

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

DISSERTATION

In vivo Studie zur Untersuchung des Einflusses von Nanokristallen
unterschiedlicher Größe auf die transkutane und transfollikuläre
Penetration von Koffein

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Petra Ruth Breuckmann
aus Heidelberg

Datum der Promotion: 03.03.2023

Inhalt

| | |
|---|-----------|
| Abstrakt | 3 |
| Abstract | 4 |
| 1. Einleitung | 5 |
| 1.1 Aufbau und Funktion der Haut | 6 |
| 1.2 Der Haarfollikel | 8 |
| 1.3 Transdermale Arzneimittelgabe/ Transdermal drug delivery (TDD): | 10 |
| 1.3.1 Nanopartikel | 12 |
| 1.3.2 Nanokristalle | 12 |
| 1.4 Bedeutung der Arbeit für das Fachgebiet / Zielsetzung | 13 |
| 2. Methodik | 14 |
| 2.1 Nanokristalle | 14 |
| 2.1.1 Material | 14 |
| 2.1.2 Herstellung | 14 |
| 2.1.3 Gefahrenpotential | 15 |
| 2.2 Studiendesign | 15 |
| 2.2.1 Ethikantrag | 15 |
| 2.2.2 Probanden | 15 |
| 2.2.3 Intervention | 16 |
| 2.2.4 Aufarbeitung der Blutproben / saure Extraktion des Koffeins | 17 |
| 2.2.5 Analyse des extrahierten Koffeins /Atmosphäre Pressure | 17 |
| Thermodesorption Surface Ionization Spectrometry (APTDSIS) | 17 |
| 2.2.6 Statistik | 18 |
| 3. Ergebnisse | 18 |
| 3.1 Herstellung und Charakterisierung der unterschiedlich großen Koffein-Nanokristalle | 18 |
| 3.2 Einfluss der Nanokristallgröße auf die perkutanen Aufnahme von Koffein – In-vivo-Studie . | 18 |
| 4. Diskussion | 21 |
| 5. Relevanz für die klinische Anwendung und weiterführende wissenschaftliche Fragestellungen | 25 |
| 6. Literatur | 28 |
| 7. Eidesstattliche Versicherung und ausführliche Anteilserklärung | 33 |
| 8. Auszug aus der "Journal Summary List" | 35 |
| 9. Druckexemplar der ausgewählten Publikation | 37 |
| 10. Lebenslauf | 46 |
| 11. Komplette Publikationsliste | 47 |
| 12. Danksagung | 48 |

Abstrakt:

Aufgrund der sehr effektiven Barriereigenschaften der menschlichen Haut spielte die transdermale Penetration von Wirkstoffen lange Zeit nur eine geringe Rolle. Das Überwinden der Hautbarriere stellt auch weiterhin eine Herausforderung dar. In den vergangenen Jahren wurden unterschiedlichste Vehikel für den dermatopharmazeutischen Einsatz entwickelt, um die Bioverfügbarkeit von topisch angewendeten Produkten zu erhöhen. Der Einsatz von partikulären Substanzen war dabei nur mäßig erfolgreich, da es ihnen aufgrund ihrer Größe nicht möglich ist, die gesunde Hautbarriere zu überwinden. Allerdings können sie besonders effektiv und tief in den Haarfollikel hinein penetrieren.

Dieser Effekt kann genutzt werden, um Wirkstoffe in nanopartikulärer Form in den Haarfollikel zu transportieren, damit dieser dann dort freigesetzt und unabhängig die Hautbarriere überwinden und bioverfügbar werden kann.

Basierend auf dem jüngsten Forschungsstand ergab sich die aktuelle Fragestellung, ob durch den topischen Einsatz von Koffein-Nanokristallen die Bioverfügbarkeit von Koffein im Vergleich zur topischen Applikation einer Koffeinlösung erhöht werden kann und welchen Einfluss verschiedene Nanokristallgrößen auf den zeitlichen Verlauf der Bioverfügbarkeit haben.

Methoden: In der vorliegenden Proof-of-Concept-Studie wurde dieser Effekt im Rahmen einer in vivo Penetrationsstudie mittels Koffein-Nanokristallen unterschiedlicher Größen (206 nm und 694 nm), jedoch gleicher Koffeinmenge an sechs männlichen Probanden untersucht.

Die Studie zeigte, dass die kleineren Nanokristalle die Bioverfügbarkeit von Koffein zu einem frühen Zeitpunkt effektiver erhöhen, während die Serumkonzentration von Koffein nach 20 Minuten höher war, wenn Koffein mit Hilfe der größeren Nanokristallen aufgetragen wurde. Koffein war in beiden Anwendungen auch noch am 5. Tag im Serum nachweisbar. Die Fläche unter der Kurve war jedoch um 82% größer, wenn die 694 nm Nanokristalle aufgetragen wurden.

Die größeren Nanokristalle stellen damit einen vielversprechenden Ansatz dar, die Bioverfügbarkeit topisch applizierter Wirkstoffe über den transfollikulären Penetrationsweg zu erhöhen und die Depoteigenschaft des Follikels optimal zu nutzen.

Abstract:

Because of the very effective barrier properties of human skin, the transdermal penetration of active ingredients played only a minor therapeutic role for a long time. Overcoming the skin barrier continues to be a challenge in dermatology. In recent years, a wide variety of vehicles for dermatopharmaceutical use have been developed in order to increase the bioavailability of topically applied products. The use of particulate substances was only moderately successful because, due to their size, they are not able to pass through the intact skin barrier. However, they can penetrate particularly effectively and deeply into the hair follicle. This effect can be used to transport active ingredients in nanoparticulate form into the hair follicle so that it can then be released there and independently cross the skin barrier and become bioavailable. Based on the latest research, the current question arose whether the topical use of caffeine nanocrystals can increase the bioavailability of caffeine compared to the topical application of a caffeine solution, and what influence different nanocrystal sizes may have on the temporal course of the bioavailability of caffeine. **Methods:** In the present proof of concept study, this effect was investigated in an in vivo penetration study in six male test subjects using caffeine nanocrystals of different sizes (206 nm and 694 nm) while keeping the amount of caffeine unchanged.

The study showed that the smaller nanocrystals were more effective in increasing the bioavailability of caffeine at an early stage, while the serum concentration of caffeine was higher after 20 minutes when caffeine was applied using the larger nanocrystals. In both applications, caffeine was still detectable in the serum on the 5th day. The area under the curve was 82% larger when the 694nm nanocrystals were applied. The larger sized nanocrystals showed an increased bioavailability via the transfollicular penetration route in comparison to other topically applied formulations.

1. Einleitung

Die Haut stellt mit ca. 2 m² das größte Organ des menschlichen Körpers dar [1]. Eine der wichtigsten Funktionen der Haut ist die Barrierefunktion, die einerseits bewirkt, dass Fremdstoffe nicht in den Organismus gelangen und andererseits hilft, den Wärme- und Wasserhaushalt zu regulieren. Die Haut ist in mehreren Schichten aufgebaut. Die Hautanhangsgebilde, die Haarfollikel und Schweißdrüsen, stellen dabei eine natürliche dreidimensionale Fortsetzung der Hautoberfläche dar. In Ihrer Summe, mit ihren ca. 2-5 Millionen Hautanhangsgebilden [2] vergrößern sie die Oberfläche auf ca. 25 m² [3].

Haarfollikel, regional jeweils in unterschiedlicher Größe und Dichte, finden sich nahezu in allen Körperregionen (Ausnahmen bilden nur die Lippen, Handflächen, Fußsohlen, Brustwarzen und Schleimhäuten). Lange Zeit wurde dem Haarfollikel, der an sich bereits ein komplexes Organ darstellt, als potenzieller Zugangsweg in den Organismus und als therapeutische Zielregion wenig Beachtung geschenkt. Dabei bietet der Haarfollikel durch die Einstülpung der Epidermis eine Vergrößerung der Haut- und damit Resorptionsoberfläche [3]. Darüber hinaus weist der Haarfollikel mit zunehmender Follikeltiefe eine reduzierte Barriereeigenschaft auf. Das bedeutet, dass Wirkstoffe, die tief genug in den Haarfollikel eindringen können, einfacher in das lebende Gewebe übertreten und bioverfügbar werden können [4]. Verschiedene Studien konnten zeigen, dass es in Hautregionen mit höherer Follikeldichte zu einer erhöhten Wirkstoffaufnahme kommt, während haarlose Mäuse kaum Wirkstoff über die Haut aufnahmen [5]. Besonders eindrücklich konnte der Beitrag der Haarfollikel an der Absorption von topisch appliziertem Koffein in der in vivo Studie von Otberg et al. gezeigt werden [6]. Waren die Haarfollikel im Applikationsareal künstlich mittels einer Lack-Wachsmischung verschlossen, konnte das Koffein, welches in Lösung topisch aufgetragen wurde, erst nach 20 Minuten im Serum von den Probanden nachgewiesen werden. Bei offenen Follikeln erfolgte der Nachweis dagegen bereits nach 5 Minuten [6]. Der transfollikuläre Penetrationsweg für topische Substanzen geriet damit in den Fokus des Interesses. Es wurde klar, dass man den Haarfollikel nutzen kann, um topisch applizierte Substanzen bioverfügbar zu machen. Dies war von besonderem Interesse, da die Bioverfügbarkeit von topisch applizierten Substanzen meist unterhalb von 1% liegt [7]. Weitere Studien konnten zeigen, dass man die follikuläre Penetration deutlich verbessern kann, wenn man partikuläre Substanzen nutzt [8]. Verschiedene Studien haben gezeigt, dass partikuläre Substanzen besonders tief und effektiv in den Haarfollikel hineinpenetrieren können und dass durch die Auswahl der Größe die Penetrationstiefe gesteuert werden kann [8,9].

Die Weiterentwicklung von Nanopartikeln während der letzten Jahre führte zu Produkten mit dem Ziel des maximalen Wirkstofftransports. Mittels der kontinuierlichen Zerkleinerung von Molekülen konnten Nanokristalle aus 100% Substanz hergestellt werden [10,11]. Nicht nur die Steigerung der Substanzmenge, sondern auch die veränderten Eigenschaften bei der Nanomisierung brachten weitere Vorteile [10,11]. Je kleiner die Partikel wurden, umso größer wurde ihre Oberfläche und umso höher wurde ihre Löslichkeit und ihre Auflösungsgeschwindigkeit. Dies definiert die Noyes–Whitney Gleichung, näher erläutert in Kapitel 1.3.2. Die Herstellung solcher Nanokristalle ist vor allem für

mäßig bis schlecht wasserlösliche Substanzen ein optimaler Ansatz. Hierzu zählen Wirkstoffe der BCS-Klasse II und IV, einem biopharmazeutischen Klassifizierungssystem, welches Medikamente hinsichtlich ihrer zu erwartenden Bioverfügbarkeit einteilt [12].

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, zwei größendifferente Koffein-Nanokristalle (206 nm und 694 nm) hinsichtlich ihrer in vivo Absorptionskinetik und Bioverfügbarkeit zu untersuchen.

Es wurde die Hypothese formuliert, dass die größeren Nanokristalle tiefer in den Haarfollikel hinein penetrieren und damit in Bereiche des Haarfollikels gelangen, die eine geringere Barrierefunktion aufweisen. Dies soll zu einer höheren kumulativen Gesamtdosis von bioaktiv nachweisbarem Koffein im Blutserum führen.

1.1 Aufbau und Funktion der Haut

Die Haut (altgriechisch δέρμα *dérma*, lateinisch *cutis*; das altgermanische Wort *hūt*=Haut/ Integument kommt etymologisch von umhüllen, bedecken) ist das offensichtlichste Organ des Menschen [13]. Sie bildet die Grenze zwischen Innen und Außen. Sie schützt, versorgt, informiert und reguliert den Körper in vielerlei Hinsicht. Durch ihren einzigartigen Aufbau schützt sie vor mechanischen Verletzungen, vor UV-Strahlen, vor Bakterien, Viren, Parasiten, anderen Noxen und Umwelteinflüssen. Ferner verfügt sie über Abwehr- und Anpassungsmechanismen und dient der Wärmeregulierung und der Wahrnehmung von Schmerz, Temperatur, Druck und Vibration sowie durch die Durchblutung auch der Kommunikation (man wird bleich vor Schreck oder rot vor Aufregung) [14]. Die äußere Hautschicht, das Stratum corneum, besteht aus mehreren Lagen entdifferenziert ausgereifter epidermaler Keratinozyten, den Korneozyten, die von einer Lipidschicht umschlossen sind [14]. Das Stratum corneum misst nur 10-20 µm und ist die am wenigsten durchlässige Hautschicht im epidermalen Differenzierungsprozess. Diese als „Ziegelstein-Mörtel-Modell“ vereinfachte dargestellte Schicht inklusive des dazugehörigen Mikrobioms spielt eine wichtige Rolle in der Abwehr von Mikroorganismen und verhindert den Wasser- und Elektrolytverlust [3]. Darunter schließen sich direkt das Stratum granulosum, das Stratum spinosum und das Stratum basale als Teile der lebenden Epidermis an [15].

Darauf folgt die Dermis mit dem Stratum papillare und Stratum reticulare. Epidermis und Dermis bilden zusammen die Kutis. Unterhalb der Kutis folgt das Fettgewebe (Abbildung 1) [15].

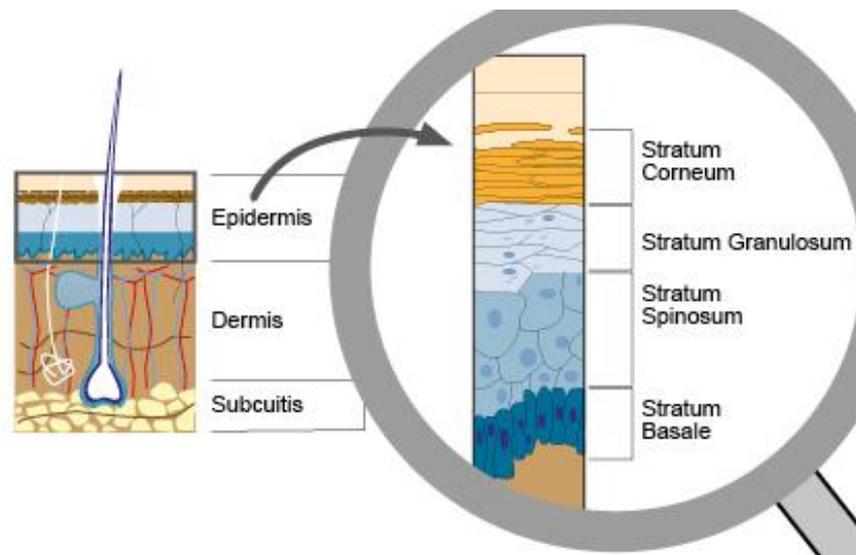


Abbildung 1. Aufbau der Haut

[in Anlehnung an Plewig G, Braun-Falco`s Dermatologie, Venerologie und Allergologie, 6.Aufl., S. 4]

Jede dieser Schichten besteht durch Besonderheiten und übernimmt Teile der Hautfunktion. So finden sich zum Beispiel antioxidativ aktive Zellen oder Immunzellen vor allem in der Epidermis, Pigmentzellen, die Melanozyten im Stratum basale oder elastische und kollagene Fasern im Stratum reticulare [16]. Hautanhangsgebilde wie die Haarfollikel mit den dazugehörigen Talgdrüsen und die ekkrinen und apokrinen Schweißdrüsen durchziehen die Haut. Mit dem Haarfollikel assoziiert ist ferner der das Haar aufrichtende Haarbalgmuskel, der *Musculus arrector pili* [17]. Störungen der Hautintegrität führen meist direkt zu sichtbaren Veränderungen und der Mensch fühlt sich nicht mehr wohl „in seiner Haut“. Denn die Haut ist nicht nur von physischer Bedeutung, sondern ist auch für die emotional psychologische Verfassung des Individuums enorm wichtig. Haare spielen hierbei ebenso eine wichtige Rolle. Sie schützen als Kopfhaar oder als Augenbraue vor UV-Strahlen. Wimpern verhindern, dass Fremdkörper oder Schweißtropfen in das Auge gelangen. Zu wenig als auch zu viele Haare, z.B. an unpassenden Körperarealen, können emotional sehr belastend sein und treiben die Forschungsbestrebungen der kosmetischen und pharmazeutischen Industrie an [17]. Die Haut ist jedoch keine unüberwindbare Grenze oder gar eine Einbahnstraße. Soll eine Substanz transkutan in den Körper eingebracht werden, so stehen prinzipiell drei Penetrationswege zur Verfügung: der interzelluläre, der transzelluläre oder der follikuläre Weg (Abbildung 2) [18].

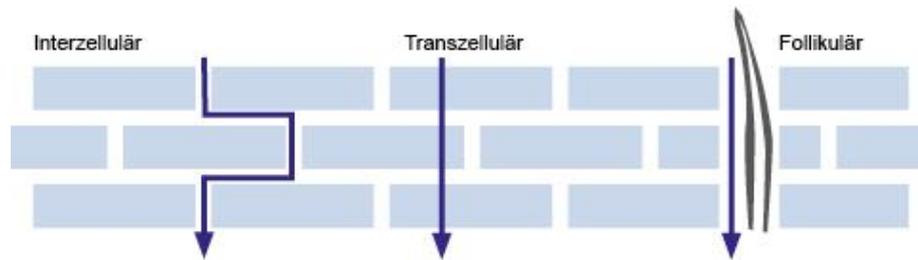


Abbildung 2. Transkutane Penetrationswege [eigene Darstellung]

Wobei beim follikulären Weg unterschieden werden muss, ob eine Substanz nur in den Haarfollikel hinein penetriert oder ob auch ein transfollikulärer Übergang in das lebende Gewebe möglich ist. Die drei Penetrationswege können simultan genutzt werden. Es hängt jedoch stark von den pharmakologischen Eigenschaften der Substanz selbst ab, welcher Penetrationsweg im speziellen hauptsächlich genutzt wird [18].

1.2 Der Haarfollikel

Nachdem in der Vergangenheit dem Haarfollikel als Penetrationsweg wenig Bedeutung beigemessen wurde, entwickelte sich in den letzten 20 Jahren ein eigenes Forschungsfeld rund um den Haarfollikel [4,5,6,8]. Für den transfollikulären Penetrationsweg sind chemische oder physikalische Vorbehandlungen der Haut nicht unbedingt notwendig, da sich der Haarfollikel förmlich als natürliche Lücke in die tieferen Schichten der Haut fügt. Es wird, wie oben bereits erwähnt, prinzipiell unterschieden, ob ein Wirkstoff direkt im Haarfollikel eine Zielstruktur erreichen soll, wie z.B. die Talgdrüse oder ob der Wirkstoff transfollikulär in das perifollikuläre Gewebe übertreten soll und dann z.B. im Serum nachweisbar wird.

Der Haarfollikel ist besonders im oberen Infundibulumbereich von zahlreichen Blutgefäßen und Immunzellen (Makrophagen, T-Zellen, Mastzellen und dendritischen Zellen) umgeben [17]. In der Wulstregion des Haarfollikels befinden sich epitheliale multipotente Stammzellen [17,19]. Dies macht den Haarfollikel zu einem therapeutischen Ziel von besonderem Interesse. Topisch applizierte Substanzen finden einen schnellen Zugang zum systemischen Kreislauf und zu immunologischen Antworten.

Die Haarfollikelanatomie begünstigt ferner die Depotbildung besonders von partikulären Substanzen, die bis zu 10 Tage im Haarfollikel gespeichert werden können [20]. Anders als auf der Hautoberfläche sind Substanzen, die in den Follikel eindringen, geschützt vor Umwelteinflüssen und dem Alltagsstress der Haut (Reibung, Kleidung, Wasserkontakt, kosmetischen Produkten, Schwitzen, UV-Strahlung). Nur langsame Prozesse wie Haarwachstum und Sebumfluss können zu einer Entleerung des Reservoirs führen, da im Falle der verwendeten Partikel eine transfollikuläre Penetration aufgrund der Substanzgröße ausgeschlossen ist [20,21]. Partikuläre Substanzen, die besonders tief in den Follikel eindringen können, haben außerdem eine größere Kontaktfläche zur Haut

und erreichen auch Teile des Haarfollikels, in denen die Barriereigenschaften weniger ausgeprägt sind. Während im oberen Bereich des Haarfollikels die Kontaktfläche als Invagination der Epidermis gesehen werden muss, wird die Barrierefunktion des Haarfollikels im unteren Bereich hauptsächlich durch sogenannte „tight junctions“ aufrechterhalten [22]. Der Haarbulbus weist dagegen keine Barriere mehr auf [22].

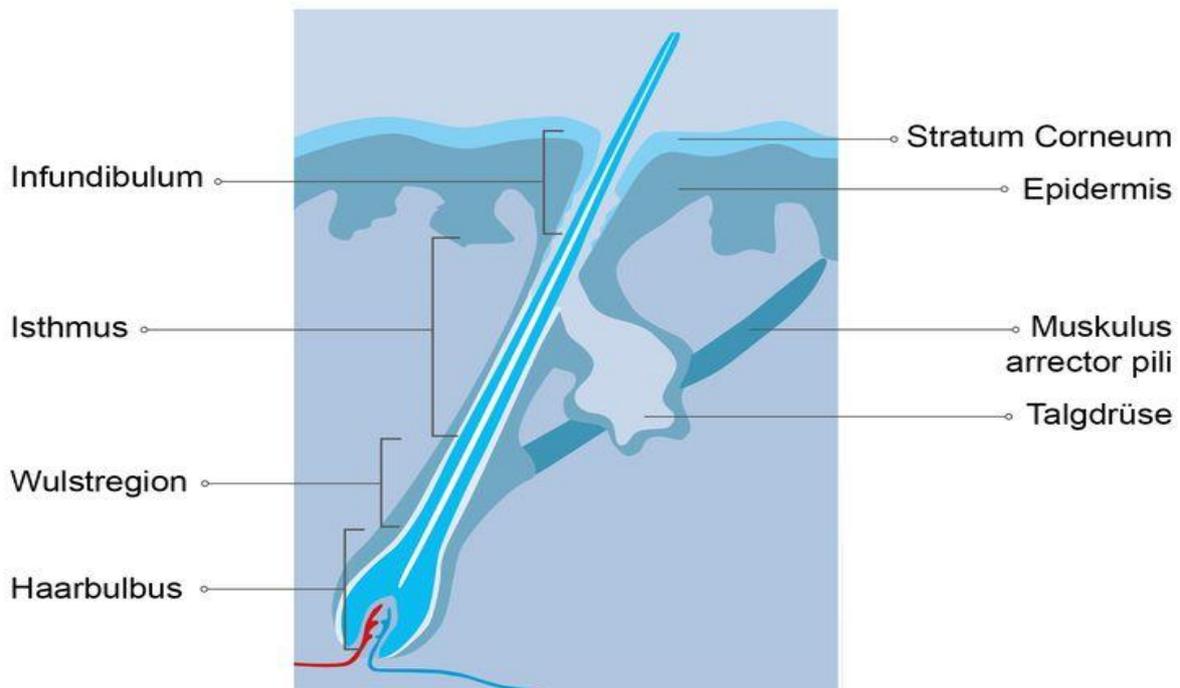


Abbildung 3. Aufbau des Haarfollikels

[in Anlehnung an Plewig G, Braun-Falco`s Dermatologie, Venerologie und Allergologie, 6.Aufl., S. 1244]

Das trichterförmig erweiterte Infundibulum reicht von der Haarfollikelöffnung bis zum Eingang der Talgdrüse, sein Epithel ist dünner ausgebildet als das der Oberflächenepidermis [23].

Der Bereich von der Mündung des Talgdrüsenausganges bis zum Ansatzpunkt des Muskulus arrector pili wird Isthmus genannt. Insertionsstelle des M. arrector pili ist die Wulstregion, dieser konstante Bereich grenzt an den variablen Anteil des Haarfollikels an, welcher dem Haarwachstumszyklus unterworfen ist (Abbildung 3) [17]. Insgesamt wurden vier Bereiche des Haarfollikels als solche mit besonderer therapeutischer Relevanz identifiziert: die Talgdrüse, die Wulstregion, das Infundibulum und die Haarmatrixzellen [24]. Um die einzelnen Zielbereiche im Haarfollikel erreichen zu können, spielt die optimale Größe der partikulären Substanzen eine übergeordnete Rolle [18,25]. In einigen in vitro Untersuchungen konnte bereits festgestellt werden, dass die ideale Partikelgröße zwischen 450- 700 nm liegt. Nanocarrier dieser Größe drangen signifikant tiefer in den Haarfollikel ein als kleinere, größere oder auch nicht partikuläre Substanzen [8,9,26].

In einer weiteren Studie konnte gezeigt werden, dass sich die folliculäre Penetrationstiefe von partikulären Substanzen unter Massage signifikant erhöht. Dies wurde am Modell einer Ratsche oder eines Zahnrades erklärt [27]. Durch die Bewegung des Haares im Haarfollikel werden die Partikel systematisch in die Tiefe transportiert, da das Haar keine glatte Oberfläche, sondern dachziegelartig überlappende Cuticulazellen besitzt. Da die Dicke der Cuticulazellen ca. 530 nm beträgt funktioniert dieser Transport am besten, wenn die Größe der Partikel ebenfalls in dieser Größenordnung liegt [27].

1.3 Transdermale Arzneimittelgabe/ Transdermal drug delivery (TDD)

Die Vorteile der topischen Arzneimittelgabe liegen auf der Hand und sind unbestritten. Es können sogenannte First Pass Effekte, gastrointestinale Nebenwirkungen, Metabolisationen und enzymatischer Abbau vermieden werden [28]. Sollen nur selektive Hautareale behandelt werden, lässt sich der Wirkstoff topisch besser dosieren, es können Ressourcen gespart werden. Die Anwendung wird insgesamt kostengünstiger. Durch die Langzeitspeicherung im Haarfollikel sind ggf. weniger Applikationen notwendig, damit kann die Compliance der Patienten erhöht werden (Abbildung 4). Insgesamt sind weniger Nebenwirkungen als bei oraler, parenteraler oder auch subkutaner Darreichung zu erwarten.

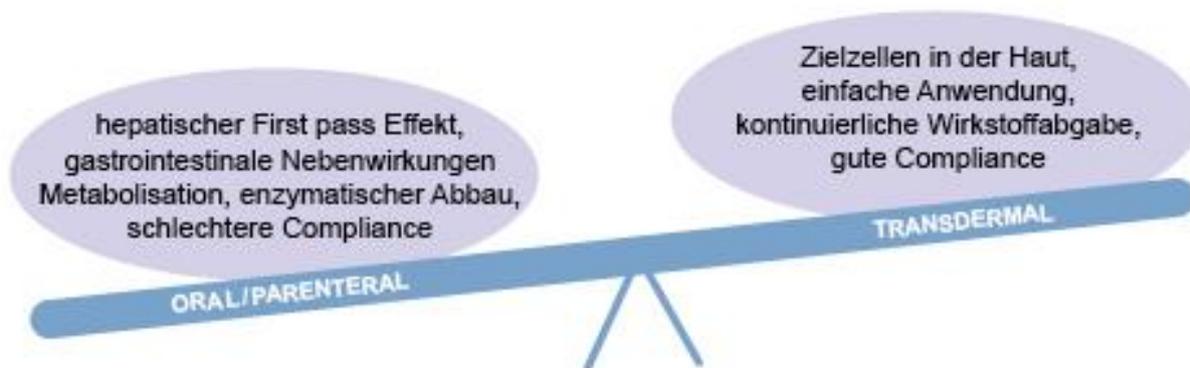


Abbildung 4. oral/parenterale versus transdermale Wirkstoffabgabe [eigene Darstellung]

Seit Jahrzehnten wird an Formulierungen zur Optimierung der topischen Applikation gearbeitet (z.B. an Pflaster, Salben und Cremes), die beispielsweise die Permeabilität der Haut verbessern sollen. Dies gelang vor allem für lipophile Arzneimittel mit niedrigem Molekulargewicht, die bei niedrigen Dosierungen wirksam sind [29].

Die Bioverfügbarkeit von den meisten topisch applizierten Substanzen ist jedoch oft sehr gering und häufig nicht höher als 1-2% der applizierten Dosis [7].

Von der FDA wurde 1979 das erste transdermal verabreichte Medikament, ein Scopolamin-Pflaster gegen Reisekrankheit (Transderm Scop®) zugelassen. Seitdem wurden einige andere Substanzen wie Nikotin, Östradiol und Testosteron, Insulin, Nitrate, Fentanyl und Lidocain sowie Kombinationspflaster mit mehr als einem Arzneimittel zur Empfängnisverhütung und zum Hormonersatz erfolgreich in TDD-Systemen (Transdermal drug delivery) formuliert [29,30,31].

Die Verbesserung der Hautpenetration von größeren, hydrophilen Arzneimitteln und schlecht löslichen Makromolekülen zur Behandlung von Krankheiten mittels chemischer Vorbehandlungen der Haut oder physikalischer Barriereunterbrechungen (z.B. durch Mikroneedling, Mikrojets, Laser, Ultraschall, Iontophoresebehandlung oder Abrieb) ist Thema aktueller Forschung [9,12,26].

Es wurden Nanoträger aus Lipiden, Metallen oder Polymeren entwickelt, um eine verbesserte Aufnahme in die Haut zu ermöglichen [32]. Problematisch war bislang, dass diese partikulären Substanzen aufgrund ihrer Größe meist weder das intakte Stratum corneum noch den folliculären Zugangsweg nutzen konnten und der gewünschte Effekt der erhöhten Wirkstoffaufnahme mehr oder weniger ausblieb. Nur durch künstlich zugefügte Hautbarriere-Störungen war in den meisten Studien eine verstärkte Hautpenetration beobachtet worden [33].

Neueste Studien der Arbeitsgruppe von Lademann et al. verfolgten den Ansatz, Wirkstoffe mittels Nanotransporter effektiv und tief in den Haarfollikel zu transportieren, um dort durch endogene (z.B. pH) oder exogene (z.B. Infrarotlicht) Trigger eine Freisetzung des Wirkstoffes zu erreichen, der dann transfollikulär in das lebende Gewebe penetrieren kann [34,35].

Mikronadeln und thermische Ablation durchlaufen derzeit klinische Studien zur Verabreichung von Makromolekülen und Impfstoffen wie Insulin, Parathormon und Grippeimpfstoff [36]. Die Verabreichung von Impfstoffen über die Haut ist besonders attraktiv, da sie auf die epidermalen Langerhanszellen und dermalen dendritischen Zellen abzielt, die bei viel niedrigeren Dosen als bei tieferen Injektionen eine starke Immunantwort hervorrufen können [37,38].

Der erfolgreichste Impfstoff aller Zeiten, der Pockenimpfstoff, der die Krankheit weltweit ausrottete, wurde mit Hilfe einer Bifurkationsnadel oder Impfpistole über die Haut verabreicht, um das Stratum corneum zu durchbrechen [39]. Folge war jedoch immer eine unschöne Narbe.

Nach heutigem Stand der Wissenschaft geht man davon aus, dass Partikel >40 nm die intakte Hautbarriere nicht überwinden können, sondern im Follikel oder in den Hautanhangsgebilden gespeichert werden [20,21,26].

Oberstes dermatopharmazeutisches Ziel ist es daher weiterhin, Formulierungen zu entwickeln, um die Hautbarriere zu überwinden, jedoch ohne sie nachhaltig zu stören, was besonders bei vorerkrankter Haut von hohem Interesse ist.

Verschiedene Studien lassen vermuten, dass vor allem der transfollikuläre Zugangsweg für eine partikuläre Abgabe eines Wirkstoffes geeignet ist [9,20,21].

1.3.1 Nanopartikel

Der Vortrag „There's plenty of room at the bottom“ („Nach unten ist eine Menge Platz“) wurde vom US-amerikanischen Physiker und späteren Nobelpreisträger Richard Feynman am 29. Dezember 1959 im Institute of Technology in Kalifornien gehalten [40]. Er beschrieb den Prozess der Kontrollierbarkeit von Atomen und Molekülen. Die Nanotechnologie wurde allerdings erst in den 1980´er Jahren mit der Weiterentwicklung der entsprechenden Technik vorangetrieben.

Aus den neuen Möglichkeiten der Nanomisierung folgte die Frage nach möglichen Anwendungsfeldern und das nicht nur im medizinischen oder pharmakologischen Bereich. Bei der heutigen Nanotechnologie handelt es sich nicht selten um Schlüsseltechnologien, manche beschreiben sie als wichtigste Errungenschaft unserer Zeit. Superlative wie langlebiger, widerstandsfähiger, energieeffizienter, innovativer, umweltfreundlicher, wirkungsvoller und effektiver werden häufig in ihrem Zusammenhang verwendet [41]. Nanopartikelartige Medikamente sollen zielgenau ihre Wirkung ohne belastende oder gefährliche Nebenwirkungen ausüben. Sie sollen z.B. die Bluthirnschranke überwinden, Krebszellen detektieren und sogar in Krebszellen eindringen. In der Dermatologie und auf dem Kosmetikmarkt werden Nanopartikel schon seit längerem, z.B. in Wundauflagen oder in Sonnenschutzmitteln eingesetzt [41,42]. Neuentwicklungen bei topischen Pharmaka bleiben jedoch aufgrund der Hautbarriere eine Herausforderung. Prinzipiell ermöglichen Nanotransporter es, besonders große Wirkstoffmengen zu transportieren und auch schwer lösliche Stoffe wie Peptide und Proteine mit schlechter Löslichkeit zu verkapseln.

1.3.2 Nanokristalle

Nanotransporter mit der höchstmöglichen Wirkstoffbeladung stellen Nanokristalle dar, da sie aus 100% Wirkstoff bestehen [10,11,46]. Nanokristalle sind partikuläre Strukturen, die durch Top-down- oder Bottom-up-Ansätze vollständig aus Wirkstoffpartikeln bestehen. Bei der Top-down Methode wird Ausgangsmaterial kontinuierlich zerkleinert, von groß nach klein; bei der Bottom-up Methode erfolgt das Gegenteil, Nanoteile werden zusammengesetzt. Die so entstandenen Nanokristalle werden mit Stabilisatoren dispergiert und stabilisiert, um ihre Aggregation zu verhindern. Dies können üblicherweise ionische, nichtionische und polymere Stabilisatoren sein [10]. Oral sind bereits Produkte auf Nanokristallbasis auf dem Markt, ihre Verwendung zur topischen Anwendung ist jedoch neu [10].

Die Umwandlung einer Substanz von der normalen Partikelgröße (μm -Bereich) in die Nanodimension verändert seine physikalischen und chemischen Eigenschaften. So bestehen Nanokristalle nicht nur aus 100% Wirkstoff, sondern verändern durch die Nanomisierung ihre Eigenschaften. Je kleiner die Kristalle sind, umso größer wird ihre Oberfläche. Je größer die Oberfläche ist, umso höher wird die Sättigungslöslichkeit (c_s) und umso schneller erfolgt die Freisetzung des Wirkstoffs [44]. Die Effekte der höheren Löslichkeit und höheren Bioverfügbarkeit bei Abnahme der Nanokristallgröße können durch die Noyes-Whitney Gleichung erklärt werden.

Gleichung 1: Die Noyes-Whitney Gleichung beschreibt die diffusionsbedingte Auflösungsgeschwindigkeit von Arzneistoffpartikeln aus der Arzneiform [45,46].

$$\frac{dm}{dt} = \frac{A \cdot D(c_s - c_t)}{x}$$

m= Masse der in Lösung gehenden Substanz (kg); *t*= Zeit (s); *A*= Grenzfläche zwischen zu lösenden Substanzen und Lösungsmittel (m²); *D*= Diffusionskoeffizient (m²/s); *C_s*= Sättigungskonzentration des Wirkstoffs (kg/m³); *c_t* = Konzentration zum Zeitpunkt *t* (kg/m³); *x* = Dicke der angenommenen Diffusionsschicht (m)

Die Diffusion des Wirkstoffs, welcher als Nanokristall gebunden ist, geschieht am Zielort, also zum Beispiel im Haarfollikel, in das lebende Gewebe durch die Änderung des Konzentrationsgradienten. Da man davon ausgeht, dass die Aufenthaltsdauer im Haarfollikel bis zu 10 Tage betragen kann, stellt der Haarfollikel ein besonders interessantes Reservoir für solche Wirkstoffformen dar [20,24,27]. Diese langsame Abgabe kann von Vorteil sein und einer nachhaltigen Versorgung mit dem Wirkstoff dienen.

1.4 Bedeutung der Arbeit für das Fachgebiet / Zielsetzung

Zielsetzung der vorliegenden Arbeit war es einerseits zu zeigen, dass die Bioverfügbarkeit von topisch appliziertem Koffein signifikant erhöht werden kann, wenn es in nanokristalliner Form appliziert wird. Weiterhin sollte gezeigt werden, dass größenoptimierte Koffein-Nanokristalle einen entscheidenden Einfluss auf die in vivo Absorptionseffektivität haben, durch die für größere Nanokristalle zu erwartende tiefere follikuläre Penetration und längere Speicherung.

Diese Arbeit ist von großer Bedeutung für das Fachgebiet, da zum ersten Mal in vivo der Einfluss von Nanokristallen auf die transfollikuläre Penetration von Koffein gezeigt werden konnte. Bisherige Studien zur transfollikulären Penetration fanden vor allem unter ex vivo Bedingungen statt und waren damit nur bedingt aussagekräftig. In der Studie von Otberg et al. konnte erstmals in vivo die schnelle Bioverfügbarkeit von einer nichtpartikulären Koffeinformulierung gezeigt werden, wenn der follikuläre Penetrationsweg zur Verfügung stand [6]. Die aktuelle Studie ist als direkte Anknüpfung an die Arbeit von Otberg et al. zu verstehen, die zeigen soll, dass die Bioverfügbarkeit durch den Einsatz von Nanokristallen signifikant erhöht werden kann [6].

In der aktuellen Studie erfolgt der Einsatz von Koffein in nanokristalliner Form als Modellwirkstoff. Prinzipiell ist jedoch die Herstellung auch anderer Wirkstoffe in nanokristalliner Form möglich. Damit eröffnet sich ein völlig neues Spektrum für topisch zu applizierende Wirkstoffe.

Folgende Hypothesen wurden im Rahmen der Arbeit formuliert:

1. Durch die topische Applikation von Koffein-Nanokristallen können höhere Koffeinsерumkonzentrationen erreicht werden als durch die topische Applikation einer Koffeinlösung.
2. Da von den größeren Koffein-Nanokristallen (ca. 700nm) eine tiefere folliculäre Penetration zu erwarten ist und damit eine längere Speicherung als von den kleineren Koffein-Nanokristallen (ca. 200nm), wird die Applikation der größeren Koffein-Nanokristalle zu einer über die Zeit kumulativ höheren Koffeinaufnahme führen.
3. Aufgrund ihrer größeren Gesamtoberfläche wird es nach Applikation der kleineren Koffein-Nanokristalle zu einem rascheren Anstieg der Koffeinsерumkonzentration kommen.

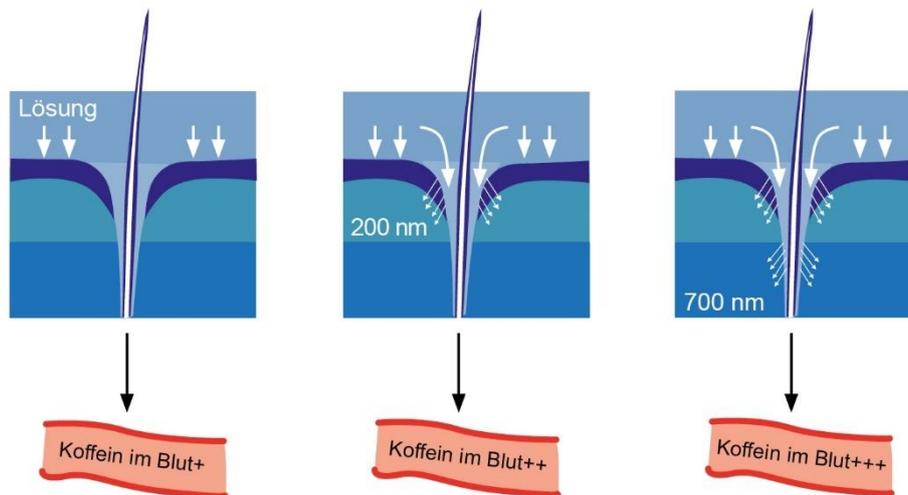


Abbildung 5. Grafische Darstellung der zu erwartenden Unterschiede (Hypothese 1 und 2 für Lösung / 200nm / 700nm) [eigene Darstellung]

2. Methodik

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden folgende Materialien und Methoden verwendet:

2.1 Nanokristalle

2.1.1 Material

Die Koffein-Nanosuspensionen bestanden aus 20% (w/w) Koffein (Sigma Aldrich, Deisenhofen, Deutschland), 2% Stabilisator (Carbopol® 981, Lubrizol Advanced Materials Europe BVBA, Brüssel, Belgien) und einem Dispersionsmedium aus 30% Ethanol und 70% Propylenglykol (beide bezogen von VWR International GmbH Darmstadt, Deutschland) auf bis zu 100% (w/w). Koffein und Carbopol® 981 entsprachen dem Standard der European Pharmacopoeia (Ph. Eur.). Die anderen Bestandteile waren von analytischer Qualität.

2.1.2 Herstellung

Die verwendeten Koffein-Nanokristalle wurden nach einem zuvor festgelegten Protokoll von der Alrise Biosystem GmbH, Berlin hergestellt, charakterisiert und zur Verfügung gestellt [11,46].

Es wurden Koffein-Nanokristallen unterschiedlicher Größen (206 nm und 694 nm), jedoch gleicher Koffeinmenge produziert.

2.1.3 Gefahrenpotential

Die Koffein-Nanokristallformulierungen waren für pharmazeutische und kosmetische Anwendungen zugelassen. Bei der topischen Anwendung der untersuchten Formulierungen waren außer dem allgemeinen Risiko einer Unverträglichkeitsreaktion bei bestehender Vorsensibilisierung gegen Bestandteile der Formulierung keine spezifischen Nachteile oder Risiken bekannt. Die Nanokristalle können aufgrund ihrer Größe nicht in den Blutkreislauf übergehen, solange es zu keiner Traumatisierung der Haut kommt.

Koffein ist das weltweit am häufigsten konsumierte Psychostimulans. Es findet sich von Natur aus in unterschiedlichen Mengen in Bohnen, Blättern und Früchten von über 60 Pflanzen [47]. Geröstete Kaffeebohnen und Teeblätter sind die Hauptquellen für Koffein in der Nahrung [47]. Koffein ist auch in Kolanüssen, Kakaobohnen, Yerba Mate und Guarana-Beeren enthalten. Koffein wird am häufigsten in Getränken wie Kaffee (71%), Erfrischungsgetränken (16%) und Tee (12%) aufgenommen [47]. In den letzten zwei Jahrzehnten wurden auch Getränke wie Energy Drinks, koffeinhaltige Sportgetränke, Säfte und Wässer damit angereichert. Darüber hinaus findet sich Koffein auch in Kakao, Schokolade und auch Medikamenten wie schmerzstillenden Formulierungen, Nahrungsergänzungsmitteln oder Shampoos [48]. Koffein hat im menschlichen Blut eine Halbwertszeit von 3,1–6,7 h [49]. Koffein konnte bereits in vielen Studien als Modellsubstanz sicher angewendet werden und wird darüber hinaus in den OECD-Leitlinien (Organisation für wirtschaftliche Zusammenarbeit und Entwicklung) für Hautpenetrationsstudien empfohlen [50].

2.2 Studiendesign

2.2.1 Ethikantrag

Nach Genehmigung durch die Ethikkommission konnte die Studie gemäß den Richtlinien der Deklaration von Helsinki (2004) und der ICH GCP-Guideline E6 durchgeführt werden. Die Studie unterlag nicht dem Arzneimittelrecht.

Die Freiwilligen wurden gebeten, Probleme sofort zu melden. Alle Probanden wurden über den Inhalt und Ablauf der Studie informiert. Die Teilnahme an der Studie konnte ohne negative Konsequenzen zu jedem Zeitpunkt abgebrochen werden. Die Probanden haben ihre Zustimmung schriftlich dokumentiert (via Aufklärungsbogen mit Unterschrift von Untersucher und Probanden).

2.2.2 Probanden

Es konnten 6 männliche Probanden in die klinische Studie aufgenommen werden. Folgende Einschlusskriterien mussten erfüllt sein: Hautgesunde männliche Personen gemäß Anamnese und medizinischer Standarduntersuchung; Alter: 20-60 Jahre; normaler BMI (Body Maß Index); Hauttyp II-

III; Haarfollikeldichte auf der Brust von mind. 22/cm²; eigenhändig unterzeichnete Einverständniserklärung der Probanden. Außerdem mussten die Probanden bereit sein, sich vollständig koffeinfrei über eine Vorbereitungs- und die Testphase zu ernähren. Ein erarbeitetes Merkblatt mit Hinweisen zu Vorsichtsmaßnahmen und in welchen Lebensmitteln sich versteckt Koffein befindet wurde ausgegeben. So war zum Beispiel auch entkoffeinierter Kaffee, schwarzer, grüner und weißer Tee, Teeprodukte aller Art, Schokolade, Energy-Drinks, andere koffeinhaltige Getränke mit Kohlensäure und auch koffeinhaltige Pflegeprodukte im Rahmen der Studie untersagt. Folgende Ausschlusskriterien durften nicht vorliegen: Personen mit bekannten Allergien und Pseudoallergien; Frauen; Kinder und Personen, die nicht eigenverantwortlich Entscheidungen treffen konnten.

2.2.3 Intervention

Vor Beginn der Testphase erfolgte für jeden Probanden eine klinische Beurteilung des Hautzustandes und die Follikeldichte der behaarten Brust wurde mittels Auflage einer Schablone ermittelt. Die männliche Brust wurde auch in der Studie von Otberg et al. [6] als Testareal ausgewählt. Nach erfolgreicher Eignung und ausführlicher Aufklärung mit schriftlicher Zustimmung zu der Studie mussten die Probanden vor dem ersten Testtag eine einwöchige koffeinfreie Diät einhalten. Auch während der gesamten Dauer des Experiments musste die strikte, koffeinfreie Diät fortgesetzt werden. Die Freiwilligen wurden gebeten 20 Minuten vor Versuchsbeginn das Testlabor zu betreten. Die Testbedingungen wurden bei einer Raumtemperatur von 22°C und einer Luftfeuchtigkeit von 50% konstant gehalten. Der Testbereich wurde mittels Schablone markiert und die Haare dort mit einer Nagelschere vorsichtig auf 2-5 mm gekürzt. Daraufhin wurden die Koffein-Nanokristalle (694nm) mit 2 mg/cm² auf dem 25 cm² großen Areal mittels Fingerlings aufgetragen und mit leichtem Druck und kreisförmigen Massagebewegungen in die Haut einmassiert. Die Bestimmung des Areals, die Applikation und vor allem auch die Massage wurden immer durch denselben Prüfarzt durchgeführt. Es erfolgte direkt vor Applikation des Testproduktes (Zeitpunkt 0) und nach 5, 20 und 60 Minuten sowie 8, 24, 72 und 120 Stunden eine Blutentnahme. Die Applikation der zweiten Koffein-Nanokristalle erfolgte im Abstand von 4 Wochen zur ersten Testreihe. Es handelte sich um dieselben Probanden, die nach Abschluss der ersten Testphase und erneuter einwöchiger koffeinfreier Diät mit dem Testprodukt 2 (204nm) nach gleichem Testprotokoll exponiert wurden. Hierdurch konnte der Einfluss möglicher interindividueller Einflussgrößen wie zum Beispiel das Alter der Probanden, Ernährungsgewohnheiten, Komorbiditäten, genetische Variabilität, Nikotinabusus, Körperfettanteil oder auch die habituell schnellere Verstoffwechslung durch hohen gewohnheitsmäßigen Koffeinkonsum vermindert werden. Aus den Blutproben wurde innerhalb von 24 h nach unten erläuterten Protokoll (Kapitel 2.2.4) das Koffein extrahiert und anschließend zur weiteren Analyse versendet.

2.2.4 Aufarbeitung der Blutproben / saure Extraktion des Koffeins

Die Extraktion des Koffeins erfolgte nach dem bereits etablierten Verfahren [6].

Die 5 ml Blutproben wurden 5 min bei 4000 Upm zentrifugiert (mit der Zentrifuge MR 812/Jouan, Saint-Herblain, Frankreich). Anschließend wurden 500 µl jeder Probe aus der Serumphase extrahiert und in ein Reagenzglas gegeben. Um eine Säureextraktion von Koffein durchzuführen [6], wurden 100 µl 0,01 mol Chlorwasserstoff (MERCK KGaA Darmstadt, Deutschland, 32% für Analysen) und 400 µl Dichlormethan (MERCK KGaA Darmstadt, Deutschland, für Spektroskopie Uvasol) hinzugegeben. Nach einminütigem Mischen (Vortex) erfolgte eine weitere Phasentrennung durch 5 Minuten Zentrifugation bei $12.800 \times g$ (Biofuge fresco/ Heraeus/Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). Danach setzte sich die Dichlormethanphase, die das extrahierte Koffein enthielt, am Boden ab. 200 µl dieser Dichlormethanphase wurden entnommen und in ein neues Analysenröhrchen gegeben. Diese Proben wurde dann zur weiteren Diagnostik versendet und mittels der Oberflächenionisations-Massenspektrometrie (Si/Ms) analysiert [51,52].

2.2.5 Analyse des extrahierten Koffeins /Atmosphere Pressure Thermodesorption Surface Ionization Spectrometry (APTDSIS)

Die Proben wurden an das Arifov Institute of Ion-Plasma and Laser Technologies of the Usbek Academy of Sciences, Taschkent, Usbekistan, geschickt und mittels Oberflächenionisations-spektrometrie analysiert. Die Oberflächenionisation (SI) ist ein physikalischer Prozess, der die Bildung von positiven und negativen Ionen bei thermischer Desorption von Partikeln von der festen Oberfläche misst. Der Ionisationsmechanismus ist der isoenergetische Übergang eines Elektrons von einem adsorbierten Partikel in einen Festkörper oder umgekehrt. Daher weist die Oberflächenionisation eine einzigartige Selektivität in Bezug auf ein Ionisierungspotential des adsorbierten Partikels auf. Besonders geeignet für diese Form der Diagnostik sind stickstoffhaltige organische Basen, wie psychotrope, medizinische oder pharmazeutische Präparate zum Beispiel viele Narkotika oder auch Koffein. Die Methode wurde mit Koffeinproben kalibriert. Die minimal nachweisbare Menge dieser Methode ist 1 ng Koffein pro ml [51,52]. Diese Messgenauigkeit ist durch die Verbesserung des Oberflächenionisationsdetektors (SID) und die Anpassung des Emittermaterials erreicht worden. Um eine besondere Stabilität, einzigartige Selektivität und Empfindlichkeit zu erreichen und aufrechtzuerhalten, wurde der Emitter aus einkristallinem Molybdän (Mo) hergestellt, das mit 2% Iridium (Ir) dotiert wurde.

Die Technik der Oberflächenionisations-Massenspektrometrie (Si/Ms) wurde in früheren Studien bereits validiert [6].

2.2.6 Statistik

Die Berechnung deskriptiver statistischer Parameter und die statistische Auswertung erfolgte mit der Software IBM SPSS® Statistics 25 (IBM, Armonk, New York, USA). Die Mittelwerte und Standardabweichungen der Koffeinkonzentrationen zu jedem Zeitpunkt wurden berechnet. Die Koffeinkonzentrationen zu jedem Zeitpunkt nach topischer Anwendung der unterschiedlich großen Koffein-Nanokristalle wurden unter Verwendung des nicht-parametrischen Wilcoxon-Tests für verwandte Proben verglichen. Ein p-Wert von $p < 0,05$ wurde als statistisch signifikant angesehen. Die Generierung der Grafiken und die Berechnung der AUC erfolgte mit dem Softwareprogramm Origin® 2019 (OriginLab Corporation, Northampton, Massachusetts, U.S.A.).

3. Ergebnisse

3.1 Herstellung und Charakterisierung der unterschiedlich großen Koffein-Nanokristalle

Die Perlmahlung der groben Koffeinsuspensionen über 15 Minuten führte zu großen Koffein-Nanokristallen mit einer Größe von 694 ± 20 nm und die Mahlung über 180 min zu einer Größe von $206 \pm 6,5$ nm. Die Messungen wurden als 10 Wiederholungsmessungen ($n = 10$) durchgeführt. Die Polydispersitätsindizes lagen bei $< 0,2$, dies weist auf eine enge Größenverteilung für beide Formulierungen hin. Die Lichtmikroskopie konnte das Fehlen größerer Partikel bestätigen. Die Koffein-Nanokristalle waren leicht negativ geladen. Die kleinen Nanokristalle besaßen ein Zeta Potential von etwa -15 mV und die größeren Nanokristalle besaßen ein Zeta Potential von etwa -18 mV.

3.2 Einfluss der Nanokristallgröße auf die perkutane Aufnahme von Koffein – In-vivo-Studie

Alle Probanden durchliefen das gesamte Testprotokoll für beide Testprodukte. Vor der topischen Applikation der Testprodukte konnte bei keinem der Probanden Koffein im Blut nachgewiesen werden, sodass die Einhaltung der koffeinfreien Diät bestätigt werden konnte. Es wurden keine lokalen oder systemischen Nebenwirkungen der Testprodukte während der Studiendauer festgestellt.

Aufgrund eines analytischen Messfehlers musste ein Proband ausgeschlossen werden. Die Ergebnisse beziehen sich somit auf 5 Teilnehmer.

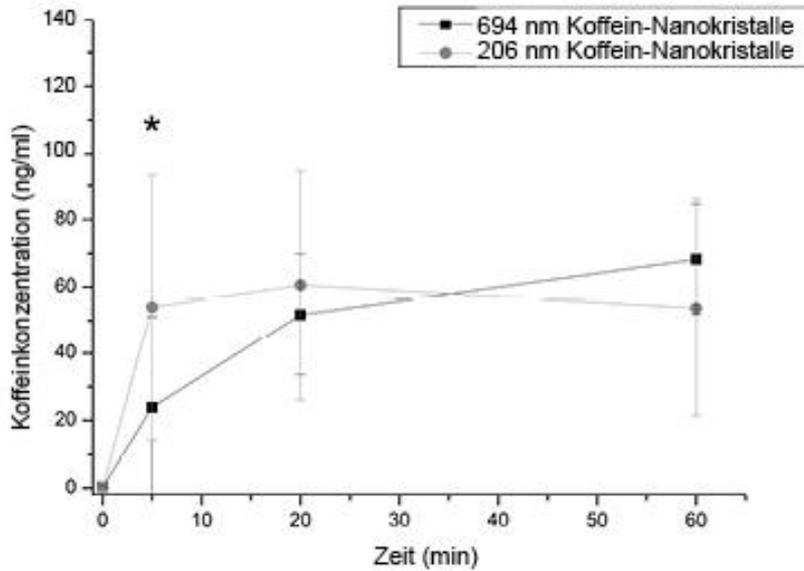


Abbildung 6. Konzentration des bioverfügbaren Koffeins in den ersten 60 Minuten (min) für 206 nm und 694 nm Kristalle [modifiziert nach 53].

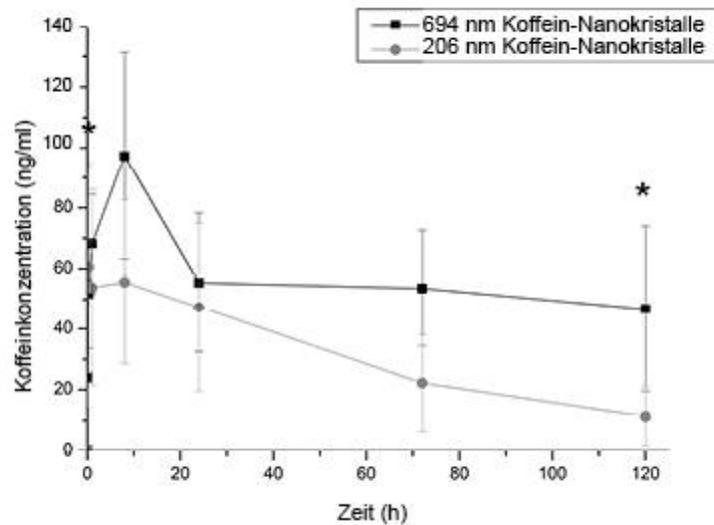


Abbildung 7. Konzentration des bioverfügbaren Koffeins über 120 Stunden (h) für 206 nm und 694 nm Kristalle [modifiziert nach 53].

In Abbildung 6 und 7 sind die Mittelwerte und Standardabweichungen der Koffeinsерumkonzentrationen in ng/ml dargestellt und geben ein Bild der Koffeinkonzentrationskinetik im Serum der Probanden wieder. Es ist deutlich zu erkennen, dass die 206 nm Koffein-Nanokristalle einen schnelleren und steileren Anstieg der Koffeinkonzentration in den ersten 5 min erreichen und die Konzentration der kleinen Kristalle mehr als doppelt so hoch ist ($p < 0.05$) als für die 694 nm Koffein-Nanokristalle.

Nach 20 min werden die Mittelwerte der gemessenen Koffeinkonzentrationen beider Koffein-Nanokristalle sehr ähnlich und nach 45 min ist die Bioverfügbarkeit der 694 nm Koffein-Nanokristallen kontinuierlich höher als die der 206 nm Koffein-Nanokristallen. Die Messwerte zu den Zeitpunkten 20 min, 60 min, 480 min, 1440 min sind als nicht signifikant berechnet ($p > 0,05$), lediglich für die Zeitpunkte 4320 min ($p = 0,08$) und 7200 min ($p = 0,05$) waren die Daten erneut nahe an der statistischen Signifikanz.

Koffein war auch noch nach 5 Tagen bei beiden Testprodukten im Serum nachweisbar. Die Kurven in Abbildung 7 zeigen nur ein geringes Absinken der Konzentration für die großen Partikel von Tag 1 bis Tag 5.

Tabelle 1. Fläche unter der Kurve ($\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{ml}$)

| | Proband A | Proband B | Proband D | Proband E | Proband F | Mittelwerte |
|--------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|---------------|
| 694 nm | 7,8 | 8,7 | 4,3 | 4,8 | 8,6 | $6,8 \pm 2,2$ |
| 206 nm | 3,0 | 4,6 | 5,0 | 1,3 | 5,0 | $3,8 \pm 1,6$ |

Die Fläche unter der Kurve (AUC) war für die größeren Koffein-Nanokristalle etwa um 82% höher als für die kleineren Koffein-Nanokristalle. Die Fläche betrug für die größeren Nanokristalle $6,8 \pm 2,2 \mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{ml}$, während es für die kleineren Nanokristalle $3,8 \pm 1,6 \mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{ml}$ waren.

Tabelle 2. Maximale Koffeinkonzentration c-max (ng/ml)

| | Proband A | Proband B | Proband D | Proband E | Proband F | Mittelwerte |
|--------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-------------|
| 694 nm | 122 | 137 | 102 | 62 | 83 | 97 ± 34 |
| 206 nm | 41 | 87 | 68 | 35 | 117 | 61 ± 35 |

Die maximale Koffeinkonzentration c-max für die 206 nm Koffeinkristalle betrug ca. $61 \pm 35 \text{ ng}/\text{ml}$ und für die 694nm Kristalle $97 \pm 34 \text{ ng}/\text{ml}$. Somit lag die maximal erreichte Konzentration der größeren Koffeinkristalle ca. 60% über der der kleinen Kristalle.

4. Diskussion

Das Ziel der Studie war es, die Bioaktivität von Koffein nach topischer Applikation in unterschiedlich großer nanokristalliner Form (206 nm und 694 nm) zu untersuchen. Es wurde vermutet, dass die Nanokristallgröße einen Einfluss auf die Absorptionskinetik von Koffein hat. Da zu erwarten war, dass nach topischer Applikation nur sehr geringe Mengen an Koffein im Blut nachweisbar waren, wurde für die Analyse der Koffeinkonzentration im Blut eine sehr empfindliche Methode, die Oberflächenionisations-Massenspektrometrie, gewählt. Diese Methode wurde am Arifov Institute of Electronics of the Usbek Academy of Sciences, Taschkent, Ustbekistan, zum Nachweis kleinster Mengen von Substanzen entwickelt und wurde bereits für ähnliche in vivo-Studien zum Nachweis von Koffein- oder Minoxidil-Konzentrationen im Blut von Probanden verwendet [6,51,52].

Die detektierten Werte entsprachen der Koffeinkonzentration im Serum der Probanden. Die Ergebnisse zeigten einen schnellen und steilen Anstieg der Koffeinserumkonzentration für die kleineren Koffein-Nanokristalle bereits in der Anfangsphase nach 5 min. Erst nach 45 min war die Absorption von Koffein, das aus den 694 nm Koffein-Nanokristallen freigesetzt wurde, kontinuierlich höher als die von den 206 nm Koffein-Nanokristallen. Die Koffeinserumkonzentrationen der großen Partikel lagen ab Zeitpunkt 45 Minuten kontinuierlich über den Werten der kleineren Partikel.

Die Ergebnisse waren für den Zeitpunkt 5 min ($p < 0.05$) statistisch signifikant, und zum Ende des Beobachtungsintervalls, zum Zeitpunkt 4320 min ($p = 0,08$) und 7200 min ($p = 0,05$) war ein Trend erkennbar.

Obwohl eine klare Tendenz zu beobachten war, wurde die statistische Testung (nichtparametrische Testung für abhängige Stichproben, Wilcoxon-Test) sicherlich durch die relativ geringe Probandenzahl (5 Probanden, 1 Drop-out) und die relativ hohe interindividuelle Koffeinbioverfügbarkeit erschwert. Die Koffeinkonzentrationsunterschiede der einzelnen Probanden zu den verschiedenen Zeitpunkten spiegelten sich in der hohen Standardabweichung wieder. Diese Unterschiede sind bedingt durch viele individuelle Faktoren wie BMI, Nikotinkonsum, gewohnheitsmäßiger Koffeinkonsum, Stoffwechsel und sind schwer auszuschließen [48]. Da dieselben Probanden beide Testprodukte durchliefen, konnte trotz der interindividuellen Unterschiede eine aussagekräftige Tendenz in der Kurvendynamik beider Produkte abgelesen werden.

Der raschere Anstieg der Koffeinserumkonzentration bereits 5 min nach topischer Applikation war bei den kleineren 206 nm Nanokristallen mehr als doppelt so hoch ($p < 0.05$) als bei den größeren Koffein-Nanokristallen.

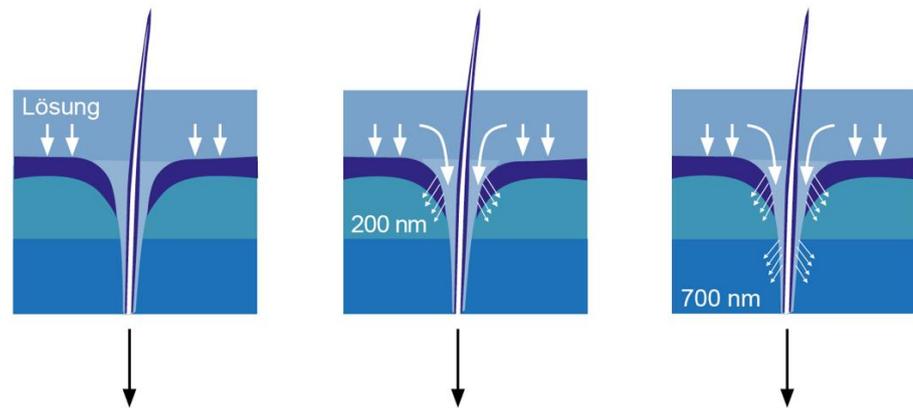
Die schnelle Resorption von Koffein bereits 5 min nach topischer Anwendung steht im Einklang mit der Studie von Otberg und al. [6], die ebenfalls zeigen konnten, dass Koffein bereits 5 min nach topischer Anwendung von Koffeinelösung systemisch verfügbar ist, wenn die Haarfollikel geöffnet sind und somit zum Penetrationsprozess beitragen. Wurden die Haarfollikel durch selektive Blockierung vom Penetrationsprozess ausgeschlossen, war Koffein erst nach 20 min systemisch verfügbar [6]. Basierend auf ihren Beobachtungen kann vermutet werden, dass die Haarfollikel in der vorlie-

genden Studie auch zum Absorptionsprozess des aus den Koffein-Nanokristallen freigesetzten Koffeins beigetragen haben. Es ist anzunehmen, dass die größere Oberfläche der kleineren Nanokristalle, verbunden mit einer höheren Auflösungsgeschwindigkeit, zu einem schnelleren Anstieg des Koffeins im Serum der Probanden führte. Dieser signifikant rasche Anstieg belegt die Überlegenheit der kleineren Kristalle im Hinblick auf die Auflösungsgeschwindigkeit und bestätigt Hypothese 3.

Interessanterweise wurden in der vorherigen Studie bei Anwendung von Koffein als Lösung die höchste maximale Serumkonzentration von Koffein nach 60 min gefunden. Für die hier verwendeten 206 nm Koffein-Nanokristalle waren die höchsten Werte bereits nach 20 Minuten nachweisbar, die 694 nm Koffein-Nanokristalle erreichten ihr Maximum erst nach 8 h (Abbildung 8).

Beim Vergleich der maximalen Koffein-Serumpeaks zwischen der Otberg und al. Studie [6] und der aktuellen Studie wurden interessante Beobachtungen gemacht. Der maximale Serumpeak nach topischer Applikation der Koffeinlösung betrug ca. 12 ng/ml [6], nach Applikation der kleinen Nanokristalle konnte ein Serumpeak von ca. 61 ± 35 ng/ml und für die größeren Nanokristalle sogar von 97 ± 34 ng/ml bestimmt werden (Abbildung 8). Im Vergleich zur Koffeinlösung konnten die kleinen Nanokristalle den Serumpeak somit um das 5-fache und die größeren Nanokristalle konnten den Peak sogar um das 8-fache erhöhen. Somit sind die partikulären Formulierungen (206 nm/ 694 nm) der Lösung gegenüber deutlich geeigneter mehr Wirkstoff bioverfügbar zu machen. Die erste Hypothese konnte damit bestätigt werden.

Vergleicht man die Fläche unter der Kurve (AUC) war diese wie oben bereits erwähnt für die größeren Koffein-Nanokristalle etwa um 82% höher als für die kleineren Koffein-Nanokristalle. Die Fläche betrug für die größeren Nanokristalle ($6,8 \pm 2,2$) $\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{ml}$, während es für die kleineren Nanokristalle nur ($3,8 \pm 1,6$) $\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{ml}$ waren. Der Vergleich der Fläche unter der Kurve (AUC) mit der AUC der Koffeinlösung zeigte für die kleineren Nanokristalle einen 15-fach erhöhten Wert und für die großen Koffein-Nanokristalle eine 27-fache Steigerung (Abbildung 8) [6]. Dies unterstreicht den Vorteil der nanokristallinen Darreichungsform, die die kumulative Bioverfügbarkeit von Koffein signifikant im Vergleich zur Applikation als Lösung erhöht. Denn bereits nach 24 h konnte in der Studie von Otberg et al. kein Koffein mehr nachgewiesen werden [6]. Die Hypothese 2 konnte durch die höhere Fläche unter der Kurve (AUC) und die höheren Koffeinserumpeaks bestätigt werden, größere Nanokristalle machen mehr Koffein bioverfügbar.



| | | | |
|-------------------------------------|--------------|-------------------|-------------------|
| Maximaler Koffein-serumpeak (c-max) | 12 ng/ml | 61 ± 35 ng/ml | 97 ± 34 ng/ml |
| Zeitpunkt von c-max | 60 min | 20 min | 8 h |
| Fläche unter der Kurve | 0,25 µg*h/ml | 3,8 ± 1,6 µg*h/ml | 6,8 ± 2,2 µg*h/ml |
| Löslichkeit | 25 mg/ml | 24,2 mg/ml | 20,2 mg/ml |

Abbildung 8: Vergleich der Ergebnisse von Lösung, 200 nm und 700 nm Kristallen [6,53]

Betrachtet man die Unterschiede der 3 Formulierungen (Lösung, kleine Kristalle, große Kristalle) muss man 3 Faktoren zur Interpretation berücksichtigen. 1. die Gesamtmenge an appliziertem Koffein, 2. die Menge an gelöstem Koffein und 3. die Gesamtkontaktfläche zur lebenden Zelle und zum Blutkreislauf bzw. zu einem Depot. Alle 3 Formulierungen wurden in einem Propylenglykol und Ethanol Mischverhältnis von 7:3 suspendiert. Bei den nanokristallinen Anwendungen wurde 2% Polyacrylsäure als Stabilisator hinzugegeben, dieser führt zu einer Gelbildung, einer erhöhten Viskosität und reduziert die Löslichkeit auf < 14 mg/ml gelöstem Koffein. Die nanokristalline Form wiederum führte zu einer Zunahme der Löslichkeit auf 20,2 mg/ml bei den großen Partikeln und auf 24,2 mg/ml bei den kleinen Partikeln. Die Löslichkeit konnte somit um 35% bzw. 70% erhöht werden und zeigt eindrücklich erneut einen klaren Vorteil von partikulären Formulierungen [11]. Der gelöste Anteil des Koffeins war bei den kleinen Partikeln mit 24,2 mg/ml daraufhin fast identisch mit dem gelösten Koffeinanteil in der Koffeinlösung, der 25 mg/ml betrug. Dieser hohe Anteil des frei gelösten Koffeins zeigt sich in der rascheren Bioverfügbarkeit. Koffein diffundierte in die Zellen bzw. in die Blutbahn aufgrund der verfügbaren Kontaktfläche, des Konzentrationsgradienten und des Diffusionskoeffizienten basierend auf dem im 1. Fick'schen Gesetz (Gleichung 2).

Gleichung 2: 1. Fick'sches Gesetz, nach dem deutschen Physiologen Adolf Fick (1829-1901)

$$J = \frac{dM}{A \cdot dt} = -D \cdot \frac{dc}{dx}$$

J=Mengenfluss (mol/m²s); *M*=Menge Wirkstoff (mol); *A*=Fläche (m²); *t*=Zeit (s); *D*=Diffusions-koeffizient (m²/s); *dc*= Konzentrationsgradient Wirkstoff (mol/m³); *dx*= Diffusionsweg (m)

Kleinere Partikel lösen sich aufgrund ihrer höheren kinetischen Löslichkeit rascher auf, da sie eine erhöhte Auflösungsgeschwindigkeit im Vergleich zu größeren Kristallen besitzen [45,46].

In einer früheren Studie von Pelikh et al. wurde gezeigt [44], dass die Partikelgröße von Nanokristallen die passive Diffusion von Hesperetin aus Wirkstoff-Nanokristallen beeinflusst. Eine Steigerung der passiven Diffusion wurde jedoch erst bei Partikelgrößen < 200 nm erreicht. Größere Nanokristalle zeigten keine ausgeprägten Unterschiede. Zudem zeigte sich, dass der Effekt mit zunehmender Eindringtiefe in die Haut abnahm und sich bereits nach 10 Klebefilmabrissen, was weniger als der Hälfte der Dicke des Stratum corneum entspricht, wieder aufhob [44]. In der vorliegenden Studie konnten die kleineren Partikel um die 204 nm bereits deutlich schneller ihr Koffein abgeben als die Kristalle mit 694 nm. Das dies durch die erhöhte Auflösungsgeschwindigkeit und durch den höheren gelösten Anteil von Koffein erfolgte, kann angenommen werden.

Wichtig scheint jedoch auch die Nutzung der Gesamtkontaktfläche durch die nanokristallinen Formulierungen. Der Konzentrationsgradient ist für Koffein in Lösung und die kleinen Partikel ähnlich und führt zu einem vergleichbar raschem Wirkstoffnachweis. Da dieser Gradient jedoch nur durch die Depoteigenschaften der kristallinen Form gewahrt bleibt, erreichen diese einen höheren Serumpeak (c-max), und eine höhere Fläche unter der Kurve (AUC) im Vergleich zur Koffeinlösung. Die Hypothese 2, dass die großen Nano-Koffeinkristalle durch ihre optimalen follikelpenetrierenden Eigenschaften zu der höchsten kumulativen Koffeinbioverfügbarkeit führen, konnte bestätigt werden. Die größenoptimierten Partikel von ca. 694 nm konnten den follikulären Weg am besten nutzen, durch ihr tieferes Eindringen und der dadurch vergrößerten Kontaktfläche konnten sie außerdem den notwendigen Konzentrationsgradienten lange optimal aufrechterhalten, um möglichst viel Koffein bioverfügbar zu machen. Selbst am 5. Tag konnte vor allem am Kurvenverlauf der großen Kristalle kaum ein Absinken der Serumkonzentration beobachtet werden, dies stimmt mit den Erkenntnissen von Lademann et al. überein, in denen der Haarfollikel als idealer Lagerungsort für partikuläre Substanzen identifiziert wurde [20]. Ein tiefes Eindringen gelang unter anderem auch unter Berücksichtigung vorheriger in vitro Beobachtungen zum Verhalten von Partikeln im Haarfollikel, wenn die topische Applikation unter Massage erfolgte [27,53,54,55]. Durch die kreisenden Applikationsbewegungen konnten sich Partikeln optimal in die Cuticula des Haarschaftes einhaken, dieser Effekt wurde als Ratschen-Effekt beschrieben [27,55] und kann durch die vorliegenden in vivo

Daten bestätigt werden, da es den größenoptimierten Partikeln mit 694 nm gelang, deutlich mehr Koffein bioverfügbar zu machen und demzufolge ihr tieferes Eindringen in den Follikel angenommen werden muss.

Die Methode, den Serumspiegel von Wirkstoffen zu analysieren, um die Wirksamkeit topischer Formulierungen zu überprüfen, ist in vivo ein geeignetes Instrument [6]. Allerdings lässt sich durch die vorliegende Studie keine Aussage machen zu einer Quantifizierung von Koffein im Follikel bzw. im perifollikulären Gewebe. Da der Konzentrationsgradient innerhalb des Follikels als notwendige Bedingung der Diffusion bei den großen Partikeln über 5 Tage aufrechterhalten wurde, kann man davon ausgehen, dass der Wirkstoff auch über 5 Tage innerhalb des Follikels aktiv war, bzw. im Gewebe zu finden war, bevor er ins Blutssystem übergegangen ist. Der Frage nach der quantitativen Bestimmung von Wirkstoffen im Gewebe mittels dermalen Mikrodialyse wurde in der Studie von Klein et al. erst kürzlich nachgegangen [56]. Da in dieser Studie im Aufbau B die gleichen Koffein-Nanokristalle der Größe 204 nm und 694 nm ex vivo am Schweineohr untersucht wurden, sind die Ergebnisse gut vergleichbar. In ihrem Modellaufbau konnten die großen Partikel die Koffeinkonzentration im Dialysat über 46 h um 72% gegenüber der kleineren Partikel erhöhen. In der hier vorliegenden in vivo Studie konnte eine 82%ige Steigerung der Bioverfügbarkeit über 120 h beobachtet werden. Der längere Beobachtungszeitraum kann hierbei eine Rolle gespielt haben, in dem die großen Partikel von ihrem positiven Depotverhalten profitieren konnten. Die ex vivo Studie konnte die Beobachtungen unserer Studie reproduzieren. Die Größe der verwendeten Nano-Koffeinkristalle hatten auch hier einen entscheidenden Einfluss auf die Resorptionskinetik [56].

Zusammenfassend bewirkten die kleineren Nanokristalle der vorliegenden Studie eine direkte Freisetzung des Koffeins, während die größeren Nanokristalle für eine langanhaltende Freisetzung und damit kumulativ höhere Absorption verantwortlich waren. Dies ist von besonderer klinischer Bedeutung, wenn es um die Erhöhung der Wirksamkeit von topisch applizierten Substanzen geht.

5. Relevanz für die klinische Anwendung und weiterführende wissenschaftliche Fragestellungen

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit tragen maßgeblich dazu bei, die dermato-pharmazeutische Forschung bezüglich der Penetration von topisch applizierten Substanzen weiterzuentwickeln. Bislang lag für die meisten Wirkstoffe die Bioverfügbarkeit unter 1%, was weder besonders effektiv noch effizient ist [7].

Durch die jüngsten Bestrebungen, partikuläre Substanzen für die Optimierung der dermalen Penetration einzusetzen, konnte ein riesiger Schritt zur besseren Bioverfügbarkeit gemacht werden.

Die hier vorliegende Proof-of-Concept Studie konnte erstmals in vivo zeigen, dass die Bioverfügbarkeit von topisch appliziertem Koffein als Modellwirkstoff signifikant erhöht werden kann, wenn es in nanokristalliner Form appliziert wird und dass die Größe der Nanokristalle einen weiteren entscheidenden Einfluss auf die Effektivität der Absorption hat.

Die im Rahmen der Studie untersuchten neuartigen Nanocarrier (Nanokristalle) eröffnen außerdem ein interessantes Forschungsfeld für den transdermalen Transport von mittelmäßig bis schlecht lösliche Substanzen wie z.B. für die BCS Klasse II und IV Medikamente. In Klasse II finden sich Medikamente wie Ibuprofen, Diclofenac oder Glibenclamid [12]. Diese zeichnen sich durch eine hohes Permeationsvermögen aber eine schlechte Löslichkeit aus. Ein hohes Permeationsvermögen liegt vor, wenn der Arzneistoff zu mehr als 90 % resorbiert wird. Dieses gute Resorptionsverhalten kann am Haarfollikel ausgenutzt werden, da schon im Bereich des Infundibulums ein direkter Zugang zu Gefäßen, lebenden Zellen und auch zu spezifischen Immunzellen erlangt wird.

In der Arbeitsgruppe von Lademann et al., in der auch die vorliegende Arbeit entstanden ist, konnte kürzlich eindrücklich gezeigt werden, dass der Haarfollikel der einzig realistische Penetrationsweg für partikuläre Substanzen darstellt [20,21,27]. Durch eine maßgeschneiderte Partikelgröße kann die Eindringtiefe in den Haarfollikel beeinflusst werden und es können interessante Zielstrukturen der Haut, wie zum Beispiel die Talgdrüse, direkt angesteuert werden. Dies ist zum Beispiel zur optimalen Therapie von Akne oder dem seborrhoischen Ekzem notwendig [57,58].

Tiefere Abschnitte des Haarfollikels wären beispielsweise für die Therapie der Alopezie und des Hirsutismus von Interesse. Darüber hinaus sind die Erkenntnisse auch von pathophysiologischer Bedeutung, denn durch das Eindringen von Typ-I-Allergenen mit direktem Kontakt zur Immunantwort kann sich eine atopische Dermatitis entwickeln oder verschlechtern [59]. So könnte versucht werden, gezielt das Infundibulum zu blockieren, um einer Sensibilisierung zuvorzukommen. Kosmetische Produkte, die eine Salbenschicht auf Schleimhäuten oder Haut hinterlassen, nutzen diesen allgemeinen Abwehrprozess bereits, haben aber keinen anhaltenden Effekt [59,60]. In zielgerichteten dermalen Formulierungen, die beispielsweise die Notwendigkeit sofortiger oder langfristiger Bioverfügbarkeit von Stoffen berücksichtigen, sollte die Wahl der Partikelgröße in fortführender Forschung unbedingt mit einfließen. Gegebenenfalls kann auch eine Kombination von verschiedenen Partikelgrößen sinnvoll sein, wenn sowohl ein schneller Wirkungseintritt als auch eine langfristige Wirkung notwendig sind.

Auch bereits in der transdermalen Anwendung befindliche Stoffe mit guter Resorptionsfähigkeit, die derzeit auf dem Markt als Pflaster etabliert sind (z.B. Schmerzpflaster (Fentanyl), Hormonpflaster (Estradiol), Nikotinpflaster oder Pflaster zur Reisekrankheitsbekämpfung (Scopolamin) [28,29,30]) könnten für bestimmte Gruppen vorteilhaft durch Nanocarrier ergänzt werden, da sich durch den Haarfollikel ein natürliches Depot ergäbe [20,24,53]. Somit könnten nicht seltene Unverträglichkeitsreaktionen der Haut auf eine Pflaster-Applikation vermieden werden. Juckreiz und Kontakterytheme durch Klebstoffe oder andere Hilfsstoffe in den Pflastern sind die häufigsten beschriebenen Nebenwirkungen [29].

Der direkte Zugang zu immunkompetenten Zellen durch geeignete Partikel ist bereits von großem Interesse [38]. So wäre eine Impfung mittels Nanocarrier möglich [38]. Auch eine spezifische Desensibilisierung müsste möglicherweise nicht mehr mittels subkutaner Injektion stattfinden und wäre

damit wahrscheinlich auch nebenwirkungsärmer als die etablierte Alternative der sublingualen Hyposensibilisierung, die häufig mit oralen Symptomen einhergeht.

Am Ende wäre die Erhöhung der Bioverfügbarkeit von Wirkstoffen ressourcensparend, die Wirksamkeit der Wirkstoffe wäre erhöht und mögliche systemische Nebenwirkungen könnten reduziert oder verhindert werden. Dies würde wiederum mit Sicherheit zu einer besseren Compliance der Patienten und somit erneut zu einem sparsameren Umgang mit Ressourcen führen.

Die Übertragung der Ergebnisse auf andere, in der Dermatologie relevante Wirkstoffe ist bereits in Planung.

6. Literaturverzeichnis:

1. Mosteller RD. Simplified calculation of body-surface area. *N Engl J Med.* 1987 Oct 22;317(17):1098. Doi: 10.1056/NEJM198710223171717. PMID: 3657876.
2. Krause K, Foitzik K. Biology of the hair follicle: the basics. *Semin Cutan Med Surg.* 2006 Mar;25(1):2-10. Doi: 10.1016/j.sder.2006.01.002. PMID: 16616298.
3. Gallo RL. Human Skin Is the Largest Epithelial Surface for Interaction with Microbes. *J Invest Dermatol.* 2017;137(6):1213-1214. doi:10.1016/j.jid.2016.11.045
4. 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. Doi: 10.1046/j.0022-202X.2003.22110.x. PMID: 14962084.
5. 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. Doi: 10.1159/000211301. PMID: 8054206.
6. Otberg N, Patzelt A, Rasulev U, Hagemeister T, Linscheid M, Sinkgraven R, Sterry W, Lademann J. The role of hair follicles in the percutaneous absorption of caffeine. *Br J Clin Pharmacol.* 2008 Apr;65(4):488-92. Doi: 10.1111/j.1365-2125.2007.03065. x. Epub 2007 Dec 7. PMID: 18070215; PMCID: PMC2291387.
7. Hadgraft J, Lane ME. Advanced topical formulations (ATF). *Int J Pharm.* 2016 Nov 30;514(1):52-57. Doi: 10.1016/j.ijpharm.2016.05.065. Epub 2016 May 31. PMID: 27260130
8. Lademann J, Richter H, Teichmann A, Otberg N, Blume-Peytavi U, Luengo J, Weiss B, Schaefer UF, Lehr CM, Wepf R, Sterry W. Nanoparticles--an efficient carrier for drug delivery into the hair follicles. *Eur J Pharm Biopharm.* 2007;66(2):159-164. doi:10.1016/j.ejpb.2006.10.019
9. Fang CL, Aljuffali IA, Li YC, Fang JY. Delivery and targeting of nanoparticles into hair follicles. *Ther Deliv.* 2014;5(9):991-1006. doi:10.4155/tde.14.61
10. Müller RH, Gohla S, Keck CM. State of the art of nanocrystals--special features, production, nanotoxicology aspects and intracellular delivery. *Eur J Pharm Biopharm.* 2011 May;78(1):1-9. Doi: 10.1016/j.ejpb.2011.01.007. Epub 2011 Jan 23. PMID: 21266197.
11. Zhai X, Lademann J, Keck CM, Muller RH. Dermal nanocrystals from medium soluble actives – physical stability and stability affecting parameters. *Eur J Pharm Biopharm.* 2014;88(1):85-91.
12. Rabinow BE. Nanosuspensions in drug delivery. *Nat Rev Drug Discov.* 2004;3(9):785-796. doi:10.1038/nrd1494
13. Das Herkunftswörterbuch, Der Duden in zwölf Bänden. Band 7, 5. Auflage, Dudenverlag, Berlin 2014 (S. 371)
14. Christophers E. Cellular architecture of the stratum comeum. *J Invest Dermatol.* 1971;56(3):165-169. doi:10.1111/1523-1747.ep12260765

15. Scheuplein RJ, Blank IH. Permeability of the skin. *Physiol Rev.* 1971;51(4):702-747. doi:10.1152/physrev.1971.51.4.702
16. Menon GK, Kligman AM. Barrier functions of human skin: a holistic view. *Skin Pharmacol Physiol.* 2009;22(4):178-189. doi:10.1159/000231523
17. Schneider MR, Schmidt-Ullrich R, Paus R. The hair follicle as a dynamic miniorgan. *Curr Biol.* 2009 Feb 10;19(3):R132-42. Doi: 10.1016/j.cub.2008.12.005. PMID: 19211055.
18. Patzelt A, Lademann J. Drug delivery to hair follicles. *Expert Opin Drug Deliv.* 2013 Jun;10(6):787-97. Doi: 10.1517/17425247.2013.776038. Epub 2013 Mar 27. PMID: 23530745.
19. Ohyama M 2007. Hair follicle bulge: a fascinating reservoir of epithelial stem cells. *J Dermatol Sci* 46: 81-9.
20. Lademann J, Richter H, Schaefer UF, Blume-Peytavi U, Teichmann A, Otberg N, Sterry W. 2006. Hair follicles – a long-term reservoir for drug delivery. *Skin Pharmacol Physiol* 19: 232-6.
21. Patzelt A, Lademann J. Recent advances in follicular drug delivery of nanoparticles. *Expert Opin Drug Deliv.* 2020 Jan;17(1):49-60. Doi: 10.1080/17425247.2020.1700226. Epub 2019 Dec 12. PMID: 31829758.
22. Mathes C, Brandner JM, Laue M, Raesch SS, Hansen S, Failla AV, A. V., Vidal, S., Moll, I., Schaefer, U. F., Lehr, C. M. 2016. Tight junctions form a barrier in porcine hair follicles. *Eur J Cell Biol* 95: 89-99.
23. Vogt A, Hadam S, Heiderhoff M, Audring H, Lademann J, Sterry W, Blume-Peytavi U. Morphometry of human terminal and vellus hair follicles. *Exp Dermatol* 2007 Nov;16(11):946-50.
24. Blume-Peytavi U, Vogt A. Human hair follicle: reservoir function and selective targeting. *Br J Dermatol.* 2011 Oct;165 Suppl 2:13-7. Doi: 10.1111/j.1365-2133.2011.10572.x. PMID: 21919898.
25. Toll R, Jacobi U, Richter H, Lademann J, Schaefer H, Blume-Peytavi U. 2004. Penetration profile of microspheres in follicular targeting of terminal hair follicles. *J Invest Dermatol* 123: 168-76.
26. Lademann J, Richter H, Meinke MC, Lange-Asschenfeldt B, Antoniou C, Mak WC, Renneberg R, Sterry W, Patzelt A. 2013. Drug Delivery with Topically Applied Nanoparticles: Science Fiction or Reality? *Skin Pharmacol Phys* 26: 227-33.
27. Radtke M, Patzelt A, Knorr F, Lademann J, Netz RR. Ratchet effect for nanoparticle transport in hair follicles. *Eur J Pharm Biopharm.* 2017 Jul;116:125-130. Doi: 10.1016/j.ejpb.2016.10.005. Epub 2016 Oct 31. PMID: 27810473.
28. Hupfeld S, Gravem H. Depotplastre som administrasjonsprinsipp for legemidler [Transdermal therapeutic systems for drug administration]. *Tidsskr Nor Laegeforen.* 2009 Mar 12;129(6):532-3. Norwegian. Doi: 10.4045/tidsskr.09.33349. PMID: 19282891.

29. Pastore MN, Kalia YN, Horstmann M, Roberts MS. Transdermal patches: history, development and pharmacology. *Br J Pharmacol.* 2015 May;172(9):2179-209. Doi: 10.1111/bph.13059. Epub 2015 Mar 18. PMID: 25560046; PMCID: PMC4403087
30. Brzozowska M, Kowalska-Koprek U, Karowicz-Bilińska A, Pajszczyk-Kieszkiewicz T. Wpływ przewlekłego leczenia przezskórnymi plastrami z GTN kobiet ciężarnych z nadciśnieniem tetniczym na stabilizację ciśnienia tetniczego oraz stan pourodzeniowy noworodków [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;75(2):134-138.
31. Cevc G. Transdermal drug delivery of insulin with ultradeformable carriers. *Clin Pharmacokinet.* 2003;42(5):461-74.
32. 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.
33. Kang NW, Kim S, Lee JY, Kim KT, Choi Y, Oh Y, Kim J, Kim DD, Park JH. Microneedles for drug delivery: recent advances in materials and geometry for preclinical and clinical studies. *Expert Opin Drug Deliv.* 2021 Jul;18(7):929-947. Doi: 10.1080/17425247.2021.1828860. PMID: 32975144.
34. Lohan SB, Icken N, Teutloff C, Saeidpour S, Bittl R, Lademann J, Fleige E, Haag R, Haag SF, Meinke MC. Investigation of cutaneous penetration properties of stearic acid loaded to dendritic core-multi-shell (CMS) nanocarriers. *Int J Pharm.* 2016 Mar 30;501(1-2):271-7. Doi: 10.1016/j.ijpharm.2016.02.004. Epub 2016 Feb 4. PMID: 26853315.
35. Park J, Lee H, Lim G-S, Kim N, Kim D, Kim Y-C. (2019). Enhanced transdermal drug delivery by sonophoresis and simultaneous application of sonophoresis and iontophoresis. *AAPS PharmSciTech* 20 1–7.
36. Pagneux Q, Ye R, Chengnan L, Barras A, Hennuyer N, Staels B, Caina D, Osses JIA, Abderrahmani A, Plaisance V, Pawlowski V, Boukherroub R, Melinte S, Szunerits S. Electrothermal patches driving the transdermal delivery of insulin. *Nanoscale Horiz.* 2020 Apr 1;5(4):663-670. Doi: 10.1039/c9nh00576e. Epub 2020 Jan 2. PMID: 32226966.)
37. Glenn GM, Kenney RT. Mass vaccination: solutions in the skin. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2006;304:247-68. Doi: 10.1007/3-540-36583-4_14. PMID: 16989274.
38. Vogt A, Hadam S, Deckert I, Schmidt J, Stroux A, Afraz Z, Rancan F, Lademann J, Combadiere B, Blume-Peytavi U. Hair follicle targeting, penetration enhancement and Langerhans cell activation make cyanoacrylate skin surface stripping a promising delivery technique for transcutaneous immunization with large molecules and particle-based vaccines. *Exp Dermatol.* 2015 Jan;24(1):73-5. Doi: 10.1111/exd.12589. Epub 2014 Dec 8. PMID: 25382068.
39. Rubin BA. A note on the development of the bifurcated needle for smallpox vaccination. *WHO Chron.* 1980 May;34(5):180-1. PMID: 7376638.
40. The Pleasure of Finding Things out. The Best Short Works of Richard P. Feynman.

41. McIntyre RA. Common nano-materials and their use in real world applications. *Sci Prog.* 2012;95(Pt 1):1-22. doi:10.3184/003685012X1329471545643140.
42. Dréno B, Alexis A, Chuberre B, Marinovich M. Safety of titanium dioxide nanoparticles in cosmetics. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2019 Nov;33 Suppl 7:34-46. Doi: 10.1111/jdv.15943. PMID: 31588611.
43. Nohynek GJ, Antignac E, Re T, Toutain H. Safety assessment of personal care products/cosmetics and their ingredients. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2010 Mar 1;243(2):239-59. Doi: 10.1016/j.taap.2009.12.001. Epub 2009 Dec 21. PMID: 20005888.
44. Pelikh O, Eckert RW, Pinnapireddy SR, Keck CM. Hair follicle targeting with curcumin nanocrystals: Influence of the formulation properties on the penetration efficacy. *J Control Release.* 2021 Jan 10; 329:598-613. Doi: 10.1016/j.jconrel.2020.09.053. Epub 2020 Oct 1. PMID: 33011240).
45. Kurt H. Bauer, Karl-Heinz Frömming, Claus Führer: Lehrbuch der Pharmazeutischen Technologie – Mit einer Einführung in die Biopharmazie; 9. Auflage; ISBN 978-3-8047-2552-2.)
46. Keck CM. Particle size analysis of nanocrystals: improved analysis method. *Int J Pharm.* 2010;390(1):3-12. doi:10.1016/j.ijpharm.2009.08.042
47. Heckman MA, Weil J, Gonzalez de Mejia E. Caffeine (1, 3, 7-trimethylxanthine) in foods: a comprehensive review on consumption, functionality, safety, and regulatory matters. *J Food Sci.* 2010 Apr;75(3):R77-87. Doi: 10.1111/j.1750-3841.2010.01561.x. PMID: 20492310.
48. Nehlig A. Interindividual Differences in Caffeine Metabolism and Factors Driving Caffeine Consumption. *Pharmacol Rev.* 2018 Apr;70(2):384-411. Doi: 10.1124/pr.117.014407. Epub 2018 Mar 7. PMID: 29514871.
49. Jacobsen JG, Smith LH. Biochemistry and physiology of taurine and taurine derivatives. *Physiol Rev.* 1968; 48:424–511.
50. OECD. Skin Absorption: In Vivo Method; OCED: Paris, France, 2004.
51. Rasulev U, Khasanov U, Palitcin VV. Surface-ionization methods and devices of indication and identification of nitrogen-containing base molecules. *J Chromatogr A.* 2000 Oct 27;896(1-2):3-18. Doi: 10.1016/s0021-9673(00)00458-1. PMID: 11093635.
52. Khasanov U, Rasulev U, Usmanov D, Iskhakova S, Nabiev U. Application of surface ionization methods for highly sensitive and selective analysis of benzodiazepine derivatives. *J Pharm Biomed Anal.* 2005 Apr 29;37(5):1125-33. Doi: 10.1016/j.jpba.2004.09.026. PMID: 15862696.
53. Breuckmann P, Meinke MC, Jaenicke T, Krutmann J, Rasulev U, Keck CM, Müller RH, Klein AL, Lademann J, Patzelt A. Influence of nanocrystal size on the in vivo absorption kinetics of caffeine after topical application. *Eur J Pharm Biopharm.* 2021 Oct;167:57-64. Doi: 10.1016/j.ejpb.2021.07.006. Epub 2021 Jul 15. PMID: 34273544.

54. Trauer S, Richter H, Kuntsche J, Büttemeyer R, Liebsch M, Linscheid M, Fahr A, Schäfer-Korting M, Lademann J, Patzelt A. Influence of massage and occlusion on the ex vivo skin penetration of rigid liposomes and invasomes. *Eur J Pharm Biopharm.* 2014 Feb;86(2):301-6. Doi: 10.1016/j.ejpb.2013.11.004. Epub 2013 Nov 16. PMID: 24252713.
55. Busch L, Keziban Y, Dähne L., Keck C, Meinke M, Lademann J, Patzelt A. The impact of skin massage frequency on the intrafollicular transport of silica nanoparticles: Validation of the ratchet effect on an ex vivo porcine skin model. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2020, 158, 266–272.
56. Klein AL, Lubda M, Skov PS, Vogt A, Keck CM, Lademann J, Beckers I, von Hagen J, Patzelt A (2020). Investigation of transfollicular caffeine penetration using microdialysis on ex vivo porcine ear skin. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 157, 1-8.
57. Lapteva M, Moller M, Gurny R, Kalia YN 2015. Self-assembled polymeric nanocarriers for the targeted delivery of retinoic acid to the hair follicle. *Nanoscale* 7: 18651-62./ 2.
58. Ridolfi DM, Marcato PD, Justo GZ, Cordi L, Machado D, Duran N 2012. Chitosan-solid lipid nanoparticles as carriers for topical delivery of tretinoin. *Colloids Surf B Biointerfaces* 93: 36-40.
59. Meinke MC, Patzelt A, Richter H, Schanzer S, Sterry W, Filbry A, et al. 2011. Prevention of follicular penetration: barrier-enhancing formulations against the penetration of pollen allergens into hair follicles. *Skin Pharmacol Physiol* 24: 144-50.
60. Van Bever HP, Nagarajan S, Shek LP, Lee BW. OPINION: Primary prevention of allergy – Will it soon become a reality? *Pediatr Allergy Immunol.* 2016 Feb;27(1):6-12. Doi: 10.1111/pai.12497. Epub 2015 Nov 17. PMID: 26456367.

7. Eidesstattliche Versicherung und ausführliche Anteilserklärung

„Ich, Petra Ruth Breuckmann, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: In vivo Studie zur Untersuchung des Einflusses von Nanokristallen unterschiedlicher Größe auf die transkutane und transfollikuläre Penetration von Koffein, selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren/innen beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) werden von mir verantwortet.

Ich versichere ferner, dass ich die in Zusammenarbeit mit anderen Personen generierten Daten, Datenauswertungen und Schlussfolgerungen korrekt gekennzeichnet und meinen eigenen Beitrag sowie die Beiträge anderer Personen korrekt kenntlich gemacht habe (siehe Anteilserklärung). Texte oder Textteile, die gemeinsam mit anderen erstellt oder verwendet wurden, habe ich korrekt kenntlich gemacht.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit der Erstbetreuerin, angegeben sind. Für sämtliche im Rahmen der Dissertation entstandenen Publikationen wurden die Richtlinien des ICMJE (International Committee of Medical Journal Editors; www.icmje.org) zur Autorenschaft eingehalten. Ich erkläre ferner, dass ich mich zur Einhaltung der Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis verpflichte.

Weiterhin versichere ich, dass ich diese Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits an einer anderen Fakultät eingereicht habe.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§§156, 161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

Anteilerklärung an der erfolgten Publikation

Publikation 1:

Breuckmann P, Meinke MC, Jaenicke T, Krutmann J, Rasulev U, Keck CM, Müller RH, Klein AL, Lademann J, Patzelt A. Influence of nanocrystal size on the in vivo absorption kinetics of caffeine after topical application. Eur J Pharm Biopharm. 2021 Oct.

Beitrag im Einzelnen:

- Konzeption, Probandenrekrutierung, Erstellen des Sicherheitsblatts zur koffeinfreien Diät, ausführliche Aufklärung der Probanden
- Erstellung des Ethikantrags (90%)
- Durchführung aller Messungen (ausgenommen: Charakterisierung und Herstellung der Testprodukte und Analytik durch die Oberflächenionisations-Massenspektrometrie (Si/Ms))
- Organisation des Transports der Proben für die Analytik
- selbstständige Erstellung aller Tabellen und Abbildungen; Fig.1 wurde in enger Zusammenarbeit mit Frau Dr. C. Keck entwickelt
- Statistische Auswertung (80%)
- Datenanalyse und Bewertung der Ergebnisse
- Verfassung des Manuskripts (ausgenommen Abschnitt Charakterisierung der Nanokristallen durch Frau Dr. C. Keck)
- Die Erstellung des englischsprachigen Manuskripts der Publikation erfolgte durch mich. Die Korrespondenz und die angefragten Revisionen mit dem Journal organisierte Anna Lena Klein

Unterschrift, Datum und Stempel der erstbetreuenden Hochschullehrerin

Unterschrift der Doktorandin

8. Auszug aus der Journal Summary List

Journal Data Filtered By: **Selected JCR Year: 2019** Selected Editions: SCIE,SSCI
 Selected Categories: "PHARMACOLOGY and PHARMACY" Selected Category
 Scheme: WoS

Gesamtanzahl: 270 Journale

| Rank | Full Journal Title | Total Cites | Journal Impact Factor | Eigenfactor Score |
|------|---|-------------|-----------------------|-------------------|
| 1 | NATURE REVIEWS DRUG DISCOVERY | 33,154 | 64.797 | 0.049170 |
| 2 | PHARMACOLOGICAL REVIEWS | 12,500 | 17.395 | 0.010370 |
| 3 | TRENDS IN PHARMACOLOGICAL SCIENCES | 13,034 | 13.503 | 0.017780 |
| 4 | ADVANCED DRUG DELIVERY REVIEWS | 36,796 | 13.300 | 0.033170 |
| 5 | Annual Review of Pharmacology and Toxicology | 7,812 | 11.250 | 0.007970 |
| 6 | DRUG RESISTANCE UPDATES | 3,165 | 11.000 | 0.004220 |
| 7 | PHARMACOLOGY & THERAPEUTICS | 16,615 | 10.557 | 0.023490 |
| 8 | MEDICINAL RESEARCH REVIEWS | 4,974 | 9.300 | 0.005360 |
| 9 | BRITISH JOURNAL OF PHARMACOLOGY | 34,040 | 7.730 | 0.031300 |
| 10 | JOURNAL OF CONTROLLED RELEASE | 49,132 | 7.727 | 0.051270 |
| 11 | ALIMENTARY PHARMACOLOGY & THERAPEUTICS | 21,233 | 7.515 | 0.032840 |
| 12 | DRUG DISCOVERY TODAY | 15,022 | 7.321 | 0.020720 |
| 13 | Acta Pharmaceutica Sinica B | 3,560 | 7.097 | 0.006580 |
| 14 | NEUROPSYCHOPHARMACOLOGY | 26,281 | 6.751 | 0.040680 |
| 15 | European Heart Journal-Cardiovascular Pharmacotherapy | 521 | 6.696 | 0.001640 |
| 16 | CLINICAL PHARMACOLOGY & THERAPEUTICS | 16,749 | 6.565 | 0.018290 |
| 17 | DRUGS | 11,128 | 6.189 | 0.014190 |
| 18 | Neurotherapeutics | 4,998 | 6.035 | 0.009520 |
| 19 | PHARMACOLOGICAL RESEARCH | 13,517 | 5.893 | 0.019090 |
| 20 | EXPERT OPINION ON THERAPEUTIC PATENTS | 3,350 | 5.611 | 0.005090 |

| Rank | Full Journal Title | Total Cites | Journal Impact Factor | Eigenfactor Score |
|------|--|-------------|-----------------------|-------------------|
| 21 | EXPERT OPINION ON THERAPEUTIC TARGETS | 5,169 | 5.473 | 0.007470 |
| 22 | JOURNAL OF ANTIMICROBIAL CHEMOTHERAPY | 32,470 | 5.439 | 0.048840 |
| 23 | BIODRUGS | 1,803 | 5.313 | 0.002980 |
| 24 | International Journal of Nanomedicine | 23,279 | 5.115 | 0.028200 |
| 25 | EXPERT OPINION ON INVESTIGATIONAL DRUGS | 4,833 | 5.081 | 0.006230 |
| 26 | ACTA PHARMACOLOGICA SINICA | 9,668 | 5.064 | 0.009310 |
| 27 | BIOCHEMICAL PHARMACOLOGY | 27,929 | 4.960 | 0.020770 |
| 28 | ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY | 67,707 | 4.904 | 0.082760 |
| 29 | DRUG DELIVERY | 5,590 | 4.902 | 0.008420 |
| 30 | Expert Opinion on Drug Discovery | 3,427 | 4.887 | 0.006290 |
| 31 | INTERNATIONAL JOURNAL OF PHARMACEUTICS | 48,995 | 4.845 | 0.034660 |
| 32 | Expert Opinion on Drug Delivery | 6,690 | 4.838 | 0.007220 |
| 33 | CURRENT OPINION IN PHARMACOLOGY | 6,720 | 4.807 | 0.009270 |
| 34 | CNS DRUGS | 4,768 | 4.786 | 0.007670 |
| 35 | JOURNAL OF FOOD AND DRUG ANALYSIS | 3,897 | 4.727 | 0.005550 |
| 36 | Biomedicines | 1,156 | 4.717 | 0.002850 |
| 37 | Reviews of Physiology Biochemistry and Pharmacology | 805 | 4.700 | 0.000670 |
| 38 | Current Neuropharmacology | 4,178 | 4.668 | 0.006280 |
| 39 | INTERNATIONAL JOURNAL OF ANTIMICROBIAL AGENTS | 12,403 | 4.621 | 0.017890 |
| 40 | CLINICAL PHARMACOKINETICS | 8,919 | 4.604 | 0.008920 |
| 40 | EUROPEAN JOURNAL OF PHARMACEUTICS AND BIOPHARMACEUTICS | 16,822 | 4.604 | 0.014330 |
| 42 | BIOMEDICINE & PHARMACOTHERAPY | 25,449 | 4.545 | 0.041300 |

9. Druckexemplar der ausgewählten Publikation

Breuckmann P, Meinke MC, Jaenicke T, Krutmann J, Rasulev U, Keck CM, Müller RH, Klein AL, Lademann J, Patzelt A. Influence of nanocrystal size on the in vivo absorption kinetics of caffeine after topical application. Eur J Pharm Biopharm. **2021** Oct;167:57-64. doi: 10.1016/j.ejpb.2021.07.006. Epub 2021 Jul 15. PMID: 34273544.

European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics: IF (2019) 4,604, Ranking in "PHARMACOLOGY and PHARMACY" 40/270

<https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2021.07.006>

10. Lebenslauf

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

11. Komplette Publikationsliste

1. Breuckmann P, Meinke MC, Jaenicke T, Krutmann J, Rasulev U, Keck CM, Müller RH, Klein AL, Lademann J, Patzelt A. Influence of nanocrystal size on the in vivo absorption kinetics of caffeine after topical application. Eur J Pharm Biopharm. 2021 Oct;167:57-64. doi: 10.1016/j.ejpb.2021.07.006. Epub 2021 Jul 15. PMID: 34273544. **IF (2019) 4,604**
2. J. Lademann, H. Richter, S. Schanzer, M. C. Meinke, M. E. Darvin, J. Schleusener, V. Carrer, P. Breuckmann, A. Patzelt; Bedeutung des follikulären Penetrationswegs für den Wirkstofftransport mittels Nanocarriern, Hautarzt. 2019 März; 70 (3):185-192. doi:10.1007/s00105-018-4343-y **IF (2017) 0.619**

12. Danksagung

Diese Arbeit wurde von der Stiftung „Hautphysiologie“ des Stifterverbandes der Deutschen Wissenschaft unterstützt.

Ich möchte mich bei dem Team der Arbeitsgruppe Experimentelle und Angewandte Physiologie der Haut bedanken. Vor allem Frau PD Dr. Alexa Patzelt, Anna Lena Klein, Frau Dr. Fanny Knorr und Herrn Prof. Dr. Dr. Ing. Lademann für den wissenschaftlichen Input, sie hatten immer ein Ohr und einen guten Ratschlag für mich. Ohne diese wohlwollende Unterstützung hätte ich diese Arbeit wohl nie zu einem Ende gebracht.

Frau Dr. Xuezhen Zhai danke ich für die Produktion der Nanokristalle und vor allem Frau Dr. Cornelia M. Keck, die diese Produktion der Nanokristalle begleitet hat und für ihre engagierte spätere wissenschaftliche Unterstützung zu den Nanokristallen.

Außerdem möchte ich mich bei meinem Mann (Michael) und meinen Kindern (Johanna, Luisa und Lukas) für Ihre Unterstützung bedanken. Das Zurückstehen war nicht immer einfach. Auch meinen Eltern und vor allem meiner kürzlich verstorbenen Mutter danke ich für die Liebe und die allumfassende Rückendeckung.