

5. Zusammenfassung

5 Zusammenfassung

Trotz der kürzlichen Einführung von Tacrolimus und Pimecrolimus in die Therapie des atopischen Ekzems, stellen topisch applizierte Glucocorticoide (GC) aufgrund ihrer starken antiinflammatorischen Eigenschaften und der langen Therapieerfahrung nach wie vor Mittel der ersten Wahl dar. Die Atrophogenität schränkt den Einsatz dieser Arzneistoffe jedoch ein. Um eine Nutzen-Risiko-Relation zu erstellen, sollte ein breites Spektrum von GC getestet und die pharmakodynamischen Effekte mit Rezeptorbindungsdaten korreliert werden. Die Untersuchungen wurden mit der Bestimmung des Effekts der GC auf die Viabilität von primären Keratinozyten, primären Fibroblasten und der Zelllinie A549 begonnen. Keratinozyten und Fibroblasten dienten als Modell für die Untersuchung der Wirkung an der Haut, die Bronchialzellcarcinom-Zelllinie A549 fungierte als Modell für die Beschreibung der Effekte während der Asthmatherapie. Aufgrund fehlender, signifikanter Beeinflussung der Viabilität bei allen drei Zelltypen für therapeutisch relevante Konzentrationen konnte anhand dieser Daten keine Einteilung der GC vorgenommen werden. Mit Hilfe des sensitiveren Proliferationsassays konnten dagegen für alle drei Zelltypen IC_{50} -Werte ermittelt werden. Hierbei war insbesondere der antiproliferative Effekt auf Fibroblasten von Interesse, der näher untersucht wurde, da dieser als Parameter für das Atrophierisiko gilt.

Anfänglich wurde angenommen, dass die Atrophie durch Induktion der Apoptose durch GC vermittelt wird, doch wirkten GC in therapeutisch relevanten Konzentrationen nicht apoptotisch. Im Gegenteil, GC schützten Fibroblasten sogar vor der durch TNF α /Act induzierten Apoptose und erhöhten die Bildung von Sphingosin-1-Phosphat (S1P), das selbst antiapoptotisch wirkt. In der vorliegenden Arbeit wurde der dafür verantwortliche Signalweg identifiziert. GC vermitteln ihre zytoprotektive Wirkung über den S1P₃ Rezeptorsubtyp und die daran angeschlossene Signalkaskade, wie mit Hilfe von S1P₃ KO Fibroblasten gezeigt wurde. Darüber hinaus konnte auch für das S1P Analogon FTY720P eine antiapoptotische Wirkung nachgewiesen werden, die ebenfalls über den S1P₃ Rezeptor vermittelt wird. Dagegen konnte das nicht phosphorylierte Prodrug FTY720 in Fibroblasten, trotz Expression der für die Phosphorylierung verantwortlichen SPHK 2, nicht oder in nicht ausreichender Menge in die aktive Form umgewandelt werden. Wurde die SPHK 2 gehemmt, stieg sogar die Apoptoserate. Dies könnte auf einem Gleichgewicht zwischen phosphorylierter und nicht phosphorylierter Form beruhen, das durch Hemmung der SPHK 2 zugunsten der nicht phosphorylierten Form verschoben wird.

Zur Erstellung der Nutzen-Risiko-Relation wurden die im Proliferationsassay gewonnenen IC_{50} -Werte auf die entsprechenden Rezeptorbindungskonstanten bezogen, jedoch wurde für keinen Zelltyp eine Korrelation gefunden. Dieser Befund entspricht nicht den klinisch relevanten Unterschieden. Daher ist anzunehmen, dass sich die topischen GC bezüglich der Nutzen-Risiko-Relation (Klasse-I Substanzen mit ausgewogener, Klasse-II Substanzen mit verbesserter Nutzen-Risiko-Relation, AWMF-Leitlinie) nicht durch die Beeinflussung von Viabilität und Proliferation, sondern vielmehr durch ihre Kinetik unterscheiden. Aus diesem Grund könnten nanopartikuläre Trägersysteme, konkret Solid Lipid Nanoparticles (SLN), Nanostructured Lipid Carriers (NLC) und Nanoemulsion (NE), die Nutzen-Risiko-Relation weiter verbessern, sofern ein epidermales Targeting erreicht wird. Dazu bedarf es offenbar der Assoziation des Arzneistoffs an die Partikeloberfläche. Dieses war mit SLN bei einzelnen Substanzen, nicht aber mit NLC oder NE möglich. Im Rahmen des Promotionsvorhabens sollte die Struktur der drei Trägersysteme aufgeklärt werden, da vermutet wurde, dass Targeting und Penetrationsverhalten entscheidend von der Wirkstoff-Träger Interaktion beeinflusst werden.

Die Charakterisierung der nanopartikulären Träger erfolgte mit Hilfe der Polarisierten Lichtstreuung (PLS), der Elektronen-Spin-Resonanz (ESR) und der Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) unter Verwendung einer gelabelten Cholestan-3 β -ol-2-one-Sonde, die kommerziell erhältlich ist und entscheidende Strukturähnlichkeit zu den GC aufweist. Die PLS ermöglicht die Lokalisierung des Arzneistoffs im Trägersystem, d.h. ob der Arzneistoff auf die Matrix des Trägers aufgelagert oder in die Matrix eingelagert ist. Bei SLN und NLC ist die Cholestan-3 β -ol-2-one-Sonde mit der Oberfläche der Partikel assoziiert, dagegen liegt bei der NE eine vollständige Inkorporation in die Matrix vor. Diese Ergebnisse wurden durch Untersuchungen mit der ESR verifiziert und die Modellvorstellung der nanopartikulären Träger wesentlich erweitert. Speziell für die Untersuchungen mit der ESR sollten sodann spingelabelte GC hergestellt werden, um die Aussagekraft der Ergebnisse durch die größtmögliche Ähnlichkeit der spingelabelten Arzneistoffe mit genuinen GC zu erhöhen. Ein Syntheseweg für Betamethason-17-valerat (BMV), Prednicarbat (PC) und Prednisolon (PD) wurde etabliert, die gelabelten Produkte waren jedoch sehr hydrolyseempfindlich, so dass sich deren Reinigung als unerwartet schwierig erwies. Der für die hochsensitive ESR erforderliche Reinheitsgrad wurde nicht erreicht, so dass die Untersuchungen weiterhin mit der bewährten Cholestan-3 β -ol-2-one-Sonde durchgeführt wurden.

Die ESR erweitert die Aussagen der PS, da mit ihrer Hilfe die unmittelbare Umgebung des Spinlabels beschrieben und der Modellstoff sehr genau im Trägersystem lokalisiert werden kann. Dadurch wird die Modellvorstellung der Träger detaillierter.

Bei SLN befindet sich die Spinsonde auf der Oberfläche des festen Lipids. Erstmals wurden mit Hilfe der ESR bei SLN zwei Subkompartimente identifiziert, die sich in ihren Korrelationszeiten unterscheiden. Ein Teil der Sonde befindet sich auf der planen Oberfläche, der andere Teil im Randbereich der SLN. Bei der NE ist die Sonde vollständig, bei NLC zum größten Teil in das flüssige Lipid (Miglyol) eingeschlossen. Bei NLC war von Interesse, ob das flüssige Lipid in die feste Partikelmatrix inkorporiert oder an der Oberfläche assoziiert ist. Die Reduktionskinetik einer wässrigen Ascorbinsäurelösung belegte die Auflagerung des Miglyols an die feste Lipidmatrix. Nur dann kann die Cholestansonde von der im wässrigen Milieu gelösten Ascorbinsäure reduziert und das ESR-Signal gelöscht werden. Dies ist bei einem Einschluss des Miglyols in die Matrix nicht möglich. Die Auflagerung des Miglyols an die Partikeloberfläche erklärt die mittels der PS gefunden Assoziation des Labels an die Oberfläche der Partikel.

Mit Hilfe der TEM wurde die Partikelform von SLN, NLC und NE aufgeklärt. SLN und NLC waren von plättchenförmiger Struktur, das flüssige Lipid ist bei den NLC an die Oberfläche der Plättchen aufgelagert und bildet die sogenannten „Nanospoons“. Bei der NE handelt es sich um kugelförmige Lipidtröpfchen.

Die Ergebnisse zeigen die Bedeutung der Pharmakokinetik für die Beeinflussung und Verbesserung der Nutzen-Risiko-Relation, SLN erscheinen wegen des epidermalen Targeting-Effekts besonders interessant. Die Charakterisierung dieser Trägersysteme, insbesondere der SLN, gibt neue Einblicke in die Modellstoff-Träger Interaktion. Unterschiedliche Verteilungen eines Arzneistoffs in den bei den SLN gefundenen Subkompartimenten könnten für den Targetingeffekt und das Penetrationsverhalten von entscheidender Bedeutung sein.

Summary

In spite of the recent introduction of tacrolimus and pimecrolimus into the therapy of atopic dermatitis, topical applied glucocorticoids (GC) are still first line treatment because of their strong anti-inflammatory properties and the long term experience in therapy with these substances. However, skin atrophy caused by GC restricts their applicability. To establish a benefit/risk ratio, a broad spectrum of GC was evaluated and pharmacodynamic effects should be correlated with receptor binding data. In the beginning of the investigations, the effects of GC on viability in primary keratinocytes, primary fibroblasts and the cell line A549 were tested.

Keratinocytes and fibroblasts served as skin model, the bronchial carcinoma cell line A549 acted as model to describe the effects during asthma therapy. Based on these data it was not possible to categorize GC in therapeutically relevant concentrations because of a lack of significant influence on the viability of all three cell types. However, with the more sensitive proliferation assay it was possible to determine IC_{50} values for all three cell types. Especially the antiproliferative effect on fibroblasts was of interest, and was investigated in more detail as it is considered to be linked to skin atrophy.

Initially we tested the hypothesis that this effect was mediated by induction of apoptosis by GC yet in therapeutically relevant concentrations GC failed to induce apoptosis. In contrast, GC even protect fibroblasts from apoptosis induced by $TNF\alpha/Act$ and augment the synthesis of sphingosine-1-phosphate (S1P), which itself acts anti-apoptotic. In the course of this work the relevant signaling pathway was identified. GC mediate their cytoprotective effect via the $S1P_3$ receptor subtype and the associated signaling cascade as could be demonstrated with $S1P_3$ KO fibroblasts. Moreover, also for the S1P analogue FTY720P an anti-apoptotic effect could be demonstrated, which was also mediated via the $S1P_3$ receptor while this was not true with the non-phosphorylated Prodrug FTY720 in spite of expression of the relevant phosphorylating enzyme SPHK2 in primary fibroblasts. SPHK2 inhibition even increased the apoptotic rate, possibly due to an equilibrium shift between the phosphorylated and the non-phosphorylated derivative.

A benefit/risk ratio by relating the data obtained in the proliferation assay to the according receptor binding data was not obtainable for any cell type. This result is not in concordance with clinically relevant differences between GC. Therefore we conclude that for differences in benefit/risk ratio of topically applied GC (class I – substances with balanced, class II – substances with enhanced risk-benefit-relation, AWMF guidelines) the influences on viability

and proliferation are less relevant as compared to differences in their kinetics. For this reason nanoparticulate carrier systems, like Solid Lipid Nanoparticles (SLN), Nanostructured Lipid Carriers (NLC) and Nanoemulsion (NE) may allow for further improvement.

In former studies it was possible to achieve an epidermal targeting with SLN, but not with NE or NLC. With SLN the targeting was depending on the substances. For this reason the structure of the three carrier systems should be elucidated, as it was assumed, that targeting and penetration characteristics are essentially influenced by drug substance-carrier interactions.

The characterization of the nanoparticulate carriers was achieved by means of Paraelectric Spectroscopy (PS), Electron-Spin-Resonance (ESR) and Transmission Electron Microscopy (TEM) by using a labeled cholestane probe, which was commercially available and showed the essential structural similarity to GC. PS allows the localization of the drug substance within the carrier, i.e. if the drug substance is either associated onto the matrix of the carrier or if it is incorporated into the matrix. The nature of association is most important as only for substances which were associated an epidermal targeting was demonstrated. With SLN and NLC the cholestane probe is associated to the surface of the particle, whereas with NE we found a total incorporation into the matrix.

These results were verified by ESR studies and the model of the nanoparticulate carrier could be essentially extended. For ESR studies spinlabelled GC should enhance the expressiveness of the results by very close similarity to genuine GC. While a synthesis strategy for betamethasone-17-valerate (BMV), prednicarbate (PC) and prednisolone (PD) was successfully established, the labeled products were very sensitive to hydrolysis so that the purification proved much more difficult than expected. It was not possible to achieve the purification grade necessary for the highly sensitive ESR measurements so that we continued studying the approved cholestane probe.

ESR extends the results of PS, as with its means the proximate environment of the spin label and the nature of association can be described more accurately. By this means the model of the carrier becomes more detailed. With SLN the spin probe is located on the surface of the solid lipid. For the first time two sub-compartments were detected. One part of the probe is located on the planar surface whereas the other part is located in the rim area of SLN. With NE, the probe is completely and, with NLC still to a great extent, embedded in the liquid lipid (Miglyol). With NLC it was of interest if the liquid lipid is incorporated into the solid particle matrix or if it is associated to the surface. Studies of the reduction kinetics by means

of an aqueous ascorbic acid solution revealed the association of Miglyol to the solid matrix. Only when the labeled cholestane probe is associated it makes contact to the aqueous ascorbic acid solution, which then deletes the ESR signal. This would not be possible if the probe was completely incorporated into the matrix.

By means of TEM the shape of the particles of SLN, NLC and NE could be elucidated. For the lipids used in this work disc-like structures were found for SLN as well as for NLC. With NLC the liquid lipid is associated onto the surface of the disc-shaped structure and forms so-called Nanospoons. For NE spherical lipid structures were found.

The results of this work clearly demonstrate the importance of pharmacokinetics for the enhancement of the benefit/risk ratio of GC. In this context SLN achieved particular importance because of their epidermal targeting effects. Distinctive distribution of a drug substance in the two subcompartments found for SLN could be of particular importance for targeting effects and penetration characteristics.