

3. ERGEBNISSE

3 Ergebnisse

3.1 Viabilitätsbestimmung

Topische GC sind Mittel der Wahl bei der Therapie des atopischen Ekzems und des Bronchialasthmas. Die bei der Therapie dieser Erkrankungen erforderliche Langzeitanwendung stellt hohe Anforderungen an die Verträglichkeit. Aus diesem Grund sollte ein breites Spektrum von GC in der Zellkultur getestet werden, um dann für jede Substanz eine Nutzen-Risiko-Relation erstellen zu können.

Begonnen wurden diese Untersuchungen mit der Bestimmung des Effekts von GC auf die Viabilität von primären Keratinozyten und Fibroblasten sowie auf die Zelllinie A549. Wie *Abb. 10* zeigt, steigern GC die Viabilität von Keratinozyten. Erst ab etwa einer Konzentration von mehr als 10^{-5} M üben sie einen zytotoxischen Effekt aus. Der Anstieg der Viabilität kurz vor der zytotoxischen Konzentration liegt vermutlich in einer finalen Aktivierung des Enzymsystems der Mitochondrien begründet, um dem Zelltod entgegen zu wirken.

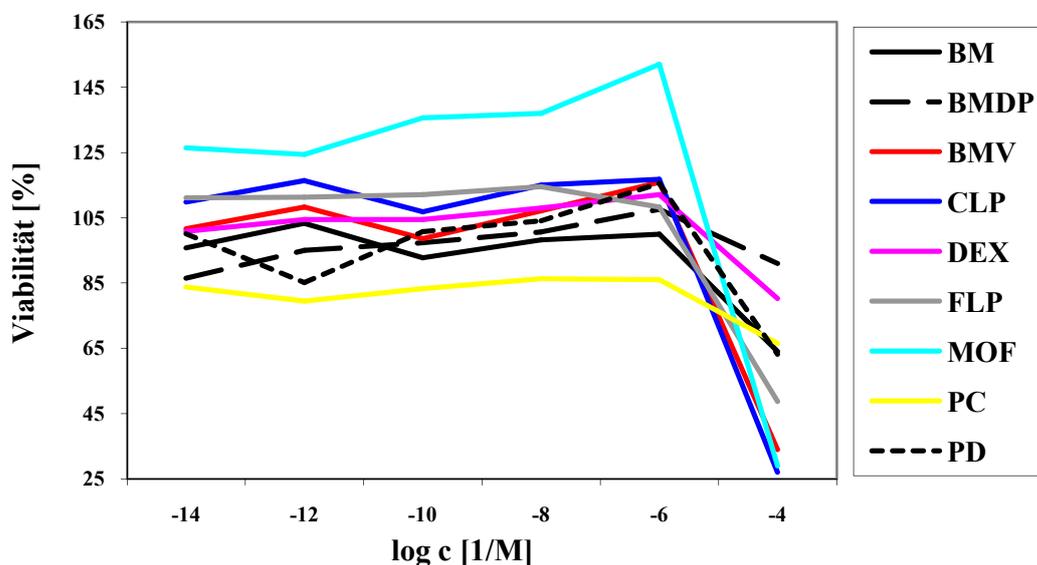


Abb. 10: MTT-Test für Keratinozyten. Stimulation mit den angegebenen GC für 48 h.

Bei Fibroblasten üben GC in therapeutisch relevanten Konzentrationen keinen Effekt auf die Viabilität aus, ab Konzentrationen größer als 10^{-6} M wirken sie zytotoxisch (Abb. 11). Ausnahmen stellen hierbei fünf schwach bis mittel wirksame GC dar, nämlich Betamethason (BM), Betamethason-17,21-dipropionat (BMDP), Dexamethason (DEX), Prednicarbat (PC) und Prednisolon (PD). Sie zeigen selbst bei einer Konzentration von 10^{-4} M nur einen wenig ausgeprägten zytotoxischen Effekt.

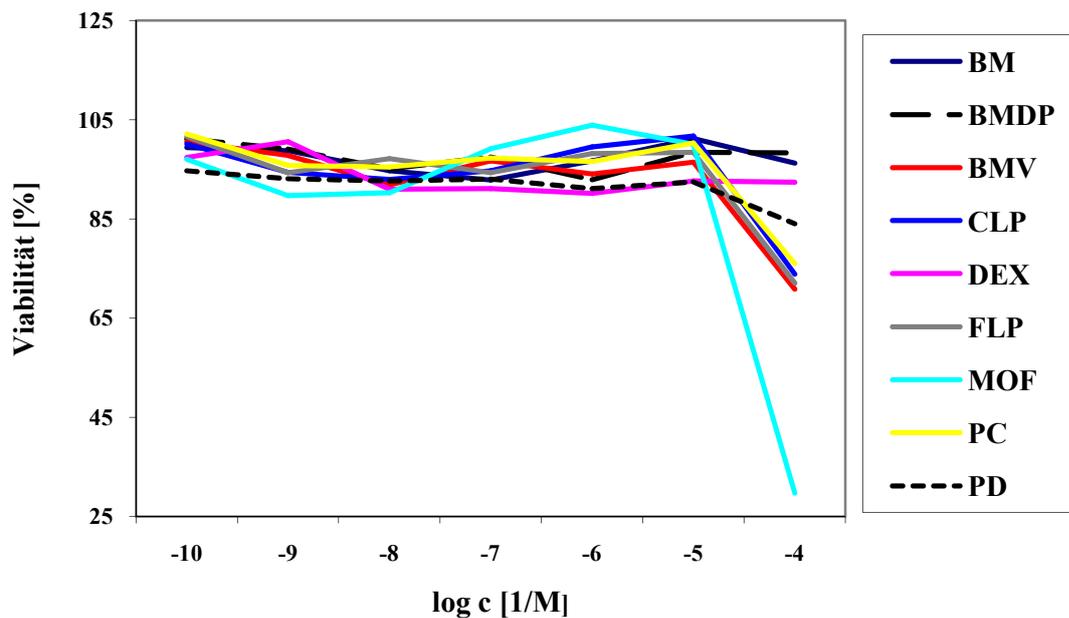


Abb. 11: MTT-Test für Fibroblasten. Stimulation mit den angegebenen GC für 48 h.

In der Zelllinie A549 zeigen die stark wirksamen GC wie Betamethason-17-valerat (BMV), Clobetasol-17-propionat (CLP), Fluticason-17-propionat (FLP) und Mometason-17-furoat (MOF) einen ausgeprägten zytotoxischen Effekt ab einer Konzentration von etwa 10^{-6} M, bei Budesonid (BD) ist diese Wirkung nicht ganz so stark ausgeprägt (Abb. 12). Dagegen waren die anderen Wirkstoffe in dem untersuchten Konzentrationsbereich kaum zytotoxisch.

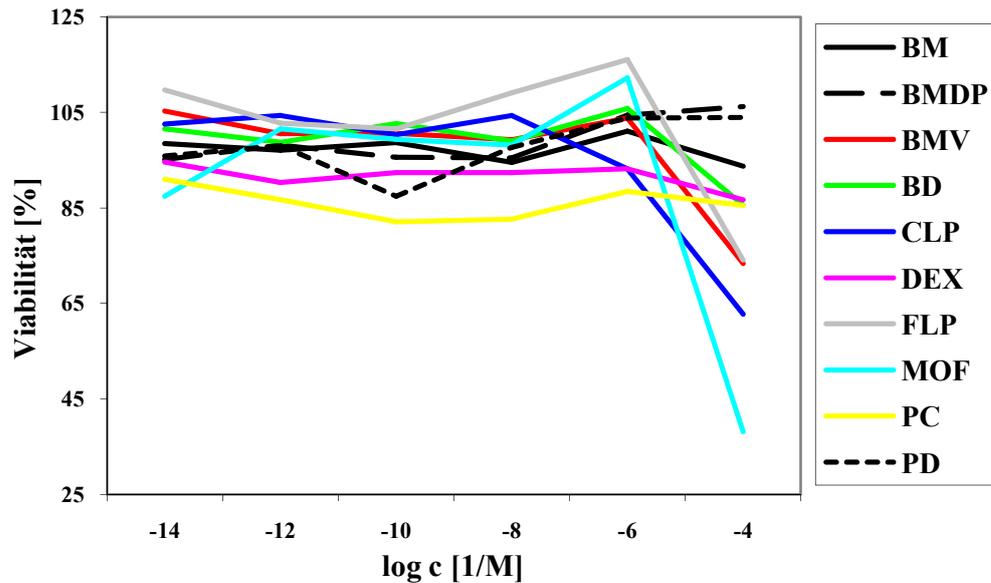


Abb. 12: MTT-Test für die Zelllinie A549. Stimulation mit den angegebenen GC für 48 h.

3.2 Proliferationsassay

Im Folgenden sollte der Einfluss der GC auf die Proliferation von primären, humanen Keratinozyten, Fibroblasten und auf die Zelllinie A549 untersucht werden. Insbesondere war der antiproliferative Effekt auf Fibroblasten von Interesse, da dieser als Parameter für das Risiko der Atrophie herangezogen werden sollte.

In der Keratinozytenkultur wurde der antiproliferative Effekt für die starken GC MOF und FLP schon bei Konzentrationen von 10^{-6} M offensichtlich (Abb. 13). Hierbei muss es sich um einen reinen antiproliferativen Effekt handeln, da die Viabilität der Zellen erst ab einer Konzentration von mehr als 10^{-5} M deutlich abnahm. BMV und CLP zeigen ebenfalls antiproliferative Wirkungen, wenn auch nicht so ausgeprägt wie MOF und FLP. Interessanterweise wirkt DEX ähnlich stark antiproliferativ wie BMV und CLP, obwohl es zu den schwächeren GC gehört. PC als mittelstark wirksames Glucocorticoid beeinflusst die Proliferation genauso wie BMDP nur geringfügig. Bei BM scheint der antiproliferative Effekt nur in der Abnahme der Viabilität begründet zu liegen.

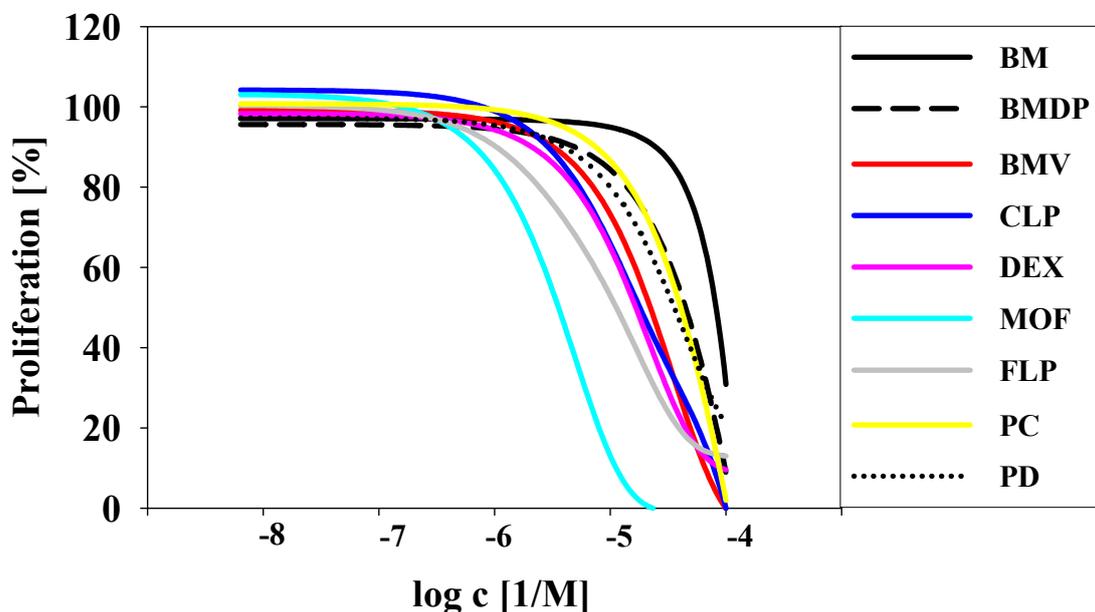


Abb. 13: Proliferationsassay für Keratinozyten. Stimulation mit den angegebenen GC für 48 h.

Bei Fibroblasten treten für DEX, PC, FLP, CLP, MOF und PD schon im Konzentrationsbereich von 10^{-8} - 10^{-7} M ausgeprägte antiproliferative Effekte auf (Abb. 14). Im Bereich von 10^{-7} - 10^{-5} M zeigten sich unterschiedlich lange Plateauphasen mit konstantem antiproliferativem Effekt. Bei höheren Konzentrationen sterben die Zellen aufgrund des zytotoxischen Effekts der GC, wie mit Hilfe des MTT-Tests gezeigt werden konnte. Bei BM sind diese Effekte wenig ausgeprägt, aber noch erkennbar. Dies könnte in der allgemein schwachen Wirksamkeit dieser Substanz begründet liegen. Ausnahmen von diesem charakteristischen Kurvenverlauf bilden BMV und BMDP, deren Proliferationsabnahme identisch zu der Abnahme bei Keratinozyten verläuft (Abb. 13).

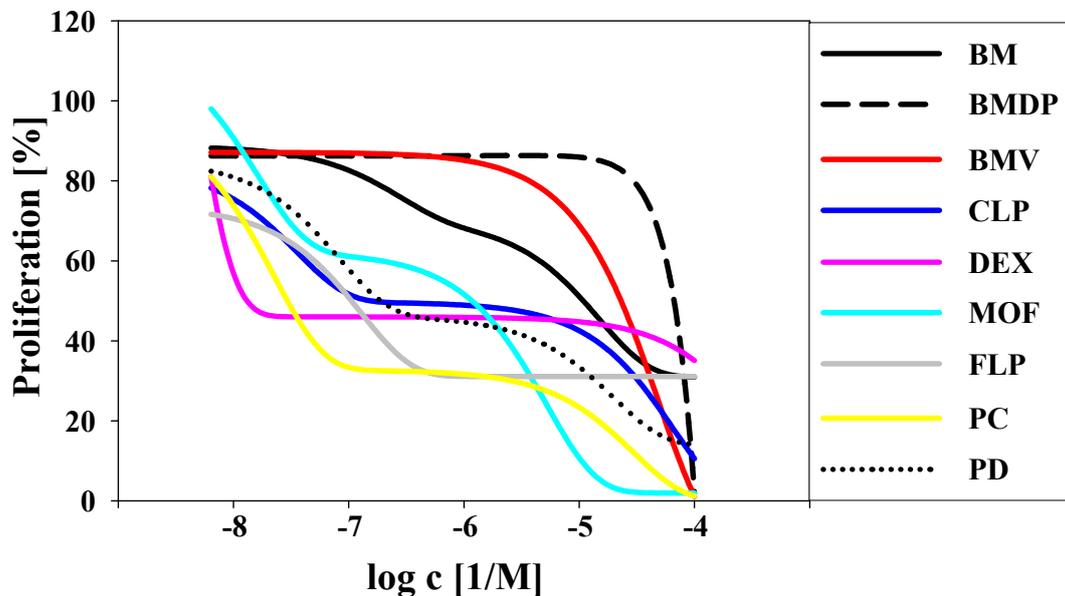


Abb. 14: Proliferationsassay für Fibroblasten. Stimulation mit den angegebenen GC für 48 h.

Bei der Zelllinie A549 zeigen die GC ähnlich wie bei den Fibroblasten einen antiproliferativen Effekt, der bei CLP, BM, BMDP, PD und PC stark ausgeprägt ist (Abb. 15). Dieser Effekt tritt bei den genannten Arzneistoffen in dem Konzentrationsbereich von 10^{-8} - 10^{-7} M auf. Daran schließt sich wie bei den Fibroblasten eine Plateauphase an, die sich über den Konzentrationsbereich von 10^{-7} - 10^{-5} M erstreckt. Bei DEX sind die Effekte deutlich weniger ausgeprägt, bei BD, MOF und BMV sind keine Plateauphasen vorhanden, es findet eine direkte Abnahme der Proliferation statt. Hierbei kann es sich um zytotoxische Effekte handeln, da die Viabilität ab einer Konzentration von 10^{-6} M durch die GC bereits beeinträchtigt wird. FLP scheint dagegen weder antiproliferativ noch zytotoxisch zu wirken. Auch der MTT-Test zeigte bei FLP kaum eine Abnahme der Viabilität.

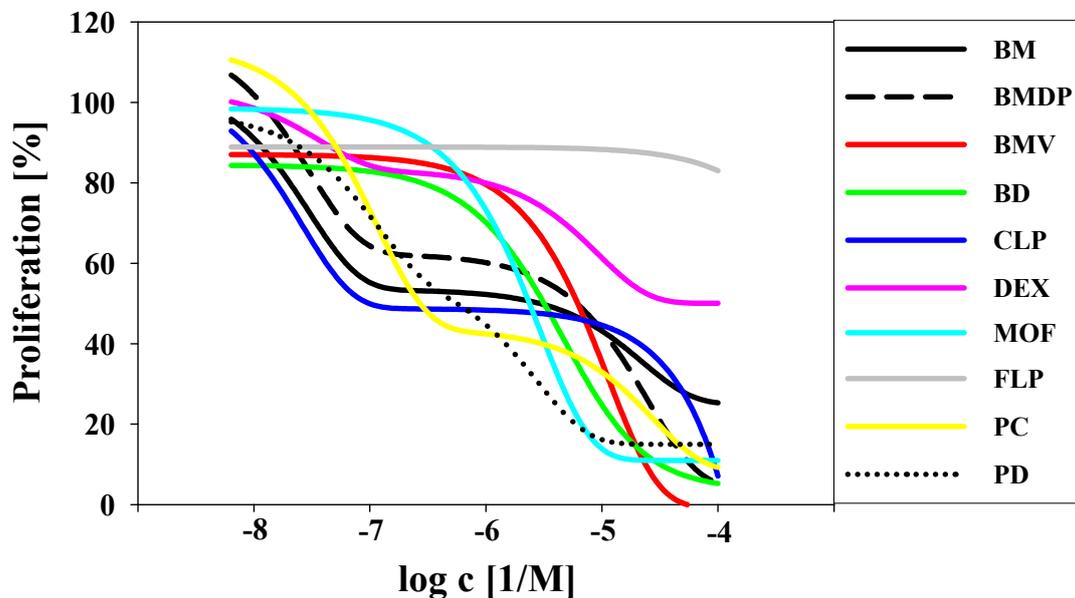


Abb. 15: Proliferationsassay für die Zelllinie A549. Stimulation mit den angegebenen GC für 48 h.

Anhand der Proliferationsdaten wurden für die drei Zelltypen die in der folgenden Tabelle aufgelisteten IC₅₀-Werte ermittelt:

Glucocorticoid	Keratinocyten IC₅₀ (mol/l)	Fibroblasten IC₅₀ (mol/l)	A549 IC₅₀ (mol/l)
Betamethason	$7,7 \times 10^{-5}$	$9,3 \times 10^{-6}$	$1,1 \times 10^{-6}$
Betamethason-17,21-dipropionat	$3,9 \times 10^{-5}$	$2,1 \times 10^{-5}$	$6,9 \times 10^{-6}$
Betamethason-17-valerat	$2,1 \times 10^{-5}$	$2,3 \times 10^{-5}$	$6,0 \times 10^{-6}$
Budesonid	$6,7 \times 10^{-6}$	$8,5 \times 10^{-6}$	$7,6 \times 10^{-5}$
Clobetasol-17-propionat	$1,8 \times 10^{-5}$	$1,5 \times 10^{-7}$	$2,7 \times 10^{-7}$
Dexamethason	$1,7 \times 10^{-5}$	$1,2 \times 10^{-7}$	$1,0 \times 10^{-4}$
Fluticason-17-propionat	$1,1 \times 10^{-5}$	$1,2 \times 10^{-6}$	-----
Mometason-17-furoat	$3,5 \times 10^{-6}$	$9,3 \times 10^{-6}$	$2,2 \times 10^{-6}$
Prednicarbat	$2,9 \times 10^{-5}$	$1,7 \times 10^{-7}$	$2,5 \times 10^{-7}$
Prednisolon	$3,9 \times 10^{-5}$	$2,9 \times 10^{-8}$	$5,5 \times 10^{-7}$

Tab. 1: IC₅₀-Werte für die genannten GC bei Keratinozyten, Fibroblasten und der Zelllinie A549.

Diese IC₅₀-Werte wurden mit den bereits gewonnenen Daten für die Rezeptorbindung (RB) (Hammer et al., 2003) korreliert. Dazu wurden jeweils die negativen Logarithmen aufgetragen. Es sollte untersucht werden, ob zwischen der RB und dem antiproliferativen Effekt ein Zusammenhang besteht. Sowohl bei Keratinozyten, Fibroblasten als auch bei der Zelllinie A549 konnte keine Korrelation gefunden werden, wie aus den folgenden Abbildungen zu entnehmen ist (Abb. 16, Abb. 17, Abb. 18).

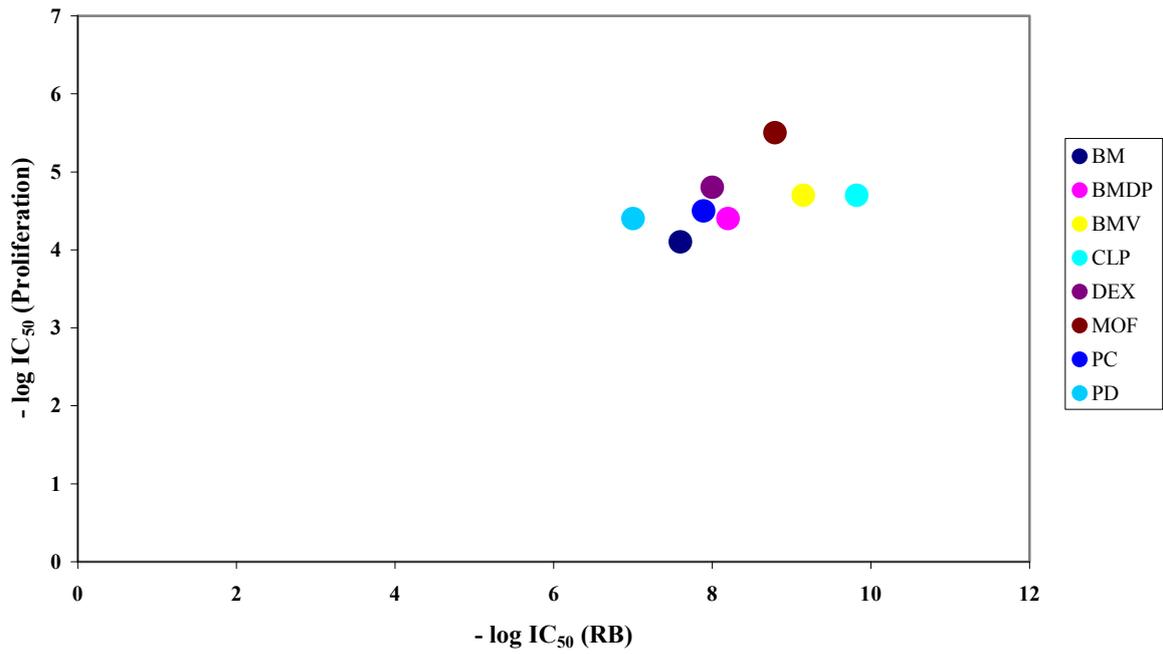


Abb. 16: Korrelation der IC_{50} -Werte für die Rezeptorbindung (RB) und die Proliferation bei Keratinozyten.

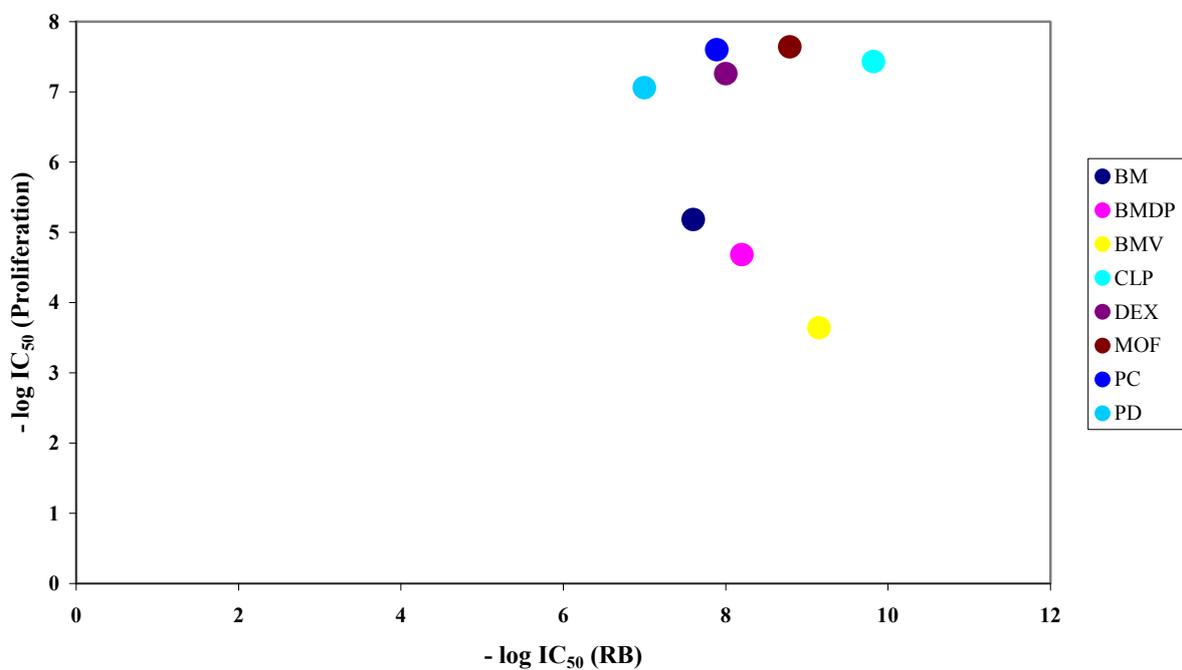


Abb. 17: Korrelation der IC_{50} -Werte für die Rezeptorbindung (RB) und die Proliferation bei Fibroblasten.

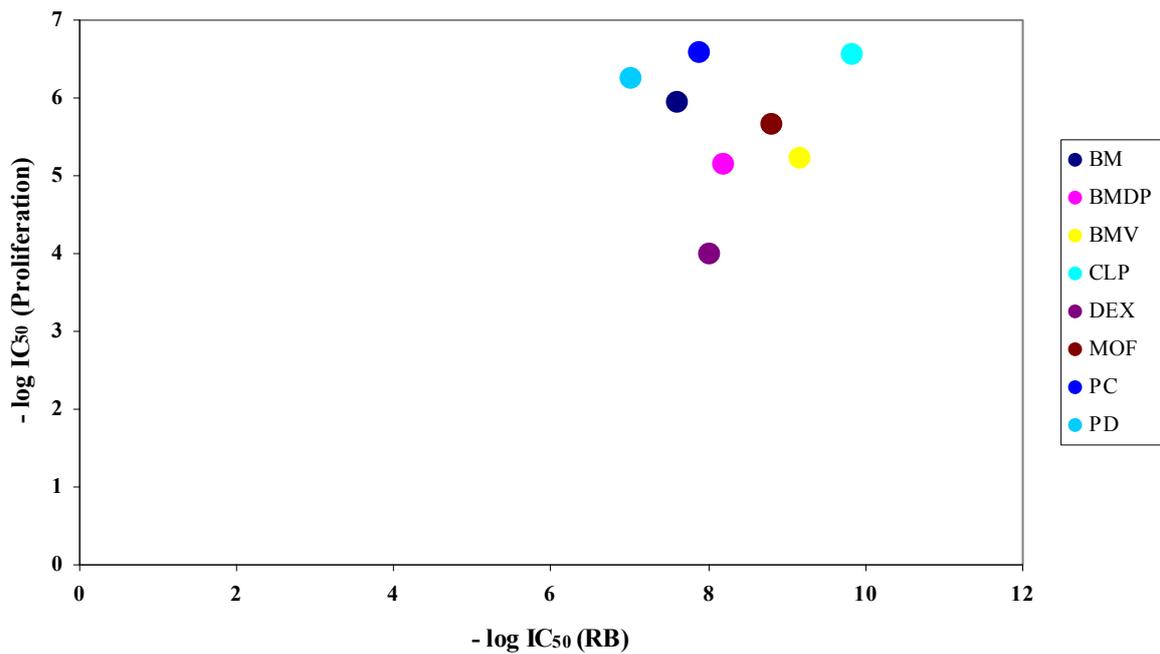


Abb. 18: Korrelation der IC_{50} -Werte für die Rezeptorbindung (RB) und die Proliferation bei der Zelllinie A549.

Es ist anzunehmen, dass die Unterschiede von topischen GC bezüglich der Nutzen-Risiko-Relation (Klasse-I Substanzen mit ausgewogener, Klasse-II Substanzen mit verbesserter Nutzen-Risiko-Relation) nicht durch Unterschiede in der Beeinflussung von Viabilität und Proliferation, sondern durch solche in der Kinetik, also Penetration und Verteilung in der Haut, zustande kommen. Aus diesem Grund könnten sich Trägersysteme in besonderer Weise für eine weitere Verbesserung der Nutzen-Risiko-Relation eignen.

3.3 Antiapoptotische Wirkung von Glucocorticoiden und FTY720P bei Fibroblasten

Vorherige Untersuchungen hatten gezeigt, dass GC die durch das proapoptotische Zytokin TNF α und den Transkriptionshemmer Actinomycin D (Act) induzierte Apoptose in Fibroblasten hemmen (Hammer et al., 2004; Hammer et al., 2003). Des Weiteren ergaben diese Untersuchungen, dass die Sphingosin-1-phosphat (S1P) Bildung durch GC in diesen Zellen hochreguliert wird. S1P selbst wirkt auf andere Zelltypen antiapoptotisch (Cuvillier and Levade, 2001; Grey et al., 2002; Maceyka et al., 2002).

Daher war es von Interesse, ob GC ihren antiapoptotischen Effekt ausschließlich über S1P vermitteln oder wie bei vielen anderen Glucocorticoidwirkungen auch, mehrere Mechanismen dafür verantwortlich sind (Hatz, 1998). Darüber hinaus sollten das synthetische Struktur analogon des S1P FTY720P und dessen Prodrug FTY720 bezüglich ihrer möglichen antiapoptotischen Wirkung untersucht werden, sowie der dafür verantwortliche Signalweg identifiziert werden. FTY720P wirkt im Gegensatz zum physiologischen S1P nicht auf den S1P-Rezeptorsubtyp 2 (S1P₂) (Brinkmann et al., 2002).

Um den Signalweg für die antiapoptotische Wirkung von DEX zu identifizieren, wurden Fibroblasten auf Basalmedium gesetzt und 24 h mit 100 nM DEX vorstimuliert. So konnte DEX vor der durch TNF α /Act induzierten Apoptose schützen, wie aus *Abb. 19* zu entnehmen ist. Als Negativkontrolle dienten unbehandelte, als Referenz für die Apoptose mit TNF α /Act stimulierte Zellen. Die Apoptoserate wurde anhand des Prozentsatzes apoptotischer Zellen der jeweiligen Probe - bezogen auf die Kontrolle - ermittelt.

In der Literatur (Franklin and McCubrey, 2000; Maceyka et al., 2002) ist beschrieben, dass S1P seinen antiapoptotischen Effekt über die Aktivierung der Phosphatidyl-Inositol-3-Kinase (PI3K) vermitteln kann. Da GC die Bildung von S1P hochregulieren, sollte die PI3K inhibiert werden. Fibroblasten wurden für 20 min mit dem PI3K Inhibitor LY294002 und im Anschluss daran für weitere 24 h mit DEX vorstimuliert, bevor die Apoptose ausgelöst wurde. Allerdings wirkt LY294002 selbst apoptotisch und erhöht die Apoptoserate. Aus diesem Grund wurden die mit TNF α /Act stimulierten Zellen zusätzlich mit 50 μ M LY294002 vorinkubiert (*Abb. 19*). Die so stimulierten Zellen dienten als Vergleich für die mit DEX, LY294002, TNF α /Act behandelten Zellen. Wie *Abb. 19* zeigt, hob der PI3K-Inhibitor den zellprotektiven Effekt von DEX vollständig auf.

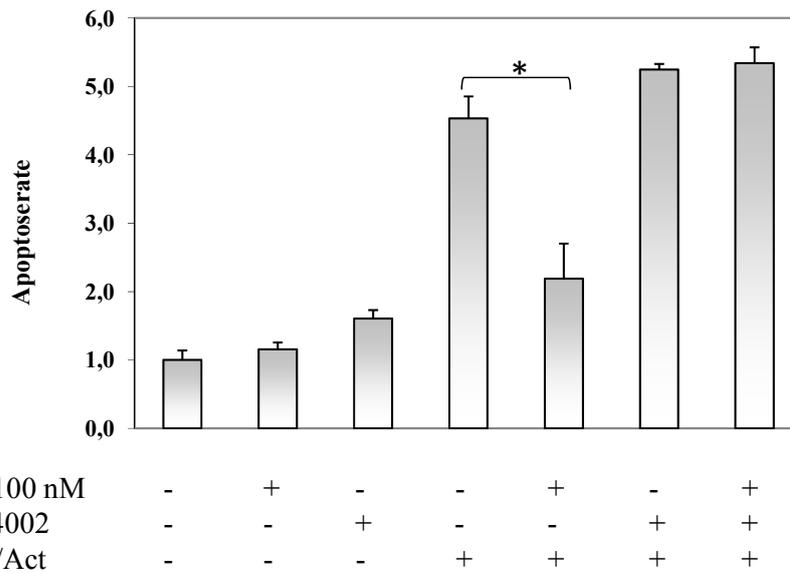


Abb. 19: *Antiapoptotischer Effekt von Dexamethason (DEX) bei humanen Fibroblasten und Aufhebung dieses Effekts durch 24 h Vorinkubation mit dem Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K) Inhibitor LY294002 (50 μ M). Die Apoptose wurde mit TNF α /Act ausgelöst (* $p \leq 0,05$).*

Für den definitiven Nachweis, dass DEX seine antiapoptotische Wirkung über die PI3K vermittelt, wurden murine S1P Rezeptorsubtyp 3 (S1P₃) KO Fibroblasten untersucht. Die PI3K wird über den Rezeptorsubtyp S1P₃ aktiviert (Franklin and McCubrey, 2000; Maceyka et al., 2002; Sanchez and Hla, 2004), so dass DEX in den KO Fibroblasten keine antiapoptotische Wirkung haben sollte.

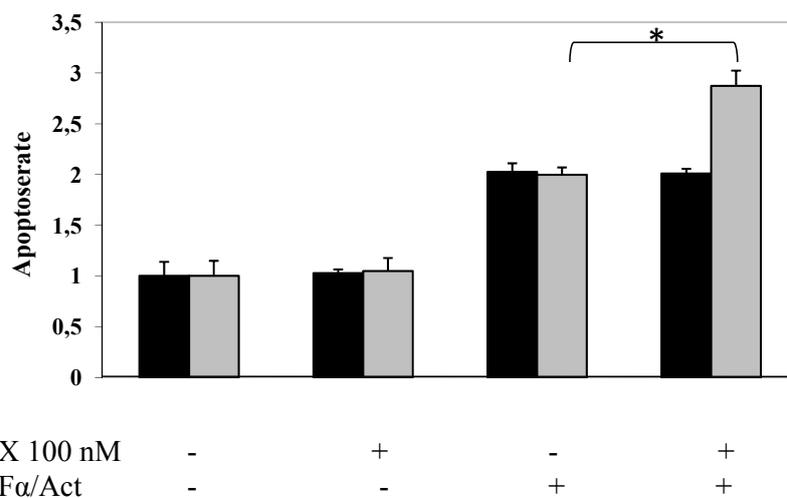


Abb. 20: *Beeinflussung der durch TNF α /Act induzierten Apoptose in murinen Fibroblasten (S1P₃ KO ■ und Wildtyp ■) durch DEX (* $p \leq 0,05$).*

Diese Vermutung konnte bestätigt werden (Abb. 20). Damit konnte nicht nur die PI3K als wesentliches Enzym in der Vermittlung des antiapoptotischen Effekts von DEX identifiziert werden, sondern auch der verantwortliche Rezeptorsubtyp. Zum Vergleich dienten murine Wildtyp Fibroblasten, in denen DEX ebenso wie in den humanen Fibroblasten vor der induzierten Apoptose schützen konnte (Abb. 20).

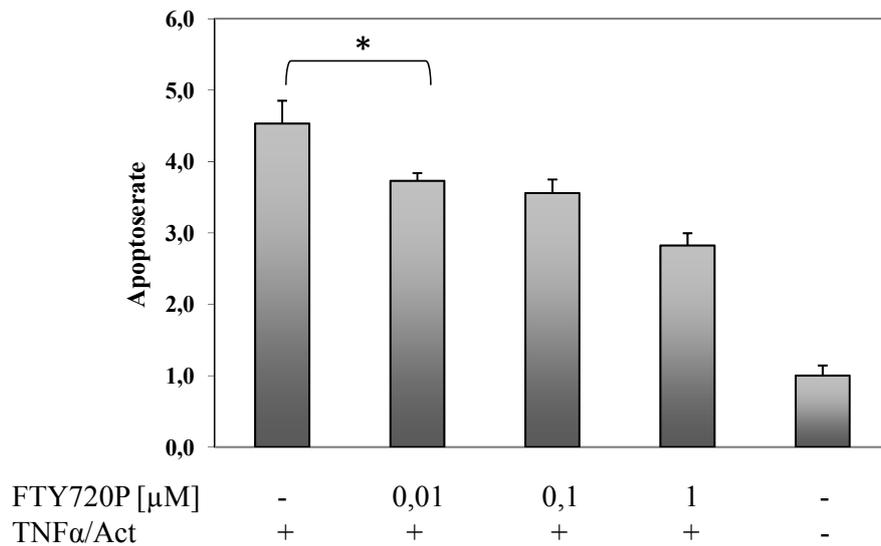


Abb.21: Antiapoptotischer Effekt von FTY720-Phosphat (FTY720P) in humanen Fibroblasten in Abhängigkeit von der Konzentration. Die Apoptose wurde mit TNFα/Act ausgelöst (* $p \leq 0,05$).

FTY720P wirkte auf Fibroblasten ebenfalls antiapoptotisch (Abb.21), die Zugabe des FTY720P erfolgte gleichzeitig mit TNFα/Act. Als Negativkontrolle dienten unbehandelte, als Referenz für die Apoptose mit TNFα/Act stimulierte Zellen. Der Prozentsatz apoptotischer Zellen der Probe wurde mit der jeweiligen Negativkontrolle ins Verhältnis gesetzt und so die Apoptoserate ermittelt.

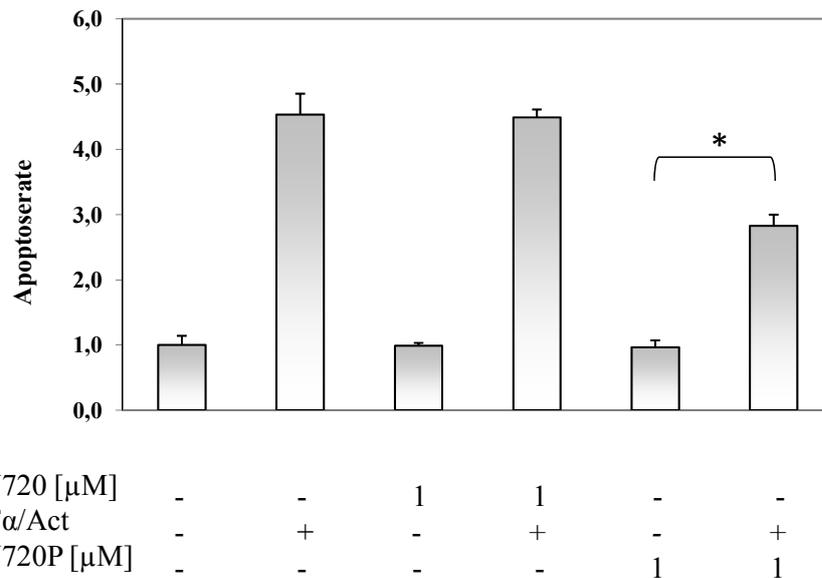


Abb. 22: FTY720 (1 μM) zeigt im Gegensatz zu FTY720P (1 μM) keinen antiapoptotischen Effekt in humanen Fibroblasten. Die Apoptose wurde mit TNFα/Act ausgelöst (* $p \leq 0,05$).

Im Gegensatz dazu zeigte das Prodrug FTY720 keine antiapoptotischen Effekte (Abb. 22).

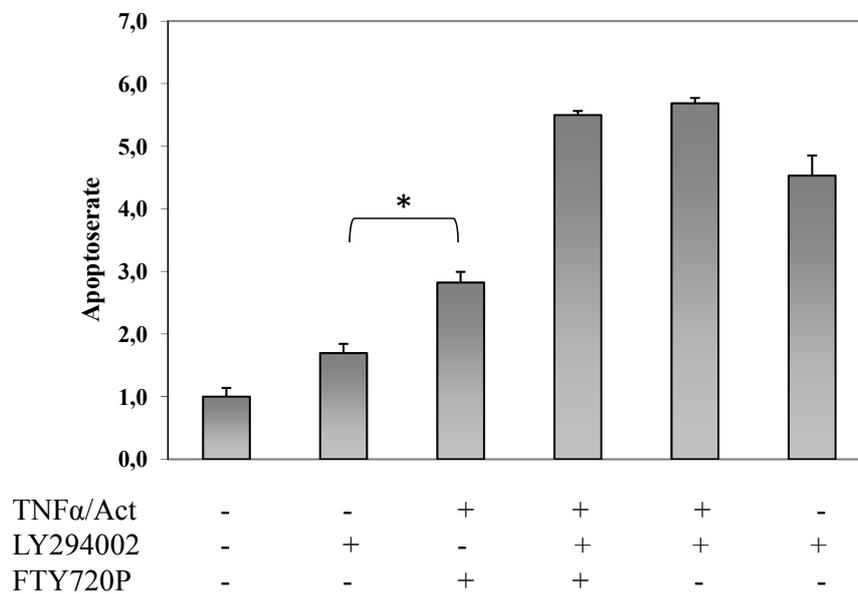


Abb. 23: Hemmung der Phosphatidylinositol-3-Kinase durch 20 min Vorinkubation mit 50 μM LY294002 und die dadurch bewirkte Aufhebung des antiapoptotischen Effekts von FTY720P (1 μM). Die Apoptose wurde mit TNFα/Act ausgelöst (* $p \leq 0,05$).

Obwohl Fibroblasten die zur Phosphorylierung des FTY720 nötige Sphingosinkinase 2 (SPHK 2) exprimieren (Keller et al., 2007), konnte FTY720 nicht vor der durch TNF α /Act induzierten Apoptose schützen. FTY720P und dessen Prodrug hatten selbst keinen Effekt auf die Apoptoserate, sie lag für beide Wirkstoffe auf Kontrollniveau (*Abb. 23*). Der antiapoptotische Effekt von FTY720P konnte wie bei den GC durch Hemmung der PI3K durch Vorinkubation mit LY294002 (50 μ M) gehemmt werden (*Abb. 23*). LY294002 wirkte selbst leicht apoptotisch, wie die etwas erhöhte Apoptoserate im Vergleich zur Kontrolle zeigt. Durch diese toxische Wirkung wurde die Apoptoserate in Zellen, die mit LY294002, TNF α /Act behandelt wurden, gegenüber nur mit TNF α /Act behandelten Zellen deutlich erhöht.

Die Apoptoserate der mit FTY720P, LY294002 und TNF α /Act stimulierten Zellen war mit der Apoptoserate der mit LY294002, TNF α /Act behandelten Zellen nahezu identisch. Dies deutet darauf hin, dass FTY720P seinen antiapoptotischen Effekt über die PI3K vermittelt. Die Aktivierung der PI3K erfolgt wie bereits beschrieben, über den S1P₃ Rezeptorsubtyp. Um den Signalweg näher zu untersuchen, bzw. den Rezeptor zu identifizieren, wurde der Einfluss von FTY720P in murinen S1P₃ KO und Wildtyp Fibroblasten untersucht.

FTY720P wirkt in den S1P₃ KO Fibroblasten nicht mehr zytoprotektiv, wodurch dieser Rezeptorsubtyp für die Vermittlung des antiapoptotischen Effekts verantwortlich gemacht werden kann. In den murinen Wildtyp Fibroblasten, die diesen Rezeptorsubtyp exprimieren, war die zellprotektive Wirkung des FTY720P gegeben (*Abb. 24*).

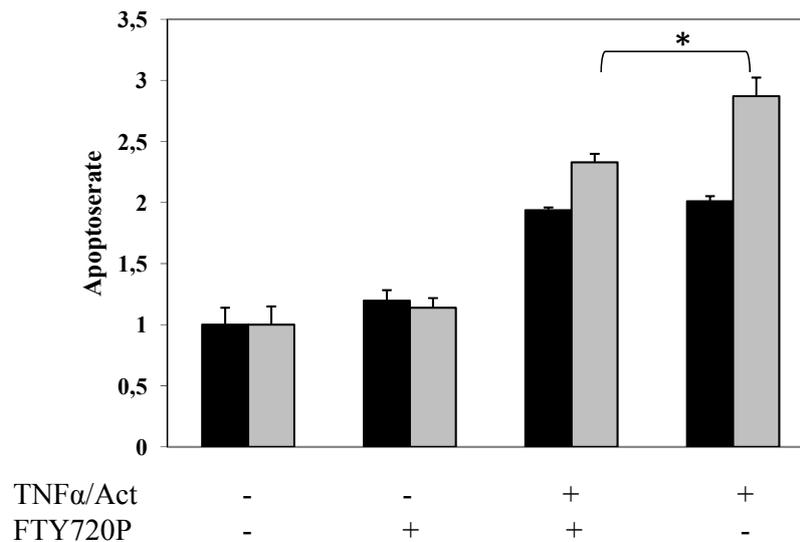


Abb. 24: Beeinflussung der Apoptose durch FTY720P (1 μ M) in murinen SIP_3 KO Fibroblasten (■) und Wildtyp Fibroblasten (▒). Die Apoptose wurde mit TNF α /Act ausgelöst (* $p \leq 0,05$).

Um zu klären, warum FTY720 nicht vor Apoptose schützen konnte, obwohl es intrazellulär zu dem zytoprotektiven FTY720P aktiviert werden müsste, wurde mit Hilfe von Antisense-ODN die Expression der SPHK 2 reduziert und die Beeinflussung der Apoptose durch FTY720P und FTY720 untersucht. Wie Abb. 25 zeigt, blieb der antiapoptotische Effekt von FTY720P sowohl bei Antisense- als auch bei Kontroll-ODN erhalten. Dagegen stieg in den Antisense-ODN behandelten Fibroblasten unter FTY720 die Apoptoserate, d.h. bei Hemmung der SPHK 2 wurde sogar die Apoptose gefördert. Die Apoptoserate der mit Kontroll-ODN behandelten Zellen zeigte keinen Anstieg, FTY720 verstärkte also nicht die apoptotische Wirkung von TNF α und Act. Ohne Induktion der Apoptose wirkt FTY720 nicht apoptotisch, wie in Abb. 25 die jeweils zugehörigen Kontrollen (nur mit Fugene[®] stimuliert) zeigen.

FTY720 ist bei anderen Zelltypen imstande, Apoptose auszulösen (Azuma et al., 2003; Shen et al., 2007). In Fibroblasten dagegen könnte zwischen phosphorylierter und nicht phosphorylierter Form ein Gleichgewicht bestehen, das durch Hemmung der SPHK 2 zugunsten der nicht phosphorylierten Form verschoben wird. Dieser mögliche Effekt könnte die Ursache für die Steigerung der Apoptoserate sein.

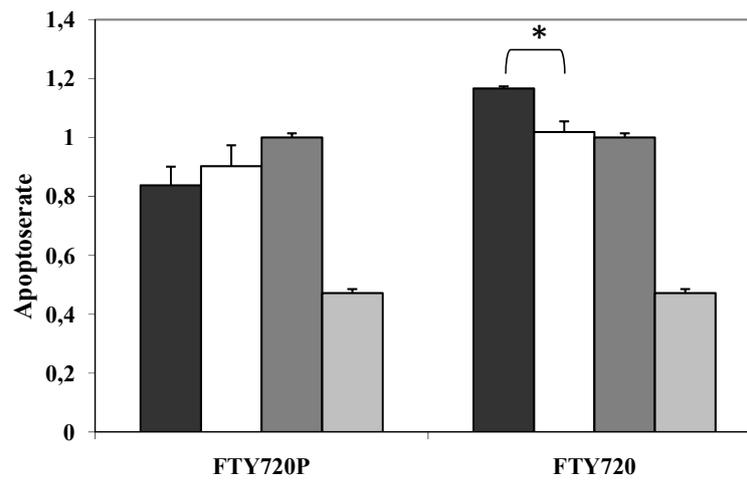


Abb. 25: Beeinflussung der Apoptose in humanen Fibroblasten durch FTY720P und FTY720 bei verminderter Expression der Sphingosinkinase 2 (SPHK 2). (■) Antisense-ODN, (□) Kontroll-ODN, (■) TNF α /Act, (■) Kontrolle (mit Fugene[®] stimuliert). Die Apoptose wurde mit TNF α /Act ausgelöst (* $p \leq 0,05$).

3.4 Synthese spingelabelter Glucocorticoide

Um bei den geplanten ESR Messungen nicht auf eine Modells substanz (2,2,5,5-Tetramethyl-3-pyrrolin-1-oxyl-3-carbonsäure, Cholestansonde) beschränkt zu sein, sollten die Arzneistoffe durch Einführung eines Spinlabels dieser Methode zugänglich gemacht werden. Deshalb wurden Methoden etabliert, die die Einführung des Spinlabels in PC, BMV und PD ermöglichen. Die Labelung jedes Steroids erfolgte mit 2,2,5,5-Tetramethyl-3-pyrrolin-1-oxyl-3-carbonsäure an der sich in Position C-11 befindlichen OH-Gruppe. Diese Position wurde gewählt, da aufgrund vorhergehender Untersuchungen (Sivaramakrishnan et al., 2004) vermutet wurde, dass die Wirkstoff-Träger Interaktion besonders durch die lipophilen Estergruppen in Position C-17 und C-21 beeinflusst wird. Somit kann eine Störung dieser Wechselwirkung durch die eingeführte Cholestansonde weitestgehend ausgeschlossen werden. Aufgrund dieser Annahme erfolgte auch die Auswahl der zur labelnden GC, nämlich der Doppelster PC, der Monoester BMV und das unveresterte PD. Es wurden die unter Material und Methoden (Kapitel 2.3) beschriebenen Synthesevorschriften etabliert, die im Folgenden kurz erläutert werden.

Abb. 26 zeigt den Syntheseweg für Einführung des Spinlabels in PC. Die Veresterung der sich in Position C-11 befindlichen OH-Gruppe kann direkt erfolgen, da es keine weiteren reaktiven Gruppen gibt, die verestert werden könnten.

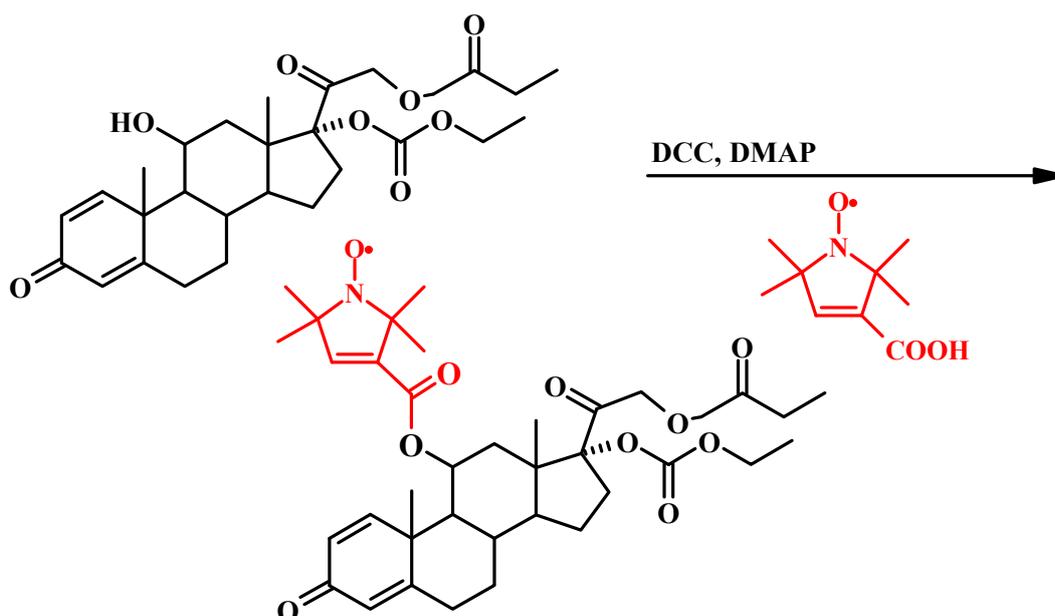


Abb. 26: Syntheseweg für spingelabeltes Prednicarbat

Dagegen ist bei der Einführung des Spinlabels in BMV zu beachten, das die reaktivere primäre OH-Gruppe in Position C-21 vor der Einführung des Spinlabels geschützt werden muss (Abb. 27). Andernfalls wäre eine Labelung neben Position C-11 auch an Position C-21 möglich. Aus diesem Grund wurde der reaktivere primäre Alkohol durch *tert*-Butyldimethylsilylchlorid geschützt und erst im Anschluss daran der sekundäre Alkohol durch das Spinlabel verestert. Die Schutzgruppe wurde mit Tetrabutylammoniumfluorid Trihydrat wieder entfernt und das gewünschte Produkt erhalten.

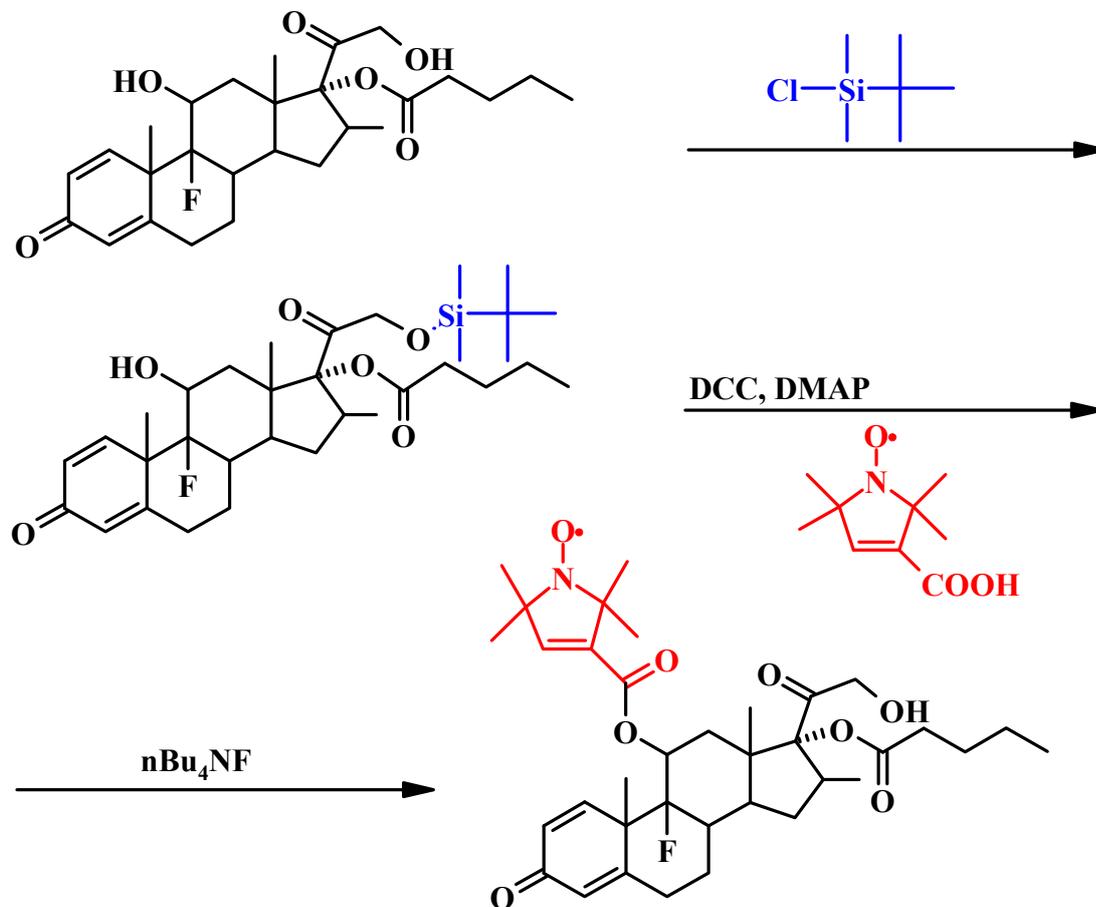


Abb. 27: Syntheseweg für spingelabeltes Betamethason-17-valerat

PD verfügt neben der sich in Position C-11 befindlichen OH-Gruppe über zwei weitere in den Positionen C-17 und C-21 (Abb. 28). Vor der Labelung der C-11 Hydroxylgruppe müssen diese OH-Gruppen ebenfalls geschützt werden, um eine Mehrfachveresterung durch das Spinlabel zu verhindern. Als Schutzgruppe diene hierbei 1,3-Dichlor-1,1,3,3-tetraisopropylsiloxan, das die genannten Positionen durch eine „Siliziumklammer“ verbindet.

Im folgenden Schritt wurde das Spinlabel eingeführt und die Schutzgruppe wieder mittels Tetrabutylammoniumfluorid Trihydrat entfernt.

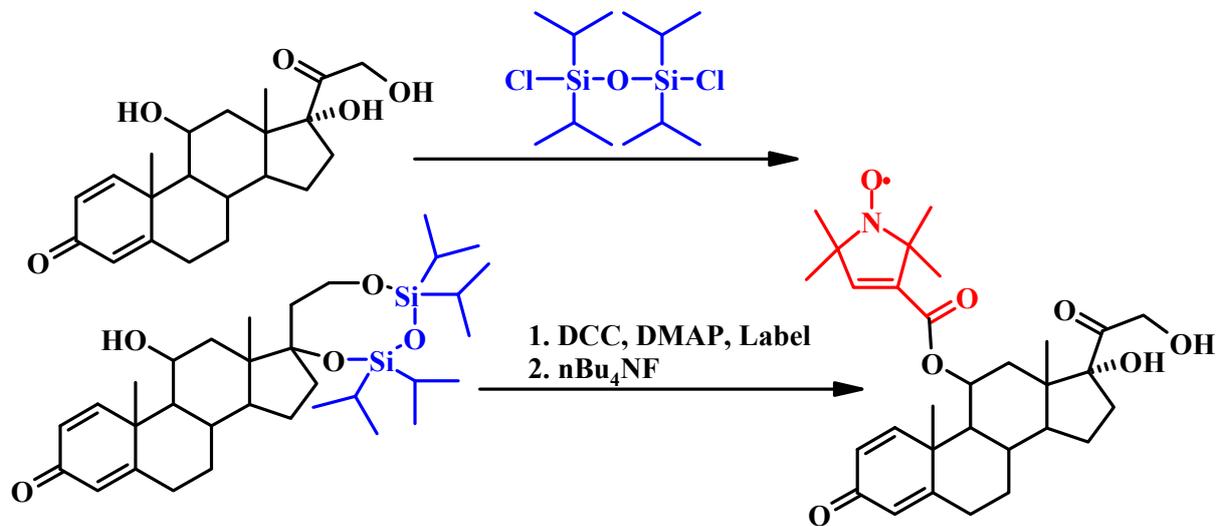


Abb. 28: Syntheseweg für spinlabeltes Prednisolon

Die Produkte wurden anhand von Massenspektren identifiziert (Abb. 29 - Abb. 31). Wegen des ungepaarten Elektrons des jeweiligen Produkts konnte keine NMR durchgeführt werden, dies war nur für die Vorstufen möglich.

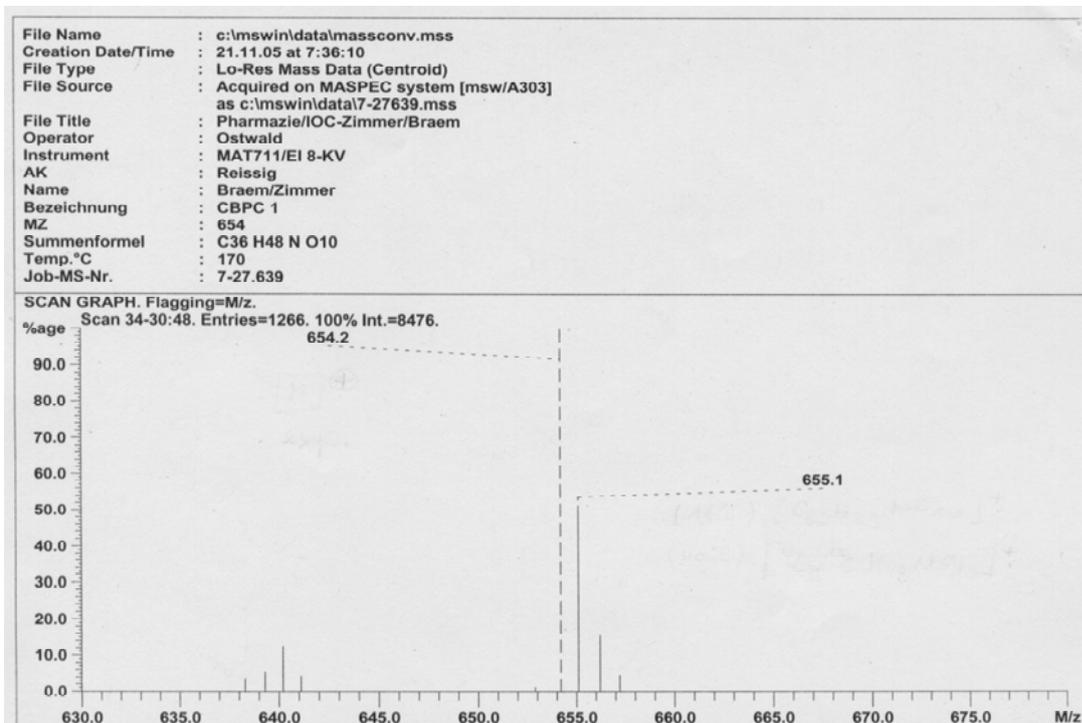


Abb. 29: Massenspektrum von spinlabeltem Prednicarbat, Molpeak bei 655 (Hochauflösung)

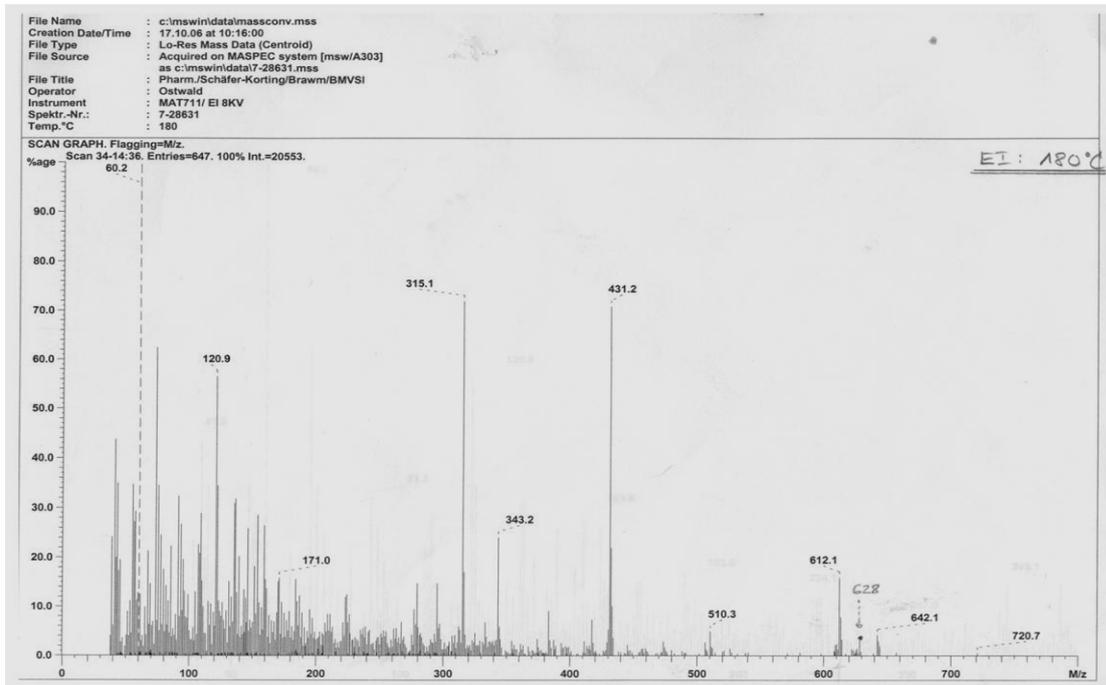


Abb. 30: Massenspektrum von Betamethason-17-valerat, Molpeak bei 628
(Hochauflösung wegen zu geringer Substanzmenge nicht möglich)

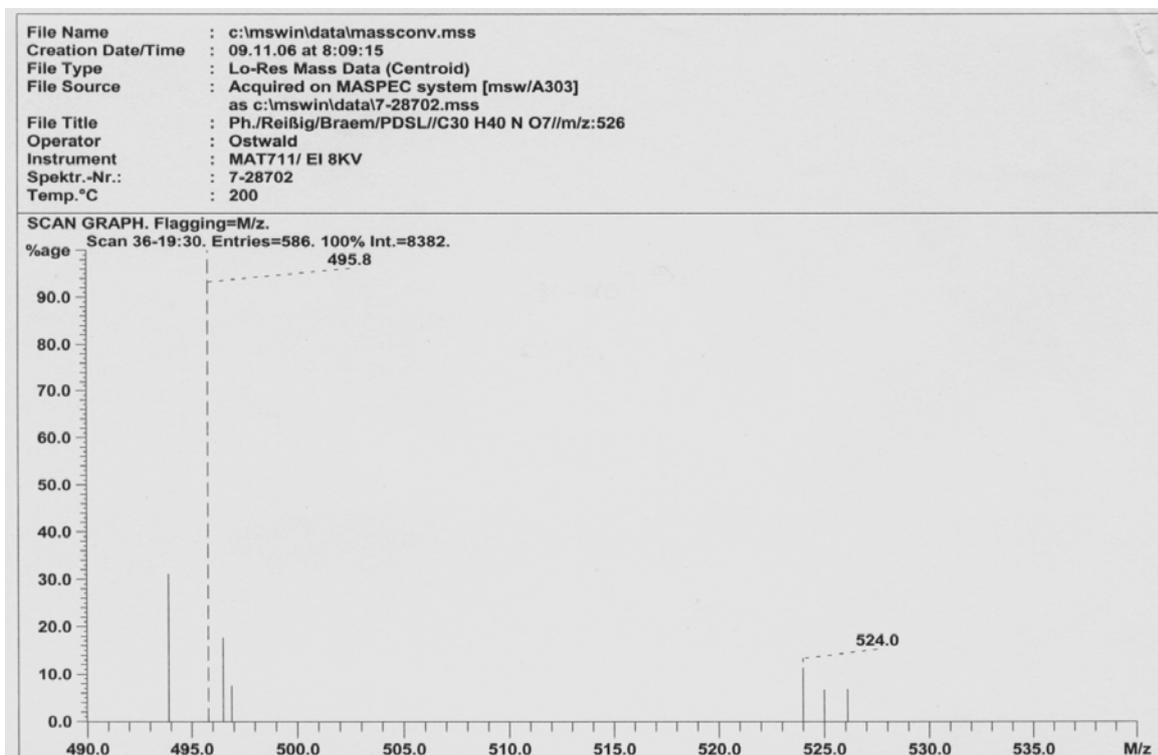


Abb. 31: Massenspektrum von spingelabeltem Prednisolon, Molpeak bei 524
(Hochauflösung)

3.5 Charakterisierung nanopartikulärer Trägersysteme mittels der Transmissionselektronenmikroskopie (TEM)

In der Literatur gibt es unterschiedliche Angaben über die Form von Solid Lipid Nanoparticles (SLN) und Nanostructured Lipid Carriers (NLC). Beide Trägersysteme werden als kugelförmige Körper (Müller et al., 2000), aber auch als Plättchen beschrieben (Jores et al., 2004).

Mit Hilfe der TEM sollten SLN, NLC und eine Nanoemulsion (NE) visualisiert werden, um die Partikelform der jeweiligen Zubereitung zu klären.

Für die SLN Zubereitung wurde eine plättchenförmige Struktur gefunden (*Abb. 32 A*). Auch bei NLC bildet das feste Lipid eine plättchenförmige Struktur, auf die das flüssige Lipid aufgelagert ist (*Abb. 32 B*). Es sind die bereits beschriebenen „Nanospoons“ zu erkennen (Jores et al., 2004). Bei der NE sind die Partikel kugelförmig, wie *Abb. 32 C* zeigt. Durch die TEM Bilder konnte für alle Zubereitungen die Anwesenheit von Mizellen ausgeschlossen werden. Dies stimmt auch mit der in der Literatur angegebenen kritischen Mizellbildungskonzentration (CMC) überein (Maskarinec et al., 2002), die für wässrige Systeme bei 20 % (m/m) Poloxamer[®] 188 bei 30 °C liegt.

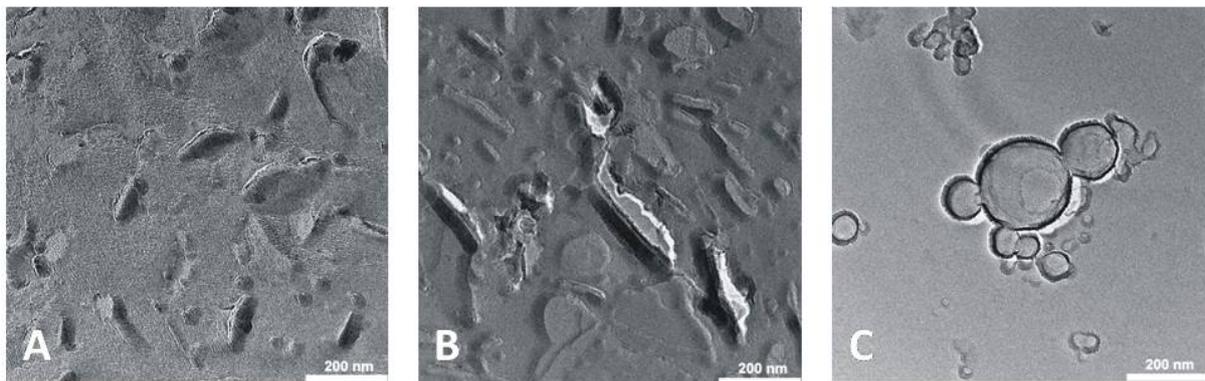


Abb. 32: A) TEM-Bild einer SLN - Zubereitung (10 % Compritol, 2,5 % Poloxamer[®] 188), B) einer NLC Zubereitung (7,5 % Compritol, 2,5 % Miglyol, 2,5 % Poloxamer[®] 188, C) einer NE (10 % Miglyol, 2,5 % Poloxamer[®] 188).

3.6 Charakterisierung der Trägersysteme mittels Parelektrischer Spektroskopie

Mit Hilfe der Parelektrischen Spektroskopie (PS) kann bestimmt werden, ob ein Arznei- oder Modellstoff in der Matrix des Trägers eingelagert oder an der Partikeloberfläche angelagert ist. Dieser Befund ist von herausragender Bedeutung, da für angelagerte Arzneistoffe ein epidermales Targeting gefunden wurde (Santos Maia et al., 2002; Stecova et al., 2007). Dagegen tritt bei Inkorporation dieser Effekt nicht auf (Lombardi-Borgia et al., 2005; Sivaramakrishnan et al., 2004), dies gilt auch für den Einschluss von Prednicarbat (Schlupp et al., in Vorbereitung). Somit ermöglicht die PS erstmals eine Vorhersage über die Verteilung trägerassoziiierter Arzneistoffe in der Haut. Der zugrunde liegende theoretische Hintergrund wurde in Zusammenarbeit mit der Physik (Herr Professor Dr. Kramer) wesentlich verfeinert und kann wie folgt dargestellt werden:

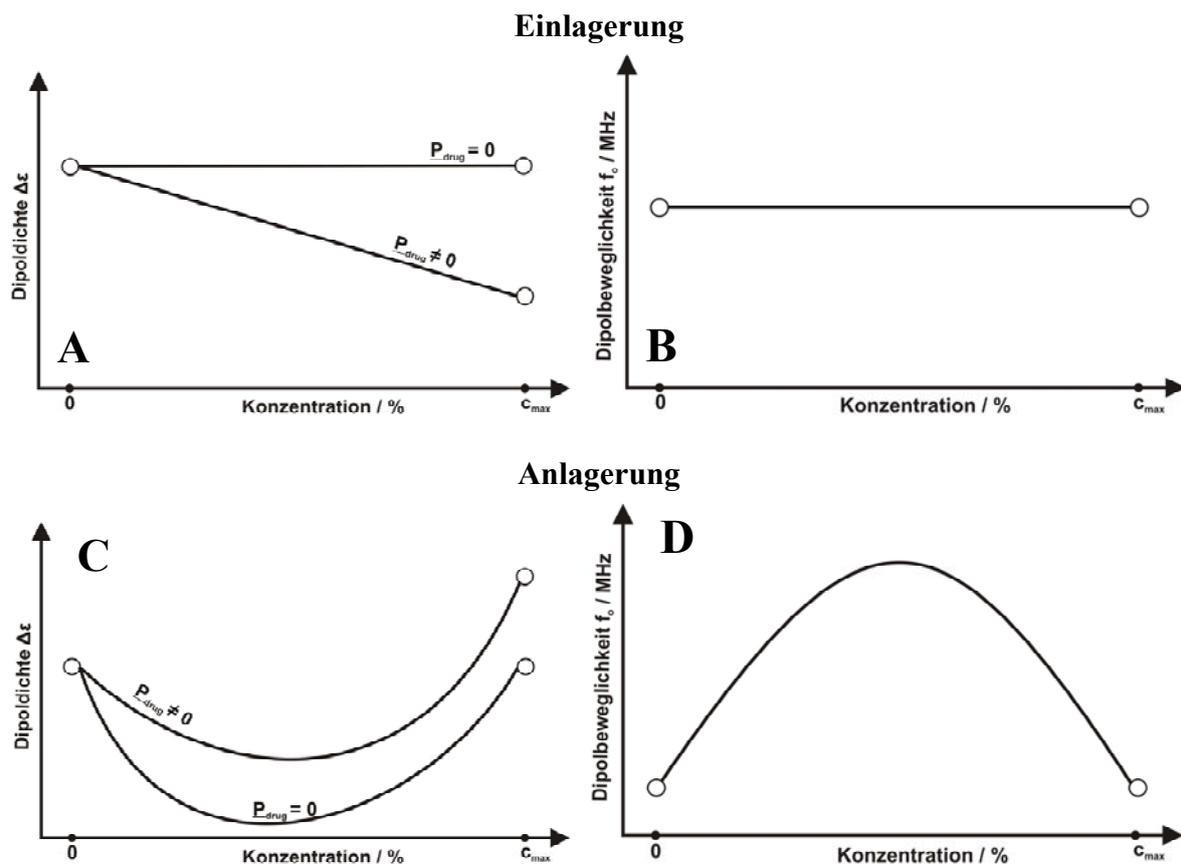


Abb. 33: Parelektrische Spektroskopie: Dipoldichte (A,C) und –beweglichkeit (B,D) bei Einlagerung (A und B) und Anlagerung (C und D) eines Moleküls mit und ohne Dipolmoment p_0 in Abhängigkeit von der Konzentration

Haben die eingelagerten Moleküle kein eigenes Dipolmoment $p_o=0$ (*Abb. 33, A*), muss die Konzentrationsabhängigkeit $\Delta\varepsilon(c)$ eine waagerechte Gerade ergeben. Die Abschwächung des Trägerdipols durch den eingelagerten Stoff ist in diesem Fall zu vernachlässigen. Besitzen die eingelagerten Moleküle dagegen ein Dipolmoment, stellt sich dies nach außen immer als eine Abschwächung dar. Dies liegt in ihrer antiparallelen Ausrichtung zum Trägerdipol begründet, weshalb die Konzentrationsabhängigkeit $\Delta\varepsilon(c)$ eine fallende Gerade ergeben muss (*Abb. 33, A*). Die Masse des Trägers nimmt durch die Einlagerung nur sehr geringfügig zu, weshalb die Beweglichkeit nahezu unbeeinflusst bleibt. Aus diesem Grund ergibt die Dipolbeweglichkeit ebenfalls eine waagerechte Gerade (*Abb. 33, B*).

Bei der Anlagerung einer Substanz (mit oder ohne Dipolmoment) ist der Minimalabstand der Trägerdipole bei fehlender und maximaler Bedeckung gleichermaßen gering. Im dazwischen liegenden Konzentrationsbereich können in dem komplexen Träger teilweise Aggregate zwischen die Arzneistoffmoleküle auf der Trägersoberfläche treten und damit den minimal möglichen Abstand merklich steigern – in diesem Fall geht die Dichte durch ein ausgeprägtes Minimum. Verfügen die eingelagerten Moleküle über ein Dipolmoment, tritt zusätzlich eine Verstärkung des Trägerdipolmoments auf, was die eben beschriebene parabolische Abhängigkeit bei einem höheren Wert enden lässt (*Abb. 33, C*). In diesem Fall richtet sich das Dipolmoment der Moleküle parallel zum Träger aus und führt so zu einer Verstärkung. Die Dipolbeweglichkeit, um sich im elektrischen Feld zu bewegen, ist für c_0 und c_{\max} am geringsten, da hier für benachbarte Trägerdipole die Aktivierungsenergie ΔE_0 am höchsten ist. Hierbei muss ein benachbarter Träger im vollen Umfang überwunden werden. Im Konzentrationsbereich dazwischen kann ein Träger seinen Nachbarn in mehreren Schritten überwinden. Die eingelagerten Stoffe wandeln die glatte Oberfläche des Trägers in eine Art Zahnrad um. Das Überspringen dieser einzelnen Zähne erfordert eine geringere Aktivierungsenergie $\Delta E < \Delta E_0$ und erklärt so die Zunahme der Dipolbeweglichkeit. Mit zunehmender Besetzung der Oberfläche des Trägers nimmt der Abstand der Zähne mehr und mehr zu, bis die Oberfläche vollständig besetzt ist. Dies erklärt die sich anschließende Abnahme der Dipolbeweglichkeit. Würde die Konzentration darüber hinaus gesteigert, schliesse sich ein linearer bzw. waagerechter Verlauf an.

SLN, NLC und NE mit einer Konzentrationsreihe der Cholestanosonde beladen und die konzentrationsabhängige Veränderung der Dipoldichte $\Delta\varepsilon(c)$ und -beweglichkeit $f_0(c)$ gemessen (*Abb. 34*):

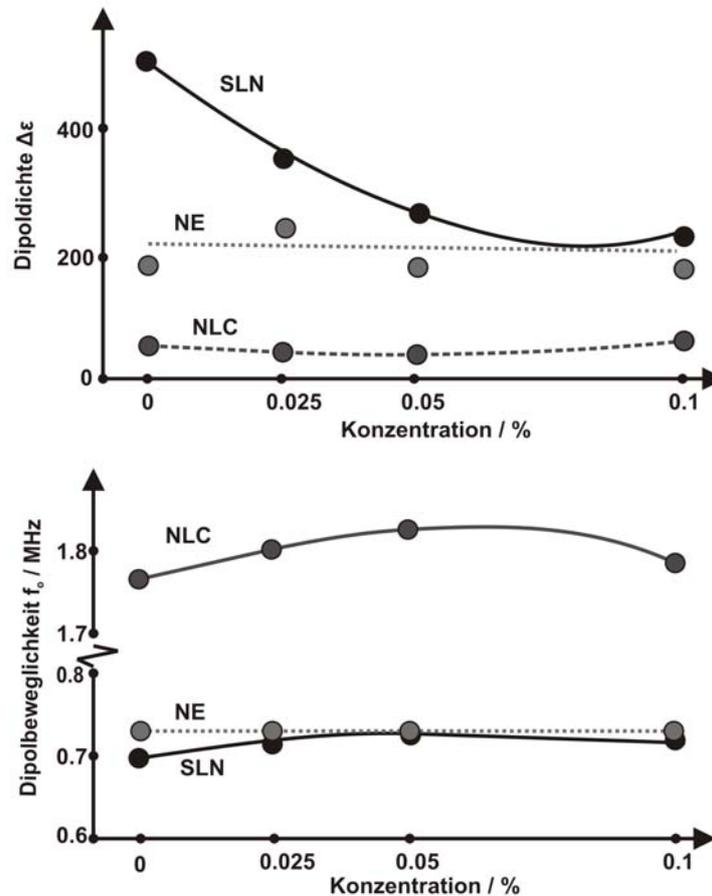


Abb. 34: Dipoldichte (oben) und Dipolbeweglichkeit (unten) für mit Cholestan-sonde beladene SLN, NLC und NE

Für SLN und NLC wurde gezeigt, dass die Cholestan-sonde an die Oberfläche der Partikel assoziiert ist. Für beide Zubereitungen liegt sowohl für die Dipoldichte als auch für die Dipolbeweglichkeit ein parabolischer Verlauf vor, so dass nach dem in *Abb. 33* beschriebenen Modell von einer Anlagerung an die Partikeloberfläche ausgegangen werden kann.

Bei einer NE liegt dagegen eine komplette Inkorporation vor (*Abb. 34*). Die Dipoldichte zeigt einen linearen, leicht abnehmenden Verlauf. Die Dipolbeweglichkeit ist ebenfalls linear. Diese Ergebnisse stimmen mit dem Modell aus *Abb. 33* überein, wonach es sich hierbei um eine Einlagerung der Cholestan-sonde handeln muss.

Des Weiteren konnte auch mit Hilfe der PS das Vorhandensein von Mizellen ausgeschlossen werden. Dazu wurden SLN mit einer Konzentrationsreihe von Poloxamer 188 (1,25 – 20 %) hergestellt und vermessen. Da die Molmasse einer Mizelle zwischen der des Trägers und Wasser liegen sollte, wurde eine Messung im Bereich von 0,1 - 1000 MHz durchgeführt. Wie in *Abb. 35* zu sehen, liegt die Antwort des Trägers im Bereich zwischen 0,1 und 1 MHz. Im Bereich größer 1000 MHz ist ein minimaler Anstieg zu verzeichnen, der der Antwort des

Wassers zuzuordnen ist, dessen Maximum bei 18000 MHz liegt. Da eine Mizelle bezüglich ihrer Molmasse sicher zwischen einem SLN und Wasser einzuordnen ist, sollte zwischen 1 und 1000 MHz ein Signal nachzuweisen sein. Wie aus *Abb. 35* zu entnehmen ist, ist dies sogar bei einer Tensidkonzentration von 20 % nicht der Fall, so dass eine Mizellbildung ausgeschlossen werden kann. Dies stimmt mit der in der Literatur angegebenen kritischen Mizellbildungskonzentration (CMC) überein (Maskarinec et al., 2002).

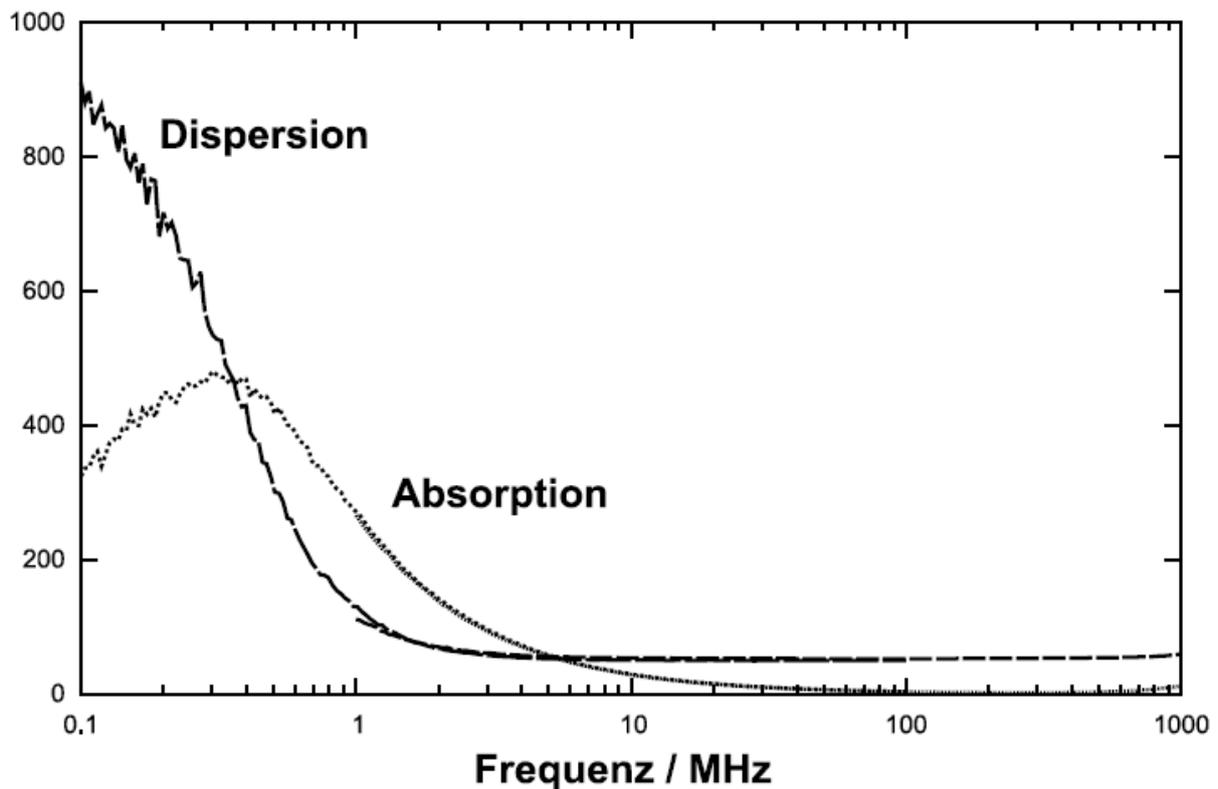


Abb. 35: PS-Spektrum einer SLN-Zubereitung mit 20 % Poloxamer[®] 188

3.7 Charakterisierung der Substanz-Träger Interaktion mittels der Elektronen-Spinresonanz-Spektroskopie

Die Elektronen-Spinresonanz-Spektroskopie (ESR) ermöglicht eine Aussage über die Beweglichkeit des spingelabelten Modellstoffs, die anhand der Rotationskorrelationszeit τ_R aus dem jeweiligen Drei-Linienspektrum ermittelt werden kann. Mit Hilfe von τ_R ist eine Aussage über die Viskosität der Umgebung der Sonde möglich. Anhand dieser Daten kann der Modellstoff lokalisiert und der Träger charakterisiert werden. Die Aussagekraft der ESR

über Arzneistoff-Träger Interaktionen wird von der Ähnlichkeit von Arznei- und Modellstoff bestimmt. Die Untersuchungen erfolgten mit der Cholestansonde (Abb. 36), die strukturell den GC ähnelt.

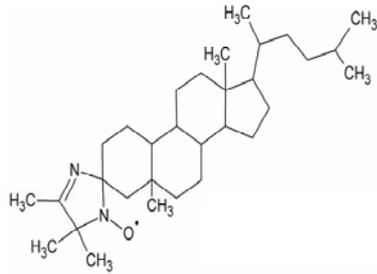


Abb. 36: Cholestansonde

Mit diesem Modellstoff wurden SLN, NLC und NE beladen und untersucht (Abb. 37).

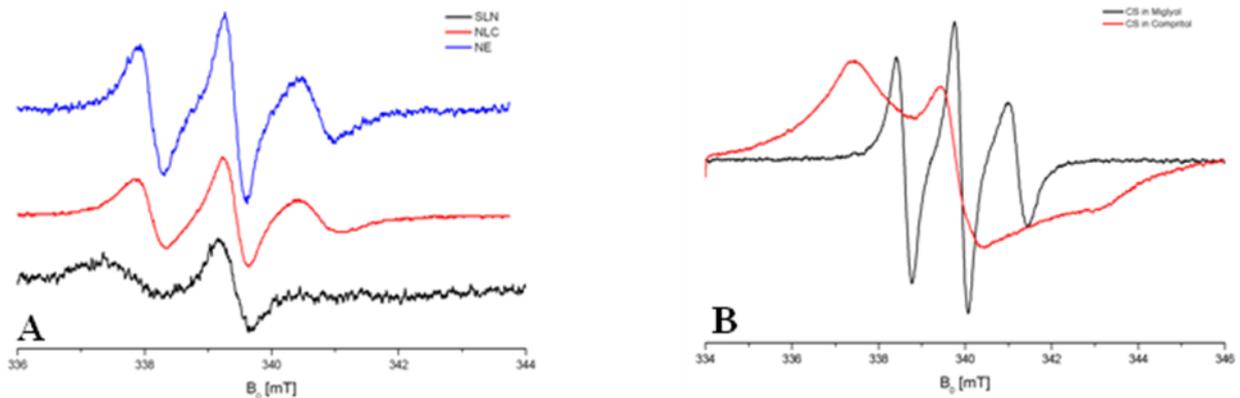


Abb. 37: ESR-Spektren mit Cholestansonde beladenen SLN, NLC und NE (A) und der Cholestansonde in reinem Miglyol[®] bzw. Compritol[®] (B)

Zum Vergleich wurde die Cholestansonde in den Komponenten der Trägersysteme, d.h. in reinem Compritol (festes Lipid) und Miglyol (flüssiges Lipid), gelöst und vermessen (Abb. 37 B). In einer 2,5 % Tensidlösung, wie sie zur Herstellung aller drei Trägersysteme verwendet wird, konnte die Cholestansonde nicht gelöst und daher nicht analysiert werden.

Aus Abb. 37 A kann entnommen werden, dass die Linienbreite für die NE am kleinsten ist und ein sauberes Drei-Linienspektrum vorliegt, das dem der in reinem Miglyol gelösten Sonde sehr ähnlich ist (Abb. 37). Die Ähnlichkeit spiegelt sich auch in den fast gleichen τ_R wieder (NE: $\tau_R = 3,12$ ns, in reinem Miglyol $\tau_R = 3,07$ ns). Daraus kann geschlossen werden, dass die Sonde komplett im Miglyol eingeschlossen ist. NLC zeigen ein etwas breiteres Spektrum,

was auf eine leichte Immobilisierung hindeutet. Der größte Teil der Cholestansonde liegt demnach im Miglyol gelöst vor, aber ein Teil ist an das feste Lipid assoziiert und führt zur Linienverbreiterung.

Zur Klärung, ob sich die Sonde bei diesen Zubereitungen in der äußeren Schale oder im Kern des Trägers aufhält, wurde das ESR-Signal durch Reduktion des Spinlabels mittels Ascorbinsäure gelöscht und eine Reduktionskinetik erstellt (Abb. 38).

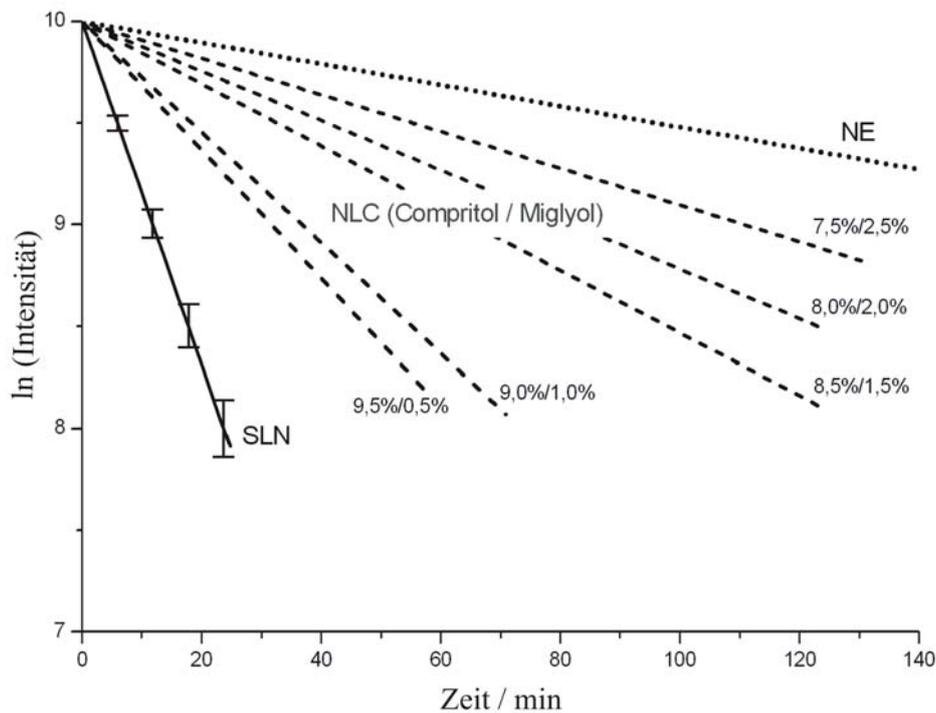


Abb. 38: Reduktionskinetik für SLN, NLC, NE: Das Spinlabel wurde durch Zugabe einer 2%igen Ascorbinsäurelösung reduziert

Das Signal der SLN konnte am schnellsten gelöscht werden, somit muss wenigstens das Radikal des Labels Kontakt mit der wässrigen Umgebung haben, während der Rest des Moleküls – gemäß den Ergebnissen der parallel durchgeführten Untersuchung mit der PS (Kapitel 3.6) – in der Tensidschicht bzw. an der Oberfläche der Lipidmatrix verankert ist. Die NE zeigte sich gegenüber dem Reduktionsmittel am stabilsten. Bei dieser Zubereitung ist die Reduktion von der Diffusion des Labels in oberflächennahe Bereiche abhängig. Bei NLC wurde eine Abhängigkeit der Reduktionsgeschwindigkeit vom Miglyolgehalt gefunden. Je mehr Miglyol enthalten ist, desto langsamer erfolgt die Signallöschung (Abb. 38).

Bei den SLN ist die Linienbreite am größten, auch das Drei-Linienspektrum ist nicht mehr deutlich zu erkennen (Abb. 37). Dies deutet auf eine Immobilisierung durch Assoziation an die feste Lipidmatrix hin. Der Verlauf ähnelt dem Spektrum in reinem Compritrol (Abb. 37 B).

Interessanterweise können die SLN in zwei Subkompartimente unterschieden werden. Es konnten zwei verschiedene τ_R gefunden werden: Für einen kleineren Anteil von 23,7 % eine τ_R von 4,85 ns und für einen größeren Anteil von 76,3 % eine τ_R von 52,8 ns. Diese Daten konnten anhand von Simulationen aus dem ESR-Spektrum der SLN-Zubereitung berechnet werden (Abb. 39).

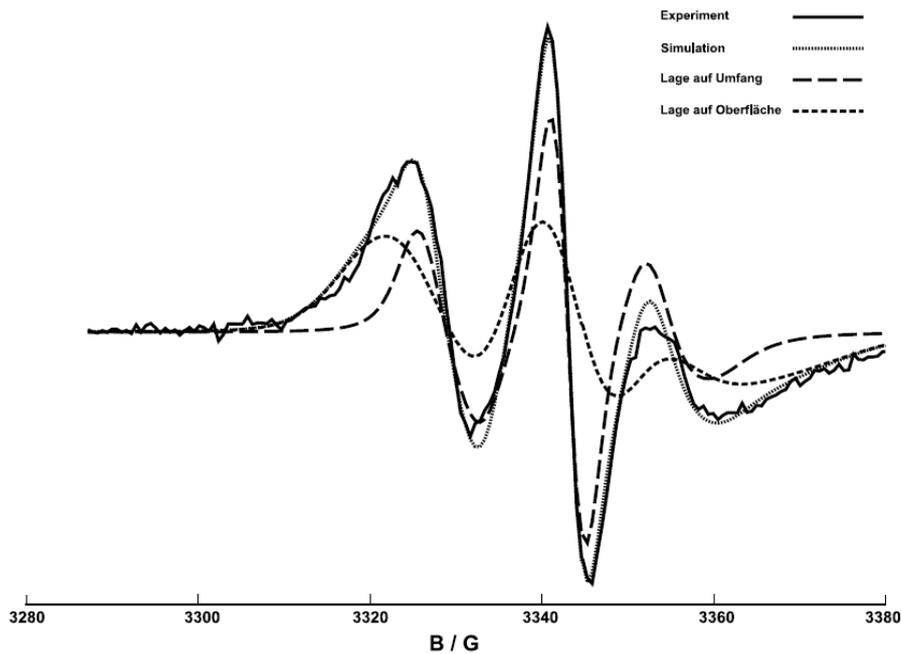


Abb. 39: ESR-Spektrum der SLN Zubereitung und den zugehörigen Simulationen

Aufgrund der Geometrie der SLN (siehe Kapitel 3.4), konnte dem kleineren Anteil der Spinsonde die Lage im Randbereich (Subkompartiment größerer Beweglichkeit, Abb. 40) und dem größeren Anteil die Lage auf der planen Oberfläche (Subkompartiment kleinerer Beweglichkeit, Abb. 40) zugeordnet werden.

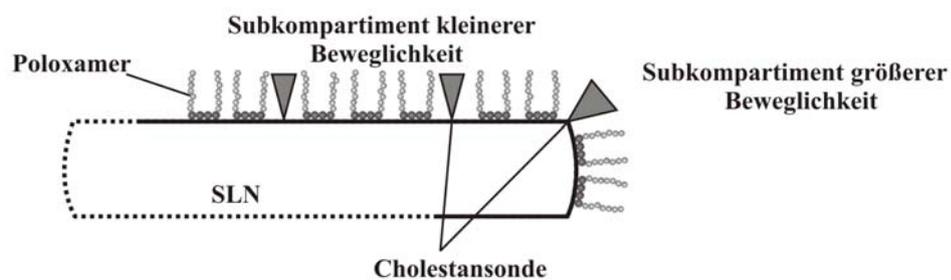


Abb. 40: Skizze eines SLN mit den beiden Subkompartimenten

Die gleichen Untersuchungen sollten auch mit spingelabelten GC durchgeführt werden (siehe Kapitel 3.4). Dazu wurden mit spingelabeltem PD beladene SLN hergestellt und mit der ESR vermessen. Wie *Abb. 41 A* zeigt, wird das Signal des gelabelten Prednisolons durch ein gut aufgelöstes Signal überdeckt.

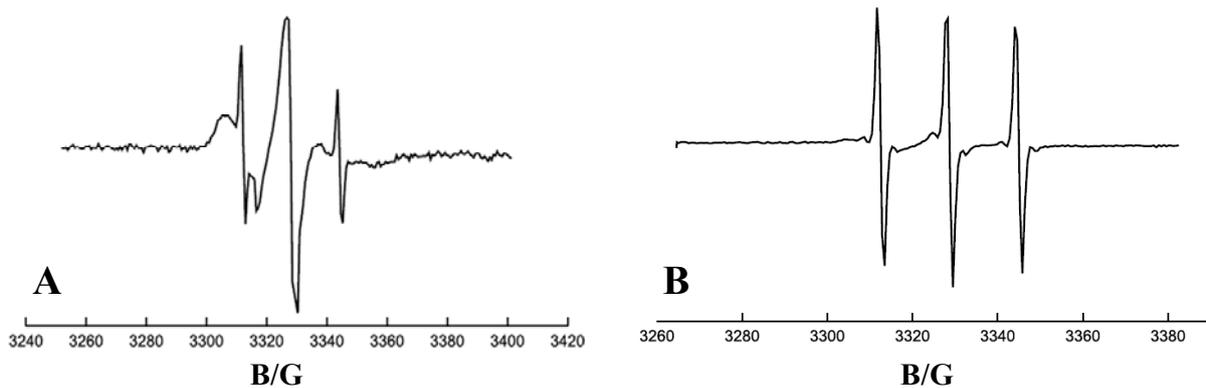


Abb. 41: A) ESR-Spektrum von spingelabeltem Prednisolon (SLN Zubereitung) und B) von 2,2,5,5-Tetramethyl-3-pyrrolin-1-oxyl-3-carbonsäure (SLN Zubereitung).

Die hohe Auflösung des Störsignals deutet auf eine hohe Beweglichkeit des Labels hin und sollte demnach durch gelöstes Spinlabel verursacht werden. Da aber spingelabeltes PD nicht wasserlöslich ist, muss das Störsignal durch das eingeführte, nicht oder nicht mehr an das PD gebundene Label hervorgerufen werden. *Abb. 41 B* zeigt ein Spektrum einer wässrigen Lösung des eingeführten Labels (2,2,5,5-Tetramethyl-3-pyrrolin-1-oxyl-3-carbonsäure). Anhand der Spektren aus *Abb. 41 A* und *Abb. 41 B* wurde versucht, eine Simulation durchzuführen, dies erwies sich jedoch als zu ungenau. Die Verunreinigung des spingelabeltem PD kann entweder bei der Synthese (siehe Kapitel 3.4) oder bei der Herstellung der SLN Zubereitung entstanden sein. Aufgrund der hohen Empfindlichkeit der ESR reichen geringste Mengen für ein Störsignal aus, insbesondere wenn es sich um eine wasserlösliche Verunreinigung handelt. Für die beiden anderen gelabelten GC wurde ebenfalls dieses Störsignal gefunden.

Diese Arbeiten wurden in einem auf dieser Dissertation aufbauenden Promotionsvorhaben aufgegriffen und zunächst PC gelabelt. Nun gelang die hinreichende Reinigung des Produktes, die wässrige Phase ist frei von Label und für die ESR geeignet.