

Hautpermeation von Timolol bei Frühgeborenen

Dissertation

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Eberhard Karls Universität Tübingen
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

vorgelegt von
Anja Rita Laur
aus Reutlingen

Tübingen
2020

Gedruckt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Eberhard Karls Universität Tübingen.

Tag der mündlichen Qualifikation:

28.07.2020

Dekan:

Prof. Dr. Wolfgang Rosenstiel

1. Berichterstatter:

Prof. Dr. Rolf Daniels

2. Berichterstatter:

Prof. Dr. Dominique Lunter

Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. Martin A. Wahl für das Anvertrauen dieses spannenden Themas. Sie hatten immer ein offenes Ohr für Probleme und Fragestellungen die sich während der Bearbeitung und Entwicklung dieses Projektes ergaben und haben meine Arbeit stets wertgeschätzt. Leider war es Ihnen nicht mehr möglich, den Abschluss dieser Arbeit zu erleben, doch über die Ergebnisse, über die Sie bis zuletzt informiert werden wollten, haben Sie sich stets gefreut.

Herr Professor Daniels danke ich ganz herzlich für die gute Zusammenarbeit und für die Selbstverständlichkeit, die Betreuung dieses Projekts weiterzuführen. Auch für die Möglichkeit zur fachlichen Weiterbildung durch die Weiterbildung zum Fachapotheker der Pharmazeutischen Technologie möchte ich mich bedanken.

Ich danke PD Dr. Dominique Lunter für die Erstellung des Zweitgutachtens und Ihre Unterstützung, insbesondere bei der Entwicklung der *in vitro* Permeationsstudien. Ebenso danke ich Ihrer Doktorandin Dr. Ziwei Zhang für die Einarbeitung bei den Arbeiten mit Schweineohrhaut.

Dr. med Rangmar Goelz danke ich ganz herzlich für die gute Zusammenarbeit und die Bereitstellung der Proben aus der Neonatologie des Universitätsklinikums Tübingen.

Ich danke der Experimentellen Medizin des Universitätsklinikums Tübingen und der Metzgerei Grießhaben für die Bereitstellung der Schweineohren.

Weiterhin möchte ich mich bei allen Kollegen für die Unterstützung und Zusammenarbeit bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat.

Abschließend gilt mein Dank meiner Familie, insbesondere meinem Mann Martin und meiner Schwester Nadja, die mich stets bedingungslos unterstützt und mir den Rücken gestärkt haben.

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	VIII
Tabellenverzeichnis.....	X
Abkürzungsverzeichnis.....	XI
Formelverzeichnis	XIV
1 Einleitung und Zielsetzung	15
1.1 Infantiles Hämangiom	15
1.1.1 Definition	15
1.1.2 Entwicklung.....	15
1.1.3 Inzidenz.....	16
1.1.4 Pathophysiologie.....	16
1.1.5 Behandlung/Therapie.....	19
1.1.6 Timolol bei der Behandlung von infantilem Hämangiom	22
1.1.7 Wirkmechanismus von Betablockern	27
1.2 Frühgeborene.....	29
1.2.1 Behandlungsstrategien	29
1.2.2 Transdermale Therapie	30
1.2.3 Klinische Studien	30
1.2.4 Urinausscheidung und Wachstum	31
1.3 Die menschliche Haut.....	32
1.3.1 Morphologie	32
1.3.2 Entwicklung.....	36
1.3.3 Perkutane Applikation von Wirkstoffen.....	38
1.4 Hautmodelle	44
1.4.1 Menschliche Modelle versus tierische Modelle.....	44
1.4.2 <i>In vivo</i> Modelle versus <i>in vitro</i> Modelle.....	44
1.4.3 <i>In vitro</i> Modelle.....	46
1.4.4 Hautmodelle von Frühgeborenen.....	51
1.5 Physiologiebasierte pharmakokineische Modelle.....	56
1.5.1 Allgemeine Informationen.....	56
1.5.2 PBPK Modelle in der Pädiatrie	57
1.6 Zielsetzung	59
2 Materialien und Methoden.....	63
2.1 Verwendete Materialien und Geräte.....	63

2.1.1	Chemikalien und Hilfsstoffe.....	63
2.1.2	Verbrauchsmaterial	64
2.1.3	Geräte.....	67
2.1.4	Software	69
2.2	Methoden	70
2.2.1	Analytik der Urinproben von Frühgeborenen	70
2.2.2	Entwicklung eines PBPK Modells humaner Haut	71
2.2.3	Permeationsstudien von Timolol	80
2.2.4	Entwicklung eines PBPK Modells des menschlichen Organismus.....	92
3	Ergebnisse und Diskussion.....	103
3.1	Urinproben von Frühgeborenen	103
3.1.1	Ergebnisse der Untersuchung der Urinproben von Frühgeborenen mit IH nach lokaler Behandlung mit Timolol	104
3.1.2	Zusammenfassung der Ergebnisse der Untersuchung der Urinproben von Frühgeborenen mit IH nach lokaler Behandlung mit Timolol.....	110
3.2	PBPK Modell humaner Haut.....	111
3.2.1	Eignung des entwickelten PBPK Modells humaner Haut.....	111
3.2.2	Vorhersage der Hautpermeation von Timolol bei Frühgeborenen.....	123
3.2.3	Zusammenfassung der Ergebnisse des entwickelten PBPK Modells humaner Haut	130
3.3	<i>In vitro</i> Permeationsstudien.....	131
3.3.1	Histologie der mittels Klebebandabrisstechnik generierten Hautproben unterschiedlichen Reifegrades	131
3.3.2	Ergebnisse der <i>in vitro</i> Permeationsstudien	133
3.3.3	Zusammenfassung der Ergebnisse der <i>in vitro</i> Permeationsstudien	145
3.4	Vergleich der Ergebnisse des entwickelten PBPK Modells humaner Haut und des entwickelten <i>in vitro</i> Modells zur Vorhersage der Hautpermeation von Timolol bei Frühgeborenen.....	146
3.4.1	Zusammenfassung des Vergleichs der Ergebnisse des entwickelten PBPK Modells humaner Haut und des entwickelten <i>in vitro</i> Modells zur Vorhersage der Hautpermeation von Timolol bei Frühgeborenen	148
3.5	PBPK Modell des menschlichen Organismus.....	148
3.5.1	Anreicherung von Timolol in Organen und Geweben	149
3.5.2	Ausscheidung von Timolol aus dem Organismus	153
3.5.3	Kalkulation von erwarteten Timololkonzentrationen im Urin	155

3.5.4	Vergleich der mittels PBPK Modellen berechneten Urinspiegelwerte von Timolol bei Frühgeborenen mit den Ergebnissen der analysierten Urinproben von Frühgeborenen.....	156
3.5.5	Zusammenfassung der Ergebnisse des entwickelten PBPK Modells des menschlichen Organismus und deren Vergleich mit den Ergebnissen der analysierten Urinproben von Frühgeborenen	157
4	Abschlussdiskussion	158
4.1	Analyse von Urinproben von Frühgeborenen mit IH nach lokaler Behandlung mit Timolol.....	159
4.2	Vorhersage der Hautpermeation von Timolol bei Frühgeborenen durch ein PBPK Modell humaner Haut.....	162
4.3	Vorhersage der Hautpermeation von Timolol bei Frühgeborenen anhand von <i>in vitro</i> Permeationsstudien.....	164
4.4	Vergleichbarkeit der Ergebnisse des PBPK Modells humaner Haut und der <i>in vitro</i> Permeationsstudien.....	166
4.5	Vorhersage des Metabolismus und der Elimination von Timolol durch ein PBPK Modell des menschlichen Organismus	167
4.6	Vergleichbarkeit der Ergebnisse der analysierten Urinproben von Frühgeborenen mit IH und der mittels PBPK Modellen berechneten Urinspiegelwerten von Timolol bei Frühgeborenen nach einer dermalen Timololapplikation	169
5	Zusammenfassung	171
6	Anhang	175
6.1	Kalibrierung.....	175
6.2	Bestimmung der Sättigungslöslichkeit von Timolol im Akzeptormedium.....	176
6.3	Quellcodes.....	177
6.3.1	Quellcode PBPK humaner Haut, Simulation mit 1-X Corneozytenschichten..	177
6.3.2	Quellcode PBPK Modell humaner Haut, Simulation mit 0 Corneozytenschichten	180
6.3.3	Quellcode PBPK Modell des menschlichen Organismus.....	182
7	Literaturverzeichnis	191

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1-1: Strukturformel von Timolol, Abbildung nach Volotinen et al. (2007).	23
Abbildung 1.3-1: Schematischer Überblick der Hautschichten, Hautanhangsorgane, Blut- und Lymphgefäße, modifiziert nach Jepps et al. (2013).	33
Abbildung 1.3-2: Schematischer Aufbau der Epidermis, nach Proksch et al. (2008).34	
Abbildung 1.3-3: Schematischer Aufbau des Stratum corneums, modifiziert nach Proksch et al. (2008).	35
Abbildung 1.3-4: Schematische Darstellung unterschiedliche Wege der Wirkstoffpenetration durch das Stratum corneum, modifiziert nach Trommer und Neubert (2006).	40
Abbildung 1.4-1: Franz-Diffusionszelle, modifiziert nach Bartosova und Bajgar (2012).....	47
Abbildung 2.2-1: Schematische Darstellung eines Querschnitts durch das SC. Abbildung modifiziert nach Johnson et al. (1997).	73
Abbildung 2.2-2: Schematische Übersicht zum Aufbau des entwickelten PBPK Modell des Organismus.	93
Abbildung 3.1-1: Übersicht der untersuchten Urinproben von Frühgeborenen mit IH nach dermalen Timololbehandlung.	104
Abbildung 3.1-2: Timololkonzentrationen im Urin in Abhängigkeit von postkonzeptionellem beziehungsweise postnatalem Alter der Kinder 1, 2, 3 und 4.	106
Abbildung 3.2-1: PBPK-Berechnung der kumulativ freigesetzten Wirkstoffmenge aus einem 20, 10 und 5 %igen Timololpflaster.	116
Abbildung 3.2-2: PBPK-Berechnung der prozentual absorbierten Nicotinmenge in Abhängigkeit von der Zeit.	119
Abbildung 3.2-3: PBPK-Berechnung der absorbierten Nicotinmenge in Abhängigkeit von der Zeit für ein 15, 30 und 60 mg Nicotinpflaster.....	120
Abbildung 3.2-4: Im PBPK-Modell berechnete absorbierte Nicotinmenge pro Zeiteinheit in Abhängigkeit von der Zeit für ein 15, 30 und 60 mg Nicotinpflaster.	121
Abbildung 3.2-5: Im PBPK-Modell berechnete Bestimmung der Freisetzungsraten aus 15, 30 und 60 mg Nicotinplastern innerhalb der ersten 8 Stunden durch lineare Regression der absorbierten Nicotinmenge in Abhängigkeit der Zeit.....	122
Abbildung 3.2-6: PBPK-Berechnung der permeierten Menge an Timolol pro Flächeneinheit aufgetragen gegen die Zeit für 0-15 Corneozytenschichten im Stratum corneum.	126
Abbildung 3.2-7: PBPK-Berechnung der kumulativ permeierten Wirkstoffmenge nach 24 h in Abhängigkeit von der Anzahl der im Stratum corneum vorhanden Corneozytenschichten.....	128

Abbildung 3.3-1: Mikroskopische Aufnahmen von Safranin gefärbter Schweineohrhaut nach Durchführung unterschiedlicher Anzahl an durchgeführten Klebebandabrissen, A: 0x, B: 3x, C: 6x, D: 9x, E: 12x.	131
Abbildung 3.3-2: Im Stratum corneum von Schweineohrhaut vorhandene Corneozytenschichten nach Durchführung unterschiedlicher Anzahl an Klebebandabrissen; n = 6; Arithmetischer Mittelwert \pm Standardabweichung (SD).....	132
Abbildung 3.3-3: Vergleich der <i>in vitro</i> Permeation von Timolol durch Hautproben nach Durchführung unterschiedlicher Anzahl an Klebebandabrissen aufgetragen gegen die Zeit; Akzeptormedium: natriumchloridhaltiger Phosphatpuffer pH 7,4; n= 3; Arithmetischer Mittelwert \pm SD; durchgeführt an Schweineohrhaut aus 3 verschiedenen Spendertieren A, B und C.	134
Abbildung 3.3-4: Permeierte Wirkstoffmenge aufgetragen gegen die Anzahl an Klebebandabrissen; n = 3; Arithmetischer Mittelwert \pm SD; durchgeführt an Schweineohrhaut aus 3 verschiedenen Spendertieren A, B und C; D Gesamtübersicht.....	137
Abbildung 3.3-5: Absolute (A-D) und relative (a-d) Dicke des getrockneten Stratum corneums der Hautproben aufgetragen gegen die Anzahl der durchgeführten Klebebandabriss; n=3; Arithmetischer Mittelwert \pm SD; durchgeführt an Schweineohrhaut aus 3 verschiedenen Spendertieren A/a, B/b und C/c; Gesamtübersicht D/d.	140
Abbildung 3.3-6: Korrelation zwischen der relativen Dicke des Stratum corneums und permeierter Wirkstoffmenge; n=3; Arithmetischer Mittelwert \pm SD; durchgeführt an Schweineohrhaut aus 3 verschiedenen Spendertieren A, B und C; Gesamtübersicht D.	143
Abbildung 3.4-1: Zusammenfassende Darstellung der durchgeführten Simulation des PBPK Modells humaner Haut und der durchgeführten <i>in vitro</i> Permeationsversuch; n = 3; arithmetischer Mittelwert \pm SD.....	146
Abbildung 3.5-1: Übersicht der erwarteten Gewebekonzentrationen von Timolol bei der Applikation eines 0,5%igen Timololgels auf einer okkludierten Fläche von 1,13 cm ² über 24 h.	151
Abbildung 3.5-2: Übersicht der mit dem PBPK-Modell berechneten kumulativ ausgeschiedenen Timololmenge in Abhängigkeit von der Zeit in A: Niere, B: Leber bei einer dermalen Applikation eines 0,5%igen Timololgels auf einer okkludierten Fläche von 1,13 cm ² über 24 h.	154
Abbildung 3.5-1: Schematische Übersicht der im Rahmen dieser Dissertation durchgeführten Teilprojekte.	158
Abbildung 4.6-1: Schematische Übersicht der im Rahmen dieser Dissertation durchgeführten Teilprojekte und der dabei erzielten Ergebnisse.	169

Tabellenverzeichnis

Tabelle 2.2-1: Übersicht über Organvolumina, Organdurchblutung, Kpu- und Kp- Werten	95
Tabelle 2.2-2: Übersicht zu Literaturwerten zum Metabolismus von Timolol.	97
Tabelle 3.2-1: Übersicht verwendeter Modellparameter zur Vorhersage puplizerter <i>ex vivo</i> Daten von Timololpflastern.	113
Tabelle 3.2-2: Übersicht der Studienergebnisse von Kubota und Yamada (1990).	114
Tabelle 3.2-3: Übersicht verwendeter Modellparameter zur Vorhersage publizierter <i>in</i> <i>vivo</i> Daten von Nicotinpflastern.....	118
Tabelle 3.2-4: Übersicht verwendeter Modellparameter für die Vorhersage der Hautpermeation von Timolol bei Frühgeborenen	125
Tabelle 3.2-5: Permeierte Wirkstoffmenge [%] für 24 h für 0 bis 15 Corneozytenschichten im Stratum corneum berechnet mit dem PBPK- Modell.	127
Tabelle 3.3-1: Übersicht der berechneten Bestimmtheitsmaße der Regressionsgeraden aus Abbildung 3.3-6 A-D.	144
Tabelle 6.1-1: Daten zur Kalibrierung von Timolol nach flüssig-flüssig Extraktion aus Urin; Interner Standard Propranolol; 0,01 – 0,10 µg/ml.....	175
Tabelle 6.1-2: Daten zur Kalibrierung von Timolol nach flüssig-flüssig Extraktion aus Urin; Interner Standard Propranolol; 0,10-1,00 µg/ml	175
Tabelle 6.1-3: Daten zur Kalibrierung von Timolol im Akzeptormedium natriumchloridhaltiger Phosphatpuffer pH 7,4 R; 1,0 – 10,0 µg/ml.....	176
Tabelle 6.1-4: Daten zur Kalibrierung von Timolol im Akzeptormedium natriumchloridhaltiger Phosphatpuffer pH 7,4 R; 10,0 – 100,0 µg/ml	176
Tabelle 6.2-1: Sättigungslöslichkeit von Timolol im Akzeptormedium; n = 3; Arithmetischer Mittelwert ± SD.....	176

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
%	Prozent
ACN	Acetonitril
bFGF	Basic fibroblast growth factor
ca.	Circa
cm	Zentimeter
cm ²	Quadratcentimeter
D _C	Diffusionskoeffizient der Corneozyten
D _{EP}	Diffusionskoeffizient der lebenden Epidermis und der Dermis
D _L	Diffusionskoeffizient der Lipidmatrix
D _V	Diffusionskoeffizient des Wirkstoffvehikels
et al.	Et alii
FDA	Food and Drug Administration; Lebensmittelüberwachungs- und Arzneimittelbehörde der Vereinigten Staaten
FE	Flächeneinheit
g	Gramm
g/mol	Gramm pro Mol
GFS	Gelbildendes System (gel forming solution)
GIT	Gastrointestinaltrakt
GLUT1	Glucosetransporter 1
h	Stunde
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
IH	Infantiles Hämangiom
kg	Kilogramm
l	Liter
IGF	Insulin-like growth factor
m	Meter
m ²	Quadratmeter
M	Molar

mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
ml/min	Milliliter/Minute
MMP9	Metalloproteinase 9
m ²	Quadratmeter
m ² /s	Quadratmeter pro Sekunde
ng	Nanogramm
ng/ml	Nanogramm pro Milliliter
nm	Nanometer
OECD	Organisation for Economic Co-Operation and Development
PBPK Modell	Physiologie basiertes pharmakokinetisches Modell
PDE	Partielle Differentialgleichung
pg/ml	Pikogramm pro Milliliter
Ph. Eur.	Pharmakopöe (Europäisches Arzneibuch)
RAF	Rapidly accelerated fibrosarcoma
s	Sekunde
SB	Stratum basale
SC	Stratum corneum
SD	Standardabweichung
SG	Stratum granulosum
SS	Stratum spinosum
SSW	Schwangerschaftswochen
t	Zeit
TEWL	Transepidermaler Wasserverlust
VEGF	Vascular endothelial growth factor, vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor
TEA	Triethylamin
TFA	Trifluoressigsäure
UpM	Umdrehungen pro Minute
USP	United States Pharmacopeia
UV	Ultraviolett

VAS	Visuelle Analogskala
WHO	Weltgesundheitsorganisation
μg	Mikrogramm
$\mu\text{g}/\text{cm}^2$	Mikrogramm pro Quadratcentimeter
$\mu\text{g}/\text{ml}$	Mikrogramm pro Milliliter
μm	Mikrometer

Formelverzeichnis

Formel 2.2-1: Berechnung des Diffusionskoeffizienten D_V des Wirkstoffvehikels, Formel nach Chen et al. (2008).	74
Formel 2.2-2: Berechnung des Radius der gelösten Substanz, Formel nach Mitragotri (2003) und Mitragotri et al. (1999).....	75
Formel 2.2-3: Berechnung des Diffusionskoeffizienten D_L der Lipidmatrix, Formel nach Chen et al. (2008).....	75
Formel 2.2-4: Berechnung des Diffusionskoeffizienten D_{ED} des Kompartiments der lebenden Epidermis und der Dermis, Formel nach Chen et al. (2015) und Kretsos et al. (2008).....	76
Formel 2.2-5: Allgemeine Formel partieller Differentialgleichungen der PDE Toolbox.	76
Formel 2.2-6: Vereinfachte partielle Differentialgleichungen für Diffusionsprozesse.	77
Formel 2.2-7: Berechnung der zum Zeitpunkt t [h] aus dem Akzeptorkompartiment entnommenen Masse an Timolol [μg].	86
Formel 2.2-8: Berechnung der permeierten Masse an Timolol pro Permeationsfläche [$\mu\text{g}/\text{cm}^2$].	87

1 Einleitung und Zielsetzung

1.1 Infantiles Hämangiom

1.1.1 Definition

Infantile Hämangiome (IH) sind proliferierende, vaskuläre Tumore. Sie sind von anderen Gefäßtumoren, wie dem kaposiformen Hämangioendotheliom oder dem Granuloma pyogenicum, und von arteriellen, venösen, lymphatischen oder kombinierten Malformationen des Gefäßsystems abzugrenzen (AWMF, 2015). Laut Goelz et al. (2015) war die Differenzierung zwischen Hämangiomen und vaskulären Fehlbildungen, welche von Mulliken und Glowacki (1982) eingeführt wurde, ein Meilenstein bei der Definition des IH. Durch das immunohistochemische Profil kann IH von anderen vaskulären Geburtsmalen oder Tumoren unterschieden werden (Chen et al., 2013). So sind kaposiforme Hämangioendotheliome Glucosetransporter1 (GLUT1)-negativ, während IH GLUT1-positiv sind (AWMF, 2015).

1.1.2 Entwicklung

IHs zeigen eine einzigartige Wachstumsdynamik, die 3 Phasen durchläuft (AWMF, 2015). Bei der Geburt meist nicht sichtbar, folgt innerhalb der ersten 5 bis 9 Monate eine sehr starke Proliferationsphase, wobei die größte Zunahme innerhalb der ersten 5 bis 8 Wochen stattfindet. Der anschließenden Phase des Wachstumsstillstands folgt eine Rückbildungsphase, welche bis zu 5 Jahre andauern kann. Zurück bleiben Deformationen wie atrophische Haut, Narben, zerstörte anatomische Strukturen, Hyper- oder Hypopigmentierung, fibrös-lipomatöse Gewebsvermehrungen, überschüssige Haut (cutis laxa) und in einigen Fällen Teleangiektasien (Goelz and Poets, 2015). Die Deformationen sind umso ausgeprägter, je größer das IH vor dem Eintritt in die Regressions- und Rückbildungsphase war (AWMF, 2015).

1.1.3 Inzidenz

Die Inzidenz von IH steigt mit abnehmendem Gestationsalter von 1 bis 4 % für Reifgeborene bis zu 23 % für Frühgeborene mit einem Geburtsgewicht unter 1000 g, mit weiblicher und kaukasischer Dominanz (Goelz and Poets, 2015; Kanada et al., 2012). Mädchen sind 3-mal häufiger betroffen als Jungen (Schneider and Vierling, 2019).

Eine Studie von Drolet et al. (2008) zeigte zum ersten Mal, dass ein niedriges Geburtsgewicht vielmehr als die Unreife an sich, der größte Risikofaktor für die Entwicklung eines IH ist.

1.1.4 Pathophysiologie

Die Pathophysiologie der Entstehung eines IHs wurde bisher noch nicht vollständig geklärt (Mihm and Nelson, 2010).

Eine derzeit gängige Hypothese besagt, dass Zellen aus der Plazenta „embolisiert“ werden und an anderen Stellen mit niedrigem Sauerstoffpartialdruck, welche beispielsweise an embryonalen Fusionsflächen auftreten, eine „metastasenbildende Nische“ ausbilden, in welcher direkt oder nach einer Ruhephase aus endothelialen Progenitorzellen das Hämangiom entsteht (Chen et al., 2013; Mihm and Nelson, 2010). So wird die Plazenta als möglicher Ursprungsort für die Progenitorzellen des Hämangioms angesehen (Mihm and Nelson, 2010).

Auch das einzigartige, sich selbst limitierende, programmierte Wachstum des IHs mit einer anfangs starken Proliferationsphase und anschließender Regressions- und Rückbildungsphase, was den Lebenszyklus von plazentarem Endothel widerspiegelt, unterstützt diese Hypothese (Barnes et al., 2005). Die Wachstumssteuerung des IHs erfolgt durch angiogene Peptide, welche das Wachstum von Blutgefäßen fördern, wie beispielsweise VEGF (vascular endothelial growth factor) und bFGF (basic fibroblast growth factor). In verschiedenen Studien konnte ein Ungleichgewicht der VEGF-Rezeptor-1 Expression und eine konsequente Hyperaktivität der VEGF-Rezeptor-2 Funktionalität in IH Gewebe festgestellt werden

(Chen et al., 2013; Jinnin et al., 2008). Hieraus leitet sich auch der sehr stark verbreitete Einsatz von Glukokortikoiden bei der Therapie von IH ab. Diese hemmen die Expression von VEGF-A und verhindern somit die Neubildung von Blutgefäßen (Chen et al., 2013; Greenberger et al., 2010). Ein weiterer wichtiger Regulator für das Wachstum von IH sind die IGF-2 Rezeptoren (insulin-like growth factor 2). Diese sind während der Proliferationsphase überexprimiert, in der Rückbildungsphase jedoch wieder deutlich reduziert (Chen et al., 2013; Ritter et al., 2002).

Histochemisch und genetisch betrachtet sprechen ebenfalls viele Faktoren für einen plazentaren Ursprung des IHs. So weisen die benignen endothelartigen Zellen des IHs die gleichen histochemischen Marker wie die Plazenta auf (GLUT-1, Lewis Y Antigen, FcyRII und Merosin) (Chen et al., 2013; North et al., 2000). Auch genetisch zeigen die Transkriptome menschlicher Plazenta und IH ausreichend Ähnlichkeiten, um einen plazentaren Ursprung für IHs zu erkennen (Barnes et al., 2005; Chen et al., 2013). So wird spekuliert, dass IHs aus einer somatischen Mutation oder Hyperreaktivität eines Gens resultieren, welches die endotheliale Zellproliferation steuert. Somit könnte die Veränderung des VEGF Signalwegs in Endothelzellen der Mechanismus der Hämangiombildung sein (Chen et al., 2013; Walter et al., 2002). Neuere Daten vermuten ebenfalls eine endotheliale Progenitorzelle als Ursprung eines IHs (Chen et al., 2013). Eine erste Studie von Kleinman et al. (2003) konnte zeigen, dass erhöhte Spiegel an zirkulierenden endothelialen Progenitorzellen zu einer Entwicklung von IHs führen können. Die endothelialen Progenitorzellen sind in der Proliferationsphase des IHs hochreguliert (Kleinman et al., 2007) und tragen zum frühen Wachstum bei (Yu et al., 2004). Im Jahre 2008 gelang es Khan et al. (2008), das erste Tiermodell für IH entwickeln, indem sie aus menschlichem Gewebe isolierte CD133+ endotheliale Progenitorzellen in immundefiziente Mäuse injizierten. Diese entwickelten daraufhin ein IH. Peichev et al. (2000) wiesen auf endothelialen Progenitorzellen, welche aus IH Gewebe isoliert wurden, die Oberflächenmarker CD34+ und CD133+ nach. Diese Progenitorzellen können sich *in vitro* in Endothelialzellen differenzieren und sind bei IH im Vergleich zur Kontrolle bis zu 15-fach erhöht (Chen et al., 2013; Kleinman et al., 2003).

Epidemiologische Beobachtungen zeigen, dass IHs verstärkt in Populationen auftreten, die mit der Entwicklung einer Hypoxie zusammenhängen, beispielsweise

bei niedrigem Geburtsgewicht oder fortgeschrittenem mütterlichen Alter (Chen et al., 2013). So geht IH auch häufig mit einer Retinopathie bei einer Frühgeburt einher, beides Faktoren, welche bekanntermaßen mit einer Ischämie zusammenhängen (Praveen et al., 2009). Durch eine Hypoxie, welche beispielsweise bei plazentarer Insuffizienz auftreten kann, werden Progenitorzellen freigesetzt. Diese nisten sich in lokalen Gebieten schlecht durchbluteten Gewebes ein und bilden eine sogenannte „Nische“. Durch die Hypoxie werden sie zu einer ungehinderten Proliferation stimuliert (Chen et al., 2013; Drolet and Frieden, 2010; Mihm and Nelson, 2010). In Bereichen mit niedriger Sauerstoffsättigung, wie beispielsweise an Flächen, die bei der embryonalen Fusion entstehen und an den embryonalen Fusionslinien der Plakoden im Gesichtsbereich, sind IHs verstärkt zu beobachten. Als gutartige Metastasen, die aus der Plazenta stammen, proliferieren sie in diesen Bereichen (Chen et al., 2013; Mihm and Nelson, 2010; Waner et al., 2003). Auch der GLUT1 Rezeptor, welcher ein sehr wichtiger Sensor für Hypoxie ist, ist ebenfalls in IH Gewebe zu finden (Chen et al., 2013; Mobasheri et al., 2005).

Ein mütterlicher Mikrochimärismus, also mütterliche Zellen im Körper des Kindes, konnte nicht als Ursprung für IH festgestellt werden. Dennoch ist die Plazenta-Theorie möglich, da diese weitestgehend fetalen Ursprungs ist (Chen et al., 2013; Pittman et al., 2006).

Eine andere Hypothese besagt, dass unreife Endothelialzellen und Perizyten, welche in der späten Phase der fetalen Entwicklung nebeneinander existieren, möglicherweise eine fortwährende Proliferationswirkung aufrecht erhalten, was zu der Entwicklung eines IHs führt (Chen et al., 2013; Takahashi et al., 1994). Gegen diese Hypothese spricht die Studie von Boye et al. (2001), welche die Klonalität von IH Zellen demonstriert. Dies widerspricht der Beteiligung einer weiteren Zellgruppe an der Entstehung eines IHs (Chen et al., 2013).

1.1.5 Behandlung/Therapie

1.1.5.1 Allgemeine Behandlungsstrategien

Die meisten IHs verschwinden auf natürliche Weise, ohne Notwendigkeit einer Therapie. Schätzungsweise 10 % der betroffenen Kinder benötigen jedoch aufgrund von Komplikationen einen systemischen Eingriff (Zhang et al., 2015). Bei unkomplizierten IHs mit einer unproblematischen Lokalisation am Stamm oder den Extremitäten ist keine Therapie, jedoch eine regelmäßige Kontrolle erforderlich (AWMF, 2015). IHs, die lebensbedrohlich sind oder Funktionen von Organen bedrohen, ulzerieren oder ein Risiko für Ulzerationen aufweisen, sehr schnelles Wachstum zeigen oder zur akuten oder chronischen Entstellung führen, müssen behandelt werden. Dies trifft auf Hämangiome in Gesicht, an Kopfhaut, Nacken, Händen, Füßen und intertriginösen und anogenitalen Bereichen zu (Goelz and Poets, 2015; Grantzow et al., 2008; Luu and Frieden, 2013). Die Therapie muss individuell gestellt werden (AWMF, 2015).

Die Schwelle zum Einschreiten wurde im Jahr 2008 durch die Einführung von Betablockern bei der Behandlung von IH als eine sehr wirksame Therapie mit weniger schwerwiegenden unerwünschten Arzneimittelwirkungen deutlich erniedrigt (Goelz and Poets, 2015; Leaute-Labreze et al., 2008). So wurden vor der Entdeckung der Betablocker nur Läsionen behandelt, die Funktionsprobleme durch Obstruktion oder Kompression verursacht haben. Läsionen am Auge wurden nur behandelt, wenn sie potentiell amblyogen waren. Heutzutage wird eine Behandlung oftmals auch aus kosmetischen Gründen in Erwägung gezogen oder um langbleibende Vernarbungen zu reduzieren (Leaute-Labreze et al., 2011; Painter and Hildebrand, 2016).

Therapieziele bei der Behandlung sind ein Wachstumsstopp des IHs, eine beschleunigte Rückbildung bei großen IHs und/oder die Verhinderung oder Beseitigung funktioneller und ästhetischer Probleme, beispielsweise am Auge, den Atemwegen oder im Gesicht. Bei vorhandenen Ulzerationen ist eine beschleunigte Abheilung das Ziel. In der Stillstands- und Regressionsphase ist in der Regel eine

abwartende Haltung zu empfehlen. Bei Komplikationen durch Ulzeration ist jedoch auch hier eine Therapie sinnvoll (AWMF, 2015).

Lokale Behandlungsmöglichkeiten sind eine Kryobehandlung oder eine Lasertherapie. Bei drohendem Funktionsverlust oder Residuen ist eine Operation erforderlich. Eine systemische Behandlung ist mit Propranolol, Glukokortikoiden, Vincristin, Cyclophosphamid und gegebenenfalls mit Interferonen möglich (AWMF, 2015).

Der Einsatz von oralem Propranolol als Alternative zu oralen Glukokortikoiden für die Behandlung von IH wurde durch Zufall von Léauté-Labrèze et al. (2008) entdeckt. Die Verwendung von Betablockern wurde insbesondere in der Pädiatrie sehr schnell akzeptiert (Painter and Hildebrand, 2016) und es folgte ein rasanter Anstieg beim Einsatz von Betablockern und eine Abnahme der bisher genutzten Glukokortikoide (Goelz and Poets, 2015; Gomulka et al., 2013). Berichteten Blatt et al. in einer Untersuchung im Jahr 2008 noch von einem Patientenanteil von 7 % bei Behandlung mit Betablockern (Propranolol oral) und 47 % bei der Behandlung mit Glukokortikoiden (Blatt et al., 2011), so konnte er im Jahr 2010 bereits einen Anteil von 54 % bei der Behandlung mit Betablockern (Propranolol oral oder Timolol lokal) und nur noch 9 % bei der Behandlung mit Glukokortikoiden verzeichnen (Painter and Hildebrand, 2016). Heute stellt die orale Therapie mit Propranolol bei der Behandlung komplizierter IHS das Mittel der ersten Wahl dar. Eine Behandlung mit systemischen Glukokortikoiden ist obsolet und wird nur noch bei Therapieversagen oder bei unmittelbar lebensbedrohlichen Situationen in kurzzeitiger Kombination mit oralem Propranolol angewendet (AWMF, 2015).

Von der Verwendung von topischem Timololmaleat wurde laut Püttgen et al. (2016) erstmals im Jahre 2010 berichtet (Guo and Ni, 2010). Guo et al. (2010) konnten dabei zeigen, dass die topische Behandlung eines IHS auf dem Augenlid eines Kindes mit einer Lösung aus 0,5 % Timololmaleat eine sichere und wirksame Alternative zu einer systemischen Therapie darstellt. Lokale oder systemische Nebenwirkungen wurden nicht bemerkt. Die erste Studie zur Verwendung eines 0,5%igen Timolol Gels zur topischen Behandlung von IH wurde von Pope et al. (2010) durchgeführt (Painter and Hildebrand, 2016). Im Jahr 2013 konnten Moehrle et al. (2013) in einer Studie die Reduktion des Wachstums und eine Förderung der

Regression von IH durch die Verwendung von topischem Timololmaleat zeigen. Auch die Verwendung dieses lokal einsetzbaren Betablockers zeigte einen rasanten Anstieg. Kumar et al. (2015) befragen in einer Studie im Jahr 2015 149 pediatriische Dermatologen zur Anwendung von oralem Propranolol und topischem Timololmaleat bei IH. 79 % beantworteten den Fragebogen, wobei davon 91 % angaben, topisches Timololmaleat für die Behandlung von IH zu verwenden, 66 % in Kombination mit oralem Propranolol.

Mittlerweile wird Propranolol von den meisten Experten als First-Line Wirkstoff empfohlen, wenn eine systemische Therapie induziert ist. Falls eine lokale Therapie ausreichend ist, wird Timololmaleat 0,5 % empfohlen (Goelz and Poets, 2015).

Leider gibt es bisher keine Leitlinie zur Anwendung von topischem Timololmaleat bei IH (Kumar et al., 2015) und nur sehr dürftige pharmakologische Untersuchungen (Berk et al., 2013). Ein Konsens zur Formulierung, Dosierung und Behandlungsdauer der Behandlung von IH mit topischen Betablockern wäre für die Beurteilung der Wirksamkeit der Therapie sehr vorteilhaft. Gleichmaßen würde eine standardisierte Methode zur Bewertung des Behandlungsfortschritts die Bewertung von zukünftigen Studien deutlich erleichtern (Painter and Hildebrand, 2016).

1.1.5.2 Behandlung von Frühgeborenen

Die Weltgesundheitsorganisation definiert ein Neugeborenes als Frühgeborenes, wenn die Geburt innerhalb der 22sten und 37sten Schwangerschaftswoche eintritt (Sekkat et al., 2004a). Dieses Patientenkollektiv weist zwar die größte Inzidenz an IH und das größte Risiko an unerwarteten Arzneimittelwirkungen auf, dennoch ist es das am schlechtesten untersuchte und wird beispielsweise in nationalen Richtlinien von den Empfehlungen ausgeschlossen (Goelz and Poets, 2015; Grantzow et al., 2008).

Im Bereich der Ophthalmologie konnte bei einer topischen Behandlung des Glaukoms mit Timolol bereits nachgewiesen werden, dass die systemische Absorption von Timolol bei Neugeborenen die von Erwachsenen übersteigt.

Außerdem könnte der unreife Metabolismus von Neugeborenen die Halbwertszeit von Timolol verlängern (McMahon et al., 2012).

Bisher gibt es speziell für diese Hochrisikogruppe jedoch keine maßgeschneiderte, kontrollierte Studie, die ausschließlich an Frühgeborenen durchgeführt wurde, mit Ausnahme einer sehr kleinen Studie von Goelz et al. (2014), bei der stickstoffgekühlte Kryokontakttherapie eingesetzt wurde (Goelz and Poets, 2015). Daten zur lokalen Behandlung mit Lasertherapie oder Timololmaleat sind ebenfalls nur eingeschränkt vorhanden (Chen et al., 2013; Goelz and Poets, 2015). Daten über die systemische Verwendung von Propranolol und, als Second Line Wirkstoff, dem Glukokortikoid Prednisolol, ehemals Standardtherapie und nun secondline Option, sind ebenfalls nur begrenzt vorhanden (Goelz and Poets, 2015). Für die derzeit vorhandenen therapeutischen Interventionen wurde bisher keine Studie speziell an Frühgeborenen durchgeführt (Barrio and Drolet, 2005).

1.1.6 Timolol bei der Behandlung von infantilem Hämangiom

1.1.6.1 Allgemeine Informationen

Timolol ((S)-(-)-1-(tert.-Butylamino)-3-[(4-morpholino-1,2,5-thiadiazol-3-yl)oxy]-2-propanol) ist mit einer relativen Molekülmasse von 316,4 (Cheung et al., 2018) und einem pK_s Wert von 9,2 (Denet et al., 2003) ein lipophiler, nichtselektiver Beta-Adrenozeptor-Antagonist. Seit 2010 wird es off-label für die topische Behandlung von IH verwendet (Guo and Ni, 2010; Puttgen et al., 2016). Klinisch verwendet wird das reine S-Enantiomer (Lennard et al., 1989), üblicherweise als Salz der Maleinsäure (Timololmaleat).

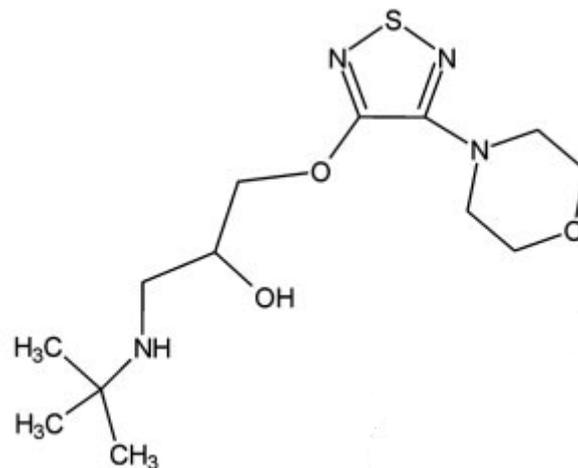


Abbildung 1.1-1: Strukturformel von Timolol, Abbildung nach Volotinen et al. (2007).

Timolol wird bereits seit Jahrzehnten klinisch eingesetzt, sein Metabolismus wurde jedoch erst in den letzten Jahren genauer untersucht (Volotinen et al., 2011). Da Timololmaleat eine orale Bioverfügbarkeit von nur ungefähr 50 % aufweist, kann eine transdermale Applikation eine wirksame Alternative sein, um den hepatischen First-Pass-Effekt zu umgehen (Denet et al., 2003).

1.1.6.2 Wirksamkeit und Sicherheit

Der Off-Label-Einsatz von Timolol bei IHs als Behandlungsalternative zur oralen Verabreichung von Propranolol ist dramatisch angestiegen und wird insbesondere bei oberflächlichen IHs empfohlen (Puttgen et al., 2016). Gerade bei Frühgeborenen erscheint es sehr sinnvoll, diese lokale Form der Behandlung mit Timolol in Erwägung zu ziehen, da sie ein wesentlich geringeres Risikoprofil als die systemische Gabe von Propranolol aufweist (Goelz and Poets, 2015). In einer ersten retrospektiven Kohortenstudie von Chakkittakandiyil et al. (2012) zur topischen Verwendung von 0,1 oder 0,5 % Timololmaleat bei IH wurde nur bei einem Kind eine signifikante Schlafstörung als Nebenwirkung beobachtet (Painter and Hildebrand, 2016). Für Propranolol wurden in Studien jedoch negative Auswirkungen auf Schlaf, Kreislauf und Metabolismus berichtet (Goelz and Poets, 2015).

Daten zur Wirksamkeit, Pharmakokinetik und langfristigen Sicherheit von topisch appliziertem Timolol bei IH sind allerdings sehr rar (Goelz and Poets, 2015; Puttgen et al., 2016). Bisher gibt es nur eine kontrollierte, randomisierte Studie von Moehrle et al. (2013) zur Verwendung von topischem Timololmaleat bei Frühgeborenen für die Behandlung in den ersten Wochen nach der Geburt oder nach Erreichen des Äquivalenzalters eines termingeborenen Säuglings (Goelz and Poets, 2015).

Daten zur transdermalen Absorption von Timololmaleat sind bisher ebenfalls nicht in ausreichendem Maße vorhanden (Goelz and Poets, 2015; Moehrle et al., 2013). Problematisch hierbei ist, dass die Haut von Frühgeborenen eine sehr viel geringere Hautbarrierefunktion als die Haut von älteren Kindern oder Erwachsenen aufweist. Die Absorption von Timololmaleat bei Frühgeborenen könnte deshalb erheblich ansteigen (Goelz and Poets, 2015). Weibel et al. (2016) waren die ersten, welche die systemische Absorption von topisch appliziertem Timololmaleat untersucht haben. Sie applizierten 2-mal täglich lokal ohne Okklusion ein 0,5%iges Timololgel und untersuchten bei einigen Patienten die Urinexkretion und Serumspiegelwerte. Bei 83 % der Kinder konnte Timolol im Urin nachgewiesen werden. Die untersuchten Serumspiegelwerte nach einer Stunde ergab Konzentrationen im Bereich von 0,1 bis 0,18 ng/ml bei ulzerierten Hämangiomen mit einem Durchmesser von 1,4 bis 2,0 cm. Ma et al. (2014) untersuchten nach einer 30 minütigen Applikation einer 0,5%igen Timolollösung auf die Haut mit Okklusion die Plasmaspiegelkonzentrationen. In allen 9 untersuchten Patienten lagen die Werte unter dem Detektionslimit von 20 pg/ml (Painter and Hildebrand, 2016). Laut Korte et al. (2002) sollten Plasmaspiegelwerte von Timolol unter 1 ng/ml jedoch physiologisch insignifikant sein und keine klinischen Auswirkungen haben.

Um den Erfolg einer Behandlung von IH beurteilen zu können, wenden viele Prüfärzte unterschiedliche Methoden an. Die meisten nutzen subjektive Messungen, um Verbesserungen festzustellen. Andere verwenden Fotografien oder eine visuelle Analogskala (VAS). Standardisierte Aufzeichnungen sind dabei durch die VAS oder die Hämangiom-Aktivitätsbeurteilung möglich und empfohlen (Painter and Hildebrand, 2016).

Einfluss auf den Behandlungserfolg zeigen sowohl der Behandlungsbeginn als auch die Behandlungsdauer.

Betrachtet man die Wachstumsphasen des IHs, so ist eine Behandlung in der Proliferationsphase naheliegend. Die Entwicklung des IHs kann gehemmt und die Größe und den Einfluss auf umliegendes Gewebe vermindert werden. Auch der kosmetische Aspekt wird dadurch deutlich verbessert (Painter and Hildebrand, 2016). Semkova et al. (2013) behandelten in einer Studie Kinder mit IH für 6 Monate lokal mit Timololmaleat. Das Alter bei Behandlungsbeginn lag zwischen 3 und 14 Monaten. Sie konnten zeigen, dass ein Behandlungsbeginn in der Proliferationsphase, also im Alter von 3 bis 6 Monaten deutlich wirksamer war als ein Behandlungsbeginn in der Rückbildungsphase, also im Alter von 8 bis 14 Monaten. Auch Xu et al. (2012) konnten in einer Studie an Kindern mit IH, welche lokal mit Propranolol behandelt wurden, vergleichbare Erkenntnisse erzielen. Sie teilten die Kinder zu Behandlungsbeginn in drei Altersklassen ein, in 0 bis 3 Monate, 3 bis 6 Monate und 6 bis 10 Monate, und stellten einen statistisch signifikanten Unterschied hinsichtlich des Alters zu Behandlungsbeginn fest. Bei der topischen Behandlung von oberflächlichen IHs mit Betablockern scheint ein Behandlungsbeginn innerhalb der Proliferationsphase wirksamer als ein späterer Behandlungsbeginn. Yu et al. (2013) konnten bei der lokalen Behandlung von Kindern mit IH mit Timolol zwar keinen signifikanten Unterschied der Wirksamkeit zwischen 1 bis 6 Monate alten Patienten und 7 bis 12 Monate alten Patienten feststellen, sie konnten jedoch zeigen, dass die Regressionsrate bei den 1 bis 6 Monate alten Patienten signifikant höher war.

Auch die Behandlungsdauer beeinflusst das Ergebnis der Therapie. Chan et al. (2013) stellten bei einer topischen Behandlung von Kindern mit IH mit Timololmaleat fest, dass eine längere Behandlungsdauer über 24 Wochen zu einer stärkeren Verbesserung des IHs führt. Auch eine retrospektive Kohortenstudie von Chakkittakandiyil et al. (2012) zur topischen Behandlung von IH mit Timolol konnte zeigen, dass eine längere Behandlungsdauer mit einer stärkeren Verbesserung zusammenhängt (Painter and Hildebrand, 2016).

Da Anhaltspunkte für eine optimale Behandlung von IH bei Frühgeborenen trotz ihrer hohen Inzidenz fehlen, werden Indikationen und Entscheidungen für die Behandlung derzeit aus Studien an älteren beziehungsweise termingerecht geborenen Kindern extrapoliert. Sie basieren deshalb hauptsächlich auf individuellen Abwägungen

(Goelz and Poets, 2015). Der topische Einsatz von Timolol bei IH sollte deshalb laut McMahon et al. (2012) eine Einzelfallentscheidung bleiben. Die Behandlung sollte engmaschig durch das Pflegepersonal kontrolliert werden, bis weitere große, randomisierte, placebokontrollierte Studien durchgeführt wurden (Weissenstein et al., 2012).

1.1.6.3 Formulierung und Dosierung von Timololpräparaten

Timololmaleat ist ein nichtselektiver Betablocker, welcher als Augenarzneimittel sowohl als Lösung als auch als gelbildendes System (GFS, gel forming solution) erhältlich ist (Puttgen et al., 2016) Obwohl eine lokale Behandlung der Haut mit Betablockern immer häufiger angewendet wird, ist derzeit keine Formulierung zur Anwendung auf der Haut im Handel verfügbar (Chantasart et al., 2013).

Viele Kliniken stellen deshalb ihre eigenen Formulierungen her und verfolgen einen eigenen Dosierungsansatz. Übliche Formulierungen sind 0,25 beziehungsweise 0,5%ige Timolol Augentropfen, 0,25 beziehungsweise 0,5%iges Timolol-haltiges GFS (gel forming solution, gelbildende Lösung) oder 0,1 beziehungsweise 0,5%iges Timololgel. Übliche Dosierungen variieren, je nach Formulierung zwischen ein- bis fünfmal am Tag und zwischen 1 und 10 Tropfen pro Dosis (Painter and Hildebrand, 2016).

Schätzungen der Bioverfügbarkeit von topischem Timololmaleat variieren sehr stark, zumal die Absorption durch ulzerierte und intakte Haut deutlich schwankt. In der Literatur gibt es bisher nur sehr wenige Daten dazu (Painter and Hildebrand, 2016). Berk et al. (2013) schätzen, dass die systemische Bioverfügbarkeit eines Tropfens Timolol 0,5 % GFS, der topisch appliziert wird (Tropfenvolumen 0,05 ml; ergibt eine Timololmenge pro Tropfen von 0,25 mg), äquivalent zu 0,2 bis 1,0 mg oralem Propranolol ist. McMahon et al. (2012) hingegen schätzen die systemische Bioverfügbarkeit eines Tropfens Timolol 0,5 % GFS, welcher topisch appliziert wird (Tropfenvolumen 0,05 ml, ergibt 0,25 mg Timolol pro Tropfen) auf eine äquivalente Menge zu 2 bis 8 mg oralem Propranolol (Painter and Hildebrand, 2016). Bei oraler

Applikation ist Timololmaleat ungefähr 6- bis 8-mal potenter als Propranolol (Singh et al., 1980; Vukovich et al., 1979).

1.1.7 Wirkmechanismus von Betablockern

Der Wirkmechanismus von Betablockern ist bisher noch nicht vollständig aufgeklärt (Painter and Hildebrand, 2016).

Beta2-Adrenozeptoren sind in IHs stark exprimiert. Sie sind für die Wirkungsweise von Betablockern wie Timolol und Propranolol verantwortlich. Die Beta-Adrenozeptor-Antagonisten führen zu Vasokonstriktion, Inhibition der Angiogenese und Induktion der Apoptose (Hadaschik et al., 2012). Der ausgelösten Vasokonstriktion folgt durch die Herunterregulation des RAF (rapidly accelerated fibrosarcoma)/Mitogen-aktivierten Protein Kinase Signalwegs und Triggerung der Apoptose von kapillaren Endothelialzellen eine reduzierte Expression an VEGF und bFGF (Chantasart et al., 2013; Pope and Chakkittakandiyil, 2010; Weissenstein et al., 2012). Somit erhöhen Betablocker die Apoptose von Stammzellen und beschleunigen die Umwandlung in Adipozyten, was die Rückbildung von IH in bindegewebs- und fettreiches Gewebe unterstützt (England et al., 2014).

Wong (2012) konnte die Anwesenheit von Beta1- und Beta2- Adrenozeptoren in IHs bestätigen (Painter and Hildebrand, 2016). Durch die Behandlung mit Propranolol wird ebenfalls die Proliferation der Hämangiome durch die Inhibition der Aktivität der Matrix-Metalloproteinase 9 (MMP-9) beeinflusst (Painter and Hildebrand, 2016; Zimmermann et al., 2010). Patienten zeigen nach der Behandlung mit Propranolol während der Proliferationsphase eine verminderte Ausscheidung von MMP-9 im Urin (Thaivalappil et al., 2013).

Außerdem wird das lokale Renin-Angiotensin-System durch den Einsatz von Betablockern geschwächt. Auf der Zelloberfläche unreifer Kapillaren in IH konnten das Angiotensin Converting Enzyme und Angiotensinrezeptoren nachgewiesen werden (Itinteang et al., 2011; Painter and Hildebrand, 2016). Bei der Geburt sind die Plasmaspiegelwerte von Renin schätzungsweise 14-mal höher als bei Erwachsenen. Nochmals deutlich höher sind sie bei weiblichen, hellhäutigen und frühgeborenen

Kindern, was die Neigung dieser Population zur Ausbildung von IH erklären würde. Durch hohe Reninspiegelwerte werden hohe Spiegel an Angiotensin II induziert, was zur Proliferation und Wachstum des Hämangioms führt (Itinteang et al., 2011; Painter and Hildebrand, 2016). Gegen Ende des ersten Lebensjahres sinken die Plasmanreninspiegelwerte. Der damit zusammenhängende Abfall an Angiotensin II führt zu einer Differenzierung der Mesenchymzellen in Adipozyten und Fettgewebe. Dies erklärt die Tendenz der Läsionen, sich nach circa einem Jahr wieder zurückzubilden (Arneja, 2012; Painter and Hildebrand, 2016).

1.2 Frühgeborene

Die Weltgesundheitsorganisation definiert ein Neugeborenes als Frühgeborenes, wenn die Geburt innerhalb der 22-ten und 37-ten Schwangerschaftswoche eintritt. Viele Organe wie Lunge, Herz, Gehirn, Gastrointestinaltrakt und Haut sind bei Frühgeborenen nach der Geburt noch nicht vollständig ausgereift und entwickelt (Sekkat et al., 2004a). Sie benötigen deshalb eine große Anzahl an Medikamenten und müssen engmaschig überwacht und untersucht werden.

1.2.1 Behandlungsstrategien

Bei einer oralen Applikation der Medikamente ist die Menge an absorbiertem Wirkstoff kaum vorhersagbar, da der Gastrointestinaltrakt häufig noch nicht vollständig ausgereift ist. Sie ist deshalb sehr problematisch.

Die meisten Medikamente werden folglich parenteral verabreicht. Dies ist mit Schmerzen und Stress für die Kinder verbunden und Heilungsschwierigkeiten an Injektionsstellen können auftreten, da die Haut noch nicht vollständig ausgereift ist. Aufgrund des geringen Körpergewichts werden nur sehr niedrige Wirkstoffdosierungen benötigt. Bereits kleine Abweichungen in der Infusionsgeschwindigkeit führen deshalb zu sehr starken Dosierungsschwankungen.

Eine transdermale Wirkstoffapplikation scheint eine geeigneten, nichtinvasive, kontinuierliche und kontrollierbare Alternative zu sein (Sekkat et al., 2004b). Da der hepatische First-Pass Metabolismus umgangen wird, ist die Bioverfügbarkeit und therapeutische Wirksamkeit im Vergleich zu einer systemischen oder oralen Applikation erhöht und längere Dosierungsintervalle können erreicht werden (Modamio et al., 2000).

1.2.2 Transdermale Therapie

Die Entwicklung einer transdermalen Formulierung für Frühgeborene erweist sich als schwierig. Durch die zu frühe Geburt ist die Hautbarrierefunktion noch nicht oder nur unvollständig ausgebildet und die Hautpermeation von Wirkstoffen entsprechend erhöht. Nach der Geburt verringert sich die Hautpermeation durch eine allmähliche Reifung der Haut wieder. Die Dosierung der Medikamente muss deshalb stets an die sich wandelnde Hautbarriere angepasst werden (Sekkat et al., 2004a).

Bei Frühgeborenen und auch bei termingerecht geborenen Kindern können Absorption, Distribution, Metabolismus und Elimination von Wirkstoffen anders sein als bei Erwachsenen. Da sie sich noch im Wachstums- und Reifungsprozess befinden, können außerdem unerwünschte Arzneimittelwirkungen auftreten, die bei Erwachsenen nicht zu beobachten sind (Tod et al., 2008).

1.2.3 Klinische Studien

Aus ethischen Gründen gibt es nur sehr wenige klinische Studien, welche speziell an Frühgeborenen oder Kindern durchgeführt wurden. Die Kennzeichnung vieler Medikamente beinhaltet deshalb häufig Haftungsausschlüsse des Herstellers, dass Sicherheit und Wirksamkeit nicht für Kinder oder nur für Kinder einer bestimmten Altersgruppe nachgewiesen wurden. Die Wirksamkeit eines Wirkstoffs kann oftmals allerdings nicht durch Studien an Erwachsenen auf Kinder extrapoliert werden, sondern erfordert zusätzliche Daten und Untersuchungen. Eine Statistik der amerikanischen Arzneimittelbehörde FDA (Food and Drug Administration, amerikanische Lebensmittelüberwachungs- und Arzneimittelbehörde) besagt, dass derzeit nur circa 38 % der neuartigen pharmazeutischen Wirkstoffe, welche möglicherweise für die Pädiatrie von Nutzen sein könnten, bei der ersten Zulassung laut Herstelleranweisung für Kinder geeignet sind. Folglich stellt in Arztpraxen ungefähr ein Drittel, bei Spezialisten in Krankenhäusern ungefähr zwei Drittel und auf der Intensivstation bis zu 90 % der verordneten Medikamente ein Off-Label Einsatz dar (Tod et al., 2008).

1.2.4 Urinausscheidung und Wachstum

Bestimmt man nach einer Wirkstoffapplikation die im Urin ausgeschiedene Wirkstoffmenge, was eine nicht invasive und einfache Möglichkeit darstellt, kann man, mit vorhandenen Kenntnissen über Urinausscheidungs- und Wirkstoffmetabolisierungsmenge, auf Wirkstoffmengen im Organismus des Kindes zurückschließen.

Die Urinausscheidung von Frühgeborenen schwankt in den ersten Lebenstagen zwischen 50 (Costarino et al., 1992) und 100 (Shaffer and Meade, 1989) ml pro Kilogramm Körpergewicht. Im Jahre 1976 erstellten Babson und Benda eine Wachstumskurve für Frühgeborene, welche sehr häufig auf Intensivstationen der Neonatologie eingesetzt wird. Diese beginnt mit einer Geburt in der 26sten Schwangerschaftswoche und einem Geburtsgewicht von 500 g (Babson and Benda, 1976). Durch Fenton (2003) wurde diese Wachstumskurve weiterentwickelt. Sie beginnt nun bei einer Geburt in der 22sten Schwangerschaftswoche und einem Geburtsgewicht von 500 g.

So lässt sich, je nach Alter und Reifegrad des Kindes, die täglich ausgeschiedene Urinmenge berechnen. Eine gemessene Wirkstoffkonzentration im Urin kann dadurch in eine Gesamtmenge an ausgeschiedenem Wirkstoff umgerechnet werden. Dies ermöglicht wiederum, mit Hilfe von Kenntnissen über den Metabolismus und der Applikationsmenge des Wirkstoffs, eine Vorhersage von Wirkstoffkonzentrationen im Organismus des Kindes.

1.3 Die menschliche Haut

1.3.1 Morphologie

Die Haut ist das größte Organ des Menschen (Trommer and Neubert, 2006) und sehr komplex aufgebaut. Sie weist beispielsweise eine größere Vielfalt an Zelltypen auf, als das Gehirn (Hadgraft, 2001). Bei einem durchschnittlichen Erwachsenen beträgt ihre Oberfläche ungefähr 2 m² (Hwa et al., 2011). Als Grenzfläche des Organismus zu seiner Umwelt bildet sie zum einen eine Schutzbarriere für den menschlichen Körper vor dem Eindringen toxischer Substanzen, Mikroorganismen, Oxidantien und ultravioletter (UV) Strahlung (Harding, 2004; Hwa et al., 2011), zum anderen verhindert sie den Wasser- und Elektrolytverlust des Körpers an die Umwelt. Durch die Regulation des Wasserhaushaltes hält sie die lebensnotwendige Homöostase aufrecht (Neubert and Wepf, 2007). Die Haut ist außerdem ein immunologisch aktiver Sensor, ein Ausscheidungsorgan und sehr wichtig für die Regulierung der Körpertemperatur (Harding, 2004; Hwa et al., 2011).

1.3.1.1 Epidermis, Dermis, subkutanes Fettgewebe

Die Haut, auch Cutis genannt, ist schichtartig aufgebaut. Sie besteht von außen nach innen aus Epidermis und Dermis. Die darunterliegende Subcutis wird, zusammen mit der Haut, auch als äußeres Integument bezeichnet (Abbildung 1.3-1). Die schichtartig angeordneten Keratinozyten der Epidermis, insbesondere die Corneozyten des Stratum corneum, sind dabei hauptsächlich für die Barrierefunktion der Haut verantwortlich. Die Dermis besteht aus Kollagen und elastischen Fasern, welche in einem Gel aus Glykosaminoglykanen eingebettet sind. Sie enthält Kapillar- und Lymphgefäße, Nervenendigungen und Hautanhangsorgane wie Haarfollikel, Talg- und Schweißdrüsen. Das subkutane Fettgewebe dient zur Wärmedämmung und schützenden Polsterung und stellt eine wichtige Energiereserve dar (Hwa et al., 2011).

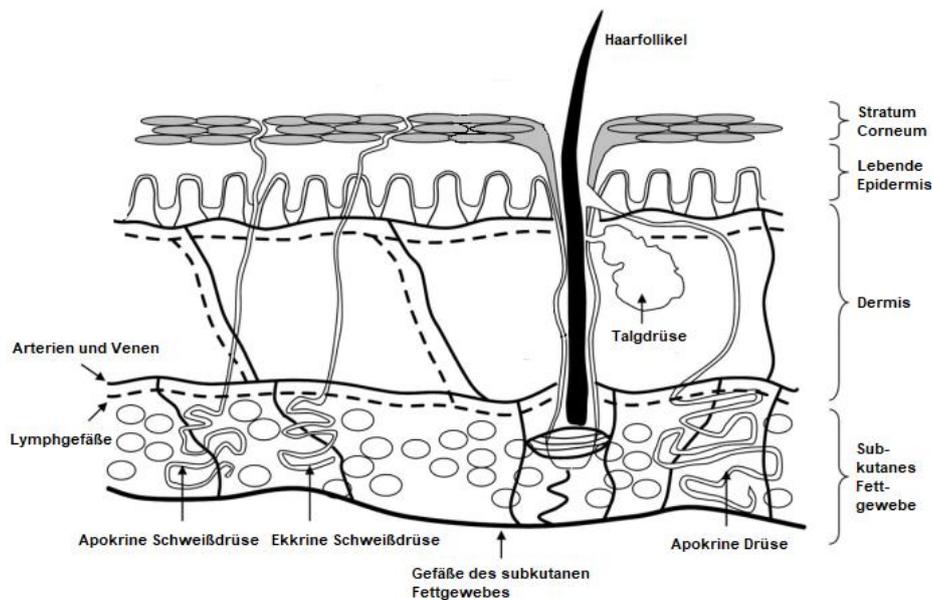


Abbildung 1.3-1: Schematischer Überblick der Hautschichten, Hautanhangsorgane, Blut- und Lymphgefäße, modifiziert nach Jepps et al. (2013).

Die Haut gliedert sich in Epidermis und Dermis. Die darunterliegende Subcutis bildet zusammen mit der Haut das äußere Integument.

Die Epidermis besteht aus schichtartig angeordneten Keratinozyten und gliedert sich, von innen nach außen, in folgende Abschnitte: Stratum basale (SB, Basalschicht), Stratum spinosum (SS, Stachelzellschicht), Stratum granulosum (SG, Körnerzellschicht) und Stratum corneum (SC, Hornschicht) (Abbildung 1.3-2) (Hwa et al., 2011). SB, SS und SG bilden mit einer Dicke von ungefähr 50 bis 100 μm den lebenden Teil der Epidermis, das SC bildet mit einer Dicke von 10 bis 20 μm den nicht lebenden Teil der Epidermis (van Smeden et al., 2014). Proliferierende Keratinozyten aus dem SB migrieren transient in Richtung SC und durchlaufen dabei einen Differenzierungsprozess. In einer Zeitspanne von schätzungsweise 14 Tagen bewegen sie sich so durch die Schichten der Epidermis und bilden schließlich, als terminal ausdifferenzierte, kernlose, abgeflachte Zellen, die sogenannten Corneozyten des SCs. Nach 14 Tagen werden die Corneozyten vom SC abgeschuppt, dieser Vorgang wird auch als Desquamation bezeichnet (Hwa et al., 2011).

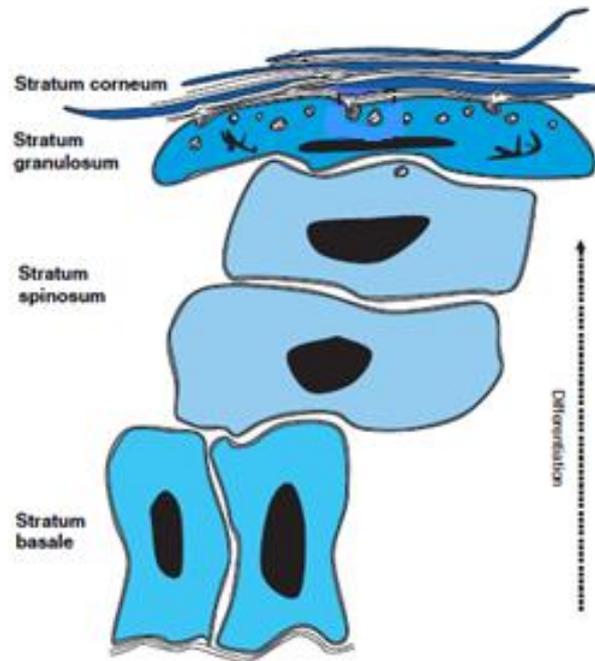


Abbildung 1.3-2: Schematischer Aufbau der Epidermis, nach Proksch et al. (2008).

Die Epidermis besteht aus schichtartig angeordneten Keratinozyten, welche von innen nach außen in die Abschnitte Stratum basale, Stratum spinosum, Stratum granulosum und Stratum corneum gegliedert ist.

Insgesamt beträgt die Zeit, welche die Epidermis benötigt, um sich einmal komplett zu erneuern, 48 Tage. Der Prozess der Zellproliferation der Keratinozyten dauert dabei ungefähr 22, der Prozess der Zelldifferenzierung ungefähr 12 und die Verweildauer der Corneozyten im SC bis zur Dequamation ungefähr 14 Tage (Iizuka, 1994).

Direkt unterhalb der Epidermis befindet sich die Basalmembran, die Lamina basalis. Die enthaltenen Fibrillen reichen bis in die Dermis hinein. Dadurch werden die Hautschichten verankert und stabilisiert (Hwa et al., 2011).

1.3.1.2 Stratum corneum

Die äußerste Schicht der Epidermis, das SC ist je nach anatomischer Region zwischen 10 und 20 μm dick (Hwa et al., 2011) und enthält zwischen 10 und 20 Corneozytenschichten, welche näherungsweise parallel zur Hautoberfläche

angeordnet und in eine Lipidmatrix eingebettet sind (van Smeden et al., 2014). Diese heterogene Struktur des SC wird auch als „Ziegelstein-Mörtel“ Struktur bezeichnet (Michaels et al., 1975b). Die hydrophilen Corneozyten sind dabei wie Ziegelsteine einer Mauer in eine interzelluläre Lipidmatrix, den Mörtel, eingebettet (Elias, 1983; Hwa et al., 2011). Verbunden werden die Corneozyten durch Corneodesmosomen (Hwa et al., 2011). Diese verknüpfen die Corneozyten miteinander und ermöglichen eine Zugfestigkeit und Widerstandsfähigkeit gegen Scherkräfte (Cork et al., 2009) (Abbildung 1.3-3).

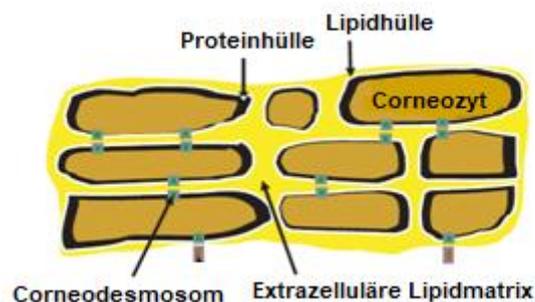


Abbildung 1.3-3: Schematischer Aufbau des Stratum corneums, modifiziert nach Proksch et al. (2008).

Die Corneozyten sind eingebettet in eine interzelluläre Lipidmatrix und über Corneodesmosomen miteinander verbunden.

Die kontinuierliche, interzelluläre Lipidmatrix nimmt ungefähr 20 % des Gesamtvolumens des Stratum corneums ein und besteht hauptsächlich aus Ceramiden, Cholesterol und freien Fettsäuren (Harding, 2004; Hwa et al., 2011). Desweiteren sind noch andere Lipidklassen wie beispielsweise Glucosylceramide, eine Vorläuferverbindung der Ceramide, und Cholesterolsulfate, welche sehr wichtig für den Desquamationsprozess sind, enthalten, jedoch in deutlich geringeren Mengen (Bouwstra et al., 2000). Interessanterweise sind keine Phospholipide enthalten, was sehr untypisch für eine biologische Membran ist (Hadgraft and Lane, 2011). Die Lipide nehmen eine hochgeordnete dreidimensionale Struktur mit dicht gepackten Lipidlamellen ein (van Smeden and Bouwstra, 2016). Die lamellaren Abschnitte verlaufen dabei annähernd parallel zur Oberfläche der Corneozyten (Bouwstra et al., 2000). Je nach Körperregion variieren Lipidzusammensetzung und -gehalt (Marjukka Suhonen et al., 1999). Diese beeinflussen die Barrierefunktion des

Stratum corneums, welche somit nicht alleine von der Anzahl der Corneozytenschichten und deren Dicke abhängig ist (Lampe et al., 1983).

Das SC kann in zwei Bereiche eingeteilt werden. Das innere Stratum compactum bildet die Hauptdiffusionsbarriere des SCs. Im weiter außen gelegenen Stratum disjunctum lösen sich die Corneozyten aus ihrem Verband und werden abgeschilfert (Hwa et al., 2011). Es ist somit eine dynamische Struktur, welche sich ständig selbst erneuert (Hadgraft and Lane, 2011). Die Dicke des SCs wird durch die Proliferationsrate der Keratinozyten im SB und der Abschuppungsrate der Corneozyten im SC beeinflusst (Hwa et al., 2011). Wird dieses empfindliche Gleichgewicht zwischen Abschuppung und Erneuerung gestört, so können Erkrankungen wie Psoriasis oder Ekzeme entstehen (Cork et al., 2009; Hadgraft and Lane, 2011).

Obwohl das SC nur die äußerste, hauchdünne Schicht der Haut darstellt, ist es hauptsächlich für die Barrierefunktion verantwortlich und Grundvoraussetzung für die Überlebensfähigkeit (Harding, 2004). Die Anwesenheit von positiv und negativ geladenen Gruppen der Proteine wie beispielsweise dem Keratin, erschwert geladenen Molekülen das Eindringen durch die Haut (Bartosova and Bajgar, 2012). Die Lipidmatrix hilft einen Wasserverlust an die Umwelt und das Eindringen von wasserlöslichen Substanzen in den Körper zu verhindern (Harding, 2004; Hwa et al., 2011). Es findet nur ein geringer Wasseraustausch mit der Umwelt statt, welcher die Hydratation und Flexibilität des Stratum corneums aufrecht erhält und die Abschuppung der Haut ermöglicht (Harding, 2004). Der geringe Wassergehalt, die an der Oberfläche angelagerten Lipide, der saure pH-Wert und die angesiedelte Mikroflora bedingen die antimikrobielle Barrierefunktion der Haut (Elias, 2007).

1.3.2 Entwicklung

Die Entwicklung der menschlichen Haut im Uterus beginnt bereits im ersten Schwangerschaftstrimenon. Nach ungefähr 24 Schwangerschaftswochen beginnt die Funktionsreifung des keratinisierten SCs. Ein klar ausgebildetes SC ist jedoch erst nach 34 Schwangerschaftswochen sichtbar (Evans and Rutter, 1986; Stamatias et

al., 2011). Die Reifung der Haut ist somit ein schrittweiser Prozess und der Reifungsgrad hängt mit der Schwangerschaftsdauer zusammen.

Bei Frühgeborenen ist die Barrierefunktion der Epidermis nur sehr schwach ausgebildet. Somit kann man bei Kindern, welche vor oder in der 28sten Schwangerschaftswoche geboren werden, einen erhöhten Transepidermalen Wasserverlust (TEWL), also eine erhöhte Permeabilität, beobachten (Stamatas et al., 2011; Wilson and Maibach, 1980). Kinder, die nach 30 bis 32 Schwangerschaftswochen geboren werden, haben bereits eine der Erwachsenenhaut vergleichbare Barrierefunktion (Kalia et al., 1998). Bei termingeborenen Kindern (38 bis 40 Schwangerschaftswochen) ist die Reifung der Epidermis vollständig abgeschlossen. Dennoch ist die Haut bei der Geburt noch nicht gänzlich ausgereift, da die Talg- und Schweißdrüsen noch nicht vollständig ausgebildet sind. Die Barrierefunktion entspricht jedoch weitgehend der von Erwachsenen (Agache et al., 1980; Behrendt and Green, 1969; Stamatas et al., 2011).

Das unzureichend ausgebildete SC bei Frühgeborenen zeigt nach der Geburt eine sehr schnelle Reifung. Bereits nach ungefähr 2 bis 4 Wochen entspricht die Barrierefunktion der Haut von Frühgeborenen der termingerecht geborener Säuglinge, welche eine funktionsfähige Hautbarrierefunktion haben (Harpin and Rutter, 1983; Kalia et al., 1998). Bei Frühgeborenen, die sehr früh, also bereits nach 23 bis 25 Schwangerschaftswochen geboren werden, dauert die vollständig Reifung des SCs deutlich länger, das heißt bis zu 8 Wochen (Kalia et al., 1998). Genaue Verlaufsdaten, welche die täglichen Veränderungen der Barrierefunktion an einem Kind in Abhängigkeit der SC Entwicklung untersuchen, gibt es bisher nicht (Kalia et al., 1998). Harpin und Rutter (1983) haben die perkutane Wirkstoffabsorption von Phenylephrinlösungen bei Neugeborenen im Alter von 25 bis 41 Schwangerschaftswochen untersucht und Messungen des Transepidermalen Wasserverlustes (TEWL) durchgeführt. Nach 37 Schwangerschaftswochen und länger sind keine oder nur sehr geringe Wirkstoffabsorptionen und sehr geringe TEWL-Werte nachweisbar. Die Haut weist somit bereits eine wirksame Barrierefunktion auf. Bei Kindern, die vor oder in der 32sten Schwangerschaftswoche geboren wurden, waren in den ersten Tagen nach der Geburt deutliche Mengen an

absorbiertem Wirkstoff und sehr hohe TEWL-Werte messbar. Die Barrierefunktion der Haut ist bei diesen Kindern somit noch nicht vollständig ausgebildet.

1.3.2.1 Vergleich der Haut von Frühgeborenen, Kindern und Erwachsenen

Die Haut von reifgeborenen Kindern hat fast die gleiche Charakteristik wie die Haut von Erwachsenen. Die Epidermis ist gut ausgebildet, die lebende Epidermis mehrere Zellschichten dick, das SC ist ausgebildet und eine Keratinisierung bereits erkennbar (Barker et al., 1987).

Bei frühgeborenen Kindern jedoch, insbesondere bei Kindern, die vor der 30sten Schwangerschaftswoche geboren werden, besteht die Epidermis nur aus 2 bis 3 Zellschichten, das SC ist nur unzureichend entwickelt, deutlich dünner und zeigt eine qualitativ und quantitativ veränderte Struktur der Lipidzusammensetzung (Barker et al., 1987; Sekkat et al., 2004a). Sie haben deshalb Schwierigkeiten bei der Regulation des Wasserhaushaltes und der Temperaturregulierung. Außerdem können topisch applizierte Substanzen durch die durchlässigere Haut in größerem Umfang permeieren (Barker et al., 1987; Kalia et al., 1998).

Bis zum zweiten Lebensjahr scheint kindliche Haut eine dünnere Epidermis und ein dünneres SC zu haben als die Haut von Erwachsenen. Sie enthält außerdem mehr Wasser und weniger natürliche Feuchthaltefaktoren. Ihre Haut scheint deshalb, trotz vollständiger Barrierefunktion, anfangs noch nicht vollständig ausgereift zu sein. Sie entwickelt sich innerhalb des ersten Lebensjahres noch weiter (Stamatas et al., 2011). Auch Umwelteinflüsse haben Einfluss auf die Reifung der Hornschicht (Sekkat et al., 2004a).

1.3.3 Perkutane Applikation von Wirkstoffen

1.3.3.1 Vorteile

Die perkutane Applikation von Wirkstoffen bringt einige Vorteile mit sich. Aufgrund der sehr leichten Durchführbarkeit erfordert sie kein medizinisches Fachpersonal und

kann oftmals vom Patienten eigenständig durchgeführt werden. Sie ist nichtinvasiv und bereitet keine Schmerzen. Bei der Behandlung von Hautkrankheiten kann die Erkrankung durch eine topische Wirkstoffapplikation direkt am Krankheitsort therapiert werden und das Risiko einer systemischen Absorption und systemisch unerwünschten Wirkungen minimiert werden. Soll eine systemische Therapie erfolgen, kann der Wirkstoff ohne signifikanten First-Pass-Metabolismus in die Blutzirkulation gelangen, da die Haut im Vergleich zur Leber nur eine relativ geringe Kapazität zum enzymatischen Wirkstoffabbau aufweist (Hwa et al., 2011). Zudem ist die Applikationsfläche auf der Haut meist relativ klein und die Metabolisierung von Wirkstoffen deshalb häufig nur von geringer Bedeutung (Bartosova and Bajgar, 2012). Durch die kontinuierliche transdermale Applikation können Peakspitzen und –täler der Wirkstoffkonzentration im Blut verringert werden, was das Risiko unerwünschter Wirkungen reduziert (Hwa et al., 2011).

1.3.3.2 Arzneistofftransport durch die Haut

Die perkutane Absorption eines Wirkstoffs beschreibt dessen Passage durch die Haut. Dieser Prozess kann in drei Schritte untergliedert werden. Die **Penetration** beschreibt den Eintritt einer Substanz in eine bestimmte Schicht oder Struktur der Haut, wie beispielsweise den Eintritt in das SC. Die **Permeation** beschreibt die Passage durch eine Schicht in eine strukturell und funktionell andere Schicht. Die **Absorption** beschreibt die Aufnahme einer Substanz nach dem Durchdringen der Haut in das vaskuläre System, also in Blutgefäße, welches als zentrales Kompartiment agiert (Bartosova and Bajgar, 2012).

Wird eine therapeutisch wirksame Substanz in einer Formulierung auf die Haut aufgebracht, so ist ihr Transport in eine bestimmte Hautschicht oder, je nach Wirkort, in die systemische Zirkulation ein sehr vielschichtiger Prozess. Der gelöste Anteil des Wirkstoffs muss sich aus der Formulierung in die äußerste Hautschicht, das SC, verteilen. Nach der Diffusion durch das SC erfolgt die Verteilung in den lebenden, hydrophilen Teil der Epidermis. Nach der Diffusion durch die lebende Epidermis und die Verteilung in die Dermis erfolgt die Aufnahme in das lokale Kapillarnetzwerk und in die systemische Zirkulation (Kalia and Guy, 2001). Dieser Prozess der

wiederholten Verteilung und Diffusion begründet die Undurchlässigkeit der Haut (Hadgraft, 2001).

Die Permeation durch die Haut ist ein passiver Diffusionsprozess (Hwa et al., 2011). Für die Durchquerung der Epidermis gibt es unterschiedliche Möglichkeiten, entweder transepidermal (interzellulär, corneodesmosomal, transzellulär) oder entlang von Hautanhangsgebilden (transglandulär, transfollikulär) (Hwa et al., 2011; Teichmann et al., 2005). Die unterschiedlichen Wege zur Durchquerung der Epidermis sind in der nachfolgenden Abbildung 1.3-4 schematisch dargestellt.

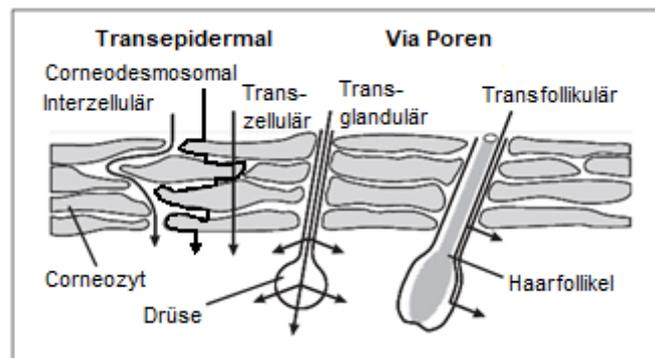


Abbildung 1.3-4: Schematische Darstellung unterschiedliche Wege der Wirkstoffpenetration durch das Stratum corneum, modifiziert nach Trommer und Neubert (2006).

Die Epidermis kann transepidermal, hierbei wird zwischen dem interzellulären, corneodesmosomalen und transzellulären Weg unterschieden, oder entlang von Hautanhangsgebilden, hierbei wird zwischen dem transglandulären und transfollikulären Weg unterschieden, durchquert werden.

Der **transzelluläre** Weg ist der direkteste Weg durch die Haut. Der Wirkstoff durchwandert abwechselnd die mit Keratin gepackten hydrophilen Corneozyten und die hydrophobe Lipidmatrix (Bartosova and Bajgar, 2012). Dieser Weg scheint jedoch aufgrund des häufigen Wechsels für die meisten Arzneistoffe von eher geringer Bedeutung zu sein.

Wahrscheinlicher ist es, dass hydrophile Wirkstoffe **corneodesmosomal** entlang der Proteinhüllen der Corneozyten über die Corneodesmosomen, den Verbindungsstellen zwischen den Corneozyten, entlangwandern (Neubert and Wepf, 2007).

Der **interzelluläre** Transport beschreibt den Weg durch die lipidreichen extrazellulären Regionen, um die Corneozyten herum. Dieser Weg wird vor allem von lipophilen Substanzen bevorzugt (Bartosova and Bajgar, 2012).

Außerdem kann ein Transport entlang der Hautanhangsorgane erfolgen. Der **transfollikuläre** Weg beschreibt den Transport entlang von Haarfollikeln, der **transglanduläre** Weg den Transport entlang von Schweißdrüsen. Da die relative Oberfläche der Hautanhangsorgane nur ungefähr 0,1 – 1,0 % der Gesamtoberfläche der Haut einnimmt, scheint diesen Wegen bei der Wirkstoffdiffusion durch die Haut nur eine geringe Bedeutung zuzukommen (Hwa et al., 2011; Teichmann et al., 2005). Bartosova und Bajgar (2012) konnten zeigen, dass der Anteil dieser Hautanhangsorgane in bestimmten Körperregionen, wie beispielsweise auf dem Rücken, jedoch deutlich größer sein kann. Hier scheint vor allem die Passage entlang von Haarfollikeln insbesondere für lipophile Substanzen eine deutlich größere Rolle zu spielen, als bisher angenommen. Um die Bedeutung des follikulären Penetrationsprozesses vollständig zu verstehen können, benötigt man für jede Körperregion spezifische Informationen über das Volumen und die Oberfläche der vorhandenen Haarfollikel (Otberg et al., 2004).

Für die meisten topisch applizierten Substanzen ist die Passage des SCs der geschwindigkeitsbestimmende Schritt für die Permeation durch die menschliche Haut (Kalia et al., 1996), was größtenteils durch dessen einzigartige Morphologie verursacht wird (Potts and Francoeur, 1991). Somit wird die Wirkstoffkonzentration der meisten topisch applizierten Substanzen innerhalb des SCs direkt mit der Wirkstoffkonzentration in Epidermis und Dermis korrelieren (Kalia et al., 2000). Hat eine Substanz das SC durchquert, so muss sie die restlichen Schichten der Epidermis überwinden, diese stellen jedoch nur wenig Widerstand dar (Hwa et al., 2011). Zwischen den gebündelten Kollagenfasern der Dermis befinden sich relativ große Lücken, was eine leichte Diffusion von Wirkstoffmolekülen ermöglicht. Der vaskuläre Plexus und die lymphatischen Gefäße der Dermis sind Wirkort für Substanzen der systemischen Applikation (Hwa et al., 2011).

Die transepidermale Permeation durch die Haut ist ein passiver Diffusionsprozess. Die Molekülgröße stellt deshalb ein limitierender Faktor dar. Ein Molekulargewicht von 500 Dalton scheint hierbei die Obergrenze zu sein (Bos and Meinardi, 2000).

1.3.3.3 Einflussfaktoren auf die perkutane Absorption

Die topische Administration eines Wirkstoffs wird gesteuert durch die anatomischen Eigenschaften der Haut wie Hauttypus und aktueller Hautzustand, physiochemische Eigenschaften des Wirkstoffs wie Lipophilie, Partikelgröße und Proteinbindungskapazität und Eigenschaften der Formulierung wie Vehikelkomposition und rheologische Eigenschaften (Trommer and Neubert, 2006).

Durch eine Okklusion der Haut kann die Evaporation flüchtiger Bestandteile von der Hautoberfläche begrenzt werden. Zudem wird die Hydratation des SCs erhöht. Beide Faktoren können zu erhöhten Absorptionsraten führen (Bartosova and Bajgar, 2012).

Die Penetration eines Wirkstoffs kann durch den Zusatz von Penetrationsverstärkern wie beispielsweise Sulfoxide, Azone, Pyrrolidone oder Alkohole in die transdermale Formulierung erhöht werden (Williams and Barry, 2004). Penetrationsverstärker sind pharmakologisch inaktive, chemische Komponenten, welche nach einer Verteilung im SC mit diesem interagieren und den Hautwiderstand für die Diffusion der Wirkstoffmoleküle herabsetzen. Außerdem können sie die thermodynamische Aktivität eines Wirkstoffs erhöhen, was ebenfalls zu erhöhten Absorptionsraten führt (Marjukka Suhonen et al., 1999; Williams and Barry, 2004).

Weitere Möglichkeiten zur Verstärkung der Penetration sind chemische Modifikationen am Wirkstoff, beispielsweise die Verwendung eines leichter permeablen Prodrugs, welcher erst am Wirkort in seine wirksame Form überführt wird oder die Verwendung elektrischer Hilfsmittel wie beispielsweise Iontophorese und Elektroporation (Marjukka Suhonen et al., 1999).

1.3.3.4 Barrierefunktion

Als Indikator für die Barriereigenschaften der Haut wird die Permeation von Wasser angesehen. Eine intakte Hautbarriere schützt vor extensivem Wasserverlust, bei einer Beeinträchtigung steigt jedoch der TEWL an (Hadgraft and Lane, 2011). Eine Objektivierung der Barrierefunktion der Haut kann beispielsweise durch die Messung des transepidermalen Wasserverlustes mittels geeigneter Geräte erfolgen (Kresken

et al., 2009). TEWL Messungen sind deshalb eine einfache und geeignete Möglichkeit, um die Barrierefunktion der Haut zu bewerten und Variationen feststellen zu können (Fluhr et al., 2006).

Wie im Abschnitt 1.3.2 bereits erläutert, wird die Barrierefunktion der Haut durch das Alter beeinflusst. Frühgeborene haben bei der Geburt eine noch unreife Haut und somit nur eine eingeschränkte Barrierefunktion (Hwa et al., 2011). Resultierende Auswirkungen sind eine veränderte Temperaturkontrolle, ein verändertes Flüssigkeitsgleichgewicht, ein reduzierter Schutz vor Mikroorganismen, eine verzögerte Wundheilung und eine erhöhte Absorption topisch applizierter Wirkstoffe. Hierbei ist insbesondere das erhöhte Risiko einer systemischen Toxizität zu berücksichtigen, da neben erhöhten Absorptionsraten noch ein erhöhtes Oberflächen-Gewichts Verhältnis von 13 % im Vergleich zu 5 % bei Erwachsenen hinzukommt (Hwa et al., 2011). Nach der Geburt dauert es ungefähr 2 bis 4 Wochen oder länger, bis ein vollständig funktionsfähiges SC ausgebildet ist (Evans and Rutter, 1986; Kalia et al., 1998). Dabei ändert sich der pH-Wert der Haut von schwach alkalisch oder neutral (6,2 – 7,5) zu leicht sauer (5,0 – 5,5), wie er üblicherweise bei Kindern und Erwachsenen mit gesunder Haut ist (Hwa et al., 2011). Beim Heranwachsen vergrößert sich die Hautoberfläche ungefähr um das 7fache. Dieser Entwicklungsprozess beeinflusst die Hautbarrierefunktion jedoch nicht, da die Dicke des SCs, also die Anzahl der Zellschichten und die Lipidzusammensetzung nicht beeinflusst werden (Hwa et al., 2011).

Anatomische Regionen der Körperoberfläche zeigen Variationen in Dicke und Lipidgehalt des SCs, der Dichte von Hautanhangsorganen wie Haarfollikel und der Blutperfusion. Die Barrierefunktionen der Haut können sich deshalb lokal unterscheiden (Hwa et al., 2011).

1.4 Hautmodelle

1.4.1 Menschliche Modelle versus tierische Modelle

Die beste Art und Weise, um Kenntnisse über perkutane Permeations- und Absorptionsprozesse des Menschen zu gewinnen, ist die Durchführung einer *in vivo* Studie am Menschen. Dies ist jedoch sehr streng durch sehr viele Regularien und Vorschriften geregelt und die Durchführung erweist sich als sehr komplex und schwierig (Jung and Maibach, 2015).

Häufig werden deshalb tierische Studien zur Bestimmung perkutaner Absorptionsraten durchgeführt. Hierbei gibt es weniger Regularien, die eingehalten werden müssen. Außerdem gibt es bei durch Inzucht gezüchteten Tieren weniger interindividuelle Abweichungen und man erhält eine größere Anzahl an auswertbaren Daten, nicht nur bezüglich Penetration und Absorption, sondern auch in Hinblick auf die Toxikologie. Berücksichtigt werden muss hierbei jedoch, dass jedes Tiermodell unterschiedliche Vorteile, Schwächen und Grenzen aufweist (Jung and Maibach, 2015).

Bei der Auswahl des Tieres sollte die Physiologie, Biochemie und Anatomie ähnlich der des Menschen sein, um für den Menschen vorhersagbare Daten zu erhalten (Simon and Maibach, 2000). Die am häufigsten eingesetzten Tiere solcher Tiermodelle sind Affe, Schwein, Ratte, Hase, Meerschweinchen, haarlose Nager wie beispielsweise haarlose Ratten, Mäuse oder Meerschweinchen sowie haarlose Hunde. Es hat sich gezeigt, dass Affe, Schwein und haarloses Meerschweinchen eine stärkere Vorhersagekraft der menschlichen Absorption und Penetration aufweisen als die anderen Modelle, die üblicherweise die menschliche Absorption und Penetration überschätzen (Jung and Maibach, 2015).

1.4.2 *In vivo* Modelle versus *in vitro* Modelle

Eine Alternative zu *in vivo* Hautmodellen stellen *in vitro* Modelle dar. Hierbei muss jedoch beachtet werden, dass es sich nicht um intakte physiologische und metabolische Systeme handelt und die Gewebeverwendbarkeit begrenzt ist.

Dennoch bieten diese Systeme auch einige Vorteile. Sie sparen nicht nur Zeit, Kosten und Platz, sondern liefern auch besser reproduzierbare Ergebnisse, da der Versuchsaufbau einfacher ist (Jung and Maibach, 2015; Simon and Maibach, 2000). Es können außerdem mehrere Replikationsmessungen mit der Haut des gleichen Spenders durchgeführt werden (Bartosova and Bajgar, 2012) und die Anzahl benötigter Probanden beziehungsweise notwendiger Versuchstiere kann dadurch reduziert werden (Jung and Maibach, 2015). Der Versuchsablauf kann mit menschlicher oder tierischer Haut unter denselben Bedingungen durchgeführt werden (Simon and Maibach, 2000).

Bei der Durchführung von *in vitro* Studien mit menschlicher Haut stellt die Verfügbarkeit von geeigneten menschlichen Gewebeproben eine Herausforderung dar. Die kommerziell erwerblichen rekonstruierten menschlichen Epidermismodelle EpiSkin, SkinEthic und EpiDerm zeigen hinsichtlich Morphologie, Lipidzusammensetzung und biochemischen Markern sehr gute Vergleichbarkeit zu natürlichem menschlichem Gewebe. Dennoch scheint ihre Barrierefunktion deutlich weniger ausgeprägt zu sein, als die der natürlichen menschlichen Haut von Erwachsenen (Netzlaff et al., 2005). Die Verwendung tierischer Haut bietet deshalb eine geeignete und häufig verwendete Alternative (Jung and Maibach, 2015).

1.4.3 *In vitro* Modelle

1.4.3.1 *Regularien*

In den letzten Jahren wurden sehr viele Richtlinien für *in vitro* Modelle verabschiedet (EMA, 2014; FDA, 1997; OECD, 2004). Auch in der United States Pharmacopeia (USP) sind Vorgaben für die Durchführung von *in vitro* Versuchen zu finden. Diese konnten bereits eine signifikante Verbesserung in der Standardisierung von *in vitro* Testsystemen und der Vergleichbarkeit von Daten unterschiedlicher Studien erzielen. Dennoch gibt es bisher noch keinen hohen Grad der Standardisierung in Hinblick auf die Art der Haut (frisch/tot, Spezies), der Präparation der Hautprobe (vollständige/dermatomisierte Haut/epidermale Membranen), dem Typus der Diffusionszelle (statisch/Durchfluss) und dem Rezeptorfluid (Jung and Maibach, 2015; van de Sandt et al., 2004).

1.4.3.2 *Diffusionszelle*

Die Richtlinie 428 der OECD (Organisation for Economic Co-Operation and Development) regelt die Durchführung von *in vitro* Methoden zur Bewertung und Abschätzung der perkutanen Absorption im Menschen. Hierbei wird die Wirkstoffdiffusion durch eine Hautprobe in ein Fluidreservoir bestimmt. Alle Abweichungen von der vorgeschriebenen Versuchsdurchführung sollten wissenschaftlich begründet und dokumentiert werden (Bartosova and Bajgar, 2012; OECD, 2004). Bei den Versuchen kann die Haut vom Körper entfernt werden, da die prinzipielle Hautbarriere das nicht lebende SC ist. Um die Diffusionsrate zu bestimmen, kann nicht lebende Haut verwendet werden. Sollen Informationen über den Hautmetabolismus und die Diffusion erzielt werden, muss metabolisch aktive Haut eingesetzt werden. Dabei ist sowohl menschliche Haut als auch Haut von Säugetieren ist geeignet. Die Haut wird in eine Diffusionskammer eingebracht, welche sie in zwei Kammern, das Donor- und das Akzeptorkompartiment, teilt. Auf die Hautoberfläche, welche sich auf der Seite des Donorkompartiments befindet, wird die Testsubstanz aufgebracht und verbleibt für eine bestimmte Zeit auf der Haut,

bevor sie durch einen geeigneten Reinigungsschritt gegebenenfalls wieder entfernt wird. Die Hautunterseite steht in Kontakt mit dem Rezeptorfluid des Rezeptorkompartiments, welches während dem Versuch stets gut durchmischt wird, beispielsweise durch ein Magnetrührstäbchen. Aus dem Rezeptorkompartiment werden zu bestimmten Zeitpunkten über einen Probenzugsarm Proben gezogen und analysiert. Die Zelle und ihre Bestandteile sollten temperierbar sein und der normalen Hauttemperatur von $32 \pm 1^\circ\text{C}$ entsprechen (OECD, 2004).

Die am häufigsten verwendete Diffusionszelle ist die von Franz (1975) entwickelte Franz-Diffusionszelle (EMA, 2014) (Abbildung 1.4-1). Franz (1975) konnte in einer Vergleichsstudie eine gute Korrelation zwischen der perkutanen Absorption unterschiedlicher Wirkstoffe *in vivo* im Menschen und ihrer *in vitro* Permeabilität durch exzidierte menschliche Haut in einer Franz-Diffusionszelle nachweisen. Die Verwendung einer solchen Franz-Diffusionszelle entspricht dem aktuellen Stand von Wissenschaft und Technik (EMA, 2014; FDA, 1997; OECD, 2004).

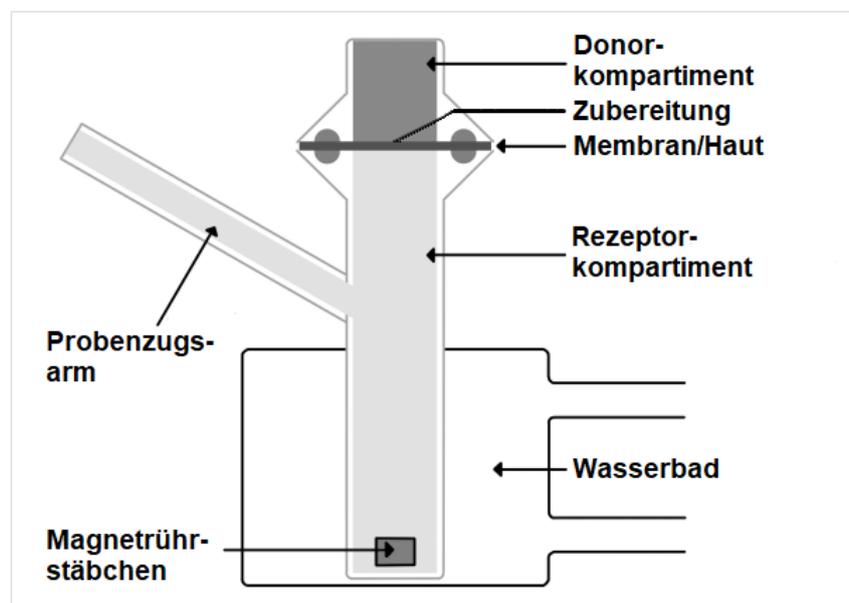


Abbildung 1.4-1: Franz-Diffusionszelle, modifiziert nach Bartosova und Bajgar (2012).

Die Franz-Diffusionszelle gliedert sich in ein Donor- und ein Akzeptorkompartiment. Durch den Probenzugsarm kann die Probe entommen werden. Die Temperierung erfolgt über ein Wasserbad.

Um Okklusionsbedingungen zu simulieren, kann das Donorkompartiment kann mit Hilfe eines Parafilms verschlossen werden.

Das Rezeptorfluid sollte einen physiologischen pH Wert und eine geeignete Lösungskapazität für die Testsubstanz aufweisen. Bei Langzeitmessungen können geeignete Konservierungsmittel zugesetzt werden (Bartosova and Bajgar, 2012).

Während der gesamten Permeationsstudie müssen Sink-Bedingungen vorliegen. Akzeptable Sink-Bedingungen liegen dann vor, wenn die Maximalkonzentration der aktiven Substanz im Rezeptorkompartiment 10-30 % der Sättigungslöslichkeit nicht überschreitet. Dies kann bei der Verwendung von statischen Diffusionszellen durch permanentes Austauschen des Rezeptorfluids oder durch die Verwendung von Durchflusszellen sichergestellt werden. (EMA, 2014)

Bei vergleichenden Untersuchungen, beispielsweise beim Vergleich unterschiedlicher Formulierungen, sollten die Zubereitungen mit dem gleichen Hauttyp verglichen werden (EMA, 2014).

1.4.3.3 Postaurikulare Schweinehaut

Die Verwendung von Schweinen für *in vivo* und *in vitro* Studien der menschlichen Hautabsorption sind weit verbreitete Methoden in der Wissenschaft (Simon and Maibach, 2000) und geeignete Modelle menschlicher Haut (Jung and Maibach, 2015; Lademann et al., 2009). Häufig wird die Schweinehaut aus den Ohren der Tiere gewonnen. Diese entstehen als Beiprodukt der normalen Verwertung von Schlachttieren. Auch ethisch betrachtet ist dies als durchaus positiv zu betrachten, da hierdurch auch die Ohren der Tiere noch Verwendung finden.

Für *in vitro* Versuche wird üblicherweise die dorsale Seite des Schweineohrs verwendet. Diese zeigt hinsichtlich Aufbau und Dicke der unterschiedlichen Hautschichten und follikulärer Struktur am meisten Übereinstimmungen mit menschlicher Haut (Jacobi et al., 2007). So weist die Haut von Schweineohren durchschnittlich 20 Haare pro cm² und die menschliche Haut durchschnittlich 14-32 Haare pro cm² auf (Capt et al., 2007; Jung and Maibach, 2015). Auch das

histologische Erscheinungsbild der menschlichen Haut ist der des Schweines sehr ähnlich (Dick and Scott, 1992; Jacobi et al., 2007). Die Dicke der unterschiedlichen Zellschichten, die Verknüpfung zwischen Epidermis und Dermis und die Anzahl, Größe und Verteilung der dermalen Blutgefäße zeigen bemerkenswerte Ähnlichkeiten und die Architektur der Kollagenfasern der Dermis ist vergleichbar. Auch die Zeitspanne der Gewebeerneuerung und die Lipidzusammensetzung sind annähernd gleich (Gray and Yardley, 1975; Jung and Maibach, 2015; Simon and Maibach, 2000).

Allerdings müssen auch Unterschiede zwischen Schweinehaut und menschlicher Haut berücksichtigt werden. Die Vaskularisierung der menschlichen Haut ist deutlich stärker ausgeprägt als beim Schwein. Während der Mensch hauptsächlich ekkrine Schweißdrüsen besitzt, findet man beim Schwein vermehrt apokrine Drüsen (Simon and Maibach, 2000). Durch den größeren Fettanteil des Schweines reichern sich lipidlösliche Stoffe verstärkt im Fettbereich an (Jung and Maibach, 2015). Die interindividuelle Variabilität der Schweinehaut ist geringer als bei menschlicher Haut (Barbero and Frasch, 2009; Jung and Maibach, 2015).

Es können drei Arten von Hautmembranen für *in vitro* Studien verwendet werden. Epidermale Membranen werden durch Hitzeseparation, chemischer oder enzymatischer Präparation gewonnen. Spalthaut kann mit einem Dermatome gewonnen werden, Vollhaut ist ebenfalls geeignet. Je nach Versuchsaufbau muss eine geeignete Hautprobe ausgewählt werden. Epidermale Membranen sind beispielsweise sehr fragil und für einige Techniken wie die Klebebandabrisstechnik nicht geeignet (Bartosova and Bajgar, 2012).

In der Praxis ist es nicht immer möglich, die Haut unmittelbar nach Erhalt für Absorptionsstudien zu verwenden. Da die perkutane Permeation einen passiven Diffusionsprozess darstellt, muss die für *in vitro* Experimente verwendete Haut jedoch nicht zwingend lebend sein. Wird allerdings der Hautmetabolismus einer Substanz untersucht, so sollte die Haut bei der Verwendung so frisch wie möglich sein und ihre Viabilität über die Versuchsdauer hinweg aufrecht erhalten werden (Bartosova and Bajgar, 2012). Werden Hautproben für die Lagerung eingefroren, so ist es empfehlenswert, subkutanes Fettgewebe vorherzu entfernen, da dies die spätere Handhabbarkeit erleichtert (Bartosova and Bajgar, 2012). Harrison et al.

(1984) konnten in einer Studie nachweisen, dass die Permeabilität von Hautproben nach Einfrieren bei -20 °C über mehrere Monate hinweg im Vergleich zur Permeabilität frischer Hautproben keine signifikanten Unterschiede bei menschlicher oder tierischer Haut zeigt (Bartosova and Bajgar, 2012). Ein erneutes Einfrieren einer aufgetauten Probe ist nicht ratsam, da dies die Permeabilität erhöhen kann (Swarbrick et al., 1982). Um den Einfluss der interindividuellen Variabilität zu reduzieren, sollte bei vergleichenden Studien die Haut desselben Schweins verwendet werden und die Präparation durch die gleiche Person durchgeführt werden.

Bei der Versuchsdurchführung sollte die Haut bereits 10 bis 30 Minuten vor der Wirkstoffapplikation mit dem Rezeptorfluid in Kontakt stehen, um einen Gleichgewichtszustand zu erreichen (Bartosova and Bajgar, 2012). Das Dosisregime kann auf zwei unterschiedliche Arten durchgeführt werden. Bei einer infiniten Dosierung verbleibt die Wirkstoffmenge beziehungsweise –konzentration auf der Haut annähernd konstant, da im Vergleich zu einer beim Patienten üblichen Applikationsmenge ein Überschuss an Formulierung aufgebracht wird. Hiermit können kinetische Parameter wie Wirkstoffflux, Permeabilitätskoeffizienten und Diffusionskoeffizienten bestimmt werden. Bei einer finiten Dosierung wird eine für die Therapie übliche Menge an wirkstoffhaltiger Zubereitung aufgebracht. Die Wirkstoffkonzentration sinkt also im Laufe der Zeit, wenn eine Hautabsorption eintritt. Hiermit kann eine Wirkstoffapplikation unter realen Bedingungen simuliert werden (Bartosova and Bajgar, 2012). Auch die Metamorphose des Vehikels, also die Veränderung der ursprünglichen Arzneiform auf der Hautoberfläche, beispielsweise durch Abdunstung flüssiger Bestandteile, wird hierbei berücksichtigt. Eine Okklusion kann ebenfalls, beispielsweise durch die Verwendung von Parafilm, simuliert werden. Bei einer Versuchsdauer über 24 Stunden sollte die Integrität der Membran streng kontrolliert werden, da diese mit der Zeit verderben oder zerstört werden kann (Bartosova and Bajgar, 2012).

1.4.4 Hautmodelle von Frühgeborenen

Aus ethischen und Sicherheitsgründen ist es nicht möglich, die Permeabilität unterschiedlicher Wirkstoffe bei Frühgeborenen *in vivo* zu untersuchen. Für ein *in vitro* Modell mit exzidiierter Haut von Frühgeborenen unterschiedlichen Geburtsalters und unterschiedlichen Alters nach der Geburt ist keine signifikante Menge an Haut verfügbar. Bereits im Jahre 1987 hatten jedoch Barker et al. (1987) die Idee, dass die Haut von Frühgeborenen der Haut von Erwachsenen nach Klebebandabriss ähnelt. Durch schrittweise Abtragung eines intakten SCs durch Klebebandabriss kann somit eine Hautbarrierefunktion unterschiedlicher Reifegrade und Durchlässigkeit generiert werden (Sekkat et al., 2004b). In ähnlicher Weise führt eine kürzere Schwangerschaftsdauer zu weniger funktionsfähigen Schichten des SCs. Eine unterschiedlich starke Beeinträchtigung des SCs durch Klebebandabriss an der Haut von Schweineohren kann deshalb als Modell für die Hautbarriere unterschiedlicher Reifegrade von Frühgeborenen dienen (Sekkat et al., 2002). Sekkat et al. (2004a) konnten so ein *in vitro* Modell für die Haut von Frühgeborenen entwickeln. Sie erstellten einen Zusammenhang zwischen TEWL Messungen und durchschnittlicher SC Dicke. Durch die Vorhersage der Permeabilität unreifer Haut in Abhängigkeit des Geburtsalters und der Lebenszeit könnte die Rate der Wirkstofffreisetzung eines transdermalen Systems an das Geburtsalter und das Alter des Freigeboeren nach der Geburt angepasst werden (Sekkat et al., 2004b).

1.4.4.1 Klebebandabrisstechnik

Bei der Klebebandabrisstechnik wird ein Klebebandabschnitt auf die Haut aufgeklebt und durch anschließendes Abziehen eine gewisse Menge an SC entfernt. Die Abzugsrichtung der Klebebandabschnitte wird nach jedem Abriss variiert, was eine relativ gleichmäßige Abtragung des SCs ermöglicht (Weigand and Gaylor, 1973).

Die Menge an SC, welche durch einen Klebebandabriss entfernt wird, hängt dabei von dem verwendeten Klebeband, der Kraft, welche bei der Entfernung des Klebebands aufgewendet wird, der anatomischen Region und dem Zustand der Haut ab (Forster et al., 2011; Lademann et al., 2009).

Kalia et al. (2000) konnten in einer Studie zeigen, dass die Anzahl der Klebebandabrisse jedoch nicht mit der abgetragenen Menge an SC korreliert. Außerdem zeigte die Entfernung der gleichen Menge SC bei unterschiedlichen Individuen nicht die gleiche Auswirkung auf die Barrierefunktion der Haut, welche durch TEWL Messungen charakterisiert wurden. So führte beispielsweise die Entfernung von 8 μm SC bei einem Probanden zu einem 10fachen Anstieg des TEWL-Wertes im Vergleich zum Basalwert, während sie bei einem anderen Probanden nur zu einem 2fachen Anstieg führte. Eine definierte Anzahl an Klebebandabrissen entfernt folglich weder die gleiche Menge an SC in unterschiedlichen Individuen, noch führt sie zu einer gleichen prozentualen Abnahme der gesamten Barrierefunktion.

Die Dicke des SCs bei gesunden Erwachsenen an gleichen Körperstellen zeigt deutliche Unterschiede, dennoch ist die Barrierefunktion der Haut relativ konstant. Individuen mit einem sehr dünnen SC scheinen deshalb mehr Barrierefunktion in weniger Gewebe „zu packen“ (Kalia et al., 2000). Eine Studie von Kalia et al. (2000) bestimmte die absolute Dicke von intaktem SC am ventralen Unterarm von 13 Probanden. Diese schwankte zwischen 5 und 20 μm . Das Abtragen des gleichen prozentualen Anteils an SC führte bei allen Probanden zu einer äquivalenten Abnahme der Barrierefunktion. Wie diese Effektivität zustande kommt, ist bisher nicht bekannt (Kalia et al., 2000).

Außerdem konnten Kalia et al. (2000) zeigen, dass das Entfernen der ersten Klebebandabschnitte proportional geringere Auswirkungen auf den TEWL hatte, als die Entfernung der darunter liegenden Schichten. Erst nach der Entfernung von 6 bis 8 μm SC konnte ein steilerer Anstieg des TEWL Wertes beobachtet werden. Die unteren Schichten des SCs, das Stratum compactum, scheinen deshalb stärkeren Einfluss auf die Barrierefunktion zu haben als die äußeren Schichten, das Stratum disjunctum.

1.4.4.2 Histologie zur Untersuchung der Dicke des Stratum corneums

Das SC besteht aus abgeflachten, keratinhaltigen Corneozyten, welche in eine Lipidmatrix eingebettet sind und deren Dicke üblicherweise unterhalb eines Mikrometers liegt. Die Dicke der Corneozytenschichten liegt somit sehr nahe am Auflösungslimit eines Lichtmikroskops, was die Zählung der vorhandenen Zellschichten nahezu unmöglich macht (Christophers and Kligman, 1964). Die von Christophers und Kligman (1964) entwickelte Methodik, welche die Tatsache ausnützt, dass Corneozyten in einer alkalischen Lösung sehr stark quellen, bietet jedoch eine sehr einfache Möglichkeit, die Zellschichten des SCs unter dem Lichtmikroskop zu zählen.

In der vorliegenden Arbeit wurde eine von Zhang und Lunter (2018) entwickelte, abgewandelte Methodik verwendet, um die vorhandenen Zellschichten des SCs auf einer Probe von dermatomierter Schweineohrhaut nach einer definierten Anzahl an Klebebandabrissen lichtmikroskopisch zu zählen. Hierfür wurden die interzellulären Bereiche mit dem Farbstoff Safranin rötlich angefärbt und die Zellen des SCs mit einer alkalischen Kaliumhydroxidlösung aufgeschwellt. Dies ermöglichte die einfache Zählung der vorhandenen SC Schichten nach definierter Anzahl an Klebebandabrissen.

1.4.4.3 Konfokale Raman-Mikroskopie zur Untersuchung der Dicke des Stratum corneums

Die Konfokale Raman-Spektroskopie ist eine Methodik, deren Anwendung sich in den letzten Jahren immer weiter ausgebreitet hat (Nafie, 2012). Sie kombiniert die optische Mikroskopie mit der konfokalen Raman-Spektroskopie (Heck, 2017). Wurden im Jahr 2002 noch 2186 Publikationen zur Raman-Spektroskopie veröffentlicht, so hat sich deren Anzahl im Jahr 2011 mit 5763 veröffentlichten Publikationen bereits nahezu verdreifacht. Dies liegt zum einen an der eindrucksvollen Entwicklung bei der Raman-Instrumentierung und der Auswertung von Spektren, zum anderen an dem sehr breiten Einsatzgebiet wie beispielsweise in

der Pharmazeutischen Industrie oder in der Medizin bei der Diagnostik von Krankheiten (Nafie, 2012).

Entdeckt wurde die Raman-Streuung von C. V. Raman bereits im Jahr 1928 (Raman and Krishnan, 1928). Heute hat sie sich zu einer der sensitivsten und empfindlichsten Techniken entwickelt, um Fragestellungen auf molekularer Ebene für ein nahezu unbegrenztes Spektrum an Proben zu beantworten (Nafie, 2012).

Die Konfokale Raman-Mikroskopie bietet auch eine nicht-invasive Möglichkeit zur Untersuchung der Dermato-Pharmakokinetik von topisch applizierten Wirkstoffen (Mateus et al., 2013) und erlaubt eine Marker-freie, nicht zerstörende Detektion von Substanzen in der menschlichen Haut (Franzen and Windbergs, 2014). Sie ermöglicht eine dreidimensionale Bildgebung mit sehr hoher räumlich-zeitlicher Auflösung (Saar et al., 2011). Somit können wichtige Informationen zur Penetration und Permeation von Wirkstoffen gewonnen werden (Lunter and Daniels, 2014). Innerhalb von einigen Sekunden bis Minuten, also innerhalb sehr kurzer Zeit, können Hautproben ohne die Notwendigkeit einer aufwendigen Probenvorbereitung direkt in 3 Dimensionen vermessen und untersucht werden (Zhang and Lunter, 2018).

Die konfokale Raman-Spektroskopie ist, ähnlich wie die Infrarot-Spektroskopie, eine Schwingungsspektroskopie, basiert jedoch auf unelastischer Lichtstreuung und nicht auf Lichtabsorption. Bei einer Raman-Messung wird die zu untersuchende Probe mit monochromatischem Laserlicht angeregt. Interaktionen der einfallenden Photonen mit den Molekülen der Probe führen zu einer Streuung des Lichts. Eine genau definierte Energiemenge wird dabei von einem Photon auf ein Molekül übertragen, welches in einen bestimmten Schwingungszustand versetzt wird (Caspers et al., 2001). Ein höheres Energieniveau als der Grundzustand wird als Stokes-, ein niedrigeres Energieniveau als der Grundzustand als Anti-Stokes-Streuung bezeichnet. Beides beschreibt den sogenannten Raman-Effekt. Ein Teil des gestreuten Lichts wird somit bei höheren Wellenlängen detektiert, als der des einfallenden Lichts. Der Teil, der keine Änderung erfährt, wird als Rayleigh-Streuung bezeichnet (Gniadecka et al., 1998). Die exakte Energiemenge, welche benötigt wird, um ein Molekül in Schwingung zu versetzen, hängt von der Masse der Atome, welche in die Schwingung einbezogen sind, und der Art der chemischen Bindung zwischen diesen Atomen ab und wird durch die molekulare Struktur, molekulare

Interaktionen und der chemischen Mikroumgebung des Moleküls beeinflusst. Moleküle weisen dabei eine sehr große Anzahl an unabhängigen Schwingungsmodi auf ($3N - 6$ für Moleküle, welche aus N Atomen bestehen). Somit ist das Raman-Spektrum sehr molekülspezifisch. Die Position und die relative Intensität und Gestalt der Banden eines Raman-Spektrums liefern detaillierte Informationen über die molekulare Zusammensetzung, molekulare Strukturen und Interaktionen einer Probe (Caspers et al., 2001).

Die Konfokale Raman-Spektroskopie ist ebenfalls eine geeignete Methodik, um die Dicke des SCs einer Hautprobe zu bestimmen (Forster et al., 2011; Mateus et al., 2013). In dieser Arbeit wurde eine von Zhang und Lunter (2018) entwickelte Technik zur Bestimmung der Dicke des SCs von dermatomierter Haut aus Schweineohren verwendet.

1.5 Physiologiebasierte pharmakokineische Modelle

1.5.1 Allgemeine Informationen

Physiologiebasierte pharmakokinetische Modelle (PBPK Modelle) sind Modelle, um die Pharmakokinetik eines Wirkstoffs im menschlichen Organismus vorherzusagen. Sie bilden ein physiologisch realistisches Kompartimentsystem nach (Jamei, 2016). Das betroffene Organ, Gewebe oder der Gewebeverband wird mathematisch durch die Verwendung von Gewebegröße, Perfusion, Permeabilität und anderen Faktoren beschrieben und durch die Verwendung von Differentialgleichungen gelöst (Grass and Sinko, 2002).

Das Interesse für die Anwendung von PBPK Modellen durch die Pharmazeutische Industrie und Aufsichtsbehörden ist in den letzten Jahren sehr stark gestiegen (Jamei, 2016). Sie sind insbesondere für Populationsgruppen, bei denen die Planung und Durchführung von klinischen Studien sehr anspruchsvoll und herausfordernd ist, beispielsweise in der Pädiatrie, von großer Bedeutung (Johnson and Rostami-Hodjegan, 2011). So können dynamische Veränderungen, die Auswirkungen auf die Pharmakokinetik und Pharmakodynamik eines Wirkstoffs haben, wie beispielsweise die Reifung des Stoffwechsels oder die Entwicklung der Körpergröße, durch die Nutzung von PBPK Modellen dynamisch angepasst werden. In bisherigen pharmakokinetischen Studien pädiatrischer Populationen sind solche Parameter häufig über die Dauer der Studie hinweg fixiert (Abduljalil et al., 2014).

Die Entwicklung und Nutzung eines PBPK Modells erlaubt die Trennung von Parametern des tierischen oder menschlichen Organismus von denen des Arzneimittels und des Studiendesigns. Dies ist essentiell für die Entwicklung wirkstoffunabhängiger Modelle, welche genutzt werden können, um pharmakokinetische und pharmakodynamische Eigenschaften auf verschiedene Populationen, beispielsweise Gesunde und Kranke, aufzuweiten (Jamei, 2016).

Die Anfänge des PBPK Modells können laut Rowland et al. (2011) bis in das Jahr 1937 auf die Arbeit von Teorell zurückgeführt werden (Teorell, 1937). Der experimentelle Aufbau, den Teorell in dieser Publikation für seine Untersuchungen verwendet, ist dabei bereits schematisch einem biologischen System

nachempfunden (Jamei, 2016). Der erste Artikel, in dem der Begriff PBPK Modell im Titel verwendet wird, wurde von Harrison et al. (1977) publiziert (Jamei, 2016).

1.5.2 PBPK Modelle in der Pädiatrie

Die Pharmakokinetik und Pharmakodynamik eines Wirkstoffs zeigt bei Erwachsenen und Kindern deutliche Unterschiede. Da sich der kindliche Organismus noch im Wachstums- und Reifungsprozess befindet, können hier außerdem unerwünschte Arzneimittelwirkungen auftreten, welche an Erwachsenen nicht festgestellt wurden. Zudem ist auch die pädiatrische Population an sich eine sehr heterogene Gruppe. Bei der Durchführung klinischer Studien in einer solchen Population werden folglich sehr viele Daten benötigt. Praktisch gesehen ist die Studiendurchführung jedoch problematisch. Die Schwierigkeit der Patientenrekrutierung und Durchführung von invasiven Eingriffen, welche mit Schmerzen, Angst und Blutverlust verbunden sind, stellen eine große Herausforderung dar. Klassische klinische Studien an Kindern, insbesondere bei Neugeborenen, werden deshalb durch Instanzen verhindert. Die Kennzeichnung vieler Medikamente beinhaltet somit sehr oft Haftungsausschlüsse des Herstellers, dass Sicherheit und Wirksamkeit nicht für Kinder oder nur für Kinder einer bestimmten Altersgruppe nachgewiesen wurden. Eine Statistik der amerikanischen Arzneimittelbehörde FDA besagt, dass derzeit 38 % der neuartigen pharmazeutischen Wirkstoffe, welche möglicherweise für die Pädiatrie von Nutzen sein könnten, bei der ersten Zulassung laut Herstelleranweisung für Kinder geeignet sind. Folglich stellt in Arztpraxen ungefähr ein Drittel, bei Spezialisten in Krankenhäusern ungefähr zwei Drittel und auf der Intensivstation bis zu 90 % der verordneten Medikamente ein Off-Label-Einsatz dar.

Die einerseits mögliche Schädigung durch unzureichend an Kindern untersuchte Medikamente und andererseits dem Bedürfnis, Kinder vor den potentiellen Risiken eines neu entwickelten Medikaments zu schützen und deshalb aus klinischen Studien auszuschließen, ist ein Dilemma.

Ansätze, welche auf pharmakokinetischen und pharmakodynamischen Modellen beruhen, kommen mit vergleichsweise sehr wenigen Daten aus und sind deshalb,

insbesondere in der Pädiatrie, durchaus reizvoll. Leider sind sie, trotz der großen Nachfrage, bisher noch immer sehr selten (Tod et al., 2008).

1.6 Zielsetzung

IHs sind proliferierende, vaskuläre Tumore, mit einer charakteristischen 3-phasigen Wachstumsdynamik (AWMF, 2015). Bei der Geburt meist nicht sichtbar, folgt innerhalb der ersten 5 bis 9 Monate eine sehr starke Proliferationsphase, wobei die größte Zunahme innerhalb der ersten 5 bis 8 Wochen stattfindet. Der anschließenden Phase des Wachstumsstillstands folgt eine Rückbildungsphase, welche bis zu 5 Jahre andauern kann. Zurück bleiben Deformationen wie atrophische Haut, Narben, zerstörte anatomische Strukturen und viele mehr (Goelz and Poets, 2015). Die Deformationen sind umso ausgeprägter, je größer das IH vor dem Eintritt in die Regressions- und Rückbildungsphase war (AWMF, 2015). Betroffene haben deshalb häufig ein Leben lang mit den Auswirkungen zu kämpfen.

Mit der im Jahr 2008 beginnenden Einführung von oralem Propranolol als sehr wirksame Alternative zu den bis dahin empfohlenen oralen Glukokortikoiden und einem vergleichsweise deutlich reduziertem Potential an unerwünschten Arzneimittelwirkungen, hat sich die Schwelle zu einer Behandlung von IH deutlich erniedrigt (Goelz and Poets, 2015; Leaute-Labreze et al., 2008). So wird eine Behandlung heutzutage auch oftmals aus kosmetischen Gründen in Erwägung gezogen, während vor der Entdeckung der Betablocker nur Läsionen behandelt wurden, welche durch Obstruktion oder Kompression Funktionsprobleme verursacht haben (Leaute-Labreze et al., 2011; Painter and Hildebrand, 2016).

Im Jahr 2010 wurde zum ersten Mal vom Off-Label Einsatz von Timolol für die topische Behandlung von IH berichtet (Guo and Ni, 2010; Puttgen et al., 2016). Dieses bietet eine lokale Alternative zum mittlerweile von den meisten Experten als First-Line Wirkstoff empfohlenen Propranolol (Goelz and Poets, 2015). Leider gibt es bisher keine Leitlinie zur Anwendung von topischem Timolol bei IH (Kumar et al., 2015) und nur sehr dürftige pharmakologische Untersuchungen (Berk et al., 2013).

Die Inzidenz eines IHs steigt mit abnehmendem Gestationsalter von 1 bis 4 % für Reifgeborene bis zu 23 % bei Frühgeborenen mit einem Geburtsgewicht unter 1000 g, mit weiblicher und kaukasischer Dominanz (Goelz and Poets, 2015; Kanada et al., 2012). Obwohl das Patientenkollektiv der Frühgeborenen die größte Inzidenz an IH und zudem das größte Risiko für unerwartete Arzneimittelwirkungen aufweist,

ist es dennoch das am schlechtesten untersuchte und wird beispielsweise in nationalen Richtlinien von den Therapieempfehlungen ausgeschlossen (Goelz and Poets, 2015; Grantzow et al., 2008). Für die derzeit vorhandenen therapeutischen Interventionen bei IH wurde bisher keine Studie speziell für Frühgeborene durchgeführt, Indikationen und Entscheidungen für die Behandlung werden folglich aus Studien an älteren beziehungsweise termingerecht geborenen Kindern extrapoliert und basieren häufig auf individuellen Abwägungen (Barrio and Drolet, 2005; Goelz and Poets, 2015).

Insbesondere für das Patientenkollektiv der Frühgeborenen erscheint es sinnvoll, eine lokale Behandlung des IH mit Timolol in Erwägung zu ziehen, da dieses ein wesentlich geringeres Risikoprofil als die systemische Gabe von Propranolol aufweist und eine einfache Applikation ermöglicht (Goelz and Poets, 2015). Daten zur transdermalen Absorption von Timolol sind bisher jedoch nicht vorhanden, was als sehr problematisch anzusehen ist, da die noch unreife Haut von Frühgeborenen eine sehr viel durchlässigere Barrierefunktion als die Haut von Reifgeborenen aufweist. Die Absorption von Timolol könnte deshalb erheblich ansteigen (Goelz and Poets, 2015; Moehrle et al., 2013).

Ziel des ersten Teils dieser Dissertation war es somit, basierend auf der Analyse von Urinproben von Frühgeborenen, Kenntnisse und Rückschlüsse zur transdermalen Wirkstoffpermeation von Timolol bei Frühgeborenen unterschiedlichen Reifegrades mit IH zu erlangen. Falls systemische Wirkstoffkonzentrationen nachweisbar sind, sollen mögliche Zusammenhänge zwischen Reifungsgrad der Frühgeborenen und Wirkstoffkonzentrationen gezogen werden. Diese könnten wichtige Informationen für die Behandlung von IH bei Frühgeborenen mit Timolol liefern.

Hierzu wurden im ersten Teil dieser Arbeit Urinproben, welche aus der Neonatologie des Universitätsklinikums Tübingen bezogen wurden, analytisch untersucht. Die Klinikproben stammten von Frühgeborenen unterschiedlichen Reifegrades und unterschiedlicher Lebensdauer nach der Geburt, welche ein IH aufwiesen und lokal mit dem Beta-Adrenozeptor-Antagonist Timolol behandelt wurden. Dieses wurde im Universitätsklinikum Tübingen als 0,5%iges Gel über einen bestimmten Zeitraum hinweg 1 Mal täglich topisch auf das IH aufgetragen und mittels Finn-Chamber okkludiert. Da diese Behandlung ein Off-Label-Einsatz von Timolol darstellt und es

insgesamt und insbesondere bei Frühgeborenen nur sehr wenige bis keine Daten und klinischen Studien gibt, stellte sich die Frage der durch diese lokale Therapie erzielten systemischen Wirkstoffkonzentrationen.

Da es aus ethischen Gründen nicht vertretbar war, für diese Zwecke Blutproben der Frühgeborenen zu entnehmen, wurde nach Zustimmung der Eltern der Urin der Kinder in einer Windelaufgabe gesammelt und anschließend im Rahmen dieser Dissertation analysiert. Systemisch verfügbare Konzentrationen des Wirkstoffs werden über die Niere im Urin ausgeschieden. Über die Bestimmung der vorhandenen Timololmengen im Urin konnten somit, mittels Kenntnisse zu Metabolismus und Elimination, Rückschlüsse auf vorhandene Blutspiegelwerte von Timolol gezogen werden.

Ziel des zweiten Teils dieser Arbeit war es, ein Hautmodell zu entwickeln, welches die einfache und schnelle Vorhersage von Plasmaspiegelwerten von Timolol bei Frühgeborenen mit unterschiedlichen Hautreifegraden ermöglicht. Dies konnte durch die Entwicklung eines PBPK Modells und die Entwicklung eines *in vitro* Modells umgesetzt werden. Kenntnisse zu Metabolismus und Elimination von Timolol ermöglichten es, die anhand der entwickelten Modelle ermittelten Plasmaspiegelwerte in erwartete Timololkonzentrationen im Urin umzurechnen. Dies ermöglichte wiederum einen Vergleich der Ergebnisse der entwickelten Modelle mit den analysierten Proben der Frühgeborenen.

Hierzu beschäftigte sich der weitere Teil dieser Arbeit mit der Fragestellung der Hautpermeation von Timolol bei Frühgeborenen. Die Hautbarriere bei Frühgeborenen ist je nach Reifegrad und Lebensdauer nach der Geburt unterschiedlich stark ausgebildet und die Wirkstoffpermeation entsprechend erhöht (Barker et al., 1987; Kalia et al., 1998). Innerhalb von 2 bis 8 Wochen nach der Geburt reift die Haut von Frühgeborenen zu einer vollständig funktionsfähigen Barriere heran (Harpin and Rutter, 1983; Kalia et al., 1998). Die Dosierung transdermaler wirkstoffhaltiger Formulierungen muss deshalb stets an dieses sich wandelnde System angepasst werden (Sekkat et al., 2004a). Um die Entwicklung solcher, an den Reifungsprozess von Frühgeborenen angepassten, wirkstoffhaltigen dermalen Formulierungen in der pharmazeutischen Technologie zu erleichtern, werden einfache Methoden benötigt, welche eine schnelle Charakterisierung des

Penetrations- und Permeationsverhaltens von Wirkstoffen, in dieser Arbeit Timolol, ermöglichen.

Ein wichtiges Ziel dieser Dissertation war es, durch die Erkenntnisse dieser Arbeit die Entwicklung von wirkstoffhaltigen dermalen Systemen, welche an den Entwicklungsstand der Haut von Frühgeborenen angepasst sind, durch eine schnelle Erlangung von Informationen zum Absorptionsverhalten des Wirkstoffs durch die Haut, deutlich zu erleichtern.

2 Materialien und Methoden

2.1 Verwendete Materialien und Geräte

2.1.1 Chemikalien und Hilfsstoffe

Artikel	Hersteller
Acetonitril	Avantor Performance Materials B.V., NL-Deventer
Benzalkoniumchlorid	Caesar & Loretz GmbH, DE-Hilden
Dichlormethan	Fisher Scientific U.K. Limited, UK-Loughborough
Dinatriumhydrogenphosphat	Carl Roth GmbH & Co. KG, DE-Karlsruhe
Hypromellose	Metolose 65SH-500, Shin-Etsu Chemical Co., JP-Tokyo
Kaliumdihydrogenphosphat	Carl Roth GmbH & Co. KG, DE-Karlsruhe
Methanol für HPLC, gradient grade	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, DE-Steinheim
Natriumchlorid	Caesar & Loretz GmbH, DE-Hilden
Natriumhydroxid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, DE-Steinheim
NEG 50™	Thermo Fisher Scientific Inc., US-Waltham
Phosphorsäure 85 %	VWR International BVBA, B-Leuven
(±)-Propranolol Hydrochlorid	Thermo Fisher GmbH, DE-Kandel
Safranin O (C.I. 50240)	Carl Roth GmbH & Co. KG, DE-Karlsruhe
Silica gel orange	Carl Roth GmbH & Co. KG, DE-Karlsruhe
Timololmaleat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, DE-Steinheim
Triethylamin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, DE-Steinheim
Trifluoressigsäure für HPLC	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, DE-Steinheim
Trypsin from porcine pancreas, type II-S (lyophilized powder)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, DE-Steinheim
Trypsin Inhibitor	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, DE-Steinheim

2.1.2 Verbrauchsmaterial

Klassierung	Bezeichnung	Hersteller
Aluminiumbehältnisse zum Einfrieren der Hautproben	Eigenanfertigung	Werkstatt des Pharmazeutischen Instituts, DE-Tübingen
Folie	Aluminiumfolie	FORA GmbH, DE-Radolfzell
Folie	Standard D-squame Discs, D100	CuDerm Corporation, US-Dallas
Folie	Parafilm®	Bemis Company Inc., US-Oshkosh
Gestell (Fixierung der Franz-Zellen)	Eigenanfertigung	Werkstatt des Pharmazeutischen Instituts, DE-Tübingen
HPLC-Analytik	Crip neck vials	Machery-Nagel GmbH & Co. KG, DE-Düren
HPLC-Analytik	Screw neck vials	Machery-Nagel GmbH & Co. KG, DE-Düren
HPLC-Analytik	Schraubkappen, schwarz, Loch, Red Rubber//FEP, 1,3 mm	Machery-Nagel GmbH & Co. KG, DE-Düren
HPLC-Analytik	Inserts, 9 mm Spitze für enge Öffnung, 0,15 ml, 5x31 mm, klar	Machery-Nagel GmbH & Co. KG, DE-Düren
HPLC-Analytik	Säule EC 250/4 Nucleosil 100-5 C18	Machery-Nagel GmbH & Co. KG, DE-Düren
HPLC-Analytik	Säule EC 125/4 Nucleosil 100-5 C8	Machery-Nagel GmbH & Co. KG, DE-Düren
HPLC-Analytik	Vorsäule EC 4/3 Universal RP	Machery-Nagel GmbH & Co. KG, DE-Düren
HPLC-Analytik	Vorsäulenhalter	Machery-Nagel GmbH & Co. KG, DE-Düren

Klassierung	Bezeichnung	Hersteller
Kanülen	Sterican®. 0,80 x 120 mm, 21 G x 4 ¾"	B.Braun Melsungen AG, DE- Melsungen
Klingen	Dermatomklingen F. Wagner Dermatom steril, GB228R	Aesulap AG, DE-Tuttlingen
Klingen	Skalpells Klinge Nr.22, unsteril, Kohlenstoffstahl, gehärtet	Bayha GmbH, DE-Tuttlingen
Klingen	MX Premier+ Microtome Blade	Thermo Fisher Scientific Inc., US-Waltham
Kruke	Gako unguator 50	GAKO International GmbH, DE-München
Magnetrührstäbchen	Stirring Bars Mico 10 x 0,3 mm	VWR International, US- Radnor
Metallklammer zur Fixierung der Franz-Diffusionszellen	Metallklammer	Gauer Glas, DE-Püttingen
Mikroreaktionsgefäß	Mico-centrifuge tubes, 2 ml, graduations, natural	VWR International, US- Radnor
Mikroreaktionsgefäß	Micro-cetrifuge tubes, 1,7 ml, graduations, natural	VWR International, US- Radnor
Objektträger	Microscope Slides	VWR International, US- Radnor
Papiertuch	Papiertuch	Wepa Apothekenbedarf GmbH & Co. KG, DE- Hillscheid
Petrischale	Petri dish 94 x 16, with vents, heavy version, sterile	Greiner bio-one GmbH, DE- Frickenhausen
Pipettenspitze	epT.I.P.S.® Standard 50 – 1000 µl	Eppendorf AG, DE-Hamburg
Pipettenspitze	epT.i.P.S.® Standard/Bulk 0,1 – 20 µl	Eppendorf AG, DE-Hamburg
Pipettenspitze	epT.I.P.S.® Standard/Bulk 2 – 200 µl	Eppendorf AG, DE-Hamburg

Klassierung	Bezeichnung	Hersteller
Pipettenspitze	5 ml	Brand GmbH & Co. KG, DE-Wertheim
Polystyrol-Platten	Styrodur	Saint-Gobain Isover G+H AG, DE-Ludwigshafen a. Rhein
Reaktionsgefäß	Cellstar® tubes, 15 ml, PP, graduated, conical bottom, blue screw cap, sterile	Greiner bio-one GmbH, DE-Frickenhausen
Reaktionsgefäß	Cellstar® tubes, 50 ml, PP, graduated, conical bottom, blue screw cap, sterile	Greiner bio-one GmbH, DE-Frickenhausen
Schliff fett	Laborfett glisseal HV	Borer Chemie AG, CH-Zuchwill
Schlinggazetupfer	Schlinggazetuper, unsterile, Gr. 5	Fuhrmann GmbH, DE-Much
Spritzen	Injekt®-F 1 ml	B. Braun Melsungen AG, DE-Melsungen

2.1.3 Geräte

Klassierung	Bezeichnung	Hersteller
Dermatom	Acculan 3Ti Dermatom GA670	Aesculap AG, DE-Tuttlingen
Franz-Diffusionszelle	Franz-Diffusionszellen, modifiziert	Gauer Glas, DE-Püttlingen
Haarschneider	Philips QC5115/15 Series 3000	Philips Consumer Lifestyle BV, NL-Amsterdam
HPLC-Analytik	Autosampler SIL.20A Detektor SPD-20A Entgaser DGU-20A5 Kommunikationsmodul CBM- 20A Ofen CTO-10ASvp Pumpe LC-20AT	Shimadzu Corporation, JP- Kyoto
Kühl- und Gefrierkombination	Kühl- und Gefrierkombination Premium	Liebherr-International AG, CH-Bulle
Kryo-Mikrotom	Microm HM 560	Thermo Fisher Scientific Inc., US-Waltham
Lichtmikroskop	Axio Imager.Z1	Carl Zeiss Jena GmbH, DE- Jena
Locheisen	Henkellocheisen Turnus Werkzeugfabrik 15 mm	Eduard Gottfried Ferne GmbH, DE-Remscheid
Locheisen	Henkellocheisen Turnus Werkzeugfabrik 25 mm	Eduard Gottfried Ferne GmbH, DE-Remscheid
Magnetrührer	Poly 15	Thermo Fisher Scientific Inc., US-Waltham
pH-Meter	S20-SevenEasy™ pH	Mettler Toledo, US- Columbus
Pipette	Eppendorff Resarch® plus, 100 – 1000 µl	Eppendorf AG, DE-Hamburg
Pipette	Eppendorff Resarch® plus, 10 – 100 µl	Eppendorf AG, DE-Hamburg

Klassierung	Bezeichnung	Hersteller
Pipette	Eppendorff Resarch® plus, 20 – 200 µl	Eppendorf AG, DE-Hamburg
Pipette	Eppendorff Resarch® plus, 2- 20 µl	Eppendorf AG, DE-Hamburg
Pipette	Transferpipette® S 0,5– 5 ml	Brand GmbH & Co. KG, DE- Wertheim
Raman-Mikroskop	<i>Alpha</i> 500 Spektrometer UHTS 300 CCD-Kamera DV401-BV	WITech GmbH, DE-Ulm
RO-Wasser-Anlage	Elga Purelab Option-Q Elga Reservoir 25 l	Elga Labwater GmbH, DE- Celle
Thermostat	Alpha	Lauda Dr. R. Wobser GmbH & Co. KG, DE-Lauda- Königshofen
Ultraschallbad	Sonorex Super RK 510/H	Bandelin electronic GmbH & Co. KG; DE-Berlin
Unguator	Unguator® 2100	GAKO Konietzko GmbH, DE-Bamberg
Vortex Mixer	SA8	Techne Inc., US-Burlington
Wasserbad	Polycarbonat-Wasserbad T020	Lauda Dr. R. Wobser GmbH & Co. KG, DE-Lauda- Königshofen
Waage	Extend ED2201-CW (d=0,1 g)	Sartorius AG, DE-Göttingen
Waage	LE1003S (d=0,001 g)	Sartorius AG, DE-Göttingen
Waage	Extend ED224S (d=0,001 g)	Sartorius AG, DE-Göttingen
Waage	XPE205 DeltaRange®	Mettler Toledo, US- Columbus
Zentrifuge	Megafuge 1.0R	Heraeus Holding GmbH, DE- Hanau
Zentrifuge	miniSpin	Eppendorf AG, DE-Hamburg

2.1.4 Software

Art	Software	Hersteller
HPLC	Shimadzu Lab Solutions	Shimadzu Corporation, JP, Kyoto
Lichtmikroskop	AxioVision Rel. 4.6.3.	Carl Zeiss Jena GmbH, DE- Jena
PBPK Modelle	Matlab R2018a	Mathworks, Inc., US-Nattick
Raman-Mikroskop	WITech Control/Project	WITech GmbH, DE-Ulm
Kalkulationen	GraphPad Prism 6	GraphPad Software, US-San Diego
Textverarbeitung	Microsoft Office.2007	Microsoft Corporation, DE- Redmond

2.2 Methoden

2.2.1 Analytik der Urinproben von Frühgeborenen

2.2.1.1 Flüssig-flüssig Extraktion der Urinproben

Die Extraktionsmethode für die aus der Neonatologie der Universitätsklinik Tübingen stammenden Urinproben von Frühgeborenen wurde nach einer von Kubota et al. (1990) entwickelten Methodik für die Extraktion von Urinproben zur Analyse mit Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC) und UV Detektion modifiziert und durchgeführt.

Die vorhandene Urinmenge (100 – 2000 µl) wird in ein 15 ml Reaktionsgefäß (Cellstar tubes 15 ml, Greiner bio-one GmbH, DE-Frickenhausen) überführt und die entsprechende Menge (2 – 40 µl) einer 5 µg/ml wässrigen Stammlösung des internen Standards Propranolol (Thermo Fisher GmbH, DE-Kandel) zugegeben, um eine Konzentration von 0,1 µg/ml an internem Standard in der Urinprobe zu erhalten. Anschließend werden 100 µl einer 4 M Natriumhydroxid Lösung (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, DE-Steinheim) und 5 ml Dichlormethan (Fisher Scientific U.K. Limited, UK-Loughborough) zugegeben und im Vortex Mixer (SA8, Techne Inc., US-Burlington) bei 2500 Upm 2 min gemischt. Nun wird die Mischung bei 22 °C für 10 min bei 6000 UpM zentrifugiert (Megafuge 1.0R, Heraeus Holding GmbH, DE-Hanau). Die anschließend in der oberen Schicht befindliche wässrige Phase wird vorsichtig abgenommen und verworfen. Die zurückbleibende Dichlormethan-Phase wird in ein neues 15 ml Reaktionsgefäß (Cellstar tubes 15 ml, Greiner bio-one GmbH, DE-Frickenhausen) überführt. 200 µl einer 0,1 M Phosphorsäure (VWR International BVBA, B-Leuven) werden zugegeben und im Vortex Mixer (SA8, Techne Inc., US-Burlington) bei 2500 UpM 2 min gemischt. Anschließend wird die Mischung bei 22 °C für 10 min bei 6000 UpM zentrifugiert (Megafuge 1.0R, Heraeus Holding GmbH, DE-Hanau). 150 µl der sich nun oben befindenden wässrigen Phase werden entnommen, in ein HPLC Vial (Screw neck vial, Machery Nagel GmbH & Co. KG, DE-Düren) mit Insert (0,15 ml Insert für enge Öffnung, Machery-Nagel GmbH & Co. KG, DE-Düren) überführt und mit einem Schraubdeckel (Schraubkappen,

Machery Nagel GmbH & Co. KG, DE-Düren) dicht verschlossen. Die Probe wird anschließend mittels HPLC analysiert (2.2.1.2).

2.2.1.2 HPLC-UV-Analytik zur Bestimmung des Timololgehalts von Urinproben

Die HPLC-Analytik wird mit einem „LC-20-A prominence“ HPLC System (Shimadzu, JP-Kyoto) durchgeführt. Verwendet wird eine HPLC Säule des Typs „EC 125/4 Nucleosil 100-5 C8“ (Machery-Nagel GmbH & Co. KG, DE-Düren) mit einer Vorsäule des Typs „EC 4/3 Universal RP“ (Machery-Nagel GmbH & Co. KG, DE-Düren).

Die Temperatur des Säulen-Ofens wird auf 25 °C festgelegt. Es wird ein Lösemittelgradient, bestehend aus 2 Fließmitteln (Fließmittel A und Fließmittel B) verwendet. Fließmittel A besteht aus 10 % Acetonitril (Avantor Performance Materials B.V., NL-Deventer), 0,1 % Trifluoressigsäure (Sigma-Adrich Chemie GmbH, DE-Steinheim) und RO-Wasser (ELGA Purelab Option-Q, ELGA Labwater GmbH, DE-Celle). Fließmittel B besteht aus 99,9 % Acetonitril (Avantor Performance Materials B.V., NL-Deventer) und 0,1 % Trifluoressigsäure (Sigma-Adrich Chemie GmbH, DE-Steinheim). Innerhalb von 9 min wird ein Gradient von 100 % Fließmittel A und 0 % Fließmittel B auf 0 % Fließmittel A und 100 % Fließmittel B gefahren. Anschließend verbleibt die Konzentration an Fließmittel B für 1 min bei 100 %. Schließlich wird innerhalb 1 min der Anteil an Fließmittel B zurück auf 0 % und der Anteil an Fließmittel A zurück auf 100 % gefahren. Für weitere 3 min verbleibt der Anteil an Fließmittel A bei 100 %. Die Flussrate beträgt 1,000 ml/min. Es werden 100 µl Probenvolumen injiziert. Timolol und Propranolol werden bei einer Wellenlänge von 280 nm nach 4,8 und 6,1 min detektiert.

2.2.2 Entwicklung eines PBPK Modells humaner Haut

Es soll ein Computermodell zur Vorhersage der transdermalen Permeation von Wirkstoffen entwickelt werden. Solche mathematischen Modelle zur Vorhersage von Permeationskinetiken der Haut gewinnen zunehmend an Bedeutung (Chen et al., 2016). Sie erleichtern, durch die Vorhersage der perkutanen Absorption in

unterschiedlichen Hautschichten, die Entwicklung transdermaler Freisetzungssysteme (Chen et al., 2015).

Zur Implementierung eines PBPK Modells humaner Haut wird das Computerprogramm Matlab 2018Ra (Mathworks Inc., US-Natick) verwendet. Es wird ein zweidimensionales Modell der humanen Haut entwickelt.

2.2.2.1 Erstellung der Kompartimente

Die Haut wird hierfür in physiologisch sinnvolle Kompartimente gegliedert. Die Einteilung orientiert sich an einer Publikation von Chen et al. (2016).

Die wirkstoffhaltige Formulierung stellt das erste Kompartiment, das **Wirkstoffvehikel**, dar. Es befindet sich als homogene Struktur auf der äußersten Hautschicht, dem SC. Die Eigenschaften des Wirkstoffvehikels hängen von der verwendeten Formulierung und dem Wirkstoff ab und müssen für das jeweilige System passend gewählt werden. Im Wirkstoffvehikel ist zu Beginn der Modellsimulation eine definierte Menge des Wirkstoffs vorhanden und diffundiert im Laufe der Permeationsstudie in die unterschiedlichen Hautschichten.

Das zweite Kompartiment bildet das **SC**, welches als heterogene Struktur simuliert wird. Corneozyten sind hierbei in eine Lipidmatrix eingebettet, ähnlich wie Ziegelsteine einer Mauer in Mörtel, was deshalb als sogenanntes Ziegelstein-Mörtel Modell dargestellt werden kann.

Der limitierende Schritt der Permeation durch die Haut ist für die meisten Substanzen die Diffusion durch das SC. Dies wird hauptsächlich durch dessen Struktur und Aufbau verursacht (Chen et al., 2008; Michaels et al., 1975a; Potts and Francoeur, 1991). Das SC kann durch Diffusion entlang des gewundenen Lipidwegs oder transzellulär mittels abwechselnder Diffusion durch Corneozyt und Lipidschicht erfolgen (Chen et al., 2008).

Der Aufbau des SCs wird durch Johnson et al. (1997) beschrieben (Abbildung 2.2-1).

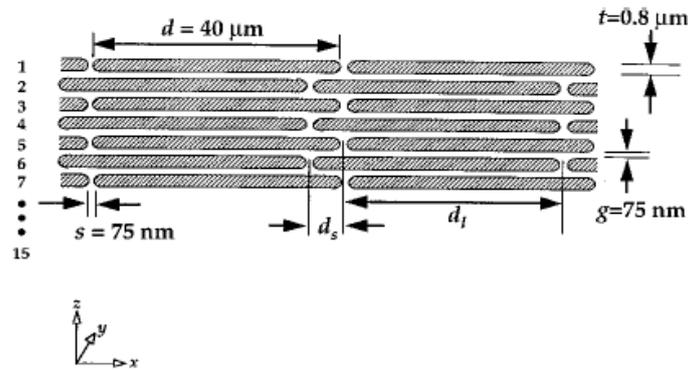


Abbildung 2.2-1: Schematische Darstellung eines Querschnitts durch das SC. Abbildung modifiziert nach Johnson et al. (1997).

Die Corneozyten, dargestellt als „Ziegelsteine“ mit den Maßen 40 x 0,8 µm, sind in eine Lipidmatrix eingebettet, deren Ausmaße in horizontaler und vertikaler Richtung 75 nm betragen.

Die Corneozyten sind als geordnete, sich teilweise überlappende Spalten von einer multiplen Lipiddoppelschicht umgeben. Der Durchmesser eines Corneozyts beträgt 40 µm, seine Dicke 0,8 µm. Die Dicke der Lipidschicht beträgt in horizontaler und vertikaler Richtung jeweils 75 nm. Die Gesamtdicke des SCs berechnet sich aus der Anzahl der Corneozytenschichten (Johnson et al., 1997). In den meisten Bereichen des menschlichen Körpers besteht das SC aus ungefähr 10 bis 20 Corneozytenschichten. Bei der Simulation unreifer Haut wird die Zahl der vorhandenen Corneozytenschichten schrittweise reduziert, um unterschiedliche Reifegrade der Haut zu simulieren. Bei einer nicht vorhandenen Hautbarrierefunktion ist überhaupt kein funktionsfähiges SC vorhanden. Nach oben und unten ist das SC jeweils durch die Lipidschicht abgegrenzt (Chen et al., 2008).

Die darunterliegende **lebende Epidermis und Dermis** werden als homogene Materialien beschrieben. Da ihre physikochemischen Eigenschaften sehr ähnlich sind, können beide Verteilungskoeffizienten und Diffusionskoeffizienten als gleich angenommen werden (Chen et al., 2016; Dancik et al., 2013; Kretsos et al., 2008). Sie werden deshalb in diesem Modell als ein Kompartiment zusammengefasst.

Der lebende Teil der Epidermis ist typischerweise ungefähr 100 µm, die Dermis typischerweise 1200 µm dick (Chen et al., 2016). Da diese beiden Bereiche als ein Kompartiment dargestellt werden, hat dieses eine Dicke von 1300 µm.

Aus diesem untersten Kompartiment ist, orientiert an einer Publikation von Chen et al. (2008), ein **unbegrenzter Abfluss** möglich.

2.2.2.2 Berechnung benötigter Koeffizienten

Eine große Einschränkung von Kompartiment-Modellen ist die Tatsache, dass sehr häufig wichtige Modellparameter wirkstoffspezifisch an experimentell gewonnene Daten angepasst werden müssen. Die Übertragbarkeit auf andere Arzneistoffe ist deshalb nur eingeschränkt möglich (Chen et al., 2016). In diesem Modell orientiert sich die Berechnung benötigter Koeffizienten deshalb an Publikationen von Chen et al. (2015; 2008, 2010; 2016), bei welcher Verteilungs- und Diffusionseigenschaften gelöster Substanzen anhand von physiochemischen Eigenschaften des Wirkstoffs, wie beispielsweise Octanol-Wasser-Verteilungskoeffizient und Molekulargewicht, und Betrachtung der physiologischen Struktur und Zusammensetzung der Haut mittels Gleichungen aus der Literatur berechnet werden.

Die hydrodynamische Hinderung der Diffusion eines Hydrogels ist bei kleinen Molekülen nur sehr gering und beträgt meist weniger als 10 % Reduktion gegenüber der Diffusion in Wasser (Amsden, 1998; Chen et al., 2016; Phillips, 2000). Der Diffusionskoeffizient D_V des Wirkstoffvehikels berechnet sich deshalb mit folgender Formel (Formel 2.2-1) (Chen et al., 2008):

$$D_V = D_W = \frac{KT}{6\pi\eta r_s} \left[\frac{m^2}{s} \right]$$

- D_V = Diffusionskoeffizient des Wirkstoffvehikels
- D_W = Diffusionskoeffizient der gelösten Substanz in Wasser
- K = Boltzmann Konstante
- T = Temperatur
- η = Viskosität von Wasser
- r_s = Radius der gelösten Substanz

Formel 2.2-1: Berechnung des Diffusionskoeffizienten D_V des Wirkstoffvehikels, Formel nach Chen et al. (2008).

Der für Formel 2.2-1 benötigte Radius der gelösten Substanz r_s berechnet sich mit der nachfolgenden Formel (Formel 2.2-2/ Formel 2.2-3) (Mitragotri, 2003; Mitragotri et al., 1999):

$$r_s = \sqrt[3]{\frac{3}{4} * 0,0987 * MW [\text{Å}]}$$

Formel 2.2-2: Berechnung des Radius der gelösten Substanz, Formel nach Mitragotri (2003) und Mitragotri et al. (1999).

Der Diffusionskoeffizient D_L der Lipidmatrix berechnet sich mit folgender Formel (Formel 2.2-3) (Chen et al., 2008; Mitragotri et al., 1999):

$$D_L = \begin{cases} 2 * 10^{-9} e^{-0,46r_s^2} & \text{wenn } MW \leq 380 \text{ Da} \\ 3 * 10^{-13} & \text{wenn } MW > 380 \text{ Da} \end{cases} \left[\frac{m^2}{s} \right]$$

- D_L = Diffusionskoeffizient in der Lipidmatrix
- r_s = Radius der gelösten Substanz (siehe Formel 2.2-2)

Formel 2.2-3: Berechnung des Diffusionskoeffizienten D_L der Lipidmatrix, Formel nach Chen et al. (2008).

Der Diffusionskoeffizient D_C der Corneozyten wird nicht berechnet, sondern aus einer Graphik der Publikation von Chen et al. (2010) entnommen, welche den Zusammenhang zwischen dem Diffusionskoeffizient D_C der Corneozyten und dem Molekulargewicht des gelösten Wirkstoffs darstellt.

Der Diffusionskoeffizient D_{ED} des Kompartiments der lebenden Epidermis und der Dermis berechnet sich mit folgender Formel (Formel 2.2-4) (Chen et al., 2015; Kretsos et al., 2008):

$$D_{ED} = \frac{10^{-8,15-0,655 \log MW}}{0,68 + \frac{0,32}{f_u} + 0,025 f_{non} K_{MW}} \left[\frac{m^2}{s} \right]$$

- f_u = nicht an Albumin gebundener Anteil an gelöster Substanz (Chen et al., 2016; Yamazaki and Kanaoka, 2004)
- f_{non} = nicht-ionisierter Anteil an gelöster Substanz (Chantasart et al., 2013; Chen et al., 2016)
- $K_{MW} = K_{OW}^{0,7}$ (Chen et al., 2008)
 K_{OW} = Octanol-Wasser-Verteilungskoeffizient

Formel 2.2-4: Berechnung des Diffusionskoeffizienten D_{ED} des Kompartiments der lebenden Epidermis und der Dermis, Formel nach Chen et al. (2015) und Kretsos et al. (2008).

2.2.2.3 Implementierung des Modells

Zur Implementierung eines PBPK Modells humaner Haut wird das Computerprogramm Matlab 2018Ra (Mathworks Inc., US-Nattick) und die dabei verfügbare Partial Differential Equation (PDE) Toolbox™ verwendet.

Mit Hilfe der PDE Toolbox lassen sich Partielle Differentialgleichungen (PDE) der folgenden Form lösen (Formel 2.2-5):

$$m \frac{\partial^2 u}{\partial t^2} + d \frac{\partial u}{\partial t} - \nabla * (c \nabla u) + au = f$$

- m = Konstante
- d = Konstante
- a = Konstante
- u = Konzentration
- t = Zeit
- c = Diffusionskoeffizient

Formel 2.2-5: Allgemeine Formel partieller Differentialgleichungen der PDE Toolbox.

Diese Gleichung kann für das implementierte Modell folgendermaßen vereinfacht werden (Formel 2.2-6):

$$\frac{\partial}{\partial t} \text{Konzentration}(\vec{x}, t) - \nabla \text{Diffusionskoeffizient} * \nabla \text{Konzentration}(\vec{x}, t) = 0$$

Formel 2.2-6: Vereinfachte partielle Differentialgleichungen für Diffusionsprozesse.

Gelöst werden die PDEs mittels finiter Elemente Methode. Hierfür kann die automatische Netzgenerierung der PDE Toolbox genutzt werden. Über die unterschiedlichen Kompartimente wird jeweils eine Netzstruktur mit einer einfachen Geometrie, beispielsweise Dreiecke gelegt. Innerhalb der generierten Maschen des Netzes wird sucht das Programm jeweils eine Lösung der Partiellen Differentialgleichung.

2.2.2.3.1 Festlegung der Randbedingungen

In diesem Modell wird ein zweidimensionales Stück der Haut mit einer Breite von 1 mm betrachtet. Es wird definiert, dass die Konzentration des Wirkstoffs zu Beginn der Simulation in allen Kompartimenten außer dem Wirkstoffvehikel 0 ist. Die Diffusion nach oben oder links und rechts seitlich aus der Simulationsfläche hinaus wird zur Vereinfachung des Modells als 0 definiert. Die Diffusion des Wirkstoffs verläuft somit nach unten in Richtung des Kompartiments der lebenden Epidermis und Dermis. Hier kann die Diffusion unbegrenzt aus dem Modell heraus erfolgen. Dies simuliert die sink-Bedingungen durch den Abtransport des Wirkstoffes aus der Haut ins Blut.

2.2.2.3.2 Form der Ergebnisse

Die Wirkstoffmenge an der untersten Stelle des Kompartiments der lebenden Epidermis und der Dermis wird über die Zeit hinweg abgegriffen und eine kumulative Summenkurve der diffundierten Wirkstoffmenge erstellt. Die Simulationsfläche des

Modells beträgt 1 mm². Je nach Applikationsfläche muss das Ergebnis deshalb noch mit einem Faktor multipliziert werden.

2.2.2.3.3 Quellcode des entwickelten Modells

Die Schritte der Implementierung des entwickelten PBPK Modells humaner Haut ist im folgenden Text dargestellt. Der vollständige Quellcode befindet sich im Anhang (Kapitel 6.3.1 und 6.3.2).

Zur Lösung des Modells wird die PDE Toolbox verwendet.

Zunächst wird die Dicke der unterschiedlichen Schichten der Kompartimente definiert. Die Dicke des Wirkstoffvehikels wird dabei das „Dinput“, die Dicke des SCs als „Dsc“ und die Dicke des Kompartiments aus lebender Epidermis und Dermis als „Dep“ dargestellt. Die Einheit der Dicken ist in Millimeter angegeben.

Als nächstes werden die Maße der Corneozyten und der Lipidschicht des SCs definiert. „LZelle“ bezeichnet die Länge eines Corneozyten, „HZelle“ bezeichnet die Dicke eines Corneozyten, „AbstVert“ bezeichnet den vertikalen Abstand zwischen zwei Corneozyten, „AbstHor“ bezeichnet den horizontalen Abstand zwischen zwei Corneozyten. Der Platz zwischen den Corneozyten besteht aus der Lipidmatrix. „eps“ definiert den Abstand der Corneozyten vom linken und rechten Rand der simulierten Fläche. Die Einheit der Konstanten ist mm.

Anschließend werden die Maße der einzelnen Kompartimente definiert. Sie werden so gewählt, dass die Breite der simulierten Fläche 1 mm beträgt. „Rvehicle“ definiert die Randmaße des Wirkstoffvehikels, „Rsc“ definiert die Randmaße des SCs, „Rep“ definiert die Randmaße des Kompartiments bestehend aus lebender Epidermis und Dermis.

Dann werden die Corneozyten in das Kompartiment des SCs eingefügt. Es wird definiert, dass das Kompartiment oben, unten, links und rechts durch die Lipidschicht abgegrenzt ist.

Nun wird das Geometrieelement gebildet und die implementierten Kompartimente werden in einer Abbildung dargestellt.

Die Position der einzelnen Kanten werden definiert und die Flächen benannt.

Die Randbedingungen für die definierten Kanten werden gesetzt. Es wird definiert, dass an der oberen Kante und den linken und rechten Kanten nichts abfließt. Alles, was den unteren Rand des Kompartiments bestehend aus lebender Epidermis und Dermis berührt, fließt ab. Dies simuliert die Sinkbedingungen durch den Abtransport des Wirkstoffs aus der Haut ins Blut.

Nun werden die Diffusionsgleichungen für die jeweiligen Kompartimente festgelegt und die benötigten Konstanten definiert. Um die allgemeine Form der Gleichung für die benötigten Diffusionsprozesse passend zu machen, werden die Konstanten m , f und a als 0 definiert. „DIFFinput“ definiert den Diffusionskoeffizienten des Wirkstoffvehikels, „DIFFsc“ definiert den Diffusionskoeffizient der Lipidmatrix des SCs, „DIFFcell“ definiert den Diffusionskoeffizienten der Corneozyten des SCs und „DIFFep“ definiert den Diffusionskoeffizienten des Kompartiments mit lebender Epidermis und Dermis. Die Einheit der Diffusionskoeffizienten ist mm^2/s .

Den einzelnen Kompartimenten wird die jeweilige Diffusionsgleichung mit den definierten Konstanten zugeordnet.

Die Anfangsbedingungen werden gesetzt. Die Wirkstoffkonzentration in allen Kompartimenten der Haut ist zu Beginn der Simulation 0. Nur im Wirkstoffvehikel ist eine bestimmte Wirkstoffkonzentration vorhanden, welche definiert wird.

Die Generierung eines Netzes wird definiert.

Nun werden die Zeitpunkte der Messung definiert, zu denen die Werte abgegriffen werden.

Die Ergebnisse zu den spezifizierten Zeitpunkten werden berechnet. Erstellt wird eine Summenkurve der permeierten Wirkstoffmenge über die Zeit, welche das Kompartiment der lebenden Epidermis und Dermis zur Unterseite hin verlassen hat.

Die berechneten Ergebnisse werden in einem Schaubild dargestellt. Die kumulativ permeierte Wirkstoffmenge wird gegen die Zeit aufgetragen.

Beachtet werden muss anschließend, dass sich die Ergebnisse auf eine simulierte Fläche von 1 mm² beziehen. In Abhängigkeit der Größe der Applikationsfläche muss das Ergebnis deshalb noch mit einem Größenfaktor multipliziert werden.

Für die Simulation des PBPK Modells der menschlichen Haut ohne vorhandenes intaktes SC, also 0 Corneozytenschichten, wird der Quellcode etwas verändert, da das Kompartiment des SCs und somit alle hierfür notwendigen Definitionen wegfallen (Kapitel 6.3.1 und 6.3.2).

2.2.3 Permeationsstudien von Timolol

2.2.3.1 Herstellung eines Timolol-Gels

Für die Durchführung der Permeationsstudien mit Timolol an (un)reifer Haut von Schweineohren wurde die gleiche Timolol-Formulierung wie in der Neonatalogie des Uniklinikum Tübingens eingesetzt. Die Herstellung dieses Timolol-Gels erfolgte analog der von Moehrle et al. (2013) beschriebenen Herstellungsweise aus Timolol Augentropfen 0,5 %.

2.2.3.1.1 Herstellung von Timolol Augentropfen 0,5 %

Für die Herstellung von 10 g einer 0,5%igen Timolol-Augentropfenlösung werden 0,0683 g Timolol-Maleat (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, DE-Steinheim) (entspricht 0,050 g Timolol) zusammen mit 0,0750 g und 0,1058 g der Puffersalze Natriumdihydrogenphosphat-Dihydrat und Dinatriumhydrogenphosphat (Carl Roth GmbH & Co. KG, DE-Karlsruhe) in ein Becherglas eingewogen und in 8,7509 g RO-Wasser (ELGA Purelab Option-Q, ELGA Labwater GmbH, DE-Celle) gelöst. Die Konservierung erfolgt mit 1,0000 g einer 0,1%igen Benzalkoniumchlorid-Stammlösung (Caesar & Loretz GmbH, DE-Hilden).

2.2.3.1.2 Herstellung eines Timolol-Gels

Die Herstellung des Timolol-Gels erfolgt aus Timolol-Augentropfen 0,5 % mit dem Unguator (Unguator 2100, GAKO Konietzko GmbH, DE-Bamberg). Hierfür werden 15,8772 g der Timolol-Augentropfen 0,5 % mit 0,6362 g Hypromellose (Metolose Grade 65SH-500, Shin-Etsu Chemical Co., JP-Tokyo) in eine 30 ml Kruke (Gako unguator 30, GAKO International GmbH, DE-München) eingewogen und mit dem Programm „Gel“ hergestellt. Die Lagerung des hergestellten Gels erfolgt im Kühlschrank (Kühl- und Gefrierkombination Premium, -International, CH-Bulle) bei 8 °C.

2.2.3.2 Hautpräparation

Für die Durchführung von *in vitro* Permeationsstudien von Timolol wird die Haut von Schweineohren verwendet. Diese stammen von Schweinen der deutschen Landrasse und werden von der Abteilung für experimentelle Medizin des Universitätsklinikums Tübingen und von einer lokalen Bio-Metzgerei der Region (DE-Mössingen-Öschingen) bezogen.

2.2.3.2.1 Präparation von Vollhaut

Unmittelbar nach Erhalt der Ohren werden diese weiterverarbeitet. Als erstes erfolgt die Dokumentation von Todesdatum, Ohrmarkennummer und etwaigen Besonderheiten wie Behaarung, Tätowierung oder Verletzungen. Die Ohrmarke wird anschließend entfernt. Die frischen Schweineohren werden nun mit isotoner Kochsalzlösung gewaschen, von anhaftendem Schmutz und Blut befreit und mit Schlinggazetupfern (unsteril Gr. 5, Fuhrmann GmbH, DE-Much) trocken getupft. Anschließend wird die Haut auf der Rückseite des Ohres mit Hilfe eines Skalpell (Skalpellklinge Nr. 22, Kohlenstoffstahl, Bayha GmbH, DE-Tuttlingen) vorsichtig exzidiert und auf einem mit isotoner Kochsalzlösung getränktem Tuch (Wepa Apothekenbedarf GmbH & Co. KG, DE-Hillscheid) zwischengelagert. Anschließend wird die exzidierte Haut erneut vorsichtig mit isotonischer Kochsalzlösung und einem

Schlinggazetupfer (Fuhrmann GmbH, DE-Much) gereinigt und trockengetupft. Nun wird sie in Aluminiumfolie (FORA GmbH, DE-Radolfzell) eingeschlagen und im Gefrierschrank (Kühl- und Gefrierkombination Premium, Liebherr-International, CH-Bulle) bei -30 °C bis zum Tag des Experiments für maximal 2 Monate gelagert.

2.2.3.2.2 Präparation von Spalthaut

Am Tag des Experiments wird die nach 2.2.3.2.1 präparierte Schweinehaut bei Raumtemperatur auf einem mit physiologischer Kochsalzlösung getränktem Papiertuch (Wepa Apothekenbedarf GmbH & Co. KG, DE-Hillscheid) aufgetaut und mit einem Skalpell (Skalpellklinge Nr. 22, Kohlenstoffstahl, Bayha GmbH, DE-Tuttlingen) in 3,0 - 3,5 cm breite Streifen geschnitten. Diese werden mit handelsüblichen Stecknadeln auf einem mit Aluminiumfolie (FORA GmbH, DE-Radolfzell) eingeschlagenen Polystyrol-Block (Styrodur, Saint-Gobain Isover G+H AG, DE-Ludwigshafen a. Rhein) fixiert. Die Haare werden mit einem Haarschneidegerät (Philips QC5115/15 Series 3000, Philips Consumer Lifestyle BV, NL-Amsterdam) auf < 5 mm getrimmt. Nach erneuter Reinigung mit physiologischer Kochsalzlösung und Trockentupfen mit Schlinggazetupfer (unsteril Gr. 5, Fuhrmann GmbH, DE-Much) wird die Haut mit einem Dermatom (Acculan 3Ti Dermatom GA670, Aesculap AG, DE-Tuttlingen) auf eine Dicke von 1,0 mm geschnitten. Aus den erhaltenen Hautstreifen werden mit einem Locheisen (Henkellocheisen Turnus Werkzeugfabrik 25 mm, Eduard Gottfried Ferne GmbH, DE-Remscheid) runde Hautstücke mit einem Durchmesser von 25 mm ausgestanzt. Bis zur Anfertigung aller benötigten Hautstanzen werden diese auf einem mit isotoner Kochsalzlösung getränktem Papiertuch (Wepa Apothekenbedarf GmbH & Co. KG, DE-Hillscheid) zwischengelagert. Das weitere Vorgehen ist unter dem Punkt 2.2.3.3 und 2.2.3.5 beschrieben.

2.2.3.3 Generierung unterschiedlicher Hautbarrierefunktionen mittels Klebebandabrisstechnik

Die Vorbereitung der Haut erfolgt wie bereits im Kapitel 2.2.3.2.2 beschrieben bis zum Punkt an dem die Haut mit einem Dermatome (Acculan 3Ti Dermatome GA670, Aesculap AG, DE-Tuttlingen) auf eine Dicke von 1,0 mm geschnitten wird. Anschließend werden die erhaltenen Hautstücke erneut mit handelsüblichen Stecknadeln auf einem mit Aluminiumfolie (FORA GmbH, DE-Radolfzell) eingeschlagenen Polystyrol-Block (Styrodur, Saint-Gobain Isover G+H AG, DE-Ludwigshafen a. Rhein) fixiert. Ein Klebestreifen (Standard D-square Discs, D100, CuDerm Corporation, US-Dallas) wird auf eine markierte Stelle der Haut aufgeklebt. Um eine reproduzierbare Adhäsion zu gewährleisten, wird der Klebestreifen mit einem definierten Gewicht (140 g/cm²) für 10 sek gleichmäßig auf die Haut gepresst. Anschließend wird der Klebestreifen mit einer Pinzette in einer zügigen, kontinuierlichen Bewegung abgezogen. Dieser Vorgang wird 3, 6, 9 oder 12-mal wiederholt. Jedes Mal wird ein neuer Klebestreifen verwendet und die Richtung des Abriss-Vorgangs um jeweils 90 ° gedreht. Die markierten Stellen werden nach Beendigung der festgelegten Anzahl an Klebebandabris-Vorgängen mit einem Lochsisen (Henkellochsisen Turnus Werkzeugfabrik 25 mm, Eduard Gottfried Ferne GmbH, DE-Remscheid) runde Hautstücke mit einem Durchmesser von 25 mm ausgestanzt. Bis zur Anfertigung aller benötigten Hautstanzen werden diese auf einem mit isotoner Kochsalzlösung getränktem Papiertuch (Wepa Apothekenbedarf GmbH & Co. KG, DE-Hillscheid) zwischengelagert. Das weitere Vorgehen ist unter dem Punkt 2.2.3.5 beschrieben.

2.2.3.4 Akzeptormedium für die Durchführung von Permeationsstudien

Für die Permeationsstudien wird natriumchloridhaltiger Phosphatpuffer pH 7,4 R Ph. Eur. verwendet. Hierfür werden 2,38 g Dinatriumhydrogenphosphat (Carl Roth GmbH & Co. KG, DE-Karlsruhe), 0,19 g Kaliumdihydrogenphosphat ((Carl Roth GmbH & Co. KG, DE-Karlsruhe) und 8,0 g Natriumchlorid (Caesar & Loretz GmbH, DE-Hilden) eingewogen, mit RO-Wasser (ELGA Purelab Option-Q, ELGA Labwater GmbH, DE-Celle) in einem 1,0 l Messkolben auf 1,0 l aufgefüllt und gelöst.

Anschließend wird der pH Wert mit dem pH-Meter (S20-SevenEasy™pH, Mettler Toledo, US-Columbus) überprüft und gegebenenfalls mit verdünnter Phosphorsäure (VWR International BVBA, B-Leuven) auf einen pH-Wert von 7,4 eingestellt. Vor der Verwendung für die Permeationsstudien wird die Pufferlösung im Ultraschallbad (Sonorex Super RK 510/H, Bandelin electronic GmbH & Co. KG, DE-Berlin) entgast.

2.2.3.5 Vorbereitung der Permeationsstudien mit modifizierten Franz-Diffusionszellen

Die *in vitro* Permeationsstudien werden mit modifizierten Franz-Diffusionszellen (Gauer Glas, DE-Püttingen) mit einem Akzeptorvolumen von 12 ml und einer Diffusionsfläche von 176,71 mm² durchgeführt. Als Akzeptormedium wird natriumchloridhaltiger Phosphatpuffer pH 7,4 R Ph. Eur. verwendet.

Ein Wasserbad (Polycarbonat-Wasserbad T020, Lauda Dr. R. Wobser GmbH & Co. KG, DE-Lauda-Königshofen) wird mit Aqua purificata befüllt und mit einem Thermostat (Alpha, Lauda Dr. R. Wobser GmbH & Co. KG, DE-Lauda-Königshofen) auf 32 °C temperiert. Dies entspricht der natürlichen Hautoberflächentemperatur *in vivo*. Eine Magnetrührerplatte mit mehreren Stellflächen (Poly 15, Thermo Fisher Scientific Inc., US-Waltham) wird unter das Wasserbad gestellt und auf eine Umdrehungsgeschwindigkeit von 500 UpM eingestellt.

Der Schliff der Franz-Diffusionszellen wird mit Schliff fett (Laborfett glisseal HV, Borer Chemie AG, CH-Zuchwill) gefettet. Dabei ist genau darauf zu achten, dass kein Schliff fett in das Donor- oder Akzeptorkompartiment gelangt. Die Akzeptorkompartimente der Franz-Diffusionszellen werden mit entgastem, auf 32 °C temperiertem Akzeptormedium befüllt und jeweils ein Magnetrührstäbchen (Stirring Bars Micro 10 x 0,3 mm, VWR International, US-Radnor) durch den Probenzugsarm zugegeben. Die wie unter Punkt 2.2.3.2.2 bzw. 2.2.3.3 beschrieben präparierten Hautproben der Schweineohren werden mit der Dermis nach unten auf das Akzeptorkompartiment aufgelegt und das Donorkompartiment aufgesetzt. Die zusammengesetzten Franz-Diffusionszellen werden mit jeweils einer Metallklammer (Gauer Glas, DE-Püttingen) dicht verschlossen und fixiert. Über den Probenzugsarm

wird das Akzeptormedium luftblasenfrei bis zur Markierung aufgefüllt. Hierbei ist drauf zu achten, dass keine Luftblase unter der Haut zurückbleibt. Nun werden die Franz-Diffusionszellen in einem Gestell zur Fixierung der Franz-Diffusionszellen (Eigenanfertigung, Werkstatt des Pharmazeutischen Instituts, DE-Tübingen) auf die Magnetrührplatte (Poly 15, Thermo Fisher Scientific Inc., US-Waltham) im Wasserbad (T020, Lauda Dr. R. Wobser GmbH & Co. KG, DE-Lauda-Königshofen) gestellt und bei 32 °C temperiert. Nach einer Äquilibrationdauer von 30 min kann die Formulierung aufgebracht werden. Anschließend wird das Donorkompartiment mit Parafilm (Bemis Company Inc., US-Oshkosh) verschlossen und der Probenzugsarm mit einem Mikroreaktionsgefäß (Micro-centrifuge tubes, 2 ml, VWR International, US-Radnor) abgedeckt, um Verdunsten von Wasser zu verhindern.

2.2.3.6 *In vitro* Permeationsstudien

Die *in vitro* Permeationsstudien werden mit modifizierten Franz-Diffusionszellen (Gauer Glas, DE-Püttingen) mit einem Akzeptorvolumen von 12 ml und einer Diffusionsfläche von 1,767 cm² durchgeführt. Als Akzeptormedium wird natriumchloridhaltiger Phosphatpuffer pH 7,4 R Ph. Eur. verwendet.

Der Permeationsversuch wird wie unter Punkt 2.2.3.5 beschrieben vorbereitet. Nach der Äquilibrationszeit von 30 min kann die Formulierung, das 0,5%ige Timolol-Gel, aufgebracht werden. Dieses wird aus dem Kühlschrank (Kühl- und Gefrierkombination Premium, Liebherr-International, CH-Bulle) entnommen, luftblasenfrei in einer 1,0 ml Spritze (Injekt-F 1 ml, B. Braun Melsungen AG, DE-Melsungen) aufgezogen und eine definierte Menge von 0,078 g des 0,5%igen Timolol-Gels aufgebracht. Die Formulierung wird dabei vorsichtig gleichmäßig auf der gesamten Permeationsfläche verteilt. Anschließend wird das Donorkompartiment mit Parafilm (Bemis Company Inc., US-Oshkosh) verschlossen, um einen Okklusionseffekt zu erreichen.

Die Dauer des Experiments beträgt 24 h. Während der Permeationsuntersuchung werden mit einer 1 ml Spritze (Injekt-F 1 ml, B. Braun Melsungen AG, DE-Melsungen) und einer langen Kanüle (Sterican 0,80 x 120 mm, B. Braun Melsungen)

AG, DE-Melungen) nach 1, 3, 5, 20, 22 und 24 h jeweils 1 ml Aliquots entnommen, in HPLC Vials (Crip nec vials, Machery-Nagel GmbH & Co. KG, DE-Düren) gefüllt und mit einer Bördelkappe (Machery-Nagel GmbH & Co. KG, DE-Düren) verkrimpt. Vor der Probenentnahme muss das in der Franz-Diffusionszelle enthaltene Akzeptormedium durch eine Auf- und Abwärtsbewegung des Spritzenkolbens durchmischt werden. Das entnommene Volumen wird unmittelbar nach dem Probenzug durch frisches, vorgewärmtes Akzeptormedium ersetzt. Nach der Entnahme des Probenzugs nach 24 h können die Franz-Diffusionszellen aus dem Wasserbad entnommen werden. Die entnommenen Proben werden mittels HPLC analysiert (2.2.3.7).

Für jeden Zeitpunkt wird die entnommene Masse an Timolol berechnet (Formel 2.2-7). Anschließend kann die kumulativ freigesetzte Masse an Timolol pro Permeationsfläche berechnet werden (Formel 2.2-8).

$$m(\text{Timolol})_{\text{Entnahme},t}[\mu\text{g}] = c(\text{Timolol})_t \left[\frac{\mu\text{g}}{\text{ml}} \right] * V(\text{Probenzug})[\text{ml}]$$

Formel 2.2-7: Berechnung der zum Zeitpunkt t [h] aus dem Akzeptorkompartiment entnommenen Masse an Timolol [µg].

$m(\text{Timolol})_{\text{Entnahme},t} [\mu\text{g}]$	= Zum Zeitpunkt t aus dem Akzeptorkompartiment entnommene Masse Timolol
t [h]	= Zeitpunkt der Probenentnahme
$c(\text{Timolol})_t [\mu\text{g}/\text{ml}]$	= Zum Zeitpunkt t analysierter Gehalt an Timolol
$V(\text{Probenzug}) [\text{ml}]$	= Volumen des aus dem Akzeptormedium entnommenen Probenzugs

$$m(\text{Timolol})_{\text{kumulativ},t} \left[\frac{\mu\text{g}}{\text{cm}^2} \right] = \frac{\left(c(\text{Timolol})_t \left[\frac{\mu\text{g}}{\text{ml}} \right] * V(\text{Akzeptorkompartiment}) [\text{ml}] \right) + \sum_{t=1}^{t-1} m(\text{Timolol})_{\text{Entnahme}}}{A(\text{Haut}) [\text{cm}^2]}$$

Formel 2.2-8: Berechnung der permeierten Masse an Timolol pro Permeationsfläche [$\mu\text{g}/\text{cm}^2$].

$m(\text{Timolol})_{\text{kumulativ},t}$ [$\mu\text{g}/\text{cm}^2$]	= Zum Zeitpunkt t permeierte Masse an Timolol pro Permeationsfläche
t [h]	= Zeitpunkt der Probennahme
$c(\text{Timolol})_t$ [$\mu\text{g}/\text{ml}$]	= Zum Zeitpunkt t analysierter Gehalt an Timolol
$V(\text{Akzeptorkompartiment})$ [ml]	= Volumen des aus dem Akzeptorkompartiments
$m(\text{Timolol})_{\text{Entnahme}}$ [μg]	= Aus dem Akzeptorkompartiment entnommene Masse an Timolol bis zum Zeitpunkt t
A (Haut) [cm^2]	Permeationsfläche der Haut

Die verwendeten Hautproben werden wie unter Punkt 2.2.3.9.1 beschrieben weiterverarbeitet und die Dicke des auf der Probe vorhandenen Stratum corneums bestimmt (1.4.4.3). Aus jedem Spendertier werden jeweils 3 Hautproben ohne angewendete Klebebandabrisstechnik und jeweils 3 Hauptproben mit 3, 6, 9 oder 12-mal durchgeführter Klebebandabrisstechnik, also insgesamt 15 Hautproben analysiert. Nach Bestimmung der pro Hautprobe vorhandenen SC Dicke kann ein Zusammenhang zwischen der kumulativ permeierten Menge an Timolol pro Flächeneinheit in Abhängigkeit der vorhandenen SC Dicke erstellt werden.

2.2.3.7 HPLC-UV-Analytik zur Bestimmung des Timololgehalts der Permeationsstudien

Die HPLC-UV-Detektionsmethode wird nach einer von Morsi et al. (2016) entwickelten Methodik zur HPLC-UV-Analyse von Timolol modifiziert und durchgeführt.

Die HPLC-Analytik wird mit einem „LC-20-A prominence“ HPLC System (Shimadzu, JP-Kyoto) durchgeführt. Verwendet wird eine HPLC Säule des Typs „EC 250/4 Nucleosil 100-5 C18“ (Machery-Nagel GmbH & Co. KG, DE-Düren) mit einer

Vorsäule des Typs „EC 4/3 Universal RP“ (Machery-Nagel GmbH & Co. KG, DE-Düren).

Die Temperatur des Säulen-Ofens wird auf 45 °C festgelegt. Das Fließmittel besteht aus 60 % Acetonitril (Avantor Performance Materials B.V., NL-Deventer) und 0,2 % Triethylamin (Sigma-Adrich Chemie GmbH, DE-Steinheim). Die Flussrate beträgt 1,000 ml/min. Es werden 100 µl Probenvolumen injiziert. Timolol wird bei einer Wellenlänge von 294 nm nach ungefähr 1,4 min detektiert.

2.2.3.8 Histologische Methode zur Bestimmung der Stratum corneum-Dicke

Die Histologische Untersuchung zur Bestimmung der SC Dicke wird nach einer von Zhang und Lunter (2018) Methodik durchgeführt.

2.2.3.8.1 Anfertigung von Gewebeschnitten mittels Kryotom

Nach der Generierung unterschiedlicher Hautreifegrade mittels Klebebandabrisstechnik (2.2.3.3), bei dem an jeweils 3 Hautproben 0, 3, 6, 9 oder 12-mal Klebebandabrisse durchgeführt werden, soll die Menge des noch vorhandenen Stratum corneums auf den Hautproben bestimmt werden. Hierfür werden von den Hautproben nach Beendigung der festgelegten Anzahl an Klebebandabrissen mit einem Locheisen (Henkellocheisen Turnus Werkzeugfabrik 15 mm, Eduard Gottfried Ferne GmbH, DE-Remscheid) runde Hautstücke mit einem Durchmesser von 15 mm ausgestanzt. Die Hautstücke werden mit einem Papiertuch (Wepa Apothekenbedarf GmbH & Co. KG, DE-Hillscheid) vorsichtig trockengetupft und in Aluminiumbehältnisse zum Einfrieren der Hautproben (Eigenanfertigung, Werkstatt des Pharmazeutischen Instituts, DE-Tübingen) eingelegt. Diese Behältnisse ermöglichen ein flaches Einfrieren der Proben, was das Anfertigen von Gewebeschnitten erleichtert. Die mit den Hautproben bestückten Aluminiumbehältnisse zum Einfrieren der Hautproben (Eigenanfertigung, Werkstatt des Pharmazeutischen Instituts, DE-Tübingen) werden vorsichtig mit einer

Tiegelzange in ein mit flüssigem Stickstoff gefülltes Dewargefäß gelegt und die Hautproben eingefroren.

Das Anfertigen von Querschnitten einer Dicke von 16 µm erfolgt mit einem Kryo-Mikrotom (Micom HM 560, Thermo Fisher Scientific Inc., US-Waltham). Hierfür werden die eingefrorenen Hautproben aus den Aluminiumbehältnissen zum Einfrieren der Hautproben (Eigenanfertigung, Werkstatt des Pharmazeutischen Instituts, DE-Tübingen) entnommen. Aus Aluminiumfolie (FORA GmbH, DE-Radolfzell) wird ein kleiner Zylinder mit einem Durchmesser von ungefähr 15 mm geformt und dieser ungefähr 3 mm hoch mit Einbettmedium (NEG 50, Thermo Fisher Scientific Inc., US-Waltham) gefüllt. Darin wird die eingefrorene Hautprobe mittels einer Pinzette so positioniert, dass sich die Hautoberfläche senkrecht zum Boden des Aluminiumzylinders befindet. In dieser Position wird die Hautprobe und durch das Einbettmedium (NEG 50, Thermo Fisher Scientific Inc., US-Waltham) fixiert, indem es bei -60 °C auf der Schnellkühlplatte des Kryo-Mikrotoms gestellt wird (Micom HM 560, Thermo Fisher Scientific Inc., US-Waltham). Die gefrorene in Gewebe fixierendes Medium eingebettete Hautprobe wird anschließend aus dem Aluminiumzylinder entnommen und auf einem Objekteller des Kryo-Mikrotoms fixiert. Dieser Objekteller wird dann auf der Objekthalterung des Kryo-Mikrotoms eingespannt und so positioniert, dass sich die Klinge (MX Premier+ Microtome Blade, Thermo Fisher Scientific Inc., US-Waltham) des Kryo-Mikrotoms lotrecht zur Hautoberfläche befindet. Die Objekttemperatur wird auf -40 °C und die Temperatur der Klinge auf -35 °C eingestellt. Lotrecht zur Hautoberfläche werden Schnitte mit einer Dicke von 16 µm angefertigt und auf einem Objektträger (Microscope Slides, VWR International, US-Radnor) fixiert. Diese Hautschnitte können anschließend angefärbt und unter dem Lichtmikroskop ausgewertet werden (2.2.3.8.2). Die kurzzeitige Lagerung der Hautschnitte bis zur Färbung und Auswertung erfolgt bei Raumtemperatur.

2.2.3.8.2 Anfärben der Gewebeschnitte

Die nach Kapitel 2.2.3.8.1 angefertigten Gewebeschnitte werden mit 1 bis 2 Tropfen einer 1%igen wässrigen Lösung von Safranin O (C. I. 50240, Carl Roth GmbH & Co.

KG, DE-Karlsruhe) beträufelt und nach 1 min Inkubation für 30 sek mit RO-Wasser (ELGA Purelab Option-Q, ELGA Labwater GmbH, DE-Celle) gespült. Safranin ergibt eine klar, gerötete Intensivierung der interzellulären Bestandteile des SCs (Christophers and Kligman, 1964).

Die abgeflachten Zellen des SCs liegen mit einer Dicke unterhalb eines Mikrometers sehr nahe am Auflösungslimit von Lichtmikroskopen. Christophers und Kligman (1964) beobachteten jedoch, dass sie in alkalischer Lösung sehr stark quellen. Dies stellt eine einfache Möglichkeit dar, um Zellschichten des SCs unter dem Lichtmikroskop zu zählen. Die Gewebeschnitte werden deshalb nach dem Waschvorgang mit Wasser mit 1 bis 2 Tropfen einer 2%igen Kaliumhydroxid-Lösung beträufelt und ein Deckglas (22 x 22 mm, VWR International, US-Radnor) aufgelegt. Nach einer Einwirkzeit von 20 min werden die Schnitte innerhalb von 10 min mit einem Lichtmikroskop, kombiniert mit einer Digitalkamera (Axio Imager.Z1, Carl Zeiss Jena GmbH, DE-Jena) visualisiert. Diese Zeit sollte unbedingt eingehalten werden, um das Verdunsten von Wasser zu vermeiden und eine Rekristallisation von Kaliumhydroxid zu verhindern. Die Anzahl der Corneozytenschichten wird an 3 unterschiedlichen Stellen gezählt, Bereiche mit Schweißdrüsen und Haarfollikeln werden vermieden.

2.2.3.9 Konfokale Raman-Mikroskopie zur Bestimmung der Stratum corneum Dicke

Die Bestimmung der Dicke des SCs mittels konfokaler Raman-Mikroskopie wurde nach einer von Zhang und Lunter (2018) entwickelten Methodik durchgeführt.

2.2.3.9.1 Isolation des Stratum corneums der Hautproben

Nach der Durchführung der *in vitro* Permeationsstudien (2.2.3.6) werden die verwendeten Hautproben aus den Franz-Diffusionszellen entnommen. Ein Filterpapier wird in eine Petrischale (94 x 16, Greiner bio-one GmbH, DE-Frickenhausen) gelegt und mit einer 0,2%igen wässrigen Trypsin-Lösung (Trypsin

from porcine pancreas, type II-S (lyophilized powder, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, DE-Steinheim) befeuchtet. Die Hautstücke werden mit dem SC nach oben aufgelegt, vorsichtig angedrückt und mit 0,2%iger Trypsinlösung (lyophilized powder, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, DE-Steinheim) überschichtet. Die Hautstücke werden für 5 h inkubiert. Anschließend wird das isolierte SC vorsichtig mit einer abgeflachten Pinzette von der Unterhaut abgelöst und für 2 min in eine 0,5%ige Lösung von Trypsin-Inhibitor (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, DE-Steinheim) gegeben. Das SC wird entnommen und mindestens 5 Mal mit RO-Wasser (ELGA Purelab Option-Q, ELGA Labwater GmbH, DE-Celle) gespült. Das isolierte, gereingte SC wird auf einem Objektträger (Microscope Slides, VWR International, US-Radnor) aufgenommen und für mindestens 72 h in einem Exsikkator über Silikagel (Silica gel orange, Carl Roth GmbH & Co. KG, DE-Karlsruhe) getrocknet. Nun kann die Dicke des SCs mittels konfokaler Raman-Mikroskopie (2.2.3.9.2) bestimmt werden.

2.2.3.9.2 Vermessung der Stratum corneum-Dicke mittels Konfokaler Raman-Mikroskopie

Das isolierte und getrocknete SC (2.2.3.9.1) wird aus dem Exsikkator entnommen und unmittelbar mittels konfokaler Raman-Mikroskopie vermessen.

Verwendet wird ein alpha 500 konfokales Raman-Mikroskop (WiTech GmbH, DE-Ulm), ausgestattet mit einem Spektrometer UHTS 300 (WiTech GmbH, DE-Ulm) und einer CCD-Kamera DV401-BV (WiTech GmbH, DE-Ulm) und eine Anregungswellenlänge von 523 nm. Um das Licht auf das SC zu fokussieren und gestreutes Licht einzusammeln wird ein 100x Objektiv (numerische Apertur 0,9, EC Epiplan-neofluor, Carl Zeiss, Deutschland) genutzt. Das zurückgestreute Licht der Proben wird durch ein optisches Gitter gestreut und auf ein ladungsgekoppeltes Gerät, dem DV401-BV CCD Detektor (WiTech GmbH, DE-Ulm) projiziert. Eine Kühlung erfolgt bei -60 °C. Vor Versuchsbeginn wird die Laserintensität mit einem optischen Leistungsmesser (PM100D, Thorlabs GmbH, DE-Dachau) auf 10 mW, gemessen als Intensität vor dem Objektiv, eingestellt.

Die Keratin-Bande ($\nu(\text{CH}_3)$, 2800 – 3000 cm^{-1}) wird genutzt, um die Dicke des SCs zu bestimmen. Zunächst wird die oberste Schicht des SC lichtmikroskopisch fokussiert. Der Tiefenscan wird von einem Punkt 50 μm oberhalb der lichtmikroskopisch bestimmten Position der SC Oberfläche gestartet und schrittweise in 1 μm Schritten durch das SC bis zu einem Punkt 50 μm unterhalb der lichtmikroskopisch bestimmten Position der SC Oberfläche durchgeführt. Die Fläche des Keratin Signals wird extrahiert und gegen die Tiefe geplottet. Die Gesamtbreite des halben Maximums dieses Kurvenpeaks ergibt die Dicke des SC in μm . Jedes Einzelspektrum wird unter Verwendung eines 100x Objektivs (numerische Apertur 0,9, EC Epiplan-neofluor, Carl Zeiss, Deutschland) mit einem Gitter von 1800 g/mm, einer Expositionszeit von 2,000 sek und 1 Akkumulation in jedem Punkt gemessen. Bei jeder Probe wird an 3 unterschiedlichen, zufällig gewählten Stellen, die Dicke des SC gemessen und der Mittelwert berechnet.

2.2.4 Entwicklung eines PBPK Modells des menschlichen Organismus

Zur Entwicklung und Implementierung eines PBPK Modells des Organismus wird das Computerprogramm Matlab R2018a (Mathworks Inc., US-Nattick) verwendet.

2.2.4.1 Erstellung der Kompartimente

Der Aufbau des Modells orientiert sich an Publikationen von Igari et al. (1983), Leggett et al. (2003) und Poulin und Theil (2002). Betrachtet werden Lunge, Gehirn, Herz, (Skelett-)Muskulatur, Knochen, Fettgewebe, Gastrointestinaltrakt (GIT), Leber und Niere. Unter dem Begriff „Andere“ werden fehlende Gewebe und Organe zusammengefasst. Die Kompartimente des Modells sind durch den Blutkreislauf miteinander verbunden. Der Input des Arzneistoffs erfolgt durch die Haut und wird nach der Aufnahme ins Blut zentral im Organismus verteilt. Zur Vereinfachung wird angenommen, dass sich der Wirkstoff in jedem Organ/Gewebe gleichmäßig verteilt und die Verteilung durch die Gewebepерfusion limitiert ist. Als Ausscheidungsorgane werden Leber und Niere betrachtet, da hier der Hauptteil des Wirkstoffs metabolisiert

bzw. ausgeschieden wird (Abbildung 2.2-2) (Mantyla et al., 1983; Volotinen et al., 2011).

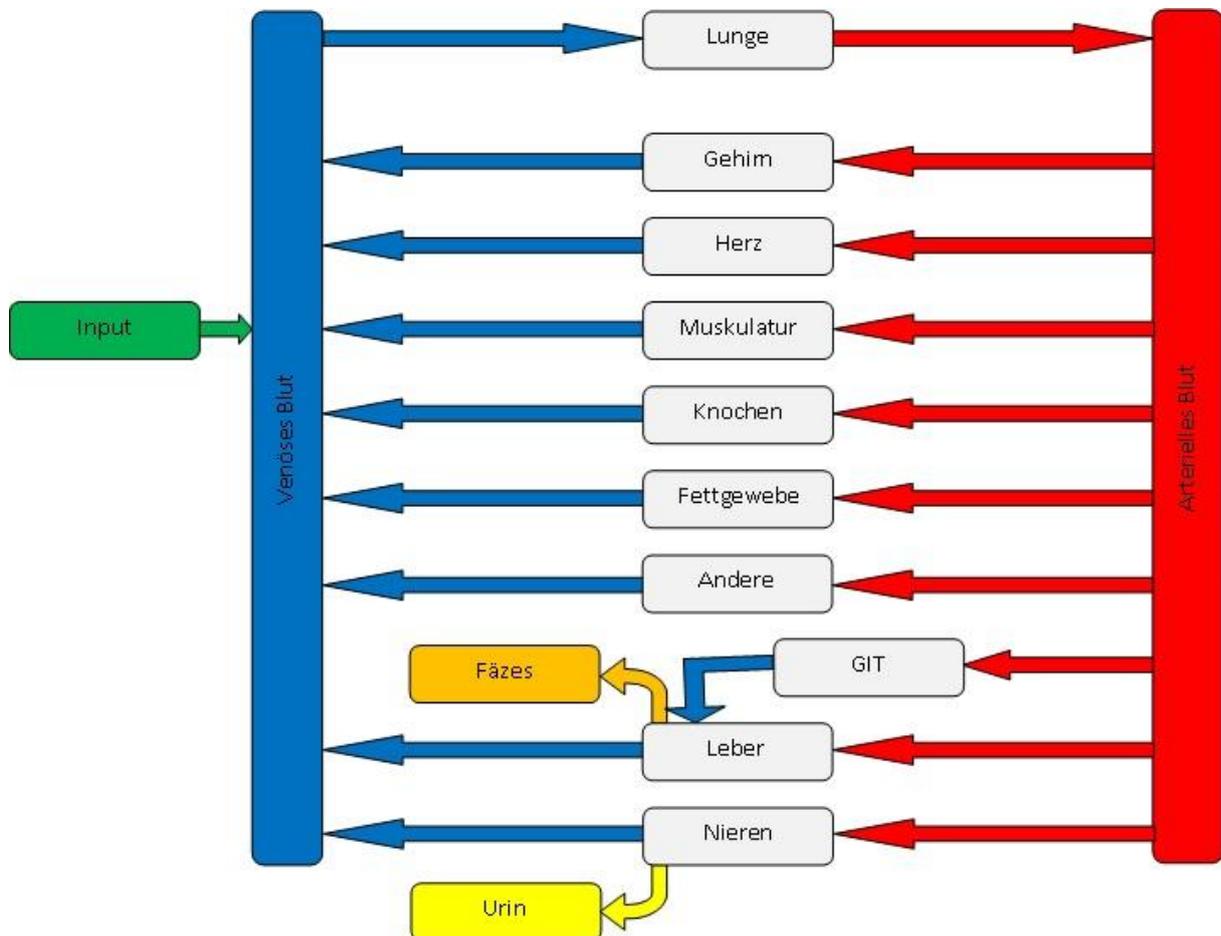


Abbildung 2.2-2: Schematische Übersicht zum Aufbau des entwickelten PBPK Modell des Organismus.

Nach der Aufnahme des Wirkstoffs über die Haut ins Blut wird er über den Blutkreislauf im Organismus verteilt. Die Ausscheidung erfolgt hauptsächlich über Leber und Nieren.

2.2.4.2 Metabolisierung und Elimination von Timolol

2.2.4.2.1 Verteilung

Für die Vorhersage der Wirkstoffverteilung im Organismus sind Blutmenge, Organperfusion und die Masse der jeweiligen Organe von Bedeutung. Die Gesamtmenge an Blut eines Menschen hängt mit dessen Körpergewicht zusammen. Der Mensch hat ungefähr 80 ml Blut pro Kilogramm Körpergewicht. Ein 70 kg schwerer Mann hätte somit ungefähr 5,6 l Blut, ein neugeborenes Kind mit 3 kg

Körpergewicht 240 ml Blut und ein unreifes Frühgeborenes, mit einem Gewicht von 500 g, 40 ml Blut. Pro Minute wird das gesamte Blut einmal durch den Organismus gepumpt (Blum et al., 2016).

Die Gesamtmenge des Blutes durchströmt in Anteilen alle Organe und Gewebe des Menschen. Die Verteilung eines Stoffes aus dem Blut in ein Gewebe oder Organ kann entweder durch die Perfusionsrate, also die Blutmenge, welche pro Zeiteinheit das Gewebe oder Organ durchströmt, oder die Permeabilität, also die Passage des Stoffes durch die Membran des Gewebes oder Organs bestimmt sein. In der Regel ist die Perfusion der geschwindigkeitsbestimmende Schritt. Auch auf Timolol trifft dies zu (Cheung et al., 2018).

Timolol zeigt, wie andere Betablocker auch, eine sehr ausgeprägte Diffusion in extravaskuläre Kompartimente (Fourtillan et al., 1981). Dies wird durch seine Lipophilie und Proteinbindung verursacht (Else et al., 1978). Ermittelte Verteilungsvolumina liegen zwischen 1,7 (Wilson et al., 1982) und 3,6 l/kg (Fourtillan et al., 1981). Erwartet wird deshalb, dass sich Timolol auch nach einer dermalen Applikation in unterschiedlichen Organen anreichern wird, da insbesondere bei frühgeborenen Kindern mit eingeschränkter Hautbarrierefunktion systemische Wirkstoffkonzentrationen erreicht werden. Das Ausmaß der Anreicherung in den jeweiligen Organen soll mit der Entwicklung des PBPK Modells des Organismus genauer untersucht werden.

Die Verteilung eines Stoffes aus dem Blut in ein Gewebe oder Organ wird durch Verteilungskoeffizienten wiedergegeben. Der Verteilungskoeffizient K_p beschreibt die Verteilung eines Stoffes zwischen Gewebe und Plasma. Der Verteilungskoeffizient K_{pu} beschreibt die Verteilung eines Stoffes zwischen Gewebe und der im Plasma ungebundenen Stofffraktion (Rodgers et al., 2005b). Ein Teil des Wirkstoffs liegt im Plasma an Proteine gebunden vor. Da nur ungebundener Wirkstoff in der Lage ist, Zellmembranen zu passieren, ist ein Parameter, welcher sich nur auf die Menge an ungebundenem Wirkstoff bezieht, also der K_{pu} -Wert, zu bevorzugen. Auch beim Extrapolieren von Werten zwischen verschiedenen Tierspezies variiert die Plasmaproteinbindung von Wirkstoffen oftmals sehr stark. Es ist deshalb sinnvoll, hier die im Plasma ungebundene Stofffraktion f_u zu berücksichtigen (Rodgers et al., 2005a; Sawada et al., 1984). Bei Enantiomeren sind sehr große Unterschiede

zwischen den Kp-Werten zu beobachten. Diese verschwinden im Wesentlichen bei der Betrachtung der Kpu-Werte. Der Unterschied zwischen den Kp-Werten scheint deshalb hauptsächlich durch die unterschiedliche Plasmaproteinbindung verursacht zu sein (Rodgers et al., 2005a, b). Der Kp-Wert lässt sich aus dem Kpu-Wert berechnen, indem dieser mit f_u multipliziert wird (Rodgers et al., 2005a).

Die experimentelle Bestimmung von Verteilungskonstanten für jedes Gewebe ist sehr schwierig und aufwändig. In den letzten Jahren wurden sehr große Anstrengungen unternommen, um Verteilungskoeffizienten zu bestimmen. Hauptsächlich erfolgte dies in Ratten (Cheung et al., 2018). Durch wirkstoffspezifische f_u -Werte des Menschen lassen sich diese tierischen Kpu-Werte in Kp-Werte des Menschen umwandeln.

In der nachfolgenden Tabelle 2.2-1 sind die prozentualen Anteile an kardialem Auswurf des Blutes für einen Standardmensch nach einer Publikation von Williams und Leggett (1989) aufgelistet. Die dazugehörigen Organvolumina nach einer Publikation von Poulin und Theil (2009) sind ebenfalls aufgeführt. Da es sich um ein vereinfachtes Modell des Organismus handelt, werden nicht alle Organe des Menschen aufgeführt. Die fehlenden Organe und Gewebe sind jeweils unter „Andere“ zusammengefasst aufgeführt. Die dazugehörigen Kpu-Werte und Kp-Werte nach Rodgers et al. (2005a) und Rodgers und Rowland (2007) sind ebenfalls aufgeführt.

Tabelle 2.2-1: Übersicht über Organvolumina, Organdurchblutung, Kpu- und Kp-Werten

Organ/Gewebe	Organvolumen	Anteil an	Kpu	Kp
	[l/kg] Nach Poulin und Theil (2009)	kardialem Auswurf Nach Williams und Leggett (1989)	In vivo Ratte Nach Rodgers et al. (2005a)	Berechnet mit f_u des Menschen Nach Rodgers und Rowland (2007)
Lunge	0,0131	1,000	42,60	17,040
Fettgewebe	0,1490	0,050	1,03	0,412
Knochen	0,1323	0,050	1,57	0,628
Gehirn	0,0213	0,120	1,66	0,664
Herz	0,0044	0,040	8,50	3,400
Muskulatur	0,4841	0,170	6,59	2,636
GIT	0,0264	0,150	32,00	12,800
Leber	0,0360	0,065	14,20	5,680
Niere	0,0044	0,190	21,30	8,520
Andere	0,1290	0,165	11,23	4,492

Für die Berechnung der K_p -Werte wurde der f_u -Wert (0,4) nach Rodgers und Rowland (2007) verwendet und mit dem K_{pu} -Wert multipliziert. Das Blut zu Plasma Konzentrationsverhältnis R von Timolol beträgt in Menschen 0,81 (Rodgers and Rowland, 2007).

2.2.4.2.2 Metabolisierung

Der Hauptort für die Metabolisierung von Timolol ist die Leber (Volotinen et al., 2011). Untersuchungen von Lowenthal et al. (1978) bestätigen dies. Sie untersuchten in einer Studie die Elimination von Timolol nach oraler Applikation bei Patienten mit chronischer renaler Insuffizienz einer moderaten oder schweren Form und konnten zeigen, dass die Elimination dadurch nicht beeinträchtigt wird.

Die totale Clearance von Timolol wird in der Literatur mit Werten zwischen 540 ml/min (Wilson et al., 1982) und 1532,4 ml/min (Fourtillan et al., 1981) beschrieben. Eine mittlere renale Clearance mit Werten zwischen 69,6 ml/min (Lowenthal et al., 1978) und 172,8 ml/min (Fourtillan et al., 1981) ergibt einen Exkretionsfaktor der Niere von 0,123 (Fourtillan et al., 1981). Ungefähr 12 % (Fourtillan et al., 1981) bis 20 % (Ishizaki et al., 1978) der Wirkstoffelimination erfolgen somit über die Niere mit dem Urin. Eine Studie von Mantyla et al. (1983), welche eine Metabolisierung von ungefähr 90 % und eine unveränderte Ausscheidung der restlichen 10 % postuliert, stimmt mit diesen Ergebnissen ebenfalls gut überein. Im Urin sind somit zwischen 5 % (Else et al., 1978) und 20 % (Tocco et al., 1975a) der applizierten Dosis an unverändert ausgeschiedenem Wirkstoff zu wiederzufinden.

Die Metabolisierung erfolgt mit über 90 % überwiegend durch CYP2D6, CYP2C19 spielt mit weniger als 10 % nur eine untergeordnete Rolle (Volotinen et al., 2011; Volotinen et al., 2007).

2.2.4.2.3 Elimination

Sowohl Else et al. (1978) als auch Wilson et al. (1982) konnten zeigen, dass die Eliminationshalbwertszeit nach oraler und systemischer Applikation keinen signifikanten Unterschied zeigt. *In vivo* untersuchte Werte liegen zwischen 2 und 5 h.

2.2.4.2.4 Übersicht

In der nachfolgenden Tabelle sind Literaturwerte zu Verteilungsvolumina, Urinausscheidung, Eliminationshalbwertszeit, renaler Clearance, totaler Clearance und Exkretionsfaktor aufgelistet. Aus den verfügbaren Daten wird jeweils der arithmetische Mittelwert gebildet und für das entwickelte PBPK Modell verwendet.

Tabelle 2.2-2: Übersicht zu Literaturwerten zum Metabolismus von Timolol.

Publikation	(Else et al., 1978)	(Fourtillan et al., 1981)	(Mantyla et al., 1983)	(Tocco et al., 1975b)	(Eldridge, Rashid, 1981)	(Tocco et al., 1975a)	(Lowenthal et al., 1978)	(Ishizaki et al., 1978)	(Wilson et al., 1982)	(Volotinen et al., 2011)	arithmetisches Mittelwert
Verteilungsvolumen [l/kg]	3,5	3,64 ±0,89	-	-	-	-	-	1,81 ±0,15	1,697 ±0,241	2,5	2,6
Urinausscheidung [%]	5	15,3 ±2,3	11,1 ±1,4	20	-	20	13,1 ±8,0	17 ±4	-	-	14,5
Eliminationshalbwertszeit [h]	4,86	2,62 ±0,17	2,9 ±0,3	5,5	-	3	5,2 ±2,6	3,2 ±0,2	2,7 ±0,5	2,9	3,65
Renale Clearance [ml/min]	-	172,8 ±30,0	97,2 ±10,1	-	-	-	69,6 ±27	100 ±7	-	180	123,9
Totale Clearance [ml/min]	-	1532,41 ±365,2	751,5 ±90,6	-	-	-	-	557 ±61	540 ±86	700	816,2
Exkretionsfaktor	-	0,123 ±0,014	-	-	-	-	-	0,180	-	-	0,152

2.2.4.3 Implementierung des PBPK Modells des menschlichen Organismus

Die Implementierung des PBPK Modells des menschlichen Organismus orientiert sich an der Publikation von Poulin und Theil (2002), welches die Organe des Organismus in nicht eliminierendes Gewebe, eliminierendes Gewebe und Lunge einteilt. Im folgenden Abschnitt ist schrittweise erläutert, wie das entwickelte Modell implementiert wurde. Der vollständige Quellcode des Modells befindet sich im Anhang in Kapitel 6.3.3.

Im Simulationsmodell wird zunächst für jedes Organ eine Funktion definiert. Hierbei wird, orientiert an der Publikation von Poulin und Theil (2002) unterschieden zwischen nicht eliminierenden Organen (Gehirn, Herz, (Skelett-)Muskulatur, Knochen, Fettgewebe, Andere) und eliminierenden Organen (Leber, Niere). Da das Blut aus dem Gastrointestinaltrakt über die Leberpfortader in die Leber fließt, werden Gastrointestinaltrakt und Leber zusammen definiert. Die Lunge wird extra aufgeführt, da durch sie das gesamte venöse Blut strömt und mit Sauerstoff angereichert als arterielles Blut die Lunge verlässt.

2.2.4.3.1 Nicht eliminierende Organe

Zu den nicht eliminierenden Organen werden Fettgewebe, Knochen, Gehirn, Herz, Muskulatur und die fehlenden Kompartimente, welche unter dem Begriff „Andere“ zusammengefasst sind, gezählt. Diese Organe/Gewebe werden von arteriellem Blut durchströmt. Je nach Verteilungskoeffizient geht ein Teil des Arzneistoffs in das Organ/Gewebe über, der restliche Teil verbleibt im Blut, welches als venöses Blut das Organ verlässt.

Die Wirkstoffmenge, welche durch das Organ strömt, berechnet sich aus der aktuellen arteriellen Wirkstoffkonzentration (bezeichnet als C_{Art}) und der Blutmenge, welche dieses Organ durchströmt (bezeichnet als Q_{Organ}).

Die aktuelle Wirkstoffkonzentration im Organ wird als ist-Konzentration bezeichnet (bezeichnet als $C_{Organ_{ist}}$). Sie berechnet sich aus der Wirkstoffmenge im arteriellen Blut (bezeichnet als m_{Art}), der bereits im Organ vorliegenden

Wirkstoffmenge (bezeichnet als $m_{\text{Organ_alt}}$) und dem Organvolumen (bezeichnet als V_{Organ}).

Ein Teil des Wirkstoffs reichert sich im Organ an, der restliche Teil des Wirkstoffs verbleibt im Blut. Der K_p -Wert beschreibt die Wirkstoffverteilung zwischen Gewebe und Plasma. Das Blut-zu-Plasma-Konzentrationsverhältnis R beschreibt die Wirkstoffverteilung zwischen Blut und Plasma. Dividiert man den K_p -Wert (Konzentrationsverhältnis Gewebe:Plasma) durch das Blut-zu-Plasma-Konzentrationsverhältnis R , so erhält man das Konzentrationsverhältnis zwischen Gewebe und Blut. Hieraus lässt sich außerdem die Wirkstoffmenge und Wirkstoffkonzentration berechnen, welche nach diesem Durchgang im Organ zurückbleibt (bezeichnet als $m_{\text{Organ_neu}}$ bzw. $C_{\text{Organ_neu}}$).

2.2.4.3.2 Eliminierende Organe

2.2.4.3.2.1 Gastrointestinaltrakt und Leber

Das Blut des Gastrointestinaltraktes gelangt über die Leberpfortader in die Leber. In der Leber wird ein Teil des Wirkstoffs eliminiert.

Zunächst wird wie oben bereits beschrieben (2.2.4.3.1) die Wirkstoffmenge berechnet, welche im Gastrointestinaltrakt zurückbleibt und welche anschließend aus diesem über die Pfortader weiter zur Leber gelangt (bezeichnet als $m_{\text{GIT_Vene}}$). Die Leber wird zudem über die Leberarterie mit frischem arteriellem Blut versorgt, welches ebenfalls eine bestimmte Wirkstoffkonzentration enthält, und in die Leber übergeht (bezeichnet als $m_{\text{Leber_ist}}$). Diese beiden Mengen müssen also addiert werden (bezeichnet als $m_{\text{Leber_istmitVeneGIT}}$).

Die Eliminationskonstante E beschreibt den Anteil an Wirkstoff, welcher bei dieser Leberpassage durch die Leber eliminiert wird. Die durch die Leber bei dieser Leberpassage ausgeschiedene Wirkstoffmenge wird berechnet (hier bezeichnet als $m_{\text{Leber_Ausscheidung}}$). Anschließend wird die eliminierte Wirkstoffmenge von der vorhandenen Wirkstoffmenge abgezogen.

Analog wie bereits im Abschnitt (2.2.4.3.1) beschrieben, wird nun berechnet, wie sich der noch vorhandene Wirkstoff zwischen Blut und Leber verteilt und welche Wirkstoffmenge nach dieser Leberpassage im venösen System zurückbleibt.

2.2.4.3.2 Niere

Die Niere ist wie die Leber ebenfalls ein Eliminationsorgan, auch hier wird durch eine Eliminationskonstante E beschrieben, welcher Anteil des Wirkstoffs bei dieser Nierenpassage durch die Niere eliminiert wird. Die Berechnungen erfolgen analog zu Abschnitt (2.2.4.3.1) und (2.2.4.3.2.1). Zunächst wird die aktuelle Wirkstoffmenge in der Niere berechnet (bezeichnet als $m_{\text{Niere_ist}}$) und die in diesem Durchgang ausgeschiedene Wirkstoffmenge ($m_{\text{Niere_Ausscheidung}}$). Nach Abzug der ausgeschiedenen Wirkstoffmenge von der aktuellen Wirkstoffmenge ($m_{\text{Niere_istnachAusscheidung}}$) wird wieder berechnet, welcher Wirkstoffanteil in der Niere zurückbleibt und welche Wirkstoffmenge mit dem venösen Blut die Niere verlässt.

2.2.4.3.3 Lunge

Die Lunge wird vom gesamten venösen Blut durchströmt und sättigt es mit Sauerstoff. Ein Teil des Arzneistoffs reichert sich in der Lunge an, der Rest wird über das arterielle System mit dem Blutkreislauf im restlichen Organismus verteilt.

2.2.4.3.4 Blutkreislauf

Im Simulationsmodell wird zunächst die vorhandene Blutmenge (bezeichnet als Q_{Gesamt}) in Abhängigkeit des Körpergewichts (bezeichnet als kg_{KG}) definiert. Sie kann somit an den jeweiligen Reifegrad des Kindes angepasst werden. Die Blutmenge wird innerhalb einer Minute einmal komplett durch den Organismus gepumpt. Die Simulationsdauer in Minuten beschreibt somit die Anzahl an

Durchläufen des Blutes durch den gesamten Organismus. Bei einer Simulation von 24 h wären dies somit 1440 Durchläufe.

Nun werden die Blutmengen, welche die jeweiligen Organe durchströmen und die Organvolumina definiert. Der jeweilige Anteil am kardialen Auswurf und die Organvolumina in Abhängigkeit des Körpergewichts wurden bereits in Tabelle 2.2-1 aufgeführt.

Die arterielle und venöse Wirkstoffkonzentration und die vorhandene Wirkstoffmenge in den Organen werden zu Beginn der Simulation als 0 definiert. Erfolgt vor einer vollständigen Wirkstoffelimination bereits eine erneute Wirkstoffapplikation, so können hier die noch im Organismus vorhandenen Wirkstoffmengen berücksichtigt werden.

Als nächstes muss noch der Zeitverlauf der Wirkstoffanreicherung in den Organen und der Zeitverlauf der Ausscheidung definiert werden.

Nun werden die Iterationen festgelegt. Alle Funktionen, die wie bereits unter Punkt 2.2.4.3.1, 2.2.4.3.2 und 2.2.4.3.3 beschrieben definiert wurden, werden nun aufgerufen und ausgeführt.

Die ausgeschiedene Wirkstoffmenge in Leber und Niere wird aufsummiert.

Die nach einem Durchgang als „neue Werte“ bezeichneten Werte, werden vor dem darauffolgenden Durchgang als „alte Werte“ definiert ($n \rightarrow n+1$)

Die Zeitvektoren werden festgelegt.

Nach einem Durchgang wird die gesamte venöse Wirkstoffkonzentration berechnet. Die Wirkstoffmenge, welche in dieser Zeit durch die Haut gelangt ist, wird ebenfalls addiert.

Am Ende eines Durchgangs gelangt das gesamte arterielle Blut durch die Lunge. Die Funktion, welche unter dem Organ Lunge definiert ist, wird aufgerufen und durchgeführt. Die nach einem Durchgang als „neue Werte“ bezeichneten Werte, werden vor dem darauffolgenden Durchgang als „alte Werte definiert ($n \rightarrow n+1$) und die Zeitvektoren festgelegt. Nun ist dieser Durchgang abgeschlossen.

Aus den berechneten Wirkstoffmengen können auch Wirkstoffkonzentrationen berechnet werden.

Am Ende soll die jeweilige Wirkstoffmenge bzw. Wirkstoffkonzentration eines Organs gegen die Zeit aufgetragen werden. Hierfür wird zunächst der Vektor für die x-Werte definiert und anschließend das Schaubild erstellt.

Außerdem wird die kumulativ ausgeschiedene Wirkstoffmenge in Leber und Niere berechnet und als kumulative Summenkurve dargestellt.

3 Ergebnisse und Diskussion

3.1 Urinproben von Frühgeborenen

Timolol wird bereits seit 2010 als Off-Label Einsatz für die topische Behandlung von IH verwendet (Guo and Ni, 2010; Puttgen et al., 2016) und von Experten empfohlen (Goelz and Poets, 2015). Dennoch gibt es insbesondere für die Hochrisikogruppe der Frühgeborenen keine kontrollierte Studie. Daten zur transdermalen Absorption von Timolol sind bisher ebenfalls nicht vorhanden (Goelz and Poets, 2015; Moehrle et al., 2013).

In dieser Arbeit sollte deshalb untersucht werden, ob und in wenn ja in welchem Größenbereich Timolol nach einer solchen topischen Behandlung im Urin nachgewiesen werden kann. Hierdurch können Rückschlüsse auf systemische Timololkonzentrationen nach einer topischen Behandlung von IH gezogen werden und nützliche Informationen über die transdermale Absorption von Timolol liefern. Durch die zu frühe Geburt der Kinder ist die Hautbarrierefunktion noch nicht oder nur unvollständig ausgebildet und die Hautpermeation von Wirkstoffen entsprechend erhöht. Nach der Geburt verringert sich die Hautpermeation durch eine allmähliche Reifung der Haut wieder (Sekkat et al., 2004a). Erwartet wird deshalb, dass durchaus Timololkonzentrationen im Urin zu finden sind, welche im Laufe der Behandlung aufgrund der allmählichen Reifung der Hautbarrierefunktion und der somit verringerten systemischen Verfügbarkeit wieder absinken.

Im ersten Teil dieser Arbeit wurden Urinproben aus der Neonatologie des Universitätsklinikums Tübingen analytisch untersucht. Die Proben stammten von frühgeborenen Kindern mit IH, welche lokal mit dem Beta-Adrenozeptor-Antagonist Timolol behandelt wurden. Timolol wurde dabei über einen bestimmten Zeitraum hinweg 1 Mal täglich als 0,5%iges Gel topisch auf das IH appliziert und mittels Finn-Chamber, Frischhaltefolie oder Handschuh okkludiert. Der Urin der Kinder wurde mittels Windel einlage aufgefangen und in Proberöhrchen abgefüllt.

Die Aufreinigung der Urinproben und die Extraktion des Timolols erfolgte mittels flüssig-flüssig Extraktion und die anschließende Analyse mittels HPLC-UV-Analytik, welche bereits in Kapitel 2.2.1 beschrieben wurden.

3.1.1 Ergebnisse der Untersuchung der Urinproben von Frühgeborenen mit IH nach lokaler Behandlung mit Timolol

3.1.1.1 Überblick der untersuchten Urinproben

Insgesamt wurden 88 Urinproben von 10 verschiedenen Frühgeborenen mit IH nach lokaler Behandlung mit Timolol untersucht. In der nachfolgenden Abbildung 3.1-1 ist eine Übersicht der untersuchten Urinproben, der Probenanzahl mit nachweisbar enthaltenem Timolol und der Probenanzahl mit bestimmbarer Timololmenge dargestellt.

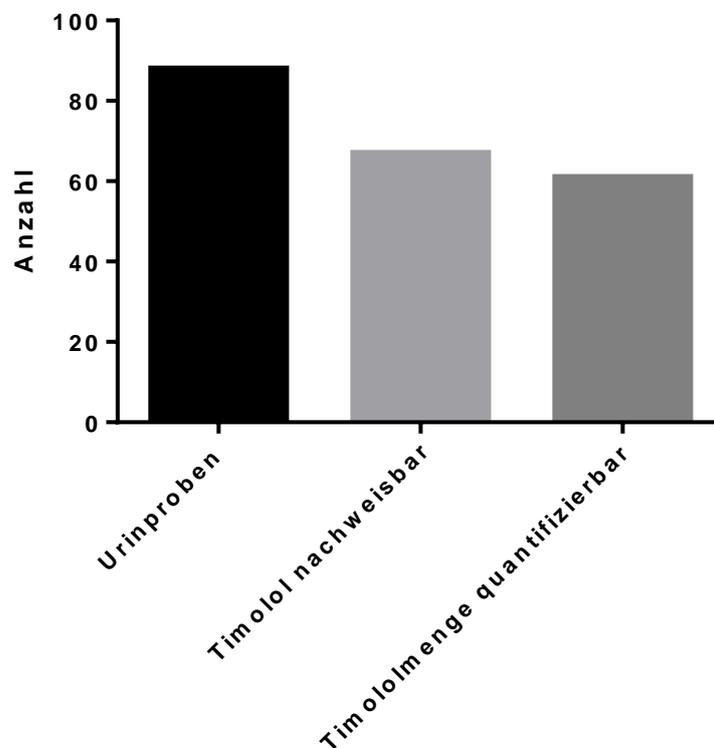


Abbildung 3.1-1: Übersicht der untersuchten Urinproben von Frühgeborenen mit IH nach dermalen Timololbehandlung.

Dargestellt sind die Gesamtzahl aller vermessenen Urinproben, die Anzahl der Proben, in denen Timolol nachweisbar war und die Anzahl der Proben, in denen die Timololmenge quantifizierbar war.

Hierbei konnte in 76 % der analysierten Proben (67 von 88 Proben) Timolol nachgewiesen werden (Nachweisgrenze (Gottwald) 0,004 µg/ml) und in 69 % der analysierten Proben (61 von 88 Proben) die Timololkonzentration quantifiziert

werden (Bestimmungsgrenze (Gottwald) 0,012 µg/ml). Diese lag im Bereich zwischen 0,01 µg/ml und 0,60 µg/ml.

3.1.1.2 Betrachtung der gemessenen Timololkonzentration im Urin in Abhängigkeit des postkonzeptionellen des postnatalen Alters

Bei 4 der 10 Kinder wurden die gemessenen Timololkonzentrationen im Urin in Abhängigkeit vom postkonzeptionellen Alter und dem postnatalen Alter betrachtet. Bei den restlichen Kindern standen nicht ausreichend Proben zur Verfügung oder notwendige Angaben zum Zeitpunkt der Probennahme fehlten. In der nachfolgenden Abbildung 3.1-2 sind die Timololkonzentrationen im Urin in Abhängigkeit von postkonzeptionellen beziehungsweise postnatalen Alter 4 verschiedener Kinder dargestellt.

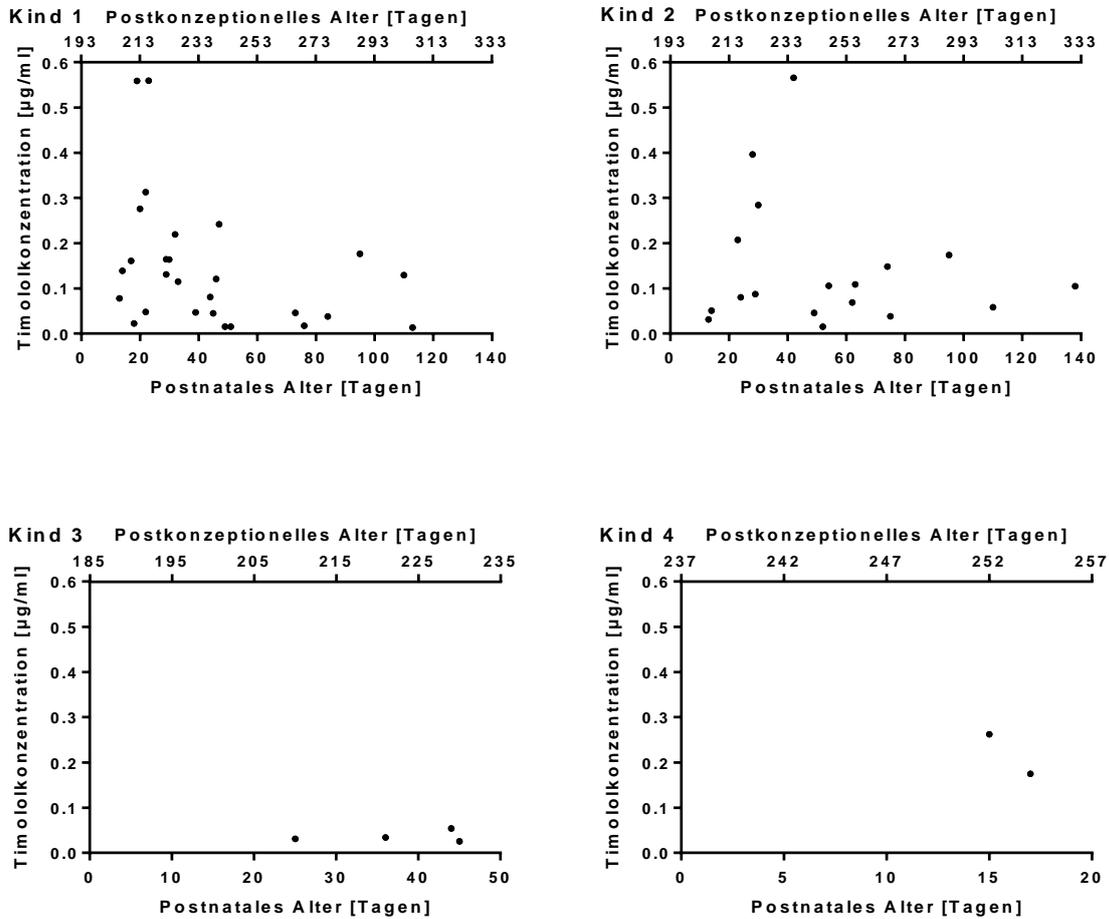


Abbildung 3.1-2: Timololkonzentrationen im Urin in Abhängigkeit von postkonzeptionellem beziehungsweise postnatalem Alter der Kinder 1, 2, 3 und 4.

Das postkonzeptionelle Alter beschreibt die Lebensdauer der Frühgeborenen vor und nach der Geburt, das postnatale Alter beschreibt die Lebensdauer nach der Geburt.

Das postnatale Alter beschreibt die Lebensdauer der Frühgeborenen nach der Geburt. Das postkonzeptionelle Alter ist die Summe von prä- und postnatalem Alter, also die Lebensdauer vor und nach der Geburt.

Die Reifung des SCs, welches für die Hauptbarrierefunktion der Haut verantwortlich ist, beginnt bereits im Uterus nach ungefähr 24 Schwangerschaftswochen (SSW) (Evans and Rutter, 1986; Harding, 2004; Stamatas et al., 2011). Der Reifungsgrad der Haut bei der Geburt hängt somit mit der Schwangerschaftsdauer zusammen. Je

früher ein Kind zur Welt kommt, desto durchlässiger ist somit seine Hautbarriere und desto stärker die Hautpermeation von Wirkstoffen.

Bei Kind 1 und 2 handelt es sich um Zwillinge, welche mit einem Gestationsalter von 193 Tagen (27 4/7 SSW) zur Welt kamen. Kind 3 wurde mit einem Gestationsalter von 185 Tagen (26 3/7 SSW) bereits 1 Woche früher geboren. Kind 4 kam mit einem Gestationsalter von 237 Tagen (33 6/7 SSW) im Vergleich zu den anderen Kindern 6 beziehungsweise 7 Wochen später zur Welt.

Bei alleiniger Betrachtung der Schwangerschaftsdauer wird folglich bei den Kindern 1, 2 und 3 aufgrund einer noch nicht oder nur teilweise ausgebildeten Hautbarrierefunktion eine relativ hohe Wirkstoffpermeation und somit deutlich höhere Timololkonzentrationen im Urin erwartet als vergleichsweise bei Kind 4.

Auffällig ist jedoch, dass die niedrigsten Timololkonzentrationen im Bereich von 0,026 bis 0,054 µg/ml bei Kind 3 gemessen wurden, welches mit dem geringsten Gestationsalter zur Welt kam. Hier wurden aufgrund der geringsten Schwangerschaftsdauer die vergleichsweise höchsten Timololkonzentrationen erwartet. Kind 1 und Kind 2 zeigen sehr ähnliche Messwerte im Bereich zwischen 0,010 und 0,560 µg/ml Timolol. Zu Beginn der Behandlung sind die bestimmten Timololkonzentrationen tendenziell höher und nehmen im Laufe der Behandlungsdauer ab. Bei Kind 4 waren nur 2 Proben auswertbar, diese lagen bei 0,175 und 0,262 µg/ml Timolol und entsprechen in etwa den erwarteten Ergebnissen.

Allerdings spielen bei der Reifung und Entwicklung des SCs nicht nur die Schwangerschaftsdauer, also das pränatale Alter des Kindes, sondern auch die Lebensdauer nach der Geburt, also das postnatale Alter, eine Rolle. Betrachtet werden muss folglich nicht nur die Schwangerschaftsdauer alleine, sondern die gesamte Lebensdauer vor und nach der Geburt, also das postkonzeptionelle Alter.

Laut einer Untersuchung von Sekkat et al. (2004a) besitzen Neugeborene mit einem postkonzeptionellen Alter von unter 160 Tagen kein funktionsfähiges Stratum corneum. Neugeborene mit einem postkonzeptionellen Alter von 260 Tagen haben bereits eine vollständig ausgebildete epidermale Hautbarriere. Dazwischen liegt eine Dauer von 100 Tagen, in welchen die vollständige Ausbildung und Entwicklung eines funktionsfähigen Stratum corneums stattfindet.

Bei Kind 1 und Kind 2 wurde die Behandlung mit einem postkonzeptionellen Alter von 206 Tagen begonnen. Die Hautbarrierefunktion betrug somit theoretisch etwa

46 % seiner finalen Form. Bei Kind 3 wurde die Behandlung mit einem postkonzeptionellen Alter von 210 Tagen begonnen, die Hautbarrierefunktion betrug somit in der Theorie ungefähr 50 % seiner finalen Form. Kind 4, welches mit einem postkonzeptionellen Alter von 252 Tagen behandelt wurde, hatte, laut Theorie, mit 92 % somit bereits eine fast vollständige Hautbarrierefunktion erreicht. Erwartet wurde deshalb, dass Kind 1, 2 und 3 bei Behandlungsbeginn vergleichbare Urinkonzentrationen aufweisen und die Urinkonzentrationen von Timolol bei Kind 4 deutlich darunter liegen.

Bei Kind 3 lagen die bestimmten Urinkonzentrationen zu Beginn der Behandlung mit einem postkonzeptionellen Alter von 210 Tagen bis zum Behandlungsende mit 230 Tagen zwischen 0,031 und 0,054 µg/ml Timolol. Kind 1 zeigte vergleichsweise für ein postkonzeptionelles Alter von 206 bis 226 Tagen Werten zwischen 0,022 und 0,559 µg/ml Timolol, Kind 2 zeigte für ein postkonzeptionelles Alter von 206 bis 235 Tagen sehr ähnliche Werte im Bereich von 0,031 bis 0,566 µg/ml Timolol. Der untere Größenordnungsbereich der bestimmten Timololkonzentrationen war somit bei Kind 1, 2 und 3 für dieses postkonzeptionelle Alter vergleichbar, Kind 1 und 2 zeigten jedoch deutlich größere Maximalkonzentrationen. Berücksichtigt werden muss jedoch, dass von Kind 3 für diesen Zeitraum nur 4 Proben zur Verfügung standen, während von Kind 2 mit 7 Proben vergleichsweise eine fast doppelte und für Kind 1 mit 14 Proben die 3,5 fache Probenanzahl zur Verfügung stand.

Die beiden zur Verfügung stehenden Urinproben von Kind 4 stammten aus einem postkonzeptionellen Alter von 252 und 254 Tagen und wiesen eine Timololkonzentration von 0,262 und 0,174 µg/ml auf. Für Kind 3 lagen für dieses postkonzeptionelle Alter keine Proben vor. Bei Kind 1 war in den Proben eines postkonzeptionellen Alters von 252, 253 und 254 Tagen kein Timolol nachweisbar. Bei Kind 2 lagen die Proben des postkonzeptionellen Alters von 247, 255 und 256 Tagen mit 0,106, 0,069 und 0,109 µg/ml Timolol in einem vergleichbaren Bereich wie bei Kind 4.

Bei alleiniger Betrachtung des postnatalen Alters, zeigten Untersuchungen von Harpin und Rutter (1983) und Kalia et al. (1998), dass das SC von Frühgeborenen nach der Geburt eine sehr schnelle Reifung zeigt, welche je nach Gestationsalter zwischen 2 und 8 Wochen dauert.

Bei Kind 1 und 2 wurde die lokale Behandlung des IHs mit Timolol mit einem postnatalen Alter von 13 Tagen begonnen. Bei Kind 3 erfolgte die erste Behandlung erst im postnatalen Alter von 25 Tagen, also fast 2 Wochen später. Die Hautbarrierefunktion könnte deshalb bereits deutlich stärker ausgebildet sein als bei Kind 1 und 2, was die niedrigeren Timololkonzentrationen im Urin erklären würde. Bei Kind 1 und 2 ist ebenfalls sehr schön die Tendenz zu erkennen, dass die Timololkonzentrationen im Laufe der Behandlungsdauer abnehmen. Dies wird durch den allmählichen Reifungsprozess der Haut verursacht. Eine zunehmende Entwicklung und Ausbildung des SCs verringert die absorbierte Timololmenge, somit sind auch im Urin niedrigere Timololkonzentrationen nachweisbar.

Bei Kind 4 wurde die Behandlung mit einem postnatalen Alter von 15 Tagen begonnen. Tendenziell wurden bei Kind 4 die niedrigsten Timololkonzentrationen im Urin erwartet, sie waren jedoch etwas höher als die gemessenen Wirkstoffkonzentrationen bei Kind 3.

Beachtet werden muss jedoch auch, dass bei keinem der Kinder die exakte Größe und der Status des IHs bekannt ist. Die Größe der Applikationsfläche und die aufgetragene Menge an Timololgel hat ebenfalls Einfluss auf die Timololkonzentrationen im Urin. Ein stärker ausgeprägtes IH lässt aufgrund einer stärkeren Vaskularisierung tendenziell höhere Permeationsraten und somit höhere Timololkonzentrationen im Urin erwarten.

Betrachtet man die in Abbildung 3.1-2 dargestellten Werte, so muss berücksichtigt werden, dass hiermit nur Tendenzen abgebildet werden können. Zum einen ist die Probenanzahl viel zu gering, um eine statistische Auswertung zu ermöglichen. Deutlich vorteilhafter wäre es, von jeder Urinausscheidung der Kinder eine Probe auszuwerten. So könnten die Wirkstoffkonzentrationen kontinuierlich über die Behandlungsdauer hinweg beobachtet werden. Das Gesamtvolumen der ausgeschiedenen Urinmenge zu kennen, wäre ebenfalls hilfreich, da diese die Timololkonzentrationen beeinflusst. Die Beobachtung weiterer Kinder mit unterschiedlichem Gestationsalter und unterschiedlichem postkonzeptionellen Alter wäre außerdem sinnvoll, um unterschiedliche Entwicklungsstadien der Haut besser erfassen zu können. Zudem sollte die Applikation des Timololgels ebenso wie die

Entnahme der Urinproben möglichst immer zu den gleichen Zeitpunkten erfolgen, um besser vergleichbare Daten zu gewinnen.

3.1.2 Zusammenfassung der Ergebnisse der Untersuchung der Urinproben von Frühgeborenen mit IH nach lokaler Behandlung mit Timolol

Zusammengefasst lässt sich sagen, dass die im Urin nachweisbaren Timololkonzentration von Frühgeborenen mit steigendem postnatalem und postkonzeptionellem Alter tendenziell abnehmen. Bei Kind 1 und Kind 2 ist sehr schön zu erkennen, dass die bestimmten Timololkonzentrationen über die Behandlungsdauer hinweg abnehmen. Dies lässt sich durch die fortschreitende Entwicklung und Reifung des Stratum corneums erklären. Bei Kind 3 und 4 standen für eine entsprechende Aussage allerdings zu wenig Proben zur Verfügung.

Die Ergebnisse der Untersuchung liefern bisher nur Tendenzen und Größenordnungen für Timololkonzentrationen im Urin bei Frühgeborenen mit IH nach lokaler Behandlung mit Timolol. Diese sind nach unten hin durch die Nachweisgrenze von $0,012 \mu\text{g/ml}$ begrenzt. Als Maximalwerte wurden Konzentrationen bis zu $0,559 \mu\text{g/ml}$ Timolol im Urin bestimmt.

Für eine statistische Auswertung lagen zu wenig verfügbare Daten und Informationen vor. Insgesamt wäre eine deutlich größere Probenanzahl und eine deutlich breiteres Spektrum an Frühgeborenen mit unterschiedlichem Geburts- und Lebensalter notwendig gewesen, um statistisch signifikante Aussagen liefern zu können. Auch eine standardisierte Timololapplikation (genau definierte Menge pro Flächeneinheit und definierter Applikationszeitpunkt) und Probenentnahme (definierte Zeitpunkte nach Timololapplikation, Protokollierung der gesamten Urinausscheidungsmenge) wäre für eine bessere Vergleichbarkeit sinnvoll gewesen. Der genaue Status und Entwicklungsverlauf des IHs muss über die Behandlungsdauer hinweg protokolliert werden, da auch die Rückbildung des IHs und die damit einhergehende veränderte Vaskularisierung die Wirkstoffpermeation beeinflussen.

Letztendlich muss zudem beachtet werden, dass Frühgeborene nicht nur eine Unreife der Haut, sondern auch eine Unreife einer Vielzahl von Organen aufweisen

(Sekkat et al., 2004a). Diese beeinflussen die Metabolisierung und Ausscheidung von Wirkstoffen. Die im Urin ausgeschiedene Timololmenge kann somit im Vergleich zu gesunden, reifgeborenen Kindern ebenfalls verändert sein. Es wäre deshalb äußerst nützlich gewesen, nicht nur Urinspielgewerte, sondern auch Plasmaspiegelwerte zur Verfügung gehabt zu haben. Dies war aus ethischen Gründen jedoch nicht vertretbar.

Im folgenden Teil dieser Arbeit sollte deshalb ein PBPK Modell der humanen Haut entwickelt werden, welches durch eine Variation des Stratum corneums an unterschiedliche Entwicklungs- und Reifegrade der Haut von Frühgeborenen angepasst werden kann. Dieses könnte wichtige Informationen zur Wirkstoffpenetration und -permeation liefern, welche eine an die Entwicklung von Frühgeborenen angepasste Formulierungsentwicklung und die Erstellung von Dosisregimen deutlich erleichtern würden. Durch Kenntnisse des Metabolismus von Timolol konnten in einem weiteren Teil der Arbeit aus diesen Berechnungen im Urin erwartete Timololkonzentrationen berechnet werden, welche sich anschließend mit den hier dargestellten Ergebnissen der Urinproben von Frühgeborenen vergleichen ließen.

3.2 PBPK Modell humaner Haut

Um absorbierte Wirkstoffmengen nach einer dermalen Wirkstoffapplikation bei unterschiedlichen Hautbarrierefunktionen vorhersagen zu können, wurde ein PBPK Modell humaner Haut entwickelt und implementiert. Die Entwicklung dieses Modells wurde bereits ausführlich in Kapitel 2.2.2 erläutert.

3.2.1 Eignung des entwickelten PBPK Modells humaner Haut

Um die Vorhersagekraft des entwickelten PBPK Modells zu überprüfen, wurden zunächst Vorhersagen aus bereits publizierten Studien durchgeführt

3.2.1.1 Vorhersage publizierter ex vivo Daten von Timololpflastern

Betrachtet wurde eine *in vitro* Studie von Kubota und Yamada (1990) zur perkutanen Absorption von Timolol durch humane Haut. In der Studie wurde ein 40 µm dickes Pflaster, welches 5, 10 oder 20 % Timolol enthielt, was einer initialen Wirkstoffmenge von 56,5, 113,1 und 226,2 µg Timolol entspricht, auf exzidierte abdominale menschliche Haut geklebt. Hierfür wurde das subkutane Fettgewebe von der menschlichen Vollhaut entfernt und die Haut in 1,5 x 1,5 cm² große Stücke geschnitten. Auf die epidermale Seite wurde ein Timolol-haltiges rundes Pflaster mit einem Durchmesser von 6 mm geklebt. Dies entsprach einer Applikationsfläche von 28,27 mm². Es wurde eine auf 32 °C temperierte Teflon-Durchfluss-Diffusionszelle mit destilliertem Wasser als Permeationsmedium und einer Flussrate von 2,5 ml/h verwendet. Nach 72 h wurden die Timololkonzentrationen in Pflaster, Haut und Permeationsmedium bestimmt.

Für die Simulation des PBPK Modells humaner Haut wurden das Molekulargewicht und der Octanol-Wasser-Verteilungskoeffizient von Timolol benötigt. Timolol hat ein Molekulargewicht von 316,4 g/mol (Chantasart et al., 2013) und einen Octanol-Wasser-Verteilungskoeffizient von 1,8 (Denet et al., 2003). Mit diesen beiden Werten wurden die Diffusionskoeffizienten D_L , D_C und D_{ED} der Lipidmatrix, der Corneozyten und des Kompartiments der lebenden Epidermis und der Dermis, wie bereits in Kapitel 2.2.2.2 erläutert, berechnet. Der Diffusionskoeffizient des Wirkstoffvehikels, in diesem Fall des Timololpflasters, wurde aus der Publikation von Kubota und Yamada (1990) entnommen. Die Dicke des Timololpflasters wurde ebenfalls aus dieser Publikation entnommen. Die in der *in vitro* Studie von Kubota und Yamada (1990) verwendete exzidierte menschliche Haut stammte vom Abdomen. Das SC abdomineller menschlicher Haut besteht aus durchschnittlich 14 Corneozytenschichten (Ya-Xian et al., 1999). Für die Simulation wurde deshalb eine Gesamtdicke des SCs von 12,4 µm gewählt, was 14 Corneozytenschichten entspricht. Die Maße der Corneozyten und der Lipidmatrix wurden bereits in Kapitel 2.2.2.1 erläutert. Als Initialdosis wurden 50, 100 oder 200 µg/mm³ eingesetzt, was einem Wirkstoffgehalt von 5, 10 oder 20 % entspricht. Am Ende der Simulation musste die Simulationsfläche (1 mm²) noch an die Applikationsfläche (28,27 mm²)

angepasst werden. Das Ergebnis musste deshalb noch mit dem Faktor 28,27 multipliziert werden.

In der nachfolgenden Tabelle 3.2-1 sind alle Parameter, welche für die Simulation des PBPK Modells humaner Haut zur Vorhersage publizierter *ex vivo* Daten von Timololpflastern verwendet wurden, aufgeführt.

Tabelle 3.2-1: Übersicht verwendeter Modellparameter zur Vorhersage publizierter *ex vivo* Daten von Timololpflastern.

	Parameter	Wert
Timolol	Molekulargewicht [g/mol]	316,42
	Octanol-Wasser-Verteilungskoeffizient	1,8
	Wirkstoffvehikel	
	Dicke [μm]	40
	Initiale Wirkstoffkonzentration [$\mu\text{g}/\text{mm}^3$]	50/100/200
	Diffusionskoeffizient des Wirkstoffvehikels D_V [m^2/s]	$3 \cdot 10^{-13}$
Stratum corneum	Dicke [μm]	12,4
	Anzahl an Corneozytenschichten	14
	Breite Corneozyt [μm]	40,0
	Höhe Corneozyt [μm]	0,8
	Lateraler Abstand Corneozyten [μm]	0,075
	Dicke Lipidmatrix [μm]	0,075
	Diffusionskoeffizient der Corneozyten D_C [m^2/s]	$7 \cdot 10^{-16}$
	Diffusionskoeffizient der Lipidmatrix D_L [m^2/s]	$8,950 \cdot 10^{-13}$
Kompartiment aus lebender Epidermis und Dermis	Dicke [μm]	1300
	Diffusionskoeffizient der lebenden Epidermis und Dermis D_{ED} [m^2/s]	$1,094 \cdot 10^{-10}$
Versuchsaufbau	Applikationsfläche [mm^2]	28,27

Die Ergebnisse der Studie von Kubota und Yamada (1990) sind in der nachfolgenden Tabelle 3.2-2 zusammengefasst.

Tabelle 3.2-2: Übersicht der Studienergebnisse von Kubota und Yamada (1990).

Konzentration [%]	Wirkstoffvehikel			Haut			Permeationsmedium		
	$\mu\text{g}/\text{cm}^2$	% der wiedergefundenen Menge	% der initialen Wirkstoffmenge	$\mu\text{g}/\text{cm}^2$	% der wiedergefundenen Menge	% der initialen Wirkstoffmenge	$\mu\text{g}/\text{cm}^2$	% der wiedergefundenen Menge	% der initialen Wirkstoffmenge
5	22,6 $\pm 7,6$	13,7 $\pm 4,5$	11,3 $\pm 3,8$	95,9 $\pm 10,5$	57,8 $\pm 4,7$	48,0 $\pm 5,3$	46,2 $\pm 13,1$	28,7 $\pm 8,9$	23,1 $\pm 6,6$
10	64,4 $\pm 17,9$	19,4 $\pm 5,2$	16,1 $\pm 4,5$	93,6 $\pm 10,7$	28,5 $\pm 3,0$	23,4 $\pm 2,7$	173,4 $\pm 23,4$	52,0 $\pm 4,4$	43,4 $\pm 5,9$
20	120,1 $\pm 66,4$	15,1 $\pm 7,5$	15,0 $\pm 8,3$	165,5 $\pm 43,4$	22,4 $\pm 4,9$	20,7 $\pm 5,4$	465,0 $\pm 66,6$	62,5 $\pm 3,4$	58,1 $\pm 8,3$

In der Studie von Kubota und Yamada (1990) wurden nach 72 h aus dem 5, 10 und 20%igen Timololpflaster $46,2 \pm 13,1$, $173,4 \pm 23,4$ und $465,0 \pm 66,6 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ Timolol im Permeationsmedium wiedergefunden, was einer prozentual freigesetzten Wirkstoffmenge von $28,7 \pm 8,9$, $52,0 \pm 4,4$ und $62,5 \pm 3,4 \%$ entspricht. Beachtet werden muss jedoch, dass hier als initiale Wirkstoffmenge die insgesamt wiedergefundene Timololmenge in Pflaster, Haut und Dissolutionsmedium verwendet wurde. Diese betrug $164,7$, $331,4$ und $750,6 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, die initiale Wirkstoffmenge in den Pflastern betrug jedoch 200 , 400 und $800 \mu\text{g}/\text{cm}^2$. Insgesamt wiedergefunden wurden somit nur $83,4$, $82,9$ und $93,8 \%$ der eingesetzten Wirkstoffmenge. Bezieht man die gemessenen Wirkstoffmengen auf die initiale Timololkonzentration in den Pflastern, so wurden $23,1 \pm 6,6$, $43,4 \pm 5,9$ und $58,1 \pm 8,3 \%$ an Wirkstoff im Permeationsmedium wiedergefunden.

In den Pflastern wurden nach 72 h $11,3 \pm 3,8$, $16,1 \pm 4,5$ und $15,0 \pm 8,3 \%$ der initialen Wirkstoffmenge gefunden.

Auffallend ist die Menge an Wirkstoff, die nach 72 h in der Haut wiedergefunden wurde. Diese betrug $48,0 \pm 5,3$, $23,4 \pm 2,7$ und $20,7 \pm 5,4 \%$ der initialen Wirkstoffmenge. Die in der Haut verbleibenden prozentualen Wirkstoffmengen unterschieden sich somit um 30% , was nicht allein auf die Wirkstoffdegradierung von Timolol in der Haut zurückgeführt werden kann (Kubota and Yamada, 1990).

Auffallend ist außerdem, dass die in der Haut verbleibende prozentuale Wirkstoffmenge bei kleineren Dosierungen deutlich größer war. Erwartungsgemäß sollte die Anreicherung in der Haut bei allen Dosierungen gleich sein und keinen Dosierungsabhängigkeiten zeigen. Auch Kubota und Yamada (1990) verwiesen bei der Diskussion der Studienergebnisse auf diese Auffälligkeiten mit dem Vermerk, dass noch weitere *in vivo* Studien notwendig sind.

Die höchste Wiederfindungsrate betrug mit 93,8 % beim 20 % Pflaster ungefähr 10 % mehr als beim 5 und 10%igen Pflaster mit Wiederfindungsraten von 83,4 und 82,9 %. Somit konnte fast 20 % des Wirkstoffs bei den beiden niedrigeren Konzentrationen nicht wiedergefunden werden. Dies könnte auch durch Messungenauigkeiten verursacht sein. Beim 5 und 10%igen Pflaster, welche insgesamt 56,5 bzw. 113,1 µg Timolol enthielten, wurden Mengen von $6,4 \pm 2,1$ bzw. $18,2 \pm 5,1$ µg Timolol im Pflaster, $27,1 \pm 3,0$ bzw. $26,5 \pm 3,1$ µg Timolol in der Haut und $13,1 \pm 3,7$ bzw. $49,1 \pm 6,7$ µg Timolol im Permeationsmedium bestimmt. Beim 20%igen Pflaster lagen die Wirkstoffmengen mit $36,4 \pm 10,2$ µg Timolol im Pflaster, $53,0 \pm 6,1$ µg Timolol in der Haut und $98,2 \pm 13,3$ µg Timolol im Permeationsmedium bis zu 8-mal höher. Für die Simulationsstudie wurde somit der Hautaugenmerk auf das Ergebnis des 20%igen Timololpflasters gelegt.

Bei der Simulation betrug die berechnete freigesetzte Wirkstoffmenge nach 72 h 40,3, 80,6 und 161,1 µg (entspricht 142,5, 285,0 und 570,0 µg/cm²) Timolol. Dies entsprach bei allen 3 Konzentrationen einer prozentual freigesetzten Wirkstoffmenge von 71,25 %. In der nachfolgenden Abbildung 3.2-1 ist die PBPK-Berechnung der kumulativ freigesetzten Wirkstoffmenge nach 72 h eines 20, 10 und 5 %igen Timololpflasters dargestellt.

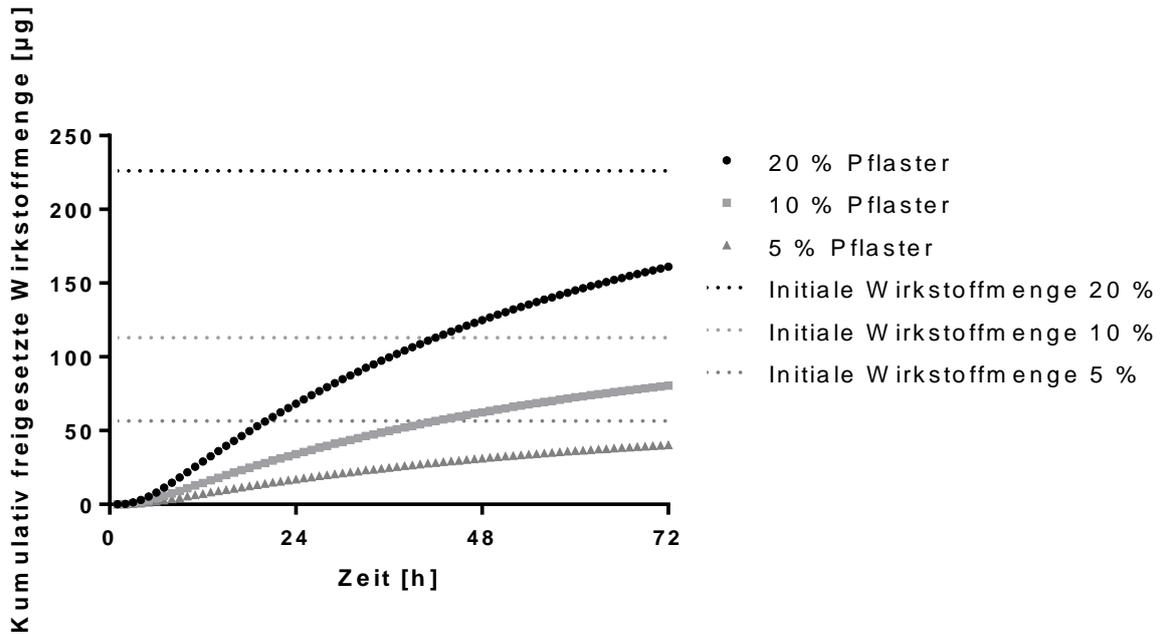


Abbildung 3.2-1: PBPK-Berechnung der kumulativ freigesetzten Wirkstoffmenge aus einem 20, 10 und 5 %igen Timololpflaster.

Gestrichelt dargestellt ist die jeweilige initial im Pflaster enthaltene Timololmenge in µg. Kurvenförmig dargestellt ist der Verlauf der aus dem jeweiligen Pflaster kumulativ freigesetzten Wirkstoffmenge in µg.

Es entspricht den Erwartungen, dass bei allen 3 Pflasterkonzentrationen der gleiche prozentuale Wirkstoffanteil freigesetzt wurde.

Vergleicht man die prozentual freigesetzte Wirkstoffmenge von 71,25 % mit dem Ergebnis der *in vitro* Studie von Kubota und Yamada (1990) mit $58,1 \pm 8,3$ %, so liegen beide Ergebnisse im gleichen Größenordnungsbereich und stimmen gut miteinander überein.

Das entwickelte PBPK Modell humaner Haut scheint somit für Simulationsstudien zur Hautpermeation von Timolol geeignet zu sein.

3.2.1.2 Vorhersage publizierter *in vivo* Daten von Nicotinplastern

Betrachtet wurde nun eine *in vivo* Studie von Bannon et al. (1989) zur perkutanen Absorption von Nicotin durch humane Haut. In dieser Studie wurden Nicotinplaster

mit einem Nicotiningehalt von 15, 30 und 60 mg gesunden Rauchern in 3 Perioden (Periode 1: 15 mg, Periode 2: 30 mg; Periode 3: 60 mg) für jeweils 24 h auf den volaren Unterarm geklebt. Nach 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 12, 16, 24, 27 und 30 h wurden Blutproben entnommen und untersucht. Zwischen jeder Behandlungsperiode lagen mindestens 7 Tage Abstand. Die Größe der Nicotinpflaster betrug 3,5 cm², 7,0 cm² und 2x7.0 cm² für jeweils 15, 30 und 60 mg Nicotin.

Für die Simulation des PBPK Modells humaner Haut wurde das Molekulargewicht und der Octanol-Wasser Verteilungskoeffizient von Nicotin benötigt. Nicotin hat ein Molekulargewicht von 162,23 g/mol und einen Octanol-Wasser Verteilungskoeffizient von 1,17 (Chen et al., 2016). Mit diesen beiden Werten wurden die Diffusionskoeffizienten D_L , D_C und D_{ED} der Lipidmatrix, der Corneozyten und des Kompartiments der lebenden Epidermis und der Dermis, wie bereits in Kapitel 2.2.2.2 erläutert, berechnet. Da die hydrodynamische Einschränkung der Diffusion eines kleinen Moleküls wie Nicotin durch ein Hydrogel sehr gering ist und meist weniger als 10 % Reduktion im Vergleich zum Diffusionskoeffizient in Wasser beträgt, wurde als Diffusionskoeffizient D_V des Wirkstoffvehikels der Diffusionskoeffizient des Wirkstoffs in Wasser verwendet (Amsden, 1998; Chen et al., 2016; Phillips, 2000). Die Dicke der Nicotinpflaster wurde in der Studie von Bannon et al. (1989) nicht angegeben. Überlicherweise betragen diese ungefähr 100 µm, weshalb dieser Wert für die Simulation verwendet wurde (Chen et al., 2016). Das Nicotinpflaster wurde in der *in vivo* Studie von Bannon et al. (1989) auf die volare Seite des Unterarms aufgeklebt. Hier besteht das Stratum corneum durchschnittlich aus 16 Corneozytenschichten (Ya-Xian et al., 1999). Für die Simulation wurde deshalb eine Gesamtdicke des SCs von 14,1 µm gewählt, was 16 Corneozytenschichten entspricht. Die Maße der Corneozyten und der Lipidmatrix wurden bereits in Kapitel 2.2.2.1 erläutert. Eine Wirkstoffmenge von 15 mg in 3,5 cm² bzw. 30 mg in 7,0 cm² bzw. 60 mg in 14,0 cm² und einer jeweiligen Pflasterdicke von 100 µm ergab eine initiale Wirkstoffkonzentration von 428,571 µg/mm³. Am Ende der Simulation musste die Simulationsfläche (1 mm²) noch an die Applikationsfläche (350, 700, 1400 mm²) angepasst werden. Das Ergebnis wurde deshalb noch mit dem Faktor 350, 700 beziehungsweise 1400 multipliziert.

In der nachfolgenden Tabelle 3.2-3 sind alle Parameter, welche für die Simulation des PBPK Modells humaner Haut zur Vorhersage publizierter *in vivo* Daten von Nicotinplastern verwendet werden, aufgeführt.

Tabelle 3.2-3: Übersicht verwendeter Modellparameter zur Vorhersage publizierter *in vivo* Daten von Nicotinplastern.

	Parameter	Wert
Nicotin	Molekulargewicht [g/mol]	162,23
	Octanol-Wasser-Verteilungskoeffizient	1,17
Wirkstoffvehikel	Dicke [μm]	100
	Initiale Wirkstoffkonzentration [$\mu\text{g}/\text{mm}^3$]	428,571
	Diffusionskoeffizient des Wirkstoffvehikels D_V [m^2/s]	$9,727 \cdot 10^{-10}$
Stratum corneum	Dicke [μg]	14,1
	Anzahl an Corneozytenschichten	16
	Breite Corneozyt [μm]	40,0
	Höhe Corneozyt [μm]	0,8
	Lateraler Abstand Corneozyten [μm]	0,075
	Dicke Lipidmatrix [μm]	0,075
	Diffusionskoeffizient der Corneozyten D_C [m^2/s]	$2,678 \cdot 10^{-15}$
	Diffusionskoeffizient der Lipidmatrix D_L [m^2/s]	$1,431 \cdot 10^{-11}$
Kompartiment aus lebender Epidermis und Dermis	Dicke [μm]	1300
	Diffusionskoeffizient der lebenden Epidermis und Dermis D_{ED} [m^2/s]	$2,365 \cdot 10^{-10}$
Versuchsaufbau	Applikationsfläche [mm^2]	350/700/1400

Bannon et al. (1989) stellten in ihrer Studie fest, dass der prozentuale Anteil der gesamt absorbierten Nicotinmenge bei allen 3 Dosierungen gleich war und die Absorption somit unabhängig von der Dosierung ist. Dies entspricht auch den Ergebnissen der in dieser Arbeit entwickelten Simulation. Da die initiale Ausgangskonzentration mit $428,571 \mu\text{g}/\text{mm}^3$ bei allen 3 Pflastern die gleiche war und das Ergebnis der Simulation nur durch unterschiedliche Faktoren, welche die Applikationsfläche berücksichtigen, multipliziert werden, ist die prozentual absorbierte Wirkstoffmenge bei allen 3 Pflastern gleich.

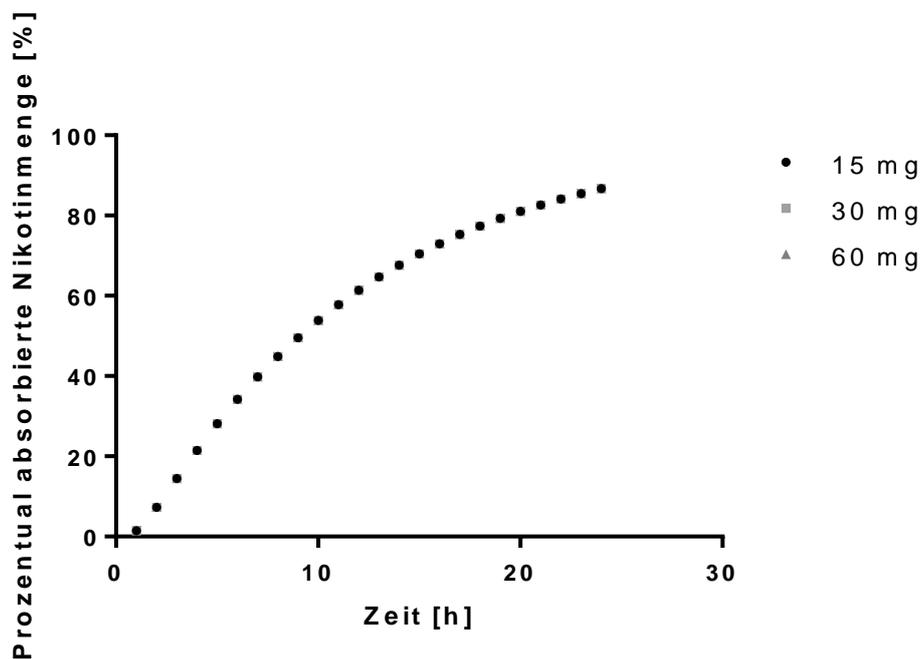


Abbildung 3.2-2: PBPK-Berechnung der prozentual absorbierten Nicotinmenge in Abhängigkeit von der Zeit.

Der Kurvenverlauf der prozentual absorbierten Nicotinmenge aus den Nicotinpflastern mit 15, 30 und 60 mg Nicotin verläuft bei allen drei Pflastern gleich, die Kurven liegen deckungsgleich übereinander.

In Abbildung 3.2-2 ist die prozentual absorbierte Nicotinmenge in Abhängigkeit von der Zeit dargestellt. Diese war bei allen 3 Nicotinpflastern (15, 30, 60 mg) gleich groß, die Kurven liegen somit deckungsgleich übereinander. Insgesamt wurden nach 24 h 86,71 % der Ausgangsmenge an Nicotin in den Pflastern absorbiert. Dies stimmt sehr gut mit den Ergebnissen von Bannon und al. (1989) überein, welche nach 24 h eine prozentual absorbierte Nicotinmenge zwischen 80 und 90 % bestimmen konnten.

Nach 24 h wiesen Bannon et al. (1989) beim Nicotinpflaster mit 15, 30 und 60 mg Wirkstoff eine absorbierte Menge von 12, 26 und 49 mg Nicotin nach. Die Simulation des PBPK Modells humaner Haut ergab Werte von 13,0, 26,0 und 52,0 mg absorbiertem Nicotin nach 24 h. Die Ergebnisse der in dieser Arbeit entwickelten Simulation stimmen somit sehr gut mit den Werten der *in vivo* Studie überein. Die Ergebnisse der Simulation sind in der folgenden Abbildung 3.2-3 dargestellt.

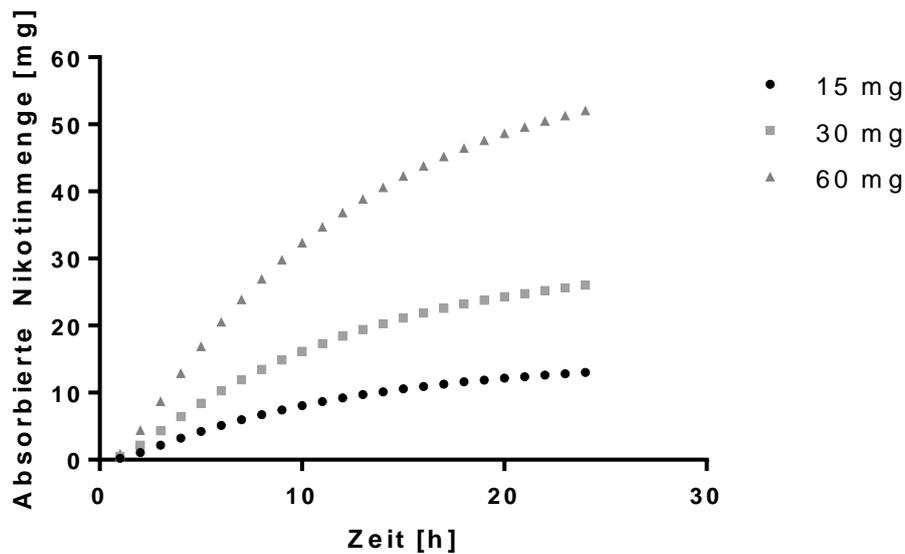


Abbildung 3.2-3: PBPK-Berechnung der absorbierten Nicotinmenge in Abhängigkeit von der Zeit für ein 15, 30 und 60 mg Nicotinpflaster.

Dargestellt sind die PBPK-Berechnungen der absorbierten Nicotinmenge aus einem 15, 30 und 60 mg Nicotinpflaster in einem Zeitraum von 24 h.

Bannon et al. (1989) beschrieben in ihrer Publikation den Kurvenverlauf der absorbierten Nicotinmenge gegen die Zeit innerhalb der ersten 8 h, was einer prozentual freigesetzten Wirkstoffmenge von 45 bis 60 % entspricht, als „relativ linear“. Die Rate der Wirkstofffreisetzung des 15, 30 und 60 mg Pflasters, welche sich durch lineare Regression dieser ersten 8 Werte der *in vivo* Studie ergibt, beträgt 0,69, 1,72 und 3,38 mg/h.

Durch die erste Ableitung der absorbierten Nicotinmenge in Abhängigkeit der Zeit wurden die Freisetzungsraten pro Zeiteinheit der Simulationsergebnisse betrachtet.

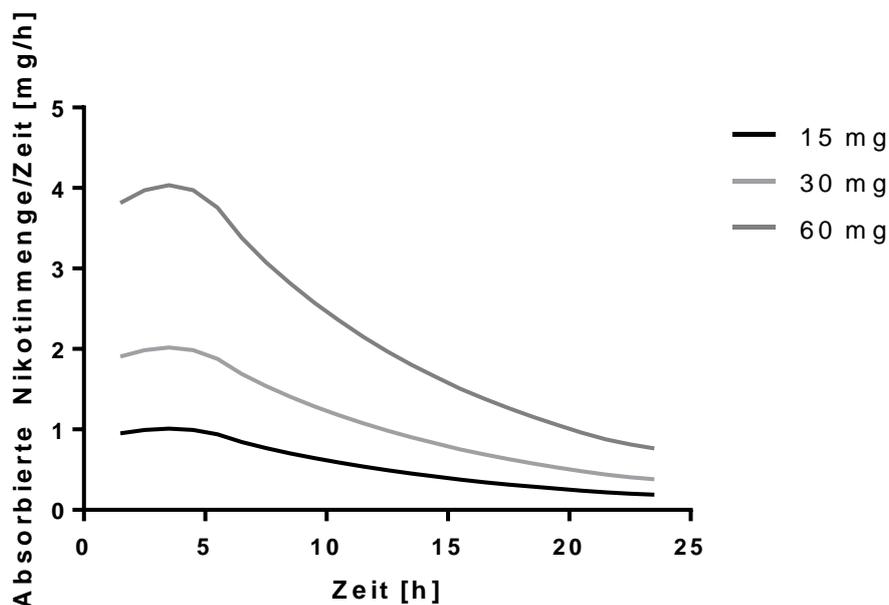


Abbildung 3.2-4: Im PBPK-Modell berechnete absorbierte Nicotinmenge pro Zeiteinheit in Abhängigkeit von der Zeit für ein 15, 30 und 60 mg Nicotinpflaster.

Dargestellt sind die PBPK-Berechnungen der stündlichen Freisetzungsrates aus einem 15, 30 und 60 mg Nicotinpflaster in einem Zeitraum von 24 h.

In Abbildung 3.2-4 ist sehr schön erkennbar, dass die pro Zeiteinheit absorbierte Nicotinmenge nach 3 h mit 1,009, 2,018 und 4,036 mg/h ihr Maximum erreicht. Anschließend nimmt die pro Zeiteinheit absorbierte Nicotinmenge wieder ab und der Kurvenverlauf flacht langsam ab. Zur besseren Vergleichbarkeit wurde dennoch die Freisetzungsrates der ersten 8 Stunden durch lineare Regression der absorbierten Nicotinmenge bestimmt.

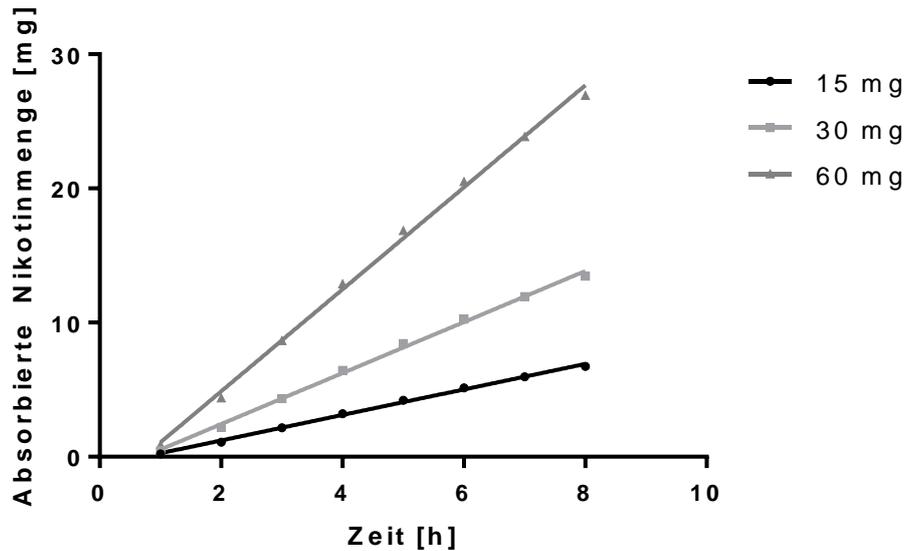


Abbildung 3.2-5: Im PBPK-Modell berechnete Bestimmung der Freisetzungsraten aus 15, 30 und 60 mg Nicotinplastern innerhalb der ersten 8 Stunden durch lineare Regression der absorbierten Nicotinmenge in Abhängigkeit der Zeit.

Dargestellt sind Regressionsgeraden der, mittels PBPK-Modell berechneten, innerhalb der ersten 8 Stunden absorbierten Nicotinmenge aus 15, 30 und 60 mg Nicotinplastern.

In Abbildung 3.2-5 sind die Regressionsgeraden der Absorbierten Nicotinmenge innerhalb der ersten 8 Stunden nach Applikation der Nicotinplaster dargestellt. Das Bestimmtheitsmaß der Regressionsgeraden betrug 0,9975. Dies ergab Freisetzungsraten von 0,95, 1,90 und 3,80 mg/h für das 15, 30 und 60 mg Nicotinplaster. Die Freisetzungsraten liegen somit etwas höher als die in der *in vivo* Studie ermittelten Freisetzungsraten von 0,69, 1,72, 3,38 mg/ml.

Insgesamt ist der Kurvenverlauf der absorbierten Nicotinmenge in Abhängigkeit der Zeit bei der Simulation zu Beginn etwas steiler und gegen Ende etwas flacher als bei der *in vivo* Studie. Die absorbierte Gesamtmenge an Nicotin mit Werten von 13,0, 26,0 und 52,0 mg nach 24 Stunden ist im Vergleich zu den Ergebnissen der *in vivo* Studie mit 12, 26 und 49 mg ist jedoch annähernd gleich.

Das entwickelte PBPK Modell humaner Haut scheint somit für Simulationsstudien zur Hautpermeation von Nicotin geeignet zu sein.

3.2.1.3 Zusammenfassung der Überprüfung der Eignung des entwickelten PBPK Modells humaner Haut

Das in dieser Arbeit entwickelte PBPK Modell humaner Haut wurde zur Vorhersage publizierter *ex vivo* Daten von Timololpflastern und publizierter *in vivo* Daten von Nicotinpflastern verwendet. Die berechneten Ergebnisse stimmten sehr gut mit den publizierten Studienergebnissen überein. Dies zeigt deutlich, dass das entwickelte PBPK Modell für die Vorhersage der Hautpermeation von Wirkstoffen geeignet ist.

3.2.2 Vorhersage der Hautpermeation von Timolol bei Frühgeborenen

Wie bereits in Kapitel 1.3.2 ausführlich erläutert, ist bei Frühgeborenen die Barrierefunktion der Haut nur sehr schwach ausgebildet (Stamatas et al., 2011). Insbesondere das Stratum corneum, welches für die Hauptbarrierefunktion der Haut verantwortlich ist, erscheint deutlich dünner und nur schlecht entwickelt (Sekkat et al., 2004a). Nach der Geburt zeigt es eine kontinuierliche Reifung (Kalia et al., 1998). Frühgeborene Kinder haben somit je nach Schwangerschaftsdauer und Lebensdauer nach der Geburt ganz unterschiedliche Reifungsgrade der Haut, welche die Hautbarrierefunktion und somit auch die Wirkstoffdurchlässigkeit der Haut stark beeinflusst. Mit Hilfe des in dieser Arbeit entwickelten PBPK Modells humaner Haut sollten unterschiedliche Reifungsgrade der Haut simuliert werden. Die Anzahl der Corneozytenschichten der Haut variiert zwischen unterschiedlichen Individuen und zeigt auch abhängig von der anatomischen Region deutliche Unterschiede. Laut einer Publikation von Ya-Xian et al. (1999) besteht das Stratum corneum eines Menschen im Gesicht durchschnittlich aus 9, am Rumpf durchschnittlich aus 13 und an den Extremitäten durchschnittlich aus 15 Corneozytenschichten. Für die Simulation wurde als maximaler Wert somit eine Dicke von 15 Corneozytenschichten angenommen. Dies entspricht einer intakten Hautbarrierefunktion. Um unterschiedliche Reifegrade der Haut zu simulieren, wurden Berechnungen für 15 bis 0 Corneozytenschichten vorgenommen. Eine intakte Hautbarrierefunktion wurde dabei durch 15 Corneozytenschichten simuliert, eine nicht vorhandene Hautbarrierefunktion wurde ohne vorhandenes Stratum corneum simuliert. Stufen dazwischen simulierten unterschiedliche Reifungsgrade der Haut.

Der Aufbau des Modells wurde bereits in Kapitel 2.2.2 ausführlich dargestellt. Die Dicke des Wirkstoffvehikels wurden aus einer Publikation von Moehrle et al. (2013) entnommen. In dieser Studie wurden 0,05 ml Timolol Gel 0,5 % für eine runde Fläche mit 12 mm Durchmesser verwendet. Dies ergibt eine Dicke des aufgetragenen Timolol Gels von 442,1 μm und eine initiale Wirkstoffkonzentration von 5 $\mu\text{g}/\text{mm}^3$. Bei geeigneter Größe des Hämangioms wurde das Gel auf das IH aufgegeben und mittels Finn-Chamber mit einem Durchmesser von 12 mm abgedeckt, um eine Okklusion zu erreichen. Dies entspricht einer Applikationsfläche von 113,1 mm^2 . Da je nach Größe des IHs die Applikationsfläche jedoch auch deutlich kleiner oder größer sein kann, wurde die applizierte Wirkstoffmenge in dem entwickelten Simulationmodell entsprechend angepasst. In der Simulation wurde deshalb die permeierte Wirkstoffmenge pro cm^2 Applikationsfläche angegeben.

Für die Simulation des PBPK Modells humaner Haut wurden das Molekulargewicht und der Octanol-Wasser-Verteilungskoeffizient von Timolol zur Berechnung der Diffusionskoeffizienten D_L , D_C und D_{ED} der Lipidmatrix, der Corneozyten und des Kompartiments der lebenden Epidermis und der Dermis, wie bereits in Kapitel 2.2.2.2 erläutert, verwendet. Da die hydrodynamische Einschränkung der Diffusion eines kleinen Moleküls wie Timolol durch ein Hydrogel sehr gering ist und meist weniger als 10 % Reduktion im Vergleich zum Diffusionskoeffizient des Wirkstoffs in Wasser beträgt, wurde als Diffusionskoeffizient D_V des Wirkstoffvehikels der Diffusionskoeffizient des Wirkstoffs in Wasser verwendet (Amsden, 1998; Chen et al., 2016; Phillips, 2000).

In der nachfolgenden Tabelle 3.2-4 sind alle Parameter, welche für die Simulation des PBPK Modells humaner Haut vor Vorhersage der Hautpermeation von Timolol bei Frühgeborenen verwendet wurden, aufgeführt.

Tabelle 3.2-4: Übersicht verwendeter Modellparameter für die Vorhersage der Hautpermeation von Timolol bei Frühgeborenen

	Parameter	Wert
Timolol	Molekulargewicht [g/mol]	316,42
	Octanol-Wasser Verteilungskoeffizient	1,8
Wirkstoffvehikel	Dicke [μm]	442,097
	Initiale Wirkstoffkonzentration [$\mu\text{g}/\text{mm}^3$]	5
	Diffusionskoeffizient des Wirkstoffvehikels D_V [m^2/s]	$7,785 \cdot 10^{-10}$
Stratum corneum	Dicke [μm]	13,200/12,325/11,450/10,575/ 9,700/8,825/7,950/7,075/ 6,200/5,325/4,450/3,575/ 2,700/1,825/0,95/0
	Anzahl an Corneozytenschichten	15/14/13/12/ 11/10/9/8/ 7/6/5/4/ 3/2/1/0
	Breite Corneozyt [μm]	40,0
	Höhe Corneozyt [μm]	0,8
	Lateraler Abstand Corneozyten [μm]	0,075
	Dicke Lipidmatrix [μm]	0,075
	Diffusionskoeffizient der Corneozyten D_C [m^2/s]	$7 \cdot 10^{-16}$
	Diffusionskoeffizient der Lipidmatrix D_L [m^2/s]	$8,950 \cdot 10^{-13}$
Kompartiment aus lebender Epidermis und Dermis	Dicke [μm]	1300
	Diffusionskoeffizient der lebenden Epidermis und Dermis D_{ED} [m^2/s]	$1,094 \cdot 10^{-10}$
Versuchsaufbau	Applikationsfläche [mm^2]	100

In der nachfolgenden Abbildung 3.2-6 ist die mit dem Simulationsmodell berechnete permeierte Menge an Timolol pro Flächeneinheit für humane Haut mit einem Stratum corneum bestehend aus 0 bis 15 Corneozytenschichten gegen die Zeit aufgetragen.

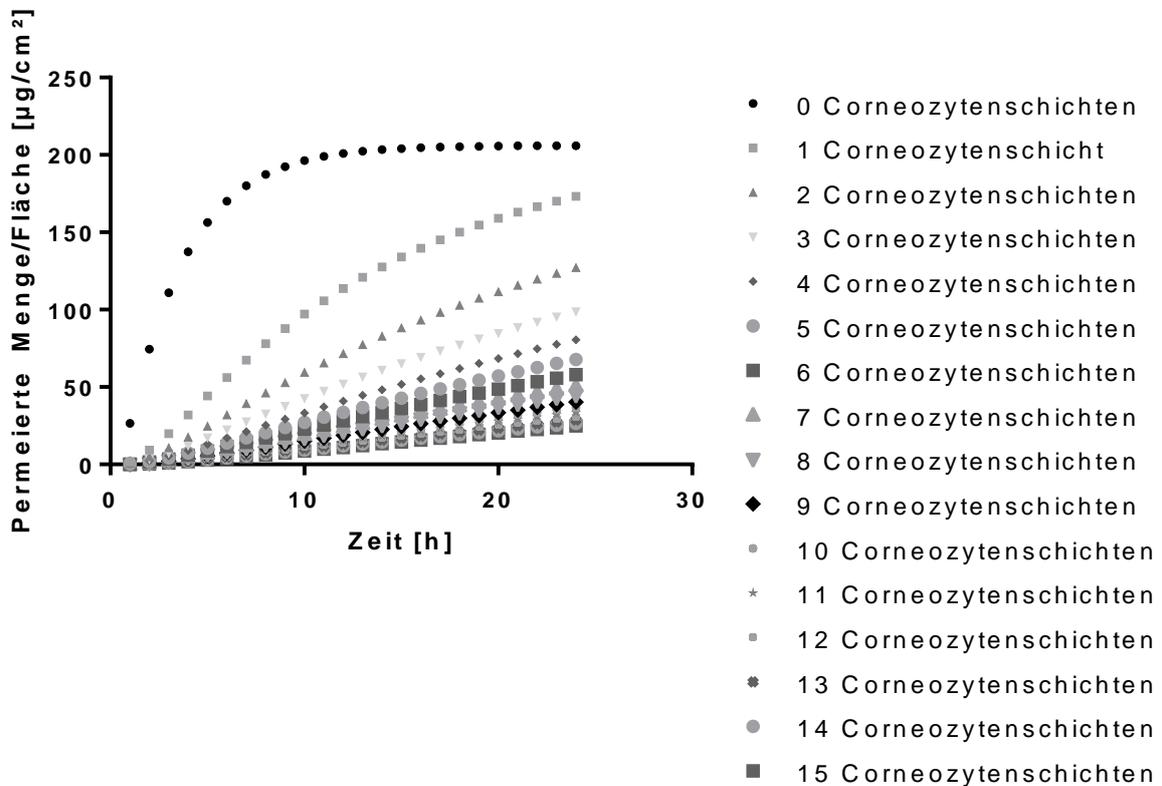


Abbildung 3.2-6: PBPK-Berechnung der permeierten Menge an Timolol pro Flächeneinheit aufgetragen gegen die Zeit für 0-15 Corneozytenschichten im Stratum corneum.

Dargestellt ist ein Zeitraum von 24 h, die initiale Wirkstoffmenge betrug 212,207 µg/cm² Timolol.

Die permeierte Menge an Timolol pro Flächeneinheit nach 24 h nahm erwartungsgemäß mit abnehmender Anzahl an vorhandenen Corneozytenschichten im Stratum corneum deutlich zu. Je weniger Corneozytenschichten vorhanden sind, desto dünner ist das Stratum corneum und desto leichter gelangt der Wirkstoff durch die Haut. Die permeierte Menge pro Flächeneinheit steigt folglich an.

Ergebnisse und Diskussion

Zur besseren Übersichtlichkeit sind in der nachfolgenden Tabelle 3.2-5 die prozentual freigesetzten Wirkstoffmengen stündlich für 24 h in Abhängigkeit von den Corneozytenschichten dargestellt.

Tabelle 3.2-5: Permeierte Wirkstoffmenge [%] für 24 h für 0 bis 15 Corneozytenschichten im Stratum corneum berechnet mit dem PBPK-Modell.

Zeit [h]	Corneozytenschichten															
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
1	12,4 9	0,78	0,39	0,25	0,17	0,13	0,09	0,07	0,05	0,04	0,03	0,02	0,01	0,01	0,01	0,01
2	35,1 3	4,32	2,26	1,51	1,12	0,87	0,69	0,56	0,45	0,37	0,31	0,26	0,21	0,18	0,14	0,12
3	52,3 0	9,42	5,06	3,43	2,58	2,05	1,65	1,37	1,15	0,98	0,85	0,74	0,63	0,55	0,47	0,41
4	64,7 3	15,1 0	8,29	5,68	4,31	3,45	2,82	2,37	2,01	1,74	1,54	1,35	1,18	1,05	0,92	0,82
5	73,7 1	20,8 5	11,6 8	8,08	6,17	4,97	4,09	3,46	2,96	2,59	2,30	2,04	1,81	1,62	1,45	1,31
6	80,2 0	26,4 4	15,1 0	10,5 2	8,09	6,54	5,40	4,59	3,95	3,47	3,10	2,77	2,48	2,24	2,02	1,84
7	84,8 8	31,7 6	18,4 7	12,9 7	10,0 1	8,13	6,73	5,74	4,96	4,37	3,93	3,52	3,16	2,87	2,60	2,39
8	88,2 7	36,7 6	21,7 5	15,3 8	11,9 2	9,71	8,07	6,90	5,98	5,28	4,76	4,28	3,86	3,51	3,20	2,94
9	90,7 1	41,4 2	24,9 3	17,7 5	13,8 1	11,2 8	9,40	8,05	6,99	6,19	5,59	5,04	4,55	4,16	3,80	3,51
10	92,4 8	45,7 6	27,9 8	20,0 5	15,6 7	12,8 3	10,7 1	9,20	8,00	7,10	6,42	5,80	5,25	4,81	4,40	4,07
11	93,7 6	49,7 8	30,9 2	22,3 0	17,4 9	14,3 5	12,0 1	10,3 3	9,00	8,00	7,24	6,56	5,94	5,45	5,00	4,64
12	94,6 9	53,5 1	33,7 5	24,4 9	19,2 7	15,8 6	13,2 9	11,4 5	9,99	8,89	8,06	7,31	6,63	6,09	5,60	5,20
13	95,3 6	56,9 7	36,4 6	26,6 2	21,0 2	17,3 3	14,5 6	12,5 6	10,9 7	9,78	8,87	8,06	7,32	6,73	6,19	5,76
14	95,8 4	60,1 7	39,0 6	28,6 9	22,7 3	18,7 8	15,8 1	13,6 6	11,9 4	10,6 6	9,68	8,80	8,00	7,37	6,79	6,32
15	96,1 9	63,1 3	41,5 6	30,7 1	24,4 0	20,2 1	17,0 4	14,7 4	12,9 0	11,5 3	10,4 8	9,53	8,68	8,00	7,37	6,87
16	96,4 5	65,8 7	43,9 5	32,6 6	26,0 4	21,6 1	18,2 5	15,8 1	13,8 5	12,3 9	11,2 7	10,2 6	9,35	8,63	7,96	7,42
17	96,6 4	68,4 1	46,2 5	34,5 6	27,6 4	22,9 9	19,4 4	16,8 6	14,7 9	13,2 4	12,0 5	10,9 8	10,0 2	9,25	8,54	7,97
18	96,7 7	70,7 6	48,4 5	36,4 1	29,2 1	24,3 4	20,6 2	17,9 0	15,7 2	14,0 9	12,8 3	11,7 0	10,6 8	9,87	9,12	8,51
19	96,8 7	72,9 3	50,5 6	38,2 1	30,7 4	25,6 7	21,7 8	18,9 3	16,6 4	14,9 2	13,6 0	12,4 1	11,3 4	10,4 8	9,69	9,06
20	96,9 4	74,9 5	52,5 9	39,9 5	32,2 4	26,9 8	22,9 2	19,9 5	17,5 5	15,7 5	14,3 7	13,1 2	11,9 9	11,0 9	10,2 6	9,59
21	97,0 0	76,8 1	54,5 3	41,6 5	33,7 1	28,2 6	24,0 5	20,9 5	18,4 5	16,5 7	15,1 2	13,8 2	12,6 4	11,7 0	10,8 3	10,1 3
22	97,0 4	78,5 3	56,3 9	43,3 0	35,1 5	29,5 3	25,1 6	21,9 4	19,3 4	17,3 8	15,8 8	14,5 2	13,2 8	12,3 0	11,3 9	10,6 6
23	97,0 7	80,1 3	58,1 8	44,9 0	36,5 5	30,7 6	26,2 5	22,9 2	20,2 2	18,1 9	16,6 2	15,2 1	13,9 2	12,8 9	11,9 5	11,1 9
24	97,0 9	81,6 1	59,8 9	46,4 5	37,9 3	31,9 8	27,3 3	23,8 9	21,1 0	18,9 8	17,3 6	15,8 9	14,5 6	13,4 9	12,5 1	11,7 2

Die berechneten Werte zeigen deutlich, dass der Wirkstoff ohne vorhandenes Stratum corneum nahezu ungehindert durch die Haut gelangt. Auch im Kurvenverlauf (Abbildung 3.2-6) ist dies sehr gut zu erkennen. Die Kurve steigt innerhalb der ersten 9 Stunden sehr steil an. Nach einer Stunde war mit einer freigesetzten Wirkstoffmenge von 12,49 % bereits mehr Wirkstoff freigesetzt als bei 15 Corneozytenschichten nach 24 Stunden (11,72 %). Bereits nach 9 Stunden sind über 90 % des applizierten Wirkstoffs durch die Haut permeiert und der Kurvenanstieg nur noch sehr gering. Insgesamt permeiert ohne Stratum corneum mit 97,09 % fast die gesamte applizierte Wirkstoffmenge innerhalb von 24 h die Haut. Bereits bei einer voll ausgebildeten Corneozytenschicht im Stratum corneum gelangen nach 24 h nur noch 81,61 % Wirkstoff durch die Haut, was 15,45 % weniger sind, als ohne Stratum corneum. Das heißt schon eine Corneozytenschicht genügt um eine effiziente Barriere zu bilden. Wie sich die Anzahl der Corneozytenschichten auf die kumulativ freigesetzte Wirkstoffmenge nach 24 h auswirkt, ist in der nachfolgenden Abbildung 3.2-7 noch einmal graphisch dargestellt.

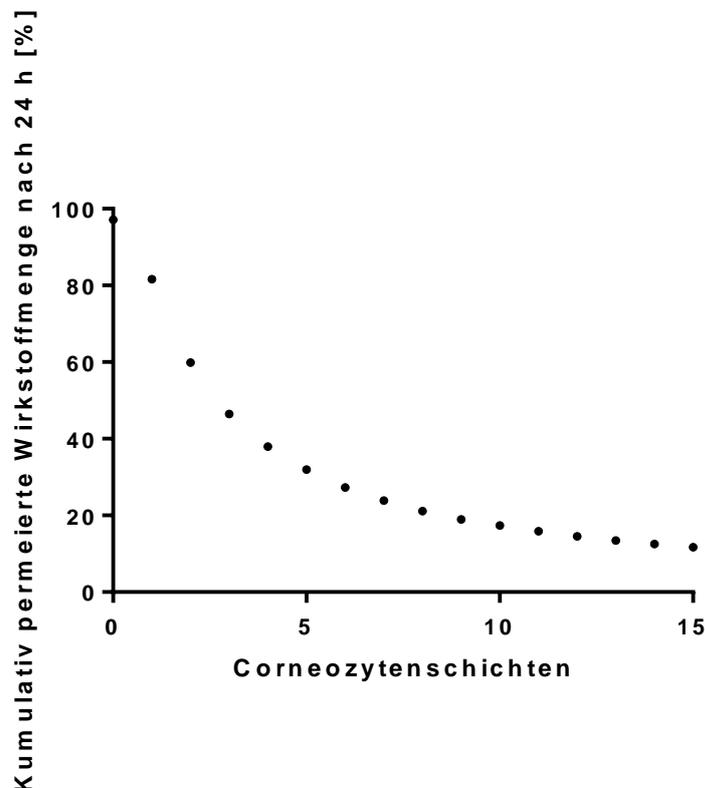


Abbildung 3.2-7: PBPK-Berechnung der kumulativ permeierten Wirkstoffmenge nach 24 h in Abhängigkeit von der Anzahl der im Stratum corneum vorhandenen Corneozytenschichten.

Die PBPK-Berechnungen wurden für 0 bis 15 Corneozytenschichten durchgeführt.

Es ist sehr gut zu erkennen, dass die kumulativ permeierte Wirkstoffmenge nach 24 h mit zunehmender Anzahl an Corneozytenschichten abnimmt. Der Abstieg verläuft jedoch nicht linear, sondern folgt einer Funktion höherer Ordnung. Die innersten Schichten des Stratum corneums haben einen deutlich stärkeren Einfluss auf die Hautbarrierefunktion als die weiter außen gelegenen Schichten. Dies stimmt auch mit Angaben aus der Literatur überein. Kalia et al. (2000) bestimmten in einer Studie zur Charakterisierung der Hautbarrierefunktion die TEWL Werte bei Probanden nach Durchführung unterschiedlicher Anzahl an Klebebandabrissen. Ein hoher TEWL Wert spiegelt dabei eine sehr große Hautdurchlässigkeit und somit eine stark eingeschränkte Hautbarrierefunktion wieder. Das Entfernen der äußersten Stratum corneum Schichten hatte proportional geringere Auswirkungen auf die Hautbarrierefunktion als die Entfernung der darunter liegenden Schichten. Außerdem beobachteten Kalia et al. (2000), dass die Dicke des Stratum corneums bei gesunden Erwachsenen an gleichen Körperstellen deutliche Unterschiede zeigte, die Barrierefunktion der Haut jedoch relativ konstant ist.

In Abbildung 3.2-7 ist bei der Betrachtung der äußeren Corneozytenschichten zu erkennen, dass die kumulativ permeierte Wirkstoffmenge nach 24 h bei 8 Corneozytenschichten 21,10 % und bei 15 Corneozytenschichten 11,72 % beträgt. Eine Erhöhung der Corneozytenschichtenanzahl von 8 auf 15 bedeutet somit eine Verringerung der kumulativ permeierten Wirkstoffmenge um 9,38 % der Ausgangsmenge. Betrachtet man nun die inneren Corneozytenschichten, so fällt auf, dass die kumulativ permeierte Wirkstoffmenge nach 24 h ohne vorhandenes Stratum Corneum 97,09 % und bei 7 Corneozytenschichten 23,88 % beträgt. Eine Erhöhung der Corneozytenschichtenanzahl von 0 auf 7 bedeutet somit eine Verringerung der kumulativ permeierten Wirkstoffmenge um 73,21 % der Ausgangsmenge. Diese Ergebnisse bestätigen somit, dass ein Großteil der Hautbarrierefunktion durch die inneren Schichten des Stratum corneums bedingt ist.

3.2.3 Zusammenfassung der Ergebnisse des entwickelten PBPK Modells humaner Haut

Die Daten zeigen deutlich, dass mit dem entwickelten PBPK Modell humaner Haut die Wirkstoffpermeation unterschiedlicher Wirkstoffe durch die Haut berechnet werden kann. Je nach anatomischer Region kann die im Stratum corneum vorhandene Anzahl an Corneozytenschichten angepasst werden. Um die Hautpermeation von Timolol bei Frühgeborenen vorherzusagen, wurden Permeationsvorgänge für 0 bis 15 Corneozytenschichten im Stratum corneum simuliert, um alle Stadien der Hautreifung, von unreif bis vollständig ausgereift, zu erfassen. Erwartungsgemäß nahm die permeierte Wirkstoffmenge mit zunehmender Hautreifung deutlich ab. Eine sehr unreife Haut ohne funktionsfähiges Stratum corneum stellt fast keine Barriere dar, der Wirkstoff gelangt relativ ungehindert, sehr schnell und nahezu vollständig durch die Haut. Mit zunehmender Hautreifung verringert sich die permeierte Wirkstoffmenge deutlich. Die inneren Corneozytenschichten des Stratum corneums haben dabei deutlich stärkeren Einfluss auf die Hautbarrierefunktion als die weiter außen gelegen Corneozytenschichten.

Insgesamt lässt sich sagen, dass das implementierte PBPK Modell humaner Haut sehr gut dafür geeignet ist, um die Permeation unterschiedlicher Wirkstoffe durch Haut unterschiedlichen Reifegrades zu berechnen.

Um die Ergebnisse der Simulation des PBPK Modells humaner Haut zur Vorhersage der Wirkstoffpermeation von Timolol bei Frühgeborenen besser einordnen zu können, wurden im folgenden Teil der Arbeit Permeationsversuche von Timolol an Schweineohrhaut mit differenzierten Hautbarriereigenschaften durchgeführt. Anschließend konnten die voneinander unabhängigen Ergebnisse der Computersimulation und die Ergebnisse des *in vitro* Modells an Schweineohrhaut miteinander verglichen werden.

3.3 *In vitro* Permeationsstudien

3.3.1 Histologie der mittels Klebebandabrisstechnik generierten Hautproben unterschiedlichen Reifegrades

Aus den, wie bereits in Kapitel 2.2.3.2 und 2.2.3.3 beschrieben, vorbereiteten Proben aus Schweineohrhaut wurden, wie in Kapitel 2.2.3.8 ausführlich erläutert, Querschnitte angefertigt und mit Safranin angefärbt. In der folgenden Abbildung 3.3-1 ist eine Übersicht mikroskopischer Aufnahmen von Safranin gefärbter Schweineohrhaut nach Durchführung unterschiedlicher Anzahl an Klebebandabrissen dargestellt.

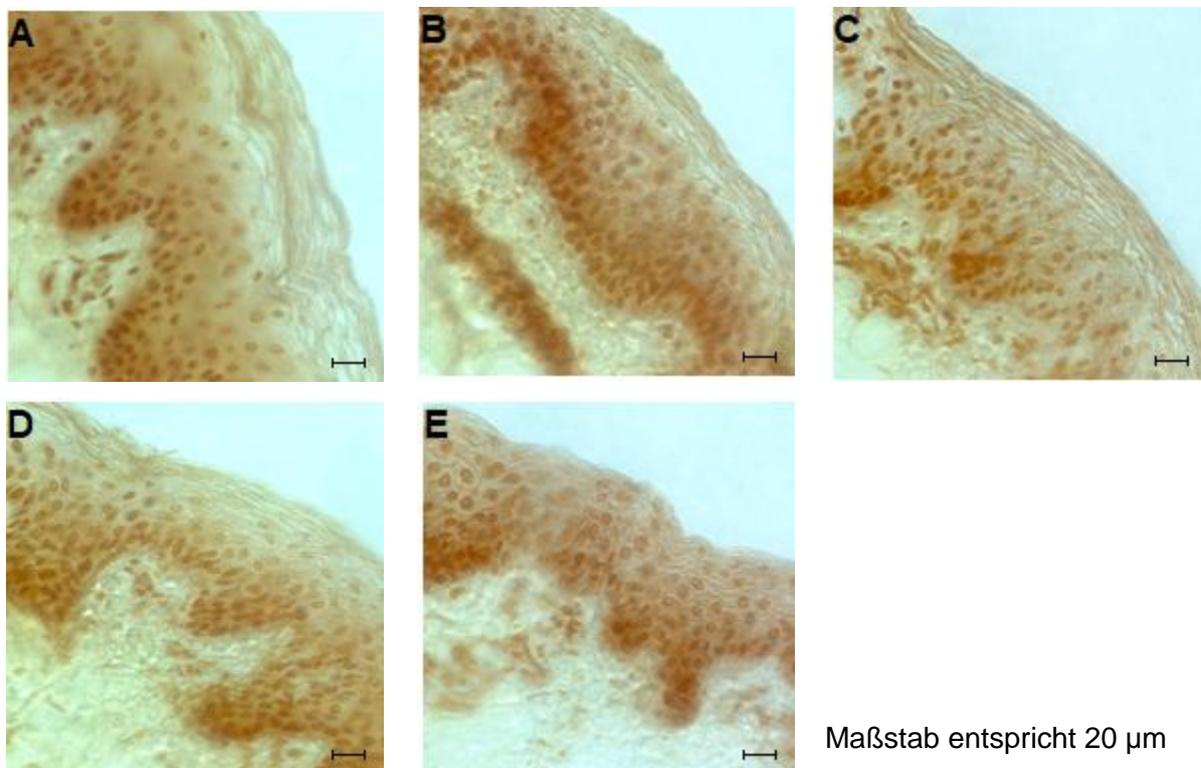


Abbildung 3.3-1: Mikroskopische Aufnahmen von Safranin gefärbter Schweineohrhaut nach Durchführung unterschiedlicher Anzahl an durchgeführten Klebebandabrissen, A: 0x, B: 3x, C: 6x, D: 9x, E: 12x.

Durch eine steigende Anzahl durchgeführter Klebebandabrissse wurden die auf der Haut vorhandenen Corneozytenschichten fortschreitend reduziert.

Mit zunehmender Anzahl durchgeführter Klebebandabrisse wurden die auf der Haut vorhandenen Corneozytenschichten zunehmend weniger, bis das Stratum corneum nahezu vollständig von der Haut entfernt war.

Die Anzahl der im Stratum corneum vorhandenen Corneozytenschichten in Abhängigkeit von der durchgeführten Anzahl an Klebebandabrissen ist in der nachfolgenden Abbildung 3.3-2 graphisch dargestellt.

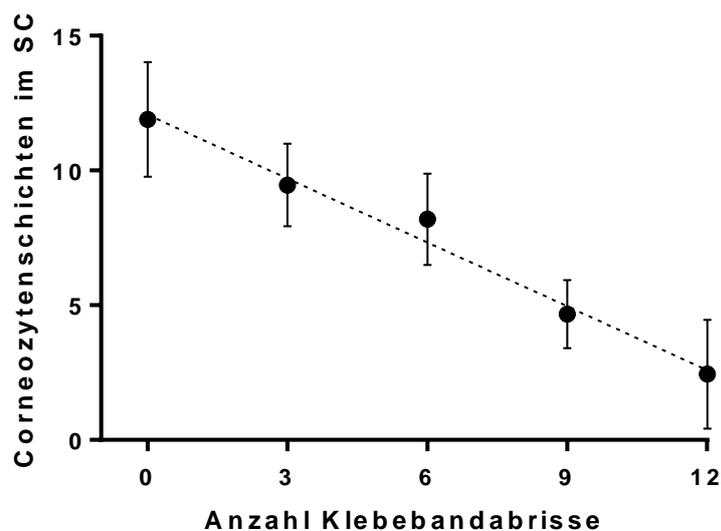


Abbildung 3.3-2: Im Stratum corneum von Schweineohrhaut vorhandene Corneozytenschichten nach Durchführung unterschiedlicher Anzahl an Klebebandabrissen; n = 6; Arithmetischer Mittelwert ± Standardabweichung (SD).

Durchgeführt wurden 0, 3, 6, 9 und 12 Klebebandabrisse und die Anzahl der anschließend auf den Hautproben vorhandenen Corneozytenschichten gezählt.

Die im Stratum corneum vorhandene Menge an Corneozytenschichten nahm mit zunehmender Anzahl an Klebebandabrissen ab. Unbehandelte Haut, an welcher keine Klebebandabrisse durchgeführt wurden, hatte durchschnittlich ungefähr 12 ± 2 Corneozytenschichten. Nach 3, 6, 9 oder 12 Klebebandabrissen waren durchschnittlich noch 10 ± 2 , 8 ± 2 , 5 ± 1 und 2 ± 2 Corneozytenschichten vorhanden. Durch eine definierte Anzahl an Klebebandabrissen ist keine konstante Abtragung des Stratum corneums möglich, die Anzahl der Klebebandabrisse korreliert somit nicht zwangsläufig mit der abgetragenen Menge an Stratum corneum (Forster et al., 2011; Kalia et al., 2000).

Auch die Regressionsgerade mit einem Bestimmtheitsmaß von 0,9837 unterstützt diese Aussage. Die Werte schwanken deutlich um die Regressionsgerade. Eine Standardabweichung von bis zu 2 Corneozytenschichten ist relativ groß, da wie bereits in Kapitel 3.2.2 beschrieben, insbesondere bei den innenliegenden Corneozytenschichten jede vorhandene bzw. nicht vorhandene Corneozytenschicht starken Einfluss auf die Hautbarrierefunktion hat. Bei den folgenden Untersuchungen wurde deshalb nach Durchführung der *in vitro* Permeationsstudien die Dicke des auf den Hautproben vorhandenen Stratum corneums mittels Konfokaler Raman-Mikroskopie bestimmt (Kapitel 2.2.3.9). Diese Methodik ermöglichte es somit, die Auswirkungen des vorhandenen Stratum corneums auf die Wirkstoffpermeation zu untersuchen.

3.3.2 Ergebnisse der *in vitro* Permeationsstudien

Im folgenden Abschnitt werden die Ergebnisse der *in vitro* Permeationsstudien schrittweise erläutert, interpretiert und diskutiert. Zunächst wurden die *in vitro* Permeationsstudien (2.2.3.6) mit Hautproben modifizierter Hautbarrierefunktion (2.2.3.2) durchgeführt.

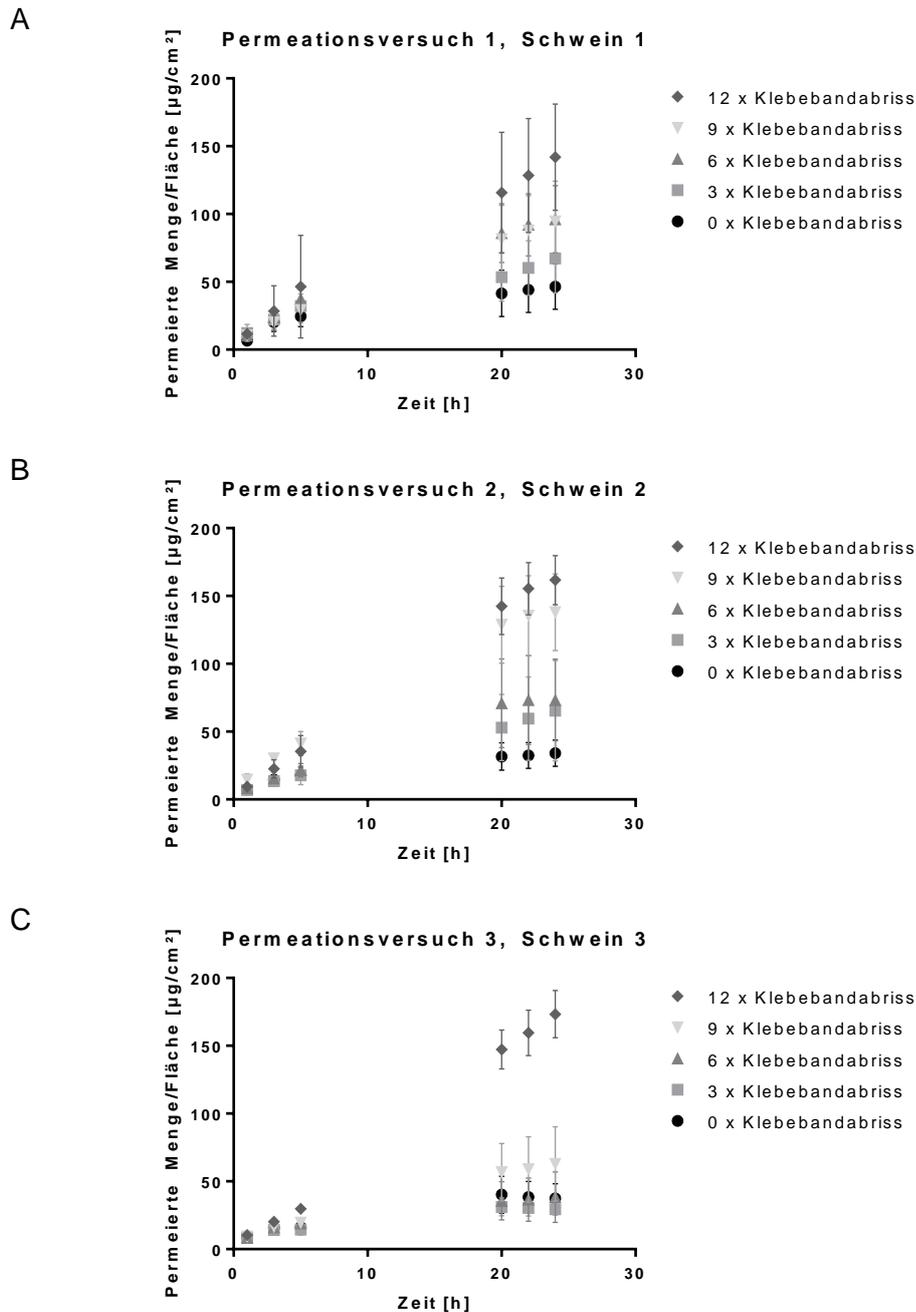


Abbildung 3.3-3: Vergleich der *in vitro* Permeation von Timolol durch Hautproben nach Durchführung unterschiedlicher Anzahl an Klebebandabrissen aufgetragen gegen die Zeit; Akzeptormedium: natriumchloridhaltiger Phosphatpuffer pH 7,4; n= 3; Arithmetischer Mittelwert \pm SD; durchgeführt an Schweineohrhaut aus 3 verschiedenen Spendertieren A, B und C.

Dargestellt ist ein Zeitraum von 24 h und die Durchführung von 0, 3, 6, und 12 Klebebandabrissen.

Abbildung 3.3-3 zeigt die Permeation von Timolol durch Hautproben von Schweineohrhaut nach Durchführung unterschiedlicher Anzahl an Klebebandabrissen aufgetragen gegen die Zeit. Durch die Klebebandabrisse wurde das Stratum corneum, welches für die Hauptbarrierefunktion der Haut verantwortlich ist (Harding, 2004), schrittweise abgetragen. Dadurch wurden Hautproben unterschiedlicher Durchlässigkeit generiert, womit Reifungszustände der Haut von Frühgeborenen unterschiedlichen Reifegrades simuliert werden sollen (Sekkat et al., 2002, 2004b). Erwartungsgemäß stieg mit zunehmender Anzahl an Klebebandabrissen die nach 24 h durch die Haut permeierte Wirkstoffmenge an (A: 46,5 / 67,3 / 96,1 / 94,5 / 142,0 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$; B: 34,1 / 65,4 / 73,3 / 138,0 / 161,7 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$; C: 37,4 / 29,4 / 38,4 / 62,8 / 173,3 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$).

Die Proben ohne Klebebandabriss simulierten mit einem intakten und vollständigen Stratum corneum eine intakte Hautbarrierefunktion, die Durchlässigkeit und die permeierte Wirkstoffmenge sollten also relativ gering sein. Bestimmt wurde eine durchschnittlich permeierte Wirkstoffmenge von 46,5, 34,1 und 37,4 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, dies entspricht einer permeierten Wirkstoffmenge von 21,9, 16,1 und 17,6 %.

Nach der Durchführung von 12 Klebebandabrissen sollte das Stratum corneum weitgehend abgetragen und somit nahezu keine Hautbarrierefunktion mehr vorhanden sein. Die durchschnittlich permeierte Wirkstoffmenge war hier mit Werten von 142,0, 161,7 und 173,3 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ erwartungsgemäß am größten. Insgesamt permeierten hier 66,9, 76,2 und 81,7 % des in der applizierten Formulierung vorhandenen Wirkstoffs.

Die Durchführung von 3, 6 und 9 Klebebandabrissen simulierte Hautbarrierefunktionen zwischen diesen beiden Extremen, also 25, 50 und 75 %. Die durchschnittlich permeierte Wirkstoffmenge bei 0 und 12 Klebebandabrissen liegt, wie oben bereits aufgeführt, bei etwa 15 bzw. 75 % des in der applizierten Formulierung vorhandenen Wirkstoffs. Erwartet wurden für die Durchführung von 3, 6 und 9 Klebebandabrissen somit Ergebnisse im Bereich von 30, 45 und 60 % des in der applizierten Formulierung vorhandenen Wirkstoffs.

Allerdings korreliert, wie bereits erläutert, die Anzahl der Klebebandabrisse nicht zwangsläufig mit der abgetragenen Menge an Stratum corneum (Forster et al., 2011;

Kalia et al., 2000). Dies ist auch an den Ergebnissen dieser *in vitro* Permeationsstudien deutlich zu erkennen.

In Abbildung 3.3-3 A liegen die Ergebnisse der Proben mit 3 und 6 Klebebandabrissen mit 67,3 und 96,1 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, dies entspricht 31,7 und 45,3 % permeierter Wirkstoffmenge, im erwarteten Bereich. Bei der Durchführung von 9 Klebebandabrissen liegt das Ergebnis mit 94,5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, dies entspricht 44,5 % permeierter Wirkstoffmenge, jedoch deutlich unter dem erwarteten Wert, es wurde also scheinbar durchschnittlich deutlich weniger Stratum corneum abgetragen.

In Abbildung 3.3-3 B entsprechen die Ergebnisse der Proben mit 3 und 9 Klebebandabrissen mit 65,4 und 138,0 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, dies entspricht 30,8 und 65,1 %, den Erwartungen. Hier liegt das Ergebnis bei 6 Klebebandabrissen mit 73,3 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, dies entspricht 34,4 %, unter dem erwarteten Wert von etwa 45 %.

In Abbildung 3.3-3 C liegen alle Proben mit 3, 6 und 9 Klebebandabrissen mit Ergebnissen von 29,4, 38,4 und 62,8 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, dies entspricht 13,8, 18,1 und 29,6 %, deutlich unter den erwarteten Ergebnissen von etwa 30, 45 und 60 %. So wurden auch hier offenbar nur wenige bis keine Corneozyten durch die Klebebandabrissse entfernt.

3.3.2.1 Betrachtung der Wirkstoffpermeation in Abhängigkeit von der durchgeführten Anzahl an Klebebandabrissen

In diesem Abschnitt wird die permeierte Wirkstoffmenge von Timolol nach 24 h durch Schweineohrhaut in Abhängigkeit der durchgeführten Anzahl an Klebebandabrissen betrachtet (Abbildung 3.3-4).

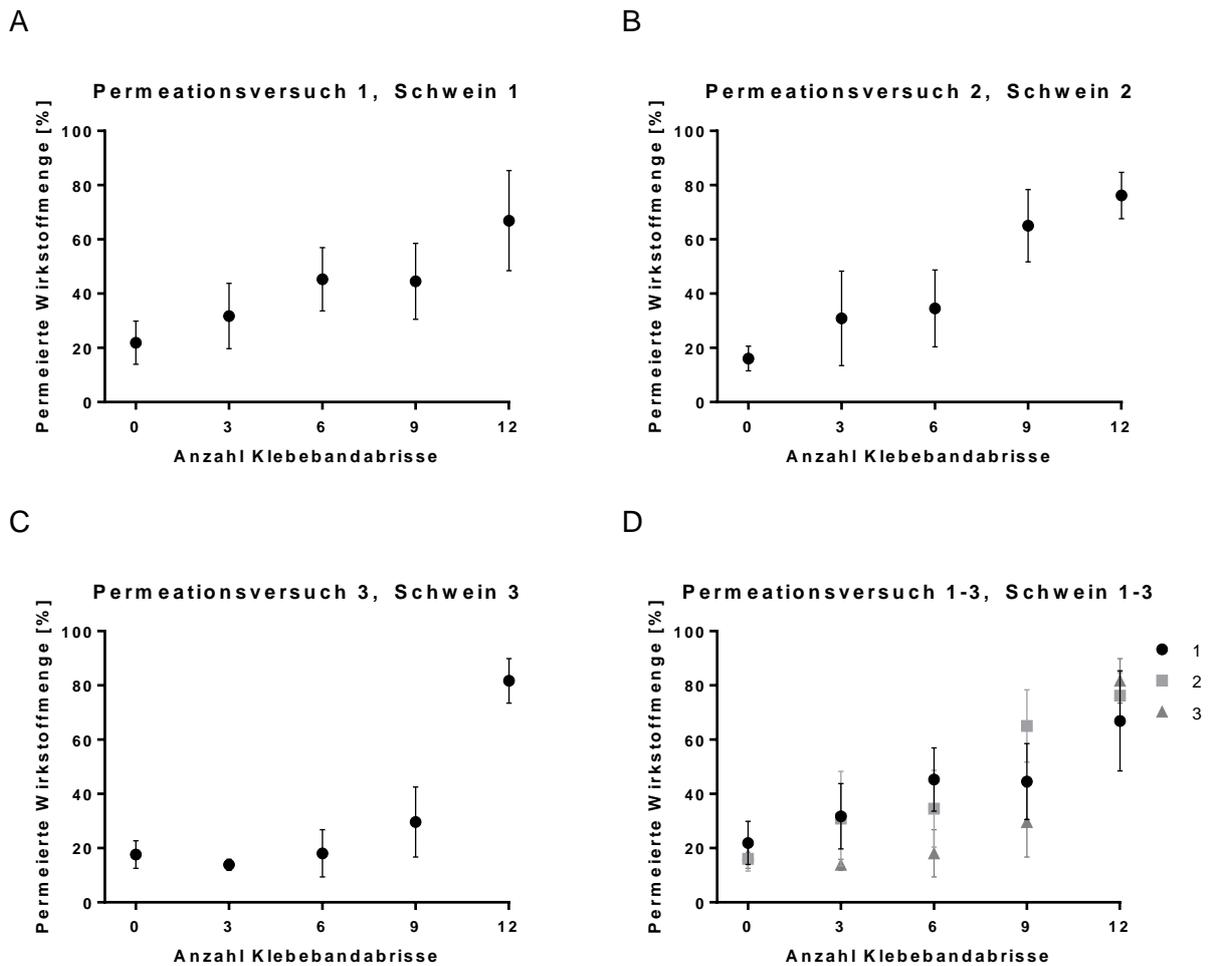


Abbildung 3.3-4: Permeierte Wirkstoffmenge aufgetragen gegen die Anzahl an Klebebandabrissen; n = 3; Arithmetischer Mittelwert ± SD; durchgeführt an Schweineohrhaut aus 3 verschiedenen Spendertieren A, B und C; D Gesamtübersicht.

Dargestellt ist die nach 24 h permeierte Wirkstoffmenge nach Durchführung von 0, 3, 6, 9 und 12 Klebebandabrissen.

Es ist gut zu erkennen, dass Anzahl der Klebebandabriss nicht mit der permeierten Wirkstoffmenge korreliert. Wäre dies der Fall, so sollten die Werte der permeierten Wirkstoffmenge auf einer Geraden liegen und die Standardabweichungen sollte deutlich geringer ausfallen. In Abbildung 3.3-4 A weichen insbesondere die Proben mit 9 Klebebandabrissen, in Abbildung 3.3-4 B die Proben mit 6 Klebebandabrissen und in Abbildung 3.3-4 C die Proben mit 3, 6 und 9 Klebebandabrissen stark von der linearen Korrelation ab. Zudem sind die Standardabweichungen der Proben bei gleicher Anzahl an Klebebandabrissen relativ hoch. Dies unterstützt die Aussage,

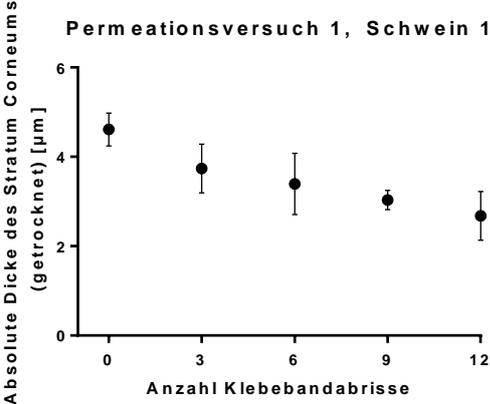
dass durch eine definierte Anzahl an Klebebandabrissen keine konstante Abtragung des Stratum corneums möglich ist. Die 3 Permeationsstudien wurden an Haut von 3 unterschiedlichen Spendertieren durchgeführt.

Zusammenfassend sind sie in Abbildung 3.3-4 D in einem Graph dargestellt. Beachtet werden muss jedoch, dass mit biologischen Proben gearbeitet wird, welche auch große interindividuelle Schwankungen aufweist.

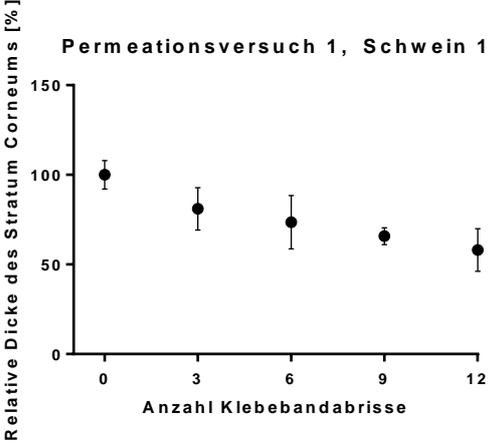
3.3.2.2 Betrachtung der absoluten und relativen Dicke des Stratum corneums in Abhängigkeit von der durchgeführten Anzahl an Klebebandabrissen

Zur Verbesserung der quantitativen Erfassung des auf den Hautproben vorhandenen Stratum corneums, wurden die verwendeten Hautproben nach der Durchführung der Permeationsstudien aufbereitet und die Dicke des darauf vorhandenen Stratum corneums mittels konfokaler Raman-Mikroskopie anhand einer von Zhang und Lunter (2018) entwickelten Methodik bestimmt (Kapitel 2.2.3.9). Dies diente dazu, einen Zusammenhang zwischen Hautreife und Wirkstoffpermeation zu ermitteln.

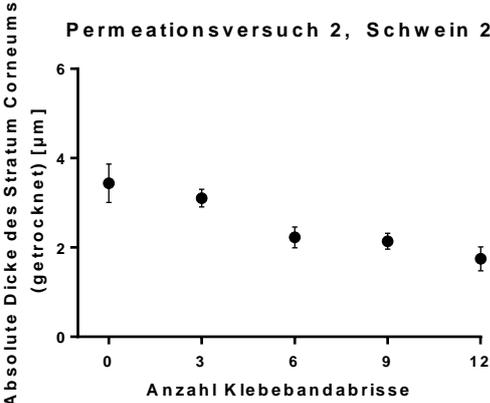
A



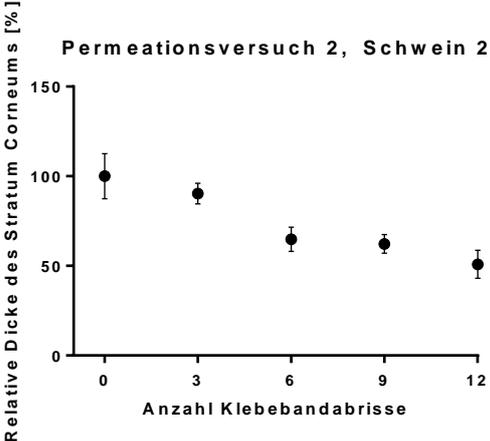
a



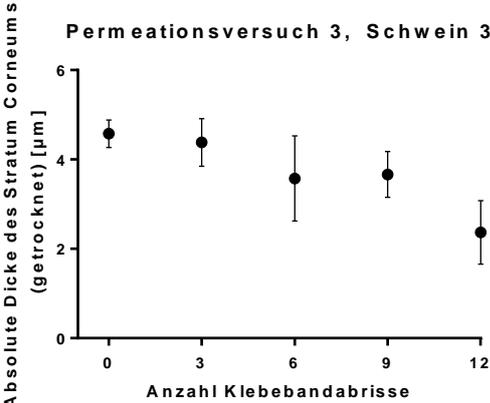
B



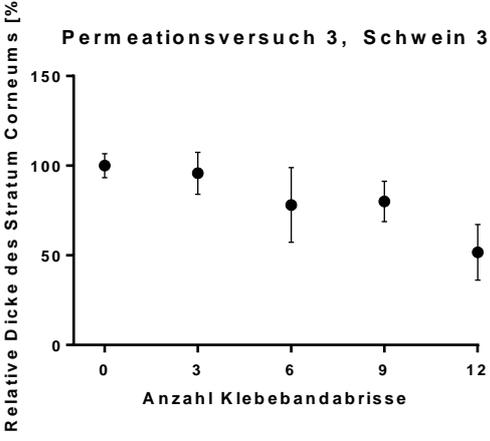
b



C



C



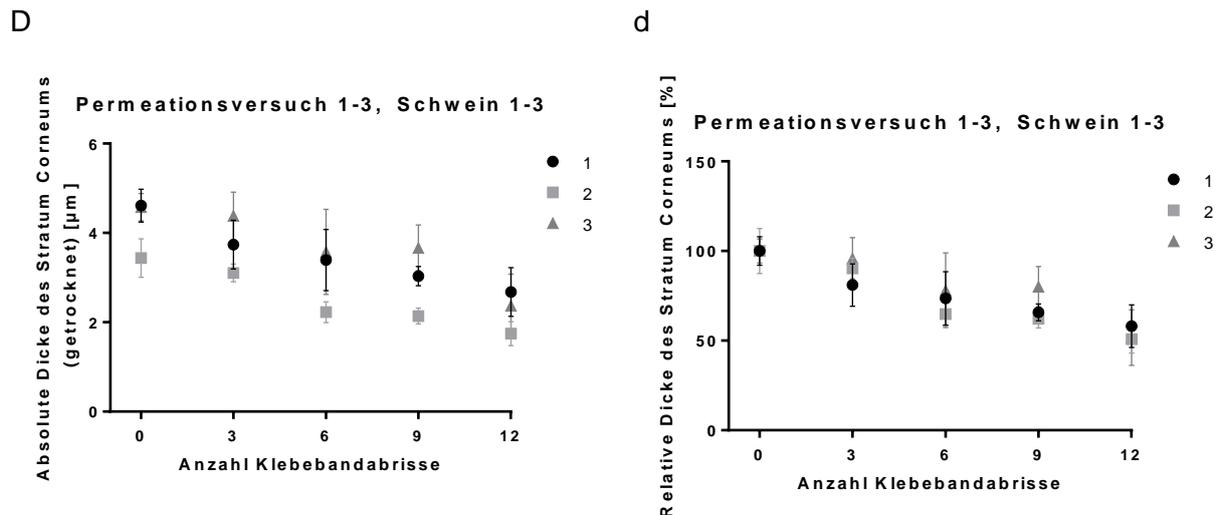


Abbildung 3.3-5: Absolute (A-D) und relative (a-d) Dicke des getrockneten Stratum corneums der Hautproben aufgetragen gegen die Anzahl der durchgeführten Klebebandabrissse; n=3; Arithmetischer Mittelwert \pm SD; durchgeführt an Schweineohrhaut aus 3 verschiedenen Spendertieren A/a, B/b und C/c; Gesamtübersicht D/d.

Durchgeführt wurden jeweils 0, 3, 6, 9 und 12 Klebebandabrissse.

In Abbildung 3.3-5 A-D wurden die mittels konfokaler Raman-Mikroskopie bestimmten Dicken des isolierten, getrockneten Stratum corneums der Hautproben gegen die Anzahl der jeweils durchgeführten Klebebandabrissse aufgetragen. Da das Stratum corneum nach der Isolation von den Hautproben vor der Vermessung getrocknet wurde, sind die gemessenen Werte deutlich kleiner als dies der Dicke von hydriertem Stratum corneum *in vivo* entspricht. Je nach anatomischer Region ist intaktes menschliches Stratum corneum zwischen 10 und 20 μm dick (van Smeden et al., 2014). Die mittels der von Zhang und Lunter (2018) entwickelten Methodik ermittelten Maximalwerte liegen dagegen zwischen 3 und 5 μm .

Wie zu erwarten nahm die Dicke des Stratum corneums mit zunehmender Anzahl an Klebebandabrissen ab. In Abbildung 3.3-5 A ist dies sehr schön zu erkennen. Allerdings zeigen die Proben mit 6 Klebebandabrissen mit $3,3911 \pm 0,6847 \mu\text{m}$ eine sehr große Standardabweichung. Insbesondere bei diesen Proben scheint die durch 6 Klebebandabrissse abgetragene Menge an Stratum corneum sehr stark zu variieren.

In Abbildung 3.3-5 B waren die Werte für 6 und 9 Klebebandabriss mit $2,2268 \pm 0,2321 \mu\text{m}$ und $2,1390 \pm 0,1768 \mu\text{m}$ annähernd gleich. Hier wurde trotz einer höheren Anzahl an Klebebandabrissen nicht mehr Stratum corneum abgetragen. Dieses Ergebnis bestätigt die oben genannte Aussage, dass durch eine definierte Anzahl an Klebebandabrissen eine definierte Abtragung an Stratum corneum nicht möglich ist. Auffallend ist außerdem, dass auch nach 12 Klebebandabrissen noch eine dünne Schicht an Stratum corneum auf den Hautproben vorhanden zu sein schien.

In Abbildung 3.3-5 C zeigen die Proben mit 6 Klebebandabrissen mit $3,5742 \pm 0,9522 \mu\text{m}$ wieder eine sehr große Standardabweichung, das heißt die durch 6 Klebebandabriss abgetragene Menge an Stratum corneum variiert stark. Die Werte der Proben mit 6 und 9 Klebebandabrissen waren mit $3,5742 \pm 0,9522 \mu\text{m}$ und $3,6647 \pm 0,5142 \mu\text{m}$ annähernd gleich, die Dicke der Proben nach 9 Klebebandabrissen liegen, entgegen der Erwartung, sogar leicht über den der Proben mit 6 Klebebandabrissen.

In Abbildung 3.3-5 D sind die Ergebnisse aller 3 Spendertiere zusammenfassend in einem Graph dargestellt. Insgesamt scheint die Dicke der Hautproben des Spendertieres 2 etwas geringer gewesen zu sein als die der Haut der Spendertiere 1 und 3.

Die Dicke des Stratum corneums bei gesunden Erwachsenen an gleichen Körperstellen zeigt deutliche Unterschiede, dennoch ist die Barrierefunktion der Haut relativ konstant (Forster et al., 2011). Individuen mit einem dünnen Stratum corneum scheinen folglich mehr Barrierefunktion in einem dünneren Gewebestück zu implementieren. Wie diese Effektivität zustande kommt, ist bisher jedoch nicht bekannt (Kalia et al., 2000). Selbst wenn die gleiche Menge an Stratum corneum abgetragen wird, resultiert dies somit nicht zwangsläufig in der gleichen Änderung der Wirkstoffpermeation. Es muss somit immer die prozentual abgetragene Menge an Stratum corneum betrachtet werden, um die daraus resultierende Auswirkung auf die Wirkstoffpermeation erfassen zu können.

In Abbildung 3.3-5 a-d wurde deshalb die relative Dicke des Stratum corneums in Prozent in Abhängigkeit von der durchgeführten Anzahl an Klebebandabrissen

dargestellt. Als 100 % wurde der Wert der unbehandelten Hautprobe verwendet. Bei 0 % ist keine Stratum corneum mehr auf der Haut vorhanden. Die Ergebnisse sind die gleichen wie bereits in Abbildung 3.3-5 A-C erläutert. In Abbildung 3.3-5 d sind die Ergebnisse aller Spendertiere in einem gemeinsamen Graph dargestellt.

3.3.2.3 Betrachtung der relativen Dicke des Stratum corneums in Abhängigkeit von der permeierten Wirkstoffmenge nach 24 h

Die unteren Schichten des Stratum corneums scheinen laut Literatur und entsprechend der bereits in Kapitel 3.2.2 erläuterten Ergebnisse stärkeren Einfluss auf die Barrierefunktion zu haben als die äußeren Schichten. So konnten Kalia et al. (2000) in einer Studie zeigen, dass das Entfernen der äußeren Stratum corneum Schichten durch Klebebandabrisse eine proportional geringere Auswirkung auf die Hautdurchlässigkeit hat, als die Entfernung der darunter liegenden Schichten. Im nächsten Schritt sollte deshalb die ermittelte Dicke des auf den Hautproben vorhandenen Stratum corneums mit der zuvor ermittelten permeierten Wirkstoffmenge nach 24 h korreliert werden.

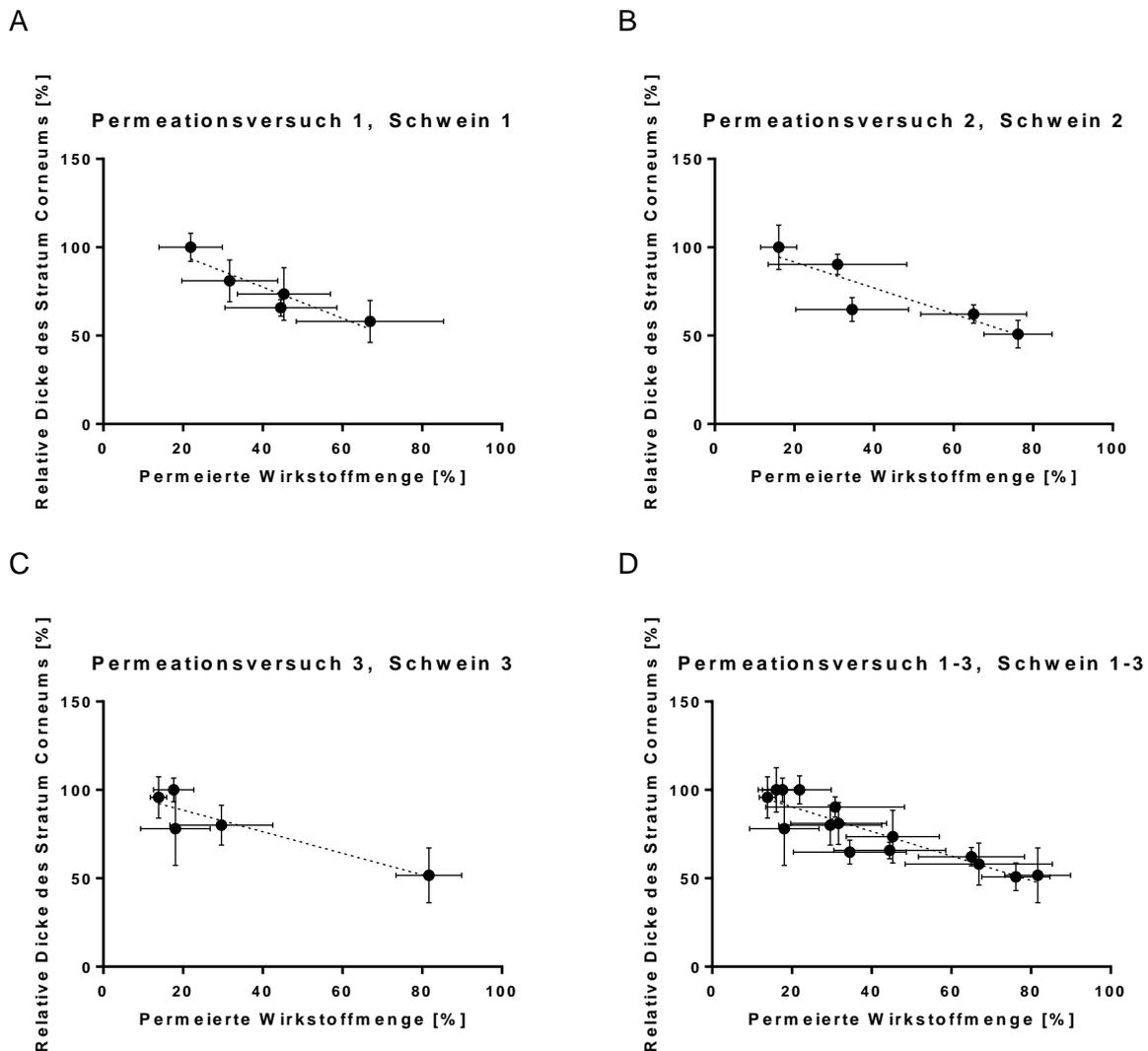


Abbildung 3.3-6: Korrelation zwischen der relativen Dicke des Stratum corneums und permeierter Wirkstoffmenge; n=3; Arithmetischer Mittelwert \pm SD; durchgeführt an Schweineohrhaut aus 3 verschiedenen Spendertieren A, B und C; Gesamtübersicht D.

Betrachtet wurde die nach 24 h permeierte prozentuale Wirkstoffmenge in Abhängigkeit von der relativen Dicke des auf den Hautproben vorhandenen Stratum corneums.

In Abbildung 3.3-6 wurde die relative Dicke des Stratum corneums der Hautproben gegen die nach 24 h permeierte Wirkstoffmenge von Timolol aufgetragen. Wie zu erwarten steigt die permeierte Wirkstoffmenge mit abnehmender Stratum corneum Dicke. Eine stärkere Zunahme der permeierten Wirkstoffmenge bei geringeren Dicken des Stratum corneums konnte hier nicht beobachtet werden, da sich eine nahezu lineare Korrelation zwischen der relativen Dicke des Stratum corneums und der permeierten Wirkstoffmenge ergibt.

In der nachfolgenden Tabelle 3.3-1 sind die berechneten Bestimmtheitsmaße der in Abbildung 3.3-6 aufgeführten Regressionsgeraden dargestellt.

Tabelle 3.3-1: Übersicht der berechneten Bestimmtheitsmaße der Regressionsgeraden aus Abbildung 3.3-6 A-D.

Abbildung	Bestimmtheitsmaß der Regressionsgeraden
Abbildung 3.3-6 A	0,8685
Abbildung 3.3-6 B	0,7948
Abbildung 3.3-6 C	0,8240
Abbildung 3.3-6 D	0,8123

Auf den ersten Blick erscheinen die Bestimmtheitsmaße der Regressionsgeraden eher gering, die ermittelten Werte schwanken sehr weit um die Regressionsgeraden. Berücksichtigt werden muss hierbei jedoch zum einen, dass es sich bei der verwendeten Haut um biologisches Material handelt. Dieses weist bereits individuelle Schwankungen auf. Deshalb wurden die Untersuchungen aus den 3 verschiedenen Spendertieren zunächst auch getrennt voneinander betrachtet. Zum anderen werden die Hautproben zur Durchführung der erläuterten Experimente mehrfach stark beansprucht. Während der Präparation und dem Schneiden der Haut wurde diese mehrfach gereinigt. Obwohl dies sehr vorsichtig erfolgte, kann dies sehr leicht zu Beschädigungen des Stratum corneums führen. Auch die Durchführung der Klebebandabrisse stellt eine starke Beanspruchung der Haut dar. Nach der Durchführung der Permeationsstudien wurde die aufgetragene Formulierung vorsichtig entfernt, die Haut gewaschen und das Stratum corneum isoliert und getrocknet. Auch hierbei kann es zu einer Beschädigung des Stratum corneums kommen. Insgesamt betrachtet ist die ermittelte Korrelation somit als durchaus gut zu erachten.

In Abbildung 3.3-6 D wurden die Ergebnisse der Permeationsstudien 1-3 aus 3 verschiedenen Spendertieren noch einmal in einer Graphik zusammenfassend dargestellt und ausgewertet. Das Bestimmtheitsmaß der Regressionsgeraden lag bei 0,8123. Da es sich hierbei um Hautproben aus 3 verschiedenen Spendertieren handelte, welches als biologisches Material bereits sehr große interindividuelle Schwankungen aufweisen kann und aus der bereits oben dargelegten Problematik

bei der Handhabung und Aufbereitung der biologischen Materialien ist dieses Ergebnis als ebenfalls als durchaus gut zu betrachten.

3.3.3 Zusammenfassung der Ergebnisse der *in vitro* Permeationsstudien

In den Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass die Abtragung des Stratum corneums bei Hautproben deren Hautbarrierefunktion und somit die Wirkstoffpermeation von Timolol beeinflusst. Reduzierte Hautbarrierefunktionen führten zu deutlich erhöhten Wirkstoffpermeationen. Wird das Stratum corneum mittels Klebebandabrisstechnik abgetragen, so korreliert die Anzahl der Klebebandabrisse nicht mit der abgetragenen Menge an Stratum corneum. Es ist deshalb eine zusätzliche Methodik zur Bestimmung der abgetragenen Menge beziehungsweise noch auf der Hautprobe vorhandenen Menge an Stratum corneum zwingend notwendig. Eine geeignete Möglichkeit hierfür stellt die konfokale Raman-Mikroskopie dar. Sie ermöglicht die Messung der Dicke des von den Hautproben isolierten und getrockneten Stratum corneums. Da die abgetragene Menge an Stratum corneum immer in Relation zur Gesamtdicke des Stratum corneums des jeweiligen Individuums betrachtet werden muss, wurde eine Korrelation zwischen der relativen Dicke des Stratum corneums und der permeierten Wirkstoffmenge erstellt. Erwartungsgemäß galt, je geringer die relative Dicke des Stratum corneums war, desto größer war die Gesamtmenge an permeiertem Wirkstoff. Das in dieser Arbeit entwickelte *in vitro* Modell ermöglichte die Untersuchung der Hautpermeation von Haut mit differenzierter Hautbarrierefunktion, um damit unterschiedliche Reifegrade der Haut bei der Entwicklung von Frühgeborenen zu simulieren. Es bietet somit die Möglichkeit, das Permeationsverhalten von Wirkstoffen, welche für die Behandlung von Frühgeborenen dermal appliziert werden, systematisch zu untersuchen und dadurch die Formulierungsentwicklung und die Erstellung von Dosisregimen, welche an die Entwicklung der Frühgeborenen angepasst sind, zu erleichtern.

3.4 Vergleich der Ergebnisse des entwickelten PBPK Modells humaner Haut und des entwickelten *in vitro* Modells zur Vorhersage der Hautpermeation von Timolol bei Frühgeborenen

In diesem Kapitel wurden die Ergebnisse der Simulation des PBPK Modells humaner Haut aus Kapitel 3.2.2 und die Ergebnisse der *in vitro* Permeationsstudien aus Kapitel 3.3.2 zur Vorhersage der Wirkstoffpermeation von Timolol bei Frühgeborenen miteinander verglichen. Beide Ansätze wurden völlig unabhängig voneinander entwickelt und durchgeführt. Ein Vergleich beider Ansätze soll zeigen, ob beide Varianten, eine Computersimulation und ein *in vitro* Modell an Schweineohrhaut, zu vergleichbaren Ergebnissen führen.

In der nachfolgenden **Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden.** ist eine Übersicht der durchgeführten Simulation des PBPK Modells humaner Haut und der durchgeführten *in vitro* Permeationsstudien an modifizierter Schweineohrhaut dargestellt.

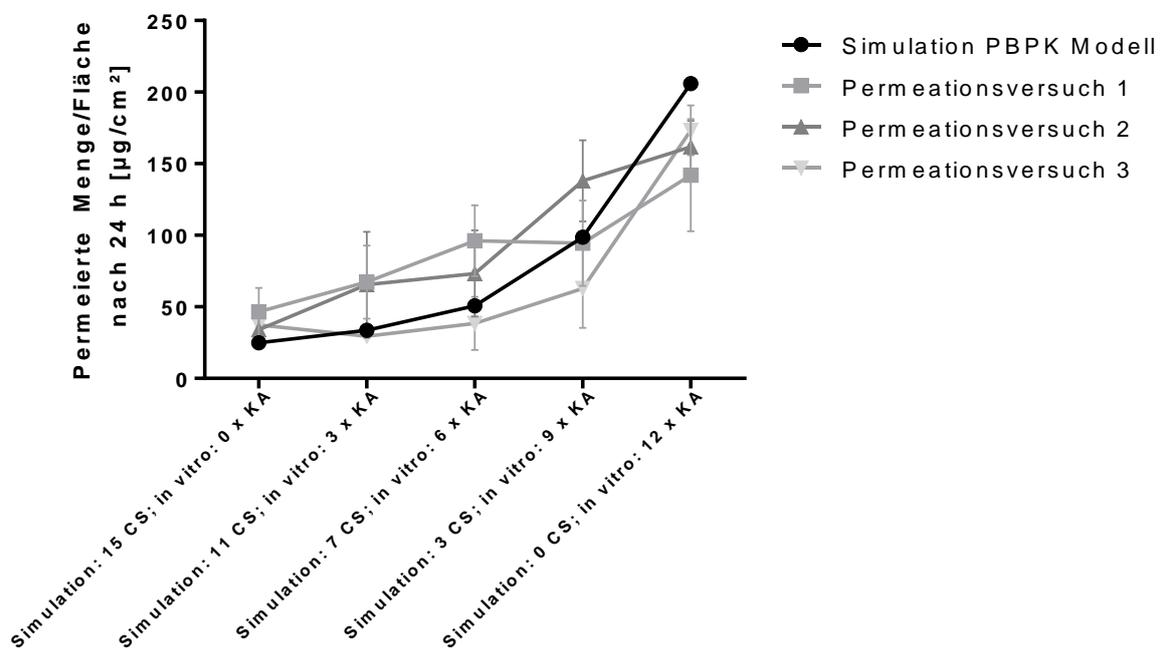


Abbildung 3.4-1: Zusammenfassende Darstellung der durchgeführten Simulation des PBPK Modells humaner Haut und der durchgeführten *in vitro* Permeationsversuch; $n = 3$; arithmetischer Mittelwert \pm SD.

Die Simulation des PBPK-Modells erfolgte mit 15, 11, 7, 3 und 0 Corneozytenschichten. Vergleichend wurden die Ergebnisse der 3 durchgeführten *in vitro* Permeationsstudien nach Durchführung von 0, 3,

6, 9 und 12 Klebebandabrissen aufgeführt. Betrachtet wurde dabei jeweils die nach 24 h permeierte Wirkstoffmenge bzw. die nach 24 h mittels PBPK-Modells berechnete permeierte Wirkstoffmenge. CS: Corneozytenschichten, KA: Klebebandabriss.

Die schwarze Kurve zeigt die Ergebnisse der Simulation des PBPK Modells humaner Haut. Aufgetragen wurde die jeweils nach 24 h permeierte Menge an Timolol durch ein Hautmodell mit einem Stratum corneum bestehend aus 15, 11, 7, 3 und 0 Corneozytenschichten.

Die in unterschiedlichen Grautönen dargestellten Kurven zeigen die Ergebnisse der *in vitro* Permeationsstudien, welche an Schweineohrhaut aus 3 unterschiedlichen Spendertieren durchgeführt wurden. Hier wurde die jeweils nach 24 h permeierte Menge an Timolol durch Schweineohrhaut nach der Durchführung von 0, 3, 6, 9 und 12 Klebebandabrissen dargestellt.

Es ist sehr schön zu erkennen, dass alle Kurven relativ gut übereinander liegen. Wie bereits in Kapitel 3.2.2 und Kapitel 3.3.2 erläutert, steigt die nach 24 h permeierte Timololmenge mit abnehmender Corneozytenzahl deutlich an, da diese zu einer Verminderung der Barrierefunktion führt. Ohne vorhandene Corneozytenschichten gelangt der Wirkstoff nahezu ungehindert und vollständig innerhalb von 24 h durch die Haut. Die Ergebnisse der *in vitro* Permeationsuntersuchungen schwankten auch innerhalb eines Spendertiers recht stark, was an den relativ großen Standardabweichungen zu erkennen ist. Sinnvoll wäre es deshalb, beispielsweise mittels TEWL-Messungen die Hautbarrierefunktion vor der Durchführung von Permeationsstudien zu überprüfen und so lange Klebebandabrisse durchzuführen, bis ein bestimmter TEWL-Wert eingestellt ist. TEWL-Messungen erfassen die Wasserdampfdurchlässigkeit der Haut, welche mit der Hautbarrierefunktion korreliert werden können. Dies würde die Vergleichbarkeit der Ergebnisse erleichtern und verbessern. In diesem Projekt wurde die Dicke des auf den Hautproben vorhandenen Stratum corneums mittels konfokaler Raman-Mikroskopie durchgeführt. Da dies jedoch eine zerstörende Prüfung ist, konnte sie erst nach der Durchführung der Permeationsstudien durchgeführt werden.

3.4.1 Zusammenfassung des Vergleichs der Ergebnisse des entwickelten PBPK Modells humaner Haut und des entwickelten *in vitro* Modells zur Vorhersage der Hautpermeation von Timolol bei Frühgeborenen

Insgesamt lässt sich jedoch sagen, dass beide Methoden sehr gut miteinander vergleichbare Ergebnisse lieferten. Durch das PBPK Modell humaner Haut konnten somit erste Berechnungen zur Wirkstoffpermeation durch Haut von Frühgeborenen durchgeführt werden. Das entwickelte PBPK Modell humaner Haut liefert somit erstmals die Möglichkeit, anhand von Berechnungen Vorhersagen zur Permeation von Wirkstoffen durch Haut von Frühgeborenen zu treffen. Dies erleichtert die Erstellung von Dosisregimen und die Anpassungen der Applikationsmenge an den Reifungsprozess der Haut bei der Behandlung von Frühgeborenen. Das *in vitro* Modell mit modifizierter Schweineohrhaut kann somit dazu dienen, entwickelte dermale Formulierungen auf ihre Handhabbarkeit unter realen Applikationsbedingungen bei 32 °C und Okklusionsbedingungen zu untersuchen und zu testen.

Im nachfolgenden Teil dieser Arbeit soll der Metabolismus und die Ausscheidung von Timolol im menschlichen Organismus genauer betrachtet werden. Die Ergebnisse des entwickelten PBPK Modells und der *in vitro* Permeationsuntersuchungen können durch Kenntnisse zum Metabolismus und zur Ausscheidung von Timolol in erwartete Urinspiegelkonzentrationen umgerechnet werden. Dies ermöglicht den Vergleich mit den im Kapitel 3.1 gewonnenen Daten der Urinproben von Frühgeborenen.

3.5 PBPK Modell des menschlichen Organismus

Im folgenden Kapitel werden die Ergebnisse des, wie in Kapitel 2.2.4 beschrieben, entwickelten und implementierten PBPK Modells des menschlichen Organismus dargestellt, erläutert und interpretiert.

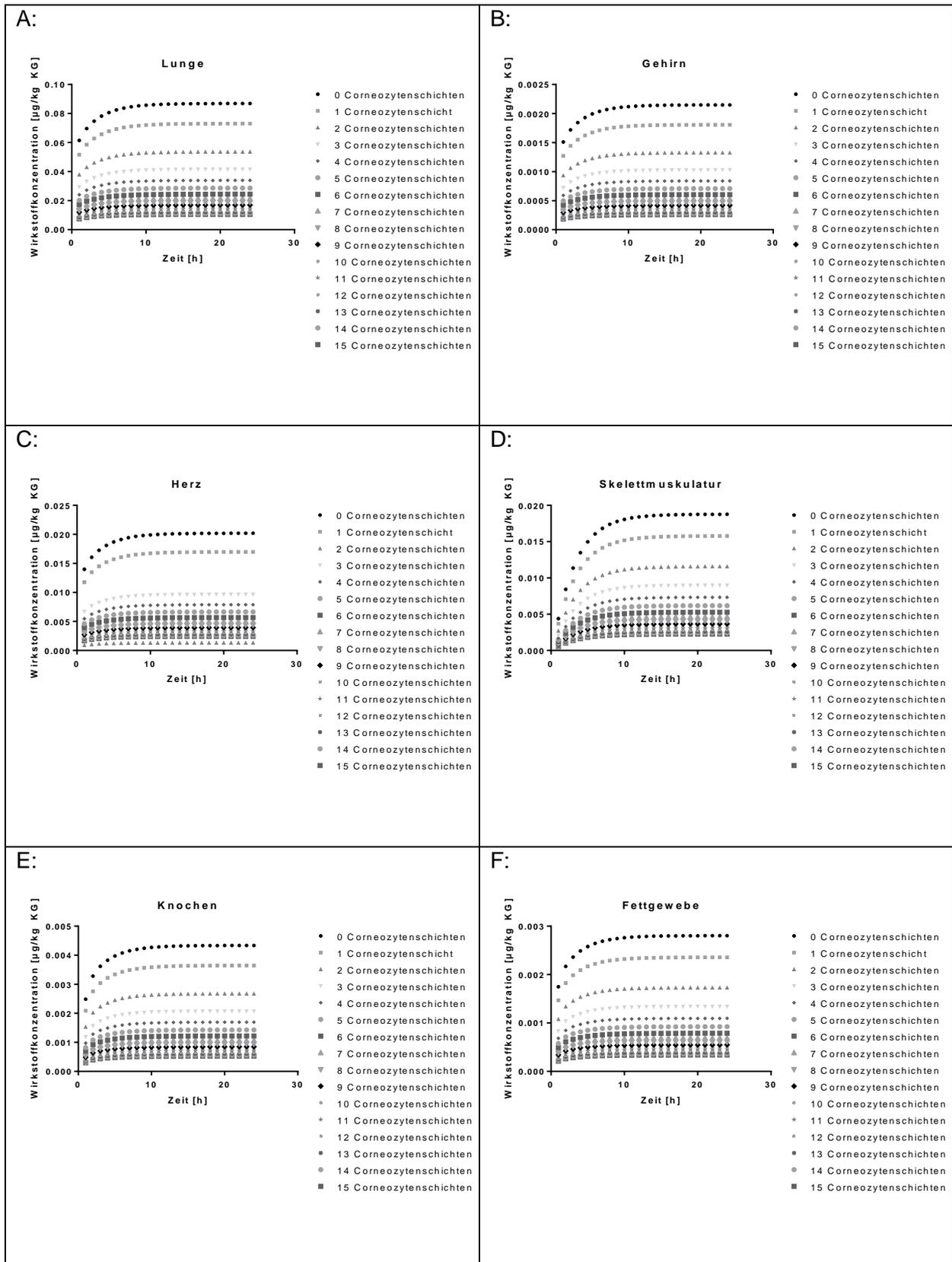
3.5.1 Anreicherung von Timolol in Organen und Geweben

Zunächst wurde die Anreicherung von Timolol in Organen und Geweben betrachtet. Die Wirkstoffmenge, die pro Zeiteinheit durch die Haut in den Organismus gelangt und über das Blut in sämtliche Gewebe und Organe verteilt wird, ergab sich aus den Berechnungen des PBPK Modells humaner Haut (Kapitel 3.2.2).

Die nachfolgenden Berechnungen wurden jeweils auf Organe und Gewebe eines Kindes mit 1 kg Körpergewicht bezogen und deshalb in der Einheit $\mu\text{g}/\text{kg KG}$ angegeben. Ist das Körpergewicht des Kindes größer, so wird die Gewebekonzentration folglich um diesen Faktor kleiner, da die vorhandene Timololmenge konstant bleibt und das Gewicht des Organs/Gewebes zunimmt. Ist das Körpergewicht des Kindes geringer, so vergrößert sich die Gewebekonzentration um den entsprechenden Faktor, da die vorhandene Timololmenge auf ein kleineres Organ/Gewebe verteilt wird.

Die durch die Haut permeierte Timololmenge folgte, wie bereits in Kapitel 3.2.2 beschrieben, einer linearen Kinetik, die Wirkstoffmenge die pro Zeiteinheit in den Organismus gelangte, blieb bei einer einmaligen Timololapplikation innerhalb von 24 h konstant. Sobald sich ein Gleichgewicht zwischen Input- und Ausscheidungsrate eingestellt hat, bleibt die im Gewebe vorhandene Timololkonzentration somit konstant. Sinkt die Inputrate oder endet die Timololapplikation, so überwiegt die Ausscheidungsrate und die Timololkonzentration im Gewebe nimmt wieder ab.

In der nachfolgenden Abbildung 3.5-1 sind die in den jeweiligen Organen mit dem PBPK-Modell berechneten Timololkonzentrationen in $\mu\text{g}/\text{kg KG}$ bei einer dermalen Applikation eines 0,5%igen Timololgels mittels einer okkludierenden Finn-Chamber einer Größe von $1,13 \text{ cm}^2$ über 24 h für Haut mit einem Stratum corneum bestehend aus 0 bis 15 Corneozytenschichten dargestellt. Hiermit wurden unterschiedliche Reifegrade der Frühgeborenen und eine im Universitätsklinikum Tübingen übliche Dosierung für IH bei Frühgeborenen abgebildet. Um die in einem Organ/Gewebe vorhandene Timololmenge zu erfassen, musste diese Konzentration mit dem jeweiligen Körpergewicht des Kindes multipliziert werden.



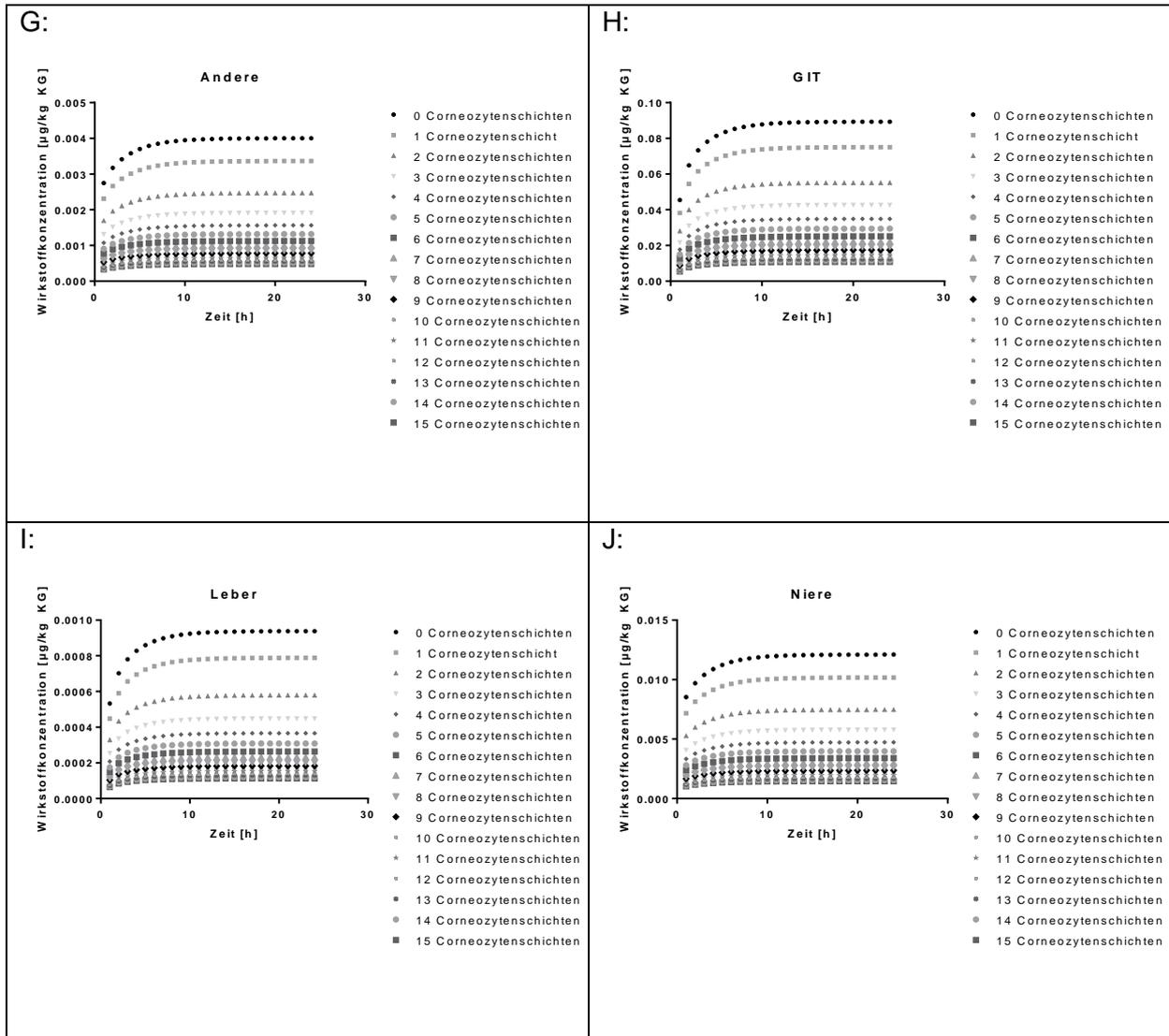


Abbildung 3.5-1: Übersicht der erwarteten Gewebekonzentrationen von Timolol bei der Applikation eines 0,5%igen Timololgels auf einer okkludierten Fläche von 1,13 cm² über 24 h.

Aufgeführt sind die für das jeweilige Organ/Gewebe berechneten Gewebekonzentrationen in einem Zeitraum von 24 h nach der Applikation eines 0,5%igen Timololgels auf eine Haut mit einem Stratum corneum bestehen aus 0 bis 15 Corneozytenschichten.

Es ist gut zu erkennen, dass sich bei allen Organen/Geweben bereits innerhalb der ersten 10 h ein Gleichgewicht zwischen Input- und Ausscheidungsrate eingestellt hat und die vorhandene Timololkonzentration konstant bleibt. Wird die Timololapplikation beendet, würde die Timololkonzentration wieder abfallen, da die Ausscheidungsrate überwiegt.

Erwartungsgemäß ist die im Gewebe vorhandene Timololkonzentration bei sehr unreifer Haut mit einem nicht vorhandenen SC am größten und nimmt mit einer zunehmenden Anzahl an Corneozytenschichten ab, da die insgesamt im Organismus vorhandene Timolomenge sinkt. Bei Frühgeborenen muss deshalb auch eine dermale Wirkstoffapplikation sehr streng überwacht und kontrolliert werden, da durch die nur sehr schwach ausgebildete Hautbarrierefunktion vergleichsweise viel Wirkstoff in den systemischen Blutkreislauf aufgenommen wird.

Die größte Anreicherung von Timolol findet in der Lunge statt. Dies ist in Übereinstimmung mit einer Studie von Tocco et al. (1976) aus dem Jahr 1976 in der gezeigt wurde, dass sich der lipophile Betablocker Timolol sehr stark in Lungengewebe anreichert. Im Gastrointestinaltrakt wird ebenfalls eine relativ hohe Timololkonzentration erreicht (0,089 µg/kgKG). Mittlere Konzentrationen von Timolol sind in Herz, Muskulatur und Niere zu finden (0,020 – 0,012 µg/kgKG), geringe Konzentrationen in Knochen, Fettgewebe, Gehirn und Leber (0,009-0,0043 µg/kgKG).

Bei der Bewertung und Interpretation der Ergebnisse muss berücksichtigt werden, dass bisher leider nur relativ wenige Daten zum Metabolismus und der Elimination von Timolol bekannt sind. Daten zur Anreicherung von Timolol in Gewebe und Organen wurden, wie bereits in Kapitel 2.2.4.2 ausführlich beschrieben, aus Untersuchungen an Ratten mittels Umrechnungsfaktoren in erwartete Werte beim Menschen umgerechnet (Rodgers et al., 2005a; Rodgers and Rowland, 2007). Außerdem wurden Daten von Standardmenschens bezüglich Organvolumina und prozentualen Anteilen an kardialem Auswurf des Blutes verwendet (Poulin and Theil, 2009; Williams and Leggett, 1989). Da nicht zu allen Organen ausreichende Informationen zur Verfügung standen, wurden alle fehlenden Organe und Gewebe unter dem Begriff „Andere“ zusammengefasst. Das entwickelte Modell liefert deshalb nur angenäherte Ergebnisse. Ausgegangen wird von einem gesunden, voll ausgebildeten Organismus. Frühgeborene zeigen jedoch nicht nur eine Unreife der Haut, sondern auch Unreife in einer Vielzahl anderer Organe wie Lunge, Herz, Gehirn und Gastrointestinaltrakt (Sekkat et al., 2004a). Der Stoffwechsel von Frühgeborenen kann deshalb vom Stoffwechsel eines gesunden Erwachsenen abweichen. Außerdem können Begleiterkrankungen und Begleitmedikationen den

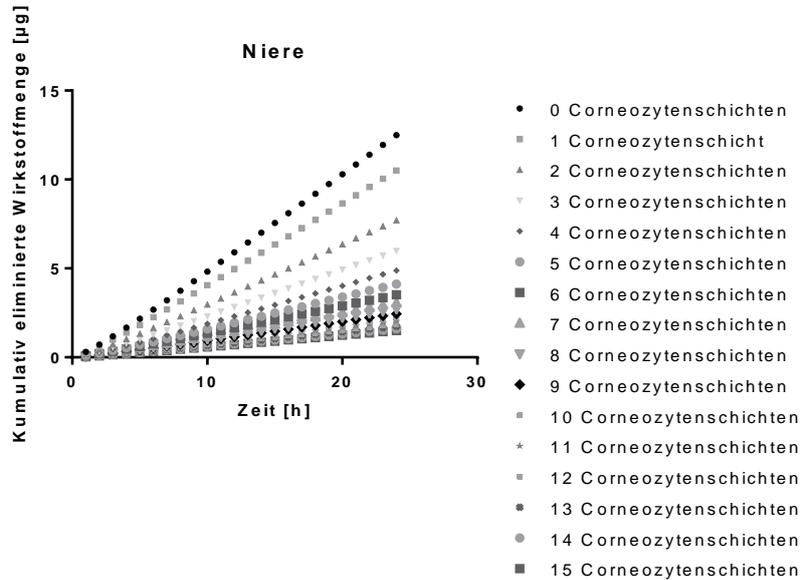
Metabolismus und die Elimination von Timolol beeinflussen. Die kalkulierten Ergebnisse stellen deshalb eine Größenordnung der erwarteten Timololmengen und Timololkonzentrationen dar. Sie sollen zur besseren Abschätzung einer an die Entwicklung der Haut von Frühgeborenen angepassten dermalen Wirkstoffapplikation dienen und die Entwicklung von dermalen Applikationssystemen, welche an die Hautreifung von Frühgeborenen angepasst sind, erleichtern.

3.5.2 Ausscheidung von Timolol aus dem Organismus

Als nächstes wurde die Ausscheidung von Timolol aus dem Organismus betrachtet. Wie in Kapitel 2.2.4.2.2 bereits beschrieben, ist der Hauptort für die Metabolisierung von Timolol die Leber (Volotinen et al., 2011). Hier werden ungefähr 90 % des Timolols metabolisiert, die restlichen 10 % werden unverändert ausgeschieden (Mantyla et al., 1983). Studienergebnisse von Fourtillan et al. (1981) welche eine Wirkstoffelimination von 12 % und von Ishizaki et al. (1978) welche eine Wirkstoffelimination von bis zu 20 % über die Niere mit dem Urin postulieren, stimmen mit diesen Ergebnissen sehr gut überein. Im Urin sind somit zwischen 5 % (Else et al., 1978) und 20 % (Tocco et al., 1975a) der applizierten Dosis an unverändert ausgeschiedenem Wirkstoff wiederzufinden.

In der nachfolgenden Abbildung 3.5-2 sind die mittels des PBPK-Modells des menschlichen Organismus berechneten Timololmengen dargestellt, welche kumulativ im Zeitraum von 24 h über die Niere bzw. Leber ausgeschieden werden.

A:



B:

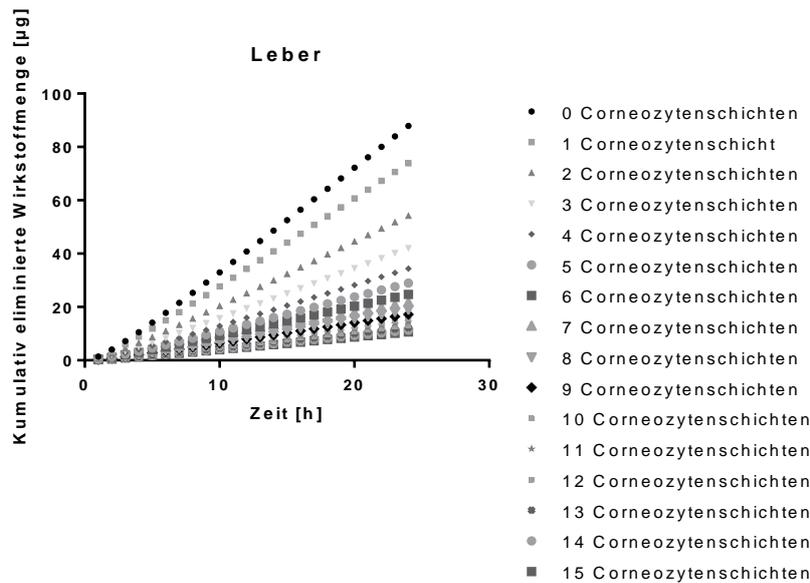


Abbildung 3.5-2: Übersicht der mit dem PBPK-Modell berechneten kumulativ ausgeschiedenen Timololmenge in Abhängigkeit von der Zeit in A: Niere, B: Leber bei einer dermalen Applikation eines 0,5%igen Timololgels auf einer okkludierten Fläche von 1,13 cm² über 24 h.

Aufgeführt sind die, mittels PBPK Modell berechneten, durch das jeweilige Organ kumulativ eliminierten Wirkstoffmengen in einem Zeitraum von 24 h nach der Applikation eines 0,5%igen Timololgels auf eine Haut mit einem Stratum corneum bestehen aus 0 bis 15 Corneozytenschichten.

Insgesamt werden bei einer 24 stündigen dermalen Applikation eines 0,5%igen Timololgels auf einer okkludierten Fläche von 1,13 cm² nach 24 h bereits wieder 43 % der insgesamt in den Organismus permeierten Timololmenge wieder ausgeschieden, davon 37,5 % über die Leber und 5,5 % über die Niere. Von der insgesamt eliminierten Wirkstoffmenge werden somit jeweils 12,45 % über die Niere und 87,55 % über die Leber ausgeschieden. Dieses Ergebnis stimmt gut mit den erwarteten Werten überein.

3.5.3 Kalkulation von erwarteten Timololkonzentrationen im Urin

Nun wurden aus den berechneten Ausscheidungsmengen von Timolol erwartete Timololkonzentrationen im Urin berechnet. Dies ermöglicht einen Vergleich der experimentell berechneten und bestimmten Daten mit den aus den Klinikproben erhobenen Daten und eine Bewertung des durchgeführten Projektes.

Wie bereits in Kapitel 1.2.4 erläutert, schwankt die Urinausscheidung von Frühgeborenen in den ersten Lebenstagen zwischen 50 (Costarino et al., 1992) und 100 (Shaffer and Meade, 1989) ml pro Kilogramm Körpergewicht. Geht man von einem Geburtsgewicht zwischen 500 g bei extrem frühgeborenen Kindern und 3500 g bei reif geborenen Kindern aus, ergibt sich somit eine Urinausscheidungsmenge zwischen 25 und 350 ml pro Tag.

Die in Kapitel 3.5.2 dargestellten Berechnungen ergaben eine nach 24 h über die Niere ausgeschiedene Timololmenge zwischen 1,51 µg bei einer vollständig ausgereiften Hautbarrierefunktion und 12,50 µg bei einer sehr unreifen Haut ohne funktionsfähiges Stratum corneum.

Die maximal erwartete Timololkonzentration im Urin ergibt sich somit aus 12,50 µg Timolol in 25 ml Urin, was einer Konzentration von 0,500 µg/ml entspricht. Die minimal erwartete Timololkonzentration im Urin ergibt sich somit aus 1,51 µg Timolol in 350 ml Urin, was einer Konzentration von 0,0043 µg/ml entspricht.

3.5.4 Vergleich der mittels PBPK Modellen berechneten Urinspiegelwerte von Timolol bei Frühgeborenen mit den Ergebnissen der analysierten Urinproben von Frühgeborenen

Im folgenden Abschnitt wurden die Ergebnisse der Analyse der Urinproben von Frühgeborenen mit IH nach einer dermalen Behandlung mit einem 0,5%igen Timololgel und die mittels PBPK Modellen berechneten Urinspiegelwerte von Timolol nach einer dermalen Applikation miteinander verglichen.

Die Ergebnisse der Berechnungen des PBPK Modells humaner Haut wurden in Kapitel 3.4 bereits mit Ergebnissen aus *in vitro* Permeationsstudien an modifizierter Schweineohrhaut verglichen. Beide unabhängig voneinander entwickelten Modelle führten zu sehr gut übereinstimmenden Ergebnissen, was die Eignung beider Modelle bestätigte. Aus diesen kalkulierten Blutspiegelwerten wurden in einem weiteren Schritt mit einem in dieser Arbeit entwickelten PBPK Modells des menschlichen Organismus die über die Niere ausgeschiedenen Timololmengen berechnet. Die hier ermittelten Timololkonzentrationen im Urin lagen bei 0,0043 bis 0,500 µg/ml.

Die minimale Timololkonzentration, welche in den Urinproben der Frühgeborenen nachgewiesen wurde (Kapitel 3.1), war durch die Bestimmungsgrenze des Analyseverfahrens begrenzt und lag bei einem Wert von 0,012 µg/ml. Die maximale gemessene Timololkonzentration lag bei einem Wert von 0,566 µg/ml.

Die Ergebnisse der mittels PBPK Modellen berechneten Urinspiegelwerte von Timolol bei Frühgeborenen (0,0043 bis 0,500 µg/ml) stimmen somit äußerst gut mit den Ergebnissen der analysierten Urinproben von Frühgeborenen (0,012 bis 0,566 µg/ml) überein.

3.5.5 Zusammenfassung der Ergebnisse des entwickelten PBPK Modells des menschlichen Organismus und deren Vergleich mit den Ergebnissen der analysierten Urinproben von Frühgeborenen

Wie zu erwarten reichert sich der lipophile nichtselektive Beta-Adrenozeptor-Antagonist Timolol auch bei einer dermalen Applikation in Geweben und Organen des Organismus an. So sprechen beispielsweise Fourtillan et al. (1981) in einer Studie von 1981 von einer sehr ausgeprägten Diffusion in extravaskuläre Kompartimente. Die Ergebnisse konnten zeigen, dass insbesondere eine starke Anreicherung im Lungengewebe berücksichtigt werden sollte. Auch die dermale Applikation eines Wirkstoffs bei Frühgeborenen muss deshalb engmaschig kontrolliert und beobachtet werden, um unerwünschte Arzneimittelwirkungen frühzeitig zu erkennen und entgegenzuwirken. In der Literatur ist bisher nur in einer Studie von Chakkittakandiyil et al. (2012) bei der topischen Verwendung von 0,1 und 0,5 % Timololmealeat bei IH eine signifikante Schlafstörung als Nebenwirkung beobachtet worden (Painter and Hildebrand, 2016). Die Sicherheit und Effizienz in einer pädiatrischen Population mit IH wurde jedoch bisher in keiner großen Kohorte untersucht (Puttgen et al., 2016).

Die berechneten kumulativen Ausscheidungsmengen von Timolol über die Niere ergaben erwartete Timololkonzentrationen zwischen 0,0043 und 0,500 µg/ml Urin. Die analysierten Urinproben von Frühgeborenen ergaben Timololkonzentrationen zwischen 0,012 und 0,566 µg/ml im Urin.

Der Vergleich zeigt, dass sowohl die berechneten, als auch die gemessenen Timololkonzentrationen im Urin sehr gut miteinander übereinstimmen. Sowohl die entwickelten PBPK Modelle, als auch das entwickelte *in vitro* Modell liefern somit realistische Ergebnisse können für die Abschätzung von erwarteten Wirkstoffspiegeln nach einer dermalen Wirkstoffapplikation bei Frühgeborenen unterschiedlicher Reifegrade verwendet werden. Dies kann die Entwicklung von dermalen Applikationssystemen, welche an den kontinuierlichen Hautreifungsprozess von Frühgeborenen angepasst sind, deutlich erleichtern.

4 Abschlussdiskussion

In der nachfolgenden Abbildung 3.5-1 ist zur besseren Übersichtlichkeit eine schematische Darstellung über die im Rahmen dieser Dissertation durchgeführten Projekte aufgeführt.

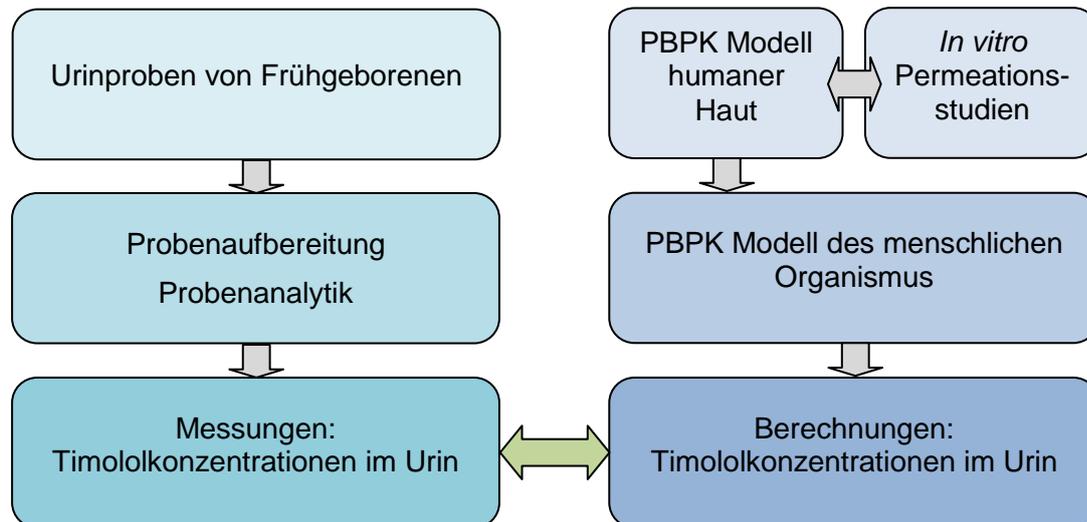


Abbildung 3.5-1: Schematische Übersicht der im Rahmen dieser Dissertation durchgeführten Teilprojekte.

Auf der linken Seite ist das Teilprojekt, welches die Aufbereitung und Analyse der Urinproben von Frühgeborenen mit IH während einer topischen Behandlung mit einem 0,5%igen Timololgel umfasst, aufgeführt. Auf der rechten Seite sind ganz oben die beiden entwickelten Modelle zur Vorhersage von Plasmaspiegelwerten von Timolol bei Frühgeborenen mit unterschiedlichen Hautreifegraden aufgeführt, nämlich das PBPK Modell humaner Haut und das *in vitro* Permeationsmodell mit modifizierter Schweineohrhaut. Beide Modelle lieferten sehr gut miteinander übereinstimmende Ergebnisse. Durch die Betrachtung des Metabolismus und der Ausscheidung von Timolol mittels eines PBPK Modells des menschlichen Organismus, in der Abbildung auf der rechten Seite mittig dargestellt, konnten aus den ermittelten Plasmaspiegelwerten die in den jeweiligen Organen vorhandenen Timololkonzentrationen berechnet werden und somit letztendlich die mit dem Urin ausgeschiedenen Timololkonzentrationen kalkuliert werden. Dies ermöglicht, in der Abbildung ganz unten aufgeführt, den Vergleich der in den Urinproben gemessenen und der mittels Modellsimulationen und –versuchen ermittelten bzw. berechneten Timololkonzentrationen im Urin.

Der erste Teil der Arbeit beschäftigte sich mit der Analyse von Urinproben von Frühgeborenen mit IH, welches durch eine dermale Applikation eines 0,5%igen Timololgels behandelt wurde. Hierbei stellte sich die Frage, ob durch diese topische

Applikation bereits systemische Wirkstoffspiegel von Timolol erreicht werden, falls ja, in welcher Größenordnung und inwiefern der Reifungsgrad der Frühgeborenen die absorbierte Timololmenge beeinflusst.

Anschließend wurde der Aspekt der Wirkstoffabsorption durch die Haut von Frühgeborenen genauer beleuchtet. Die Entwicklung eines PBPK Modells der menschlichen Haut, welches durch Variation der im Stratum corneum enthaltenen Corneozytenschichten unterschiedliche Grade der Hautreifung von Frühgeborenen widerspiegelte, ermöglichte die Berechnung von erwarteten Timolol-Plasmaspiegelwerten nach einer dermalen Applikation eines 0,5%igen Timololgels. In einem weiteren Schritt wurden zudem *in vitro* Permeationsuntersuchungen an Schweineohrhaut durchgeführt, welche durch Klebebandabrisse an unterschiedliche Hautreifungsgrade von Frühgeborenen angepasst wurde. Auch dieses Modell ermöglichte die Ermittlung von erwarteten Timolol-Plasmaspiegelwerten nach einer dermalen Applikation eines 0,5%igen Timololgels.

Um die Ergebnisse dieser beiden Modelle mit den gewonnenen Daten aus den Urinproben der Frühgeborenen vergleichen zu können, wurde im nächsten Schritt die Pharmakokinetik und insbesondere die Elimination von Timolol genauer betrachtet und ein PBPK Modell des menschlichen Organismus entwickelt. Dies ermöglichte die Kalkulation von erwarteten Timololmengen im Urin, welche von Frühgeborenen mit unterschiedlichen Hautreifegraden nach einer dermalen Applikation eines 0,5%igen Timololgels ausgeschieden werden.

4.1 Analyse von Urinproben von Frühgeborenen mit IH nach lokaler Behandlung mit Timolol

Im ersten Teilprojekt dieser Dissertation wurden Urinproben von Frühgeborenen mit IH nach einer lokalen Behandlung mit einem 0,5%igen Timololgel aus der Neonatologie des Universitätsklinikums Tübingen aufbereitet und analysiert.

Die lokale Behandlung von IH mit dem lipophilen Beta-Adrenozeptor-Antagonist Timolol ist eine im Jahr 2010 erstmals durchgeführte Behandlungsalternative für die orale Verabreichung des Betablockers Propranolol und insbesondere bei

oberflächlichen IHs empfohlen (Puttgen et al., 2016). Es stellt jedoch eine Off-Label Anwendung von Timolol dar und die Sicherheit und Effizienz dieser Therapie in einer pädiatrischen Population wurde bisher in keiner großen Kohorte untersucht (Puttgen et al., 2016). Insbesondere bei Frühgeborenen scheint es dennoch sinnvoll, diese lokale Behandlungsmöglichkeit mit Timolol in Erwägung zu ziehen, da es ein wesentlich günstigeres Risikoprofil als die systemische Gabe von Propranolol aufweist (Goelz and Poets, 2015).

Der Hauptort für die Elimination von Timolol ist die Leber, jedoch werden etwa 5 bis 20 % des Timolols unverändert durch die Niere im Urin ausgeschieden (Else et al., 1978; Tocco et al., 1975a; Volotinen et al., 2011). Systemische Timololmengen sind somit auch indirekt im Urin nachweisbar. In Zusammenarbeit mit der Neonatologie des Universitätsklinikums Tübingen wurden deshalb mit Hilfe einer Windeleinlage Urinproben von Frühgeborenen mit IH gesammelt, welche lokal mit einem 0,5%igen Timololgel behandelt wurden. Durch eine Analyse dieser Proben sollte untersucht werden, ob und wenn ja in welchem Größenordnungsbereich Timolol im Urin nachweisbar ist.

Die Untersuchungen zeigten, dass Timolol in einem Großteil der Urinproben (67 von 88, entspricht 76 %) nachweisbar war (Nachweisgrenze (Gottwald) 0,004 µg/ml). In 69 % der analysierten Proben (61 aus 88) lag die Timololkonzentration oberhalb der Bestimmungsgrenze und die im Urin vorhandene Timololkonzentration konnte quantifiziert werden (Bestimmungsgrenze (Gottwald) 0,012 µg/ml). Diese lag, nach unten begrenzt durch die Nachweisgrenze der Detektionsmethode, zwischen 0,012 und 0,566 µg/ml Timolol im Urin. Diese Ergebnisse machen deutlich, dass auch bei einer dermalen Applikation von Timolol systemisch wirksame Konzentrationen erreicht werden. Die Therapie muss deshalb stets engmaschig überwacht und kontrolliert werden, um unerwünschte Arzneimittelwirkungen frühzeitig zu erkennen und diesen entgegenzuwirken.

Es ist bekannt, dass die Haut von Frühgeborenen eine sehr viel durchlässigere Hautbarrierefunktion als die Haut von älteren Kindern und Erwachsenen aufweist (Goelz and Poets, 2015). Insbesondere das Stratum corneum, welches die Hauptbarrierefunktion der Haut darstellt, ist bei Frühgeborenen nur sehr schwach ausgebildet (Harding, 2004; Stamatias et al., 2011). Nach der Geburt wird jedoch

innerhalb von 2 bis 8 Wochen eine vollständige Reifung und somit eine funktionsfähige Hautbarrierefunktion erreicht (Harpin and Rutter, 1983; Kalia et al., 1998). Bei der Analyse der Urinproben der Frühgeborenen sollte deshalb ebenfalls untersucht werden, ob ein Zusammenhang zwischen dem Alter der Frühgeborenen bei der Geburt, also der Einfluss des Reifungsgrades durch die Schwangerschaftsdauer, dem Lebensalter der Frühgeborenen nach der Geburt, also dem Reifungsprozess der Haut nach der Geburt, und der in den Urinproben nachgewiesenen Timololmenge erstellt werden kann.

Die im Urin gemessenen Timololkonzentrationen nahmen mit steigendem postnatalem und postkonzeptionellem Alter der Frühgeborenen tendenziell ab. Auch im Laufe der Behandlung war eine tendenzielle Abnahme der im Urin nachweisbaren Timololkonzentrationen erkennbar. Beides entspricht den Erwartungen und lässt sich durch die fortschreitende Entwicklung und Reifung des Stratum corneums erklären, welches die Hauptbarrierefunktion der Haut darstellt (Harding, 2004). Bei Frühgeborenen ist die Epidermis, je nach Reifegrad, nur sehr schwach ausgebildet (Stamatas et al., 2011). Nach der Geburt erreicht die Haut durch einen kontinuierlichen Reifungsprozess innerhalb von 2 bis 8 Wochen eine vollständig funktionsfähige Barrierefunktion (Harpin and Rutter, 1983; Kalia et al., 1998). Je besser die Barrierefunktion ausgebildet ist, desto weniger Timolol gelangt durch die Haut in den systemischen Kreislauf und desto weniger Timolol ist folglich im Urin auffindbar.

Für eine statistische Auswertung der Ergebnisse dieses Projektes lagen letztlich zu wenig verfügbare Daten und Informationen vor. Insgesamt wäre eine deutlich größere Probenanzahl und ein deutlich breiteres Spektrum an Frühgeborenen mit unterschiedlichem Geburts- und Lebensalter notwendig, um statistisch belastbare Aussagen treffen zu können. Auch eine Standardisierung der Timololapplikation, bei der zu einem definierten Applikationszeitpunkt eine genau definierte Menge Timolol pro Flächeneinheit aufgetragen und zu festgelegten Zeitpunkten die Entnahme und Protokollierung der gesamten Urinausscheidungsmenge erfolgt, wäre für eine bessere Interpretation und Vergleichbarkeit der Ergebnisse sinnvoll. Ebenso sollte der genaue Status und die im Laufe der Behandlung stattfindende Rückbildung des IHs protokolliert werden, um die damit einhergehende veränderte Vaskularisierung

des Gewebes erfassen zu können, da auch diese die Wirkstoffpermeation beeinflusst.

Im Rahmen dieses Projektes standen aus ethischen Gründen nur Urinproben und keine Plasmaspiegelwerte der Frühgeborenen zur Verfügung. Es muss jedoch berücksichtigt werden, dass Frühgeborene nicht nur eine unreife Hautbarriere, sondern auch eine Unreife einer Vielzahl von Organen aufweisen können (Sekkat et al., 2004a). Eine dadurch möglicherweise veränderte Metabolisierung und Elimination kann dazu führen, dass sich die im Urin ausgeschiedene Timololmenge von der gesunder, reifgeborener Kinder unterscheidet.

Letztendlich lässt sich jedoch sagen, dass dieses Projekt erste sehr nützliche und wichtige Informationen liefert. Es zeigt, dass selbst bei einer dermalen Wirkstoffapplikation systemische Wirkstoffkonzentrationen und damit möglicherweise einhergehende unerwünschte Arzneimittelwirkungen auftreten können. Auch der Reifungsgrad der Frühgeborenen bei der Geburt und die Lebensdauer nach der Geburt beeinflussen die Therapie. Je weiter die Hautreifung fortgeschritten ist, desto weniger Timolol gelangt durch die Haut in den systemischen Kreislauf. Bei der Wirkstoffdosierung muss dieser kontinuierliche Reifungsprozess daher berücksichtigt werden und gegebenenfalls eine schrittweise Anpassung der Dosierung erfolgen. Insbesondere in der pharmazeutischen Technologie sind die Erkenntnisse dieses Projekts für die Entwicklung von dermalen Formulierungen und Systemen, welche an die Entwicklungs- und Reifegrade der Haut von Frühgeborenen angepasst sind, daher sehr nützlich und wichtig.

4.2 Vorhersage der Hautpermeation von Timolol bei Frühgeborenen durch ein PBPK Modell humaner Haut

Das sich an die Analyse von Urinproben von Frühgeborenen mit IH nach lokaler Behandlung mit Timolol anschließende Teilprojekt dieser Doktorarbeit beschäftigte sich mit der Frage, welche Wirkstoffmengen insbesondere bei der dermalen Therapie von Frühgeborenen unterschiedlichen Reifegrades und somit unterschiedlicher Hautbarrierefunktion durch die Haut gelangen.

PBPK Modelle bilden ein physiologisch realistisches Kompartimentsystem nach, beschreiben es mathematisch durch die Verwendung von Gewebegrößen, Permeabilität und anderen Faktoren und lösen es durch die Anwendung von Differentialgleichungen (Grass and Sinko, 2002). Insbesondere für Populationsgruppen, bei denen die Planung und Durchführung von klinischen Studien sehr anspruchsvoll und herausfordernd ist, wie beispielsweise in der Pädiatrie, gewinnen sie zunehmend an Bedeutung (Johnson and Rostami-Hodjegan, 2011). Da in diesem Projekt die Entnahme von Blutproben der Frühgeborenen mit IH nach der dermalen Applikation eines 0,5%igen Timololgels aus ethischen Gründen nicht vertretbar ist, sollte die Entwicklung eines solchen PBPK Modells dazu dienen, Kenntnisse zur Wirkstoffpermeation von Timolol bei Frühgeborenen zu erlangen.

Es wurde folglich ein PBPK Modell der humanen Haut entwickelt und implementiert, welches durch eine Variation der vorhandenen Menge an Stratum corneum an unterschiedliche Entwicklungs- und Reifegrade der Haut von Frühgeborenen angepasst werden kann. Je nach anatomischer Region und Hautreifungsgrad kann die im Stratum corneum vorhandene Anzahl an Corneozytenschichten angepasst werden und die erwartete Wirkstoffpermeation unterschiedlicher Wirkstoffe durch die Haut berechnet werden. Um im Rahmen dieser Arbeit alle Stadien der Hautreifung bei Frühgeborenen zu erfassen, von unreif bis vollständig ausgereift, wurden Permeationsvorgänge von Timolol durch Haut mit einem Stratum corneum bestehend aus 0 bis 15 Corneozytenschichten simuliert. Die applizierte Timololmenge und Applikationsdauer wurde an die in der Neonatologie des Universitätsklinikums Tübingen übliche Therapie angepasst.

Erwartungsgemäß nimmt die permeierte Timololmenge mit zunehmender Hautreifung deutlich ab. Eine sehr unreife Haut ohne funktionsfähiges Stratum corneum besitzt nahezu keine Barrierefunktion, Timolol permeiert daher relativ ungehindert, sehr schnell und nahezu vollständig die Haut. Mit zunehmender Hautreifung, welche durch eine zunehmende Anzahl der im Stratum corneum vorhandenen Corneozytenschichten simuliert wird, verringert sich die permeierte Timololmenge deutlich. Ein experimenteller Abfall der nach 24 h permeierten Timololmenge in Abhängigkeit der Barrieredicke war deutlich zu erkennen. Die berechnete nach 24 h durch die Haut permeierte Timololmenge war dabei bei einem

nicht vorhandenen Stratum corneum mit $206,03 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ im Vergleich einer intakten Haut mit einem Stratum corneum bestehend aus 15 Corneozytenschichten mit $24,86 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ Timolol 8-fach erhöht. Die inneren Corneozytenschichten des Stratum corneums hatten dabei deutlich stärkeren Einfluss auf die Hautbarrierefunktion als die weiter außen gelegen Corneozytenschichten. Auch dies entspricht den Erwartungen und wurde in der Literatur bereits von Kalia et al. (2000) beschrieben.

Das implementierte PBPK Modell humaner Haut liefert somit wichtige Ergebnisse für die Hautpermeation von Timolol durch Haut unterschiedlicher Reifegrade. Es kann jedoch auch für andere Wirkstoffe angewendet werden, da die Berechnung aller notwendigen Modellfaktoren allein auf dem Molekulargewicht und dem Octanol-Wasser-Verteilungskoeffizient des Wirkstoffs beruht. Insbesondere wenn die Gewinnung von *in vivo* Daten aus ethischen Gründen nicht vertretbar ist, können mit Hilfe des implementierten PBPK Modells wichtige Informationen gewonnen werden. Die Kalkulation von Permeations- und auch Penetrationsmengen unterschiedlicher Wirkstoffe kann insbesondere die Formulierungsentwicklung in der pharmazeutischen Technologie unterstützen und erleichtern.

4.3 Vorhersage der Hautpermeation von Timolol bei Frühgeborenen anhand von *in vitro* Permeationsstudien

Eine weitere Möglichkeit, um die durch die Haut absorbierten Wirkstoffmengen bei einer dermalen Therapie von Frühgeborenen unterschiedlichen Reifegrades ermitteln zu können, stellt die Anwendung von *in vitro* Modellen dar.

In vitro Modelle sind einfache, günstige und zeitsparende Alternativen zu *in vivo* Studien und *in vivo* Modellen. Da es sich nicht um intakte physiologische und metabolische Systeme, sondern um stark vereinfachte Modelle handelt, muss bei der Anwendung beachtet werden, dass nur Teilaspekte wie beispielsweise die Wirkstoffabsorption durch die Haut betrachtet und die Ergebnisse von *in vivo* Studien abweichen können (Jung and Maibach, 2015; Simon and Maibach, 2000). Dennoch stellen *in vitro* Modelle insbesondere in der Forschung und Entwicklung sinnvolle und

hilfreiche Möglichkeiten dar, um frühzeitig wichtige Informationen beispielsweise zum Permeationsverhalten von Wirkstoffen durch die Haut zu erlangen.

In diesem Teilprojekt dieser Doktorarbeit wurden *in vitro* Permeationsversuche von Timolol an Haut von Schweineohren mit differenzierten Hautbarriereigenschaften durchgeführt. Die Verwendung der dorsalen Seite des Schweineohrs ist insbesondere für *in vitro* Versuche eine weit verbreitete Methode in der Wissenschaft (Jacobi et al., 2007; Simon and Maibach, 2000). Sie zeigt hinsichtlich Aufbau und Dicke der unterschiedlichen Hautschichten und follikulärer Struktur am meisten Übereinstimmungen mit menschlicher Haut (Jacobi et al., 2007). Durch die Durchführung von Klebebandabrissen kann das Stratum corneum schrittweise abgetragen werden. Da dieses die Hauptbarrierefunktion der Haut darstellt, ist es möglich, durch eine unterschiedliche starke Beeinträchtigung des Stratum corneums an Schweineohrhaut ein Modell für die Hautbarriere unterschiedlicher Reifegrade von Frühgeborenen zu erstellen (Sekkat et al., 2002, 2004a).

Da dieses Projekt unabhängig vom entwickelten PBPK Modell humaner Haut erstellt wurde, kann der Vergleich der Ergebnisse aus beiden Untersuchungen wichtige Erkenntnisse zur Eignung beider Modelle für die Vorhersage der Wirkstoffpermeation von Timolol bei Frühgeborenen liefern.

Auch die *in vitro* Permeationsuntersuchungen konnten zeigen, dass durch eine zunehmende Abtragung des Stratum corneums mittels Klebebandabrisstechnik und einer dadurch zunehmend gestörten Hautbarrierefunktion die permeierte Timololmenge deutlich zunimmt. Auch hier konnte bei einer vollständigen Abtragung des Stratum corneums ein bis zu 8-fach erhöhter Anstieg der nach 24 h durch die Haut permeierten Timololmenge beobachtet werden.

Die Vergleichbarkeit der Ergebnisse der *in vitro* Permeationsstudien wird dadurch erschwert, dass die Anzahl der durchgeführten Klebebandabrisse nicht zwangsläufig mit der Abtragungsmenge an Stratum corneum korreliert. Somit ist es durch eine anschließend durchgeführte Bestimmung der Dicke des Stratum corneums zwar möglich, eine Korrelation zur Barrierefunktion zu erstellen, da es sich dabei jedoch um eine zerstörende Prüfung handelt, ist es nicht möglich, diese vor den

Permeationsstudien durchzuführen, um Hautproben einer definierten Barrierefunktion zu erzeugen.

Um eine Vergleichbarkeit der Ergebnisse zu erleichtern, wäre es deshalb sinnvoll, die Hautbarrierefunktion vor der Durchführung der Permeationsstudien, beispielsweise mittels TEWL-Messungen, zu überprüfen und so lange Klebebandabrisse durchzuführen, bis ein bestimmter TEWL-Wert eingestellt ist. TEWL-Messungen erfassen die Wasserdampfdurchlässigkeit der Haut, welche mit der Barrierefunktion korreliert werden kann. Die Problematik, dass Individuen mit einem sehr dünnen Stratum corneum die gleiche Effektivität der Barrierefunktion wie Individuen mit einem verhältnismäßig sehr dicken Stratum corneum aufweisen und somit weder die Anzahl der vorhandenen Corneozytenschichten, noch die Dicke des vorhandenen Stratum corneums direkt mit der Barrierefunktion korreliert werden kann, würde dadurch umgangen.

Wie bereits das entwickelte PBPK Modell humaner Haut ermöglichte auch das entwickelte *in vitro* Modell auf relativ einfache Art und Weise das Permeations- und Penetrationsverhaltens von Wirkstoffen durch Haut mit differenzierter Hautbarrierefunktion, was unterschiedliche Hautreifungsgrade bei der Entwicklung von Frühgeborenen simuliert, zu charakterisieren. Es bietet somit ebenfalls die Möglichkeit, das Permeationsverhalten von Wirkstoffen, welche für die Behandlung von Frühgeborenen dermal appliziert werden, systematisch zu untersuchen und dadurch die Formulierungsentwicklung und die Erstellung von Dosisregimen, welche an die Entwicklung der Frühgeborenen angepasst sind, zu erleichtern.

4.4 Vergleichbarkeit der Ergebnisse des PBPK Modells humaner Haut und der *in vitro* Permeationsstudien

Die Bestimmung absorbierter Wirkstoffmengen bei einer dermalen Therapie von Frühgeborenen unterschiedlichen Reifegrades wurde in dieser Dissertation mittels zweier völlig unabhängig voneinander entwickelten Teilprojekte, dem PBPK Modell humaner Haut und der *in vitro* Peremationsstudien, durchgeführt. Die Ergebnisse beider Teilprojekte stimmten sehr gut miteinander überein. Da beide unabhängig

voneinander entwickelten Methoden zu gleichen Ergebnissen führten, scheinen somit beide Methoden gut geeignet zu sein, um das Permeationsverhalten von Wirkstoffen, insbesondere Timolol, bei Frühgeborenen zu charakterisieren.

Durch die Anwendung beider Methoden können die jeweiligen Vorteile der Modelle genutzt werden. Das PBPK Modell humaner Haut ermöglicht eine sehr schnelle und einfache Möglichkeit zur Berechnung erwarteter Wirkstoffpermeation von Wirkstoffen durch Haut von Frühgeborenen. Dies erleichtert die Erstellung von Dosisregimen und die Anpassungen der Applikationsmenge an den kontinuierlichen Reifungsprozess der Haut bei der Therapie von Frühgeborenen. Das *in vitro* Permeationsmodell mit modifizierter Schweineohrhaut kann dazu dienen, entwickelte Formulierungen zur dermalen Anwendung auf ihre Handhabbarkeit unter realen Applikationsbedingungen bei 32 °C und Okklusionsbedingungen zu untersuchen und zu testen. Problematiken der Wirkstoffapplikation können hier bereits erkannt und somit frühzeitig behoben werden.

4.5 Vorhersage des Metabolismus und der Elimination von Timolol durch ein PBPK Modell des menschlichen Organismus

Im nachfolgenden Teilprojekt dieser Arbeit sollte der Metabolismus und die Ausscheidung von Timolol im menschlichen Organismus genauer betrachtet werden. Die Ergebnisse des entwickelten PBPK Modells humaner Haut und der *in vitro* Permeationsuntersuchungen konnten durch Kenntnisse zum Metabolismus und zur Ausscheidung von Timolol in erwartete Urinspiegelkonzentrationen umgerechnet werden. Dies ermöglichte den Vergleich der experimentell ermittelten und durch Rechenmodelle kalkulierten Werte mit den gewonnenen Daten der analysierten Urinproben von Frühgeborenen.

Auch hier wurde wieder auf die Entwicklung eines PBPK Modells zurückgegriffen. Die Simulation des implementierten PBPK Modells des menschlichen Organismus zeigt, dass sich der lipophile nichtselektive Beta-Adrenozeptor-Antagonist Timolol auch bei einer dermalen Applikation erwartungsgemäß in Geweben und Organen des Organismus anreichert. Es verdeutlicht, dass insbesondere eine starke

Anreicherung im Lungengewebe bei der Therapie berücksichtigt werden sollte. Dies entspricht den Erwartungen. Bereits im Jahr 1981 konnte Fourtillan et al. (1981) in einer Studie zeigen, dass Timolol, wie andere Betablocker auch, eine sehr ausgeprägte Diffusion in extravaskuläre Kompartimente aufweist.

Wie bereits bei der Untersuchung der Urinproben der Frühgeborenen diskutiert, muss deshalb auch eine dermale Applikation von Timolol bei Frühgeborenen engmaschig kontrolliert und beobachtet werden, um unerwünschte Arzneimittelwirkungen frühzeitig zu erkennen und ihnen entgegenzuwirken. Bisher ist in der Literatur nur in einer Studie von Chakkittakandiyil et al. (2012) bei der topischen Anwendung einer 0,1 und 0,5%igen Timololformulierung bei IH eine signifikante Schlafstörung als Nebenwirkung beobachtet worden (Painter and Hildebrand, 2016). Die Sicherheit und Effizienz einer pädiatrischen Population mit IH wurde jedoch bisher in keiner großen Kohorte untersucht (Puttgen et al., 2016).

Bei der Bewertung und Interpretation der Ergebnisse des PBPK Modells des menschlichen Organismus sollte berücksichtigt werden, dass es sich hierbei um ein vereinfachtes Modell zur Abschätzung erwarteter Wirkstoffmengen und Wirkstoffkonzentrationen handelt. Da die Unreife des gesamten Organismus von Frühgeborenen und Begleiterkrankungen den Metabolismus und die Elimination von Timolol stark beeinflussen können, ist die Ermittlung von exakten Werten problematisch. Dennoch können die erzielten Ergebnisse zur besseren Abschätzung einer an die Entwicklung der Haut von Frühgeborenen angepassten dermalen Wirkstoffapplikation dienen und die Entwicklung von dermalen Applikationssystemen für diese Populationsgruppe erleichtern.

4.6 Vergleichbarkeit der Ergebnisse der analysierten Urinproben von Frühgeborenen mit IH und der mittels PBPK Modellen berechneten Urinspiegelwerten von Timolol bei Frühgeborenen nach einer dermalen Timololapplikation

In der nachfolgenden Abbildung 4.6-1 sind die im Rahmen dieser Dissertation durchgeführten Teilprojekte und die dabei erzielten Ergebnisse noch einmal zusammenfassend dargestellt.

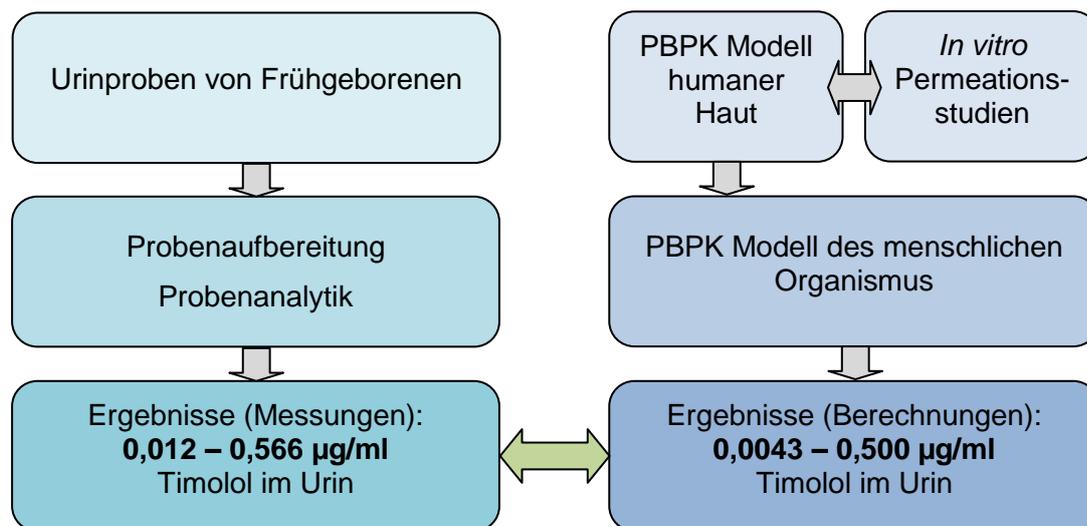


Abbildung 4.6-1: Schematische Übersicht der im Rahmen dieser Dissertation durchgeführten Teilprojekte und der dabei erzielten Ergebnisse.

Auf der linken Seite unten sind die Ergebnisse des Teilprojektes, welches sich mit der Aufbereitung und Analyse der Urinproben von Frühgeborenen mit IH während einer topischen Behandlung mit einem 0,5%igen Timololgel befasste, aufgeführt. Auf der rechten Seite unten sind die Ergebnisse der anhand von Computersimulationen und *in vitro* Permeationsstudien kalkulierten Timololkonzentrationen aufgeführt, welche nach einer dermalen Applikation eines 0,5%igen Timololgels auf Haut unterschiedlicher Reifegrade im Urin erwartet werden, aufgeführt.

Die in Abbildung 4.6-1 auf der linken und rechten Seite dargestellten Teilprojekte dieser Dissertation wurden völlig unabhängig voneinander entwickelt, durchgeführt und ausgewertet und deren Ergebnisse erst ganz am Ende miteinander verglichen.

Die Daten zur absorbierten Wirkstoffmenge bei einer dermalen Therapie von Frühgeborenen unterschiedlicher Reifegrade mit Timolol wurden auf zwei unabhängig voneinander durchgeführten Wegen, nämlich zum einen durch die

Entwicklung eines PBPK Modells humaner Haut, zum anderen durch die Durchführung von *in vitro* Permeationsstudien, gewonnen. Beide Modelle stellen geeignete Möglichkeiten dar, um die Permeation von Timolol durch die Haut von Frühgeborenen unterschiedlichen Reifegrades vorhersagen zu können. Die auf Grundlage dieser Daten mittels eines PBPK Modells des menschlichen Organismus durchgeführten Berechnungen zur Erfassung der Metabolisierung und Elimination von Timolol, ergaben Timololkonzentrationen im Urin im Bereich von 0,0043 und 0,500 µg/ml. Die Analyse der Urinproben der Frühgeborenen mit IH nach einer dermalen Timololbehandlung ergab Timololkonzentrationen im Urin im Bereich von 0,012 bis 0,566 µg/ml. Diese erstmals gefundenen Ergebnisse, welche auf zwei völlig unabhängigen Wegen erzielt wurden, stimmen sehr gut miteinander überein.

Die entwickelten PBPK und *in vitro* Modelle liefern somit für Timolol realistische Werte und können hervorragend für die Abschätzung erwarteter Wirkstoffspiegel nach einer dermalen Wirkstoffapplikation bei Frühgeborenen unterschiedlicher Reifegrade verwendet werden.

Die Entwicklung von dermalen Applikationssystemen, welche an den kontinuierlichen Hautreifungsprozess von Frühgeborenen angepasst sind, kann somit durch die entwickelten Modelle deutlich erleichtert werden. Zudem konnten neue, wichtige Erkenntnisse für die dermale Behandlung von IH mit Timolol bei Frühgeborenen gewonnen werden. Durch diese Dissertation stehen nun erstmals Ergebnisse zur Permeation von Timolol durch Haut unterschiedlicher Reifegrade und der daraus resultierenden Urinspiegelwerte von Timolol zur Verfügung.

5 Zusammenfassung

Ein Ziel dieser Dissertation war es, basierend auf der Analyse von Urinproben von Frühgeborenen aus der Neonatologie des Universitätsklinikums Tübingens, Kenntnisse und Rückschlüsse zur transdermalen Wirkstoffpermeation von Timolol bei Frühgeborenen unterschiedlichen Reifegrades mit IH zu erlangen. Diese könnten wichtige Informationen für die Behandlung von IH bei Frühgeborenen mit Timolol liefern.

Die Entwicklung einer Extraktions- und Detektionsmethodik ermöglichte die Analyse von Timolol in Urinproben von Frühgeborenen mit IH während einer lokalen Behandlung mit einem 0,5%igen Timololgel. Insgesamt konnte in 76 % der 88 zur Verfügung stehenden Proben (entspricht 67 von 88 Proben, Nachweisgrenze (Gottwald): 0,004 µg/ml) Timolol nachgewiesen werden. In 69 % der Proben (entspricht 61 von 88 Proben, Bestimmungsgrenze (Gottwald): 0,012 µg/ml) konnte die im Urin vorhandene Timololkonzentration quantifiziert werden. Diese lag, nach unten begrenzt durch die Bestimmungsgrenze der Detektionsmethode, zwischen 0,012 und 0,566 µg/ml Timolol im Urin. Diese Ergebnisse liefern erstmals Daten zu Timololkonzentrationen im Urin nach einer lokalen Behandlung von IH bei Frühgeborenen mit Timolol und machen deutlich, dass auch bei einer dermalen Applikation von Timolol durchaus systemische Wirkstoffkonzentrationen erreicht werden und damit möglicherweise einhergehende unerwünschte Arzneimittelwirkungen auftreten können. Der 45-fache Konzentrationsunterschied zwischen der minimal und maximal ermittelten Konzentration zeigt, dass der Reifungsgrad der Frühgeborenen bei der Therapie durchaus zu berücksichtigen ist, da hierdurch die Wirkstoffpermeation, Metabolisierung und Elimination im Vergleich zu gesunden, reifgeborenen Kindern variieren kann. Um notwendige therapeutische Wirkstoffspiegel erreichen und Überdosierungen vermeiden zu können, ist es deshalb zwingend notwendig, auch eine dermale Therapie kontinuierlich an den Entwicklungsstand der Frühgeborenen anzupassen. Auch eine engmaschige Kontrolle, um unerwünschte Arzneimittelwirkungen frühzeitig erkennen und entgegenwirken zu können, ist unabdinglich.

In einem weiteren Teil dieser Arbeit sollte ein Hautmodell entwickelt werden, welches die einfache und schnelle Vorhersage von Plasmaspiegelwerten von Timolol bei Frühgeborenen mit unterschiedlichen Hautreifegraden ermöglicht. Diese Zielsetzung wurde durch die Entwicklung zweier, unabhängig voneinander entwickelter, unterschiedlicher Modelle umgesetzt, einem PBPK Modell humaner Haut und einem *in vitro* Permeationsmodell mittels modifizierter Schweineohrhaut.

Das implementierte PBPK Modell humaner Haut kann durch Variation der vorhandenen Menge Stratum corneum an unterschiedliche Entwicklungs- und Reifegrade der Haut von Frühgeborenen angepasst werden. Um im Rahmen dieser Arbeit alle Stadien der Hautreifung Frühgeborener zu erfassen, von unreif bis vollständig ausgereift, wurden Permeationsvorgänge von Timolol durch Haut mit einem Stratum corneum bestehend aus 0 bis 15 Corneozytenschichten simuliert. Die applizierte Timololmenge und Applikationsdauer wurde an die in der Neonatologie des Universitätsklinikums Tübingen übliche Therapie angepasst. Erwartungsgemäß nahm die permeierte Timololmenge mit zunehmender Hautreifung deutlich ab, die berechneten Timololmengen waren dabei bei einer intakten Barrierefunktion (simuliert mit 15 Corneozytenschichten) um das 8-fache niedriger als ohne vorhandene Barrierefunktion (simuliert mit 0 Corneozytenschichten) (24,86 vs 206,03 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$). Die inneren Corneozytenschichten des Stratum corneums zeigten dabei, entsprechend der Literatur, deutlich stärkeren Einfluss auf die Barrierefunktion als die weiter außen gelegenen Corneozytenschichten.

Das entwickelte *in vitro* Permeationsmodell wurde anhand von Schweineohrhaut mit durch Klebebandabrisse variierten Barriereigenschaften durchgeführt. In sehr guter Übereinstimmung mit den Ergebnissen des PBPK-Modells humaner Haut konnten die *in vitro* Permeationsuntersuchungen zeigen, dass durch eine zunehmende Abtragung des Stratum corneums mittels Klebebandabrisstechnik und einer dadurch zunehmend gestörten Barrierefunktion die permeierte Timololmenge deutlich zunimmt. Einen stärkeren Einfluss der inneren Corneozytenschichten auf die Barrierefunktion konnte hierbei jedoch nicht beobachtet werden.

Die Ergebnisse des entwickelten PBPK Modells humaner Haut und des entwickelten *in vitro* Permeationsmodells stimmen äußerst gut miteinander überein. Da beide gänzlich unabhängig voneinander entwickelten Methoden zu vergleichbaren

Ergebnissen führen, scheinen somit beide Methoden sehr gut geeignet zu sein, um auf eine sehr schnelle und einfache Art und Weise wichtige Erkenntnisse zur Hautpermeation eines Wirkstoffs durch Haut von Frühgeborenen zu erlangen, insbesondere wenn die Gewinnung von *in vivo* Daten aus ethischen Gründen nicht vertretbar ist. So kann die Erstellung von Dosisregimen erleichtert und die Applikationsmenge an den kontinuierlichen Reifungsprozess der Haut bei der Therapie von Frühgeborenen angepasst werden. Ein großer Vorteil des PBPK Modells humaner Haut ist es, dass erste Erkenntnisse einfacher wirkstoffhaltiger Formulierungen komplett ohne Tierversuche gewonnen werden können. Der Einsatz des *in vitro* Permeationsmodells mit modifizierter Schweineohrhaut kann dabei helfen, auch bei komplexen Formulierungen Problematiken bezüglich Handhabbarkeit und Applikation frühzeitig zu erkennen und zu beheben. Die Stärken beider Modelle können so ergänzend genutzt werden.

In einem weiteren Teilprojekt dieser Arbeit wurden der Metabolismus und die Ausscheidung von Timolol im menschlichen Organismus genauer beleuchtet. Die Ergebnisse des entwickelten PBPK Modells humaner Haut und der *in vitro* Permeationsuntersuchungen können durch Kenntnisse zum Metabolismus und zur Ausscheidung von Timolol in erwartete Urinspiegelkonzentrationen umgerechnet werden. Dies ermöglicht den Vergleich der experimentell ermittelten und durch Rechenmodelle kalkulierten Werte mit den gewonnenen Daten der Urinproben von Frühgeborenen.

Die Simulation des implementierten PBPK Modells des menschlichen Organismus zeigte, dass sich der lipophile nichtselektive Beta-Adrenozeptor-Antagonist Timolol auch bei einer dermalen Applikation erwartungsgemäß in Geweben und Organen des Organismus anreichert. Insbesondere eine starke Anreicherung im Lungengewebe sollte bei der Therapie berücksichtigt werden.

Der Vergleich der aus den Urinproben gewonnen Daten und der mittels der PBPK Modellen berechneten Ergebnissen zeigt eine äußerst gute Übereinstimmung (Urindaten: 0,0043 bis 0,500 µg/ml vs PBPK Berechnungen: 0,012 bis 0,566 µg/ml) und bestätigt die hohe Qualität der Vorhersage. Die entwickelten PBPK und *in vitro* Modelle liefern somit für Timolol realistische Werte und können durchaus für die Abschätzung des Permeationsverhaltens und erwarteter Wirkstoffspiegel nach einer

dermalen Wirkstoffapplikation bei Frühgeborenen verwendet werden. Die Entwicklung dermalen Applikationssysteme, welche an den kontinuierlichen Hautreifungsprozess von Frühgeborenen angepasst sind, kann somit deutlich erleichtert und die Therapiesicherheit verbessert werden.

6 Anhang

6.1 Kalibrierung

Tabelle 6.1-1: Daten zur Kalibrierung von Timolol nach flüssig-flüssig Extraktion aus Urin; Interner Standard Propranolol; 0,01 – 0,10 µg/ml

Konzentrationsbereich	0,01-0,10 µg/ml
Verwendet für	Analyse Urinproben
Injektionsvolumen	100 µl
Fließmittelzusammensetzung	Fließmittel A: 10 % ACN, 0,1 %TFA, 89,9 % RO-H ₂ O Fließmittel B: 99,9 % ACN, 0,1 % TFA 0 bis 9 min: 100 % Fließmittel A und 0 % Fließmittel B zu 0 % Fließmittel A und 100 % Fließmittel B 9 bis 10 min: 100 %Fließmittel B 10 bis 11 min: 0 % Fließmittel A und 100 % Fließmittel B zu 100 % Fließmittel A und 0 % Fließmittel B 11 bis 14 min: Fließmittel A 100 %
Flussrate	1,000 ml/min
Detektion	280 nm
Ofentemperatur	25 °C
Steigung	7,6153 µg/ml/FE
Ordinatenabschnitt	0,0372 FE
Bestimmtheitsmaß	0,99319
Nachweisgrenze (Gottwald)	0,004 µg/ml
Bestimmungsgrenze (Gottwald)	0,012 µg/ml

Tabelle 6.1-2: Daten zur Kalibrierung von Timolol nach flüssig-flüssig Extraktion aus Urin; Interner Standard Propranolol; 0,10-1,00 µg/ml

Konzentrationsbereich	0,10-1,00 µg/ml
Verwendet für	Analyse Urinproben
Injektionsvolumen	100 µl
Fließmittelzusammensetzung	Fließmittel A: 10 % ACN, 0,1 %TFA, 89,9 % RO-H ₂ O Fließmittel B: 99,9 % ACN, 0,1 % TFA 0 bis 9 min: 100 % Fließmittel A und 0 % Fließmittel B zu 0 % Fließmittel A und 100 % Fließmittel B 9 bis 10 min: 100 %Fließmittel B 10 bis 11 min: 0 % Fließmittel A und 100 % Fließmittel B zu 100 % Fließmittel A und 0 % Fließmittel B 11 bis 14 min: Fließmittel A 100 %
Flussrate	1,000 ml/min
Detektion	280 nm
Ofentemperatur	25 °C
Steigung	0,7867 µg/ml/FE
Ordinatenabschnitt	0,0048 FE
Bestimmtheitsmaß	0,99733
Nachweisgrenze (Gottwald)	0,022 µg/ml
Bestimmungsgrenze (Gottwald)	0,079 µg/ml

Tabelle 6.1-3: Daten zur Kalibrierung von Timolol im Akzeptormedium natriumchloridhaltiger Phosphatpuffer pH 7,4 R; 1,0 – 10,0 µg/ml

Konzentrationsbereich	1,0-10,0 µg/ml
Verwendet für	Permeationsstudien
Injektionsvolumen	100 µl
Fließmittelzusammensetzung	60 ACN, 0,2 % TEA, 38,8 % RO-H ₂ O
Flussrate	1,000 ml/min
Detektion	294 nm
Ofentemperatur	45 °C
Steigung	116655,91 µg/ml/FE
Ordinatenabschnitt	17618,75 FE
Bestimmtheitsmaß	0,99964
Nachweisgrenze (Gottwald)	0,082 µg/ml
Bestimmungsgrenze (Gottwald)	0,294 µg/ml

Tabelle 6.1-4: Daten zur Kalibrierung von Timolol im Akzeptormedium natriumchloridhaltiger Phosphatpuffer pH 7,4 R; 10,0 – 100,0 µg/ml

Konzentrationsbereich	10,0-100,0 µg/ml
Verwendet für	Permeationsstudien
Injektionsvolumen	100 µl
Fließmittelzusammensetzung	60 ACN, 0,2 % TEA, 38,8 % RO-H ₂ O
Flussrate	1,000 ml/min
Detektion	294 nm
Ofentemperatur	45 °C
Steigung	110873,03 µg/ml/FE
Ordinatenabschnitt	106912,69 FE
Bestimmtheitsmaß	0,99981
Nachweisgrenze (Gottwald)	0,603 µg/ml
Bestimmungsgrenze (Gottwald)	2,174 µg/ml

6.2 Bestimmung der Sättigungslöslichkeit von Timolol im Akzeptormedium

Tabelle 6.2-1: Sättigungslöslichkeit von Timolol im Akzeptormedium; n = 3; Arithmetischer Mittelwert ± SD

Akzeptormedium	Konzentration [µg/ml]
Natriumchloridhaltiger Phosphatpuffer pH 7,4 R	79975,42 (± 988,48)

6.3 Quellcodes

6.3.1 Quellcode PBPK humaner Haut, Simulation mit 1-X Corneozytenschichten

```
model=createpde();
Dinput=X; (entsprechenden Wert eintragen)
Dsc=X; (entsprechenden Wert eintragen)
Dep=1300E-3;
LZelle = 40E-3;
HZelle = 0.8E-3;
AbstVert=0.075E-3;
AbstHor =0.075E-3;
eps=0.075E-3;
Rvehicle=[3,4,-0.5,0.5,0.5,-0.5,Dinput,Dinput,0,0]';
Rsc = [3,4,-0.5,0.5,0.5,-0.5,0,0,-Dsc,-Dsc]';
Rep = [3,4,-0.5,0.5,0.5,-0.5,-Dsc,-Dsc,-Dsc-Dep,-Dsc-Dep]';
k=1;
PosX=-0.5+AbstHor;
PosY=0-AbstVert;
AnzahlY=0;
while(PosY > -Dsc+HZelle+AbstVert)
    AnzahlX=0;
    while(PosX < 0.5)
        if(PosX+LZelle+AbstHor>0.5)
            Rcell0[k]=[3,4,PosX,0.5-eps,0.5-eps,PosX,PosY,PosY,PosY-HZelle,PosY-
HZelle]';
            PosX=PosX+LZelle+AbstHor;
            k=k+1;
        else
            Rcell0[k]=[3,4,PosX,PosX+LZelle,PosX+LZelle,PosX,PosY,PosY,PosY-
HZelle,PosY-HZelle]';
            PosX=PosX+LZelle+AbstHor;
            k=k+1;
```

```
AnzahlX=AnzahlX+1;
end
end
PosX=-0.5+AbstHor;
PosY=PosY-HZelle-AbstVert;
AnzahlY=AnzahlY+1;
end
Rcell=cell2mat(Rcell0);
gd=[Rvehicle,Rsc,Rep];
for k=1:size(Rcell0,2)
    gd=[gd,Rcell(:,k)];
end
g = decsg(gd);
geometryFromEdges(model,g);
pdegplot(g,'VertexLabels','off','EdgeLabels','off','FaceLabels','off');
axis square
for i=1:size(g,2)
    if(g(2,i)==-0.5&&g(3,i)==0.5&&g(4,i)==Dinput&&g(5,i)==Dinput)
        EdgeTop=i;
    elseif(g(2,i)==0.5&&g(3,i)==0.5&&g(4,i)==0&&g(5,i)==Dinput)
        EdgeRight1=i;
    elseif(g(2,i)==0.5&&g(3,i)==0.5&&g(4,i)==-Dsc&&g(5,i)==0)
        EdgeRight2=i;
    elseif(g(2,i)==0.5&&g(3,i)==0.5&&g(4,i)==-Dsc-Dep&&g(5,i)==-Dsc)
        EdgeRight3=i;
    elseif(g(2,i)==0.5&&g(3,i)==-0.5&&g(4,i)==-Dsc-Dep&&g(5,i)==-Dsc-Dep)
        EdgeBottom=i;
    elseif(g(2,i)==-0.5&&g(3,i)==-0.5&&g(4,i)==0&&g(5,i)==Dinput)
        EdgeLeft1=i;
    elseif(g(2,i)==-0.5&&g(3,i)==-0.5&&g(4,i)==-Dsc&&g(5,i)==0)
        EdgeLeft2=i;
    elseif(g(2,i)==-0.5&&g(3,i)==-0.5&&g(4,i)==-Dsc-Dep&&g(5,i)==-Dsc)
        EdgeLeft3=i;
    end
end
```

```
    else
    continue;
    end
end
Face_ID_input=g(7,EdgeLeft1);
Face_ID_sc=g(7,EdgeLeft2);
Face_ID_ep=g(7,EdgeLeft3);
edges=size(g);
NumberEdges = edges(2);
applyBoundaryCondition(model,'neumann','Edge',EdgeTop,'q',0,'g',0);
applyBoundaryCondition(model,'neumann','Edge',[EdgeRight1,EdgeRight2,EdgeRight3,EdgeLeft1,EdgeLeft2,EdgeLeft3],'q',0,'g',0);
applyBoundaryCondition(model,'neumann','Edge',EdgeBottom,'q',1,'g',0);
for n=1:NumberEdges
if(n~=EdgeTop&& n~=EdgeRight1&& n~=EdgeRight2&& n~=EdgeRight3&& n~=EdgeLeft1&& n~=EdgeLeft2&& n~=EdgeLeft3)
applyBoundaryCondition(model,'neumann','Edge',n,'q',1,'g',0);
    end
end
m=0;
d=1;
f=0;
a=0;
DIFFinput=X; (entsprechenden Wert einfügen)
DIFFsc=X; (entsprechenden Wert einfügen)
DIFFcell=X; (entsprechenden Wert einfügen)
DIFFep=X; (entsprechenden Wert einfügen)
specifyCoefficients(model,'m',m,'d',d,'a',a,'c',DIFFinput,'f',0,'Face',Face_ID_input);
specifyCoefficients(model,'m',m,'d',d,'a',a,'c',DIFFsc,'f',0,'Face',Face_ID_sc);
specifyCoefficients(model,'m',m,'d',d,'a',a,'c',DIFFep,'f',0,'Face',Face_ID_ep);
for k=1:size(Rcell0,2)+3
    if(k~=Face_ID_input && k~=Face_ID_sc&& k~=Face_ID_ep)
specifyCoefficients(model,'m',m,'d',d,'a',a,'c',DIFFcell,'f',0,'Face',k);
```

```
    else
        continue;
    end
end
setInitialConditions(model,0);
setInitialConditions(model,X,'Face',Face_ID_input); (entsprechenden Wert einsetzen)
generateMesh(model);
tlist=0:X:X; (entsprechenden Wert einfügen)
result = solvepde(model,tlist);
xx1=linspace(-0.5,0.5,10000);
xx=transpose(xx1);
yy=-Dsc-Dep * ones(10000, 1);
T=1:1:size(tlist,2);
[cgradxq,cgradyq] = evaluateCGradient(result,xx,yy,T);
MeanY=mean(cgradyq);
for i=1:size(T,2)
    AbsolutT1(i)=mean(MeanY(1:i))*tlist(i);
end
plot(T,AbsolutT1);
AbsolutT1=AbsolutT1';
figure;
```

6.3.2 Quellcode PBPK Modell humaner Haut, Simulation mit 0 Corneozytenschichten

```
model=createpde();
Dinput=X; (entsprechenden Wert einsetzen)
Dep=1300E-3;
Rvehicle=[3,4,-0.5,0.5,0.5,-0.5,Dinput,Dinput,0,0]';
Rep = [3,4,-0.5,0.5,0.5,-0.5,0,0,-Dep,-Dep]';
gd=[Rvehicle,Rep];
g = decsg(gd);
geometryFromEdges(model,g);
```

```
pdegplot(g,'VertexLabels','off','EdgeLabels','on','FaceLabels','on');
axis square
applyBoundaryCondition(model,'neumann','Edge',1,'q',0,'g',0);
applyBoundaryCondition(model,'neumann','Edge',[4,5,6,7],'q',0,'g',0);
applyBoundaryCondition(model,'neumann','Edge',2,'q',1,'g',0);
d=1;
f=0;
a=0;
m=0;
DIFFinput=X; (entsprechenden Wert einsetzen)
DIFFep=X; (entsprechenden Wert einsetzen)
specifyCoefficients(model,'m',m,'d',d,'a',a,'c',DIFFinput,'f',0,'Face',1);
specifyCoefficients(model,'m',m,'d',d,'a',a,'c',DIFFep,'f',0,'Face',2);
setInitialConditions(model,0);
setInitialConditions(model,X,'Face',1); (entsprechenden Wert einsetzen)
generateMesh(model);
tlist=0:X:X; (entsprechenden Wert einsetzen)
result = solvepde(model,tlist);
xx1=linspace(-0.5,0.5,10000);
xx=transpose(xx1);
yy=-Dep * ones(10000, 1);
T=1:1:size(tlist,2);
[cgradxq,cgradyq] = evaluateCGradient(result,xx,yy,T);
MeanY=mean(cgradyq);
for i=1:size(T,2)
AbsolutT1(i)=mean(MeanY(1:i))*tlist(i);
end
plot(T,AbsolutT1);
AbsolutT1=AbsolutT1';
figure;
```

6.3.3 Quellcode PBPK Modell des menschlichen Organismus

Fettgewebe:

```
function
```

```
[m_Fett_ist,C_Fett_Vene,m_Fett_Vene,m_Fett_neu,C_Fett_neu]=Fett(QFett,VFett,C  
_Art,m_Fett_alt)
```

```
K_Fett=0.412;
```

```
R=0.81;
```

```
m_Art=C_Art*QFett;
```

```
m_Fett_ist=m_Art+m_Fett_alt;
```

```
C_Fett_ist=m_Fett_ist/VFett;
```

```
C_Fett_Vene=C_Fett_ist/(K_Fett/R);
```

```
m_Fett_Vene=C_Fett_Vene*QFett;
```

```
m_Fett_neu=m_Fett_ist-m_Fett_Vene;
```

```
C_Fett_neu=m_Fett_neu/VFett;
```

```
End
```

Knochen:

```
function
```

```
[m_Knochen_ist,C_Knochen_Vene,m_Knochen_Vene,m_Knochen_neu,C_Knochen  
_neu]=Knochen(QKnochen,VKnochen,C_Art,m_Knochen_alt)
```

```
K_Knochen=0.628;
```

```
R=0.81;
```

```
m_Art=C_Art*QKnochen;
```

```
m_Knochen_ist=m_Art+m_Knochen_alt;
```

```
C_Knochen_ist=m_Knochen_ist/VKnochen;
```

```
C_Knochen_Vene=C_Knochen_ist/(K_Knochen/R);
```

```
m_Knochen_Vene=C_Knochen_Vene*QKnochen;
```

```
m_Knochen_neu=m_Knochen_ist-m_Knochen_Vene;
```

```
C_Knochen_neu=m_Knochen_neu/VKnochen;
```

```
end
```

Gehirn:

function

[m_Gehirn_ist,C_Gehirn_Vene,m_Gehirn_Vene,m_Gehirn_neu,C_Gehirn_neu]=Gehirn(QGehirn,VGehirn,C_Art,m_Gehirn_alt)

K_Gehirn=0.664;

R=0.81;

m_Art=C_Art*QGehirn;

m_Gehirn_ist=m_Art+m_Gehirn_alt;

C_Gehirn_ist=m_Gehirn_ist/VGehirn;

C_Gehirn_Vene=C_Gehirn_ist/(K_Gehirn/R);

m_Gehirn_Vene=C_Gehirn_Vene*QGehirn;

m_Gehirn_neu=m_Gehirn_ist-m_Gehirn_Vene;

C_Gehirn_neu=m_Gehirn_neu/VGehirn;

end

Herz

function

[m_Herz_ist,C_Herz_Vene,m_Herz_Vene,m_Herz_neu,C_Herz_neu]=Herz(QHerz,VHerz,C_Art,m_Herz_alt)

K_Herz=3.4;

R=0.81;

m_Art=C_Art*QHerz;

m_Herz_ist=m_Art+m_Herz_alt;

C_Herz_ist=m_Herz_ist/VHerz;

C_Herz_Vene=C_Herz_ist/(K_Herz/R);

m_Herz_Vene=C_Herz_Vene*QHerz;

m_Herz_neu=m_Herz_ist-m_Herz_Vene;

C_Herz_neu=m_Herz_neu/VHerz;

end

Muskulatur:

function

[m_Muskulatur_ist,C_Muskulatur_Vene,m_Muskulatur_Vene,m_Muskulatur_neu,C_Muskulatur_neu]=Muskulatur(QMuskulatur,VMuskulatur,C_Art,m_Muskulatur_alt)

K_Muskulatur=2.636;

```
R=0.81;
m_Art=C_Art*QMuskulatur;
m_Muskulatur_ist=m_Art+m_Muskulatur_alt;
C_Muskulatur_ist=m_Muskulatur_ist/VMuskulatur;
C_Muskulatur_Vene=C_Muskulatur_ist/(K_Fett/R);
m_Muskulatur_Vene=C_Muskulatur_Vene*QMuskulatur;
m_Muskulatur_neu=m_Muskulatur_ist-m_Muskulatur_Vene;
C_Muskulatur_neu=m_Muskulatur_neu/VMuskulatur;
end
```

Andere:

```
function
[m_Andere_ist,C_Andere_Vene,m_Andere_Vene,m_Andere_neu,C_Andere_neu]=A
ndere(QAndere,VAndere,C_Art,m_Andere_alt)
K_Andere=0.64;
R=0.81;
m_Art=C_Art*QAndere;
m_Andere_ist=m_Art+m_Andere_alt;
C_Andere_ist=m_Andere_ist/VAndere;
C_Andere_Vene=C_Andere_ist/(K_Andere/R);
m_Andere_Vene=C_Andere_Vene*QAndere;
m_Andere_neu=m_Andere_ist-m_Andere_Vene;
C_Andere_neu=m_Andere_neu/VAndere;
End
```

GIT_Leber:

```
function
[m_GIT_ist,m_Leber_ist,C_GIT_Vene,C_Leber_Vene,m_GIT_Vene,m_Leber_Vene,
m_GIT_neu,m_Leber_neu,C_GIT_neu,C_Leber_neu,m_Leber_Ausscheidung]=GIT_
Leber(QGIT,QLeber,VGIT,VLeber,C_Art,m_GIT_alt,m_Leber_alt)
K_GIT=12.8;
K_Leber=5.68;
E_Leber=0.6554;
R=0.81;
```

```
m_Art=C_Art*QGIT;
m_GIT_ist=m_Art+m_GIT_alt;
C_GIT_ist=m_GIT_ist/VGIT;
C_GIT_Vene=C_GIT_ist/(K_GIT/R);
m_GIT_Vene=C_GIT_Vene*QGIT;
m_GIT_neu=m_GIT_ist-m_GIT_Vene;
C_GIT_neu=m_GIT_neu/VGIT;
m_Art=C_Art*QLeber;
m_Leber_ist=m_Art+m_Leber_alt;
C_Leber_ist=m_Leber_ist/VLeber;
m_Leber_istmitVeneGIT=m_Leber_ist+m_GIT_Vene;
C_Leber_istmitVeneGIT=m_Leber_istmitVeneGIT/VLeber;
m_Leber_Ausscheidung=(m_Leber_istmitVeneGIT)*E_Leber;
m_Leber_istnachAusscheidung=m_Leber_istmitVeneGIT-m_Leber_Ausscheidung;
C_Leber_istnachAusscheidung=m_Leber_istnachAusscheidung/VLeber;
C_Leber_Vene=C_Leber_istnachAusscheidung/(K_Leber/R);
m_Leber_Vene=C_Leber_Vene*QLeber;
m_Leber_neu=m_Leber_istnachAusscheidung-m_Leber_Vene;
C_Leber_neu=m_Leber_neu/VLeber;
end
```

Niere:

```
function [m_Niere_ist,C_Niere_Vene,m_Niere_Vene,
m_Niere_istnachAusscheidung,m_Niere_neu,C_Niere_neu,m_Niere_Ausscheidung]
=Niere(QNiere,VNiere,C_Art,m_Niere_alt)
K_Niere=8.52;
R=0.81;
E_Niere=0.1036;
m_Art=C_Art*QNiere;
m_Niere_ist=m_Art+m_Niere_alt;
C_Niere_ist=m_Niere_ist/VNiere;
m_Niere_Ausscheidung=m_Niere_ist*E_Niere;
m_Niere_istnachAusscheidung=m_Niere_ist-m_Niere_Ausscheidung;
C_Niere_istnachAusscheidung=m_Niere_istnachAusscheidung/VNiere;
```

```
C_Niere_Vene=C_Niere_istnachAusscheidung/(K_Niere/R);
m_Niere_Vene=C_Niere_Vene*QNiere;
m_Niere_neu=m_Niere_istnachAusscheidung-m_Niere_Vene;
C_Niere_neu=m_Niere_neu/VNiere;
end
```

Lunge:

```
function
[m_Lunge_ist,m_Lunge_neu,C_Lunge_neu,C_Art]=Lunge(QGesamt,VLunge,C_Ven,
m_Lunge_alt)
K_Lunge=17.04;
R=0.81;
m_Ven=C_Ven*QGesamt;
m_Lunge_ist=m_Ven+m_Lunge_alt;
C_Lunge_ist=m_Lunge_ist/VLunge;
C_Art=C_Lunge_ist/(K_Lunge/R);
m_Art=C_Art*QGesamt;
m_Lunge_neu=m_Lunge_ist-m_Art;
C_Lunge_neu=m_Lunge_neu/VLunge;
end
```

Iterate Blutkreislauf

```
steps=X; (entsprechenden Wert eintragen)
kgKG=X; (entsprechenden Wert eintragen)
BlutkgKG=80;
QGesamt=kgKG*BlutkgKG;
QFett=0.05*kgKG*BlutkgKG;
QKnochen=0.05*kgKG*BlutkgKG;
QGehirn=0.12*kgKG*BlutkgKG;
QHerz=0.04*kgKG*BlutkgKG;
QMuskulatur=0.17*kgKG*BlutkgKG;
QAndere=0.165*kgKG*BlutkgKG;
QGIT=0.15*kgKG*BlutkgKG;
QLeber=0.065*kgKG*BlutkgKG;
```

QNiere=0.19*kgKG*BlutkgKG;
VFett=0.149*1000*kgKG;
VKnochen=0.1323*1000*kgKG;
VGehirn=0.0213*1000*kgKG;
VHerz=0.0044*1000*kgKG;
VMuskulatur=0.4841*1000*kgKG;
VAndere=0.129*1000*kgKG;
VGIT=0.0264*1000*kgKG;
VLeber=0.036*1000*kgKG;
VNiere=0.0044*1000*kgKG;
VLunge=0.0131*1000*kgKG;
C_Ven=0;
C_Art=0;
m_Fett_alt=0;
m_Knochen_alt=0;
m_Gehirn_alt=0;
m_Herz_alt=0;
m_Muskulatur_alt=0;
m_Andere_alt=0;
m_GIT_alt=0;
m_Leber_alt=0;
m_Niere_alt=0;
m_Lunge_alt=0;
Fett_Zeit=zeros(steps,1);
Knochen_Zeit=zeros(steps,1);
Gehirn_Zeit=zeros(steps,1);
Herz_Zeit=zeros(steps,1);
Muskulatur_Zeit=zeros(steps,1);
Andere_Zeit=zeros(steps,1);
GIT_Zeit=zeros(steps,1);
Leber_Zeit=zeros(steps,1);
Niere_Zeit=zeros(steps,1);
Lunge_Zeit=zeros(steps,1);

```
Niere_Ausscheidung=zeros(steps,1);
Leber_Ausscheidung=zeros(steps,1);
for i=0:steps
[m_Fett_ist,C_Fett_Vene,m_Fett_Vene,m_Fett_neu,C_Fett_neu]=Fett(QFett,VFett,C
_Art,m_Fett_alt);
[m_Knochen_ist,C_Knochen_Vene,m_Knochen_Vene,m_Knochen_neu,C_Knochen
_neu]=Knochen(QKnochen,VKnochen,C_Art,m_Knochen_alt);
[m_Gehirn_ist,C_Gehirn_Vene,m_Gehirn_Vene,m_Gehirn_neu,C_Gehirn_neu]=Geh
irn(QGehirn,VGehirn,C_Art,m_Gehirn_alt);
[m_Herz_ist,C_Herz_Vene,m_Herz_Vene,m_Herz_neu,C_Herz_neu]=Herz(QHerz,V
Herz,C_Art,m_Herz_alt);
[m_Muskulatur_ist,C_Muskulatur_Vene,m_Muskulatur_Vene,m_Muskulatur_neu,C_
Muskulatur_neu]=Muskulatur(QMuskulatur,VMuskulatur,C_Art,m_Muskulatur_alt);
[m_Andere_ist,C_Andere_Vene,m_Andere_Vene,m_Andere_neu,C_Andere_neu]=A
ndere(QAndere,VAndere,C_Art,m_Andere_alt);
[m_GIT_ist,m_Leber_ist,C_GIT_Vene,C_Leber_Vene,m_GIT_Vene,m_Leber_Vene,
m_GIT_neu,m_Leber_neu,C_GIT_neu,C_Leber_neu,m_Leber_Ausscheidung]=GIT_
Leber(QGIT,QLeber,VGIT,VLeber,C_Art,m_GIT_alt,m_Leber_alt);
[m_Niere_ist,C_Niere_Vene,m_Niere_Vene,
m_Niere_istnachAusscheidung,m_Niere_neu,C_Niere_neu,m_Niere_Ausscheidung]
=Niere(QNiere,VNiere,C_Art,m_Niere_alt);
Leber_Ausscheidung(i+1)=m_Leber_Ausscheidung;
Niere_Ausscheidung(i+1)=m_Niere_Ausscheidung;
m_Fett_alt=m_Fett_neu;
m_Knochen_alt=m_Knochen_neu;
m_Gehirn_alt=m_Gehirn_neu;
m_Herz_alt=m_Herz_neu;
m_Muskulatur_alt=m_Muskulatur_neu;
m_Andere_alt=m_Andere_neu;
m_GIT_alt=m_GIT_neu;
m_Leber_istnachAusscheidung=m_Niere_neu;
m_Niere_istnachAusscheidung=m_Niere_neu;
Fett_Zeit(i+1)=m_Fett_neu;
```

```
Knochen_Zeit(i+1)=m_Knochen_neu;
Gehirn_Zeit(i+1)=m_Gehirn_neu;
Herz_Zeit(i+1)=m_Herz_neu;
Muskulatur_Zeit(i+1)=m_Muskulatur_neu;
Andere_Zeit(i+1)=m_Andere_neu;
GIT_Zeit(i+1)=m_GIT_neu;
Leber_Zeit(i+1)=m_Leber_neu;
Niere_Zeit(i+1)=m_Niere_neu;
m_Ven_nachDurchfluss=m_Fett_Vene+m_Knochen_Vene+m_Gehirn_Vene+m_Herz_Vene+m_Muskulatur_Vene+m_Andere_Vene+m_Leber_Vene+m_Niere_Vene;
m_Ven=m_Ven_nachDurchfluss+0.0195;
C_Ven=m_Ven/QGesamt;
[m_Lunge_ist,m_Lunge_neu,C_Lunge_neu,C_Art]=Lunge(QGesamt,VLunge,C_Ven,m_Lunge_alt);
m_Lunge_alt=m_Lunge_neu;
Lunge_Zeit(i+1)=m_Lunge_neu;
end
C_Fett_Zeit=Fett_Zeit/VFett;
C_Knochen_Zeit=Knochen_Zeit/VKnochen;
C_Gehirn_Zeit=Gehirn_Zeit/VGehirn;
C_Herz_Zeit=Herz_Zeit/VHerz;
C_Muskulatur_Zeit=Muskulatur_Zeit/VMuskulatur;
C_Andere_Zeit=Andere_Zeit/VAndere;
C_GIT_Zeit=GIT_Zeit/VGIT;
C_Leber_Zeit=Leber_Zeit/VLeber;
C_Niere_Zeit=Niere_Zeit/VNiere;
C_Lunge_Zeit=Lunge_Zeit/VLunge;
x=linspace(1,steps,steps+1);
x=x';
plot(x,Fett_Zeit)
hold on
plot(x,Knochen_Zeit)
plot(x,Gehirn_Zeit)
```

```
plot(x,Herz_Zeit)
plot(x,Muskulatur_Zeit)
plot(x,Andere_Zeit)
plot(x,GIT_Zeit)
plot(x,Leber_Zeit)
plot(x,Niere_Zeit)
plot(x,Lunge_Zeit)
legend('m(Fett)[µg]', 'm(Knochen)[µg]', 'm(Gehirn)[µg]', 'm(Herz)[µg]', 'm(Muskulatur)[µg]
', 'm(Andere)[µg]', 'm(GIT)[µg]', 'm(Leber)[µg]', 'm(Niere)[µg]', 'm(Lunge)[µg]');
hold off
plot(x,C_Fett_Zeit)
hold on
plot(x,C_Knochen_Zeit)
plot(x,C_Gehirn_Zeit)
plot(x,C_Herz_Zeit)
plot(x,C_Muskulatur_Zeit)
plot(x,C_Andere_Zeit)
plot(x,C_GIT_Zeit)
plot(x,C_Leber_Zeit)
plot(x,C_Niere_Zeit)
plot(x,C_Lunge_Zeit)
legend('c(Fett) [µg/ml]', 'c(Knochen) [µg/ml]', 'c(Gehirn) [µg/ml]', 'c(Herz)
[µg/ml]', 'c(Muskulatur) [µg/ml]', 'c(Andere) [µg/ml]', 'c(GIT) [µg/ml]', 'c(Leber)
[µg/ml]', 'c(Niere) [µg/ml]', 'c(Lunge) [µg/ml]');
hold off
Leber_Summe=sum(Leber_Ausscheidung)
Leber_Cummuliert=cumsum(Leber_Ausscheidung);
Niere_Summe=sum(Niere_Ausscheidung)
Niere_Cummuliert=cumsum(Niere_Ausscheidung);
plot(x,Leber_Cummuliert)
plot(x,Niere_Cummuliert)
```

7 Literaturverzeichnis

- Abduljalil, K., Jamei, M., Rostami-Hodjegan, A., and Johnson, T.N. (2014). Changes in individual drug-independent system parameters during virtual paediatric pharmacokinetic trials: introducing time-varying physiology into a paediatric PBPK model. *AAPS J* 16, 568-576.
- Agache, P., Blanc, D., Barrand, C., and Laurent, R. (1980). Sebum levels during the first year of life. *Br J Dermatol* 103, 643-649.
- Amsden, B. (1998). Solute Diffusion within Hydrogels. Mechanisms and Models. ACS Publications 31, 8382-8395.
- Arneja, J.S. (2012). Pharmacologic therapies for infantile hemangioma: is there a rational basis? *Plast Reconstr Surg* 129, 724e-725e; author reply 725e-727e.
- AWMF, A.d.W.M.F. (2015). S2k Leitlinie 006/100: Infantile Hämangiome im Säuglings- und Kleinkindesalter, A. online, ed.
- Babson, S.G., and Benda, G.I. (1976). Growth graphs for the clinical assessment of infants of varying gestational age. *J Pediatr* 89, 814-820.
- Bannon, Y.B., Corish, J., Corrigan, O.I., Devane, J.G., Kavanagh, M., and Mulligan, S. (1989). Transdermal delivery of nicotine in normal human volunteers: a single dose and multiple dose study. *Eur J Clin Pharmacol* 37, 285-290.
- Barbero, A.M., and Fransch, H.F. (2009). Pig and guinea pig skin as surrogates for human in vitro penetration studies: a quantitative review. *Toxicol In Vitro* 23, 1-13.
- Barker, N., Hadgraft, J., and Rutter, N. (1987). Skin permeability in the newborn. *J Invest Dermatol* 88, 409-411.
- Barnes, C.M., Huang, S., Kaipainen, A., Sanoudou, D., Chen, E.J., Eichler, G.S., Guo, Y., Yu, Y., Ingber, D.E., Mulliken, J.B., *et al.* (2005). Evidence by molecular profiling for a placental origin of infantile hemangioma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 19097-19102.
- Barrio, V.R., and Drolet, B.A. (2005). Treatment of hemangiomas of infancy. *Dermatol Ther* 18, 151-159.
- Bartosova, L., and Bajgar, J. (2012). Transdermal drug delivery in vitro using diffusion cells. *Curr Med Chem* 19, 4671-4677.
- Behrendt, H., and Green, M. (1969). Drug-induced localized sweating in full-size and low-birth-weight neonates. *Am J Dis Child* 117, 299-306.
- Berk, D.R., Lehman, P.A., Franz, T.J., Blunt, J.R., and Bayliss, S.J. (2013). On topical timolol gel-forming solution for infantile hemangiomas. *Pediatr Dermatol* 30, 160-161.

- Blatt, J., Morrell, D.S., Buck, S., Zdanski, C., Gold, S., Stavas, J., Powell, C., and Burkhart, C.N. (2011). beta-blockers for infantile hemangiomas: a single-institution experience. *Clin Pediatr (Phila)* 50, 757-763.
- Blum, U., Meyer, H., and Beerbaum, P. (2016). Das gesunde Herz.
- Bos, J.D., and Meinardi, M.M. (2000). The 500 Dalton rule for the skin penetration of chemical compounds and drugs. *Exp Dermatol* 9, 165-169.
- Bouwstra, J.A., Dubbelaar, F.E., Gooris, G.S., and Ponc, M. (2000). The lipid organisation in the skin barrier. *Acta Derm Venereol Suppl (Stockh)* 208, 23-30.
- Boye, E., Yu, Y., Paranya, G., Mulliken, J.B., Olsen, B.R., and Bischoff, J. (2001). Clonality and altered behavior of endothelial cells from hemangiomas. *J Clin Invest* 107, 745-752.
- Capt, A., Luzy, A.P., Esdaile, D., and Blanck, O. (2007). Comparison of the human skin grafted onto nude mouse model with in vivo and in vitro models in the prediction of percutaneous penetration of three lipophilic pesticides. *Regul Toxicol Pharmacol* 47, 274-287.
- Caspers, P.J., Lucassen, G.W., Carter, E.A., Bruining, H.A., and Puppels, G.J. (2001). In vivo confocal Raman microspectroscopy of the skin: noninvasive determination of molecular concentration profiles. *J Invest Dermatol* 116, 434-442.
- Chakkittakandiyil, A., Phillips, R., Frieden, I.J., Siegfried, E., Lara-Corrales, I., Lam, J., Bergmann, J., Bekhor, P., Poorsattar, S., and Pope, E. (2012). Timolol maleate 0.5% or 0.1% gel-forming solution for infantile hemangiomas: a retrospective, multicenter, cohort study. *Pediatr Dermatol* 29, 28-31.
- Chan, H., McKay, C., Adams, S., and Wargon, O. (2013). RCT of timolol maleate gel for superficial infantile hemangiomas in 5- to 24-week-olds. *Pediatrics* 131, e1739-1747.
- Chantasart, D., Hao, J., and Li, S.K. (2013). Evaluation of skin permeation of beta-blockers for topical drug delivery. *Pharm Res* 30, 866-877.
- Chen, L., Han, L., Saib, O., and Lian, G. (2015). In silico prediction of percutaneous absorption and disposition kinetics of chemicals. *Pharm Res* 32, 1779-1793.
- Chen, L., Lian, G., and Han, L. (2008). Use of "Bricks and Mortar" Model To Predict Transdermal Permeation: Model Development and Initial Validation. *Industrial & Engineering Chemistry Research* 47, 6465-6472.
- Chen, L., Lian, G., and Han, L. (2010). Modeling transdermal permeation. Part I. Predicting skin permeability of both hydrophobic and hydrophilic solutes. *AIChE Journal* 56, 1136-1146.

- Chen, T., Lian, G., and Kattou, P. (2016). In Silico Modelling of Transdermal and Systemic Kinetics of Topically Applied Solutes: Model Development and Initial Validation for Transdermal Nicotine. *Pharm Res* 33, 1602-1614.
- Chen, T.S., Eichenfield, L.F., and Friedlander, S.F. (2013). Infantile hemangiomas: an update on pathogenesis and therapy. *Pediatrics* 131, 99-108.
- Cheung, S.Y.A., Rodgers, T., Aarons, L., Gueorguieva, I., Dickinson, G.L., Murby, S., Brown, C., Collins, B., and Rowland, M. (2018). Whole body physiologically based modelling of beta-blockers in the rat: events in tissues and plasma following an i.v. bolus dose. *Br J Pharmacol* 175, 67-83.
- Christophers, E., and Kligman, A.M. (1964). Visualization of the Cell Layers of the Stratum Corneum. *J Invest Dermatol* 42, 407-409.
- Cork, M.J., Danby, S.G., Vasilopoulos, Y., Hadgraft, J., Lane, M.E., Moustafa, M., Guy, R.H., Macgowan, A.L., Tazi-Ahnini, R., and Ward, S.J. (2009). Epidermal barrier dysfunction in atopic dermatitis. *J Invest Dermatol* 129, 1892-1908.
- Costarino, A.T., Jr., Gruskay, J.A., Corcoran, L., Polin, R.A., and Baumgart, S. (1992). Sodium restriction versus daily maintenance replacement in very low birth weight premature neonates: a randomized, blind therapeutic trial. *J Pediatr* 120, 99-106.
- Dancik, Y., Miller, M.A., Jaworska, J., and Kasting, G.B. (2013). Design and performance of a spreadsheet-based model for estimating bioavailability of chemicals from dermal exposure. *Adv Drug Deliv Rev* 65, 221-236.
- Denet, A.R., Ucakar, B., and Preat, V. (2003). Transdermal delivery of timolol and atenolol using electroporation and iontophoresis in combination: a mechanistic approach. *Pharm Res* 20, 1946-1951.
- Dick, I.P., and Scott, R.C. (1992). Pig ear skin as an in-vitro model for human skin permeability. *J Pharm Pharmacol* 44.
- Drolet, B.A., and Frieden, I.J. (2010). Characteristics of infantile hemangiomas as clues to pathogenesis: does hypoxia connect the dots? *Arch Dermatol* 146, 1295-1299.
- Drolet, B.A., Swanson, E.A., Frieden, I.J., and Hemangioma Investigator, G. (2008). Infantile hemangiomas: an emerging health issue linked to an increased rate of low birth weight infants. *J Pediatr* 153, 712-715, 715 e711.
- El-Rashidy, R. (1981). Estimation of the systemic bioavailability of timolol in man. *Biopharm Drug Dispos* 2, 197-202.
- Elias, P.M. (1983). Epidermal lipids, barrier function, and desquamation. *J Invest Dermatol* 80, 44s-49s.

- Elias, P.M. (2007). The skin barrier as an innate immune element. *Semin Immunopathol* 29, 3-14.
- Else, O.F., Sorenson, H., and Edwards, I.R. (1978). Plasma timolol levels after oral and intravenous administration. *Eur J Clin Pharmacol* 14, 431-434.
- EMA (2014). Guideline on quality of transdermal patches. EMA/CHMP/QWP/608924/2014
- England, R.W., Hardy, K.L., Kitajewski, A.M., Wong, A., Kitajewski, J.K., Shawber, C.J., and Wu, J.K. (2014). Propranolol promotes accelerated and dysregulated adipogenesis in hemangioma stem cells. *Ann Plast Surg* 73 Suppl 1, S119-124.
- Evans, N.J., and Rutter, N. (1986). Development of the epidermis in the newborn. *Biol Neonate* 49, 74-80.
- FDA (1997). Guidance for Industry: Nonsterile Semisolid Dosage Forms. US Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER).
- Fenton, T.R. (2003). A new growth chart for preterm babies: Babson and Benda's chart updated with recent data and a new format. *BMC Pediatr* 3, 13.
- Fluhr, J.W., Feingold, K.R., and Elias, P.M. (2006). Transepidermal water loss reflects permeability barrier status: validation in human and rodent in vivo and ex vivo models. *Exp Dermatol* 15, 483-492.
- Forster, M., Bolzinger, M.A., Rovere, M.R., Damour, O., Montagnac, G., and Briancon, S. (2011). Confocal Raman microspectroscopy for evaluating the stratum corneum removal by 3 standard methods. *Skin Pharmacol Physiol* 24, 103-112.
- Fourtillan, J.B., Courtois, P., Lefebvre, M.A., and Girault, J. (1981). Pharmacokinetics of oral timolol studied by mass fragmentography. *Eur J Clin Pharmacol* 19, 193-196.
- Franz, T.J. (1975). Percutaneous absorption on the relevance of in vitro data. *J Invest Dermatol* 64, 190-195.
- Franzen, L., and Windbergs, M. (2014). Accessing Raman spectral variability in human stratum corneum for quantitative in vitro depth profiling. *Journal of Raman Spectroscopy* 45, 82-88.
- Gniadecka, M., Faurskov Nielsen, O., Christensen, D.H., and Wulf, H.C. (1998). Structure of water, proteins, and lipids in intact human skin, hair, and nail. *J Invest Dermatol* 110, 393-398.
- Goelz, R., Moll, M., Meisner, C., Rocken, M., Poets, C.F., and Moehrle, M.C. (2014). Prospective controlled study to evaluate cryocontact therapy for infantile haemangioma in preterm infants. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 99, F345-346.

- Goelz, R., and Poets, C.F. (2015). Incidence and treatment of infantile haemangioma in preterm infants. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 100, F85-91.
- Gomulka, J., Siegel, D.H., and Drolet, B.A. (2013). Dramatic shift in the infantile hemangioma treatment paradigm at a single institution. *Pediatr Dermatol* 30, 751-752.
- Grantzow, R., Schmittenbecher, P., Cremer, H., Hoger, P., Rossler, J., Hamm, H., and Hohenleutner, U. (2008). Hemangiomas in infancy and childhood. S 2k Guideline of the German Society of Dermatology with the working group Pediatric Dermatology together with the German Society for Pediatric Surgery and the German Society for Pediatric Medicine. *J Dtsch Dermatol Ges* 6, 324-329.
- Grass, G.M., and Sinko, P.J. (2002). Physiologically-based pharmacokinetic simulation modelling. *Adv Drug Deliv Rev* 54, 433-451.
- Gray, G.M., and Yardley, H.J. (1975). Lipid compositions of cells isolated from pig, human, and rat epidermis. *J Lipid Res* 16, 434-440.
- Greenberger, S., Boscolo, E., Adini, I., Mulliken, J.B., and Bischoff, J. (2010). Corticosteroid suppression of VEGF-A in infantile hemangioma-derived stem cells. *N Engl J Med* 362, 1005-1013.
- Guo, S., and Ni, N. (2010). Topical treatment for capillary hemangioma of the eyelid using beta-blocker solution. *Arch Ophthalmol* 128, 255-256.
- Hadaschik, E., Scheiba, N., Engstner, M., and Flux, K. (2012). High levels of beta2-adrenoceptors are expressed in infantile capillary hemangiomas and may mediate the therapeutic effect of propranolol. *J Cutan Pathol* 39, 881-883.
- Hadgraft, J. (2001). Skin, the final frontier. *Int J Pharm* 224, 1-18.
- Hadgraft, J., and Lane, M.E. (2011). Skin: the ultimate interface. *Phys Chem Chem Phys* 13, 5215-5222.
- Harding, C.R. (2004). The stratum corneum: structure and function in health and disease. *Dermatol Ther* 17 Suppl 1, 6-15.
- Harpin, V.A., and Rutter, N. (1983). Barrier properties of the newborn infant's skin. *J Pediatr* 102, 419-425.
- Harrison, L.I., and Gibaldi, M. (1977). Physiologically based pharmacokinetic model for digoxin disposition in dogs and its preliminary application to humans. *J Pharm Sci* 66, 1679-1683.
- Harrison, S.M., Barry, B.W., and Dugard, P.H. (1984). Effects of freezing on human skin permeability. *J Pharm Pharmacol* 36, 261-262.
- Heck, R.E. (2017). Poröses Silica als Wirkstoffträgerin filmbildenden Dermatikum mit retardierter Wirkstoffabgabe zur Therapie des chronischen Pruritus. In *Pharmazeutische Technologie* (Tuebingen: University of Tuebingen).

- Hwa, C., Bauer, E.A., and Cohen, D.E. (2011). Skin biology. *Dermatol Ther* 24, 464-470.
- Igari, Y., Sugiyama, Y., Sawada, Y., Iga, T., and Hanano, M. (1983). Prediction of diazepam disposition in the rat and man by a physiologically based pharmacokinetic model. *J Pharmacokinet Biopharm* 11, 577-593.
- Iizuka, H. (1994). Epidermal turnover time. *J Dermatol Sci* 8, 215-217.
- Ishizaki, T., Tawara, K., Oyama, Y., and Nakaya, H. (1978). Clinical pharmacologic observations on timolol. I. Disposition and effect in relation to plasma level in normal individuals. *J Clin Pharmacol* 18, 511-518.
- Itinteang, T., Withers, A.H., Leadbitter, P., Day, D.J., and Tan, S.T. (2011). Pharmacologic therapies for infantile hemangioma: is there a rational basis? *Plast Reconstr Surg* 128, 499-507.
- Jacobi, U., Kaiser, M., Toll, R., Mangelsdorf, S., Audring, H., Otberg, N., Sterry, W., and Lademann, J. (2007). Porcine ear skin: an in vitro model for human skin. *Skin Res Technol* 13, 19-24.
- Jamei, M. (2016). Recent Advances in Development and Application of Physiologically-Based Pharmacokinetic (PBPK) Models: a Transition from Academic Curiosity to Regulatory Acceptance. *Curr Pharmacol Rep* 2, 161-169.
- Jepps, O.G., Dancik, Y., Anissimov, Y.G., and Roberts, M.S. (2013). Modeling the human skin barrier--towards a better understanding of dermal absorption. *Adv Drug Deliv Rev* 65, 152-168.
- Jinnin, M., Medici, D., Park, L., Limaye, N., Liu, Y., Boscolo, E., Bischoff, J., Vikkula, M., Boye, E., and Olsen, B.R. (2008). Suppressed NFAT-dependent VEGFR1 expression and constitutive VEGFR2 signaling in infantile hemangioma. *Nat Med* 14, 1236-1246.
- Johnson, M.E., Blankschtein, D., and Langer, R. (1997). Evaluation of solute permeation through the stratum corneum: lateral bilayer diffusion as the primary transport mechanism. *J Pharm Sci* 86, 1162-1172.
- Johnson, T.N., and Rostami-Hodjegan, A. (2011). Resurgence in the use of physiologically based pharmacokinetic models in pediatric clinical pharmacology: parallel shift in incorporating the knowledge of biological elements and increased applicability to drug development and clinical practice. *Paediatr Anaesth* 21, 291-301.
- Jung, E.C., and Maibach, H.I. (2015). Animal models for percutaneous absorption. *J Appl Toxicol* 35, 1-10.
- Kalia, Y.N., Alberti, I., Sekkat, N., Curdy, C., Naik, A., and Guy, R.H. (2000). Normalization of stratum corneum barrier function and transepidermal water loss in vivo. *Pharm Res* 17, 1148-1150.
- Kalia, Y.N., and Guy, R.H. (2001). Modeling transdermal drug release. *Adv Drug Deliv Rev* 48, 159-172.

- Kalia, Y.N., Nonato, L.B., Lund, C.H., and Guy, R.H. (1998). Development of skin barrier function in premature infants. *J Invest Dermatol* 111, 320-326.
- Kalia, Y.N., Pirot, F., and Guy, R.H. (1996). Homogeneous transport in a heterogeneous membrane: water diffusion across human stratum corneum in vivo. *Biophys J* 71, 2692-2700.
- Kanada, K.N., Merin, M.R., Munden, A., and Friedlander, S.F. (2012). A prospective study of cutaneous findings in newborns in the United States: correlation with race, ethnicity, and gestational status using updated classification and nomenclature. *J Pediatr* 161, 240-245.
- Khan, Z.A., Boscolo, E., Picard, A., Psutka, S., Melero-Martin, J.M., Bartch, T.C., Mulliken, J.B., and Bischoff, J. (2008). Multipotential stem cells recapitulate human infantile hemangioma in immunodeficient mice. *J Clin Invest* 118, 2592-2599.
- Kleinman, M.E., Greives, M.R., Churgin, S.S., Blechman, K.M., Chang, E.I., Ceradini, D.J., Tepper, O.M., and Gurtner, G.C. (2007). Hypoxia-induced mediators of stem/progenitor cell trafficking are increased in children with hemangioma. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 27, 2664-2670.
- Kleinman, M.E., Tepper, O.M., Capla, J.M., Bhatt, K.A., Ceradini, D.J., Galiano, R.D., Blei, F., Levine, J.P., and Gurtner, G.C. (2003). Increased circulating AC133+ CD34+ endothelial progenitor cells in children with hemangioma. *Lymphat Res Biol* 1, 301-307.
- Korte, J.M., Kaila, T., and Saari, K.M. (2002). Systemic bioavailability and cardiopulmonary effects of 0.5% timolol eyedrops. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 240, 430-435.
- Kresken, J., Daniels, R., and Arens-Corell, M. (2009). Leitlinie der GD Gesellschaft für
- Dermopharmazie e. V.: Dermokosmetika zur
- Reinigung und Pflege
- trockener Haut. GD Gesellschaft für Dermopharmazie, 1-12.
- Kretsos, K., Miller, M.A., Zamora-Estrada, G., and Kasting, G.B. (2008). Partitioning, diffusivity and clearance of skin permeants in mammalian dermis. *Int J Pharm* 346, 64-79.
- Kubota, K., and Yamada, T. (1990). Finite dose percutaneous drug absorption: theory and its application to in vitro timolol permeation. *J Pharm Sci* 79, 1015-1019.
- Kubota, K.N., Hidefumi; Koyama, Eriko; Yamada, Takao; Kikuchi, Katsuya; Ishizaki, Takashi (1990). Simple and sensitive determination of timolol in human plasma and urine by high-performance liquid

- chromatography with ultraviolet detection. *Journal of Chromatography* 533, 255-263.
- Kumar, M.G., Coughlin, C., and Bayliss, S.J. (2015). Outpatient use of oral propranolol and topical timolol for infantile hemangiomas: survey results and comparison with propranolol consensus statement guidelines. *Pediatr Dermatol* 32, 171-179.
- Lademann, J., Patzelt, A., Richter, H., Antoniou, C., Sterry, W., and Knorr, F. (2009). Determination of the cuticula thickness of human and porcine hairs and their potential influence on the penetration of nanoparticles into the hair follicles. *J Biomed Opt* 14, 021014.
- Lampe, M.A., Burlingame, A.L., Whitney, J., Williams, M.L., Brown, B.E., Roitman, E., and Elias, P.M. (1983). Human stratum corneum lipids: characterization and regional variations. *J Lipid Res* 24, 120-130.
- Leaute-Labreze, C., Dumas de la Roque, E., Hubiche, T., Boralevi, F., Thambo, J.B., and Taieb, A. (2008). Propranolol for severe hemangiomas of infancy. *N Engl J Med* 358, 2649-2651.
- Leaute-Labreze, C., Prey, S., and Ezzedine, K. (2011). Infantile haemangioma: part II. Risks, complications and treatment. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 25, 1254-1260.
- Leggett, R.W., Williams, L.R., Melo, D.R., and Lipsztein, J.L. (2003). A physiologically based biokinetic model for cesium in the human body. *Sci Total Environ* 317, 235-255.
- Lennard, M.S., Lewis, R.V., Brawn, L.A., Tucker, G.T., Ramsay, L.E., Jackson, P.R., and Woods, H.F. (1989). Timolol metabolism and debrisoquine oxidation polymorphism: a population study. *Br J Clin Pharmacol* 27, 429-434.
- Lowenthal, D.T., Pitone, J.M., Affrime, M.B., Shirk, J., Busby, P., Kim, K.E., Nancarrow, J., Swartz, C.D., and Onesti, G. (1978). Timolol kinetics in chronic renal insufficiency. *Clin Pharmacol Ther* 23, 606-615.
- Lunter, D., and Daniels, R. (2014). Confocal Raman microscopic investigation of the effectiveness of penetration enhancers for procaine delivery to the skin. *J Biomed Opt* 19, 126015.
- Luu, M., and Frieden, I.J. (2013). Haemangioma: clinical course, complications and management. *Br J Dermatol* 169, 20-30.
- Ma, G., Wu, P., Lin, X., Chen, H., Hu, X., Jin, Y., and Qiu, Y. (2014). Fractional carbon dioxide laser-assisted drug delivery of topical timolol solution for the treatment of deep infantile hemangioma: a pilot study. *Pediatr Dermatol* 31, 286-291.
- Mantyla, R., Mannisto, P., Nykanen, S., Koponen, A., and Lamminsivu, U. (1983). Pharmacokinetic interactions of timolol with vasodilating drugs, food and phenobarbitone in healthy human volunteers. *Eur J Clin Pharmacol* 24, 227-230.

- Marjukka Suhonen, T., Bouwstra, J.A., and Urtti, A. (1999). Chemical enhancement of percutaneous absorption in relation to stratum corneum structural alterations. *J Control Release* 59, 149-161.
- Mateus, R., Abdalghafor, H., Oliveira, G., Hadgraft, J., and Lane, M.E. (2013). A new paradigm in dermatopharmacokinetics – Confocal Raman spectroscopy. *International Journal of Pharmaceutics* 444, 106-108.
- McMahon, P., Oza, V., and Frieden, I.J. (2012). Topical timolol for infantile hemangiomas: putting a note of caution in "cautiously optimistic". *Pediatr Dermatol* 29, 127-130.
- Michaels, A.S., Chandrasekaran, S.K., and Shaw, J.E. (1975a). Drug permeation through human skin: Theory and invitro experimental measurement *AIChE Journal* 21, 985-996.
- Michaels, A.S., Chandrasekaran, S.K., and Shaw, J.E. (1975b). Drug permeation through human skin: Theory and invitro experimental measurement. *AIChE Journal* 21, 985-996.
- Mihm, M.C., Jr., and Nelson, J.S. (2010). Hypothesis: the metastatic niche theory can elucidate infantile hemangioma development. *J Cutan Pathol* 37 *Suppl* 1, 83-87.
- Mitragotri, S. (2003). Modeling skin permeability to hydrophilic and hydrophobic solutes based on four permeation pathways. *J Control Release* 86, 69-92.
- Mitragotri, S., Johnson, M.E., Blankschtein, D., and Langer, R. (1999). An analysis of the size selectivity of solute partitioning, diffusion, and permeation across lipid bilayers. *Biophys J* 77, 1268-1283.
- Mobasher, A., Richardson, S., Mobasher, R., Shakibaei, M., and Hoyland, J.A. (2005). Hypoxia inducible factor-1 and facilitative glucose transporters GLUT1 and GLUT3: putative molecular components of the oxygen and glucose sensing apparatus in articular chondrocytes. *Histol Histopathol* 20, 1327-1338.
- Modamio, P., Lastra, C.F., and Marino, E.L. (2000). A comparative in vitro study of percutaneous penetration of beta-blockers in human skin. *Int J Pharm* 194, 249-259.
- Moehrle, M., Leaute-Labreze, C., Schmidt, V., Rocken, M., Poets, C.F., and Goelz, R. (2013). Topical timolol for small hemangiomas of infancy. *Pediatr Dermatol* 30, 245-249.
- Morsi, N.M., Aboelwafa, A.A., and Dawoud, M.H. (2016). Improved bioavailability of timolol maleate via transdermal transfersomal gel: Statistical optimization, characterization, and pharmacokinetic assessment. *J Adv Res* 7, 691-701.
- Mulliken, J.B., and Glowacki, J. (1982). Hemangiomas and vascular malformations in infants and children: a classification based on endothelial characteristics. *Plast Reconstr Surg* 69, 412-422.

- Nafie, L.A. (2012). Recent advances in linear and nonlinear Raman spectroscopy. Part VI. *Journal of Raman Spectroscopy* 43, 1845-1863.
- Netzloff, F., Lehr, C.M., Wertz, P.W., and Schaefer, U.F. (2005). The human epidermis models EpiSkin, SkinEthic and EpiDerm: an evaluation of morphology and their suitability for testing phototoxicity, irritancy, corrosivity, and substance transport. *Eur J Pharm Biopharm* 60, 167-178.
- Neubert, R.H.H., and Wepf, R. (2007). Stratum corneum, Struktur und Morphologie einer Barriere. *Pharmazeutische Zeitung* 17, 14-21.
- North, P.E., Waner, M., Mizeracki, A., and Mihm, M.C., Jr. (2000). GLUT1: a newly discovered immunohistochemical marker for juvenile hemangiomas. *Hum Pathol* 31, 11-22.
- OECD (2004). Test No. 428: Skin Absorption: In Vitro Method.
- Otberg, N., Richter, H., Schaefer, H., Blume-Peytavi, U., Sterry, W., and Lademann, J. (2004). Variations of hair follicle size and distribution in different body sites. *J Invest Dermatol* 122, 14-19.
- Painter, S.L., and Hildebrand, G.D. (2016). Review of topical beta blockers as treatment for infantile hemangiomas. *Surv Ophthalmol* 61, 51-58.
- Peichev, M., Naiyer, A.J., Pereira, D., Zhu, Z., Lane, W.J., Williams, M., Oz, M.C., Hicklin, D.J., Witte, L., Moore, M.A., *et al.* (2000). Expression of VEGFR-2 and AC133 by circulating human CD34(+) cells identifies a population of functional endothelial precursors. *Blood* 95, 952-958.
- Phillips, R.J. (2000). A hydrodynamic model for hindered diffusion of proteins and micelles in hydrogels. *Biophys J* 79, 3350-3353.
- Pittman, K.M., Losken, H.W., Kleinman, M.E., Marcus, J.R., Blei, F., Gurtner, G.C., and Marchuk, D.A. (2006). No evidence for maternal-fetal microchimerism in infantile hemangioma: a molecular genetic investigation. *J Invest Dermatol* 126, 2533-2538.
- Pope, E., and Chakkittakandiyil, A. (2010). Topical timolol gel for infantile hemangiomas: a pilot study. *Arch Dermatol* 146, 564-565.
- Potts, R.O., and Francoeur, M.L. (1991). The influence of stratum corneum morphology on water permeability. *J Invest Dermatol* 96, 495-499.
- Poulin, P., and Theil, F.P. (2002). Prediction of pharmacokinetics prior to in vivo studies. II. Generic physiologically based pharmacokinetic models of drug disposition. *J Pharm Sci* 91, 1358-1370.
- Poulin, P., and Theil, F.P. (2009). Development of a novel method for predicting human volume of distribution at steady-state of basic drugs and comparative assessment with existing methods. *J Pharm Sci* 98, 4941-4961.
- Praveen, V., Vidavalur, R., Rosenkrantz, T.S., and Hussain, N. (2009). Infantile hemangiomas and retinopathy of prematurity: possible association. *Pediatrics* 123, e484-489.

- Proksch, E., Brandner, J.M., and Jensen, J.M. (2008). The skin: an indispensable barrier. *Exp Dermatol* 17, 1063-1072.
- Puttgen, K., Lucky, A., Adams, D., Pope, E., McCuaig, C., Powell, J., Feigenbaum, D., Savva, Y., Baselga, E., Holland, K., *et al.* (2016). Topical Timolol Maleate Treatment of Infantile Hemangiomas. *Pediatrics* 138.
- Raman, C.V., and Krishnan, K.S. (1928). A New Type of Secondary Radiation. *Nature* 121, 501-502.
- Ritter, M.R., Dorrell, M.I., Edmonds, J., Friedlander, S.F., and Friedlander, M. (2002). Insulin-like growth factor 2 and potential regulators of hemangioma growth and involution identified by large-scale expression analysis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 7455-7460.
- Rodgers, T., Leahy, D., and Rowland, M. (2005a). Physiologically based pharmacokinetic modeling 1: predicting the tissue distribution of moderate-to-strong bases. *J Pharm Sci* 94, 1259-1276.
- Rodgers, T., Leahy, D., and Rowland, M. (2005b). Tissue distribution of basic drugs: accounting for enantiomeric, compound and regional differences amongst beta-blocking drugs in rat. *J Pharm Sci* 94, 1237-1248.
- Rodgers, T., and Rowland, M. (2007). Mechanistic approaches to volume of distribution predictions: understanding the processes. *Pharm Res* 24, 918-933.
- Rowland, M., Peck, C., and Tucker, G. (2011). Physiologically-based pharmacokinetics in drug development and regulatory science. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 51, 45-73.
- Saar, B.G., Contreras-Rojas, L.R., Xie, X.S., and Guy, R.H. (2011). Imaging drug delivery to skin with stimulated Raman scattering microscopy. *Mol Pharm* 8, 969-975.
- Sawada, Y., Hanano, M., Sugiyama, Y., Harashima, H., and Iga, T. (1984). Prediction of the volumes of distribution of basic drugs in humans based on data from animals. *J Pharmacokinet Biopharm* 12, 587-596.
- Schneider, M., and Vierling, M. (2019). Aktualisierte Handlungsempfehlung nach der Leitlinie „Infantile Hämangiome im Säuglings- und Kleinkindesalter“. *Monatsschrift Kinderheilkunde* 167, 149-150.
- Sekkat, N., Kalia, Y.N., and Guy, R.H. (2002). Biophysical study of porcine ear skin in vitro and its comparison to human skin in vivo. *J Pharm Sci* 91, 2376-2381.
- Sekkat, N., Kalia, Y.N., and Guy, R.H. (2004a). Development of an in vitro model for premature neonatal skin: biophysical characterization using transepidermal water loss. *J Pharm Sci* 93, 2936-2940.
- Sekkat, N., Kalia, Y.N., and Guy, R.H. (2004b). Porcine ear skin as a model for the assessment of transdermal drug delivery to premature neonates. *Pharm Res* 21, 1390-1397.

- Semkova, K., and Kazandjieva, J. (2013). Topical timolol maleate for treatment of infantile haemangiomas: preliminary results of a prospective study. *Clin Exp Dermatol* 38, 143-146.
- Shaffer, S.G., and Meade, V.M. (1989). Sodium balance and extracellular volume regulation in very low birth weight infants. *J Pediatr* 115, 285-290.
- Simon, G.A., and Maibach, H.I. (2000). The pig as an experimental animal model of percutaneous permeation in man: qualitative and quantitative observations--an overview. *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol* 13, 229-234.
- Singh, B.N., Williams, F.M., Whitlock, R.M., Collett, J., and Chew, C. (1980). Plasma timolol levels and systolic time intervals. *Clin Pharmacol Ther* 28, 159-166.
- Stamatas, G.N., Nikolovski, J., Mack, M.C., and Kollias, N. (2011). Infant skin physiology and development during the first years of life: a review of recent findings based on in vivo studies. *Int J Cosmet Sci* 33, 17-24.
- Swarbrick, J., Lee, G., and Brom, J. (1982). Drug Permeation through Human Skin: I. Effects of Storage Conditions of Skin. *Journal of Investigative Dermatology* 78, 63-66.
- Takahashi, K., Mulliken, J.B., Kozakewich, H.P., Rogers, R.A., Folkman, J., and Ezekowitz, R.A. (1994). Cellular markers that distinguish the phases of hemangioma during infancy and childhood. *J Clin Invest* 93, 2357-2364.
- Teichmann, A., Jacobi, U., Ossadnik, M., Richter, H., Koch, S., Sterry, W., and Lademann, J. (2005). Differential stripping: determination of the amount of topically applied substances penetrated into the hair follicles. *J Invest Dermatol* 125, 264-269.
- Teorell, T. (1937). Studies on the diffusion effect upon ionic distribution: II. experiments on ionic accumulation. *J Gen Physiol* 21, 107-122.
- Thaivalappil, S., Bauman, N., Saieg, A., Movius, E., Brown, K.J., and Preciado, D. (2013). Propranolol-mediated attenuation of MMP-9 excretion in infants with hemangiomas. *JAMA Otolaryngol Head Neck Surg* 139, 1026-1031.
- Tocco, D.J., deLuna, F.A., and Duncan, A.E. (1975a). Electron-capture GLC determination of timolol in human plasma and urine. *J Pharm Sci* 64, 1879-1881.
- Tocco, D.J., Duncan, A.E., Delauna, F.A., Hucker, H.B., Gruber, V.F., and Vandenheuvell, W.J. (1975b). Physiological disposition and metabolism of timolol in man and laboratory animals. *Drug Metab Dispos* 3, 361-370.

- Tocco, D.J., Hooke, K.F., Deluna, F.A., and Duncan, A.E. (1976). Stereospecific binding of timolol, a beta-adrenergic blocking agent. *Drug Metab Dispos* 4, 323-329.
- Tod, M., Jullien, V., and Pons, G. (2008). Facilitation of drug evaluation in children by population methods and modelling. *Clin Pharmacokinet* 47, 231-243.
- Trommer, H., and Neubert, R.H. (2006). Overcoming the stratum corneum: the modulation of skin penetration. A review. *Skin Pharmacol Physiol* 19, 106-121.
- van de Sandt, J.J., van Burgsteden, J.A., Cage, S., Carmichael, P.L., Dick, I., Kenyon, S., Korinth, G., Larese, F., Limasset, J.C., Maas, W.J., *et al.* (2004). In vitro predictions of skin absorption of caffeine, testosterone, and benzoic acid: a multi-centre comparison study. *Regul Toxicol Pharmacol* 39, 271-281.
- van Smeden, J., and Bouwstra, J.A. (2016). Stratum Corneum Lipids: Their Role for the Skin Barrier Function in Healthy Subjects and Atopic Dermatitis Patients. *Curr Probl Dermatol* 49, 8-26.
- van Smeden, J., Janssens, M., Gooris, G.S., and Bouwstra, J.A. (2014). The important role of stratum corneum lipids for the cutaneous barrier function. *Biochim Biophys Acta* 1841, 295-313.
- Volotinen, M., Hakkola, J., Pelkonen, O., Vapaatalo, H., and Maenpaa, J. (2011). Metabolism of ophthalmic timolol: new aspects of an old drug. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 108, 297-303.
- Volotinen, M., Turpeinen, M., Tolonen, A., Uusitalo, J., Maenpaa, J., and Pelkonen, O. (2007). Timolol metabolism in human liver microsomes is mediated principally by CYP2D6. *Drug Metab Dispos* 35, 1135-1141.
- Vukovich, R.A., Foley, J.E., Brown, B., Willard, D.A., Buckley, M., O'Kelly, D., Fitzgerald, D., Tormey, W., and Darragh, A. (1979). Effect of beta-blockers on exercise double product (systolic blood pressure x heart rate). *Br J Clin Pharmacol* 7 *Suppl* 2, 167S-172S.
- Walter, J.W., North, P.E., Waner, M., Mizeracki, A., Blei, F., Walker, J.W., Reinisch, J.F., and Marchuk, D.A. (2002). Somatic mutation of vascular endothelial growth factor receptors in juvenile hemangioma. *Genes Chromosomes Cancer* 33, 295-303.
- Waner, M., North, P.E., Scherer, K.A., Frieden, I.J., Waner, A., and Mihm, M.C., Jr. (2003). The nonrandom distribution of facial hemangiomas. *Arch Dermatol* 139, 869-875.
- Weibel, L., Barysch, M.J., Scheer, H.S., Konigs, I., Neuhaus, K., Schiestl, C., Rentsch, K., Muller, D.M., and Theiler, M. (2016). Topical Timolol for Infantile Hemangiomas: Evidence for Efficacy and Degree of Systemic Absorption. *Pediatr Dermatol* 33, 184-190.

- Weigand, D.A., and Gaylor, J.R. (1973). Removal of stratum corneum in vivo: an improvement on the cellophane tape stripping technique. *J Invest Dermatol* 60, 84-87.
- Weissenstein, A., Villalon, G., Luchter, E., and Bittmann, S. (2012). Children's haemangiomas: use of new topical therapies. *Br J Nurs* 21, 274.
- Williams, A.C., and Barry, B.W. (2004). Penetration enhancers. *Adv Drug Deliv Rev* 56, 603-618.
- Williams, L.R., and Leggett, R.W. (1989). Reference values for resting blood flow to organs of man. *Clin Phys Physiol Meas* 10, 187-217.
- Wilson, D.R., and Maibach, H.I. (1980). Transepidermal water loss in vivo. Premature and term infants. *Biol Neonate* 37, 180-185.
- Wilson, T.W., Firor, W.B., Johnson, G.E., Holmes, G.I., Tsianco, M.C., Huber, P.B., and Davies, R.O. (1982). Timolol and propranolol: bioavailability, plasma concentrations, and beta blockade. *Clin Pharmacol Ther* 32, 676-685.
- Wong, A., Hardy, K.L., Kitajewski, A.M., Shawber, C.J., Kitajewski, J.K., and Wu, J.K. (2012). Propranolol accelerates adipogenesis in hemangioma stem cells and causes apoptosis of hemangioma endothelial cells. *Plast Reconstr Surg* 130, 1012-1021.
- Xu, G., Lv, R., Zhao, Z., and Huo, R. (2012). Topical propranolol for treatment of superficial infantile hemangiomas. *J Am Acad Dermatol* 67, 1210-1213.
- Ya-Xian, Z., Suetake, T., and Tagami, H. (1999). Number of cell layers of the stratum corneum in normal skin - relationship to the anatomical location on the body, age, sex and physical parameters. *Arch Dermatol Res* 291, 555-559.
- Yamazaki, K., and Kanaoka, M. (2004). Computational prediction of the plasma protein-binding percent of diverse pharmaceutical compounds. *J Pharm Sci* 93, 1480-1494.
- Yu, L., Li, S., Su, B., Liu, Z., Fang, J., Zhu, L., Huang, M., Shan, W., Song, D., Ye, B., *et al.* (2013). Treatment of superficial infantile hemangiomas with timolol: Evaluation of short-term efficacy and safety in infants. *Exp Ther Med* 6, 388-390.
- Yu, Y., Flint, A.F., Mulliken, J.B., Wu, J.K., and Bischoff, J. (2004). Endothelial progenitor cells in infantile hemangioma. *Blood* 103, 1373-1375.
- Zhang, Q., Chantasart, D., and Li, S.K. (2015). Evaluation of beta-blocker gel and effect of dosing volume for topical delivery. *J Pharm Sci* 104, 1721-1731.
- Zhang, Z., and Lunter, D.J. (2018). Confocal Raman microspectroscopy as an alternative method to investigate the extraction of lipids from stratum corneum by emulsifiers and formulations. *Eur J Pharm Biopharm* 127, 61-71.

Zimmermann, A.P., Wiegand, S., Werner, J.A., and Eivazi, B. (2010).
Propranolol therapy for infantile haemangiomas: review of the
literature. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 74, 338-342.