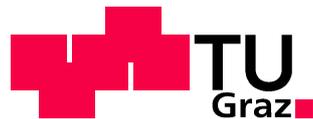


Katrin Tiffner

Vergleich der Penetration von Fentanyl und Benzoesäure zwischen der Mikrodialyse- und der Offenen Mikroperfusions-Technik

Diplomarbeit

Institut für Medizintechnik
Technische Universität Graz



Begutachter:

Ao.Univ.-Prof. Dipl.-Ing. Dr.techn. Hermann Scharfetter

Im Zusammenarbeit mit

Joanneum Research

HEALTH - Institut für Biomedizin und Gesundheitswissenschaften

Biomedizinische Technik und Monitoring



Betreut von

Dipl.-Ing. Christian Höfferer

Graz (März, 2011)

EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG

Ich erkläre an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig verfasst, andere als die angegebenen Quellen/Hilfsmittel nicht benutzt und die den benutzten Quellen wörtlich und inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Graz, am

.....
(Unterschrift)

Kurzfassung

Ziel dieser Arbeit ist der Vergleich von drei minimal invasiven Sampling-Methoden, die eine Untersuchung von biochemischen Vorgängen in der Haut ermöglichen.

Die dabei verwendeten dermalen Katheter werden in die Epidermis implantiert und liefern kontinuierlich Gewebsflüssigkeit, die als Grundlage für weitere chemische Analysen dient.

Der Versuchsaufbau soll optimiert, die Messergebnisse sollen statistisch analysiert und die Katheter anhand dieser Ergebnisse verglichen werden.

Es wurden ex-vivo und in-vitro Versuche mit einem Offenen Mikroperfusionskatheter (OFM, Joanneum Research Graz), einem CMA 66 – Katheter (Mikrodialyse Katheter, 100 kDa, CMA Microdialysis AB) und einem 2 kDa Mikrodialyse-Katheter (Dänemark) durchgeführt. Als Testsubstanzen wurden Fentanyl und Benzoesäure verwendet. Die gesampelte Probenflüssigkeit wurde vom Labor (JR, HEALTH, BAM) analysiert und die Messergebnisse wurden statistisch aufbereitet.

Anhand der Messergebnisse kann gezeigt werden dass der OFM-Katheter und der CMA-Katheter reproduzierbarere Ergebnisse liefern als der 2 kDa MD-Katheter.

Die Ergebnisse zeigen auch, dass ein Sampling von Fentanyl ohne Ethanol mit dem OFM-Katheter möglich ist. In einer Machbarkeitsstudie wurde auch gezeigt, dass der OFM-Katheter das Sammeln von Fentanyl bei der Applikation eines Depotpflasters in ex-vivo Haut ermöglicht.

Schlüsselwörter: Offene Mikroperfusuion, Mikrodialyse, Haut, Fentanyl, Benzoesäure

Abstract

The aim of this work is to compare three minimal invasive sampling methods. With these sampling methods it is possible to monitor the biochemical environment in the skin.

Dermal catheters are implanted in the epidermis and provide interstitial fluid for further chemical analytics.

The aim is to optimize the experimental set up, to analyze the measurement results by statistic methods and to compare the results of the different catheters.

Ex-vivo and in-vitro experiments were performed with an Open-Flow-Microperfusion probe (OFM, Joanneum Research Graz), a CMA 66 (Microdialysis probe, 100 kDa, CMA Microdialysis AB) probe and a 2 kDa Microdialysis probe (Denmark). As test substance Fentanyl and benzoic acid were used. The lab (JR, HEALTH, BAM) analyzed the sampled fluid and the results were evaluated statistically.

The results were more reproducibile with the OFM probes and the CMA probes as with the 2 kDa MD probes.

The results show that a sampling of Fentanyl without Ethanol is possible with the OFM probe. The feasibility study shows that it is possible to sample Fentanyl with the OFM probes after an application of a transdermal patch.

Keywords: open flow microperfusion, microdialysis, skin, fentanyl, benzoic acid

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei meinen Arbeitskolleginnen und Arbeitskollegen des Joanneum Research bedanken, die mich in meiner Tätigkeit inspirierten und mir neue Perspektiven eröffneten. Mein spezieller Dank gilt Herrn DI Christian Höfferer, der mich während meiner gesamten Arbeit unterstützte. Bei der Forschungsgruppe Bioanalytik und Metabolomics möchte ich mich recht herzlich für die Analytik meiner Proben bedanken.

Ein großer Dank geht auch an meine Eltern Irene und Christian Tiffner für die finanzielle und persönliche Unterstützung während meines Studiums und an meine Schwester Corinna Tiffner.

Für die Unterstützung während meines Studiums möchte ich mich gerne bei meinen Studienkolleginnen und Studienkollegen bedanken. Allen voran Asmir Hrnica und Christian Schneider.

Weiteres möchte ich mich bei der Studienvertretung Elektrotechnik und Biomedical Engineering, bei der BLATT und bei der HTU für die erfolgreiche Zusammenarbeit in den letzten Jahren bedanken:

Pupak Azmoudeh, Andrea Schmölzer, Betty Häupl, Peter Reinprecht, Christoph Birkl, Wolfgang Buc, Michael Steiner, Sebastian Tschatschek, Christian Wahl, Gerwin Kircher, Andreas Neuhold, Christian Raunig, Jörg Huaunig, Christian Huber, Dominik Kullnig, Birgit Ungerböck, Florian Ungerböck, Magdalena Tendl, Alexander Thalhammer, Michael Bayer, Ina Baumgartner, Bastian Dünhofen, Christian Dobnig, Andreas Kainer, Katrin Koren, Philipp Müller, Kerstin Huber, Benjamin Schmid-Lanz, Simon Schwingenschuh und Lukas Ladinig.

Ein herzliches Dankeschön für die Unterstützung in den letzten Jahren möchte ich auch folgenden Freunden aussprechen: Christoph Steger, Christian Wagner, Andreas Ofitsch, Irene Strasser, Wolfgang Fediuk, Romy Kneißl, Barbara Mehsner, Birgit Mitter, Lisa Galler, Marie-Therese Wegerer und Dina Tutkur.

Zum Schluss möchte ich mich bei der Technischen Universität Graz bedanken, die für mich in den letzten Jahren auch eine zweite Heimat geworden ist.

Inhaltsverzeichnis

1. EINLEITUNG	1
1.1. Die Haut	4
1.1.1. Aufgabe der Haut	4
1.1.2. Aufbau der Haut	5
1.1.3. Penetration und Permeation von Medikamenten	8
1.2. Fentanyl	11
1.3. Benzoesäure.....	12
1.4. Zielsetzung	13
2. METHODEN.....	15
2.1. Dermale Katheter	15
2.1.1. Offener Mikroperfusions (OFM) Katheter.....	16
2.1.2. CMA 66	18
2.1.3. 2 kDa Mikrodialyse (MD) Katheter	20
2.2. Versuchsaufbau und zeitlicher Ablauf	21
2.2.1. In-vitro Versuche	21
2.2.2. Ex-vivo Versuche	24
2.2.2.1. Vorbereitung der Haut.....	24
2.2.2.2. Setzen der Katheter	24
2.2.2.3. Vorversuche	26
2.2.2.4. Hauptversuche.....	33
2.3. Peristaltikpumpen.....	36
2.4. Perfusat.....	38
2.5. Analytik	39
2.6. Statistische Methoden.....	41
2.6.1. Grafische Darstellung	41
2.6.2. Lagemaß und Streuungsmaß.....	41
2.6.3. Vergleich der Konzentrationen	41
2.7. Lag time	42
2.8. Sampling-Effizienz	42
3. ERGEBNISSE.....	43
3.1. In-vitro Versuche.....	43
3.2. Vorversuch 1	46
3.3. Vorversuch 2	47
3.4. Hauptversuche.....	49
4. DISKUSSION.....	53

4.1. In-vitro Versuche.....	53
4.2. Vorversuche	54
4.2.1. Vorversuch 1	54
4.2.2. Vorversuch 2	54
4.3. Hauptversuche	58
4.4. Vergleich der Konzentrationen.....	60
4.5. Lag time	60
5. SCHLUSSFOLGERUNG	61
6. LITERATURVERZEICHNIS.....	63
7. ABBILDUNGSVERZEICHNIS	65

Begriffserklärung

<i>Analyt</i>	Gesamtheit des zu untersuchenden Materials
<i>antiinflammatorisch</i>	Entzündungshemmend
<i>antiproliferativ</i>	Wachstumshemmend, hemmt Zell- und Gewebswachstum
<i>Baseline Sample</i>	Erste Sample eines Versuchs ohne Applikation einer Testsubstanz
<i>Cut Off</i>	Maßeinheit für die Porengröße einer Membran: minimale Molekülmasse eines Moleküls, das von einer Membran noch zurückgehalten wird und die Membran nicht passiert
<i>extrazelluläre Flüssigkeit</i>	Flüssigkeit, die sich außerhalb der Zellen befindet
<i>HPLC</i>	High performance liquid chromatography, Hochleistungs-Flüssigkeitschromatograph
<i>hydrophil</i>	Eigenschaft von Stoffen, die eine besondere Affinität (das Bestreben eine Wechselwirkung einzugehen) zum Wasser haben
<i>immunsuppressiv</i>	Unterdrückt das Immunsystem
<i>interstitielle Flüssigkeit</i>	Teil der extrazellulären Flüssigkeit die sich im Interstitium befindet, Gewebsflüssigkeit
<i>lipophil</i>	Eigenschaft von Stoffen, die sich in Fetten oder Ölen lösen
<i>Parafilm</i>	Verschlussfolie
<i>Perfusion</i>	Durchspülen des Katheters
<i>Perfusat</i>	Spülflüssigkeit, welche durch den Katheter gepumpt wird.
<i>perkutane Applikation</i>	Oberflächliches Auftragen von Substanzen auf die Haut
<i>Pharmakodynamik</i>	Lehre von der Wirkung des Arzneistoffs im Organismus
<i>Pharmakokinetik</i>	Lehre von der Aufnahme, Verteilung und Elimination von Arzneistoffen im Organismus
<i>poolen</i>	Zusammenmischen mehrerer Proben
<i>Probe</i>	Die gewonnene Probenflüssigkeit nach Perfusion des Katheters
<i>respiratorisch</i>	Bezüglich der Atmung
<i>Sample</i>	Siehe ‚Probe‘.
<i>Sampling</i>	Probengewinnung
<i>Vial</i>	Probengefäß

Abkürzungsverzeichnis

EtOH	Ethanol
ID	Innendurchmesser
OD	Außendurchmesser
OFM	Offene Mikroperfusion

1. Einleitung

Laut dem § 1. (1) des österreichischen Arzneimittelgesetzes sind Arzneimittel Substanzen, die dazu dienen

- Krankheiten, Leiden, Körperschäden oder krankhafte Beschwerden zu heilen, zu lindern, zu verhüten oder zu erkennen,
- die Beschaffenheit, den Zustand oder die Funktionen des Körpers oder seelische Zustände erkennen zu lassen,
- vom menschlichen oder tierischen Körper erzeugte Wirkstoffe oder Körperflüssigkeiten zu ersetzen,
- Krankheitserreger, Parasiten oder körperfremde Stoffe abzuwehren, zu beseitigen oder unschädlich zu machen oder
- die Beschaffenheit, den Zustand oder die Funktionen des Körpers oder seelische Zustände zu beeinflussen. [1]

Es vergehen mehrere Jahre bevor ein Arzneimittel am Menschen angewandt werden kann. Die neue Substanz muss mehrere Entwicklungsstadien durchlaufen. Das Patent wird in einem sehr frühen Stadium der Substanzenerkennung beantragt. Von der Substanzfindung bis zum Einsatz am Menschen können bis zu 12 Jahre vergehen und die durchschnittlichen Kosten betragen 1,5 Milliarden Euro (Abbildung 1).

Allein die Ausgaben für Arzneimittel in Österreich beliefen sich im Jahr 2008 auf 3,7 Milliarden Euro. Die Forschungs- und Entwicklungs-Ausgaben der österreichischen Pharmaindustrie betragen im Jahr 2008 rund 433 Millionen Euro. [2]

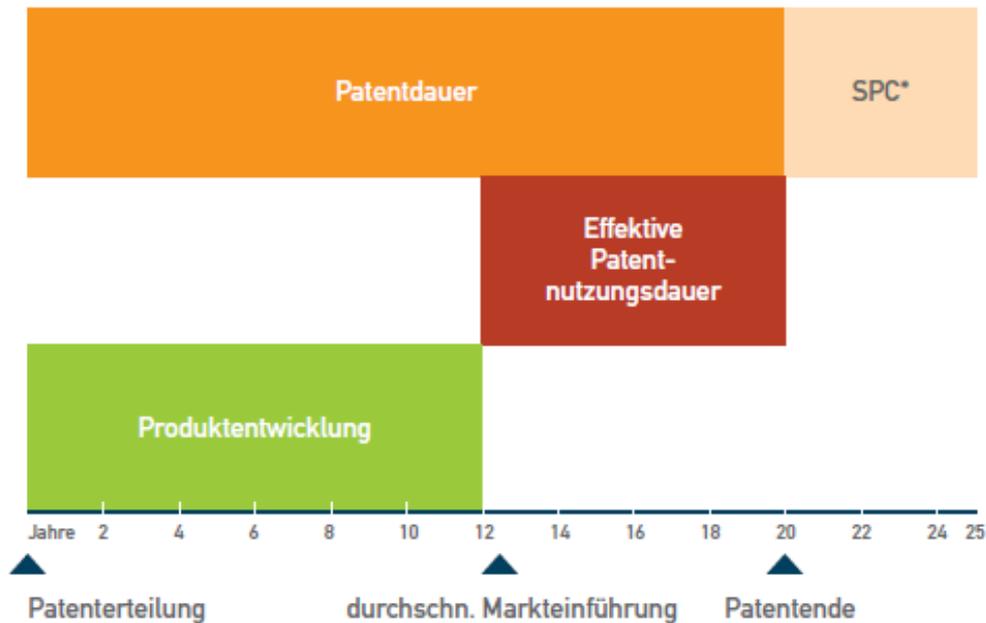


Abbildung 1: Zeitlicher Verlauf der Arzneimittelentwicklung- Von der Substanzerkennung bis zur Markteinführung (Quelle: Pharmig [2])

Bevor Medikamente am Menschen angewendet werden dürfen, müssen sie einer Reihe von Prüfungen unterzogen werden und von einer Zulassungsbehörde zugelassen werden. Man unterscheidet zwischen präklinischer und klinischer Prüfung. Die gesetzliche Grundlage dafür ist in Österreich das Arzneimittelgesetz (AMG).

Für die Zulassung muss der erwartende Nutzen eines Medikaments die erwartenden Nebenwirkungen übersteigen. Der Nachweis erfolgt durch die Vorlage von pharmazeutischen, präklinischen und klinischen Daten.

In der präklinischen Forschung erfolgt die chemische Synthese von Substanzen und die Herstellung der Substanz. In Zellkulturen oder im Tiermodell wird die Wirksamkeit der Substanz überprüft. Die Toxizität der Substanz und somit das Schädigungspotenzial für den Menschen wird ermittelt.

Von 250 Substanzen, die in der präklinischen Forschung untersucht werden, wird nur eine am Ende zugelassen. In den Jahren 2004-2008 wurden 144 neue Substanzen auf dem Welt-Pharmamarkt eingeführt. Davon stammen 47 von europäischen Pharmaunternehmen.

Wenn aus den präklinischen Daten hervor geht, dass die Substanz nicht toxisch ist, kann mit den klinischen Studien am Menschen begonnen werden.

Die klinische Studie unterteilt sich in 4 Phasen. Bei der ersten Phase werden gesunde Probanden verwendet. Ab Phase II werden Patienten eingesetzt. In diesen Phasen sollen die Wirkung sowie die Nebenwirkungen evaluiert werden. Die klinischen Studien dienen zur Dosisfindung sowie zur Feststellung der Pharmakokinetik.

Nach der positiven Absolvierung der Phasen I-III kann das Medikament zugelassen werden. Die Phase IV dient zur Erfassung der Nebenwirkungen und der Langzeitwirkungen. In dieser Phase wird das Medikament auch mit anderen Medikamenten verglichen. [2][3][4][5]

Die Markteinführung eines Medikamentes ist daher ein langwieriger und kostenintensiver Prozess. Ein großes Ziel ist daher, kostengünstigere und schnellere Verfahren und Methoden für die präklinische und klinische Forschung zu entwickeln, um die Zeitspanne zwischen Substanzerkennung und Markteinführung zu verkürzen.

Die folgende Arbeit konzentriert sich auf Samplingmethoden, deren Ziel es ist, die Pharmakokinetik und die Pharmakodynamik bei perkutan applizierten Medikamenten zu untersuchen.

Eine Methode, um kontinuierlich die Konzentration von Medikamenten in der Epidermis zu untersuchen, sind dermale Katheter. Mit diesen Kathetern ist es möglich, einen direkten minimal-invasiven Zugang zum Hautgewebe zu bekommen.

Der dermale Katheter wird mit einem Perfusat durchspült und an der Austauschfläche des Katheters kommt es zum Substanzenaustausch zwischen dem Perfusat und der Gewebsflüssigkeit. Am Ausgang des Katheters wird die Probenflüssigkeit gesammelt, die ein Abbild der biochemischen Zusammensetzung Gewebsflüssigkeit darstellt. Diese kontinuierlich gesammelte Probenflüssigkeit dient als Grundlage für weitere chemische Analysen.

1.1. Die Haut

Die Haut bedeckt mit einer Fläche von 1,5 bis 2 m² und einem Gewicht von 3,5 bis 10 kg den menschlichen Körper und ist somit das größte Organ. Sie ist an verschiedenen Körperregionen unterschiedlich. An mechanisch beanspruchten Orten, wie die Fußsohlen, weist sie eine größere Dicke auf als an weniger beanspruchten Stellen wie das Augenlid. [6]

1.1.1. Aufgabe der Haut

Die Haut hat mehrere Funktionen. Zum einen trennt sie das Innere des Körpers von der Außenwelt ab und hat daher eine Schutzfunktion. Sie schützt den Körper vor mechanischen Einflüssen, wie Druck, Stößen und Reibung, sowie vor chemischen Einflüssen. Sie zählt auch zum unspezifischen Immunsystem und dient als äußere Schutzbarriere (Hautflora und Permeabilitätsbarriere der Hornschicht) und verhindert das Eindringen von krankmachenden Mikroorganismen. Weiters schützt die Haut den Körper vor Strahlung wie zum Beispiel UV Strahlung.

Zum anderen stellt sie mit ihren verschiedenen Rezeptoren und Tastkörpern die Verbindung zur Außenwelt her und ist daher ein wichtiges Sinnesorgan. Zu den Rezeptoren zählen zum Beispiel die Thermorezeptoren, die Schmerzrezeptoren oder die Mechanorezeptoren, die mechanische Einflüsse wie Druck und Zugkräfte registrieren.

Die Haut spielt eine wichtige Rolle bei der Temperaturregulation, wobei durch die Abgabe von Flüssigkeiten und durch Verengung und Erweiterung der Hautgefäße die Körpertemperatur konstant gehalten wird.

Die Haut wirkt gegen einen extremen Wasserverlust und schützt damit den Körper vor Austrocknung. Andererseits gibt sie auch Salze und Flüssigkeiten ab. [6]

1.1.2. Aufbau der Haut

Die Haut besteht aus 3 Schichten. Die unterste Schicht ist die Subcutis oder Hypodermis (Unterhaut), die aus lockerem Bindegewebe besteht. Darüber liegt die Dermis oder Corium (Lederhaut)

Die mehrschichtige Epidermis (Oberhaut) bildet die äußerste Hautschicht. Dieser Aufbau der Haut ist in Abbildung 2 zusehen.

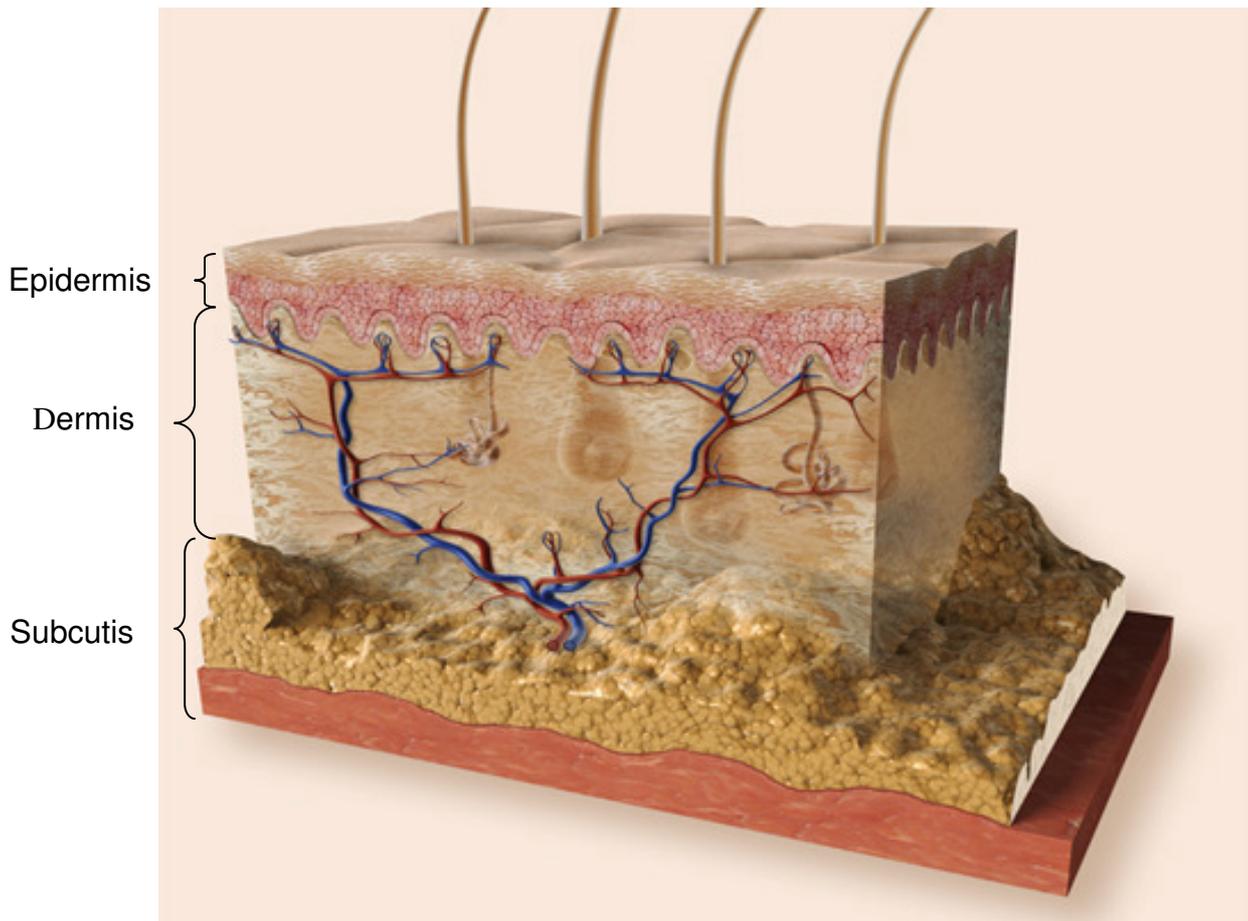


Abbildung 2: Aufbau der Haut (Quelle: http://psoriasis.net.dynamicweb.dk/Files/Billeder/DE/Deutsche_Animation/haut_gesund_75.jpg)

Die unterste Schicht ist die Subcutis oder Unterhaut. Sie besteht aus lockerem Bindegewebe. Die Dermis dient als Verschiebeschicht zu den darunter liegenden Strukturen. Sie enthält das Fettgewebe, das als Wärmeisolator dient. Weiters verlaufen hier die Gefäße und die Nerven. In dieser Schicht liegen die Drüsen und die Haarwurzeln.

Über der Subcutis liegt die Dermis, die wiederum aus dem Stratum papillare und dem Stratum reticulare besteht.

Das Stratum reticulare oder Geflechschicht ist die innerste Schicht. Sie enthält kräftige Kollagenfaserbündel, die die Haut elastisch und trotzdem stabil machen.

Darüber liegt das Stratum papillare. Sie ist fest mit der Epidermis durch kammförmige dermale Papillen verbunden. Dort sind Kapillarschlingen vorhanden, die die gefäßlose Epidermis versorgt. Weiters enthält diese Schicht freie Nervenendungen und damit auch Rezeptoren.

Die Epidermis ist die äußerste Schicht und ist in Abbildung 3 zu sehen. Sie enthält keine Blutgefäße und ist aus mehreren Schichten aufgebaut.

Da sie keine Blutgefäße besitzt, erfolgt die Versorgung von Nährstoffen durch Diffusion aus der Dermis. Befestigt ist die Epidermis an der Dermis mittels der Basalmembran.

Die innerste Schicht ist das Stratum basale oder die Basalzellschicht. Hier befinden sich die Keratinozyten, die durch Mitose entstehen. Sie werden durch die nachkommenden Zellen laufend an die Oberfläche weiter geschoben. Beim Durchwandern durch die oberen Schichten werden die Keratinozyten weiter differenziert.

Die nächste Schicht ist das Stratum spinosum (Stachelzellschicht). Da die Keratinozyten weniger mit Nährstoffen versorgt werden, verändern sie ihre Morphologie und ihren Stoffwechsel. Die Keratinozyten werden wegen der zunehmenden Dehydrierung flacher, richten sich horizontal aus und sind mit Desmosomen miteinander verbunden. Dadurch bilden sie ein starkes Gerüst, das die Epidermis stabil hält. Hier beginnt die Keratinisierung. Unter Keratinisierung versteht man den Verhornungsprozess der Zellen.

Darüber liegt das Stratum granulosum oder Körnerschicht. Die Zellen enthalten Keratingranula, die wichtig zur Keratinisierung sind. Hier verlieren die Zellen ihren Zellkern. Die Zellorganellen werden in den Interzellularraum abgegeben.

Die nächste Schicht ist das Stratum lucidum. Sie ist nur in dicker Epidermis vorhanden und befindet sich daher nur an den Handtellern und Fußsohlen. Das Stratum lucidum schützt die Haut vor mechanischen Belastungen.

Die oberste Schicht wird Stratum corneum (SC) oder Hornschicht genannt und besteht aus kernlosen, keratinisierten Zellen, die auch Korneozyten genannt werden. Die abgeflachten toten Zellen werden von einem Lipidmantel umgeben, die die

Kittsubstanz darstellen. Diese Kerneozyten werden ständig an der Oberfläche abgeschliffen. [6]

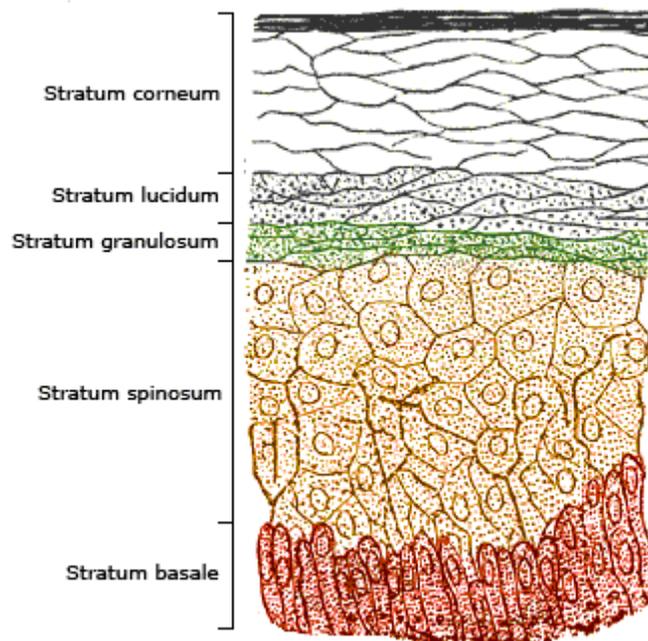


Abbildung 3: Aufbau der Epidermis (Quelle: <http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/2/20/Skinlayers.png>)

1.1.3. Penetration und Permeation von Medikamenten

Das Eindringen eines Wirkstoffes in die Haut nennt man Penetration. Die Permeation ist das Durchdringen des Wirkstoffes durch die Hautschichten, um in tiefere Zonen und in den systemischen Kreislauf zu gelangen.

Beim Weg durch die Haut muss der Wirkstoff einige Barrieren überwinden. Der Wirkstoff kann in der Haut in unveränderter Form daliegen. Manche Wirkstoffmoleküle werden beim Durchgang durch das SC verändert. Der Wirkungsort der perkutan applizierten Arzneistoffe kann lokal die Haut sein. Der Wirkstoff kann aber auch über die Kapillaren in der Haut und somit über den Blutkreislauf in andere Körperregionen weiter geleitet werden.

Medikamente die auf die Haut appliziert werden bestehen aus einer Grundlage (Vehikel) und einem oder mehreren Wirkstoffen. Die Grundlage kann dabei Wasser, Fette, Öle, Emulsionen, Paste oder Puder sein.

Die perkutane Anwendung von Medikamenten bietet viele Vorteile. Die erforderliche Dosis ist meistens niedriger, da der Wirkstoff ohne First Pass Effekt in den Körper gelangen kann. Bei oraler Einnahme von Medikamenten durchlaufen die Wirkstoffe, bevor sie in den Blutkreislauf gelangen, den Magen-Darm-Trakt und werden in der Leber metabolisiert. Dies nennt man den First Pass Effekt.

Bei der perkutanen Anwendung nimmt das SC die Funktion als Zwischenspeicher ein. Hier bilden sich bei einigen Wirkstoffen Reservoirs, die den Wirkstoff langsam wieder abgeben. Eine sehr schnelle Freisetzung des Wirkstoffes im Zielgewebe ist daher nicht möglich. Spezielle Arzneiformen, die diese verlängerte Wirkstofffreisetzung nutzen, sind die transdermale therapeutische System (TTS). TTS sind wirkstoffhaltige Pflaster die den Wirkstoff gleichmäßig freisetzen.

Zuerst muss der Wirkstoff aus dem Vehikel an der Grenzfläche des SC freigesetzt werden. Diesen Vorgang nennt man Liberation. Die Liberation ist davon abhängig in welcher Form der Arzneistoff vorliegt. In gelöster Form erhält man eine sehr schnelle Freisetzung des Wirkstoffes während bei TTS die Freisetzung des Wirkstoffes verlängert wird. Nach der Liberation kommt es zur Adsorption. Unter Adsorption versteht man die Anlagerung von Molekülen an Oberflächen. Dabei bindet der Wirkstoff an die oberflächliche Hautstruktur, insbesondere an das SC. Unter Absorption oder Resorption versteht man die Aufnahme einer Substanz in bestimmte

Schichten der Haut bzw. in das Gewebe. Die Resorption kann zum Beispiel durch passiven oder aktiven Transport erfolgen. Die Resorption durch die Haut geschieht sehr langsam. Der Wirkstoff kann sich einige Zeit in Depots in der Haut anlagern und wird erst danach wieder frei gesetzt. Einige Wirkstoffe werden ins Blut abgegeben und über das Blut in andere Körpergewebe verteilt. Ziel anderer Wirkstoffe ist es, lokal in der Haut zu wirken. Eine Abgabe ins Blut ist daher unerwünscht. Eventuell wird der Wirkstoff durch biochemische Prozesse umgewandelt oder abgebaut. Am Ende steht die Exkretion. Bei der Exkretion wird der Wirkstoff aus dem Körper ausgeschieden. Zum größten Teil geschieht dies über die Nieren und den Urin.

Das SC ist die eigentliche Penetrationsbarriere. Sie bestimmt die Geschwindigkeit des Wirkstofftransportes durch die Haut.

Im SC sind die Kerneozyten mit dichten Lipidschichten verbunden. Diese Lipide sind nur schlecht hydratisierbar und verhindern damit die Penetration nicht nur von Partikeln, sondern auch von Wasser und hydrophilen Stoffen. Lipophile Substanzen werden daher leichter vom SC aufgenommen als hydrophile Substanzen.

Durch den Aufbau der Haut ergeben sich drei Penetrationswege. Entweder penetriert der Wirkstoff transepidermal, transfollikulär oder transglandulär durch die Haut.

Beim transepidermalen Weg geschieht das entweder transzellulär oder interzellulär. Bei der transzellulären Penetration diffundiert der Wirkstoff abwechselnd durch die Kerneozyten und die Lipidmatrix (Abbildung 4). Bei der interzellulären erfolgt die Diffusion ausschließlich durch die mit Lipid gefüllten Zwischenräume.

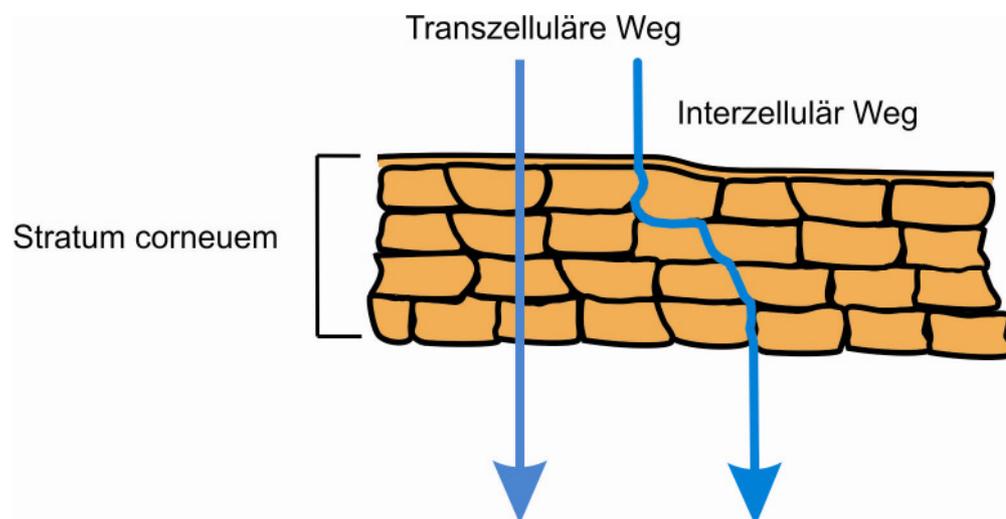


Abbildung 4: Penetration durch das Stratum corneum über den transepidermalen Weg

Bei der transfollikulären und transglandulären Penetration gelangt der Wirkstoff über die Hautanhangsgebilde in die Haut.

Bei der transfollikulären Penetration gelangt der Wirkstoff über Haarfollikel oder Drüsen und bei der transglandulären über Schweißdrüsen in die Haut.

Die Permeation von Wirkstoffen durch die Haut ist auch vom Zustand der Haut und von der physikalischen und chemischen Eigenschaft des Wirkstoffes und des Vehikels abhängig.

Zum Beispiel hat kindliche Haut eine höhere Permeabilität als die von Erwachsenen. Auch bei verschiedenen Hautregionen liegt ein unterschiedliches Permeationsverhalten von Wirkstoffen vor. [3] [4] [8]

1.2. Fentanyl

Fentanyl ist ein narkotisierendes Analgetikum, das aufgrund seiner schmerzstillenden Wirkung zur intravenösen und intramuskulären Schmerzbehandlung in der Anästhesie und postoperativ eingesetzt wird. Durch die hohe Lipidlöslichkeit ($\log P=4,05$) und das niedrige Molekulargewicht (336,5 g/mol) ist Fentanyl auch für transdermale Systeme geeignet.

Am Markt ist Fentanyl als intravenöse Injektion (Sublimaze®), transdermales Pflaster (Durogesic®), transmukosale Lutschtablette (Actiq®) und als Buccaltabletten (Effentora®) erhältlich.

Das transdermale Pflaster ist in verschiedenen Größen, die verschiedene Mengen an Fentanyl enthalten, erhältlich. Es ist verschreibungspflichtig und darf nur auf ärztliche Anweisung eingenommen werden.

Durogesic® wird bei chronischen Schmerzen, die einer längeren, kontinuierlichen Behandlung bedürfen, eingesetzt. [8]

Die Pflaster besitzen je nach Hersteller einen Matrix- oder Membranaufbau. Beim Matrixpflaster ist der Wirkstoff in einer ein- oder mehrschichtigen Matrix enthalten. Die Matrix besteht aus einer hochviskosen Polymerschicht. Diese ist Wirkstoffträger und Klebeschicht zugleich. Durch die Eigenschaft des Polymers und durch die Dosierung des Wirkstoffes lässt sich die Wirkstoffabgabe steuern. Das Membranpflaster besitzt ein Wirkstoff-Reservoir. Die Fentanylabgabe wird durch eine Membran, die zwischen Haut und Depot liegt, gesteuert.

Bei beiden Systemen diffundiert der Wirkstoff durch die Haut. Dies geschieht entweder transzellulär – der Wirkstoff wandert durch die Zelle – oder interzellulär, wobei der Wirkstoff über die verbindenden Lipidschichten durch das Stratum corneum vordringt.

Das Durogesic® Depotplaster ermöglicht eine kontinuierliche systemische Verabreichung von Fentanyl über 72 Stunden. Nach der ersten Applikation wird nach ungefähr 12 bis 24 Stunden eine konstante Serumkonzentration erreicht. Nach 3 Tagen ist ein Pflasterwechsel erforderlich.

Das Fentanyl dringt über die Haut in den Körper ein und führt zu einer gleichbleibenden Wirkung über 72 Stunden. Zielort des Fentanyl ist das zentrale Nervensystem, wo es durch seine gute Fettlöslichkeit sehr rasch eintreten kann. [4][8] Das Penetrationsverhalten von Fentanyl über die Haut wurde in einigen Studien untersucht [9][10]. Dabei wurde die Konzentration von Fentanyl im Blut gemessen. Eine genauere Untersuchung des Verhaltens von Fentanyl lokal in der Haut weckt daher großes Interesse. Vor allem durch die große Lipophilie ($\log P=4,05$) ist Fentanyl eine neue Herausforderung für den OFM-Katheter.

1.3. Benzoesäure

Benzoesäure oder Acidum benzoicum wird hauptsächlich als Konservierungsmittel in der Lebensmittelindustrie verwendet.

Durch ihre antiseptische Eigenschaft wird sie auch in der Medizin angewendet.

Natürlich kommt die Benzoesäure in Früchten wie Preiselbeeren oder Pflaumen und in einigen Harzen vor.

In Arzneimitteln ist die Benzoesäure in verschiedenen Erkältungsmitteln, in Wundheilmitteln sowie in homöopathischen Präparaten enthalten [11]. Benzoesäure hat eine molare Masse von 122,1 g/mol und ist leicht lipophil ($\log P$ 1.87).

Für die folgenden Versuche wurde Benzoesäure als Testsubstanz ausgewählt, da die Penetration von Benzoesäure in einigen Studien mit der Mikrodialyse Technik bereits untersucht wurde [12].

1.4. Zielsetzung

In dieser Arbeit sollen drei verschiedene Samplingmethoden zur Gewinnung von Gewebsflüssigkeit aus der Epidermis verglichen werden. Als Samplingmethoden werden zwei verschiedene Mikrodialysekatheter und der Offene Mikroperfusionskatheter verwendet. Um diese Katheter zu vergleichen, sollen die Katheter in ex-vivo Haut implantiert und zwei verschiedene Testsubstanzen aufgetragen werden. Die dabei verwendeten Testsubstanzen sind Fentanyl und Benzoessäure. Diese werden in flüssiger Form aufgetragen.

Die chemische Analyse der Gewebsflüssigkeit wird von der Forschungsgruppe Bioanalytik und Metabolomics (Joanneum Research, Institut HEALTH – Institut für Biomedizin und Gesundheitswissenschaft) durchgeführt.

Ziel dieser Arbeit ist es

- den Versuchsaufbau für den Vergleich der drei Katheter zu optimieren,
- die Durchführung der Versuche,
- die statistische Analyse der Messergebnisse
- und der Vergleich der drei Samplingmethoden anhand der gewonnenen Messergebnisse.

Im Vorhinein wurde im Dezember 2009 der erste ex-vivo Versuch mit humanen Hautstücken durchgeführt. Dieser galt als Vorlage für die folgenden Versuche. Dabei konnten einige Probleme festgestellt werden, die erhoben werden sollten.

Beim ersten ex-vivo Versuch wurden auf die Dermis vier Applikationsflächen mit jeweils 3 Kathetern aufgebracht (Abbildung 5). Die zu untersuchenden Analyten waren Fentanyl (1 ml/Applikationsfläche mit einer Konzentration von 50 µg/ml) und Benzoessäure (1 ml/Applikationsfläche mit einer Konzentration von 4 mg/ml). Dieser Versuch wurde am Hahnhof (Medizinische Universität Graz, Institut für biomedizinische Forschung) durchgeführt.

Alle Katheter wurden im Push-Betrieb betrieben. Beim Push-Betrieb wird mit einer Peristaltikpumpe das Perfusat in das Gewebe gepumpt.

Ein Problem stellten die schwankenden Umgebungsbedingungen dar. Am Versuchsort gab es direkte Sonneneinstrahlung, was zu Temperaturschwankungen

und Luftfeuchtigkeitsschwankungen führte. Dies führte zur Verdunstung und zu einer Austrocknung der Hautoberfläche.

Bei 7 von 12 Kathetern gab es auch keinen initialen Probenausfluss und während dem Versuch kam es teilweise zu nicht konstantem Ausfluss.

Da der Versuch in der Nacht ohne Aufsicht weiterlief, waren in den Morgenstunden die Katheter trocken gelaufen, da das Perfusat ausging bzw. verdunstete.

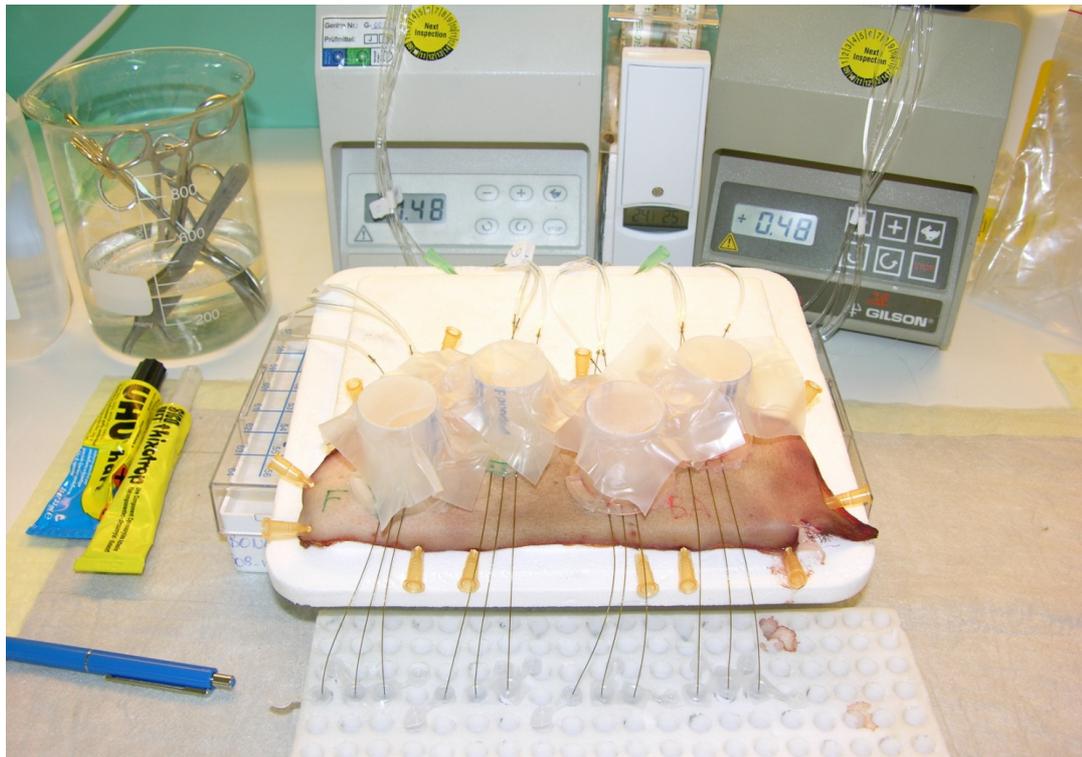


Abbildung 5: Aufbau des Versuchs vom Dezember 2009

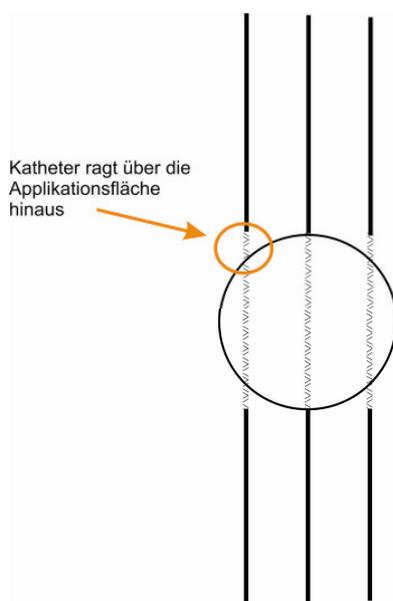


Abbildung 6: Katheter mit runder Applikationsfläche

Bei den Messergebnissen war auffällig, dass die Katheter, die am Rand der Applikationsfläche gesetzt waren, eine um die Hälfte niedrigere Konzentration aufwiesen. Dies ist darauf zurückzuführen, dass die runden Applikationskammern zu klein waren und Teile der Austauschflächen der Katheter nicht unter der Applikationsfläche lagen, sondern darüber hinaus ragten (Abbildung 6), was zu einer verminderten Aufnahme der Analyten führte.

Diese Messfehler sollten in den folgenden Versuchen durch Verwendung von quadratischen Applikationskammern verbessert werden.

2. Methoden

Die Penetration von Fentanyl und Benzoesäure in ex-vivo Haut wurde mittels drei verschiedenen dermalen Kathetern untersucht. Dabei wurden zwei Vorversuche und neun Hauptversuche durchgeführt.

Um die Sampling-Effizienz der Katheter festzustellen wurden in-vitro Versuche durchgeführt.

2.1. Dermale Katheter

Mit einem dermalen Hautkatheter wird der Konzentrationsverlauf von biochemischen Vorgängen in der Epidermis oder in der Subcutis kontinuierlich gemessen.

Dabei wird der dermale Katheter in das Hautgewebe implantiert und mit einem Perfusat mit einer geringen Flussrate von 0,5 µl/min bis 2 µl/min durchspült. Das Perfusat ist eine Spüllösung, die eine ähnliche Zusammensetzung wie die interstitielle Flüssigkeit hat. Über die Austauschfläche des Katheters diffundieren Moleküle aus der Gewebsflüssigkeit des Zielgewebes in das Innere des Katheters und fließen über den Katheter ab.

Die Diffusion ist vom Konzentrationsunterschied und von der Flussgeschwindigkeit des Perfusats abhängig. Eine niedrigere Flussgeschwindigkeit führt zu einer höheren Konzentration der Moleküle im Perfusat.

Am Katheterausgang wird die Probenflüssigkeit aufgefangen und in dieser wird die Konzentration der zu untersuchenden Substanzen gemessen. Dadurch kann die Pharmakokinetik bzw. die Pharmakodynamik einer bestimmten Substanz im zu untersuchenden Zielgewebe evaluiert werden.

Für die Versuche wurden zwei Mikrodialysekatheter (MD-Katheter) und ein Offener Mikroperfusions Katheter (OFM-Katheter) verwendet. Der OFM-Katheter besitzt im Gegensatz zum MD-Katheter keine Membran.

2.1.1. Offener Mikroperfusions (OFM) Katheter

Die Austauschfläche des OFM-Katheters (Joanneum Research Forschungsgesellschaft mbH, Österreich) besteht aus makroskopischen Öffnungen, über die es zum Flüssigkeitsaustausch zwischen dem durchströmenden Perfusat und der interstitielle Flüssigkeit des Zielgewebes kommt. Im Gegensatz zur Membran können über diese Austauschfläche größere Moleküle erfasst werden.

Der Katheter besteht aus einem Zuflussschlauch, einer Austauschfläche und einem Abflussschlauch.

Die Zu- und Abflusseite des Katheters besteht aus einem Polyimidschlauch (OD: 0,36 mm, ID: 0,25 mm) der eine Geflechtseinlage aus Edelstahl besitzt. Im Inneren ist der Katheter mit einer dünnen Teflonschicht beschichtet. Die Austauschfläche ist 15 mm lang und besteht nur aus dem Edelstahlgeflecht. 7 mm vom distalen und proximalen Ende der Austauschfläche entfernt sind weiße Markerbänder, die die Positionierung der Austauschfläche ins Zielgewebe erleichtern. Der Katheter und die Austauschfläche sind in Abbildung 7 zu sehen.

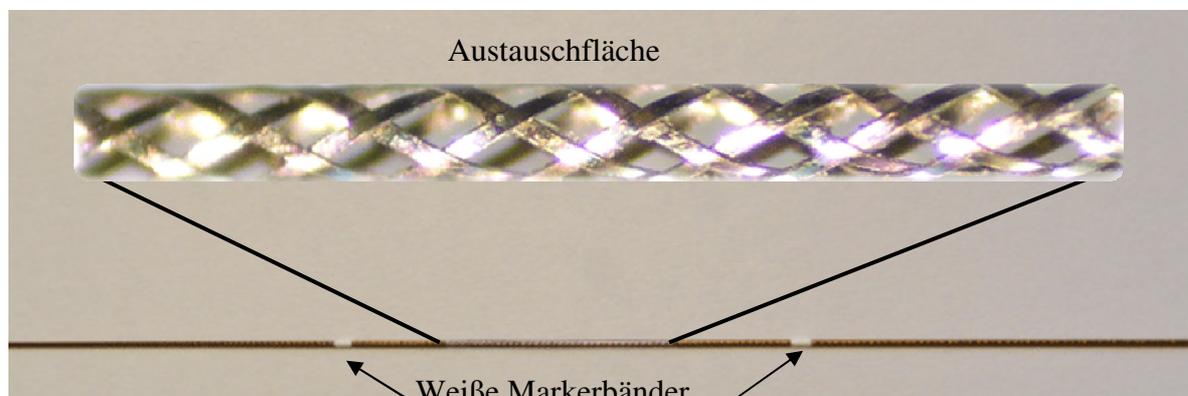


Abbildung 7: OFM-Katheter mit Austauschfläche

Der Katheter wird mit einer oder zwei Pumpen betrieben. In den folgenden Versuchen wurden immer zwei Pumpen verwendet.

Am Eingang wird der Katheter mit einem Schlauch mit der Push-Pumpe verbunden. Der Ausgang des Katheters wird über eine Dichtung mit einem Ende der Kapillare verbunden. Das zweite Ende der Kapillare wird über eine weitere Dichtung mit einem Schlauch verbunden. Dieser Schlauch ist mit der Pull-Pumpe verbunden.

Die Push-Pumpe pumpt das Perfusat, mit einer bestimmten Flowrate, in das Gewebe. Aus dem Gewebe wird mit der Pull-Pumpe die Probenflüssigkeit abgesaugt. Die abgesaugte Probenflüssigkeit wird in der Kapillare gesammelt. Zusammengefasst wird Perfusat in das Gewebe gepumpt und Probenflüssigkeit abgesaugt. Das System arbeitet im Push-Pull Betrieb.

In Abbildung 8 ist der Systemaufbau zu sehen.

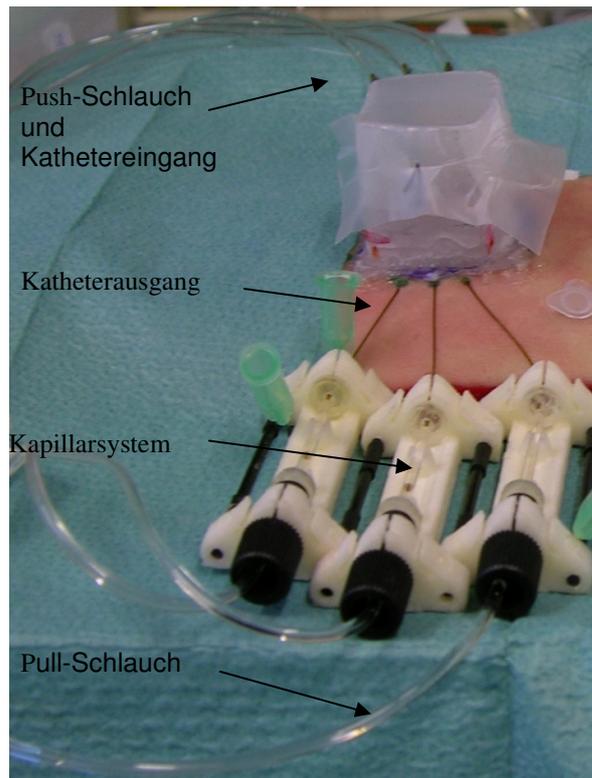


Abbildung 8: Probenflüssigkeitsentnahme mit dem OFM-Katheter

2.1.2. CMA 66

Der CMA Katheter ist ein Mikrodialyse Katheter. Die Austauschfläche des linearen CMA-Katheters (CMA Microdialysis AB, Schweden) besteht aus einer Membran, die eine Ausschlussgrenze bzw. einen „Cut off“ von 100 kDa besitzt. Unter Ausschlussgrenze versteht man die minimale Molekülmasse eines Moleküls, das von der Membran noch zurückgehalten wird und die Membran nicht passiert. Dieser Wert wird in Dalton angegeben. Dalton ist eine atomare Masseneinheit: $1 \text{ Da} = 1,6605 \cdot 10^{-27} \text{ kg}$.

Der Katheter besteht aus einem Zuflussschlauch, einer Austauschfläche und einem Abflussschlauch.

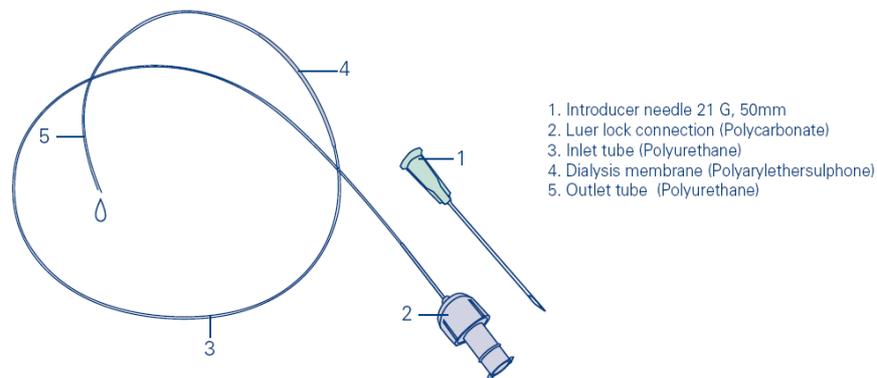


Abbildung 9: CMA 66 Katheter¹¹

Der Zuflussschlauch ist 400 mm und der Abflussschlauch ist 100 mm lang. Diese bestehen aus Polyurethan und haben einen Durchmesser von 0.4 mm. Die Membran hat eine Austauschfläche von 10 mm und besteht aus Polyarylether-Sulfon. Sie hat einen Durchmesser von 0.5 mm. Aus dem Zielgewebe diffundieren die zu untersuchenden Wirkstoffe durch die Mikrodialysemembran. Der Katheter und die Austauschfläche sind in Abbildung 9 und 10 zu sehen. [13]



Abbildung 10: Austauschfläche des CMA 66 Katheters

Der Katheter wird mit einer Pumpe betrieben. Dafür können Peristaltikpumpen oder Spritzenpumpen verwendet werden. Mit den Pumpen muss es möglich sein, bei geringer Flussrate von ungefähr 1 $\mu\text{l}/\text{min}$, kontinuierlich zu pumpen.

Der Eingang des Katheters wird mit einem Schlauch mit der Push-Pumpe verbunden. Der Ausgang des Katheters wird mit einem Vial verbunden (Abbildung 11).

Die Push Pumpe pumpt das Perfusat in den Katheter. An der Austauschfläche kommt es aufgrund des Konzentrationsunterschiedes zwischen dem Perfusat und der extrazellulären Flüssigkeit zur Diffusion. Moleküle diffundieren aus dem extrazellulären Fluid durch die Membran in den Katheter. An der Ausgangsseite fließt die Probenflüssigkeit aus dem Katheter und wird in einem Vial gesammelt.

Das System arbeitet im Push-Betrieb.



Abbildung 11: Probenflussentnahme mit dem CMA-Katheter

Die Anwendung dieser Katheter ist durch die Membran und dessen Fähigkeit zur Aufnahme großmolekularer Substanzen begrenzt.

2.1.3. 2 kDa Mikrodialyse (MD) Katheter

Die Austauschfläche des 2 kDa MD-Katheters (Institut für Dermatologie, Dänemark) besteht aus einer Membran, die eine Ausschlussgrenze bzw. einen „Cut off“ von 2 kDa besitzt. Im Gegensatz zu den beiden anderen Kathetern, die maschinell gefertigt wurden, wurde dieser Katheter von Kooperationspartner im Labor hergestellt

Der Katheter besteht aus einem Zuflussschlauch und einer Austauschfläche (Abbildung 12).

Der Zuflussschlauch des Katheters besteht aus einem Nylonschlauch (Smith Medical, USA) und hat eine Länge von 30 cm.

Die Austauschfläche besteht aus einer hohlen 65 mm langen Membran. Diese besteht aus Dialysefasern GFS 16+ (Gambro Lundia AB, Schweden) und hat einen äußeren Durchmesser von 0,216 mm.

Der Schlauch wurde mit der Membran mit Hilfe eines Cyanacrylat Klebers (Loctite, Dänemark) zusammen geklebt. Innerhalb der Membran wurde ein Edelsstahldraht (Sandvik, Norwegen) mit einer Länge von 65 mm, zur Stabilisierung mit verklebt. Dieser Katheter besitzt keinen zusätzlichen Abflussschlauch. Die Probenflüssigkeit fließt über die 65 mm lange Membran ab und wird am Ende der Membran in Vials gesammelt. [14]



Abbildung 12: 2 kDa MD-Katheter (Membran mit angeklebten Nylon)

Wie beim CMA-Katheter wird der 2 kDa- Katheter mit einer Pumpe betrieben.

Der Katheter ist am Eingang mit einer Push-Pumpe und am Ausgang mit einem Vial verbunden.

Die Push-Pumpe pumpt das Perfusat in den Katheter und an der Austauschfläche diffundieren Molekülen aus dem extrazellulären Fluid durch die Membran in den Katheter. Die Probenflüssigkeit wird mit Vials am Ausgang gesammelt.

Das System arbeitet im Push-Betrieb.

Wie beim CMA-Katheter stellt bei diesem Katheter die Membran den limitierenden Faktor dar.

2.2. Versuchsaufbau und zeitlicher Ablauf

2.2.1. In-vitro Versuche

Mit den in-vitro Versuchen wurde die Sampling-Effizienz der Katheter untersucht. Mit der Sampling-Effizienz soll festgestellt werden, wie weit die Konzentration der gesammelten Probenflüssigkeit mit der tatsächlichen Konzentration in der Testlösung übereinstimmt.

Es wurden drei OFM-, drei CMA- und drei 2 kDa MD-Katheter verwendet. Diese wurden in einen Glasbehälter mit Testflüssigkeit, die eine bestimmte Konzentration von Fentanyl oder Benzoesäure enthielt, gelegt. Der Glasbehälter stand auf einem Magnetrührer, um eine konstante Konzentration der Testflüssigkeit im Behälter zu garantieren.

Damit die Katheter in gleicher Höhe und im gleichen Abstand in der Testflüssigkeit positioniert werden konnten, wurde eine Halterung gebaut. An dieser wurden die Katheter befestigt.

Der OFM-Katheter wurde im Push-/Pull-Betrieb, die CMA- und die 2 kDa MD-Katheter wurden im Push-Betrieb betrieben.

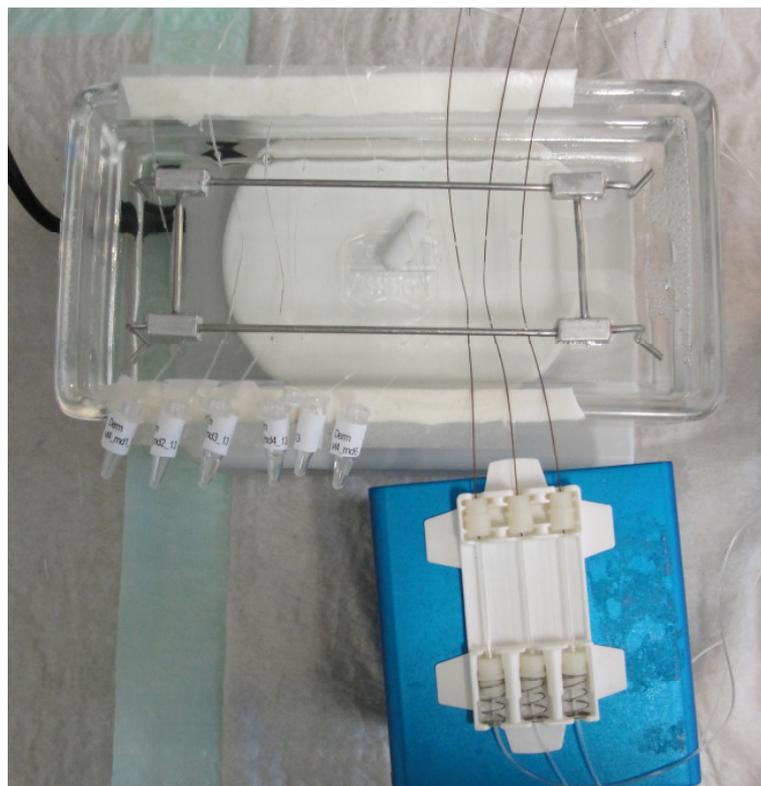


Abbildung 13: Aufbau des in-vitro-Versuchs

Die Probenflüssigkeit der CMA- und 2 kDa MD-Katheter wurde in Vials (0.2 ml Maximum Recovery PCR tubes® ,Axygen, USA) und die Probenflüssigkeit der OFM-Katheter in Kapillaren (50 µl Glaskapillaren, Hirschmann, Deutschland) gesammelt. Dieser Versuchsaufbau ist in Abbildung 13 zu sehen.

Zur Ermittlung der Sampling-Effizienz wurden für Fentanyl und für Benzoessäure vier Versuche mit vier verschiedenen Konzentrationen durchgeführt.

Das Fentanyl wurde in ELO-MEL mit 1% Humanem Serum Albumin (HSA) gelöst. Die verwendeten Konzentrationen sind in der folgenden Tabelle ersichtlich.

Tabelle 1: Verwendete Konzentrationen von Fentanyl bei den in-vitro Versuchen

Fentanyl		
	Konzentration 1	1 ng/ml
	Konzentration 2	10 ng/ml
	Konzentration 3	100 ng/ml
	Konzentration 4	500 ng/ml

Die Benzoessäure wurde in 8% Ethanol (EtOH) gelöst.

Die verwendeten Konzentrationen sind in der folgenden Tabelle ersichtlich.

Tabelle 2: Verwendete Konzentrationen von Benzoessäure bei den in-vitro Versuchen

Benzoessäure		
	Konzentration 1	10 µg/ml
	Konzentration 2	100 µg/ml
	Konzentration 3	250 µg/ml
	Konzentration 4	1000 µg/ml

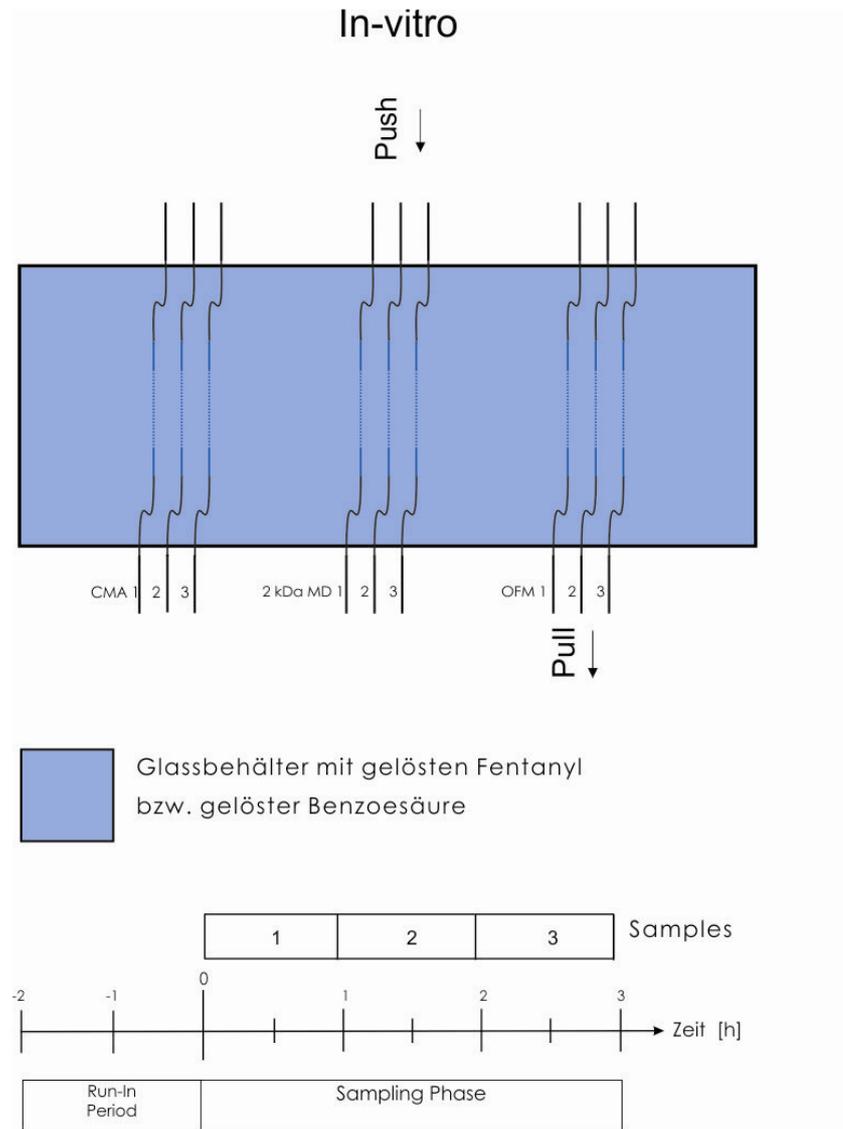


Abbildung 14: Zeitlicher Ablauf des in-vitro Versuchs

Bei diesen Versuchen wurde Probenflüssigkeit über einen Zeitraum von drei Stunden gesammelt. Das Samplingintervall betrug eine Stunde. Der zeitliche Verlauf der Versuche ist in Abbildung 14 zu sehen.

Da das Fassungsvermögen der Kapillaren zu gering war wurden diese halbstündig gewechselt und in ein Vial zusammen gepoolt.

2.2.2. Ex-vivo Versuche

2.2.2.1. Vorbereitung der Haut

Die Hautstücke wurden von Frau Dr. R. Holmgard zur Verfügung gestellt und wurden im Rahmen von plastischen Operationen in Dänemark dem Spender entnommen. Diese bestanden aus der Subkutis, der Dermis und der Epidermis.

Nach der Anlieferung in Trockeneistransportboxen ins Zentrum für medizinische Forschung (ZMF, LKH Graz) wurden diese im Tiefkühlschrank bei -80°C eingefroren. Einige Tage vor dem Versuchsstart wurden die Hautstücke zuerst im -20°C Kühlschrank zwischen gelagert und 20 Stunden vor Versuchsbeginn bei Zimmertemperatur aufgetaut. Durch das langsame Auftauen, sollte die Zerstörung der Haut verringert werden.

Die Hautstücke wurden auf einer, mit einer Krankenunterlage (Molinea) eingehüllten Styroporplatte mit der Epidermis nach oben aufgelegt und mittels Kanülen fixiert.

2.2.2.2. Setzen der Katheter

Die Katheter wurden von Dr. R. Holmgard gesetzt. Pro Applikationsfläche wurden immer drei Katheter in die Haut implantiert. Zuerst wurde auf die Hautstücke die Größe der Applikationsflächen sowie die Ein- und Austrittstellen der Katheter markiert. Die Applikationsfläche hatte eine Größe von 2 x 2 cm. Die einzelnen Katheter wurden in einen Abstand von 5 mm voneinander gesetzt. Zum Setzen wurden Injektions-Kanülen (0,80 mm x 50 mm, 21 G * 2“) verwendet. Diese wurden durch die markierten Ein- und Austrittstrittstellen in die Epidermis gesetzt. Danach wurden die Katheter durch die Kanülen durchgezogen und die Kanülen wurde wieder entfernt. Das Durchziehen des Katheters durch die Kanüle musste vorsichtig geschehen, um etwaige Beschädigungen der Membran der Mikrodialyse-Katheter zu vermeiden.

Zur Zugentlastung wurden die Katheterein- und Katheterausgänge mit einem schmalen Streifen Klebepflaster (3M™ Durapore™, 3M, Österreich) fixiert.

Die CMA-Katheter und die 2 kDa MD-Katheter wurden vor dem Setzen mit ELO-MEL gespült um die Funktionsfähigkeit zu überprüfen. Bei den 2 kDa MD-Kathetern musste nach der Spülung und bei der Verbindung mit dem Pumpschlauch darauf geachtet werden, dass keine Luftblasen durch das System gepumpt wurden. Die Luftblasen würden die Funktionsfähigkeit des Katheters erheblich beeinflussen.

In der nächsten Abbildung ist links das Setzen der Kanülen und rechts das Durchziehen eines OFM-Katheters zu sehen.

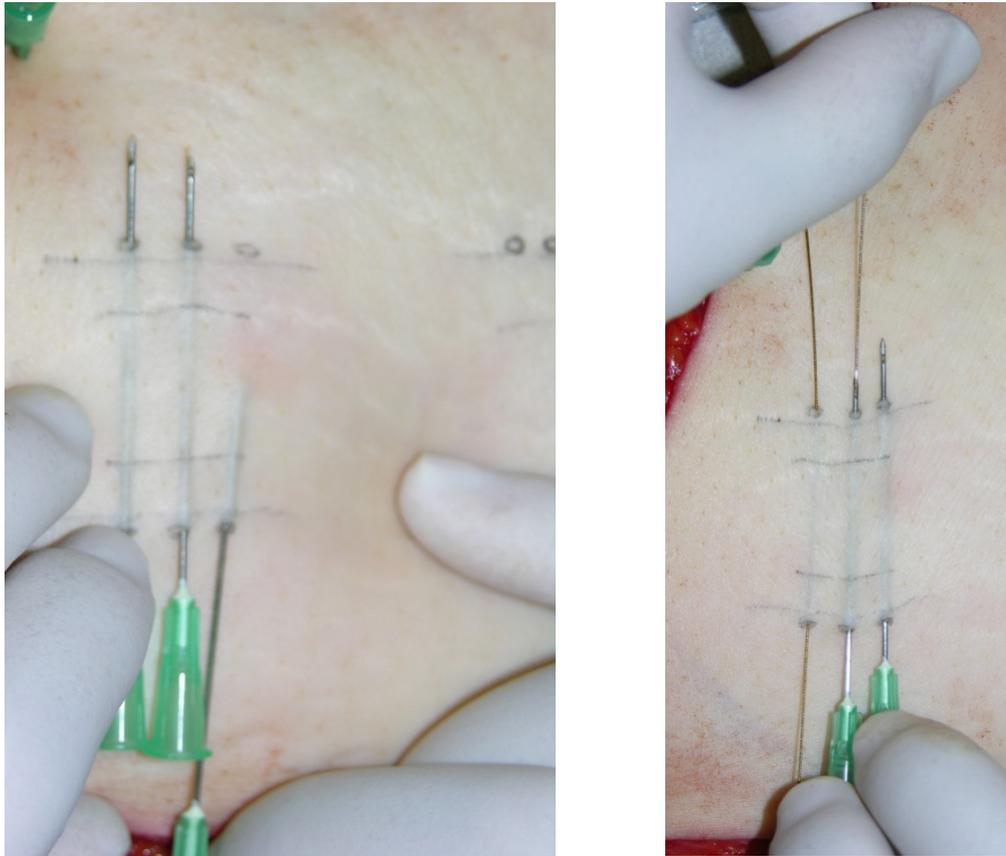


Abbildung 15: Setzen der Katheter

2.2.2.3. Vorversuche

Die Vorversuche dienten zur Optimierung des Versuchsaufbaus.

Beim ersten Vorversuch wurde ein Hautstück verwendet. Es wurden drei Applikationsflächen aufgebracht. In die Haut wurden pro Applikationsfläche je drei OFM-, drei CMA- und drei 2 kDa MD-Katheter gesetzt. Alle neuen Katheter wurden im Push-Pull Betrieb betrieben. Die Katheterausgänge wurden mit einem Kapillarsystem verbunden, um die Probenflüssigkeit in Kapillaren zu sammeln.

In folgender Abbildung ist der Aufbau zu sehen.

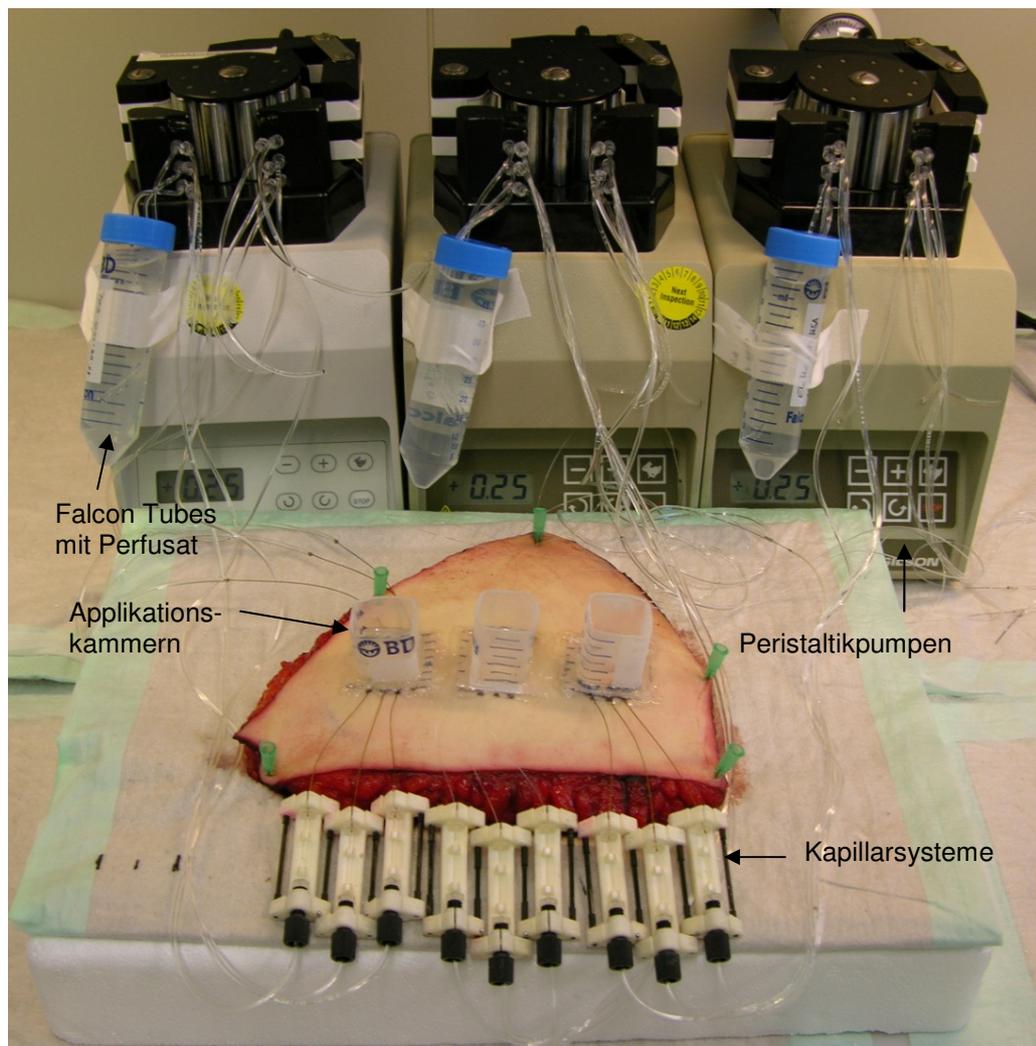


Abbildung 16: Aufbau des ersten Vorversuchs

In dieser Abbildung sind Falcon Tubes zu sehen, die an der Peristaltikpumpe befestigt wurden. In diesen befand sich das Perfusat, das in das Gewebe gepumpt wurde.

Auf die Applikationsfläche wurde flüssiges Fentanyl aufgebracht. Da das Fentanyl in flüssiger Form vorlag, wurden Applikationskammern verwendet, die mit Cyanacrylat Kleber (Loctite, Dänemark) auf die Haut aufgeklebt wurden.

Die Applikationskammern waren quadratisch und hatten eine Größe von 2 x 2 cm. Diese wurden selbst gefertigt. Dabei wurden runde Falcon Tubes (BD Bioscience, Österreich) verwendet. Diese wurden abgeschnitten und mit Hilfe eines Heißluftföhns wurden die Kanten geformt. Zum leichteren Aufkleben auf die Haut wurde ein Kleberand auf die Unterseite der Kammern aufgeklebt.

Die Applikationskammern wurden mit Parafilm zugedeckt, um eine Verdunstung der Applikationsflüssigkeit zu verhindern (Abbildung 17).

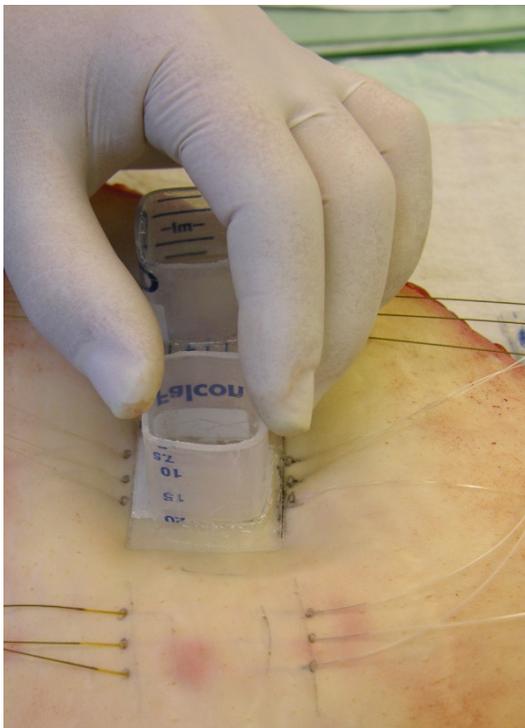


Abbildung 17: Im linken Bild ist das Aufkleben der Applikationskammern zu sehen und im rechten Bild die zugedeckten Applikationskammern im Betrieb

Auf die drei Applikationsflächen wurde in die Applikationskammern 25 µg/ml Fentanyl (Janssen Cilag, Österreich) in 50% EtOH appliziert.

Die Applikationsflächen, das Samplingintervall und die Applikationszeit des ersten Vorversuchs sind in Abbildung 18 zu sehen.

Vorversuch 1

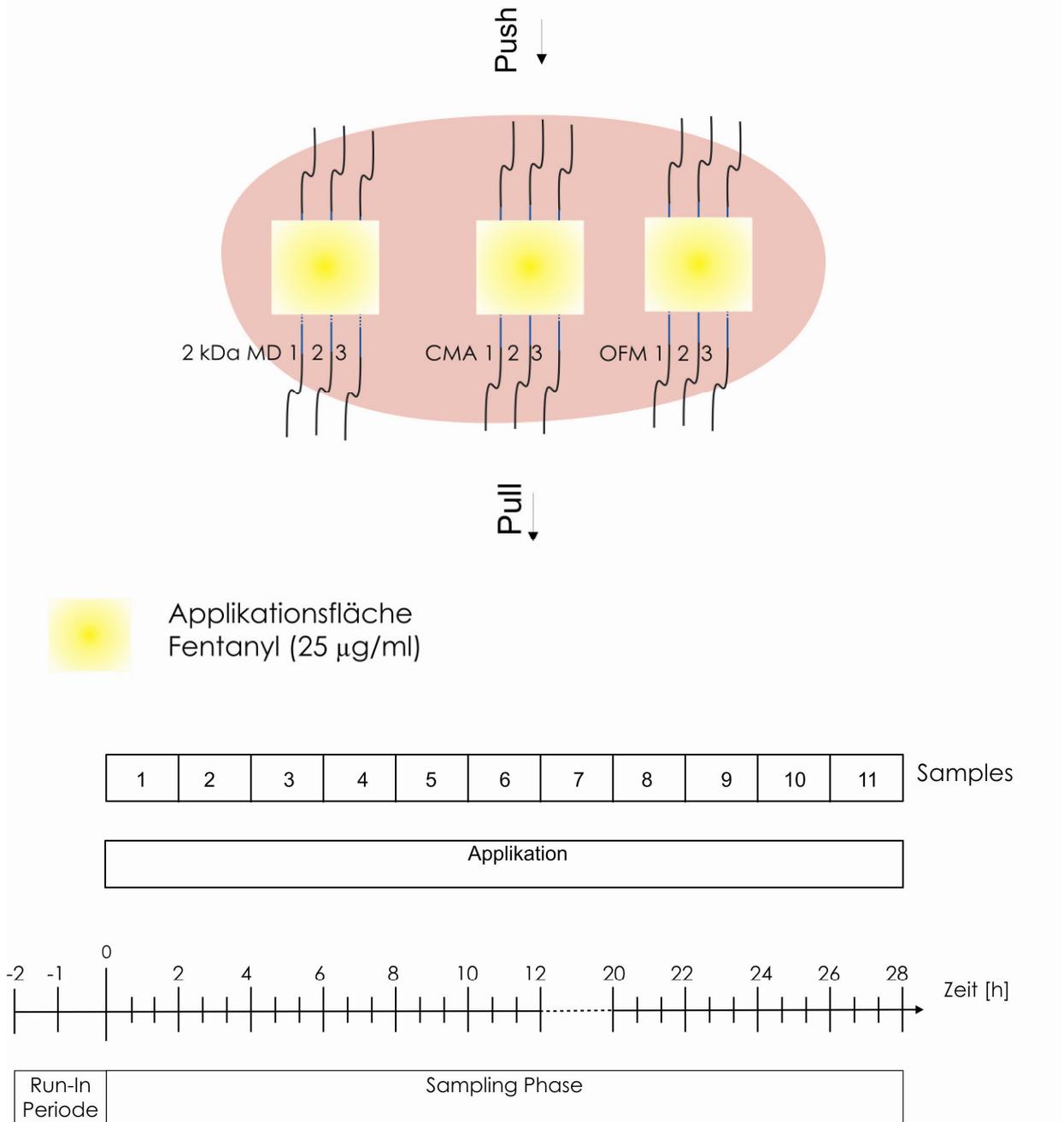


Abbildung 18: Zeitlicher Ablauf ersten Vorversuchs

In Abbildung 18 ist zu sehen, dass die Applikationszeit 28 Stunden betrug und 11 Proben pro Katheter gesammelt wurden.

Das Samplingintervall der Proben betrug zwei Stunden, außer in der Nacht. Zwischen 24 Uhr und 8 Uhr früh betrug das Samplingintervall 8 Stunden. In der Nacht wurde die Probenflüssigkeit von allen Kathetern nicht in den Kapillaren sondern in Vials gesammelt. Dazu wurde der Zweig der Kapillaren kurzgeschlossen, die Probenflüssigkeit durch den Schlauch am Ausgang des Katheters gepumpt und am Ende des Schlauchs in Vials aufgefangen.

Da die verwendeten Kapillaren ein Fassungsvermögen von 50 µl hatten, wurden die Kapillaren während des zwei stündigen Samplingintervalls dreimal gewechselt und die gesammelte Probenflüssigkeit in ein Vial zusammen gepoolt. Die Proben wurden bis zur Analyse bei -80°C eingefroren. Bei allen gesammelten Samples wurde die Fentanylkonzentration analysiert.

Um die Flussrate zu überprüfen, wurden die leeren und die vollen Vials abgewogen (siehe Formel 1 in Abschnitt 2.3). Die Differenz dieser Gewichte ergibt die Menge der gesammelten Probenflüssigkeit.

Beim zweiten Vorversuch wurden zwei Hautstücke verwendet. Pro Hautstück wurden 2 Applikationsflächen aufgebracht.

Im ersten Hautstück wurden pro Applikationsfläche drei CMA- und drei 2 kDa MD-Katheter gesetzt. Die Katheter wurden im Push-Betrieb betrieben. Die Probenflüssigkeit wurde in Vials gesammelt.

Im zweiten Hautstück wurden 3 OFM-Katheter pro Applikationsflächen gesetzt. Die OFM-Katheter wurden im Push-Pull Betrieb betrieben. Zum Sammeln der Probenflüssigkeit wurden Kapillaren verwendet.

Der Versuchsaufbau ist in Abbildung 19 zu sehen.

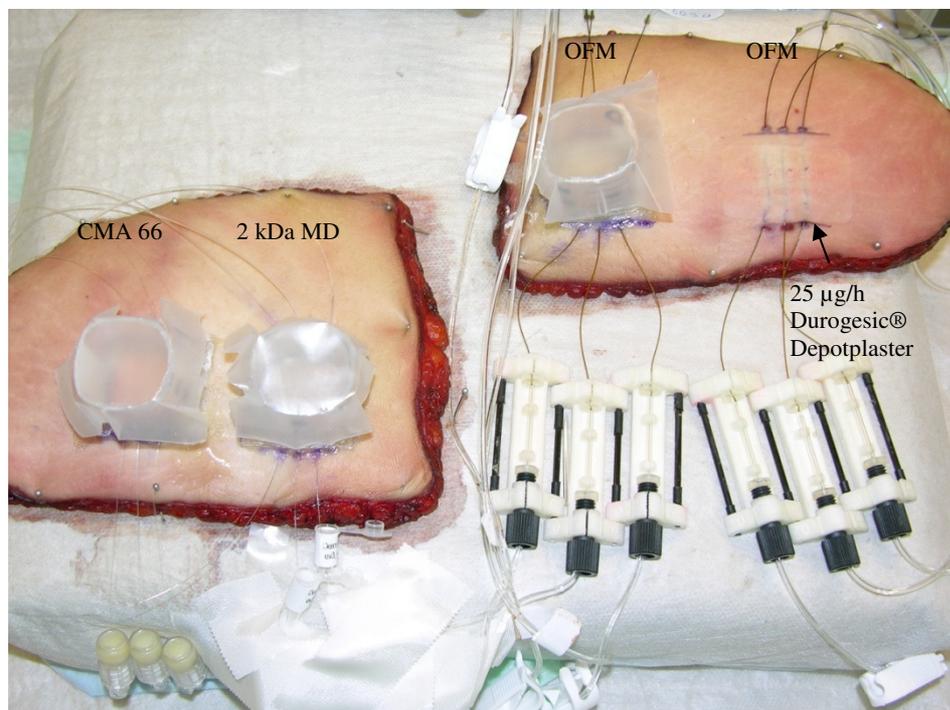


Abbildung 19: Aufbau des zweiten Vorversuchs

Die Applikationsflächen, das Samplingintervall und die Applikationszeit des zweiten Vorversuchs sind in Abbildung 20 zu sehen.

Am ersten Hautstück wurde in die zwei Applikationskammern 40 µg/ml Fentanyl in 20% EtOH appliziert. Am zweiten Hautstück wurde in die dritte Applikationskammer 50 µg/ml Fentanyl in H₂O appliziert und auf die vierte Applikationsfläche wurde ein 25 µg/h Durogesic® Depotplaster (Janssen-Cilag, Dänemark) geklebt.

Vorversuch 2

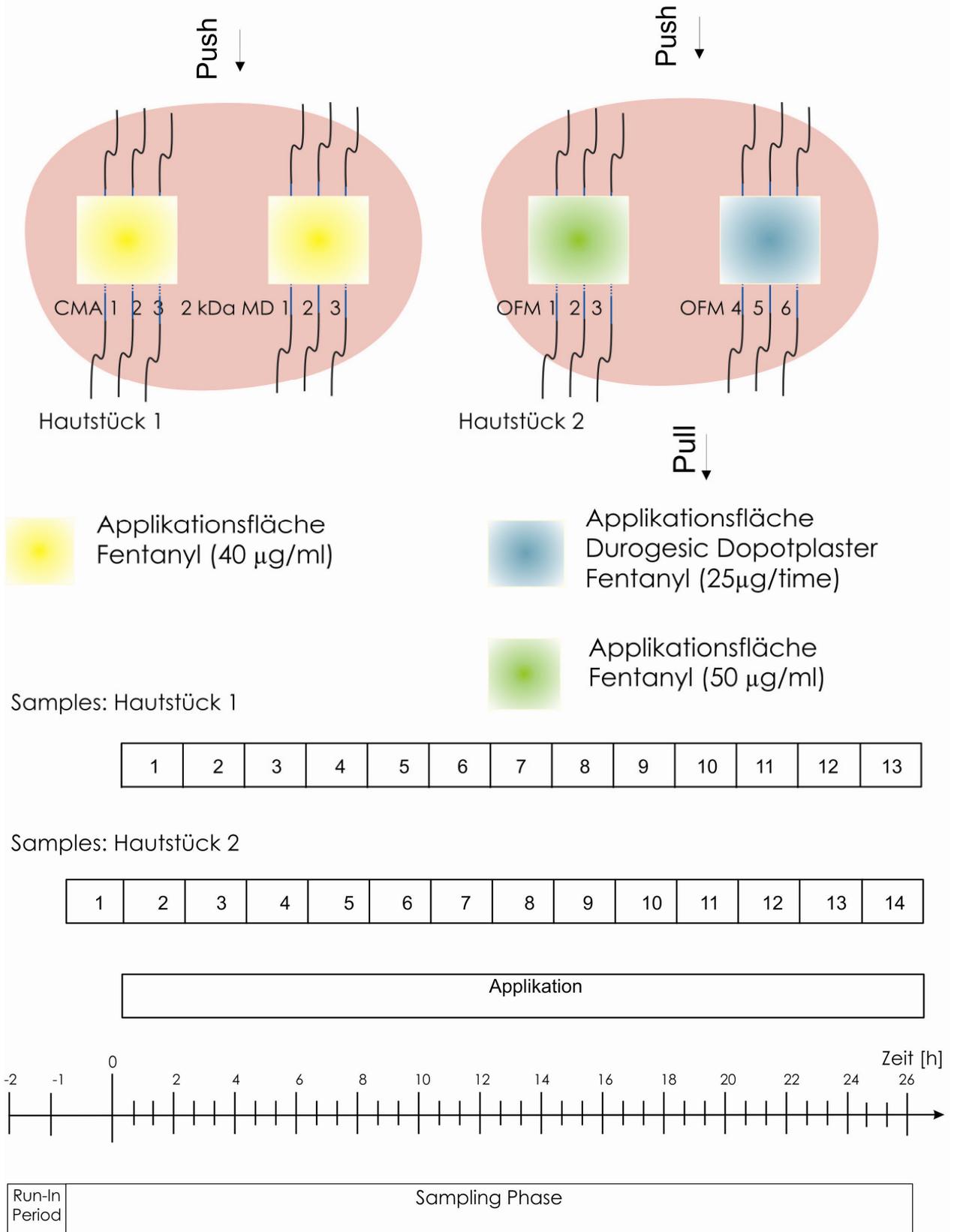


Abbildung 20: Zeitlicher Ablauf des zweiten Vorversuchs

Die Applikationszeit betrug 26 Stunden und es wurden 13 Proben bei Hautstück 1 und 14 Proben bei Hautstück 2 gesammelt. Bei Hautstück 2 wurde eine Probe mehr gesammelt, da bei den OFM-Kathetern ein Baseline Sample durchgeführt wurde. Über den gesamten Applikationszeitraum hinweg wurden die Proben im zwei Stunden Takt gesammelt.

Die Kapillaren des OFM-Katheters wurden dreimal in zwei Stunden gewechselt und die Probenflüssigkeit in ein Vial zusammen gepoolt. Die Probenflüssigkeit der CMA- und der 2 kDa MD-Katheter wurde direkt in einem Vial im zwei Stunden Intervall gesammelt.

Um die Flussrate zu überprüfen wurden die leeren und die vollen Vials gewogen und danach bis zur Analyse bei -80°C eingefroren. Bei allen gesammelten Samples wurde die Fentanylkonzentration analysiert.

2.2.2.4. Hauptversuche

Insgesamt wurden neun Hauptversuche durchgeführt. Pro Versuche wurden zwei Hautstücke vom gleichen Spender verwendet. Pro Hautstück wurden unter die drei Applikationsflächen jeweils drei OFM-, drei CMA- und drei 2 kDa MD-Katheter gesetzt.

Die Probenflüssigkeit wurden bei den CMA- und den 2 kDa MD-Kathetern in Vials gesammelt. Bei den OFM-Kathetern wurden Kapillaren verwendet.

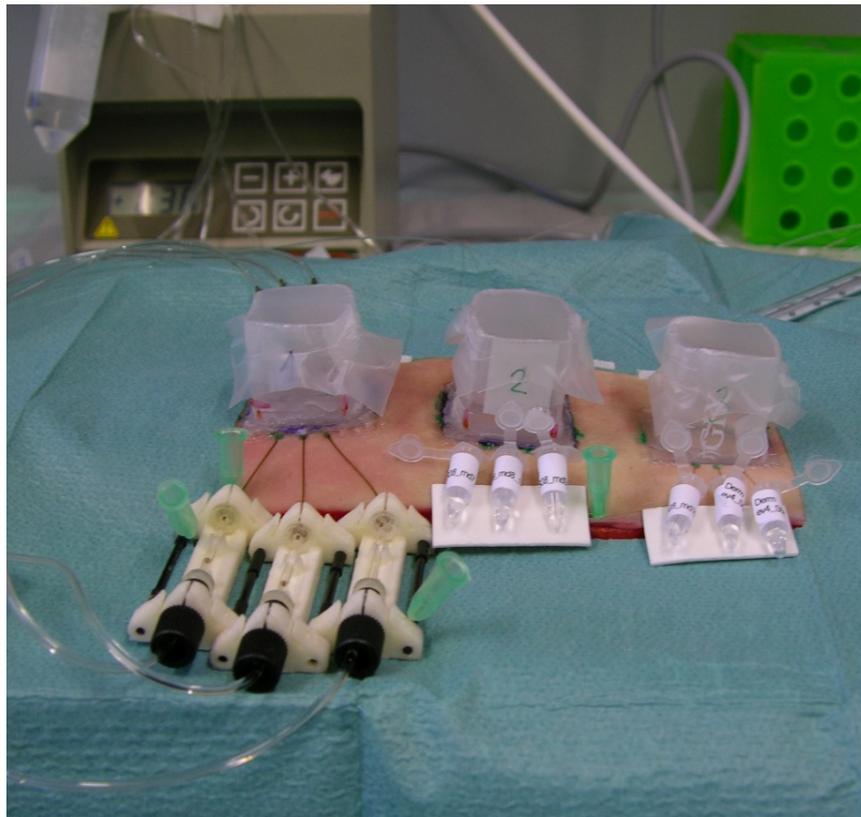


Abbildung 21: Aufbau des Hauptversuches – ein Hautstück mit 6 Kathetern

Es wurde versucht die Temperatur zwischen 25 und 28°C konstant zu halten. Dazu wurden mobile OP Leuchten verwendet. Mittels eines Thermometers, das unter den Hautstücken positioniert war, wurde die Temperatur kontrolliert. Durch Ein- und Ausschalten der Leuchten wurde die Temperatur reguliert. Die Versuche wurden an einem Ort durchgeführt, wo die Haut vor direkter Sonneneinstrahlung geschützt war.

Die Applikationsflächen, das Samplingintervall und die Applikationszeit des Hauptversuchs sind in Abbildung 22 zu sehen.

Hauptversuch

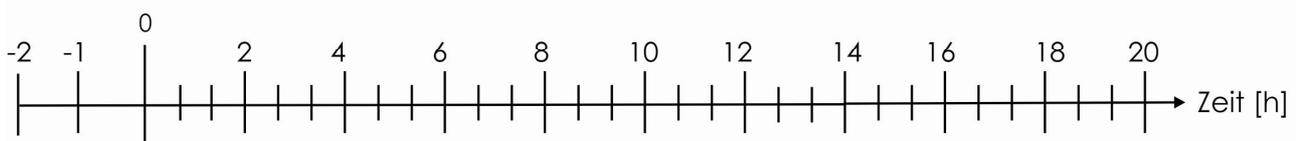
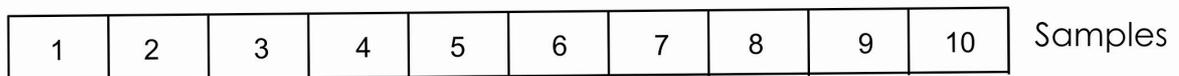
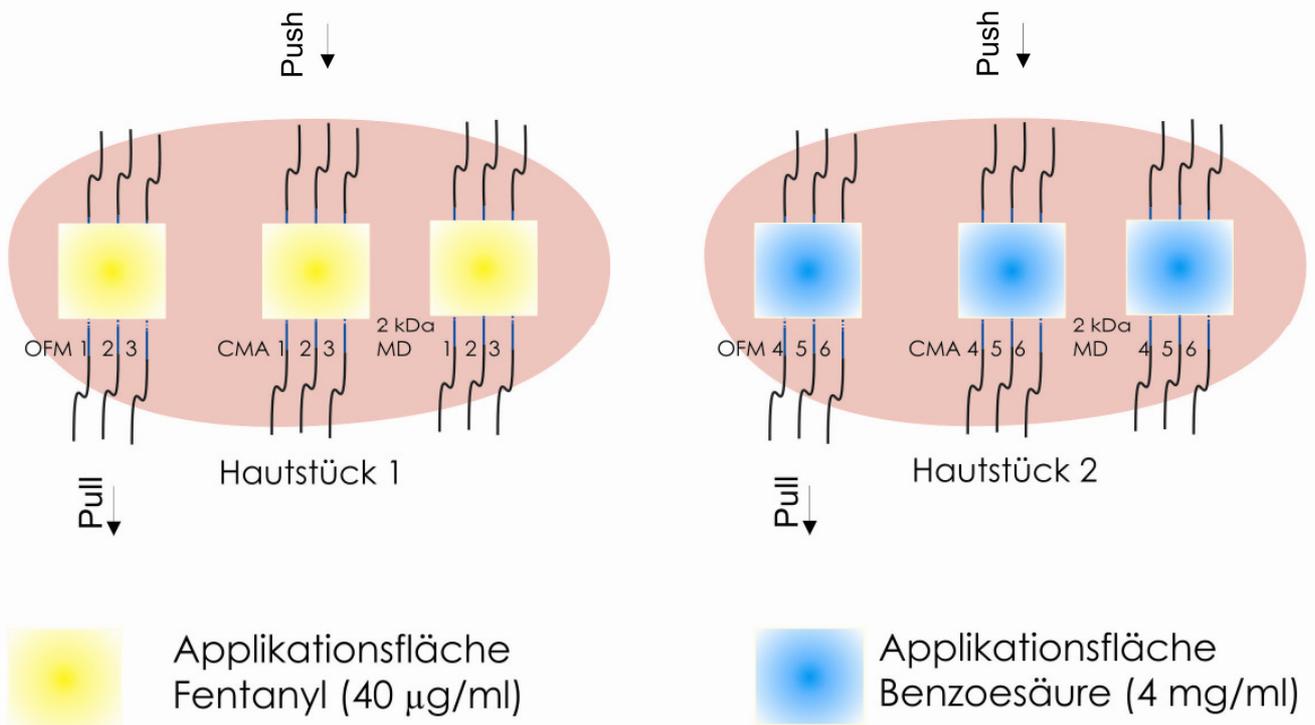


Abbildung 22: Zeitlicher Ablauf der Hauptversuche

Auf die ersten drei Applikationsflächen wurden 40 µg/ml gelöstes Fentanyl in 20% EtOH in die Applikationskammern appliziert.

Im zweiten Hautstück wurden auf die drei Applikationsflächen 4 mg/ml Benzoessäure in H₂O aufgetragen.

Die Applikationszeit der 9 Hauptversuche betrug 20 Stunden und es wurden 10 Proben pro Hautstück gesampelt. Das Samplingintervall betrug 2 Stunden.

Die Kapillaren der OFM-Katheter wurden dreimal in zwei Stunden gewechselt und die Probenflüssigkeit in ein Vial zusammen gepoolt.

Um die Flussrate zu überprüfen, wurden die leeren und die vollen Vials gewogen und danach bis zur Analyse bei -80 °C eingefroren.

Nach Beendigung eines Versuches wurde die Flussraten aller Katheter über den gesamten Versuchszeitraum überprüft. Pro Applikationsfläche wurden die zwei Katheter mit dem konstantesten Probenfluss ausgewählt. Bei diesen zwei wurde aus der gesammelten Probenflüssigkeit die Konzentration von Fentanyl bzw. von Benzoesäure ermittelt.

2.3. Peristaltikpumpen

Als Pumpen wurde die Minipuls[®] 3 (Gilson, Frankreich) verwendet.

Diese Peristaltikpumpe besteht aus einem Rotor mit Rollen. Die Schläuche werden mit einem Gleitschuh gegen diese Rollen gepresst (Abbildung 23).

Die verwendeten Schläuche wurden selbst hergestellt. Dabei wurden Tygon-Schläuche (IL-3603, Cole Parmer, USA) mit einem ID von 0,19 mm und einem OD 2,03 mm verwendet. Diese wurden auf eine Länge von 80 cm zu geschnitten. Zwei Stoppringe wurden auf den Schlauch aufgeklebt. Durch diese wurde der Schlauch in den Pumpkopf eingehackt.

Durch die Drehung des Rotors kommt es zur mechanischen Verformung des Schlauches. Dadurch wird die Flüssigkeit durch den Schlauch gepresst. Die Schläuche müssen aus elastischem Material bestehen, damit eine elastische Verformung möglich ist.

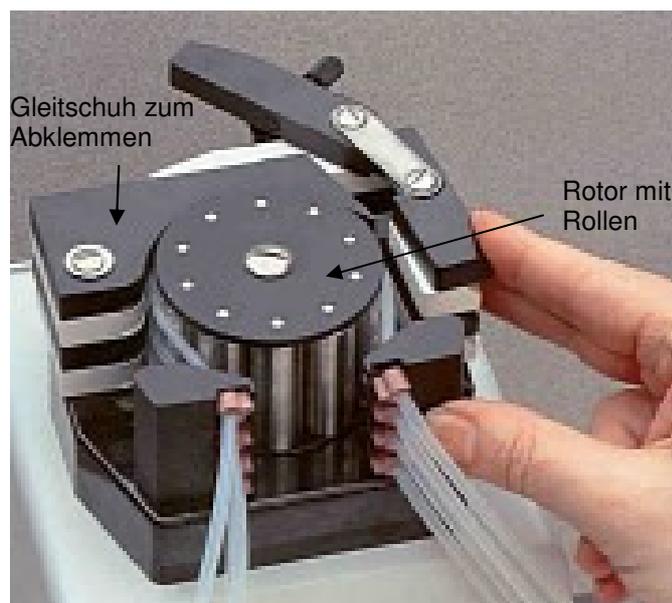


Abbildung 23: Minipuls[®] 3 Peristaltikpumpe [15]

Der Nachteil der Peristaltikpumpen ist, dass es durch die mechanische Verformung des Schlauches zur Abnützung kommt. Daher wurde vor den Versuchen eine Flussmessung durchgeführt. [15]

Bei der Flussmessung wurde Perfusat durch den Pumpschlauch über einen bestimmten Zeitraum t_s gepumpt und am Ende in einem Vial gesammelt. Es wurden die leeren und die vollen Vials gewogen und aus dieser Differenz wurde die Flowrate bestimmt.

$$Flowrate = \frac{Volumen(1) - Volumen(0)}{t_S} \left[\frac{\mu l}{min} \right] \quad (1)$$

Nach längerer Verwendung der Pumpschläuche wurden diese durch neue Schläuche ersetzt.

2.4. Perfusat

Als Perfusat wurde für die Versuche mit Fentanyl ELO-MEL mit 1 % Humanen Serum Albumin (HSA) (Octapharma, Österreich) und für die Versuche mit Benzoesäure reines ELO-MEL verwendet.

ELO-MEL ist eine Vollelektrolyt Lösung und wird intravenös bei Dehydrierung und bei Flüssigkeitsverlust verabreicht [16].

HSA ist ein menschliches Protein, das im Blut vorkommt. Es wird als Blutersatzmittel verwendet.

Da Luftblasen die Funktionsfähigkeit der Katheter beeinflusst, dürfen im Perfusat keine Luftblasen vorhanden sein. Um die Luftblasen aus dem Perfusat zu entfernen wurde das Perfusat in einem Ultraschalbad für 10 Minuten entgast.

2.5. Analytik

Zur Analyse der Probenflüssigkeit waren 90 µl nötig. Dabei wurde zur Analyse von Fentanyl eine HPLC (Ultimate 3000, Dionex, USA) zur Auftrennung der in der Probenflüssigkeit enthaltenen Substanzen und ein Massenspektrometer (TSQ Quantum Ultra AM, Thermo Finnigan, Schweiz) zur Konzentrationsbestimmung verwendet.

Zur Analyse der Benzoesäure wurde ein LaChrom High Performance Liquid Chromatography System (Merck Hitachi, Darmstadt, Deutschland) verwendet.

Im Zusammenhang mit den Analyseergebnissen wird das Limit of Quantification angegeben. Das Limit of Quantification ist die Quantifizierungsgrenze oder Bestimmungsgrenze. Im Bereich zwischen diesen Grenzen kann die Konzentration mit einer bestimmten Präzision und mit einer bestimmten Richtigkeit detektiert werden.

Die obere Bestimmungsgrenze wird als Upper Limit of Quantification (ULOQ) und die untere Bestimmungsgrenze als Lower Limit of Quantification (LLOQ) bezeichnet.

Neben dem LOQ gibt es noch die Nachweisgrenze oder das Limit of Detection (LOD). Das ist die Grenze, über der der zu untersuchende Analyt gerade noch messbar ist. Daher weiß man, dass der zu untersuchende Analyt im Probenvolumen vorhanden ist, aber eine genauere Aussage über dessen Konzentration kann nicht gemacht werden. In der folgenden Abbildung ist der Zusammenhang zwischen LOQ und LOD ersichtlich.

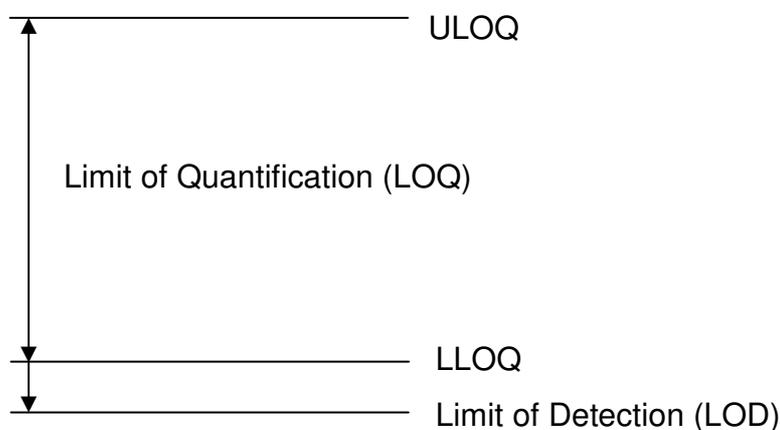


Abbildung 24: Limit of Quantification und Limit of Detection

Die Präzision gibt Auskunft über die Reproduzierbarkeit eines Messverfahrens. Dabei werden wiederholte Messungen bei gleichen Bedingungen durchgeführt. Die Präzision beschreibt das Ausmaß der Übereinstimmung der einzelnen Messungen. Dabei werden zufällige Messfehler erfasst. Die quantitative Erfassung der Präzision erfolgt mittels des Variationskoeffizienten (CV). Es werden zwischen zwei Präzisionen unterschieden. Der Intra-Präzision und der Inter-Präzision. Bei der Intra-Präzision wird die Präzision innerhalb einer einzigen analytischen Messreihe und bei der Inter-Präzision wird die Präzision bei verschiedenen Messreihen ermittelt. Dabei wird der Variationskoeffizient ermittelt der die 15 % Grenze nicht überschreiten darf (Ausnahme LLOQ: 20 %).

Unter Richtigkeit versteht man wie weit der gemessene Wert mit dem wahren Wert übereinstimmt. Dabei werden wiederholte Messungen von Samples mit bestimmter Menge des Analyten durchgeführt. Die Abweichung der gemessenen Konzentration soll nicht mehr als 15 % vom wahren Wert abweichen.

Bei der Methodenspezifikation wird auch die Linearität des Messbereichs festgestellt. Dabei wird das Bestimmtheitsmaß R^2 bestimmt. Dieses Maß gibt Auskunft über die Qualität der Linearität einer Messreihe. Wenn R^2 den Wert 1 hat, ist ein perfekter linearer Zusammenhang gegeben. Bei 0 gibt es keinen linearen Zusammenhang. [17][18]

Das LLOQ lag bei Fentanyl bei 0,1 ng/ml und das ULOQ bei 20 ng/ml.

Bei der Benzoesäure lag er LLOQ 5 ng/ml und das ULOQ bei 1000 ng/ml.

2.6. Statistische Methoden

2.6.1. Grafische Darstellung

Zur grafischen Darstellung der Daten wird ein Liniendiagramm verwendet. Dabei wird der Konzentrationsverlauf über die Zeit dargestellt.

2.6.2. Lagemaß und Streuungsmaß

Als statistische Kenngröße wird als Lagemaß der Mittelwert angewandt. Der Mittelwert wird wie folgt definiert:

$$\bar{x} = \frac{\sum_{i=1}^n x_i}{n} \quad (2)$$

\bar{x} Mittelwert
 x_i i -te Messwert mit $i = 1, 2, \dots, n$
 n Anzahl der Messwerte

Als Streuungsmaß wurde die Standardabweichung ausgewählt. Dies ist eine Kenngröße zur Beurteilung der Streuung um den Mittelwert. Dieser ist wie folgt definiert:

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{(n-1)}} \quad (3)$$

s Standardabweichung

Da die Standardabweichung ein absolutes Streuungsmaß ist wurde der Varianzkoeffizient (CV) berechnet. Dieser ermöglicht eine relative Darstellung der Streuung.

$$v = \frac{s}{\bar{x}} \quad (4)$$

v Variationskoeffizient

Der Mittelwert, die Standardabweichung und der Variationskoeffizient wurden mit den Microsoft Excel 2007 *Mittelwert* und *Stabw* berechnet.

2.6.3. Vergleich der Konzentrationen

Um die Konzentration in den gesammelten Probenflüssigkeiten der drei Katheter vergleichen zu können, wurden die Konzentrationen pro Katheter pro Testsubstanz über den gesamten Versuchszeitraum aufsummiert. Es wurde der Mittelwert, die Standardabweichung und der CV pro Stunde berechnet.

2.7. Lag time

Von der Applikation des Wirkstoffes bis zur Penetration durch die Haut vergeht einige Zeit, die als Lag time oder Verzögerungszeit bezeichnet wird. Um die Lag time zu ermitteln, wurde die Zeit bis zur ersten Detektion des Analyten ermittelt.

Die Lag time wurde für die Hauptversuche ermittelt.

2.8. Sampling-Effizienz

Zur Ermittlung der Sampling-Effizienz wurden in-vitro Versuche durchgeführt. Die Ergebnisse wurden mittels eines Diagrammes dargestellt.

Um einen Vergleich bei verschiedenen Konzentrationen zu erhalten, wurde die Sampling-Effizienz wie folgt ermittelt. Dabei wird das Verhältnis zwischen der Konzentration im Sample C_{Sample} und der tatsächlichen Konzentration in der Testlösung $C_{\text{Testlösung}}$ gebildet.

$$\text{Sampling - Effizienz} = \frac{[C_{\text{Sample}}]}{[C_{\text{Testlösung}}]} [\%] \quad (5)$$

Bei einem Wert von 100% kann mit dem Katheter die tatsächliche Konzentration in der Testlösung gesampelt werden.

3. Ergebnisse

3.1. In-vitro Versuche

Die Ergebnisse für die Sampling-Effizienz bei Fentanyl für 4 verschiedene Konzentrationen zeigen die Abbildungen 25 bis 28 und die dazugehörigen Standardabweichungen sind in den Tabellen 3 bis 6 zu sehen.

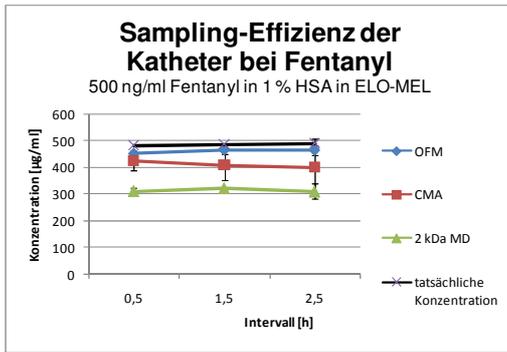


Abbildung 25: Sampling-Effizienz der Katheter bei Fentanyl mit einer Konzentration von 500 ng/ml

Tabelle 3: Standardabweichung für eine Konzentration von 500 ng/ml

Zeit [h]	Standardabweichung [ng/ml]		
	OFM	CMA	2 kDa MD
0,5	9,25	35,84	13,36
1,5	12,11	57,75	2,06
2,5	17,36	106,58	29,03

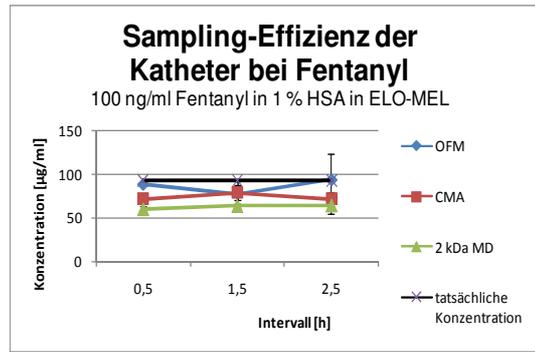


Abbildung 26: Sampling-Effizienz der Katheter bei Fentanyl mit einer Konzentration von 100 ng/ml

Tabelle 4: Standardabweichung für eine Konzentration von 100 ng/ml

Zeit [h]	Standardabweichung [ng/ml]		
	OFM	CMA	2 kDa MD
0,5	0,53	5,53	3,67
1,5	14,66	8,11	3,31
2,5	30,24	7,65	9,55

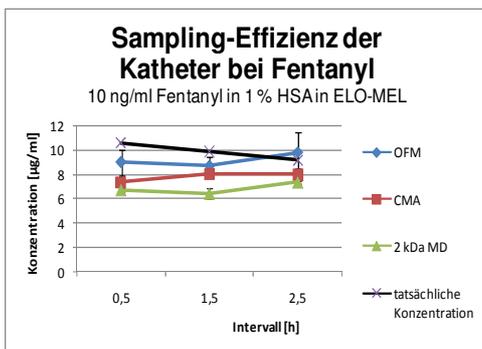


Abbildung 27: Sampling-Effizienz der Katheter bei Fentanyl mit einer Konzentration von 10 ng/ml

Tabelle 5: Standardabweichung für eine Konzentration von 10 ng/ml

Zeit [h]	Standardabweichung [ng/ml]		
	OFM	CMA	2 kDa MD
0,5	1,06	0,43	0,13
1,5	0,72	0,20	0,43
2,5	1,63	0,48	0,10

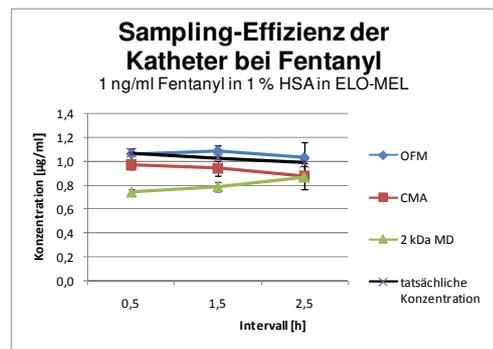


Abbildung 28: Sampling-Effizienz der Katheter bei Fentanyl mit einer Konzentration von 1 ng/ml

Tabelle 6: Standardabweichung für eine Konzentration von 1 ng/ml

Zeit [h]	Standardabweichung [µg/ml]		
	OFM	CMA	2 kDa MD
0,5	0,05	0,04	0,02
1,5	0,04	0,06	0,04
2,5	0,13	0,11	0,10

Die Ergebnisse für die Sampling-Effizienz bei Benzoesäure für 4 verschiedene Konzentrationen zeigen die Abbildungen 29 bis 32 und die dazugehörigen Standardabweichungen sind in den Tabellen 7 bis 10 zusehen.

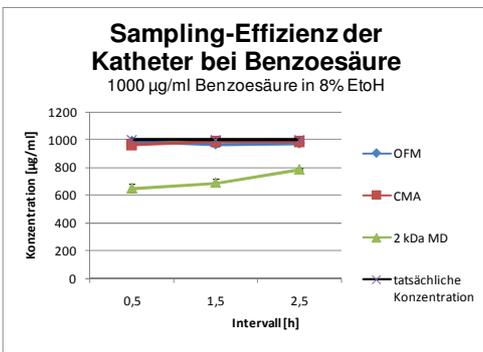


Abbildung 29: Sampling-Effizienz der Katheter bei Benzoesäure mit einer Konzentration von 1000 µg/ml

Tabelle 7: Standardabweichung für eine Konzentration von 1000 µg/ml

Zeit [h]	Standardabweichung [µg/ml]		
	OFM	CMA	2 kDa MD
0,5	22,65	8,17	28,24
1,5	11,21	2,02	27,09
2,5	6,67	4,91	10,07

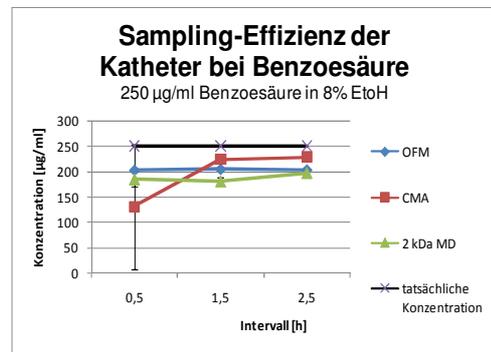


Abbildung 30: Sampling-Effizienz der Katheter bei Benzoesäure mit einer Konzentration von 250 µg/ml

Tabelle 8: Standardabweichung Konzentration von 250 µg/ml

Zeit [h]	Standardabweichung [µg/ml]		
	OFM	CMA	2 kDa MD
0,5	2,78	123,61	14,98
1,5	3,07	1,06	7,65
2,5	0,98	2,18	7,22

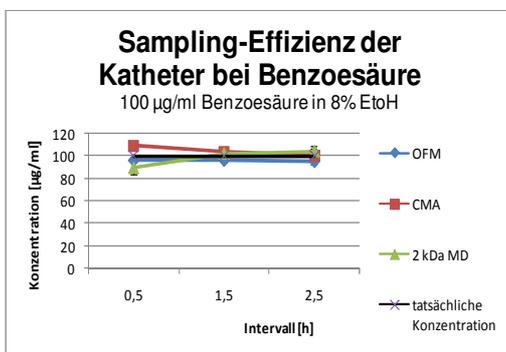


Abbildung 31: Sampling-Effizienz der Katheter bei Benzoesäure mit einer Konzentration von 100 µg/ml

Tabelle 9: Standardabweichung für eine Konzentration von 100 µg/ml

Zeit [h]	Standardabweichung [µg/ml]		
	OFM	CMA	2 kDa MD
0,5	1,04	2,87	5,64
1,5	1,31	1,79	2,31
2,5	2,79	6,04	4,32

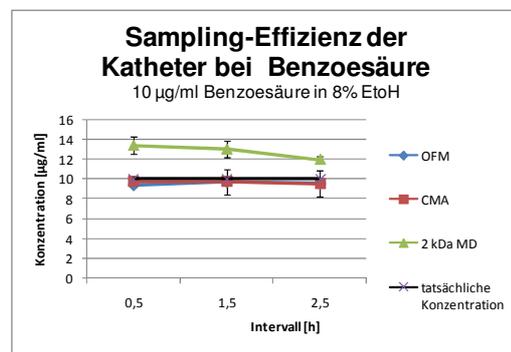


Abbildung 32: Sampling-Effizienz der Katheter bei Benzoesäure mit einer Konzentration von 10 µg/ml

Tabelle 10: Standardabweichung für eine Konzentration von 10 µg/ml

Zeit [h]	Standardabweichung [µg/ml]		
	OFM	CMA	2 kDa MD
0,5	0,16	0,20	0,87
1,5	0,05	1,29	0,86
2,5	0,10	1,32	0,33

Bei der Lösung von 250 µg/ml Benzoesäure zeigt der CMA-Katheter eine sehr hohe Standardabweichung. Dies ist auf die Probleme beim Versuchsstart zurückzuführen.

Die Ergebnisse in Tabelle 13 zeigen die Sampling-Effizienz für die in-vitro Versuche.

Tabelle 11: Verhältnis zwischen tatsächlicher Konzentration und gesampelter Konzentration bei Fentanyl und Benzooesäure

Zeit	OFM [%]	CMA [%]	2 kDa MD [%]	Zeit	OFM [%]	CMA [%]	2 kDa MD [%]
0,5	93,56	88,32	64,79	0,5	98,75	96,40	64,96
1,5	95,54	84,17	66,41	1,5	96,71	98,52	68,99
2,5	94,75	81,98	63,48	2,5	97,53	98,71	78,65
0,5	95,47	77,78	64,71	0,5	81,12	52,37	73,94
1,5	83,53	85,37	68,46	1,5	81,99	89,91	72,43
2,5	100,92	77,22	68,99	2,5	81,50	91,29	78,91
0,5	85,06	69,62	63,57	0,5	95,08	109,29	89,56
1,5	87,93	81,35	65,16	1,5	95,28	103,99	102,54
2,5	106,78	87,15	80,16	2,5	94,32	100,39	104,42
0,5	99,35	90,70	69,38	0,5	93,50	96,97	133,64
1,5	105,81	91,53	76,48	1,5	96,58	97,33	129,96
2,5	104,83	88,80	87,81	2,5	95,37	95,08	119,35
	Fentanyl [ng /ml]:		500		Benzooesäure[µg /ml]:		1000
			100				250
			10				100
			1				10

Der OFM- und der CMA-Katheter konnten bei den in-vitro Versuchen mit Benzooesäure eine bessere Übereinstimmung mit der tatsächlichen Konzentration erzielen als der 2 kDa MD-Katheter. Bei der Konzentration von 250 µg/ml lagen alle Katheter weit unter der tatsächlichen Konzentration.

Einige Ergebnisse in Tabelle 11 zeigen eine Sampling-Effizienz über 100%. Dies ist in der Praxis nicht möglich. Diese Werte sind durch Messfehler bei der Analyse entstanden. Diese Messfehler liegen aber innerhalb der tolerierbaren Grenzen (15 % bzw. 20 % Abweichung, siehe 2.5).

3.2. Vorversuch 1

Den Mittelwert für den Konzentrationsverlauf von Fentanyl bei einer Applikation von 25 µg/ml im betrachteten Zeitraum von 28 Stunden für jeweils drei OFM-, CMA- und 2 kDa MD-Katheter zeigt Abbildung 33.

Die Ergebnisse für die Standardabweichung und den Variationskoeffizienten zeigt Tabelle 12.

Es gibt keine Messergebnisse zwischen Stunde 12 und 20. In diesem Zeitraum wurde die Probenflüssigkeit nicht zweistündig in Kapillaren gesammelt, sondern die Probenflüssigkeit wurde während der 8 Stunden durch den Pull-Schlauch gepumpt und am Ende in Vials aufgefangen.

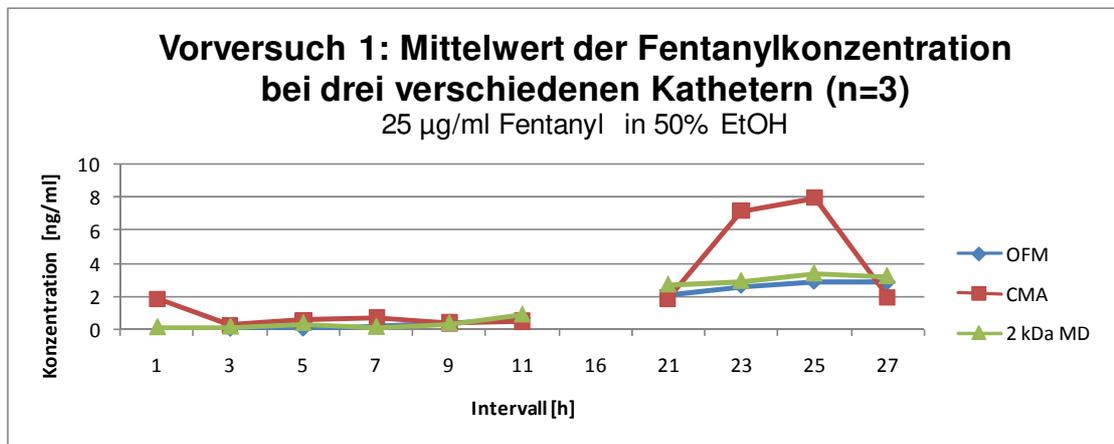


Abbildung 33: Mittelwert der Fentanylkonzentration in der Epidermis bei einer Applikation von 25 µg/ml Fentanyl über einen Zeitraum von 28 Stunden

Tabelle 12: Standardabweichung und Variationskoeffizient des ersten Vorversuchs

Stunde	Standardabweichung [ng/ml]			CV [%]		
	OFM	CMA	2 kDa MD	OFM	CMA	2 kDa MD
1						
3		0,14	0,17		57,49	108,56
5	0,03	0,48	0,40	50,00	97,61	109,26
7	0,07	0,91	0,02	37,41	132,65	15,98
9	0,13	0,19	0,23	30,82	49,69	63,59
11	0,16	0,17		24,52	35,85	
16						
21	0,60	0,87	1,89	27,93	46,70	69,86
23	0,60	8,46	1,03	22,60	118,28	35,12
25	0,60	9,75	1,05	20,54	122,46	31,23
27	0,60	0,23	2,65	21,01	11,91	82,20

Beim 2 kDa MD-Katheter konnte in Stunde elf nur bei einem Katheter die Konzentration der Probe analysiert werden. Daher sind keine Standardabweichung und kein Variationskoeffizient in der Tabelle eingetragen.

3.3. Vorversuch 2

Den Mittelwert für den Konzentrationsverlauf von flüssigem Fentanyl im betrachteten Zeitraum von 26 Stunden für jeweils drei OFM-, CMA- und 2 kDa MD-Katheter zeigt Abbildung 34 und die Ergebnisse für den Konzentrationsverlauf bei der Applikation eines 25 µg/h Durogesic® Depotplasters zeigt Abbildung 35.

Die Ergebnisse für die Standardabweichung und den Variationskoeffizient für die Applikation von flüssigen Fentanyl zeigt Tabelle 13.

Bei drei CMA- und drei 2 kDa MD-Kathetern wurde Fentanyl in einer Konzentration von 40 µg/ml in 20% EtOH und bei drei OFM-Kathetern wurde 50 µg/ml Fentanyl in H₂O appliziert.

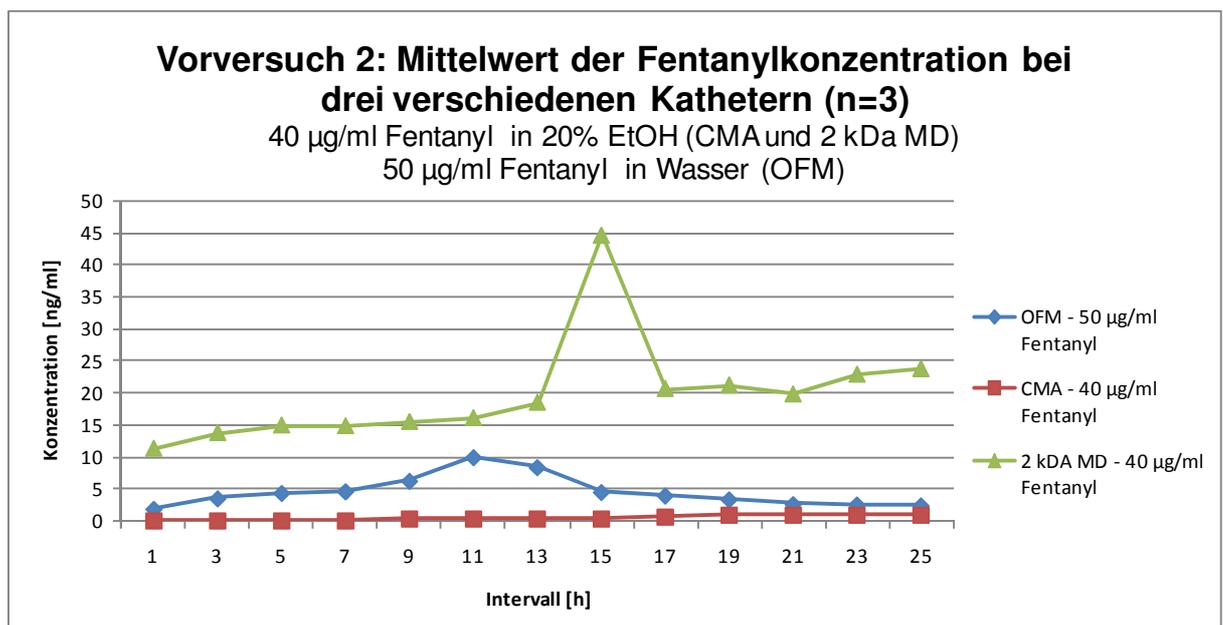


Abbildung 34: Mittelwert der Fentanylkonzentration in der Epidermis bei einer Applikation von 40 µg/ml bzw. 50 µg/ml über einen Versuchszeitraum von 25 Stunden

Tabelle 13: Standardabweichung und Variationskoeffizient des zweiten Vorversuchs

Stunde	Standardabweichung [ng/ml]			CV [%]		
	OFM	CMA	2 kDa MD	OFM	CMA	2 kDa MD
1	2,85		13,36			
3	5,25		16,26	281,84		144,38
5	6,24	0,08	16,83	176,69	71,99	122,68
7	5,67	0,06	15,75	130,51	71,44	105,65
9	8,07	0,22	16,43	174,20	216,39	111,14
11	13,20	0,16	15,83	211,31	73,72	102,54
13	9,67	0,11	16,32	97,37	46,70	101,70
15	3,45	0,12	1,21	41,17	52,89	6,54
17	2,15	0,16	17,00	47,86	53,81	38,17
19	1,59	0,29	16,60	40,34	53,09	80,59
21	1,22	0,35	17,10	36,27	43,01	80,86
23	0,95	0,45	20,04	35,95	50,08	101,38
25	1,10	0,50	20,61	42,93	53,79	90,28

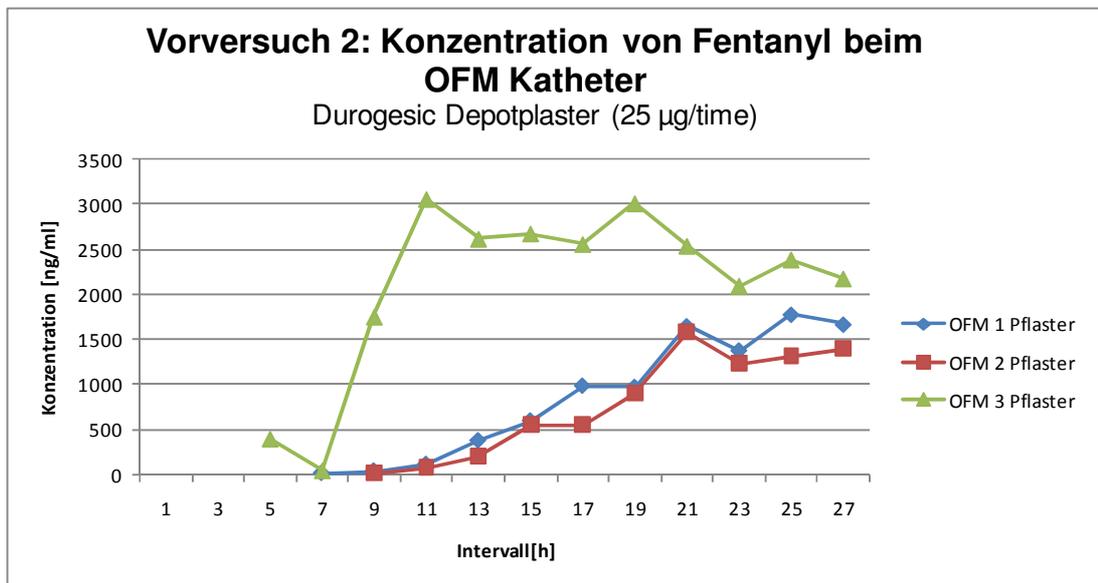


Abbildung 35: Konzentration von Fentanyl in der Epidermis bei der Applikation eines 25 µg/h Durogesic® Depotplaster während des Versuchszeitraumes von 25 Stunden

Im Vergleich zu flüssigem Fentanyl ist die Konzentration von Fentanyl in der Haut bei der Verwendung von 25 µg/h Durogesic® Depotplaster um ein 400-faches höher.

3.4. Hauptversuche

Dem Mittelwert für den Konzentrationsverlauf, bei einer Applikation von 40 µg/ml Fentanyl in 20 % EtOH, von jeweils 18 OFM-, CMA- und 2 kDa MD-Katheter zeigt Abbildung 36 und die dazugehörigen Standardabweichungen und den Variationskoeffizienten zeigt Tabelle 14.

Der Mittelwert wurde aus den Messergebnissen, die innerhalb der Quantifizierungsgrenze lagen, gebildet.

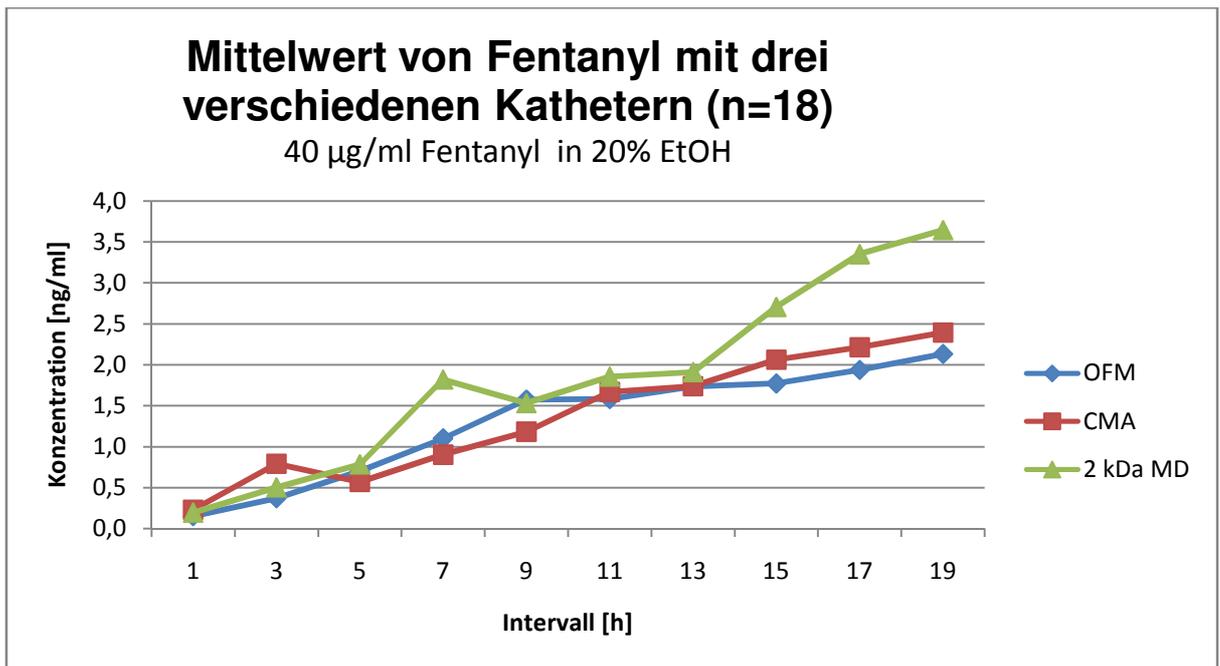


Abbildung 36: Mittelwert der Fentanylkonzentration in der Epidermis bei einer Applikation von 40 µg/ml über einen Versuchszeitraum von 20 Stunden

Tabelle 14: Standardabweichung und CV für die Hauptversuche mit Fentanyl

Stunde	Fentanyl			CV [%]		
	Standardabweichung [ng/ml]			CV [%]		
	OFM	CMA	2 kDa MD	OFM	CMA	2 kDa MD
1	0,07	0,14	0,20	44,71	59,83	103,47
3	0,32	0,88	0,56	86,59	110,59	112,07
5	0,60	0,58	0,55	85,47	102,08	69,88
7	0,88	0,82	1,38	80,32	90,82	76,00
9	1,30	0,94	1,24	82,52	79,65	80,57
11	1,16	1,34	1,50	73,00	80,22	80,83
13	1,17	1,16	1,66	67,59	66,93	86,88
15	1,12	1,30	2,23	63,10	63,21	82,41
17	1,09	1,29	2,85	56,31	58,09	84,92
19	1,16	1,43	2,96	54,61	59,71	81,27

Über den Versuchszeitraum von 20 Stunden ist ein deutlicher Anstieg der Konzentration von Fentanyl bei allen Kathetern ersichtlich. Der Variationskoeffizient ist für den 2 kDa MD-Katheter deutlich höher als für den OFM- und den CMA-Katheter.

Den Mittelwert für den Konzentrationsverlauf, bei einer Applikation von 4 mg/ml Benzoessäure in Wasser, von jeweils 18 OFM-, CMA- und 2 kDa MD-Katheter zeigt Abbildung 37 und die dazugehörigen Standardabweichungen und Variationskoeffizienten zeigt Tabelle 15.

Im Gegensatz zu Fentanyl ist bei der Benzoessäure eine Plateauphase erkennbar.

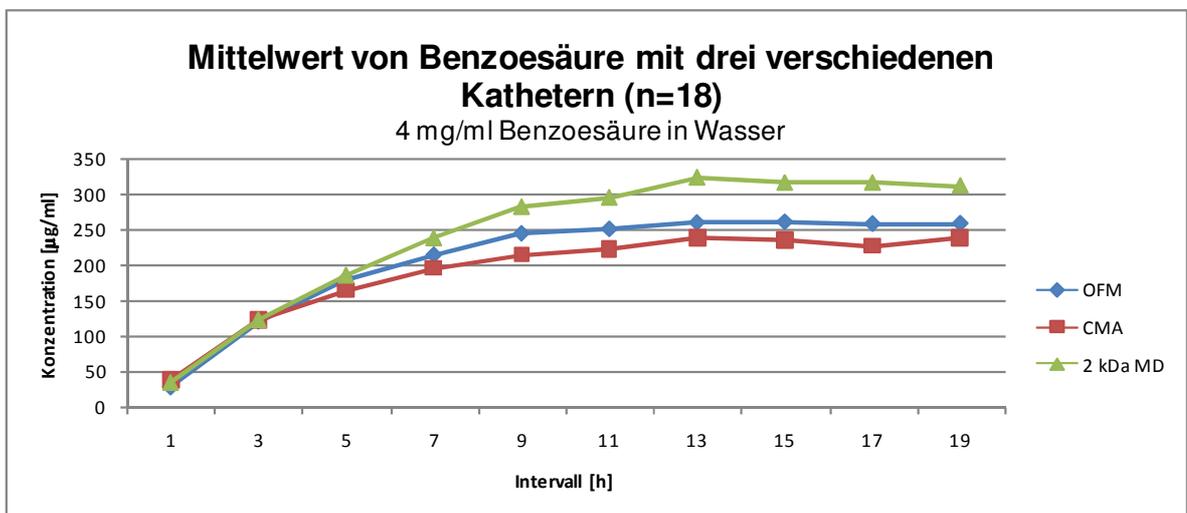


Abbildung 37: Mittelwert der Benzoessäurekonzentration in der Epidermis bei einer Applikation von 4 mg/ml über einen Versuchszeitraum von 20 Stunden

Tabelle 15: Standardabweichung und CV für die Hauptversuche mit Benzoessäure

Stunde	Benzoessäure					
	Standardabweichung [ng/ml]			CV [%]		
	OFM	CMA	2 kDa MD	OFM	CMA	2 kDa MD
1	17,61	41,84	34,36	64,91	114,96	103,62
3	48,97	90,82	100,69	40,94	74,37	82,59
5	64,61	80,52	118,62	36,03	49,20	64,19
7	72,82	92,41	155,68	34,13	47,53	65,56
9	95,40	100,94	202,62	39,18	47,24	71,96
11	84,12	100,63	196,99	33,69	45,57	66,82
13	86,60	116,11	223,88	33,47	48,85	69,27
15	76,47	104,16	198,58	29,44	44,52	62,88
17	82,01	100,92	192,80	31,88	44,53	61,05
19	79,87	104,08	188,13	31,01	43,86	60,34

3.4.1. Vergleich der Konzentrationen

Bei Fentanyl ergibt sich für den OFM- und CMA- Katheter dieselbe Konzentration pro Stunde. Mit dem 2 kDa MD-Katheter kann ein höherer Wert erreicht werden. Doch der Variationskoeffizient ist bei diesem Katheter bei Benzoesäure deutlich höher.

Die Ergebnisse für den Mittelwert, die Standardabweichung und den Variationskoeffizienten der Konzentrationen für die Hauptversuche zeigt Tabelle 16 für Fentanyl und Tabelle 17 für Benzoesäure.

Tabelle 16: Konzentrationen bei Fentanyl

<i>Fentanyl</i>	Mittelwert [ng/ml h]	Standardabweichung [ng/ml h]	CV [%]
OFM	0,69	0,36	51,51
CMA	0,69	0,39	56,98
2 kDA MD	0,98	0,53	54,50

Tabelle 17: Konzentrationen für Benzoesäure

<i>Benzoesäure</i>	Mittelwert [$\mu\text{g/ml h}$]	Standardabweichung [$\mu\text{g/ml h}$]	CV [%]
OFM	103,30	33,90	32,82
CMA	84,08	37,66	44,79
2 kDA MD	127,61	72,83	57,07

3.4.2. Lag Time

Die Ergebnisse zeigen, dass die Verzögerungszeit bei Fentanyl größer war als bei Benzoessäure.

Die Ergebnisse für die Verzögerungszeit für Fentanyl bei den Hauptversuchen zeigt Tabelle 18.

Tabelle 18: Lag time für Fentanyl

	OFM	CMA	2 kDa MD
Mittelwert [h]	3,33	4,33	3,43
Standardabweichung [h]	1,81	1,97	1,99

Bei den Versuchen mit Benzoessäure konnte die Konzentration von Benzoessäure in allen ersten Proben gemessen werden. Die Verzögerungszeit ist daher geringer als zwei Stunden.

4. Diskussion

4.1. In-vitro Versuche

Die in-vitro Versuche zeigen, dass der OFM-Katheter bei Fentanyl bessere Ergebnisse als die anderen beiden Katheter erzielt. Die schlechtere Sampling-Effizienz des CMA- und 2 kDa MD-Katheters ist auf die höhere Lipophilie von Fentanyl zurückzuführen. Der CMA- und der 2 kDa MD-Katheter besitzen eine Membran, die die Diffusion von lipophilen Substanzen einschränkt. Da die Austauschfläche des OFM-Katheters aus einem Drahtgeflecht besteht, können lipophile Substanzen leichter gesampelt werden,

Die Ergebnisse zeigen, dass der OFM-Katheter und der CMA-Katheter bei Benzoessäure eine bessere Sampling-Effizienz aufweisen als der 2 kDa MD-Katheter.

Bei den in-vitro Versuchen liefern alle Katheter bei der Lösung mit 250 µg/ml Benzoessäure einen um 50 µg/ml niedrigeren Wert. Dies weist darauf hin, dass eine niedrigere Konzentration in der Testlösung vorhanden war als die 250 µg/ml.

Die Messergebnisse der OFM-Katheter weichen bei allen Fentanylkonzentrationen bei Stunde 2,5 nicht mehr als 7% von der tatsächlichen Konzentration ab.

Für den OFM-Katheter ist bei Benzoessäure die Abweichung von der tatsächlichen Konzentration, außer bei der Konzentration mit 250 µg/ml, in Stunde 2,5 nicht größer als 5%.

Der CMA-Katheter hat eine schlechtere Sampling-Effizienz bei Fentanyl als der OFM-Katheter. Die gemessene Konzentration von Fentanyl weicht von der tatsächlichen Konzentration um 18 % in Stunde 2,5 ab.

Der CMA-Katheter liefert bei der kleinmolekularen Substanz Benzoessäure ähnliche Ergebnisse wie der OFM-Katheter, was zu erwarten war.

Der 2 kDa MD-Katheter schneidet bei diesen Versuchen deutlich schlechter ab, als die anderen beiden Katheter. Bei Fentanyl weichen die gemessenen Konzentrationen in Stunde 2,5 um bis zu 36 % und bei Benzoessäure um bis zu 22 % von den tatsächlichen Konzentrationen ab.

4.2. Vorversuche

4.2.1. Vorversuch 1

Mit den Vorversuchen konnte der Versuchsaufbau optimiert werden.

Bei diesem Versuch wurden alle Katheter im Push-Pull Betrieb betrieben. Da aber in der Praxis die CMA- und die 2 kDa MD-Katheter nur im Push-Betrieb betrieben werden, sollen die darauf folgenden Versuche auch mit diesem Setting durchgeführt werden.

Die Ergebnisse zeigen weiter, dass Probenflüssigkeit direkt am Katheterausgang gesammelt werden soll.

In der siebten Probe kann bei keinem Katheter eine Konzentration von Fentanyl nachgewiesen werden. Dies ist darauf zurückzuführen, dass während des Samplingintervalls, die Probenflüssigkeit nicht direkt am Katheterausgang gesammelt wurde. Die Probenflüssigkeit wurde über die Pumpschläuche abgesaugt und am Ende in Vials aufgefangen. Es ist daraus zu schließen, dass die verwendeten Pumpschläuche das Fentanyl adsorbieren.

Daher wurden bei den folgenden Versuchen beim OFM-Katheter die Proben nur mehr mit Hilfe der Kapillaren gesammelt.

4.2.2. Vorversuch 2

Beim zweiten Vorversuch wurden verschiedene Fentanylkonzentrationen mit und ohne EtOH und ein Fentanylpflaster verglichen.

Die Ergebnisse zeigen, dass ein Sampling von Fentanyl ohne EtOH mit dem OFM-Katheter möglich ist. Des Weiteren zeigen unveröffentlichte Daten, dass eine Messung von Fentanyl ohne die Zugabe von EtOH mit dem 2 kDa MD-Katheter nicht möglich ist. Deshalb wurde bei dem OFM-Katheter bei einer Applikationsfläche auf EtOH verzichtet und 40 µg/ml Fentanyl in H₂O aufgetragen.

Im folgenden Diagramm sind die Messergebnisse für die OFM-Katheter bei einer Applikation von 25 µg/ml Fentanyl in 50% EtOH aus dem Vorversuch 1 und bei einer Applikation von 50 µg/ml Fentanyl in H₂O aus Vorversuch 2 gegenübergestellt.

Dabei wurde der verunreinigte Katheter, von der Applikationsfläche mit 50 µg/ml Fentanyl in H₂O, aus der Darstellung weggelassen.

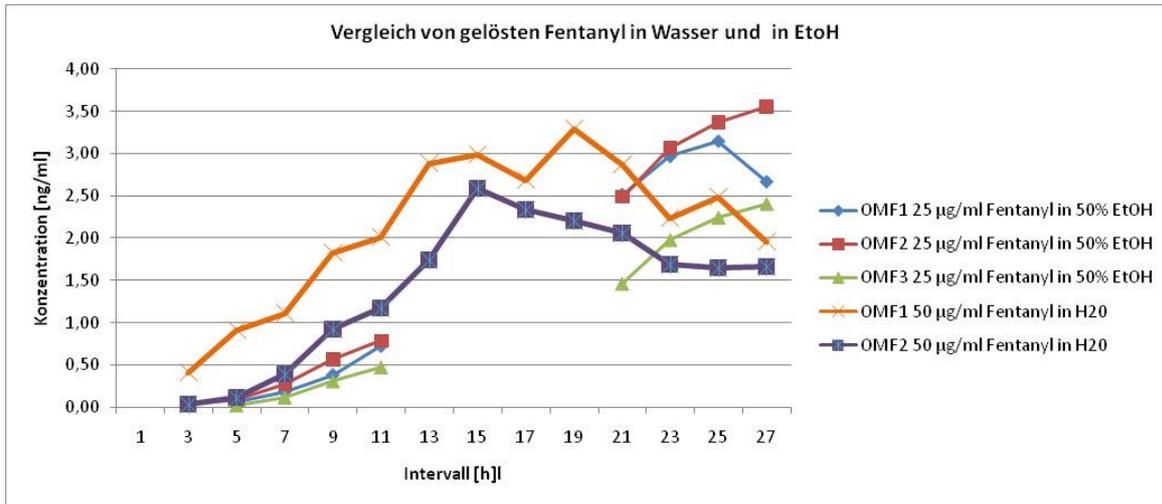


Abbildung 38: Vergleich der OFM Katheter bei einer Applikation von 50 µg/ml Fentanyl in EtOH und 40 µg/ml Fentanyl in H₂O

Die Ergebnisse zeigen auch, dass die Zugabe von EtOH in die Fentanyllösung die Penetration steigert, was auch Krill et al [19] zeigt.

Obwohl beim zweiten Vorversuch eine doppelt so hohe Konzentration von Fentanyl auf die Applikationsflächen aufgetragen wurde, sind in den Messergebnissen kaum Unterschiede zu sehen.

Daher wurde in den Hauptversuchen die Konzentration von EtOH verringert.

Bei der Applikation eines 25 µg/h Durogesic® Depotplasters ist die Messung von Fentanyl in der Probenflüssigkeit mit dem OFM-Katheter möglich, aber die Verzögerungszeit ist länger. Die Applikation des Depotplasters diente als Machbarkeitsstudie und deshalb wurde in dieser Arbeit auf weitere Versuche verzichtet.

Im Vergleich zu flüssigem Fentanyl liefert das Pflaster höhere Konzentrationswerte in der Probe. Im Gegensatz zu flüssigem Fentanyl, das direkt auf die Haut aufgetragen wird, muss beim Pflaster der Wirkstoff Fentanyl erst aus dem Pflaster freigesetzt werden. Diese Tatsache spiegelt sich in der verlängerten Verzögerungszeit beim Pflaster wieder. Fentanyl kann erst ab Stunde 5 in der Haut detektiert werden, während bei der Applikation von flüssigem Fentanyl die Proben schon in den ersten ein bis drei Stunden Messergebnisse liefern.

In den Messergebnissen sind einige Ausreißer zu sehen, wobei zwei Arten von Ausreißern auffällig sind. Entweder sind die gesamten Messergebnisse eines Katheters über den gesamten Versuchszeitraum erhöht (Abbildung 35 – OFM 3 Pflaster) oder es kommt zu einer kurzen sprunghaften Erhöhung mit Abklingverhalten (Abbildung 34 – 2 k Da MD).

Wenn die Werte während des gesamten Versuchszeitraums erhöht sind, kann man zwei Rückschlüsse ziehen. Entweder wurde der Katheter zu hoch gesetzt oder die Flowrate des Katheters war niedriger und somit wurde die Probe aufkonzentriert.

Eine sprunghafte Erhöhung mit Abklingverhalten deutet auf eine Verunreinigung der Probe hin.

Bei der Applikationsfläche mit dem 25 µg/h Durogesic® Depotplaster ist zu erkennen, dass der OFM 3 während des gesamten Versuchszeitraums erhöhte Konzentrationswerte hat (Abbildung 35). Die Fentanyl Konzentration liegt beim OFM 3 um ein vielfaches höher als bei OFM 1 und OFM 2. Diese Abweichung ist entweder auf eine geringere Setztiefe des Katheters oder auf eine geringere Flowrate zurückzuführen. Daher wird die Flowraten des Pflasterversuchs überprüft. Die Mittelwerte und die Standardabweichungen der Flowraten liefern folgende Ergebnisse:

Tabelle 19: Flowraten für den Versuch mit dem 25 µg/h Durogesic® Depotplaster

	OFM 1 Pflaster [µl/min]	OFM 2 Pflaster [µl/min]	OFM 3 Pflaster [µl/min]
Mittelwert	0,95	0,98	0,98
Standardabweichung	0,11	0,11	0,08

Da nur eine geringe Abweichung der Flowraten zwischen den drei Kathetern erkennbar ist, kann davon ausgegangen werden, dass die erhöhte Konzentration beim OFM 3 Katheter auf eine geringere Setztiefe zurückzuführen ist.

Bei der Applikationsfläche mit 50 µg/ml Fentanyl in H₂O kam es während des Versuchs zu Problemen. Die Applikationskammer wurde undicht und Fentanyl lief ab Stunde 10 aus. Dadurch wurde der OFM 2 verunreinigt. Diese Tatsache zeigt sich in den Stunden 11 bis 13, durch eine 10-mal höhere Konzentration von Fentanyl in der Probenflüssigkeit als bei den anderen OFM-Katheter.

Aufgrund der Vorversuche wurde beschlossen für die Hauptversuche Fentanyl in einer Konzentration von 40 µg/ml in 20 % EtOH auf die Applikationsflächen aufzutragen. Die Versuche wurden über einen Zeitraum von 20 Stunden durchgeführt und die Proben wurden im zwei Stunden Intervall gesammelt.

4.3. Hauptversuche

Die Ergebnisse zeigen, dass mit dem OFM-Katheter ein reproduzierbareres Ergebnis erzielt werden kann als mit dem CMA-Katheter und dem 2 kDa MD-Katheter. Die Ergebnisse zeigen bei der Applikation von Fentanyl höhere Standardabweichungen als bei der Applikation von Benzoesäure.

Bei den Hauptversuchen mit Fentanyl ist ein kontinuierlicher Anstieg der Fentanylkonzentration über den Versuchszeitraum zu erkennen. Bei der Benzoesäure sind in den ersten Stunden ein Anstieg und danach eine Plateauphase erkennbar. Aus dieser Plateauphase ist abzuleiten, dass der Wirkstoff in der Haut den Steady State erreicht hat.

In Abbildung 36 ist der Konzentrationsverlauf von Fentanyl für die drei Katheter zu sehen. Der OFM-Katheter und der CMA-Katheter haben einen annähernd gleichen Verlauf. Die Ergebnisse des 2 kDa-Katheters zeigen einige Ausreißer. In Stunde 7 ist ein Anstieg des Mittelwertes des 2 kDa-Katheter zu erkennen. Dieser Anstieg wird durch einen der 18 Katheters verursacht, der einen sprunghaften Verlauf der Fentanylkonzentration aufweist. Die Fentanylkonzentration steigt bei diesem Katheter von 0,46 ng/ml auf 4,79 ng/ml in Stunde 7 an und sinkt in Stunde 9 auf 1,07 ng/ml ab. Da sich die Flowrate zu diesem Zeitpunkt nicht verändert, kann angenommen werden, dass diese Probe verunreinigt ist.

Bei den Versuchen mit Benzoesäure sind im Vergleich zu Fentanyl weniger Ausreißer in den Messergebnissen vorhanden. Vor allem in den ersten Stunden weisen die Katheter nahezu identische Mittelwerte auf. In der Plateauphase zeigen die Ergebnisse der 2 kDa MD-Katheter höhere Konzentrationswerte gegenüber den anderen Kathetern.

Die Standardabweichung und der Variationskoeffizient zeigen bei allen Kathetern erhöhte Werte in der Anfangsphase. Diese großen Abweichungen sind auf die Verwendung von verschiedenen Hautstücken von verschiedenen Spendern zurückzuführen. Da kein Hautstück einen identischen Aufbau und somit ein identisches Penetrationsverhalten aufweist, sind auch in den Ergebnissen diese Abweichungen ersichtlich.

Vor allem bei Versuchsbeginn zeigen die Ergebnisse kaum eine Übereinstimmung und liefern daher sehr hohe CV Werte. Bei allen Versuchen nehmen die Standardabweichung und der Variationskoeffizient mit zunehmender Konzentration ab.

Am Anfang liegt der Variationskoeffizient (CV) bei Fentanyl um die 100 %, was eine sehr schlechte Reproduzierbarkeit bedeutet. Am Ende liegt der CV bei Fentanyl für die OFM- und CMA-Katheter bei rund 50 %. Bei den 2 kDa MD-Kathetern kann der CV während der ganzen Versuchszeit die 80% Grenze nicht unterschreiten.

Bei Benzoesäure ist der Variationskoeffizient für alle Katheter geringer. Er liegt am Ende des Versuchs beim OFM-Katheter zwischen 30% und 40%, beim CMA-Katheter um die 45 % und beim 2 kDa MD-Katheter über 60%.

4.4. *Vergleich der Konzentrationen*

Die Konzentration ist beim 2 kDa MD-Katheter deutlich höher als bei den anderen Kathetern.

Die erhöhte Aufnahme von Fentanyl ist auf die größere Austauschlänge zurückzuführen. Während der OFM-Katheter und der CMA-Katheter eine Austauschlänge von 15 mm bzw. von 10 mm besitzen, hat der 2 kDa MD-Katheter eine Austauschlänge von 65 mm. Beim 2 kDa MD-Katheter liegen aber nur 20 mm der Membran im Hautgewebe. Die restliche Austauschfläche ragt aus der Ausstichstelle heraus und dient zum Transport der Probenflüssigkeit in das Vial.

Bei den Versuchen mit Fentanyl liefern der OFM- und der CMA-Katheter nahezu identische Ergebnisse. Bei den Versuchen mit Benzoesäure kann mit dem OFM-Katheter mehr Benzoesäure gesammelt werden als mit dem CMA-Katheter.

4.5. *Lag time*

Bei Fentanyl kommt es zu Verzögerungszeiten. In der Probenflüssigkeit der OFM-Katheter und der 2 kDa MD-Katheter kann Fentanyl nach 3 bis 4 Stunden nachgewiesen werden. Beim CMA-Katheter ist die Verzögerungszeit etwas höher und liegt bei 4,33 Stunden.

Bei der Benzoesäure kann im Gegensatz zu Fentanyl keine Verzögerungszeit festgestellt werden. Innerhalb der ersten zwei Stunden kann die Benzoesäure in die Haut penetrieren und in der gesammelten Probenflüssigkeit gemessen werden.

Diese schnellere Penetration durch die Haut ist auf die kleinere Molekülgröße und auf die geringere Lipophilie von Benzoesäure zurückzuführen.

5. Schlussfolgerung

Aufgrund der in-vitro Versuche und der Hauptversuche kann deutlich gezeigt werden, dass mit den OFM- und CMA-Kathetern ein deutlich besseres Ergebnis erzielt werden kann als mit den 2 kDa MD-Kathetern.

Die Benzoesäure ist bei diesen Versuchen mit den verwendeten Sampling-Techniken mit einer größeren Genauigkeit und mit weniger Messfehlern detektierbar, als das Fentanyl. Bei Fentanyl tritt höhere Standardabweichungen auf. Doch die Benzoesäure ist leichter zu analysieren, da deren Messbereich in μg -Bereich liegt. Währenddessen liegt bei Fentanyl der Messbereich im Nano-Gramm-Bereich. Eine Detektion von Substanzen in diesem Bereich ist mit einem erheblich größeren Messaufwand verbunden.

Der 2 kDa MD-Katheter liefert bei allen Versuchen höhere Standardabweichungen und höhere Variationskoeffizienten als die anderen beiden Katheter. Dies ist darauf zurückzuführen, dass der 2 kDa MD-Katheter manuell und nicht wie die anderen beiden industriell gefertigt ist. Daher ist keine genaue Reproduzierbarkeit des Katheteraufbaus gegeben.

Beim Konzentrationsvergleich kann der 2 kDa MD-Katheter höhere Werte für beide Testsubstanzen gegenüber den anderen Kathetern erzielen. Dieses Ergebnis kann aber durch die größere Austauschlänge dieses Katheters erklärt werden.

Der CMA-Katheter und der OFM-Katheter erzielen bei den Hauptversuchen nahezu gleiche Ergebnisse. Mit dem OFM-Katheter kann ein reproduzierbareres Ergebnis erzielt werden, wie die höheren Standardabweichungen des CMA-Katheters zeigen.

Da die Molekülgröße der beiden Testsubstanzen weit unter 100 kDa liegt, ist ein Sampling mit den CMA- und dem 2 kDa MD-Katheter möglich. Bei größeren Molekülen ist ein Sampling mit diesen Kathetern nicht mehr möglich, da die Ausschlussgrenze für den CMA-Katheter bei 100 kDa und für den 2 kDa MD-Katheter bei 2 kDa liegt. Der OFM-Katheter zeigt erst beim Sampling von großmolekularen und lipophilen Substanzen einen großen Vorteil. Da die Austauschfläche große Öffnungen besitzt, ist ein Sampling von großen Molekülen möglich.

Eine Frage, die zum Schluss offen bleibt, ist wie weit die Setztiefe und die Flowrate die Konzentration der Substanz in der Probe beeinflusst. Daher ist bei weiteren Versuchen die Setztiefe durch ein Ultraschallgerät zu kontrollieren.

Um den Zusammenhang zwischen der Konzentration der Testsubstanz in der Probenflüssigkeit und der Flowrate des Perfusats feststellen zu können, sollen weitere Versuche durchgeführt werden.

Um keine Zerstörung der Haut durch das Einfrieren hervorzurufen, sollte die Haut direkt nach der Explantation für ex-vivo Versuche verwendet werden. Um ein besseres Umgebungsklima zu schaffen, ist eine Aufbewahrung der Haut während des Versuchs in einer „Inkubator Box“ von Vorteil. Mit dieser „Inkubator Box“ sollte eine konstante Regelung der Temperatur und der Luftfeuchtigkeit möglich sein.

6. Literaturverzeichnis

- [1] Bundeskanzleramt Österreich (2010): Bundesrecht:-*Gesamte Rechtsvorschrift für Arzneimittelgesetz. Fassung vom 01.12.2010.*
<http://www.ris.bka.gv.at/GeltendeFassung.wxe?Abfrage=Bundesnormen&Gesetzesnummer=10010441> – Download vom 01.12.2010
- [2] Pharmig-Verband der pharmazeutischen Industrie Österreichs (2010): *Arzneimittel und Gesundheitswesen in Österreich. Daten 2008/ Ausgabe 2010.*
http://www.pharmig.at/upload/Publikationen/Daten%20und%20Fakten_Ausgabe%202010.pdf – Download vom 15.11.2010
- [3] Braun-Falco, Otto; Plewig, Gerd.; Wolff, Helmut Heinrich; Landthaler, Michael:
Dermatologie und Venerologie (5. Auflage). Springer (2005)
- [4] Mutschler, Ernst; Geisslinger, Gerd; Kroemer, Heyo K.; Ruth, Peter; & Schäfer-Korting, Monika (2008): *Mutschler Arzneimittelwirkungen: Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie (9. Auflage).* Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart (2008.)
- [5] Steiermärkische Gebietskrankenkasse (2004): *Med Info Extraausgabe. Klinische Studien (14.Jg./Nr.5/2004).* http://www.stgkk.at/mediaDB/MMDB60056_44714.PDF -
Downlaod vom Oktober 2010
- [6] Zalpour, Christoff: *Anatomie, Physiologie.* Urban & Fischer bei Elsevier (2002)
- [7] Universität Tübingen (2008): *Vorlesung Biopharmazie.* http://www.uni-tuebingen.de/pharmazie/abteilungen/technologie/vorlbioph/1_2_liber_absorp_WS0809.pdf
Downlaod vom 1.12.2010
- [8] DACON GmbH (2008): *Durogesic 25-µg/h-Depotpflaster.*
<http://www.pharmazie.com/graphic/A/67/1-21367.pdf> – Downlaod vom 15.08.2010
- [9] Varvel, J.R.; Shafer, S.L.; Hwang, S.S.; Coen, P.A.; Stanski, D.R.: Absorption characteristics of transdermally administered Fentanyl. *Anesthesiology* 70: 928-934 (1989)
- [10] Miguel, Rafael; Kreitzer, Josef M.; Reinhart, Douglas; Sebel, Peter S.; Bowie, Julius; Freedman Gordon; Eisenkraft James B.: Postoperative pain control with a new transdermal Fentanyl delivery system. *Anesthesiology* 83: 470-477 (1995)

- [11] Mc Donald S., Lunte C: Determination of the dermal penetration of esterom components using microdialysis sampling. *Pharmaceutical Research* 20 (11): 1827 -34 (2003)
- [12] Rougier A., Rallis M., Krien P., Lotte C.: In vivo percutaneous absorption: a key role for stratum corneum/vehicle partitioning. *Archives of Dermatological Research* 282 (8): 498-505 (1990)
- [13] CMA Microdialysis AB (2007): *CMA 66. Linear Microdialysis Catheter*.
http://www.microdialysis.se/public/file.php?REF=c042f4db68f23406c6cecf84a7ebb0fe&art=322&FILE_ID=20100526073620_1_12.pdf – Download vom: Juli 2010
- [14] Benfeldt, Eva; Groth, Lotte: Feasibility of Measuring Lipophilic or Protein-bound Drugs in the Dermis by In Vivo Microdialysis after topical or Systemic Drug Administration. *Acta Dermato-Venereologica (Stockholm)* 78: 274-278 (1998)
- [15] Gilson S.A.S (2003): *Minipuls 3 Peristaltic Pump. User Guid.*
http://www.gilson.com/Resources/Minipuls_3_Peristaltic_Pump_Users_Guide.pdf - Download vom Juni 2010.
- [16] DACON GmbH (2008): ELO-MEL isoton-Infusionslösung.
<http://www.pharmazie.com/graphic/A/79/1-19279.pdf> - Download vom September 2010.
- [17] Zeeck, Axel; Grond, Stephanie; Papastavrou, Ina; Zeeck, Sabine: *Chemie für Mediziner (7.Auflage)*. Urban & Fischer bei Elsevier 2010.
- [18] FDA Food and Durg Administration (2001): *Guidance for Industry – Bioanalytical Method Validation*.
<http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidance/ucm0701.pdf> - Download vom September 2010
- [19] Krill SL, Knutson K, Higuchi WI: Ethanol effects on the stratum corneum lipid phase behavior. *Biochemica et biophysica acta* 1112 (2): 273-80 (1992)

7. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Zeitlicher Verlauf der Arzneimittelentwicklung- Von der Substanzenerkennung bis zur Markteinführung (Quelle: Pharmig [2]).....	2
Abbildung 2: Aufbau der Haut (Quelle: http://psoriasis.net.dynamicweb.dk/Files/Billeder/DE/Deutsche_Animation/haut_gesund_75.jpg).....	5
Abbildung 3: Aufbau der Epidermis (Quelle: http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/2/20/Skinlayers.png).....	7
Abbildung 4: Penetration durch das Stratum corneum über den transepidermalen Weg.....	9
Abbildung 5: Aufbau des Versuchs vom Dezember 2009	14
Abbildung 6: Katheter mit runder Applikationsfläche	14
Abbildung 7: OFM-Katheter mit Austauschfläche.....	16
Abbildung 8: Probenflüssigkeitsentnahme mit dem OFM-Katheter	17
Abbildung 9: CMA 66 Katheter ¹¹	18
Abbildung 10: Austauschfläche des CMA 66 Katheters	18
Abbildung 11: Probenflussentnahme mit dem CMA-Katheter	19
Abbildung 12: 2 kDa MD-Katheter (Membran mit angeklebten Nylon)	20
Abbildung 13: Aufbau des in-vitro-Versuchs	21
Abbildung 14: Zeitlicher Ablauf des in-vitro Versuchs	23
Abbildung 15: Setzen der Katheter	25
Abbildung 16: Aufbau des ersten Vorversuchs	26
Abbildung 17: Im linken Bild ist das Aufkleben der Applikationskammern zu sehen und im rechten Bild die zugedeckten Applikationskammern im Betrieb	27
Abbildung 18: Zeitlicher Ablauf ersten Vorversuchs	28
Abbildung 19: Aufbau des zweiten Vorversuchs	30
Abbildung 20: Zeitlicher Ablauf des zweiten Vorversuchs	31
Abbildung 21: Aufbau des Hauptversuches – ein Hautstück mit 6 Kathetern	33
Abbildung 22: Zeitlicher Ablauf der Hauptversuche	34
Abbildung 23: Minipuls [®] 3 Peristaltikpumpe [15].....	36
Abbildung 24: Limit of Quantification und Limit of Detection.....	39
Abbildung 25: Sampling-Effizienz der Katheter bei Fentanyl mit einer	43
Abbildung 26: Sampling-Effizienz der Katheter bei Fentanyl mit einer	43
Abbildung 27: Sampling-Effizienz der Katheter bei Fentanyl mit einer	43
Abbildung 28: Sampling-Effizienz der Katheter bei Fentanyl mit einer	43
Abbildung 29: Sampling-Effizienz der Katheter bei Benzoesäure mit einer	44
Abbildung 30: Sampling-Effizienz der Katheter bei Benzoesäure mit einer	44
Abbildung 31: Sampling-Effizienz der Katheter bei Benzoesäure mit einer	44
Abbildung 32: Sampling-Effizienz der Katheter bei Benzoesäure mit einer	44
Abbildung 33: Mittelwert der Fentanylkonzentration in der Epidermis bei einer Applikation von 25 µg/ml Fentanyl über einen Zeitraum von 28 Stunden.....	46
Abbildung 34: Mittelwert der Fentanylkonzentration in der Epidermis bei einer Applikation von 40 µg/ml bzw. 50 µg/ml über einen Versuchszeitraum von 25 Stunden	47
Abbildung 35: Konzentration von Fentanyl in der Epidermis bei der Applikation eines 25 µg/h Durogesic [®] Depotplaster während des Versuchszeitraumes von 25 Stunden	48
Abbildung 36: Mittelwert der Fentanylkonzentration in der Epidermis bei einer Applikation von 40 µg/ml über einen Versuchszeitraum von 20 Stunden	49
Abbildung 37: Mittelwert der Benzoesäurekonzentration in der Epidermis bei einer Applikation von 4 mg/ml über einen Versuchszeitraum von 20 Stunden	50
Abbildung 38: Vergleich der OFM Katheter bei einer Applikation von 50 µg/ml Fentanyl in EtOH und 40 µg/ml Fentanyl in H ₂ O	55