

Aus der Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie  
der Medizinischen Fakultät Charité - Universitätsmedizin Berlin

## DISSERTATION

### **Penetration von Nanopartikeln in menschliche Haut–**

Auswirkung von Cyanoacrylate Skin Surface Stripping vs.  
Massage auf das Penetrationsverhalten von 40nm und 200nm  
soliden Polysterolpartikeln in wässriger Lösung und  
Cremegrundlage

Zur Erlangung des akademischen Grades  
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité - Universitätsmedizin Berlin

von

Julia Schmidt  
aus Schlema

Gutachter/in: 1. Prof. Dr. med. U. Blume- Peytavi  
2. Prof. Dr. med. J. Wohlrab  
3. Prof. Dr. E. Rühl

Datum der Promotion: 19. März 2010

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>6</b>
<b>1 Einleitung .....</b>	<b>7</b>
1.1 Einführung– Das transdermale System.....	7
1.2 Anatomie der Haut .....	8
1.3 Hautanhangsgebilde .....	9
1.3.1 Anatomie des Haarfollikels.....	9
1.3.2 Die Rolle der Langerhanszellen in der immunologischen Funktion des Haarfollikels.....	11
1.3.3 Talgdrüsen .....	13
1.3.4 Schweißdrüsen .....	13
1.4 Penetrationswege.....	14
1.4.1 Rolle der Haarfollikel als Penetrationsweg.....	14
1.4.2 Gezieltes Einbringen von Wirkstoffen in den Haarfollikel .....	14
1.5 Einflussfaktoren auf das Penetrationsverhalten von Stoffen .....	15
1.5.1 Haardichte.....	16
1.5.2 Haarfollikeltypen.....	16
1.5.3 Haarzyklus .....	17
1.5.4 Konzept der „offenen“ und „geschlossenen“ Haarfollikel.....	18
1.6 Bestimmung der Penetration topisch applizierter Substanzen .....	19
1.7 Topische Applikation von Partikeln.....	19
1.7.1 Größenabhängige Penetration von Partikeln in Haarfollikel.....	20
1.7.2 Solide und semi- solide Partikel und ihre Anwendungsmöglichkeiten als Wirkstoffträger.....	22
1.7.3 Vehikel zur Applikation der Partikel.....	22
1.8 Transkutane Vakzinierung - Applikation von immunogenen Partikeln.....	23
1.8.1 Möglichkeiten der Transkutane Vakzinierung .....	23
1.8.2 Mechanische Penetrationsverstärker und immunstimulatorische Effekte	24
1.8.3 Immunisierung mit Partikeln- Aufnahme von Partikeln von DZ <i>in vitro</i> .....	25
1.9 Zielstellung .....	26
<b>2 Materialien und Methoden .....</b>	<b>28</b>
2.1 Einführung: Die Tesa®- Film- und die Cyanoacrylat- Abrisstechnik.....	28
2.1.1 Die Tesa®- Film- Abrisstechnik.....	28

2.1.2	Die Cyanoacrylat- Abrisstechnik .....	29
2.2	Das Differentielle Tape Stripping.....	31
2.2.1	Hautmaterial.....	31
2.2.2	Die Nanopartikel.....	31
2.2.3	Nanopartikel in PBS- Lösung bzw. Basiscreme- Grundlage .....	32
2.2.4	Vorbereitung der Hautareale .....	33
2.2.5	Auftragen der Partikel .....	33
2.2.6	Differentielles Tape Stripping I: Bestimmung der Nanopartikel im Stratum corneum mittels der Tesa®- Film- Abrisstechnik.....	34
2.2.7	Differentielles Tape Stripping II: Bestimmung der Nanopartikel in den Haarfollikeln mittels Cyanoacrylat- Abrisstechnik.....	34
2.2.8	Quantitative Analyse der topisch applizierten Substanz im Stratum corneum und in den Haarfollikeln .....	35
2.2.9	Photometrie und Fluoreszenz .....	35
2.2.10	Statistik .....	37
2.2.11	Kalibrierungskurven .....	37
2.3	Das Hornschichttiefen- und Penetrationsprofil .....	37
2.3.1	Allgemeines zur Erstellung der Hornschicht- und Penetrationsprofile .....	37
2.3.2	Die Erstellung des Hornschichtprofils.....	39
2.3.3	Die Erstellung des Penetrationsprofils .....	39
2.3.4	Die Darstellung des Hornschichtprofils .....	40
2.3.5	Die Darstellung des Penetrationsprofils .....	40
2.4	Semiquantitative Beurteilung der follikulären Penetration anhand von Kryoschnitten.....	41
2.4.1	Material .....	41
2.4.2	Das Auftragen der Nanopartikel .....	41
2.4.3	Anfertigung der Kryoschnitte .....	42
2.4.4	Auswertung der Proben .....	42
2.4.5	Statistik .....	43
2.5	Langerhanszellfärbung.....	44
2.6	Konfokale Laser Scanning Mikroskopie .....	45
<b>3</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>46</b>
3.1	Differentielles Tape Stripping .....	46
3.1.1	Kalibrierungskurve .....	46

3.1.2	Bestimmung der Haarfollikeldichte anhand der Cyanoacrylatabrisse .....	46
3.1.3	Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung der Substanzverteilung .....	47
3.1.4	Differentielles Tape Stripping I – Quantifizierung der Nanopartikel im Stratum corneum.....	48
3.1.5	Differentielles Tape Stripping II – Quantifizierung der Nanopartikel in den Haarfollikeln .....	52
3.1.6	Follikulärer Anteil der insgesamt gemessenen Nanopartikel.....	54
3.2	Hornschicht und Penetrationsprofile.....	56
3.2.1	Hornschichtprofil- Bestimmung der Menge an Korneozyten je Filmstreifen .....	60
3.2.2	CSSS .....	62
3.2.3	Penetrationsprofile- Verteilung der Nanopartikel im Stratum Corneum....	62
3.3	Kryoschnitte .....	68
3.3.1	Fluoreszenzaufnahmen der Penetration von Partikeln.....	68
3.3.2	Wirkung der Vorbehandlung mit einem CSSS auf das Penetrationsverhalten .....	70
3.3.3	Wirkung von Massage auf das Penetrationsverhalten .....	73
3.4	Langerhanszellfärbung.....	77
3.5	Konfokale Laser Scanning Mikroskopie- Untersuchung des Lateralen Spreitens .....	77
<b>4</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>79</b>
4.1	Einleitung .....	79
4.2	Auswertung des Differentiellen Tape Strippings.....	80
4.2.1	Differentielles Tape Stripping I: Penetration von Partikeln in das Stratum corneum .....	80
4.2.2	Differentielles Tape Stripping II: Penetration von Partikeln in die Haarfollikel .....	80
4.2.3	Verteilung der Nanopartikel in den Haarfollikeln und im Stratum corneum .. ..	80
4.2.4	Differentielles Tape Stripping II: Diskussion des Einflusses der Vorbehandlungstechniken auf das follikuläre Reservoir.....	81
4.2.5	Einfluss des „Stretch Effektes“ auf die Haardichte .....	82
4.3	Auswertung der Hornschichtprofile- Einfluss der Formulierung auf die je Filmstreifen entfernte Menge an Korneozyten .....	83

4.4	Einfluss von CSSS auf die Integrität des Stratum corneum .....	84
4.5	Anteil der Nanopartikel in den obersten Schichten des SC .....	84
4.6	Recovery Rate- Differentielles Tape Stripping und Penetrationsprofile im Vergleich.....	85
4.6.1	Differentielles Tape Stripping I: Recovery Rate aus dem Stratum corneum .....	85
4.6.2	Differentielles Tape Stripping II: Recovery Rate aus den Haarfollikeln ....	85
4.6.3	Penetrationsprofil: Recovery Rate aus dem Stratum corneum .....	86
4.6.4	Recovery Rate des Stratum corneum: Penetrationsprofil und Differentielles Tape Stripping im Vergleich.....	86
4.6.5	Verminderung des folliculären Reservoirs <i>in vitro</i> .....	88
4.7	Kryoschnitte .....	89
4.7.1	Semiquantitative Auswertung der Gewebsschnitte .....	89
4.7.2	Die Auswertung der Gewebeproben und des Differentiellen Tape Strippings im Vergleich.....	90
4.7.3	Zusammenfassung- Vergleich der Erfassung der folliculären Penetration von Nanopartikeln in menschliche Haut mittels Differentiellem Tape Stripping und der Kryoschnitte .....	92
4.8	Penetrationsfördernde und Immunstimulierende Effekte von CSSS .....	94
4.9	Kleine Partikel zeigen eine verbesserte Aufnahme durch APZ .....	96
4.10	Praktische Schlussfolgerung für die Entwicklung von Protokollen zur topischen Applikation partikulärer therapeutischer Systeme.....	97
4.11	Vor- und Nachteile solider Polyesterolpartikel.....	97
4.12	Ausblick.....	98
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>100</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>103</b>
	<b>Anhang .....</b>	<b>113</b>
	<b>Danksagung .....</b>	<b>116</b>
	<b>Eidesstattliche Erklärung.....</b>	<b>117</b>
	<b>Lebenslauf.....</b>	<b>118</b>

## Abkürzungsverzeichnis

NP	Nanopartikel
BC	Basiscreme
SC	Stratum Corneum
VHF	Vellushaarfollikel
IHF	Intermediärhaarfollikel
THF	Terminalhaarfollikel
CSSS	Cyanoacrylate Skin Surface Stripping
DTS	Differentielles Tape Stripping
HP	Hornschichtprofil
PP	Penetrationsprofil
CLSM	Confocal Laser Scan Mikroskopy
LZ	Langerhans Zelle(n)
DZ	Dendritische Zelle(n)
APZ	Antigenpräsentierende Zelle
TCI	Transkutane Vakzinierung
LT	Hitze- labiles Enterotoxin von E. coli
Abb.	Abbildung

# 1 Einleitung

## 1.1 Einführung– Das transdermale System

Seit Jahrhunderten werden Stoffe zum Schmuck, zum Schutz oder zu medizinischen Zwecken topisch appliziert. Ein Wirkstoff kann in die Haut penetrieren und dort zur Behandlung haut- oder haarassoziierter Krankheiten dienen bzw. die Haut durchdringen, das Lymph- oder Blutsystem erreichen und systemische Wirkung entfalten. Erhältlich sind Pflastersysteme zur Behandlung von Reiseübelkeit, Herzkreislauferkrankungen, Schmerzen, zur Hormontherapie und Kontrazeption sowie zur Nikotinsubstitution (1-5). Im Vergleich zur oralen oder parenteralen Darreichung werden systemische Nebenwirkungen und Belastungen z.B. des hepatischen Metabolismus vermindert.

Der Haarfollikel spielt eine wichtige Rolle als Penetrationsweg zur Überwindung der Hautbarriere. Im Gegensatz zum Stratum corneum (SC), das raschen Erneuerungsprozessen unterliegt, bilden Haarfollikel ein Langzeitreservoir für topisch applizierte Präparate. Durch die anatomische Nähe zu haarfollikelassoziierten Immun- und Stammzellen, Melanozyten sowie Talgdrüsen und perifollikulären Blutgefäßen ist gezielte Pharmakotherapie möglich. Einen Schwerpunkt der Forschung stellt dabei die kutane Applikation bioaktiver Moleküle in Form von Mikro- und Nanopartikeln dar, die größenabhängig in Haarfollikel penetrieren und aggregieren können.

Anhand verschiedenster Untersuchungsmethoden, die v.a. auf der Tesa®- Film-, bzw. Cyanoacrylat- Abrisstechnik, der Spektrophotometrie und der Konfokalen Laser Scanning Mikroskopie basieren, können *in vitro* und *in vivo* pharmakokinetische Untersuchungen und Penetrationsprofile für Partikel unterschiedlichster physikochemischer Eigenschaften erstellt werden.

Neben dem morphologischen und funktionellen Status des Haarfollikels haben Größe und chemische Eigenschaften des Stoffes bzw. seines Vehikels Einfluss auf das Penetrationsverhalten. Verschiedene Vorbehandlungstechniken wie der Cyanoacrylatabriss (CSSS) oder Massage gelten als mechanische Penetrationsverstärker (6-9).

Das follikuläre Targeting mit bioaktiven partikulären Präparaten hat neben der Deposition verschiedenster Arzneimittel Bedeutung für die Immun-, Stammzell- und Gentherapie sowie transkutane Vakzinierungen, jedoch im Hinblick auf die mögliche Toxizität nanopartikulärer Systeme auch im Bereich der Umweltmedizin.



In der vorliegenden Arbeit soll das Penetrationsverhalten verschiedener Partikelgrößen im Nanometerbereich in verschiedenen Formulierungen und nach den Vorbehandlungstechniken CSSS und Massage im SC und in den Haarfollikeln untersucht werden.

## **1.2 Anatomie der Haut**

Die Haut bildet ein Grenzorgan zwischen Organismus und Umwelt. Neben verschiedenen Sinnesfunktionen bietet sie Schutz vor Kälte, Hitze, Austrocknen des Körpers durch große Wasserverluste, UV- Licht, mechanischen Noxen, dem Eindringen von Mikroorganismen und spielt eine besondere Rolle als Immunorgan. Für das Verständnis von Penetrationsvorgängen ist die Kenntnis der Anatomie der Haut von Bedeutung.

Die Haut von Säugetieren besteht aus den drei Schichten der Epidermis, Dermis und Subkutis. Die Epidermis ist ein verhornendes Plattenepithel ektodermaler Herkunft (10). Sie hat eine Dicke von 50 $\mu$ m bis 100 $\mu$ m und besteht von unten nach oben aus dem, einer Basalmembran aufsitzenden, Stratum basale, dem Stratum spinosum und dem Stratum granulosum, welche die lebende Epidermis bilden. Diese ist Produzent des SC, einer kernlosen Zellschicht. Diese Hornschicht, stellt die äußerste und größte Barriere für die Penetration von Partikeln  $> 500$  Da dar (11); Die Penetration von hydrophilen Stoffen wird dabei eher behindert als die von lipophilen Komponenten (4).

Die Epidermis besteht zu 90% aus Keratinozyten und ist ständiger Erneuerung unterworfen. Die Keratinozyten gehen während der Passage von den basalen Schichten der Epidermis zur Oberfläche in Apoptose. Die daraus hervorgehenden kernlosen, plättchenartigen Korneozyten bilden die Hornschicht. Während dieses Prozesses bauen die Zellen Phospholipide ab und synthetisieren Ceramide. Diese werden, in Granula gepackt, sezerniert und bilden im Interzellularraum gemeinsam mit Cholesterol, langkettigen freien Fettsäuren und Cholesterolsulfat eine Art lipidhaltigen Mörtel, welcher die Hornzellen einbettet (12). Die Zellen überlappen sich, so dass Cluster gebildet werden. An den Verbindungsstellen entstehen hydrophile Nanoporen von durchschnittlich 20nm bis zu 100nm (4). Das SC besteht in Abhängigkeit von der Körperregion aus 10 – 20 Lagen von Korneozyten, welche eine Dicke von etwa 220nm – 400nm haben. Das gesamte SC hat eine Dicke von etwa 10 $\mu$ m – 20 $\mu$ m (13)

Die Dicke und der Hydratationszustand des SC sowie die Zusammensetzung der interzellulären Lipide bestimmt die kutane Permeabilitätsbarriere. Neben der

Barrierefunktion fungiert das SC als Reservoir für topisch applizierte Stoffe. Dabei kann u.a. die Bindung an das Keratin der Korneozyten (14) oder die Vermischung des Stoffes mit den lipidhaltigen Bereichen eine Rolle spielen.

Unter der Epidermis befindet sich die Dermis, welche sich in das Stratum papillare und retikulare gliedert und eine Dicke von 1mm- 2mm aufweist. Die Lederhaut ist ein fibroelastisches Gewebe, das als Träger für die die Haut versorgenden Nerven, Blut- und Lymphgefäße sowie die Hautanhangsgebilde wie Haare, Nägel, Talg- und Schweißdrüsen fungiert (13). Bindegewebszapfen ragen in die Epidermis hinein und vergrößern damit die Austauschfläche zwischen beiden Hautschichten. Im Stratum papillare befindet sich der obere, an der Grenze zur Subkutis, einem Polster aus Fettgewebe, der tiefe Gefäßplexus der Haut.

Zu den Zellpopulationen der Epidermis zählen neben den Keratinozyten die Sinnesfunktionen ausübenden Merkelzellen, immunologisch wichtige Langerhanszellen (LZ) und Melanozyten. Letztere produzieren Melanin und tragen zur Eigenfarbe der Haut sowie dem Schutz vor UV- Licht bei. Zellpopulationen der Dermis sind Fibroblasten, Dermale Dendritische Zellen, Makrophagen, Mastzellen und Lymphozyten (15).

### **1.3 Hautanhangsgebilde**

Zu den wichtigsten Hautanhangsgebilden gehören neben den Nägeln, auf die hier nicht eingegangen werden soll, die Haare, die Talg- und die Schweißdrüsen.

#### **1.3.1 Anatomie des Haarfollikels**

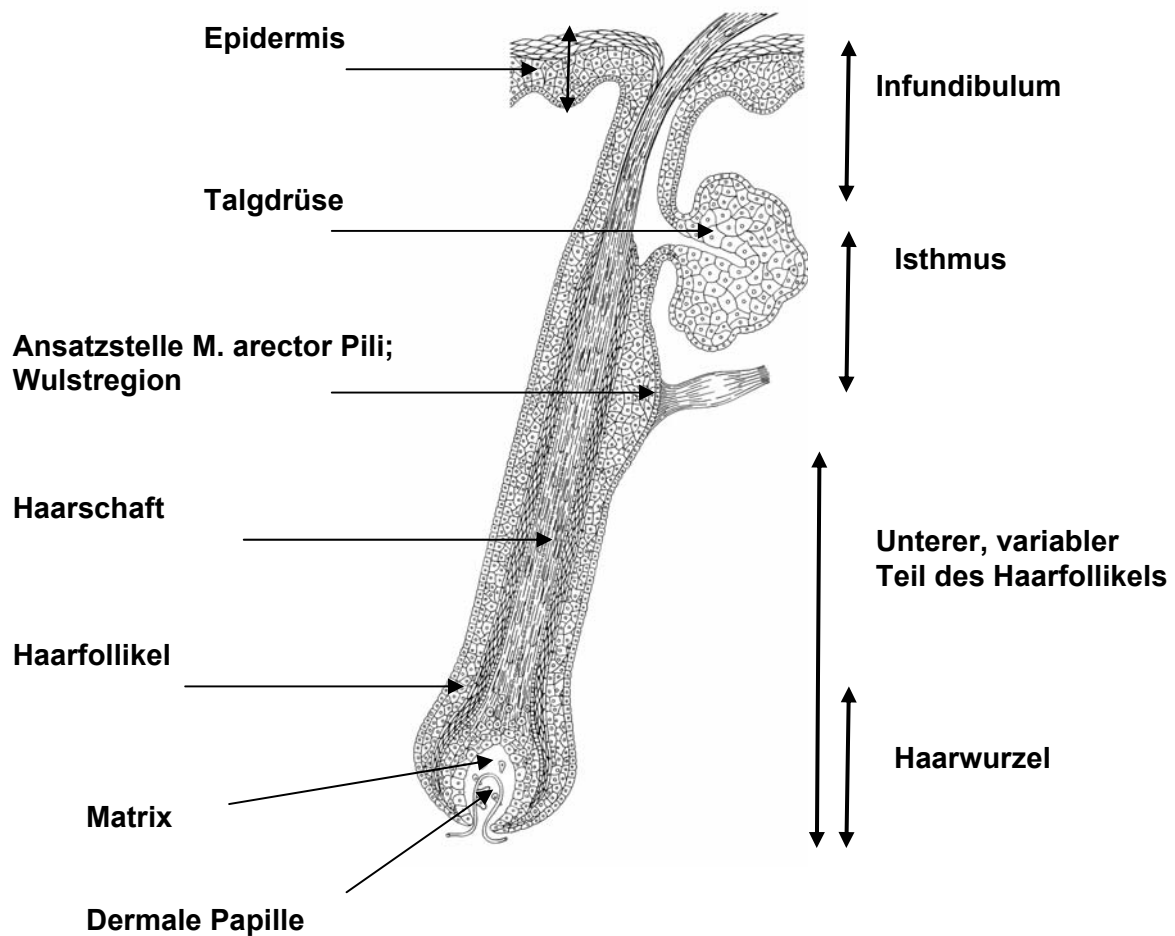
Im englischen Sprachgebrauch wird oft von der „pilosebaceous unit“ (Talgdrüsenfollikeleinheit) gesprochen, um die Einheit von Haarfollikel, Haarschaft, dem M. arrector pili und den assoziierten Talgdrüsen zu beschreiben. Die zahlreichen assoziierten Zellpopulationen sind an der Regulation biochemischer, metabolischer und immunologischer Prozesse beteiligt (16).

Die Haarschaft besteht aus Keratin und steckt in einer „Invagination der Epidermis, dem Haarfollikel“ (10) und durchzieht die Haut von der Subkutis oder Dermis aus. Der Haarfollikel lässt sich in drei Teile unterteilen (15):

Der untere Teil reicht von der Basis des Follikels inklusive des Haarbulbus bis zur Insertionsstelle des Musculus arrector pili. Als Isthmus wird der Teil von der Insertionsstelle des M. arrector pili bis zur Mündung des Talgdrüsenganges bezeichnet.

Der Ansatzpunkt des M. arector pili wird auch als Wulstregion bezeichnet und bildet die Grenze zwischen dem konstanten und dem variablen Anteil des Haarfollikels, welcher einem Zyklus unterworfen ist.

Das trichterförmig erweiterte Infundibulum reicht vom Eingang der Talgdrüse bis zur Haarfollikelöffnung. Das Epithel des Infundibulums ist dünner als das der umgebenden interfollikulären Epidermis (17). Der obere Teil, das Akroinfundibulum, gleicht im Aufbau der Epidermis. Im unteren Teil hingegen finden sich kleinere und brüchig wirkende Zellen, welche die Hautbarriere permeabler für Fremdstoffen machen (10).



**Abbildung 1 Aufbau des Haares**

Abb. 1 zeigt die Unterteilung des Haares und kennzeichnet die wichtigsten Strukturen

Die Haarwurzelscheiden stellen trichterförmige Einsenkungen der Haut dar, die sich um die Haarwurzel bis in die Tiefe fortsetzen und in einer zwiebel förmigen Auftreibung, dem Haarbulbus, enden.

Man unterscheidet die innere und äußere epitheliale von der bindegewebigen Wurzelscheide, dem Haarbalg. Die innere Wurzelscheide umfasst den Haarschaft und

reicht nur bis etwa zur Talgdrüsenöffnung. Sie ist nur in der Wachstumsphase des Follikels nachweisbar und gibt keratinhaltige Zellen durch Desquamation in den Haartrichter ab (10). Die äußere Wurzelscheide ist eine keratinisierte Schicht in Kontinuität mit der Epidermis. Umhüllt werden die epithelialen Wurzelscheiden von der azellulären Basalmembran (Glasmembran).

Der Haarbulbus besteht aus einem epithelialen Anteil, die Matrix, die den dermalen Teil, die Papille, glockenförmig umhüllt. Während die Matrixkeratinozyten zu den Wurzelscheiden differenzieren, induzieren die spezialisierten Fibroblasten der Papille durch bestimmte Signale die einzelnen Phasen des Haarzyklus. Von der gefäßreichen Papille aus erfolgt die Ernährung des Haares. Bulbus, Papille und Wurzelscheiden bilden den Haarfollikel.

Aus den Matrixzellen, undifferenzierten Keratinozyten, bildet sich der Haarschaft. Dieser besteht aus dem innen liegenden, aus dicht gepacktem Keratin aufgebauten Kortex und der außen liegenden Kutikula, einer einschichtigen Lage von dachziegelartig angeordneten Hornzellen, welche sich mit der inneren Wurzelscheide verzahnen (18). Die sich im Kortex befindliche Medulla kommt nur in Terminalhaaren vor.

### **1.3.2 Die Rolle der Langerhanszellen in der immunologischen Funktion des Haarfollikels**

Haarfollikel stellen eine Unterbrechung der Barriere des SC dar. Insbesondere sein oberflächennaher Teil bietet eine primäre Eintrittspforte für Allergene jeder Art und zeichnet sich durch eine hohe Dichte immunkompetenter Zellen aus (9). Auch Keratinozyten sind nicht nur für den Erhalt der physikalischen Hautbarriere verantwortlich, sondern tragen durch die Produktion von Zytokinen zu einer balancierten Immunantwort der Haut bei (19).

Christopher et al. (20) konnten zeigen, dass das distale Epithel des Haarfollikels dabei nicht nur ein Reservoir für LZ, sondern auch CD4+ und CD8+- Zellen aufweist. Letztere befinden sich in der distalen äußeren Wurzelscheide des menschlichen Haarfollikels in höherer Zahl als in der interfollikulären Epidermis. Makrophagen und Mastzellen sind bevorzugt im perifollikulären Bindegewebe lokalisiert. Kaum vertreten sind B- Zellen, Natürliche- Killer- Zellen und  $\gamma\delta$ - T- Zellen (20).

LZ, die durch ihre horizontale Ausrichtung und langen Ausläufer etwa 20% der basalen Epidermisfläche abdecken (19), bilden ein Netzwerk mit immunologischer Wächterfunktion („sentinels“) gegen eindringende Fremdstoffe.

Sie sind spezialisierte, aus dem Knochenmark stammende Leukozyten und besiedeln die Epidermis mit einer Dichte von 500 (Rumpf, Kopfhaut, Arm, Bein) bis 1000 (Gesicht, Hals) LZ/cm<sup>2</sup> (21). Sie bilden etwa 2- 8% der epidermalen Zellpopulation. LZ zeichnen sich durch ihre dendritische Morphologie, die Präsenz der einzigartigen intrazytoplasmatischen Organellen, der Birbeck Granula, und typische Oberflächenmarker aus (22, 23). In Abwesenheit von Gefahrensignalen sind sie eine Population ruhender Zellen, die immunologisch unreifen Dendritischen Zellen (DZ) entsprechen.

Nach der Antigenaufnahme, wobei Makropinozytose, Rezeptor- vermittelte Endozytose oder Phagozytose von Partikeln unterschieden werden (24), differenzieren sich die LZ zu reifen DZ. Sie wandern, getriggert durch bestimmte Chemokine (25) zu den regionalen Lymphknoten, wo sie naive B- und T- Zellen antreffen. Zu dem Aktivierungs-, bzw. Reifungsprozess gehört die Hochregulation von MHC I und II sowie kostimulatorischer Moleküle (26, 27). E- Cadherin und CCR 6 werden herabreguliert, was es den LZ erlaubt, ihre Bindung zu den Keratinozyten zu lösen (28). Mittels der Sekretion von Metalloproteasen können sie extrazelluläre Matrix, Basalmembran und Dermis bis zum Treffen auf lymphatische Gefäße durchdringen und zu den Lymphknoten migrieren (29). Dort sind sie befähigt als Retikulumzellen naive T- Zellen, welche den für das in der Peripherie aufgenommene Antigen passenden Rezeptor tragen, zu stimulieren. Aktivierte T- Effektor und Gedächtniszellen sowie evtl. in Interaktion mit B- Zellen generierte Antikörper gelangen zurück in die Peripherie und können das Pathogen gezielt eliminieren (30).

Die Antigenaufnahme und Präsentation kann auf verschiedenen Wegen erfolgen .

Dabei werden durch Antigenpräsentierende Zellen (APZ), zu denen die LZ zählen, a) mittels des endozytotischen Pathways exogene Antigene auf MHC Klasse II Moleküle geladen und CD4+ T-Zellen oder b) auf dem endogenen Pfad endogene Antigene in Verbindung mit MHC Klasse I Molekülen CD8+T- Zellen präsentiert (28).

T- Helferzellen (CD4<sup>+</sup>) sind v.a. für die humorale Immunantwort verantwortlich und können die Produktion von spezifischen Antikörpern und die Aktivität von Phagozyten stimulieren, die Krankheitserreger in Körperflüssigkeiten inaktivieren und eliminieren. T- Killerzellen (CD8<sup>+</sup>) identifizieren infizierte und entartete Zellen, die körperfremde Proteine herstellen, und sind fähig, diese durch die zelluläre Immunantwort zu eliminieren.

Zusätzlich besitzen DZ und isolierte LZ (31) die Fähigkeit exogene partikuläre und zellassozierte Antigene mittels des MHC- I Pfades zu verarbeiten und die Produktion von IFN- $\gamma$  sowie Zytotoxizität in CD8+ T- Zellen zu induzieren (31). Dieser als Kreuzpräsentation bezeichnete Mechanismus ermöglicht die Induktion einer Immunantwort gegen Viren und Tumoren (24, 28), ohne dass die APZ primär selbst davon befallen sein muss. Nicht voll ausgereifte LZ nehmen auch unter normalen Umständen apoptotisches Material der Umgebung auf und migrieren zu den Lymphknoten. Sie üben dadurch Toleranzfunktion aus, indem T- regulatorische Zellen, welche eine Immunantwort unterdrücken, stimuliert werden (28).

Die Repopulation (32, 33) der Epidermis findet in stabilem Zustand durch Vorläuferzellen aus der Haut bzw. einem haarfollikelassozierten Reservoir statt (34). Nach einer Entzündung, in deren Rahmen eine große Zahl von LZ zu den abfließenden Lymphknoten migrieren, wandern LZ aus der Blutzirkulation zurück in die Epidermis (22, 28). Dabei spielen durch epidermale Keratinozyten und dermale Fibroblasten produzierte Chemokine, die Interaktion von Adhäsionsmolekülen auf LZ, epithelialen und dermalen Zellen sowie die proteolytische Aktivität von Metalloproteasen eine besondere Rolle.

### **1.3.3 Talgdrüsen**

Mit Ausnahme der so genannten freien Talgdrüsen im Genitalbereich und der Mundschleimhaut sind die Talgdrüsen an den Follikelapparat gebunden. Sie sind holokrine Drüsen, welche Talg, eine fungi- und bakteriostatische Mischung aus überwiegend kurzkettigen Fettsäuren produzieren (18). Das Sebum fließt über den Talgdrüsengang in das obere Drittel des Haarfollikels ab und schafft dort ein von neutralen, nicht polaren Lipiden geprägtes Milieu. Die Sebumproduktion wird durch Sexualhormone gesteuert und ist altersabhängig. Sie dauert etwa drei Wochen. Zwischen seiner Freisetzung bis zum Erscheinen auf der Hautoberfläche vergehen acht Tage (35).

### **1.3.4 Schweißdrüsen**

Es gibt zwei Arten von Schweißdrüsen. Die über den gesamten Körper verteilten, von Haarfollikeln unabhängigen, cholinerg innervierten ekkrinen Schweißdrüsen haben eine Bedeutung für die Erhaltung des Wärmegleichgewichts und die Hydrierung des SC. Die adrenerg innervierten apokrinen Schweißdrüsen kommen v.a. in der Achsel und Perigenitalregion vor. Sie münden in das Infundibulum der Haarfollikel (10).

## **1.4 Penetrationswege**

Bezüglich der Penetrationswege kann die Diffusion durch die Interzellulärsubstanz des SC, das transzelluläre Eindringen durch die Korneozyten und die Penetration durch Anhangsgebilde, insbesondere die Haarfollikel, voneinander unterschieden werden (12, 36). Das Reservoir im SC bildet sich v.a. in seinen obersten Schichten aus und ist aufgrund seiner ständigen Umbau- und Erneuerungsvorgänge von kurzer Dauer.

### **1.4.1 Rolle der Haarfollikel als Penetrationsweg**

Studien, welche die Penetration in haarfollikelfreier mit follikelhaltiger Haut vergleichen, deuten darauf hin, dass den Hautanhangsgebilden bei der Penetration von Stoffen eine große Bedeutung zukommt. Illel et al. (37) untersuchten die noch follikelfreie Haut neugeborener Ratten mit der älterer Tiere, die schon normal ausgebildete Hautanhangsgebilde besaßen. Man stellte dabei eine deutlich höhere Diffusion von Hydrocortison durch die Haut fest. Zu ähnlichen Ergebnissen in vergleichenden Penetrationsversuchen an haarlosen und normal behaarten Tiermodellen kommen z.B. Shim et al., Kao et. al. und Hueber et al. (38-40).

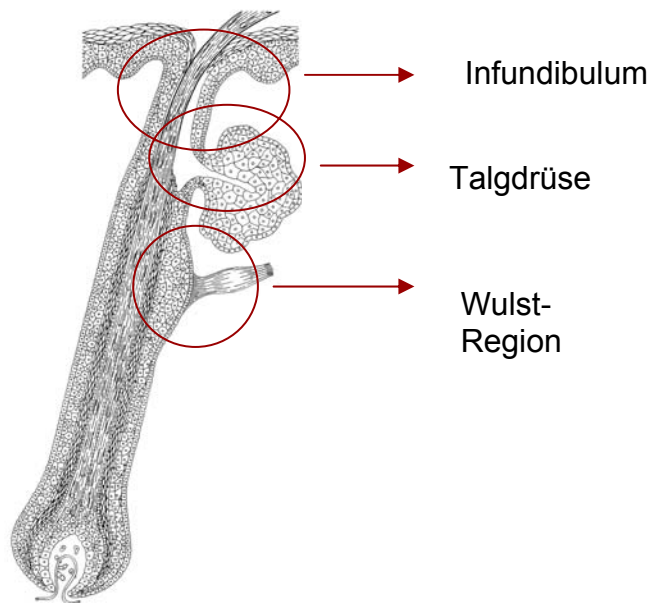
Ein dichtes Kapillarnetz, welches mit den dermalen Gefäßen assoziiert ist, versorgt den oberen Teil des Haarfollikels und die Talgdrüse mit Blut, während die unteren Follikelbereiche Anschluss an die Gefäße der tiefen Dermis und Subkutis haben (18). Beide Gefäßsysteme sind durch arteriovenöse Shunts verbunden.

Otberg et al. (41) verglichen die Blutkonzentration von Koffein nach der Applikation auf die Brusthaut von gesunden Probanden vor und nach dem Verschluss der sich dort befindlichen Haarfollikel durch ein Lack- Wachs- Gemisch. Bei offenen Follikeln zeigte sich nicht nur eine deutlich höhere, sondern auch schneller messbare Konzentration von Koffein im Blut.

Durch follikuläre Penetration können topisch applizierte Stoffe oder andere Allergene das SC überwinden, die Blutzirkulation erreichen und in Interaktion mit dem follikulären Epithel und assoziierten Zellpopulationen treten.

### **1.4.2 Gezieltes Einbringen von Wirkstoffen in den Haarfollikel**

Die Reservoirfunktion des Haarfollikels ermöglicht das Einbringen aktiver Wirkstoffe in den Haarfollikel, wo sich maximale Wirkstoffkonzentrationen in unmittelbarer Nähe follikelassoziierter Zielstrukturen entfalten können (Targeting) (18, 42, 43).



### **Abbildung 2 Follikuläres Targeting**

Verschiedene Strukturen des Haarfollikels können Ziel topisch applizierter Stoffe sein (Abb. modifiziert nach Vogt 2005)

Eine mögliche Anwendung ist die Immuntherapie. Hierbei sind z.B. APZ, im Bereich der hoch permeablen Epidermis des follikulären Infundibulums Ziel der Applikation topisch applizierter Stoffe. Fertig entwickelte therapeutische Systeme gibt es jedoch noch nicht. Der Gang der Talgdrüse mündet im Bereich des unteren Infundibulums in den Haarschaft. Studien zeigten, dass topisch applizierte Präparate, z.B. in der Aknetherapie, intrafollikulär penetrieren und sich in der Talgdrüse anreichern können (44).

Die Wulstregion befindet sich in der äußeren Wurzelscheide an der Insertionsstelle des M. arrector pili. Sie beherbergt epitheliale Stammzellen (45, 46) die zur Erneuerung des Haarfollikels und der interfollikulären Epidermis befähigt sind und Stammzellen der Melanozyten (47). Ein therapeutisches Eingreifen in dieser Region kann bei Störungen des Haarwachstums- oder Pigmentierungsstörungen erfolgen. Hier bietet sich als neue therapeutische Option von Haar- oder Hauterkrankungen die Möglichkeit der genetischen Manipulation von Stammzellen (48).

### **1.5 Einflussfaktoren auf das Penetrationsverhalten von Stoffen**

Die Kenntnis der Dichte und Proportionen der Haarfollikelöffnungen ist für die Bestimmung des follikulären Reservoirs sehr wichtig. Das Penetrationsverhalten wird



nicht nur von der Morphologie des Haarfollikels, sondern auch durch dessen funktionellen Status beeinflusst.

### **1.5.1 Haardichte**

Die Haardichte variiert in Abhängigkeit vom Haarfollikeltyp und der Körperfläche und zeigt große interindividuelle Unterschiede (49).

Vellushaare nehmen mit ca. 300- 400/cm<sup>3</sup> an der Stirn, bzw. 30- 93/cm<sup>3</sup> am Rücken einen nicht unbedeutenden Anteil der Körperoberfläche ein (16, 50, 51):

Neuere Untersuchungen widersprechen der lange geteilten Annahme, dass die Haarfollikelöffnungen nicht mehr als 0,1% der Gesamtoberfläche der Haut ausmachen würden (12, 52). Dieser Anteil trifft nur für einzelne Regionen wie z.B. den Unterarm zu, welcher eine geringe Follikelzahl mit kleinem Reservoir aufweist (51):

Die Bildung der Haarfollikel ist in der frühen Fetalperiode abgeschlossen (18). Nach der Geburt bleibt die Zahl der Haarfollikel unverändert. Das Wachstum des Körpers und der Haut führt jedoch zu erheblichen regionalen Unterschieden in ihrer Verteilung. So ist das Wachstum des Kopfes im Vergleich zu den Extremitäten deutlich geringer, was eine höhere Dichte an Haarfollikel zur Folge hat. Otberg et al. (51) ermittelten die Follikeldichte und Größe der Haarfollikelöffnungen von verschiedenen Hautarealen. Die größte Follikeldichte fand sich an der Stirn, der größte mittlere Durchmesser bei deutlich geringerer Dichte an der Wade. Das kalkulierte follikuläre Volumen an diesen Stellen entsprach dem des angenommenen Reservoirs des SC.

### **1.5.2 Haarfollikeltypen**

Außer an den Handflächen, Fußsohlen und einzelnen Bezirken, wie dem Lippenrot und Teilen der Genitale, ist der Körper mit Haaren bedeckt. Aufgrund ihrer unterschiedlichen Morphologie lassen sich Lanugo-, Vellus-, und Terminalhaare voneinander unterscheiden (16):

Lanugohaare werden etwa im 4. Fetalmonat gebildet. Sie werden perinatal allmählich durch Vellushaare ersetzt, welche fast die gesamte Körperoberfläche bedecken. Sie haben einen Durchmesser von ca. 30µm, sind pigment- und marklos (50) und reichen kurz in die Dermis hinein. Intermediärhaare, welche einen Durchmesser > 30µm aufweisen, nehmen eine Position zwischen Vellus- und Terminalhaaren ein (51). Letztere sind ca. 50- 100µm dick, meist pigmentiert und erstrecken sich bis in die untere Dermis oder gar Subkutis. Sie finden sich lediglich am Kopf und in hormonsensiblen Regionen wie im Bartbereich, der Axilla oder im Schambereich. Auf der Kopfhaut

wachsen die Haarfollikel meist in Einheiten, wobei jeweils vier Terminal- und zwei Vellushaarfollikel eine Einheit bilden, die von Ästen desselben M. arrector pili umschlungen werden (53).

Morphometrische Messungen an histologischen Schnitten von Vellus- und Terminalhaaren der Kopfhaut und Retroaurikulärregion unserer Arbeitsgruppe ergaben, dass die verschiedenen Haarfollikeltypen homogene Gruppen bilden (17):

Terminalhaarfollikel (THF) weisen demnach eine Gesamtlänge von ca. 3900µm auf. Das untere Ende des Infundibulum, dem Eingang der Talgdrüse entsprechend, liegt in etwa 580µm, die Wulstregion in etwa 1200µm Tiefe. Hingegen dehnt sich in den ca. 650µm langen Vellushaarfollikeln (VHF) das Infundibulum bis zu 225µm Tiefe aus, während das obere Ende der Wulstregion etwa 360µm unter der Hautoberfläche liegt. Unterschiede bestehen auch im oberflächlichen Bereich. So ist der mittlere Durchmesser der Öffnung der THF etwa doppelt so groß wie der von VHF (170µm im Vergleich zu 85µm). Weitere Messungen in die Tiefe ergaben, dass topisch applizierte Stoffe in VHF nur ein relativ oberflächliches Reservoir bis in etwa 100µm Tiefe bilden, während es sich in THF bis zu etwa 300µm erstreckt.

### **1.5.3 Haarzyklus**

Das Haarwachstum erfolgt beim Menschen nicht kontinuierlich, sondern asynchron. Dies gewährleistet einen gleichmässigen Haarbestand. Grundlage für die Regulation des Haarzyklus bildet die Interaktion zwischen follikulären Stamm-, und dermalen Papillenzellen (54). Der Zyklus unterliegt einer intrinsischen „Uhr“ und wird durch extrinsische Signale wie Hormone, Retinoide, Wachstumsfaktoren, Neuropeptide moduliert.

Alle Follikel durchlaufen dabei einen spezifischen Wachstumszyklus, in dem sich Phasen der Aktivität mit denen der Ruhe abwechseln (55). In der Anagenphase kommt es zu einer rapiden Proliferation der Haarmatrixzellen. Dies führt zur Bildung des Haarschaftes und der inneren und äußeren Haarwurzelscheide. Das Haar bleibt durchschnittlich über zwei bis drei Jahre in dieser aktiven Phase. Während der nur wenige Wochen dauernden Katagenphase sistiert die Mitoseaktivität der Matrix. Der untere Teil des Follikels geht zu weiten Teilen in Apoptose und wird resorbiert.

Das Haar wandert dabei langsam nach außen, zieht dabei die äußere Wurzelscheide und die geschrumpfte dermale Papille mit sich. Es bleibt etwa in Höhe des Wulstes locker verankert liegen. Mit Beendigung dieses Prozesses setzt sich der Follikel von der

dermalen Papille ab und geht in die Telogenphase, einen Ruhezustand über, welche etwa drei Monate dauert. Der Follikel kehrt spontan oder durch ein Ausreißen des Haares in die Anagenphase zurück, indem Stammzellen aktiviert werden, deren Sitz in der Region des Wulstes in der äußeren Haarwurzelscheide vermutet wird. Diese und die dermale Papille wandern wieder nach unten und organisieren sich neu. Die neue Matrix beginnt erneut, sich zu teilen und der untere Teil des Follikels bildet sich zurück.

#### **1.5.4 Konzept der „offenen“ und „geschlossenen“ Haarfollikel**

In verschiedenen Studien wurde beobachtet, dass ein applizierter Stoff nicht in alle Haarfollikel penetriert. Es konnte ein positiver Zusammenhang zwischen dem Haarwachstum (6, 8), der Sebumproduktion und der Penetration von Stoffen gezeigt werden (56). Die Öffnungen ruhender Haarfollikel seien wahrscheinlich durch eine Art „Deckel“ aus abgestorbenen Korneozyten und Sebum verschlossen, was das Eindringen von topisch applizierten Stoffen behindere. Die meisten „verschlossenen“ Follikel befänden sich am Unterarm, während seborrhische Areale wie Rücken oder Stirn eine Vielzahl „offener“ Follikel aufweisen würden (36). Stoffe penetrieren also bevorzugt in „aktive“ und „offene“ anstelle von „inaktiven“ bzw. „verschlossenen“ Follikeln (56).

Auf Basis dieser Überlegungen wurde das Cyanoacrylate Skin Surface Stripping (CSSS), ein Abriss mit Cyanoacrylat, als Vorbehandlung von Penetrationsstudien *in vitro* und *in vivo* eingeführt. Dabei wird ein Sekundenkleber auf die Haut aufgetragen und nach seiner Polymerisation abgezogen. Abgesehen von einer leichten Zerstörung des SC, werden dabei abgeschilferte Hornzellen und Talg aus den Haarfollikeln entfernt und diese somit für das Eindringen von Stoffen „geöffnet“ (57).

Eine Verbesserung der Penetration ist außerdem für die Anwendung von Massage beschrieben (6, 8). Lademann et al. (7) beschreibt den Pumpmechanismus der Massage durch die Kutikulazellen. Es wird vermutet, dass dabei Partikel, die eine den Kutikulazellen ähnliche Größe haben, entlang des Haarschaftes in die Tiefe der Haarfollikel befördert werden. Die Massage sei dabei der kontinuierlichen Bewegung in natürlichem Gewebe vergleichbar.

Toll et al. werteten die Penetration von soliden Polysterolpartikeln (0,75µm- 6µm) in Terminalhaare menschlicher Haut *ex vivo* nach Anwendung verschiedener Vorbehandlungstechniken aus und konnte neben Wärmebehandlung und Massage v.a. für CSSS eine Verbesserung der follikulären Penetrationsrate und – tiefe feststellen (8).

## **1.6 Bestimmung der Penetration topisch applizierter Substanzen**

Verschiedene *in vivo* und *in vitro* Methoden wurden etabliert, um die Penetration und perkutane Absorption topisch applizierter Stoffe zu quantifizieren.

Aus ethischen Gründen werden Untersuchungen *in vitro* bevorzugt. Neben dem Einbringen von Hautproben in Diffusionszellen zählt die Tesa®- Filmabrissmethode (bzw. Tape Stripping), wobei Teile des SC schichtweise abgetragen werden, zu den Standardmethoden der Penetrationsmessungen.

Die selektive Untersuchung der Follikelpenetration ist theoretisch zwar durch einen Vergleich der Resorptionsraten in follikelfreier und normaler Haut möglich (58), praktisch ergeben sich jedoch Schwierigkeiten durch die unterschiedliche Beschaffenheit des SC und insofern schlechtere Vergleichbarkeit der Hautproben. Die mikroskopische Untersuchung von histologischen Schnitten erlaubt eine semiquantitative Auswertung, jedoch keine exakte Quantifizierung und kinetische Messungen.

*In vivo* besteht die Möglichkeit, die Konzentrationen von bestimmten Substanzen im Serum, im Urin oder den Faeces zu bestimmen. Des Weiteren kann die follikuläre Penetration durch selektive Blockade von Haarfollikeln (41) oder das Differentielle Tape Stripping (DTS) (59, 60) bestimmt werden. Dabei wird mittels Tape Stripping das Reservoir des SC abgetragen und anschließend Cyanoacrylat aufgetragen, welcher in die Haarfollikel läuft und polymerisiert, so dass der follikuläre Anteil einer topisch applizierten Substanz separat erfasst werden kann. Neuere Ansätze zur Evaluierung der Kinetik fluoreszierender Substanzen in der Haut und in Haarfollikeln beruhen auf der Konfokalen Laser Scanning Mikroskopie (61, 62).

## **1.7 Topische Applikation von Partikeln**

Moderne Konzepte im Bereich der gezielten Pharmakotherapie basieren auf der Nutzung von Mikro- und Nanopartikeln. Partikuläre Systeme zeigen dabei die Tendenz, in Haarfollikeln zu aggregieren (7).

Mit dem Begriff Mikrosphären bezieht man sich generell auf Partikel mit einer Größe von 50nm bis 2mm. Nanopartikel (NP) sind definiert als Partikel einer Größe von unter 100nm, wobei deren Agglomerate auch größer sein können (63).

Polymere Mikrosphären können aus verschiedensten natürlichen und synthetischen Stoffen hergestellt werden und finden verschiedenste Anwendung in der Biomedizin. Sie können mit chemischen, magnetischen, radioaktiven oder fluoreszierenden Markern

oder funktionellen Gruppen bestückt sein bzw. ein Immunogen (z.B. Protein, Peptid oder Nukleinsäuremolekül) einschließen (64). Neben der Entwicklung mechanischer Vorbehandlungstechniken ist die Optimierung der physikochemischen Eigenschaften der Präparate entscheidend, um die Konzentrationen topisch applizierter Stoffe im Haarfollikel und in seiner Umgebung zu maximieren und gegebenenfalls die kontrollierte und prolongierte Freisetzung ihres Inhalts zu ermöglichen (65).

### **1.7.1 Größenabhängige Penetration von Partikeln in Haarfollikel**

Rolland et al. gehörten zu den ersten, die eine Verbesserung des transdermalen Transports durch partikelassoziierte Stoffe zeigten (52). Man beobachtete dabei die bevorzugte Penetration von 5µm PLGA- Mikrosphären in Haarfollikel *in vitro* und *in vivo* am Tiermodell und in menschliche Haut. Die Deposition von 5µm großen, mit Methylenblau beladenen Nylon- Mikrosphären in Haarfollikel von Ratten konnte durch Mordon et al. gezeigt werden (66). Ähnliche Beobachtungen machten Schäfer et al. welche demonstrierten, dass Mikropartikel zwischen 3µm und 10µm nur über Haarfollikelöffnungen penetrieren, während kleinere < 1µm auch im SC zu finden sein, größere > 10µm jedoch auf der Oberfläche liegen blieben (57).

Teichmann et al. (67) konnten zeigen, dass die Penetration von Fluorescein enthaltendem Hydrogel, appliziert auf die Wade von Probanden, durch vorheriges Auftragen von 5µm Polysterolpartikeln deutlich verringert wurde im Vergleich zum Auftragen ohne vorherige Applikation der Mikropartikel. Histologische Untersuchungen an Schweinehaut zeigten, dass die Partikel die Haarfollikelöffnungen blockierten und somit die Penetration des Farbstoffes verhinderten.

Die oben erwähnten Untersuchungen von Toll et al. dokumentieren eine bessere Penetration für Mikropartikel < 1,5µm im Vergleich zu größeren Partikeln (8).

Die follikuläre Penetration ist auch relevant für kleinere Partikel.

Kohli et al. (68) verglichen die Penetration von 50nm, 100nm, 200nm und 500nm Latexpartikeln verschiedener Oberflächenladungen auf exzidierte Schweinehaut in einer Diffusionskammer. Allein negativ geladene 50nm und 500nm Partikel konnten dabei die Haut penetrieren.

Alvarez- Román et al. (69) untersuchten die Penetration von 20nm und 200nm Polysterolpartikeln in Schweinehaut *ex vivo*. Die Visualisierung mittels Konfokaler Laser Scanning Mikroskopie ergab, dass die Partikel sowohl in den Furchen der Haut, als auch zeitabhängig und unter Bevorzugung der kleineren Größe in den

Haarfollikelöffnungen aggregierten. Auch Shim et al. (40) zeigten eine effiziente Penetration kleiner Partikel in Versuchen an exzidierte Haut von Meerschweinchen am Diffusionsmodell. Es fanden sich mehr 40nm als 130nm Partikel in der Rezeptorflüssigkeit, während der Gehalt an Partikeln im SC keine Größenabhängigkeit zeigte.

Während einige Untersuchungen am Schwein keine Penetration von Zinkoxid bzw. Titaniumdioxid durch die Haut ergaben (70), demonstrieren andere Studien eine erhöhte Konzentration von Titaniumdioxid aus Sonnencremes in Epidermis und Dermis nach regelmäßiger dermaler Applikation (71). Lademann et al. (72) konnten zeigen, dass ca. 100nm große Titaniumdioxidpartikel, appliziert in Sonnencreme auf den Unterarm von Probanden, allein in den obersten Schichten des SC, nicht aber der interfollikulären Epidermis zu finden waren. Die Partikel reichert sich in einigen Haarfollikeln an, wobei die Penetrationstiefe von den Follikelöffnungen bis in tiefere Schichten reichte.

Die Penetration von kovalent an 320nm NP gebundenes Fluoresceinamin wurde im Vergleich zur nicht partikelassoziierten Form des Stoffes in Schweinehaut und in menschlicher Haut (Wade) untersucht (7). Am Schweinemodell fand sich nur nach Anwendung einer Massage eine deutlich tiefere Penetration des partikelgebundenen Farbstoffes. Die Massage wurde dementsprechend in das Protokoll für die Untersuchungen an den Probanden aufgenommen. Partikelgebundenes Fluorescein konnte bis zu 10 Tagen, im Vergleich zu vier Tagen nach Applikation des einfach gelösten Stoffes, in den Haarfollikeln gespeichert werden.

Lademann et al. 2006 (73) konnte zeigen, dass die Partikelkonzentration nach 30min in der Hornschicht acht mal höher als in den Haarfollikeln war. Während Partikel auch nach 10 Tagen noch in letzteren detektiert wurden, betrug die Speicherzeit im SC nur ca. 24h.

Das SC und die Haarfollikel stellen also ein potentielles, wenn auch ungleich großes Reservoir für topisch applizierte Stoffe dar. Das SC ist multiplen Umwelteinflüssen ausgesetzt und unterliegt einem kontinuierlichen Erneuerungsprozess.

Das Haarwachstum und die Sebumproduktion können Stoffe wieder aus dem Haarfollikel hinaus befördern. Dies sind sehr langsame Vorgänge, die neben der Penetration in das umliegende Gewebe das follikuläre Speichervermögen begrenzen.

### **1.7.2 Solide und semi- solide Partikel und ihre Anwendungsmöglichkeiten als Wirkstoffträger**

Nicht abbaubare, solide Partikel aus Gold, Silicon, Latex oder Polysterol sind effiziente Träger bioaktiver Substanzen. Da sie ihre Inhaltsstoffe vor Abbau schützen, zeigen an sie gekoppelte Wirkstoffe eine prolongierte Freisetzung und verlängerte Wirkzeit.

Verschiedene Studien zeigen die Aufnahme von Partikeln in LZ, die Induktion einer effizienten MHC- Klasse I- Präsentation und CD8+ T- Zell Aktivierung sowie die Initiierung einer humoralen und zellulären Immunantwort nach Applikation exogenen Antigens (74) auf Latex- (75), Gold (76) -, oder Polysterolpartikeln (77). Solide Partikel in dermatokinetischen Modellen sind Gegenstand aktueller Untersuchungen.

Zu den biologisch abbaubaren und klinisch nutzbaren Partikeln gehören z.B. Liposomen, PLGA- (78), PLA- (79, 80) Mikrosphären, das polymere Material Chitosan die neueren Formulierungen der ISCOMS (immune-stimulating complex) (81) oder der Solid Lipid Nanopartikel (4).

Verschiedene Arbeitsgruppen zeigten die Aufnahme von PLGA- und PLA- Partikel in DZ (79, 82). Mit eingeschlossenen Peptiden, Proteinen oder Plasmid- DNA konnte eine starke Immunantwort mit Antikörpern, Zytotoxischen T- Lymphozyten und mukosalem Schutz erzeugt werden .

Verschiedene Ansätze in der Entwicklung von Impfungen gegen Infektionskrankheiten oder Tumore beruhen auf Liposomen (83). In diese Phospholipidvesikel eingeschlossenen Moleküle können dabei gezielt in die Haarfollikel eingebracht werden und zeigen eine tiefere Penetration als nicht partikuläre Stoffe (84-86).

### **1.7.3 Vehikel zur Applikation der Partikel**

Neben der Wahl der Größe scheint auch die Wahl des Vehikels einen Einfluss auf die folliculäre Penetration zu haben.

Verschiedene Arbeitsgruppen beobachteten die bevorzugte folliculäre Akkumulation lipophiler Stoffe. (87). Die Penetration weniger lipophiler Substanzen könne durch die Applikation in 30%- iger Ethanollösung verbessert werden (88). Eine Beimischung von Ethanol scheint die intrafolliculäre Penetration von Stoffen zu verbessern (40). Ethanol ist als Lösungsmittel gut mit Sebum mischbar, bewirkt eine Schwellung des SC und beeinflusst den Interzellulärraum so, dass Stoffe besser penetrieren können (89).

Jacobi et al. (90) verglichen die Penetration des lipophilen Curcumin und des hydrophilen Patent blue V in reinem Öl bzw. Wasser oder einer o/w Emulsion am Schweinmodell und gesunden Probanden. Curcumin zeigte eine bevorzugt

interzelluläre Penetration. In einer späteren Studie konnte neben dem Eindringen in das SC auch eine folliculäre Penetration festgestellt werden. Das hydrophile Patent blue V konnte unabhängig von der Applikation in Wasser oder o/w Emulsion v.a. in Haarfollikeln detektiert werden.

Verschiedene Autoren verweisen auf die besondere Rolle der Haarfollikel als Shuntweg für hydrophile Stoffe, welche zu groß sind, um durch das SC zu penetrieren (40, 41, 91).

## **1.8 Transkutane Vakzinierung - Applikation von immunogenen Partikeln**

In der gezielten Pharmakotherapie transkutan applizierter Wirkstoffe wird u.a. im Bereich der Gen-, Stammzell- und Immuntherapie geforscht. Neueste Ansätze setzen auf Immunisierungsstrategien mit transkutan applizierten Immunmodulatoren, welche APZ direkt erreichen können.

### **1.8.1 Möglichkeiten der Transkutane Vakzinierung**

Sowohl *in vitro* als auch *in vivo*, am Tiermodell (92) und in verschiedenen klinischen Studien, konnte gezeigt werden, dass durch transkutane Immunisierung (transcutaneous immunization/ TCI) eine effiziente humorale und zelluläre Immunantwort gegen topisch applizierte Peptide (93), Proteine (94), und DNA (95, 96) initiiert werden kann (27, 97-99). Dabei können auch Partikel über 500 Da die Hautbarriere überwinden (13).

Die Arbeitsgruppe um Glenn et al. war die erste, welche die Möglichkeit der TCI mit hitzelabilem Enterotoxin von *E. coli* (LT), einem Proteinantigen von 86000 Da zeigte (100). Für LT enthaltende Pflaster konnte in mehreren klinischen Studien eine immunstimulierende Wirkung gezeigt werden (96, 101-103).

Für die Therapie von Tumoren oder Infektionskrankheiten kommt LZ und Dermalen DZ aufgrund ihrer Fähigkeit zur Kreuzpräsentation eine besondere Rolle bei der Induktion einer CD8+ T- Zelle vermittelten Immunantwort zu (28).

Während sich der Muskel, in den üblicherweise Impfungen appliziert werden, nicht durch effiziente Antigenpräsentation auszeichnet (76), findet sich in der Haut eine Vielzahl von APZ. Zahlreiche vergleichende Studien konnten zeigen, dass intra- oder transdermale Impfungen eine vergleichbare, wenn nicht gar besser Immunantwort im Vergleich zu intramuskulären Injektionen hervorriefen und dies bei teilweise deutlicher



Reduktion der Standarddosis (13, 104, 105). Fan et al. beobachteten eine Abhängigkeit der TCI von intakten Haarfollikeln (97).

### **1.8.2 Mechanische Penetrationsverstärker und immunstimulatorische Effekte**

Zu den mechanischen Penetrationsverstärkern topisch applizierter Wirkstoffe gehört u.a. das Tape Stripping. Dabei wird ein Klebestreifen auf die Haut geklebt und anschließend mit einem Ruck abgerissen, so dass Teile des SC entfernt werden. Andere nicht- bzw. semi- invasive Methoden zur Vorbereitung der Haut sind die Abschürfung der obersten Schichten des SC (106), die Depilation (107), die Hyperthermie (108), die Hydratation der Hornschicht (13), die Applikation penetrationsfördernder Substanzen wie z.B. Ethanol oder gar der Einsatz weiter entwickelter, an dieser Stelle nur zu erwähnender Technologien wie Elektroporation, Laser- oder Hitzeablation, Iontophoresis, Sonophoresis, Liquid Jet-Injektionen u.a. (109).

Ein CSSS verbessert durch die leichte Zerstörung der Hautbarriere und die Öffnung der Haarfollikel neben der inter-, auch die intrafollikuläre Penetration und hat durch zusätzliche immunstimulierende Effekte Bedeutung für Immunisierungsstrategien.

1982 zeigte die Gruppe von Streilein et al. (33) am Mausmodell, dass nach der Anwendung von einem Tape Stripping eine Aktivierung von LZ, gefolgt von ihrem Verschwinden aus der Epidermis, erfolgte. Strid et al. vermuten, dass die Reifung der LZ durch das Tape Stripping, die Wanderung zu den Lymphknoten jedoch durch anschließende Exposition eines Antigens bewirkt wird (26, 110).

Vogt et al. 2008 konnten die Induktion einer effizienten antigenspezifischen zellulären Immunantwort nach Applikation von Influenza- Impfstoff *in vivo* nach Vorbehandlung der Haut mit CSSS zeigen (99).

Für die Aktivierung von LZ (111) und die Induktion Zytotoxischer T- Zellen (93) *in vivo*, z.B. nach Applikation eines transkutanen Impfstoffes, scheint die Störung der Hautbarriere notwendig (31). Die Barrierezerstörung dient zum einen der Verbesserung der Penetration von Molekülen. Die Immunantwort kann durch Koadministration eines Adjuvanz wie z.B. Cholera- Toxin (110, 112) oder LT (94, 102, 113) noch verstärkt werden. Die Störung der Hautbarriere (93) bzw. die Bindung eines Adjuvanz (114) an Keratinozyten bewirkt die Sekretion verschiedener Zytokine. Diese stimulieren LZ zur Maturation und Migration und fördern deren Kapazität zur Antigen- und

Kreuzpräsentation (115). Zytokine sind auch an der Modulierung einer Th1 oder Th2 (24), d.h. einer zellulär, oder humoral gewichteten Immunantwort beteiligt (116).

### **1.8.3 Immunisierung mit Partikeln- Aufnahme von Partikeln von DZ *in vitro***

Scheicher et al. (77) konnten am Mausmodell zeigen, wie die Aufnahme partikelgebundener Antigene durch knochenmarksstämmige DZ *in vitro* deren Aktivierung und Kapazität zur Antigenpräsentation im Vergleich zu freiem Antigen steigerte. Shen et al. (117) beschreibt die gesteigerte Präsentation exogenen Ovalbumins in geklonten DZ bei Vorlage des Antigens in partikulärer Form.

Mikropartikel einer Größe unter 5µm können von verschiedenen phagozytierenden APZ aufgenommen werden (64). Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe zeigten die Aufnahme von 40nm, 750nm und 1500nm Partikeln durch LZ *in vitro* (9) bzw. von 40nm, 200nm und Viruspartikeln ähnlicher Größenordnung *in vivo* am Mausmodell (118).

Verschieden Studien weisen darauf hin, dass kleinere Partikel, idealerweise unter 0,5µm bevorzugt von DZ internalisiert werden. Fifi et al. (119) zeigte am Mausmodell die Überlegenheit von an 40nm bis 50nm Polysterolpartikel gebundenen Antigenen nach intradermaler Injektion im Vergleich zu größeren Partikeln.

Partikelgebundene Impfstoffe scheinen auch ohne zusätzliche verstärkende Maßnahmen eine adäquate Immunantwort generieren zu können. Die Partikel selbst fungieren als Adjuvanz, indem sie durch die Förderung der Aufnahme durch APZ immunstimulierend wirken (119, 120).

## 1.9 Zielstellung

Die Optimierung des Vehikels bzw. des Applikationsprotokolls für NP hat besondere Bedeutung, da eine Verbesserung der Penetration zum einen die Reservoirfunktion des SC und der Haarfollikel vergrößern vermag und zum anderen bestimmte follikelassoziierte Strukturen bzw. Zellpopulationen gezielt erreicht werden können.

Ziel der Arbeit war es, den Einfluss der Formulierung und verschiedener Vorbehandlungstechniken auf das Penetrationsverhalten von 40nm und 200nm soliden fluoreszierenden Polyesterolpartikeln zu untersuchen.

Beide Partikelgrößen wurden dabei jeweils in wässriger Lösung, PBS, und lipophiler Grundlage, Basiscreme, auf nicht vorbehandelte, CSSS vorbehandelte bzw. nach dem Auftragen mit Massage behandelte Haut appliziert. Die Untersuchungen des interfollikulären bzw. follikulären Reservoirs lassen sich grob in drei Teile gliedern.

1. Das Differentielle Tape Stripping ist eine nicht- invasive, auch *in vivo* durchführbare Methode, welche es durch eine Kombination der Tesa®- Film- Abrisstechnik und CSSS erlaubt, das interfollikuläre bzw. follikuläre Reservoir der insgesamt in die Haut penetrierten NP separat zu quantifizieren. Zusätzliche Untersuchungen mit Konfokaler Laser Scanning Mikroskopie dienten dazu, das Spreiten von NP über die Applikationsfläche hinaus zu untersuchen.

2. Die Erstellung der Hornschicht- und Penetrationsprofile diene zur Einordnung der im DTS ermittelten Ergebnisse in die gesamte Hornschicht. Dabei sollte v.a. die Annahme verifiziert werden, dass der dabei bestimmte interfollikuläre Anteil den größten Teil der insgesamt penetrierten NP repräsentierte.

Anders als durch die Quantifizierung des Reservoirs, kann mittels der Penetrationsprofile das Penetrationsverhalten der Partikel im SC differenzierter ausgewertet werden.

Anhand der Hornschichtprofile, welche Aussagen über die pro Filmstreifen entfernte Menge an Korneozyten geben, kann das Ausmaß der Barrierestörung durch CSSS und dessen Effekt auf das Penetrationsverhalten im SC bestimmt werden.

3. Die Anfertigung und Auswertung von Gewebsschnitten erlaubte die genaue anatomische Lokalisation der NP in den Haarfollikeln. Mittels einer Lagerhanszellfärbung sollte die Nähe dieser immunkompetenten Zellen zu den follikulären Strukturen dargestellt werden.

Die semiquantitative Evaluierung von 40nm und 200nm Partikeln in PBS bzw. Basiscreme nach den verschiedenen Vorbehandlungstechniken erlaubte eine genauere, qualitative Untersuchung und fluoreszenzmikroskopische Visualisierung des follikulären Penetrationsverhaltens.

Der Einfluss von Formulierung und Vorbehandlungstechniken auf die Penetration im SC und in die Haarfollikel sollten in dieser Arbeit unter Bezugnahme auf den bisherigen Forschungsstand analysiert werden.

Die Ergebnisse sollen der Entwicklung eines Protokolls zur topischen Applikation von wirkstoffbeladenen NP dienen. Diese eröffnen neue Möglichkeiten in der Dermatotherapie, indem sie ein gezieltes Heranbringen von bioaktiven Substanzen an Zielstrukturen wie die Talgdrüse oder Zellpopulationen, wie z.B. APZ und Stammzellen ermöglichen.

## **2 Materialien und Methoden**

### **2.1 Einführung: Die Tesa®- Film- und die Cyanoacrylat- Abrisstechnik**

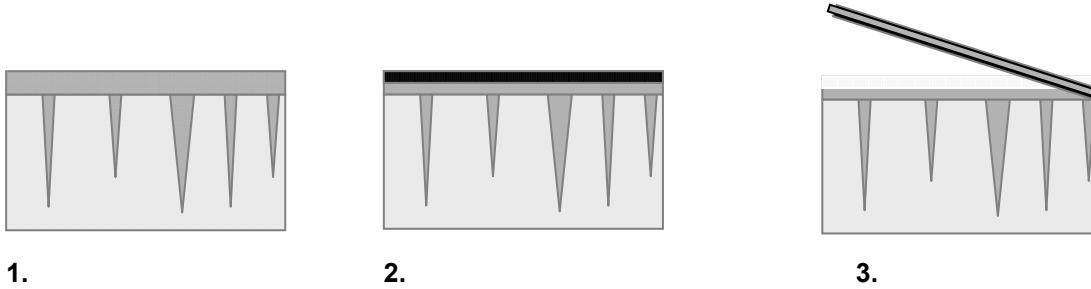
Die Tesa®- Film- und die Cyanoacrylat- Abrisstechnik stellen nicht- invasive Methoden dar, um die transepidermale und intrafollikuläre Penetration topisch applizierter Stoffe zu untersuchen. Sie finden auch Anwendung bei Penetrationsuntersuchungen an exzidiertem Humanhaut (121). Es sind anerkannte Verfahren zur Untersuchung des SC, der Haarfollikel und der Dermatopharmakokinetik von auf die Haut aufgetragenen Stoffen. Sie werden in dieser Arbeit in verschiedener Art und Weise Anwendung finden und sollen deshalb an dieser Stelle näher beschrieben werden.

#### **2.1.1 Die Tesa®- Film- Abrisstechnik**

Die Tesa®- Film- Abrisstechnik, bzw. das Tape Stripping, welche 1939 das erste Mal von Wolf et al. beschrieben und später von Pinkus (122) ausgeweitet wurde, stellt eine anerkannte Methode zur Untersuchung des Penetrationsverhaltens von topisch applizierten Substanzen dar und basiert auf dem schichtweisen Abtragen des SC (123). Mit Hilfe des Tape Strippings lassen sich die Korneozyten von der Oberfläche des SC bis in dessen tiefe Schichten entfernen, indem sie durch wiederholtes Aufbringen eines adhäsiven Filmstreifens schichtweise auf diesen übertragen werden. Dabei wird Tesa®- Filmstreifen auf das zu untersuchende Hautareal aufgeklebt, unter gleichmäßigem Druck eine definierte Anzahl darüber gerollt und der Filmstreifen anschließend abgezogen (Abbildung/ Abb. 3).

Verschiedene Faktoren beeinflussen die pro Filmstreifen entfernte Menge an Korneozyten (124). Neben externen, durch Versuchsaufbau und –durchführung bedingten, sind interne Faktoren der Haut zu berücksichtigen. Der Einsatz der Rolle, mit welcher der Filmstreifen behandelt wird, dient dazu, den Einfluss der zahlreichen Falten der Haut auf die Zahl der entfernten Korneozyten zu minimieren. Dadurch wird die Haut etwas gedehnt und die Falten abgeflacht, so dass die gesamte Hornschicht Kontakt zu dem Tape erhält (125).

Neben den Korneozyten werden auch topisch applizierte Stoffe auf das Tape übertragen. Es bietet sich die Möglichkeit, deren Konzentrationen auf den einzelnen Klebefilmstreifen, d.h. in den verschiedenen Lagen des SC, zu ermitteln.



**Abbildung 3 Tesa®- Film- Abrisstechnik**

Auf das SC (1) wird ein Filmstreifen aufgebracht (2) und mit einer Rolle darüber gerollt, um Hautfurchen zu minimieren. Mit dem Abziehen des Tapes wird neben Teilen der Hornschicht (3) auch der Anteil der in diese Zellschichten des SC penetrierten topisch applizierten Substanz entfernt.

Neben der Evaluierung der Bioverfügbarkeit von Stoffen im SC können mittels dieser Methode Zellbiopsien zur mikrobiologischen Untersuchung gewonnen werden. Sie erlaubt auch den Erhalt von Informationen über Regenerationsvorgänge in der Hornschicht nach Störung ihrer Integrität (126) oder eine Sensibilisierung vor Applikation eines Allergens .

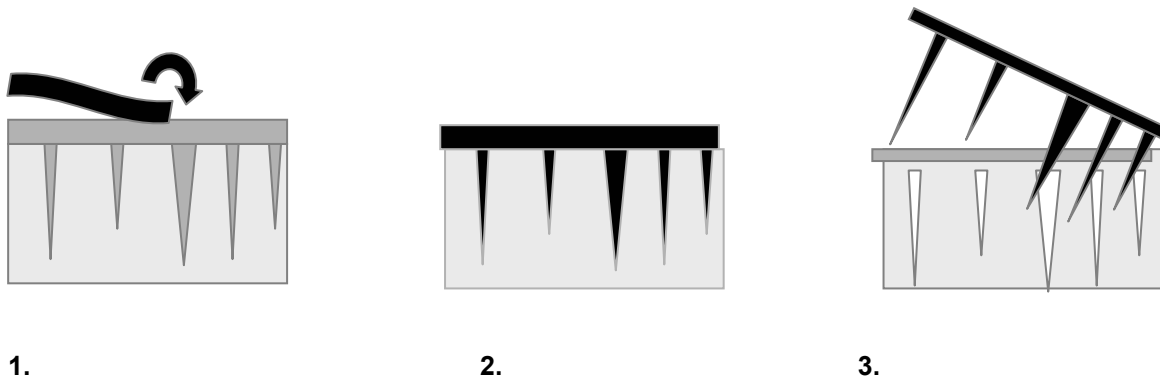
Studien konnten zeigen, dass sich der Grossteil einer topisch applizierten Substanz in den obersten Lagen der Hornschicht befindet (72, 89, 121, 127, 128). Die Ergebnisse sind u.a. abhängig von den chemischen Eigenschaften des Stoffes. Bei der Untersuchung der Penetration topisch applizierter Stoffe ins SC mittels der Tesa®- Film- Abrisstechnik kommt den ersten 3- 5 Filmstreifen besondere Bedeutung zu (129).

### 2.1.2 Die Cyanoacrylat- Abrisstechnik

Die Cyanoacrylat- Abrisstechnik, das Cyanoacrylat Skin Surface Stripping (CSSS), ist eine andere nicht- invasive Methode, um Teile des SC zu entfernen bzw. Haarfollikel zu untersuchen.

Unter Cyanoacrylat (Cyanoacrylat oder Alkylcyanacrylat) versteht man polymerisierbare, bei Raumtemperatur flüssige chemische Verbindungen, welche unter leichtem Druck und Feuchtigkeit schnell polymerisieren und ein starkes, optisch transparentes Band bilden. Einige Tropfen Cyanoacrylat werden auf das zu untersuchende Hautareal gegeben, mit einem Objektträger verstrichen und rasch ein Tesa® -Filmstreifen darüber geklebt. Nach der Aushärtung und Polymerisation des Sekundenklebers wird das Tape abgezogen und mit ihm einige Schichten des SC sowie der Inhalt von Haarfollikeln entfernt (Abb. 4).

Marks und Dawber (130) benutzten zur Herstellung von Hautoberflächenbiopsien Cyanoacrylat. Diese „Skin surface biopsy“ diente zur Untersuchung des oberflächlichen SC gesunder und erkrankter Haut (131, 132):



**Abbildung 4 Cyanoacrylat- Abrisstechnik**

Cyanoacrylat wird auf dem Hautareal verteilt und ein Tesa®- Filmstreifen darüber gegeben (1). Der Sekundenkleber verteilt sich auf der Oberfläche des SC und in den Haarfollikeln (2). Nach seiner Polymerisation wird das Tape, zusammen mit Bestandteilen der Hornschicht, und dem Inhalt der Infundibula entfernt (3).

Holmes et al. sowie Mills und Kligman untersuchten mit dieser Methode VHF (133, 134). Die so genannte „cyanoacrylate follicular biopsy“ kann Anwendung finden bei zahlreichen Untersuchungen. Neben der von Retentionsprodukten, z.B. bei Akne (133, 135), eignet sie sich zur Analyse der mikrobiellen Besiedelung der Follikel (134) und der Wirkung von intrafollikulär wirkenden Medikamenten (136). Pagnoni et al. (49) ermittelten mittels CSSS die Follikeldichte und verglichen sie mit der Talgproduktion auf den untersuchten Hautarealen von Stirn, Nase, Wange und Kinn. Die CSSS- Technik erlaubt die Untersuchung der follikulären Penetration topisch applizierter Stoffe (60). Abgesehen von der Möglichkeit, auf diese Art und Weise eine Hautbiopsie zu entnehmen, dient das Verfahren der Öffnung von „inaktiven“, „geschlossenen“ Haarfollikeln. Holmes et al. (133) berichtet von einer Verstärkung des Talgausflusses nach CSSS. Indem der Klebstoff das Infundibulum ausfüllt und in diesem polymerisiert, werden mit der Entfernung des Filmstreifens Zelldetritus und Talg aus diesem entfernt. Für die Anwendung von CSSS konnte eine penetrationsverstärkende Wirkung gezeigt werden (8). Außerdem hat die ungleich stärkere Zerstörung der Hautbarriere durch CSSS im Vergleich zu Tape Stripping immunstimulierende Wirkung. Die Cyanoacrylat-Abrissmethode fand Anwendung in Protokollen zur TCI (27, 99).

## **2.2 Das Differentielle Tape Stripping**

Der erste Teil der Arbeit dient der quantitativen Bestimmung der topisch applizierten NP im SC und in den Haarfollikeln mittels des DTS (56, 60, 124). Dabei werden die nicht-invasiven Methoden Tesa®- Film- Abrisstechnik und CSSS kombiniert. Einzeln angewendet, kann mit ihrer Hilfe zwar die Konzentration einer in die Haut penetrierten Substanz ermittelt, dabei jedoch nicht zwischen inter- und intrafollikulärer Penetration unterschieden werden. Teichmann et al. beschreiben die Methode des DTS (60). Dabei wird zunächst die Tesa®- Film-Abrissmethode so lange durchgeführt, bis das SC vollständig von Partikeln befreit ist, und anschließend mit CSSS der Inhalt der Haarfollikel, einschließlich der darin befindlichen NP, extrahiert.

### **2.2.1 Hautmaterial**

Verwendung fand die Haut von gesunden Probandinnen, welche sich im Rahmen einer plastisch chirurgischen Operation einer Bruststraffung oder –verkleinerung unterzogen hatten. Die Untersuchungen fanden mit Einverständnis der Probandinnen, der Bewilligung der Ethik- Kommission der Charité Universitätsmedizin Berlin und gemäß den ethischen Grundsätze der Deklaration der Richtlinien von Helsinki statt.

Die Haut wurde innerhalb von 24 Stunden postoperativ im Labor der Hautklinik/ Charité weiterverarbeitet.

### **2.2.2 Die Nanopartikel**

In der vorliegenden Arbeit wurden FluoSpheres®- beads der Firma Molecular Probes, solide und kovalent mit Fluoreszenzfarbstoff beladene Polyesterpartikel, verwendet. Somit wurde sichergestellt, dass die später untersuchte Fluoreszenz auch tatsächlich den Partikeln und nicht etwa nur dem Farbstoff Fluorescein entspricht. Diese Polyesterpartikel können in relativ genauer Größe geliefert werden und haben eine solche Farbtintensität, dass auch einzelne Partikel visualisiert werden können. Die Experimente wurden mit gelb- grünen FluoSpheres®- NP der Größen 40nm und 200nm (Exzitations-/ Emissionsmaximum 505/ 515 nm) durchgeführt (137). Die verwendeten NeutrAvidin™ beladenen FluoSpheres® weisen fast neutrale Eigenschaften auf, so dass unspezifische Bindungen minimiert werden konnten. NeutrAvidin™ beladene FluoSpheres®- Partikel werden als 1%- ige Lösung in 50mM Natriumphosphat, 50mM Natriumchlorid, pH 7.5 plus 0.02% Tween 20 and 2– 5mM Natriumazid geliefert.



### 2.2.3 Nanopartikel in PBS- Lösung bzw. Basiscreme- Grundlage

Die NP wurden 0,01%-ig in PBS (Biochrom, L 182- 50) gelöst bzw. 0,1%-ig in Basiscreme DAC homogen verteilt.

Phosphat-Puffer-Saline (PBS) hat folgende Zusammensetzung: 137mM NaCl, 2,7mM KCl, 4,3mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 1,4mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ .

Basiscreme DAC (im folgenden Basiscreme bzw. BC) ist eine weiße, mit Wasser von der Haut abwaschbare Creme von schwachem Geruch. Sie hat amphiphile Eigenschaften. Pro 100g besteht sie aus 4g Glycerolmonostearat, 6g Cetylalkohol, 7,5g mittelkettigen Triglyceriden, 25,5g weißer Vaseline, 7g Macrogol-20-glycerolmonostearat, 10g Propylenglycol und 40g gereinigtem Wasser.

Für die wässrige Lösung wurden die NP 0,01%-ig in PBS pipettiert und für drei Minuten sonifiziert (Sonorex Super RK1020H, Bandelin Electronic, Berlin, Germany).

Mit Hilfe eines feinen Mikrospatels wurden die NP 0,1%-ig in BC vermischt. Die homogene Verteilung wurde mittels nur Sekunden dauernder Zentrifugation (Tischzentrifuge „Biofuge fresco“ Heareus, 4000rp) und fünfminütiger Behandlung mit MS 1 Minishaker IKA unterstützt.

Es wurden 20 $\mu\text{l}/\text{cm}^2$  der NP in PBS- Lösung bzw. 2mg/cm<sup>2</sup> der NP in BC auf die Haut aufgetragen. Die Konzentration der Partikel in wässriger Lösung bzw. lipophiler Grundlage entsprechen den üblicherweise aufgetragenen Mengen in unserer Arbeitsgruppe und wurden deshalb als Referenz genommen (9, 60). Die Partikelkonzentration ist zwar unterschiedlich in wässriger Lösung bzw. lipophiler Grundlage, gleicht sich jedoch durch die aufgetragene Menge wieder so aus, dass letztendlich je cm<sup>2</sup> die gleiche Menge an Partikeln verteilt wurde.

Die Menge der Partikel je ml Lösung wurde mit folgender Formel (137) berechnet:

$$\text{Number of microspheres/ml} = \frac{6C \times 10^{12}}{\rho \times \pi \times \Phi^3}$$

C= concentration of suspended beads in g/ml

$\Phi$ =diameter of microspheres in  $\mu\text{m}$

$\rho$  =density of polymer in g/ml

Demnach enthält 0,01%-iger Lösung von 40nm Partikeln 2,84 x 10<sup>12</sup> Partikel/ ml bzw. dieselbe Menge in 1g Creme. 0,01%-ige 200nm Partikel- hantige Lösung enthalten 2,27 x 10<sup>10</sup> Partikel/ ml bzw. /g.

Jede 40nm Mikrosphäre enthält  $3,5 \times 10^2$  Fluorescein- Äquivalente. Mikrosphären von 200nm Größe enthalten  $1,1 \times 10^5$  Fluorescein- Äquivalente.

#### **2.2.4 Vorbereitung der Hautareale**

Es war nicht praktikabel, alle Parameter an ein und derselben Hautprobe zu überprüfen. So wurde pro Probe der Einfluss der Vorbehandlungstechniken an einer Partikelgröße in einer Formulierung untersucht, d.h. z.B. das von 40nm NP in PBS. Unabhängig von der Applikationstechnik wurde die Haut zunächst mit destilliertem Wasser von den größten Verunreinigungen wie Blut und Fett befreit. Je Vorbehandlungstechnik wurden mindestens drei Hautareale vorbereitet ( $3 \times n=3$ ), indem diese mit Folienmarker eingezeichnet wurden. Die Flächen hatten eine Größe von  $2,5 \times 3\text{cm}^2$ .

#### **2.2.5 Auftragen der Partikel**

Auf die unbehandelte Haut wurden nun die Partikel aufgetragen. Das Auftragen der entsprechenden Menge an NP in PBS erfolgte tropfenweise und unter gleichmäßiger Verteilung mit der Pipettenspitze. Partikel in lipophiler Grundlage wurden mit Hilfe eines Spatels appliziert. Dieser wurde vor und nach der Aufnahme der entsprechenden Menge an NP in BC sowie nach deren Aufstreichen auf die Haut gewogen (Analysenwaage 770, Kern) und somit das Auftragen der exakten Menge an Creme sichergestellt.

Zur Untersuchung der Wirkung von Massage wurden die Partikel nach der beschriebenen Applikationstechnik für drei Minuten mit einem Massagerät (PC60, Petra Electric, Burgau, Germany, 3000 Oszillationen/ min.) einmassiert. Der auf den Massagekopf gezogene Fingerling wurde dazu vorher für 20 Minuten mit NP in PBS oder BC gesättigt.

Drei Hautareale wurden mit einem CSSS vorbehandelt. Das Verfahren diente hier zur Untersuchung des Effekts der „Öffnung“ von Haarfollikeln durch Entfernen von Talg und abgeschilferten Zellen aus dem Infundibulum. Dazu wurden vier Tropfen Cyanoacrylat (UHU® Sekundenkleber, UHU GmbH, Brühl), in Anlehnung an Untersuchungen in unserem Labor, die eine ideale Menge von 9 Tropfen je  $16\text{cm}^2$  als ideale Menge ermittelten, aufgetragen und mit einem Objektträger verteilt. Sofort im Anschluss klebte man Tesafilm darüber, bedeckte es mit einer Zwischenlage Papier und rollte 10 Mal mit einer speziellen Kunststoffrolle unter gleichmäßiger Druckausübung darüber, um die Hautfalten zu glätten und den Kleber gleichmäßig zu verteilen. Nach ca. 30 Minuten Trocknen, was eine vollständige Polymerisierung des Klebers gewährleistete, wurde der

Tesafilm ruckartig von der Haut entfernt. Die sich darauf befindlichen Haarfollikel und ausgerissenen Vellushaare konnten später unter dem Mikroskop ausgezählt werden. Das anschließende Auftragen der Partikel erfolgte in oben beschriebener Art und Weise. Die so vorbereiteten Proben wurden in einer feuchten Kammer bei 37°C für 4h inkubiert.

### **2.2.6 Differentielles Tape Stripping I: Bestimmung der Nanopartikel im Stratum corneum mittels der Tesa®- Film- Abrisstechnik**

Mittels der Tesa®- Film- Abrisstechnik lassen sich Korneozyten Schicht für Schicht auf einen adhäsiven Filmstreifen übertragen. Durch Wiederholung des Vorgangs kann das SC bis in dessen tiefe Schichten entfernt werden.

Nach der Inkubation der Proben wurde Tesa®- Film (Nr. 5529, Beiersdorf, Hamburg), dessen Länge das markierte Hautareal überschreitet, sowie eine Zwischenlage aus Papier auf das Hautareal aufgebracht. Zuvor behandelte man den wässrigen Überstand mit Warmluft so, dass er verdunsten konnte. Auch im Falle der Creme verwarf man nicht penetrierten Überstand, d.h. die ersten Tapes, nicht (89).

Mittels einer Kunststoffrolle wurde der Filmstreifen fest auf die Haut gepresst und jeweils 10 Mal unter gleichmäßigem Druck über das Hautareal gerollt. Das zu untersuchende Testareal, 2,5 x 3cm<sup>2</sup>, enthielt entweder eine Markierung durch einen Abdruck des markierten Hautareals bzw. wurde nun mit Folienmarker markiert. In einem letzten Schritt wurde der Korneozyten und NP enthaltende Filmstreifen ruckartig von der Haut entfernt.

Aufgrund der Annahme, dass sich der Grossteil der NP in den obersten Schichten des SC befindet, befestigte man nur die ersten fünf Filmstreifen auf nummerierte Halterungen (z.B. N 1 – 5), um sie zur weiteren Messung zu verwenden. Anschließend wurden ca. 15 weitere Abrisse getätigt, die das SC vollständig von den aufgetragenen Partikeln befreiten. Die letzten Filmstreifen wurden diesbezüglich unter dem Fluoreszenzmikroskop (BX60F3, Olympus, Hamburg, Germany) untersucht, jedoch nicht in die weiteren Messungen eingeschlossen.

### **2.2.7 Differentielles Tape Stripping II: Bestimmung der Nanopartikel in den Haarfollikeln mittels Cyanoacrylat- Abrisstechnik**

Nach dem Abtragen der NP aus der Hornschicht kann mittels CSSS der Inhalt der Haarfollikel bestimmt werden. Auch hier wurden vier Tropfen Cyanoacrylat (UHU® Sekundenkleber, UHU GmbH, Brühl) je 2,5 x 3cm<sup>2</sup> großem Hautareal homogen verteilt, Tesa®- Film aufgeklebt, mit einer Rolle seine gleichmäßige Adhäsion gewährleistet,

und dieser nach der Polymerisierung des Klebers entfernt. Neben Sebum und Zellresten haften auf dem Abriss die in die Haarfollikel penetrierten NP. Den beschrifteten CSSS- Filmstreifen (z.B. N- CSSS) befestigte man ebenfalls auf einer Halterung.

### **2.2.8 Quantitative Analyse der topisch applizierten Substanz im Stratum corneum und in den Haarfollikeln**

Zusammenfassend ist zu sagen, dass für jede Untersuchungseinheit (z.B. 40nm NP in PBS) je vorbereitetem Hautareal sechs Abrisse (fünf, welche repräsentativ für die Substanz im SC stehen und ein CSSS Abriss als Maß für die NP in den Haarfollikeln) zur weiteren Messung vorlagen. Für jede der zu vergleichenden Vorbehandlungstechniken waren auf drei Flächen NP appliziert worden. Aus den markierten Arealen wurden jeweils zwei Stenzen mit einem konstanten Durchmesser von 15mm gewonnen.

Die insgesamt zehn Stanzproben der fünf Filmstreifen des Tape Strippings wurden in eines, die zwei Stanzproben aus dem CSSS- Abriss in ein weiteres Oak- Ridge Röhrchen (Oak Ridge Centrifuge Tube, PPCO, 10ml, Nalge Nunc International) gegeben und jedem Behältnis 1,767 ml Ethanol (Uvasol, Merck, Darmstadt, Germany) hinzugefügt. Eine Behandlung der Oak- Ridge Röhrchen im Ultraschallbad (Sonorex Super RK1020H, Bandelin Electronic, Berlin, Germany, für 1 min.) und in der Zentrifuge (4x 1000 rpm, für 10 min. bei 20°C) löste die NP von den Filmstreifen. Der abzentrifugierte Überstand mit den NP wurde anschließend in Küvetten (Hellma Präzisionsküvetten aus Quarzglas, Suprasil®, Schichtdicke 5 x 5mm) gegeben und im Fluoreszenzspektrometer (Luminescent LS 50B, Perkin Elmer, Überlingen, Germany) im Wellenlängenbereich 505 – 600nm gemessen.

### **2.2.9 Photometrie und Fluoreszenz**

Zum besseren Verständnis der Bestimmung der fluoreszierenden NP aus den Filmstreifen ist eine kurze Beschreibung der Photometrie im Allgemeinen und der Fluoreszenzspektrometrie im Besonderen notwendig.

Die Photometrie beschreibt ein Messverfahren im Wellenlängenbereich des sichtbaren Lichtes, das z.B. zur Konzentrationsbestimmung von gelösten Stoffen in chemischen Proben dient. Das Prinzip der Photometrie beruht auf der Absorptions- bzw. Extinktionsmessung monochromatischen Lichtes beim Durchgang durch eine probenhaltige Küvette bzw. bei der Erstellung des Hornschichtprofils auch durch einen

Tesa®- Filmabriss. Gemessen wird mit der Wellenlänge, bei welcher die zu untersuchende Substanz ihr Absorptionsmaximum hat. Bei der Absorption wird ein bestimmter Energiebetrag aufgenommen, der von der Frequenz der elektromagnetischen Strahlung abhängt. Die Transmission (T) ergibt sich aus dem Verhältnis von geschwächter Lichtintensität (I) zu eingestrahelter Lichtintensität

$$(I_0): T = I / I_0.$$

Die Extinktion ist das logarithmische Maß für die Schwächung einer Lichtwelle durch Absorption und Streuung. Sie wird nach dem Lambert Beer Gesetz berechnet.

$$E = \ln I / I_0 = \epsilon \times c \times d$$

**E** = Extinktion, **ε** = Extinktionskoeffizient, **c** = Konzentration des Absorbers,  
**d** = Weglänge des Lichtstrahls durch das absorbierende System

Das Gesetz besagt, dass sich die Extinktion E einer Lösung direkt proportional zur Konzentration (c) der darin gelösten lichtabsorbierenden Substanz und der Schichtdicke (d) der Lösung verhält und abhängig vom Extinktionskoeffizienten (ε) ist. Das Lambert Beer Gesetz hat Gültigkeit für monochromatisches Licht und verdünnte Lösungen.

Fluoreszenz bezeichnet die Eigenschaft einiger Moleküle, Energie einer bestimmten Wellenlänge aufzunehmen, dadurch in einen „angeregten Zustand“ (138) zu gelangen und nach einer gewissen Zeit einen Teil der Energie wieder zu emittieren. Dieser als Fluoreszenz abgestrahlte Teil ist stets geringer als die absorbierte Energie, hat also eine größere Wellenlänge. Die Absorption von Energie in Form von Licht und die Emission von Energie in Form von Fluoreszenz kann nur bei bestimmten, für ein Molekül charakteristischen Wellenlängen erfolgen (139). Die Fluoreszenzphotometrie ist ein optisches Messverfahren zur Konzentrationsbestimmung fluoreszierender Substanzen. Es ist eine Methode der Spektrophotometrie, welches die Eigenschaft von mit kurzwelligem oder ultraviolettem Licht bestrahlter Fluoreszenz infolge seiner Anregung Licht abzusenden, nutzt. Ein Fluoreszenzspektrometer misst die Intensität des emittierten Fluoreszenzlichtes, sodass ein Rückschluss auf die Menge der sich in der Probe befindlichen Moleküle möglich ist.

Das an die verwendeten NP gebundene Fluorescein gibt bei Anregung mit blauem Licht (Absorptionsmaximum bei einer Wellenlänge von 496 nm, z.B. durch einen Argon- Ionen Laser) grünes Licht (Wellenlänge ca. 520 bis 530 nm) ab.

### **2.2.10 Statistik**

Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Programm R Version 2.6.1. Zur Auswertung der Ergebnisse des DTS wurde ein lineares gemischtes Modell verwendet, welches im Unterschied zum einfachen linearen Modell die Tatsache berücksichtigt, dass mehrere Messungen an einer Person stattfanden. Die Überprüfung der Normalverteilung und Streuung der Daten erfolgte mittels plot- und qqnorm Berechnungen. Mittelwerte und Standardabweichung wurden mit Hilfe des Software Programms Microsoft® Excel 2003 kalkuliert.

### **2.2.11 Kalibrierungskurven**

Zur genauen Quantifizierung der extrahierten Menge an NP wurden im Vorfeld 40nm bzw. 200nm Partikel in absteigenden Konzentrationen von 0,1% bis 0,0005% (40nm) bzw. 0,0001% (200nm) verdünnt und in jeweils 1,767 ml Ethanol gelöst. Dies entspricht der verwendeten Menge an Ethanol für die Lösung der Partikel aus den Filmstreifen je Messröhrchen. Die so erstellten Kalibrierungskurven ermöglichten nach der spektrophotometrischen Messung eine Umrechnung der ermittelten Emissionswerte in Konzentrationen und somit die Quantifizierung der NP.

## **2.3 Das Hornschichttiefen- und Penetrationsprofil**

Geeignete Methoden, um Informationen über die Penetration topisch applizierter Stoffe und ihre Verteilung im SC zu erlangen, sind die Erstellung eines Hornschicht- und Penetrationsprofils. Dabei wird die Tesa®- Film- Abrisstechnik mit UV/ VIS bzw. Fluoreszenzspektroskopie verbunden (140). Die Verfahren dienen in dieser Arbeit v.a. zur genaueren Analyse der Penetration ins SC und Lokalisation der im Rahmen des DTS als repräsentativ für die Substanz im SC gemessenen Filmstreifen.

### **2.3.1 Allgemeines zur Erstellung der Hornschicht- und Penetrationsprofile**

Die Barriere- und Reservoirfunktion der Haut hat Auswirkung auf das Penetrationsverhalten topisch applizierter Stoffe. Außerdem beeinflussen die chemische Zusammensetzung der Substanzen bzw. ihres Vehikels und physikalische Einwirkungen die Bildung des Reservoirs.

Penetrationsmessungen mittels der Tesa®- Film- Abrisstechnik unterliegen ebenfalls verschiedenen Einflussfaktoren und müssen deshalb gemäß der pro Filmstreifen entfernten Menge an Korneozyten korrigiert werden (89, 128, 141). Die Korrelation der penetrierten Menge einer topisch applizierten Substanz zur pro Filmstreifen entfernten

Menge an Korneozyten anstatt zur jeweiligen Tapenummer führt zu einer genaueren Lokalisation innerhalb des Hornschichtprofils. Eine geeignete Methode darf nur die Korneozyten auf einem Abriss messen und sich nicht durch ebenfalls auf dem Tape befindliche Substanzen beeinflussen lassen.

Das klassische Verfahren der Gravimetrie, das Wiegen der Korneozyten, ist aufgrund des Einflusses von Talg, Schweiß, der in tiefen Schichten zunehmenden interzellulären Flüssigkeit und topisch applizierten Substanzen nicht nur zeitaufwendig, sondern auch sehr störanfällig (128, 142, 143). Ebenso nachteilig erwiesen sich die Messung des transepidermalen Wasserverlustes (129), die Bestimmung der Proteinabsorption in den Korneozyten (142) im UV Bereich oder durch ein Infrarot- Dichtemessgerät (144), die Messung der Absorption spezifischer Korneozytenfärbungen auf den Abrissen (145) sowie die mikroskopische Bestimmung der Hornzellichte (146).

Weigmann et al. (128, 143) beschreiben die Möglichkeit der Messung der Pseudoabsorption der Korneozyten. Sie seien die einzigen Bestandteile auf dem Filmstreifen, welche photometrisch im sichtbaren Bereich gemessen werden könnten. Die Korneozyten reflektieren, streuen und beugen Licht fast unabhängig von der Wellenlänge, anstatt es, wie die anderen Komponenten des SC, v.a. im ultravioletten Spektrum zu absorbieren. Der Filmstreifen störe dabei nicht die Messung der Pseudoabsorption. Es konnte gezeigt werden, dass die entfernte Zahl von Zellschichten pro Filmabriss (59) sowie das Gewicht der Filmstreifen unter Ausschluss von Störfaktoren (143) gut mit der spektrophotometrisch gemessenen Pseudoabsorption der Korneozyten korreliert. Diese Form der Analyse bietet daher eine praktikable Methode, um die Zelldichte pro Tape zu charakterisieren.

Zur Erstellung des Hornschichtprofils (HP) muss zunächst das gesamte SC entfernt werden, d.h. soweit, bis der Filmstreifen visuell und spektrophotometrisch leer ist. Es bedarf individuell verschieden und durch viele Faktoren beeinflussbar einer unterschiedlichen Zahl von Abrissen, um das SC komplett zu entfernen. Meist werden 100 Filmstreifen abgerissen, doch seien auch 30- 60 Tapes angemessen, um seine zu Dicke bestimmen (141).

Die Absorption der Abrisse wird anschließend im sichtbaren Bereich gemessen. Die Summe aller Absorptionen fasst die komplette Menge an Korneozytenaggregaten zusammen, die während des Tesa®- Filmabrissmethode entfernt wurden. Die Korrelation der Absorption je Tape zur Gesamtabsorption entspricht der Zahl der

Korneozyten je Filmstreifen im Verhältnis zur kompletten Hornschicht. Somit kann die Position eines Abrisses im HP genau charakterisiert werden.

In Penetrationsstudien kann die Konzentration einer topisch applizierten Substanz bestimmt und in das HP eingeordnet werden (72, 89, 128). Dieses so genannte Penetrationsprofil (PP) berücksichtigt die Korneozyten und die Stoffkonzentration je Filmstreifen. Basis ist die Dichte der Korneozyten. Die Stoffkonzentration wird zur Tiefe des SC, von der der Abriss genommen wurde, in Beziehung gesetzt. Verschiedene Studien haben gezeigt, dass sich der Grossteil des Stoffes in den obersten Zelllagen befindet (121, 127):

### **2.3.2 Die Erstellung des Hornschichtprofils**

Material, Methoden und Vorbereitung der Haut entsprechen dem DTS. Für jede Partikelgröße (40nm bzw. 200nm), Vorbehandlungstechnik und Formulierung (PBS bzw. BC) wurde mindestens ein HP bzw. PP erstellt. Wie beim DTS wurden die Partikel entweder auf unbehandelte, CSSS vorbehandelte oder mit Massage behandelte Haut aufgetragen. Nach 4 Stunden Inkubation in der feuchten Kammer wurde die Tesa®-Filmabrissmethode max. 100 Mal durchgeführt. Die abgenommenen Tapes befestigte man auf nummerierten Haltevorrichtungen. Abbruchkriterium war eine gemessene Transmission des Filmstreifens von über 98,5%, was die nahezu komplette Entfernung des SC anzeigte. Die einzelnen Filmstreifen bzw. die daran haftenden Korneozyten wurden mittels eines Zweistrahlenspektrophotometers (Lambda 20; Perkin Elmer, Überlingen, Germany) im sichtbaren Bereich bei 750nm gegen dem Rohwert eines leeren Tapes vermessen. Durch die Subtraktion des Leerstreifens von der Messung des jeweiligen Abrisses wurde sichergestellt, dass die spektroskopischen Messwerte wirklich nur durch die Korneozyten zustande kamen.

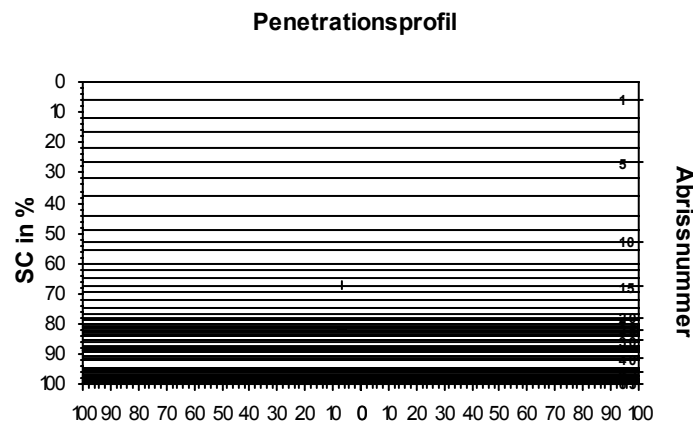
### **2.3.3 Die Erstellung des Penetrationsprofils**

Zur Erstellung des PP wurden je Abriss zwei Stanzen von 1,5mm Durchmesser gefertigt. Jeweils vier Stanzen aus zwei Tapes zusammenfassend in ein OAK- Ridge Röhrchen gebend, wurden die NP mittels Ultraschallbad und Zentrifuge in 1,767 ml Ethanol (s.o.) von den Filmstreifen gelöst und anschließend im Fluoreszenzspektrometer gemessen.



### 2.3.4 Die Darstellung des Hornschichtprofils

Das HP soll die abgetragene Hornschicht möglichst realitätsnah darstellen. Es wird ein Koordinatensystem mit zwei Ordinaten erstellt. Auf der linken Seite werden die aufsummierten Extinktionen der Korneozyten bei 750nm in Prozent aufgetragen. Der oberste Wert entspricht 0%, der Schnittpunkt mit der Abszisse 100%. Diese Prozentwerte werden als horizontale Linien in das Koordinatensystem eingetragen. Das Hornschichtprofil wird durch eine waagerechte, optisch der Hautoberfläche entsprechenden Linie beim Wert 0 nach oben hin abgeschlossen. Die entstehenden Balken stellen die Dicke der Korneozytenschicht auf dem entsprechenden Abriss dar. Sie werden auf der rechten Abszisse bei 1 beginnend von oben durchnummeriert, was den Abrissnummern entspricht. Ein Beispiel ist in Abb. 5 dargestellt.

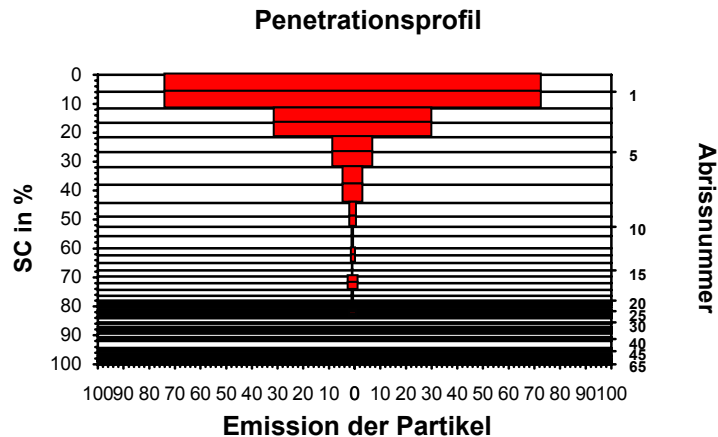


**Abbildung 5 Hornschichtprofil**

Jede horizontale Linie in dieser Darstellung stellt einen Abriss dar. Der Abstand zwischen den Linien entspricht der Menge der Korneozyten auf den einzelnen Tapes. Im vorliegenden Fall wurde das SC vollständig entfernt.

### 2.3.5 Die Darstellung des Penetrationsprofils

Die Partikelkonzentrationen der untersuchten Abrisse werden als waagerechte Balken in das HP eingetragen. Dadurch entsteht das PP (Abb. 6). Zur besseren Veranschaulichung werden die Balken zentriert, der Wert 0 liegt in der Mitte der X-Achse. Die Skala ist beide Seiten addierend, vom Nullpunkt aus in beide Richtungen abzulesen.



**Abbildung 6 Penetrationsprofil**

Das PP ist wie ein Schnitt durch die Hornschicht, der die Penetration der Substanz veranschaulicht. Viele Autoren berichten, dass sich der Großteil eines topisch applizierten Stoffes in den obersten Schichten des SC befindet.

**2.4 Semiquantitative Beurteilung der folliculären Penetration anhand von Kryoschnitten**

Mittels der Anfertigung von Gewebsschnitten sollte semiquantitativ die folliculäre Penetration untersucht werden. Dabei war es möglich, die fluoreszierenden Partikel in den Haarfollikeln zu detektieren und die Penetrationstiefe in Abhängigkeit von der Partikelgröße, der Formulierung und den verschiedenen Vorbehandlungstechniken zu vergleichen.

**2.4.1 Material**

Gearbeitet wurde mit Haut von gesunden Probanden, welche sich im Rahmen einer plastisch chirurgischen Operation einer Gesichtsstraffung unterzogen hatten. Die Untersuchungen fanden unter Einverständnis der Probandinnen, der Bewilligung der Ethik- Kommission der Charité Universitätsmedizin Berlin und gemäß der ethischen Grundsätze der Deklaration der Richtlinien von Helsinki statt. Die Haut wurde innerhalb von 24 Stunden im Labor der Hautklinik/ Charité weiterverarbeitet.

**2.4.2 Das Auftragen der Nanopartikel**

Die Experimente wurden mit denselben gelb- grünen 40nm und 200 nm FluoSpheres® NP durchgeführt wie sie im Rahmen des DTS Verwendung fanden. Hierzu wurden die 40nm und 200nm Partikel 0,1%-ig in PBS gelöst und vor dem Auftragen für 3 min. im Ultraschallbad (s.o.) homogenisiert bzw. in 1%-ig in BC homogen verteilt. 0,1% Lösung enthalten  $2,84 \times 10^{13}$  40nm NP/ ml Lösung bzw. entsprechend 1g/ Creme. 200nm

partikelhaltige 0,1%-ige Lösung enthält  $2,27 \times 10^{11}$  Partikel/ ml. Auf den Hautproben markierte man  $1\text{cm}^2$  große Hautareale mit einem Faserschreiber. Anschließend wurden  $20\mu\text{l}/\text{cm}^2$  der NP in PBS bzw.  $2\text{mg}/\text{cm}^2$  in BC auf die Haut appliziert (s.o.). Die Partikel wurden auf nicht bzw. CSSS vorbehandelte oder mit Massage behandelte Haut aufgetragen. Die Inkubation der Proben erfolgte für 4h in der feuchten Kammer, den Überschuss der wässrigen Lösung behandelte man mit Warmluft.

Bei der Untersuchung der Partikel in BC stammten unbehandelte, CSSS vorbehandelte und mit Massage behandelte Proben jeweils von einem Probanden. Somit wurden zwei Experimente (40nm bzw. 200nm in BC) mit jeweils drei Hautarealen durchgeführt.

Bei den Proben der 40nm und 200nm NP in PBS untersuchte ein Experiment die Wirkung von CSSS für beide Partikelgrößen, eine andere Probe den Effekt der Massage im Vergleich zu nicht vorbehandelter Haut. Auch hier gab es also zwei Versuchsreihen (Wirkung von CSSS bzw. Massage für jeweils 40nm/ 200nm Partikel, je vier Hautareale). Somit diente jeweils ein Experiment als Ergänzung zum DTS,  $n=1$ .

### **2.4.3 Anfertigung der Kryoschnitte**

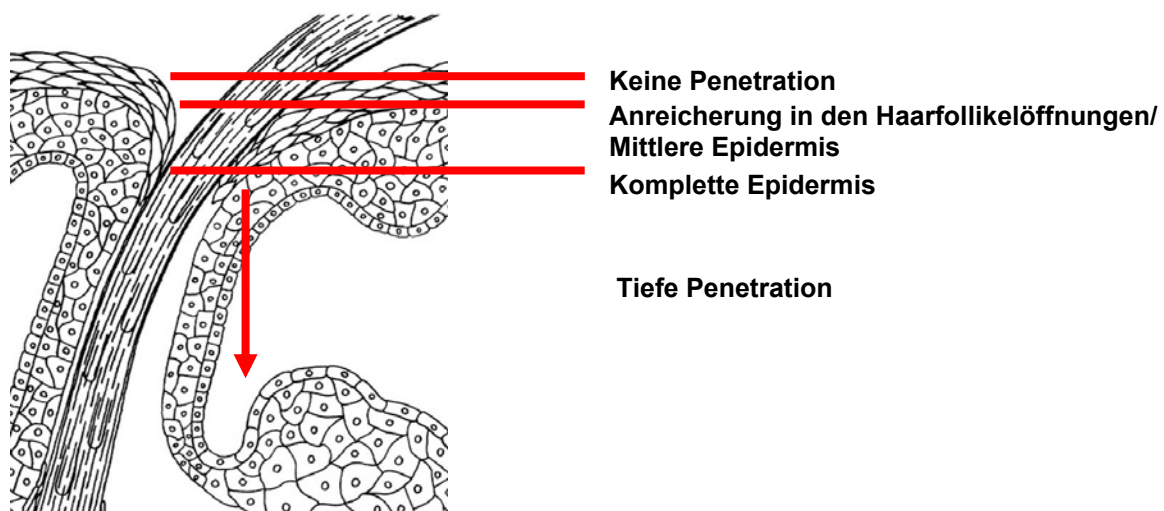
Nach der Inkubation der Proben wurde auf jeder Hautprobe fünf Mal die Tesa®- Film-Abrisstechnik durchgeführt. Dies stellte die Entfernung des Großteils der aufgetragenen Partikel aus dem SC sicher und verhinderte das sekundäre Einbringen von Partikeln in die Haarfollikelöffnungen, z.B. im Rahmen der Anfertigung der Gewebeschnitte.

Die  $1\text{cm}^2$  großen Hautproben wurden vor dem Einfrieren mit flüssigem Stickstoff in vier gleich große Blöcke von  $0,5 \times 0,5\text{cm}^2$  geschnitten. Aus jedem dieser Quadrate wurden anschließend Kryo-, d.h. Gefrierschnitte von  $5\mu\text{m}$  Dicke angefertigt (2800 Frigocut- N, Reichert- Jung, Heidelberg, Germany). Dabei wurde möglichst parallel zu den Haarfollikeln und von der Dermis in Richtung Epidermis geschnitten, um ein Einbringen von NP in die Haarfollikel im Rahmen des Schneidevorgangs zu vermeiden. Für jede zu untersuchende Variable wurden im Durchschnitt 20 Objektträger mit 15 Einzelschnitten angefertigt.

### **2.4.4 Auswertung der Proben**

Die Schnitte wurden anschließend unter dem Fluoreszenzmikroskop (BX60F3, Olympus, Hamburg, Germany) hinsichtlich der follikulären Penetration untersucht (Abb. 7). Ein Fluoreszenzmikroskop kann Licht der stoffspezifischen Wellenlänge aussenden, die Fluoreszenzpartikel detektieren, sie anregen, soviel wie möglich der emittierten Fluoreszenz sammeln und Exzitations- von Emissionsenergie trennen (139, 147).

Dokumentiert wurde die Auswertung mittels der „Overlay“- , d.h. Überlagerungstechnik (8, 148). Dazu fertigte man ein Nativbild mit dem Lichtmikroskop und ein Fluoreszenzbild unter Nutzung eines NIBA Filters (Wellenlänge 470 - 490nm; Filter 515 - 550nm) zur Kontrastverstärkung von derselben Stelle eines Haarfollikels an. Das Software Programm „analySIS“ (Soft Imaging System GmbH SIS, Münster, Germany) erlaubte durch Übereinanderlegung von Fluoreszenz- und Nativbild die Anfertigung eines Überlagerungsbildes. Die grüne Farbe der Fluoreszenz wurde zur besseren Darstellung computergesteuert in Rot umgewandelt.



**Abbildung 7 Auswertung der folliculären Penetration**

Es wurde zwischen Haarfollikeln, die negativ und solchen, die positiv für Penetration waren, differenziert. In letzterem Fall unterschied man Follikel, in denen sich Partikel in den Haarfollikelöffnungen (Mittlere Epidermis) angereichert hatten, von solchen, die eine Penetration bis zur kompletten Epidermis und tiefer zeigten.

#### 2.4.5 Statistik

Die Unterschiede im Penetrationsverhalten wurden mit der Erstellung von Chi- Quadrat im Statistikprogramm R Version 2.6.1 analysiert. Mittelwerte und Standardabweichung wurden mit Hilfe des Software Programms Microsoft® Excel 2003 kalkuliert.

## 2.5 Langerhanszellfärbung

Mittels einer Anti- CD1a- Fluoreszenzfärbung können LZ selektiv immunhistochemisch dargestellt werden. Dazu wurden einige Gewebeschnitte, auf denen sich Haarfollikel besonders gut angeschnitten fanden, herausgesucht und die Färbung entsprechend folgendem Protokoll durchgeführt. Anwendung fanden dabei Proben, welche die Penetration von 200nm Partikeln in wässriger Lösung und lipophiler Grundlage zeigten. Für die Fluoreszenzfärbung CD1a- positiver Zellen fixiert man die Kryoschnitte zunächst für 10 Minuten in Aceton (Backer, 8002). Die Proben werden dreimal für fünf Minuten in PBS (Biochrom, L 182 -50) gewaschen, anschließend die Waschlösung vom Objektträger kräftig abgeschlagen. Mit einem Pap- Pen (Vector Labs, H – 4000) zieht man einen durchgängigen Paraffinkreis um den Objektträger mit den zu färbenden Einzelschnitten. Dabei ist auf einen ausreichenden, mindestens 3mm großen Abstand zum Gewebe zu achten. Hiernach wird die Probe für 60 Minuten mit DAKO Proteinblock (Vector Labs, X – 0909) geblockt. Primärantikörper Anti- CD1a (DAKO; M 0721) werden in Humanem AB – Serum (Biotest, 805135), einem antikörperfreien humanen Serum der Blutgruppe AB, im Verhältnis 1: 100 verdünnt und auf den Objektträger aufgetragen. Parallel dazu gibt man auf eine Kontrollprobe mit nur Humanem AB- Serum ohne Zusatz den CD1a – Antikörper. Nach einer Stunde werden die Proben dreimal für fünf Minuten in PBS (s.o.) gewaschen. In einem letzten Schritt werden die Proben mit 1: 50 in Humanem AB- Serum verdünnten anti- mouse FITC (Vector Labs, FI – 2000) benetzt und die Objektträger anschließend für 45 Minuten im Dunkeln gelagert. Um den Fluoreszenzfarbstoff zu schützen, muss auf einen Schutz vor Licht unbedingt geachtet werden! Die Auswertung der Objektträger erfolgt mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops unter Benutzung eines NIBA – Filters (Wellenlänge 470 - 490nm; Filter 515 - 550nm) bzw. WBV- Filters (Wellenlänge 330 – 385nm; Filter > 420nm).

## 2.6 Konfokale Laser Scanning Mikroskopie

Konfokale Laser Scanning Mikroskopie (Confocal Laser Scan Mikroskopy/ CLSM) in Verbindung mit Fluorophoren ermöglicht die Echtzeit- Visualisierung der Penetration von Stoffen *in vivo*. Artefakte, wie sie bei der Fixierung von Haut entstehen, werden dabei vermieden (149). *In vivo* lassen sich Strukturen bis zu etwa 200µm Tiefe detektieren. Für tiefere Hautschichten ist die Methode nicht so gut geeignet wie histologische Analysen (61). In der vorliegenden Arbeit wurde mittels CLSM das „Laterale Spreading“ bzw. Laterale Spreiten (150), die Diffusion der applizierten Substanz über das markierte Hautareal hinaus, untersucht. Die Untersuchung erfolgte beispielhaft an den mit 200nm NP 0,1% in PBS inkubierten Proben vor und nach Durchführung der Tesa®- Film- Abrisstechnik.

Das Grundprinzip der CLSM beruht darauf, dass das Licht einer punktaktigen monochromen Lichtquelle, eines Lasers, über ein Objektiv auf einen Punkt in der Ebene eines zu untersuchenden Objektes fokussiert wird und dieses angeregt. Während bei der Fluoreszenzmikroskopie das gesamte Sichtfeld angeregt wird, handelt es sich bei der CLSM um eine rasterartige Anregung von einem Punkt zum anderen. Das von dem Punkt in Folge der Anregung emittierte Licht wird auf eine variable Lochblende fokussiert und dahinter detektiert. Im Unterschied zur Fluoreszenzmikroskopie werden nicht fokussierte Ebenen ausgeblendet und somit eine bessere Bildqualität erzielt. Durch die Möglichkeit, mehrere übereinander liegende Ebenen zu scannen, kann computergesteuert ein dreidimensionales Bild erzeugt werden (151).

Die Untersuchungen wurden mit einem dermatologischen Konfokalen Laser Scanning Mikroskop ('Stratum', Optiscan Ltd., Melbourne) durchgeführt. Die Objektivlinse und das Scan (Abtast-) Modul des Mikroskops sind in einem Handstück vereint. Dieses wird direkt auf die Hautoberfläche aufgesetzt und ist manuell verschiebbar. Die Strahlung eines Argon- Ionen- Lasers bei einer Wellenlänge von 488nm wurde genutzt, um den Fluoreszenzfarbstoff Fluorescein anzuregen. Das Untersuchungsfeld beträgt 200 x 200µm. Die Aufnahmen werden in Echtzeit durchgeführt. Das optische Fenster ist direkt auf die Hautoberfläche aufgesetzt. Die Emission der Fluoreszenz wird in der Objektivlinse gesammelt und durch einen Lichtleiter zu einem Photodetektor geleitet. Die Bildtiefe kann durch Focusverstellung am Handstück manuell verändert werden (62).

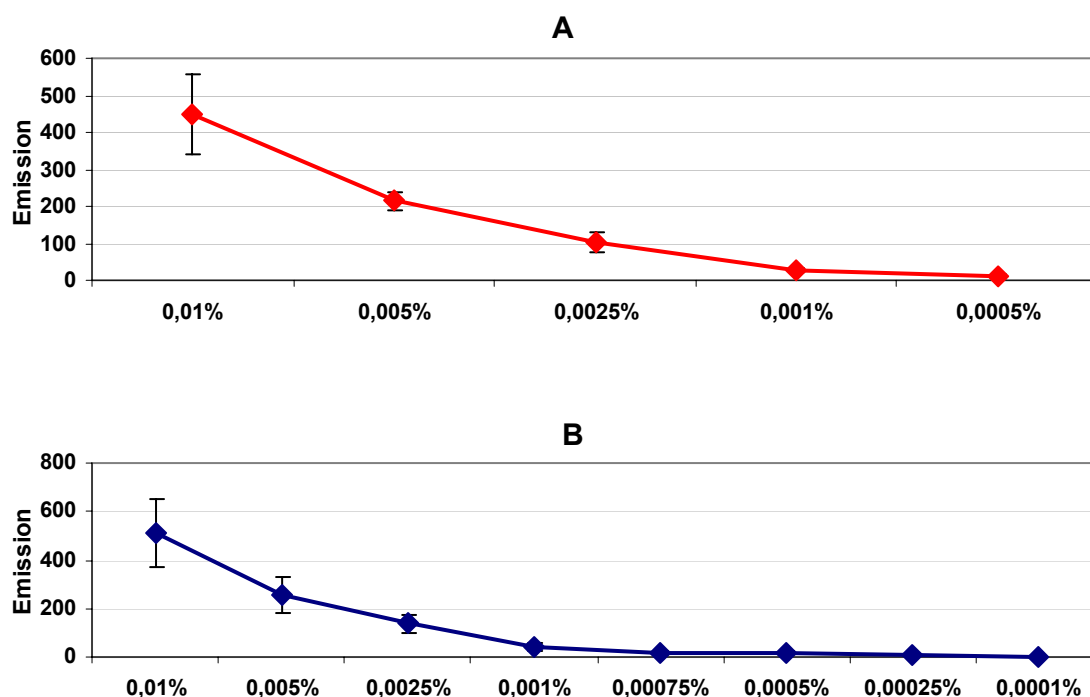
### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Differentielles Tape Stripping

Durch das DTS und fluoreszenzspektrophotometrische Messungen konnte das Reservoir topisch applizierter NP im SC und in den Haarfollikeln quantifiziert werden.

##### 3.1.1 Kalibrierungskurve

Anhand der Kalibrierungskurven ist es möglich, die im Fluoreszenzspektrometer ermittelte Emission einer Probe einer Konzentration an Partikeln in derselben zuzuordnen.



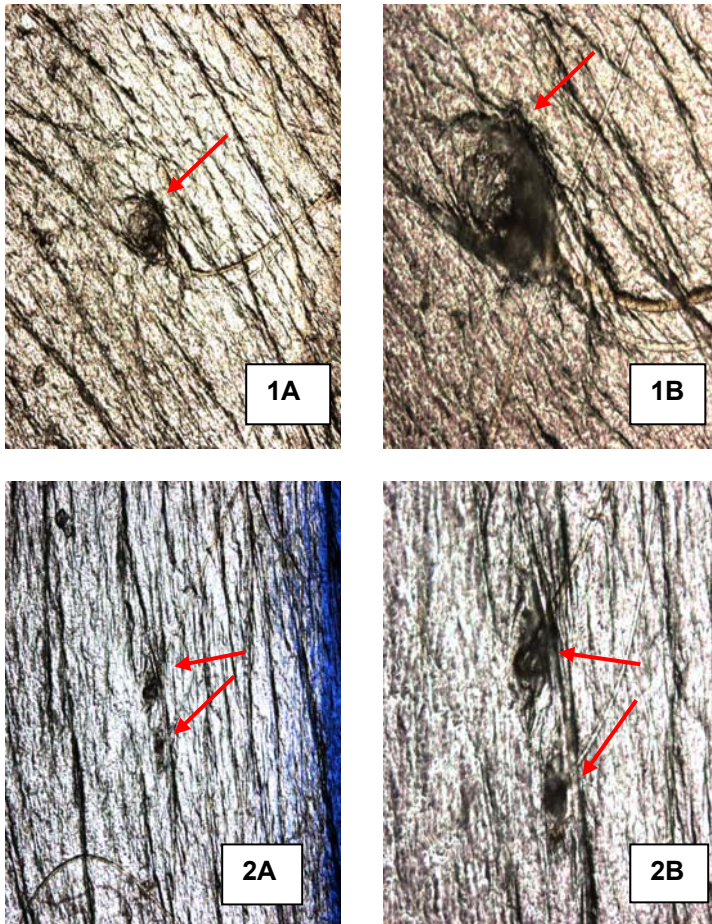
**Abbildung 8 Kalibrierungskurven 40nm und 200nm NP in PBS**

Die Kalibrierungskurven stellen Mittelwerte (n=4) für 40nm NP (Diagramm A) und 200nm NP (Diagramm B) in PBS, von 0,01% in absteigender Konzentration in 1,767ml Ethanol gelöst, dar. Die x- Achse gibt die Partikelkonzentration, die y- Achse die entsprechende, fluoreszenzspektrometrisch ermittelte Emission an.

##### 3.1.2 Bestimmung der Haarfollikeldichte anhand der Cyanoacrylatabrisse

Die Cyanoacrylatabrisse, welche man vor Applikation der Partikel im Rahmen der Vorbehandlungstechniken angefertigt, konnten unter dem Mikroskop bezüglich der Zahl der Haarfollikel je Fläche ausgewertet werden. Die Auszählung ergab eine Dichte von durchschnittlich 10 Haarfollikeln/cm<sup>2</sup>.



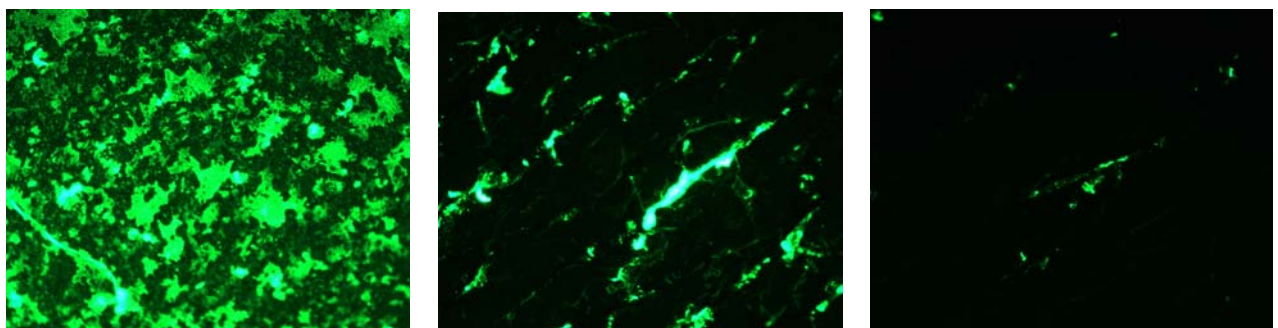


**Abbildung 9 Bestimmung der Haarfollikeldichte mittels CSSS**

Die Abbildungen zeigen zwei CSSS Abrisse. Es sind entfernte Hornschicht und Haarfollikel zu erkennen. Die Aufnahmen wurden mittels des Gerätes Inverses Mikroskop Olympus IX50 in 4facher (1A, 2A) bzw. 10facher (1B, 2B) Vergrößerung angefertigt.

### 3.1.3 Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung der Substanzverteilung

Die im ersten Teil des DTS angefertigten Filmabrisse wurden vor der quantitativen Analyse der ersten fünf Tapes unter dem Fluoreszenzmikroskop untersucht.



**Abbildung 10 Fluoreszenzsignal der NP auf den Filmstreifen**

**1. Abriss**

**5. Abriss**

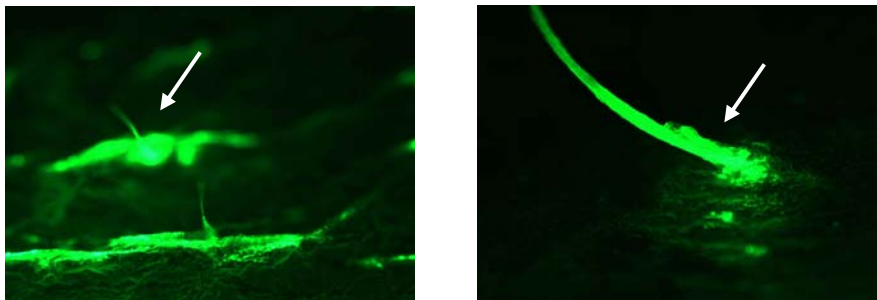
**20. Abriss**

Die Aufnahmen zeigen den 1., 5. und 20. Filmstreifen aus dem ersten Teil des DTS unter dem Fluoreszenzmikroskop BX60F3, Olympus, Hamburg, Germany bei 10facher Vergrößerung. Die Abnahme des Fluoreszenzsignals mit steigender Abrissnummer ist deutlich zu erkennen.



Abb. 10 zeigt dies an einem repräsentativen Beispiel. Der erste Abriss zeigt ein deutliches Fluoreszenzsignal, das auf dem 5. Tape schon deutlich geringer und v.a. aus den Furchen zu detektieren ist. Bis auf einige wenige Partikel in den Hautfurchen ist auf dem 20. Filmstreifen kaum mehr Fluoreszenz zu erkennen.

Anschließend wurde mittels eines CSSS Abrisses die Konzentration der NP in den Haarfollikeln ermittelt. Die folgenden Bilder (Abb. 11) zeigen Fluoreszenzaufnahmen dieser CSSS- Abrisse. Es ist schwierig, die Auto- Fluoreszenz der Haarfollikel von jener der Partikel zu differenzieren.



**Abbildung 11 Fluoreszierende Nanopartikel auf CSSS- Abrissen**

Aufnahmen der CSSS- Abrisse vor der fluoreszenzphotometrischen Messung der follikulären Penetration mit dem Fluoreszenzmikroskop -BX60F3, Olympus, Hamburg, Germany bei 10facher Vergrößerung. Der Pfeil kennzeichnet einen Haarfollikel. Dessen Auto- Fluoreszenz ist nur schwer von dem Signal der NP zu unterscheiden.

### **3.1.4 Differentielles Tape Stripping I – Quantifizierung der Nanopartikel im Stratum corneum**

In der statistischen Auswertung wurden zunächst die Ergebnisse für die Emission bzw. Konzentration der NP im SC getrennt analysiert. Dabei zeigte sich erwartungsgemäß kein Unterschied. Abb.12 und 13 stellen die Emission der Fluoreszenz der in PBS und BC applizierten Partikel als Maß für ihre Konzentration im SC dar.

Insgesamt betrachtet zeigten in hydrophiler Lösung applizierte Partikel eine bessere Penetration in die Hornschicht. Die Ergebnisse waren statistisch jedoch nicht signifikant. Die 200nm NP zeigten in lipophiler Grundlage eine etwas bessere Penetration als in PBS. Die 40nm NP in beiden Formulierungen bildeten dabei ein signifikant ( $p < 0,001$ ) größeres Reservoir im SC als die größeren 200nm NP.

Nach der Anwendung von CSSS konnte für 40nm NP in PBS eine Verbesserung der Penetration beobachtet werden. 200nm Partikel zeigen eine geringfügig schlechtere Penetration in PBS ( $p = 0,05$ ) bzw. keine Beeinflussung in BC.

Massage bewirkte, dass signifikant ( $p < 0,0001$ ) weniger NP im SC gemessen wurden. Dieser Effekt ist bei Applikation der NP in BC bei beiden Partikelgrößen zu beobachten und zeigte sich bei 40nm Partikeln, nicht aber 200nm NP in PBS (Abb. 12).

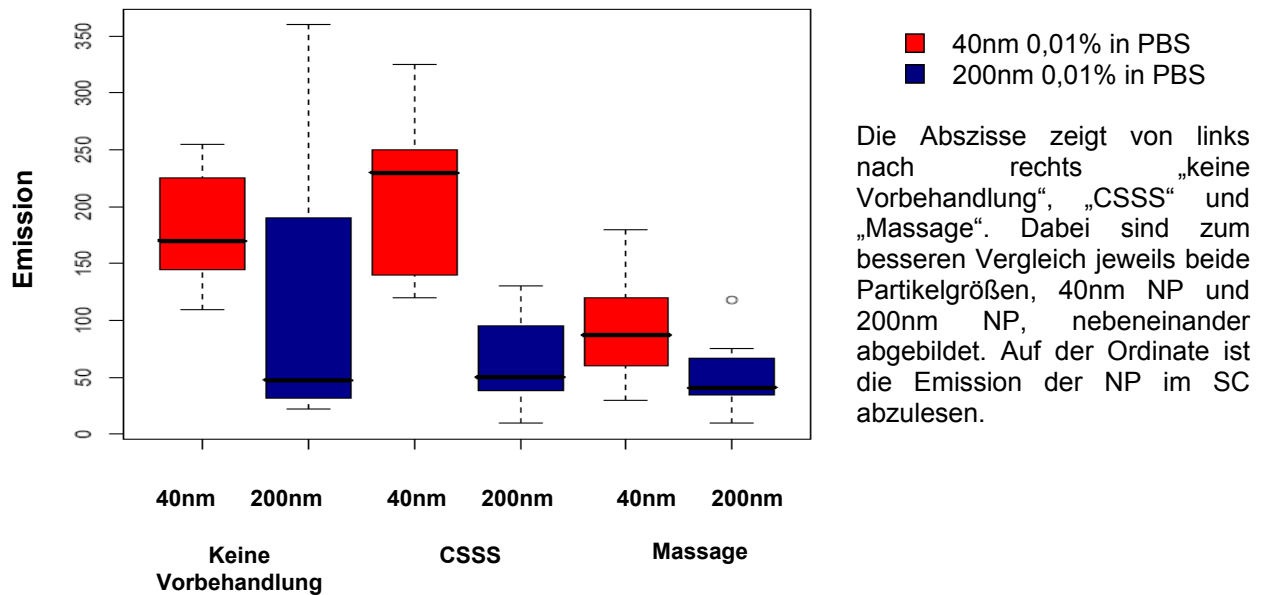


Abbildung 12 Emission der NP im Stratum corneum- 40nm/ 200nm 0,01% in PBS

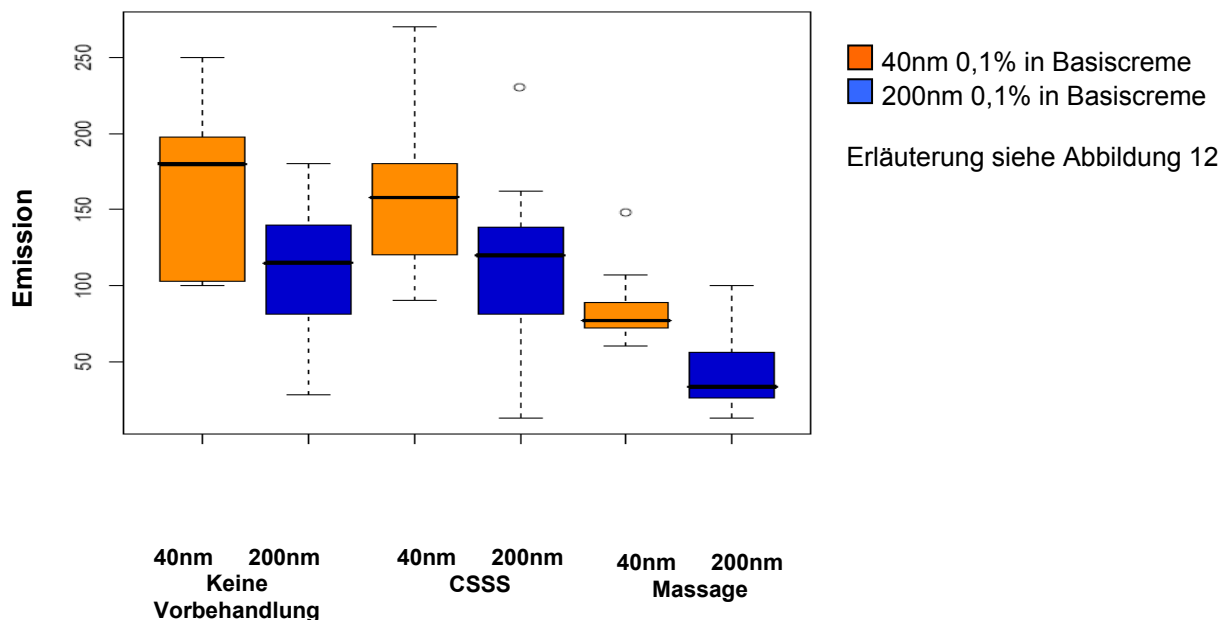
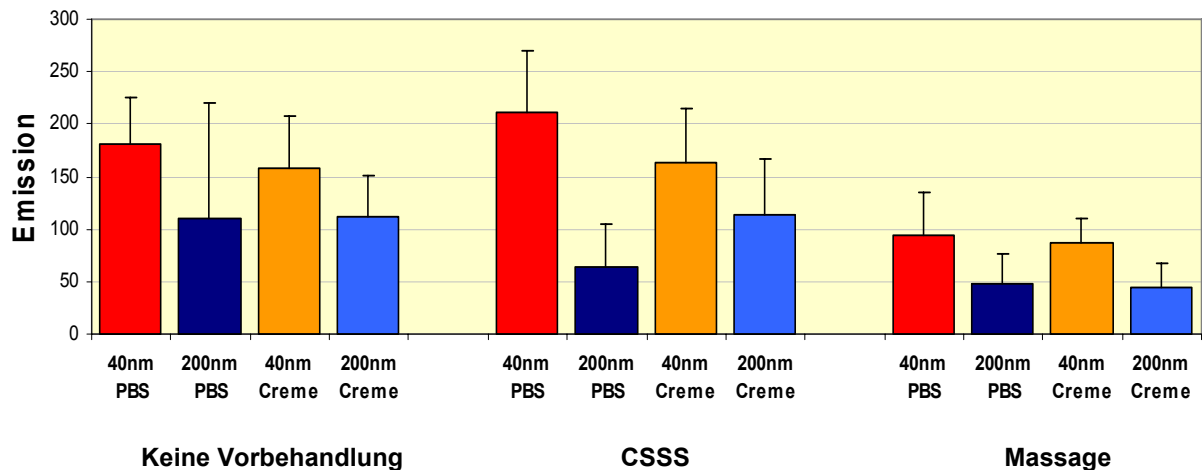


Abbildung 13 Emission der NP im Stratum corneum- 40nm/ 200nm 0,1% in BC

Die Recovery Rate beschreibt die Konzentrationsmenge der NP, die im Verhältnis zu der insgesamt applizierten Menge aus den abgetragenen Filmstreifen bestimmt werden konnte (90, 150). Anhand der Kalibrierungskurve kann von der Emission auf die Konzentration der NP rückgeschlossen und berechnet werden, wieviel der applizierten Partikel sich z.B. im SC bzw. in den dafür repräsentativ stehenden fünf Abrissen befanden.



**Abbildung 14- Zusammenfassung der NP im SC: 40nm/ 200nm NP 0,01% in PBS bzw. 0,1% in BC**  
 Auf der y- Achse ist die Emission der NP im SC abgebildet. 40nm und 200nm Partikel sind, jeweils in PBS bzw. BC, für jede Vorbehandlungstechnik (von links nach rechts: „keine Vorbehandlung“, „CSSS“ und „Massage“) auf der x- Achse nebeneinander abgebildet.

- 40nm 0,01% in PBS
- 200nm 0,01% in PBS
- 40nm 0,1% in Basiscreme
- 200nm 0,1% in Basiscreme

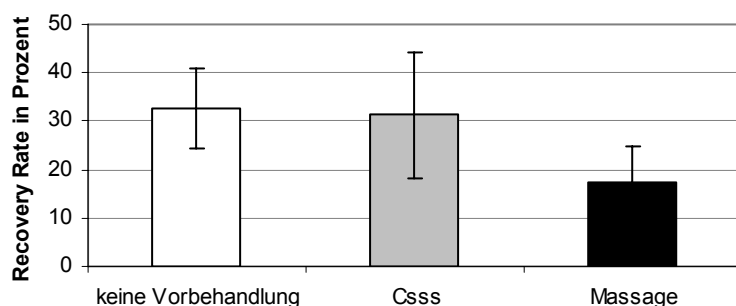
Von den 40nm NP konnten  $40\% \pm 11\%$  der 0,01% in PBS applizierten bzw.  $32\% \pm 5\%$  der 0,1% in BC applizierten NP in der Hornschicht gemessen werden. Von den applizierten 200nm NP 0,01% in PBS bzw. 0,1% in BC wurden  $17\% \pm 6\%$  bzw.  $20\% \pm 7\%$  der applizierten Partikel aus den ersten Filmstreifen extrahiert. In Tabelle 1 sind diese Ergebnisse für die Vorbehandlungstechniken einzeln aufgelistet.

	keine Vorbehandlung	CSSS	Massage
40nm PBS	0,0045% (45%)	0,005% (50%)	0,0025% (25%)
200nm PBS	0,0025% (25%)	0,0015% (15%)	0,001% (10%)
40nm Basiscreme	0,0035% (35%)	0,0035% (35%)	0,0025% (25%)
200nm Basiscreme	0,0025% (25%)	0,0025% (25%)	0,001% (10%)

**Tabelle 1 Konzentration der NP im SC**

Für 40nm NP bzw. 200nm NP, 0,01% in PBS bzw. 0,1% in Basiscreme nach en einzelnen Vorbehandlungstechniken wurde die aus dem SC ermittelte Emission in eine mittlere Partikelkonzentration umgerechnet, hier ohne Angabe der Standardabweichung (vgl. Abb. 14). In Klammern ist hinzugefügt, welchem Prozentsatz der aufgetragenen Menge die Konzentration aus den ersten fünf Abrissen entspricht.

Eine Zusammenstellung der Recovery Rate für die Vorbehandlungstechniken zeigt, dass Massage das Reservoir des SC signifikant reduzierte.



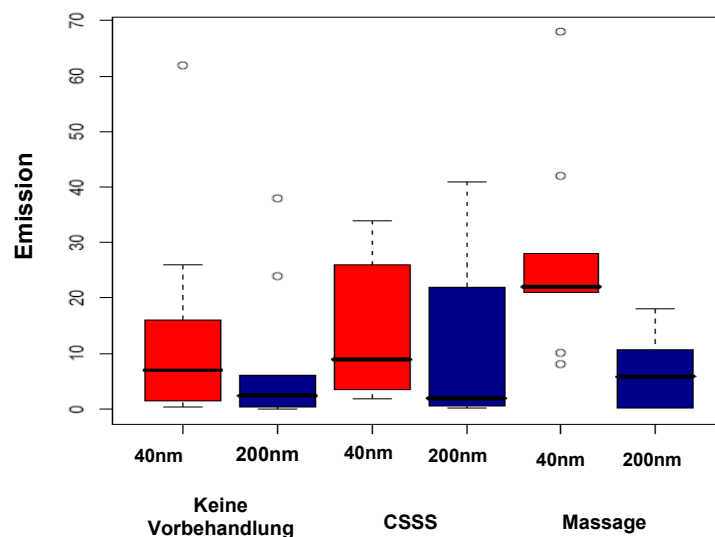
**Abbildung 15 Recovery Rate im SC in Abhängigkeit von den Vorbehandlungstechniken**

Mittelwerte/ Standardabweichung des interfollikulären Anteils an der applizierten Menge NP im SC für beide Partikelgrößen und Formulierungen zusammengefasst nach „keine Vorbehandlung“, „CSSS“, „Massage“.

### 3.1.5 Differentielles Tape Stripping II – Quantifizierung der Nanopartikel in den Haarfollikeln

Bei vergleichender Betrachtung der Konzentrationen bzw. Emission der NP in den Haarfollikeln zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in der statistischen Auswertung. Graphisch dargestellt sind aufgrund der größeren Genauigkeit die Emissionswerte (Abb. 16 und 17).

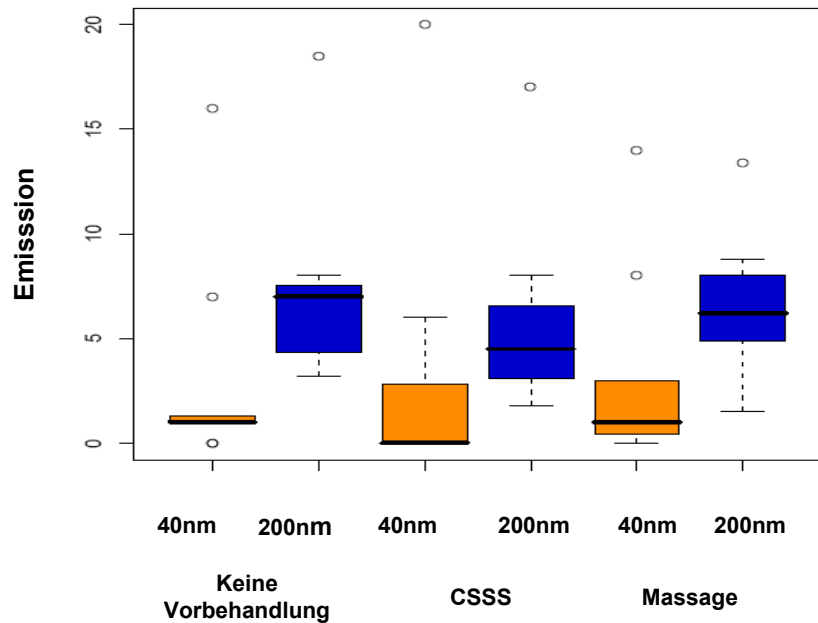
Die follikuläre Penetration der NP war besser nach Applikation in PBS als in BC. Fünf Prozent der ohne Vorbehandlung aufgetragenen 40nm Partikel fanden sich in den Haarfollikeln. Von den 200nm NP in PBS und beiden Partikelgrößen in BC konnten nur 2,5% der ohne Vorbehandlung aufgetragenen NP in den Follikeln gemessen werden.



**Abbildung 16 Emission der Nanopartikel in den Haarfollikeln- 40nm/ 200nm 0,01% in PBS**

- 40nm 0,01% in PBS
- 200nm 0,01% in PBS

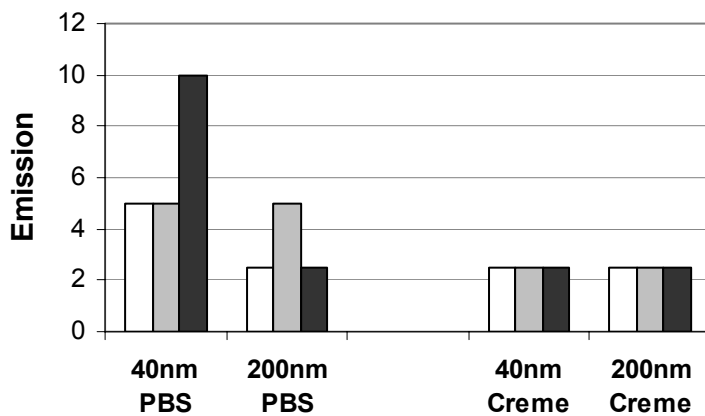
Auf der x- Achse sind die Vorbehandlungstechniken „keine Vorbehandlung“, „CSSS“ und „Massage“ von links nach rechts, jeweils 40nm und 200nm Partikel nebeneinander darstellend, „abgebildet“. Die Quantifizierung der NP in den Haarfollikeln erfolgte mittels CSSS. Die daraus extrahierte und gemessene Emission ist auf der y- Achse abgebildet



**Abbildung 17 Emission der NP in den Haarfollikeln- 40nm/ 200nm 0,1% in Basiscreme**

■ 40nm 0,1% in Basiscreme  
■ 200nm 0,1% in Basiscreme, Erklärung siehe Abb. 16.

Die Anwendung von CSSS und Massage zeigten insgesamt betrachtet einen positiven Effekt auf die Penetration. Diese Effekte lassen sich besser nach Applikation in PBS als in BC beobachten. (siehe Abb. 16-19)

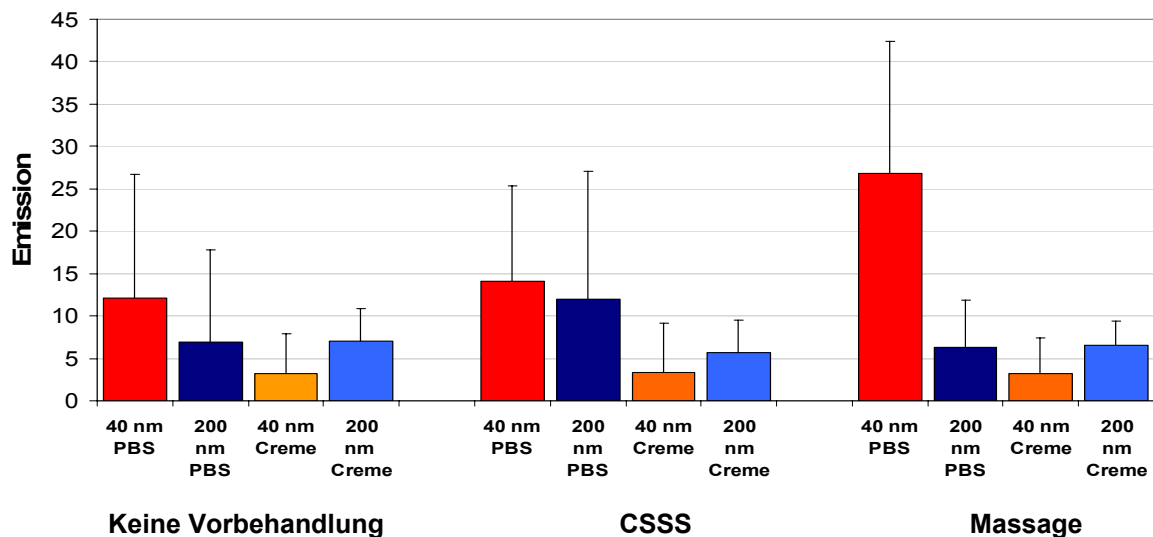


Zu sehen ist der Anteil der aufgetragenen NP in Prozent, welcher in den Haarfollikeln gemessen wurde. Auf der linken Seite sind 40nm und 200nm 0,01% in PBS, rechts 40nm und 200nm 0,1% in Basiscreme abgebildet. Für jede Partikelgröße in hydrophiler oder lipophiler Formulierung sind nebeneinander die Ergebnisse der Proben ohne Vorbehandlung (□ weiß) nach einem CSSS (■ grau) bzw. nach Massage (■ schwarz) abgebildet.

**Abbildung 18 Anteil der NP in den Haarfollikel in %**

So erhöhte sich das folliculäre Reservoir von 200nm Partikeln in PBS nach der Vorbehandlung mit einem CSSS von 2,5% auf 5% der aufgetragenen Partikelmenge. Dieser Anstieg ist jedoch statistisch nicht signifikant. Massage zeigte einen signifikanten Einfluss auf die folliculäre Penetration der 40nm NP in PBS ( $p < 0,05$ ). Es konnte ein Anstieg von 5% auf 10% der aufgetragenen Partikel in den Haarfollikeln verzeichnet werden.

200nm NP penetrierten in etwas geringerem Maße als die kleineren 40nm Partikel. 200nm NP zeigten in lipophiler Grundlage eine etwas bessere Penetration als 40nm NP.



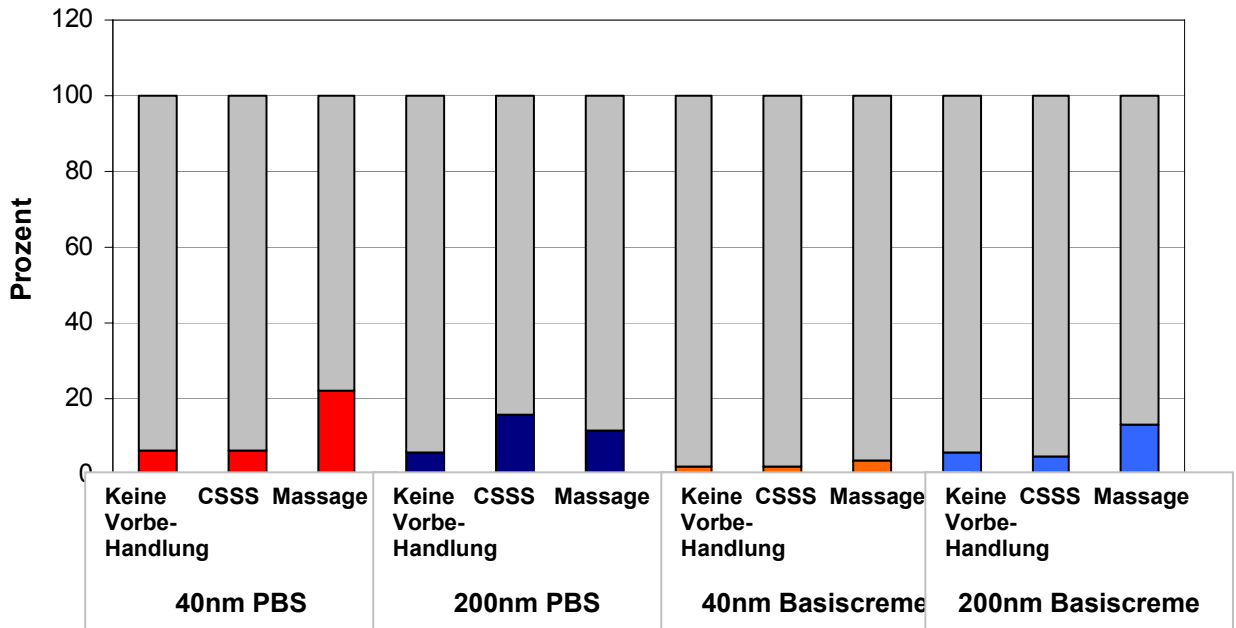
**Abbildung 19 Zusammenfassung: 40nm/ 200nm NP 0,01% in PBS bzw. 0,1% in BC- NP in den Haarfollikeln**

Emissionswerte der NP in den Haarfollikeln. Die Ergebnisse der 40nm und 200nm NP, in PBS bzw. BC, sind für jede Vorbehandlungstechniken (von links nach rechts: „keine Vorbehandlung“, „CSSS“ und „Massage“) jeweils nebeneinander abgebildet.



### 3.1.6 Folliculärer Anteil der insgesamt gemessenen Nanopartikel

Mit Hilfe der Kalibrierungskurve konnte anhand der mittleren Emissionswerte auf die Konzentration der Partikel in den Haarfollikeln rückgeschlossen werden. Für die insgesamt durch das DTS ermittelte Konzentration an NP konnte ein Verhältnis von durchschnittlich  $94,8 \% \pm 5,2\%$  in PBS bzw.  $88,7\% \pm 11,3\%$  in BC im SC und  $11,3\% \pm 6$  in PBS bzw.  $5,2\% \pm 3,7\%$  in BC in den Haarfollikeln bestimmt werden.

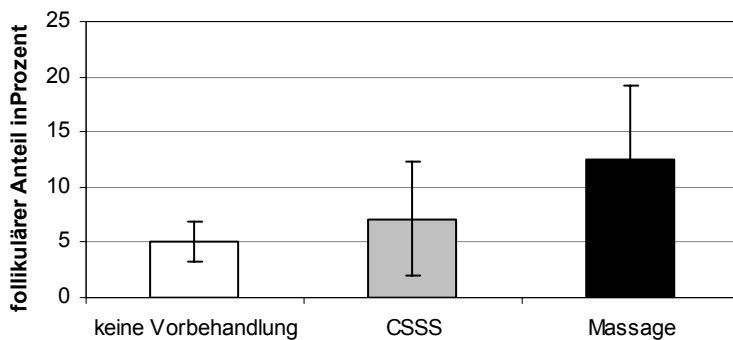


**Abbildung 20 Recovery Rate: Follikulärer und interfollikulärer Anteil in Prozent**

Farblich dargestellt ist jeweils der follikuläre Anteil der NP (siehe Legende). Von links nach rechts 40nm und 200nm NP 0,01% in PBS, 40nm und 200nm NP 0,1% in BC. Für jede Partikelgröße nebeneinander die Vorbehandlungstechniken „keine Vorbehandlung“, „CSSS“, „Massage“. Ermittelt wurde die Konzentration aus den gemittelten Emissionswerten. Standardabweichungen siehe 3.1.4/ 5.

- 40nm 0,01% in PBS
- 200nm 0,01% in PBS
- 40nm 0,1% in Basiscreme
- 200nm 0,1% in Basiscreme

Eine Zusammenfassung des follikulären Anteils in Prozent nach den einzelnen Vorbehandlungstechniken zeigt, dass sich ohne Vorbehandlung  $5,1\% \pm 1,8\%$ , nach CSSS  $7,2\% \pm 5,1\%$  und nach Massage  $12,5\% \pm 6,6\%$  der insgesamt in einer Probe bestimmten Partikel in den Haarfollikeln befand (vgl. Abb. 21).



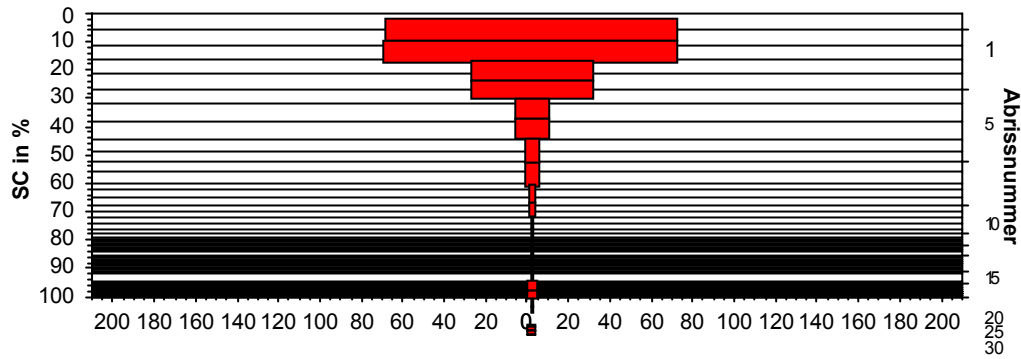
**Abbildung 21 Follikuläre Recovery Rate**

Mittelwerte des prozentualen follikulären Anteils der insgesamt durch DTS bestimmten NP „keine Vorbehandlung“, „CSSS“, „Massage“ unter Zusammenfassung von Partikelgröße und Formulierung.

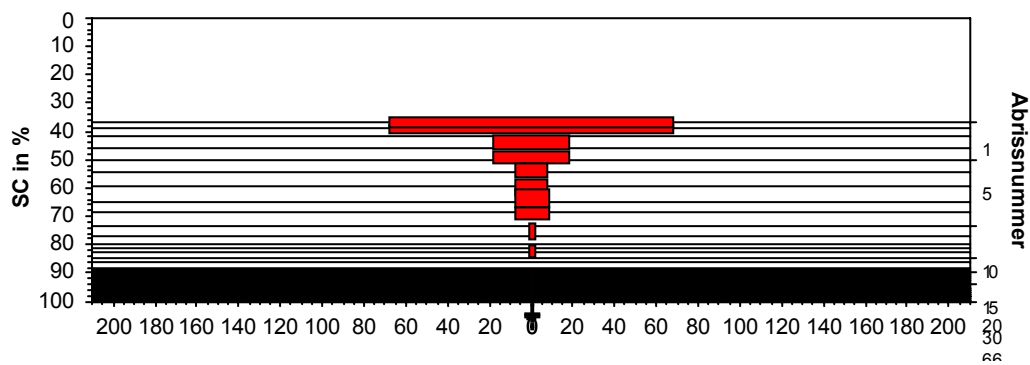


### 3.2 Hornschicht und Penetrationsprofile

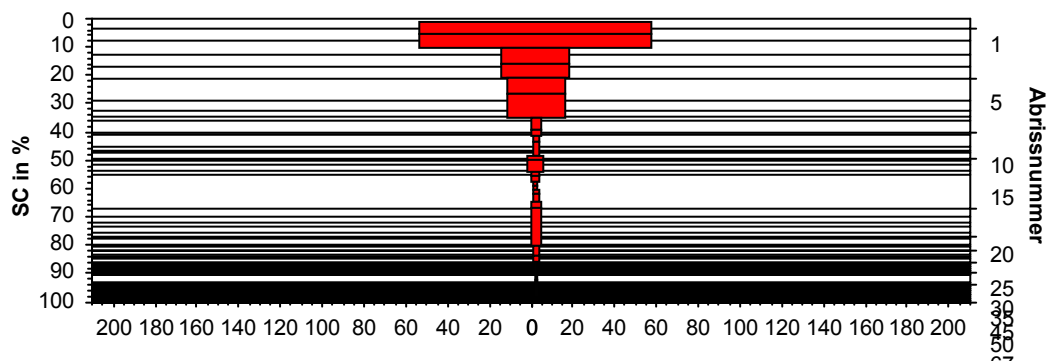
Die folgenden Abbildungen zeigen eine Gegenüberstellung der HP und PP für 40nm und 200nm in PBS und BC.



1- A – Hornschichtprofil ■ 40nm 0,01% in PBS „keine Vorbehandlung“



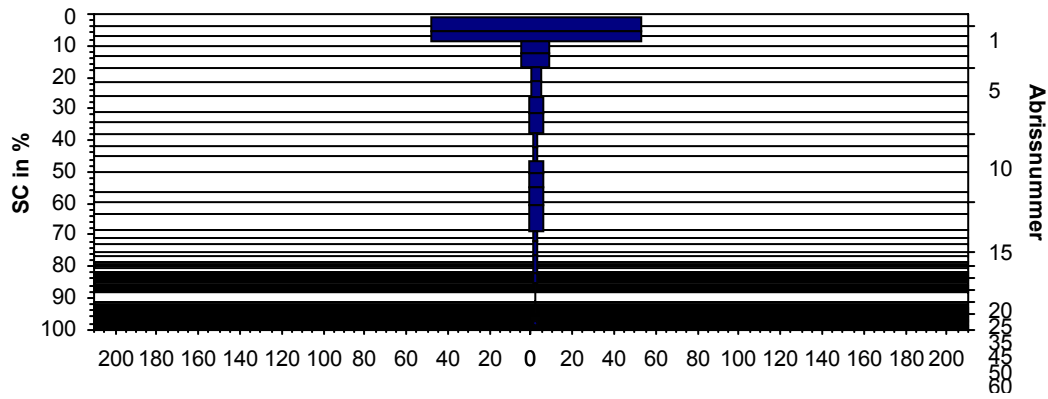
1- B- Hornschichtprofil ■ 40nm 0,1% in PBS- „CSSS“



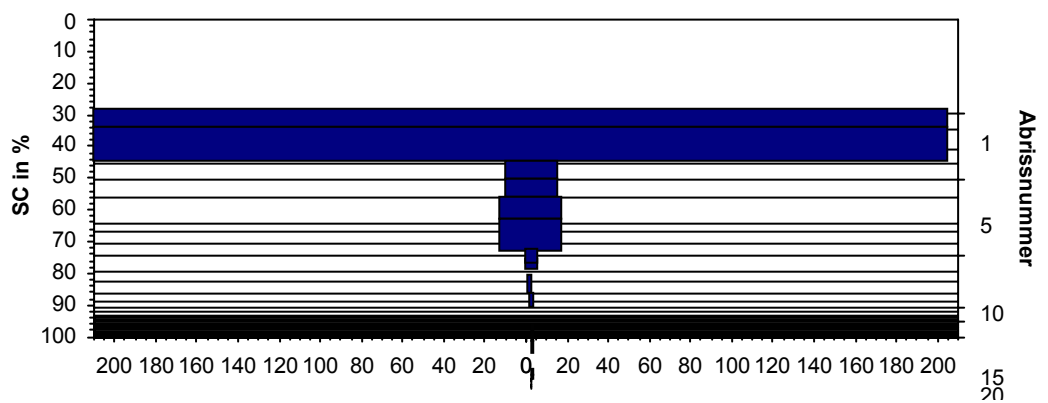
1- C- Hornschichtprofil ■ 40nm 0,1% in PBS- „Massage“

#### Abbildung 22 Hornschicht-/ Penetrationsprofile 40m 0,01% in PBS

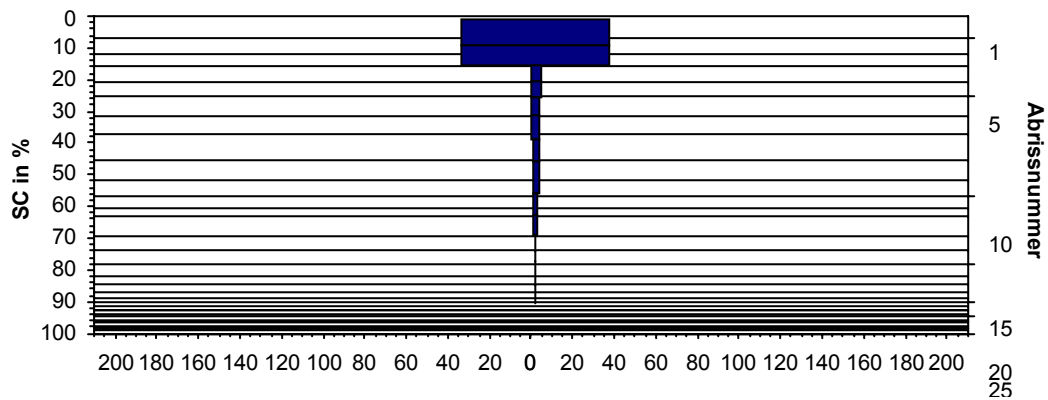
Diagramme A- C zeigen die PP für die Applikation von 40nm NP 0,01% in PBS auf nicht vorbehandelte Haut (A), auf CSSS vorbehandelte Haut (B) und nach Massage der Partikel (C). Auf der linken y- Achse ist der Prozentsatz entfernter SC, auf der rechten y- Achse die Filmabrisnummer aufgetragen. Die x- Achse stellt die Emission der NP dar. Sie ist in beide Richtungen abzulesen und die Werte zu addieren.



**2 A- Hornschichtprofil ■ 200nm 0,1% in PBS- „keine Vorbehandlung“**



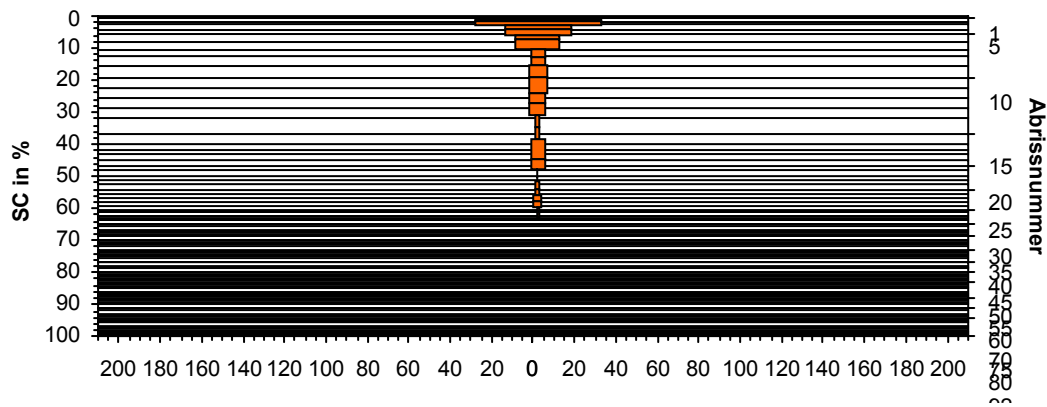
**2 B- Hornschichtprofil ■ 200nm 0,1% in PBS- „CSSS“**



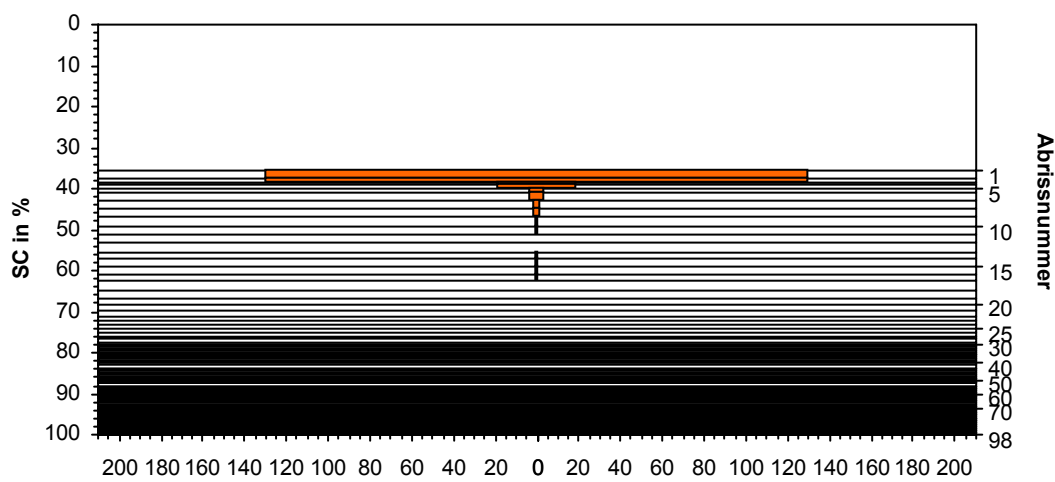
**3 C- Hornschichtprofil ■ 200nm 0,1% in PBS- „Massage“**

**Abbildung 23 Hornschicht-/ Penetrationsprofile 200m 0,01% in PBS**

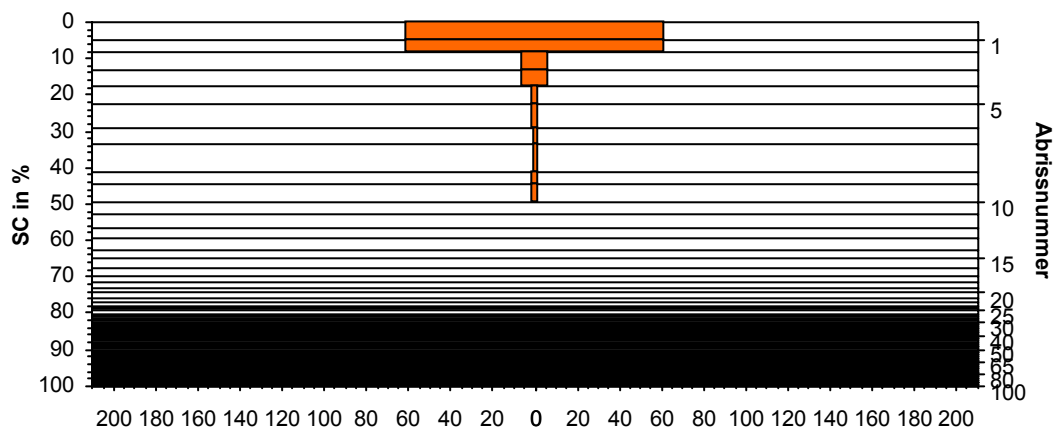
Diagramme A- C zeigen die PP für die Applikation von 200nm NP 0,01% in PBS auf nicht vorbehandelte Haut (A), auf CSSS vorbehandelte Haut (B) und nach Massage der Partikel (C). Achsenbeschriftung siehe Abb. 22.



**3 A- Hornschichtprofil 40nm 0,1% in BC- „keine Vorbehandlung“**



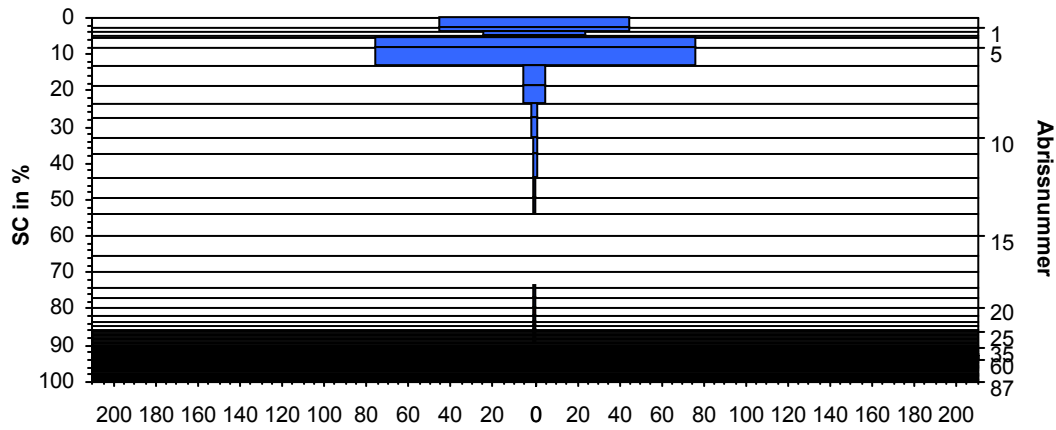
**3 B- Hornschichtprofil 40nm 0,1% in BC- „CSSS“**



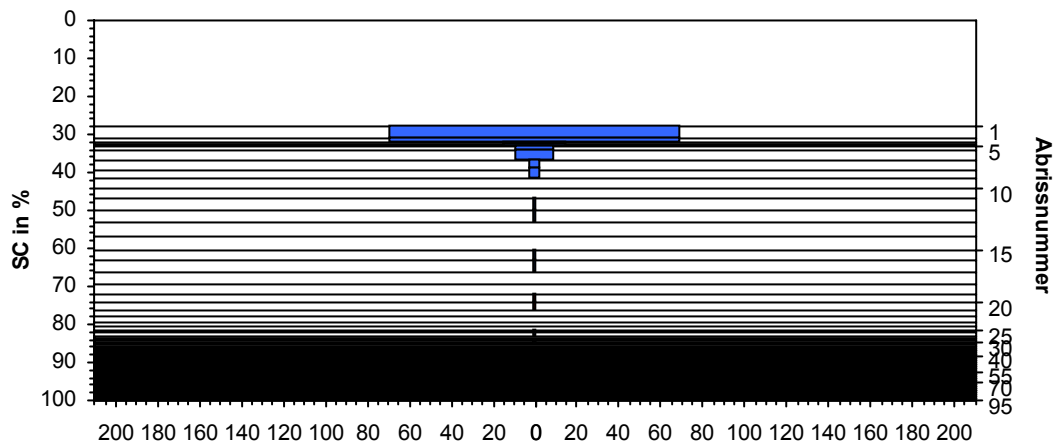
**3 C- Hornschichtprofil 40nm 0,1% in BC- „Massage“**

**Abbildung 24 Hornschicht-/ Penetrationsprofile 40m 0,1% in Basiscreme**

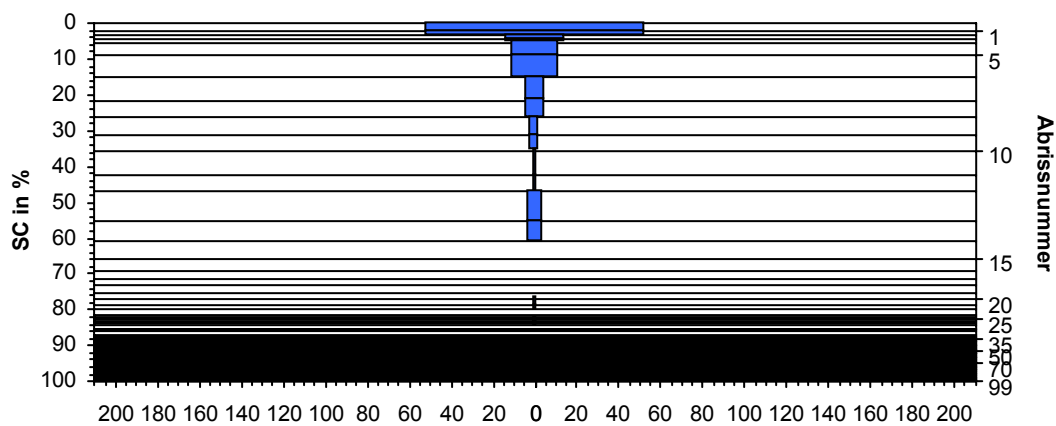
Diagramme A- C zeigen die PP für die Applikation von 40nm NP 0,1% in BC auf nicht vorbehandelte Haut (A), auf CSSS vorbehandelte Haut (B) und nach Massage der Partikel (C). Achsenbeschriftung siehe Abb.22.



4 A- Hornschichtprofil 200nm 0,1% in BC- „keine Vorbehandlung“



4 B- Hornschichtprofil 200nm 0,1% in BC- „CSSS“



4 C- Hornschichtprofil 200nm 0,1% in BC- „Massage“

**Abbildung 25** Hornschicht-/ Penetrationsprofile 200m 0,1% in Basiscreme

Diagramme A- C zeigen die PP für die Applikation von 200nm NP 0,1% in BC auf nicht vorbehandelte Haut (A), auf CSSS vorbehandelte Haut (B) und nach Massage der Partikel (C). Achsenbeschriftung siehe Abb.22.

### 3.2.1 Hornschichtprofil- Bestimmung der Menge an Korneozyten je Filmstreifen

Durch die Erstellung der Hornschichtprofile konnte der Einfluss der Formulierung bzw. der Vorbehandlungen auf die entfernte Menge an SC je Filmstreifen untersucht werden. In der Zusammenstellung der einzelnen Vorbehandlungstechniken zeigte sich kein signifikanter Einfluss der Partikelgröße und Formulierung (Abb. 26- 28).

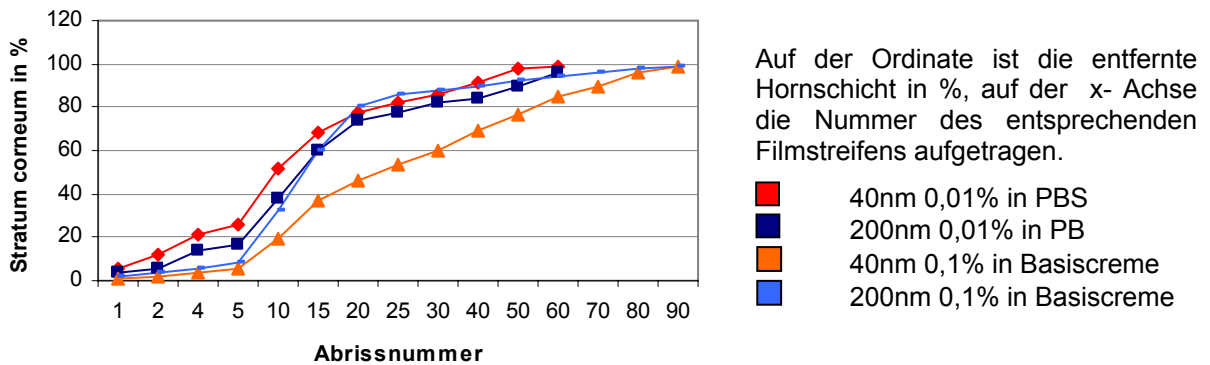


Abbildung 26 Prozentual entfernte Menge an Korneozyten nach kompletter Entfernung des SC nach NP- Applikation auf unbehandelte Haut.

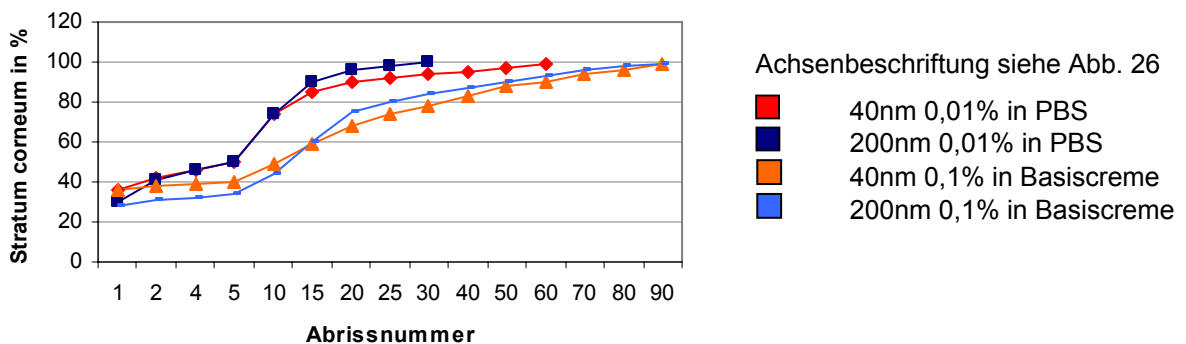


Abbildung 27 Prozentual entfernte Menge an Korneozyten nach kompletter Entfernung des SC nach NP- Applikation auf CSSS- vorbehandelte Haut.

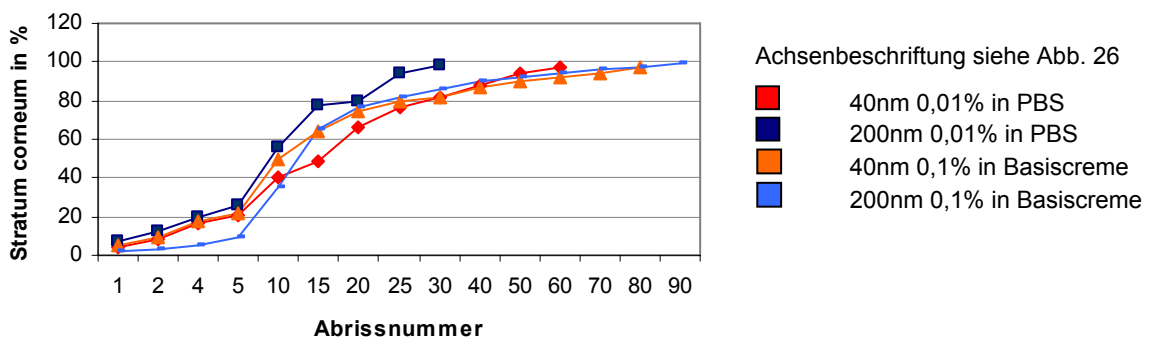
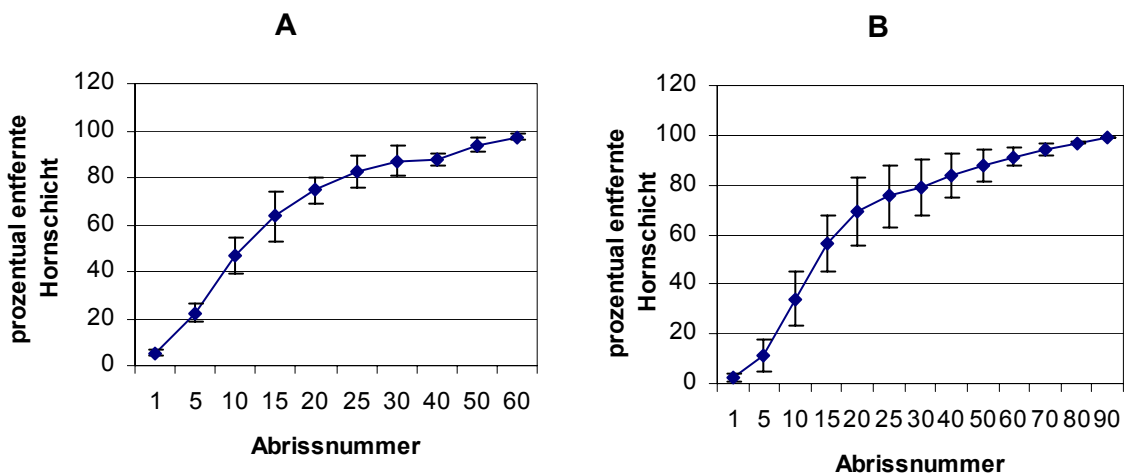


Abbildung 28 Prozentual entfernte Menge an Korneozyten nach kompletter Entfernung des SC nach NP- Applikation auf Massage behandelte Haut.

Nach Applikation der NP in PBS wurde in nicht behandelten und mit CSSS vorbehandelten Hautproben mehr SC je Filmstreifen entfernt. Bei der Untersuchung des Einflusses von Massage gilt dies allein für 200nm NP in PBS. Die Ergebnisse liegen jedoch nah beieinander.

Eine Darstellung der Mittelwerte bestätigt, dass nach Applikation der Substanz in PBS mehr Hornschichtzellen je Abriss entfernt wurden als in der BC- Formulierung. Dabei verglich man nur nicht vorbehandelte und mit Massage behandelte Haut miteinander. Bezüglich CSSS vorbehandelter Haut ist zu bemerken, dass der erste Abriss zwar mehr Korneozytenschichten entfernte, doch sich die Kurven mit steigender Filmrissnummer zunehmend an die nicht vorbehandelten bzw. mit Massage behandelten Proben angleichen ( nicht veröffentlichte Daten).



**Abbildung 29** Prozentual entfernte Menge an SC je Filmstreifen: Mittelwerte 40nm und 200 nm NP in PBS bzw. BC

Die Abbildungen zeigen die Mittelwerte des prozentual entfernten SC (Ordinate) je Abrissnummer (Abszisse) für beide Partikelgrößen in PBS (A) bzw. BC (B) zusammengefasst.

Aus den Abbildungen können folgende Aussagen getroffen werden:

Es zeigt sich, dass man nach Applikation in PBS mit 5 Filmstreifen 22,5% ± 3,8%, mit 10 Tapes 46,5% ± 7,7%, nach 20 Filmstreifen 74,5% ± 5,4%, nach 30 Tapes 87% ± 6,6% und mit 50 Tapes 94% ± 3,3% des SC durchschnittlich abtrug.

Nach Auftragen der Partikel in BC wurden mit 5 Filmstreifen 11,25% ± 6,3%, nach 10 Tapes 34% ± 11%, mit 20 Tapes 69,3% ± 13,5%, mit 30 Abrissen 79% ± 11,2% und nach 50 Tapes im Mittel 87,8% ± 6,3% der Hornschicht entfernt.

Die gemittelten Werte für die einzelnen Vorbehandlungstechniken liegen dementsprechend zwischen den Ergebnissen für hydrophile Lösung bzw. lipophiler Grundlage (Tabelle 2).

Abriss-nr.	Mittelwerte in % „keine Vorbe- handlung“	Mittelwerte in % „CSSS“	Mittelwerte in % „Massage“
1	3,3	32,5	4,5
2	6,0	38,0	8,0
4	11,3	40,8	15,0
5	14,3	43,5	19,5
10	35,3	60,3	45,3
15	56,3	73,5	64,0
20	69,5	82,3	74,3
25	75,0	86,0	83,3
30	79,0	89,0	87,0
40	83,5	88,3	88,3
50	89,3	91,7	92,0
60	93,5	94,0	94,3
70	93,0	95,0	95,0
80	97,0	97,0	97,0
90	99,0	99,0	99,0

**Tabelle 2 Mittelwerte der je Filmstreifen entfernten Hornschicht in Prozent**

Mittels des HP wurde das gesamte SC abgetragen.

Tabelle 2 stellt die durchschnittlich entfernte Menge an Korneozyten je Abrissnummer für die einzelnen Vorbehandlungstechniken dar.

### 3.2.2 CSSS

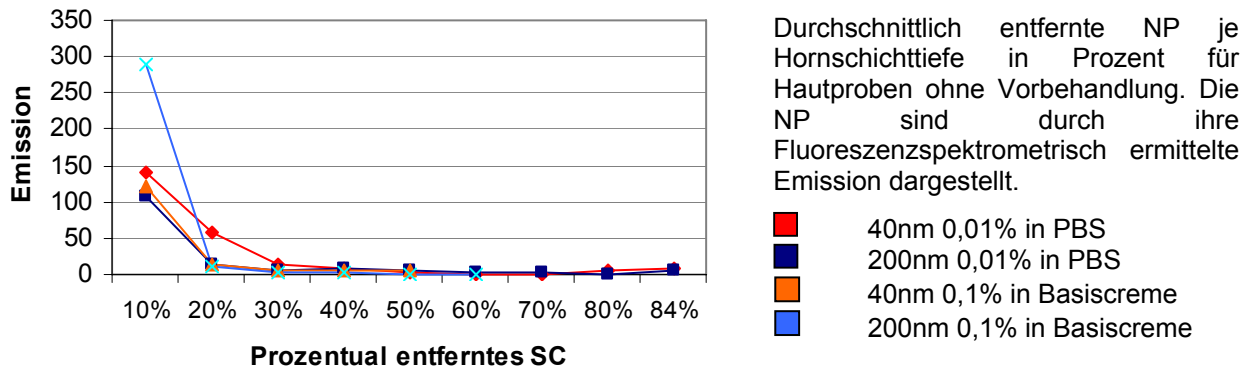
Die Erstellung der Mittelwerte für die nach CSSS entfernte Menge an Korneozyten ergab, dass ein Cyanoacrylatabriss  $32,5\% \pm 3,6\%$  des SC entfernt (vgl. Tabelle 2).

### 3.2.3 Penetrationsprofile- Verteilung der Nanopartikel im Stratum Corneum

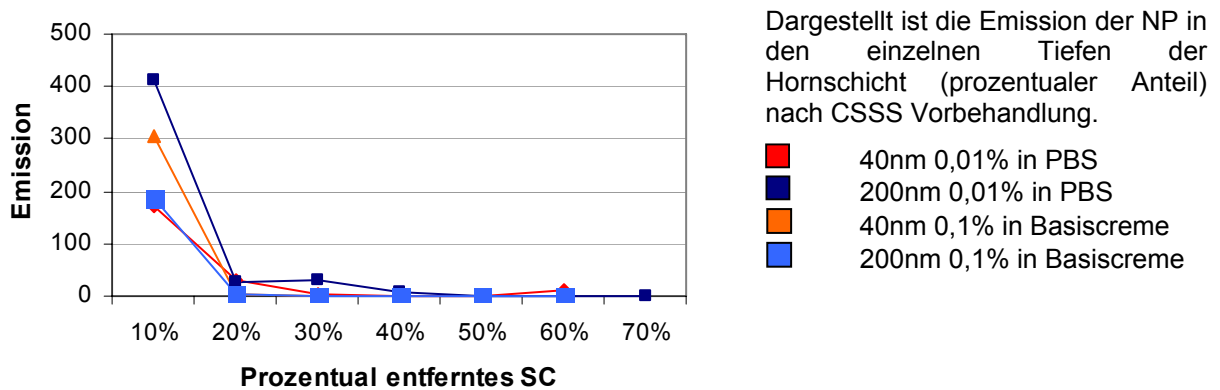
Mittels der HP wurde das gesamte SC entfernt und für die einzelnen Filmstreifen der Prozentsatz an entfernten Korneozyten bestimmt.

Mittels der PP, wobei man jeweils zwei Filmstreifen zusammenfasste, konnte die Emission der Partikel in den verschiedenen Tiefen der Hornschicht ermittelt werden. Anhand der Kalibrierungskurven kann man anschließend die Konzentration der Partikel bestimmen. Die folgenden Diagramme zeigen die je 10%, 20%, 30% etc. entfernter Hornschicht gemessenen NP unter Angabe der Emission.

In nicht vorbehandelter Haut (Abb. 30) fanden sich in den obersten 10% des SC 20 - 55% der aufgetragenen Menge von NP (200nm PBS < 40nm BC < 40nm PBS < 200nm BC), bis zu 20% der Hornschicht 3 - 15% und bis zur Entfernung von 30% des SC 1 - 6% der insgesamt applizierten Partikel. Weit unter 5% fanden sich bis zur Entfernung von 80% des SC nach Applikation in PBS und bis zu 50% (40nm) bzw. 60% (200nm) der Partikel in BC.



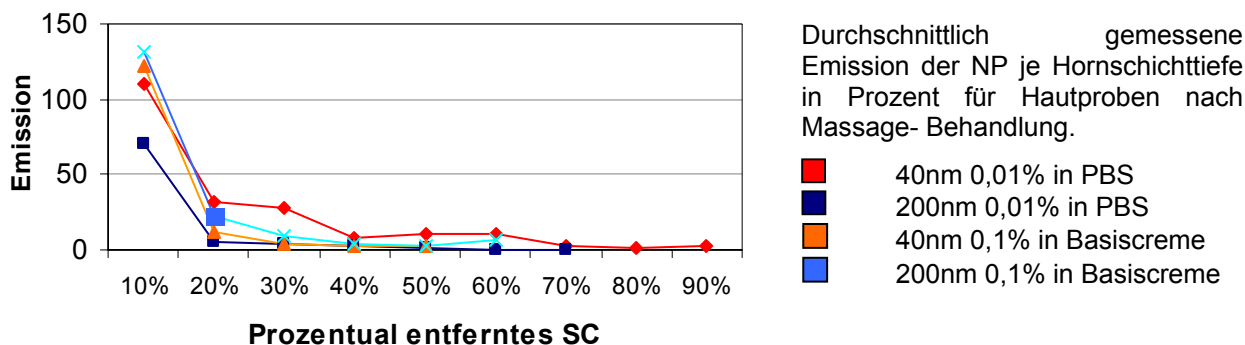
**Abbildung 30 Verteilung der NP im SC: Hautproben ohne Vorbehandlung**



**Abbildung 31 Verteilung der NP im SC: Hautproben nach CSSS-Vorbehandlung**

In CSSS vorbehandelter Haut (Abb. 31) konnten in den obersten 10% der Hornschicht 35 - 80% der aufgetragenen Partikelmenge wiedergefunden werden (200nm BC < 40nm PBS < 40nm BC < 200nm PBS). Bis zu 20% bzw. daraufhin bis zu 30% entfernten SC fanden sich jeweils 2 - 10% der applizierten Partikel. 40nm NP in PBS und 200nm in beiden Formulierungen konnten in geringen Konzentrationen bis zur Entfernung von 60% der Hornschicht detektiert werden



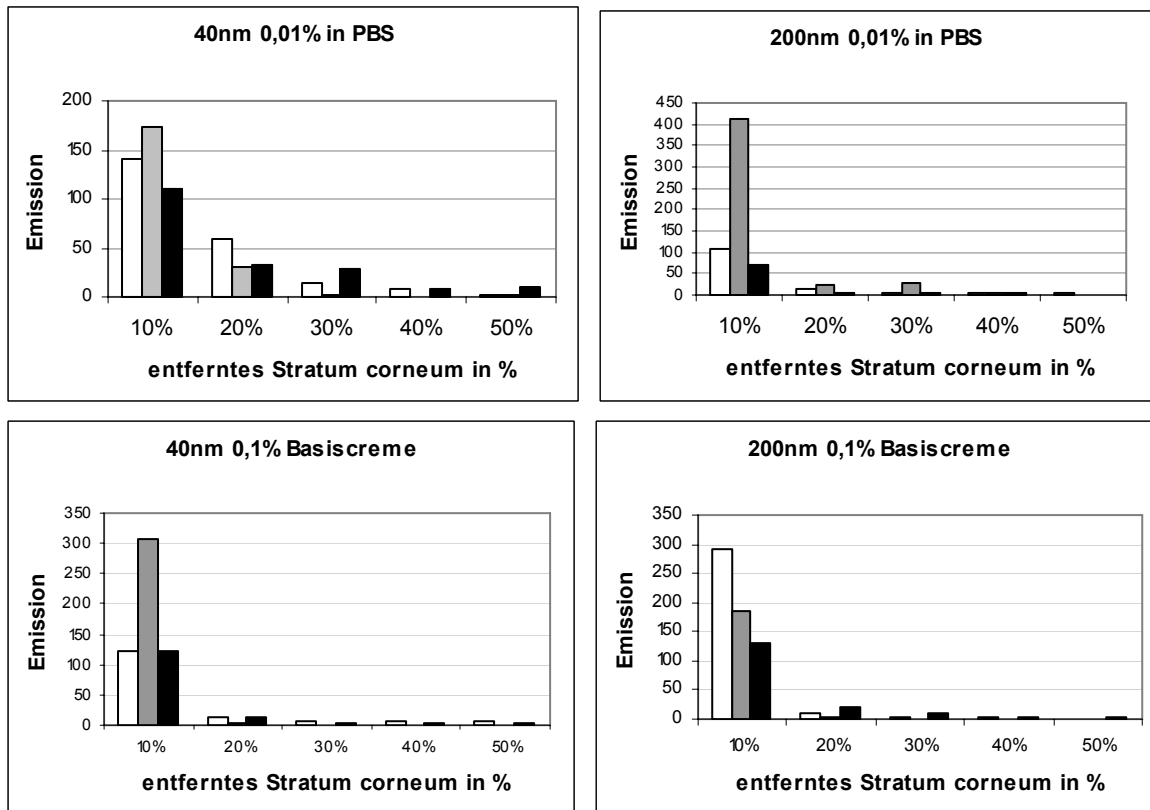


**Abbildung 32 Verteilung der NP im SC: Hautproben mit Massage-Behandlung**

Aus mit Massage behandelter Haut (Abb. 32) konnten in den obersten 10% des SC 15-30% der applizierten NP detektiert werden (200nm PBS < 40nm PBS < 40/ 200nm BC). In den beiden folgenden 10 Prozent entfernter Hornschicht, d.h. bis zu 20% bzw. 30% konnten jeweils 2- 10% der aufgetragenen Partikel aus den Tapes extrahiert werden. In geringen Mengen, d.h. weit unter 5% der aufgetragenen Partikel, konnten 40nm NP in PBS bis zu 90%, 200nm NP in PBS bis 70% und NP in BC bis zu 50% abgetragener Hornschicht gefunden werden.

Aus den Abbildungen wird ersichtlich, dass sich der größte Anteil der aufgetragenen NP in den obersten 10% bzw. bis zu 20% des SC befindet und Partikel in geringen Mengen noch bis zu mind. 50% Tiefe zu finden sind.

In Abb. 33 wird der Einfluss der Vorbehandlungstechniken innerhalb einer Partikelgröße und Formulierung verglichen. Im Unterschied zu allen anderen Partikelgrößen, bei denen das HP bzw. PP jeweils nur einmal erstellt worden war, ist es für die 40nm Partikel 0,01% in PBS mit der Häufigkeit n=4 erstellt worden.



**Abbildung 33 Verteilung der NP in den Schichten des SC**

In vier Diagrammen ist die Emission für 40nm und 200nm NP in PBS bzw. BC aus jeweils zwei zusammengefassten Filmstreifen dargestellt. Dabei ist die Menge an Partikeln, nebeneinander jeweils die Proben ohne Vorbehandlung (weiß), nach CSSS (grau) und nach Massage (schwarz), in den einzelnen Schichten des SC (von 10% bis max. 50% der Hornschicht) dargestellt.

Die Auswertung der 40nm NP in PBS zeigte kaum einen Einfluss der Vorbehandlungstechniken. Nach CSSS fand sich eine etwas höhere, nach Massage eine etwas geringere Konzentration an NP in den obersten 10% der Hornschicht.

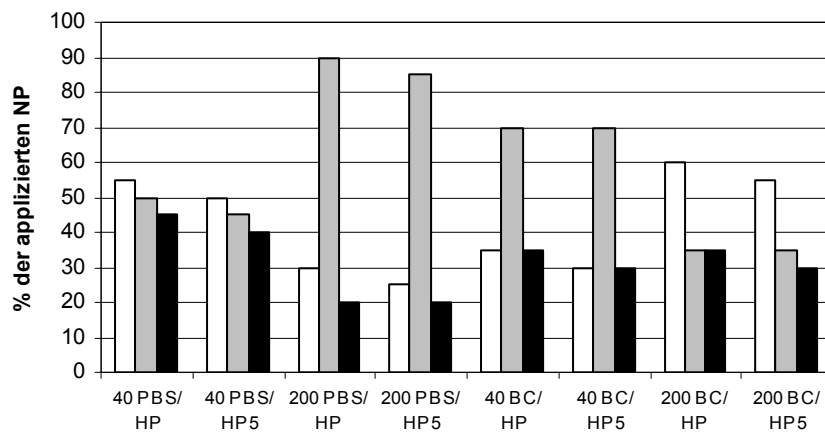
Nach einem CSSS fanden sich etwa vier Mal mehr 200nm NP 0,01% in PBS bzw. zweieinhalb Mal mehr 40nm NP 0,1% in BC in den obersten 10% der Hornschicht im Vergleich zu un behandelter bzw. mit Massage behandelter Haut. Einzig bei 200nm NP in BC zeigte sich eine leichte Abnahme der NP in den obersten Lagen der Hornschicht nach CSSS. Nach Massage zeigt sich für alle Partikelgrößen und Formulierungen eine Abnahme der NP-Konzentration in den ersten 10% des SC.

In allen Diagrammen ist zu sehen, dass die Konzentration aller Partikel gleichmäßig und in ähnlichen Größenordnungen mit zunehmender Tiefe des SC sinkt.

Partikel in PBS können in tieferen Lagen der Hornschicht detektiert werden als bei Applikation in BC. Zur Verbesserung der Übersichtlichkeit ist in Abb. 33 nur die Partikelpenetration bis zur Hälfte des SC dargestellt.

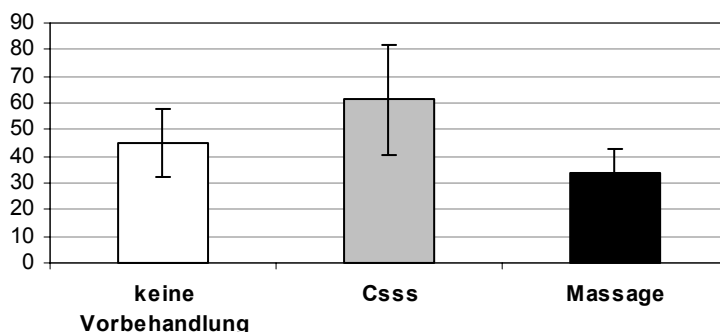
Mit den ersten fünf Abrissen des PP erfasste man  $88,5\% \pm 9,5\%$  der insgesamt gemessenen Emission (Abb. 34).

Anhand der Kalibrierungskurve konnte für die PP die Recovery Rate, d.h. der Anteil der im SC gemessenen Partikel an der applizierten Menge der Substanz, bestimmt werden. Im Durchschnitt wurden  $46,7\% \pm 18,8\%$  der aufgetragenen Partikel im vollständig abgetragenen SC gemessen.



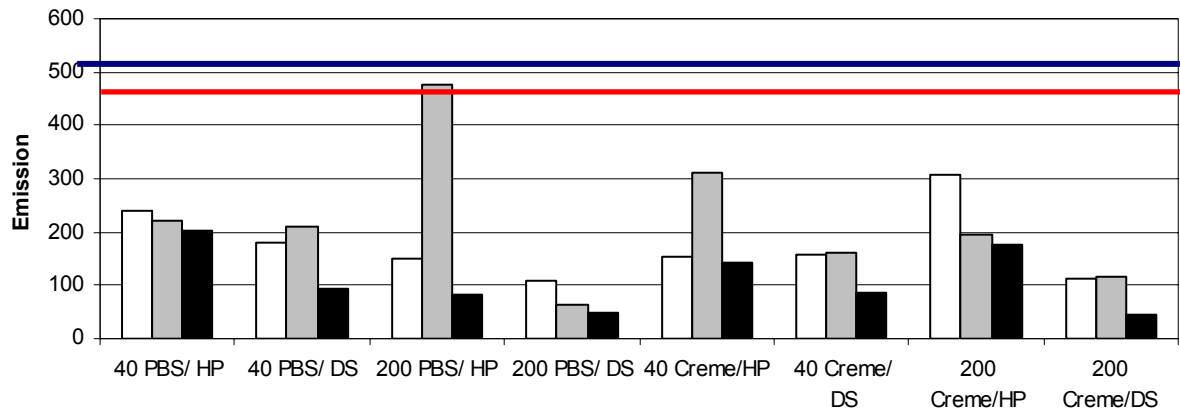
**Abbildung 34 Recovery Rate aus dem gesamten SC bzw. aus den ersten fünf Abrissen des PP** Nebeneinander jeweils die Recover Rate aus dem gesamten SC (HP) bzw. den ersten 5 Abrissen (HP5) für beide Partikelgrößen und Formulierungen. Mit den ersten fünf Tapes wird der Grossteil der NP im SC erfasst.

Die Differenzierung für die einzelnen Vorbehandlungstechniken zeigt Abb. 35. Nach CSSS zeigt sich eine Vergrößerung, nach Massage eine Reduktion des interfollikulären Reservoirs.



**Abbildung 35 Mittelwerte der Recovery Rate von 40nm und 200nm NP in PBS und BC für die Vorbehandlungstechniken „keine Vorbehandlung“, „CSSS“, Massage“.**

Abb. 36 stellt die Recovery Rate des gesamten PP jener der ersten fünf Filmstreifen, die im DTS als repräsentativ für das SC erfasst wurden, gegenüber.

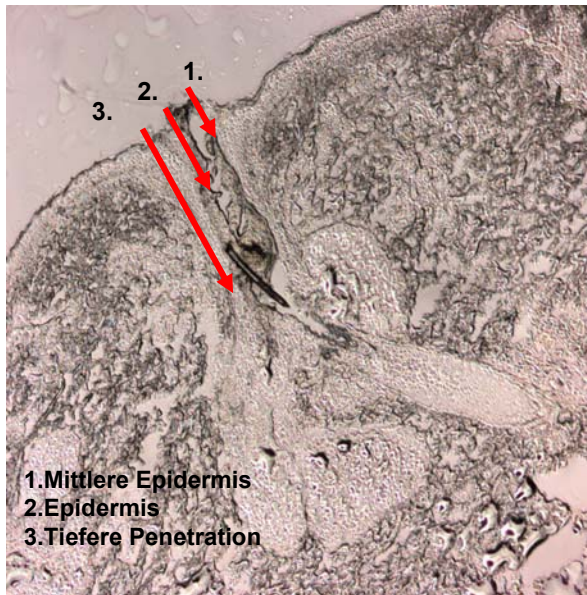


**Abbildung 36 Im PP bzw. im DTS ermittelte Recovery Rate**

Die summierten Emissionsraten der NP aus dem vollständig entfernten SC (HP) entsprechen der Gesamt- Recovery Rate. Sie werden der Emission der ersten fünf Tapes des DTS (DS) gegenübergestellt. Die beiden Gruppen, HP und DS, sind für 40nm NP 0,01% in PBS, 200nm NP 0,01% in PBS, 40nm NP 0,1% in BC, 200nm NP 0,1% in BC nebeneinander dargestellt. Für jede Gruppe ist die Recovery Rates der drei Vorbehandlungstechniken (keine Vorbehandlung: weiß/ CSSS: grau/ Massage: schwarz) nebeneinander abgebildet. Die rote bzw. blaue Linie stellt die Emission der 40nm (rot) bzw. 200nm (blau) Partikel dar, welche der Konzentration der insgesamt applizierten Menge an NP entspricht.

### 3.3 Kryoschnitte

Abb. 37 zeigt die Aufnahme eines Haarfollikels. Eingezeichnet sind drei der unterschiedenen Penetrationstiefen „Mittlere Epidermis“, „Epidermis“ und „tiefer“, die das Eindringen der Partikel charakterisierten. Diese für Penetration „offenen“ Follikel sind bei Auswertung der Proben von Haarfollikeln, die „keine Penetration“ zeigten, zu unterscheiden.



Die Abbildung zeigt die Aufnahme eines Intermediärhaarfollikels. Zu sehen sind Teile des Haarschaftes, die Haarwurzel und die Talgdrüse. Man erkennt die Epidermis, die Dermis und die Subkutis.

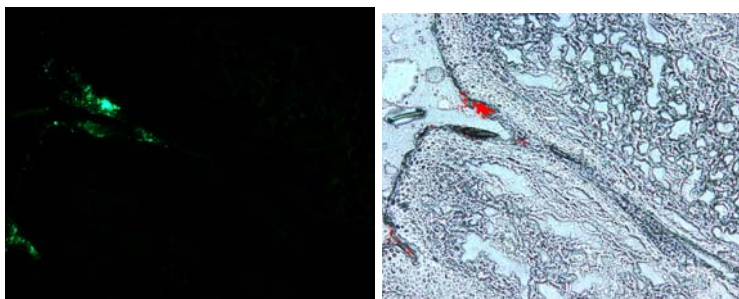
Nativaufnahme bei 10facher Vergrößerung mit dem Fluoreszenzmikroskop (BX60F3, Olympus, Hamburg, Germany).

Mit Pfeilen gekennzeichnet sind die Eindringtiefen der NP, zwischen denen bei der Auswertung der Gewebsschnitte unterschieden wurde.

Abbildung 37 Auswertung der Penetrationstiefen.

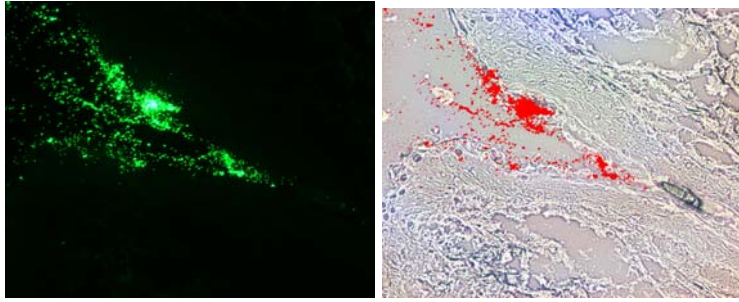
#### 3.3.1 Fluoreszenzaufnahmen der Penetration von Partikeln

Die folgenden Aufnahmen (Abb. 38- 43) zeigen Fluoreszenzaufnahmen und jeweils ein entsprechendes Überlagerungsbild aus Fluoreszenz- und Nativbild derselben Stelle eines Haarfollikels. Darin erkennt man die NP rot in den Strukturen des Follikels.



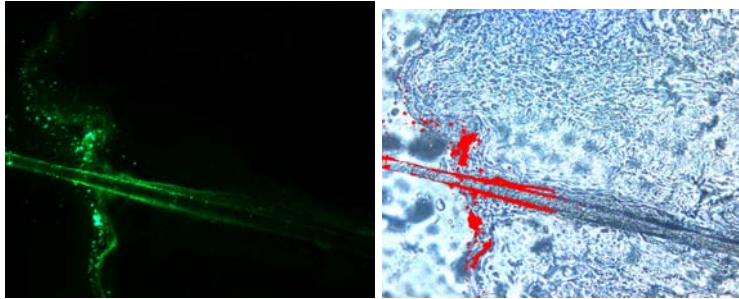
Niba/ Überlagerungsbild,  
Fluoreszenzmikroskop -  
BX60F3, Olympus,  
Hamburg, Germany, 20x  
Vergrößerung.

Abbildung 38 Foto: 200nm NP 0,1% in PBS/ keine Vorbehandlung



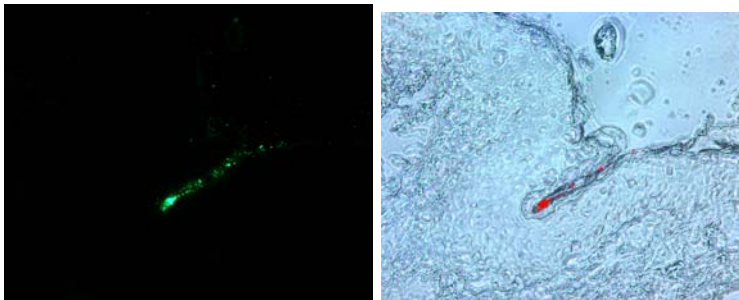
Niba/ Überlagerungsbild,  
Fluoreszenzmikroskop s.  
Abb. 38, 20x Vergrößerung.

**Abbildung 39 Foto: 200nm NP 0,1% in PBS/ keine Vorbehandlung**



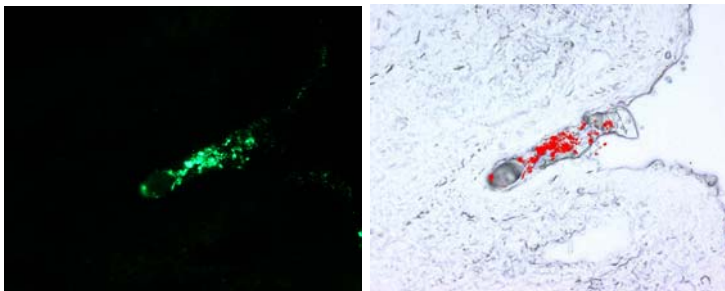
Niba/ Überlagerungsbild,  
Fluoreszenzmikroskop s.  
Abb. 38, 20x Vergrößerung.

**Abbildung 40 Foto: 200nm NP 0,1% in PBS/ Massage**



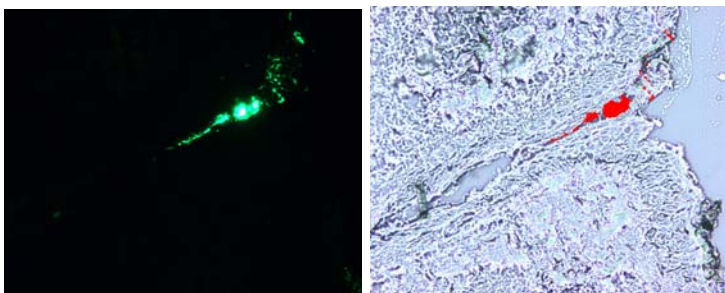
Niba/ Überlagerungsbild,  
Fluoreszenzmikroskop s.  
Abb. 38, 20x Vergrößerung.

**Abbildung 41 Foto: 200nm NP 0,1% in PBS/ Massage**



Niba/ Überlagerungsbild,  
Fluoreszenzmikroskop s.  
Abb. 38, 20x Vergrößerung,

**Abbildung 42 Foto: 40nm NP 0,1% in PBS/ CSSS**



Niba/ Überlagerungsbild,  
Fluoreszenzmikroskop s.  
Abb. 38, 20x Vergrößerung.

**Abbildung 43 Foto: 40nm NP 0,1% in PBS/ CSSS**

### 3.3.2 Wirkung der Vorbehandlung mit einem CSSS auf das Penetrationsverhalten

Zunächst wird die Wirkung von CSSS auf das Penetrationsverhalten der 40nm und 200nm Partikel in PBS und BC analysiert.

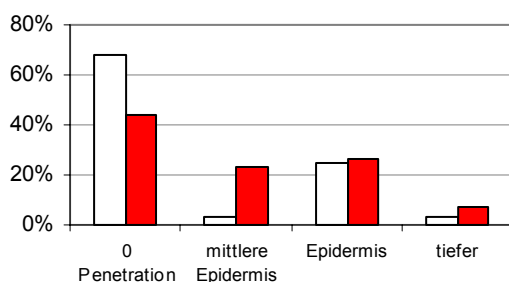
#### 3.3.2.1 40nm und 200nm NP 0,1% in PBS im Vergleich: keine Vorbehandlung versus 1 CSSS

Nach einem CSSS zeigten sich durchschnittlich 37% mehr Haarfollikel offen für die Penetration von 40nm Partikeln 0,1% in PBS. Die Unterschiede zu un behandelter Haut waren statistisch signifikant ( $p < 0,0002$ ). Das vermehrte Eindringen von Partikeln zeigte sich in allen Tiefen des Haarfollikels. In VHF ist die Verstärkung der oberflächlichen Penetration besonders augenfällig (4% auf 23%). In IHF ließ sich eher eine Zunahme der tiefen Penetration beobachten (bis zur kompletten Epidermis von 27% bei un behandelter Haut auf 35% nach 1 CSSS bzw. tiefe Penetration von 0% auf 20%).

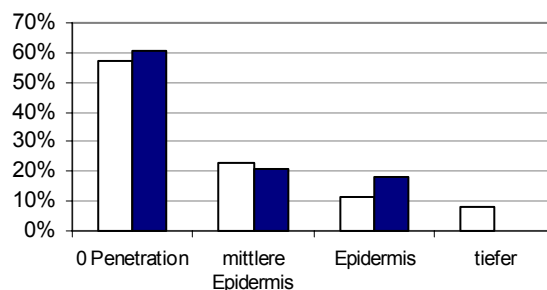
Die Vorbehandlung mit einem CSSS brachte keine signifikante Verbesserung der Penetration von 200nm NP 0,1% in PBS im Vergleich zu un behandelter Haut.

Auffällig in VHF und IHF ist die leichte Abnahme der Penetration bis zur mittleren Epidermis (z.B. in IHF von 24% in un behandelter Haut auf 14% nach CSSS) und gleichzeitige Zunahme der detektierten Partikel bis zur kompletten Epidermis (z.B. von 26% ohne Vorbehandlung auf 41% nach CSSS in IHF) bei unveränderter Zahl der „offenen“ Follikel und der tiefen Penetration.

40nm 0,1% in PBS- keine Vorbehandlung vs 1 CSSS (137 VHF)

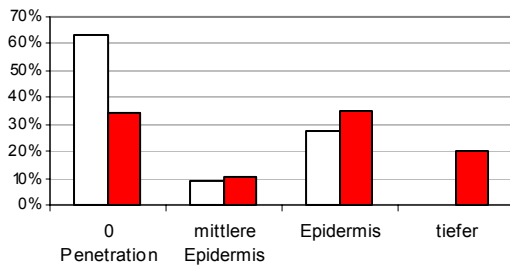


200nm 0,1% in PBS- keine Vorbehandlung vs 1 CSSS (94 VHF)

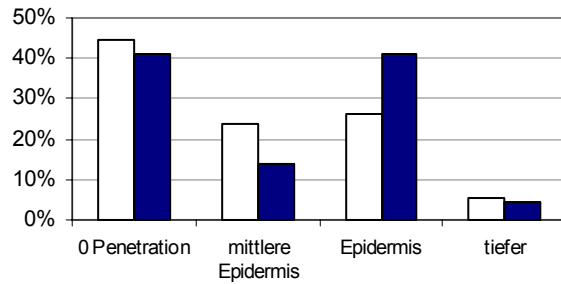




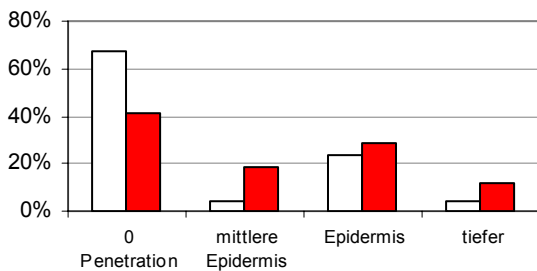
**40nm 0,1% in PBS- keine Vorbehandlung vs 1 CSSS (54 IHF)**



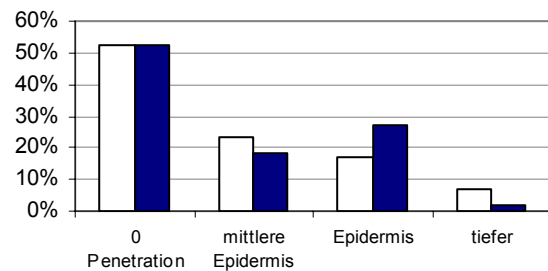
**200nm 0,1% in PBS 0 Probe vs 1 CSSS (60 IHF)**



**40nm 0,1% in PBS- keine Vorbehandlung vs 1 CSSS (191 Haarfollikel gesamt)**



**200nm 0,1% in PBS- keine Vorbehandlung vs 1 CSSS (154 Haarfollikel gesamt)**



1.

2.

**Abbildung 44 Follikuläre Penetration von 40nm und 200nm NP 0,1% in PBS nach CSSS**

Die Diagramme zeigen das Penetrationsverhalten von 40nm (1.) bzw. 200nm Partikeln (2.) 0,1% in PBS nach Applikation auf unbehandelte ( □ ) oder CSSS- vorbehandelte (40nm ■ 200nm ■ ) Haut. Bei der Auswertung der Gewebsschnitte wurde zwischen keiner, d.h. „0 Penetration“, und Penetration bis zur „mittlere“n Epidermis, bis zur „Epidermis“ oder „tiefer“ unterschieden.

Die Analyse der 40nm NP zeige eine signifikante Zunahme der „offenen“ Follikel nach CSSS.

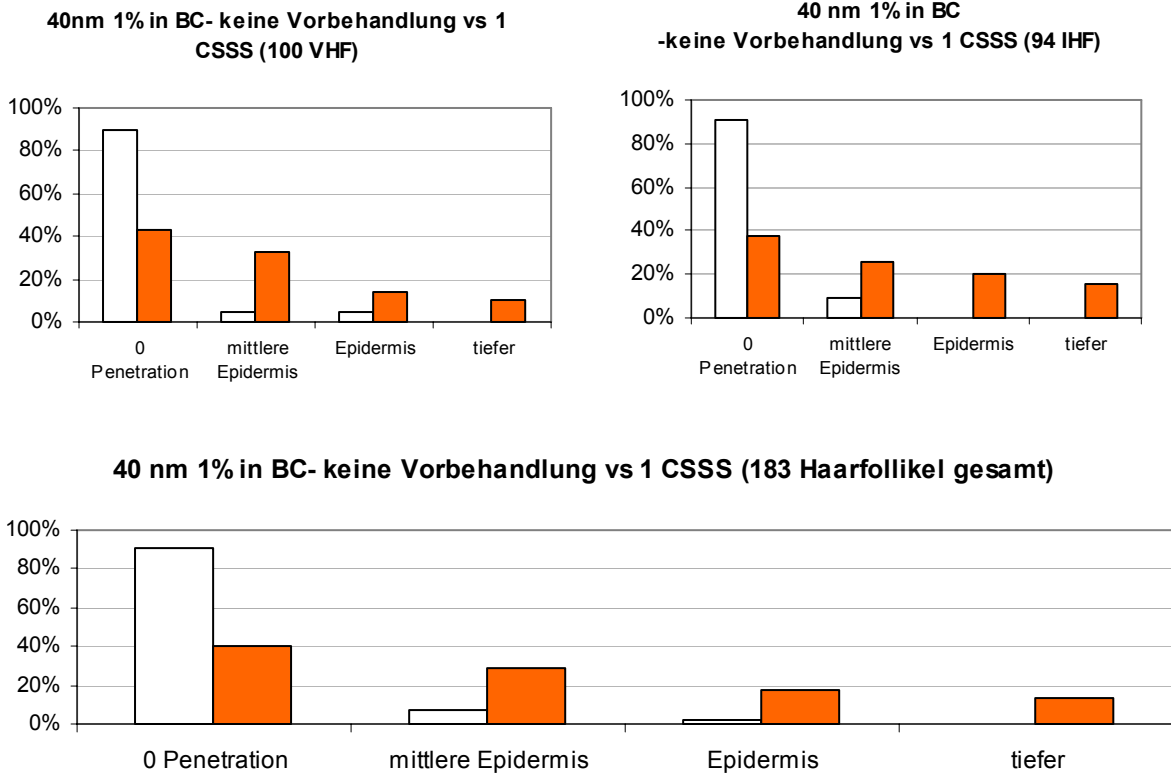
Die Auswertung der 200nm NP Proben ergab keine signifikanten Unterschiede im Penetrationsverhalten nach Anwendung von CSSS im Unterschied zu keiner Vorbehandlung.

**3.3.2.2 40nm NP in 1% in Basiscreme: Keine Vorbehandlung versus 1 CSSS**

Nach einem CSSS ließ sich eine deutlich verstärkte Penetration der 40nm NP 1% in BC in Vellus- und Intermediärhaaren in allen Tiefen des Haarfollikels beobachten. In VHF ist ein stärkerer Anstieg bis zur mittleren Epidermis (in VHF von 5% auf 33%, in IHF von 9 auf 26%) zu verzeichnen. Die prozentuale Penetrationssteigerung bis zur kompletten Epidermis bzw. tiefer war ausgeprägter in Intermediärhaaren (Epidermis 0% auf 20% nach CSSS bzw. tiefer 0% auf 16%).

Nach einem CSSS waren durchschnittlich 55% mehr Follikel offen für Penetration im Unterschied zur Applikation der Partikel auf unbehandelte Haut. Die Unterschiede sind statistisch signifikant ( $p < 0,0001$ ).



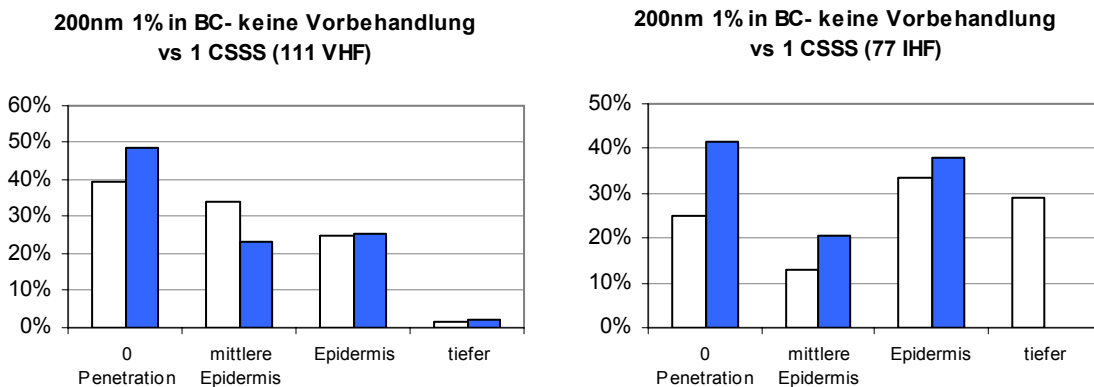


**Abbildung 45 Follikuläre Penetration von 40nm 1% in BC nach CSSS**

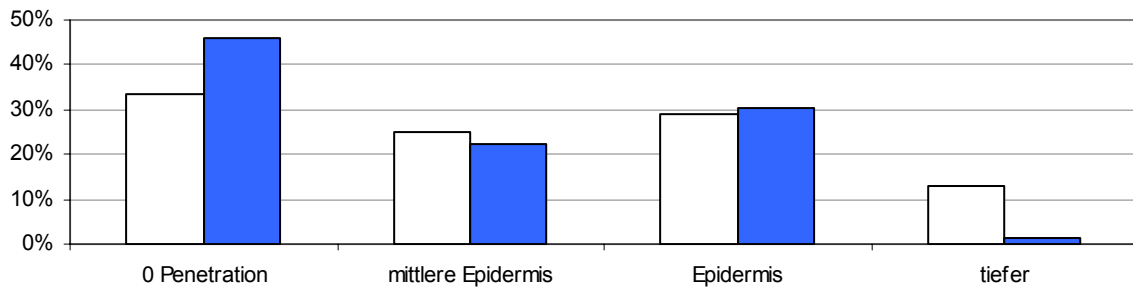
Die Diagramme zeigen das Penetrationsverhalten von 40nm 1% in BC nach einfachem Auftragen (□) bzw. nach Vorbehandlung mit einem Cyanoacrylatabriss (■), welcher die Zahl der „offenen“ Follikel signifikant erhöhte.

### 3.3.2.3 200nm NP in 1% in BC: Keine Vorbehandlung vs. 1 CSSS

Die Behandlung mit CSSS zeigte keine Verbesserung der Penetration von 200nm Partikeln in BC. Die Unterschiede in IHF und der Gesamtfollikelzahl waren statistisch signifikant ( $p < 0,005$ ). Bei Betrachtung der Gesamtzahl zeigten nach einem CSSS 40% weniger Haarfollikel keine Penetration von Partikeln im Vergleich zu unbehandelter Haut. Besonders die tiefe Penetration war reduziert.



**200nm 1% in BC- keine Vorbehandlung vs 1 CSSS (178 Haarfollikel gesamt)**



**Abbildung 46 Follikuläre Penetration von 200nm 1% in BC nach CSSS**

Die Untersuchung des Einflusses von CSSS (■) auf das Penetrationsverhalten von 200nm Partikeln 1% in BC zeigte keine Verbesserung des intrafollikulären Eindringens der Mikrosphären im Vergleich zur Applikation auf unbehandelte Haut (□).

**3.3.2.4 Zusammenfassung: Keine Vorbehandlung versus CSSS**

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass sich für 40nm Partikel in PBS und BC nach CSSS ein signifikanter Anstieg in der Zahl offener Follikel zeigte. Dabei war in VHF v.a. ein Anstieg der Penetration bis zur mittleren Epidermis und in IHF bis zur kompletten Epidermis bzw. tiefer zu verzeichnen.

Bezüglich 200nm NP in PBS konnte, bei gleich bleibender Zahl der „offenen Follikel“, ein Anstieg in der Penetration bis zur kompletten Epidermis beobachtet werden.

200nm NP in BC zeigten nach 1 CSSS keine Verbesserung des Penetrationsverhaltens.

**3.3.3 Wirkung von Massage auf das Penetrationsverhalten**

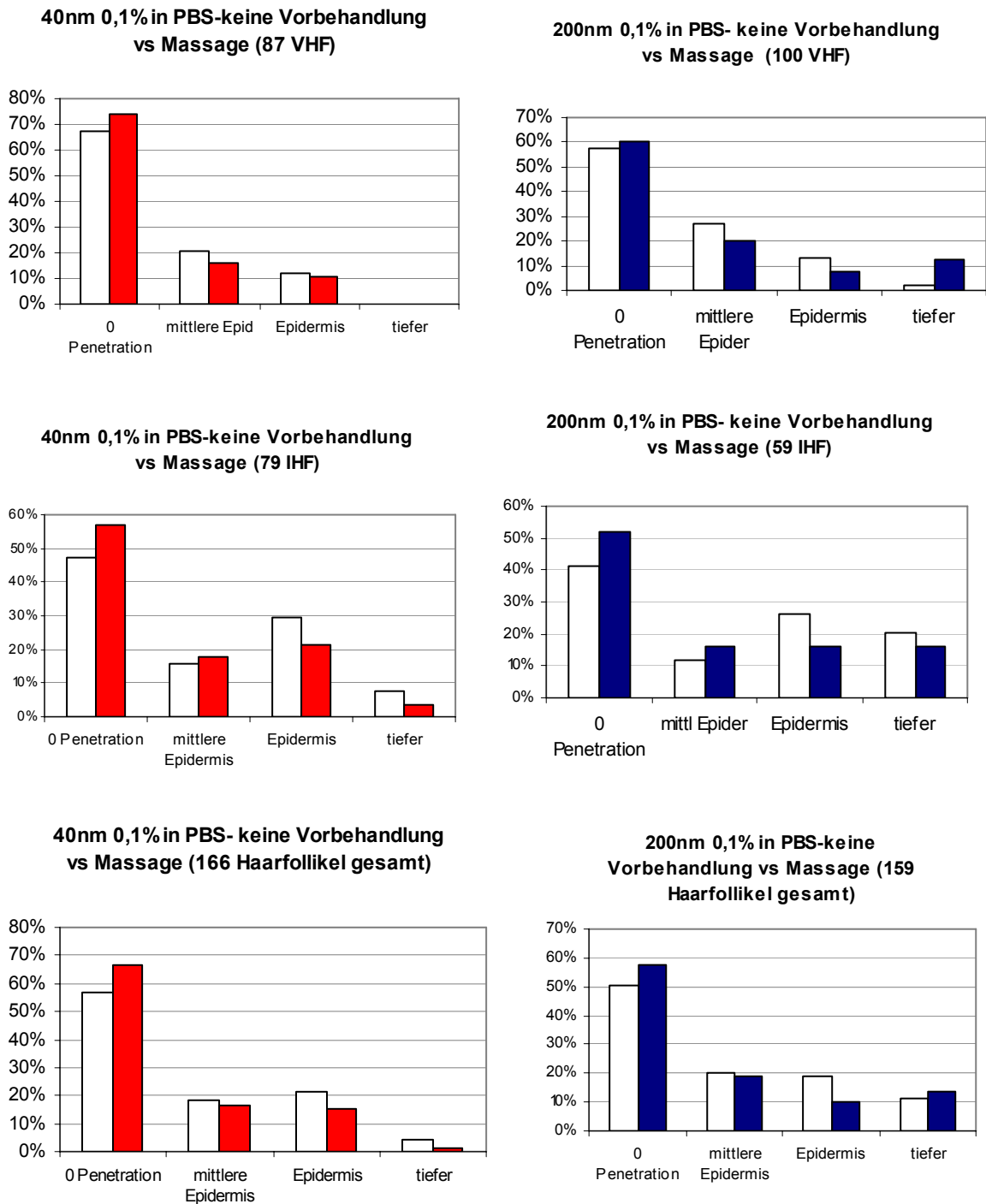
Im Folgenden wird die Wirkung von Massage auf das Penetrationsverhalten von 40nm NP und 200nm NP in PBS oder BC untersucht.

**3.3.3.1 40nm und 200nm NP 0,1% in PBS im Vergleich: keine Vorbehandlung versus Massage**

Massage zeigte im Vergleich zum Auftragen auf unbehandelte Haut keinen signifikanten Einfluss auf das Penetrationsverhalten von 40nm Partikel 0,1% in PBS.

Die statistische Auswertung zeigte einen signifikanten Unterschied im Penetrationsverhalten von 200nm Partikeln 0,1% in PBS nach Anwendung von Massage in VHF (p= 0,002) im Vergleich zu keiner Vorbehandlung. Zwar war ein geringerer Anteil von Partikeln bis zur kompletten Epidermis penetriert, doch zeigte sich, bei etwa gleich bleibender Zahl „offener“ Follikel, ein Anstieg der tiefen Penetration von 2% in Proben un behandelter Haut auf 13% nach Massage.

Die Analyse der Ergebnisse der IHF ergab keinen statistisch signifikanten Unterschied.



1.

2.

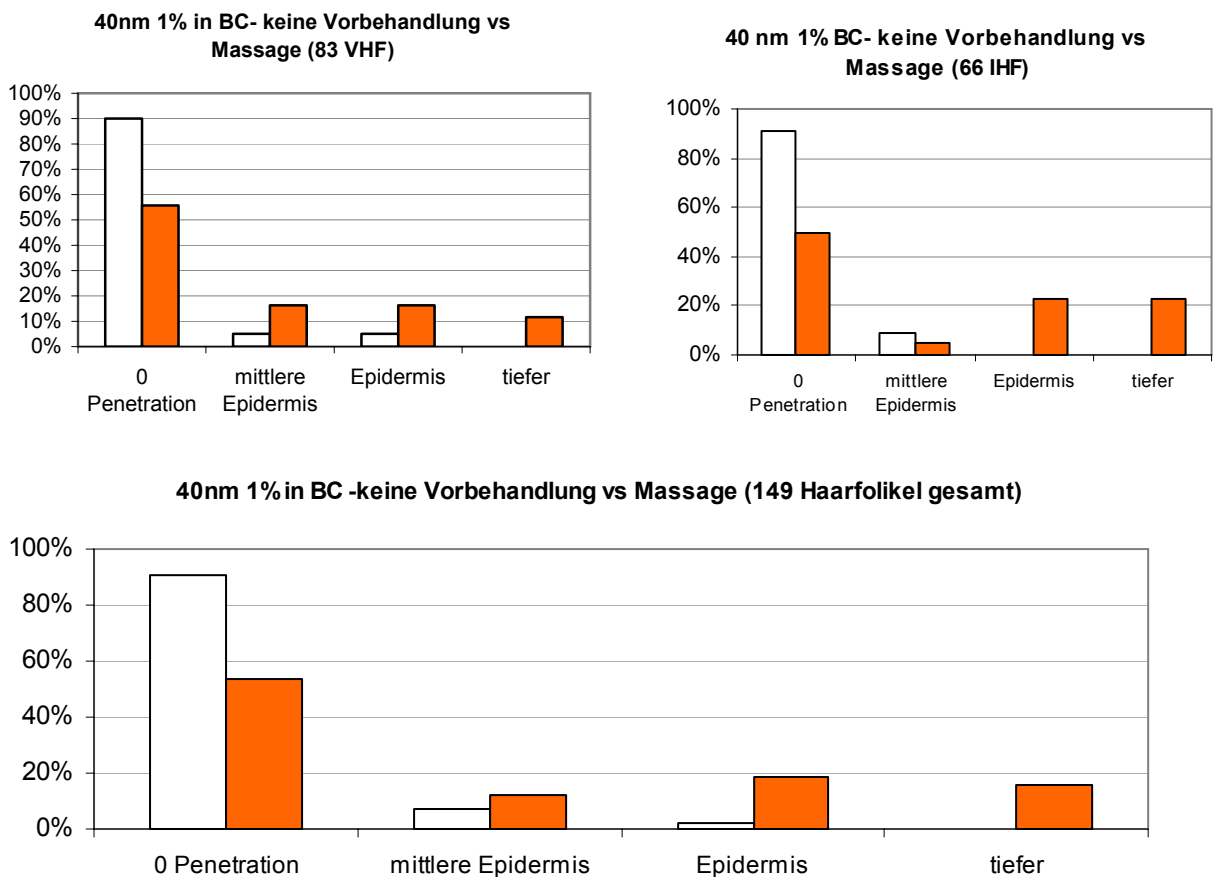
**Abbildung 47 Follikuläre Penetration von 40nm und 200nm NP 0,1% in PBS nach Massage**

Die Diagramme zeigen das Penetrationsverhalten von 40nm (1.) bzw. 200nm Partikeln (2.) 0,1% in PBS nach Applikation auf unbehandelte (□) oder mit Massage behandelte (40nm ■ 200nm ■) Haut. Bei der Auswertung der Gewebsschnitte wurde zwischen den Tiefen „0 Penetration“, „mittlere“ Epidermis, „Epidermis“ oder „tiefer“ unterschieden. Nur für das Penetrationsverhalten von 200nm NP in VHF (2.) konnte ein statistisch signifikanter Unterschied im Penetrationsverhalten nach Massage gezeigt werden.

### 3.3.3.2 40nm NP in 1% in BC: Keine Vorbehandlung versus Massage

Nach der Anwendung von Massage waren durchschnittlich 43% mehr Follikel positiv für die Penetration von Partikeln. Zu beobachten waren ein diskreter Anstieg in der Penetration bis zur mittleren Epidermis, insbesondere bei VHF, und eine deutliche Zunahme des Eindringens von Partikeln bis zur kompletten Epidermis und darüber hinaus. Dieser Effekt ist in IHF deutlicher ausgeprägt als bei den VHF (Penetration bis zur Epidermis 3 x mehr in VHF, 22 x mehr in IHF bzw. tiefer 11 x mehr in VHF, 23 x mehr in IHF nach Massage im Vergleich zu un behandelter Haut).

Der Vergleich des Penetrationsverhalten von 40nm NP nach dem Auftragen auf un behandelte Haut bzw. nach dem Einmassieren der Partikel zeigte einen signifikanten Unterschied ( $p < 0,0001$ ) in VHF und IHF.

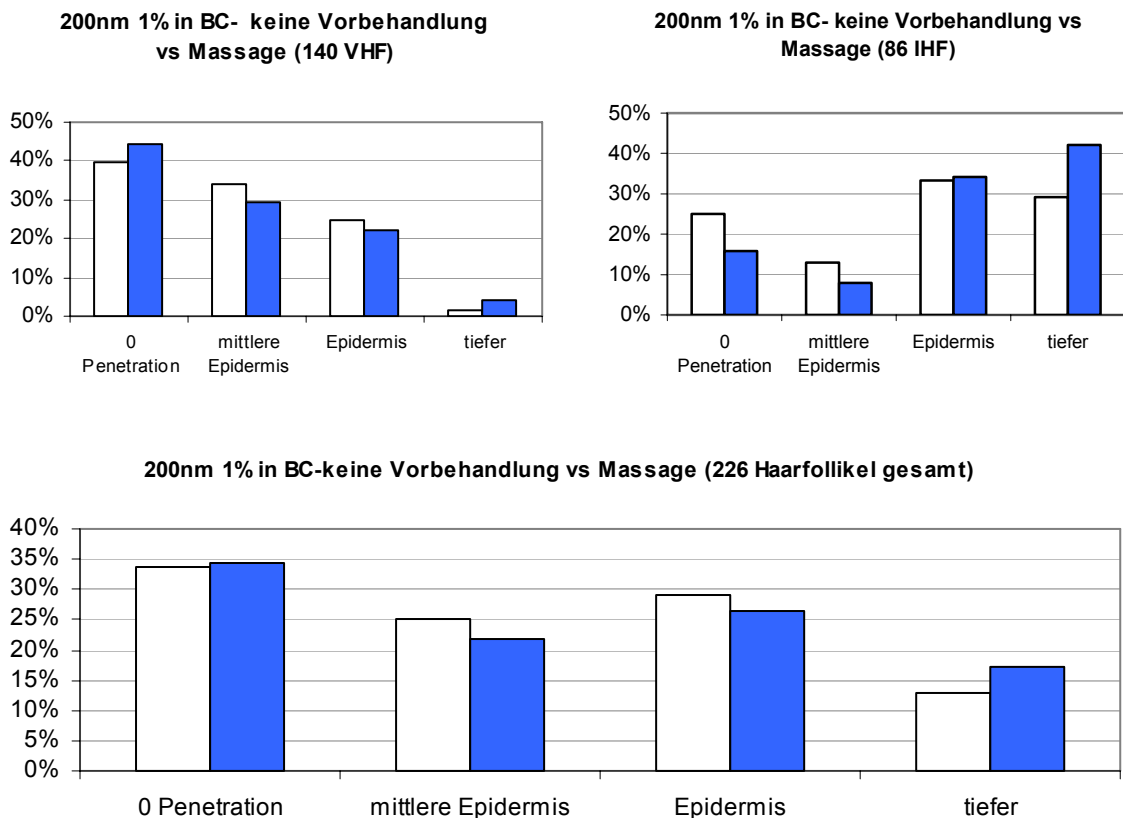


**Abbildung 48 Follikuläre Penetration von 40nm 1% in BC nach Massage**

Die Diagramme zeigen das Penetrationsverhalten von 40nm NP 1% in Basiscreme nach Applikation auf un behandelte ( □ ) oder mit Massage behandelte ( ■ ) Haut. Bei der Auswertung, die zwischen „0 Penetration“, „mittlere“ Epidermis, „Epidermis“ oder „tiefer“ unterschied, zeigte sich eine signifikante Zunahme der „offenen“ Follikel nach Massage.

### 3.3.3.3 200nm NP in 1% in BC: Keine Vorbehandlung versus Massage

Bei Betrachtung aller Haarfollikel zeigte sich kein Unterschied in der Zahl der „offenen“ Follikel. Wenn man VHF und IHF getrennt betrachtet, sieht man eine dezente Abnahme in VHF, jedoch eine Zunahme der für Penetration positiven IHF um 36%. Es ist ein Anstieg der tiefen Penetration von 29% auf 42% der Follikel zu verzeichnen. Die statistische Analyse zeigte keinen signifikanten Einfluss der Massage.



**Abbildung 49 Follikuläre Penetration von 200nm 1% in BC nach Massage**

Die Anwendung von Massage (■) zeigte im Vergleich zu einfacher Applikation (□) keinen signifikanten Einfluss auf das Penetrationsverhalten von 200nm Partikeln 1% in BC.

### 3.3.3.4 Zusammenfassung: Keine Vorbehandlung versus Massage

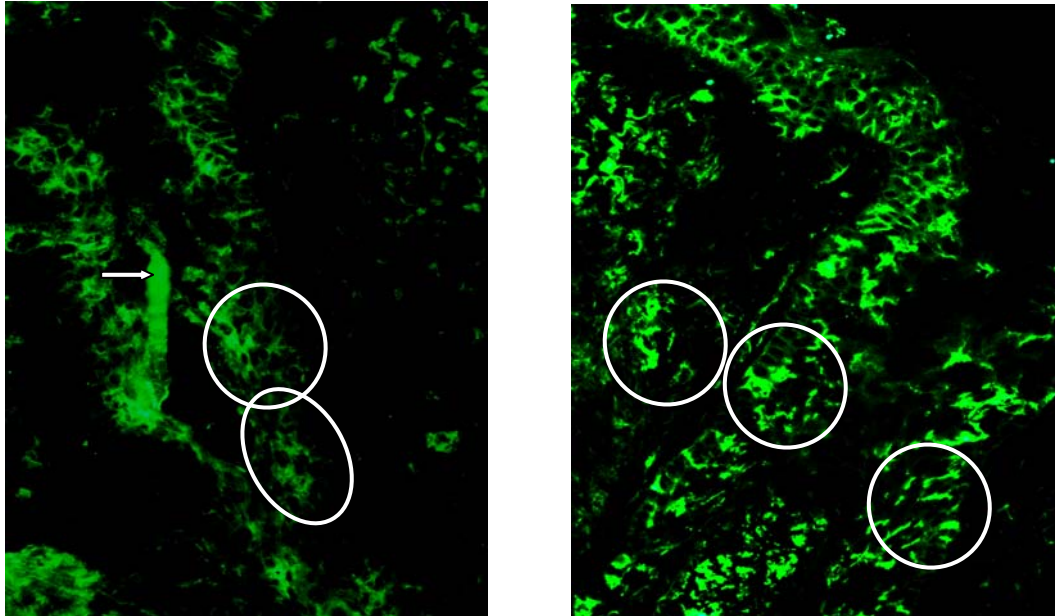
Für 40nm NP in BC kann ein signifikanter Anstieg der Penetration nach Massage festgestellt werden.

200nm Partikel in BC zeigten bei gleich bleibender Zahl „offener“ Follikel eine Zunahme der tiefen Penetration in IHF.

Bei 40nm NP in PBS konnte kein Einfluss von Massage beobachtet werden. 200nm NP in PBS zeigten einen signifikanten Anstieg der tiefen follikulären Penetration in VHF.

### 3.4 Langerhanszellfärbung

Auf den folgenden Aufnahmen der Gewebeschnitte sieht man Haarfollikel, in der die LZ selektiv mit fluoreszierendem Farbstoff markiert wurden. Es zeigt sich eine deutliche Konzentration von LZ in der folliculären Epidermis.

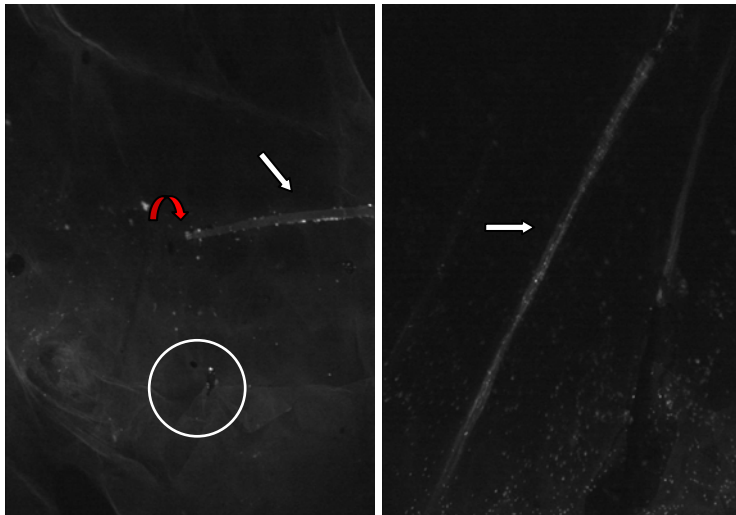


**Abbildung 50 Langerhanszellfärbung**

Die LZ wurden selektiv mit fluoreszierenden CD1a- Antikörpern markiert. Sie sind insbesondere perifollikulär konzentriert. Die dendritische Morphologie lässt sich erahnen (weißer Kreis  $\bigcirc$ ). Auch die Auto- Fluoreszenz der Epidermis und einzelner Haare ist zu sehen (Pfeil  $\Rightarrow$ ). Die Aufnahmen wurden mit dem Fluoreszenzmikroskop, BX60F3, Olympus, Hamburg, Germany, bei 10facher Vergrößerung angefertigt.

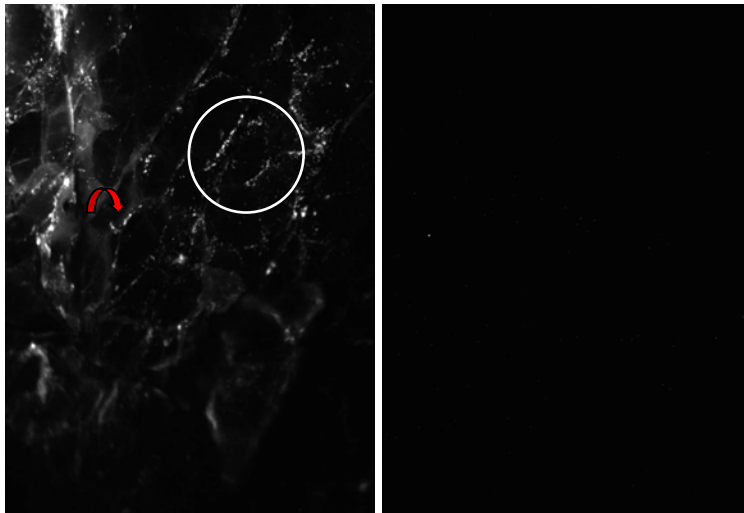
### 3.5 Konfokale Laser Scanning Mikroskopie- Untersuchung des Lateralen Spreitens

Mit CLSM wurde die Haut vor und nach der Tesa®- Film- Abrisstechnik bis in die Tiefe auf NP untersucht. Die meisten Partikel waren innerhalb des markierten Hautareals detektierbar. Außerhalb dieser Fläche zeigte sich das SC fast frei von NP, so dass Laterales Spreiten der Partikel keinen großen Einflussfaktor darzustellen scheint. Lediglich mit Massage behandelte Haut zeigte am Rand, 2mm neben dem markierten Areal, Fluoreszenzsignal von NP (Abb. 53), welches jedoch geringer ausfiel als innerhalb der Applikationsfläche. Es war bereits in 3mm Randabstand kaum mehr vorhanden.



Die CLSM- Aufnahmen stammen von Proben ohne Vorbehandlung und wurden im zu untersuchenden Hautareal vor Entnahme der Abrisse durch Tape Stripping gemacht. Man sieht das Schollenmuster der Korneozyten (weiß umkreist) und einzelne Haare (weißer Pfeil). NP (roter Pfeil) sind im SC und an den Haaren zu detektieren. Am Rand des markierten Areals fanden sich keine Partikel im SC (keine Abbildung, vlg. Abb. 52/ 2.)

**Abbildung 51 CLSM- Aufnahmen nicht vorbehandelter Haut**

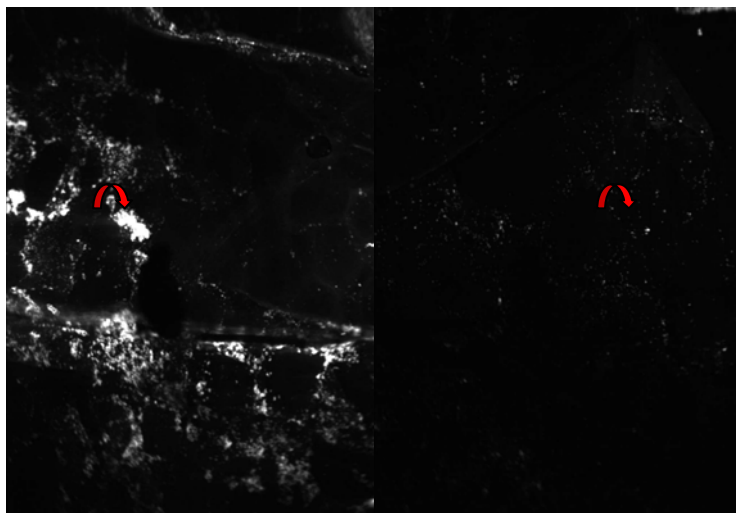


Die Abbildungen zeigen CLSM- Aufnahmen der mit CSSS vorbehandelten Probe. Die Partikel (roter Pfeil) sind zwischen den Korneozyten (weiß umkreist) zu sehen (1.). 2. zeigt eine Aufnahme, die ca. 3mm vom Rand des Untersuchungsareals stammt. Es sind keine Partikel zu detektieren.

**Abbildung 52 CLSM- Aufnahmen CSSS vorbehandelter Haut**

1.

2.



Auch die Untersuchung der mit Massage behandelten Haut zeigte die NP (roter Pfeil) verteilt zwischen Korneozyten (1.). Direkt außerhalb der untersuchten Fläche, ca. 2mm von deren Rand, finden sich einige NP (2.). Bereits 1mm weiter entfernt wurde, entsprechend der unbehandelten bzw. CSSS vorbehandelten Probe, kein Fluoreszenzsignal mehr detektiert.

**Abbildung 53 CLSM- Aufnahmen Massage behandelter Haut**

1.

2.

## 4 Diskussion

### 4.1 Einleitung

Das Einschließen von Wirkstoffen in nanopartikuläre Systeme ist eine zunehmend angewandte Strategie in der Dermatotherapie, um den Transport topisch applizierter Medikamente in und durch die Haut zu den entsprechenden Zielstrukturen, d.h. das Targeting von z.B. Talgdrüse, Wulstregion oder Immunzellen zu verbessern. Die Partikel schützen den gebundenen Stoff vor schnellem Abbau und verbessern die Aufnahme bioaktiver partikelgebundener Substanzen durch haarfollikelassoziierte Zellpopulationen.

Das spezifische Targeting von APZ, welche reichhaltig in Epidermis und Dermis vertreten sind und die Fähigkeit zur Induktion einer robusten humoralen und zellulären Immunantwort haben, macht die Haut zu einem attraktiven Gewebe für die Applikation von Impfstoffen.

Ein wichtiges Ziel bei der Immunisierung gegen chronische virale Erkrankungen wie HIV, Hepatitis C oder Tumoren ist die Induktion spezifischer Zytotoxischer T-Lymphozyten, wie es z.B. LZ durch ihre Möglichkeit zur Kreuzpräsentation möglich ist. Durch eine zelluläre Immunantwort kann die virale Replikation kontrolliert und die Progression der Krankheit verlangsamt werden (152). Dabei erfolgreich einsetzbare Lebendimpfstoffe können jedoch aufgrund der Gefahr einer unkontrollierten Ausbreitung des Virus nicht bei immunsupprimierten Patienten eingesetzt werden (153).

Mehrere Studien konnten die Induktion einer humoralen und auch zellulären Immunantwort nach topischer Applikation von DNA-, Protein-, oder Peptid- Antigenen zeigen (92, 93, 95, 154). Dabei wird auf die immunstimulatorische Wirkung der Barrierezerstörung oder der Zusetzung eines Adjuvanz hingewiesen (94, 106).

Seo et al. konnten am Mausmodell beobachten, dass eine Immunisierung mit Tumor-assoziierten Epitopen durch barrieregestörte Haut präventive und therapeutische Effekte auf das Tumorwachstum *in vivo* hatte (93, 98). Er wies nach, dass Zytotoxische T- Lymphozyten für den antitumorösen Effekt verantwortlich waren und diese in Abhängigkeit von LZ aktiviert worden waren.

Im Folgenden sollen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit diskutiert und Schlussfolgerungen zur Entwicklung bzw. Optimierung eines Protokolls zur topischen Applikation therapeutischer nanopartikulärer Systeme getroffen werden.



## **4.2 Auswertung des Differentiellen Tape Strippings**

Mittels des DTS wurde der Anteil der *ex vivo* in das SC bzw. in die Haarfollikel penetrierten NP quantitativ bestimmt. Die Methode ist *in vitro* und *in vivo* anwendbar.

### **4.2.1 Differentielles Tape Stripping I: Penetration von Partikeln in das Stratum corneum**

Die Ergebnisse des DTS ergaben, dass 40nm Partikel ein signifikant größeres Reservoir in der Hornschicht bildeten als 200nm NP. PBS hatte einen positiven Effekt auf die Penetration im Vergleich zu Basiscreme.

Abgesehen von einer leichten Verbesserung der Penetration von 40nm NP in PBS nach Anwendung von einem CSSS zeigte sich kein wesentlicher Einfluss dieser Vorbehandlungstechnik auf das Eindringen von Partikeln in das SC.

Nach Massage konnten für alle Partikelgrößen und Formulierungen weniger (bzw. bei 200nm in PBS gleich viele) Partikel aus den ersten fünf, als repräsentativ für die Substanz im SC gemessenen, Filmsreifen extrahiert werden.

Es ist nicht anzunehmen, dass durch den eigentlichen Effekt der Massage das Reservoir der Hornschicht verringert wird. Ein wesentlicher Einfluss des Lateralen Spreitens der Partikel konnte durch CLSM weitestgehend ausgeschlossen werden. Trotzdem ist es möglich, dass ein geringer Teil der Partikel durch den Massagekopf über die Grenzen des markierten Hautareals gedrückt und somit die ermittelte Partikelkonzentration in der Hornschicht nach Applikation von Massage verringert wurde. Des Weiteren ist zu vermuten, dass der Fingerling trotz Sättigung einen nicht unwesentlichen Teil der Partikel während der Behandlung mit Massage absorbierte.

### **4.2.2 Differentielles Tape Stripping II: Penetration von Partikeln in die Haarfollikel**

Auch für die Analyse der NP in den Haarfollikeln lässt sich die Beobachtung der besseren Penetration von 40nm Partikeln in PBS machen. Effekte der Vorbehandlungstechniken ließen sich allein für die in hydrophiler Lösung applizierten Partikel verzeichnen. 40nm Partikel penetrierten dabei signifikant besser nach Massage, während CSSS die follikuläre Penetration von v.a. 200nm NP verstärkte.

### **4.2.3 Verteilung der Nanopartikel in den Haarfollikeln und im Stratum corneum**

Die durchschnittliche Verteilung der durch DTS insgesamt aus einer Probe gelösten NP in den Haarfollikeln und im SC ist in Abb. 20 dargestellt. Durchschnittlich wurden  $92\% \pm 5\%$  der Partikel im SC und  $8\% \pm 5\%$  in den Haarfollikeln gemessen. Relativ gesehen bildeten die Partikel dabei ein größeres Reservoir nach Applikation in PBS als in BC.

Teichmann et al. (60) bestimmten für auf den Unterarm von Probanden appliziertes hydrophiles Natriumfluorescein in Eucerin cum Aqua ein Verhältnis von  $95\% \pm 14\%$  im SC und  $5\% \pm 0,9\%$  in den Haarfollikeln, was gut mit den Ergebnissen für in PBS applizierte Partikel korrespondiert.

Die bereits erwähnte penetrationsverstärkende Wirkung von Massage auf applizierte 40nm Partikel 0,01% in PBS bzw. von CSSS auf das der 200nm NP 0,01% in PBS spiegelt sich in dem prozentualen Anteil der NP in den Haarfollikeln wider. Ebenso zeigte sich ein positiver Effekt der Massage auf 200nm 0,1% in BC.

#### **4.2.4 Differentielles Tape Stripping II: Diskussion des Einflusses der Vorbehandlungstechniken auf das folliculäre Reservoir**

Die im SC beobachtete Abnahme des Reservoirs nach Massage im Unterschied zu nicht behandelter Haut zeigte sich nicht in den Haarfollikeln.

Der relative folliculäre Anteil der insgesamt aus den Proben extrahierten Partikel ist am größten nach Massage (Abb. 21), gefolgt von CSSS und dem kleinsten Anteil in den Haarfollikeln nicht vorbehandelter Haut. Der Grund dafür ist sicherlich in erster Linie in einer relativen Erhöhung aufgrund des geringen Anteils an NP im SC zu suchen. Doch beobachtete man nach Massage durchaus positive Effekte auf die folliculäre Penetration (40nm NP in PBS). Von der Größe des interfolliculären Reservoirs ist also nicht zwangsläufig auf das der Haarfollikel zu schließen. Letzteres kann evtl. durch Optimierung der Applikationsfläche, -menge und -konzentration noch erhöht werden. So ist unter der Annahme, dass NP durch den Fingerling verloren gingen bzw. Massage Laterales Spreiten förderte, zu vermuten, dass unter Berücksichtigung der genannten Störfaktoren die Penetration von Partikel in die Infundibula hätte optimiert werden können.

Lademann et al. (7) verweisen darauf, dass Massage die Penetration partikulärer Stoffe in die Haarfollikel verstärken kann. Der Effekt der Massage sei bei Partikeln, deren Größe der von Kutikulazellen entspräche, besonders ausgeprägt. Letztere würden durch die Massage bzw. die natürliche Bewegung des Körpers und somit auch der Haare Partikel tief in den Haarfollikel „pumpen“. Er zeigte, dass Massage einen Effekt auf 320nm große natriumfluoresceinhaltige NP, nicht jedoch den gelösten, d.h. nicht partikelgebundenen Stoff hatte. Ein positiver Effekt von Massage wäre also auch bei 200nm NP zu erwarten gewesen.

Unterschiedliche Ergebnisse in Penetrationsuntersuchungen können durch die Wahl der anatomischen Stelle, welche sich durch das Vorhandensein von VHF oder THF,

eine spezifische Haardichte und die Größe der Haarfollikelinfundibula charakterisiert, bestimmt sein. Viele Penetrationsstudien werden wegen des relativ großen follikulären Volumens an der Wade oder auch an Schweinehaut, welche im Aufbau dem menschlicher Haut ähnelt, durchgeführt (155). So ist die Haardichte an der Brust ( $22/\text{cm}^2$ ) zwar höher als an der Wade ( $14/\text{cm}^2$ ), doch ist sowohl der Durchmesser des Haarschaftes, als auch das follikuläre Infundibulum am Thorax deutlich kleiner (51). An den Vellushaaren der Brust zeigte Massage in der vorliegenden Arbeit v.a. Effekt auf die kleineren Partikel.

Der Effekt von CSSS fiel kleiner aus als nach der „Öffnung“ der Haarfollikel erwartet. Eine zu klein gewählte Applikationsfläche, eine geringere Haardichte bzw. eine zu niedrig angesetzte Konzentration an NP könnten ursächlich dafür sein, dass Unterschiede der Vorbehandlungstechniken nicht deutlich wurden.

Außerdem besteht die Möglichkeit, dass CSSS Teile von Follikeln verklebte und für die Penetration verschloss bzw. chemische Unverträglichkeiten die Penetration von BC in CSSS vorbehandelten Proben beeinflusste.

#### **4.2.5 Einfluss des „Stretch Effektes“ auf die Haardichte**

Die Haarfollikeldichte hat einen großen Einfluss auf das follikuläre Penetrationsverhalten. Sie kann durch Auszählen der Haarfollikel auf dem CSSS Abriss, welcher auf einigen Proben als Vorbehandlungstechnik durchgeführt worden war, bestimmt werden.

Die Auswertung ergab eine durchschnittliche Dichte von  $10 \text{ Haarfollikel}/\text{cm}^2$  für Brusthaut. Dies liegt unter dem von Otberg et al. ermittelten Werten für den Thorax ( $22 \text{ Haarfollikel}/\text{cm}^2$ ) (51).

Einflussfaktoren sind dabei neben individuellen Unterschieden der Haardichte an der Messstelle der Einschluss männlicher und weiblicher Probanden in die Studie von Otberg. Des Weiteren muss aufgrund der Verwendung von Haut aus Brustverkleinerungen und -straffungen der „Stretch Effekt“ berücksichtigt werden. Da die in der frühen Fetalperiode angelegte Zahl der Follikel sich durch das natürliche Wachstum des Körpers bzw. Dehnung der Haut bei Gewichtszunahme nicht verändert, können in diesen Fällen weniger Haarfollikel pro  $\text{cm}^2$  gezählt werden können.

### **4.3 Auswertung der Hornschichtprofile- Einfluss der Formulierung auf die je Filmstreifen entfernte Menge an Korneozyten**

Die Erstellung der HP, wobei das gesamte SC schichtweise abgetragen wird, ergab, dass pro Filmstreifen eine unterschiedliche Zahl an Korneozyten entfernt wird. Dies wurde bereits von mehreren Autoren festgestellt (142). Die je Tape entfernte Menge an SC sinkt nicht- linear mit zunehmender Tiefe der Hornschicht. Als Grund hierfür wird der zunehmende Zusammenhalt der Zellen in den tiefen Schichten diskutiert.

Die pro Klebefilmstreifen vom SC entfernte Menge an Korneozyten wird durch unterschiedliche Faktoren beeinflusst (124). An internen Faktoren der Haut sind zu nennen die inter- und intraindividuelle Hydratation der Haut in Abhängigkeit z.B. vom Alter des Probanden (156), der mit der Tiefe des SC zunehmende zelluläre Zusammenhalt und Unterschiede in Abhängigkeit von der Körperregion, an der ein Tape Stripping durchgeführt wird. Weiterhin beeinflussen die Art des Filmstreifens, die chemischen und physikalischen Eigenschaften des applizierten Stoffes bzw. seines Vehikels (89) und deren Penetrationszeit, aber auch die Art und Weise der experimentellen Durchführung die Zellzahl auf den einzelnen Abrissen. Ebenso beeinflussen die Kontaktzeit zwischen Filmstreifen und Haut sowie die Geschwindigkeit, mit welcher das Tape entfernt wird, den Zusammenhalt der Hornschicht und somit die Zahl an entfernten Korneozyten (123, 124).

Um die verschiedenen Einflussfaktoren zu minimieren ist auf eine standardisierte Versuchsdurchführung geachtet worden.

Unter standardisierten Versuchsbedingungen ist es aufgrund der vielen weiteren Einflussfaktoren auf die pro Filmstreifen entfernten Zellen genauer, bei der Messung einer topisch applizierten Substanz deren Konzentration zur Menge an Korneozyten pro Tape, anstatt zur Anzahl der abgetragenen Filmstreifen in Korrelation zu setzen. Aus diesem Grund wurden die HP erstellt.

Im Allgemeinen kann die Formulierung die Kohäsion zwischen den Korneozyten bzw. die Adhäsion zwischen ihnen und dem Filmstreifen und somit die je Tape Stripping entfernte Zellzahl beeinflussen (141). Die Ergebnisse in Kapitel 3.2.1 zeigten, dass bei Applikation in PBS mehr Korneozyten je Filmsreifen entfernt wurden im Vergleich zur BC- Formulierung. Somit ist eine verringerte Adhäsion zwischen Korneozyten und Filmstreifen durch die lipophile Grundlage bzw. eine Förderung der Ablösung der Zellen durch die wässrige Lösung denkbar.

Die Ergebnisse, welche die Abrissnummer in Bezug zur prozentual entfernten Menge an SC setzen, sind vergleichbar mit den Resultaten von Jacobi et al. (141). In dieser Arbeit wurde eine generelle Beziehung zwischen den Filmstreifen und der entfernten Menge an Korneozyten auf unbehandelter Haut unter standardisierten Versuchsbedingungen hergestellt. Dabei entfernten 20 Tapes 66%  $\pm$  12%, 30 Abrisse 84%  $\pm$  11% und 50 Filmstreifen 95%  $\pm$  3% des SC.

#### **4.4 Einfluss von CSSS auf die Integrität des Stratum corneum**

Die Auswertung der HP ergab, dass ein CSSS durchschnittlich 33% des SC entfernt. Ein CSSS stellt somit eine leichte Barrierestörung der Haut dar.

Obwohl für die tieferen Schichten der Hornschicht ein festerer Zusammenhalt der Korneozyten angenommen wird, zeigte das PP der NP die trichterähnliche Form wie nach Applikation auf nicht vorbehandelte Haut bzw. nach Massage.

#### **4.5 Anteil der Nanopartikel in den obersten Schichten des SC**

Die Erstellung der PP diente u.a. dazu, die aus den ersten Filmstreifen extrahierte Substanz, welche als repräsentativ für die Substanz im SC gemessen wurde, in Beziehung zu den in die gesamte Hornschicht penetrierten NP zu setzen. Nach der Erstellung des PP wurden die ersten fünf Abrisse in Bezug zu den insgesamt extrahierten Partikeln gesetzt. Mit den ersten fünf Abrissen, welche durchschnittlich 17% des SC entsprachen, wurden etwa 88,5%  $\pm$  9,5% der insgesamt gemessenen NP-Emission erfasst.

Die Bedeutung der ersten fünf Abrisse wurde bereits von Weigmann et al. (129) betont. In diesen obersten Schichten des SC befindet sich ein Grossteil der applizierten Substanz (72, 89, 90, 127, 128). Potard et al. (121) konnten einen Anteil von 90% der aufgetragenen UV-Filter Substanzen in den ersten 6 Tapes detektieren. Lademann et al., 1999 kommen zu ähnlichen Ergebnissen, indem gezeigt werden konnte, dass sich der größte Teil topisch applizierter Titaniumdioxid Mikropartikel in den obersten 20% des SC befindet (72).

In geringen Mengen sind Partikel aber noch bis zu mindestens 50% der Hornschichttiefe zu finden gewesen (141). In PBS zeigten Partikel eine tiefere Penetration als in BC. Jacobi et al. beobachtete für Patent blue V größere Konzentrationen in den tiefen Lagen des SC bei Applikation in wässriger Lösung im Vergleich zur Applikation in o/w Emulsion (90).

Vor der Anfertigung des CSSS zur Bestimmung des folliculären Reservoirs wurden insgesamt 20 Filmstreifen, d.h. etwa 72% des SC abgetragen. Die sich dort befindlichen Konzentrationen an NP sind so gering, dass angenommen werden kann, dass sie die Messergebnisse des CSSS Abrisses nicht wesentlich beeinflussten.

#### **4.6 Recovery Rate- Differentielles Tape Stripping und Penetrationsprofile im Vergleich**

Die Recovery Rate beschreibt den Anteil an Partikeln, welcher mittels DTS bzw. im Rahmen der Penetrationsprofile aus den abgetragenen Filmstreifen im Verhältnis zur insgesamt applizierten Menge bestimmt wurde (150).

##### **4.6.1 Differentielles Tape Stripping I: Recovery Rate aus dem Stratum corneum**

Jacobi et al. (89, 157) untersuchten den Einfluss der Applikationsform von Vanillin mittels Tesa®- Film- Abrisstechnik und der Erstellung von Hornschichtprofilen. Es wird der Annahme widersprochen, die das Verwerfen der ersten beiden Filmstreifen empfiehlt (123), da diese nicht penetrierte Substanz enthielten und keine Relevanz für die Untersuchung hätten. Allein das Einbeziehen der ersten Tapes in die Messung hätte im PP Unterschiede der beiden Formulierungen aufgedeckt.

Auch im Versuchsprotokoll der vorliegenden Arbeit wurde die überschüssige Substanz zu Beginn des DTS nicht entfernt. Die hydrophile Lösung wurde mit Warmluft zum Verdunsten gebracht bzw. überschüssige Creme, die sich auf dem ersten gemessenen Filmstreifen befand, nicht entfernt, so dass theoretisch die gesamte Menge der applizierten Partikel in die Messung einging.

Im DTS zeigte sich eine etwas höhere Gesamt- Recovery Rate für 40nm Partikel im Vergleich zu 200nm Partikel und eine Verstärkung des Effektes bei Applikation in hydrophiler Lösung (siehe Ergebnisse, Tabelle 1). Durchschnittlich konnten  $36\% \pm 9\%$  der applizierten 40nm Partikel bzw.  $18\% \pm 7\%$  der 200nm Partikel mit den ersten fünf Filmstreifen im SC gemessen werden. Ein signifikanter Einfluss ließ sich nach Massage beobachten, welche das Reservoir für NP im SC in allen Gruppen minderte.

##### **4.6.2 Differentielles Tape Stripping II: Recovery Rate aus den Haarfollikeln**

Bei Applikation von 40nm NP 0,01% in PBS auf unbehandelte oder CSSS vorbehandelte Haut fanden sich ca. 5% der aufgetragenen Partikel in den Haarfollikeln. Die Anwendung von Massage erhöhte das folliculäre Reservoir auf eine Konzentration von 0,001%, d.h. 10% der applizierten Partikel. Für 200nm NP 0,01% in PBS ließ sich

ein Anstieg der Partikelkonzentration in den Haarfollikeln von durchschnittlich 0,00025% auf 0,0005%, d.h. von 2,5% auf 5% der aufgetragenen Partikel, nach CSSS beobachten.

Es ist zu beachten, dass vor Durchführung des CSSS- Abrisses 20 Tapes mittels der Tesa®- Film- Abrisstechnik entnommen wurden, um das SC möglichst vollständig von Partikeln zu befreien. Anzunehmen ist, dass dies bereits Teile des follikulären Inhalts entfernte und die Recovery Rate der Haarfollikel etwas höher zu schätzen ist.

#### **4.6.3 Penetrationsprofil: Recovery Rate aus dem Stratum corneum**

Genauer als mittels DTS, wobei allein die ersten fünf Abrisse gemessen werden, kann durch die Erstellung von HP und PP die Recovery Rate für die gesamte Hornschicht und der sich daraus ergebende prozentuale Anteil der NP in den einzelnen Filmstreifen ermittelt werden. Die PP wurden jedoch nicht in genügend hoher Fallzahl durchgeführt, um allgemeine Rückschlüsse über den Einfluss der Partikelgröße oder Formulierung ziehen zu können. Sie dienten v.a. zur Einordnung der ersten fünf Abrisse in das HP und zur Bestimmung des Anteils der aus ihnen extrahierten NP am gesamten interfollikulären Reservoir.

Mit Hilfe der Erstellung der PP konnten knapp unter 50% der applizierten NP im SC gemessen werden. Die relativ große Standardabweichung wird dabei v.a. durch die Ergebnisse der 200nm NP in PBS und 40nm NP in BC nach CSSS verursacht. Auch zeigte sich die oben diskutierte Reduktion des interfollikulären Reservoirs nach Massage.

Bei einem Vergleich von Abb. 15 und 35 fällt die höhere Recovery Rate nach CSSS in den PP auf, die sich nicht im DTS zeigte. Da mittels DTS eine höhere Fallzahl untersucht wurde, liegt die Vermutung eines Zufallsbefundes nahe. Es ist auch zu überlegen, ob dieser Unterschied im Penetrationsverhalten nicht durch die Erfassung von Partikeln in der Tiefe der Hornschicht mittels des PP verursacht wurde. Da gezeigt werden konnte, dass die ersten fünf Abrisse des PP etwa 90% des Reservoirs des SC erfassen, ist für Partikelkonzentrationen aus den tieferen Schichten eigentlich kein entscheidender Einfluss zu erwarten.

#### **4.6.4 Recovery Rate des Stratum corneum: Penetrationsprofil und Differentielles Tape Stripping im Vergleich**

Abb. 34 und 36 stellen die Recovery Rate aus dem gesamten PP zum einen dieser seiner ersten fünf Abrisse und zum anderen jener des DTS gegenüber.

Mittels DTS wurden weniger NP aus dem SC extrahiert als durch die Erstellung der Tiefenprofile. Letztere wiesen eine durchschnittliche Recovery Rate von  $46,7\% \pm 18,8\%$  auf. Durch DTS konnten ca.  $27,1\% \pm 12\%$  der applizierten Partikel als Reservoir in der Hornschicht erfasst werden.

Es bleibt offen, ob die aus der Reihe fallenden hohen Werte für 200nm NP in PBS und 40nm NP in BC nach CSSS nicht als Zufallsbefunde zu werten sind. Die Differenz der aus den Abrissen extrahierten NP aus dem DST bzw. den PP würde sich nach Herausnahme aus der Reihe fallender Werte relativieren.

Einfluss auf die Ergebnisse der Recovery Rate aus beiden Untersuchungen hatte neben interindividuellen Unterschieden die Tatsache, dass beim DTS nur die ersten fünf Abrisse als repräsentativ für die NP im SC gemessen wurden.

Mit 20 Abrissen entfernte man über 70% des SC. Bei der Untersuchung dieses 20. Filmstreifens im Fluoreszenzmikroskop (Abb. 10), bzw. des gestrippten Hautareals mittels CLSM nach dem ersten Teil des DTS, konnten kaum mehr Partikel im SC nachgewiesen werden. Trotzdem ließen sich bei der Erstellung des PP bis etwa zum 30. Abriss, d.h. bis zu über 80% der Hornschichttiefe, NP bestimmen, wenn auch die Konzentration in diesen Tiefen bereits verschwindend gering war und nicht anzunehmen ist, dass diese Partikel die Ergebnisse der Messung der Substanz in den Haarfollikeln durch CSSS maßgeblich beeinflussten. Die Abrisse 6- 30, welche in die Messungen des PP eingingen, wurden also nicht durch das DTS erfasst. Es kann andererseits für das PP spekuliert werden, ob in der Tiefe des SC gemessene Partikel nicht follikuläre Anteile enthielten (72).

Die Recovery Rate aus beiden Untersuchungen liegt unter der von Teichmann et al. (60) *in vivo* für hydrophiles Natriumfluorescein in Eucerin cum Aqua ( $54\% \pm 8,1\%$ ) ermittelten.

*In vivo* wird die Reduktion der Recovery Rate im Vergleich zur applizierten Substanz durch den Abtransport topisch applizierter Substanz über die Blutbahn erklärt (41).

*In vitro* verringert sich durch den Zusammenfall elastischer Fasern um die Haarfollikel das follikuläre Reservoir. Evtl. hat dies auch Einfluss auf das Reservoir des SC. Prinzipiell gilt jedoch, dass Penetrationsstudien *in vitro* eine Aussage über die Absorption durch die Haut *in vivo* treffen können (158-160).



Berücksichtigt werden muss die Applikationsstelle auf dem Rücken von Probanden bei Teichmann et al. im Gegensatz zu der auf exzidierte Brusthaut in der vorliegenden Arbeit. Unterschiede im funktionellen Status und der Morphologie der Haut können Einfluss auf das Ergebnis nehmen.

Neben der Verwendung unterschiedlicher Formulierungen in den beiden Arbeiten ist die Applikationsfläche, die bei Teichmann 5cm x 12cm und in der vorliegenden Arbeit 2,5cm x 3cm (entsprechend der Größe des Filmstreifens) betrug, ein wichtiger Einflussfaktor.

Jacobi et al. (150) konnten in ihren Penetrationsstudien mit UV-Filter-Substanzen an gesunden Probanden zeigen, dass das Laterale Spreiten einer topisch applizierten Substanz über die Untersuchungsfläche hinaus *in vivo* stets eine Rolle spielt. Während interindividuelle Unterschiede das Laterale Spreiten kaum beeinflussen, fördern eine kleine Applikationsfläche und lange Penetrationszeiten den Verlust einer topisch applizierten Substanz über die Ränder des Untersuchungsareals hinaus. Die Untersuchungen von Jacobi et al. wurden *in vivo* durchgeführt, so dass ihre Bedeutung für Untersuchungen *in vitro* nicht geklärt ist.

In einer Versuchsdurchführung des DTS konnte Laterales Spreiten in den seitlichen Arealen neben der Applikationsfläche mittels CLSM ausgeschlossen werden. Da dies jedoch nur exemplarisch an einer Probe durchgeführt wurde, muss dieser Einfluss in der Diskussion über die Recovery Rate stets berücksichtigt werden.

#### **4.6.5 Verminderung des follikulären Reservoirs *in vitro***

Für alle Untersuchungen muss berücksichtigt werden, dass sie an exzidierte Haut stattfanden und die ermittelte Recovery Rate nicht dem follikulären Reservoir *in vivo* entspricht. Patzelt et al. (161) untersuchten mittels DTS das Penetrationsverhalten von 100nm curcuminhaltigen NP 0,12% in einer o/w Formulierung an adipösen Patienten vor und an exzidierte Haut nach Bauchstraffungs-OP, d.h. *in vivo* und *in vitro* am selben Probanden. Es wurde festgestellt, dass das follikuläre Reservoir *in vitro* auf etwa 10% im Vergleich zur Penetration *in vivo* reduziert ist. Histologische Untersuchungen ergaben, dass der Grund dafür in der Kontraktion elastischer Fasern um und zwischen den Haarfollikeln zu suchen ist.

Die Ergebnisse haben besondere Bedeutung für Studien zur Penetration von Stoffen, bei denen die follikuläre Penetration eine große Rolle spielt, wie eben partikuläre Substanzen oder auch Koffein (7, 8, 41).

Der Einfluss von Formulierungen bzw. Vorbehandlungstechniken wirkt sich sicherlich auch *in vitro* bzw. *ex vivo* aus, ist jedoch unter Umständen weniger prägend. Es sollten deshalb entsprechend große bzw. haarfollikelreiche Hautareale gewählt werden, um das potentielle folliculäre Reservoir künstlich zu vergrößern und Unterschiede deutlich zu machen.

Festzuhalten ist, dass die in dieser Arbeit an exzidierte Haut ermittelten Verhältnisse der NP in den Haarfollikeln zu jenen im SC den von Teichmann et al. (60) *in vivo* gefundenen entsprechen (siehe Kapitel 4.2.3 ). Aufgrund der beschriebenen Vorgänge wäre ein kleinerer folliculärer Anteil zu erwarten gewesen. Teichmann et al. verwendeten in ihrer Untersuchung nicht- partikuläres Natriumfluorescein. Es ist bekannt, dass partikelassoziierte Stoffe ein besseres Penetrationsverhalten zeigen als nicht- partikuläre (7). Es ist denkbar, dass die Applikation gelösten Fluoresceins den Nachteil der Versuchsdurchführung *in vitro* mit dem Stoff in der partikulären Form ausglich. Die geringer als erwartet ausfallenden Unterschiede in der Recovery Rate und das etwa gleich ausfallende Verhältnis der topisch applizierten Substanz im SC und in den Haarfollikeln könnten darin eine Erklärung finden.

## **4.7 Kryoschnitte**

Mittels der Anfertigung der Gefrierschnitte von Hautproben aus Facelifting konnte die Penetration in die Haarfollikelöffnungen semiquantitativ ausgewertet und visualisiert werden.

### **4.7.1 Semiquantitative Auswertung der Gewebsschnitte**

Wie bei der quantitativen Auswertung des DTS zeigt sich auch hier ein positiver Einfluss von CSSS auf NP in PBS. Für 40nm Partikel in PBS und in den Hautbiopsien auch in BC konnte nach CSSS eine signifikante Zunahme der offenen, d.h. für Penetration positiven Follikel festgestellt werden. Eine Verbesserung der tiefen Penetration konnte v.a. in IHF beobachtet werden. 200nm NP in PBS zeigten keine Zunahme der offenen Follikel, aber eine verbesserte Penetration bis zur kompletten Epidermis. In BC zeigte sich für 200nm NP nach CSSS kein positiver Effekt der folliculären Penetration.

Mit CSSS vorbehandelte Proben zeigten durchschnittlich  $55\% \pm 5\%$  offene Follikel im Vergleich zu unbehandelten Proben, in denen sich  $39\% \pm 21\%$  für Penetration positive Follikel fanden.

Toll et al. (8) fand in ihren Penetrationsversuchen mit 0,76µm– 6,0µm großen Polyesterpartikeln ebenfalls 55% offene Follikel nach CSSS. In unbehandelter Haut zählte sie ca. 25% Haarfollikel, die Penetration von Partikeln zeigten.

Die Unterschiede der Kontrollprobe können zum einen durch die verschiedenen Hautproben verursacht worden sein. Des Weiteren wurden Partikel unterschiedlicher Hersteller in verschiedenen Vehikeln appliziert. Entscheidend ist sicherlich auch die Wahl der Größe der Partikel. In dieser Arbeit wurden im Unterschied zu der Arbeit von Toll et al. weitaus kleinere NP verwendet. Wenn auch dort v.a. die Penetration in THF im Unterschied zu VHF bzw. IHF evaluiert wurde, ist es durchaus denkbar, dass kleine Partikel  $\leq 200\text{nm}$  auch ohne mechanische Verstärkung besser in die Haarfollikel penetrieren als die großen Mikrosphären.

Nach Massage waren signifikant mehr Haarfollikel offen für die Penetration von 40nm Partikeln in BC. Für 200nm NP in BC konnte bei gleich bleibender Zahl der offenen Follikel eine Zunahme der tiefen Penetration verzeichnet werden. Massage zeigte anders als in der quantitativen Auswertung keinen signifikanten Einfluss auf die follikuläre Penetration von 40nm und 200nm NP in PBS.

Es fand sich nur eine geringe Differenz in der durchschnittlichen Anzahl offener Follikel in unbehandelten Proben ( $43\% \pm 21\%$ ) bzw. nach Massage ( $47\% \pm 12\%$ ).

#### **4.7.2 Die Auswertung der Gewebeproben und des Differentiellen Tape Strippings im Vergleich**

Bei der Bewertung der Ergebnisse der Kryoschnitte muss darauf hingewiesen werden, dass es sich um einmalig durchgeführte Untersuchungen mit eingeschränkter Aussagekraft handelt, die lediglich auf Probandenebene zu vergleichen sind.

Einflussfaktoren sind inter- und intraindividuelle Unterschiede der Hautproben, welche durch morphologische oder funktionelle Gegebenheiten der Haarfollikel die Penetration beeinflussen. Bezüglich des DTS wurden bereits Gründe diskutiert, welche die erwartete Penetrationsverbesserung durch CSSS oder Massage verhindert haben könnten.

Für die 1cm<sup>2</sup> großen Facelifting- Proben ist zu überlegen, ob der ausgebliebene Effekt von Massage für Partikel in PBS bei Penetrationsverstärkung nach Applikation in BC nicht durch das ungünstige Verhältnis des relativ großen Massagekopfes zu der relativ kleinen Applikationsfläche zu erklären ist. Hier noch mehr als beim DTS, wo ein größeres Hautareal zur Verfügung stand, ist zu erwarten, dass Partikel mehr in Lösung

als in Cremegrundlage zur Seite gedrückt wurden und nicht mehr für die Penetration zur Verfügung standen.

Die Hautproben aus Bruststraffungen bzw. –verkleinerungen und der Gewebeschnitte aus Facelifting- Operationen sind nicht direkt vergleichbar.

Ein wichtiger Punkt ist das Auftragen einer 10fach höheren Konzentration für die semiquantitativen Untersuchungen der Haarfollikel auf Gesichtshaut im Vergleich zu den quantitativen Untersuchungen auf Brusthaut. Hier wurde aus messtechnischen Gründen mit niedrigeren Konzentrationen gearbeitet.

Bei der Bewertung von Penetrationsversuchen müssen die Haarfollikelphysiologie, die Größen- und Dichteunterschiede sowie der funktionelle Status der Follikel berücksichtigt werden. Otberg et al. (51) ermittelten für den Thorax 22 Haarfollikel/cm<sup>2</sup> bzw. für die Stirn 292 Haarfollikel/cm<sup>2</sup>. Für Hautproben nach Brust- bzw. Gesichtsstraffung muss der Stretcheffekt und somit eine reduzierte Haarfollikeldichte, berücksichtigt werden. Trotzdem weisen die Gefrierschnitte, mittels derer semiquantitativ die follikuläre Penetration bestimmt wurde, etwa 10x mehr Haarfollikel/cm<sup>2</sup> auf als die Hautproben für das DTS.

Otberg ermittelte ein follikuläres Volumen an der Stirn von 0,19mm<sup>3</sup>. Dies sei um ein fünffaches geringer als das des SC von 1mm<sup>3</sup>, wenn man für dieses eine Dicke von 10µm annehme. Da sich der Großteil einer topisch applizierten Substanz in den obersten 20% der Hornschicht befindet, könne man sagen, dass das interfollikuläre und das follikuläre Reservoir an der Stirn in etwa gleich groß sind.

Für den Thorax ermittelte die Arbeitsgruppe ein durchschnittliches Volumen der Infundibula von 0,05mm<sup>3</sup>, d.h. ein 20fach geringeres als das des SC. Für Brusthaut muss laut obigen Überlegungen ein Reservoir der Haarfollikel von 25% der Größe des SC angenommen werden.

Das im DTS ermittelte follikuläre Reservoir lag zwischen 2,5% und 10% der insgesamt extrahierten NP, d.h. weit unter diesen von Otberg ermittelten Werten. Das tatsächliche follikuläre Reservoir wird durch die Zahl der „offenen“, „aktiven“, d.h. sich in der Wachstumsphase befindlichen und talgproduzierenden Follikel bestimmt und fällt somit geringer als in den theoretischen Berechnungen aus. Des Weiteren muss die Versuchsdurchführung *in vitro* in Betracht gezogen werden, welche wie bereits erläutert das follikuläre Reservoir zu verkleinern scheint.

Auch die Methoden erlauben keinen direkten Vergleich. Bei dem DTS handelt es sich um eine quantitative, bei den Gefrierschnitten um eine semi- quantitative Auswertung,

d.h. der Einfluss der Formulierung oder der Vorbehandlungstechniken wird auf unterschiedliche Weise erfasst. Zufällige Anreicherungen von NP in einzelnen Haarfollikeln, die unter Umständen die quantitative Auswertung stark beeinflussen, lassen sich bei der mikroskopischen Auszählung aller Follikel einer Probe relativieren. Bei den Gewebeschnitten hingegen kann der Einfluss einzelner, in die Tiefe penetrierter Partikel auf die Gesamtmenge des follikulären Reservoirs nicht bestimmt werden.

#### **4.7.3 Zusammenfassung- Vergleich der Erfassung der follikulären Penetration von Nanopartikeln in menschliche Haut mittels Differentiellem Tape Stripping und der Kryoschnitte**

Während die Durchführbarkeit von Gewebeschnitten an Hautbiopsien *in vivo* aus ethischen Gründen stark eingeschränkt ist, kann man DTS *in vitro* und *in vivo* durchführen.

Die follikuläre Penetration unterliegt großen inter- und intraindividuellen Unterschieden. Bedeutung für die Optimierung der Penetrationsuntersuchungen hat neben der Wahl der Applikationsfläche, des Vehikels, der Konzentration der Partikel und der Inkubationszeit das Auftragen der Partikel, wobei ein Verlust von Partikeln durch Verstärkung des Lateralen Spreitens aufgrund technischer Schwierigkeiten (z.B. Massage von Partikeln in wässriger Lösung auf kleinen Flächen) vermieden werden sollte.

Effekte der Vorbehandlungstechniken zeigten sich in beiden Formulierungen, jedoch ausgeprägter für 40nm Partikel. In der Auswertung der Gefrierschnitte fand sich nur hier, nicht aber für 200nm NP, eine signifikante Erhöhung der Zahl der „offenen“ Follikel. Für die größeren Partikel zeigte sich allein eine Veränderung der Penetrationstiefe. Die Vorbehandlung mit CSSS zeigt einen stärkeren und öfter reproduzierbaren Effekt.

##### **4.7.3.1 Einfluss der Partikelgröße**

Für 40nm Partikel zeigte sich nach CSSS nur bei Applikation in PBS ein Anstieg der Zahl der „offenen“ Follikel in der quantitativen Auswertung des DTS. In der semi-quantitativen Auszählung der Gewebeproben sah man einen signifikanten Anstieg für beide Formulierungen. Massage hatte einen signifikant positiven Effekt auf die follikuläre Penetration von 40nm Partikeln in PBS im DTS bzw. zeigten sich signifikant mehr offene Haarfollikel in den Gefrierschnittproben der 40nm NP in BC.

Auch für die 200nm Partikel ließen sich Effekte der Vorbehandlungstechniken verzeichnen, doch waren diese weniger stark ausgeprägt als bei den kleinen NP.

In PBS zeigte sich nach CSSS ein positiver Effekt in den Untersuchungen des DTS und der Kryoschnitte. Applikation in BC zeigte keine Verbesserung der folliculären Penetration. Massage zeigte in der semiquantitativen Auswertung der 200nm NP in BC einen Einfluss auf die Penetrationstiefe in den Haarfollikeln.

#### **4.7.3.2 Einfluss der Formulierung**

Es konnte kein signifikanter Einfluss der Formulierung, PBS oder BC, beobachtet werden. Viele Autoren beschreiben die bevorzugte Penetration hydrophiler Stoffe durch barrieregestörte Haut (162) bzw. in Haarfollikel (91). Die Applikationsform fand bereits in mehreren Protokollen zur TCI Anwendung (27, 94, 100).

Jacobi et al. (90) beschreiben die bevorzugte interzelluläre Penetration lipophiler Stoffe bzw. die eher intrazelluläre und intrafollikuläre Anreicherung hydrophiler Stoffe bzw. nach Applikation in wässriger Lösung. Topisch applizierte Stoffe würden so tiefer penetrieren, sich bevorzugt in Haarfollikel anreichern und das Targeting von Zellen könnte damit verbessert werden.

Die Applikation in hydrophilen Formulierungen scheint insofern, auch angesichts der technischen Probleme bei der Herstellung einer homogenen Cremeformulierung, praktikabler für Penetrationsstudien.

Die Wahl der Formulierung muss natürlich an den Zielort des Wirkstoffes angepasst sein. So ist für die Deposition von Wirkstoffen, z.B. in Form von Liposomen im Talgdrüsengang, sicherlich eher eine lipophile Grundlage von Vorteil.

#### **4.7.3.3 Einfluss der Vorbehandlungstechniken**

Für CSSS konnte ein positiver Effekt auf das Penetrationsverhalten im DTS und in der semiquantitativen Evaluierung der Haarfollikel festgestellt werden. Effekte zeigten sich für beide Partikelgrößen, jedoch stärker ausgeprägt für 40nm Partikel. CSSS stellt ein anerkanntes Verfahren zur „Öffnung“ von Follikeln dar, indem der Inhalt der Infundibula entfernt und somit die Penetration von Partikeln verbessert wird (8, 9).

Verschiedene Arbeiten konnten die problemlose Anwendung von CSSS *in vivo* zeigen (8, 27, 99). Für die praktikablere klinische Verwendung sind vorgefertigte Pflaster, Wachsepilation bzw. auch Peeling der Haut denkbar (8).

Auch nach Massage konnten penetrationsverstärkende Effekte beobachtet werden. In der semiquantitativen Auswertung fand sich, mit Ausnahme der 40nm NP in BC, keine Veränderung der Zahl der „offenen“ Follikel, jedoch eine Verbesserung der Penetrationstiefe. In der quantitativen Erfassung durch DTS zeigte sich ein signifikant

größeres folliculäres Reservoir für 40nm Partikel in PBS. Massage wurde bereits in mehreren Penetrationsuntersuchungen angewandt (6, 8, 52). Der positive Effekt auf die folliculäre Penetration von Partikeln konnte gezeigt werden (7, 8).

Es ist denkbar, dass der folliculäre Inhalt nicht wie bei CSSS entfernt, sondern durch Massage komprimiert und tiefer in die Haarfollikel hineingepresst, d.h. die Penetrationstiefe und Konzentration der NP im Infundibulum beeinflusst wird.

Die Größe des Massagegerätes sollte dabei in Bezug auf die Applikationsfläche optimiert werden, um die Förderung von Lateralem Spreiten zu vermeiden. Praktisch ist auch das Einmassieren mit dem Finger denkbar. Lademann et al. verweisen darauf, dass der Pumpmechanismus *in vivo* durch Körperbewegung auch ohne Massagegerät stattfindet. Diese natürliche Stimulierung des Pumpmechanismus in den Haarfollikeln sei zwar geringer als die durch mechanische Massage, jedoch ein kontinuierlicher Prozess (7).

Für folgende Penetrationsstudien scheint die Untersuchung des kombinierten Effekts von CSSS und Massage sinnvoll.

#### **4.8 Penetrationsfördernde und Immunstimulierende Effekte von CSSS**

Es scheint unwahrscheinlich, dass NP über 100nm die Hautbarriere überwinden und Gewebe unterhalb des SC erreichen. Forschungsbedarf besteht v.a. hinsichtlich kleinerer Partikel bzw. der Applikation auf barrieregestörte Haut (7, 163, 164).

Unsere Arbeitsgruppe untersuchte das Penetrationsverhalten derselben wie in dieser Arbeit verwendeten soliden 40nm, 750nm und 1500nm Polyesterolpartikeln (9) nach Applikation auf CSSS vorbehandelte humane Gesichtshaut von gesunden Probanden, die sich einer plastischen Operation unterzogen hatten. Die fluoreszenzmikroskopische Auswertung der Proben zeigte, dass 40nm Partikel zumindest bis zum Eingang der Talgdrüse penetrierten und in der interfolliculären Epidermis und Dermis zu sehen waren, während die größeren Partikel allein in den Haarfollikelöffnungen aggregierten. Außerdem konnte die Aufnahme von 40nm Partikeln durch LZ, deren Konzentration um das Infundibulum der untersuchten VHF in speziellen Färbungen bestätigt werden konnte, nach transkutaner Applikation beobachtet werden. Die Aufnahme der anderen Partikelgrößen wurde allein *in vitro* gesehen.

Es kann festgehalten werden, dass CSSS nicht nur das Reservoir für topisch applizierte NP erhöht, sondern größenabhängig auch deren Translokation ins lebende Gewebe, wahrscheinlich auf folliculärem Weg, zu verbessern scheint.

Eine Pilotstudie unserer Arbeitsgruppe zeigte nach dem Auftragen eines Grippeimpfstoffes ohne zusätzliches Adjuvanz auf CSSS vorbehandelte Haut einen Anstieg IFN-  $\gamma$  produzierender T- Zellen (92, 99). Die humorale Immunantwort nach transkutaner Vakzinierung war der nach intramuskulärer Injektion vergleichbar. Allein nach transkutaner Applikation konnte nicht nur eine CD 4+-, sondern auch CD 8+- T-Zell-, d.h. antigenspezifische zelluläre Immunantwort generiert werden.

Neben der Verbesserung der Reservoirfunktion und der Überwindung der Hautbarriere zeigt CSSS also auch immunmodulierende Effekte.

Die Wirkung von Tape Stripping auf das Immunsystem konnte von verschiedenen Arbeitsgruppen gezeigt werden (26, 33, 110). Glenn et al. (106) konnten in einer klinischen Studie die immunstimulierende Wirkung der Barrierestörung durch die Behandlung mit einem EKG Prep- Pad, das eine Entfernung von etwa 29% des SC bewirkte, vor Applikation eines LT- enthaltenden Pflasters auf die Haut von Probanden demonstrieren. Es wurde bei geringeren Nebenwirkungen eine bessere Immunantwort als nach oraler Gabe der Vakzine beobachtet.

Auch CSSS entfernt etwa ein Drittel des SC, was einer leichten Störung der Hautbarriere entspricht. Anders als das konventionelle Tape Stripping, welches v.a. die Permeabilität der interfollikulären Epidermis erhöht, kann CSSS die Haarfollikel für die Penetration von Partikeln öffnen, indem es Sebum und abgestorbene Zellbestandteile aus dem Infundibulum entfernt. Die besondere Rolle der Follikel für die Penetration von Stoffen aufgrund der erhöhten Permeabilität der Hautbarriere im unteren Infundibulum und der hohen perifollikulären Dichte von APZ wurde erläutert.

CSSS kommt somit im Gegensatz zur Tesa®- Film- Abrisstechnik durch seine immunstimulierende und Haarfollikel öffnende Wirkung eine besondere Rolle beim Targeting von APZ, z.B. bei der transkutanen Applikation von Impfstoffen, und der Generierung einer Immunantwort zu. Die Konzentration von LZ um die Haarfollikel konnte auch in dieser Arbeit gezeigt werden. Ihre Reifung und Abwanderung zu den regionalen Lymphknoten, wo sie an der Generierung einer Immunantwort maßgeblich beteiligt sind, nach Barrierestörung wurde von mehreren Arbeitsgruppen nachgewiesen (86, 93, 111, 114, 165). Dadurch wird ihre Fähigkeit zur Antigen- und Kreuz-Präsentation erhöht (167). Dies ist z.B. für die Induktion einer CD8+ T- Zell vermittelten Immunantwort bei der Therapie oder Prävention von Tumor oder Infektionskrankheiten bedeutend (28, 166).



Lisziewicz et al. (167) entwickelte einen HIV-1- Antigen kodierende Plasmid- DNA in Form von NP enthaltenden DermaVir Patch, der am Rhesusaffenmodell auf Tape-gestrippte Haut appliziert wurde. Eine virusspezifische CD4+ T- Helfer und CD8+ T- Gedächtniszell- Immunantwort konnte generiert werden. Präklinische und Klinische Phase 1- Studien zeigten, dass DermaVir sicher zu applizieren und gut zu tolerieren ist (152).

Yagi et al. (27) beschreiben die Ergebnisse einer patientenbasierten Studie, in der fünf perkutane Immunisierungen auf durch CSSS barrieregestörte Haut mit einem HLA-Klasse I beschränkten Antigen- Peptid eine für Melanom- und HIV- Peptide spezifische Zytotoxische T- Zell- Antwort generieren und die Produktion von IFN-  $\gamma$  anregen konnten.

Eine erst kürzlich veröffentlichte Studie unserer Arbeitsgruppe zeigte die Penetration von 40nm und 200nm soliden Polyesterolpartikeln sowie Viruspartikeln in die mit Tape Stripping vorbehandelte Haut von Mäusen. Die tiefe Penetration in die Haarfollikel, die Diffusion in das umliegende Gewebe, die Aufnahme durch APZ sowie der Transport der Partikel zu den drainierenden Lymphknoten konnte mittels faseroptischer konfokaler Mikroskopie *in vivo* visualisiert werden. Nach TCI mit Viruspartikeln konnte eine starke zelluläre und humorale Immunantwort induziert werden. Nach nasaler Provokation mit dem Vakzine- Virus zeigte sich bei den geimpften Tieren klinisch deutlich eine protektive Wirkung (118, 168).

#### **4.9 Kleine Partikel zeigen eine verbesserte Aufnahme durch APZ**

Die Aufnahme partikelassoziierter Wirkstoffe durch APZ und die Generierung einer adäquaten Immunantwort auch ohne Zusatz eines Adjuvanz scheint abhängig von der Partikelgröße zu sein (77, 119, 120). Unabhängig vom Follikeltyp und den zu untersuchenden Partikeln konnte in verschiedenen Studien ein besseres Penetrationsverhalten der kleineren Partikelgröße beobachtet werden (8).

In der vorliegenden Arbeit ergab sich ein Vorteil der 40nm NP über die 200nm NP bezüglich der follikulären Penetration. Die oben beschriebenen Penetrationsmessungen unserer Arbeitsgruppe mit denselben wie in dieser Arbeit verwendeten Polyesterolpartikeln zeigte, dass 40nm Partikel im Unterschied zu Partikel > 750nm tief in VHF barrieregestörter Haut hinein penetrierten (9).

Die Ergebnisse verschiedener Studien lassen vermuten, dass insbesondere kleinere Partikel im Nanometerbereich unter 0,5 $\mu$ m, idealerweise gar unter 100nm (40, 69, 119),

in Haarfollikel oder auch durch barrieregestörte Haut penetrieren und gezielt die APZ der Haut und somit die abführenden Lymphknoten erreichen können.

Dies konnte in der in Kapitel 4.8 zuletzt erwähnten Studie (118) zwar auch für 200nm NP, in höherer Frequenz jedoch für die 40nm NP nach Applikation auf Tape gestrippte Haut gezeigt werden.

Zusammenzufassen ist, dass eine Partikelgröße <100nm nicht nur die Aufnahme über die Haarfollikel bzw. durch barrieregestörte Haut, sondern auch die Aufnahme durch APZ *in vitro* bzw. nach topischer Applikation und den Transport zu den drainierenden Lymphknoten zu fördern scheint.

#### **4.10 Praktische Schlussfolgerung für die Entwicklung von Protokollen zur topischen Applikation partikulärer therapeutischer Systeme**

Ein entsprechendes Protokoll sollte die Applikation partikelassoziierter Wirkstoffe einer Größe von möglichst unter 100nm enthalten, welche aufgrund der einfacheren Herstellungsmöglichkeiten in wässriger Lösung appliziert werden sollten. Auch 200nm Partikel sind nicht auszuschließen. Abgesehen von den genannten Gründen zum Penetrationsverhalten und der zellulären Aufnahme zeigten sich in dieser Arbeit stärkere Effekte der Vorbehandlungstechniken auf das Penetrationsverhalten der 40nm NP. Aufgrund der Penetrationsförderung und der Immunstimulation erscheint der Einschluß von CSSS in Protokolle zur TCI unabdingbar. Die Substanz sollte auf einem entsprechend großen Hautareal aufgetragen und ggf. mit einem gesättigten Fingerling einmassiert werden.

Die Kombination von CSSS und Massage fand bereits in klinischen Studien zur TCI Anwendung (99).

#### **4.11 Vor- und Nachteile solider Polyesterolpartikel**

In der vorliegenden Arbeit dienten solide Polyesterolpartikel als stabile, fluoreszierende Modellpartikel. Im Zuge der Untersuchung der Anwendungsmöglichkeiten von NP in der Diagnostik und Therapie wurden jedoch verschiedenste Arten von Partikeln unterschiedlichster physikochemischer Eigenschaften untersucht.

Trotz bzw. gerade wegen der besseren Penetration kleiner Partikel, welche sich durch Vorbehandlungstechniken wie CSSS oder Massage noch verbessern lässt, sowie Hinweise auf das Eindringen von NP in Haarfollikel, barrieregestörte Haut und auch Zellen, bedarf es in diesem Bereich weiterer Forschung bezüglich der therapeutischen

Anwendbarkeit. Vor allem hinsichtlich Partikelgrößen unter 100nm besteht Unklarheit hinsichtlich ihres Penetrationsverhaltens. Doch müssen auch die größeren Partikel in toxikologische Untersuchungen einbezogen werden. Es ist nicht mit Sicherheit auszuschließen, dass sie das SC überwinden, lebendes Gewebe und Zellen erreichen, Anschluss an die Blut bzw. Lymphbahn erhalten und systemische Wirkung entfalten können. Nohynek et al. (63) weisen darauf hin, dass Partikel in erster Linie durch ihre intrinsische Toxizität, d.h. ihre chemische Natur, toxisch wirken und physikalische Eigenschaften, wie Größe oder Form der Partikel, diese verstärken oder reduzieren können.

Solide Partikel sind vor raschem Abbau im Gewebe geschützt und stellen somit ein Reservoir der kontinuierlichen bzw. prolongierten Stimulation dar. Die Möglichkeit der kovalenten Bindung eines z.B. fluoreszierenden Farbstoffes unter experimentellen Bedingungen ermöglicht eine sichere Detektion der Partikel. Da sie biologisch nicht abbaubar sind, müssen aufgrund der Gefahr der Toxizität besondere Studien durchgeführt werden (63).

In klinischen Untersuchungen werden also eher biologisch abbaubare Partikel wie Liposomen, PLGA-, PLA-, Solid Lipid Nanopartikel oder ISCOMS Anwendung finden. Das spezifische Penetrationsverhalten variiert auch dann in Abhängigkeit von der Größe, der chemischen Zusammensetzung bzw. vom Vehikel der Partikel.

Anhand der in dieser Arbeit verwendeten soliden Polyesterpartikel konnte ein Penetrationsvorteil für kleinere, 40nm, NP in hydrophiler Grundlage und nach Anwendung von CSSS und evtl. Massage gesehen werden. Dies reiht sich in die Beobachtungen vorangehender Studien ein und kann insofern zukünftig in Protokollen von Penetrationsstudien bzw. Untersuchungen zur transkutanen Darreichung von Wirkstoffen berücksichtigt werden.

#### **4.12 Ausblick**

Eine Optimierung der Penetration von NP durch die Wahl der idealen Größe und des Vehikels bzw. die mechanische Verbesserung ihrer Penetration in die Haarfollikel hat Bedeutung für die Vergrößerung des follikulären Reservoirs. Die Wirkstoffmenge wird erhöht und die Speicherzeit verlängert. Unter Berücksichtigung der Größe und chemischer Eigenschaften des Stoffes bzw. seiner Formulierung können spezifische Strukturen des Haarfollikels bzw. assoziierte Zellpopulationen gezielt erreicht werden. Mit bioaktiven Molekülen oder Vektoren zur DNA- Expression beladene NP können in

die Talgdrüse eingebracht werden, Stammzellen der Wulstregion erreichen bzw. die gestörte Hautbarriere des unteren Infundibulums durchdringen und in Kontakt mit APZ, insbesondere LZ treten, die sich um die Haarfollikel konzentrieren.

Vorbehandlungstechniken wie Massage oder CSSS können durch Einflussnahme auf die Penetrationsquantität oder –qualität das Targeting verbessern.

Da CSSS neben der penetrationsfördernden auch eine immunstimulierende Wirkung hat, besitzt diese Vorbehandlungstechnik eine besondere Bedeutung für transkutan applizierte Impfstoffe. Neben der Verringerung von Nebenwirkung fördert TCI insbesondere bei Kindern die Compliance und in Entwicklungsländern den Erfolg von Impfkampagnen durch Einsparung von Material, geschultem Personal und eine Verminderung der Infektionsgefahr durch unsaubere Nadeln (153, 168).

## 5 Zusammenfassung

Bei der transkutanen Darreichung von Wirkstoffen spielt neben dem intra-, und interzellulären der intrafollikuläre Penetrationsweg zur Überwindung der Barriere des Stratum corneums (SC) eine wichtige Rolle. Während letzteres ständigen Erneuerungsprozessen unterliegt, stellen Haarfollikel ein Langzeitreservoir für topisch applizierte Präparate dar. Besonders partikuläre Stoffe im Mikro- und Nanometerbereich penetrieren größenabhängig bevorzugt in Haarfollikel. Aufgrund der Nähe zu Talgdrüsen, dem perifollikulären Kapillarnetz und haarfollikelassoziierten Melanozyten, Stamm- und Immunzellen ist gezielte Pharmakotherapie möglich.

Zielstellung der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung des Penetrationsverhaltens von 40nm und 200nm soliden fluoreszierenden Polyesterolpartikeln in exzidierte menschlicher Haut. Dabei wurde der Einfluss der Formulierung und verschiedener Vorbehandlungstechniken evaluiert. Die Partikel wurden in wässriger Lösung (PBS), bzw. lipophiler Grundlage (Basiscreme) appliziert und auf unbehandelte, mit einem Cyanoacrylatabriss (CSSS) vorbehandelte, bzw. nach dem Auftragen der Partikel mit Massage behandelte Haut appliziert.

Die nicht- invasive Methode des Differentiellen Tape Strippings (DTS) erlaubte die differenzierte Quantifizierung der Nanopartikel (NP) im SC und in den Haarfollikeln. Durch die Erstellung von Hornschichtprofilen (HP), wobei das gesamte SC mittels der Filmabrissmethode abgetragen wird, kann eine Relation zwischen Abrissnummer und dabei entfernter Menge an Korneozyten hergestellt werden. Die Konzentration der Partikel auf jedem Abriss kann bestimmt und somit ihr Eindringen in das SC in einem Penetrationsprofil (PP) visualisiert werden. Die Anfertigung von Gewebeschnitten erlaubte durch die anatomische Lokalisation der NP in den Haarfollikeln eine qualitative Auswertung der zu untersuchenden Parameter.

Die quantitative Auswertung des DTS ergab für die Penetration in das SC und die Haarfollikel einen Vorteil für 40nm NP im Vergleich zu 200nm Partikeln. Bezüglich des SC konnte für Applikation in PBS ein positiver Effekt verzeichnet werden. Die Vorbehandlungstechniken zeigten dabei keinen wesentlichen Einfluss. Die Abnahme

des interfollikulären Reservoirs nach Massage ist am ehesten auf Laterales Spreiten durch den Massagekopf zurückzuführen.

Ein Einfluss der Vorbehandlungstechniken auf die follikuläre Penetration zeigte sich allein für Partikel in hydrophiler Lösung. Für 40nm Partikel in PBS ließ sich ein signifikant positiver Effekt nach Massage, für 200nm Partikel eine Verbesserung der follikulären Penetration nach CSSS verzeichnen.

Die Hornschicht- und Penetrationsprofile zeigten, dass nach Applikation der NP in PBS durchschnittlich mehr Korneozyten je Abriss entfernt wurden als in Basiscreme (BC). Fünf Filmstreifen, die im DTS zur Bestimmung des interfollikulären Reservoirs genutzt wurden, entsprachen etwa 17% des SC. Diese fünf Abrisse erfassten ca. 90% der in die gesamte Hornschicht penetrierten NP. Die Annahme, dass im ersten Teil des DTS die fünf Abrisse den Grossteil der sich in der Hornschicht befindlichen NP messen, konnte verifiziert werden.

Das trichterförmige PP zeigte den Grossteil der Partikel in den obersten Schichten und eine Abnahme der Konzentration bis zur Nachweisgrenze in Tiefen von über 50% der Hornschicht.

Zwanzig Tapes entsprachen ca. 70% des SC. Diese Zahl wurde im DTS vor Bestimmung des follikulären Anteils der Partikel mittels CSSS entfernt. Das PP zeigte, dass sich in diesen Tiefen kaum mehr NP befanden. Damit wurde bestätigt, dass zwanzig Abrisse genügen, um das SC von Partikeln zu befreien und zu gewährleisten, dass der folgende CSSS allein den Anteil aus den Haarfollikeln erfasst.

Während die Vorbehandlungstechniken keinen signifikanten Einfluss auf die interfollikuläre Penetration hatten, zeigte sich nach Applikation in PBS ein positiver Effekt auf die Eindringtiefe im Vergleich zu BC.

Mittels der Gefrierschnitte konnte die Penetration in die Haarfollikel semiquantitativ untersucht, anatomisch lokalisiert und visualisiert werden. Nach CSSS konnte für 40nm Partikel in PBS und in BC bzw. nach Massage in BC die Zahl der offenen Follikel signifikant erhöht werden. Für 200nm in PBS nach CSSS bzw. für 200nm in BC nach Massage zeigte sich eine Verbesserung der Penetrationstiefe bei unveränderter Zahl der offenen Follikel. Insgesamt lässt sich ein positiver Effekt der Vorbehandlungstechniken v.a. für die kleinen Partikel und besonders ausgeprägt bei Applikation in PBS und nach CSSS zeigen.

Eine Zusammenstellung der Ergebnisse macht deutlich, dass eine Verbesserung der Penetration durch die Wahl einer kleinen Partikelgröße und Applikation in wässriger Lösung verbessert werden kann.

Lademann et al. beschreibt das Phänomen der „offenen“ und „geschlossenen“ Haarfollikel, welches die follikuläre Penetration bestimmt. Anhand der Evaluierung der Gewebeschnitte lässt sich vermuten, wie auch theoretisch erklären, dass CSSS durch die Entfernung von Talg und Debris die Zahl der offenen Follikel erhöhen kann, während Massage v.a. Einfluss auf die Penetrationstiefe ausübt.

CSSS dient nicht nur zur Öffnung von Haarfollikeln, sondern bewirkt durch die gleichzeitige Entfernung von etwa einem Drittel des SC dessen Barrierestörung. Dies fördert nicht nur die inter- und intrafollikuläre Penetration von insbesondere kleinen Partikeln, sondern hat auch immunstimulierende Wirkung.

Vogt et al. (9) zeigte, dass auf exzidierte menschliche Haut aufgebrachte 40nm Partikel durch barrieregestörte Epidermis und Haarfollikel penetrieren und bevorzugt von Langerhanszellen aufgenommen werden können. Des Weiteren fördert eine kleine Partikelgröße die Aufnahme durch Antigenpräsentierende Zellen, so dass NP eine herausragende Rolle in der Forschung der Transkutanen Immunisierung erhalten haben.

Die Optimierung der Penetration von Nanopartikeln hat Bedeutung für die Vergrößerung des follikulären Reservoirs. Unter Berücksichtigung der Größe und der chemischen Eigenschaften des Stoffes können haarfollikelassoziierte Zellpopulationen gezielt erreicht werden. Vorbehandlungstechniken wie Massage oder der Cyanoacrylatabriss können das Targeting durch Beeinflussung des Penetrationsverhaltens verbessern bzw., im Fall der Immunstimulation durch CSSS, zusätzliche Effekte ausüben.

## 6 Literaturverzeichnis

1. Barry BW. Breaching the skin's barrier to drugs. *Nat Biotechnol.* 2004 Feb;22(2):165-7.
2. Brzozowska M, Kowalska-Koprek U, Karowicz-Bilinska A, Pajszczyk-Kieszkiewicz T. [Effect of long-term therapy with transdermal patches releasing glyceryl trinitrate (GTN) used in pregnant hypertensive women on stabilisation of blood pressure and on the condition of the newborn infant]. *Ginekol Pol.* 2004 Feb;75(2):134-8.
3. Cevc G. Transdermal drug delivery of insulin with ultradeformable carriers. *Clin Pharmacokinet.* 2003;42(5):461-74.
4. Schafer-Korting M, Mehnert W, Korting HC. Lipid nanoparticles for improved topical application of drugs for skin diseases. *Adv Drug Deliv Rev.* 2007 Jul 10;59(6):427-43.
5. Aqil M, Ali A, Sultana Y, Saha N. Comparative bioavailability of metoprolol tartrate after oral and transdermal administration in healthy male volunteers. *Clin Drug Investig.* 2007;27(12):833-9.
6. Genina EA, Bashkatov AN, Sinichkin YP, Kochubey VI, Lakodina NA, Altshuler GB, et al. In vitro and in vivo study of dye diffusion into the human skin and hair follicles. *J Biomed Opt.* 2002 Jul;7(3):471-7.
7. Lademann J, Richter H, Teichmann A, Otberg N, Blume-Peytavi U, Luengo J, et al. Nanoparticles--an efficient carrier for drug delivery into the hair follicles. *Eur J Pharm Biopharm.* 2007 May;66(2):159-64.
8. Toll R, Jacobi U, Richter H, Lademann J, Schaefer H, Blume-Peytavi U. Penetration profile of microspheres in follicular targeting of terminal hair follicles. *J Invest Dermatol.* 2004 Jul;123(1):168-76.
9. Vogt A, Combadiere B, Hadam S, Stieler KM, Lademann J, Schaefer H, et al. 40 nm, but not 750 or 1,500 nm, nanoparticles enter epidermal CD1a+ cells after transcutaneous application on human skin. *J Invest Dermatol.* 2006 Jun;126(6):1316-22.
10. Fritsch P. *Dermatologie, Venerologie* 2. Aufl. ed. Berlin [u.a.] Springer; 2004.
11. Bos JD, Meinardi MM. The 500 Dalton rule for the skin penetration of chemical compounds and drugs. *Exp Dermatol.* 2000 Jun;9(3):165-9.
12. Bouwstra JA, Honeywell-Nguyen PL, Gooris GS, Ponc M. Structure of the skin barrier and its modulation by vesicular formulations. *Prog Lipid Res.* 2003 Jan;42(1):1-36.
13. Glenn GM, Kenney RT, Hammond SA, Ellingsworth LR. Transcutaneous immunization and immunostimulant strategies. *Immunol Allergy Clin North Am.* 2003 Nov;23(4):787-813.
14. Heard CM, Monk BV, Modley AJ. Binding of primaquine to epidermal membranes and keratin. *Int J Pharm.* 2003 May 12;257(1-2):237-44.
15. Prost-Squarcioni C. [Histology of skin and hair follicle]. *Med Sci (Paris).* 2006 Feb;22(2):131-7.
16. Vogt A, Blume-Peytavi U. [Biology of the human hair follicle. New knowledge and the clinical significance]. *Hautarzt.* 2003 Aug;54(8):692-8.
17. Vogt A, Hadam S, Heiderhoff M, Audring H, Lademann J, Sterry W, et al. Morphometry of human terminal and vellus hair follicles. *Exp Dermatol* 2007 Nov;16(11):946-50.
18. Meidan VM, Bonner MC, Michniak BB. Transfollicular drug delivery--is it a reality? *Int J Pharm.* 2005 Dec 8;306(1-2):1-14.



19. Partidos CD, Beignon AS, Mawas F, Belliard G, Briand JP, Muller S. Immunity under the skin: potential application for topical delivery of vaccines. *Vaccine*. 2003 Jan 30;21(7-8):776-80.
20. Christoph T, Muller-Rover S, Audring H, Tobin DJ, Hermes B, Cotsarelis G, et al. The human hair follicle immune system: cellular composition and immune privilege. *Br J Dermatol*. 2000 May;142(5):862-73.
21. Chen H, Yuan J, Wang Y, Silvers WK. Distribution of ATPase-positive Langerhans cells in normal adult human skin. *Br J Dermatol*. 1985 Dec;113(6):707-11.
22. Berger CL, Vasquez JG, Shofner J, Mariwalla K, Edelson RL. Langerhans cells: mediators of immunity and tolerance. *Int J Biochem Cell Biol*. 2006;38(10):1632-6.
23. Valladeau J, Saeland S. Cutaneous dendritic cells. *Semin Immunol*. 2005 Aug;17(4):273-83.
24. Banchereau J, Briere F, Caux C, Davoust J, Lebecque S, Liu YJ, et al. Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol*. 2000;18:767-811.
25. Jakob T, Ring J, Udey MC. Multistep navigation of Langerhans/dendritic cells in and out of the skin. *J Allergy Clin Immunol*. 2001 Nov;108(5):688-96.
26. Strid J, Hourihane J, Kimber I, Callard R, Strobel S. Disruption of the stratum corneum allows potent epicutaneous immunization with protein antigens resulting in a dominant systemic Th2 response. *Eur J Immunol*. 2004 Aug;34(8):2100-9.
27. Yagi H, Hashizume H, Horibe T, Yoshinari Y, Hata M, Ohshima A, et al. Induction of therapeutically relevant cytotoxic T lymphocytes in humans by percutaneous peptide immunization. *Cancer Res*. 2006 Oct 15;66(20):10136-44.
28. Larregina AT, Falo LD, Jr. Changing paradigms in cutaneous immunology: adapting with dendritic cells. *J Invest Dermatol*. 2005 Jan;124(1):1-12.
29. Stoitzner P, Pfaller K, Stossel H, Romani N. A close-up view of migrating Langerhans cells in the skin. *J Invest Dermatol*. 2002 Jan;118(1):117-25.
30. Kaech SM, Wherry EJ, Ahmed R. Effector and memory T-cell differentiation: implications for vaccine development. *Nat Rev Immunol*. 2002 Apr;2(4):251-62.
31. Stoitzner P, Tripp CH, Eberhart A, Price KM, Jung JY, Bursch L, et al. Langerhans cells cross-present antigen derived from skin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006 May 16;103(20):7783-8.
32. Ghaznawie M, Papadimitriou JM, Heenan PJ. The repopulation of murine Langerhans cells after depletion by mild heat injury. *Br J Dermatol*. 1999 Aug;141(2):206-10.
33. Streilein JW, Lonsberry LW, Bergstresser PR. Depletion of epidermal langerhans cells and Ia immunogenicity from tape-stripped mouse skin. *J Exp Med*. 1982 Mar 1;155(3):863-71.
34. Gilliam AC, Kremer IB, Yoshida Y, Stevens SR, Tootell E, Teunissen MB, et al. The human hair follicle: a reservoir of CD40+ B7-deficient Langerhans cells that repopulate epidermis after UVB exposure. *J Invest Dermatol*. 1998 Apr;110(4):422-7.
35. Downing DT, Stewart ME, Strauss JS. Changes in sebum secretion and the sebaceous gland. *Clin Geriatr Med*. 1989 Feb;5(1):109-14.
36. Lademann J, Otberg N, Richter H, Jacobi U, Schaefer H, Blume-Peytavi U, et al. [Follicular penetration. An important pathway for topically applied substances]. *Hautarzt*. 2003 Apr;54(4):321-3.
37. Illel B, Schaefer H, Illel B, Schaefer H, Wepierre J, Doucet O. Transfollicular percutaneous absorption. Skin model for quantitative studies  
Follicles play an important role in percutaneous absorption. *Acta Derm Venereol*. 1988 May;68(5):427-30.

38. Hueber F, Schaefer H, Wepierre J. Role of transepidermal and transfollicular routes in percutaneous absorption of steroids: in vitro studies on human skin. *Skin Pharmacol.* 1994;7(5):237-44.
39. Kao J, Hall J, Helman G. In vitro percutaneous absorption in mouse skin: influence of skin appendages. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1988 Jun 15;94(1):93-103.
40. Shim J, Seok Kang H, Park WS, Han SH, Kim J, Chang IS. Transdermal delivery of mixnoxidil with block copolymer nanoparticles. *J Control Release.* 2004 Jul 7;97(3):477-84.
41. Otberg N, Patzelt A, Rasulev U, Hagemeister T, Linscheid M, Sinkgraven R, et al. The role of hair follicles in the percutaneous absorption of caffeine. *Br J Clin Pharmacol.* 2008 Apr;65(4):488-92.
42. Vogt A, Mandt N, Lademann J, Schaefer H, Blume-Peytavi U. Follicular targeting--a promising tool in selective dermatotherapy. *J Investig Dermatol Symp Proc.* 2005 Dec;10(3):252-5.
43. Knorr F, Lademann J, Patzelt A, Sterry W, Blume-Peytavi U, Vogt A. Follicular transport route--research progress and future perspectives. *Eur J Pharm Biopharm* 2009 Feb;71(2):173-80 Epub 2008 Nov 24.
44. Munster U, Nakamura C, Haberland A, Jores K, Mehnert W, Rummel S, et al. RU 58841-myristate--prodrug development for topical treatment of acne and androgenetic alopecia. *Pharmazie.* 2005 Jan;60(1):8-12.
45. Cotsarelis G. Epithelial stem cells: a folliculocentric view. *J Invest Dermatol.* 2006 Jul;126(7):1459-68.
46. Ohyama M, Terunuma A, Tock CL, Radonovich MF, Pise-Masison CA, Hopping SB, et al. Characterization and isolation of stem cell-enriched human hair follicle bulge cells. *J Clin Invest.* 2006 Jan;116(1):249-60.
47. Osawa M, Egawa G, Mak SS, Moriyama M, Freter R, Yonetani S, et al. Molecular characterization of melanocyte stem cells in their niche. *Development.* 2005 Dec;132(24):5589-99.
48. Ohyama M, Vogel JC. Gene delivery to the hair follicle. *J Investig Dermatol Symp Proc.* 2003 Oct;8(2):204-6.
49. Pagnoni A, Kligman AM, el Gammal S, Stoudemayer T. Determination of density of follicles on various regions of the face by cyanoacrylate biopsy: correlation with sebum output. *Br J Dermatol.* 1994 Dec;131(6):862-5.
50. Blume U, Ferracin J, Verschoore M, Czernielewski JM, Schaefer H. Physiology of the vellus hair follicle: hair growth and sebum excretion. *Br J Dermatol.* 1991 Jan;124(1):21-8.
51. Otberg N, Richter H, Schaefer H, Blume-Peytavi U, Sterry W, Lademann J. Variations of hair follicle size and distribution in different body sites. *J Invest Dermatol.* 2004 Jan;122(1):14-9.
52. Rolland A, Wagner N, Chatelus A, Shroot B, Schaefer H. Site-specific drug delivery to pilosebaceous structures using polymeric microspheres. *Pharm Res.* 1993 Dec;10(12):1738-44.
53. Poblet E, Ortega F, Jimenez F. The arrector pili muscle and the follicular unit of the scalp: a microscopic anatomy study. *Dermatol Surg.* 2002 Sep;28(9):800-3.
54. Stenn KS, Paus R. Controls of hair follicle cycling. *Physiol Rev.* 2001 Jan;81(1):449-94.
55. Paus R, Foitzik K. In search of the "hair cycle clock": a guided tour. *Differentiation.* 2004 Dec;72(9-10):489-511.

56. Lademann J, Otberg N, Richter H, Weigmann HJ, Lindemann U, Schaefer H, et al. Investigation of follicular penetration of topically applied substances. *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol*. 2001;14 Suppl 1:17-22.
57. Schaefer H, Lademann J. The role of follicular penetration. A differential view. *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol*. 2001;14 Suppl 1:23-7.
58. Hueber F, Besnard M, Schaefer H, Wepierre J. Percutaneous absorption of estradiol and progesterone in normal and appendage-free skin of the hairless rat: lack of importance of nutritional blood flow. *Skin Pharmacol*. 1994;7(5):245-56.
59. Jacobi U, Kaiser M, Richter H, Audring H, Sterry W, Lademann J. The number of stratum corneum cell layers correlates with the pseudo-absorption of the corneocytes. *Skin Pharmacol Physiol*. 2005 Jul-Aug;18(4):175-9.
60. Teichmann A, Jacobi U, Ossadnik M, Richter H, Koch S, Sterry W, et al. Differential stripping: determination of the amount of topically applied substances penetrated into the hair follicles. *J Invest Dermatol*. 2005 Aug;125(2):264-9.
61. Lademann J, Otberg N, Richter H, Meyer L, Audring H, Teichmann A, et al. Application of optical non-invasive methods in skin physiology: a comparison of laser scanning microscopy and optical coherent tomography with histological analysis. *Skin Res Technol*. 2007 May;13(2):119-32.
62. Lademann JR, H. Otberg, N. Lawrenz, F. Blume-Peytavi, U.; Sterry, W. . Application of a Dermatological Laser Scanning Confocal Microscope for Investigation in Skin Physiology. *LASER PHYSICS- LAWRENCE-*. 2003;VOL 13( PART 5):756-60.
63. Nohynek GJ, Lademann J, Ribaud C, Roberts MS. Grey goo on the skin? Nanotechnology, cosmetic and sunscreen safety. *Crit Rev Toxicol*. 2007 Mar;37(3):251-77.
64. Combadiere B, Mahe B. Particle-based vaccines for transcutaneous vaccination. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*. 2008 Mar;31(2-3):293-315.
65. Alexis F, Rhee JW, Richie JP, Radovic-Moreno AF, Langer R, Farokhzad OC. New frontiers in nanotechnology for cancer treatment. *Urol Oncol*. 2008 Jan-Feb;26(1):74-85.
66. Mordon S, Sumian C, Devoisselle JM. Site-specific methylene blue delivery to pilosebaceous structures using highly porous nylon microspheres: an experimental evaluation. *Lasers Surg Med*. 2003;33(2):119-25.
67. Teichmann A, Ossadnik M, Richter H, Sterry W, Lademann J. Semiquantitative determination of the penetration of a fluorescent hydrogel formulation into the hair follicle with and without follicular closure by microparticles by means of differential stripping. *Skin Pharmacol Physiol*. 2006;19(2):101-5.
68. Kohli AK, Alpar HO. Potential use of nanoparticles for transcutaneous vaccine delivery: effect of particle size and charge. *Int J Pharm*. 2004 May 4;275(1-2):13-7.
69. Alvarez-Roman R, Naik A, Kalia YN, Guy RH, Fessi H. Skin penetration and distribution of polymeric nanoparticles. *J Control Release*. 2004 Sep 14;99(1):53-62.
70. Pflucker F, Wendel V, Hohenberg H, Gartner E, Will T, Pfeiffer S, et al. The human stratum corneum layer: an effective barrier against dermal uptake of different forms of topically applied micronised titanium dioxide. *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol*. 2001;14 Suppl 1:92-7.
71. Tan MH, Commens CA, Burnett L, Snitch PJ. A pilot study on the percutaneous absorption of microfine titanium dioxide from sunscreens. *Australas J Dermatol*. 1996 Nov;37(4):185-7.
72. Lademann J, Weigmann H, Rickmeyer C, Barthelmes H, Schaefer H, Mueller G, et al. Penetration of titanium dioxide microparticles in a sunscreen formulation into the

horny layer and the follicular orifice. *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol*. 1999 Sep-Oct;12(5):247-56.

73. Lademann J, Richter H, Schaefer UF, Blume-Peytavi U, Teichmann A, Otberg N, et al. Hair follicles - a long-term reservoir for drug delivery. *Skin Pharmacol Physiol*. 2006;19(4):232-6.

74. Chen D, Zuleger C, Chu Q, Maa YF, Osorio J, Payne LG. Epidermal powder immunization with a recombinant HIV gp120 targets Langerhans cells and induces enhanced immune responses. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2002 Jul 1;18(10):715-22.

75. Reece JC, Vardaxis NJ, Marshall JA, Crowe SM, Cameron PU. Uptake of HIV and latex particles by fresh and cultured dendritic cells and monocytes. *Immunol Cell Biol*. 2001 Jun;79(3):255-63.

76. Dean HJ, Fuller D, Osorio JE. Powder and particle-mediated approaches for delivery of DNA and protein vaccines into the epidermis. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*. 2003 Oct;26(5-6):373-88.

77. Scheicher C, Mehlig M, Dienes HP, Reske K. Uptake of microparticle-adsorbed protein antigen by bone marrow-derived dendritic cells results in up-regulation of interleukin-1 alpha and interleukin-12 p40/p35 and triggers prolonged, efficient antigen presentation. *Eur J Immunol*. 1995 Jun;25(6):1566-72.

78. Prabha S, Zhou WZ, Panyam J, Labhsetwar V. Size-dependency of nanoparticle-mediated gene transfection: studies with fractionated nanoparticles. *Int J Pharm*. 2002 Sep 5;244(1-2):105-15.

79. Akagi T, Wang X, Uto T, Baba M, Akashi M. Protein direct delivery to dendritic cells using nanoparticles based on amphiphilic poly(amino acid) derivatives. *Biomaterials*. 2007 Aug;28(23):3427-36.

80. Rancan F, Papakostas D, Hadam S, Hackbarth S, Delair T, Primard C, et al. Investigation of Polylactic Acid (PLA) Nanoparticles as Drug Delivery Systems for Local Dermatotherapy. *Pharm Res*. 2009 Jun 17;17:17.

81. Sjolander A, Drane D, Maraskovsky E, Scheerlinck JP, Suhrbier A, Tennent J, et al. Immune responses to ISCOM formulations in animal and primate models. *Vaccine*. 2001 Mar 21;19(17-19):2661-5.

82. Newman KD, Elamanchili P, Kwon GS, Samuel J. Uptake of poly(D,L-lactic-co-glycolic acid) microspheres by antigen-presenting cells in vivo. *J Biomed Mater Res*. 2002 Jun 5;60(3):480-6.

83. Neelapu SS, Baskar S, Gause BL, Kobrin CB, Watson TM, Frye AR, et al. Human autologous tumor-specific T-cell responses induced by liposomal delivery of a lymphoma antigen. *Clin Cancer Res*. 2004 Dec 15;10(24):8309-17.

84. Jung S, Otberg N, Thiede G, Richter H, Sterry W, Panzner S, et al. Innovative liposomes as a transfollicular drug delivery system: penetration into porcine hair follicles. *J Invest Dermatol*. 2006 Aug;126(8):1728-32.

85. Jung S, Patzelt A, Otberg N, Thiede G, Sterry W, Lademann J. Strategy of topical vaccination with nanoparticles. *J Biomed Opt*. 2009 Mar-Apr;14(2):021001.

86. Hoffman RM. Topical liposome targeting of dyes, melanins, genes, and proteins selectively to hair follicles. *J Drug Target*. 1998;5(2):67-74.

87. Grams YY, Alarukka S, Lashley L, Caussin J, Whitehead L, Bouwstra JA. Permeant lipophilicity and vehicle composition influence accumulation of dyes in hair follicles of human skin. *Eur J Pharm Sci*. 2003 Apr;18(5):329-36.

88. Grams YY, Bouwstra JA. Penetration and distribution of three lipophilic probes in vitro in human skin focusing on the hair follicle. *J Control Release*. 2002 Oct 4;83(2):253-62.

89. Jacobi U, Meykadeh N, Sterry W, Lademann J. Effect of the vehicle on the amount of stratum corneum removed by tape stripping. *J Dtsch Dermatol Ges.* 2003 Nov;1(11):884-9.
90. Jacobi U, Tassopoulos T, Surber C, Lademann J. Cutaneous distribution and localization of dyes affected by vehicles all with different lipophilicity. *Arch Dermatol Res.* 2006 Jan;297(7):303-10.
91. Ogiso T, Shiraki T, Okajima K, Tanino T, Iwaki M, Wada T. Transfollicular drug delivery: penetration of drugs through human scalp skin and comparison of penetration between scalp and abdominal skins in vitro. *J Drug Target.* 2002 Aug;10(5):369-78.
92. Skountzou I, Quan FS, Jacob J, Compans RW, Kang SM. Transcutaneous immunization with inactivated influenza virus induces protective immune responses. *Vaccine.* 2006 Aug 28;24(35-36):6110-9.
93. Seo N, Tokura Y, Nishijima T, Hashizume H, Furukawa F, Takigawa M. Percutaneous peptide immunization via corneum barrier-disrupted murine skin for experimental tumor immunoprophylaxis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000 Jan 4;97(1):371-6.
94. Guereña-Burgueno F, Hall ER, Taylor DN, Cassels FJ, Scott DA, Wolf MK, et al. Safety and immunogenicity of a prototype enterotoxigenic *Escherichia coli* vaccine administered transcutaneously. *Infect Immun.* 2002 Apr;70(4):1874-80.
95. Choi MJ, Kim JH, Maibach HI. Topical DNA vaccination with DNA/Lipid based complex. *Curr Drug Deliv.* 2006 Jan;3(1):37-45.
96. Mkrtichyan M, Ghochikyan A, Movsesyan N, Karapetyan A, Begoyan G, Yu J, et al. Immunostimulant adjuvant patch enhances humoral and cellular immune responses to DNA immunization. *DNA Cell Biol.* 2008 Jan;27(1):19-24.
97. Fan H, Lin Q, Morrissey GR, Khavari PA. Immunization via hair follicles by topical application of naked DNA to normal skin. *Nat Biotechnol.* 1999 Sep;17(9):870-2.
98. Seo N, Takigawa M. The current status and future direction of percutaneous peptide immunization against melanoma. *J Dermatol Sci.* 2007 Nov;48(2):77-85.
99. Vogt A, Mahe B, Costagliola D, Bonduelle O, Hadam S, Schaefer G, et al. Transcutaneous anti-influenza vaccination promotes both CD4 and CD8 T cell immune responses in humans. *J Immunol.* 2008 Feb 1;180(3):1482-9.
100. Glenn GM, Taylor DN, Li X, Frankel S, Montemarano A, Alving CR. Transcutaneous immunization: a human vaccine delivery strategy using a patch. *Nat Med.* 2000 Dec;6(12):1403-6.
101. Frech SA, Kenney RT, Spyr CA, Lazar H, Viret JF, Herzog C, et al. Improved immune responses to influenza vaccination in the elderly using an immunostimulant patch. *Vaccine.* 2005 Jan 4;23(7):946-50.
102. Guebre-Xabier M, Hammond SA, Epperson DE, Yu J, Ellingsworth L, Glenn GM. Immunostimulant patch containing heat-labile enterotoxin from *Escherichia coli* enhances immune responses to injected influenza virus vaccine through activation of skin dendritic cells. *J Virol.* 2003 May;77(9):5218-25.
103. Frech SA, Dupont HL, Bourgeois AL, McKenzie R, Belkind-Gerson J, Figueroa JF, et al. Use of a patch containing heat-labile toxin from *Escherichia coli* against travellers' diarrhoea: a phase II, randomised, double-blind, placebo-controlled field trial. *Lancet.* 2008 Jun 14;371(9629):2019-25.
104. Auewarakul P, Kositanont U, Sornsathapornkul P, Tothong P, Kanyok R, Thongcharoen P. Antibody responses after dose-sparing intradermal influenza vaccination. *Vaccine.* 2007 Jan 8;25(4):659-63.

105. Kenney RT, Frech SA, Muenz LR, Villar CP, Glenn GM. Dose sparing with intradermal injection of influenza vaccine. *N Engl J Med*. 2004 Nov 25;351(22):2295-301.
106. Glenn GM, Villar CP, Flyer DC, Bourgeois AL, McKenzie R, Lavker RM, et al. Safety and immunogenicity of an enterotoxigenic *Escherichia coli* vaccine patch containing heat-labile toxin: use of skin pretreatment to disrupt the stratum corneum. *Infect Immun*. 2007 May;75(5):2163-70.
107. Shi Z, Zeng M, Yang G, Siegel F, Cain LJ, van Kampen KR, et al. Protection against tetanus by needle-free inoculation of adenovirus-vectored nasal and epicutaneous vaccines. *J Virol*. 2001 Dec;75(23):11474-82.
108. Upadhyay P. Enhanced transdermal-immunization with diphtheria-toxoid using local hyperthermia. *Vaccine*. 2006 Jul 7;24(27-28):5593-8.
109. Kendall M. Engineering of needle-free physical methods to target epidermal cells for DNA vaccination. *Vaccine*. 2006 May 22;24(21):4651-6.
110. Kahlon R, Hu Y, Orteu CH, Kifayet A, Trudeau JD, Tan R, et al. Optimization of epicutaneous immunization for the induction of CTL. *Vaccine*. 2003 Jun 20;21(21-22):2890-9.
111. Jacobs JJ, Lehe CL, Hasegawa H, Elliott GR, Das PK. Skin irritants and contact sensitizers induce Langerhans cell migration and maturation at irritant concentration. *Exp Dermatol*. 2006 Jun;15(6):432-40.
112. Godefroy S, Peyre M, Garcia N, Muller S, Sesardic D, Partidos CD. Effect of skin barrier disruption on immune responses to topically applied cross-reacting material, CRM(197), of diphtheria toxin. *Infect Immun*. 2005 Aug;73(8):4803-9.
113. Kenney RT, Yu J, Guebre-Xabier M, Frech SA, Lambert A, Heller BA, et al. Induction of protective immunity against lethal anthrax challenge with a patch. *J Infect Dis*. 2004 Aug 15;190(4):774-82.
114. Chen D, Burger M, Chu Q, Endres R, Zuleger C, Dean H, et al. Epidermal powder immunization: cellular and molecular mechanisms for enhancing vaccine immunogenicity. *Virus Res*. 2004 Jul;103(1-2):147-53.
115. Partidos CD, Muller S. Decision-making at the surface of the intact or barrier disrupted skin: potential applications for vaccination or therapy. *Cell Mol Life Sci*. 2005 Jul;62(13):1418-24.
116. Partidos CD, Beignon AS, Briand JP, Muller S. Modulation of immune responses with transcutaneously deliverable adjuvants. *Vaccine*. 2004 Jun 23;22(19):2385-90.
117. Shen Z, Reznikoff G, Dranoff G, Rock KL. Cloned dendritic cells can present exogenous antigens on both MHC class I and class II molecules. *J Immunol*. 1997 Mar 15;158(6):2723-30.
118. Mahe B, Vogt A, Liard C, Duffy D, Abadie V, Bonduelle O, et al. Nanoparticle-based targeting of vaccine compounds to skin antigen-presenting cells by hair follicles and their transport in mice. *J Invest Dermatol* 2009 May;129(5):1156-64 Epub 2008 Dec 4.
119. Fifis T, Gamvrellis A, Crimeen-Irwin B, Pietersz GA, Li J, Mottram PL, et al. Size-dependent immunogenicity: therapeutic and protective properties of nano-vaccines against tumors. *J Immunol*. 2004 Sep 1;173(5):3148-54.
120. Fifis T, Mottram P, Bogdanoska V, Hanley J, Plebanski M. Short peptide sequences containing MHC class I and/or class II epitopes linked to nano-beads induce strong immunity and inhibition of growth of antigen-specific tumour challenge in mice. *Vaccine*. 2004 Nov 25;23(2):258-66.

121. Potard G, Laugel C, Schaefer H, Marty JP. The stripping technique: in vitro absorption and penetration of five UV filters on excised fresh human skin. *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol*. 2000 Nov-Dec;13(6):336-44.
122. Pinkus H. Examination of the epidermis by the strip method of removing horny layers. I. Observations on thickness of the horny layer, and on mitotic activity after stripping. *J Invest Dermatol*. 1951 Jun;16(6):383-6.
123. Breternitz M, Flach M, Prassler J, Elsner P, Fluhr JW. Acute barrier disruption by adhesive tapes is influenced by pressure, time and anatomical location: integrity and cohesion assessed by sequential tape stripping. A randomized, controlled study. *Br J Dermatol*. 2007 Feb;156(2):231-40.
124. Loffler H, Dreher F, Maibach HI. Stratum corneum adhesive tape stripping: influence of anatomical site, application pressure, duration and removal. *Br J Dermatol*. 2004 Oct;151(4):746-52.
125. Lademann J, Weigmann HJ, Schanzer S, Richter H, Audring H, Antoniou C, et al. Optical investigations to avoid the disturbing influences of furrows and wrinkles quantifying penetration of drugs and cosmetics into the skin by tape stripping. *J Biomed Opt*. 2005 Sep-Oct;10(5):054015.
126. Fluhr JW, Dickel H, Kuss O, Weyher I, Diepgen TL, Berardesca E. Impact of anatomical location on barrier recovery, surface pH and stratum corneum hydration after acute barrier disruption. *Br J Dermatol*. 2002 May;146(5):770-6.
127. Pelchrzim R, Weigmann HJ, Schaefer H, Hagemeister T, Linscheid M, Shah VP, et al. Determination of the formation of the stratum corneum reservoir for two different corticosteroid formulations using tape stripping combined with UV/VIS spectroscopy. *J Dtsch Dermatol Ges*. 2004 Nov;2(11):914-9.
128. Weigmann H, Lademann J, Meffert H, Schaefer H, Sterry W. Determination of the horny layer profile by tape stripping in combination with optical spectroscopy in the visible range as a prerequisite to quantify percutaneous absorption. *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol*. 1999 Jan-Apr;12(1-2):34-45.
129. Weigmann HJ, Ulrich J, Schanzer S, Jacobi U, Schaefer H, Sterry W, et al. Comparison of transepidermal water loss and spectroscopic absorbance to quantify changes of the stratum corneum after tape stripping. *Skin Pharmacol Physiol*. 2005 Jul-Aug;18(4):180-5.
130. Marks R, Dawber RP. Skin surface biopsy: an improved technique for the examination of the horny layer. *Br J Dermatol*. 1971 Feb;84(2):117-23.
131. Pierard GE, Pierard-Franchimont C, Arrese Estrada J, Delvoye P, Henry C, Damseaux M, et al. Cyanoacrylate skin surface stripping: an improved approach for distinguishing dysplastic nevi from malignant melanomas. *J Cutan Pathol*. 1989 Aug;16(4):180-2.
132. Sparavigna A, Pietro A, Setaro M. Sensitive skin: correlation with skin surface microrelief appearance. *Skin Res Technol*. 2006 Feb;12(1):7-10.
133. Holmes RL, Williams M, Cunliffe WJ. Pilo-sebaceous duct obstruction and acne. *Br J Dermatol*. 1972 Oct;87(4):327-32.
134. Mills OH, Jr., Kligman AM. The follicular biopsy. *Dermatologica*. 1983;167(2):57-63.
135. Thielitz A, Helmdach M, Ropke EM, Gollnick H. Lipid analysis of follicular casts from cyanoacrylate strips as a new method for studying therapeutic effects of antiacne agents. *Br J Dermatol*. 2001 Jul;145(1):19-27.
136. Ossadnik M, Czaika V, Teichmann A, Sterry W, Tietz HJ, Lademann J, et al. Differential stripping: introduction of a method to show the penetration of topically applied antifungal substances into the hair follicles. *Mycoses*. 2007 Nov;50(6):457-62.

137. MolecularProbes™. FluoSpheres®- Fluorescent Microspheres. Product information. 2005.
138. Garini Y, Young IT, McNamara G. Spectral imaging: principles and applications. *Cytometry A*. 2006 Aug 1;69(8):735-47.
139. Herman B. Fluorescence microscopy. *Curr Protoc Cell Biol*. 2002 Feb;Chapter 4(4):Unit 4 2.
140. Weigmann HJ, Jacobi U, Antoniou C, Tsikrikas GN, Wendel V, Rapp C, et al. Determination of penetration profiles of topically applied substances by means of tape stripping and optical spectroscopy: UV filter substance in sunscreens. *J Biomed Opt*. 2005 Jan-Feb;10(1):14009.
141. Jacobi U, Weigmann HJ, Ulrich J, Sterry W, Lademann J. Estimation of the relative stratum corneum amount removed by tape stripping. *Skin Res Technol*. 2005 May;11(2):91-6.
142. Marttin E, Neelissen-Subnel MT, De Haan FH, Bodde HE. A critical comparison of methods to quantify stratum corneum removed by tape stripping. *Skin Pharmacol*. 1996;9(1):69-77.
143. Weigmann HJ, Lindemann U, Antoniou C, Tsikrikas GN, Stratigos AI, Katsambas A, et al. UV/VIS absorbance allows rapid, accurate, and reproducible mass determination of corneocytes removed by tape stripping. *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol*. 2003 Jul-Aug;16(4):217-27.
144. Voegeli R, Heiland J, Doppler S, Rawlings AV, Schreier T. Efficient and simple quantification of stratum corneum proteins on tape strippings by infrared densitometry. *Skin Res Technol*. 2007 Aug;13(3):242-51.
145. Dreher F, Arens A, Hostynek JJ, Mudumba S, Ademola J, Maibach HI. Colorimetric method for quantifying human Stratum corneum removed by adhesive-tape stripping. *Acta Derm Venereol*. 1998 May;78(3):186-9.
146. Lindemann U, Wilken K, Weigmann HJ, Schaefer H, Sterry W, Lademann J. Quantification of the horny layer using tape stripping and microscopic techniques. *J Biomed Opt*. 2003 Oct;8(4):601-7.
147. Petty HR. Fluorescence microscopy: established and emerging methods, experimental strategies, and applications in immunology. *Microsc Res Tech*. 2007 Aug;70(8):687-709.
148. Monteiro-Leal LH, Troster H, Campanati L, Spring H, M FT. Gold finder: a computer method for fast automatic double gold labeling detection, counting, and color overlay in electron microscopic images. *J Struct Biol*. 2003 Mar;141(3):228-39.
149. Alvarez-Roman R, Naik A, Kalia YN, Fessi H, Guy RH. Visualization of skin penetration using confocal laser scanning microscopy. *Eur J Pharm Biopharm*. 2004 Sep;58(2):301-16.
150. Jacobi U, Weigmann HJ, Baumann M, Reiche AI, Sterry W, Lademann J. Lateral spreading of topically applied UV filter substances investigated by tape stripping. *Skin Pharmacol Physiol*. 2004 Jan-Feb;17(1):17-22.
151. Roderfeld M, Matern S, Roeb E. [Confocal laser scanning microscopy: a deep look into the cell]. *Dtsch Med Wochenschr*. 2003 Nov 28;128(48):2539-42.
152. Lori F, Calarota SA, Lisziewicz J. Nanochemistry-based immunotherapy for HIV-1. *Curr Med Chem*. 2007;14(18):1911-9.
153. Babiuk S, Baca-Estrada M, Babiuk LA, Ewen C, Foldvari M. Cutaneous vaccination: the skin as an immunologically active tissue and the challenge of antigen delivery. *J Control Release*. 2000 May 15;66(2-3):199-214.



154. Watabe S, Xin KQ, Ihata A, Liu LJ, Honsho A, Aoki I, et al. Protection against influenza virus challenge by topical application of influenza DNA vaccine. *Vaccine*. 2001 Aug 14;19(31):4434-44.
155. Simon GA, Maibach HI. The pig as an experimental animal model of percutaneous permeation in man: qualitative and quantitative observations--an overview. *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol*. 2000 Sep-Oct;13(5):229-34.
156. Jacobi U, Chen M, Frankowski G, Sinkgraven R, Hund M, Rzany B, et al. In vivo determination of skin surface topography using an optical 3D device. *Skin Res Technol*. 2004 Nov;10(4):207-14.
157. Teichmann A, Heuschkel S, Jacobi U, Presse G, Neubert RH, Sterry W, et al. Comparison of stratum corneum penetration and localization of a lipophilic model drug applied in an o/w microemulsion and an amphiphilic cream. *Eur J Pharm Biopharm*. 2007 Nov;67(3):699-706.
158. Wagner H, Kostka KH, Lehr CM, Schaefer UF. Human skin penetration of flufenamic acid: in vivo/in vitro correlation (deeper skin layers) for skin samples from the same subject. *J Invest Dermatol*. 2002 Mar;118(3):540-4.
159. Jacobi U, Engel K, Patzelt A, Worm M, Sterry W, Lademann J. Penetration of pollen proteins into the skin. *Skin Pharmacol Physiol*. 2007;20(6):297-304.
160. Williams F. In vitro studies – how good are they at replacing in vivo studies for measurement of skin absorption? . *Pharmacol* 2006;21(2):199-203.
161. Patzelt A, Richter H, Buettmeyer R, Huber HJ, Blume-Peytavi U, Sterry W, et al. Differential stripping demonstrates a significant reduction of the hair follicle reservoir in vitro compared to in vivo. *Eur J Pharm Biopharm*. 2008 Mar 16;16:16.
162. Nielsen JB. Percutaneous penetration through slightly damaged skin. *Arch Dermatol Res*. 2005 Jun;296(12):560-7.
163. Warheit DB, Borm PJ, Hennes C, Lademann J. Testing strategies to establish the safety of nanomaterials: conclusions of an ECETOC workshop. *Inhal Toxicol*. 2007 Jun;19(8):631-43.
164. Lademann J, Knorr F, Richter H, Blume-Peytavi U, Vogt A, Antoniou C, et al. Hair follicles--an efficient storage and penetration pathway for topically applied substances. Summary of recent results obtained at the Center of Experimental and Applied Cutaneous Physiology, Charite -Universitätsmedizin Berlin, Germany. *Skin Pharmacol Physiol*. 2008;21(3):150-5.
165. Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity: enhancing the efficiency of antigen presentation. *Mt Sinai J Med*. 2001 May;68(3):160-6.
166. Robinson HL, Amara RR. T cell vaccines for microbial infections. *Nat Med*. 2005 Apr;11(4 Suppl):S25-32.
167. Lisziewicz J, Trocio J, Whitman L, Varga G, Xu J, Bakare N, et al. DermaVir: a novel topical vaccine for HIV/AIDS. *J Invest Dermatol*. 2005 Jan;124(1):160-9.
168. Nasir A. Nanotechnology in vaccine development: a step forward. *J Invest Dermatol*. 2009 May;129(5):1055-9.

# Anhang

## I. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1	Aufbau des Haares .....	10
Abbildung 2	Follikuläres Targeting .....	15
Abbildung 3	Tesa®- Film- Abrisstechnik .....	29
Abbildung 4	Cyanoacrylat- Abrisstechnik .....	30
Abbildung 5	Hornschichtprofil .....	40
Abbildung 6	Penetrationsprofil .....	41
Abbildung 7	Auswertung der follikulären Penetration .....	43
Abbildung 8	Kalibrierungskurven 40nm und 200nm NP in PBS .....	46
Abbildung 9	Bestimmung der Haarfollikeldichte mittels CSSS .....	47
Abbildung 10	Fluoreszenzsignal der NP auf den Filmstreifen .....	47
Abbildung 11	Fluoreszierende Nanopartikel auf CSSS- Abrissen .....	48
Abbildung 12	Emission der NP im Stratum corneum- 40nm/ 200nm 0,01% in PBS...	49
Abbildung 13	Emission der NP im Stratum corneum- 40nm/ 200nm 0,1% in BC.....	49
Abbildung 14-	Zusammenfassung der NP im SC: 40nm/ 200nm NP 0,01% in PBS bzw. 0,1% in BC .....	50
Abbildung 15	Recovery Rate im SC in Abhängigkeit von den Vorbehandlungstechniken .....	51
Abbildung 16	Emission der Nanopartikel in den Haarfollikeln- 40nm/ 200nm 0,01% in PBS .....	52
Abbildung 17	Emission der NP in den Haarfollikeln- 40nm/ 200nm 0,1% in Basiscreme.....	53
Abbildung 18	Anteil der NP in den Haarfollikel in % .....	53
Abbildung 19	Zusammenfassung: 40nm/ 200nm NP 0,01% in PBS bzw. 0,1% in BC- NP in den Haarfollikeln .....	54
Abbildung 20	Recovery Rate: Follikulärer und interfollikulärer Anteil in Prozent .....	55
Abbildung 21	Follikuläre Recovery Rate.....	55
Abbildung 22	Hornschicht-/ Penetrationsprofile 40m 0,01% in PBS.....	56
Abbildung 23	Hornschicht-/ Penetrationsprofile 200m 0,01% in PBS.....	57
Abbildung 24	Hornschicht-/ Penetrationsprofile 40m 0,1% in Basiscreme .....	58
Abbildung 25	Hornschicht-/ Penetrationsprofile 200m 0,1% in Basiscreme .....	59

Abbildung 26	Prozentual entfernte Menge an Korneozyten nach kompletter Entfernung des SC nach NP- Applikation auf unbehandelte Haut.....	60
Abbildung 27	Prozentual entfernte Menge an Korneozyten nach kompletter Entfernung des SC nach NP- Applikation auf CSSS- vorbehandelte Haut.....	60
Abbildung 28	Prozentual entfernte Menge an Korneozyten nach kompletter Entfernung des SC nach NP- Applikation auf Massage behandelte Haut. ....	60
Abbildung 29	Prozentual entfernte Menge an SC je Filmstreifen: Mittelwerte 40nm und 200 nm NP in PBS bzw. BC .....	61
Abbildung 30	Verteilung der NP im SC: Hautproben ohne Vorbehandlung.....	63
Abbildung 31	Verteilung der NP im SC: Hautproben nach CSSS-Vorbehandlung .....	63
Abbildung 32	Verteilung der NP im SC: Hautproben mit Massage-Behandlung .....	64
Abbildung 33	Verteilung der NP in den Schichten des SC .....	65
Abbildung 34	Recovery Rate aus dem gesamten SC bzw. aus den ersten fünf Abrissen des PP .....	66
Abbildung 35	Mittelwerte der Recovery Rate von 40nm und 200nm NP in PBS und BC für die Vorbehandlungstechniken „keine Vorbehandlung“, „CSSS“, Massage“.	66
Abbildung 36	Im PP bzw. im DTS ermittelte Recovery Rate .....	67
Abbildung 37	Auswertung der Penetrationstiefen.....	68
Abbildung 38	Foto: 200nm NP 0,1% in PBS/ keine Vorbehandlung.....	68
Abbildung 39	Foto: 200nm NP 0,1% in PBS/ keine Vorbehandlung.....	69
Abbildung 40	Foto: 200nm NP 0,1% in PBS/ Massage.....	69
Abbildung 41	Foto: 200nm NP 0,1% in PBS/ Massage.....	69
Abbildung 42	Foto: 40nm NP 0,1% in PBS/ CSSS.....	69
Abbildung 43	Foto: 40nm NP 0,1% in PBS/ CSSS.....	69
Abbildung 44	Follikuläre Penetration von 40nm und 200nm NP 0,1% in PBS nach CSSS .....	71
Abbildung 45	Follikuläre Penetration von 40nm 1% in BC nach CSSS.....	72
Abbildung 46	Follikuläre Penetration von 200nm 1% in BC nach CSSS .....	73
Abbildung 47	Follikuläre Penetration von 40nm und 200nm NP 0,1% in PBS nach Massage .....	74
Abbildung 48	Follikuläre Penetration von 40nm 1% in BC nach Massage .....	75
Abbildung 49	Follikuläre Penetration von 200nm 1% in BC nach Massage .....	76
Abbildung 50	Langerhanszellfärbung .....	77
Abbildung 51	CLSM- Aufnahmen nicht vorbehandelter Haut .....	78

Abbildung 52	CLSM- Aufnahmen CSSS vorbehandelter Haut.....	78
Abbildung 53	CLSM- Aufnahmen Massage behandelter Haut.....	78

## **II. Tabellenverzeichnis**

Tabelle 1	Konzentration der NP im SC.....	51
Tabelle 2	Mittelwerte der je Filmstreifen entfernten Hornschicht in Prozent.....	62

## Danksagung

Zuerst möchte ich Frau Prof. Dr. med. Ulrike Blume- Peytavi für die Möglichkeit danken, an der dermatologischen Klinik der Charité zu promovieren.

Mein herzlicher Dank gilt vor allem Frau Dr. med. Annika Vogt für die Bereitstellung des interessanten Themas, ihre exzellente Hilfe bei der Klärung von Problemen und ihre kompetente Unterstützung während der Entstehung dieser Arbeit.

Bedanken möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Dr.-Ing. Jürgen Lademann, der ebenfalls mit freundlichem Rat an meiner Seite stand und dessen Arbeitsgruppe eng mit mir zusammenarbeitete. Frau Heike Richter und Frau Sabine Schanzer möchte ich in diesem Zusammenhang für die tatkräftige Unterstützung zur Lösung technischer Fragestellungen danken.

An gleicher Stelle gebührt mein Dank Frau Sabrina Hadam für ihre tolle Hilfe im Labor und bei der Fluoreszenzmikroskopie.

Bedanken möchte ich mich auch bei allen anderen Mitarbeitern des CRC und CCP für die gute Zusammenarbeit und zahlreiche fröhliche Momente.

Weiterhin möchte ich mich bei der Abteilung für Plastisch- Ästhetische Chirurgie der Asklepios Klinik Birkenwerder, sowie der Klinik für Plastische, Ästhetische und Mammachirurgie des HELIOS Klinikum Emil von Behring ganz herzlich für ihre Zusammenarbeit bedanken.

Ein Dank gilt Iliane, die mir als erste im dunklen Labor die fluoreszierenden Haarfollikel zeigte und mich dafür begeisterte konnte und mir auch auf dem weiteren Weg zur Dissertation eine liebe Freundin und Ratgeberin wurde.

Bedanken möchte ich mich bei Dana und Stefan, welche die mühevollen Aufgabe des Korrekturlesens meiner Arbeit auf sich nahmen.

Zuletzt möchte ich mich von Herzen bei meinen Eltern bedanken, die es mir durch ihre Unterstützung ermöglicht haben, Medizin zu studieren und damit auch die vorliegende Dissertation zu erstellen. Ein besonderer Dank an meine Mutter, die immer an mich glaubte und mir bei allen Entscheidungen zur Seite stand.

Vielen Dank!

## Eidesstattliche Erklärung

Ich, Julia Schmidt, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema:

„Penetration von Nanopartikeln in menschliche Haut–

Auswirkung von Cyanoacrylate Skin Surface Stripping vs. Massage auf das Penetrationsverhalten von 40nm und 200nm soliden Polysterolpartikeln in wässriger Lösung und Cremegrundlage“

selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.

Datum

Unterschrift

## **Lebenslauf**

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.