 2000. 143(4): p. 767-72.

32. Karrer, S., et al., Long-pulse dye laser for photodynamic therapy: investigations in vitro and in vivo. Lasers Surg Med, 1999. 25(1): p. 51-9.

33. Clark, C., et al., Topical 5-aminolaevulinic acid photodynamic therapy for cutaneous lesions: outcome and comparison of light sources. Photodermatol Photoimmunol Photomed, 2003. 19(3): p. 134-41.

34. Morton, C.A., Methyl aminolevulinate (Metvix) photodynamic therapy - practical pearls. J Dermatolog Treat, 2003. 14 Suppl 3: p. 23-6.

35. De Rosa, F.S. and M.V. Bentley, Photodynamic therapy of skin cancers: sensitizers, clinical studies and future directives. Pharm Res, 2000. 17(12): p. 1447-55.

36. Meyer, W., et al., [The structure of the skin of the ear in domesticated pigs, with special reference to their use for human dermatological research. 2. Specific histology of the integument.]. Berl Munch Tierarztl Wochenschr, 2001. 114(3-4): p. 100-11.

37. Meyer, W., N.H. Zschemisch, and K. Neurand, [The structure of the skin of the ear in domesticated pigs, with special reference to their use for human dermatological research. 1. Macroscopic aspects and hair coat.]. Berl Munch Tierarztl Wochenschr, 2001. 114(3-4): p. 92-9.

38. Saikia, P., et al., Safety testing of indocyanine green in an ex vivo porcine retina model. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2006. 47(11): p. 4998-5003.

39. Donnelly, R.F., P.A. McCarron, and A.D. Woolfson, Drug delivery of aminolevulinic acid from topical formulations intended for photodynamic therapy. Photochem Photobiol, 2005. 81(4): p. 750-67.

40. Schmook, F.P., J.G. Meingassner, and A. Billich, Comparison of human skin or epidermis models with human and animal skin in in-vitro percutaneous absorption. Int J Pharm, 2001. 215(1-2): p. 51-6.

41. Karrer, S., et al., Topical application of a first porphycene dye for photodynamic therapy--penetration studies in human perilesional skin and basal cell carcinoma. Arch Dermatol Res, 1997. 289(3): p. 132-7.

42. van den Akker, J.T., et al., Effect of elevating the skin temperature during topical ALA application on in vitro ALA penetration through mouse skin and in vivo PpIX production in human skin. Photochem Photobiol Sci, 2004. 3(3): p. 263-7.

43. van den Akker, J.T., et al., Comparative in vitro percutaneous penetration of 5-aminolevulinic acid and two of its esters through excised hairless mouse skin. Lasers Surg Med, 2003. 33(3): p. 173-81.

44. Juzenas, P., et al., Uptake of topically applied 5-aminolevulinic acid and production of protoporphyrin IX in normal mouse skin: dependence on skin temperature. Photochem Photobiol, 1999. 69(4): p. 478-81.

45. Moan, J., et al., The temperature dependence of protoporphyrin IX production in cells and tissues. Photochem Photobiol, 1999. 70(4): p. 669-73.

46. Kennedy, J.C. and R.H. Pottier, Endogenous protoporphyrin IX, a clinically useful photosensitizer for photodynamic therapy. J Photochem Photobiol B, 1992. 14(4): p. 275-92.

47. Lampe, M.A., et al., Human stratum corneum lipids: characterization and regional variations. J Lipid Res, 1983. 24(2): p. 120-30.

48. Elias, P.M., Epidermal lipids, membranes, and keratinization. Int J Dermatol, 1981. 20(1): p. 1-19.

49. Jacobi, U., et al., Cutaneous distribution and localization of dyes affected by vehicles all with different lipophilicity. Arch Dermatol Res, 2006. 297(7): p. 303-10.

50. Abels, C., Wirkmechanismen der Photodynamischen Therapie, in Klinische Fluoreszenzdiagnostik und photodynamische Thera, R.M. Szeimies, M. Landthaler, and D. Jocham, Editors. 2003, Blackwall Verlag GmbH: Berlin, Wien. p. 60.

51. Kurihara-Bergstrom, T., et al., Percutaneous absorption enhancement of an ionic molecule by ethanol-water systems in human skin. Pharm Res, 1990. 7(7): p. 762-6.

52. Williams, A.C. and B.W. Barry, Skin absorption enhancers. Crit Rev Ther Drug Carrier Syst, 1992. 9(3-4): p. 305-53.

53. Goates, C.Y. and K. Knutson, Enhanced permeation of polar compounds through human epidermis. I. Permeability and membrane structural changes in the presence of short chain alcohols. Biochim Biophys Acta, 1994. 1195(1): p. 169-79.

54. Williams, A.C. and B.W. Barry, Penetration enhancers. Adv Drug Deliv Rev, 2004. 56(5): p. 603-18.

55. Mak, V.H., R.O. Potts, and R.H. Guy, Percutaneous penetration enhancement in vivo measured by attenuated total reflectance infrared spectroscopy. Pharm Res, 1990. 7(8): p. 835-41.

56. Elias, P.M., et al., The potential of metabolic interventions to enhance transdermal drug delivery. J Investig Dermatol Symp Proc, 2002. 7(1): p. 79-85.

57. Donnelly, R.F., et al., 5-Aminolevulinic acid for photodynamic therapy of vulval intraepithelial neoplasia,assay development and release from a proprietaryformulation. J. Pharm. Pharmacol., 2002. 54: p. 16.

58. Casas, A., H. Fukuda, and A.M. Batlle, Tissue distribution and kinetics of endogenous porphyrins synthesized after topical application of ALA in different vehicles. Br J Cancer, 1999. 81(1): p. 13-8.

59. Gaullier, J.M., et al., Use of 5-aminolevulinic acid esters to improve photodynamic therapy on cells in culture. Cancer Res, 1997. 57(8): p. 1481-6.

60. Kloek, J., W. Akkermans, and G.M. Beijersbergen van Henegouwen, Derivatives of 5-aminolevulinic acid for photodynamic therapy: enzymatic conversion into protoporphyrin. Photochem Photobiol, 1998. 67(1): p. 150-4.

61. Marti, A., et al., Optimisation of the formation and distribution of protoporphyrin IX in the urothelium: an in vitro approach. J Urol, 1999. 162(2): p. 546-52.

62. Uehlinger, P., et al., 5-Aminolevulinic acid and its derivatives: physical chemical properties and protoporphyrin IX formation in cultured cells. J Photochem Photobiol B, 2000. 54(1): p. 72-80.

63. Luksiene, Z., et al., Evaluation of protoporphyrin IX production, phototoxicity and cell death pathway induced by hexylester of 5-aminolevulinic acid in Reh and HPB-ALL cells. Cancer Lett, 2001. 169(1): p. 33-9.

64. Sorensen, R., et al., Formation of Protoporphyrin IX in mouse skin after topical application of 5-aminolevulinic acid and it`s methyl ester. Proc SPIE, 1999. 3563: p. 77-81.

65. Peng, Q., et al., Build-up of esterified aminolevulinic-acid-derivative-induced porphyrin fluorescence in normal mouse skin. J Photochem Photobiol B, 1996. 34(1): p. 95-6.

66. van den Akker, J.T., et al., Systemic component of protoporphyrin IX production in nude mouse skin upon topical application of aminolevulinic acid depends on the application conditions. Photochem Photobiol, 2002. 75(2): p. 172-7.

67. Wokalek, H., Die Haut, in Dermatika, R. Niedner and J. Ziegenmeyer, Editors. 1992, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH: Stuttgart.

68. Ziegenmeyer, J., [Skin-vehicle-drug, the decision criterion for skin absorption]. Pharm Unserer Zeit, 1986. 15(5): p. 129-43.

69. Butler, A.R. and S. George, The nonenzymatic cyclic dimerisation of 5-aminolevulinic acid. Tetrahedron, 1992. 48: p. 7879-7886.

70. Franck, B. and H. Stratmann, Condensation products of the porphyrin precursor 5-aminolevulinic acid. Heteroycles, 1981. 15: p. 919-923.

71. Novo, M., G. Huttmann, and H. Diddens, Chemical instability of 5-aminolevulinic acid used in the fluorescence diagnosis of bladder tumours. J Photochem Photobiol B, 1996. 34(2-3): p. 143-8.

72. De Rosa, F.S., et al., In vitro skin permeation and retention of 5-aminolevulinic acid ester derivatives for photodynamic therapy. J Control Release, 2003. 89(2): p. 261-9.

73. Winkler, A. and C.C. Muller-Goymann, The influence of topical formulations on the permeation of 5-aminolevulinic acid and its n-butyl ester through excised human stratum corneum. Eur J Pharm Biopharm, 2005. 60(3): p. 427-37.

74. Lieb, S., R.M. Szeimies, and G. Lee, Self-adhesive thin films for topical delivery of 5-aminolevulinic acid. Eur J Pharm Biopharm, 2002. 53(1): p. 99-106.

75. Bendas, B., R. Neubert, and W. Wohlrab, Propylene glycol, in Percutaneous penetration enhancers, E.W. Smith and H.I. Maibach, Editors. 1995, CRC Press Boca Raton: New York, London,Tokyo.

76. Walkley, K., Bound water in stratium corneum measured by differential scanning calorimetry. J Invest Dermatol, 1972. 59(3): p. 225-7.

77. De Rosa, F.S., et al., A vehicle for photodynamic therapy of skin cancer: influence of dimethylsulphoxide on 5-aminolevulinic acid in vitro cutaneous permeation and in vivo protoporphyrin IX accumulation determined by confocal microscopy. J Control Release, 2000. 65(3): p. 359-66.

78. Anigbogu, A.N.C., et al., Fourier Transform-Raman spectroscopyof interactions between the penetration enhancer dimethylsulphoxideand human statum corneum. Int. J. Pharm., 1995. 125: p. 265-282.

79. Wiechers, J.W., The barrier function of the skin in relation to percutaneous absorption of drugs. Pharm Weekbl Sci, 1989. 11(6): p. 185-98.

80. Landmann, L., The epidermal permeability barrier. Anat Embryol (Berl), 1988. 178(1): p. 1-13.

81. Sekkat, N., Y.N. Kalia, and R.H. Guy, Biophysical study of porcine ear skin in vitro and its comparison to human skin in vivo. J Pharm Sci, 2002. 91(11): p. 2376-81.

82. King, C.S., et al., The change in properties of the stratum corneum as a function of depth. Br J Dermatol, 1979. 100(2): p. 165-72.

83. Marttin, E., et al., A critical comparison of methods to quantify stratum corneum removed by tape stripping. Skin Pharmacol, 1996. 9(1): p. 69-77.

84. Weigmann, H., et al., Determination of the horny layer profile by tape stripping in combination with optical spectroscopy in the visible range as a prerequisite to quantify percutaneous absorption. Skin Pharmacol Appl Skin Physiol, 1999. 12 (1-2): p. 34-45.

85. Dick, I.P., H.M. Clowes, and R.C. Scott, Evaluation of pig ear ski as a model for human skin in vitro percutaneous absorption studies in Prediction of Percutaneous Penetration. Methods, Measurements, Modelling, I.T. Serv., Editor. 1991, Scott, I.P., Guy, R.H.,Hadgraft, J., Bodde, H.E., London. p. 451-457.

86. Fink-Puches, R., et al., Primary clinical response and long-term follow-up of solar keratoses treated with topically applied 5-aminolevulinic acid and irradiation by different wave bands of light. J Photochem Photobiol B, 1997. 41(1-2): p. 145-51.

87. Radakovik-Fijan, S., H. Hönigsmann, and A. Tanew, Onkologische Indikationen in der Dermatologie: Präkanzerosen dr Haut (aktinische Keratosen, Morbus Bowen), in Klinische Fluoreszenzdiagnostik und photodynamische Therapie, R.M. Szeimies, M. Landthaler, and D. Jocham, Editors. 2003, Blackwall Verlag GmbH, Berlin, Wien. p. 191-195.

88. Bäumler, W., Lichtquellen, in Klinische Fluoreszenzdiagnostik und photodynamische Therapie, R.M. Szeimies, M. Landthaler, and D. Jocham, Editors. 2003, Blackwall Verlag GmbH: Berlin, Wien. p. 44-46.

VII. Anhang

1. Reagenzien, Zusammensetzungen und Equipment

1.1. Formulierungen

Metvix® 160 mg/g Creme *Wirkstoff:* Methyl-(5-amino-4-oxopentanoat) (als Hydrochlorid) (16%)	Galderma SA, Paris, Frankreich
Levulan® Kerastick® *Wirkstoff:* 5-amino-4-oxopentanoat- hydrochlorid (20%)	Wilmington, MA, USA
5-ALA in hydrophilem Gel *mit 40 % DMSO* *Wirkstoff:* 5-Aminolävulinsäure (20%) mit 40% DMSO	Apotheke der Universitätsklinik Regensburg
5-ALA in hydrophilem Gel *(ohne DMSO)* *Wirkstoff:* 5-Aminolävulinsäure (20%) ohne DMSO	Apotheke der Universitätsklinik Regensburg
5-ALA in Psoralon Fettcreme (w/ö) *Wirkstoff:* 5-Aminolävulinsäure (20%)	Apotheke der Universitätsklinik Regensburg
5-ALA in Unguentum emulsificans aquosum (ö/w) *Wirkstoff:* 5-Aminolävulinsäure (20%)	Apotheke der Universitätsklinik Regensburg

1.2. HEPES-Agar

Agar	Merck (Darmstadt)
Hepes -Puffer:	
11,9 g HEPES	Roth (Karlsruhe)
40,0 g NaCL	Merck (Darmstadt)
1,5 g KCl	Merck (Darmstadt)
10,0 g Glukose	Merck (Darmstadt)
450 ml H_2O	

Agar ansetzen:
1,5 g Agar
150 ml H_2O

Mischen und in der Mikrowelle aufkochen bis die Flüssigkeit klar ist;
16,7 ml HEPES-Puffer in den handkalten Agar mischen;

1.3. HE-Färbung

Mayers Hämalaun	Merck (Darmstadt)
Eosin	Merck (Darmstadt)
Ethanolreihe (70%, 96%, 100%)	Apotheke der Universitätsklinik Regensburg
Xylol	Merck (Darmstadt)
Enthylan (Eindeckmedium)	Merck (Darmstadt)

1.4. NBTC-Färbung

NADH (2,5 mg/ml)	Sigma (Taufkirchen)
NBTC (2,0 mg/ml)	Sigma (Taufkirchen)
PBS (pH 7,4)	Biochrom AG (Berlin)
Ringer-Solution	Braun (Melsungen)

1.5. TUNEL

FragEL DNA Fragmentation Detection Kit,	Calbiochem (Darmstadt)
Fluorescent-TdT Enzym	Calbiochem (Darmstadt)
Natriumchlorid	Merck (Darmstadt)
DNase I (in PBS)	Roche (Mannheim)
TRIS (pH 8)	Invitrogen (Karlsruhe)

TBS-Puffer:
TRIS 20mmol/L
NaCl 140 mmol/L — Merck (Darmstadt)

1.6. Sonstiges

Rotationsmikrotom	Microm International AG (Volketswil, Schweiz)
Kryostat	Microm International AG (Volketswil, Schweiz)
Durchlichtmikroskop (Laborlux S)	Leitz (Wetzlar)
Fluoreszenzmikroskop	Zeiss Vario-Axio Tech (Göttingen)

Filter: Omega® Optical, Inc. (Brattleboro, USA)

Photofrin: Anregungsfilter 405 FD 40, dichroider Spiegel 415 DRLP; Emissionsfilter 60 EFLP

Höchst: Anregungsfilter 365 WB 50, dichroider Spiegel 400 DRLP; Emissionsfilter 450 AF 58

FITC: Anregungsfilter 475 AF 40, dichroider Spiegel 505 DRLP; Emissionsfilter 535 AF 45

Lampe (PDT 1200L)	Waldmann Medizintechnik (Villingen-Schwenningen)
Skalpell (Disposable Scalpel)	Feather (Köln)
Petrischalen Ø 10cm	Greiner (Kremsmünster, Österreich)
Micro Slides (Objektträger)	Surgipath (Richemond, USA)
Biopsy Punch	Stiefel® (Wächtersbach)
Langhaarschneider	Braun (Kronberg, Tschechei)
Klebeband	Tesafilm (Baiersdorf, Hamburg)

2. Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
Aqua bidest.	2-fach destilliertes Wasser
5-ALA	5-Aminolävulinsäure
cm	Zentimeter
DHE	Dihämatoporphyrinderivate
DMSO	Dimethylsulfoxid
h	Stunden
Hp	Hämatoporphyrin
J	Joule
LKS	Levulan®Kerastick®
MET	Metvix®
MFI	Mittlere Fluoreszenzintensität
µm	Mikrometer
n	Anzahl der Parallelversuche
nm	Nanometer
PDT	photodynamische Therapie
PPIX	Protoporphyrin IX
ROS	Radikale Sauerstoffspezies
Tab.	Tabelle
u. a.	unter anderem
Ungt. emuls. aquos.	Unguentum emulsificans aquosum
z. B.	zum Beispiel
z. T.	zum Teil

3. CURRICULUM VITAE

PERSÖNLICHE ANGABEN

Name	Christine Worlicek
Geburtsdatum	08.07.1982
Geburtsort	Erlangen
Adresse	Birkenschlagweg 39 D-93053 Regensburg Tel. +49 (0) 941 / 997907 Mobil: + 49 (0) 176/20343673 christine.worlicek@web.de
Eltern	Dr. med. Hans Worlicek (Gastroenterologe) Gisela Worlicek (Pharmazeutin)

SCHULAUSBILDUNG

1989 – 1993	Grundschule St. Wolfgang, Regensburg
1993 – 2002	Goethe-Gymnasium, Regensburg
28/06/2002	Allgemeine Hochschulreife (Note: 1,5)

STUDIUM

2002- 2008	Humanmedizin, Universität Regensburg
09/2004	Ärztliche Vorprüfung (Note 1,6)
2008	Staatsexamen

PROMOTION

„Fluoreszenzinduktion und relatives Penetrationsverhalten verschiedener 5-Aminolävulinsäure/-methylester Formulierungen am ex vivo Schweinehautmodell“

Lehrstuhl für Dermatologie der Medizinischen Fakultät der Universität Regensburg,
Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Landthaler
Doktorvater: Prof. Dr. med. R. M. Szeimies

VERÖFFENTLICHUNGEN

A HCL/alcohol formulation increased 5-aminolevulinic acid skin distribution using an ex vivo full thickness porcine skin model
Tim Maisch, Christine Worlicek, Philipp Babilas, Michael Landthaler and Rolf-Markus Szeimies; Experimental Dermatology, 2008

Evaluation of different 5-Ala/5-Ala methylester formulations regarding fluorescence induction and penetration using an ex-vivo porcine skin model
T. Maisch, C. Worlicek, P. Babilas, M. Landthaler and R. M. Szeimies; Experimental Dermatology 2007, Vol. 16 (3): 247 (abstract)

POSTERBEITRÄGE

Penetration and fluorescence induction of different 5-aminolevulinic acid formulations in an *ex-vivo* porcine skin model.
R. Szeimies, C. Worlicek and T. Maisch.
68th Annual Meeting, The Society of Investigative Dermatology, Los Angeles (09.05.2007- 12.05.2007)

Evaluation of different 5-Ala/5-Ala methylester formulations regarding fluorescence induction and penetration using an ex-vivo porcine skin model
T. Maisch, C. Worlicek, P. Babilas, M. Landthaler and R. Szeimies
34. ADF-Jahrestagung, Freiburg (08.03.- 10.03.2007)

4. Danksagung

Ich bedanke mich bei Herrn Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Landthaler für die Möglichkeit der Durchführung dieser Promotionsarbeit in der Klinik und Poliklinik für Dermatologie der Universitätsklinik Regensburg.

Mein herzlicher Dank gilt Herrn Prof. Dr. Szeimies für die freundliche Betreuung, seinen Ideenreichtum und Weitblick, die den Grundstein dieser Arbeit gebildet haben.

Ganz besonders möchte ich mich bei Dr. Tim Maisch für die wertvolle Unterstützung während der Durchführung dieser Arbeit sowie die schöne Zeit im Labor bedanken.

Frau Petra Weiderer danke ich für Ihre kompetente und geduldige Hilfe bei der Anlernung diverser Labortechniken.

Ich danke dem gesamten Forschungsteam der Dermatologie für die herzliche und freundschaftliche Zusammenarbeit.