

1. EINLEITUNG

1 Einleitung

1.1 Aufbau der Haut

Die Haut kann von außen nach innen in drei Gewebsschichten unterteilt werden: die Epidermis, die Dermis oder Corium und die Subcutis. Epidermis und Dermis bilden zusammen die Cutis, d.h. die Haut im eigentlichen Sinne. Des Weiteren zählen zur Haut auch die Hautanhangsgebilde wie Haare, Nägel und verschiedene Drüsen.

Bei der Epidermis handelt es sich um verhornendes Plattenepithel, das sich aus fünf differenzierten Zellschichten zusammensetzt. Die Regeneration erfolgt dabei in den beiden untersten Zellschichten. Mit der Zellneubildung gelangen die Zellen zur Hautoberfläche, wobei es im Verlauf zur vollständigen Keratinisierung der Zellen kommt. Die oberste Hornschicht wird in einem ständigen Prozess der Abschuppung abgeschilfert. Unter physiologischen Bedingungen nimmt die Erneuerung der Oberhaut von der Zellteilung bis zum Lösen der verhornten Zellen ungefähr 30 Tage in Anspruch. Die Epidermis ist gefäßlos und wird durch Diffusion von Nährstoffen aus dem Kapillarbett der Dermis versorgt. Der dominierende Zelltyp der Epidermis sind die Keratinozyten, die ihren Namen aufgrund der Fähigkeit zur Keratinsynthese erhalten haben. Keratine sind unlösliche Strukturproteine mit hoher Temperatur- und pH-Resistenz, die nur schwer enzymatischem Abbau zugänglich sind. Es gibt zwei unterschiedliche Strukturen, nämlich die harten α - und die weichen β -Keratine. α -Keratine bilden Haare und Nägel, β -Keratine sind Hauptbestandteil der verhornten Zellen der äußeren Epidermisschichten, werden aber auch als Verbindungssubstanz im extrazellulären Raum vorgefunden. Weitere wichtige Funktionseinheiten der Epidermis sind die Langerhans-Zellen, die für die Immunreaktion der Haut von Bedeutung sind, die sensorischen Merkelzellen sowie die Melanozyten.

Das Stratum basale bildet die innerste Schicht der Epidermis. Sie besteht aus zylindrischen Keratinozyten, Stammzellen gewährleisten die fortlaufende Regeneration der Epidermis. Das Stratum basale verläuft entlang der Papillen der Dermis. Zwischen der Basalschicht und der Dermis liegt die gefäßlose Basalmembran. Sie trennt beide Hautschichten voneinander, dient aber zugleich der Verankerung der Basalzellen und steuert in einem gewissen Umfang den Transport von Proteinen.

Das Stratum spinosum enthält bis zu sechs Lagen unregelmäßig gestalteter Zellen, die Keratine synthetisieren und noch eine geringe mitotische Aktivität aufweisen. Diese Zellen

sind durch Desmosomen miteinander verbunden, die den Zellen nach Dehydrierung ihr „stacheliges Aussehen“ verleihen.

Im anschließenden Stratum granulosum beginnt die Verhornung. Es umfasst je nach Dicke der Verhornung eine bis drei Lagen flacher Zellen, die grobe Körnchen aus Keratohyalin, einer Vorstufe des Keratins, aufweisen.

Die Zellen des Stratum lucidum sind kernlos und zeichnen sich durch hohe enzymatische Aktivität aus. Es wird die Keratinisierung fortgesetzt, Keratohyalin granula werden zu Eleidin, einem azidophilen Lipoprotein, das die Epidermis vor der Einwirkung wässriger Lösungen schützt, abgebaut.

Das Stratum corneum besteht aus kernlosen, keratinisierten Zellen, die als Korneozyten bezeichnet werden. Sie liegen dachziegelartig übereinander und sind durch Keratohyalin sowie durch Tonofibrillen fest miteinander verbunden. Das Stratum corneum umfasst etwa 15 - 20 Zellschichten, wobei die oberste Schicht als Hautschuppen verloren geht.

An die Basalmembran schließt sich innen die Dermis an. Es ist ein gefäß- und nervenreiches Bindegewebe, das histologisch in zwei Schichten unterteilt wird: das äußere Stratum papillare und das innere Stratum reticulare. Der Unterschied der beiden Schichten besteht in der Dichte und Anordnung der Bindegewebsfasern.

Das Stratum papillare ist durch vorgestülpte Bindegewebszapfen, die Papillen, fest mit der Epidermis verbunden. Im Bereich der Papillen befinden sich Kapillarschlingen, welche die Versorgung der gefäßlosen Epidermis sicherstellen, sowie freie Nervenendigungen und initiale Lymphgefäße enthalten. Das Bindegewebe selbst besteht aus Fibrozyten (Ruheform der Fibroblasten) und ist mit elastischen Kollagenfasern durchzogen. Der Faserzwischenraum ist mit extrazellulärer Matrix gefüllt, in der sich mobile Blut- und Gewebezellen bewegen können.

Hingegen besteht das Stratum reticulare aus miteinander verflochtenen, kräftigen Faserbündeln, zwischen denen elastische Fasernetze eingelagert sind. Diese Struktur gibt der Haut ihre Elastizität, so dass sie sich Bewegungen und Volumenschwankungen des Organismus anpassen kann.

Der charakteristische Zelltyp der Dermis ist der Fibrozyt, der in seiner aktiven Form als Fibroblast eine Reihe von Substanzen zum Aufbau neuen Gewebes bereitstellt. Fibroblasten synthetisieren und sezernieren Vorstufen von Kollagen, Elastin und Proteoglykanen, die außerhalb der Zelle zu Kollagen- und Elastinfasern ausreifen und in amorpher Form die gelartige extrazelluläre Matrix bilden.

Die Bindegewebsfasern der Dermis bestehen aus dem Strukturprotein Kollagen, das ungefähr 60 – 80 % des Trockengewichts des Gewebes ausmacht. Von den vier unterschiedlichen Kollagen-Typen, die im menschlichen Körper vorkommen, befindet sich in der Dermis vorwiegend der faserbildende Kollagen - Typ I. Bei dem Aufbau von Kollagenfasern werden intrazellulär die charakteristischen Aminosäuren des Kollagens, Glyzin und Prolin/Hydroxyprolin sowie ein weiteres Drittel anderer Aminosäuren, zu einer Dreifach-Helix als Prokollagen verbunden und nach außen in den extrazellulären Raum abgegeben. Dort erfolgen weitere enzymatische Modifikationen, wodurch das noch lösliche Prokollagen in unlösliche Kollagenfibrillen überführt wird, die schließlich zu Kollagenfasern zusammengesetzt werden. Elastin, eine spiralige Polypeptidkette mit hochelastischen Eigenschaften ermöglicht die reversible Dehnung der Haut.

Darüber hinaus befinden sich in der Dermis Mastzellen, deren Granula Heparin und Histamin enthalten, Makrophagen, die aus Monozyten des Blutes hervorgehen, sowie Lymphozyten.

Die Zellen des Gewebes kommunizieren mit den von ihnen sezernierten Stoffen zu einem komplexen dreidimensionalen Netzwerk, das als extrazelluläre Matrix bezeichnet wird. Eine solche Matrix ist in allen Geweben vorzufinden, Struktur und Zusammensetzung weisen gewebsspezifische Unterschiede auf.

1.2 Glucocorticoide zur Therapie des atopischen Ekzems und des Bronchialasthmas

Trotz der kürzlichen Einführung von Tacrolimus und Pimecrolimus in die Therapie der atopischen Dermatitis, sind Glucocorticoide (GC) nach wie vor Mittel der Wahl bei dieser und auch anderen entzündlichen Hauterkrankungen (Artik and Ruzicka, 2003; Charman and Williams, 2003). Darüber hinaus sind GC wesentliche Arzneistoffe bei der Therapie des Bronchialasthmas (Leone et al., 2003).

GC zeichnen sich in der Therapie des atopischen Ekzems durch ihren antiinflammatorischen Effekt aus. Die Proliferationshemmung ist die Hauptursache für die unerwünschten Wirkungen der GC und die Schädigung des Bindegewebes. Neben der stärkeren Wirkung der Glucocorticoidtherapie ist die Therapieerfahrung über fünf Jahrzehnte gegenüber den Calcineurin-Inhibitoren von Vorteil (Niedner, 2003).

1.2.1 Wirkweise der Glucocorticoide

Dennoch wurde erst in letzter Zeit der Wirkmechanismus dieser Pharmaka aufgeklärt. Unterschiedliche Glucocorticoidrezeptor (GR) Subtypen und Signalwege sind nun bekannt (Bamberger et al., 1995; Barnes and Adcock, 2003; Oakley et al., 1996). Bei höheren Arzneistoffkonzentrationen werden auch nicht-rezeptorvermittelte bzw. nicht-genomische Effekte bedeutsam (Buttgereit, 2000; Falkenstein et al., 2000). Die Signalwege regeln die Aktivierung und Repression sogenannter Zielgene (De Bosscher et al., 2003), wobei erhebliche Unterschiede zwischen den Zielzellen bestehen. Durch Bindung an bestimmte Nukleotidsequenzen in DNA-Promotor-Regionen, die Glucocorticoid-responsiven Elemente (GRE), können GC die Expression von Zielgenen fördern („Transaktivierung“) bzw. durch Bindung an negative GRE (nGRE) hemmen. Meist beruht aber eine Hemmung der Genexpression auf der Blockade anderer Transkriptionsfaktoren, wie z.B. des Aktivatorproteins-1 (AP-1) und des Nuklearen Faktors κ B (NF κ B, „Transrepression“) oder auf der Interferenz mit Histon-Acetyltransferasen bzw. -deacetylasen und Kofaktoren (De Bosscher et al., 2003).

1.2.2 Glucocorticoidtherapie des atopischen Ekzems und des Bronchialasthmas

Zur Behandlung von entzündlichen Hauterkrankungen dienen seit einigen Jahren insbesondere nicht-halogenierte GC-Doppelester wie z.B. Prednicarbat (PC), die sich durch eine starke antiinflammatorische und immunsuppressive Aktivität bei einer schwachen Atrophogenität auszeichnen (Schäfer-Korting et al., 1993). Die Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen und Medizinischen Fachgesellschaften (AWMF) hat eine Leitlinie zur topischen Dermatotherapie mit GC erarbeitet. In dieser Leitlinie werden die GC in zwei Klassen eingeteilt. Klasse-I enthält GC mit ausgeglichenem Verhältnis von erwünschten zu unerwünschten Wirkungen, bei GC der Klasse-II überwiegen die erwünschten gegenüber den unerwünschten Wirkungen deutlich. PC und andere Klasse-II GC hemmen die Bildung proinflammatorischer Zytokine, insbesondere von Interleukin-1 α (IL-1 α) in Keratinozyten der Epidermis (Lange et al., 1997). Dies ist von großer Bedeutung, da Keratinozyten die wichtigste Quelle von Entzündungsmediatoren innerhalb der Haut sind (Groves et al., 1995; Kupper and Groves, 1995; Murphy et al., 2000). Des Weiteren reduzieren GC die Zahl der T-Lymphozyten im Gewebe durch antiproliferative und proapoptotische Effekte, die wiederum auf die Hemmung der IL-Synthese durch Steroide zurückgeführt werden können (Almawi et

al., 2002; Amsterdam and Sasson, 2002). Auch die verlängerte Überlebenszeit der eosinophilen Granulozyten beim Atopiker wird durch die Apoptose induzierende Wirkung der GC reguliert (Barnes, 1998). Zusätzlich unterstützen die vasokontrahierenden und gefäßabdichtenden Effekte den schnellen Rückgang der Rötung, Bläschen- und Ödembildung. Die überschießende Verhornung, Schuppen- und Krustenbildung der Epidermis nimmt ab. So können verschiedene Symptome der atopischen Dermatitis schnell und effektiv durch eine lokale GC Therapie gebessert werden (Niedner, 1991).

Eingeschränkt wird die topische Therapie mit GC durch die Atrophie der Haut durch Inhibierung der Kollagensynthese von Fibroblasten (Koivukangas et al., 1995; Lehmann et al., 1983; Oikarinen and Autio, 1991; Russell et al., 1995), wodurch es zu einer Abnahme der elastischen Fasern und der Kollagenfasern kommt (Oikarinen et al., 1992; Siddiqui et al., 1992). Die initial reversible Hautverdünnung des perivaskulären Bindegewebes geht bei einer Fortsetzung der Steroidapplikation in eine irreversible Degeneration elastischer Fasern mit der Bildung von Striae (Hautdehnungsstreifen) und ebenfalls irreversiblen Teleangiektasien (Erweiterung oberflächlicher Hautgefäße) über (Heng et al., 1990). Darüber hinaus hemmen GC die Chemotaxis von Fibroblasten (Hatz, 1998; Hein et al., 1994), so dass Wundheilungsstörungen induziert werden (Cutroneo, 2002). Diese Effekte sind bei Klasse-II GC wenig ausgeprägt (Lange et al., 1997). Als weitere lokale, unerwünschte Wirkung muss eine mögliche Allergisierung durch die GC selbst beachtet werden (Niedner, 1991). Systemische Nebenwirkungen treten vor allem bei längerer Anwendung von hochpotenten fluorierten GC unter Okklusion oder auf Hautarealen dünnerer Hornschicht, wie zum Beispiel im Gesicht, auf. Zu beachten ist insbesondere die Gefahr einer Nebennierenrindenatrophie und von Wachstumsstörungen bei Kindern (Hatz, 1998). Die systemischen Nebenwirkungen können jedoch durch Einsatz eines GC von adäquater Wirkstärke vermieden werden und sind in der Regel reversibel (Niedner, 1991).

Neue Trends zeigen Möglichkeiten auf, GC beim schweren atopischen Ekzem auch zur Rezidivprophylaxe einzusetzen (Van Der Meer et al., 1999; Veien et al., 1999).

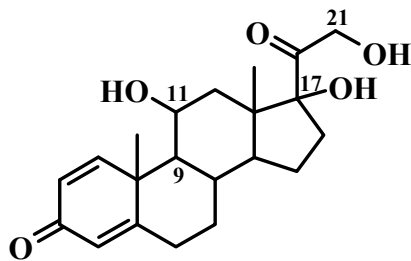
1.2.3 Strukturoptimierung von Glucocorticoiden

Durch Veränderungen am Steroidmolekül können gezielt pharmakodynamische und pharmakokinetische Eigenschaften betont, reduziert und im Idealfall auch eliminiert werden. Die Entwicklung von GC zur topischen Therapie gliedert sich in verschiedene Stufen. Zur ersten Generation gehören Substanzen wie Hydrocortison und Prednisolon (PD) (*Abb. 1*), die

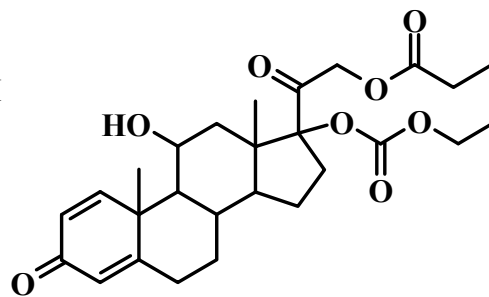
nur über eine geringe Wirkstärke verfügen. Die zur zweiten Generation gehörenden Stoffe Dexamethason (DEX) und Betamethason-17-valerat (BMV) zeichnen sich durch eine Fluorierung an der Position C-9 aus, die zu einer stärkeren Rezeptoraffinität führt. Die dritte Generation wurde zusätzlich an Position C-21 halogeniert, wie dies z.B. bei Clobetasolpropionat (CLP) und Mometasonfuorat (MOF) der Fall ist (*Abb. 1*). Mit der deutlich erhöhten Potenz nehmen neben dem therapeutischen Effekt jedoch meist auch die unerwünschten Wirkungen zu.

Die für die topische Therapie vorteilhafte Erhöhung der Lipidlöslichkeit wurde durch eine Alkylierung an Position C-17 und C-21 nichthalogenerter GC erreicht, wobei gleichzeitig die Halbwertszeit sinkt. Die Abspaltung der Estergruppe an C-17 führt zu weniger wirksamen oder unwirksamen GC. Dieser Effekt wird beispielsweise bei PC in der topischen Therapie von Hauterkrankungen und bei Budesonid (BD) in der Asthmatherapie ausgenutzt.

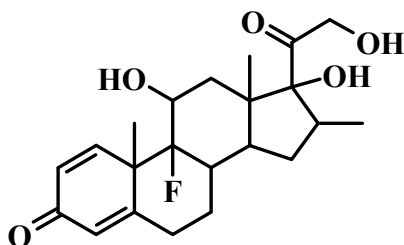
Die Vertreter dieser Gruppe zeichnen sich in der topischen Therapie durch eine verbesserte Nutzen-Risiko-Relation aus. Insbesondere ist der PD-Doppelester PC hervorzuheben (Schäfer-Korting et al., 1996), das in klinischen Versuchen eine starke antientzündliche, bei gleichzeitig nur schwach ausgeprägter antiproliferativer, Wirkung zeigt.



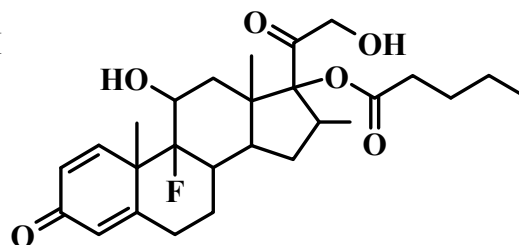
Prednisolon (PD)



Prednicarbat (PC)



Dexamethason (DEX)



Betamethason-17-valerat (BMV)

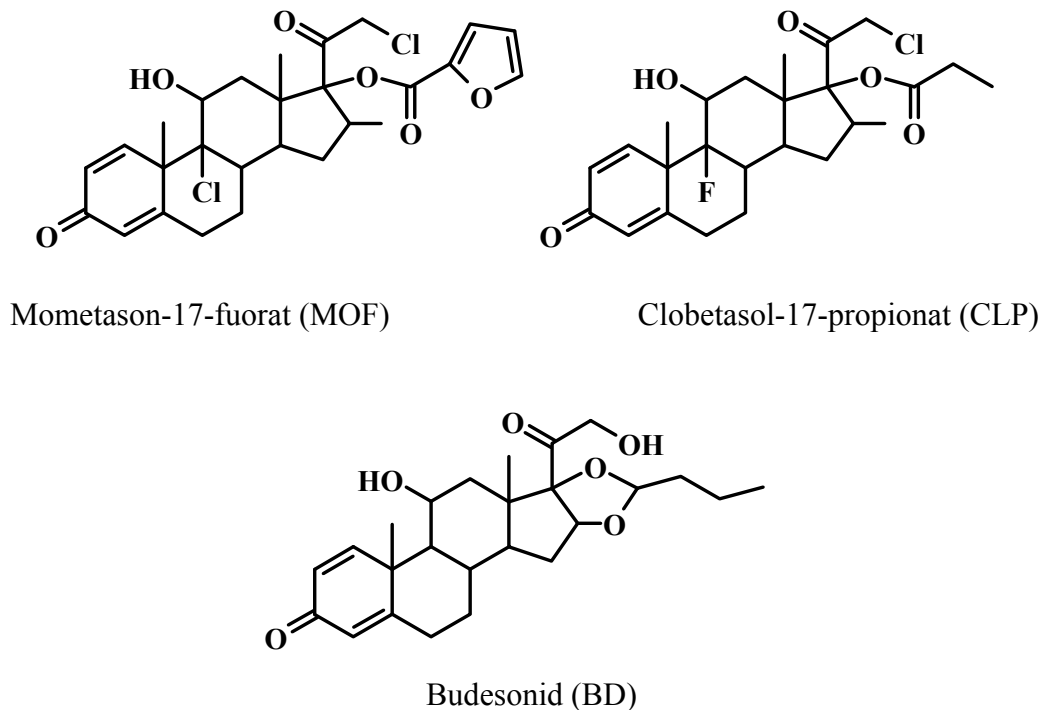


Abb. 1: Strukturformeln verschiedener Glucocorticoide

1.2.4 Nutzen-Risiko-Relation

Wesentlich ist die Differenzierung von antiinflammatorischer und antiproliferativer Wirkung, da die Atrophie der Haut die gefürchtetste unerwünschte Wirkung in der topischen Glucocorticoidtherapie von entzündlichen Hauterkrankungen darstellt und bei Patienten zu Noncompliance, sogar bis zur vollständigen Ablehnung der Therapie, führt (Charman and Williams, 2003).

Die Entwicklung von halogenierten GC-Derivaten führte zu hochpotenten Wirkstoffen mit stark gesteigerter Rezeptoraffinität (Hammer et al., 2003). Allerdings stieg in gleichem Maße wie die Wirkstärke auch das Nebenwirkungspotential (Brazzini and Pimpinelli, 2002).

Nichthalogenierte GC-17,21-Doppelester durchdringen aufgrund ihrer Lipophilie das Stratum corneum gut, Hydrolyse des Esters in Position C-21 kann die Substanz zusätzlich aktivieren. Anschließend entstehen durch Acylmigration der Säure von Position C-17 nach C-21 und der darauf folgenden Spaltung des C-21 Esters weniger stark wirksame GC. Bei Keratinozyten und Fibroblasten wurden Unterschiede in der Hydrolyserate gefunden (Gysler et al., 1999;

Gysler et al., 1997). Zu diesen auch als GC der Klasse-II bezeichneten Arzneistoffen gehören Methylprednisolonaceponat (Methylprednisolon-17-propionat-21-acetat), PC (Prednisolon-17-ethylcarbonat-21propionat, Prednicarbat) und Hydrocortisonaceponat, die in klinischen Studien bei guter antiinflammatorischer Wirksamkeit sowohl ein signifikant niedrigeres Atrophierisiko als auch keine systemischen Nebenwirkungen zeigten (Brazzini and Pimpinelli, 2002; Hanifin, 1994; Korting et al., 2002; Prakash and Benfield, 1998; Schäfer-Korting et al., 1996). Auch in vitro Versuche konnten eine starke Hemmung der Interleukinfreisetzung bei Keratinozyten zeigen, während die Interleukinsynthese und die Proliferation von Fibroblasten deutlich weniger beeinträchtigt wurden (Lange et al., 1997; Lange et al., 2000). Die Ursachen für die pharmakodynamischen Unterschiede und die Keratinozyten-Selektivität sind noch ungeklärt.

Die entsprechenden Signalwege gezielt durch noch selektiver wirksame Substanzen anzusprechen, erscheint als eine attraktive Möglichkeit zur Verbesserung der Nutzen-Risiko-Relation bei der Behandlung von Ekzemen (Schackert, 2000) und Bronchialasthma (Barnes and Adcock, 2003; Croxtall et al., 2003; Croxtall et al., 2002; Kurucz et al., 2003). Selektive Glucocorticoidrezeptoragonisten (SEGRAs) sollen den Glucosestoffwechsel weniger beeinflussen, als dies die konventionellen GC tun (Belvisi et al., 2001; De Bosscher et al., 2003; Vayssiere et al., 1997). Dies könnte einen Vorteil für die systemische Therapie und die Lokaltherapie bei Bronchialasthma, nicht aber für die topische Anwendung bei Ekzemen bedeuten. Allerdings haben SEGRAs – anders als in der Zellkultur – im Tierversuch nicht überzeugt.

1.3 Nanopartikuläre Trägersysteme zur topischen Anwendung

Durch die äußerst vielfältigen Angriffspunkte von GC und die Konvergenz von Signalwegen würde eine Strukturoptimierung nur einen graduellen Fortschritt in der Nutzen-Risiko-Relation bewirken. Da zunehmend eine Langzeitanwendung topischer GC nicht nur bei Bronchialasthma, sondern auch bei schweren Formen des atopischen Ekzems empfohlen wird (Vermeer et al., 2003), ist eine gute Verträglichkeit essentiell. Daher ist ein zweiter Ansatz zur Verbesserung der Nutzen-Risiko-Relation von Interesse, der auf einem Drug Targeting zur Zielzelle mittels partikulärer Trägersysteme beruht (Santos Maia et al., 2002). Es konnte bereits gezeigt werden, dass nach einer Behandlung mit CLP-beladenen Solid Lipid Nanoparticles (SLN) Entzündung und Juckreiz bei Patienten mit chronischem Ekzem

gebessert wurden. Bei dieser Untersuchung war die partikuläre Präparation der Referenz signifikant überlegen (Kalariya et al., 2005). Auch bei der Verwendung von Liposomen kann das atrophogene Potential von Triamcinolonacetonid stark verringert werden, da die Dosierung um das Zehnfache gesenkt werden kann (Fesq et al., 2003).

Aus diesem Grund spielten in den letzten Jahren zunehmend die Entwicklung und Charakterisierung mikro- und nanopartikulärer Arzneistoffträgersysteme eine Rolle in der galenischen Forschung. Diese Trägersysteme bieten Vorteile bei der topischen Therapie, da sie eine erhöhte Arzneistoffpenetration in die Haut ermöglichen. Ist der Arzneistoff in der Partikelmatrix inkorporiert, kann eine kontrollierte Freisetzung des Arzneistoffs möglich werden. Neben der Erhöhung der Arzneistoffpenetration ist die gezielte Anreicherung des Arzneistoffs in bestimmten Hautschichten, das sogenannte Drug Targeting, von besonderem Interesse. Mit Hilfe dieses Targetings sollen die GC in den obersten Hautschichten konzentriert werden, um so die Gefahr unerwünschter systemischer Wirkungen zu verringern. Als nanopartikuläre Trägersysteme fanden in unserem Arbeitskreis bisher die sogenannten SLN und Nanostructured Lipid Carriers (NLC) Verwendung, die im Folgenden vorgestellt werden.

1.3.1 Solid Lipid Nanoparticles (SLN)

SLN stellen ein alternatives Trägersystem zu Polymer- und Albuminpartikeln, Liposomen und Emulsionen dar. Die Partikelgröße bewegt sich im Bereich von ca. 50 – 1000 nm. Die Matrix dieses Trägersystems besteht aus festem Lipid, vorzugsweise aus physiologischen Lipiden, weshalb SLN eine sehr gute in vivo Verträglichkeit besitzen. Zur physikalischen Stabilisierung dieser hochdispersen und daher energiereichen Systeme müssen Tenside zugesetzt werden. SLN zeichnen sich aufgrund der eingesetzten Lipide und Tenside durch eine gute Hautverträglichkeit aus. Von Vorteil ist weiterhin, dass sie im Vergleich mit anderen nanopartikulären Trägersystemen sowohl ohne organische Lösungsmittel als auch problemlos im „large scale“ Verfahren hergestellt werden können (Mehnert and Mäder, 2001).

Die Herstellung erfolgt durch Heiß- oder für die Einarbeitung thermolabiler oder hydrophiler Wirkstoffe durch Kalthomogenisation. Bei der Heißhomogenisation wird das als Matrix verwendete Lipid geschmolzen und der Arzneistoff darin gelöst bzw. dispergiert. Die erhitzte Lipidphase wird in einer auf gleicher Temperatur befindlichen wässrigen Tensidlösung mit einem Rührer dispergiert. In Abhängigkeit vom Schmelzpunkt des Lipids liegt die

Temperatur dabei etwa zwischen 40 - 90 °C. Die so erhaltene Präemulsion wird im Anschluss in einem Kolben-Spalt-Homogenisator bei Drücken zwischen 200 – 1500 bar im heißen Zustand homogenisiert. Es entsteht eine Emulsion, deren Lipidphase beim Erkalten rekristallisiert.

Bei der Kalthomogenisation wird der Arzneistoff in das geschmolzene Lipid eingearbeitet, anschließend die Arzneistoff-Lipidmischung abgekühlt und nach der Rekristallisation gemahlen. Die erhaltenen Lipidmikropartikel (ca. 50 – 100 µm) werden dann in einer kalten Tensidlösung dispergiert und diese Suspension anschließend hochdruckhomogenisiert. Die bei der Hochdruckhomogenisation auftretenden Kavitations- und Scherkräfte sind ausreichend groß, um die Lipidmikropartikel in Lipidnanopartikel zu überführen. Die Kalthomogenisation bietet insbesondere für hydrophile Arzneistoffe Vorteile, da diese sich bei der Heißhomogenisation von der flüssigen Lipidphase in die Wasserphase umverteilen würden.

Ein wesentliches Problem bei SLN ist eine mögliche Veränderung der Kristallstruktur nach der Herstellung. Dies kann zur physikalischen Destabilisierung des Systems führen, die sich als Aggregation und Gelbildung manifestiert. Diese Instabilität ist von der Zusammensetzung des Lipids sowie den Lagerungsbedingungen abhängig. Ferner kann es durch Modifikationsumwandlungen zu einer Umverteilung des Wirkstoffs aus dem Kristallgitter an die Partikeloberfläche kommen, was zu einer schnellen Wirkstofffreisetzung führt (Jenning, 1999).

1.3.2 Nanostructured Lipid Carriers (NLC)

Eine Weiterentwicklung der SLN stellen die Nanostructured Lipid Carriers (NLC) dar, die eine höhere Arzneistoffbeladung als SLN erlauben. Die schlechtere Beladungskapazität der SLN liegt darin begründet, dass bei der Kristallisation der festen Lipidmatrix der Arzneistoff Störstellen im Kristallgitter verursacht. Diese Störstellen werden zeitabhängig durch Auslagerung des Arzneistoffs ausgeglichen und können so zur Instabilität der SLN-Zubereitung führen.

Zur Herstellung dieser Träger werden Mischungen von bei Raumtemperatur festen und flüssigen Lipiden eingesetzt (Müller et al., 2002), wodurch der in SLN vorliegende Ordnungsgrad der Lipidkristallstruktur teilweise oder vollständig aufgehoben wird. Eine Erhöhung der Beladungskapazität und eine langfristig stabile Inkorporation von Wirkstoffen sollen dadurch möglich werden.

Bisher wurden drei mögliche Modelle der Kristallstruktur von NLC beschrieben (Abb. 2), die durch unterschiedliche Herstellungsverfahren oder Zusammensetzung der Lipide entstehen können (Müller et al., 2002).

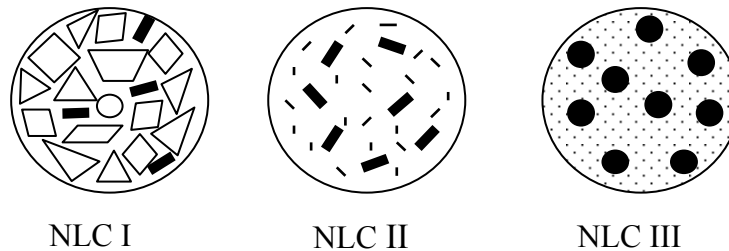


Abb. 3: NLC Strukturen **NLC I**: „Imperfect crystal type“ sind NLC, die eine relativ hohe Kristallinität aufweisen und den Wirkstoff in durch das flüssige Lipid erzeugten Fehlstellen des Kristallgitters einschließen können. **NLC II**: Amorphe NLC zeichnen sich durch Fehlen des Kristallgitters aus, wodurch die Arzneistoffverdrängung verhindert wird. **NLC III**: Multiple NLC sind Träger, bei denen das flüssige Lipid in der festen Matrix in Form von Tröpfchen verteilt ist, in denen der Wirkstoff gelöst vorliegt.

Die Typ III-Struktur wurde für Retinol beschrieben (Jenning et al., 2000), andere Arbeiten weisen aber auf eine Lokalisation der Ölphase in den Randbereichen der Partikel (Radtko, 2002) oder Anlagerung der Öltröpfchen auf der Partikeloberfläche hin (Jores et al., 2005; Zimmermann and Müller, 2001). Befindet sich das flüssige Lipid nicht im Inneren der festen Lipidmatrix, ist eine Beeinflussung der Kristallstruktur durch das flüssige Lipid unwahrscheinlich. Die unterschiedlichen Möglichkeiten der Verteilung des flüssigen Lipids in NLC Zubereitungen werden u.a. in Kapitel 1.3.4 beschrieben.

1.3.3 Targetingeffekte durch Nanopartikuläre Trägersysteme

SLN wurden bezüglich einer Anreicherung des Wirkstoffs am Wirkort, dem sogenannten Targeting, intensiv untersucht. In vergleichenden Untersuchungen zwischen PC-SLN und der handelsüblichen Creme an rekonstruierter Epidermis wurden nach sechsständiger Einwirkzeit für SLN eine dreifach höhere Glucocorticoidkonzentration (inklusive der

Prednicarbatmetabolite) im Akzeptormedium gefunden (Maia et al., 2000). Versuche an exzidiierter Humanhaut ergaben zudem eine im Vergleich zur Creme starke Anreicherung des Wirkstoffs durch SLN vor allem in den obersten Hautschichten (0 - 100 μm) (Santos Maia et al., 2002). Ein Epidermis-Targeting-Effekt wurde auch bei Applikation von Retinol-SLN an Schweinehaut (Jenning et al., 2000) und Cyproteronacetat an Humanhaut (Stecova et al., 2007) beobachtet. BMV beladene SLN zeigten dagegen keinen Targetingeffekt. Untersuchungen mittels der Rastersondenmikroskopie (PS) ergaben für BMV-SLN nur eine schwache Wirkstoff-Assoziation an die Trägersystemoberfläche, das System war bereits bei niedrigeren als in den Penetrationsversuchen verwendeten Konzentration gesättigt (Sivaramakrishnan et al., 2004). Auch Nilrot-beladene SLN bewirkten eine verstärkte Aufnahme in die Haut, jedoch kein Epidermis-Targeting. Durch die PS konnte gezeigt werden, dass der Farbstoff fast vollständig inkorporiert in der Lipidmatrix vorliegt (Lombardi-Borgia et al., 2005). Daher könnte der Targetingeffekt von der Art der Assoziation des Wirkstoffs an dem Trägersystem abhängig sein.

Bezüglich der Beeinflussung der kutanen Penetration bzw. Permeation von Wirkstoffen durch NLC Zubereitungen gibt es bisher nur wenige Untersuchungen. Retinol-NLC zeigten eine erhöhte Penetration des Wirkstoffes gegenüber einer Nanoemulsion (Jenning et al., 2000). NLC waren hinsichtlich der Hautpenetration von Nilrot und Cyproteronacetat den SLN unterlegen (Lombardi-Borgia et al., 2005; Stecova et al., 2007), noch schlechter schnitten NE ab. Durch die Einarbeitung von Ciclosporin A –NLC und –SLN in eine Creme konnten langzeitstabile Formulierungen hergestellt werden, die aber beträchtlich unterschiedliche Freisetzungprofile aufwiesen (Müller et al., 2002; Muller et al., 2002).

1.3.4 Modellvorstellungen für Nanopartikuläre Trägersysteme

Für NE, SLN und NLC können die im Folgenden beschriebenen Strukturen angenommen werden (*Abb. 4*). Bei der NE handelt es sich um flüssige Fetttröpfchen die in einer wässrigen Phase dispergiert vorliegen. Zur Stabilisierung dieses hochdispersen Systems wird ein Tensid zugesetzt, das die Oberfläche der Fetttröpfchen umgibt. Je nach Art und Konzentration des verwendeten Tensids können zusätzlich Mizellen gebildet werden. Die Modellvorstellung für SLN ist analog zu der für die NE, der Unterschied besteht jedoch in der Verwendung eines festen Lipids. Ob das Tensid, wie in *Abb. 4* gezeigt, nahezu vollständig in die kristallisierte Lipidmatrix eingeschlossen ist oder ob bei dem Kristallisationsprozess Teile der

Tensidmoleküle aus der Kristallstruktur herausragen, ist noch ungeklärt. Auslagerung könnte die Mizellbildung fördern.

Die Partikelform von SLN als auch von NLC wird in der Literatur sowohl als kugel- (Müller et al., 2000) als auch als plättchenförmig (Braem et al., 2007; Jores et al., 2004) beschrieben. Die entstehende Partikelform ist vermutlich von dem verwendeten Lipid sowie den Herstellungsbedingungen abhängig.

Von besonderem Interesse sind bei den genannten Trägersystemen die Lokalisation des Arzneistoffs bzw. dessen Interaktion mit dem Träger und die sich daraus ergebenden Effekte bezüglich des Targetings. Auch die Partikelform könnte einen bedeutenden Einfluss auf den Targetingeffekt haben.

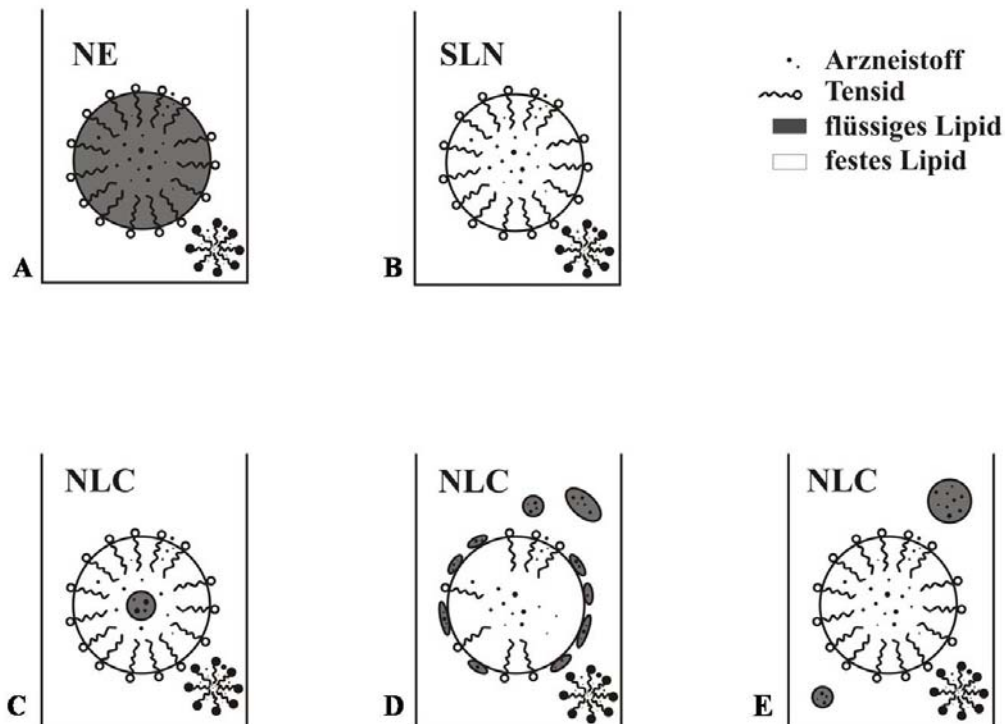


Abb. 4: Modellvorstellungen für die Trägersysteme A) Nanoemulsion (NE), B) Solid Lipid Nanoparticles (SLN) und C-E) Nanostructured Lipid Carriers (NLC). Für NLC kommen hierbei drei unterschiedliche Modelle in Betracht (Aus grafischen Gründen wurde auf die Abbildung der Tensidschicht auf dem flüssigen Lipid der NLC verzichtet). In jedem dargestellten Trägersystem ist die Mizellbildung grundsätzlich möglich.

1.4 Beeinflussung der Apoptose durch Glucocorticoide und Sphingosin-1-phosphat

Wie bereits in Kapitel 1.2 beschrieben, ist die gute antiinflammatorische Wirkung der GC mit einer Proliferationshemmung der Fibroblasten verbunden. Dies kann in der Langzeittherapie zur Atrophie der Haut führen (Korting et al., 2002; Lange et al., 2000; Ponec et al., 1980; Ramalingam et al., 1997; Schäfer-Korting et al., 1996). Die antiproliferative Wirkung der GC ist häufig von der Induktion von Apoptose begleitet (Amsterdam and Sasson, 2002). So konnte gezeigt werden, dass Methylprednisolon der mesangialen Hyperzellularität bei der Glomerulonephritis durch Hemmung proliferierender Zellen und der Auslösung von Apoptose entgegen wirkt (Maruyama et al., 2001). Wegen der Apoptose induzierenden Wirkung bei Lymphozyten sind GC auch in der Therapie der Leukämie wirksam (Distelhorst, 2002). Ferner ist die antiinflammatorische Wirkung der GC auch über die proapoptotische Wirkung auf T-Lymphozyten und Monozyten erklärbar (Sikora et al., 1996). Im Gegensatz dazu können GC in anderen Zellen auch zellprotektive Eigenschaften haben (Evans-Storms and Cidlowski, 2000; Messmer et al., 1999; Moran et al., 2000; Webster and Cidlowski, 1999).

Bei Hautzellen wurden ebenfalls unterschiedliche Effekte gefunden. Bei Fibroblasten wirkt Dexamethason (DEX) zwar antiproliferativ, löst aber keine Apoptose aus. Interessanterweise kann es sogar in wachstumshemmenden Konzentrationen vor der mit $\text{TNF}\alpha$ und Actinomycin D induzierten Apoptose schützen. Dieser Effekt wurde in Keratinozyten nicht gefunden. Obwohl DEX die durch $\text{TNF}\alpha$ ausgelöste Aktivität von $\text{NF}\kappa\text{B}$ hemmt, wurde dieser Mechanismus für die Vermittlung des zellprotektiven Effekts mittels spezifischer $\text{NF}\kappa\text{B}$ – Inhibitoren ausgeschlossen (Hammer et al., 2003).

Dagegen konnte mit Hilfe des Sphingosinkinase Inhibitors N,N-Dimethylsphingosin (DMS) der antiapoptotische Effekt der GC nahezu aufgehoben werden. DMS hemmt die Bildung des Sphingosin-1-phosphats (S1P), das vor der durch mit $\text{TNF}\alpha$ und Actinomycin D induzierten Apoptose schützen kann. Darüber hinaus steigern GC die Bildung von S1P in Fibroblasten. Daher könnte dieses Sphingolipid bei der Vermittlung des zytprotektiven Effekts der GC wesentlich sein (Hammer et al., 2003).

1.5 Zielsetzung

Da die Hautatrophie die am meisten gefürchtete unerwünschte Wirkung der topischen GC bei einer Lokalthherapie der Haut ist, sollten verschiedene GC in dieser Hinsicht vergleichend geprüft und eine Nutzen-Risiko-Relation erstellt werden. Dazu wurde an Zellkulturen die Beeinflussung der Viabilität und der Proliferation durch die Steroide untersucht. Im Anschluss daran wurde deren antiinflammatorische Wirkung ermittelt und mit den Daten aus Proliferation und Viabilität korreliert.

Zudem sollte der zugrundeliegende Signalweg des antiapoptotischen Effekts von GC in der Fibroblastenkultur näher untersucht werden. Da die Bildung von antiapoptotisch wirkendem S1P durch GC hochreguliert wird, sollte auch die mögliche Beeinflussung der Apoptose durch das synthetische Analogon FTY720-Phosphat (FTY720P) bzw. dessen Prodrug FTY720 untersucht werden.

Da auch mittels eines Drug Targetings die Nutzen-Risiko-Relation verbessert werden könnte, wird auch dieser Weg in dem Dissertationsvorhaben verfolgt. Dazu sollten die physikalisch-chemischen Grundlagen einer GC-Träger Assoziation und Möglichkeiten der Modulation untersucht werden. Partikuläre Arzneistoffträger vom Typ SLN, NLC und NE wurden hergestellt, mit Modellstoffen und Steroiden beladen und charakterisiert. GC können auf unterschiedliche Art und Weise an die Partikel assoziiert werden. Da gemäß den bisherigen Erfahrungen nur durch die stabile Beladung des Trägers mit dem Wirkstoff ein Targeting möglich ist, sollten mit Elektronen-Spin-Resonanz (ESR), signalgebenden Modellsubstanzen (Spinlabel) sowie 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. Darüber hinaus waren die Klärung der Partikelform der Zubereitungen sowie die Verteilung des flüssigen Lipids in NLC Zubereitungen von Interesse.