

4. DISKUSSION

4 Diskussion

4.1 Nutzen-Risiko-Relation für die topische Therapie mit Glucocorticoiden, Wirkung von Glucocorticoiden

GC stellen trotz der kürzlich eingeführten Inhibitoren von NFAT (nuklearer Faktor aktivierter T - Lymphozyten) nach wie vor Mittel der Wahl zur Therapie entzündlicher Hauterkrankungen dar. Neben der guten antiinflammatorischen Wirkung zeigen GC proliferationshemmende Effekte, die bei Fibroblasten zur Hautatrophie führen. Um topische Steroide einfacher bewerten zu können, ist ein System zur Nutzen-Risiko-Analyse in vitro wünschenswert.

In der vorliegenden Arbeit wurden zunächst die zytotoxische Wirkung der GC mit dem MTT-Test und der proliferationshemmende Effekt mit Hilfe des Thymidin Einbaus bewertet. Diese Daten sollten mit Rezeptorbindungskonstanten (Hammer et al., 2003) korreliert werden. Der antiproliferative Effekt wird über eine Vielzahl von trans- und post-transkriptionalen Effekten vermittelt (Almawi et al., 2002). Die Beeinflussung der Transkription erfolgt durch die Bindung an den zytosolischen GC Rezeptor α , eingeleitet durch die Translokation in den Zellkern. Die Interaktion mit den entsprechenden Promotorregionen reguliert die Expression bestimmter Gene. Für die proliferationshemmende Wirkung ist die Hemmung der Zytokinbildung wesentlich. Dieser Effekt wird auch über post-transkriptionale Effekte verursacht, wie die Hochregulierung des Transforming-Growth-Factors- β (TGF- β), der die Zytokinbildung inhibiert. Der der Proliferationshemmung zugrundeliegende Mechanismus scheint nicht direkt durch die Rezeptorbindung beschreibbar zu sein.

Glucocorticoide der Klasse-I	Glucocorticoide der Klasse-II
Hydrocortison	Prednicarbat
Betamethason-17-valerat	Mometason-17-furoat
Triamcinolonacetonid	Methylprednisolonaceponat
Clobetasol-17-propionat	Hydrocortisonbutyrat

Tab. 2: Einteilung der Glucocorticoide (GC) in die Klassen I (Verhältnis der erwünschten zu unerwünschten Wirkungen ausgeglichen) und II (Verhältnis der erwünschten überwiegt den unerwünschten Wirkungen deutlich) nach AWMF-Leitlinie.

Die gewonnenen Daten stehen in keiner Übereinstimmung mit klinisch relevanten Unterschieden (Klasse-I und Klasse-II GC), wofür neben der Komplexität des Signalwegs insbesondere ein pharmakokinetischer Unterschied verantwortlich ist.

Allgemein wird das Penetrationsverhalten der Arzneistoffe in die Haut neben der Größe der Moleküle in hohem Maße von deren Lipophilie beeinflusst (Cross et al., 2003). Bei GC kann das Penetrationsverhalten gut mit deren Lipophilie korreliert werden (Ponec and Kempenaar, 1983). Darüber hinaus kann die Penetration stark durch den Trägertyp und dessen Zusammensetzung beeinflusst werden (Lombardi-Borgia et al., 2005; Ponec and Kempenaar, 1983; Stecova et al., 2007) und so zu einer verbesserten Nutzen-Risiko-Relation führen. Die Metabolisierung der GC spielt ebenfalls eine wesentliche Rolle für die Nutzen-Risiko-Relation. Der antiinflammatorische Effekt der GC wird nach einer sehr kurzen Einwirkdauer vermittelt, daher trägt eine schnelle Metabolisierung zu inaktiven Metaboliten zu einer verringerten Atrophogenität bei (Gysler et al., 1997; Lange et al., 1997; Lange et al., 2000). Für MOF konnte in der Asthmatherapie gezeigt werden, dass hochaktive Metabolite gebildet werden, die offenbar für die systemischen Nebenwirkungen verantwortlich sind (Valotis and Hogger, 2004). Dieser Befund steht im Gegensatz zu der Einteilung durch die AWMF, die MOF zu den Klasse-II GC zählt. Dies kann aber auch in der unterschiedlichen metabolischen Aktivität von Lungengewebe und Haut begründet liegen.

Aufgrund der bereits bekannten - und in den dynamischen Experimenten in der Relevanz noch verstärkten - Bedeutung der Pharmakokinetik der verschiedenen Mitglieder dieser Wirkstoffgruppe sollte in Zusammenarbeit mit der Klinik für Dermatologie und Allergologie der LMU München die Möglichkeit des mit Lipidnanopartikeln erreichbaren Targetings untersucht werden. Im Vordergrund stand die Frage, welche Interaktionen zwischen Träger, GC und Haut stattfinden. Infolge der Komplexität beschränkt sich das Promotionsvorhaben auf die Interaktion zwischen Träger und Steroid.

Vor dem Beginn der pharmazeutisch-technologischen Untersuchungen wurden die Signalwege, über die GC Fibroblasten vor der Apoptose schützen, untersucht. Dabei wird Transkriptionsfaktor NFκB sowohl bei apoptotischen als auch bei antiapoptotischen Prozessen Bedeutung zugesprochen. Vielfach wird eine Hemmung von NFκB durch GC beobachtet (Gottlicher et al., 1998). Dagegen erhöht die Stimulation mit GC bei Hepatomzellen die nukleäre Translokation von NFκB, die zur Senkung der Apoptoserate führt (Evans-Storms and Cidlowski, 2000). Als bedeutender Transkriptionsfaktor der Entzündungsreaktion verstärkt NFκB die Expression von proinflammatorischen und

proapoptotischen Zytokinen wie TNF α und IL-2 (van der Burg and van der Saag, 1996), NF κ B selbst wirkt hauptsächlich antiapoptotisch (Natoli et al., 1998). Bei primären Fibroblasten ist NF κ B allerdings nicht an dem zellschützenden Effekt der GC beteiligt (Hammer et al., 2003).

Eine zelltypspezifische Beeinflussung der Apoptose regulierenden Signalwege durch GC ist aber auch jenseits NF κ B vermittelter Effekte bekannt. In Maus-Osteoblasten verhindern GC die durch TNF α induzierte Apoptose durch Hemmung der durch Zytokine induzierten Ceramidfreisetzung (Chae et al., 2000). Bei primären Fibroblasten wirken GC der durch TNF α und Ceramide induzierten Apoptose entgegen (Hammer et al., 2003). Interessanterweise ist der zytoprotektive Effekt von DEX durch den Inhibitor der Sphingosinkinase 1 (SPHK1) N,N-Dimethyl-D-erythro-Sphingosin (DMS) aufhebbar, so dass eine Interferenz mit der weiteren Ceramid-Metabolisierung zu vermuten ist (Maceyka et al., 2002; Manggau et al., 2001). DMS hemmt die Umsetzung des Ceramid-Abbauprodukts Sphingosin zu dem auch in Fibroblasten zellprotektiven S1P (Hammer et al., 2003; Maceyka et al., 2002; Sauer et al., 2005). Der durch die GC vermittelte antiapoptotische Effekt kommt durch die verstärkte Umwandlung proapoptotischer Ceramide über Sphingosin zu S1P zustande (Hammer et al., 2003).

S1P selbst vermittelt antiapoptotische Effekte (Cuvillier and Levade, 2001; Maceyka et al., 2002; Sauer et al., 2005). Neben der dem S1P₃ Rezeptorsubtyp nachgeschalteten Signalkaskade über die Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K) und Akt Aktivierung (Baudhuin et al., 2004; Maceyka et al., 2002; Means et al., 2007) werden auch rezeptorunabhängige Mechanismen für die zellprotektive Wirkung beschrieben. So sollen die Konzentrationsverhältnisse der Sphingolipidmetabolite zueinander eine wichtige Rolle spielen (Huwiler and Pfeilschifter, 2006; Maceyka et al., 2002). Jedoch scheint die Art der Beeinflussung der Apoptose durch die Sphingolipide zellspezifisch zu sein.

In der vorliegenden Arbeit konnte mit Hilfe muriner Knockout Fibroblasten für die GC der S1P₃ Rezeptorsubtyp als Vermittler der zellprotektiven Wirkung identifiziert werden. Es ist bereits bekannt, dass es über S1P₃ zu einer Aktivierung der PI3K und anschließend von Akt kommt (Baudhuin et al., 2004; Means et al., 2007).

Darüber hinaus wurden die Sphingosin und S1P Analoga FTY720 und FTY720P bezüglich ihrer Beeinflussung der Apoptose untersucht. Für FTY720 werden in der Literatur hauptsächlich apoptotische Effekte beschrieben (Isoyama et al., 2006; Sugito et al., 2006), jedoch gibt es auch Hinweise auf antiapoptotische Effekte (Zhao et al., 2004). Eigene

Untersuchungen zeigten, dass FTY720P genauso wie Sphingosin-1-Phosphat eine antiapoptotische Wirkung in primären Fibroblasten zeigt. Obwohl FTY720 durch die in Fibroblasten exprimierte SPHK 2 zu FTY720P umgewandelt werden kann (Keller et al., 2007), konnte für FTY720 keine zellprotektive Eigenschaft gefunden werden. Durch die Hemmung der Expression der SPHK 2 wirkte FTY720 sogar apoptotisch. Die apoptotische Wirkung kann - wie bei anderen Zelltypen auch - den dephosphorylierenden Eigenschaften von FTY720 (Lee et al., 2004; Ng et al., 2007; Shen et al., 2007) zugeschrieben werden, insbesondere der Dephosphorylierung von Phospho-Akt. Bei humanen Fibroblasten könnten die apoptotischen Effekte des FTY720 durch eine teilweise erfolgende Phosphorylierung zu FTY720P kompensiert werden. Erst durch die Hemmung der SPHK 2 wird das bestehende Gleichgewicht zwischen FTY720 und FTY720P zugunsten des apoptotisch wirkenden FTY720 verschoben.

4.2 Synthese spingelabelter Glucocorticoide

Gemäß den bisherigen Erfahrungen ist nur durch die stabile Beladung des Trägers mit dem Wirkstoff ein Targeting möglich (Santos Maia et al., 2002; Sivaramakrishnan et al., 2004; Stecova et al., 2007). Neben ESR signalgebenden Modellsubstanzen wie der Cholestansonde oder Tempol, sollten mit speziell für die ESR Spektroskopie modifizierten GC die Ergebnisse der PS überprüft und die physikochemischen bzw. strukturellen Anforderungen an GC für eine effektive Trägerassoziation und die präzise Form der Beladung aufgezeigt werden. Trotz des Modellcharakters durch die Labelung des Arzneistoffs sollte so die bestmögliche Vergleichbarkeit mit dem genuinen Arzneistoff erreicht werden. Die anspruchsvolle Einführung eines Spinlabels in GC gelang für alle ausgewählten Vertreter, nämlich PC, BMV und PD.

Aufgrund vorhergehender Untersuchungen (Sivaramakrishnan et al., 2004) wurde die Assoziation der GC über deren Estergruppen an den Träger vermutet. Um diese Interaktion möglichst nicht zu beeinflussen und gleichzeitig die Zugänglichkeit des Arzneistoffs für die ESR zu gewährleisten, sollte die Labelung möglichst an einer zu den Estergruppen entfernt stehenden Gruppe erfolgen. Zu diesem Zweck schien sich der an der Position C-11 befindliche sekundäre Alkohol auch wegen seiner Reaktivität zu eignen. Die Einführung des Spinlabels sollte über eine Veresterung dieses Alkohols erfolgen.

Die Bedingungen für die Einführung des Spinlabels an der sich in Position C-11 befindlichen Hydroxylgruppe wurden mit Hilfe der ebenfalls sterisch gehinderten Pivalinsäure in Vorversuchen ermittelt. Die Verwendung der Pivalinsäure trug der Struktur der als Spinlabel eingeführten 2,2,5,5-Tetramethyl-3-pyrrolin-1-oxyl-3-carbonsäure Rechnung, die aufgrund der Doppelbindung ebenfalls eine sterische Hinderung aufweist. Die Doppelbindung des Spinlabels wiederum verhindert die Enantiomerie der gelabelten Produkte, was für die spätere durchzuführende Analytik von Bedeutung war.

Die Reinigung der erhaltenen Produkte gestaltete sich besonders schwierig. Aufgrund der äußerst hohen, offenbar pH abhängigen Hydrolyseempfindlichkeit der labilen Esterbindungen mussten sowohl für das spingelabelte PC als auch für das spingelabelte BMV neue Verfahren etabliert werden. Insbesondere schienen dabei Umlagerungseffekte, d.h. die Verschiebung der Estergruppe von Position C-17 nach C-21 und anschließend die vollständige Abspaltung, eine Rolle zu spielen, wie bereits in anderem Zusammenhang beschrieben wurde (Gysler et al., 1997). Die Reinigung erfolgte über eine Kieselgelsäule, die über leicht saure Hydroxylgruppen verfügt. Im Allgemeinen sind Estergruppen eher im sauren als im alkalischen stabil. Dennoch traten Zersetzungsprodukte in einem Ausmaß auf, die bei der extrem empfindlichen ESR zu nicht kompensierbaren Störsignalen führten (*Abb. 41*).

4.3 Charakterisierung Nanopartikulärer Trägersysteme

Die Fortschritte im Verständnis der Pathophysiologie von Krankheiten auf molekularer Ebene erlaubt die Entwicklung hochaktiver Arzneistoffe. Die gute Wirksamkeit wird jedoch häufig von toxischen Effekten begleitet. Um die Verträglichkeit dieser Arzneistoffe zu verbessern und so deren Einführung in die Therapie zu ermöglichen bzw. den therapeutischen Nutzen zu erhöhen, werden u.a. Nanopartikuläre Trägersysteme entwickelt.

Um das Potenzial dieser Träger für die Therapie topischer Erkrankungen bewerten zu können, müssen die Interaktionen zwischen Arzneistoff und Partikel (Jores et al., 2004; Lombardi-Borgia et al., 2005; Sivaramakrishnan et al., 2004) einschließlich der sich durch die Beladung mit dem Arzneistoff ergebenden Modifikationen der Partikeloberfläche (Hong et al., 2006) näher untersucht werden. Darüber hinaus ist die Distribution (Hong et al., 2006; Nguyen et al., 2003; Yoncheva et al., 2005) und die Beeinflussung der Penetration (Schafer-Korting et al., 2007) des Arzneistoffs näher zu charakterisieren, sowie die sich daraus ergebene Nutzen-Risiko-Relation (Fesq et al., 2003).

Die enge Relation zwischen dem Penetrationsverhalten und der Wirkstoff-Träger Interaktion wurde mit Hilfe der Parelektrischen Spektroskopie (PS) und der Elektronen-Spin-Resonanz Spektroskopie (ESR) näher untersucht. Darüber hinaus wurde die Struktur der Partikel mit der Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) aufgeklärt. Dazu wurden in der vorliegenden Arbeit die Nanopartikulären Trägersysteme SLN, NLC und NE in Abhängigkeit von der Konzentration des Arznei- bzw. Modellstoffs untersucht. Die Methode der PS beruht auf dem Vorhandensein eines elektrischen Dipolmoments, über das nahezu jeder Arzneistoff aber auch die Trägersysteme verfügen. Im Gegensatz dazu sind für die ESR Moleküle mit ungepaarten Elektronen nötig, so dass bei dieser Methode Modellstoffe oder gelabelte Arzneistoffe verwendet werden müssen. Damit die Modellsubstanz den bestmöglichen Vergleich mit dem Arzneistoff zulässt, sollten neben der Cholestansonde spingelabelte GC eingesetzt werden.

Wegen des epidermalen Targetingeffekts von mit PC beladenen SLN (Maia et al., 2000; Sivaramakrishnan et al., 2004; Stecova et al., 2007) ist die Charakterisierung dieses Trägersystems von besonderem Interesse. Dies ist auch der Hauptgrund für die Verwendung der Cholestansonde als Modellstoff in dieser Arbeit, da dieses Molekül Strukturähnlichkeit zu den Steroiden aufweist und im Gegensatz zu spingelabelten GC kommerziell verfügbar ist. Die ESR erlaubt eine deutlich genauere Lokalisierung des Modellstoffs als die PS und kann eine Aussage über die Viskosität der Umgebung des Modellstoffs treffen. Darüber hinaus kann mit Hilfe der Ascorbinsäurereduktionskinetik geklärt werden, ob sich der Modellstoff auf der Oberfläche des Trägers oder im Kern befindet (Jores et al., 2004; Pegi et al., 2003). Mit ESR und PS gleichermaßen ist die Unterscheidung zwischen Anlagerung und Inkorporation an bzw. in die Partikel möglich. In welches Lipid bei Lipidmischungen die Anlagerung bzw. Inkorporation erfolgt ist, kann mit der PS jedoch nicht geklärt werden. Die Vorteile dieser Methode bestehen in der breiten Anwendbarkeit, da der genuine Arzneistoff vermessen werden kann und offenbar in der Vorhersagbarkeit des Targetingeffekts (Santos Maia et al., 2002; Sivaramakrishnan et al., 2004). Da die PS erst kürzlich in die Charakterisierung nanopartikulärer Trägersysteme eingeführt wurde, sollten die Ergebnisse durch die ESR-Spektroskopie verifiziert und erweitert werden.

Für die SLN Zubereitung wurde eine Assoziation des Arznei- bzw. Modellstoffs an die Partikeloberfläche gefunden. Im Fall der NE Zubereitung konnte mit Hilfe der Ascorbinsäurereduktionskinetik gezeigt werden, dass die Cholestansonde in den Miglyoltröpfchen eingeschlossen ist (*Abb. 38*). Die NLC verändern dagegen ihre Eigenschaften bezüglich der Reduzierbarkeit des Modellstoffs in Abhängigkeit von der

Miglyolkonzentration. Bei hohem Miglyolgehalt nähert sich die Reduktionskinetik der NLC an die der NE an (*Abb. 38*). Dieser Befund bestätigt die durch die PS erhaltenen Ergebnisse. Mit abnehmender Miglyolkonzentration nähert sich das Verhalten immer mehr dem der SLN an. Wird ein hydrophiles Spinlabel wie Tempol verwendet, ist dies der Ascorbinsäure frei zugänglich (Jores et al., 2004).

Mit Hilfe der TEM konnte gezeigt werden, dass es sich bei den NE Zubereitungen um kugelförmige Tröpfchen handelt, während SLN eine plättchenartige Struktur aufweisen (*Abb. 32*). Die NLC ähneln in ihrer Struktur den plättchenförmigen SLN, jedoch ist an ihre Oberfläche das flüssige Lipid assoziiert. Diese Ergebnisse stimmen bezüglich der Struktur von SLN und NLC mit bereits publizierten Daten überein (Jores et al., 2004; Pegi et al., 2003). Es ist jedoch keinesfalls auszuschließen, dass bei anderen Zubereitungen, d.h. anderen Lipiden und Tensiden oder Variationen im Herstellungsverfahren, nicht plättchenförmige Partikel entstehen können. Diese Struktur ist für SLN und NLC ebenfalls in der Literatur beschrieben.

Anhand der in dieser Arbeit gewonnen Daten konnten für die drei untersuchten Trägersysteme NE, SLN und NLC die folgenden Modellvorstellungen entwickelt werden. Bei der NE handelt es sich um eine Emulsion in der das flüssige Lipid in Form von kugelförmigen Tröpfchen vorliegt. SLN bilden genauso wie NLC eine Suspension, in der das feste Lipid plättchenförmige Partikel ausbildet. Das in den NLC zusätzlich enthaltene flüssige Lipid lagert sich an der Partikeloberfläche an (*Abb. 42*).



Abb. 42: Modellvorstellungen für NE, SLN und NLC

Die darüber hinaus mit Hilfe der ESR identifizierten zwei Subkompartimente der SLN Zubereitung (*Abb. 39*), können anhand der plättchenförmigen Struktur erklärt werden (*Abb. 43*) (Braem et al., 2007). Das Spinlabel kann entweder auf dem Rand oder auf der Partikelfläche sitzen (*Abb. 40*).

Ob bzw. in welcher Art die Unterschiede in der Partikelform und der Wirkstoff-Träger Interaktion die Haut-Träger bzw. Haut-Wirkstoff Interaktion und somit die Arzneistofffreisetzung und Penetration des Arzneistoffs in die Haut maßgeblich beeinflussen, bleibt weiteren Untersuchungen vorbehalten.

Gleiches gilt für die Charakterisierung der mit spingelabelten GC beladenen Trägersysteme. Das ESR-Signal des spingelabelten Arzneistoffs wurde durch ein Störsignal überlagert. Dieses Signal ist auf eine Verunreinigung der Probe durch freies Spinlabel zurückzuführen, die Reinheit der erhaltenen Produkte bei der Synthese ist nicht ausreichend. Die auf der Oberfläche der SLN als Aggregate vorliegenden gelabelten Arzneistoffmoleküle führen zu einem kleineren ESR – Signal als die Reste hydrophilen Labels in der wässrigen Lösung. Daher überdecken schon kleinste Konzentrationen das Signal der gelabelten Arzneistoffmoleküle (*Abb. 41 A*). In einem nachfolgenden Dissertationsvorhaben konnte dieses Problem inzwischen gelöst werden.

4.4 Ausblick

Die Ergebnisse des Proliferationsassays konnten nicht mit den Daten der Rezeptorbindungsstudien korreliert werden. Als Messgröße für das Risiko könnte statt der Proliferationshemmung die Suppression der Kollagensynthese des Typs I bestimmt werden, um eventuell eine entsprechende Korrelation erstellen zu können. Dazu bietet sich die Bestimmung der mRNA des Prokollagens vom Typ I an. Dieses Vorgehen erscheint nach jetzigem Kenntnisstand zweckmäßiger, da dieser Mechanismus ausschließlich rezeptorabhängig verlaufen soll (Cutroneo, 2003) und somit die Korrelation mit der Rezeptorbindung möglich sein sollte. Vor allem aber sollte dieser Effekt enger mit der unerwünschten Wirkung Hautatrophie assoziiert sein. In Analogie zu den SERMs könnte durch die verschiedenen GC und nichtsteroidale SEGRAs als Rezeptorliganden eine differenzierte Beeinflussung der Kofaktor-Rekrutierung und somit der Expression bestimmter Gene erfolgen und so eventuell stark wirksame Substanzen mit verbesserter Nutzen-Risiko-Relation identifiziert werden (Brazzini and Pimpinelli, 2002; Korting et al., 2002; Schacke et al., 2005; Schäfer-Korting et al., 1996). Die Identifizierung des S1P₃ – Rezeptor – Subtyps als Vermittler der antiapoptotischen Wirkung von GC als auch von FTY720P sollte durch weitere Untersuchungen der nachgeschalteten Signalkaskade definitiv belegt werden. Hierzu würde sich die Untersuchung der Phospho-Akt Bildung als auch die Messung des Mitochondrienmembranpotenzials anbieten (Kang et al., 2004; Sanchez and Hla, 2004).

Die Art der Assoziation des Wirkstoffs an seinen Träger ist für den Targetingeffekt von entscheidender Bedeutung. Durch die Kombination der PS, der ESR und der TEM zur Charakterisierung Nanopartikulärer Trägersysteme wurde das Verständnis der Wirkstoff-Träger-Interaktion wesentlich erweitert. Die mit der Cholestansonde durchgeführten Untersuchungen sollten und werden mit den spingelabelten GC ergänzt, damit eine möglichst realitätsnahe Modellvorstellung für die Wirkstoff-Träger Interaktion der genuinen GC entwickelt werden kann. Darüber hinaus wäre auch die Untersuchung des möglichen Einflusses unterschiedlicher Lipide auf die Partikelform im Fall der SLN von Interesse. Das Verständnis für die Beschaffenheit eines Nanopartikulären Trägersystems um einen Targetingeffekt zu erreichen, könnte auch bei der Therapie anderer topischer Erkrankungen, wie z.B. von Hauttumoren, eine wesentliche Rolle einnehmen.